文章编号:1000-5404(2009)21-2069-04

论著

Endostar对肿瘤血管内皮细胞生长及功能的抑制作用

蒋 力,何 勇,蒋耀光 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨Endostar对肿瘤血管内皮细胞生长和功能的抑制作用及其相关的抗血管形成机制。**方法** 采用A549细胞上清诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)成为肿瘤血管内皮细胞(tumor-derived endothelial cells,Td-EC),通过MTT法、细胞迁徙试验、流式细胞术、TUNEL法等检测Endostar对Td-EC细胞生物学特性的影响。**结果** Endostar在体外对于Td-EC有显著的生长抑制作用,并具有时间和浓度依赖性,但对于HUVEC的生长抑制作用并不显著;一定浓度的Endostar能显著降低Td-EC细胞迁徙活性,促使细胞凋亡数目增加、细胞形态学发生改变,并能显著增加Td-EC S期细胞比例($P<0.01$),而同样条件下,Endostar影响细胞迁徙活性及促进细胞凋亡的作用对于HUVEC并不显著($P>0.05$)。**结论** Endostar可以特异性地抑制肿瘤血管内皮细胞的生长及功能。

关键词: Endostar;Td-EC;细胞迁徙
中图法分类号: R73-76; R730.23; R979.1 **文献标识码:** A

Endostar inhibits proliferation and cell functions of tumor-derived endothelial cells

JIANG Li, HE Yong, JIANG Yao-guang (Thoracic Surgery Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective Tumor vessels were foundation of tumors' formation, growth and metastasis, and the destruction of a spot of them would lead to wide avascular necrosis of tumor cells, so the specific killing effect on tumor vasculature endothelial cells had become one of the most important strategies for tumor therapy. Endostar, a novel recombinant human endostatin expressed and purified with an additional nine-amino acid sequence, is a new anti- drug. This study aimed to determine how endostar to affect the behavior of endothelial cells and tumor endothelial cells in vitro and *in vivo*. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was isolated and cultured followed by identification with Ⅷ factor related antigens. The cells differentiated into tumor-derived endothelial cells (Td-ECs) by co-culturing with supernatants of A549 cells. The anti- effect of endostar on Td-ECs was detected with MTT assay, cell migration assay, flow cytometry and TUNEL assay. **Results** Endostar had a significant effect on the proliferation of Td-EC in a time- and concentration-dependent manner. At the same time, though Endostar at a certain concentration inhibited cell migration process significantly, arrested the cells at G_0/G_1 and S phases and induced cell apoptosis ($P<0.01$), however, under the same conditions, Endostar had little impact on HUVEC ($P>0.05$). **Conclusion** Our study indicates a novel function of endostar, to inhibit and Td-ECs proliferation *in vitro*. So, using endostar for cancer therapy is worthwhile for further study in clinical trials.

Key words: endostar; tumor-derived endothelial cells; migration

抗肿瘤血管治疗成为肿瘤治疗的重要研究方向之一[1]。在多种血管生成抑制剂中,内皮抑素(endostatin)曾被认为是最有效的肿瘤血管生成抑制剂[2],2005年10月,我国科学家首次将重组人内皮抑素开发成抗肿瘤药物Endostar,不仅使其稳定性提高,半衰期延长,而且生物活性增加。"肿瘤饥饿疗法"理论创始人福克曼教授的报道证实了Endostar的抗癌作

基金项目:国家自然科学基金(30600611);第三军医大学青年基金(XG200540) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600611) and the Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (XG200540)
作者简介:蒋 力,男,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事肺癌防治方面的研究。E-mail:dickjl01@163.com
通信作者:何 勇,E-mail:yongHe@yahoo.com
收稿日期:2009-03-16;修回日期:2009-03-31

用[3]。在本研究中,我们将探讨 Endostar 在体外的抗血管形成效应,以期揭示其对肿瘤血管内皮细胞生长及相关功能的影响,为进一步的临床药效研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

参照文献[4]方法进行。取健康、足月剖宫产胎儿脐带 20~30 cm,以胰酶灌注法分离脐静脉血管内皮细胞,用含 20% 胎牛血清,10 ng/L VEGF 的 PRMI1640 培养传代,免疫荧光法检测Ⅷ因子相关抗原以鉴定 HUVEC;人肺腺癌 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 液培养至 70% 汇合时,换成无血清的 RPMI1640 液再培养 48 h。收集培养上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,于 -80 ℃保存备用。取第 3 代 HUVEC, 用含体积分数 50% A549 细胞培养上清的 HESFM 培养, 汇合至 80% 时收集细胞, 即为肿瘤血管血管内皮细胞(Td-EC),并可培养传代。

1.2 RT-PCR 检测

以正常 HUVEC 为对照组,按 TaKaRa 试剂盒的说明书提取总 RNA。根据 TEM1 及 TEM8 的 cDNA 设计引物, 并由英俊生物工程技术有限公司合成。扩增 TEM1 基因片段为 287 bp,上游引物:5′-TCGAGTGTTATTGTAGCGAGGGACATG-3′, 下游引物:5′-AGGTGGGCTCCGGGTAGGGTAT-3′;扩增 TEM8 基因片段为 462 bp,上游引物:5′-CGGATTGCGGACAGTAAGG-3′,下游引物:5′-GCCAGAACCACCAGAGGAG-3′; 按 TaKaRa BcaBESTTM RNA PCR Kit 试剂盒的说明书进行扩增。用凝胶电泳成像系统摄像。

1.3 细胞增殖曲线测定

采用 MTT 法[5]检测 Endostar(商品名:恩度,先声药业集团惠赠)浓度为 5、10、15、20 μg/ml 培养时 HUVEC、Td-EC 2 组细胞在检测时间分别为 12、24、48、72 h 时内皮细胞的存活率,分别以正常生长的 HUVEC、Td-EC 2 组内皮细胞为对照组,选择 490 nm 波长,实验结果用细胞存活率表示,细胞存活率(%) = $D(490)_{实验组}/D(490)_{对照组}\times100\%$。

1.4 细胞迁徙试验

将小室放入 24 孔培养板中,在上室加入 300 μl 预温的无血清培养基,室温下静置 15~30 min,吸去剩余培养液, 24 孔板下室加入 500 μl 含 20% FBS 的 PRMI1640 培养基,放入小室,取细胞悬液[(2~3)×10^5/ml]200 μl 加入 Transwell 小室,常规培养 12~24 h 后,90% 酒精常温固定 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,清水漂净,取 3~5 个视野计数细胞个数;将上室液更换为 Endostar 浓度为 15 μg/ml 的培养液,重复以上试验步骤,研究 Endostar 对内皮细胞迁徙特性的影响。

1.5 透射电镜检测

将 HUVEC、Td-EC 及分别经 Endostar 浓度为 15 μg/ml 的培养液培养 48 h 的 2 组内皮细胞分为 4 组,调整细胞浓度 2×10^6/ml 左右,取 4 ml 细胞悬液 1 500 r/min 离心 10 min,倒出上清,倒置离心管 5 min,加入 2.5% 戊二醛 1.5 ml 固定;0.1 mmol/L PBS 漂洗 2 次,10 min/次;1% 锇酸固定 2 h;丙酮酸梯度脱水;树脂包埋后半切片定位;超薄切片后铀染、铅染,送透射电镜室观察(Philips TECNI10)。

1.6 流式细胞检测细胞周期

将 HUVEC、Td-EC 内皮细胞各分为 2 组,共 4 组,每组 12 孔接种到 24 孔板内。24 h 后,HUVEC 及 Td-EC 实验组换为 Endostar 浓度为 15 μg/ml 的无血清培养液,其余 2 组为对照组,培养 3 d 后,以 0.25% 胰酶消化,收集细胞,800 r/min 离心 5 min,0.01 mol/L PBS 漂洗,吹打成单细胞悬液,70% 冷乙醇 4 ℃下固定 24 h, RNAase 消化,碘化丙啶标记,在激发光 488 nm,检测光 610 nm 下用流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

将 HUVEC、Td-EC 2 组内皮细胞分别按每孔 4×10^4/ml 细胞,每组 12 孔接种到 24 孔板,24 h 后,每组取 6 孔更换为 Endostar 浓度为 15 μg/100 ml 的无血清培养液,为 HUVEC、Td-EC 实验组,其余 6 孔为对照组,72 h 后将细胞用 3.7% 中性福尔马林室温固定 10 min ,经 100%、95%、70% 梯度酒精室温各 5 min 水化,PBS 室温荡洗 10 min,每孔滴加 50 μl Cytonin,室温 30 min,DNase-free 水洗 2 min ×2 次,新鲜配置的 3% H_2O_2 溶液,室温 5 min, PBS 洗 1 min, TdT 标记缓冲液室温孵育 5 min,每孔滴加 50 μl 标记反应混和液,37 ℃ 1 h 后用 TdT 终止缓冲液室温作用 5 min,倒置荧光显微镜下观察绿色荧光颗粒者为凋亡细胞。

1.8 统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件行方差分析。

2 结果

2.1 HUVEC 的分离培养及鉴定

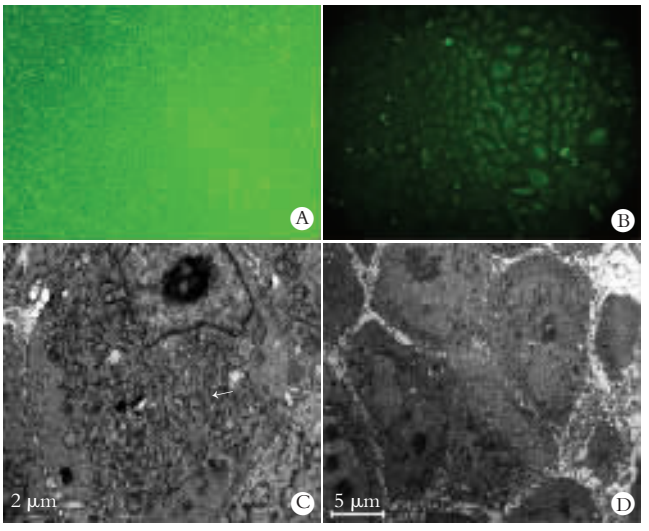
细胞接种 24 h 后, 普通光镜下可见细胞贴壁,初长出的细胞为梭形, 第 3~5 天,细胞长成片,中心排列紧密的部分可见呈典型铺路石子状排列的单层细胞。培养的细胞经荧光免疫染色后,荧光显微镜下可见细胞质内有黄绿色荧光,细胞内有内皮细胞特有的人Ⅷ因子相关抗原存在(图 1A、B)。

2.2 肿瘤血管内皮细胞的诱导生成及鉴定

在透射电镜下观察,Td-EC 细胞饱满,与 HUVEC 细胞比较,细胞器丰富(图 1C、D),RT-PCR 扩增产物的电泳显示:从 Td-EC 中能扩增出约 290 bp 及 460 bp 的条带(图 2),说明 HUVEC 经 A549 细胞培养上清诱导后,细胞表达 TEM1 和 TEM8,这是肿瘤血管内皮细胞特有的表达抗原,故诱导细胞具备了肿瘤血管内皮细胞的特性。

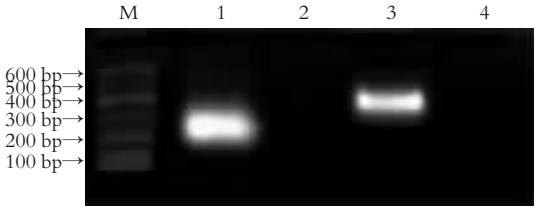
2.3 Endostar 对细胞增殖的影响

24 h 后,Td-EC 组细胞存活率开始降低,并与时间及剂量成正相关,与对照组正常 Td-EC 细胞相比,差异有显著性,并具有时间和浓度依赖性($P<0.01$,表 1);而 HUVEC 组细胞存活率在各浓度和时相相差不大($P>0.05$,表 1),表明 Endostar 对 HUVEC 生长抑制作用不明显。



A:HUVEC 细胞倒置显微镜下观察(×100)　细胞呈典型铺路石样排列;B:HUVEC 细胞荧光免疫染色观察(×100)　可见细胞质内绿色荧光颗粒;C:Td-EC 细胞透射电镜观察　↑:胞内细胞器丰富;D:正常 HUVEC 透射电镜观察　细胞间正常连接

图 1　HUVEC 及 Td-EC 细胞形态学观察



M: DNA 标准;1:TEM1 mRNA 在 Td-EC 中的表达;2: TEM1 mRNA 在 HUVEC 中的表达;3:TEM8 mRNA 在 Td-EC 中的表达;4: TEM8 mRNA 在 HUVEC 中的表达

图 2　RT-PCR 检测 TEM1 和 TEM8 mRNA 在 Td-EC 中表达

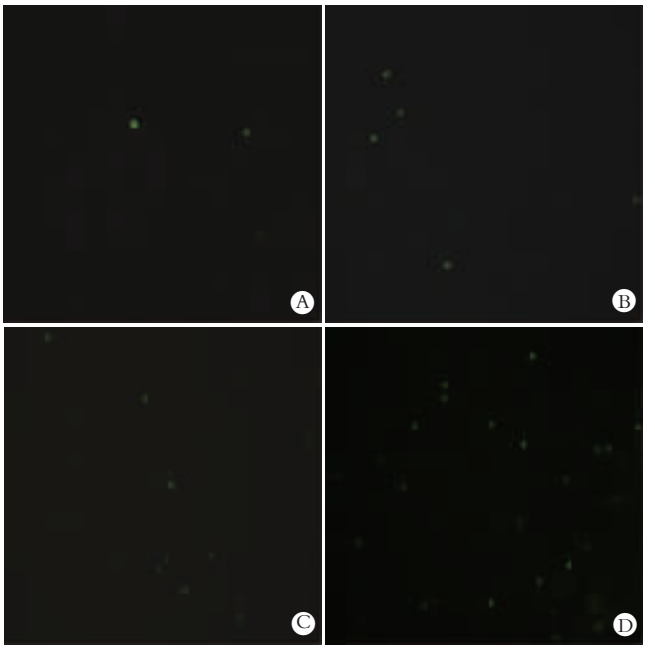
表 1　Endostar 对 HUVEC 及 Td-EC 细胞存活率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
HUVEC 组				
10 μg/100 μl	94.74 ±7.29	92.52 ±6.41	90.03 ±3.67	89.89 ±4.62
15 μg/100 μl	94.18 ±7.36	90.53 ±4.26	89.28 ±5.39	87.76 ±5.18
20 μg/100 μl	90.24 ±6.34	87.38 ±5.26[a]	84.94 ±4.38[ab]	83.59 ±4.28[ab]
Td-EC 组				
10 μg/100 μl	94.74 ±3.34	89.52 ±4.27[a]	86.52 ±5.38[ab]	85.89 ±4.38[a]
15 μg/100 μl	93.21 ±6.24[a]	88.53 ±6.47[ab]	83.27 ±6.21[ab]	80.49 ±3.64[ab]
20 μg/100 μl	90.24 ±5.58[a]	83.25 ±4.64[ab]	77.34 ±2.19[ab]	75.26 ±7.10[ab]

a:$P<0.01$,与正常培养对照组细胞存活率(100%)比较;b:$P<0.01$,与同浓度组前一时相比较

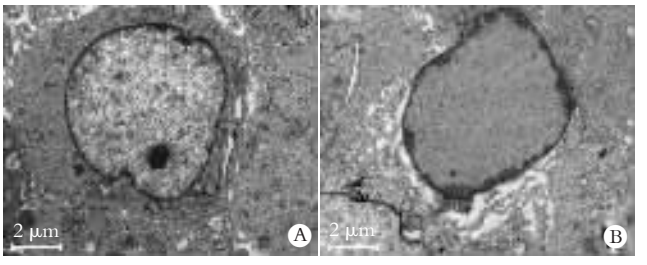
2.4　Endostar 对细胞凋亡的影响

加入 Endostar 培养后 HUVEC 与正常 HUVEC 的细胞凋亡数分别为 1.1 个/mm^2 和 0.8 个/mm^2,两者无显著差别($n=20$, $P>0.05$);正常培养 Td-EC 细胞凋亡数为 4.3 个/mm^2,而 Td-EC 细胞在加入 Endostar 培养 72 h 后,细胞凋亡数为 7.2 个/mm^2,后者细胞凋亡明显增加($n=20$,$P<0.01$, 图 3)。透射电镜结果显示:经 Endostar 浓度为 15 μg/ml 培养液培育 48 h 后,HUVEC 细胞形态基本正常,Td-EC 细胞出现染色质边集现象,表明 Td-EC 细胞凋亡明显增多(图 4)。



A:正常 HUVEC 细胞　可见零星发出绿色荧光凋亡细胞;B:HUVEC Endostar 组　可见发出绿色荧光的凋亡细胞;C:Td-EC 细胞　凋亡细胞呈绿色荧光颗粒散在分布;D:Td-EC Endostar 组　凋亡细胞呈绿色荧光颗粒散在分布,数目较多

图 3　Endostar 对 HUVEC 及 Td-EC 凋亡的影响　(倒置荧光显微镜×200)



A:HUVEC 细胞 15 μg/ml Endostar 培育 48 h 后　细胞形态基本正常;B:Td-EC 细胞 15 μg/ml Endostar 培育 48 h 后　细胞出现染色质边集现象

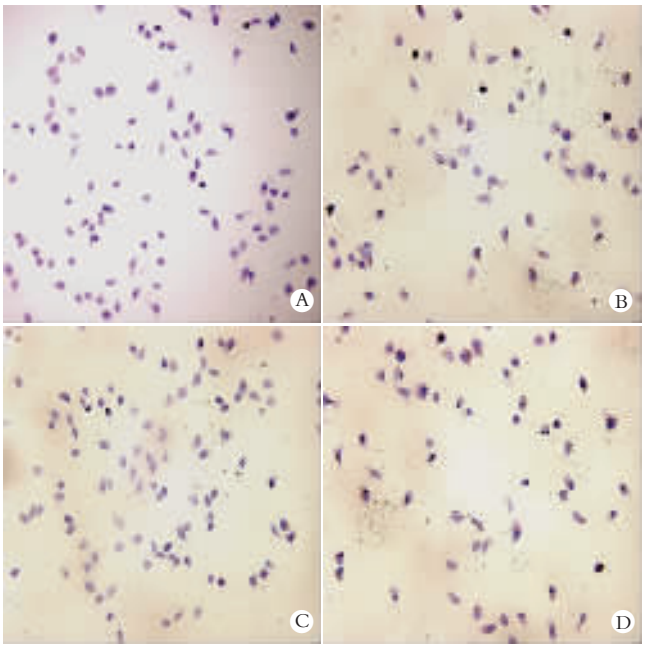
图 4　15 μg/ml Endostar 培育 48 h 后 HUVEC 和 Td-EC 细胞形态观察

2.5　内皮细胞迁徙试验

正常 HUVEC 与加入 15 μg/ml Endostar 培养的 HUVEC 在每个视野下细胞迁徙数分别为 23.41、20.83 个,两者间无明显的差异($P>0.05$),而 Td-EC 细胞与加入 15 μg/ml Endostar 培养的 Td-EC 细胞迁徙数分别为 37.45、18.37 个,2 者间差异显著($P<0.01$),且正常 HUVEC 细胞与 Td-EC 细胞比较差异显著($P<0.01$,图 5)。表明 Td-EC 细胞较正常内皮细胞具有更强的迁徙能力,利于肿瘤的生长,Endostar 能显著抑制 Td-EC 的迁徙能力,而对正常内皮细胞的影响较小。

2.6　Endostar 对内皮细胞细胞周期的影响

Endostar 浓度为 15 μg/100 μl 培养液培养 72 h 后,经细胞周期检测,处理组 Td-EC 细胞 G_0/G_1 期细胞所占比例为 77.41%,S 期细胞比例为 22.41%,G_2/M 期细胞比例 2.19%,对照组细胞 Td-EC 细胞 G_0/G_1 期细胞所占比例为 76.97%,S 期细胞比例为 9.21%,G_2/M 期细胞比例 13.62% ($P<0.01$),而 15 μg/100 μl 浓度的 Endostar 对 HUVEC 细胞的细胞周期影响不大($P>0.05$)。



A:HUVEC 细胞; B: Endostar 处理后 HUVEC 细胞; C: Td-EC 细胞; D: Endostar 处理后 Td-EC 细胞

图5 Endostar 对 HUVEC、Td-EC 细胞迁徙的影响 (TUNEL×100)

3 讨论

在抗血管形成机制和药物研究领域,人脐静脉内皮细胞和人微血管内皮细胞被认为是细胞水平分析的标准模型[6],但这些成熟的人普通内皮细胞并不能完全代替肿瘤内皮细胞,所以,找到合适的实验模型应用于药物研究和前期临床试验,对于抗肿瘤研究的发展至关重要。本研究参照国外文献[4]报道方法,采用A549 细胞培养上清刺激 HUVEC 生长的方法来得到肿瘤血管内皮细胞,在与肿瘤细胞上清混合培养环境中,HUVEC 细胞生长环境类似在体肿瘤内血管。有研究表明 A549 细胞上清包含多种生长因子,如 VEGF、bFGF 等,可以导致内皮细胞内 PDGF-β 等表达增加,HUVEC 细胞增殖调控改变,使细胞增生更加活跃[5]。本研究中,HUVEC 与 A549 细胞上清共培养3~5 d 后,探测到细胞表达 TEM1 和 TEM8 等肿瘤血管内皮细胞特异性抗原,透射电镜图像表明细胞出现多核仁、细胞器增多,细胞增生活跃,并通过试验证实 Td-EC 有较强的细胞迁徙能力,与 HUVEC 比较差异显著;细胞周期分析 S 期、G_2/M 期细胞比例远大于 HUVEC 细胞,说明刺激后生成的内皮细胞具有肿瘤血管内皮细胞的特性。所以,Td-EC 作为研究 Endostar 在体外抗血管生成作用机制的研究模型,比 HUVEC 和 HUMEC 细胞更具有代表性,可解决在体肿瘤血管内皮细胞数量少且难于分离的难题,为实现抗肿瘤血管的免疫治疗提供了一种简单易行的方法。

本研究证实 Endostar 在体外对于肿瘤血管内皮细胞有显著抑制作用,在其细胞迁徙、增殖以及凋亡等多方面均有调节作用,我们发现小剂量的 Endostar (15 μg/ml)既可以明显抑制 Td-EC 细胞生长,而对正常内皮细胞影响较小,这对于探讨 Endostar 抑制肿瘤血管的生长有重要意义。很多动物实验都证实[3,7],Endostar 能显著抑制异体瘤的生长,在降低固体肿瘤内血管密度和肿瘤的侵润性,以及抑制血管出芽形成等方面都有显著的作用,但是,对于血管内单个的内皮细胞的作用效应少有报道。本研究在体外实验中发现 Endostar 对肿瘤血管内皮细胞迁徙能力及增殖有显著的抑制作用,并能促进细胞的凋亡,这可能与文献[8]报道 Endostar 能与细胞表面锚定的 Glypicans 蛋白家族相结合有关,Glypicans 是内皮抑素的低亲和度受体,但其可以通过蛋白-蛋白的方式结合为内皮抑素的高亲和度受体,从而激活信号传导通路,抑制基质金属蛋白酶的表达,干扰细胞表面 VEGF 受体的功能,同时下调骆胺酸和磷酸激酶的活性,并干扰抗凋亡物质的生成,这也可能是 Endostar 影响内皮细胞功能的机制。

本研究证实了 Endostar 在体外明显抑制 Td-EC 细胞生长并促进其凋亡,且对正常 HUVEC 影响较小,故能有效异体抑制肿瘤的生长。但 Endostar 的药效特异性及局部药物浓度高低等问题,尚需进一步研究以解决。

参考文献:

[1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1993, 1(1): 27-31.

[2] Li Q, Olsen B R. Increased angiogenic response in aortic explants of collagen XVIII/endostatin-null mice[J]. Am J Pathol, 2004, 165(2): 415-424.

[3] Folkman, J. Tumor suppression by p53 is mediated in part by the anti-angiogenic activity of endostatin and tumstatin[J]. Sci-STKE, 2006, 2006(354): pe35.

[4] Chung I, Wong M K, Flynn G, *et al*. Differential antiproliferative effects of calcitriol on tumor-derived and matrigel-derived endothelial cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8565-8573.

[5] Ahmad S, Ahmad A, Schneider K B, *et al*. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells[J]. Int J Toxicol, 2006, 25(1): 17-23.

[6] Capillo M, Mancuso P, Gobbi A, *et al*. Continuous infusion of endostatin inhibits differentiation, mobilization, and clonogenic potential of endothelial cell progenitors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 377-382.

[7] Streit M, Stephen A E, Hawighorst T, *et al*. Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy[J]. Cancer Res, 2004, 62(7): 2004-2012.

[8] Lakatosova-Andelova M, Duskova M, Lucansky V, *et al*. Effects of endostatin production on oncogenicity and metastatic activity of HPV16-transformed mouse cells: role of interleukin 1alpha[J]. Int J Oncol, 2009, 35(1): 213-222.

(编辑 吴培红)