DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.010
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

文章编号:1000-5404(2003)22-1989-03

论著

重组 endostatin 抑制小鼠膀胱癌生长及血管形成研究

潘进洪,王 亮,金锡御,宋 波 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察内源性血管形成抑制剂(endostatin)对膀胱癌生长的抑制作用。方法 用大肠杆菌表达重组小鼠 endostatin,Ni-NTA 亲和层析纯化。予 endostatin 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}皮下注射 T739 膀胱癌荷瘤小鼠,观察肿瘤生长情况及对肿瘤血管形成的影响。结果 重组 endostatin 治疗后小鼠肿瘤生长缓慢,抑瘤率达 81.4%;肿瘤微血管密度(MVD)明显低于对照组($P<0.01$)。结论 重组 endostatm 对膀胱癌的血管形成及生长有明显的抑制作用。

关键词:endostatim;血管形成;膀胱癌
中图法分类号:R394-33;R730.23;R737.14 文献标识码:A

Effects of recombinant endostatin on the growth and angiogenesis of mouse bladder cancer

PAN Jin-hong, WANG Liang, JIN Xi-yu, SONG Bo (Center for Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of endogenous angiogenesis inhibitor endostatin on the growth of bladder transitional cell carcinoma. Methods Recombinant mouse endostatin expressed by *E. coli* was purified with Ni-NTA affinity chromatography and was administrated into mice bearing T739 bladder transitional cell carcinoma *via* subcutaneous injection at the dose of 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}. The tumor growth and angiogenesis were observed 10 days later. Results Tumors in mice treated with endostatin grew slowly and the inhibition rate reached 81.4%. Microvessel density(MVD) of tumor in treated group was significantly lower than that in the control group($P<0.01$). Conclusion Recombinant mouse endostatin can markedly suppress bladder cancer growth and angiogenesis.

Key words: endostatin; angiogenesis; bladder cancer

肿瘤生长对血管形成有极大的依赖性,肿瘤血管不仅为肿瘤的生长提供营养,同时还是肿瘤转移的重要通道。Endostatin 是近年来新发现的一种强大的内皮细胞生长抑制因子,为观察 endostatin 对膀胱癌生长和血管形成的抑制作用,我们用大肠杆菌表达重组小鼠 endostatin,Ni-NTA 亲和层析纯化后的蛋白,治疗 T739 膀胱癌荷瘤小鼠,观察它对膀胱癌血管形成及肿瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pTB01 #8,由美国哈佛大学儿童医院 Folkman 实验室 Boehm 博士惠赠,系将小鼠 endosatin 全长 cDNA 克隆于原核表达载体 PET11d 多克隆位点中的 NdeⅠ及 NheⅠ位点上构建而成;Ni-NTA 亲和层析柱,购自 Qiogen 公司;异内基硫代一 B-D 半乳糖苷(IPTG),购自 Sigma 公司。兔抗鼠 endostatin 多克隆抗体,由 Boehm 博士惠赠,鼠抗人 CD34 单抗,羊抗鼠二抗及 DAB 显色试剂,均购自福州迈新公司;T739 小鼠由第二军医大学动物所提供;膀胱癌 T739 细胞引自南京铁道医学院[1];细胞培养及其它常规试剂购自本校基础医学部分子遗传学教研室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T739 细胞接种于 25 ml 培养瓶中,1640 培养基,加 10%小牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml,于 37 ℃、5%CO_2、95%CO_2 孵箱中培养,2~3 d 更换培养液。90%融合时用 0.1%胰酶/EDTA 消化传代。

1.2.2 重组小鼠 endostatin 的表达纯化及鉴定

1.2.2.1 重组小鼠 endostatin 的表达及纯化 将 pTB01 #8 原核表达载体转染大肠杆菌 BL21(DE3),37 ℃、LB 中培养,当 OD 值达 0.8~1.0 时加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h,离心取湿菌,用 8 mol/L 尿素溶解湿菌,Ni-NTA 过柱吸附,用不同 pH 值

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800168)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(39800168)
作者简介:潘进洪(1967-),男,云南省罗平县人,博士,主治医师,讲师,主要从事膀胱癌的基础和临床方面的研究。电话:(023)68754186
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2002-08-12;修回日期:2003-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的8 mol/L尿素缓冲液梯度洗脱进行蛋白纯化，纯化后的蛋白置于透析袋(MWCO=6 000~8 000)，于4 ℃在PBS中透析过夜，离心获取重组endostatin蛋白，重悬于PBS中，-20 ℃保存备用。

1.2.2.2 重组小鼠endostatin的鉴定 采用SDS-PAGE电泳、凝胶薄层扫描检测重组蛋白表达情况；免疫印迹(Western blot)法对重组蛋白进行定性分析；一抗为兔抗鼠endostatin多克隆抗体，二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG，将蛋白质转移至醋酸纤维膜上进行免疫印迹。

1.2.3 动物实验

1.2.3.1 动物分组 取4周龄小鼠16只，雌雄各半，体质量(18.5±0.6)g，随机分为治疗组及对照组，每组各8只，两组小鼠间体质量无明显差异。

1.2.3.2 肿瘤细胞接种 消化处于对数生长期的T739细胞，台盼蓝染色，计数，并用生理盐水调整细胞浓度为1.0×10^7个细胞/ml。以1.0×10^6个细胞/0.1 ml生理盐水于小鼠右侧胁部皮下注射。于种植后第5天开始，治疗组小鼠给予重组小鼠endostatin 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}，于远离肿瘤处皮下注射，对照组小鼠注射等量PBS。

1.2.3.3 观察指标 ①肿瘤生长情况：隔日测量肿瘤体积，肿瘤体积=$0.5\times a\times b^2$，其中a为肿瘤最大径，b为最小径，绘制肿瘤生长曲线。并计算抑瘤率，抑瘤率=(对照组肿瘤增加体积-治疗组肿瘤增加体积)/对照组肿瘤增加体积×100%；②肿瘤微血管密度(MVD)测定：采用免疫组化S-P法染色血管内皮细胞。肿瘤组织石蜡包埋，一抗为鼠抗人CD34单克隆抗体，按说明书操作，DAB显色，苏木精复染。微血管密度测定方法：CD34染色阳性的单个内皮细胞或一簇内皮细胞作为一个微血管，排除肿瘤坏死区及边缘反应区，在200倍视野下记数3个血管密度最高区域(热点)的微血管数目，其平均值即为肿瘤的微血管密度(MVD)。③毒性反应：包括动物的体质量、精神、食欲、毛色及有无消化道症状等。

1.3 统计学方法

采用t检验。

2 结果

2.1 重组小鼠endostatin的表达纯化及鉴定

SDS-PAGE电泳显示，加入IPTG诱导后1 h，可见大肠杆菌BL21(DE3)内有相对分子量22×10^3的重组蛋白表达，诱导后4 h达到高峰值。凝胶扫描仪薄层扫描显示，重组蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达量高达28.2%，是最高峰蛋白，纯化后获取的重组蛋白纯度达95%以上，其中含少部分二聚体。免疫印迹显示该蛋白与鼠endostatin多克隆抗体呈阳性反应，表明此蛋白即为重组鼠endostatin。表明使用大肠杆菌，IPTG诱导表达、Ni-NTA亲和层析纯化获取重组endostatin，具有表达量大、纯化效率高、纯度高的优点，是一种较好的方法。

2.2 肿瘤生长情况

重组小鼠endostatin治疗组小鼠肿瘤体积增长缓慢，对照肿瘤体积增长迅速(肿瘤的生长情况见图1)。治疗组的抑瘤率达81.4%。动物处死后解剖显示，重组小鼠endostatin治疗组小鼠肿瘤明显小于对照组，肿瘤色泽苍白，表面血管细小，而对照组肿瘤颜色红润，表面有粗大的肿瘤血管。

2.3 对肿瘤MVD的影响

用内皮细胞特异性抗体，经免疫组化显色后，计数肿瘤组织内的微血管密度，重组小鼠endostatin治疗组MVD为8.2±1.2，对照组MVD为29.2±3.9，治疗组较对照组MVD明显低于对照组($P<0.01$)。

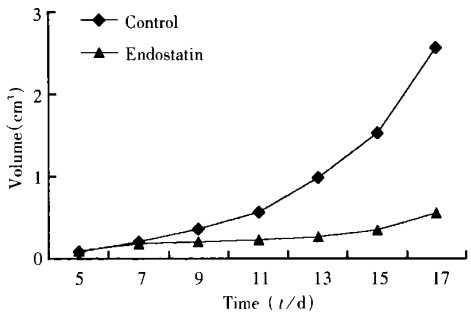


图1 肿瘤生长曲线

Fig 1 Growth curve of tumor

2.4 毒性反应

治疗组小鼠精神、食欲良好，无脱毛、消瘦、腹泻等毒性反应，体质量略有增加。

3 讨论

血管形成在恶性肿瘤的生长和浸润转移中具有非常重要的作用，新生血管不仅为肿瘤的生长提供营养，同时还是肿瘤转移的重要通道。细胞恶变后，如果仅依靠周围组织渗透提供营养，则肿瘤在长到直径3 mm左右即无法继续生长，新生血管长入后则肿瘤生长明显加快，同时，由于新生血管管壁结构不完整，为肿瘤细胞进入血液循环，形成转移提供了通道。Folkman等[2]于1971年首次提出利用切断肿瘤血供的方法治疗恶性肿瘤的设想。经过对肿瘤血管形成机制近30年的研究，发现了大量促进肿瘤血管形成及抑制肿瘤血管形成的细胞因子，在多种天然及合成的血管形成抑制剂在研究上取得了巨大的进步。某些药物已进入Ⅱ期或Ⅲ期临床实验阶段，抑制肿瘤血管形成的治疗方法正逐渐成为继手术，放疗，化疗后的一种新兴的，极有发展前景的治疗手段。

血管形成受血管形成诱导因子及抑制因子的调控，生理情况下抑制因子占绝对优势。在肿瘤发展过程中，由于血管形成诱导因子产生过多和/或抑制因子产生减少，启动血管形成，其中，前者起主导作用。现在已知的内源性血管形成诱导因子至少有20种以上，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其中 bFGF 与 VEGF 分布广、作用强, 在多数肿瘤的血管形成中起重要作用[3]。

Endostafin 是 X、Ⅷ型胶原 C 末端的 184 个氨基酸片段[4], 是目前所发现的作用最强的血管形成抑制剂。体外实验显示它能特异性抑制内皮细胞增殖与迁移, 但无细胞毒性作用, 也不影响成纤维细胞及肿瘤细胞的增殖; 在鸡胚尿囊膜实验中能明显抑制血管形成。动物实验显示 20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 重组 endostatin 对皮下种植的小鼠 Lewis 肺癌、黑色素瘤及纤维肉瘤的血管形成及肿瘤生长与转移有很强的抑制作用, 能使转移瘤稳定于休眠状态, 使体积 200 ~ 300 mm^3 的原发肿瘤迅速缩小到显微水平, 抑瘤率达 99% 以上。

Boehm 等[5] 在进一步实验中观察到 endostatin 使体积更大的肿瘤(350 mm^3 以上)缩小至显微水平, 反复使用 4 ~ 6 个疗程, 肿瘤仍不出现耐药性, 停药后长期稳定于休眠状态。Endostatin 基因转染发现其对原发肿瘤生长及人工形成的肺转移有非常显著的抑制作用。其后 Dhamabal 等[6] 发现, 重组小鼠 endostatin 虽可明显抑制小鼠肾癌的生长, 但并不能使已形成的原发肿瘤缩小。Endostatin 单独或与 angiostatin 基因联合转染均发现, 其对肿瘤的生长及肺转移的发生都有显著的抑制作用[7]。

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 与其它实体肿瘤一样, 膀胱癌的浸润性生长与转移也有赖于血管形成, 动物实验表明, 抗血管形成能抑制膀胱癌生长[8]。有关 endostatin 对膀胱癌作用的研究, 目前未见报道。本实验结果表明, 重组小鼠 endostatin 对膀胱癌的血管形成有显著的抑制作用, endostatin 治疗组 MVD 明显低于对照组; 对肿瘤生长有明显抑制作用, 抑瘤率为 81.4%, 较前述报道作用弱, 这可能与肿瘤类型和(或)重组 endostatin 的活性不稳定有关。

Endostatin 是一种内源性血管形成抑制剂, 抗肿瘤效果好, 无明显毒性反应, 不产生耐药性, 可以长期使用, 配合手术及传统的放化疗使用, 可能会取得很好的效果。最近, 有活性的重组人 endostatin 表达获得成功, 将于近期开始临床实验[9]。相信对 eodostatin 的进一步研究有可能在肿瘤的治疗上取得突破性进展。

参考文献:

[1] 蒋　锋, 周性明, 张忠林, 等. 可移植性小鼠膀胱移行细胞癌模型的建立[J]. 中华泌尿外科杂志, 1993, 14(2): 184－186.

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 11824－11826.

[3] Kathleen R. The basic science underlying antiangiogenic therapies[J]. Biochimi Biophys Acta, 1998, 1378(2), 27－31.

[4] O' Reilly R S, Boehm T, Shing C, *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2)277－285.

[5] Boehm T, Folkman J, growder T, *et al*. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. Nature, 1997, 39(6658): 404－407.

[6] Dhamabal M, Ratachandran R, Volk R, *et al*. Endostatin: yeast production, mutants and antitumor effect in renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 404－407.

[7] Liu W M, Hu D E, Liang L, *et al*. Single or double transfection of angiostatin and endostatin genes affect mammary tumor growth, lung metastasis and structural and perfused vessels[J]. Int J Radiat Oncol Biol Physiol, 2001, 51(3 Suppl1): 152－158.

[8] Osawa S, Terashima Y, Kimkura G, *et al*. Antitumor effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumors induced by N-butyl N (4-hydroxybutyl) nitrosamine[J]. BJU Int, 1999, 83(1): 123－128.

[9] Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, *et al*. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(2): 345－352.

(编辑　郭建秀)

(上接 1985 页)

洁、干燥, 避免大小便污染。切口附近若被尿液浸湿, 应及时更换敷料, 防止切口感染。

2.2.4　观察阴囊有无水肿　　本组有两例患者出现阴囊水肿, 经对症处理后水肿消退。

2.2.5　尿管护理　　注意引流通畅, 定时冲洗膀胱, 预防泌尿系感染。

2.2.6　防止腹内压增高　　如病人有咳嗽及时对症治疗, 咳嗽时协助病人用手按压切口部位。询问病人排便情况, 便秘者应及时给予缓泻剂。

2.3　出院指导

本组有 5 例患者未拆线出院, 嘱患者术后 7 d 到医院复诊拆线。注意休息: 出院后仍应适当休息, 逐渐增加活动量, 3 个月内避免重体力劳动。饮食方面: 多吃营养丰富的食物, 多吃蔬菜、水果, 保持大便通畅。防止感冒和咳嗽, 有排尿及排便困难应及时治疗, 防止复发。

关键词: 护理; 无张力疝修补术; 腹股沟疝
中图法分类号: R656.21　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 马颂章, 李燕青. 疝环充填式无张力疝修补术[J]. 临床外科杂志, 1998, 6(4): 234.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net