维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0261-03

超声激活血卟啉声动力作用对鸡胚绒毛尿囊膜 VEGF 表达的影响

王 静[1],王志刚[1],许川山[1,2],李 攀[1],张群霞[3],张茂惠[3]

(1.重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010;2.重庆医科大学附属第二医院康复医学中心,重庆 400010;
3.重庆医科大学附属第二医院超声科,重庆 400010)

【摘 要】目的:本研究探讨超声激活血卟啉(Hematoporphrin,Hp)声动力作用对鸡胚绒毛尿囊膜(Chorioallantoie membrane,CAM)的血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial cell growth factor,VEGF)表达的影响,为应用声动力疗法(Sonodynamic therapy,SDT)进行抗肿瘤血管新生提供实验基础。方法:种蛋随机分为 4 组,孵育 7d 后建 CAM 模型,随机分为空白组、单纯超声组、单纯 Hp 组、声动力治疗组。各组药物分别加于 CAM 表面的载体上,作用后制备标本,用免疫组化检测各组鸡胚 CAM VEGF 表达情况。结果:与空白组相比,单纯 Hp 组差异无统计学意义($P>0.05$);单纯超声组、声动力治疗组与之差异有统计学意义($P<0.05$);单纯超声组与声动力治疗组之间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:Hp 介导的声动力作用显著抑制了鸡胚绒毛尿囊膜 VEGF 的表达,这可能是其抑制新生血管形成的重要机制。

【关键词】声动力作用;血卟啉;血管生成;绒毛尿囊膜;血管内皮细胞生长因子
【中国图书分类法分类号】Q681 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-18

Effect of sonodynamic therapy with hematoporphrin on the expression of VEGF in chick chorioallantoic membrane

WANG Jing, et al

(*Department of Ultrasonography, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of sonodynamic therapy with hematoporphrin on the expression of VEGF in Chick Chorioallantoic Membrane and provide experimental basis for appling sonodynamic therapy(SDT) on anti-angiogenesis in tumor therapy. *Methods*: The hatching eggs cultured for 7 days were randomly divided into 4 groups: blank control group, ultrasound group, hematoporphrin group, sonodynamic therapy group. The express of VEGF in CAM was detected by immunity histochemistry. *Result*: There were significant differences between control group and ultrasound group($P<0.05$) and also between control group and SDT group($P<0.05$), and between ultrasound group and SDT group($P<0.05$); while no difference between control group and hematoporphrin group($P>0.05$). conclusion The results show that sonodynamic therapy with hematoporphrin has a significant inhibitionary effect on the express of VEGF in CAM and this maybe is the most important mechanism of its anti-angiogenesis effect.

【Key words】 Sonodynamic effect; Hematoporphrin; Chorioallantoie membrane; Angiogenesis; VEGF

生理情况下,新生血管形成主要发生在胚胎发育和女性月经周期内膜修复过程。在某些病理情况下,如损伤修复、炎症等也常伴发血管生成,特别是肿瘤生长和转移与血管生成密切相关。鸡胚 CAM 的二维空间血管结构使其无需特别的准备便能观察微血管结构变化,从而成为 1 个测试促血管或抗血管生长药物公认的实验器官。实验表明 CAM 的微循环已成为 1 个研究癌细胞血液转移的有用模型,从而成功用于肿瘤研究[1]。

Hp 是从血清中提取的一种有机光敏性物质,结构式为 $C_{34}H_{38}O_6N_4$(见图 1),其衍生物具有共同的卟啉核心环 -4 个吡咯大环结构,因侧链不同而形成不同结构的卟啉类衍生物。Hp 及其衍生物可以

作者介绍:王 静(1978-),女,硕士,
研究方向:影像医学与核医学。
通讯作者:王志刚,男,教授,E-mail:wzg62942443@163.com。

基金项目:国家自然科学重点基金(30430230);国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2006AA02Z4F0);重庆市科委自然科学基金项目(渝科发计字 2005-34)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

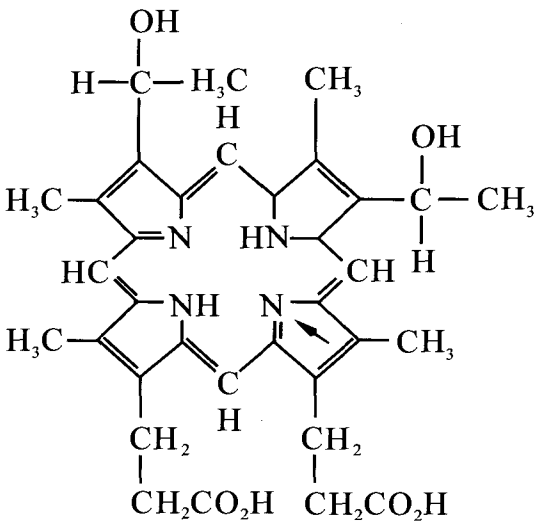


图 1 Hp 分子结构图

在肿瘤、肝、肾、脾、皮肤、骨等组织中选择性聚积并潴留。在正常组织中 Hp 及其衍生物数小时可清除，48～72h 后基本完全清除，但在肿瘤组织中可以滞留数天。关于 Hp 及其衍生物在肿瘤组织中特异性聚积的原理目前还不完全清楚，但此特性有利于 Hp SDT 对肿瘤的治疗[2]。

本研究采用超声辐照加入 Hp 的鸡胚CAM 进行 SDT 实验，观察 CAM VEGF 表达的改变，为探讨 Hp SDT 抑制血管生成的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与材料

1.1.1 种蛋 由重庆市疾病控制中心实验室提供种蛋要求清洁，均匀，表面光滑，蛋壳薄厚适中，蛋形指数为 0.72~0.75。

1.1.2 材料 Hp(sigma 生产)；中速定性滤纸(杭州新华纸业有限公司产品，型号：GBT1914-93)；医用净化台(苏州净化设备有限公司产品，型号：SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台)；隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂产品，型号 PYX-DHS-50 × 65-S)；超声转染仪(重庆医科大学超声影象学研究所自制，型号 UGT1025 型，超声频率为 1MHz，声强范围在 0.25~2.5W/cm² 连续可调。本实验采用 1.5W/cm² 声强，CMB2000 病理图像分析系统。

1.2 实验方法

1.2.1 载体制备 选择中速定性滤纸为载体，用打孔器制成直径为 0.5cm 的小碟片，湿热高压消毒，无菌水浸洗 2 次备用。

1.2.2 CAM 模型建立

1.2.2.1 种蛋的孵育 种蛋先用 1‰新洁尔灭液擦去污渍，再用 75%酒精消毒。随机分为空白组、Hp 组、单纯超声组、声动力治疗组共 4 组，孵育于电热培养箱中，温度 37.8℃，培养箱中放 1 个水盘以保持相对湿度在 40%~70%，并留一通气孔，保证氧气的供应。孵育前培养箱内及室内地面用 84 消毒液消毒 60~120min。孵育中的转蛋：种蛋钝端(大头端)朝上，呈 45° 倾斜，每天转蛋至少 2~4 次，可促进羊膜运动，防止胚胎发生粘连。

1.2.2.2 鸡胚的检查 自制照卵灯，使用聚光射灯光源。每日检查胚胎发育情况，识别胚胎发育的标志特征，随时淘汰死弱精和死胎及胚胎发育不良的种蛋。

1.2.2.3 假气室的制备 孵育第 7d，酒精消毒种蛋气室(大头端)表面 2cm × 3cm 区域，用眼科镊在气室头端钻 1 小孔以减压。用牙科砂轮在蛋壳表面刻划出凹痕，用眼科弯镊小心揭去蛋壳，开 1 个 1.5cm × 1.5cm 的小窗。然后用一次性注射器(1ml)在 CAM 上滴 1 滴生理盐水，用注射器针头透过盐水滴在气室膜上轻轻点刺一下，然后用针头小心推开气室膜并及时用眼科镊夹住，在注射针头协助下，轻轻揭去气室膜，使 CAM 完全暴露。

1.2.3 加药及标本制备 将定性滤纸小碟片，轻轻放置在 CAM 血管较少的部位，Hp 组用微量进样器将浓度为 50μg/ml[3]的 Hp 注射液 20μl 滴入载体中；声动力治疗组加入 Hp 注射液 20μl 后用带水囊超声转染仪辐照 1min；单纯超声组超声辐照 1min。加药后用 ⁶⁰Co 消毒过的透明胶带密封开窗部位，再孵育 3d 后，取出从窗口处加入固定液(甲醇:丙酮 =1:1)，固定 20min 后，用眼科镊、眼科剪等工具小心将绒毛尿囊膜一层分离下来，再平铺在玻片上，阴干保存并拍照。

1.2.4 VEGF 免疫组化 取各组 CAM 标本置于 10%福尔马林溶液中固定后，制作厚度为 5μm 的石蜡切片，进行标准免疫组化染色操作。染色后切片在 CMB2000 病理图像分析系统中用免疫组化定量软件进行定量分析。每张切片随机观察 3 个视野(×200)，用该软件计算平均光密度值，取其平均值作为该切片的平均光密度值。

1.3 统计分析

数据以均数 ± 标准差表示，应用 MATLAB R2007b 统计工具箱软件，采用 t 检验，显著性水平 α 取 0.05。

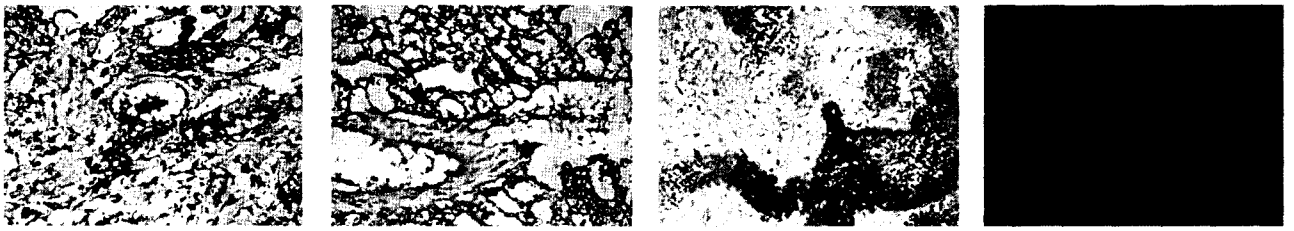
2 结 果

数据显示：与空白组相比，Hp 组差异无统计学意义(P>0.05)；单纯超声组、声动力治疗组与之差异有统计学意义(P<0.05)；单纯超声组与声动力治疗组之间比较，差异有统计学意义(P<0.05)。提示 HpSDT 有明显抑制血管生成作用(见表 1，图 2)。

3 讨 论

许多疾病都与血管不正常增生有十分紧密的

维普资讯 http://www.cqvip.com



空白组　Hp 咻组　单纯超声组　声动力治疗组

图 2　鸡胚组织 VEGF 免疫组化染色结果(10×20)

表 1　HpSDT 对 VEGF 表达的影响

组别	平均光密度
空白组	0.46 ± 0.07
Hp 组	0.40 ± 0.10
单纯超声组	0.26 ± 0.05
Hp 联合超声	0.14 ± 0.07

联系，血管生成的机制及其调控是十分重要的研究课题。血管生成是体内一种非常重要的过程，它不仅涉及再生、创伤愈合等生理过程，还参与糖尿病、视网膜病变、风湿性关节炎和肿瘤生长与侵袭等病理过程。尤其是肿瘤的生长和转移，均依赖于人体内新生血管。

研究表明，在 Hp 存在条件下，超声诱导肿瘤细胞坏死比无 Hp 时明显增多，表明 HpSDT 可以直接杀伤肿瘤细胞，抑制肿瘤生长[4]。针对抗肿瘤血管新生的抗肿瘤治疗可能比针对肿瘤细胞本身的治疗更为有效[5]，这是因为：(1)根据肿瘤细胞的起源和肿瘤生长的特性，肿瘤实际上是一大类不同的疾病。单一针对肿瘤细胞的化疗药物往往只能对单个或数个相类似肿瘤的治疗有效。而抗肿瘤血管新生的药物却能抑制所有富含血管新生的肿瘤生长。(2)针对肿瘤细胞的化疗药物作用机理是：抑制或阻断肿瘤在某一特定肿瘤发展阶段某一基因产物的产生或表达。所以临床常需联合化疗用药。即便这样，也往往不能够真正阻止肿瘤的发展。因为，肿瘤基因的突变组是极不稳定的。肿瘤组基因突变不断发生，基因表达产物发生变化，肿瘤原发灶和转移灶的特性由此经常发生改变。频繁的肿瘤生物特性的改变使针对原基因突变产物的药物很快失去效用。然而，肿瘤血管生成的基因组是稳定的，所以化疗药物耐药性的问题不会发生在抗 VEGF、抗肿瘤血管生成的治疗中。(3)一些血管新生相关因子细胞效用蛋白只表达在新生的血管内皮细胞，不表达于静止的血管内皮细胞和其他细胞。这包括 VEGF 受体、angiopoietin、ephrons 和一些特异性粘附因子。由于它们惟一作用于新生的血管内皮细胞，所以较少有化疗药物常见的副作用，如骨髓抑制、胃肠症状、脱发等。(4)肿瘤血管新生与肿瘤转移的发生密切相关。肿瘤富含新生血管，易发生远隔转移，临床预后差。另外，早期的肿瘤细胞团除非有血管系统新生，否则不会形成真正的肿瘤块。针对肿瘤血管的治疗不仅抑制原发灶的生长，也抑制肿瘤的扩散和转移[6]。

筛选血管生成活性物质可利用内环境与人体相似且血管新生的过程易于观察的动物模型来检测[7]。常用模型有兔或大鼠的角膜囊模型、地鼠颊囊模型和鸡胚绒毛尿囊膜模型。其中 CAM 模型简便易行、周期短、计数指标客观成熟并具有良好的重复性，可定性定量地检测不同组织或细胞系分泌成分及生物因子等对血管的作用，成本较低，易于大样本重复等特点而得到了广泛应用[8]。为此，我们采用经典的研究血管形成的模型 -CAM 模型来进行 HpSDT 的抗血管形成实验，观察其对 CAM 血管生长因子的影响。研究药物对鸡胚血管生成的影响多选择在受精鸡蛋孵化第 6 ~ 9d 进行。因此期间 CAM 上毛细血管密度不断增大，血管生长较为旺盛，超过此期血管生成基本停止，故本实验利用孵化第 7d 的 CAM 血管生成模型。本实验中，对鸡胚 CAM 进行超声辐照的方法为无气水囊包裹超声转染仪的探头，通过鸡胚开窗处接触载药滤纸片，效果较好。无论血管生成是在生理还是病理条件下，血管内皮细胞的激活是血管生成的第 1 步。局部组织的缺血和缺氧可激活各种来源的细胞因子，从而可迅速的激活内皮细胞。VEGF 是迄今为止发现的作用最强的血管生成促进因子，可以有效地促进内皮增殖、内皮细胞趋化，提高血管渗透性。目前已发现至少

(下转第 273 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

结果提示环境类雌激素的促有丝分裂作用主要通过影响 Bcl-2 途径而实现的。

3 讨 论

MCF-7 细胞为雌激素受体阳性，雌激素是其有效的促有丝分裂剂[5]。本次实验观察了 5-BDE 对 MCF-7 细胞增殖的影响，并对其生物活性的分子生物学作用机制进行了探讨。结果表明，在 1×(10^{-8}~10^{-4})mol/L 浓度范围内，5-BDE 可显著促进 MCF-7 细胞增殖，此效应存在良好的剂量－效应和时间－效应关系。免疫组化和 RT-PCR 结果显示，5-BDE 同雌激素类似可促进 MCF-7 细胞 Bcl-2 和抑制 Bax mRNA 及蛋白质的表达。

细胞凋亡在多细胞有机体的发育和生长过程中起着重要的调节作用。1994 年，Reed 等确认了 Bcl-2 为一个重要的细胞凋亡调节癌蛋白，其表达在肿瘤组织往往增高，该基因通过抑制肿瘤细胞凋亡、延长肿瘤细胞生命周期而促进肿瘤组织的生长作用[6]。Bax 属于 Bcl-2 家族，但其作用与 Bcl-2 相反，Bax 的主要功能是抑制细胞增殖、促进细胞凋亡，并对 Bcl-2 的功能有重要调节作用。Bax 和 Bcl-2 构成一对负反馈调节因子，二者的平衡是决定细胞死亡或存活的重要因素，因此 Bax/Bcl-2 蛋白表达比例有着重要的生理意义。本次结果表明，5-BDE 同雌二醇类似，可上调 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达并抑制 Bax 的表达，使 Bax/Bc1-2 比值降低，从而抑制细胞凋亡的发生，向细胞增殖的方向发展。此结果也提示，外源性类雌激素对细胞癌基因具有调节作用，因而对相关肿瘤的发生、发展有一定的影响。

参 考 文 献

[1] Clarke R, Hilakivi-Clarke L, Trock B. Breast cancer: dietary and environmental oestrogens[J]. Biologist, 2001; 48(1): 21-26.

[2] WHO. Environmental health criteria: brominated dipheny ethes [M]. World Health Organization, 1994.162.

[3] Damerud PO, Eriksen GS, et al. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology[J]. Environ Health Perspect, 2001; 109(S): 49-68.

[4] Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, et al. Flame retardants: Persistent pollutants in land-applied sludges[J]. Nature, 2001; 412: 140-141.

[5] Gadd SL, Hobbs G, Miller MR. Acetaminophen-induced proliferation of estrogen-responsive breast cancer cells is associated with increases in c-myc RNA expression and NF-kappaB activity [J]. Toxicol Sci, 2002; 66(2): 233-243.

[6] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994; 124(1-2): 1-6.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 263 页)

有 20 种以上的生长因子作用于血管内皮细胞，其中多种生长因子是通过诱导 VEGF 表达实现的[9]。VEGF 作用于相应的受体，不仅促进内皮细胞的增殖和迁移，还诱导生成一些降解基底膜的蛋白水解酶及表达某些整合素。VEGF 在血管生成中发挥了十分重要的作用。本实验 CAM 血管生成模型表现出的抗血管生成作用，推测其作用机理可能是抑制了血管生成相关因子如 VEGF 的表达，进而抑制了血管生成。因此对 CAM 血管进行了 VEGF 的免疫组化标记，并计数，结果表明 HpSDT 组 VEGF 要少于其他组。但目前 SDT 的机制还不明确，还需作进一步的研究。

本实验证实，Hp 介导的声动力作用可显著抑制 CAM 的 VEGF 表达，从而抑制新生血管形成。

参 考 文 献

[1] 姚 昶，薛 涛，朱永康，等.鸡胚绒毛尿囊膜模型在微血管实验研究中的应用[J]. 微循环学杂志，2005；15(4)：70-73.

[2] 许以伴，陈爱军，刘鼎新，等. H-Hp 衍生物在载瘤小鼠体内的分布[J]. 白求恩医科大学学报，1985；11(2)：126-128.

[3] 石焕文，尚志远，谢 娟，等.超声声化学激活 Hp 效应的研究[J]. 声学技术，2000；19(4)：193-196.

[4] Uchida T, Tachibana K, Hisano S, et al. Elimination of adult T cell leukemia cells by ultrasound in the presence of porfimer sodium[J]. Anticancer Drugs, 1997; 8(4): 329-335.

[5] 许川山，王志刚，虞乐华，等.肿瘤声动力学疗法的研究现状与展望[J]. 临床超声医学杂志，2005；7(1)：37-38.

[6] 李 军，俞 兰.VEGF、肿瘤血管再生及抗肿瘤血管生成治疗[J].医师进修杂志(外科版)，2004；27(4)：52-54.

[7] 王淑美，徐晓玉，陈伟海，等. 26 种活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[J]. 重庆医科大学学报，2006；31(3)：401-407.

[8] 张树成，吴志奎，王 蕾，等. 研究中药血管生成活性和作用的鸡胚绒毛尿囊膜实验模型的应用[J]. 中国中医基础医学杂志，1999；5(5)：16-19.

[9] Roberts WG, Palade GE. Neovascular induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated[J]. CancerRes, 1997; 5(7): 765-772.

(责任编辑：冉明会)