基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.016

小剂量紫杉醇联合重组人血管内皮抑素对乳腺癌 MCF-7 细胞抑制作用的实验研究

饶明月，张幸平，程　丽，周涛琪，杨　敏，何阳科
（重庆医科大学附属第一医院肿瘤科，重庆　400016）

【摘　要】目的：观察小剂量(40 μg/ml)紫杉醇(Paclitaxel，PTX)联合重组人血管内皮抑素(Recombinant human endostatin，rh-ES)对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长及其血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor，VEGF)表达的抑制作用。方法：实验分为对照组(A 组)、PTX 组(B 组)、rh-ES 组(C 组)及 PTX+rh-ES 组(D 组)。用细胞计数板计数法测定各组药物作用于 MCF-7 细胞 24 h 后的细胞存活数并计算细胞抑制率。免疫细胞化学 SABC 法检测各组 VEGF 蛋白表达，RT-PCR 法检测各组 VEGF mRNA 表达。结果：D 组的细胞抑制率明显高于 C 组(P=0.002)，但与 B 组比较无统计学差异(P=0.57)。D 组的 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达较其余 3 组明显减少，差异具有统计学意义(P<0.05)。细胞抑制率的增加与 VEGF 表达减少之间具有线性相关性(r=0.564，P<0.001)。结论：小剂量 PTX 与 rh-ES 联合应用可明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长及其 VEGF 表达，提示两者联用在抑制肿瘤血管生成方面具有协同作用。

【关键词】乳腺癌；紫杉醇；抗血管生成化疗；重组人血管内皮抑素；血管内皮生长因子
【中国图书分类法分类号】R737.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-12

Inhibitory effect of low-dose paclitaxel combined with recombinant human endostatin on breast cancer MCF-7 cell line

RAO Ming-yue，ZHANG Xing-ping，CHENG Li，ZHOU Tao-qi，YANG Min，HE Yang-ke
(*Department of Oncology，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*：To observe the low-dose(40 μg/ml) paclitaxel(PTX) combined with recombinant human endostatin(rh-ES) in inhibiting the growth of human breast cancer MCF-7 cell line and suppressing the gene expression of vascular endothelial growth factor(VEGF). *Methods*：The experiment had four groups：control group(group A)，group PTX(group B)，group rh-ES(group C) and group PTX + rh-ES(group D). It enumerated the surviving MCF-7 cells after 24 h，which were treated with the four

作者介绍：饶明月(1986-)，男，硕士，
研究方向：肿瘤临床及基础研究。
通信作者：张幸平，女，教授，Email:zhang.xinping@163.com。

对大鼠等小动物的无创性检查上具有其独特的优势，对评价 SD 大鼠肾上腺区人 NB 异种移植瘤造模有较高价值。

参　考　文　献

[1] Teicher B A.Tumor models for efficacy determination[J].Mol Cancer Ther，2006，5(10)：2435-2443.

[2] Pastorino F，Loi M，Sapra P，et al.Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38 (EZN-2208)，a novel topoisomerase I inhibitor[J].Clin Cancer Res，2010，16(19)：4809-4821.

[3] 鹿洪亭，董　蒨，高　强，等.神经母细胞瘤细胞系裸鼠转移模型及局部皮下荷瘤模型的建立[J].中华肿瘤杂志，2010，32(4)：258-261.

[4] 郝希伟，董　蒨，鹿洪亭，等.神经母细胞瘤荷瘤鼠模型建立的实验研究[J].中华小儿外科杂志，2005，26(7)：372-375.

[5] Krieger-Hinck N，Schumacher U，Müller A，et al.The effect of the PPAR-gamma agonist rosiglitazone on neuroblastoma SK-N-SH cells in a metastatic xenograft mouse model[J].Oncol Res，2010，18(8)：387-393.

[6] 廖美焱，周云峰，冯茂辉，等.高致瘤性人肺癌裸鼠模型的建立[J].中华实验外科杂志，2009，26(9)：1216-1217.

[7] 何文飞，何大维，马　超，等.人神经母细胞瘤免疫活性小鼠移植瘤模的建立[J].重庆医科大学学报，2010，35(11)：1627-1629.

[8] Lindskog M，Kogner P，Ponthan F，et al.Noninvasive estimation of tumour viability in a xenograft model of human neuroblastoma with proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS)[J].Br J Cancer，2003，88(3)：478-485.

[9] 何文飞，何大维，马　超，等.C57BL/6j 小鼠异种移植瘤模型的建立[J].中华实验外科杂志，2011，28(1)：145-147.

（责任编辑：冉明会）

methods.Inhibitory rate of cells of the four groups was calculated.The VEGF protein and mRNA expressions were detected by immunocytochemistry and RT-PCR. *Results*:The inhibitory rate of group D was higher than that of group C(P=0.002),but there was no statistic significance of inhibitory rate between group D and group B(P=0.57). When VEGF protein and mRNA expressions were compared between each group,those in group D were significantly lower than in the other three groups(P<0.05). The increased inhibitory rate of MCF-7 cells and the decreased expression of VEGF were in linear correlation(r=0.564,P<0.001). *Conclusion*:Low-dose PTX combined with rh-ES can obviously inhibit the growth of MCF-7 cell line and suppress gene expression of VEGF. Our results demonstrate the combined use of low-dose PTX and rh-ES has synergistic effects in inhibiting tumor growth and angiogenesis.

【Key words】breast cancer;paclitaxel;antiangiogenic chemotherapy;recombinant human endostatin;VEGF

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一，其治疗模式为以手术为主的综合治疗。抗血管生成治疗的深入研究为乳腺癌的合理治疗提供了新思路。重组人血管内皮抑素（Recombinant human endostatin，rh-ES）在治疗非小细胞肺癌[1]中已被证实能通过抑制肿瘤新生血管生成而有效地缩小肿瘤体积，但其在乳腺癌的治疗中少有报道。最近的研究[2,3]还发现，化疗药物紫杉醇（Paclitaxel，PTX）在小剂量、高频率应用下能有效地抑制肿瘤细胞血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的表达、血管内皮细胞增殖及迁移，继而抑制肿瘤新生血管生成。本实验通过研究小剂量 PTX 联合 rh-ES 对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长及 VEGF 表达的抑制作用，为探讨两者联用在抗肿瘤新生血管生成上的作用及其可能的机制提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞株（由成都医学院形态学教研室惠赠）、紫杉醇（江苏奥赛康药业有限公司，100 mg/支，批号 H20064299）、重组人血管内皮抑素（山东先声麦得津生物制药有限公司，15 mg/支，批号 S20050088）。RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司，小牛血清购自杭州四季青公司。兔抗人 VEGF 多克隆抗体及免疫细胞化学 SABC 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。RNAiso Plus、Prime Script RT Kit 均购自大连 TaKaRa 公司，2*Taq PCR Master Mix 购自北京天根生物有限公司，PCR 扩增引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞株培养于含 10%小牛血清、青霉素 100 μg/ml、链霉素 100 μg/ml 的 RPMI 1640 完全培养基，5%CO_2、37℃孵箱培养。细胞呈贴壁生长，隔日换液，2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 实验分组及用药方案 待 MCF-7 细胞处于对数生长期时，常规传代于 50 ml 细胞培养瓶中培养。将传代细胞随机分为 4 组：对照组（A 组）、PTX 组（B 组）、rh-ES 组（C 组）及 PTX+rh-ES 组（D 组），每组 20 瓶。用药方案：根据临床用药剂量经体表面积公式换算后药物终浓度为：PTX 40 μg/ml；rh-ES 15 μg/ml。A 组：PBS 275 μl；B 组：小剂量 PTX 给药一次（PTX 200 μl+生理盐水 75 μl）；C 组：rh-ES 给药一次（rh-ES 75 μl+生理盐水 200 μl）；D 组：小剂量 PTX 及 rh-ES 联合给药一次（PTX 200 μl+ rh-ES 75 μl）。

1.2.3 细胞计数板计数法测定细胞存活数、计算细胞抑制率 取对数生长期细胞，调整细胞悬液浓度为 2×10^5 个/ml。将细胞以每瓶 5 ml 接种于 50 ml 的培养瓶中，待细胞贴壁后再培养 12 h，每组加入相应的药物。用药后细胞培养 7 h 后常规换液，加入不含药物的培养基培养至 24 h，测定各组细胞的数量后，D 组继续培养至 48、72 h。观察各组细胞在用药后 24 h 时的形态学变化，用细胞计数板进行计数、计算细胞抑制率。细胞抑制率=[(对照组细胞数-实验组细胞数)/对照组细胞数]×100 %。继续观察 D 组细胞在用药后 48、72 h 的形态学变化，用细胞计数板进行计数、计算细胞抑制率。

1.2.4 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 表达 将对数生长期的细胞培养于 50 ml 培养瓶内，实验分组及处理同前。各组于处理 24 h 后收集细胞，按照试剂说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA 模板。PCR 扩增引物序列如下：VEGF 上游：CCAGGAAAGACTGATACAGAACG；VEGF 下游：CTCCCAACTCAAGTCCACAGC；扩增长度为 453 bp。GAPDH 上游：AGAAGGCTGGGGCTCATTTG；GAPDH 下游：AGGGGCCATCCACAGTCTTC；产物长度为 258 bp。PCR 扩增条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s、59℃ 30 s、72℃ 30 s，循环 35 次；72℃ 5 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min（电压80 V），凝胶成像系统[Chemi Doc XRS(BIO-RAD)]CCD 拍照，Quantity One 软件对条带灰度值进行分析，以 VEGF 基因与 GAPDH相对浓度的比值反映 VEGF 表达量。

1.2.5 免疫细胞化学 SABC 法检测 VEGF 蛋白表达 将对数生长期的细胞制成细胞悬液，接种于 24 孔板（内置 10 mm×10 mm 玻片，用于细胞爬片）。待细胞贴壁 12 h 后，随机分为 4 组，每组 15 孔。药物浓度同前。根据细胞生长面积调整药物剂量为：A 组 PBS 11 μl；B 组 PTX 8 μl+生理盐水 3 μl；C 组 rh-ES 3 μl+生理盐水 8 μl；D 组 PTX 8 μl+rh-ES 3 μl。每组加入相应的药物后 7 h 常规换液，加入不含药物的培养基培养至 24 h。细胞经 95%乙醇固定后，先予以 0.3%甲醇双氧水阻断内源性过氧化物酶，再将一抗稀释至 1:50 滴

加至细胞爬片表面。于4℃冰箱孵育 20 h 后，再 37℃孵箱复温 45 min，依次加入二抗、SABC 后于 37℃孵箱孵育 20 min。各步骤间均以 PBS 漂洗，最后 DAB 显色。

以 MCF-7 细胞的胞质或包膜中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。在 400 倍光学显微镜下随机取 3 个视野计数网格（114.3 μm×114.3 μm）计数，取其平均数为该爬片的 VEGF 阳性染色细胞数。判定标准：(-)：无阳性染色细胞；(+)：阳性细胞数<25%；(++)：阳性细胞数 25%~50%；(+++)：阳性细胞数>50%。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对各组数据进行统计分析。计量资料用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用秩和检验，多组间两两比较采用 *Dunn* 检验。依据时间变化的数据采用重复测量方差分析。计数资料用秩和检验方法，进行等级相关分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞计数板计数法测定细胞抑制率

细胞计数板计数实验结果显示，小剂量 PTX 和 rh-ES 分别及联合作用于 MCF-7 细胞 24 h 后，细胞生长受到不同程度抑制。根据计算公式得出各组肿瘤细胞的抑制率，见表 1。B 组细胞抑制率为 69.17%，C 组为 27.71%，D 组为 77.03%。结果表明 D 组的细胞抑制率明显高于 A 组及 C 组，差异有统计学意义（*P* 值分别为 0.003、0.002），但与 B 组比较无统计学差异（*P*=0.57）。D 组细胞在用药后不同时间点（24、48 h 及 72 h）的抑制率结果表明，联合用药组的细胞抑制率随着时间的增加而增加（*P*<0.05），见表 2。

表 1 药物作用 24 h 后各组肿瘤细胞的抑制率

组别	例数	肿瘤细胞计数（10^5）$\bar{x} \pm s$	抑制率（%）	*P*值（组间两两比较）		
				A组	B组	C组
A组	20	354.85±69.560	-	-	-	-
B组	20	108.00±14.370	69.17	0.007	-	-
C组	20	255.30±44.670	27.71	0.680	0.008	-
D组	20	80.50±12.305	77.03	0.003	0.570	0.002

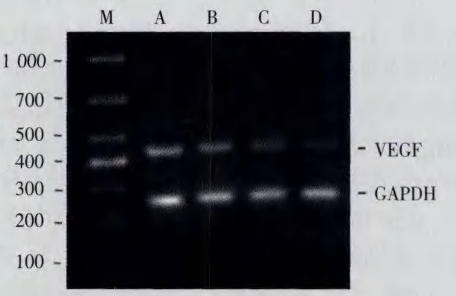
-：无数据

表 2 D 组肿瘤细胞在用药后各时间点的抑制率

时间点	例数	肿瘤细胞计数（10^5）$\bar{x} \pm s$	抑制率（%）	*P*值（组间两两比较）	
				24 h	48 h
24 h	20	80.50±12.305	69.17		
48 h	20	43.03±7.220	86.83	<0.000 1	
72 h	20	6.50±3.060	95.13	<0.000 1	<0.000 1

2.2 各组细胞 VEGF mRNA 表达的差异

图 1 为各组细胞的 VEGF mRNA 经 RT-PCR 扩增、1.5% 琼脂糖凝胶电泳后，凝胶成像系统拍照所得的电泳照片。Quantity One 软件计算出各组平均灰度值分别为：0.891±0.012、0.645±0.012、0.401±0.020、0.211±0.020。经统计学分析后结果表明，B、C、D 组细胞的 VEGF mRNA 表达较 A 组减少（$P<0.05$），D 组的 VEGF mRNA 下调水平较 B、C 组显著（$P<0.05$）。

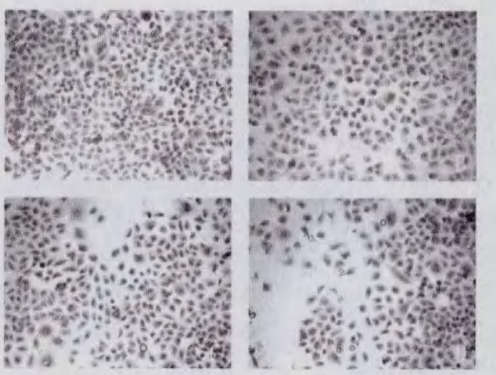


A. 对照组；B. PTX 组；C. rh-ES 组；D. PTX+rh-ES 组

图 1 RT-PCR 检测的各组细胞 VEGF mRNA 表达

2.3 各组细胞 VEGF 蛋白表达的差异

图 2 为各组细胞爬片免疫细胞化学检测 VEGF 的 200 倍照片。VEGF 蛋白主要表达于 MCF-7 细胞的胞质，阳性显色呈棕黄色。从图 2 可见 D 组的 VEGF 表达明显低于其余 3 组。统计学分析的结果显示，C、D 组细胞的 VEGF 蛋白表达均较对照组减少（*P* 值分别为 0.001、0.0001），且 D 组的VEGF 下调水平较 B、C 组显著（*P* 值分别为 0.002、0.01），见表 3。



A. 对照组；B. PTX 组；C. rh-ES 组；D. PTX+rh-ES 组

图 2 细胞爬片免疫细胞化学 VEGF 图（20×10）

表 3 各组细胞 VEGF 蛋白表达的差异

组别	例数	VEGF表达				*P*值（组间两两比较）		
		(-)	(+)	(++)	(+++)	A组	B组	C组
A组	20	0	0	8	12			
B组	20	0	2	10	8	0.220 0		
C组	20	0	7	9	4	0.001 0	0.254	
D组	20	0	13	5	2	0.000 1	0.002	0.01

2.4 细胞抑制率与 VEGF 表达之间相关性分析

相关性分析结果显示，细胞抑制率的增加与 VEGF 表达减少之间具有线性相关性（$r=0.564$，$P<0.001$），提示各组间细胞抑制率越高，其 VEGF 表达程度越低。

3 讨 论

肿瘤新生血管生成是促血管生成因子与抑制因子失衡的结果。Tseng 等[4]证实了 VEGF 是目前已知活性最强、特异性最高的促血管生成因子。Folkman 的研究发现[5]，rh-ES 表面的肝磷脂硫酸结合位点通过与 VEGF 竞争性地结合内皮细胞表面的肝磷脂或乙酰肝素硫酸盐蛋白聚糖，可抑制VEGF 的表达，达到对多种实体肿瘤新生血管生成的抑制作用。

临床上应用细胞毒药物 PTX 化疗时多采用人体最大耐受量：单药为 135~200 mg/m^2，联合用药为 135~175 mg/m^2。Lyons[6]建立的离体乳腺癌组织促血管生成模型发现实验组经小剂量、高频率应用 PTX 后，血管初始形成较对照组减少 69%，血管增长较对照组减少 81%，总体血管生成较对照组减少 94%。

在本实验中，将小剂量 PTX(40 μg/ml)和 rh-ES 分别及联合作用于乳腺癌 MCF-7 细胞，通过观察细胞形态及细胞计数板计数，我们发现各组用药后均能有效地抑制MCF-7 细胞生长。联合用药组的细胞抑制率明显高于 rh-ES 组及空白对照组（P 值分别为 0.002，0.003），但与 PTX 组相比无统计学差异（P=0.57）。提示 PTX 在小剂量应用下仍能有效抑制肿瘤细胞生长，但与 rh-ES 联用尚不能证实在抑制肿瘤细胞生长上具有协同效应。

目前研究表明，PTX 的抗血管生成效应的机制主要是通过下调 VEGF 受体-2[7,8]，以减少 VEGF 的有效表达。Caballero 等[9]选择 33 例对铂类药物耐药的头颈部鳞癌患者，每周应用小剂量 PTX。6 周后患者血清 VEGF 水平至少降低 30%（P=0.01）。我们的实验结果表明，小剂量的 PTX 能一定程度地抑制 MCF-7 细胞 VEGF 的表达，但与对照组比较差异无统计学意义（P=0.22），其原因可能为本实验为离体细胞实验，仅行 PTX 治疗 1 个周期，治疗时间较文献报道的时间短有关。后续研究可在本实验的基础上加做动物实验，增加 PTX 的治疗周期。

本实验证实了 rh-ES 组和 PTX+rh-ES 联合用药组均能抑制 MCF-7 细胞 VEGF 的表达，但联合用药组作用更为显著（P=0.01），提示两者联用对抑制 VEGF 表达具有协同作用。该结果与 Holtz[10]建立的卵巢癌在体实验结果一致。其可能的作用机制为：(1)PTX 在小剂量应用时能下调 VEGF 受体-2 的表达，使其与 VEGF 结合产生的二聚体减少，针对其信号通路中的起始环节，切断信号传导的途径。(2)rh-ES 竞争性地占据 VEGF 结合位点，拮抗 VEGF 表达。两者共同抑制 VEGF 信号通路，关闭血管生成“开关”，抑制肿瘤血管生成，从而达到抑制肿瘤生长的目的。

本研究还发现，各实验组间肿瘤细胞的抑制率越高，其 VEGF 表达程度越低，该结论与文献资料[11]报道一致。这一结论也提示，肿瘤及其血管的生长与 VEGF 表达程度密切相关。其可能的机制[12]为肿瘤细胞分泌的 VEGF 能促进微血管生成，为肿瘤提供更多的营养物质及氧，促进肿瘤的生长及转移。而减少肿瘤细胞 VEGF 的表达，能抑制肿瘤血管生成，从而间接抑制肿瘤生长。

小剂量 PTX 与 rh-ES 联合应用可明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长及其 VEGF 表达，提示两者联用在抑制肿瘤血管生成方面具有协同作用。但我们的实验仅为离体的细胞实验，有局限性，还需要进一步的动物实验研究来证实这一结论。

参 考 文 献

[1] 秦叔逵，刘秀峰，王 林，等.重组人血管内皮抑素与化疗联合治疗肺外晚期恶性肿瘤的临床研究[J].临床肿瘤学杂志，2007，12(10)：728-735.

[2] Wang J，Lou P，Lesniewski R，et al.Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly[J].Anticancer Drugs，2003，14(1)：13-19.

[3] Huang Y，Chen X M，Zhao B X，et al.Antiangiogenic activity of sterically stabilized liposomes containing paclitaxel (SSL-PTX)：in vitro and in vivo[J].AAPS PharmSciTech，2010，11(2)：752-759.

[4] Tseng C S，Lo H W，Teng H C，et al.Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever[J].FEMS Immunol Med Microbiol，2005，43(1)：99-102.

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

[6] Lyons J M，Anthony C T，Thomson J L，et al.A novel assay to assess the effectiveness of antiangiogenic drugs in human breast cancer[J].Ann Surg Oncol，2008，15(12)：3407-3414.

[7] Albertsson P，Lennernas B，Norrby K，et al.On metronomic chemotherapy：modulation of angiogenesis mediated by VEGF-A[J].Acta Oncologica，2006，45(2)：144-155.

[8] Loo W T，Fong J H，Cheung M N，et al.The efficacy of Paclitaxel on solid tumor analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression：a translational research study[J].Biomedicine Pharmacotherapy，2005，59(2)：S337-S339.

[9] Caballero M，Grau J J，Blanch J L，et al.Serum vascular endothelial growth factor as a predictive factor in metronomic (weekly) Paclitaxel treatment for advanced head and neck cancer[J].Arch Otolaryngol Head Neck Surg，2007，133(11)：1143-1148.

[10] Holtz D O，Krafty R T，Mohamed-Hadley A.Should tumor VEGF expression influence decisions on combining low-dose chemotherapy with antiangiogenic therapy? Preclinical modeling in ovarian cancer[J].J Transl Med，2008，6：2.

[11] 汪力慧，李 凯.血管内皮抑素对小鼠体内 Lewis 肺癌血管生成及转移影响的研究[J].中国肿瘤临床，2008，35(10)：587-590.

[12] Jiang H，Tao W，Zhang M，et al.Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice[J].Cancer Invest，2010，28(1)：74-84.

（责任编辑：关蕴良）