

腹腔内应用重组人血管内皮抑制素治疗艾氏腹水瘤的实验研究

彭登付¹ 胡冰¹ 何义富¹ 陈健¹ 袁幸¹ 王伟¹ 李庆²

摘要 目的 观察重组人血管内皮抑制素对艾氏腹水瘤(EAC)小鼠的治疗作用,并初步探讨其相关作用机制。方法

采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同终浓度的重组人血管内皮抑制素(0、5、10、20、40 μg/ml)对体外培养的EAC细胞的抑制率;利用EAC细胞建立腹水瘤小鼠模型,将54只腹水瘤小鼠随机分为3组:A组(重组人血管内皮抑制素8 mg/kg,每12 h腹腔注射1次)、B组(重组人血管内皮抑制素8 mg/kg,每24 h腹腔注射1次)、C组即对照组(生理盐水0.2 ml/只,每12 h腹腔注射1次)。详细记录小鼠腹水量、体重及生存期;酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠腹水血管内皮生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2);并通过尾静脉注射伊文思蓝染液间接反映微血管通透性。结果 体外实验显示,不同浓度的重组人血管内皮抑制素对EAC未见抑制作用;体内试验显示,重组人血管内皮抑制素组(A组和B组)小鼠的体重、腹水量及腹水中VEGF和MMP-2浓度均低于对照组,生存时间较对照组延长($P < 0.05$);3组小鼠血管通透性、A组与B组之间的各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 腹腔内给药治疗小鼠EAC疗效较好,其作用机制可能与抑制VEGF及MMP-2的生成有关,提示重组人血管内皮抑制素在临床上治疗恶性腹水有较好的应用前景。

关键词 重组人血管内皮抑制素;艾氏腹水瘤;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶-2

中图分类号 R 735; R 739.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1218-04

重组人血管内皮抑制素是我国自主研发的重组人血管内皮抑制素,可以抑制肿瘤血管生成,目前临床上用其治疗恶性胸、腹水均取得了较好的疗效^[1-2],该研究在此基础上通过改变其给药频率来观察重组人血管内皮抑制素在治疗艾氏腹水瘤(ehrlich ascites carcinoma, EAC)小鼠中的疗效,并通过检测腹水中的血管内皮生长因子(vascular endothelial cell factor, VEGF)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的浓度及微血

管通透性来初步探讨其相关的作用机制,以便更好的指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 主要的试验材料及仪器 10%胎牛血清、1640培养基(美国Hyclone公司);EAC细胞株(南京先声药业细胞室赠送);MTT、伊文思蓝(美国Sigma公司);清洁级ICR小鼠,雄性4~5周龄,16~18 g,购于上海斯克实验动物有限公司;重组人血管内皮抑制素(商品名为恩度,15 mg/支,南京先声药业);小鼠VEGF、MMP-2的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(美国R&D分装);CO₂恒温培养箱(日本SANYO公司);光学显微镜及其拍照系统(日本O-LYMPUS公司);酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 体外细胞培养与MTT EAC细胞复苏后培养于含10%胎牛血清的1640培养基中(内含1%的双抗:青霉素100 U/ml,链霉素100 U/ml),于37℃、5% CO₂培养箱中培养;取对数生长期细胞用0.2%台盼蓝染色鉴别细胞活力大于90%,配制成 5×10^3 个/ml的细胞悬液,接种于96孔板,200 μl/孔,5% CO₂、37℃培养12 h,加入不同终浓度的重组人血管内皮抑制素(0、5、10、20、40) μg/ml及10 μg/ml的顺铂(cisplatin, DDP),培养细胞24 h。每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,37℃继续培养4 h,96孔板于1 500 r/min离心5 min,弃培养基,各孔分别加入150 μl二甲基亚砷,振荡10 min后用酶标仪在490 nm波长下测定吸光度(optical density, OD)值,计算抑制率。抑制率=(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值×100%。每个浓度设置3个平行孔,实验重复3次。

1.2.2 体内动物模型的建立 用不含血清的1640培养基将EAC细胞配制成 2×10^7 个/ml细胞悬液,取0.5 ml(约含 5×10^6 个细胞)接种于4周龄的雄性ICR小鼠左下腹腔,第8天颈椎脱臼法处死小鼠并收集腹水,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,生理盐水吹洗,再次离心,用生理盐水配制成 2×10^7 个/ml细胞悬液;取配制好的细胞悬液按0.1 ml/只(相当于每只小鼠腹腔注射 2×10^6 个细胞)接种于

2014-05-26 接收

基金项目:安徽省科技厅基金资助项目(编号:12070403084)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 肿瘤化疗科、² 中心实验室,合肥 230001

作者简介:彭登付,男,硕士研究生;

胡冰,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:hubin3756@sina.com

ICR 小鼠左下腹腔 整个过程严格无菌操作。

1.2.3 实验小鼠分组及给药方法 接种 72 h 后将 54 只小鼠随机分为 3 组: A 组(重组人血管内皮抑制素 8 mg/kg, 每 12 h 腹腔注射 1 次)、B 组(重组人血管内皮抑制素 8 mg/kg, 每 24 h 腹腔注射 1 次)、C 组即对照组(生理盐水 0.2 ml/只, 每 12 h 腹腔注射 1 次), 接种当日记为第 1 天, 于第 5~10 天按照上述给药剂量腹腔注射, 调整药物浓度, 每只小鼠每次注射体积 0.2 ml。每组随机选取 8 只小鼠用于相关指标的检测, 余下小鼠继续饲养, 用于观察生存期。

1.2.4 小鼠行为状态及生存状况 给药期间观察小鼠行为状态, 末次给药 24 h 后测量腹水瘤小鼠的体重、腹水体积; 记录腹水瘤小鼠的死亡时间, 绘制生存曲线。

1.2.5 VEGF 及 MMP-2 的检测 末次给药 24 h 后, 用无菌注射器收集小鼠腹水 0.4 ml, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于 -20 °C 冰箱中, 检测时按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 每份标本设置复孔, 分别计算出每份标本中的 VEGF、MMP-2 的浓度。

1.2.6 微血管通透性的检测 通过小鼠尾静脉按 50 mg/kg 的剂量注射 2% 的伊文思蓝染液(2 g 依文

思蓝溶于 100 ml 的 PBS 溶液) 2 h 后颈椎脱臼法处死小鼠, 收集腹水 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 设置复孔, 酶标仪预设 10 min 后在 540 nm 波长下测 OD 值, 间接反映微血管通透性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析及其两两比较 SNK(S) 法 q 检验进行分析, 方差不齐时采用 Games-Howell(A) 法分析, 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。

2 结果

2.1 重组人血管内皮抑制素对体外培养 EAC 细胞的影响 不同浓度重组人血管内皮抑制素对 EAC 的形态未见明显变化, 而加 DDP 后细胞形态明显改变, 边缘不整, 细胞间隙可见明显细胞碎片, 见图 1。

2.2 重组人血管内皮抑制素对 EAC 细胞活力的影响 药物作用 EAC 24 h 后, 不同浓度的重组人血管内皮抑制素组间的吸光度及细胞抑制率差异无统计学意义 ($F = 16.85, P > 0.05$), DDP 组与对照组(重组人血管内皮抑制素 0 $\mu\text{g/ml}$) 比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.035$), 见表 1。

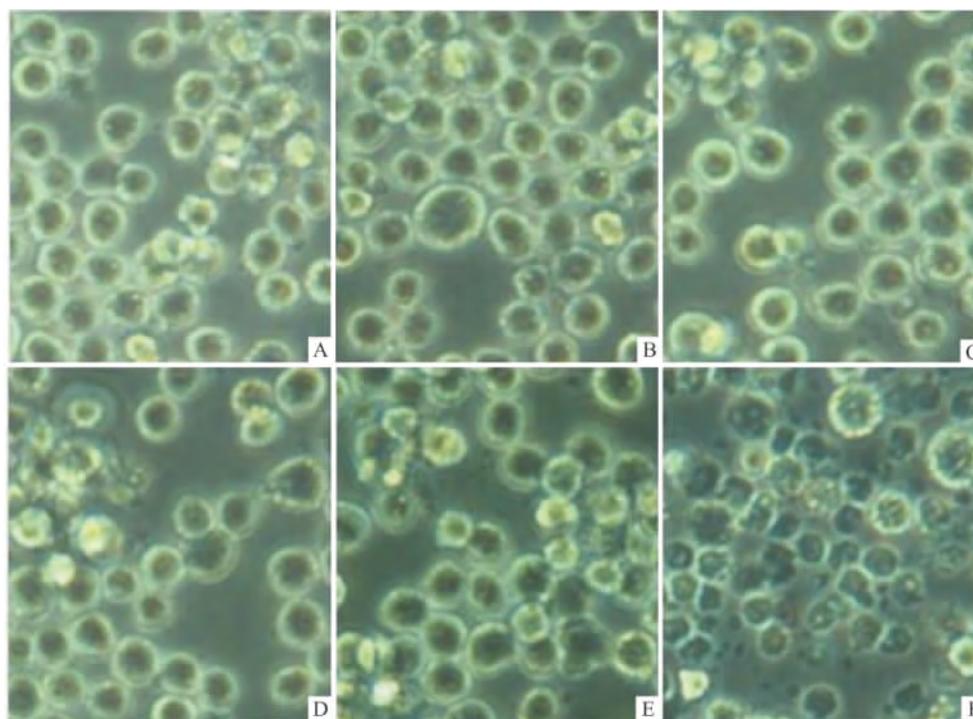


图 1 不同浓度的重组人血管内皮抑制素对体外培养的 EAC 细胞的影响 $\times 400$

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{g/ml}$ 重组人血管内皮抑制素; C: 10 $\mu\text{g/ml}$ 重组人血管内皮抑制素; D: 20 $\mu\text{g/ml}$ 重组人血管内皮抑制素; E: 40 $\mu\text{g/ml}$ 重组人血管内皮抑制素; F: 10 $\mu\text{g/ml}$ DDP

表1 不同浓度的重组人血管内皮抑制素及 DDP 对 EAC 细胞的增殖影响 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

| 药物 | OD 值 | 细胞抑制率 (%) |
|---------------------------------|----------------------|------------------|
| 重组人血管内皮抑制素 ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| 0 | 1.540 \pm 0.154 | 0 |
| 5 | 1.311 \pm 0.120 | 14.87 \pm 1.13 |
| 10 | 1.399 \pm 0.158 | 9.16 \pm 0.67 |
| 20 | 1.337 \pm 0.167 | 13.18 \pm 0.95 |
| 40 | 1.449 \pm 0.168 | 5.91 \pm 0.42 |
| DDP 10 $\mu\text{g/ml}$ | 0.715 \pm 0.090 ** | 69.82 \pm 3.87 |

与重组人血管内皮抑制素 (0 $\mu\text{g/ml}$) 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 腹水生长状况 接种 EAC 细胞后,小鼠一般于第 5~6 天开始出现少量淡黄色腹水,第 8~9 天腹部明显增大,并开始出现血性腹水,重组人血管内皮抑制素组小鼠行为状态较好,而对照组小鼠精神比较萎靡,最终 54 只小鼠均出现腹水。末次给药 24 h 后(第 11 天)测量小鼠体重及腹腔积液,重组人血管内皮抑制素组小鼠的体重及腹水体积均低于对照组 ($F_{\text{体重}} = 4.30, F_{\text{腹水体积}} = 6.72, P < 0.05$),A 组与 B 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

2.4 重组人血管内皮抑制素对小鼠腹水中 VEGF 及 MMP-2 含量的影响 重组人血管内皮抑制素组小鼠腹水中 VEGF 明显低于对照组 ($F = 12.86, P < 0.01$),而重组人血管内皮抑制素组间小鼠腹水中 VEGF 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$);重组人血管内皮抑制素组腹水瘤小鼠腹水中 MMP-2 含量明显低于对照组 ($F = 10.53, P < 0.05$),而重组人血管内皮抑制素组间小鼠腹水中 MMP-2 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表2 3组腹水瘤小鼠体重及腹水体积的比较 (n=8 $\bar{x} \pm s$)

| 指标 | A 组 | B 组 | C 组 |
|---------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| 小鼠体重 (g) | 32.95 \pm 2.38* | 32.81 \pm 2.47* | 35.94 \pm 2.16 |
| 腹水体积 (ml) | 5.33 \pm 1.38* | 6.01 \pm 1.47* | 7.64 \pm 1.06 |
| VEGF (pg/ml) | 135.57 \pm 17.45** | 132.23 \pm 11.29** | 175.24 \pm 25.18 |
| MMP-2 (ng/ml) | 116.78 \pm 16.25* | 104.60 \pm 14.92** | 147.45 \pm 19.52 |

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 重组人血管内皮抑制素对腹水瘤小鼠的微血管通透性的影响 尾静脉注射伊文思蓝后 A、B、C 3 组小鼠的 OD 值分别为 0.247 \pm 0.027、0.251 \pm 0.029、0.278 \pm 0.026 组间差异无统计学意义 ($F = 2.95, P > 0.05$)。

2.6 重组人血管内皮抑制素对腹水瘤小鼠生存期的影响 C 组第 12 天开始发现 1 只小鼠死亡,第 16 天全部死亡,平均存活时间 (14.30 \pm 1.34) d; B 组第

14 天开始发现有 1 只小鼠死亡,第 18 天全部死亡,平均存活时间为 (16.10 \pm 1.21) d; A 组第 15 天开始发现小鼠死亡,第 19 天全部死亡,平均生存时间为 (17.00 \pm 1.15) d。与对照组比较,重组人血管内皮抑制素组小鼠生存时间延长 (Log rank = 18.09, $P < 0.05$),而 A 组与 B 组小鼠生存期差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

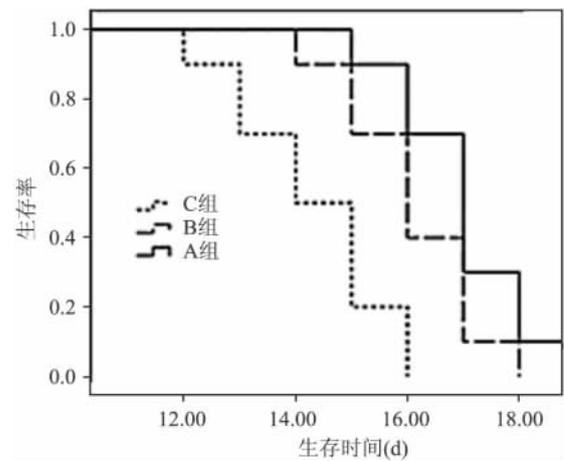


图2 3组小鼠的生存时间

3 讨论

本研究在前期临床研究的基础上,通过改变其给药频率来观察腹腔应用重组人血管内皮抑制素治疗 EAC 的疗效,并通过检测腹水中 VEGF、MMP-2 的含量及微血管通透性来初步探讨重组人血管内皮抑制素治疗腹水的作用机制。

在本研究的体外实验中,EAC 细胞镜下观及 MTT 的结果提示重组人血管内皮抑制素在 0~40 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内尚未发现其对 EAC 细胞有抑制作用。体内试验表明重组人血管内皮抑制素可以减少腹水瘤小鼠的腹水生成,并可以延长其生存期,这与 Jiang et al^[3] 利用重组人血管内皮抑制素治疗 H22 肝癌腹水瘤小鼠的报道基本一致。本研究中重组人血管内皮抑制素组 VEGF、MMP-2 浓度较对照组明显减低,虽然 3 组小鼠血管通透性差异无统计学意义,但间接反映血管通透性的 OD 值较对照组有减小的趋势。这与 Verheul et al^[4] 的研究中抑制 VEGF 的产生后,积液量也随之减少的结果基本一致。另外,鉴于重组人血管内皮抑制素的半衰期约 10 h,因此其中一组采用了每 12 h 给药一次。然而,2 组重组人血管内皮抑制素组小鼠的行为状态、腹水体积、生存期以及 VEGF、MMP-2 等指标均未见明

显差异,而魏红梅等^[5]发现利用重组人血管内皮抑制素治疗 S180 细胞及 H22 细胞建立的腹水瘤模型时,每天给药 1 次的疗效较每隔 1d 给药或每隔 2d 给药好。可能的原因是按照 8 mg/kg 的剂量每天给药 1 次即可在体内维持较高的血药浓度,这与杨林等^[6]分别用 7.5、15 mg/m² 的剂量治疗非小细胞肺癌时疗效接近的结果相吻合。本研究将 54 只小鼠共分 3 组,其中一组为对照组,另外两组为相同剂量不同给药频率实验组,在后续试验中可以继续考察相同给药频率下、不同给药剂量对腹水瘤小鼠的疗效影响。

本研究显示腹腔应用重组人血管内皮抑制素治疗 EAC 效果较好,据此对重组人血管内皮抑制素治疗腹水的可能机制作出以下预测:① 竞争性阻碍 VEGF 与 VEGF-R 的结合,通过正反馈作用抑制 VEGF 的生成;② 直接作用于 VEGF,减少其生成;③ 通过抑制 MMP-2 的生成来减少基质中 VEGF 的释放;④ VEGF 的减少进一步抑制了新生血管的生成,并相应地减少了微血管面积及血管通透性。

参考文献

- [1] 何立峰,施益挺,华刚. 重组人血管内皮抑制素联合顺铂治疗恶性胸腔积液 32 例的临床评价[J]. 中国药业,2013,22(12): 49-50.
- [2] 何义富,孙玉蓓,陈键,等. 腹腔内应用重组人血管内皮抑制素联合氟尿嘧啶治疗恶性腹水的初步探讨[J]. 临床肿瘤学杂志,2009,14(3): 252-5.
- [3] Jiang Z Y, Qing S K, Yin X J, et al. Synergistic effects of Endostar combined with β -elemene on malignant ascites in a mouse model[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(2): 277-84.
- [4] Verheul H M, Hoekman K, Jorna A S, et al. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation[J]. *Oncologist*, 2000, 5(1): 45-50.
- [5] 魏红梅,秦叔逵,殷晓进,等. 新型重组人血管内皮抑制素对小鼠腹水瘤的作用特点[J]. 南方医科大学学报,2010,30(7): 1509-13.
- [6] 杨林,王金万,孙燕. 重组人血管内皮抑制素 YH16 治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(2): 138-41.

Research on administration of recombinant human endostatin by intraperitoneal injection in ehrlich ascites carcinoma

Peng Dengfu, Hu Bing, He Yifu, et al

(Dept of Chemotherapy, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effect of recombinant human endostatin on ehrlich ascites carcinoma (EAC) mice and explore the underlying mechanism initially. **Methods** Developing EAC cells and the cells were treated with different concentrations of recombinant human endostatin (0, 5, 10, 20, 40) μ g/ml for 24 h and then the growth inhibitory rate of each group cells was examined by MTT method. Mice with ascites models were established by intraperitoneal injection of ehrlich ascites carcinoma cells, and then 54 ICR mice were randomly divided into three groups: Group A (recombinant human endostatin 8 mg/kg, every 12 hours), Group B (recombinant human endostatin 8 mg/kg, every 24 hours) and Group C (NS 0.2 ml, every 24 hours). Weight, ascites volume and survival time were recorded and the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was measured by ELISA method respectively. Evans blue were injected *via* the caudal vein and then the peritoneal microvascular permeability was assessed indirectly. **Results** The weight, ascites volume and the concentration of VEGF and MMP-2 of Group A and Group B was lower than that of Group C ($P < 0.05$), while the survival time of recombinant human endostatin groups were longer than those of the Group C ($P < 0.05$). However, no statistical difference was found between Group A and Group B about the above indicators. **Conclusion** Recombinant human endostatin is an effective therapy for ehrlich ascites carcinoma mice and its mechanism may be associated with inhibition of the VEGF expression. Taken together, our preliminary findings suggest that recombinant human endostatin may have a favorable prospect in the clinical treatment of malignant ascites.

Key words recombinant human endostatin; ehrlich ascites carcinoma; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-2