

· 论著 ·

重组人血管内皮抑素腹腔内给药治疗恶性腹腔积液的实验研究

高文斌 李花妮 黄剑辉 吕金燕 王刚 马建增 郑真真 邓蓉 王若雨 方今女

【摘要】 目的 初步探讨血管内皮抑素(ES)腹腔内给药治疗恶性腹腔积液的治疗机制。**方法** 健康BABL/C小鼠,应用S180细胞建立腹腔积液模型。ES分为5.00 mg/kg、2.50 mg/kg及1.25 mg/kg三组;阴性对照组为生理盐水组;阳性对照组为60.00 mg/kg顺铂组。S180细胞腹腔注射接种5 d后,实验药物隔日腹腔注射。记录小鼠体重作为腹水计量变化指标。计数小鼠存活只数计算存活率。**结果** ES治疗癌性腹水的实验结果显示实验各组间小鼠体重具有统计学差异,高剂量组具有明显的优势,并且与顺铂对照组相当,组间比较具有统计学差异($P < 0.05$)。ES对恶性腹水小鼠存活率的影响提示,除低剂量组与中剂量组之间无统计学差异外,其余各组间均有统计学差异($P < 0.05$);不同时间存活率各组间比较均有统计学差异($P < 0.01$)。综合分析结果显示:在各实验组中,低剂量治疗组小鼠存活率显著高于其他各治疗组,低剂量组小鼠,存活时间长。**结论** 重组人ES具有较好的抗肿瘤性腔内积液效果,并可延长腹水小鼠的生存时间,提高生存率。

【关键词】 注射,腹腔内; 肿瘤; 血管内皮抑素

Clinical research of endostatin in the treatment of malignant serous cavity effusion GAO Wen-bin, LI Hua-ni, HUANG Jian-hui, LV Jin-yan, WANG Gang, MA Jian-zeng, ZHENG Zhen-zhen, DENG Rong, WANG Ruo-yu, FANG Jin-nv. Department of Oncology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China

Corresponding author: GAO Wen-bin, Email: wenbingao@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective A preliminary discussion of endostatin abdominal cavity chemotherapy in the treatment of malignant serous cavity effusion. **Methods** Endostatin, cisplatin and saline of different dosages were injected into the abdominal cavity of mice with ascites, then conduct a comparison. Endostatin of 5.00 mg/kg, 2.50 mg/kg and 1.25 mg/kg was injected into three groups, saline into negative control group, positive cisplatin (60.00 mg/kg) into positive control group, kept a record of the mice weight as a measurement indicator for ascites, and worked out the mice survival rate by counting the number of mice alive. **Results** Experiment showed that there were significant differences in the weight among these various groups of mice. A distinctive advantage ($P < 0.05$) in the high-dosage group was existed, nearly equivalent to the cisplatin comparison group. Endostatin had effects on the survival rate of the mice with malicious ascites. There were no obvious statistical differences between the low-dosage group and medium-dosage group, but differences do existed in the other groups ($P < 0.05$), and survival rate at different times was statistically quite different ($P < 0.01$). A high survival rate and long life span were seen in the low-dosage group. **Conclusions** Recombinant human endostatin can work well on controlling malignant serous cavity effusion to prolong mice life span and raise survival rate.

【Key words】 Injections, intraperitoneal; Neoplasms; Endostatin

血管内皮抑素(endostatin, ES)为内源性抗血管生成因子,特异性地作用于血管内皮细胞尤其是微血管

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.13.020

基金项目: 2010年度“CSCO-金港榄香烯肿瘤学研究生奖学助学基金”项目(J-2010-008)

作者单位: 116001 辽宁省,大连大学附属中山医院肿瘤内科(高文斌、李花妮、黄剑辉、吕金燕、王刚、马建增、郑真真、邓蓉、王若雨); 延边大学医学部病理及病理生理学教研室(方今女)

通讯作者: 高文斌, Email: wenbingao@yahoo.com.cn

的内皮细胞,抑制其迁移、诱导其凋亡,从而抑制血管生成和肿瘤生长,已成为近年来肿瘤治疗的新策略。采用大肠杆菌作为蛋白表达体系生产出的重组人 ES(rh-Endostatin, 商品名:Endostar, 恩度, YH-16), 实验研究表明对肺癌、纤维肉瘤及黑色素瘤等多种肿瘤有效,临床研究中也同样表现出较好的疗效和安全性^[1-2]。我们在临床实践中发现,静脉使用重组人 ES 过程中,对恶性肿瘤患者转移性胸腹腔积液的控制也取得了较为满意的效果^[3-4],受其启发我们进行了 YH-16 腔内给药治疗恶性腹腔积液的基础研究以探讨其治疗机制,报道如下。

材料与方 法

一、材料

1. 动物及细胞株:健康 BABL/C 小鼠,雌雄各半,购自大连医科大学实验动物中心。S180 细胞株由中国科学院大连化学物理研究所杨凌教授惠赠,本实验室保存。

2. 实验药物:ES 为无色透明液体,烟台麦得津生物工程有限公司提供,于 -4 °C 保存,使用时加入生理盐水(NS)稀释至所需浓度;注射用顺铂(DDP),山东齐鲁药厂出品。

二、方法

1. 腹水小鼠模型的建立及分组:取对数生长期的 S180 细胞,制成药 1 × 10⁷/ml 细胞悬液,每只小鼠腹腔注射接种 0.1 ml,实验动物随机分 5 组,每组 10 只小鼠。实验药物分组依照 YH-16 的使用剂量进行,分为 5.00 mg/kg、2.50 mg/kg 及 1.25 mg/kg 三组;为 NS 对照组;60 mg/kg DDP 为阳性对照组^[5]。

2. 实验方法:S180 细胞腹腔注射接种 5 d 后,实验鼠腹水产生,依照实验设计分别进行不同剂量实验药物 YH-16[分为 5.00 mg/kg(高剂量组)、2.50 mg/kg(中剂量组)及 1.25 mg/kg(低剂量组)],隔日腹腔注射;阴性对照组给予同体积的 NS 隔日腹腔注射;阳性对照组给予 60.00 mg/kg DDP 第一天腹腔注射。每次给药前记录小鼠体重作为腹水计量变化指标。记数小鼠存活只数计算存活率、生存率。实验所用的饲料、垫料、笼具均高压灭菌后使用,注射器械采用一次性无菌器械。

3. 统计学分析:实验各组数据采用 SPSS 13.0 软件包进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存期曲线。

结 果

1. ES 治疗癌性腹水的实验结果(表 1):自第 5 天起,实验各组间小鼠体重具有统计学差异,其中以高剂量组具有明显的优势,但其与 DDP 对照组相当。

表 1 ES 对癌性腹水量的影响比较

组别	实验剂量 (mg/kg)	小鼠体重(g, $\bar{x} \pm s$)						
		D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13
实验组	5.00	22.61 ± 2.33	25.87 ± 3.11	26.89 ± 2.83 ^a	26.69 ± 3.51 ^a	27.00 ± 2.84 ^a	-	-
	2.50	25.17 ± 2.71	27.45 ± 2.98	29.13 ± 3.04 ^{ab}	30.36 ± 3.21 ^{ab}	32.01 ± 3.28 ^b	35.85 ± 3.71	38.54 ± 3.23
	1.25	23.83 ± 1.93	26.50 ± 2.83	27.96 ± 3.01	27.89 ± 2.93 ^{abc}	28.98 ± 3.33 ^{bc}	36.70 ± 3.45	43.80 ± 4.52
DDP 组	60.00	21.11 ± 2.41	26.54 ± 2.89	26.64 ± 3.01	27.25 ± 3.45	-	-	-
NS 组	同体积	17.51 ± 2.01	23.54 ± 1.93	28.04 ± 3.35	32.15 ± 4.17	-	-	-

注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 5.00 mg/kg 组比较,^b $P < 0.05$;与 2.50 mg/kg 组比较,^c $P < 0.05$

2. ES 对恶性腹水小鼠存活率的影响(表 2,图 1):经统计学分析,不同实验组间存活率比较显示:低剂量组与中剂量组存活率较高,优于其他各组,两组间比较差异无统计学意义,其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);不同时间存活率各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。综合分析结果显示:在各实验组中,低剂量治疗组疗效显著高于其他各治疗组,低剂量组小鼠的存活率较高,存活时间长。

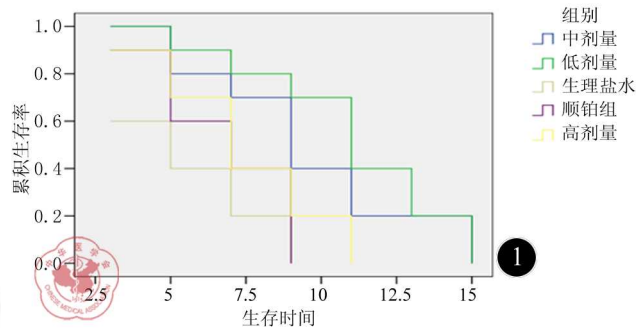


图1 各实验药物组荷癌性腹水小鼠生存曲线的比较

表2 ES对荷癌性腹水小鼠存活率的比较(%)

组别	实验剂量 (mg/kg)	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15
实验组	5.00	100	90	70	40	20	0	0	0
	2.50	100	100	80 ^a	70 ^a	40 ^a	20	20	0
	1.25	100	100	90 ^a	80 ^a	70 ^a	40	20	0
DDP组	60.00	100	90	60	40	0	0	0	0
NS组	同体积	100	60	40 ^a	20 ^a	0 ^a	0	0	0

注:与5.00 mg/kg实验剂量组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

恶性胸腹腔积液是指由恶性肿瘤累及胸、腹膜或胸、腹膜原发性肿瘤所致的胸腹膜腔积液,是晚期恶性肿瘤的常见并发症。几乎所有肿瘤均有侵犯胸膜、腹膜的报道,其中肺癌、消化道肿瘤、妇科肿瘤最为常见,约占2/3左右,临床上恶性肿瘤患者一旦出现胸腹腔积液,即意味着病变已到晚期^[6-8]。传统观点认为:胸腹腔积液是从壁层胸腹膜进入,脏层胸腹膜吸收,胸腹腔积液的形成是由于壁层与脏层胸腹膜之间的静水压、胶体渗透压和胸腹膜腔内负压的压力差所致。近年提出与传统观点不同的新理论即肿瘤阻塞壁层胸腹膜血管、淋巴管,或转移至纵隔淋巴结,使胸腹腔积液的回流吸收受阻;以及肿瘤直接侵犯和伴随的炎症使毛细血管的通透性增加也是主要原因之一^[9]。

ES作为一种新型以作用于血管内皮细胞为靶点的靶向药物,其抗肿瘤作用机制很多,主要包括:特异地作用于新生血管的内皮细胞并抑制内皮细胞迁移,诱导其凋亡;调节肿瘤细胞表面血管内皮生长因子的表达及蛋白水解酶的活性,间接导致肿瘤休眠或退缩^[10];阻碍增生内皮细胞与基质蛋白的相互作用,诱导内皮细胞凋亡,同时减少Bcl-2、Bcl-xL抗凋亡蛋白,抑制内皮细胞增殖;与VEGF、bFGF等竞争性抑制血管生成^[11];特异性识别并结合内皮细胞表面整合素 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha V\beta 3$ 阻止内皮细胞发生黏附移行,抑制并干扰细胞-基质间黏附达到抑制肿瘤侵袭转移的目的^[12-13]。Sumi等^[14]报道ES在良、恶性胸腔积液中均有表达,而在恶性胸腔积液中表达明显增高,其原因可能与胸腔内局部产生ES有关。有研究表明胸腹腔新生血管的形成和微血管通透性的增加是胸腹水形成的主要原因^[9],而rh-Endostatin能抑制胸腹膜新生血管形成和对抗血管内皮生长因子作用,使胸腹膜的新生血管和通透性均减少,从而达到控制胸腹水的作用。

我们在前期的临床观察中发现,应用YH-16静脉联合化疗药物治疗晚期恶性肿瘤时,合并胸腹腔恶性积液的患者其恶性积液的控制明显优于实体肿瘤。此结果提示我们将此药物应用于恶性胸腹腔积液的腔内局部治疗,可获得满意的疗效^[3-4],其疗效与国内学者的研究结果相近^[15]。我们的基础研究显示,高剂量YH-16治疗组治疗优势明显,与DDP对照组相当,提示YH-16具有较好的控制腹水生成作用;小鼠存活率的比较中显示,低、中剂量组明显优于其他各组;低剂量治疗组小鼠的存活率较高,存活时间长。此结果与国

内其他学者的研究相近^[5,16-17]。

近年来,国内外很多学者都开展了ES治疗恶性胸腹腔积液的基础与临床应用研究。基础研究显示,ES治疗小鼠肿瘤腹水模型的腹水量、腹水中红细胞、癌细胞和VEGF、bFGF、MMP2、MMP9以及CD44V6表达降低,腹水中的凋亡细胞增多,肿瘤组织内微血管密度减少,小鼠的生存期明显延长,小鼠的生活质量也明显提高^[16-19]。在临床观察中,无论是ES单药,还是与其他化疗药物联合使用,局部胸腹腔内恶性积液的治疗都获得了较为满意的疗效,临床有效率为42.8%~100.0%,而且,联合化疗药物治疗组的效果相对更加明显,患者的恶性胸腹水得到了较好的控制,减轻临床症状,延长生存期,改善生活质量。其不良反应除化疗药物所引起的消化道反应、骨髓抑制以外,未发现其他严重的不良反应报道^[15]。值得注意的是,我们的研究中发现,中、低剂量组小鼠的生存期明显优于其他各组,这与既往的研究文献中所使用的剂量相比均较低^[5],这也说明目前临床上对于药物的使用剂量、时间间隔、治疗疗程数量等内容尚无统一标准,临床最佳治疗模式仍有待于进一步研究、规范。

参 考 文 献

- [1] 杨林,王金万,崔成旭,等. 重组人血管内皮抑制素 YH-16 联合用药治疗晚期非小细胞肺癌的多中心 II 期临床试验. 中国新药杂志, 2005, 14:204-207.
- [2] 高文斌,吕金燕,王若雨. 重组人血管内皮抑制素的临床疗效及不良反应. 药物不良反应杂志, 2007, 9:32-35.
- [3] 高文斌,王武龙,王若雨,等. 重组人血管内皮抑制素治疗恶性胸腹腔积液的疗效观察. 中国实用医刊杂志, 2009, 36:46-47.
- [4] 高文斌,王武龙,王若雨,等. 重组人血管内皮抑制素治疗恶性胸腹腔积液的临床观察. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14:544-546.
- [5] 魏红梅,秦叔逵,殷晓进,等. 新型重组人血管内皮抑制素对小鼠腹水瘤的作用特点探讨. 南方医科大学学报, 2010, 30:1509-1513.
- [6] Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, et al. Management of malignant pleural effusions. European Respiratory Journal, 2001, 18:402-419.
- [7] Garrison RN, Kaelin LD, Galloway RH, et al. Malignant ascites: clinical and experimental observations. Ann Surg, 1986, 203:644-651.
- [8] Oliver WP, Robert L. Management of malignant pericardial effusion and tamponade. JAMA, 1987, 257:1088-1092.
- [9] Tamsma JT, Keizer HJ, Meinders AE. Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited. Ann Oncol, 2001, 12:1353-1357.
- [10] Li B, Wu XY, Zhou H, et al. Acid-induced unfolding mechanism of recombinant human endostatin. Biochemistry, 2004, 43:2550-2557.
- [11] Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282:C947-970.
- [12] Furumatsu T, Yamaguchi N. Endostatin inhibits adhesion of endothelial cells to collagen I via $\alpha 2\beta 1$ integrin, a possible cause of prevention of chondrosarcoma growth. J Biol Chem, 2002, 277:619-626.
- [13] Dixelous J, Cross M, Matsumoto T, et al. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. Cancer Res, 2002, 62:1944-1947.
- [14] Sumi M, Kagohashi K, Satoh H, et al. Endostatin levels in exudative pleural effusions. Lung, 2003, 181:329-334.
- [15] 姜子瑜,秦叔逵. 重组人血管内皮抑素治疗恶性浆膜腔积液的研究进展. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15:937-943.
- [16] 魏红梅,秦叔逵. 新型重组人血管内皮抑制素(恩度)抗小鼠腹水瘤作用机制的体内外研究. 中国医学论坛报, 2010-9-16(B6).
- [17] Wei HM, Qin SK, Yin XJ, et al. Endostar, a modified endostatin inhibits ascites formation, prolonging survival in mice tumor ascites mode. Proceeding of ASCO, 2010:399.
- [18] 吴莹,赵敏,杨莉,等. 内皮抑素基因治疗对癌性腹水的抑制效应研究. 四川大学学报:医学版, 2004, 35:316-319.
- [19] Fang F, Chen P, Wu X, et al. Therapeutic effects of recombinant human endostatin adenovirus in a mouse model of malignant pleural effusion. Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135:1149-1157.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:巨娟梅)

高文斌,李花妮,黄剑辉,等. 重组人血管内皮抑素腹腔内给药治疗恶性腹腔积液的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5(13):3773-3776.