

内皮抑素对卵黄囊瘤裸鼠模型血管生长的影响

陈聪德 吴碎春 王 浩 陈肖鸣 张 华

摘 要 **目的** 通过动物实验验证血管生长在卵黄囊瘤裸鼠模型中的作用,以及内皮抑素对模型血管生长的影响。**方法** 建立卵黄囊瘤裸鼠模型,分别采用 $1.5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 及 $0.75\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 两个浓度重组人血管内皮抑制素局部注射干预,并皮下及瘤内注射生理盐水 $25\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 注射对照,共 14 天,每组 10 只。药物干预结束后,明胶-氧化铅悬浊液灌注法行肿瘤血管造影,观察肿瘤血管差异。免疫组化方法检测移植瘤 AFP、VEGF、CD34。**结果** (1) 小儿恶性畸胎瘤裸鼠模型复制成功,AFP 在移植瘤细胞胞质中有表达,肿瘤性质稳定。(2) 肿瘤体积自第 6 天测量治疗组肿瘤生长速度明显低于对照组 ($P < 0.05$);第 12 天测量结果提示高剂量组与低剂量组肿瘤体积出现显著差异 ($P < 0.01$)。(3) 免疫组化:VEGF 表达范围及强度,治疗组均小于对照组 ($P < 0.05$),高剂量组小于低剂量组 ($P < 0.05$),两对照组之间无明显差异 ($P > 0.05$);MVD:治疗组均小于对照组 ($P < 0.01$),高剂量组小于低剂量组 ($P < 0.01$),两对照组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。(4) 肿瘤血管造影:血管分布密度内皮抑素高剂量治疗组 $<$ 低剂量组 $<$ 实验对照组。**结论** 内皮抑制素通过抑制 VEGF 的作用,减少血管发生,从而对卵黄囊瘤裸鼠模型移植瘤的生长有抑制作用。

关键词 卵黄囊瘤 内皮抑素 移植瘤 明胶-氧化铅造影 VEGF

Effects of Endostatin Treatment on Yolk Sac Tumor Xenografts of Children in Nude Mice. Chen Congde, Wu Suichun, Wang Hao, et al. Department of Pediatric Surgery, Yuying Children Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective Based on the establishment of Yolk Sac tumor xenografts of children in nude mice, we study the effects and mechanism of endostatin (ES) on YST'S tumor xenografts of children. **Methods** Fourty nude mice were inoculated with tissue of YST'S xenograft and five males and five females for each group. In high-dose (HD) group, nude mice bearing cancer would be subcutaneously and intratumorally injected ES by $1.5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 14 days. In low-dose (LD) group, mice would be injected ES by $0.75\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 14 days. In experimental control group, mice be injected isotonic Nachloride by $25\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 14 days. And in blank control group, mice would not be injected. The volume of transplantation tumors was measured everyday. Tumor control rate and draw growth curve were detected. The differences of the tumor vessel between each group were observed. The expression of AFP and level of VEGF and MVD also be measured by immunohistochemistry. **Results** The duplication of malignant teratoma xenografts of children in nude mice was successful, and the quale of the transplantation tumors is steady. The speed of tumor growth of treatment groups was slower than control groups since the sixth day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Measurements on the 12th day shown that the contrast of gross tumor volume between HD group and LD group was significant ($P < 0.01$). There were no significant deviation between experimental control group and blank control group on any time point ($P > 0.05$). Treatment groups were lower than control groups in extent and magnitude of expression of VEGF ($P < 0.05$). And there was no significant deviation between experimental control group and blank control group ($P > 0.05$). For MVD, treatment groups were fewer than control groups ($P < 0.01$). HD group was fewer than LD group ($P < 0.01$), and there was no significant deviation between experimental control group and blank control group ($P > 0.05$). Angiography of tumor showed that vascular distribution density was HD group $<$ LD group $<$ experimental control. **Conclusion** Endostatin could hindrance the effect of VEGF, thus to control angiogenesis, which thereby effectively iahibit YST'S xenografts of children in nude mice.

Key words Yolk sac tumor; Endostatin (ES); Transplantation tumor; Lead oxide-gelatin; VEGF

自 20 世纪 70 年代 Folkman 提出血管生成抑制疗法以来,目前已发现了多种血管生长抑制因子,特别是近几年抗血管生成治疗发展迅速。血管内皮抑

素(endostatin, ES)是近年来发现的一种新的强效血管生成抑制因子,由于 ES 特异性地靶向作用于增生的内皮细胞,对转移性肿瘤和原发性肿瘤的种植瘤均有显著的抑制作用。但目前国内针对儿童生殖细胞肿瘤的抗血管治疗研究甚少,几乎未见报道。本实验采用国内首次建立的卵黄囊瘤移植瘤模型为实验对象,对内皮抑素的抗肿瘤作用进行深入研究^[1]。

基金项目:国家计生委科技司基金资助项目(2005C1-55)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院小儿外科

通讯作者:陈肖鸣,电子信箱:cxm@wzmc.net

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物及标本:裸鼠 BALB/C (nu/nu) 小鼠 40 只,雌雄各半,3~4 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限公司。饲养于温州医学院实验动物中心 SPF 级实验室。肿瘤标本来源于小儿卵黄囊瘤荷瘤鼠第 17 代模型。已对荷瘤鼠肿瘤鉴定,证实保留原肿瘤生物学特性^[1,2]。(2)主要试剂:重组人血管内皮抑制素注射液 15 毫克/(3 毫升·支),避光保存于 4℃ 冰箱,移液器量取,加入医用生理盐水,配制成溶液,浓度为 0.06mg/ml 及 0.03mg/ml,现配现用。

2. 方法:(1)动物模型建立:对荷瘤鼠第 17 代肿瘤生物学性质再次鉴定,证实具有良好的原肿瘤生物学特性。按照陈聪德等^[1,2]人移植瘤模型建立的方法,把第 17 代肿瘤移植在 40 只雄性裸鼠单侧腹股沟皮下区。(2)成瘤模型分组:裸鼠按照高剂量组 1.5mg/(kg·d)、低剂量组 0.75mg/(kg·d)、实验对照组、空白对照组分组后开始重组人血管内皮抑制素注射液药物干预,每日测量裸鼠重量并记录,依照测得体重数据,计算用药量。实验对照组注射医用生理盐水 25ml/(kg·d),空白对照组不予干预。于实验第 7 天开始干预,注射部位为肿瘤皮下及瘤内。每日定时注射药物,连续给药 14 天。(3)肿瘤生长测量:定期观察肿瘤生长情况,记录肿瘤生长的潜伏期和肿瘤生长速度,当肿瘤直径达 3mm 时,定人每隔 5 天用游标卡尺测量肿瘤的最大直径 a 及横径 b,按公式 $V = \pi/6 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积。取第 1、3、6、9、12、15 天肿瘤体积进行各组间点差异的比较。(4)免疫组化标记:雌性裸鼠各组 5 只,颈椎脱臼法处死,迅速剥离肿瘤,4℃ 生理盐水冲洗,观察肿瘤标本大体形态(表面及切面颜色、有无坏死灶),4% 多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋,连续切片。免疫细胞化学步骤参照 SP 试剂盒提供的说明书进行,AFP、CD34、VEGF 的一抗浓度均为 1:100。用 Image-pro plus 软件进行图像分析。随机选取 10 个高倍视野,计数免疫组化阳性细胞数及测定阳性细胞的光密度。将两项数据相乘即为所测样本的免疫组化染色的相对定量结果(expression value, OD)。用 CD34 来计算血管密度(microvessel density, MVD),对肿瘤的新生血管形成进行量化。(5)肿瘤血管造影:1)药物干预完成后,每组取雄性裸鼠各 5 只,4% 水合氯醛溶液 12ml/kg 腹腔注射麻醉,沿胸骨左缘打开胸腔,剪开心包膜,暴露心尖部,心尖部穿刺,明胶-氧化铅悬浊液 75ml/kg 灌注,至裸鼠鼻尖、趾缘、尾尖、虹膜及肿瘤表层血管变色产生橘红色斑片状,清洁裸鼠体表,4℃ 冷藏过夜以便明胶凝集。2)球管至台面的高度为 102cm,曝

光时间为 0.25s,电流为 100mA,电压为 45V,X 线拍片。3)拍片后以 Image-Pro Plus 图像分析软件计算肿瘤血管网平面面积,计算面积比率,面积比率=肿瘤血管网平面面积/肿瘤平面面积,对面积比率进行各组间比较。

3. 统计学方法:全部数据经 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素多重方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett'T3 检验,取 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有高度显著性。

结 果

1. 各组肿瘤生长状况:裸鼠移植肿瘤组织后 1 周,全部接种成功,瘤体开始生长(图 1)。给药第 1 天(即分组后)及第 3 天测量各组间肿瘤体积均无明显差异($F = 0.567, P > 0.05$),自第 6 天测量内皮抑素治疗组,肿瘤生长受到明显抑制,肿瘤生长速度明显低于对照组($F = 14.254, P < 0.01$);第 12 天测量结果提示高剂量组与低剂量组肿瘤体积出现显著差异($F = 12.989, P < 0.01$),实验对照组与空白对照组比较,各时间点肿瘤体积测量结果均无差异。至实验结束,内皮抑素高剂量治疗组,平均肿瘤抑制率随治疗时间的推移持续增长,最高抑瘤率为第 15 天测得 49%,明显高于低剂量治疗组及实验对照组;低剂量治疗组肿瘤抑制率曲线稍有波动,最高抑瘤率为第 15 天测得 31%;实验对照组肿瘤抑制率低,且呈下降趋势,与高剂量组及低剂量组差异明显($F = 15.147, P < 0.01$),不同剂量间肿瘤抑制率存在差异($F = 9.628, P < 0.05$)(表 1)。



图 1 第 18 代卵黄囊瘤移植瘤模型

表 1 各实验组肿瘤体积测量结果 (mm³)

实验时间(天)	高剂量组	低剂量组	实验对照组	空白对照组
1	284.5 ± 66.4	258.2 ± 111.9	244.9 ± 106.2	266.5 ± 89.1
3	400.1 ± 52.7	408.7 ± 101.7	411.9 ± 112.8	443.7 ± 72.5
6	535.4 ± 49.1 **▲	597.3 ± 105.0 *▲	657.7 ± 116.1	691.9 ± 77.2
9	626.2 ± 64.1 **▲▲	741.1 ± 112.0 *▲▲	892.5 ± 123.2	937.4 ± 79.5
12	678.2 ± 72.2 **▲▲*	861.1 ± 123.5 **▲▲	1133.4 ± 130.9	1190.6 ± 81.6
15	703.4 ± 79.0 **▲▲*	951.9 ± 119.6 **▲▲	1357.3 ± 112.4	1380.5 ± 86.8

与同一时空白对照组的数值相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与实验对照组的数值相比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与低剂量组的数值相比,* $P < 0.05$

2. 免疫组化结果:各实验组肿瘤切片中均可见不同程度的 AFP 表达(图 2), AFP 定位于胞质,染色阳性者呈黄棕色,细胞核及周围细胞间质无 AFP 表达处,苏木素染色呈蓝色。CD34 表达,从高剂量、低剂量、实验对照、空白对照的 OD 值为 7.24 ± 4.01 、 12.28 ± 5.59 、 22.32 ± 3.75 、 22.52 ± 3.06 ,高剂量组 MVD 值明显低于低剂量组($F = 18.852, P < 0.01$)及两对照组($F = 20.198, P < 0.01$),低剂量组 MVD 值低于两对照组($F = 11.323, P < 0.01$),两对照组之间无明显差别($F = 1.658, P > 0.05$)(图 3)。各实验组从高剂量、低剂量、实验对照、空白对照的 VEGF 的 OD 值为 12.40 ± 3.25 、 9.50 ± 3.12 、 7.08 ± 2.93 、 7.48 ± 2.39 ,表达强度上,两对照组均较强且之间无

明显差别($F = 1.459, P > 0.05$),低剂量组弱于实验对照组($F = 11.225, P < 0.05$),强于高剂量组($F = 15.978, P < 0.01$)(图 4)。

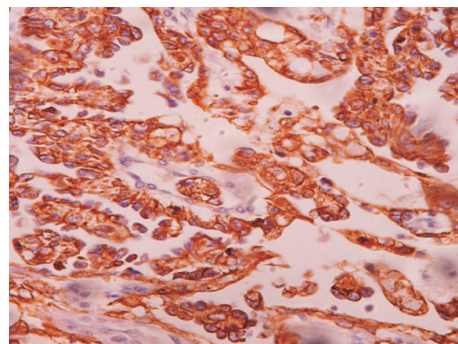


图 2 移植瘤组织 AFP 表达($\times 400$)

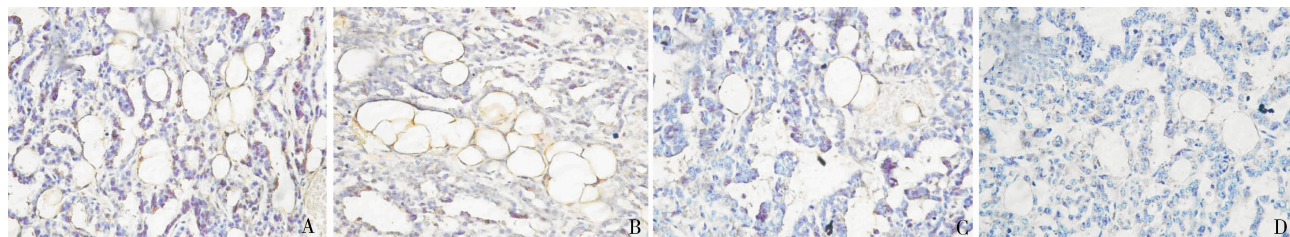


图 3 CD34 在各组移植瘤组织中的表达($\times 400$)

A. 空白对照组;B. 实验对照组;C. 低剂量组;D. 高剂量组

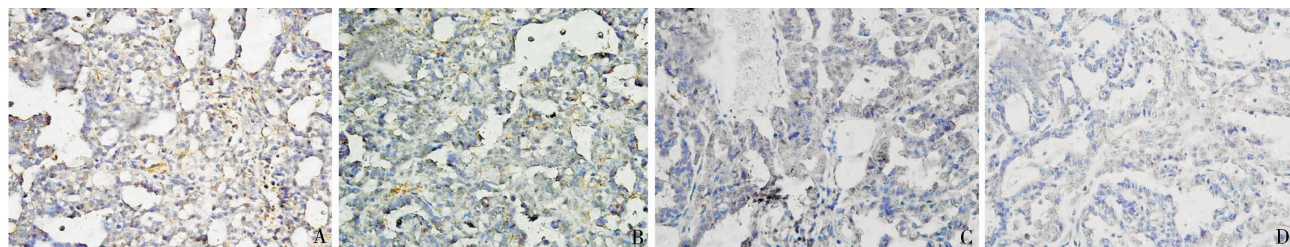


图 4 VEGF 在各组移植瘤组织中的表达($\times 400$)

A. 空白对照组;B. 实验对照组;C. 低剂量组;D. 高剂量组

3. 肿瘤血管明胶-氧化铅造影:荷瘤裸鼠血管灌注并拍片后,由 X 线片可以发现经药物干预的组别,肿瘤内部未见明显的坏死空腔,两个对照组个别肿瘤内部可以见到偏心性坏死空腔。肿瘤周边部位正常血管。各实验组肿瘤血管面积比率:高剂量组 0.36 ± 0.12 、低剂量组 0.49 ± 0.04 、实验对照组 0.69 ± 0.07 、空白对照组 0.65 ± 0.12 。治疗组与对照组之间存在显著差异($F = 12.989, P < 0.01$),两治疗组之间存在差异($F = 1.275, P < 0.05$)。

讨 论

睾丸生殖细胞肿瘤的发生率在过去的 40 年里增加了 2 倍,达 7.5/10 万人^[1]。而儿童生殖细胞肿瘤

占小儿睾丸肿瘤的 60% ~ 75%,其中以卵黄囊瘤最多。我们首次在国内建立了卵黄囊瘤裸小鼠移植瘤模型,并通过对其生物学特性的鉴定,已经成功应用于对卵黄囊瘤的抗肿瘤研究^[2]。本次研究选取卵黄囊瘤模型,为血管密度高、血运丰富的恶性实体瘤,而且血道转移较多,目前国内尚无针对该瘤血管治疗的相关报道。

自 20 世纪 70 年代 Folkman 提出血管生成抑制疗法以来,发现了很多具有血管抑制活性的药物,尤其是近几年抗血管生成治疗发展迅速^[3-5]。针对血管内皮细胞的抗血管生成疗法具有针对肿瘤细胞的化疗所不可比拟的优越性,肿瘤细胞具有基因突变

性,因而化疗容易产生耐药性且不良反应大,而肿瘤内的血管具有基因的相对稳定性,因而不易耐药,重复给药有效。而血管内皮抑素(endostatin, ES)是近年来发现的一种新的强效血管生成抑制因子,可通过抑制内皮细胞增生和迁移、拮抗肿瘤新生血管生成,阻断肿瘤血液供应,抑制肿瘤生长而使其进入“休眠状态”并导致凋亡^[6,7]。体内外实验表明,ES 显示出强大的特异性抑制血管内皮细胞增殖的作用,由于 ES 特异性地靶向作用于增生的内皮细胞,对转移性肿瘤和原发性肿瘤的种植瘤均有显著的抑制作用,一般不会诱发骨髓抑制和胃肠道反应等化疗药物常表现出的不良反应^[8-11]。

本实验结果提示,肿瘤组织中 VEGF 含量,高剂量组 < 低剂量组 < 实验对照组 $\approx$ 空白对照组。关于 ES 对 VEGF 的影响机制仍不十分清楚, Hohenester 等^[12]的研究认为内皮抑素可能是与 bFGF 和 VEGF 竞争细胞表面的硫酸肝素黏蛋白类,阻挡有丝分裂生长因子的信号传导,抑制内皮细胞增殖,并阻止内皮细胞移向 bFGF,从而抑制血管生成。目前较肯定的信号传导通路有:通过抑制 EGFR、Raf - Ras - MEK - MAPK、STAT3 和 PI₃K - AKT 等信号传导途径下调 VEGF^[13];通过 Thrombin 受体启动 PAR - 1 和 PAR - 2 通路,下调血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 和蛋白质表达,从而减少其产生;影响内皮细胞上一氧化氮合成酶的活性,减少 VEGF 诱导的一氧化氮的生成,从而抑制了 VEGF 介导的内皮细胞迁移和血管的形成。ES 可能通过上述或者尚未知的途径对肿瘤组织内的 VEGF 起作用,从而减少其在肿瘤组织中的含量,进而抑制新生卵黄囊瘤血管发生及进展,但具体机制仍需后续研究发现。

本实验首次选择明胶 - 氧化铅悬浊液作为造影剂应用于卵黄囊瘤裸鼠移植瘤模型。氧化铅是解剖标本血管灌注造影最常用的造影剂之一,管径 0.1 mm 的动脉也可以清晰显影,造影效果保留相对之间较长可以反复拍片观察,并且操作简便,价格低廉,适用肿瘤血管的观察。本实验结果非常直观地显示,经内皮抑素干预后,肿瘤体积明显小于未经干预者,肿瘤内血管管径较小,血管分布范围及密度低,面积比率高剂量组 < 低剂量组 < 实验对照组 $\approx$ 空白对

照组。也验证了内皮抑素抗血管生成治疗的靶点是新生的卵黄囊瘤血管的观点。

通过研究笔者发现,ES 抑制卵黄囊瘤 VEGF 的生成,减少其对血管内皮的作用,从而减少血管生成,从而抑制卵黄囊瘤裸鼠移植瘤的生长。为卵黄囊瘤的临床抗血管生成治疗提供有效的实验依据。

参考文献

- 1 陈聪德,陈肖鸣. 顺铂诱导体外培养儿童睾丸卵黄囊瘤细胞凋亡机制研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2009, 30(7): 423 - 426
- 2 陈聪德,陈肖鸣. 卵黄囊瘤裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 30(3): 176 - 179
- 3 Folkman J. Antiangiogenic gene therapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (16): 9064 - 9066
- 4 Kong HL, Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis[J]. Natl Cancer Inst, 1998, 90 (4): 273 - 286
- 5 Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors: angiostatin, endostatin, and other proteolytic fragments [J]. Prog Mol Subcell Biol, 1998, 20: 161 - 176
- 6 Perletti G, Concarri P, Giardini R, *et al.* Antitumor activity of endostatin against carcinogen - induced rat primary mammary tumors [J]. Cancer Res, 2000, 60 (7): 1793 - 1796
- 7 Ziche M, Donnini S, Morbidelli L, *et al.* Development of new drugs in angiogenesis [J]. Curr Drug Targets, 2004, 5: 485
- 8 Luo X, Slater JM, Gridley DS. Enhancement of radiation effects by pXLG - mEndo in a lung carcinoma model [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 63 (2): 553 - 564
- 9 Bloch W, Huggel K, Sasaki T, *et al.* The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing [J]. FASEB J, 2000, 14 (15): 2373 - 2376
- 10 Abraham D, Abri S, Hofmann M, *et al.* Low dose carboplatin combined with angiostatic agents prevents metastasis in human testicular germ cell tumor xenografts [J]. J Urol, 2003, 170 (4 Pt 1): 1388 - 1393
- 11 Scharovskoy G, Binda MM, Rozados VR, *et al.* An angiogenic and antiangiogenic balance regulates concomitant antitumoral resistance [J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21: 177
- 12 Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, *et al.* Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution [J]. Embo J, 1998, 17 (6): 1656 - 1664
- 13 Kuhn H, Hammerschmidt S, Wirtz H. Targeting tumor angiogenesis in lung cancer by suppression of VEGF and its receptor - results from clinical trials and novel experimental approaches [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(30): 3157 - 3165

(收稿: 2011 - 11 - 03)

(修回: 2011 - 11 - 07)