重组人内皮抑素对胃肠间质瘤血管形成及生长的抑制作用

王天宝[1*]，李至秦[2]，唐录英[3]，黄文生[1]，林维浩[1]，石汉平[1]，董文广[1]
(中山大学附属第一医院 1. 外科，2. 内镜室，广东 广州 510080 3.中山大学 附属第三医院病理科，广东 广州 510630)

摘 要：【目的】研究重组人内皮抑素(recombinant human endostatin，rhES)能否抑制胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor，GIST)裸鼠移植肿瘤血管生成及生长，探讨抑制血管形成作为 GIST 治疗方法的可行性。【方法】随机将 20 只荷瘤裸鼠分为实验组与对照组。对照组瘤周注射生理盐水，实验组瘤周注射 rhES，连用 10 d。自用药开始，每 5 d 测量肿瘤体积，直至用药结束后 5 d。计算抑瘤率和肿瘤缩小率。比较实验组与对照组肿瘤体积、微血管密度(microvascular density，MVD)、bcl-2 阳性表达率、凋亡指数(AI)及实验组治疗前后肿瘤体积差异是否具有显著性。【结果】用药前实验组与对照组肿瘤体积无差别($P = 0.628$)。用药后实验组肿瘤体积逐渐减小。用药结束后 5 d，实验组肿瘤体积与用药前及对照组相比均明显缩小($P = 0.000$)，抑瘤率 86.5%，肿瘤缩小率为 55.5%。所有瘤株 CD117 均为阳性表达。实验组 MVD 低于对照组($P = 0.020$)。实验组 bcl-2 阳性表达率均低于对照组($P = 0.023$)。实验组 AI 高于对照组($P = 0.020$)。【结论】rhES 抑制 GIST 血管生成、促进肿瘤细胞凋亡及遏制肿瘤生长，有可能成为治疗 GIST 的有效方法之一。

关键词：胃肠间质瘤；重组人内皮抑素；血管形成；裸鼠
中图分类号：R730.53，735.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2010)06-0798-04

Inhibition of Recombinant Human Endostatin on Angiogenesis and Growth of Gastrointestinal Stromal Tumor

WANG Tian-bao[1*], LI Zhi-qin[2], TANG Lu-ying[3], HUANG Wen-sheng[3],
LIN Wei-hao[1], SHI Han-ping[1], DONG Wen-guang[1]
(1. Department of Surgery, 2. Department of Endoscopy The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, china)

Abstract：【Objective】To investigate whether rhES can inhibit the angiogenesis and growth of GIST xenografts in nude mices, and the feasibility of anti-angiogenesis to become treatment method for GIST.【Methods】Twenty Balb/c-nu/nu mice burdened GIST were randomly divided into two groups. NS 0.1 mL in control group and rhES 2 mg/kg in experimental group were injected around the tumor, once a day for 10 days. The tumor bulk was measured every five days until five days after the end of test. The tumor inhibition rate (TIR) and tumor condensing rate (TCR) were calculated. The difference of tumor bulk, microvascular density (MVD), bcl-2 positive expression rate and AI between the two groups were assessed. The tumor volumes between before and after treatment in experimental group were compared.【Results】The difference of the tumor bulk between the two group was no statistical significance before treatment ($P = 0.628$), but at the end of test, the difference was significant ($P = 0.000$), and in the test group the tumor bulk was also decreased significantly after treatment ($P = 0.000$). In experimental group, the TIR and TCR were 86.5% and 55.5%, respectively. All xenografts showed CD117 positive staining. MVD and bcl-2 positive rate presented lower in experimental group than those in control group ($P = 0.020$ and $P = 0.023$, respectively). AI increased significant in experimental group compared with in control group ($P = 0.020$).【Conclusions】rhES can reduce angiogenesis, promote cell apoptosis, and inhibit the growth of GIST xenograft. It is possible that rhES becomes an effective drug for GIST in the future.

Key words：GIST; recombinant human endostatin; angiogenesis; nude mice
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(6):798-801]

收稿日期：2010-03-01
基金项目：广东省科技厅基金(2008B060600022)；教育部博士点新教师基金(20070558266)；广东省科委基金(2007B031515004)
作者简介：王天宝，副教授，硕士生导师。E-mail：wangtianbao1@163.com

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是起源于胃肠道的间叶性肿瘤之一,发生于胃者约为 60% ~ 70%,小肠 20% ~ 30%,直肠约 5%。90%的 GIST 标本 CD117 免疫组化阳性表达,是诊断 GIST 的重要依据。手术切除是 GIST 首选并有可能治愈的惟一方法, 但术后复发率约为 90%,传统常用的消化道肿瘤化学药基本无效。目前可选用的药物为格列卫,但有效率不足 60%,停药后即复发,无效者占 40%,其中包括产生原发或继发耐药者占 20%,因此应探索新的 GIST 治疗方法[1]。血管生成是恶性肿瘤浸润生长和转移的必要条件之一, 减少肿瘤的血供可抑制肿瘤的生长和转移, 因此抗血管生成现已成为肿瘤治疗的新靶点。本课题组曾用重组人内皮抑素(recombinant human endostatin, rhES)高效抑制胃癌新生血管形成, 减少微血管密度, 促进肿瘤细胞凋亡,遏制胃癌肿瘤生长[2]。文献以及本课题组前期研究证实GIST 肿瘤组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)明显升高,与基于 CD31 染色的瘤组织微血管密度(microvascular density, MVD)密切相关,促进疾病进展,高表达 VEGF 及高 MVD 提示预后不良, 因此抑制血管形成有可能成为治疗 GIST 新方法[1,3-4]。凋亡抑制蛋白 bcl-2 在 GIST 阳性表达率高达 93%,提示 GIST 生长与肿瘤细胞凋亡受阻相关 [5]。本课题研究 rhES 对 GIST 血管形成及肿瘤细胞凋亡的影响,探讨抑制血管形成作为 GIST 治疗方法的可行性,目前尚未见有关此项研究的文献报道。

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

Balb/c-nu/nu 裸鼠购自中国医学科学院动物研究所,周龄 5 ~ 10 周,体质量 10 ~ 20 g,雌、雄兼用。CD117、bcl-2 及 CD31 免疫组化试剂盒与细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。rhES 购自山东烟台荣昌制药有限公司。

1.2　建立异位移植瘤株

参考 Huynh 等[6]报道的 GIST 异位移植瘤株构建方法,具体步骤如下:胃间质瘤离体后,迅速在无菌条件下切取大小约 0.8 cm × 0.8 cm 肿瘤组织,立即置于装有冰 RPMI 1640 无菌试管中,将该试管包埋于装有冰块的泡沫试剂盒并迅速转运至实验室。将标本切为 2 ~ 3 mm 厚度的薄片组织,RPMI 1640 冲洗 3 次,进一步剪碎,以便可顺利通过 18# 注射针头。按 1∶1 体积与基质胶混合均匀,Balb/c-nu/nu 小鼠背侧皮下注射 0.1 mL。当移植瘤直径约 1 cm 时,传代移植 5 只裸鼠。取第 2 代移植瘤组织,混合后,按前述方法得 GIST 组织混合液,同时给 26 只裸鼠皮下注射。共计 20 例形成异位移植肿瘤,随机分为实验组和对照组。

1.3　用药方法

实验组给予 rhES 2 mg/kg, 对照组给予生理盐水 0.1 mL,瘤周注射,1 次/d,连用 10 d,实验操作均遵循无菌原则。

1.4　观察项目

1.4.1　*移植瘤生长情况*　移植后逐日观察荷瘤鼠生活情况,肿瘤大小与外观,记录潜伏期。用药后每 5 d 测量肿瘤长径(a),短径(b),按 $V = a \times b^2/2$ 求得肿瘤的体积。计算抑瘤率 (tumor inhibition rate, TIR),TIR=(对照组肿瘤体积-实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积×100%。肿瘤缩小率(tumor condensing rate, TCR),TCR= (治疗前肿瘤体积-治疗后肿瘤体积)/治疗前肿瘤体积 × 100%。

1.4.2　*HE 染色病理检查*　实验结束时瘤株组织、肝、肺行 HE 染色病理检查确定有无转移。

1.4.3　*SABC 免疫组织化学检测*　免疫组化检测移植瘤组织中 CD117、bcl-2 及 CD31 表达情况,操作步骤依说明书进行。CD117 及 bcl-2 表达阳性细胞可见胞浆或细胞膜棕黄色染色 (图 1,2), 将 4 个 200 倍视野平均阳性细胞数< 20%者归为阴性表达组, 平均阳性细胞数> 20%者归为阳性表达组。CD31 可使血管内皮染色,从而确定 MVD。选择微血管密集的 4 个区域,在 100 倍显微镜下记数血管数,取平均值作为每个标本的 MVD(图 3)。

1.4.4　*原位末端标记法测定肿瘤细胞凋亡*　操作步骤依说明书进行,在 400 倍视野下记数 4 个凋亡细胞集中区,平均每 100 个肿瘤细胞中凋亡细胞数,即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.5　统计学处理

SPSS10.5 统计软件,采用 t 检验及 Fisher′s 确切概率法,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　GIST 瘤株肿瘤生长

瘤株肿瘤潜伏期均为 9 – 15 d，呈膨胀性生长，质韧，活动(图 4)。移植后 25 d，瘤株肿瘤体积实验组平均为(173.9 ± 17.4) mm^3，对照组为(177.0 ± 17.7)mm^3 (t = 0.493，P = 0.628)。用药后实验组肿瘤体积逐渐缩小，对照组依然较快生长。治疗结束后 5 d，实验组肿瘤体积平均为(77.3 ± 8.9)mm^3，对照组为(571.3 ± 52.6)mm^3 (t = 29.265，P = 0.000)。实验组 TIR 为 86.5%，TCR 为 55.5%。用药结束后实验组肿瘤体积明显小于用药前(t = 15.587，P = 0.000)。部分对照组裸鼠出现恶液质，局部皮肤破溃。

2.2 HE 染色病理检查

两组瘤株均呈间叶性肿瘤，瘤细胞成梭形，细胞核深染，胞浆丰富，细胞排列欠规则，但实验组坏死区较多(图 5)。所有瘤株均未见肝或肺转移。

2.3 CD117 及 bcl-2 免疫组化检测

两组瘤株 CD117 均为阳性染色，证实瘤株保持胃肠间质瘤组织学特性(图 6)。Bcl-2 阳性表达实验组 2 例(2/10)，对照组为 8 例(8/10)(Fisher′s test，P = 0.023)。

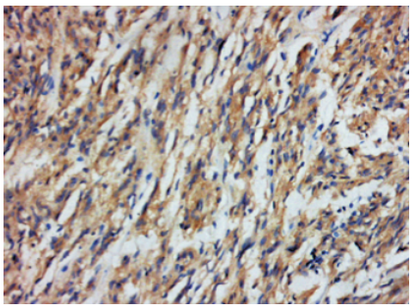


图 1 CD117 阳性染色(× 200)
Fig.1 CD117 positive staining presented brown cell in xenograft tumor(× 200)

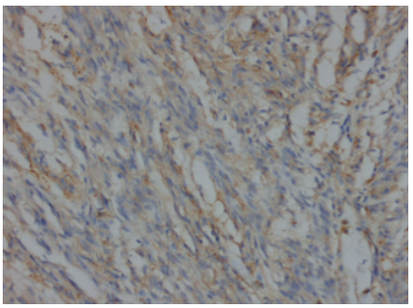


图 2 bcl-2 阳性染色(× 200)
Fig.2 bcl-2 positive staining presented brown cell in xenograft tumor(× 200)

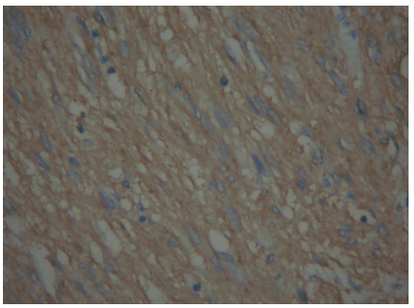


图 3 CD31 阳性染色微血管(× 100)
Fig.3 CD113 staining showed the microvascular endothelial cell in xenograft tumor(× 100)



图 4 GIST 裸鼠移植瘤株
Fig.4 Xenograft in nude mice was expansive, mobile, and a little hard.

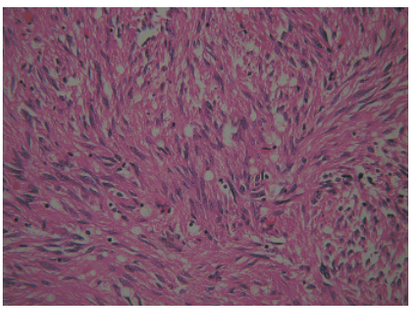


图 5 移植瘤 HE 染色(× 200)
Fig.5 HE staining of xenograft presented lots of spindle-shaped cell(× 200)

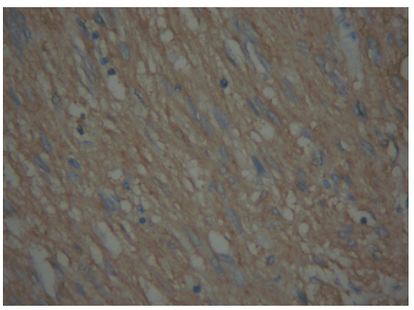


图 6 移植瘤 CD117 阳性染色(× 200)
Fig.6 CD117 staining showed brown cell in xenograft tumor (× 200)

2.4 MVD 比较

实验组 MVD 平均为(7.9 ± 1.1)个/100 × Hp，对照组为(10.3 ± 1.8)个/100 × Hp (t = 3.556，P = 0.020)。

2.5 肿瘤细胞 AI

实验组 AI 平均为(6.8 ± 1.3)%，对照组为(5.0 ± 0.9)%(t = 3.515，P = 0.020)。

3 讨 论

血管形成是恶性实体肿瘤生长、浸润和转移的必要条件之一，1972 年 Folkman 提出抑制血管生成可作为治疗肿瘤的方法之一。VEGF 是血管内皮细胞有丝分裂原，在诱导肿瘤新生血管形成中

发挥重要作用。我们前期研究发现,GIST 肿瘤组织 VEGF 及 MVD 明显升高，提示 GIST 存在新生血管增加，进一步分析证实 VEGF 及 MVD 与 GIST核分裂数、复发转移及不良预后有关[1]。Nakayama等[3]报道 GIST 中 VEGF 及 VEGFR-1 和 VEGFR-2 表达升高。Imamura 等[4]发现 GIST 血管形成与患者预后有关,MVD 高者预后不良。McAuliffe 等[7]报道新生血管促进 GIST 病期进展,影响患者预后,提出抑制血管形成有可能是 GIST 治疗的新方法。总之,目前资料证实新生血管增加促进 GIST 病情进展,抗血管生成治疗有可能成为 GIST 治疗的重要策略之一。

1997年,O′Reilly 等[8]分离出内皮抑素(ES),可有效地抑制血管形成,使原发肿瘤缩小到 < 1 mm^3,未发现耐药性及毒性反应。本研究显示实验组 MVD 明显低于对照组,证实 rhES 可抑制 GIST 裸鼠移植瘤微血管形成。Subramanian 等[9]证实rhES 抑制卵巢癌原位移植瘤生长,延长实验鼠生存期。Ling 等[10]报道 rhES 通过抑制 VEGF 诱导的内皮细胞 KDR/Flk-1 酪氨酸磷酸化而抑制新生血管形成。本资料发现 rhES 治疗组凋亡抑制基因 bcl-2 表达明显下调，而凋亡指数显著增加，提示 rhES 促进 GIST 细胞凋亡。文献亦报道内皮抑素治疗肿瘤并不是使肿瘤细胞的增殖减少，而是使其凋亡速度比治疗前高出 7 倍，给予结直肠癌裸鼠瘤株肌肉注射含有 ES 基因重组腺病毒,足以阻止肿瘤血管形成,抑制肿瘤生长[11]。本研究结果显示实验组肿瘤体积逐渐缩小,TIR 为 86.5%,TCR 为 55.5%,提示 rhES 可遏制 GIST 生长,与文献报道 rhES 抑制胃癌、卵巢癌及直肠癌生长的结果相一致[2, 9,11]。

综上所述,rhES 抑制 GIST 内皮细胞增殖,减少肿瘤血管形成,促进细胞凋亡,从而“杀灭”肿瘤细胞,减小肿瘤体积。随着抑制血管形成在实体肿瘤临床治疗中的进一步推广,rhES 有望成为治疗 GIST 的有效方法之一。

参考文献：

[1] Wang TB, Qiu WS, Wei B, et al. Serum vascular endothelial growth factor and angiogenesis are related to the prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors [J]. Iri J Med Sci, 2009, 178(3): 315-320.

[2] 王天宝,董文广,李兆亭. 重组人内皮抑素(rhES)联合应用 5-Fu 对胃癌裸鼠瘤株生长的影响[J].中华普通外科杂志,2005,20(5):307-310.

[3] Nakayama T, Cho YC, Mine Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors VEGFR-1 and 2 in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(38): 6182-6187.

[4] Imamura M, Yamamoto H, Nakamura N, et al. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor[J]. Mod Pathol, 2007, 20(5): 529-537.

[5] Huynh H, Lee JW, Chow PK, et al. Sorafenib induces growth suppression in mouse models of gastrointestinal stromal tumor[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(1): 152-159.

[6] Meara RS, Cangiarella J, Simsir A, et al. Prediction of aggressiveness of gastrointestinal stromal tumours based on immunostaining with bcl-2, Ki-67 and p53 [J]. Cytopathology, 2007,18(5):283-289.

[7] McAuliffe JC, Lazar AJ, Yang D, et al. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(22 Pt 1): 6727-6734.

[8] O′Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and human tumor growth [J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.

[9] Subramanian IV, Bui Nguyen TM, Truskinovsky AM, et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of a mutant endostatin in combination with carboplatin treatment inhibits orthotopic growth of ovarian cancer and improves long-term survival [J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4319-4328.

[10] Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 79-84.

[11] Shi W, Teschendorf C, Muzyczka N, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of endostatin inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo [J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(6):513-521.

(编辑　王晓鹰)