

重组人血管内皮抑素对肿瘤血管正常化时间窗的研究

郝美丽¹, 陈士花², 谭叶¹, 丁晓¹, 孙立¹, 陆海军¹
(1. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003; 2. 黄岛区中心医院, 山东 青岛 266555)

摘要: [目的] 探讨重组人血管内皮抑素对小鼠胃癌移植瘤的血管正常化时间窗及其可能机制。[方法] 建立 50 只 MFC 小鼠胃癌移植瘤模型, 随机分成对照组与恩度(rh-ES)组: 对照组小鼠尾静脉注射生理盐水(0.2ml/d); 恩度组小鼠尾静脉注射 rh-ES[20mg/(kg·d)], 分别于治疗后 d1、d3、d5、d7、d9 各处死 5 只小鼠。取出肿瘤, 观察并测量各组肿瘤体积变化, 绘制肿瘤生长曲线, 采用免疫组化方法检测各组肿瘤组织中 MVD、Collagen-IV、RGS5 和 HIF-1 α 表达情况。[结果] rh-ES 组较对照组肿瘤生长慢。rh-ES 组在 d5~9, CD34、RGS5、HIF-1 α 表达降低, Collagen-IV 表达升高, 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。[结论] 恩度作用于胃癌小鼠, 在第 5~9d 肿瘤微血管产生一个短暂趋于正常化时间窗, 该时间窗内肿瘤细胞乏氧改善, 可能与 MVD、Collagen-IV、RGS5、HIF-1 α 有关。
关键词: 重组人血管内皮抑素; 血管正常化; G 蛋白调节信号 5; 微血管密度
中图分类号: R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)11-0962-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.11.B007

Time Window of Tumor Vascular Normalization by rh-Endostatin

HAO Mei-li¹, CHEN Shi-hua², TAN Ye¹, DING Xiao¹, SUN Li¹, LU Hai-jun¹

(1. Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 2. Huangdao District Central Hospital, Qingdao, Qingdao 266555, China)

Abstract: [Objective] To investigate the normalization time window of recombinant human endostatin (rh-endostatin) in mouse gastric cancer xenografts and its possible mechanism. [Methods] Fifty MFC mice bearing gastric cancer xenograft were randomly divided into control (NS) group and Endo(rh-ES) group ($n=25$ in each group). Mice in NS group were injected with normal saline (0.2ml/d) via the tail vein, while mice in rh-ES group were intravenously administered with 20 mg/(kg·d) rh-endostatin; batches of 5 mice in each group were sacrificed at d1, d3, d5, d7, and d9 after treatment. Tumors were harvested, and the tumor volume changes of each group were observed and measured. The tumor growth curve was drawn and the tumor inhibition rate was calculated. The microvessel density (MVD), the expression of collagen-IV, RGS5 and HIF-1 α in each group were detected by immunohistochemistry. [Results] Compared with the NS group, the rh-ES group had slower tumor growth and higher tumor inhibition rate. In the rh-ES group at d5~9, the MVD (CD34 expression) and RGS5 expression were decreased, the expression of collagen-IV increased and HIF-1 α decreased significantly compared with NS group (all $P<0.05$). [Conclusion] When endostatin acts on gastric cancer mice, a transient normalization time window of tumor microvessels was produced at the 5th to 9th day. During this time window, the hypoxia of tumor cells is improved, in which the MVD, collagen-IV, RGS5 and HIF-1 α may be involved.

Subject words: endostar; vascular normalization; RGS5; microvessel density

肿瘤内血管趋于正常化的这一时间段即为血管正常化时间窗, 在该时间窗内, 肿瘤紊乱血管得到纠正、血管基底膜增厚、血管周细胞覆盖率增加、乏氧

细胞比例降低, 肿瘤对放化疗的敏感性提高^[1]。抗血管生成并不是直接杀灭癌细胞, 而是通过该治疗方案改善肿瘤异常血管和肿瘤微环境, 提高肿瘤对化疗敏感性。重组人血管内皮抑素(恩度)是我国自主研发的一种广谱抗血管生成药物。本文研究恩度对胃癌移植瘤的血管正常化时间窗及其可能机制。

通信作者: 陆海军, 主任医师, 博士; 青岛大学附属医院市南院区肿瘤放疗科, 山东省青岛市市南区江苏路 16 号(266003); E-mail: lhj82920608@163.com

收稿日期: 2019-07-18; 修回日期: 2019-08-31

1 材料与方 法

1.1 材 料

细胞及动物:MFC 小鼠胃癌细胞购自青岛大学 中心实验室;6~8 周龄雄性昆明小鼠,体重 18~25g, 购自即墨医学动物实验中心。在青岛大学动物实验 中心饲养,SPF 级饲养。

材 料:细胞培养基 DMEM 高糖培养基、澳洲 源胎牛血清、青霉素/链霉素双抗、胰酶(Hyclone 公 司);二甲亚砜(美国 Sigma 公司);恩度(中国山东先 声麦得津生物制药有限公司);RGS5 兔抗小鼠多 抗、HIF-1 α 兔抗小鼠多抗、CD34 兔抗小鼠多抗、IV 型 胶原兔抗小鼠多抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 MFC 小鼠胃癌细胞培养

将 MFC 悬浮细胞置于 CO₂ 恒温培养箱中培养, 采用贴壁细胞培养法培养,细胞覆盖培养瓶 80%~ 90%时进行细胞传代,2~3d 传代 1 次。当细胞呈指 数分裂时,用胰酶消化,PBS 洗 2 次,制成细胞密度 为 1 $\times$ 10⁷ 个/ml 的单细胞悬液。

1.2.2 小鼠皮下成瘤

用 1ml 注射器于小鼠右腋下皮肤进针约 5mm 后推入细胞悬液 0.2ml,约 7d 左右,小鼠右腋皮下出 现米粒样小结节,质韧。用游标卡尺测量肿瘤长短 径,约 2 周左右,肿瘤体积生长为大约 200~300mm³, 质硬。

1.2.3 实验分组及处理

移植瘤面积约为 200~300mm³ 时,将 50 只小鼠 随机分成对照组和恩度组:对照组小鼠尾静脉注射 生理盐水(0.2ml/d);恩度组小鼠尾静脉注射重组人 血管内皮抑素 [20mg/(kg·d)],分别于治疗后 d1、 d3、d5、d7、d9 各处死 5 只小鼠。分别于治疗后 d1、 d3、d5、d7、d9 各处死小鼠一组。对 50 只小鼠完整剥 离肿瘤并称取瘤重,将肿瘤标本立即放入 4%甲醛 溶液中固定。

1.3 研究指标

肿瘤生长情况:每 2 日用游标卡尺测量小鼠皮 下移植瘤的最长径(a)及最短径(b),按照公式:肿瘤 体积 V=0.523ab²,计算小鼠皮下移植瘤的体积,取其 平均值,绘制肿瘤生长曲线。

微血管密度、HIF-1 α 和 RGS5 蛋白测定:肿瘤

标本用 4%甲醛溶液中固定后,进行脱水、透明、浸 蜡、包埋及切片。用免疫组织化学 SABC 法检测小鼠 肿瘤组织中 CD34、RGS5、HIF-1 α 、IV 型胶原表达情 况。通过 CD34 表达计数微血管密度(microvessel density,MVD),CD34 主要在血管内皮细胞的胞浆和 细胞膜上表达,阳性表达呈棕黄色或褐色;IV 型胶原 主要表达于血管外周,阳性表达也呈棕黄色。HIF- 1 α 主要在细胞浆表达,少部分表达于细胞核,阳性 表达为棕黄色至棕褐色的颗粒;RGS5 蛋白表达阳 性者为细胞浆有棕黄色颗粒。根据染色强度及染色 范围进行综合评分。染色强度分为 0~3 级,0 阴性; 1 弱阳性;2 阳性;3 强阳性。染色范围(阳性细胞比 例)分为 0~4 级,0:阴性;1:阳性细胞比例 1%~25%; 2:阳性细胞比例 26%~50%;3:阳性细胞比例 51%~ 75%;4:阳性细胞比例 76%~100%,最后采用综合积 分法,根据染色范围和染色强度进行评分, $\geq$ 3 分即 为阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。两组间正 态分布计数资料比较采用 t 检验,多组间比较采用 单因素方差分析,非符合正态分布及方差齐性的资 料采用秩和检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠皮下移植瘤生长情况

小鼠成瘤率 100%。约 7 天左右,小鼠右腋皮下 出现米粒样小结节,质韧。约 2 周左右肿瘤体积生长 为大约 200~300mm³,肿瘤生长曲线见 Figure 1。

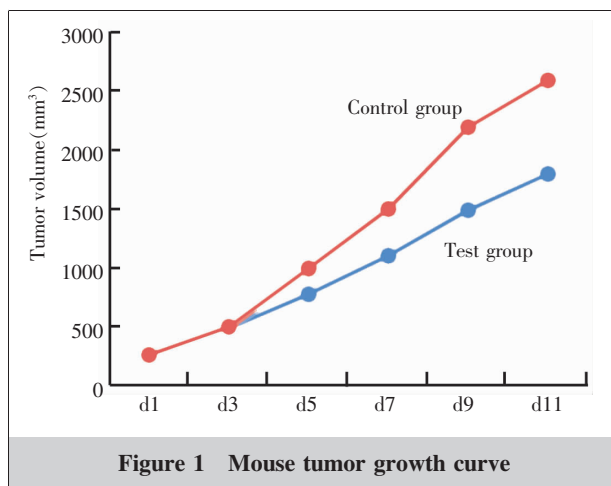


Figure 1 Mouse tumor growth curve

2.2 MVD 表达比较

恩度用药 5d 后棕黄色区减少,不连续,MVD 表达较对照组明显降低,在恩度治疗后第 7d 达到最低,与对照组比较有统计学差异($P<0.001$),在实验第 9d 棕黄色区有增多趋势,MVD 表达较前增加($P<0.001$)(Table 1)。

Table 1 The expression of MVD in two groups

Time	MVD		P
	Test group	Control group	
d3	15.2±2.1	14.6±3.2	0.38
d5	11.6±2.9	16.4±2.3	0.02
d7	8.4±1.8	20.2±3.8	<0.01
d9	10.6±2.9	25.0±4.0	<0.01
d11	14.2±2.7	25.0±3.6	<0.01

2.3 Collage-IV 表达比较

在恩度用药第 5~9d,微血管棕黄色区厚度增加,中断减少,Collage-IV 呈高表达,与相应对照组比较有统计学差异($P<0.05$)。在恩度用药第 11d Collage-IV 表达降低,与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)(Table 2)。

Table 2 Distribution of collage-IV in two groups

Time	Collage-IV		P
	Test group	Control group	
d3	5.8±1.4	4.4±1.1	0.13
d5	14.0±1.8	6.6±1.8	<0.01
d7	20.6±4.9	8.0±2.9	<0.01
d9	15.0±2.2	8.8±3.4	<0.01
d11	11.2±1.6	9.0±2.7	0.16

2.4 HIF-1 α 表达比较

在恩度用药第 5~9d 肿瘤乏氧区明显减小,其中,恩度用药的第 7d 乏氧改善最明显,HIF-1 α 表达减少,与对照组比较均有统计学意义($P<0.05$)。在恩度用药第 11d,HIF-1 α 表达增加,呈中等强度表达,与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)(Table 3)。

Table 3 Expression of HIF-1 α in two groups

Time	HIF-1 α		P
	Test group	Control group	
d3	3.6±0.5	3.8±0.8	0.67
d5	2.4±1.1	4.6±1.1	0.02
d7	1.8±0.8	5.2±1.3	<0.01
d9	3.4±0.5	5.8±0.8	<0.01
d11	5.4±0.5	6.2±0.8	0.11

2.5 肿瘤组织中 RGS5 表达比较

在恩度用药第 5~9d,微血管的棕黄色区厚度增加,中断减少,RGS5 呈低表达,与对照组相比有统计

学差异($P<0.05$)。在恩度用药第 11d RGS5 表达增加,与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)(Table 4)。

Table 4 Expression of RGS5 in two groups

Time	RGS5		P
	Test group	Control group	
d3	3.4±1.1	3.6±1.1	0.78
d5	2.2±0.8	4.6±1.5	0.02
d7	1.8±1.3	5.2±1.3	<0.01
d9	3.2±0.8	5.6±1.3	<0.01
d11	5.4±1.1	6.0±1.2	0.45

3 讨论

肿瘤血管生成是由促血管生成因子及血管生成抑制因子等共同调节的复杂过程^[2-3]。新形成的肿瘤血管形态结构紊乱、微血管密度大、无完整周细胞覆盖、基底膜不完整,导致血流紊乱、氧及营养物质输送不足,影响放化疗的疗效。血管生成抑制剂可以使肿瘤血管出现短暂的正常化现象,血管结构变得规则、基底膜完整,增加肿瘤的氧供,改善乏氧,增加放化疗的敏感性,从而提高疗效^[4-5]。本研究通过免疫组化检测肿瘤微血管密度、周细胞及基底膜的变化以及肿瘤乏氧的改变,探讨恩度存在血管正常化现象。

在肿瘤新生血管中,可通过肿瘤组织 MVD 代表肿瘤新生血管的数量,而 CD34 变化可计数 MVD,目前 CD34 作为公认的标记血管内皮细胞的标志物被广泛使用^[6]。Collagen-IV 是细胞基底膜的重要组成部分,存在于所有细胞的基底膜中,在血管生成时合成并储存在内皮细胞和周细胞中。周细胞是主要的内皮支持细胞,在肿瘤血管中广泛存在,周细胞覆盖率反映血管的成熟程度。RGS5 是血管周细胞发生、发展中的重要调节蛋白,与新生血管负相关^[7]。研究显示恩度可使周细胞表型正常,周细胞与内皮细胞紧密连接,RGS5 表达降低,新生血管减少,血管出现正常化现象^[8]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚单位组成的异二聚体。HIF-1 β 并不随组织氧分压的改变而变化。HIF-1 α 在不同的氧分压下稳定性差异较大^[9]。在常氧状态下,HIF-1 α 多泛素化,并被泛素连接酶降解,从而抑制 HIF-1 功能。研究表明,HIF-1 α 过表达可提高 HGF mRNA 的稳定性,HIF-1 α 持续表达可以抑制细胞增生,促进细胞凋亡,保护内皮细胞。在低氧状态下,HIF-1 α 表达水平增高,

并与 HIF-1 β 形成二聚体,活化 HIF-1。HIF-1 启动一系列缺氧应答基因,应对缺氧状态,同时活化包括 VEGF 在内的血管生长因子转录基因,诱导新生血管生成^[9]。目前 HIF-1 α 是反映肿瘤乏氧情况的重要指标。

本文实验组 MVD、RGS5、HIF-1 α 较对照组明显降低,在恩度治疗后第 5~9d 降低,第 7d 最低,与对照组相比差异有统计学意义。Collagen-IV 在恩度用药后第 3d 开始增高,第 7d 达到高峰,第 9d 开始下降,与对照组相比有统计学意义,说明在恩度用药后第 5~9d 肿瘤微血管密度减少,基底膜完整,周细胞覆盖率增加,血管出现短暂的正常化。

综上所述,经恩度治疗后肿瘤血管正常化时间窗为第 5~9d,以第 7d 最为明显,该时间窗内肿瘤细胞乏氧改善,可能与 MVD、Collagen-IV、RGS5 和 HIF-1 α 等表达有关。本实验通过探讨恩度治疗后肿瘤微血管正常化时间窗,对进一步完善肿瘤的治疗决策提供一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Ji HN,Xin Y,Xiao YP. Progress in angiogenesis mimicry [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2011,18(21):1736-1740.[姬海宁,辛彦,肖玉平. 血管生成拟态研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(21):1736-1740.]
- [2] Ferrara N,Kerb R. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature (London),2005,438(7070):967-974.
- [3] Kitadai Y. Cancer-stromal cell interaction and tumor angiogenesis in gastric cancer[J]. Cancer Microenviron,2010,3(1):109-116.
- [4] Mcgee MC,Hamner JB,Williams RF,et al. Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2010,76(5):1537-1545.
- [5] Welén K,Jennbacken K,Tesan T,et al. Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis,2009,12(1):41-46.
- [6] Netto GC,Bleil CB,Hilbig A,et al. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF- β (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas[J]. Neuropathology,2010,28(1):17-23.
- [7] Ye Z,Wang YS,Cai Y,et al. Role and possible mechanism of regulators of G-protein signaling 5 in development of experimental choroidal neovascularization[J]. Chinese Journal of Ophthalmology,2010,46(8):731.
- [8] Huang G,Chen L. Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2010,136(8):1201-1211.
- [9] Greer SN,Metcalf JL,Wang Y,et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor[J]. EMBO J,2012,31(11):2448-2460.