

## 血管抑素基因转染联合化疗药物对人卵巢癌裸鼠 腹腔移植瘤的治疗作用

孙 平, 孔北华

山东大学 齐鲁医院妇产科, 济南 250012

通信作者: 孔北华 电话: 0531-82169009, 电子邮件: kongbeihua@sdu.edu.cn

**摘要:** **目的** 研究血管抑素 (*angiostatin*) 基因转染联合化疗药物顺铂对人卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤的协同治疗作用及其相关机制。**方法** 使用人卵巢癌细胞株 SKOV3 建立人卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤模型。将荷瘤裸鼠随机分为 4 组, 分别注射空质粒 PcDNA3、*angiostatin*/PcDNA3、化疗药物顺铂、*angiostatin*/PcDNA3 + 顺铂, 质粒用脂质体 DOTAP 介导转染细胞。观察各组动物的腹水量及腹腔荷瘤量, 检测各组肿瘤组织中 *angiostatin* 的表达和微血管密度, 利用 TUNEL 染色法行原位细胞凋亡分析。**结果** 联合治疗组裸鼠的腹水量 ( $P < 0.01$ ) 及腹腔瘤负荷 ( $P < 0.005$ ) 均显著低于其他实验组; 肿瘤组织中 *angiostatin* 蛋白局部高表达, 微血管密度显著低于其他实验组 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡指数显著高于其他实验组 ( $P < 0.05$ )。**结论** *Angiostatin* 基因联合化疗治疗人卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤可以产生协同抑制作用, 多途径联合用药是提高疗效的有效方法之一。

**关键词:** 血管抑素; 抗血管生成治疗; 基因治疗; 化疗; 卵巢癌

中图分类号: R737 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)01-0091-04

## Treatment of Intraperitoneal Implanted Human Ovarian Carcinoma of Nude Mice by *Angiostatin* Gene and Chemotherapy *In Vivo*

SUN Ping, KONG Bei-hua

Department of Obstetrics and Gynecology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: KONG Bei-hua Tel: 0531-82169009, E-mail: kongbeihua@sdu.edu.cn

**ABSTRACT: Objective** To observe the effects of *angiostatin* gene combined with chemotherapy on implanted human ovarian carcinoma of nude mouse. **Methods** The mice were randomly divided into four groups after 7 days of the intraperitoneal injection of tumor cells ( $4 \times 10^6$ ), and injected respectively with empty plasmid pcDNA3.0, *angiostatin* plasmid, cisplatin, and *angiostatin* plasmid + cisplatin. For combinational treatment, reagents were delivered in a timed fashion, where *angiostatin* plasmid was injected first, followed by cisplatin 24h later. The tumor samples were prepared to be used in the examinations of the expression of *angiostatin* with immunohistochemistry, of MVD in the tumor with immunohistochemistry, and of cell apoptosis with TUNEL staining. **Results** Tumor growth and ascites formation were inhibited in all 3 groups except for the control group. The therapeutic effectiveness in the combined group was more significant than in the other two groups. In this group, MVD ( $32.5 \pm 4.3$ ) was the lowest and apoptosis index ( $5.12 \pm 0.63$ ) was the highest ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** *Angiostatin* gene therapy combined with chemotherapy has a synergistic effect on the inhibition of ovarian cancer angiogenesis and ascites formation. Combining multiple therapies to treat ovarian cancer is an effective strategy.

**Key words:** *angiostatin*; antiangiogenic therapy; gene therapy; chemotherapy; ovarian carcinoma

卵巢癌早期临床症状隐匿, 诊断明确时大部分患者往往存在腹腔广泛转移。随着外科手术和放、化疗技术的开展, 卵巢癌的病死率已有所下降, 但晚期卵巢癌的平均存活率仍低于5年<sup>[1,2]</sup>。因此, 探索治疗卵巢癌的新方法便显得尤为重要。本研究拟用血管抑素 (*angiostatin*) 基因联合顺铂腹腔注射治疗人卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤, 观察 *angiostatin* 基因与化疗之间是否存在协同作用, 并探讨其作用机制。

## 材料和方法

**实验材料** 人卵巢上皮浆液性囊腺癌细胞株 (SKOV3) 由山东大学齐鲁医院中心实验室保存。真核表达质粒 PcDNA3、*angiostatin*/PcDNA3 由新西兰奥克兰大学孙学英博士惠赠。实验动物为 BALB/c 遗传背景的雌性裸小鼠, 共 24 只, 4~6 周龄, 体重 17~19 g, 购自中国科学院上海实验动物中心。顺铂购自山东齐鲁制药厂。

**质粒的制备和鉴定** 真核表达质粒用分子生物学的方法扩增制备, 经酶切、测序鉴定。

**细胞培养** 人卵巢癌细胞株 SKOV3 用含有 10% 小牛血清的 1640 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。细胞生长至对数生长期, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 PBS 制成细胞悬液, 调整细胞密度至  $2 \times 10^7$ /ml, 用于建立动物模型。

**动物模型的建立及实验分组** 向每只裸鼠腹腔内注射 SKOV3 细胞悬液 200  $\mu$ l (约  $4 \times 10^6$  个细胞), 然后随机分为 4 组 ( $n=6$ ), 分别为空质粒组、基因治疗组、化疗组和联合治疗组。建立动物模型后第 7 天开始基因治疗。目的基因在阳离子脂质体 DOTAP 的介导下转染细胞。

**治疗方案** 分别向 4 组裸鼠腹腔内注射 PcDNA3 基因转染液、*angiostatin* 基因转染液、无菌生理盐水 100  $\mu$ l、*angiostatin* 基因转染液 100  $\mu$ l, 每周 1 次, 共 2 次。基因转染液总体积为 100  $\mu$ l, 常温下配制, 其中纯化的真核表达质粒 50  $\mu$ l (浓度约为 2 g/L), DOTAP 40  $\mu$ l, 50% 葡萄糖 10  $\mu$ l, 1% Triton X-100 1  $\mu$ l。第 2 次基因治疗结束后第 2 天开始化疗, 分别向化疗组及联合治疗组裸鼠腹腔内注射浓度为 1 g/L 的顺铂溶液 150  $\mu$ l。化疗结束后继续饲养 3 d, 于第 4 天处死裸鼠, 无菌条件下开腹, 观察腹水量及腹腔

肿瘤病灶, 切除标本送实验室检查。

### 观察指标

**腹腔肿瘤负荷:** 半定量估计参考 Mesiano 等<sup>[3]</sup>方法。-: 腹腔内无肿瘤结节; +: 腹腔内极少小的肿瘤结节; ++: 低度负荷, 腹腔内散在小结节, 无大的肿瘤结节; +++: 中度负荷, 腹腔内散在直径 3~5 mm 的肿瘤结节及小结节; ++++: 高度负荷, 腹腔内可见多个直径 5~10 mm 的肿瘤结节以及弥散的小结节。

**免疫组织化学检查:** 检测各实验组中 *angiostatin* 的表达情况。用 CD31 抗体 MEC13.3 标记微血管, 检测微血管密度 (microvessel density, MVD), MVD 计数方法参见文献 [4]。免疫组织化学结果判定: 结合病理图像分析系统, 由两名病理科医师采用盲法阅片的方式, 进行结果评价。评价标准见参考文献 [5]。

**肿瘤组织中细胞凋亡的检测** 采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotide mediated nick end labeling, TUNEL): 石蜡切片经脱蜡后, 按细胞凋亡检测试剂盒说明操作。凋亡指数 (apoptosis index, AI) 的计算方法见参考文献 [6]。

**统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件, 免疫组织化学和腹腔肿瘤负荷的统计分析采用  $\chi^2$  检验。其他实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 结 果

**各组人卵巢癌裸鼠的腹水量** 空质粒组裸鼠腹腔内均有大量血性腹水; 基因治疗组裸鼠腹腔内也出现腹水, 量较少, 其中有 3 只裸鼠的腹水为血性; 联合治疗组有 2 只裸鼠无腹水形成, 其余裸鼠腹水量较少。基因治疗组、化疗组和联合治疗组的腹水量分别为 ( $1.72 \pm 0.32$ )、( $1.38 \pm 0.24$ ) 和 ( $0.78 \pm 0.55$ ) ml, 均显著少于空质粒组的 ( $2.36 \pm 0.11$ ) ml ( $P$  均  $< 0.01$ )。此外, 联合治疗组的腹水量显著少于基因治疗组和化疗组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

**各组人卵巢癌裸鼠的腹腔肿瘤负荷** 空质粒组、基因治疗组和化疗组裸鼠的腹腔内均可见程度不等的肿瘤病灶, 联合治疗组有 2 只裸鼠腹腔内无肿瘤

形成。联合治疗组与其他各实验组相比较, 差异有显著性 ( $P < 0.005$ ) (表 1)。

表 1 不同治疗对卵巢癌裸鼠腹腔肿瘤形成的影响  
Table 1 Therapeutic effect on intraperitoneal tumor in each group

组别 Group	肿瘤负荷分级 Levels of tumor load				
	-	+	++	+++	++++
空质粒组 PcDNA <sub>3</sub>	0	0	0	0	6
基因治疗组 Angiostatin/PcDNA <sub>3</sub>	0	0	2	3	1
化疗组 Cisplatin	0	2	3	1	0
联合治疗组 Angiostatin/PcDNA <sub>3</sub> + cisplatin	2	2	2	0	0

**各组肿瘤组织中 angiostatin 的表达** 空质粒组和化疗组裸鼠肿瘤组织中 angiostatin 蛋白的表达很少, 而基因治疗组和联合治疗组的 angiostatin 为高表达 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

**各组肿瘤组织的 MVD** 空质粒组裸鼠的肿瘤组织中 MVD 为高表达 ( $60.2 \pm 9.1$ ), 其余各组 MVD 均明显下降。基因治疗组的 MVD ( $48.6 \pm 5.8$ ) 显著低于空质粒组 ( $P < 0.01$ ); 联合治疗组的 MVD ( $32.5 \pm 4.3$ ) 显著低于基因治疗组 ( $P < 0.01$ ) 和化疗组 ( $46.3 \pm 5.4$ ,  $P < 0.01$ ) (图 1A ~ C)。

**各组肿瘤组织的细胞凋亡** 空质粒组肿瘤细胞凋亡不明显, AI 值为 ( $1.23 \pm 0.21$ ), 其余各组均出现不同程度的细胞凋亡。基因治疗组的 AI 值 ( $2.64 \pm 0.34$ ) 显著高于空质粒组 ( $P < 0.01$ ); 联合治疗组的 AI 值 ( $5.91 \pm 0.41$ ) 显著高于基因治疗组 ( $P < 0.01$ ) 和化疗组 ( $5.02 \pm 0.42$ ;  $P < 0.05$ ) (图 1D ~ F)。

## 讨 论

在西方国家, 卵巢癌是妇科恶性肿瘤中最主要的致死性疾病<sup>[7]</sup>。随着人们对卵巢癌分子生物学机制的深入了解, 基因转移疗法已经成为一种充满生机的治疗策略, 尽管其目前仍处于不成熟阶段<sup>[8]</sup>。卵巢癌最大的特点是局限在腹腔内的种植性转移和癌性腹水形成, 这也使得腹腔内基因转移治疗成为一种可能<sup>[9,10]</sup>。有研究表明, 腹膜腔新生血管的形成和微血管通透性的增加是腹水形成的主要原因<sup>[11,12]</sup>。在治疗中如能抑制新生血管的形成, 就可以在很大程度上抑制腹水的产生, 对改善患者的预后产生重要意义<sup>[13,14]</sup>。本研究选用 *angiostatin* 基因作为靶基因, 试图通过其抑制卵巢癌血管新生的作用而阻止肿瘤生长。因为其作用靶点是机体内基因

性状相对稳定的正常血管内皮细胞, 所以一直以来被认为能够避免或者明显延迟耐药性的产生<sup>[15,16]</sup>。研究结果显示基因治疗组的肿瘤组织中有 *angiostatin* 蛋白高表达, 腹腔荷瘤量和腹水量均低于空质粒对照组, MVD 降低, 肿瘤细胞凋亡增加, 实验结果提示腹腔内基因转移治疗是可行的。本研究选用的基因载体为质粒 PcDNA<sub>3</sub>, 由阳离子脂质体 DOTAP 介导转染细胞。尽管质粒的转染效率要低于病毒载体, 但是其安全性优于病毒载体, 而且本实验结果证实肿瘤组织内有高表达的 *angiostatin* 蛋白, 这说明阳离子脂质体包裹质粒可以作为一种有效的基因载体用于实验研究, 与文献报道结果一致<sup>[17,18]</sup>。

Folkman 等<sup>[19]</sup>认为, 联合针对肿瘤细胞和内皮细胞的治疗可以提高疗效并减少毒性, 这对于卵巢癌的治疗和预防复发具有很高的应用价值。抗血管生成药物可以通过抑制血管的形成、减少血管的渗透来降低肿瘤周围的水肿程度, 提高局部的化疗药物浓度, 从而提高疗效<sup>[20]</sup>。本研究建立了空质粒组、基因治疗组、化疗组和基因治疗 + 化疗的联合治疗组, 并观察基因治疗和化疗两种方法能否产生协同作用。研究结果显示, 基因治疗、化疗和联合治疗均可以抑制卵巢癌裸鼠腹腔内肿瘤和腹水形成, 其中联合治疗的效果要明显好于单用 *angiostatin* 或单用顺铂进行治疗。*Angiostatin* 可以通过其抗新血管生成的能力抑制腹腔内肿瘤和腹水的形成。同时, 顺铂也可以通过其细胞毒作用杀死癌细胞<sup>[21,22]</sup>, 并间接抑制肿瘤细胞诱导的血管生成和腹水产生。尽管二者机制不同, 但联合应用能够表现出显著的协同作用, 取得比对照组和两个单独治疗组更好的疗效。

采用联合治疗控制卵巢癌的进展是非常有效的, 其具体作用机制尽管目前尚不能明确, 但推测两种治疗产生协同作用有以下几种可能: 一般情况下化疗过程是间歇进行的, 往往在间歇期肿瘤得以重新

生长,若持续给予抗血管生成治疗,则可以填补该漏洞,使肿瘤得到持续抑制;减少血管生成可以减轻间质压力,使较少血管和较低量药物形成运转平衡,促进药物作用发挥。总之,化疗药物抑制肿瘤细胞生长,血管生成抑制剂抑制血管形成,双管齐下,从而起到协同治疗肿瘤的作用。多途径联合用药治疗卵巢癌或许是提高疗效的有效方法之一。

(本文图1见插图第4页)

## 参 考 文 献

- [1] Thulesius HO, Lindgren AC, Olsson HL, *et al.* Diagnosis and prognosis of breast and ovarian cancer--a population-based study of 234 women [J]. *Acta Oncol*, 2004, 43(2):175-181.
- [2] Ozols RF. Optimum chemotherapy for ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2000, 10(S1):33-37.
- [3] Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer; inhibition of ascites formation by immunoneutralization [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(4):1249-1256.
- [4] Araya M, Terashima M, Takagane A, *et al.* Microvessel count predicts metastasis and prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 1997, 65(4):232-236.
- [5] Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, *et al.* Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer [J]. *Hinyokika Kyo*, 2000, 46(10):757-762.
- [6] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al.* Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(10):719-727.
- [7] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2):74-108.
- [8] Raki M, Rein DT, Kanerva A, *et al.* Gene transfer approaches for gynecological diseases [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(2):154-163.
- [9] Mahendra G, Kumar S, Isayeva T, *et al.* Antiangiogenic cancer gene therapy by adeno-associated virus 2-mediated stable expression of the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 receptor [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(1):26-34.
- [10] Mahasreshti PJ, Navarro JG, Kataram M, *et al.* Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(7):2057-2066.
- [11] Liu CD, Tilch L, Kwan D, *et al.* Vascular endothelial growth factor is increased in ascites from metastatic pancreatic cancer [J]. *J Surg Res*, 2002, 102(1):31-34.
- [12] Tamsma JT, Keizer HJ, Meinders AE. Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12(10):1353-1357.
- [13] Hampl M, Tanaka T, Albert PS, *et al.* Therapeutic effects of viral vector-mediated antiangiogenic gene transfer in malignant ascites [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(14):1713-1729.
- [14] Indraccolo S, Tisato V, Tosello V, *et al.* Interferon-alpha gene therapy by lentiviral vectors contrasts ovarian cancer growth through angiogenesis inhibition [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(8):957-970.
- [15] Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents [J]. *Bioessays*, 1991, 13(1):31-36.
- [16] Folkman J, Hahmfeldt P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1):76-79.
- [17] Hortobagyi GN, Ueno NT, Xia W, *et al.* Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(14):3422-3433.
- [18] Grundker C, Huschmand Nia A, Emons G. Gonadotropin-releasing hormone receptor-targeted gene therapy of gynecologic cancers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2):225-231.
- [19] Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 1992, 3(2):89-96.
- [20] Devineni D, Klein-Szanto A, Gallo JM. Uptake of temozolomide in a rat glioma model in the presence and absence of the angiogenesis inhibitor TNP-470 [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(9):1983-1987.
- [21] Harries M, Kaye SB. Recent advances in the treatment of epithelial ovarian cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10(9):1715-1724.
- [22] Tattersall MN. Ovarian cancer chemotherapy: carboplatin as standard [J]. *Lancet*, 2002, 360(9332):500-501.

(2007-04-19 收稿)