DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.011
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
272 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0272-04

血管生成抑制剂 TNP-470 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 及其移植瘤生长的影响

杜琳琳,卞修武,陈意生,史景泉 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察 TNP-470 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 体内和体外生长的影响。方法 采用 MTT 法、软琼脂克隆法、流式细胞仪、光镜和透射电镜技术观察 SHG-44 细胞体外增殖、克隆形成、细胞周期和形态学变化及异种移植瘤生长情况。结果 20~2 000 ng/ml TNP-470 可显著抑制 SHG-44 细胞体外增殖,克隆形成率显著降低,G_0/G_1 期细胞明显增多,S、G_2/M 期细胞减少。采用 30 mg/kg 体重 TNP-470 隔日皮下注射后,移植瘤体积缩小、重量显著减轻,组织出现明显凋亡细胞和坏死。结论 TNP-470 对 SHG-44 细胞的生长抑制作用与其调控细胞周期和诱导细胞凋亡相关,提示 TNP-470 作为一种血管生成抑制剂对胶质瘤细胞生长也具有直接抑制作用。

关键词:TNP-470;细胞周期;凋亡;胶质瘤
中图法分类号:R329.28;R730.264;R979.19 文献标识码:A

Inhibitory effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 on growth of a human malignant glioma cell line SHG-44 and its xenografted tumor

DU Lin-lin, BIAN Xiu-wu, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective** To investigate the effects of TNP-470 on the growth of a human malignant glioma cell line SHG-44 *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The colorimetric MTT assay, soft agar culture, flow cytometry, light and electron microscopy were used to determine the proliferation, the cloning efficiency, cell cycle and the morphological changes of SHG-44 cells as well as the growth of its xenografted tumor. **Results** TNP-470 (20~2 000 ng/ml) significantly inhibited the proliferation of SHG-44 cells *in vitro* (the 50% inhibitory concentration was 200 ng/ml). Cloning efficiency reduced obviously. The number of cells in G_0/G_1 phase increased, while that in S, G_2/M phases decreased significantly. Weight and volume of xenografted tumors treated with TNP-470 (30 mg/kg, injected subcutaneously every other day) reduced notably. Furthermore, there were necrotic area and apoptosis in the tumor. No severe side effect of TNP-470 was found in this study. **Conclusion** The inhibitory effect of TNP-470 on the growth of SHG-44 cells correlates with its functions of regulating cell cycle and inducing apoptosis, which suggests that the angiogenesis inhibitor TNP-470 has strong inhibitory effect on human malignant gliomas.

Key words: O-(chloroacetyl-carbamoyl)fumagillol (TNP-470); cell cycle; apoptosis; glioma

实体瘤的生长和转移都依赖于血管生成(Angiogenesis)[1]。因此,若能阻止肿瘤组织内血管生成,也就可能抑制肿瘤的生长。近20年来,已发现多种化合物可不同程度地抑制肿瘤血管的生成,但绝大多数都因疗效太低和(或)毒性太大而不能用于临床。TNP-470以其高效低毒的特性被认为是目前最有前途的血管生成抑制剂,但它对瘤细胞本身的直接作用尚少报道。本研究通过观察TNP-470对人恶性胶质瘤细胞系SHG-44及其异种移植瘤生长的影响,探讨TNP-470抗胶质瘤作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 方法

1.1.1 细胞生长曲线测定 人恶性胶质瘤细胞系SHG-44引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室,按照我室常规方法培养[2]。取对数生长期细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(Gibco公司)配成1×10^4/ml细胞悬液,分别接种于6孔培养板中,每孔2 ml。TNP-470(日本Takeda Chemical Industries, Ltd惠赠)用二甲基亚砜溶解,浓度为100 mg/ml,用完全培养基稀释后过滤,取100 μl加入各孔内使其终浓度分别为20、200、2 000 ng/ml,另设相应对照孔加PBS,各浓度设4个复孔。各个样本做16个平行孔,每天取4孔弃培养液,PBS洗3次后,用0.25%胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,0.5%台盼蓝染色后计数,连续进行4 d,取均数绘制细胞生长曲线。

1.1.2 噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖指数 取对数生长期细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化,用完全培养基制成2×10^4/ml细胞悬液,于96孔培养板接种100 μl/孔,培养24 h后加入TNP-470溶液100 μl,使其终浓度同上。培养72 h后,吸去上清,加MTT(Fulka公司,2.5 mg/ml)25 μl,孵育3~4 h,在各孔中加入10%十二烷基硫酸钠(SDS)100 μl,继续孵育至细胞中形成的蓝紫色结晶物彻底溶解,振荡后在Bio Rad 3550型酶标仪上测波长595 nm处吸光度(*A*)值。实验重复3次取均值。

1.1.3 细胞软琼脂培养试验 采用双层软琼脂培养法。6孔培养板内加入完全RPMI-1640培养基稀释的琼脂,底琼脂浓度为0.6%,顶琼脂浓度为0.3%,分别接种经不同浓度TNP-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570295)
作者简介:杜琳琳(1969-),女,山西省介休市人,博士,讲师,主要从事胶质瘤诱导分化和血管生成方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752247
通信作者:卞修武(Email:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2000-08-29;修回日期:2001-02-08

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

470 处理 3 d 的瘤细胞 5×10^3 个, 另设相应对照组, 每组设 4 个复孔, 培养 14 d, 常规显微镜下记录≥20 个细胞的克隆数及克隆形成率。

1.1.4　流式细胞仪分析细胞周期　　取对数生长期细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化后制成 2×10^4/ml 细胞悬液, 分别接种于 25 ml 培养瓶中, 培养 24 h 后, 加入 TNP-470(终浓度为 200 ng/ml), 分别于 6、24、72 h 收集细胞, 离心、沉淀后, 在振荡条件下加入 70%乙醇至 1 ml, 固定 30 min, 用 PBS 洗 1 次后加入 RNA 酶, 37 ℃温育 30 min, 放入冰浴中消化。碘化丙锭(PI)染色 2 h, FACStar^{plus}型流式细胞仪检测细胞周期。

1.1.5　光镜和电镜观察　　上述培养细胞除倒置显微镜下观察外, 尚进行常规 HE 染色和常规电镜制样, 分别于光镜和 JEM-2000EX 型透射电镜下观察。

1.2　体内实验

采用我所卞修武等建立的人恶性胶质瘤裸鼠移植瘤模型 TMMC-G。动物为我校实验动物中心引进的近交系 BALB/c nu/nu 无胸腺裸小鼠。鼠龄 5~7 周, 体重 16~22 g, 饲养于净化室内。实验时按无菌规则操作。将裸鼠随机分为 TNP-470 处理组和生理盐水对照组, 每组各 6 只。每组均在胸前部皮下接种移植瘤细胞悬液 0.2 ml(约含 1×10^7 个细胞)。接种后第 7 天治疗组开始皮下注射 TNP-470 30 mg/kg 体重(TNP-470 按文献[3]方法配制), 隔日 1 次; 对照组只给予等体积等渗盐水。分别于治疗后第 7、14、21、28 天测其体重与瘤体积。于接种后第 35 天终止观察, 活杀取材(移植瘤、脑、心、肝与肾), 取瘤组织进行光镜、电镜检查, 并取部分组织于液氮中冻存。体积按公式计算: 体积=$0.5\times a\times b^2$(mm^3)(a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。

1.3　统计学处理

以 $\bar{x}\pm s$ 表示的计量数据采用本校数理统计学教研室提供的统计程序包 SPMR 进行两样本均数间显著性检验。

2　结果

2.1　体外 SHG-44 细胞形态学改变

SHG-44 细胞传代后 2 h 左右即可见细胞陆续贴壁, 继而细胞由圆形变短梭形或三角形, 此后逐渐伸出胞突, 细胞呈粗梭形、三角形或柳叶形, 瘤细胞贴壁伸长后生长旺盛, 大部分呈柱状或梭形, 核分裂像多见。

SHG-44 细胞经 200 ng/ml TNP-470 处理后, 在倒置显微镜下见细胞透亮性下降, 并见颗粒。HE 染色见细胞体积缩小, 呈扁长形, 核浆比例减小。30 min 后细胞饱满, 呈多角形, 可见伸展的突起。6 h 后大部分细胞呈多边形或梭形, 少数细胞变细长, 突起延伸较长, 少数细胞变圆, 突起消失。12 h 后部分细胞变圆, 个别细胞核深染固缩。48、72 h 后, 可见较多细胞变圆, 部分区域瘤细胞稀疏, 形似正常星形细胞, HE 染色可见瘤细胞胞核深染、固缩或染色质呈大小不等的团块状(凋亡细胞), 见图 1。电镜下见瘤细胞核仁小, 细胞器丰富, 并见细胞膜向外突起增多。线粒体肿胀、空化, 线粒体嵴不同程度的断裂、紊乱, 有些形成髓鞘样结构, 见图 2。

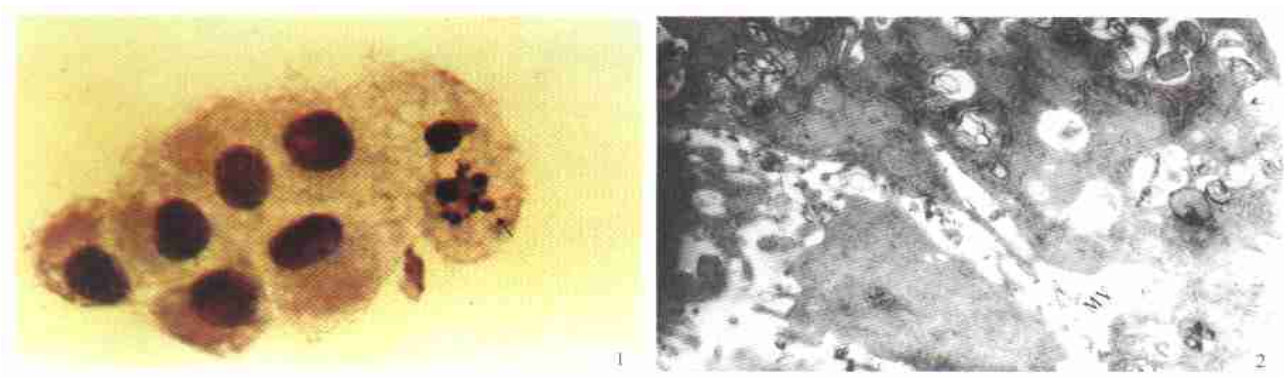


图 1　TNP-470 处理 72 h SHG-44 细胞　　较多细胞呈圆形, 可见凋亡小体(→)　(HE×1 000)

Fig 1　SHG-44 cells treated with TNP-470 for 72 h　　The cells were round and apoptotic bodies(→) cound be seen　(HE×1 000)

图 2　TNP-470 处理 72 h SHG-44 细胞　　多数线粒体肿胀、空化, 嵴不同程度的断裂、紊乱, 有髓鞘样结构形成, 部分微绒毛(MV)脱落　(TEM×15 000)

Fig 2　SHG-44 cells treated with TNP-470 for 72 h　　Most mitochondria swollen with broken cristae and formation of myelin figure, some microvilli (MV) dropped down　(TEM×15 000)

2.2　TNP-470 对 SHG-44 细胞生长曲线的影响

与对照组相比, 20、200、2000 ng/ml TNP-470 对 SHG-44 细胞生长均有抑制作用, 同一时相点细胞数随浓度升高而明显减少, 即呈剂量一时相依赖性, 见图 3。

2.3　TNP-470 对 SHG-44 细胞体外增殖的影响

与对照组相比, 20~2000 ng/ml TNP-470 处理 SHG-44 细胞后, 其增殖指数受到明显抑制($P<0.01$), 见图 4, 且具有剂量依赖性。IC_{50}值为 200 ng/ml。

2.4　TNP-470 对 SHG-44 细胞软琼脂克隆形成率的影响

SHG-44 细胞在软琼脂内能形成克隆, 经低到高浓度 TNP-470 处理后, 其克隆形成率分别为 65.8%、44.9%、24.5%, 均显著低于对照组(88.6%, $P<0.05$)。

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

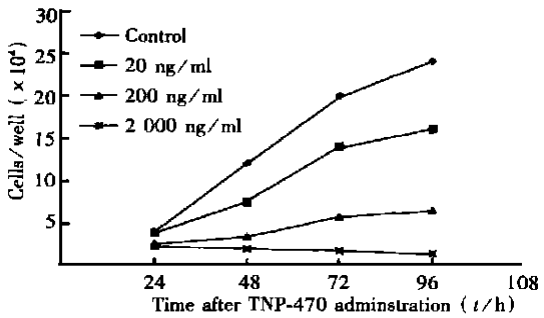


图 3 TNP-470 对 SHG-44 细胞生长曲线的影响

Fig 3 Effect of TNP-470 on the growth curves of SHG-44 cells

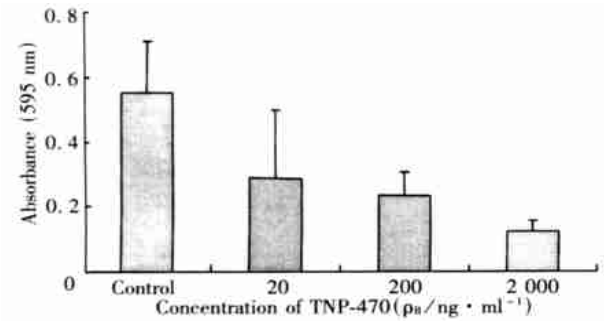


图 4 TNP-470 对 SHG-44 细胞体外增殖的影响

Fig 4 Effect of TNP-470 on the proliferation of SHG-44 cells *in vitro*

2.5 TNP-470 对 SHG-44 细胞周期进程的影响

流式细胞仪分析结果见表 1。与对照组相比，200 ng/ml TNP-470 处理的肿瘤细胞，6 h 后出现明显的凋亡峰，G_0/G_1 期细胞增多，S 期、G_2/M 期细胞明显减少；24 h 后出现大量的凋亡细胞，各期细胞均出现不同程度的减少，TNP-470 使 SHG-44 细胞周期进程阻滞在 G_1 期。

表 1 TNP-470 对 SHG-44 细胞周期的影响

Tab 1 Effect of TNP-470 on cell cycle of SHG-44 cells

Group	Cell cycles' phases (%)			
	apoptotic rate	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	1.13	61.15	17.63	20.86
TNP-470				
6 h	5.24	65.57	14.42	15.22
24 h	23.56	47.41	12.91	16.39
72 h	24.60	42.26	12.66	20.79

2.6 TNP-470 对移植瘤的影响

TNP-470 治疗 14 d 开始，移植瘤体积明显缩小，与对照组相比差异非常显著（$P<0.01$），T/C 比值明显降低。其中，治疗后第 28 天移植瘤重量为（1.470±0.2815）g，而对照组为（4.0767±0.5602）g，二者差异非常显著（$P<0.01$）。对照组移植瘤细胞排列紧密，呈梭形或栅状，可见较多核分裂像和微血管形成，见图 5。TNP-470 治疗组瘤细胞排列稀疏，呈圆形或细梭形，坏死面积较对照组明显增大，可见瘤细胞核深染、固缩或染色质碎裂（凋亡细胞），见图 6。电镜下见染色质凝集成块或边集，有的细胞核碎裂成几块，核膜结构不清。核仁不及对照组明显。线粒体肿胀、空化，嵴紊乱、断裂，可见多少不等的髓鞘样结构。

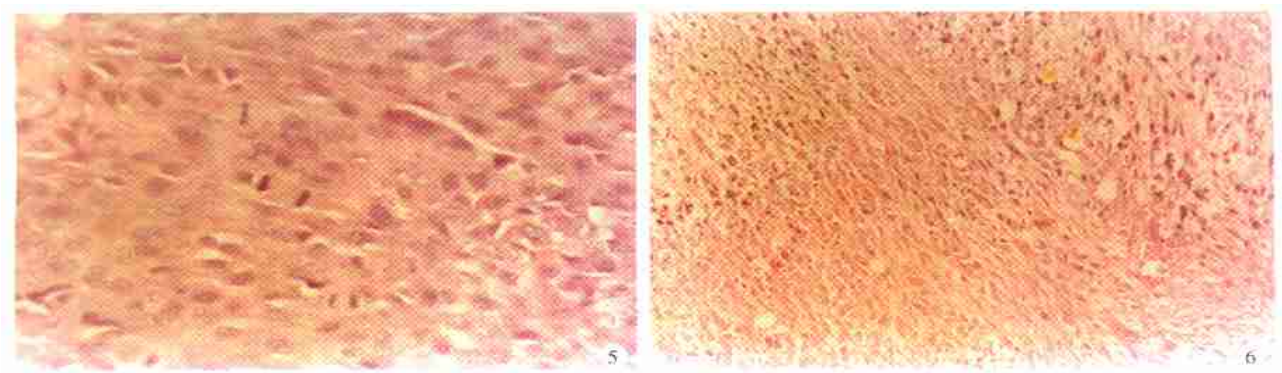


图 5 等渗盐水对照组移植瘤 组织瘤细胞排列密集，呈梭形、圆形，核大深染，可见较多核分裂像 （HE× 400）

Fig 5 Grafted tumor tissue in control group Neoplastic cells show spindle or round shaped and large, deep stained neuclei. Mitotic figures could easily be identified （HE× 400）

图 6 TNP-470 治疗组移植瘤 组织瘤细胞排列稀疏，可见大片坏死 （HE× 200）

Fig 6 Grafted tumor tissue in treatment group Tumor cells scattered arranged with massive necrosis （HE× 200）

2.7 TNP-470 对移植瘤裸小鼠体重和主要脏器的影响

皮下注射 TNP-470 后，裸小鼠的体重在各时相点无统计学差异，且未观察到明显的毒副作用，如活动迟缓、腹泻、脱毛、厌食等症状。心、肝、肾和脑光镜下未见明显病变。

3 讨论

TNP-470，化学名为 O-（氯乙酰-氨甲酰基）烟曲霉醇，是烟曲霉素的一种半合成衍生物。研究表明，TNP-470 可显著抑制人及动物多种肿瘤细胞系移植瘤的生长和肿瘤血管生成。Takamiya 等[4] 发现：TNP-470 可抑制人多种胶质瘤细胞系的体外增殖，其中 A172 母细胞胶质瘤细胞最敏感（IC_{50} 为 50 pg/ml），U-87MG 胶质母细胞瘤细胞的敏感性类似于内皮细胞（IC_{50} 为 55 pg/ml），T98G 胶质母细胞瘤细胞和 SW1088 星形细胞瘤相对不敏感。Taki 等[3] 对人胶质瘤细胞系的研究发现，TNP-470 对胶质瘤细胞系细胞毒作用的 IC_{50} 为 9.8

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

~28 μg/ml。皮下注射 TNP-470(30 mg/kg)可显著抑制 T98G 胶质瘤细胞移植瘤的肿瘤体积和血管生成,细胞增殖活性降低。Isobe 等[5] 对大鼠胶质肉瘤 9L 细胞系的研究发现,高浓度 TNP-470 可抑制 9L 细胞的体外增殖,10 和 30 mg/kg TNP-470 可显著抑制大鼠皮下移植瘤的生长。组织学检查发现,治疗组肿瘤细胞明显坏死,血管密度减小。30 mg/kg TNP-470 可明显改善荷瘤大鼠的生存时间。本研究发现,200 ng/ml TNP-470 可显著抑制胶质瘤细胞系 SHG-44 的体外增殖,细胞软琼脂克隆形成率降低;处理组移植瘤体积较对照组明显缩小、重量减轻,T/C 比值降低,组织出现明显的坏死区域。结果提示,TNP-470 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 体内外生长均有显著抑制作用,表明 TNP-470 的抗肿瘤作用除了抗血管生成机制外,还与其直接的抑制瘤细胞增殖、促进肿瘤坏死有关。

已有研究表明,TNP-470 在低浓度时选择性抑制内皮细胞的 DNA 合成,提示 TNP-470 可能高亲和力地与某些直接或间接抑制 DNA 合成的特异分子互相作用。Antoine[6] 的研究表明,TNP-470 特异性阻止正常内皮细胞进入周期的 G_1 期,使 G_0 期细胞所占百分数上升。TNP-470 处理人脐静脉内皮细胞孵育超过 21 h 后,G_0/G_1 期细胞比例上升,而 G_2/M 期和 S 期细胞比例下降。TNP-470 可完全阻止血管生长因子 bFGF 诱导的内皮细胞增生,而转化后的内皮细胞 Ea.hy926 和 cEnd.1 对 TNP-470 不敏感,说明 TNP-470 可能影响一种在正常内皮细胞进入 G_1 期的过程中起关键作用的细胞周期控制通道,而转化的细胞可通过其它旁路绕开这种抑制作用。Yamamoto 等[7] 用二十碳五烯酸(EPA)联合 TNP-470 对 5 个人乳腺癌细胞系的体外增殖进行了研究,发现 TNP-470 对乳腺癌细胞系的增殖呈剂量一时相依赖性抑制。高浓度 TNP-470 合用 EPA 具有加成作用。流式细胞仪分析显示 TNP-470 处理60 h后,出现 G_1 亚群,合用 EPA 后 G_1 亚群进一步增加。本研究亦发现,TNP-470 处理 6 h 后,流式细胞仪细胞周期分析显示典型的凋亡峰,在 24、72 h 细胞凋亡进一步增加,G_0/G_1 期细胞增加,S、G_2/M 细胞减少,提示 TNP-470 确实可使肿瘤细胞阻滞在 G_1 期。关于 TNP-470 对细胞周期影响的分子机制,尚需进一步深入研究。

已往的研究报告 TNP-470 诱导肿瘤细胞死亡的途径在体外为非特异性机制,而体内通过凋亡机制。主要是由于新血管生成被抑制引起缺氧所致。Yamamoto 等[7] 发现 TNP-470 处理人乳腺癌细胞系 24 h 后,可见细胞皱缩,核碎裂,微绒毛消失,胞膜泡状化,邻近的肿瘤细胞胞浆内可见被吞噬的凋亡细胞。Yoshida 等[8] 的研究发现 TNP-470 可诱导体外培养的肝细胞瘤细胞核碎片和微核增加,TNP-470 处理的瘤细胞其 DNA 琼脂糖凝胶电泳出现典型的凋亡带,瘤细胞和血管内皮细胞的凋亡率分别为 17%和 26%。我们亦发现,TNP-470 在体内外均可使 SHG-44 细胞发生细胞皱缩、核碎裂、微绒毛消失、胞膜泡状化、凋亡小体形成等典型的凋亡形态,表明凋亡参与了 TNP-470 对胶质瘤的治疗作用。结合体内和体外实验结果,我们认为,TNP-470 引起瘤细胞凋亡的机制可能以其对瘤细胞的直接作用为主。

参考文献:

[1] Kong H L, Crystal R G. Gene therapy strategies for tumor angiogenesis[J]. J Nat Cancer Ins, 1998, 90(4): 273—286.

[2] 卞修武, 陈自强, 郭德玉, 等. 人脑胶质母细胞瘤细胞系 SHG-44 中血管生成因子和细胞周期调控因子的表达[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 178—181.

[3] Taki T, Ohnishi T, Arita N, *et al*. Anti-proliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma *in vivo*: potent inhibition of tumor angiogenesis [J]. J Neurooncol, 1994, 19(3): 251—258.

[4] Takamiya Y, Brem H, Ojeifo J, *et al*. AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Neurosurg, 1994, 34(5): 869—875.

[5] Isobe N, Uozumi T, Kurisu K, *et al*. Antitumor effect of TNP-470 on glial tumors transplanted in rats[J]. Anticancer Res, 1996, 16(1): 71—76.

[6] Antoine N, Greimers R, De Roanne C, *et al*. AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle[J]. Cancer Res, 1994, 54(8): 2 073—2 076.

[7] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, *et al*. Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 55(2): 149—160.

[8] Yoshida T, Kanedo Y, Tsukamoto A, *et al*. Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP-470: possible involvement of nitric oxide synthase[J]. Cancer Res, 1998, 58(16): 3 751—3 756

(编辑　冯崇英)

(上接 271 页)

安全,易于掌握。不需特殊穿刺探头,可免去穿刺探头消毒的繁琐,穿刺后,术者通过屏幕可任意调整穿刺针的进针方向,选择最佳角度,清晰地显示针尖到达部位、深度、脓液抽吸的完全与否及药液在脓腔内的弥散情况;③并发症少,副作用轻,经济负担小,易于接受;④胸腔闭式引流套管比普通引流管粗,二者管腔直径分别为 1.5 cm 和 0.6 cm,有利于脓液及较大的坏死组织的引流,抽吸容易,引流通畅。

值得注意的是要严格掌握腹腔脓肿穿刺置管引流的适应症,对于凝血机制不良和伴有大量腹水、脓肿位置特殊、脓腔呈多房性的患者不宜采用本法;同时,由于引流管粗,置管时需防止损伤腹腔内及腹膜后大血管和其它重要脏器。对于脓腔内坏死组织块较大较多的脓肿,引流后症状改善后症状又反复出现者,仍要考虑手术治疗。

关键词:腹部肿瘤;穿刺术;引流
中图法分类号:R632.505　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Hiura A, Kim E C, Zkehare T, *et al*. Hepatic abscess as a complication of the sump sydnome[J]. Hepatobiliary Pancreat surg, 2000, 7(2): 231—235.

[2] 刘金池, 施成章, 纪明章, 等. 超声引导经皮穿刺置管引流治疗重症急性胰腺炎术后继发腹膜后脓肿[J]. 中国医学影像技术, 1999, 12(15): 924—926.

[3] Hanna R W, Dahniya M H. Percntaneous catheter drainage in drug-resistant liver abscess[J]. Trop Med Int Health, 2000, 5(8): 578—581.

(编辑　汪勤俭)

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