恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0546-04

重组人血管内皮抑素联合 NP 方案对人乳腺癌裸鼠移植瘤作用的实验研究

程 丽[1]，张幸平[1]，杨鸿捷[2]，周涛琪[1]，饶明月[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科，重庆 400016；2. 成都医学院基础医学院形态学教研室，成都 610081）

【摘 要】目的：探讨重组人血管内皮抑素（Recombinant human endostatin，rh-ES）联合长春瑞滨＋顺铂（NP 方案）化疗对人乳腺癌裸鼠移植瘤的肿瘤生长及新生血管生成的抑制作用。方法：将 40 只荷瘤裸鼠随机分成 NP 方案组（A 组）、rh-ES 组（B 组）、联合用药组（C 组）和空白对照组（D 组），每组 10 只。A 组给予 NP 方案化疗 1 周期，B 组给予 rh-ES 2 周期，C 组给予 rh-ES 两周期加 NP 方案 1 周期，D 组给予等剂量生理盐水。其中，rh-ES 连续用药 14 d 为 1 周期，间隔 7 d 后重复 1 周期。计算各组抑瘤率，绘制肿瘤生长曲线。肿瘤组织进行免疫组化法染色，测各组血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）及微血管密度（Microvascular density，MVD）的表达。结果：A、B、C 3 组抑瘤率分别为 61.80%、64.79%、88.95%，C 组抑瘤率明显高于其它两组。C 组与 A、D 两组比较 VEGF 表达，具有显著的统计学差异（P 值均为 0.001）。C 组与 A、B、D 3 组比较 MVD，P 值分别为 0.000，0.006 和 0.000，均具有统计学意义。结论：rh-ES 联合 NP 方案化疗能明显抑制人乳腺癌裸鼠移植瘤生长及新生血管生成，且两者联用具有协同作用。

【关键词】乳腺癌；MCF-7 细胞株；重组人血管内皮抑素；血管内皮生长因子；微血管密度

【中国图书分类法分类号】R73-36 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-16

作者介绍：程 丽（1982-），女，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。

[12] Km S W，Rhee J，Ko J，et al.Inhibition of cytosolic phospholipase A2 b annexin I：specific interaction model and mapping of the interaction site[J].J BiolChem，2001，276（19）：151712-151719.

[13] Alldridge L C，Bryant C E.Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the $ERK_{1/2}$ MAPK signal[J].Exp Cell Res，2003，290（1）：93.

[14] 张 毅，孙树汉，陈 蕊，等.一个新的钙磷脂结合蛋白-Annexin32 对血凝及血栓形成的影响[J].中国科学，2002，32（2）：172-175.

[15] Bai X F，Ni X G，Zhao P，et al.Overexpresion of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance[J].World J Gastroenterol，2004，10（10）：1466-1470.

[16] Rao J Y.Targeting actin remodeling profiles for the detection and management of urothelial cancers a perspective for bladder cancer research [J].Front Biosci，2002，7（1）：1-8.

[17] Rrichelt J，Fursten berger G，Magin T M.loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase（MAPK）activation，increased keratinocyle turnover，and decreased tumor formation in mice[J].J Invest Dermatol，2004，123（5）：973-981.

[18] 李 萃，肖志强，章晓鹏，等.人肺鳞癌组织的血清蛋白质组学的比较分析[J].中国生物化学与分子生物学报，2005，21（3）：357-368.

[19] Hoagland L F，Campa M J，Gottlin E B，et al.Haptoglobin and post-translational glycan-modified derivatives as serum biomarkers for the diagnosis of nonsmall cell lung cancer[J].Cancer，2007，110（10）：2260-2268.

[20] Juan H F，Chen J H，Hsu W T，et al.Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques：from mouse to human[J].Proteomics，2004，4（9）：2766-2775.

[21] Huang H L，Stasyk T，Morandell S，et al.Biomarker discovery in breast cancer serum using 2D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays[J].Electrophoresis，2006，27（8）：1641-1650.

[22] 聂赣娟，李茂玉，张鹏飞，等.肺鳞癌患者和健康人血清的差异蛋白质组学研究[J].国际病理科学与临床杂志，2007，27（6）：470-475.

[23] 龙 华，曾 勇，郑 英.转铁蛋白的研究与发展[J].生物工程进展，2001，21（2）：32-39.

（责任编辑：冉明会）

Experimental study of recombinant human endostatin combined with NVB-Cisplatin on human breast cancer xenografts in nude mice

CHENG Li[1], *ZHANG Xing-ping*[1], *YANG Hong-jie*[2], *ZHOU Tao-qi*[1], *RAO Ming-yue*[1]

(*1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Department of Morphology, School of Basic Medical Schence, Chengdu Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the inhibitory effect of recombinant human endostatin(rh-ES) combined with NP treatment on tumor growth and antiagiogenesis in nude mice after xenograft of MCF-7 cell line. *Methods*: 40 nude mice models with human breast carcinoma were divided into group NVB-Cisplatin(group A), group rh-ES(group B), group NVB-Cisplatin + rh-ES(group C)and control group(group D), each group had 10 nude mice. Group A was given NP treatment one cycle. Group B was given rh-Endostatin two cycles. Group C was given NP treatment one cycle combined with rh-Endostatin two cycles. Group D was given normal saline solution respectively. Rh-Endostatin was used two cycles, each cycle for 14 days, two cycles interval 7 days. Tumor inhibition rate (TIR) and growth curve of each group was calculated and plotted. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvascular density (MVD) expression were detected by immunohistochemistry. *Results*: TIR of A, B and C groups were 61.80%, 64.79% and 88.95%. The TIR of group C was obviously higher than other two groups. Compared with VEGF expression, group C was significantly lower than group A and group D (both P were 0.001). Compared with MVD, group C was significantly lower than other three groups. *Conclusion*: Rh-Endostatin combined NP treatment have synergistic effect, they can obviously inhibit tumor growth and angiogenesis.

【Key words】breast cancer; MCF-7 cell line; recombinant human endostatin; VEGF; MVD

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤，居我国城市妇女恶性肿瘤的首位。作为血管生成依赖性实体肿瘤，乳腺癌新生血管在其发生、发展及转移中起着重要作用。因此，针对肿瘤新生血管生成的生物靶向治疗成为乳腺癌治疗的研究热点。

重组人血管内皮抑素(Recombinant human endostatin, rh-ES)是我国学者研发的一种抑制新生血管生成的生物靶向制剂。已有研究表明[1]，rh-ES 对包括肺癌、结直肠癌在内的多种实体肿瘤新生血管有强烈的特异性抑制作用，从而达到治疗肿瘤的目的。本实验采用人 MCF-7 乳腺癌细胞株裸鼠移植瘤动物模型，观察 rh-ES 联合 NP（长春瑞滨 + 顺铂，NVB + DDP）方案化疗对人乳腺癌裸鼠移植瘤模型肿瘤生长及新生血管生成的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 重组人血管内皮抑素注射液（山东先声麦得津生物制药有限公司，15 mg/支，批号 20080902）；长春瑞滨（江苏豪森药业股份有限公司，30 mg/支，批号 081102）；顺铂（云南生物谷灯盏花药业有限公司，10 mg/支，批号：20080601）；VEGF、CD31 抗体、DAB 显色液（武汉博士德）；SP检测试剂盒（中杉金桥，批号：511783A）。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株，由成都医学院生化教研室张涛老师惠赠。培养条件：细胞株生长于含 10%小牛血清（TBD 公司生产）、青霉素 100 μ/ml、链霉素 100 μg/ml、RPMI1640 完全培养基，37℃，5%CO_2 孵箱培养。细胞呈贴壁生长，隔日换液，2~3 d 传代 1 次。

1.1.3 实验动物模型的建立 3~4 周龄 BALB/c-nu/nu 裸鼠 45 只，雌性，体重 18~25 g，购于四川省实验动物检测中心，合格证号 SCXK（川）2008-24，饲养于 SPF 级层流室。取对数生长期 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，浓度为 1×10^7 个/ml，于裸鼠右侧腋窝下注射 0.2 ml。注射后 18~24 d 可见到肿瘤开始生长，并逐渐增大。45 只裸鼠全部成瘤。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 45 只荷瘤鼠全部成瘤后，测量肿瘤最大径（a）和最小径（b），将肿瘤最小径达 2 mm 以上的纳入实验。共有 40 只荷瘤鼠进入实验，随机分成 4 组(随机数字表法)，每组 10 只。肿瘤体积 V（mm^3）=$1/6\pi ab^2$，各组肿瘤平均体积差异无统计学意义（P=0.72）。

1.2.2 实验用药方案 A 组：NP 方案化疗 1 个周期：NVB 10 mg/kg，第 1 天、第 8 天；DDP 10 mg/kg，第 3~5 天。B 组 rh-ES 5 mg/kg，连续用药 14 d 为 1 周期，间隔 7 d 后重复 1 周期；C 组：rh-ES 两周期加 NP 方案 1 周期，给药方法及剂量同前；D 组：生理盐水 0.2 ml/d，给药时间同 B 组。所有药物均用生理盐水稀释至 0.2 ml，给药途径均为腹腔内注射。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肿瘤生长曲线及抑瘤率 自用药前 1 d 起，每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤最大径和最小径，直至实验结束后 1 d。取每组每次测量的肿瘤体积平均值，绘制肿瘤生长曲线，并计算每组抑瘤率（Tumor inhibition rate, TIR）。TIR=（对照组肿瘤

3 讨 论

1971年美国学者 Folkman[3]在乳腺癌研究中，首次系统提出肿瘤生长和转移依赖于血管生成的学说。1996 年 Hanahan 等[4]提出了血管生成的开关平衡假说（Angiogenic switch），认为血管形成是自身存在的血管生长抑制因子，如血管他丁、内皮抑素（Endostatin，ES）与促血管生长因子，如 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子等共同调控的结果。当促进因子的表达水平显著高于抑制因子时，开关打开，血管生成发生；反之血管生成被抑制。此后大量研究发现，ES 是目前公认作用最强的血管生成抑制剂。最近研究发现，ES 对多种肿瘤通过抑制新生血管生长起到抑制肿瘤的作用，尤其是实体肿瘤[1]。其表面的肝磷脂硫酸结合位点可以通过与 VEGF 及成纤维细胞生长因子 2（Fibroblast growth factor-2，FGF-2）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，从而竞争性地抑制 VEGF 的表达，达到抑制血管生长的作用。而 VEGF 是目前唯一特异性作用于血管内皮细胞的一种生长因子。在肿瘤发生、发展过程中，肿瘤细胞通过旁分泌和自分泌方式释放 VEGF，诱导新生血管生成，为肿瘤进一步生长和转移提供条件。有研究表明，在肿瘤、炎症、创伤愈合等病变过程中 VEGF 表达显著升高[5,6]。因此，在肿瘤抗血管生成治疗过程中，ES 主要通过与 VEGF 竞争性地与血管内皮生长因子受体（Vascular endothelial growth factor receptors，VEGFR）结合起到抑制新生血管生成，从而抑制肿瘤的生长和转移。

在乳腺癌的化学治疗中，NP 方案为常用的化疗方案。其中长春瑞滨作用于微管蛋白通过抑制微管形成，诱导微管解聚，使癌细胞分裂中止于有丝分裂中期。顺铂通过与 DNA 链上的碱基作用，引起 DNA 复制障碍，从而抑制肿瘤细胞分裂。两者协同作用于肿瘤细胞，抑制肿瘤细胞的增殖，起到治疗肿瘤的作用。NP 方案作为乳腺癌拯救治疗方案在临床应用中取得了良好的效果[7]。

本研究中，我们观察到 rh-ES 联合 NP 化疗方案治疗人乳腺癌裸鼠移植瘤时，肿瘤生长速度缓慢，肿瘤体积明显较单一用药组小。其抑瘤率为 88.95%，远远高于单一用药组的抑瘤率 61.80%和 64.79%。单用 rh-ES 的抑瘤率为 64.79%，与国内外文献报道[8]的 ES 抑瘤率在 45%~99%之间的结果相似。通过对肿瘤生长曲线的观察，可以看到联合用药组肿瘤生长缓慢，肿瘤生长呈消退趋势，但未观察到文献报道的肿瘤消失现象[9]。

本研究通过比较各组 VEGF 表达情况，从分子水平上证实 rh-ES 通过下调 VEGF 表达起到抑制肿瘤新生血管生成的作用；rh-ES 联合 NP 方案时下调 VEGF 表达的作用尤为显著，说明 rh-ES 联合 NP 方案具有协同作用。其作用机制可能为 NP 方案抑制肿瘤细胞增殖，肿瘤细胞自分泌的 VEGF减少；rh-ES 竞争性占据内皮细胞上 VEGF 结合位点，拮抗 VEGF 表达。两者通过不同方式共同下调 VEGF 表达，达到抑制新生血管生成的作用，从而抑制肿瘤生长。rh-ES 组与 NP 组 VEGF 表达之间无统计学差异，也证实两者均有下调VEGF 表达的作用。rh-ES 组与联合用药组在 VEGF 表达上无统计学差异，提示联合用药时，NP 方案主要抑制肿瘤细胞增殖，而 rh-ES 主要抑制新生血管生成。

通过各组 MVD 的比较，从细胞水平证实：rh-ES 具有抑制新生血管生成的作用，且与 NP 方案联用时，抑制作用更为显著。rh-ES 组与 NP 组 MVD 无统计学差异，证实两者均能抑制新生血管生成。该结论与本试验中各实验组抑制 VEGF 表达情况一致。

因此，本研究结果从分子水平和细胞水平均证实，rh-ES 联合 NP 方案化疗能抑制乳腺癌肿瘤生长及新生血管生成，且两者联用具有协同作用。但本研究未见到肿瘤有消失现象，可能为本实验仅行 rh-ES 治疗两周期，治疗时间较推荐的时间短有关。后续实验可在本实验基础上延长 rh-ES 治疗周期，以观察是否存在肿瘤消失。

参 考 文 献

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

[2] Weidenr N.Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J].Breast Cancer Res Treat，1995，36(2)：169-180.

[3] Folkman J.Tumor angiogenesis：therapeutic implications[J].N Engl J Med，1971，5(21)：1182-1186.

[4] Hanahan D，Christofori G，Naik P，et al.Transgenic mouse models of tumor angiogenesis：the angiogenic switch，its molecular controls，and prospects for preclinical therapeutic models[J].Eur J Cancer，1996，32(14)：2386.

[5] Ye F，Xi G M，Qin B Y，et al.Influence of mild hypothermia on vascular endothelial growth factor and infarct volume in brain tissues after cerebral ischemia in rats[J].Neural Regen Res，2006，1(9)：847-850.

[6] Liu H J，Yang J P，Liu F H，et al.Vascular endothelial growth factor induced angiogenesis following focal cerebral ischemia reperfusion injury in rabbits[J].Neural Regen Res，2006，1(4)：297-301.

[7] 郭 莉，杨顺成.诺维本联合顺铂治疗晚期乳腺癌的疗效分析[J].新疆医科大学学报，2008，31(9)：1214-1217.

[8] 王 东，仲召阳，李增鹏，等.内皮抑素治疗人骨肉瘤裸鼠模型的实验研究[J].中国肿瘤临床，2007，34(1)：52-55.

[9] Yokoyama Y，Dhanabal M，Griffioen A W，et al.Synergy between angiostatin and endostatin：inhibition of ovarian cancer growth[J].Cancer Res，2000，60(8)：2190-2191.

（责任编辑：关蕴良）