文章编号:1000-5404(2008)09-0783-04

论著

# 重组人内皮抑素联合紫杉醇+顺铂化疗方案治疗人乳腺癌裸鼠移植瘤的研究

邓 莉[1],张轩珍[2],王卫东[1],陈正堂[1],曹正怀[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所,重庆 400037;[2]重庆市妇幼保健院病理科,重庆 400013)

**摘 要:目的** 探讨重组人内皮抑素(endostar,商品名恩度)联合化疗方案对人乳腺癌(MCF-7)裸鼠模型的治疗,观察其对裸鼠血管生成及肿瘤生长的抑制作用。**方法** 将 48 只荷瘤鼠按随机数字表法分为 A 组及 B 组,每组 24 只,两组再分为化疗组、内皮抑素组、联合用药组及对照组,化疗组给予紫杉醇+顺铂(TP),紫杉醇 20 mg/kg,腹腔注射,第 1、7、14 天,顺铂 5 mg/kg,腹腔注射,第 1、7 天;内皮抑素组给予重组人内皮抑素 10 mg/kg,静脉推注,连续 14 d;联合用药组给予重组人内皮抑素+TP:紫杉醇 20 mg/kg,腹腔注射,第 1、7、14 天,顺铂 5 mg/kg,腹腔注射,第 1、7 天,重组人内皮抑素 10 mg/kg,静脉推注;对照组连续 14 d 静脉推注等体积生理盐水,比较各组的抑瘤率,绘制肿瘤生长曲线。ELISA 方法检测血清血管内皮生长因子(VEGF),肿瘤组织病理切片,观察微血管密度(MVD)、凋亡指数,B 组动物观察其生存期。**结果** 联合用药组 VEGF、MVD 与其他各组比较明显减低($P<0.05$),凋亡指数与其他各组比较明显增加($P<0.05$),生存时间与对照组比较明显延长($P<0.05$)。**结论** 重组人内皮抑素联合 TP 方案治疗人乳腺癌裸鼠移植瘤对肿瘤生长及肿瘤血管抑制优于单一化疗,但 1 个周期联合化疗用药不能延长生存期。

**关键词:**乳腺癌;重组人内皮抑素;化疗;裸鼠
**中图法分类号:**R73-36;R737.9;R979.1 **文献标识码:**A

# Recombinant human endostatin combined with paclitaxel-cisplatin chemotherapy in treatment of human breast cancer xenograft in nude mice

DENG Li[1], ZHANG Xuan-zhen[2], WANG Wei-dong[1], CHEN Zheng-tang[1], CAO Zheng-huai[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Pathology, Women's and Children's Health Care Hospital of Chongqing, Chongqing 400013, China)

**Abstract:** Objective To investigate the anti-angiogenesis and tumor inhibitory effects of recombinant human endostatin (rhES) combined with paclitaxel-cisplatin chemotherapy (TP regimen) on xenograft tumors in nude mice of human breast carcinoma cell MCF-7. Methods Forty-eight xenograft nude mice were randomized into group A and group B, then every group were divided 4 subgroups, that is, TP group (cisplatin 20 mg/kg at days 1, 7 and 14, and paclitaxel 5 mg/kg at days 1 and 7, i. p.), rhES group (rhES 10 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ for 14 d, i. v.), rhES+TP group (combined treatment as above-mentioned), and control group (normal saline, i. v.). Inhibitory rate of xenograft and tumor growth curve was calculated and plotted. Serum VEGF level was determined by ELISA, microvessel density (MVD) in tumors was measured by immunohistochemistry, and cell apoptosis was examined by TUNEL staining. Survival time was observed in group B. Results Serum VEGF and MVD was significantly lower in rhES+TP group than in other groups ($P<0.05$), but its apoptosis index was higher ($P<0.05$). Survival time had no difference in rhES+TP group than in TP group, but was longer than that of control group ($P<0.05$). Conclusion rhES combined TP regimen is better than TP regimen in tumor growth and microvessel growth of human breast cancer xenograft, but the survival is not significant prolonged within one treatment cycle.

**Key words:** breast cancer; recombinant human endostatin; chemotherapy; nude mice

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,近年来发病率呈逐年递增趋势,生物治疗成为继放化疗、内分泌治疗后的另一种值得期待的保守治疗方法。作为血管依赖的实体肿瘤,乳腺癌的血管生成在其生长及侵袭中有重要作用,并与其预后有关系。内皮抑素是近年来发现的一种抑制血管生成的蛋白质[1]。本实验采用重组人

基金项目:全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G069)
Supported by the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G069)
作者简介:邓 莉,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤靶向治疗方面的研究。电话:(023)66306148,E-mail:dengli@mail.tmmu.com.cn
通信作者:陈正堂,电话:(023)68755626
收稿日期:2007-11-23;修回日期:2008-01-29

内皮抑素联合紫杉醇+顺铂(TP)化疗方案对人乳腺癌裸鼠模型进行研究,以探讨其对乳腺癌血管生成和肿瘤生长以及预后的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验试剂 重组人内皮抑素(endostar,商品名恩度),由江苏先声药业提供;紫杉醇 30 mg/支,山西普德药业生产,批号 20070101,顺铂,10 mg/支,齐鲁药业生产,批号 703014CF,均购于本院中心药房;VEGF ELISA 试剂盒购自美国 Market 公司;免疫组化一抗 CD34、DAB 显色液均购于武汉博士德;TUNEL 试剂盒购自德国罗氏公司。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株,由第三军医大学军事预防医学院提供,培养条件:生长于含 10% 胎牛血清(TBD 公司)、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 的 RPMI1640 液体培养基(HyClone 公司),37 ℃、饱和湿度、5% $CO_2$ 孵箱培养。细胞呈贴壁生长,每日换液,2~3 d 传代 1 次。

1.1.3 实验动物模型的建立 4~5 周龄 BALB/c-nu/nu 裸鼠 52 只,雌性,体质量 18~25 g,购于北京医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(京)-2007001,饲养于本院实验动物中心 SPF 级层流室。取对数生长的 MCF-7 细胞,用 0.25% 胰酶消化,含血清的培养基终止消化,弯头吸管吹打成细胞悬液,800 r/min,离心 5 min,PBS 稀释,制成细胞悬液,细胞数为 $3.3\times10^7$ $ml^{-1}$,于裸鼠右侧乳垫下注射 0.3 ml,注射后 2~7 d 可见到肿瘤开始生长,逐渐增大,未见到肿瘤消退,52 只裸鼠全部成瘤。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 人乳腺癌 MCF-7 细胞原位接种后 10 d,52 只荷瘤鼠全部成瘤,测量肿瘤最大径(a)和最小径(b),计算肿瘤体积($V$):$V=ab^2/2$,将肿瘤体积过大及过小者排除,共有 48 只荷瘤鼠进入实验,按随机数字表法分成 A、B 2 组,各组再按用药不同分成 4 个亚组,每组 6 只,各组肿瘤平均体积差异无统计学意义($P>0.05$)。联合用药组(重组人内皮抑素+TP):紫杉醇 20 mg/kg,腹腔注射,第 1、7、14 天,顺铂 5 mg/kg,腹腔注射,第 1、7 天,重组人内皮抑素 10 mg/kg,静脉推注,自第 1 天起连续用药 14 d;化疗组(TP):紫杉醇 20 mg/kg,腹腔注射,第 1、7、14 天,顺铂 5 mg/kg,腹腔注射,第 1、7 天;内皮抑素组:重组人内皮抑素 10 mg/kg,静脉推注,连续 14 d;对照组:等量无菌生理盐水,静脉推注,连续 14 d,A 组进行各项指标检测,B 组观察各组生存期。

1.2.2 检测指标及方法

1.2.2.1 肿瘤体积及肿瘤生长曲线 每 3 天用游标卡尺测 1 次肿瘤体积,直至注药结束后 1 d,取各组平均值,绘制肿瘤生长曲线;实验结束,完整剥离肿瘤,称质量,计算抑瘤率。

$$抑瘤率(\%)=\frac{对照组瘤体质量-实验组瘤体质量}{对照组瘤体质量}\times100\%$$

1.2.2.2 血管内皮生长因子(VEGF)检测 注药结束后 1 d,眼球拔除取血,5 000 r/min,离心 8 min,取上清,-70 ℃保存,双抗夹心 ELISA 法测 VEGF,检测标本按 1∶100 进行稀释,混匀,标准品已经 1∶100 稀释(按操作步骤按照说明书进行)。取血后颈椎脱位致死,完整将肿瘤剥离,将剥离的肿瘤组织立即用 10% 甲醛固定,石蜡包埋、5 μm切片、免疫组化染色。

1.2.2.3 肿瘤微血管密度(MVD) 采用 1∶100 稀释的小鼠 CD34 多克隆抗体为一抗,编号:BAO532,DAB 显色,操作步骤按说明书进行,切片观察先用 40 倍光镜扫视整个切片确定血管密度最高的区域,再用 400 倍光镜视野下计数血管数目。结果用 5 个不连续 400 倍视野下的血管数目的平均数来表示。

1.2.2.4 癌细胞凋亡指数(AI) 采用末端转移酶介导的 dUTP 切口末端标记法(TUNEL 法)。酶溶液(含 TdT)和标记液(含 Biotin-dUTP)按 1∶9混合,配成 TUNEL 反应液(按实验步骤按说明书进行)。细胞核呈棕黄色者为凋亡细胞。在 400 倍视野下,选取 5 个癌区,计算阳性细胞在全部癌细胞中所占的比例。

$$AI(\%)=\frac{凋亡细胞数}{癌细胞总数}\times100\%$$

1.2.2.5 生存期 实验 B 组连续用药 14 d 后,结束用药,正常饲养,直至自然死亡,记录各组动物自接种肿瘤细胞开始至死亡的时间,绘制生存曲线。

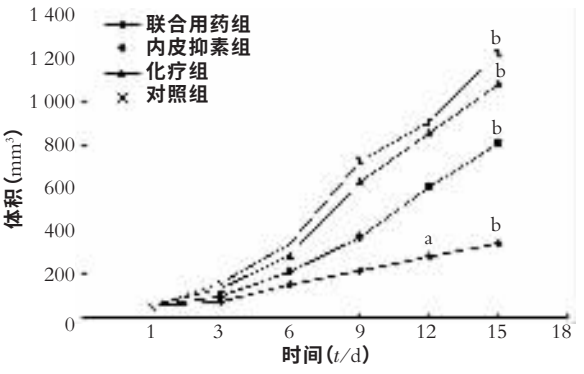
### 1.3 统计学方法

肿瘤体积、VEGF、MVD、AI 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方法分析,生存时间采用 Kaplan-Meier 分析,绘制生存曲线,所有数据用 SPSS 13.0 进行统计学处理。

## 2 结果

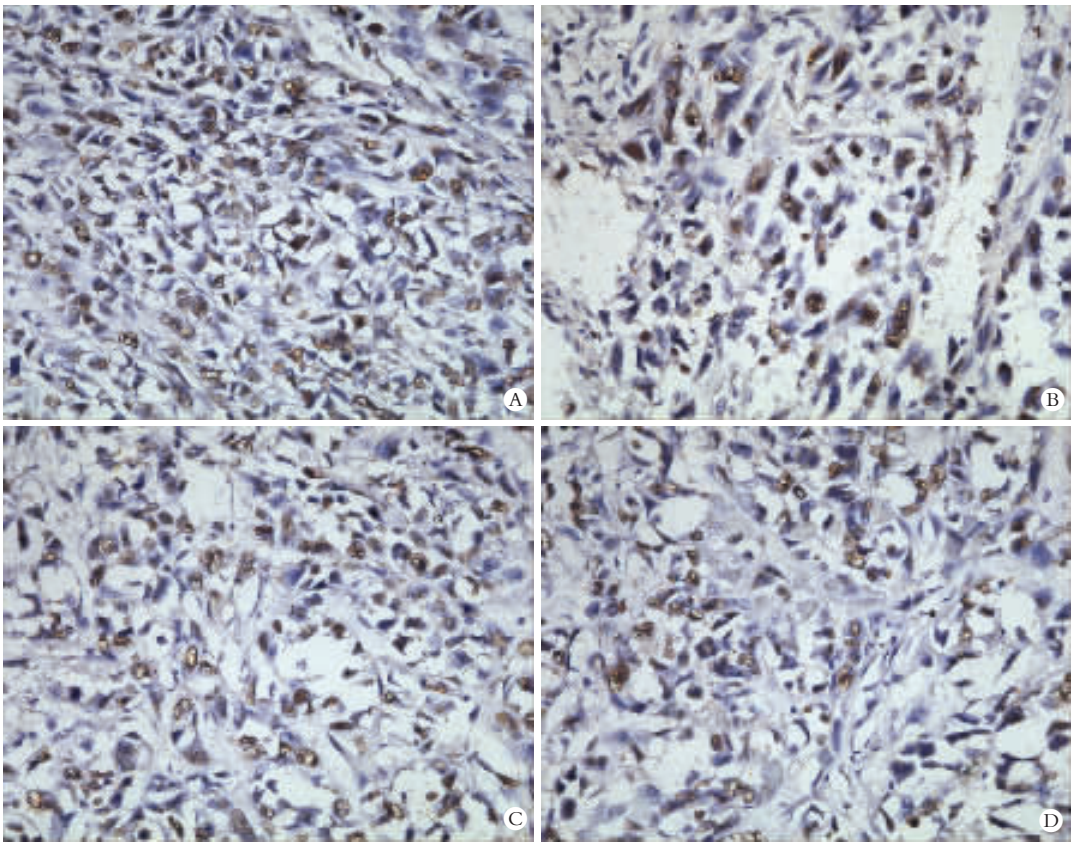
### 2.1 各组肿瘤生长曲线的比较

A 组至实验结束,无死亡,全部进入指标检测,每日观察动物生活情况,各组动物能正常进食,活泼,无明显消瘦。自用药前 1 d 开始,每 3 天测 1 次肿瘤长短径,直至用药结束,用药后前 3 d,各组肿瘤生长平缓,体积比较无统计学差异($P>0.05$),第 3 天后,各组肿瘤生长出现差异,联合用药组及化疗组生长曲线平缓,但未停滞,对照组生长较快,曲线陡直,第 12 天,联合用药组与化疗组比较有统计学差异,实验结束各组体积比较有统计学差异($P<0.05$)。肿瘤生长曲线见图 1,注药结束,各实验组瘤体质量分别为联合组(0.523 3±0.116 6)g,化疗组(0.863 3±0.114 5)g,内皮抑素组(1.055 0±0.179 9)g,对照组(1.363 3±0.379 3)g,联合用药组抑瘤率为 72.02%,化疗组抑瘤率为 34.10%。




a:$P<0.05$,与化疗组比较;b:$P<0.05$,组间两两比较

图1 各组肿瘤生长曲线的比较




A:联合用药组;B:内皮抑素组;C:化疗组;D:对照组

**图 2　各组肿瘤组织细胞凋亡 TUNEL 染色结果　(×400)**

### 2.2　免疫组化方法比较 MVD

采用 CD34 标记微血管,CD34 蛋白阳性染色呈棕黄色,定位于移植瘤微血管内皮细胞的细胞膜和(或)细胞质,与其他组织分界清晰,任何被 CD34 染成棕色的内皮细胞或内皮细胞簇,必须与邻近微血管、肿瘤细胞和周围结缔组织分界清楚,才可作为 1 个微血管计数,管腔大于 8 个红细胞及有较厚肌层的血管不计数,背景中阳性染色的浆细胞、白细胞依据形态排除(图 2)。MVD 计数:联合用药组(22.17 ± 5.98),化疗组(37.33 ± 6.80),内皮抑素组(32.00 ± 3.35),对照组(48.00 ± 3.41)。联合用药组与其他 3 组 MVD 计数明显比较减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

### 2.3　各实验组肿瘤组织内凋亡细胞的比较

光镜下 TUNEL 染色阳性信号呈棕黄色,位于细胞核内,浓缩的核质紧贴核膜,或出现均匀的染色,各组凋亡指数分别为联合用药组(60.00 ± 5.33)%,化疗组(38.00 ± 7.21)%,内皮抑素组(33.83 ± 7.21)%,对照组(11.50 ± 3.78)%,联合用药组凋亡指数高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

### 2.4　ELISA 法检测血清 VEGF

联合用药组血清 VEGF(33.50 ± 2.17) pg/ml,化疗组(45.67 ± 3.56) pg/ml,内皮抑素组(41.33 ± 4.93) pg/ml,对照组(73.67 ± 3.50) pg/ml,各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

### 2.5　生存分析

平均生存时间:联合用药组(79.50 ± 3.15) d,化疗组(73.17 ± 1.28) d,对照组(50.50 ± 3.04) d,内皮抑素组(69.33 ± 2.22) d。联合用药组平均生存期与化疗组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),与对照组比较生存期延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

## 3　讨论

1997 年,O'Reilly 等[1] 从小鼠血管内皮瘤细胞的培养上清液中分离得到一种相对分子量为 $22 \times 10^3$ 的蛋白质——内皮抑素,研究表明内皮抑素是胶原 XⅧ的 C 末端非胶原区 NCI 结构域的 184 个氨基酸片段。内皮抑素的作用机制不明,有报道认为整合素、原肌球蛋白、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、层黏连蛋白、MMP-2 是其结合蛋白,但这些受体对于是否发挥抗肿瘤作用依然不明确[2,3]。目前有研究认为其作用机制是通过阻断内皮细胞特异性表达的 E-选择素来调节内皮细胞黏附和血管骨架的形成。还有研究认为内皮抑素通过下调 β-连环素的活性,抑制细胞周期蛋白 D1 的表达,引起内皮细胞 $G_1$ 期阻滞[4]。Jia 等[5] 研究得出联合重组人内皮抑素治疗 B16F10 黑素瘤能减少肿瘤血管生

成,增加肿瘤组织凋亡;Luo 等[6]研究表明联合放疗与内皮抑素质粒治疗小鼠 Lewis 肺癌模型能增强抗肿瘤疗效。

本实验采用的重组人内皮抑素(商品名恩度),由烟台麦得津公司 2000 年利用大肠杆菌在全球首次将内皮抑素大规模成功复性,并创造性的在内皮抑素肽链 N 端加了 9 个氨基酸,能与金属螯合,这一变化解决了传统方法生产成本高,纯度过低,稳定性差等难题。内皮抑素的作用机制已有较多研究,但未达成共识,乳腺癌是女性高发肿瘤,经过不断的摸索和新的化疗药物的出现,其有效率也有所提高,但化疗毒副反应强,容易产生耐药性,以赫塞丁、贝伐单抗为代表的靶向治疗成为新的研究热点,血管内皮基因稳定,针对血管内皮靶向治疗可长期用药,不易产生耐药性,内皮抑素抑制肿瘤血管生成的能力,在肿瘤的不同时期有不同作用,在血管形成期的应用效果大于血管成熟期[7]。

促血管生成因子中最重要的是 VEGF,能增加血管的通透性、促进内皮细胞的迁移、增生和肿瘤新生血管的生成,促进肿瘤的生长和转移。最近研究表明,内皮抑素的作用与 VEGF 信号通路有关,其通过抑制 VEGF 诱导的 VEGFR-2(KDR/Flk-1)酪氨酸磷酸化和细胞外信号调节激酶(ERK)的活性来抑制血管生成和肿瘤细胞活性,抑制内皮细胞增殖,促使内皮细胞凋亡[8]。谢家印等[9]对 162 例非霍奇金淋巴瘤患者血清内皮抑素及 VEGF 水平进行检测,发现 VEGF 与内皮抑素呈显著正相关。本实验也观察到联合用药组血清 VEGF 较其他组明显减低($P<0.05$),这对于临床上寻找重组人内皮抑素是否有效的生物学标志有参考价值。

本实验在肿瘤成瘤早期即开始用药,观察到了对肿瘤生长和血管生成的抑制,但远期疗效,与单一化疗方案比较,未观察到生存期延长($P>0.05$)。对于此结果,分析原因为恶性肿瘤的保守治疗,推荐采用序贯化疗。本研究仅进行了 1 个周期治疗,用药结束后残存肿瘤细胞可继续增殖,从而影响远期疗效。使用内皮抑素对于临床常见的中晚期肿瘤疗效如何,用药时机的把握,还需继续研究。

本研究利用重组人内皮抑素联合 TP 方案治疗人乳腺癌裸鼠,结果显示,与单用 TP 方案比较,肿瘤血管的生长受到明显抑制,肿瘤组织中凋亡细胞增多,瘤体未见到消退或明显缩小,但肿瘤生长速度减慢,实验结束,各组体积差异有统计学意义($P<0.05$)。联合用药优于单一化疗,与黄纯等[10]运用重组人内皮抑素对肺癌进行研究实验结果一致。原因可能是紫杉醇作为一种细胞毒剂,其稳定微管特性使细胞阻滞于 $G_2$ 期及 M 期而诱导肿瘤细胞凋亡[11],而内皮抑素干扰血管形成,破坏了肿瘤细胞赖以生长的营养管道。

本研究采用人乳腺癌 MCF-7 细胞株建立人乳腺癌裸鼠模型,该细胞株基因型为野生型 P53,对化疗药物敏感,与抗肿瘤化疗药物协同,减少了肿瘤血管生成,加速了肿瘤细胞的凋亡,影响其生长。同时我们进行了 1 个周期的药物干预后,观察到联合用药组与化疗组生存时间差异无统计学意义($P>0.05$),考虑到疗程不够,可导致残存肿瘤细胞的增殖,所以我们推荐在课题的后续实验及临床试验中进行 2 个周期以上的药物干预,这为临床使用重组人内皮抑素治疗乳腺癌用药方案的选择提供一定的实验依据。

## 参考文献:


[1] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 2771.

[2] MacDonald N J, Shivers W Y, Narum D L, *et al*. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27): 25190-25196.

[3] 束永前,王榕生,蒲骁麟. 重组人血管内皮抑制素的抗肿瘤活性研究[J]. 实用临床医药杂志,2006,10(6): 2-5.

[4] Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi S A, *et al*. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16464-16469.

[5] Jia L J, Xu H M, Ma D Y, *et al*. Enhanced therapeutic effect by combination of tumor-targeting Salmonella and endostatin in murine melanoma model[J]. Cancer Biolo Ther, 2005, 4(8): 840-845.

[6] Luo X, Slater J M, Gridley D S. Enhancement of radiation effects by pXLG-mEndo in a lung carcinoma model[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 63(2): 553-564.

[7] Macpherson G R, Ng S S, Forbes S L, *et al*. Anti-angiogenic activity of human endostatin is HIF-1-independent *in vitro* and sensitive to timing of treatment in a human saphenous vein assay[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(9): 845-854.

[8] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 594-607.

[9] 谢家印,向德兵,王 阁,等. 非霍奇金淋巴瘤患者血清 VEGF 及 Endostatin 水平检测的临床相关研究[J]. 第三军医大学学报,2006, 28(2): 129-132.

[10] 黄 纯,李 凯,魏熙胤,等. 晚期非小细胞肺癌循环血管内皮细胞水平的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(10): 780-783.

[11] Schmidt M, Schler G, Gruensfelder P, *et al*. Differential gene expression in a paclitaxel-resistant clone of a head and neck cancer cell line[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2006, 263(2): 127-134.


(编辑 王 红)