

[文章编号] 1000-4718(2008)08-1514-04

3TSR 治疗裸鼠胃癌的实验研究*

蒋平, 金洲祥[△], 王继生, 徐鲁白, 张伟, 朱少俊

(温州医学院附属第二医院普通外科, 浙江温州 325027)

[摘要] 目的: 探讨血管形成抑制剂 3TSR 对人胃癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用及机制。方法: 建立人胃癌裸鼠皮下种植瘤模型, 实验分为对照组(腹腔注射 PBS 0.2 mL)、3TSR 组(腹腔注射 3TSR 3 mg/kg BW), 每组 8 只。给药 3 周后处死动物, 提取瘤体, 测量各组荷瘤体积, HE 染色检测肿瘤坏死面积百分比, 免疫组织化学方法检测肿瘤微血管表达、肿瘤细胞增殖指数, 原位末端标记法(TUNEL 法)检测肿瘤细胞凋亡率, CD31/TUNEL/DAPI 重复染色法测定肿瘤血管内皮细胞凋亡率。结果: 3TSR 组平均肿瘤体积为(648.34 ± 126.90) mm³, 较对照组显著缩小($P < 0.05$); 3TSR 组平均肿瘤坏死面积百分比为(39.6 ± 7.8)%, 较对照组扩大 69.2%, 2 组间有显著差异($P < 0.05$)。3TSR 组肿瘤平均微血管数为 12.8 ± 4.1, 平均微血管面积为(689.3 ± 118.6) μm², 均显著低于对照组($P < 0.05$), 3TSR 组增殖指数和凋亡率分别为(40.0 ± 7.1)% 和(3.4 ± 1.2)%, 与对照组比较无显著差异($P > 0.05$), 3TSR 组肿瘤血管内皮细胞凋亡率为(11.6 ± 2.8)%, 显著高于对照组的(2.9 ± 1.5)%, $P < 0.05$ 。结论: 3TSR 能抑制裸鼠胃癌新生血管形成, 具有显著减少肿瘤体积、肿瘤血管和增加肿瘤细胞坏死的作用, 但对胃癌细胞无直接抑制作用, 其机制可能与诱导内皮细胞凋亡有关。

[关键词] 胃肿瘤; 血管形成; 3TSR

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Therapeutic effect of 3TSR on gastric carcinoma in nude mice

JIANG Ping, JIN Zhou-xiang, WANG Ji-sheng, XU Lu-bai, ZHANG Wei, ZHU Shao-jun

(Department of Surgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China. E-mail: jzx0847@sina.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the anti-tumor efficacy of angiogenic inhibitor three thrombospondin-1 type repeats (3TSR) on gastric cancer. **METHODS:** Human gastric carcinoma cell line SGC-7901 was inoculated subcutaneously to BALB/c mice, and then the mice were divided into two groups (8 mice each): control group and 3TSR group. After administration of 3TSR by intraperitoneal injection for 3 weeks, mice were sacrificed. The tumor volume and percentage of necrotic area were detected. The micro-vessel index and cell proliferation index were detected by immunohistochemistry method. The apoptosis rate of gastric carcinoma cells was measured by TUNEL method. The vascular endothelial cell apoptosis rates were detected by CD31/TUNEL/DAPI staining. **RESULTS:** The tumor volume in 3TSR group was (648.34 ± 126.91) mm³, significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). The percentage of tumor necrosis area in 3TSR group was (39.6 ± 7.8)%, almost increased by 69.2% than that in the control. Average micro-vessel numbers and micro-vessel area in 3TSR were 12.8 ± 4.1 and (689.3 ± 118.6) μm², respectively, significantly lower than those in the control. The proliferation index and apoptosis rate in 3TSR group were (40.0 ± 7.1)% and (3.4 ± 1.2)%, respectively. No difference between 3TSR group and the control was observed. The endothelial cell apoptosis rate in 3TSR group was (11.6 ± 2.8)%, significantly higher than that in control group (2.9 ± 1.5)%. **CONCLUSION:** 3TSR inhibits tumor angiogenesis, remarkably reduces tumor volume, average micro-vessel and increased tumor necrosis. 3TSR shows no direct inhibitory effects on gastric cancer cells. The antiangiogenesis effects of 3TSR on gastric carcinoma may be due to the induction of apoptosis of vascular endothelia cells.

[KEY WORDS] Stomach neoplasms; Angiogenesis; 3TSR

[收稿日期] 2007-04-11 [修回日期] 2007-09-18

* [基金项目] 温州市科技计划项目(No. Y20070092)

△ 通讯作者 E-mail: jzx0847@sina.com.cn

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,目前在我国,发病率和病死率仍居首位^[1]。近年来,采用新生血管形成抑制剂治疗实质性肿瘤已成为当前肿瘤治疗研究热点之一。3TSR(three hrombospondin-1 type repeats)是近年来被哈佛医学院 Beth Isreal Deaconess 医学中心病理实验室提纯的一种新的抗新生血管形成剂,初步研究表明 3TSR 具有显著的抗胰腺癌作用^[2],但目前 3TSR 对其它恶性肿瘤的作用效果尚未得到证实,其抗肿瘤机制也仍未明确。本研究通过观察 3TSR 对人胃癌裸鼠皮下移植瘤的影响,旨在为胃癌治疗提供新的思路。

材 料 和 方 法

1 材料

人类胃癌细胞株 SGC-7901 购自南京凯基生物公司, BALB/c 裸鼠购自中科院上海实验动物中心, 3TSR 由 Jack Lauler 教授提供(Beth Israel Deaconess Medical Center), RPMI-1640 细胞培养液和 TUNEL 试剂盒均购自南京凯基生物公司, 鼠抗人单克隆 VIII 因子相关抗原(FVIII Rag)、鼠抗人 PCNA 单克隆抗体和超敏 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司。鼠抗 CD31(BD PharMingen, San Diego), 抗鼠 IgG(Texas Red 1:500, Vector Laboratories), 4',6-二脒基苯基吡啶(Vector Lab Inc., CA, Burlingame), TUNEL 荧光试验盒购于广州华美公司。

2 方法

2.1 人胃癌裸鼠皮下移植瘤模型建立 SGC-7901 细胞悬液调整至 10^{10} cells/L, 0.2 mL 细胞悬液接种于 16 只 BALB/c 裸鼠右腋窝皮下, 10 d 后随机分为对照组(每天腹腔注射生理盐水 0.2 mL), 3TSR 组(每日腹腔注射 3TSR 3 mg/kg BW), 每组 8 只, 连续注射 3 周后处死动物模型, 解剖提取肿瘤, 测定肿瘤体积($V=1/6 \times \pi \times \text{长} \times \text{高} \times \text{宽}$)。置于 4 °C 三聚甲醛中固定 2-4 h 后, 包埋于鸟氨酸胺甲酰基转移酶复合物中, 液氮速冻, -80 °C 冷藏。切成 5 μm 厚组织切片。

2.2 肿瘤坏死面积测定 每个肿瘤标本切片 3 张行 HE 染色, 在携带数码相机的 Nikon TE-300 显微镜下采用 IP-Lab 软件测定每张片的坏死面积及肿瘤面积, 并计算出肿瘤坏死面积百分比(=肿瘤坏死面积/肿瘤面积 $\times 100\%$)。

2.3 微血管指标的测定 VIII 因子相关抗原(FVIII Rag) 标记内皮细胞, 用过氧化酶标记的链霉卵白素(streptavidin-peroxidase, S-P) 免疫组织化学方法

染色, 步骤操作按试剂盒说明书, 染色微血管呈棕黄色。肿瘤微血管数及面积测定: 每份肿瘤标本切片 5 张染色, 而后在携带数码相机的 Nikon TE-300 显微镜下放大 20 倍摄片, 在每张染色片上摄取 4 处微血管丰富的热点区域(非坏死区), 采用 IP-Lab 软件计算肿瘤微血管数, 肿瘤微血管面积。

2.4 胃癌细胞增殖指数的测定 用增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 标记, S-P 法染色检测增殖指数。每肿瘤标本切片 5 张, 按试剂盒说明行 PCNA 染色标记, 主要步骤: (1) 30% H_2O_2 1 份+纯甲醇 50 份混合, 室温浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; (2) 100 mL/L 正常羊血清 37 °C 30 min; (3) 滴加 I 抗, 4 °C 过夜; (4) 滴加生物素化羊抗鼠 IgG(1:150), 37 °C 30 min; (5) 滴加 S-P 复合物(1:150), 37 °C 30 min; (6) 0.5 g/L DAB 显色 10 min; (7) 苏木素复染、脱水、透明、封片。每批染色均设阴性对照(以 PBS 置换 I 抗作阴性对照)。光镜下观察结果。每片观察 5 个高倍视野, 统计阳性细胞数所占的百分数。PCNA 为颗粒型或弥漫型棕色阳性, 定位于癌细胞核内, 胞浆一般不着色。部分核分裂细胞显示整个细胞的阳性反应。

2.5 TUNEL 法检测胃癌细胞凋亡率 按试剂盒说明进行操作, 结果判定: 细胞核或浆中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。每份肿瘤标本取 5 张切片, 每张切片观察 10 个以上高倍视野或计数 500 个以上细胞, 计算阳性细胞占细胞总数百分率。

2.6 胃癌血管内皮细胞凋亡率

①组织切片 用鼠抗-CD31 孵化 15 到 18 h, 用 PBS 液冲洗, 再用生物素化的兔抗鼠 II 抗在潮湿的 4 °C 空间里孵化 1 h。

②CD31 和 TUNEL 双重免疫荧光染色 组织切片按上述方法行 CD31 染色后, 用 PBS 冲洗, 用抗鼠 IgG 共轭在潮湿阴暗环境中孵化 1 h, 切片用包含 0.1% Brij 99 (V/V) PBS 冲洗后, 用 TUNEL 标记(方法同上)。阴性对照为载玻片上缺乏末端脱氧核苷酰转移酶。

③薄层切片 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI) 染色 切片用含 DAPI 的封固剂包埋, 对细胞核进行复染色。切片用 Nikon TE300 显微镜观察图像由 SPOT 数码相机采取后, 用 IP-Lab 软件进行形态测定分析。内皮细胞在显微镜下表现为红色荧光, 凋亡内皮细胞内探测到的局部的绿色和黄色荧光为 DNA 片断。内皮细胞内 DAPI 染色的细胞核数代表内皮细胞总数。胃癌血管内皮细胞凋亡率=凋亡的内皮

细胞/总的内皮细胞 × 100%。

3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 并用 SPSS 10.0 软件分析处理。

结 果

1 平均肿瘤体积

对照组平均肿瘤体积是 (1 175.6 ± 198.9) mm³, 而 3TSR 组平均肿瘤体积为 (648.34 ± 126.91) mm³, 3TSR 组肿瘤体积显著低于对照组, *P* < 0.05, 见图 1。



Fig 1 The tumor volume in 3TSR treatment and control group.

A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 1 3TSR 组和对照组肿瘤体积

2 肿瘤坏死面积测定

3TSR 治疗组肿瘤坏死面积百分比为 (39.6 ± 7.8)%, 较对照组扩大约 69.2%, 2 组间有显著差异, *P* < 0.05, 见图 2。

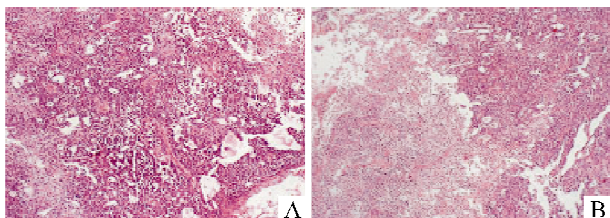


Fig 2 The necrotic area in 3TSR treatment and control group (HE staining, ×40). A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 2 肿瘤坏死面积百分比

3 肿瘤单位面积微血管测定

3TSR 组肿瘤平均微血管数为 12.8 ± 4.1, 平均微血管面积为 (689.3 ± 118.6) μm², 均显著低于对照组的 37.1 ± 9.4 和 (1 323.0 ± 187.1) μm², *P* < 0.05, 见图 3。

4 胃癌细胞增殖指数

对照组胃癌细胞增殖指数为 (37.2 ± 8.3)%, 3TSR 组 (40.0 ± 7.1)%, 3TSR 组与对照组无显著差异, *P* > 0.05, 见图 4。

5 胃癌细胞凋亡率

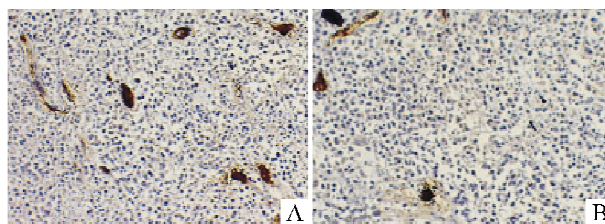


Fig 3 The tumor microvessel index in 3TSR treatment and control group (S-P method, ×100). A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 3 肿瘤微血管指标测定

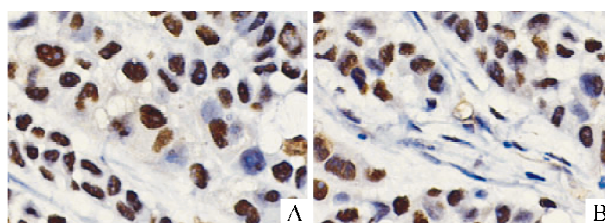


Fig 4 The proliferating index of gastric cancer cells in 3TSR treatment and control group (S-P method, ×400). A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 4 胃癌细胞增殖指数测定

对照组细胞凋亡率为 (3.7 ± 1.8)%, 3TSR 组 (3.4 ± 1.2)%, 3TSR 组凋亡率与对照组无显著差异, *P* > 0.05, 见图 5。

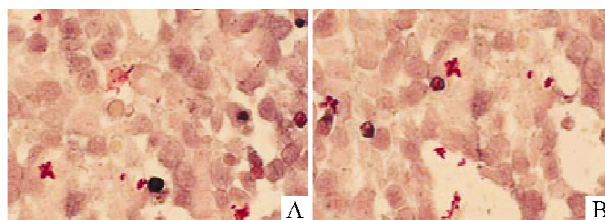


Fig 5 The apoptosis rate of gastric carcinoma cells in 3TSR treatment and control group (TUNEL, ×400). A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 5 胃癌细胞凋亡率测定

6 胃癌血管内皮细胞凋亡率

3TSR 组血管内皮细胞凋亡率为 (11.6 ± 2.8)%, 显著高于对照组的 (2.9 ± 1.5)%, 见图 6。

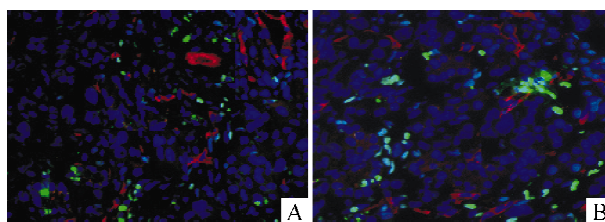


Fig 6 The apoptosis rate of endothelial cells in 3TSR treatment and control group (CD31 and TUNEL staining, ×100). A: control group; B: 3TSR treatment group.

图 6 胃癌血管内皮细胞凋亡率测定

讨 论

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,由于多方面的原因,绝大多数的患者在确诊时,已经处于中晚期。目前针对胃癌的治疗手段仍然是以手术为主的综合治疗措施。近年来,肿瘤的生物治疗渐渐受到重视,血管抑制剂就是其中最受关注的领域之一。故近年就如何抑制早期血管形成、破坏肿瘤血管,即抗肿瘤血管生成治疗便成了肿瘤治疗研究的热点和突破口^[3,4]。有研究表明,对肿瘤组织中已存在的血管和/或正在血管生成的肿瘤进行干预,能有效地抑制肿瘤增殖和生长。目前常用的血管抑制剂有 TNP-740、TSP-1(thrombospondin-1)和 IL-8 反义核酸等^[5-8],但由于上述血管抑制剂副作用多,或应用技术不成熟,临床上应用受到许多限制。3TSR 是近年来提纯的一种新生血管形成抑制剂,是最早发现的新生血管形成抑制因子 TSP-1(thrombospondin-1)的一个结构功能域,它保留了 TSP-1 的抑制血管形成的功能,但大大减弱 TSP-1 其它功能引起的负作用,因此,3TSR 具有临床应用前景。鉴于新生血管形成在实体肿瘤发生发展中的重要作用,本研究观察了 3TSR 对人胃癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用,并从肿瘤增殖指数、肿瘤细胞凋亡率和内皮细胞凋亡率等方面探讨了其初步机制,为该药的临床应用提供实验依据。

本实验研究结果表明 3TSR 组肿瘤体积较对照组显著降低,肿瘤坏死面积百分比显著增高,约为对照组的 1.69 倍,表明 3TSR 对人胃癌裸鼠移植瘤有显著治疗作用。进一步实验发现,3TSR 组微血管指标显著低于对照组,但 3TSR 组癌细胞增殖指数与凋亡率较对照组无显著差异。表明 3TSR 能抑制胃癌血管生成,但对胃癌细胞无直接增殖抑制及诱导凋亡作用。我们进一步用 CD31/TUNEL/DAPI 法检测

了肿瘤血管内皮细胞凋亡率,发现处理组内皮细胞凋亡率显著高于对照组。表明 3TSR 抗血管生成机制可能与诱导内皮细胞凋亡有关。

[参 考 文 献]

- [1] Sun XD, Mu R, Zhou SY, et al. 1990 - 1992 mortality of stomach cancer in China [J]. *Zhongguo Zhongliu Zazhi*, 2002, 24(1): 4 - 8.
- [2] Miao WM, Seng WL, Duquette M, et al. Thrombospondin - 1 type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor - beta - dependent and - independent mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7830 - 7839.
- [3] Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, et al. Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti - angiogenesis agent [J]. *Anticancer Drug Des*, 2000, 15(1): 29 - 41.
- [4] 杜 彬,周序珑. 血管生成素的特点及其对血管生成的调节作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(2): 275 - 278.
- [5] Shintani S, Li C, Mihara M, et al. Anti - tumor effect of radiation response by combined treatment with angiogenesis inhibitor, TNP - 470, in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2006, 42(1): 66 - 72.
- [6] Karavasili V, Malamou - Mitsi V, Briasoulis E, et al. Angiogenesis in cancer of unknown primary: clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP - 1 [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5(3): 25 - 28.
- [7] 薛建锋, 庞志刚, 刘 超, 等. 血小板反应蛋白 - 1 及受体 CD36 在肝细胞性肝癌中的表达及意义 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(2): 376 - 379.
- [8] Li A, Dubey S, Varney ML, et al. IL - 8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis [J]. *J Immunol*, 2003, 170(6): 3369 - 3376.

中国病理生理学会新网站正式开通

中国病理生理学会本着“团结国内外广大的病理生理学和相关学科的科学工作者,推动病理生理学教学和科学研究工作的发展,加强基础医学与临床医学之间的联系,促进与国内和国际学术团体之间的学术交流”的理念,根据中国病理生理学会常务理事八届二次会议决定,由《中国病理生理杂志》编辑部和暨南大学医学院病理生理教研室建立和管理中国病理生理学会新网站;在中国病理生理学会理事长韩启德院士领导下,副理事长陆大祥教授主持下,经过一段时间的积极筹划和精心准备,于 2008 年 5 月正式开通,网站新网址为:<http://www.caop.ac.cn/>

欢迎国内外病理生理学及相关学科的科学工作者上网浏览,并提出宝贵意见和建议,支持网站建设发展及刊载内容的及时更新,真正成为中国病理生理学会全体会员的“网上家园”。

联系地址:广州市暨南大学《中国病理生理杂志》编辑部

联系人:陈妙玲,戚仁斌

电话:020 - 85220269, 020 - 85228071

E - mail: obsbjb@jnu.edu.cn