

[文章编号] 1000-4718(2007)08-1495-04

## IFN- $\alpha$ 抑制 HUVECs 以及荷人肝癌裸小鼠血管生成的实验研究\*

汤地, 梁力建, 彭宝岗, 周凡, 李绍强, 殷晓煜  
(中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 检测 IFN- $\alpha$  体内外对人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)的抑制作用, 探讨 IFN- $\alpha$  抑制肝癌血管生成的机制。方法: 运用细胞增殖抑制试验、MTT 试验、管样结构形成试验、移动抑制试验以及裸鼠体内移植瘤生长和血管密度测定探讨 IFN- $\alpha$  对 HUVECs 的抑制作用。结果: IFN- $\alpha$  对 HUVECs 的细胞增殖、移动和管样结构形成试验有明显的抑制作用, 体内实验提示试验组移植瘤直径明显小于对照组, 微血管密度(MVD)亦明显低于对照组。结论: IFN- $\alpha$  可以通过抑制肿瘤的血管新生, 起到抑制肿瘤生长的作用。

**[关键词]** 干扰素 $\alpha$ ; 肝肿瘤; 抗血管生成

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Anti-angiogenesis effects of IFN- $\alpha$ on cultured HUVECs and human HCC bearing nude mouse

TANG Di, LIANG Li-jian, PENG Bao-gang, ZHOU Fan, LI Shao-qiang, YIN Xiao-yu  
(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China.  
E-mail: tangdi@126.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To evaluate the anti-angiogenesis effect of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) on cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human hepatocellular carcinoma (HCC) bearing nude mouse. **METHODS:** Anti-proliferation test, MTT test, tube-formation test, migration test on cultured HUVECs were employed and the tumor volume and microvascular density (MVD) of IFN- $\alpha$  treated human hepatoma cell line (HuH7) were measured. **RESULTS:** IFN- $\alpha$  displayed apparent inhibitory effects on cultured HUVECs in anti-proliferation test, MTT test, tube-formation test, migration test, and the tumor diameter and MVD in IFN- $\alpha$  treated HuH7 inoculated nude mouse group were significantly less than those in PBS treated HuH7 inoculated nude mouse group. **CONCLUSION:** IFN- $\alpha$  inhibits tumor growth through anti-angiogenesis.

**[KEY WORDS]** Interferon- $\alpha$ ; Liver neoplasms; Anti-angiogenesis

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤。根治性手术切除对于早期肝癌虽然能够产生较好的结果, 但往往由于进展期肝癌术中无法清除手术区域以外的肝内微转移和微血管浸润灶, 肿瘤术后往往快速复发。近年来的研究提示, 干扰素 $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) 联合其它化疗药物能够降低肝癌切除术后复发的机率<sup>[1]</sup>, 延长晚期肝癌合并门静脉癌栓的中位生存期<sup>[2,3]</sup>。进一步的研究提示, IFN- $\alpha$  可能部分通过抑制血管生成发挥抗肿瘤作用<sup>[4,5]</sup>。但是, 目前大多数研究的热点在于 IFN- $\alpha$  和其它抗代谢药物一起, 对肝癌细胞表达和释放促血管新生因子的抑制

方面, 而较少有研究探讨 IFN- $\alpha$  对血管内皮细胞的直接抑制作用。我们检测了 IFN- $\alpha$  体外对碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和小牛血清激活的人血管内皮细胞增殖、血管形成功能和移动功能的抑制作用以及 IFN- $\alpha$  对人肝癌裸鼠荷瘤模型的生长抑制和血管新生的抑制作用, 以探讨 IFN- $\alpha$  抑制肝癌血管生成的机制。

### 材 料 和 方 法

#### 1 细胞株和主要试剂

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endo-

[收稿日期] 2006-09-11 [修回日期] 2007-04-11

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 5001723)

Tel: 020-87755766-8214; E-mail: tangdi@126.com

thelial cells, HUVECs) 细胞株为 10 代以内人脐带静脉内皮细胞, 人肝癌细胞株为 HuH7 细胞株。MCDB-131 (Life Technologies) 血管内皮细胞专用培养液, bFGF, Human recombinant (BD Bioscience, 重组人 beta 表皮生长因子), type I collagen (Sigma, I 型胶原蛋白), 0.25% 胰酶为 Gibco 公司产品; 小牛血清, IFN- $\alpha$  (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd. Osaka, Japan), 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS), CHEMICON's ECMatrix 体外血管新生试剂盒。血管内皮细胞专用培养液的配制: 无菌状态下 500 mL 的 MCDB-131 内中加入 5  $\mu$ g 的 bFGF、55 mL 常规灭活的小牛血清, 加入青、链霉素致最终浓度为 penicillin  $1 \times 10^5$  U/L 和 streptomycin 100 mg/L。I 型胶原蛋白溶液配制: 40 mg/L type I collagen 加入 0.15 mol/L 乙酸溶液内, 常温过夜, 再加入 1/25 体积的 3.76% NaCl, 储存于 4  $^{\circ}$ C 冰箱。

## 2 细胞培养、细胞增殖抑制和 MTT 试验

75 cm<sup>2</sup> 培养瓶先加入 5 mL I 型胶原蛋白溶液, 常温孵育 2 h 后, 无菌 PBS 冲洗干净备用。复苏 HUVECs 并加入配制好的含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液, 单层培养于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度 CO<sub>2</sub> 培养箱中。根据培养基的颜色定期更换培养基, 一般 3 d 1 次。等待细胞覆盖培养瓶壁 80% - 90% 后, 给予传代培养。取对数生长期的  $1 \times 10^8$  cells/L 的 HUVECs 每孔 750  $\mu$ L 加入 6 孔板, 孵育 24 h 后进行细胞增殖试验。实验分为 4 组: A 组为对照组, 仅加入含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液; B、C、D 组中除加入上述培养基外, 还分别按终浓度  $1 \times 10^5$  U/L、 $1 \times 10^6$  U/L 和  $1 \times 10^7$  U/L 量加入 IFN- $\alpha$ 。细胞在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中孵育, 每天更换培养液和药物, 每组细胞加药后第 1、3、5、7 d 进行细胞计数。以时间为横轴, 细胞计数为纵轴, 绘制曲线。MTT 试验: 取对数生长期的  $1 \times 10^8$  cells/L 的 HUVECs 每孔 50  $\mu$ L 加入 96 孔板, 孵育 24 h 后进行细胞增殖抑制试验。实验分为 4 组: A 组为对照组, 仅加入含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液; B、C 组中除加入上述培养基外, 还分别按终浓度  $1 \times 10^5$  U/L、 $2 \times 10^6$  U/L 的量加入 IFN- $\alpha$ 。细胞在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中孵育。每组细胞加药后第 12、24、48、72、96 h 进行 MTT 比色试验。最后测定实验组和对照组的吸光度 (A) 平均值, 细胞增殖抑制率的定义为 [(对照组的 A 均值 - 同时间试验组的 A 均值)/对照组的 A 均值]。以时间为横轴、细胞增殖抑制率为纵轴, 绘制曲线。

## 3 管样结构形成试验 (tube-formation test)

参考 ECMatrix 体外血管新生试剂盒的说明书。

将 ECMatrix 试剂盒置于冰上, 将 100  $\mu$ L 的 10X ECMatrix 加入 900  $\mu$ L 的 ECMatrix gel solution 中, 混匀。取 50  $\mu$ L/well 将混合液加入 96 孔平底板中, 37  $^{\circ}$ C 下孵育 1 h 使其胶充分凝固。按照  $1 \times 10^4$  cells/well HUVECs 加入到 96 孔平底板中。实验分为 4 组: A 组为对照组, 仅加入含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液; B、C、D 组中除加入上述培养基外, 还分别按终浓度  $1 \times 10^5$  U/L、 $1 \times 10^6$  U/L 和  $1 \times 10^7$  U/L 量加入 IFN- $\alpha$ 。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 10 h, 20X 倒置显微镜拍照计数。计数方法根据试剂盒说明书推荐的方法, 即计算 5 个随机 100X 显微镜视野下的 HUVECs 形成的管状结构的交叉点数目并取平均值。

## 4 细胞迁移抑制试验

将  $1.5 \times 10^7$  cells/L 的 HUVECs 750  $\mu$ L 加入含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液的 12 孔胶原蛋白覆盖的培养板内, 单层培养于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度 CO<sub>2</sub> 培养箱中。使用刀片在细胞表层造成一水平刮痕, 并用 FBS 将悬浮的细胞冲洗干净。实验分为 4 组: A 组为对照组, 仅加入含 5% 小牛血清和 bFGF 的 MD131 培养液; B、C、D 组中除加入上述培养基外, 还分别按终浓度  $1 \times 10^5$  U/L、 $1 \times 10^6$  U/L 和  $1 \times 10^7$  U/L 量加入 IFN- $\alpha$ 。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h, 取 5 个随机 100 $\times$  镜下在 250  $\mu$ m 区域内的跨越刮痕的 HUVECs 细胞数目并取平均值。细胞迁移抑制率 = (对照组细胞数 - 实验组细胞数)/对照组细胞数。

## 5 体外肿瘤体积和血管密度测定

取人肝癌 HuH7 细胞株, 制成  $2 \times 10^6$  细胞悬液, 接种于裸鼠 (BALB/c nu/nu, 4 weeks, 雌性) 皮下。待皮下肿瘤长至 5 mm 后, 分为 2 组, 每组各 6 只, 对照组给予 PBS 皮下注射, 每周 3 次, 试验组给予 IFN- $\alpha$   $10^6$  U/kg, 每周 3 次。每周记录肿瘤直径, 第 6 周时处死动物, 取出肿瘤, 称重并记录体积。肿瘤常规 100 mL/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 并行微血管密度 (microvascular density, MVD) 检查。

## 6 统计学处理

用 SPSS 11.5 软件建立数据库, 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验和方差分析进行均数显著性检验。

# 结 果

## 1 细胞增殖抑制试验

可见 4 组细胞随着培养时间的延长, HUVECs 数目依次增加, 但是随着 IFN- $\alpha$  浓度的升高, 细胞数

目增加的速度减慢。提示随着药物浓度的增加,抑制效果越明显(图1)。

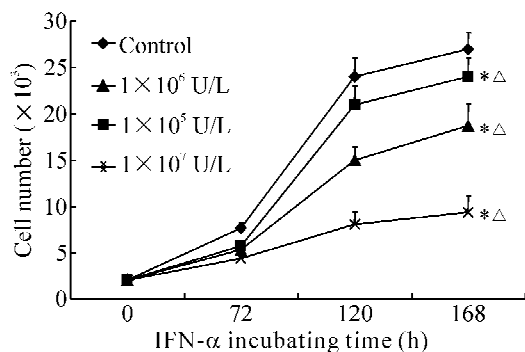


Fig 1 The effects of IFN -  $\alpha$  on the proliferation of HUVECs.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  between different doses of IFN -  $\alpha$ .

图1 IFN -  $\alpha$  对 HUVECs 增殖的影响

### 2 MTT 试验

可见2组细胞随着培养时间的延长,HUVECs增殖的抑制率升高,但是 $2 \times 10^6$  U/L组比 $1 \times 10^5$  U/L组更加明显。提示随着药物作用时间的延长,抑制效果越明显(图2)。

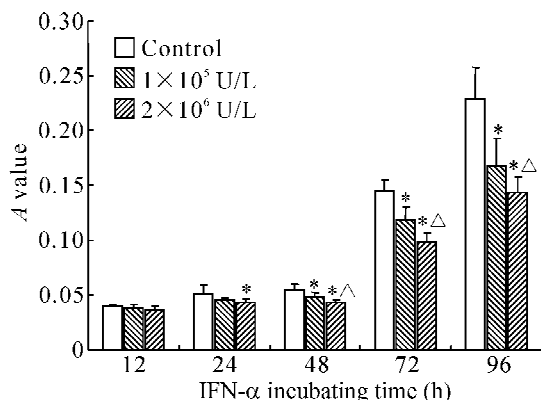


Fig 2 The MTT test for HUVECs incubated with IFN -  $\alpha$ .  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 8$ . \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs  $1 \times 10^5$  U/L group.

图2 IFN -  $\alpha$  对 HUVECs 的 MTT 试验

### 3 HUVECs 的管样结构形成试验

4组HUVECs均形成了类似体内毛细血管的管状结构(tube-formation)。但是,对照组的管状结构最清晰,结构也最复杂,随着IFN- $\alpha$ 浓度的升高,形成的管状结构逐渐减少,形态也渐模糊,表明对HUVECs的管样结构形成功能的抑制作用越强(图3、4)。

### 4 HUVECs 移动抑制试验

与对照组相比,HUVECs的移动受到了明显的抑制,且随着IFN- $\alpha$ 浓度的提高,HUVECs的迁移抑制率更加明显(图5)。

### 5 种植瘤生长情况和微血管密度

注射种植后第6周,对照组肿瘤直径为20.8 mm,

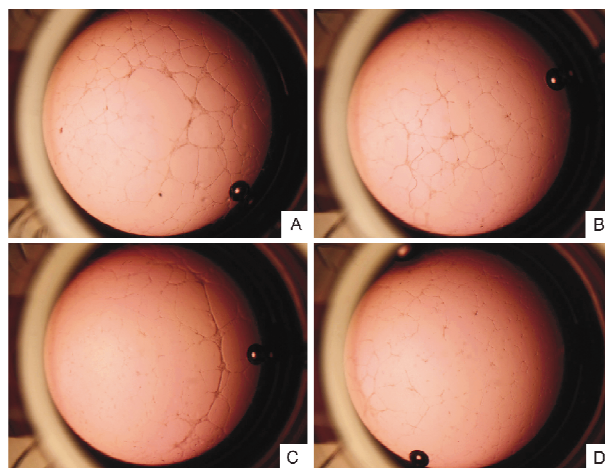


Fig 3 Tube - formation test for IFN -  $\alpha$  - incubated HUVECs. A: control; B:  $1 \times 10^5$  U/L group; C:  $1 \times 10^6$  U/L group; D:  $1 \times 10^7$  U/L group.

图3 不同浓度 IFN -  $\alpha$  孵育 HUVECs 后的管样结构形成试验

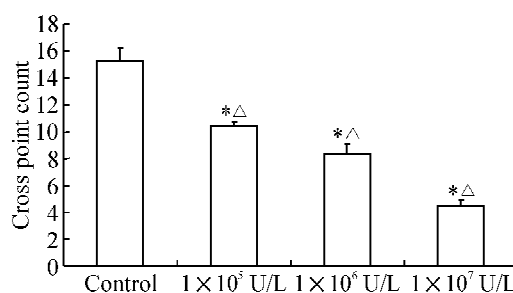


Fig 4 Tube - formation test for IFN -  $\alpha$  - incubated HUVECs.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 15$ . \* $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  between different doses of IFN -  $\alpha$ .

图4 不同浓度 IFN -  $\alpha$  孵育 HUVECs 后的管样结构形成试验

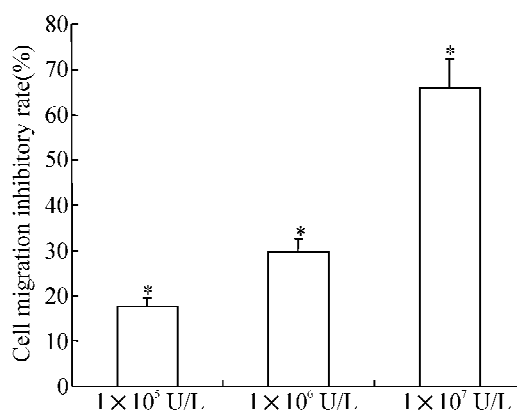


Fig 5 The effect of IFN -  $\alpha$  at different doses on the migration of HUVECs.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs control (0).

图5 IFN -  $\alpha$  对于 HUVECs 的移动抑制试验

试验组肿瘤直径为13.7 mm,试验组肿瘤直径明显小于对照组( $P < 0.05$ )。抗鼠CD31染色,显示对照组MVD为17,试验组MVD为9,试验组明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

本组试验显示,在体外试验中,IFN- $\alpha$ 能够抑制 HUVECs 的增殖,并且抑制作用随着 IFN- $\alpha$  的浓度和作用时间延长而增强,显示出对 HUVECs 的增殖抑制作用是时间依赖性和浓度依赖性。血管形成是由血管内皮细胞通过一系列的生理过程,包括细胞的相互黏连、细胞的移位、功能分化、增殖等过程完成的<sup>[6]</sup>,本试验使用的 ECmatrix 试剂盒,能在体外形成与体内相似的血管基膜,较好地模拟了体内血管新生的状况,且容易定量。既往的研究常使用动物模型例如鼠角膜新生血管形成抑制试验,鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制试验,容易受到试验动物个体差异、试验动物、鸡胚的血管内皮细胞与人的血管内皮细胞的先天差异、指标难以定量等客观因素的影响。本试验使用的血管形成抑制试剂盒则克服了动物体内试验的缺点。

本实验提示,荷瘤裸鼠的人肝癌细胞株 HuH7 生长受到明显的抑制,同时肿瘤的微血管密度也显著减少,提示 IFN- $\alpha$  能抑制肝癌的血管新生并且抑制肿瘤的生长。IFN- $\alpha$  对肿瘤的抑制作用可能包括以下机制:(1)对血管内皮细胞的直接抑制<sup>[7]</sup>;(2)抑制肿瘤细胞产生 VEGF 等促血管新生因子<sup>[8]</sup>;(3)直接抑制肿瘤的生长<sup>[9]</sup>;(4)抑制肝炎病毒,特别是 C 型肝炎病毒的复制,减轻肝内的炎症反应和炎症因子的释放<sup>[10]</sup>。

本试验的结果与 Wang 等<sup>[7]</sup>对人脐血管内皮细胞的抑制试验一致。他们的试验观测到体外 IFN 对 HUVECs 的生长抑制和对大鼠体内角膜血管新生的抑制作用;本试验则使用血管内皮细胞的管形成试验试剂盒进一步观察了 IFN 对体外 HUVECs 管形成功能的抑制。IFN- $\alpha$  对 HUVECs 的抑制作用机制还不明确。已有研究指出 HUVECs 在炎症因子例如 LPS 等刺激下表达 interferon regulatory factor-1<sup>[11]</sup>, IFN- $\alpha$  可能通过激活此受体调控 HUVECs 的功能。另有报道指出 IFN- $\alpha$  还能促使 HUVECs 细胞在因病毒感染而激活的 dsRNA 作用下发生凋亡<sup>[12]</sup>,但是具体的调控路径有待进一步研究。

文献证实,IFN- $\alpha$  联合化疗药物,对于合并门静脉癌栓和全肝内播散的晚期肝癌患者有一定的疗效<sup>[2,3]</sup>,本研究提示,IFN- $\alpha$  可以通过抑制肿瘤的血管新生,起到抑制肿瘤生长的作用。

### [参 考 文 献]

[1] Sun HC, Tang ZY, Wang L, et al. Postoperative interferon alpha treatment postponed recurrence and improved

overall survival in patients after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132 (7): 458-465.

[2] 殷晓煜, 吕明德, 梁力建, 等. 全身性化学治疗晚期原发性肝癌(附 20 例临床分析) [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2004, 10(10): 665-667.

[3] Obi S, Yoshida H, Toune R, et al. Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion [J]. *Cancer*, 2006, 106(9): 1990-1997.

[4] Taylor KL, Oates RK, Grane R, et al. IFN-alpha 1, 8 inhibits tumor-induced angiogenesis in murine angiosarcomas [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2006, 26 (5): 353-361.

[5] Wang L, Wu WZ, Sun HC, et al. Mechanism of interferon alpha on inhibition of metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma after curative resection in nude mice [J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7(5): 587-594.

[6] Meyer GT, Matthias LJ, Noack L, et al. Lumen formation during angiogenesis *in vitro* involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells [J]. *Anat Rec*, 1997, 249(3): 327-340.

[7] Wang L, Tang ZY, Qin LX, et al. High-dose and long-term therapy with interferon- $\alpha$  inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential [J]. *Hepatology*, 2000, 32(1): 43-48.

[8] Wu WZ, Sun HC, Shen YF, et al. Interferon alpha 2a down-regulates VEGF expression through PI3 kinase and MAP kinase signaling pathways [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(3): 169-178.

[9] 刘昕, 汪泳, 潘兴斌, 等. IFN- $\alpha$  对人胃癌细胞株 BGC-823 生长的抑制作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(9): 1756-1761.

[10] Ito Y, Yamamoto N, Nakata R. Delayed development of hepatocellular carcinoma during long-term follow-up after eradication of hepatitis C virus by interferon therapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (45): 7218-7221.

[11] Liu L, Paul A, MacKenzie CJ, et al. Nuclear factor kappa B is involved in lipopolysaccharide-stimulated induction of interferon regulatory factor-1 and GAS/GAF DNA-binding in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(8): 1629-1638.

[12] Kaiser WJ, Kaufman JL, Offermann MK. IFN-alpha sensitizes human umbilical vein endothelial cells to apoptosis induced by double-stranded RNA [J]. *J Immunol*, 2004, 172(3): 1699-1710.