

人纤溶酶原 K5 体内抑制 Lewis 肺癌肿瘤生长与转移

蔡卫斌, 程锐, 徐祖敏, 杨霞, 杨中汉, 魏玲, 杨军, 高国全

(中山大学中山医学院生物化学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】通过体内实验探讨人纤溶酶原 Kringle 5(K5)对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长与转移的抑制作用。【方法】采用腋下接种肿瘤细胞的方法建立 Lewis 肺癌细胞皮下种植瘤小鼠模型,分为 PBS 对照组和 K5 治疗组,观察各组肿瘤生长情况,测量肿瘤大小,制备小鼠体质量-时间曲线和肿瘤体积-时间曲线;采用皮下种植瘤剔除术建立 Lewis 肺癌自发性肺转移模型,术后分为 PBS 对照组和 K5 治疗组,观察各组小鼠肺组织转移瘤数量,取肺组织进行病理学分析。【结果】在皮下种植瘤模型中,与对照组相比,K5 治疗组小鼠肿瘤体积-时间曲线变化平缓,肿块增长缓慢,肿瘤质量明显降低[分别为 (4.57 ± 0.79) g 和 (1.15 ± 0.31) g, $P=0.006$];在 Lewis 肺癌转移瘤模型中,K5 治疗组小鼠肺表面转移瘤结节数[分别为 (15.75 ± 9.79) 个和 (6.60 ± 3.39) 个, $P=0.029$]以及肺湿质量明显少于对照组,高倍镜下治疗组肺微转移灶数目亦较少。【结论】人纤溶酶原 K5 能显著抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长,并能明显抑制 Lewis 肺癌细胞转移。

关键词: 纤溶酶原 K5; 肺癌; 肿瘤转移

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2008)05-0566-04

Inhibition of Human Plasminogen Kringle 5 on Growth and Metastasis of Lewis Lung Carcinoma in Vivo

CAI Wei-bin, CHENG Rui, XU Zu-min, YANG Xia, YANG Zhong-han,

WEI Ling, YANG Jun, GAO Guo-quan

(Department of Biochemistry, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the inhibitory effects of human plasminogen kringle 5 (K5) on the growth and metastasis of mouse Lewis lung carcinoma (LLC) in vivo. 【Methods】To evaluate K5 activity in vivo, the mouse lung cancer graft model was established by injection of Lewis lung carcinoma cells subcutaneously into the oter of C57BL/6J mice. On the 7th days after inoculation, the mice then received an intraperitoneal injection of K5 or phosphate buffered solution (PBS) as control. Tumor volume and mouse body weight were measured and plotted in tumor-volume curve and body-weight curve to estimate the tumor growth rate and general constitution of the animals during the course of treatment. A spontaneous metastasis mouse model of Lewis lung carcinoma was established by removing the primary tumors in the 7th days after inoculation. Right after the tumor remove, mice received K5 or PBS by intraperitoneal injection. The body weight and survival rate of both groups were recorded. After the mice were executed, the lungs were dissected, weighted, and undertaken a pathological analysis. 【Results】The K5-treated group had a tumor growth rate which was significantly lower than that of the control group in grafted LLC mouse model, and distinctly depression of tumor weight [(4.57 ± 0.79) g, and (1.15 ± 0.31) g, respectively, $P=0.006$] and body weight. Compared to PBS-treated group, the incidence of metastasis to lung and the mean number of metastatic lung nodules (15.75 ± 9.79 and 6.60 ± 3.39 respectively, $P=0.29$) and the wet lung weight of each animal were reduced by K5 treatment in metastasis model of mouse Lewis lung carcinoma.

收稿日期:2008-03-17

基金项目:国家自然科学基金(30570372);国家自然科学基金(30600724);国家自然科学基金(30700120);广东省自然科学基金团队(No.06201946);教育部博士点基金(新教师)(20070558209);教育部博士点基金(新教师)(20070558215);广东省科技计划项目(2005A10902003);广东省科技计划项目(2006B35502001);广东省医学科研基金(B2005021)

作者简介:蔡卫斌(1976-),男,湖北黄冈人,博士,讲师;高国全,通讯作者,教授,课题负责人, E-mail: gaogq@mail.sysu.edu.cn

Similarly, the pulmonary micrometastasis of K5-treated group decreased obviously with microscopic observation at high magnification. 【Conclusion】 K5 can inhibit the growth of Lewis lung carcinoma, and suppress the pulmonary metastasis of LLC cells in vivo.

Key words: plasminogen kringle 5; lung carcinoma; metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5):566-569; 574]

K5 是人纤溶酶原(plasminogen)分子中与血管抑素(angiotatin)相连的另一个 Kringle 结构域,是抗血管增生活性最强的纤溶酶原裂解片段^[1]。我们在视网膜血管增生大鼠模型以及兔角膜新生血管增生模型中观察到 K5 能预防和阻断新生血管形成^[2,3]。由于 K5 的高活性、高稳定性以及在体内、外实验中表现出的显著效果,我们分析 K5 应具备潜在的抑制恶性肿瘤新生血管形成的作用,最近我们在 HepA 肝癌皮下种植瘤模型上观察到 K5 能显著降低肿瘤组织中微血管密度(microvessel density)和抑制肿瘤生长^[4]。为了进一步探讨 K5 抗瘤作用机制,我们在体外观察了 K5 对肿瘤细胞的直接影响,发现 K5 能明显抑制多种肿瘤细胞株的迁移和侵袭。本研究在前期工作基础上,在小鼠 Lewis 肺癌(Lewis lung carcinoma, LLC)移植瘤模型和自发性肿瘤转移模型上观察 K5 体内抗肿瘤生长和转移作用,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

K5/pET22b (+) 重组体由本课题构建并保存,重组蛋白的获取以及功能鉴定方法见参考文献[5];高糖 DMEM 培养基购自 GBICO 公司;FBS 为天津灏洋生物公司产品;水合氯醛为天津市大茂化学试剂厂产品;40 g/L 多聚甲醛、伊红和苏木素均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 实验动物

SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,雄性,体质量 19~22 g,由中山大学中山医学院实验动物中心供应,许可证号:SCXK(粤)2004-0011,粤监证字 2006A071。

1.3 LLC 细胞的体外培养与保存

鼠源性 LLC 细胞由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所赵清正教授惠赠。LLC 细胞在含 50 mL/L FBS 的高糖 DMEM 培养基、37℃、50 mL/L CO₂ 环境中培养,隔日换液,4~6 d 传代 1 次。

常规方法冻存和复苏 LLC 细胞生长缓慢,常收集复苏后细胞或处于对数生长期的 LLC 细胞,用生理盐水重悬至细胞数为 1×10^6 /L,以 0.2 mL/只的剂量接种于 C57BL/6J 小鼠的方式保种。接种 7~9 d 后可形成大小约 300 mm³ 肿块,无菌条件下取瘤块按参考文献[6]方法进行原代培养,HE 染色观察培养细胞纯度,并收集培养细胞重新接种 C57BL/6J 小鼠以证实其成瘤性。通过这种方法即可获得生长旺盛、体内成瘤率高的肿瘤细胞。

1.4 LLC 细胞皮下种植瘤模型的建立及药物处理

LLC 细胞皮下种植方式如前述。取接种肿瘤 7 d 后的荷瘤 C57BL/6J 小鼠,随机分为 PBS 对照组和 K5 处理组。K5 处理组用药总剂量为 10 mg/kg,将重组 K5 蛋白用无菌 PBS 稀释至所需浓度,每次腹腔注射 0.2 mL,隔 2 d 给药 1 次,连续 4 次,对照组每次注射 0.2 mL PBS,末次给药后的第 6 天处死小鼠。于接种肿瘤前记录小鼠原始体质量。接种后第 7 天开始每隔两天记录小鼠体质量、测量肿瘤大小,计算体质量增长率和肿瘤体积,公式分别为:体质量增长率=(测定体质量-原始体质量)/原始体质量 $\times 100\%$;肿瘤体积=($a \times b^2$)/2 (a 、 b 分别为肿瘤的长径和短径)。处死小鼠后,剥取肿瘤,称瘤质量。

1.5 LLC 细胞自发性肺转移模型的建立及药物处理

参照 O'Reilly 等^[7]的实验方法,稍加改进:取接种 7~9 d 的荷瘤 C57BL/6J 小鼠(约 300~500 mm³),腹腔注射 50 g/L 水合氯醛 0.2 mL,小鼠深度麻醉后遵守无菌原则分离出完整肿瘤,缝合前向皮下创面推加 0.2 mL 青霉素(10^4 万单位/L),将小鼠转移至清洁处,常规饲养。每天观察小鼠状态。小鼠复苏后即随机分为 PBS 组和 K5 处理组。以无菌的 PBS 为溶剂,按总剂量为 10 mg/kg 将重组 K5 蛋白适当稀释,隔 2 d 给药 1 次,连续 4 次,每次腹腔注射 0.2 mL,对照组以相同方式给 0.2 mL PBS。于接种肿瘤前记录小鼠原始体质量,术后每 2 天记录小鼠体质量 1 次。对中期死亡小鼠称质

量,取肺组织。末次给药 6 d 后处死小鼠,称鼠质量,取肺组织。对所有肺组织称全肺湿质量,观察并计数全肺表面肉眼可见的瘤结节。

1.6 自发性肺转移小鼠肺组织的病理切片分析

将所有标本的同一侧完整肺组织固定于 40 g/L 多聚甲醛,进行病理切片。每个肺被分为 3 块包埋于同一蜡块,每一蜡块切 3 张片并行 HE 染色。在 160 × 镜下观察并计数具有原发瘤病理特征且独立的 Lewis 肺癌微转移灶的数目,每张切片随机选择 5 个视野计数,以每个标本 3 张切片中 15 个视野微转移灶的平均数为评价指标。癌细胞肺转移后常引起肺间质反应性增生使肺泡萎缩,故使用 Imagepro Plus V6.0 图像分析软件定量分析肺泡相对面积,间接反映肿瘤微转移的程度。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,计量指标结果用 $\bar{x} \pm s$; 组间均数比较采用 ANOVA 分析或

t 检验,结果用 Microsoft Excel 进行制图处理。

2 结果

2.1 K5 对小鼠 Lewis 肺癌实体瘤生长的抑制作用

在皮下接种 LLC 细胞后第 16 天,PBS 对照组与 K5 处理组的肿瘤体积有明显差异(图 1A, $P = 0.008$),且 K5 处理组肿块体积变化平缓,肿瘤生长缓慢,而 PBS 对照组肿块呈指数增长的方式生长(图 1A);同时,在接种后第 16 天,PBS 对照组荷瘤小鼠体质量增长速度超过 K5 处理组,差异有统计学意义(图 1B,第 19 天 $P = 0.041$,第 22 天 $P = 0.006$);接种后第 22 天处死小鼠,剥瘤取材,称瘤质量显示 K5 治疗组肿块明显小于 PBS 对照组,说明 K5 能明显抑制 LLC 皮下种植瘤的生长,瘤质量分别为 (4.6 ± 0.8) g 和 (1.2 ± 0.3) g, $P = 0.006$ (图 1C)。

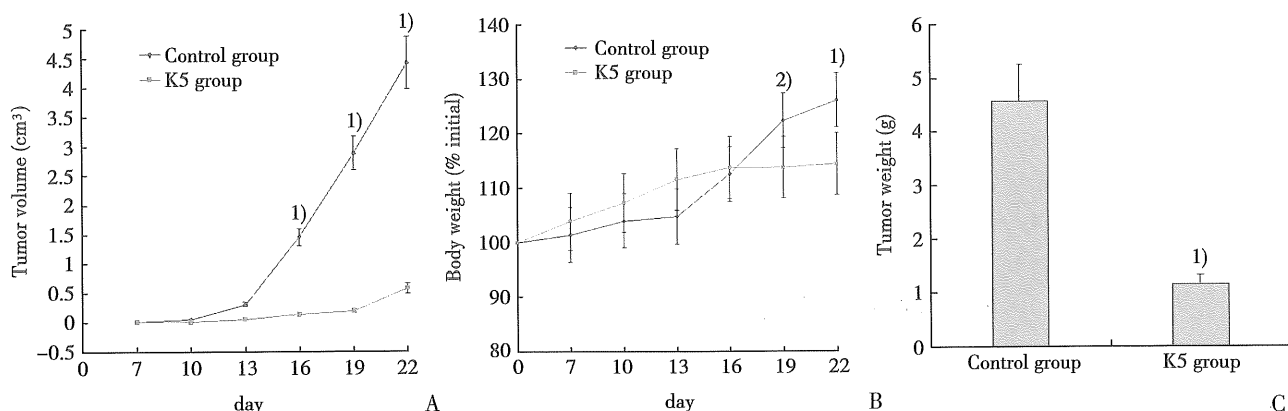


图 1 K5 抑制 Lewis 肺癌细胞皮下种植瘤小鼠模型的肿瘤生长

Fig.1 Inhibition of LLC grafted tumor growth by K5

A: Tumor volumes curve of K5-treated group or PBS-treated control group on days indicated; B: Body weight curve of animal treated with K5 or PBS on days indicated; C: Tumor weight of K5-treated group and PBS-treated control group; 1): $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

2.2 Lewis 肺癌细胞自发性转移模型的建立

在 C57BL/6J 小鼠体内 Lewis 肺癌细胞转移的靶器官主要是肺和肝脏,其他器官少见;皮下原发瘤剔除术后第 7 天即可观察到肺和肝转移灶,术后第 15 天约 80% 的小鼠肝和肺组织有肉眼可见的转移瘤结节,高倍镜下见大量微转移灶(图 2)。

2.3 K5 对小鼠 Lewis 肺癌细胞肺转移的抑制作用

术后第 15 天处死小鼠,取肺组织,大体观可见 K5 治疗组小鼠肺表面瘤结节数明显少于 PBS 对照组,差异具有统计学意义(图 3A, $P = 0.029$);高倍镜下可见 K5 治疗组小鼠肺组织中微转移灶

数量明显少于 PBS 对照组,差异具有统计学意义(图 3B, $P = 0.008$),低倍镜下可见 K5 治疗组小鼠部分接近正常肺形态,且肺泡相对面积比 PBS 对照组高,差异有统计学意义,结果显示:K5 对 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌细胞自发性肺转移有明显抑制作用。

3 讨论

一般认为,K5 对肿瘤生长和肿瘤组织血管密度的显著抑制作用主要取决于其抗血管增生活

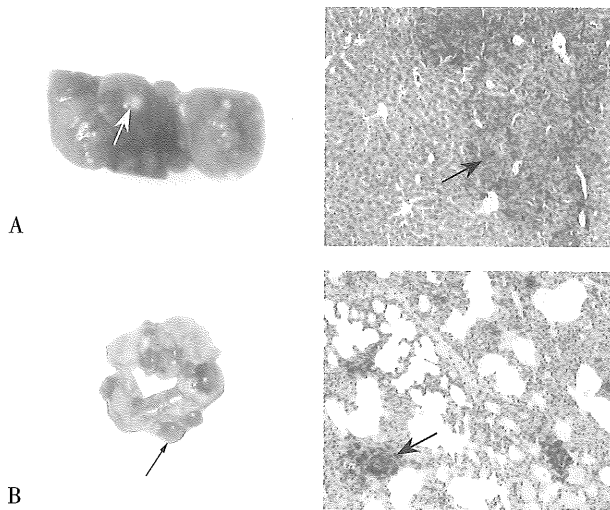


图 2 皮下接种 Lewis 肺癌细胞向肝和肺组织转移
Fig.2 Pulmonary and hepatic metastasis of Lewis lung carcinoma cells from subcutaneous inoculation

A: surface nodules (left, white arrow) and micrometastasis (right, black arrow, $\times 320$) in liver; B: surface nodules (left, black arrow) and micrometastasis (right, black arrow, $\times 320$) in lung

性^[4],从这个角度讲,K5 也应具备抑制肿瘤转移的作用。本研究采用 Lewis 肺癌细胞株建立恶性肿瘤自发性转移模型,在体内实验初步探讨和证实 K5 对肿瘤细胞转移的影响。

本研究采用的 LLC 细胞是转移型小鼠非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)细胞,皮下种植时一般定向转移至肝和肺组织,是建立肿瘤自发性转移模型的常用细胞株^[6,7]。本研究对 O'Reilly^[7]建模方法稍加修改,即选取血管丰富的腋窝作为接种部位,手术时间选择在接种后的 7 ~ 9 d,此时皮下肿瘤大小约 300 ~ 500 mm³。O'Reilly 的研究选在接种后第 13 天进行剥瘤,在实验中我们发现此时手术后死亡率明显增加,分析原因可能与接种的细胞数量、接种部位(腋窝处有很多大血管)以及细胞来源有关。采用腋窝下种植瘤剔除术建立的 LLC 自发性肺转移模型可以观察较高的转移效率(大于 80%),为后续实验奠定了基础。

在 Lewis 肺癌细胞皮下种植瘤模型上我们证实 K5 能明显抑制肿瘤生长,降低肿瘤块大小和质量。由于 C57BL/6J 小鼠体质量较小(约 20 ~ 25 g),且 LLC 高度恶性,种植瘤短期内能快速增大,所以肿瘤块质量改变间接反应在小鼠体质量改变。在 Lewis 肺癌自发性肺转移模型上首次证实了 K5 对肿瘤转移的抑制作用,肺组织大体观和镜下观表明 K5 处理后肺表面瘤结节和微转移灶均明显减

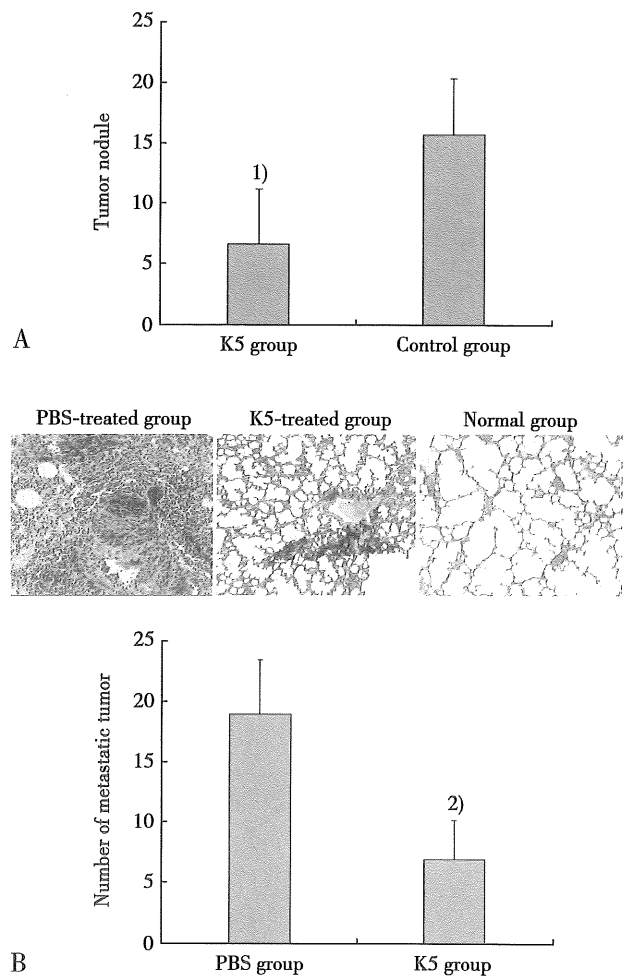


图 3 K5 抑制 Lewis 肺癌细胞自发性肺转移。

Fig.3 Inhibition of LLC metastatic tumor growth in vivo by K5

A: Metastatic surface nodules of mouse lung; B: Number of micrometastasis in lung, 1): $P < 0.05$ vs PBS control group; 2): $P < 0.01$ vs PBS control group; $\times 320$

少,肺间质反应增生减弱,肺泡相对面积增加,接近正常肺组织结构特征,肺湿质量减少。在实验取材过程中还观察到多数 K5 处理组小鼠肺可以在 PBS 中漂浮,而对照组小鼠肺组织却在 PBS 下沉,说明肺组织密度和质量有明显差异。

K5 是活性很强的血管增生抑制因子可能通过多种途径共同作用抑制肿瘤转移。一般认为其作用的靶点是处于增殖状态的血管内皮细胞^[8],其抗肿瘤生长和转移作用与其抗血管增生活性密切相关。同时,有研究表明 K5 对某些有运动潜能的细胞,如血管生成过程中的内皮细胞^[9]、脑胶质瘤中巨噬细胞^[10,11]以及碱烧伤角膜血管增生模型中的