

· 论 著 ·

苏拉明联合紫杉醇对 LA795 肺腺癌小鼠移植瘤生长的抑制作用及机制*

欧立文¹, 贺兼斌², 邓 琼¹, 张 平^{3△}

(1. 湘南学院附属医院呼吸内科, 湖南郴州 423000; 2. 怀化市第一人民医院呼吸内科, 湖南怀化 418000;
3. 南华大学附属第一医院呼吸内科, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 观察苏拉明联合紫杉醇对 LA795 肺腺癌小鼠移植瘤生长的抑制作用, 并探讨其作用机制。方法 将 32 只皮下接种 LA795 肺腺癌细胞 T739 小鼠随机分为对照组、紫杉醇组、苏拉明组和联合组, 每组 8 只。观察移植瘤生长情况, 饲养 24 d 后处死小鼠, 剥离皮下移植瘤, 采用免疫组化检测移植瘤组织中血管生成素-2(Ang-2)和微血管密度(MVD)。结果 紫杉醇组、苏拉明组和联合组移植瘤的生长明显受到抑制, 以联合组生长最慢。对照组移植瘤质量大于其他 3 组($P < 0.05$)。紫杉醇组和苏拉明组移植瘤质量大于联合组($P < 0.05$); 苏拉明组、紫杉醇组及联合组的抑瘤率分别为 22.638%、25.629%及 54.109%, 其 Q 值为 1.274(> 1.15)。苏拉明组和联合组移植瘤组织内 Ang-2 的表达均低于对照组和紫杉醇组($P < 0.05$)。对照组移植瘤组织内 MVD 高于其他 3 组($P < 0.05$); 紫杉醇组或苏拉明组移植瘤组织内 MVD 高于联合组($P < 0.05$)。移植瘤组织中 Ang-2 表达、MVD 与移植瘤质量均呈正相关($r = 0.468, 0.526, P < 0.01$)。结论 苏拉明可下调肿瘤组织 Ang-2 表达, 抑制肿瘤内微血管形成, 与紫杉醇联合对 LA795 肺腺癌小鼠皮下移植瘤生长发挥协同抑制作用。

关键词:腺癌; 移植, 同种; 小鼠; 苏拉明; 紫杉醇

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.18.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)18-1772-03

Inhibitory effects of suramin combined with paclitaxel on growth of transplanted LA795 lung adenocarcinoma in mice and its mechanism*

Ou Liwen¹, He Jianbin², Deng Qiong¹, Zhang Ping^{3△}

(1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China;

2. Department of Respiratory Medicine, First People's Hospital of Huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China;

3. Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the inhibitory effect of suramin combined with paclitaxel on growth of transplanted LA795 lung adenocarcinoma in mice and explore its mechanism. **Methods** 32 T739 mice inoculated subcutaneously with LA795 lung adenocarcinoma cells were randomly divided into the control, paclitaxel, suramin and combination group, with 8 mice in each group. The growth of transplanted carcinoma were observed. Mice were sacrificed after 24 d feeding, and then the subcutaneous transplanted carcinoma were peeled. Angiopoietin-2(Ang-2) and microvessel density(MVD) of transplanted carcinoma tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** The growth of transplanted carcinoma in the paclitaxel, suramin and combination group were suppressed significantly, and the lowest growth was found in the combination group. The mass of transplanted carcinoma in the control group was greater than those in the other 3 groups($P < 0.05$), and those in the paclitaxel and suramin group were greater than that in the combination group($P < 0.05$); Carcinoma inhibitory rates in the suramin, paclitaxel and combination group were 22.638%, 25.629% and 54.109%, respectively, and the Q value was 1.274(> 1.15). Ang-2 expression of transplanted carcinoma tissue in the suramin and combination group were both lower than those in the control and paclitaxel group($P < 0.05$). MVD of transplanted carcinoma tissue in the control group was higher than those in the other 3 groups($P < 0.05$), and that in the paclitaxel group or suramin group was higher than in combination group ($P < 0.05$). Ang-2 expression or MVD in transplanted carcinoma tissue showed positive correlation with the carcinoma mass($r = 0.468, 0.526, P < 0.01$). **Conclusion** Suramin may down-regulate Ang-2 expression in carcinoma tissue, inhibit the formation of microvessel in carcinoma and play a synergistic inhibitory role in growth of transplanted LA795 lung adenocarcinoma in mice with paclitaxel.

Key words: adenocarcinoma; transplantation, homologous; mice; suramin; paclitaxel

肿瘤的发生和发展受多种因素影响, 其中细胞周期调节的失控和肿瘤诱导新生血管的形成是人类肿瘤生长的主要驱动力^[1-2]。本实验利用小鼠肺腺癌细胞 LA795 建立高转移小鼠皮下移植瘤动物模型, 应用血管生成抑制剂苏拉明联合抗癌药紫杉醇治疗, 观察移植瘤的生长情况, 探讨苏拉明联合紫杉醇治疗肺腺癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞株、药品及试剂 T739 雄性小鼠 32 只, 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级, 鼠龄 4~5 周, 体质量为 20 g 左右; LA795 肺腺癌荷瘤鼠 2 只, 均由中国医学科学院肿瘤医院动物室提供(动物合格证号: SCXK11-00-0005)。SPF 级饲养环境由南华大学肿瘤研究所提供。紫杉醇

表 1 24 d 后各组小鼠皮下移植瘤组织 Ang-2 表达、MVD 以及移植瘤质量、抑瘤率的比较

组别	n	Ang-2 (PU)	MVD (个/单位面积)	移植瘤质量(g)	抑瘤率(%)	Q 值
对照组	7	17.329±4.264	22.613±4.637	5.529 ±1.047	0	—
紫杉醇组	8	16.946±3.947	17.182±4.783 ^a	4.126±1.087 ^a	25.629	—
苏拉明组	8	10.652±3.167 ^{b,c}	15.947±6.162 ^a	4.279±1.143 ^a	22.638	—
联合组	7	10.239±3.073 ^{b,c}	9.119±6.029 ^{b,c,d}	2.531±1.128 ^{b,c,d}	54.109	1.274

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与紫杉醇组比较; ^d: $P < 0.05$, 与苏拉明组比较; —: 表示此项目无数据。

购自海口市制药厂有限公司, 苏拉明购自美国 Sigma 公司。兔抗鼠血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2) 抗体和兔抗鼠聚类分化群 (cluster of differentiation, CD) 34 抗体购自武汉博士德公司, 通用型链霉菌白素-过氧化物酶 (streptavidin peroxidase, SP) 试剂盒和二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色剂均购自福州迈新生物工程公司。

1.2 动物模型的建立 断颈处死 2 只荷瘤鼠, 在无菌条件下剥离瘤块, 按 1 g 肿瘤组织加 4 mL 生理盐水放入表面皿中, 剪碎肿瘤组织, 研磨成匀浆液, 过 360 目钢网, 制成肿瘤细胞悬液, 倒入离心管中, 加生理盐水调节细胞密度为 2×10^6 /mL, 于 32 只 T739 小鼠右后腿根部外侧皮下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液, 建立 LA795 肺腺癌小鼠皮下移植瘤模型。实验过程符合动物伦理学标准。

1.3 分组及用药 32 只实验小鼠接种 4 d 后随机平分为 4 组, (1) 对照组: 腹腔注射生理盐水 0.2 mL, 1 次/d, 共 16 d; (2) 紫杉醇组: 紫杉醇 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 溶于生理盐水 0.2 mL 中腹腔注射, 于接种后第 4 天和第 11 天各 1 次; (3) 苏拉明组: 苏拉明 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 溶于生理盐水 0.2 mL 中腹腔注射, 1 次/d, 用药 16 d; (4) 联合组 (苏拉明联合紫杉醇) 按苏拉明组和紫杉醇组的剂量与用法联合给药。

1.4 观察药物对移植瘤生长的影响 从小鼠接种后第 4 天开始, 每 5 天用游标卡尺测量小鼠皮下移植瘤最大长径 (a) 和横径 (b), 计算移植瘤体积 ($V = a \times b^2 / 2$)。第 24 天处死全部小鼠, 剥离皮下移植瘤称质量, 按公式计算各组药物的抑瘤率, 药物的抑瘤率 = $(1 - ET/EC) \times 100\%$, 其中 ET 为用药组平均瘤质量, EC 为对照组平均瘤质量。按以下公式计算 Q 值, $Q \text{ 值} = E(A+B) / [EA + EB(1-EA)]$, 其中 EA、EB 和 E(A+B) 分别表示紫杉醇组、苏拉明组及联合用药组的抑瘤率, 根据 Q 值来判断联合用药疗效, Q 值小于 0.85 为拮抗作用, Q 值介于 0.85~1.15 之间为相加作用, Q 值大于 1.15 为协同作用^[3]。

1.5 检测移植瘤内 Ang-2 表达及微血管密度 (microvessel density, MVD) SP 免疫组化法检测移植瘤内 Ang-2 表达及 MVD, 方法步骤严格按试剂盒说明书进行, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 代替一抗作阴性对照。Ang-2 的判定标准: 高倍显微镜下计数 100 个细胞, 细胞质及细胞膜呈棕黄色的阳性细胞数所占百分比小于 10% 为阴性, $\geq 10\%$ 阳性, 采用德国 KONTRON IBSA 2.5 全自动图像分析系统测定移植瘤组织中 Ang-2 的表达, 平均灰度和象素面积按系统内公式自动换算成阳性单位 (positive Unit, PU), 以 PU 值定量 Ang-2 的表达强度。MVD 的判定标准: 采用特异性的 CD34 抗体标记血管内皮细胞, 血管内皮细胞被染成棕黄色, 凡与邻近的肿瘤细胞、微血管或结缔组织分开, 呈棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞串计为一个血管, 肌层较厚或管腔大于 8 个红细胞直径的血管不计数。MVD 计数参考 Weidner 等^[4]

方法, 先在低倍镜下扫视整个组织切片, 在肿瘤浸润区选择内皮细胞染色清晰, 背景良好, 微血管最密集的 4 个视野, 然后在高倍显微镜视野范围内计数所有染色的微血管, 取 4 个视野的计数结果均数为该切片的微血管数。

1.6 统计学处理 用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用方差分析, 组间比较采用 *q* 检验, 相关性用直线相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠皮下移植瘤的生长曲线 32 只小鼠接种后均成功建立了 LA795 肺腺癌小鼠皮下移植瘤模型。实验期间对照组和联合组均死亡 1 只。各组小鼠第 4 天移植瘤体积大致相同。随着实验时间延长, 移植瘤体积均逐渐增大, 对照组小鼠于 14~24 d 生长明显快于紫杉醇组、苏拉明组和联合组 ($P < 0.05$), 联合组小鼠的移植瘤生长最慢。见图 1。

2.2 24 d 后各组用药对小鼠皮下移植瘤质量及抑瘤率的影响 对照组瘤质量大于其他 3 组 ($P < 0.05$)。苏拉明组和紫杉醇组瘤质量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。紫杉醇组和苏拉明组瘤质量均大于联合组 ($P < 0.05$); 苏拉明组、紫杉醇组及联合组的抑瘤率分别为 22.638%、25.629% 及 54.109%, 其 Q 值为 1.274 (> 1.15), 提示紫杉醇和苏拉明有协同作用。见表 1。

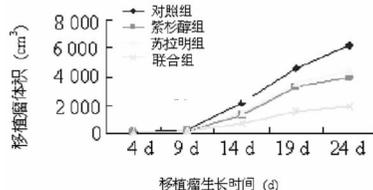


图 1 各组小鼠皮下移植瘤生长曲线

2.3 24 d 后各组小鼠皮下移植瘤内 Ang-2 表达及 MVD 对照组与紫杉醇组、苏拉明组与联合组移植瘤组织内 Ang-2 的表达大致相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 苏拉明组和联合组组织内 Ang-2 的表达均低于对照组和紫杉醇组 ($P < 0.05$)。对照组移植瘤组织内 MVD 高于其他 3 组 ($P < 0.05$); 紫杉醇组、苏拉明组和联合组移植瘤内 MVD 依次降低, 紫杉醇组与苏拉明组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而紫杉醇组、苏拉明组与联合组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1, 封 3 图 2、3。

2.4 相关性分析 移植瘤组织中 Ang-2 表达与移植瘤质量、MVD 与移植瘤质量均呈同向变化, 作相关分析均呈正相关性 ($r = 0.468, 0.526, P < 0.01$)。

3 讨 论

本研究发现, 随着实验时间延长, 移植瘤生长速度最快为

对照组,其后依次为苏拉明组、紫杉醇组及联合组。第 24 天剥离移植瘤,移植瘤质量最大为对照组,其后依次为苏拉明组、紫杉醇组及联合组;苏拉明组、紫杉醇组及联合组的抑瘤率分别为 22.638%、25.629% 及 54.109%,其 AQ 值为 1.274 (>1.15),提示苏拉明和紫杉醇均能抑制肺腺癌小鼠皮下移植瘤生长,二者联合有协同抑制作用。

Ang-2 是一种与血管生成及成熟有关的因子,与内皮细胞特异性酪氨酸酶受体上表皮生长因子样域酪氨酸激酶 2 (porcine tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, Tie-2) 结合,导致内皮细胞之间与支持细胞之间相互作用减弱,血管结构稳定性受到破坏,毛细血管出芽,形成新生血管^[5-6]。有研究发现 Ang-2 的表达是肿瘤血管新生起始的强化因素,与肿瘤血管生成的数目及密度、肿瘤的大小、肿瘤的侵袭转移密切相关,是临床判断肿瘤生物学行为的指标之一^[7-9]。MVD 是反映肿瘤血管生成活性或强度的重要定量指标之一^[10],可用于血管抑制药物的疗效评价。苏拉明作为血管生成抑制剂,能抑制肿瘤组织中碱性成纤维细胞生长因子的表达而使肿瘤细胞增生^[11]。紫杉醇是一种抗肿瘤药物,通过抑制细胞有丝分裂,使肿瘤细胞停止在 G₂ 期和 M 期,而且紫杉醇还可以通过与凋亡相关的基因作用,诱导肿瘤细胞凋亡^[12-14]。本研究选用人原始造血细胞抗原 CD34 标记移植瘤内血管内皮细胞,采用免疫组化检查移植瘤组织中 Ang-2 表达及 MVD。发现紫杉醇组移植瘤组织中 Ang-2 表达与对照组相当,但 MVD 明显低于对照组 ($P < 0.05$),说明紫杉醇抑制移植瘤内微血管形成可能不是通过抑制 Ang-2 表达实现,至于其具体机制可能为:紫杉醇作为周期特异性药物,作用于细胞微管网,通过提高有活性内皮细胞的微管动力,减弱分裂间期微管功能从而抑制血管生成^[15]。苏拉明组和联合组移植瘤内 Ang-2 表达大致相当,但明显低于对照组和紫杉醇组 ($P < 0.05$);苏拉明组与紫杉醇组 MVD 相当,但明显低于对照组 ($P < 0.05$);联合组 MVD 明显低于对照组、紫杉醇组和苏拉明组 ($P < 0.05$);移植瘤内 Ang-2 表达或 MVD 与瘤质量均呈同向变化,作相关分析均呈正相关性 ($r = 0.468, 0.526, P < 0.01$),说明苏拉明可能通过下调移植瘤组织中 Ang-2 表达,减少微血管形成,导致肿瘤局部营养和血供不足,从而抑制肿瘤细胞生长,更有意义的是苏拉明与紫杉醇有协同抑制作用。

本研究表明苏拉明与紫杉醇对 LA795 肺腺癌小鼠皮下移植瘤生长具有协同抑制作用,其机制可能为苏拉明下调肿瘤内 Ang-2 表达,抑制肿瘤内微血管形成,从而抑制肿瘤生长;另一方面,紫杉醇除有抑制细胞有丝分裂,诱导肿瘤细胞凋亡等作用外^[12-13],还能与苏拉明协同抑制肿瘤内微血管形成,从而抑制肿瘤生长。因此,血管生成抑制剂与紫杉醇联合治疗肺腺癌具有较好的临床应用前景。

参考文献:

[1] 邵荣光. 以细胞周期调控分子为靶点的肿瘤治疗[J]. 中国肿瘤, 2005, 14(11): 706-708.
[2] 邵荣光. 新分子靶点的抗癌药物研究[J]. 中国肿瘤,

2002, 11(4): 228-230.

- [3] 王小华, 王铮, 段宝春, 等. 烟曲霉醇联合环磷酰胺对小鼠 LA795 肺腺癌转移的抑制作用[J]. 癌症, 2005, 24(12): 1448-1452.
[4] Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication[J]. Semin Diagn Pathol, 1993, 10(4): 302-313.
[5] Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 527-537.
[6] Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, et al. Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(7 Pt 2): 157-164.
[7] Zhou Q, Guo P, Gallo JM. Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1540-1549.
[8] 雷杰, 夏登云, 费建东, 等. Ang-2 和 ER 在乳腺良恶性肿瘤中的表达及生物学意义[J]. 河北医药, 2009, 31(2): 137-138.
[9] Da MX, Wu Z, Tian HW. Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors[J]. Arch Med Res, 2008, 39(4): 365-372.
[10] 张波, 孔宪炳. 肝细胞癌的抗新生血管治疗[J]. 重庆医学, 2007, 36(7): 656-659.
[11] 贺兼斌, 向志, 杨凯, 等. 苏拉明对肺腺癌小鼠移植瘤的抑制作用及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(4): 408-412.
[12] Yoshino T, Shiina H, Urakami S, et al. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6116-6124.
[13] Yang YC, Hsu YT, Wu CC, et al. Silencing of astrin induces the p53-dependent apoptosis by suppression of HPV18 E6 expression and sensitizes cells to paclitaxel treatment in HeLa cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 428-434.
[14] 周文杰, 蒋敬庭, 李敏, 等. CIK 联合紫杉醇对胃癌细胞株 SGC-7901 的杀伤作用观察[J]. 山东医药, 2009, 49(42): 70-71.
[15] Merchan JR, Jayaram DR, Supko JG, et al. Increased endothelial uptake of paclitaxel as a potential mechanism for its antiangiogenic effects: potentiation by Cox-2 inhibition[J]. Int J Cancer, 2005, 113(3): 490-498.

(收稿日期: 2011-01-13 修回日期: 2011-04-30)