DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.022
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

文章编号:1000-5404(2001)05-0539-02

论著

苏拉明对肺癌血管生成的抑制作用

王海东,王明荣,杨 康,杨军民,曾会昌 (第三军医大学附属西南医院胸心外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究苏拉明对肺癌血管生成的抑制作用及其机制。方法 采用细胞培养和免疫组织化学的方法离体研究肺癌A549细胞、人血管内皮ECV-304细胞VEGF及其受体(Flt、KDR)的表达及苏拉明的影响。结果 苏拉明对肺癌细胞产生和分泌VEGF无影响;ECV-304细胞KDR、Flt的蛋白表达在苏拉明浓度为0.25 ng/ml和2.5 ng/ml时,受到显著抑制;而苏拉明浓度为0.25 ng/ml和25 ng/ml时Flt的表达,以及苏拉明浓度为2.5 ng/ml和25 ng/ml时KDR的表达则无明显变化(与对照组比较,$P>0.05$);苏拉明对A549、ECV-304细胞增生无影响。结论 苏拉明抑制肺癌血管生成的作用机制可能是通过抑制血管内皮细胞上的VEGF受体表达,减少VEGF与其受体结合所致。

关键词:苏拉明;肺癌;血管生成
中图法分类号:R734.205.3;R977.9 文献标识码:A

Study of the inhibitory effect of suramin on the angiogenesis of lung cancer

WANG Hai-dong, WANG Ming-rong, YANG Kang, YANG Jun-ming, ZENG Hui-chang (Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of suramin in inhibiting the angiogenesis of lung cancer. Methods The protein expression of VEGF and its receptor fms-like tyrosine kinase(Flt), kinase insert domain-containing receptor(KDR) in lung cancer cell A549 and ECV-304 was studied with immunohistochemical technique. The anti-angiogenesis effect of suramin was evaluated with immunohistochemical technique and cell culture. Results Suramin showed no effect on the production of lung cancer cells and their secretion of VEGF. No possitive expression of Flt, KDR in A549 was found in the suramin interfered group and non-interfered group, but VEGF was expressed in both groups. The Flt and KDR expressions in ECV-304 cells were decreased significantly after the treatment of suramin at 0.25 ng/ml and 2.5 ng/ml respectively. There was no effect on proliferetion of A549 and ECV-304 after suramin interference. Conclusion The mechanism of inhibiting-angiogenesis of suramin is probably due to reducing the VEGF receptor expression in vascular endothelial cells and inhibiting the binding of VEGF and its receptors.

Key words: suramin; lung cancer; angiogenesis

肿瘤生长依赖于血管生成,丰富的血管可以持续不断地向肿瘤提供营养和排泄代谢产物,为其生长提供物质条件。肿瘤组织诱导的血管生成是一复杂的、由多种因素调节的过程。血管内皮生长因子(VEGF)由各种肿瘤细胞及某些正常组织细胞产生,通过旁分泌机制,特异地作用于表达VEGF受体的血管内皮细胞(EC),使EC分裂增殖,新生血管生成,并使血管通透性增高,血浆外渗,从而促进肿瘤的生长、转移和体腔积液形成[1,2]。研究表明,VEGF在肿瘤的生长、转移和腹水的形成中发挥着重要作用,对VEGF的深入研究可为肿瘤治疗提供新的途径和方法[3,4]。我们采用细胞培养技术离体观察苏拉明对肺癌血管生成的抑制作用,旨在探讨苏拉明抑制肺癌血管生成的部分生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组

按苏拉明血浆高峰浓度(PPC)为标准分为4组:①未加苏拉明对照组。②苏拉明0.25 ng/ml组(0.1 PPC)。③苏拉明2.5 ng/ml组(1 PPC)。④苏拉明25 ng/ml组(10 PPC)。

作者简介:王海东(1970-),男,四川省阆中市人,硕士,医师,主要从事肺癌的发病机制和防治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65387414

收稿日期:2000-12-24;修回日期:2001-02-27

1.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增生

0.25%胰蛋白酶消化收集细胞。用含10%胎牛血清的培养液将细胞密度调整成1×10^5个/ml,以每孔100μl加入96孔培养板中,另补加100μl培养液,置CO_2培养箱内使细胞贴壁生长24 h,换用无血清培养液培养48 h,使细胞处于增殖的相对静止期。分组后常规条件下继续培养48 h后,每孔加入1% MTT 20μl,培养5 h,吸掉培养液,以Hanks液洗3次,每孔加入二甲基亚砜200μl并振荡使沉淀完全溶解。用Bio-RAD 450酶标仪于570 nm波长下检测各孔吸光度(D_{570})值。每个浓度取8孔,结果取其平均值。

1.3 A549细胞、ECV-304细胞计数

将细胞密度调整为4×10^4个/ml,以每孔1 ml加入24孔培养板中,贴壁培养24 h后换用无血清培养液,使细胞处于增殖的相对静止期。分组后均加入同浓度的10%胎牛血清,常规培养96 h后收集细胞,用血球计数板计数各孔A549细胞数量。

1.4 A549细胞、ECV-304细胞VEGF、Flt、KDR免疫组织化学检测及彩色图像分析

对A549细胞、ECV-304细胞爬片分别进行鼠抗人VEGF单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,工作浓度为1∶75)、兔抗人Flt多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,工作浓度为1∶100)、兔抗人KDR多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,工作浓度为1∶50)免疫组织化学检测(High-SABC法)。所作的切片经过彩色图像分析系统处理,每张切片随机选取10个视野,同一条件(同一光源与放大倍数200)、同一表达水平在平均光密度灰度范围内(50~250)测定各切片平均光密度值来表示免疫组织化学染色强度。

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

1.5 统计学分析

采用第三军医大学数学教研室编制的统计程序包进行统计,实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 苏拉明干预后A549细胞、ECV-304细胞增生MTT法检测结果

干预后在苏拉明不同浓度0.25 ng/ml(0.1 PPC)、2.5 ng/ml(1 PPC)、25 ng/ml(10 PPC)3组中均未见A549细胞、ECV-304细胞对MTT的摄取与代谢有明显变化,与未加苏拉明对照组比较差异不显著($P>0.05$),见表1。

表1 苏拉明对A549细胞、ECV-304细胞增生的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of suramin on the proliferation of A549, ECV-304 cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	A549		ECV-304	
		MTT (D_{570})	Cell count ($\times 10^6$/ml)	MTT (D_{570})	Cell count ($\times 10^6$/ml)
Control	8	0.420±0.002	1.063±0.031	0.149±0.002	1.024±0.023
0.25 ng/ml	8	0.422±0.002	1.011±0.027	0.157±0.001	1.071±0.030
2.5 ng/ml	8	0.424±0.002	0.992±0.035	0.161±0.002	0.982±0.012
25 ng/ml	8	0.406±0.003	1.113±0.016	0.160±0.003	1.041±0.022

2.2 苏拉明干预后A549细胞、ECV-304细胞增生计数结果

干预后在不同浓度0.25、2.5、25 ng/ml 3组中均未见苏拉明对A549细胞、ECV-304细胞增生有明显的影响,与未加苏拉明干预组比较差异不显著($P>0.05$),见表1。

2.3 苏拉明分组干预后A549细胞VEGF、Flt、KDR免疫组织化学检测结果

未干预组、干预组A549细胞VEGF免疫组化均为强阳性表达,组间比较差异不显著($P>0.05$)。A549细胞Flt、KDR免疫组化干预组、未干预组均未见阳性表达。

2.4 苏拉明分组干预后ECV-304细胞VEGF、Flt、KDR免疫组织化学检测结果

干预组、未干预组ECV-304细胞均无VEGF阳性表达。未干预组细胞在基础状态下也存在Flt、KDR的表达。其中Flt表达在苏拉明浓度为2.5 ng/ml时、KDR表达在苏拉明浓度为0.25 ng/ml时较未干预组显著减弱($P<0.01$),与其它干预组比较差异也有显著性($P<0.01$)。在苏拉明浓度为0.25 ng/ml和25 ng/ml时Flt的表达,以及苏拉明浓度为2.5 ng/ml和25 ng/ml时KDR的表达与未干预组比较差异均无显著性($P>0.05$),见表2。

表2 苏拉明干预后ECV-304细胞VEGF、Flt、KDR免疫组织化学检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Result of VEGF, Flt, KDR expression in ECV-304 after suram in interference detected by immunohistochemical technique($\bar{x}\pm s$)

Group	n	VEGF	Flt	KDR
Control	10	0.7601±0.0052	0.7244±0.0053	0.7761±0.0044
0.25 ng/ml	10	0.7519±0.0033	0.7151±0.0043	0.3340±0.0027**
2.5 ng/ml	10	0.7521±0.0023	0.2779±0.0035**	0.7597±0.0023
25 ng/ml	19	0.7755±0.0012	0.7316±0.0028	0.7374±0.0037

**: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

本实验显示在无苏拉明干预时A549、ECV-304细胞,表现为正常增生。A549细胞强阳性表达VEGF而不表达Flt、KDR,说明该细胞可以合成分泌VEGF但不存在VEGF受体;ECV-304细胞VEGF表达阴性而Flt、KDR表达强阳性,说明ECV-304细胞不分泌VEGF但存在VEGF受体Flt和KDR。上述结果与VEGF在血管生成中的作用及VEGF作用方式吻合。

实验结果显示,苏拉明干预前后A549、ECV-304细胞增殖均无明显变化,说明苏拉明对A549、ECV-304细胞增殖这一生物学行为并无影响。苏拉明干预后A549细胞VEGF的表达仍为强阳性,表明苏拉明对肺癌细胞产生和分泌VEGF亦无影响。这与Gradishar[5]的研究结果相一致,其结果发现在苏拉明作用后乳腺癌细胞中VEGF蛋白及mRNA表达均无变化。本实验同时显示,苏拉明可以显著抑制ECV-304细胞Flt、KDR的蛋白表达。因此,苏拉明抑制肿瘤血管生成的作用可能是通过抑制血管内皮细胞上的VEGF受体表达,减少VEGF与其受体结合所致。

实验发现,ECV-304细胞中Flt、KDR的表达分别在不同浓度的苏拉明干预后受到显著的抑制,提示苏拉明抑制Flt、KDR蛋白表达可能具有浓度选择性,即只有在适宜的浓度时才可以发挥最大的抑制作用,浓度过高过低均不能达到最佳抑制效果[6]。另外,有学者[7]在肝癌的研究中发现苏拉明抑制作用还具有时间依赖性,在不同的作用时间其作用效率不同,并且总有一个最佳作用时间,但苏拉明对肺癌血管生成的抑制作用是否也具有上述特点,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Qin L X, Tang Z Y, Li X M, *et al*. Effect of antiangiogenic agents on experimental animal models of hepatocellular carcinoma[J]. Ann Acad Med Singapore, 1999, 28(1): 147—151.

[2] Gagliardi A R, Kassack M, Kreimeyer A, *et al*. Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 41(2): 117—124.

[3] Meyers M O, Gagliardi A R, Flattmann G J, *et al*. Suramin analogs inhibit human angiogenesis *in vitro*[J]. J Surg Res, 2000, 91(2): 130—134.

[4] Waltenberger J, Mayr U, Frank H, *et al*. Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(7): 1 523—1 529.

[5] Gradishar W J, Soff G, Liu J, *et al*. A pilot trial of suramin in metastatic breast cancer to assess antiangiogenic activity in individual patients[J]. Oncology, 2000, 58(4): 324—333.

[6] Lauwers P, Hubens G, Hendriks J, *et al*. Effects of suramin on anastomotic colon tumors in a rat model[J]. Eur Surg Res, 1999, 31(4): 347—356.

[7] Bocci G, Danesi R, Benelli U, *et al*. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 43(3): 205—212.

(编辑 薛国文)

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