

- related compounds[J]. Tetrahedron Lett, 1997, 38: 5339 - 5342
- 3 LuWS. Advance of tumor suppressor p16[J]. J Anhui Institute Edu, 2003, 21 (3): 63 - 65
- 4 Hormann A, Chauduri B. DNA binding properties of the marine sponge pigment faspaplysin[J]. Bioorgan Med Chem, 2001, 9: 917 - 921
- 5 Lin J, Yan XJ, Chen HM. Faspaplysin, a selective CDK4 inhibitor, exhibit antiangiogenic activity in vitro and in vivo[J]. Cancer Chemoth Pharm, 2007, 59: 439 - 445
- 6 Subramanian B, Nakeff A, Tenney K, *et al.* A new paradigm for the development of anticancer agents from natural products[J]. J Exp T her Oncol, 2006, 5: 195 - 204
- 7 卢晓玲, 郑燕玲, 陈海敏, 等. Faspaplysin 通过诱导细胞凋亡抑制 HeLa 细胞体外增殖[J]. 药学报, 2009, 44 (9): 980 - 986
- 8 Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair [J]. Cell, 1992, 69 (2): 367 - 374
- 9 Deepak AV, Salimath BP. Antiangiogenic and proapoptotic activity of a novel glycoprotein from *U. indica* is mediated by NF - κ B and caspase activated DNase in ascites tumor model[J]. Biochimie, 2006, 88: 297 - 307
- 10 鲁文胜. 抑癌基因 p16 的研究进展[J]. 安徽教育学院学报, 2003, 21 (3): 63 - 65
- 11 Hormann A, Chauduri B. DNA binding properties of the marine sponge pigment faspaplysin [J]. Bioorg Med Chem, 2001, 9: 917 - 921
- 12 徐炜烽, 王峰, 陈海敏, 等. Faspaplysin 对 ICR 小鼠 S180 移植瘤的抑制作用及体内安全性的初步观察[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15 (11): 1206 - 1210

(收稿: 2011 - 06 - 21)

(修回: 2011 - 06 - 23)

微囊化人血管抑素基因工程细胞对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

罗 芸 薛毅琬 赵 卉

摘 要 目的 了解海藻酸钠 - 多聚赖氨酸 - 海藻酸钠 (alginate - polylysine - alginate, APA) 微囊化人血管抑素基因工程细胞对人脐静脉内皮细胞 (Huecv304) 增殖的影响。**方法** 采用 APA 制备微囊包裹的表达人血管抑素 (human angiostatin, hAS) 的基因工程细胞 (APA - hAS/293 细胞微囊) 或空载体转染的基因工程细胞 (APA - 0/293 细胞微囊)。分别将上述两种细胞微囊以不同浓度与人脐静脉内皮细胞 Huecv304 细胞共培养, 于培养 0、24、48 及 72h 时, 以 MTT 法测定 Huecv304 细胞的增殖情况。**结果** APA - hAS/293 细胞微囊对共培养的 Huecv304 细胞的增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 且具有良好的量效关系。而对照组 APA - 0/293 细胞微囊对 Huecv304 细胞的增殖无明显抑制作用。**结论** 体外培养的表达人血管抑素基因的工程细胞的分泌物可以通过微囊膜并对人脐静脉内皮细胞的增殖产生显著的抑制效应。

关键词 血管抑素 基因工程细胞 微囊 内皮细胞

Effect of Microencapsulated Human Angiostatin Gene Engineered Cell on the Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cell. Luo Yun, Xue Yilong, Zhao Hui. Institute of Geriatrics, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract Objective To study the effect of microencapsulated human angiostatin gene engineered cell on the proliferation of human umbilical vein endothelial cell Huecv304. **Methods** Alginate - polylysine - alginate (APA) was used to encapsulate 293 cells expressing human angiostatin (APA - hAS/293) or empty vector (APA - 0/293). Microencapsulated APA - hAS/293 or APA - 0/293 cells were co - cultured with Huecv304 in different cell concentration. After 0, 24, 48 and 72h, the proliferation of Huecv304 was measured with MTT assay. **Results** Microencapsulated APA - hAS/293 inhibited the proliferation of cocultured Huecv304 cells ($P < 0.01$) in a dose - dependent manner. While microencapsulated APA - 0/293 didn't inhibit the proliferation of Huecv304 cells in co - culture. **Conclusion** The secretion of gene engineered cells expressing human angiostatin could pass through the membrane of microencapsule and inhibit the proliferation of human umbilical vein endothelial cells.

Key words Angiostatin; Gene engineered cells; Microencapsule; Endothelial cell

迁移,阻止血管发生,促进实验动物肿瘤原发灶消退,抑制转移灶的形成^[1]。近年来随着越来越多的对血管抑素的研究发现:血管抑素能特异性的抑制血管内皮细胞的生长和迁徙,阻止血管生长^[2,3]。目前重组的人血管抑素作为抗肿瘤药已进入临床实验。但由于其半衰期短,全身用药合并不良反应如:心脏毒性、消化道、皮肤和附件反应、到达肿瘤局部浓度低等因素,影响临床应用^[4,5]。若将血管抑素基因转入具有高度增殖活性的载体细胞,构建可持续分泌血管抑素的基因工程细胞种植于肿瘤组织中,可使血管抑素在肿瘤组织内达到长期、高浓度给药的效果,抑制肿瘤生长,但又要克服异体细胞移植的免疫排斥反应是目前临床应用急需解决的问题。本课题组在前期多年研究微囊化免疫隔离细胞的基础上,构件了可持续分泌人血管抑素的基因工程细胞,采用微囊包裹细胞以达到既可持续分泌血管抑素达到长期给药的目的,又防止基因工程细胞过度生长以及异种细胞移植免疫排斥反应^[6,7]。本研究在体外培养条件下观察微囊化分泌人血管抑素的基因工程细胞对人脐静脉内皮细胞的增殖是否具有抑制效应。

材料与方法

1. 材料:海藻酸钠、多聚赖氨酸购自 Sigma 公司,DMEM 培养基、胎牛血清和 bFGF 产品购自 Gibco 公司,加强型小牛血清购自 PAA 公司,酶标仪购自美国伯乐公司。流式细胞仪购自美国 Beckman 公司,低温离心机购自德国 Hermal 公司,荧光倒置生物显微镜购自日本 Olympus 公司。

2. 方法:(1)人血管抑素的基因工程细胞及空载体的基因工程细胞构建:采用本组前期构建的可稳定分泌人血管抑素的单克隆细胞(hAS/293 细胞)及插入空载体构建的基因工程细胞(0/293 细胞)^[8]。(2)hAS/293 细胞和 0/293 细胞的培养及单细胞制备:将 hAS/293 和 0/293 细胞用含质量分数为 10% 胎牛血清、80U/ml 庆大霉素的 DMEM 培养液接种于无菌培养瓶中,在 37℃ 体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养,至细胞贴壁生长至 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化细胞,离心后收集,用无菌生理盐水漂洗 2 次,台盼蓝染色计数活细胞百分率为 95% 以上,制成单细胞悬液备用。(3)APA-hAS/293 或 APA-0/293 细胞微囊的制作及微囊化细胞培养:①将制备好的 hAS-293 和 0-293 单细胞悬液按照 1×10^6 /ml 的浓度悬浮于海藻酸钠溶液中,用静电微囊发生器将其喷入氯化钙溶液中以形成海藻酸钙珠。采用本组前期报道的方法制备 APA-hAS/293 或 APA-0/293 细胞微囊^[9];②用生理盐水清洗微囊化 APA-hAS/293 或 APA-0/293,加入含质量分数为 10% 胎牛血清、80U/ml 庆大霉素的 DMEM 培养液,37℃ 体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。(4)Huecv304 细胞的培养:将本室保存的 Huecv304 细胞,用

含质量分数为 10% 加强型小牛血清、80U/ml 庆大霉素的 DMEM 培养液培养,置于 37℃ 体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,至细胞贴壁生长状态良好时备用。(5)MTT 法测定细胞生长:常规 MTT 法于测定时间点加入浓度为 5mg/ml 的 MTT,继续培养 4h 后去除 MTT,加入二甲亚砜,37℃ 水浴震荡 10min,吸到 96 孔板放置酶标仪 490 微米波长比色,测定 OD 值。(6)细胞生长抑制实验:①取贴壁生长处于对数生长期的 Huecv304 细胞消化收集,制备单细胞悬液,按 1×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板,每组、每个时间点复测 6 孔样本,按实验所需接种孔数。培养 24h 后吸出培养孔中的培养液,加入含终浓度为 3ng/ml bFGF 的含质量分数为 10% 加强型小牛血清、80U/ml 庆大霉素的 DMEM 培养液和微囊化细胞,共同培养。实验组均在共同培养时间的 0、24、48、72h 采用 MTT 法测定 Huecv304 细胞生长的 OD 值;②实验分组:实验组为 100 个 APA-hAS-293 细胞微囊;高、中、低剂量组为每孔分别加入 100、50、25 个 APA-hAS/293 细胞微囊与 1×10^4 个/孔 Huecv304 细胞共培养。对照组为 100 个 APA-0/293 细胞微囊与 1×10^4 个/孔 Huecv304 细胞共培养。按计划时间点测定 Huecv304 细胞生长的 OD 值。

3. 统计学方法:采用 CHISS 统计软件进行成组、单组间的 *t* 检验,结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

结 果

1. 体外培养的 APA-hAS/293 细胞微囊对 bFGF 刺激的 HUECV304 细胞的增殖有明显的抑制作用:分别将 APA-hAS/293 细胞微囊或 APA-0/293 细胞微囊与 HUECV304 细胞共培养,在培养 0、24、48 及 72h 时,采用 MTT 染色法检测其在 490nm 激发光下的光密度值(OD)(表 1)。从表 1 可见,在 APA-0/293 细胞微囊对照组中,培养 24、48、72h 时的 OD 值均高于共培养 0h 时点,其中 24h 极为显著($P < 0.01$)。而 APA-hAS/293 细胞微囊的实验组中,与共培养 0h 时相比,培养 24、48 及 72h 时的 OD 值呈下降趋势,随着培养时间的延长 48、72h 时 OD 值降低极为显著($P < 0.01$)。在相同时间点比较,实验组的 OD 值明显低于对照组($P < 0.01$)。结果表明 APA-hAS/293 细胞微囊对共培养的 HUECV304 的增殖具有抑制作用。

表 1 APA-hAS/293 细胞微囊对 bFGF 刺激的 HUECV304 细胞增殖的影响 OD 值($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	n	APA-hAS/293 实验组	APA-0/293 对照组
0	6	0.118 ± 0.026	0.118 ± 0.026
24	6	0.114 ± 0.015 *	0.202 ± 0.016 [△]
48	6	0.073 ± 0.013 * [△]	0.147 ± 0.010
72	6	0.060 ± 0.016 * [△]	0.164 ± 0.036

两组间比较,* $P < 0.01$;与 0h 组比较,[△] $P < 0.01$

2. 不同剂量的 APA - hAS/293 细胞微囊对 bFGF 刺激的 HUECV304 细胞增殖的量效关系:将不同剂量的 APA - hAS/293 细胞微囊对 bFGF 刺激的 HUECV304 细胞共培养,在培养 0、24、48、72h 时,采用 MTT 染色法检测其在 490nm 激发光下的光密度值(OD)(表 2)。从表 2 可见,高剂量组从共培养 24h 开始,HUECV304 细胞增殖基本停止,中剂量组在 48h 细胞 HUECV304 细胞增殖受抑制,低剂量组虽然 HUECV304 细胞 OD 值 0 ~ 24h 之间升高,但 24h 后 OD 值呈下降趋势见,不同剂量组 APA - hAS/293 细胞微囊对 bFGF 刺激的 HUECV304 细胞增殖有着良好的量效关系。

表 2 APA - hAS/293 不同剂量与 Huecv - 304 细胞共培养 MTT 染色 490nm 吸光度值(OD) ($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	n	高剂量组	中剂量组	低剂量组
0	6	0.118 ± 0.026	0.118 ± 0.026	0.118 ± 0.026
24	6	0.114 ± 0.015 *	0.150 ± 0.009 * [△]	0.184 ± 0.016 ^{△△}
48	6	0.073 ± 0.013 * [△]	0.107 ± 0.011 *	0.171 ± 0.041
72	6	0.060 ± 0.016 * [△]	0.083 ± 0.050 * [△]	0.133 ± 0.029

高、中剂量组与低剂量组比较,* $P < 0.01$;组内各时间点与 0h 比较,[△] $P < 0.05$ 、^{△△} $P < 0.01$

讨 论

肿瘤细胞的生长依赖于血管的生成,阻断新生血管的生成对抑制肿瘤的生长成为治疗肿瘤的新的方向和手段。目前实验研究已证明血管抑素有着显著的抑制血管内皮细胞生长作用,重组的人血管抑素制品作为抗肿瘤药物已进入临床实验阶段,取得可喜的临床效果。

然而,重组的人血管抑素制品由于半衰期短,全身用药到达肿瘤局部浓度低,需多次重复使用等因素制约了临床使用疗效。如何提高肿瘤局部血管抑素的浓度,且保持持续有效的血管抑制作用,是当前临床治疗急需解决的问题。

目前,基础研究已经通过生物工程技术构建出能持续分泌人基因工程细胞体外实验可长期有效的抑制血管内皮细胞的生长及凋亡^[10],血管抑素是一种分子质量为 20kDa 的低分子物质,我们制作的 APA 微囊是一种网格状结构的免疫隔离膜,膜孔可截隔分子质量为 70kDa 以上的高分子物质,允许低分子物质通过,且具有良好的生物相容性。我们将可持续分泌人血管抑素基因工程细胞和含空载体基因工程细胞

用微囊包裹后,与 Huecv304 共同培养后观察到:Huecv304 生长随着时间的增加,与分泌人血管抑素基因工程细胞共培养的培养孔内的内皮细胞数量呈减少趋势,在 3 种剂量组中即使最低剂量组也有抑制 Huecv304 的增殖的趋势,而与含空载体基因工程细胞共培养的 Huecv304 细胞量随着培养时间的延长细胞数量呈上升趋势,两组有显著的统计学差异。表明:血管抑素因子可以透过微囊膜释放到培养液中达到抑制 Huecv304 细胞的生长,导致细胞凋亡的作用。

对于微囊化分泌人血管抑素的基因工程细胞在人体内分泌血管抑素的达到治疗剂量的探索是一个极为复杂的实验、微囊化基因工程细胞在动物体内长期存活的时间也是我们在下一步实验中的继续探索 and 研究的课题。

本实验结果表明微囊化分泌人血管抑素的基因工程细胞可持续、高浓度的分泌血管抑素,发挥抑制新生血管的生成,达到抑制肿瘤生长的作用,为血管抑素在临床肿瘤治疗上提供了新的途径。

参考文献

- 1 Barinaga M. Cancer research. A surprising partner for angiostatin [J]. Science,1999, 283(5409):1831 - 1840
- 2 张玲,张亚嘉,王越中,等. 血管抑素对人脐静脉内皮细胞及体外微血管模型的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,1(41):8259 - 8262
- 3 刘保良. 血管抑素研究进展[J]. 临床合理用药,2009,2(24):126 - 127
- 4 刘秀峰,秦叔逵. 重组人血管内皮抑素临床应用和研究的新进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2009,14(10):951 - 956
- 5 陆筱灵,左云,许震,等. 重组血管内皮抑素联合化疗晚期消化道恶性肿瘤的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志,2010,15(1):78 - 81
- 6 薛毅珑,罗芸,徐龙和,等. APA - BCC 微胶囊蛛网膜下植入对癌痛病人的镇痛效应[J]. 中国疼痛医学杂志,2005,11(4):231 - 235
- 7 薛毅珑,朱明伟,张锦明,等. 脑内植入 APA - BCC 的偏侧帕金森病样猴的多巴胺 D2 受体功能影像观察[J]. 中国神经科学杂志,2004,20(3):234 - 237
- 8 赵卉. 微囊化分泌人血管抑素和人内皮抑素的基因工程细胞的构建及其抗肿瘤生长的研究[D]. 军医进修学院博士学位论文,2005:16 - 23
- 9 李新建,薛毅珑,陆庆国,等. APA 微胶囊免疫隔离生物膜制备中的质量控制[J]. 标记免疫分析与临床,2005,12(1):32 - 34
- 10 潘欣,王泳,张珉,等. 内皮抑素 - 血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对新生血管的抑制效应[J]. 生物技术通讯,2003,14(5):439 - 443

(收稿:2011 - 09 - 10)

(修回:2011 - 09 - 12)