



重组人内皮抑素对小鼠肺腺癌LA795的抑制作用

血管生成是实体肿瘤生长和转移的必要条件, 新生血管为异常增殖的肿瘤细胞提供充足的营养, 阻断其血管形成, 肿瘤细胞将停止增殖并死亡。这是血管生成抑制剂抑制肿瘤生长及浸润转移的理论依据, 并已被大量的动物实验所证实。内皮抑素(endostatin) [1]是继血管抑素(Angiostatin) [2]发现后的又一血管生成抑制剂, 氨基酸序列分析表明它是胶原蛋白18的C-末端片段; 动物实验表明, 它可抑制多种肿瘤的生长和转移, 且尚未发现耐药性及毒副作用[1][3]。本实验旨在观察重组人内皮抑素(rhES)对鼠LA795肺腺癌细胞生长和转移的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源及分组 6~8周龄、平均体质量20 g(16~22 g)的雄性 T_{739} 近交系小鼠及LA795荷瘤鼠均购自中国医学科学院肿瘤研究所实验动物室。将 T_{739} 近交系小鼠随机分为治疗组和对照组, 每组各15只。

1.1.2 仪器及试剂 Triton X-100购自Farcochemical Supplies公司, RPMI-1640粉及Trypsin购于Gibco公司; Hepes购自Sigma公司; 其余试剂均为国产分析纯产品。Superdex 75 prep grade及Sephacryl S-200 High Resolution购自瑞士Pharmacia Biotech公司。HD-97-1核酸蛋白质检测仪为上海康华生化仪器制造厂产品, SORVALL RC-5C plus高速低温离心机为DuPont公司产品, USADY-600型中压电泳仪为汕头市广播仪器厂产品, DHZ-C大容量恒温振荡器为江苏太仓实验设备厂产品, 分析天平为Derver Instrument公司产品。

1.2 方法

1.2.1 rhES的制备 含人内皮抑素表达质粒pCX的大肠杆菌(本室构建并贮存于 -20°C)接种于培养基, 扩增培养及诱导表达, 经超声破菌, 包涵体用0.5% Triton X-100、2 mol/L尿素及50%异丙醇洗涤后再用含8 mol/L尿素的裂解液溶解, 上清经Sephacryl S-200 High Resolution及Superdex 75 prep grade两次凝胶过滤, 目的峰对PBS透析, 得到纯化的rhES, 分装贮存于 -20°C 。使用前 4°C 融化摇匀。

1.2.2 纯化产物的鉴定和分析 用15% SDS-PAGE不连续电泳鉴定各纯化步骤中rhES存在的组分, 银盐染色; 蛋白质定量用紫外吸收法, 以小牛血清白蛋白为标准参照物。

1.2.3 动物模型 培养的LA795肺腺癌细胞经胰蛋白酶消化后, 600 r/min离心3 min, 得到其单细胞悬液, 用RPMI-1640培养液调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 按0.2 ml/只接种于 T_{739} 近交系小鼠背部皮下。

1.2.4 rhES的疗效观察 细胞接种后第10天起, 治疗组每只分别给予rhES 20 mg/kg·b.w. 在远离肿瘤部位皮下注射, 对照组给予等量PBS, 连续14 d。治疗期间每2天用两脚规测量肿瘤长短径, 按公式 $a^2 \times b \times 0.52$ (a为短径, b为长径) 计算肿瘤体积[1], 并观察小鼠用药前后的外观、行为等变化情况。治疗结束后, 2组各随机取10只断颈处死小鼠, 称肺湿重, 计数肺表面转移结节, 肺及肿瘤组织行病理学检查。未处死小鼠任其自然死亡, 记录小鼠的生存时间。

1.3 统计学处理
数据统计学分析均采用两样本均数比较的t检验。

2 结果

2.1 rhES的纯化结果

由上述方法获得的rhES行聚丙烯酰胺凝胶电泳显示单一条带，纯度达到95%以上(图1)。

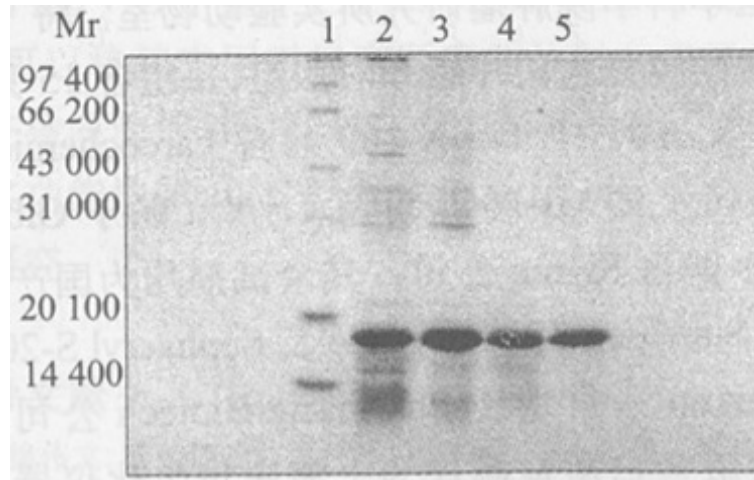


图1 rhES纯化的SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of purified rhES

1: Molecular weight marker; 2: Total cell pellet; 3: Inclusion bodies; 4: S-200 eluted; 5: Supeluted; rhES: Recombinan human endostatin

2.2 rhES对肿瘤生长的抑制作用

2.2.1 肿瘤体积 接种LA795细胞后第5天全部小鼠均出现皮下肿瘤；第7天后肿瘤增长速度明显加快。rhES治疗组肿瘤增长缓慢，用药6 d 即显示出非常显著的疗效，瘤块中心出现坏死，8 d后肿瘤逐渐回缩(图2)，质地变硬；而对照组则表现为肿瘤体积不断增大，且肿瘤质地偏软，并侵及股骨及脊柱致后肢瘫痪。病理学检查发现，rhES治疗组肿瘤大片坏死，而PBS组则肿瘤坏死不明显(图3、4，见封三)。

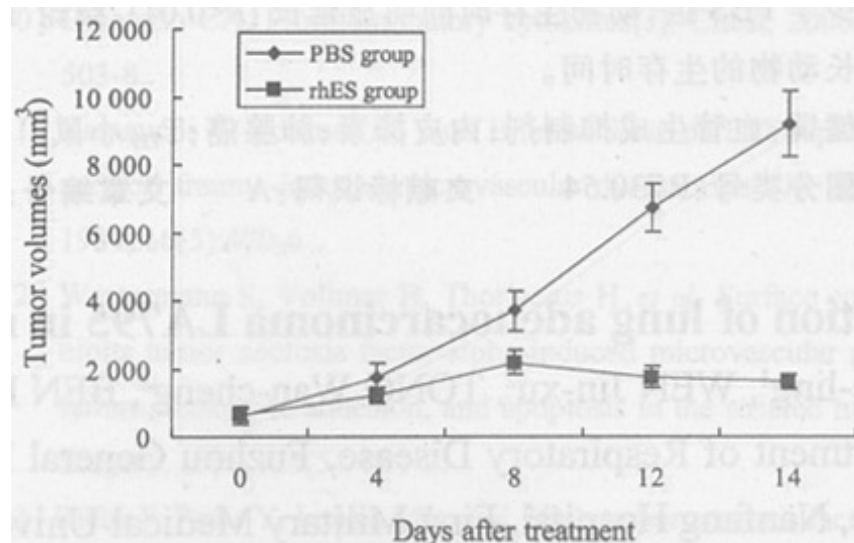


图2 治疗前后肿瘤体积变化

Fig.2 Changes in tumor volumes of the two groups before and after treatment with rhES

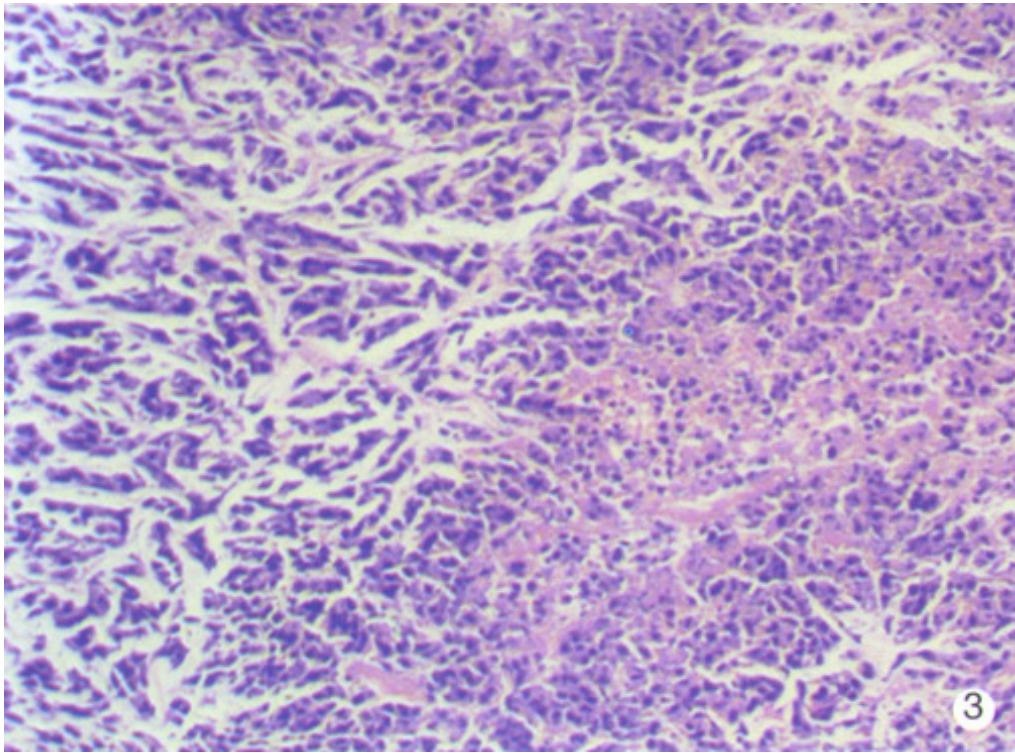


图3 rhES治疗组肿瘤病理组织学检查显示肿瘤大片坏死，血管减少(HE染色， $\times 100$)
Fig.3 Extensive necrosis and reduction of vascular density in the tumor tissue after treatment with recombinant human endostatin (HE staining, $\times 100$)

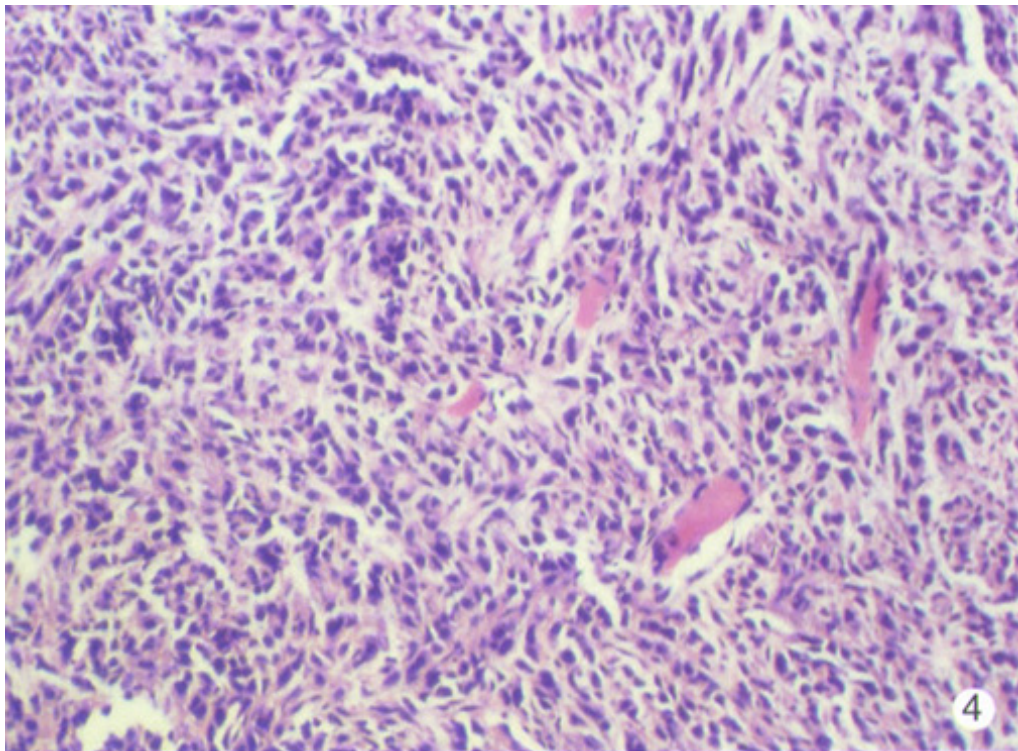


图4 PBS治疗组肿瘤病理组织学检查，肿瘤呈腺癌样表现，未见明显坏死，血管数目增多(HE染色， $\times 100$)
Fig.4 Vascular proliferation without obvious necrosis in the tumor tissue that resembles adenocarcinoma after PBS treatment (HE staining, $\times 100$)

2.2.2 肺湿重及肺表面转移灶数目 rhES治疗组肺湿重明显轻于对照组，肺表面转移灶数目明显少于PBS组(表1)。病理学检查治疗组肺脏转移结节小而少；而对照组结节大而多。

表 1 两组肺湿重及肺表面转移灶数目的比较($n=10, \bar{x}\pm s$)
 Tab.1 Comparison of two groups in the lung weight and the number of lung surface metastases ($n=10, Mean\pm SD$)

Group	Lung weight (mg)	Number of lung surface metastases
rhES	190.3±25.9	8±2
PBS	324.2±43.7*	22±8*

* $P<0.01$

2.2.3 生存时间 rhES治疗组平均存活时间为(48±10)d(鼠的1 d相当于人的35 d[2])，PBS组仅为(27±2)d ($P<0.001$)。rhES治疗组在停止治疗后2周左右，即可见部分小鼠肿瘤复发，肿瘤质地变软，体积再次增大，平均复发时间为停药后3周左右。

2.2.4 用药期间副作用的观察 在用药的整个过程中，rhES治疗组小鼠活动良好，精神状态佳，反应灵敏，能正常摄食，除肿瘤坏死部位有脱毛外，未见其他不良反应。PBS组在接种2周起，即出现摄食、活动减少、消瘦、精神状态差及反应迟钝。

3 讨论

内皮抑素是近年发现的血管生成抑制剂之一，可特异性抑制血管内皮细胞的增殖，从而抑制多种肿瘤的生长和转移[1][3][4][5]，氨基酸测序证明它是胶原18的C-末端片段，鼠内皮抑素相对分子质量约为20 000 [1]；人内皮抑素N-末端比鼠的少12个氨基酸，故相对分子质量稍小，约18 500，与鼠内皮抑素氨基酸序列比较，86%同源 [6]，故可用人内皮抑素治疗小鼠恶性肿瘤。本实验表明，大肠杆菌表达的rhES以不溶性包涵体形式存在于胞浆中。经超声破菌、离心及低浓度变性剂反复洗涤抽提出大部分可溶性杂质，使包涵体纯度达到85%。采用在较高浓度的变性剂(8 mol/L尿素)条件下经S-200 HR、Superdex 75二次凝胶过滤的方法，可得到高纯度的rhES。在对PBS透析过程中，rhES析出沉淀，与O'Reilly等[1]的报道相似。以混悬液的形式给小鼠注射，可取得明显的抗肿瘤效应，证明本文采用的纯化方法是可行的，亦提示非折叠形式的rhES在小鼠体内可逐渐恢复折叠状态[1]。

LA795是一株低免疫原性小鼠肺腺癌细胞株，具有高度恶性及自发转移特征，将($1\times 10^5\sim 1\times 10^6$)个LA795细胞接种于T₇₃₉小鼠，致瘤率达100%，肺转移率为100%[7]。本实验也证实了这一点。实验还显示，治疗前rhES组肿瘤体积为650 mm³，皮下注射人内皮抑素6 d，肿瘤即出现坏死，但肿瘤体积增至2 178 mm³，8 d后瘤体逐渐缩小，随着治疗时间的延长，瘤体继续缩小，至第14天肿瘤体积缩小至1 642 mm³，且肺脏转移灶数目少、转移结节小，小鼠生存时间延长，在整个治疗过程中未发现毒副作用；而PBS肿瘤体积由治疗前的623 mm³增至9 194 mm³，肺脏转移灶数目多、转移结节大，小鼠生存时间短。这些结果显示：rhES对LA795肺腺癌的生长和转移具有良好治疗效果。

实验发现，接受rhES治疗后的前8 d，肿瘤体积仍呈进行性增大；治疗结束时，肿瘤体积为治疗前的2倍余，逊于国外文献报道[1][3]，其原因可能为：(1)内皮抑素的抗肿瘤效应可能有种属特异性，LA795肺腺癌荷瘤鼠对人内皮抑素敏感性差。(2)以非折叠形式存在的内皮抑素，其抑制内皮细胞增殖的活性会受到影响。将表达内皮抑素cDNA基因的载体转染真核细胞，如人胚胎肾细胞[8]，获得可溶性的内皮抑素，有可能方便纯化，提高其抗肿瘤效应。(3)开始治疗的时间较晚。文献报道均在肿瘤早期(瘤重占小鼠体质量的1%~2%) [1][3]即开始治疗，而我们的实验为肿瘤占小鼠体质量的3%~4%才开始用药，较晚治疗，效果可能会差些。

治疗停止后3周左右，肿瘤再次复发，表明短期应用内皮抑素不能根治LA795，提示内皮抑素治疗恶性肿

瘤需一个合理的用药方案和一定的疗程。内皮抑素的周期治疗和联合其他血管生成抑制剂或联合化放疗及肿瘤细胞凋亡指数和血管密度的测定有待于进一步研究和完善。

参考文献:

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88(2):277-85.
- [2] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma[J]. *Cell*, 1994, 79(2):315-28.
- [3] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. *Nature*, 1997, 390(6658):404-7.
- [4] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1):189-97.
- [5] Blezinger P, Wang J, Margaret G, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene[J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17(4):343-8.
- [6] Standker L, Schrader M, Kanse SM, et al. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin[J]. *FEBS Lett*, 1997, 420(2-3):129-33.
- [7] 张兆伟, 张金芝, 孙文义, 等. 小鼠肺腺癌(LA-795)细胞株的建立及一些生物学特性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1985, 7(2):83-5.
- [8] Hohenester E, Sasaki T, Olsen RB, et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution[J]. *EMBO J*, 1998, 17(6):1656-64.

参考文献:

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88(2):277-85.
- [2] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma[J]. *Cell*, 1994, 79(2):315-28.
- [3] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. *Nature*, 1997, 390(6658):404-7.
- [4] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1):189-97.
- [5] Blezinger P, Wang J, Margaret G, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene[J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17(4):343-8.
- [6] Standker L, Schrader M, Kanse SM, et al. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin[J]. *FEBS Lett*, 1997, 420(2-3):129-33.
- [7] 张兆伟, 张金芝, 孙文义, 等. 小鼠肺腺癌(LA-795)细胞株的建立及一些生物学特性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1985, 7(2):83-5.
- [8] Hohenester E, Sasaki T, Olsen RB, et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution[J]. *EMBO J*, 1998, 17(6):1656-64.