

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.10.002

长春瑞滨及联合热疗抗血管生成作用的实验

万莉¹, 钱晓萍², 刘宝瑞², 胡静², 朱丽晶², 禹立夏²

Experiment of Vinorelbine or Combined with Hyperthermia on Inhibiting Angiogenesis

WAN Li¹, QIAN Xiao-ping², LIU Bao-rui², HU Jing², ZHU Li-jing², YU Li-xia²

1. Department of Oncology, Nanjing Second Hospital, Nanjing 210003, China; 2. Cancer Center, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School

Corresponding Author: QIAN Xiao-ping, E-mail: qianxiaoping211@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the antiangiogenesis ability of Vinorelbine or combined with hyperthermia *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Human pulmonary adenocarcinoma A549 cell was used as control; proliferations of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) was measured by MTT assay. Transwell cabin test and out-body canalicularization test were used to observe the impact of Vinorelbine on cell migration and capillary-like tube formation ability, and the apoptosis rate of HUVEC was calculated by flow cytometry. *In vivo*, the chicken chorioallantoic membrane (CAM) model was used to check whether the neovascularization of CAM could be suppressed. **Results** Low dose Vinorelbine[(0.1~1)ng/ml] had a much more effect of inhibiting the proliferation of HUVEC than that of A549, and the difference was significant ($P=0.000$). The inhibition rate of HUVEC within a range of (0.1~1.0)ng/ml Vinorelbine was positive correlated with the concentration ($r=0.993$, $P=0.000$). Sub-additive or synergistic anti-angiogenic effect was observed when combined low dose Vinorelbine with hyperthermia *in vitro*. Low dose Vinorelbine has the ability of inhibiting migration and tube formation of HUVEC. Furthermore, it could induce apoptosis of HUVEC. We also observed that Vinorelbine suppressed the neovascularization of CAM *in vivo*. **Conclusion** The results of this experiment show that low dose of vinorelbine has anti-angiogenic effect both *in vivo* and *in vitro*, and there is additional effect when in combination with hyperthermia.

Key words: Vinorelbine; HUVEC; Angiogenesis; Hyperthermia

摘要:目的 探讨长春瑞滨及联合热疗对血管生成的抑制作用。**方法** 以人肺癌 A549 细胞为对照, 采用 MTT 法观察长春瑞滨及联合热疗对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的影响;通过 Transwell 趋化实验、小管形成实验及流式细胞术观察长春瑞滨对 HUVEC 迁移、小管形成及细胞凋亡的影响;利用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型,观察长春瑞滨对体内 CAM 新生血管的影响。**结果** 小剂量(0.1~1 ng/ml)长春瑞滨对 HUVEC 和 A549 增殖抑制具有差异细胞毒性($P=0.000$)。0.1~1 ng/ml 长春瑞滨呈剂量依赖性抑制 HUVEC 增殖($r=0.993$, $P=0.000$),联合热疗具有抑制 HUVEC 增殖的叠加或协同效应。小剂量长春瑞滨能够抑制 HUVEC 迁移和小管形成,诱导 HUVEC 凋亡,遏制 CAM 新生血管形成。**结论** 小剂量长春瑞滨具有抗血管生成作用,联合热疗具有协同或叠加效应。

关键词: 长春瑞滨;人脐静脉内皮细胞;血管生成;热疗

中图分类号:R73-36;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)10-1101-04

0 引言

长春瑞滨与长春碱同属长春花生物碱类,实验表明长春碱^[1]在小剂量使用时具有抗血管生成作用。长春瑞滨是临床常用化疗药,对肺癌等有较好

疗效,但由于其存在明显骨髓抑制、神经及皮肤毒性等不良反应而限制其更广泛应用,因此我们研究小剂量长春瑞滨在体内是否具有抗血管生成作用,以期年老体弱不能耐受大剂量化疗或耐药的肿瘤患者提供新的治疗模式。热疗是通过加热使肿瘤组织温度达到 40℃~44℃从而引起肿瘤细胞生长受阻和死亡的一种治疗方式,具有安全简便、不良反应低等优点,研究发现其具有抗血管生成作用^[2]。本实验旨在探讨长春瑞滨及联合热疗的抗血管生成作用。

收稿日期:2010-11-12;修回日期:2011-04-14

基金项目:江苏省卫生厅资助项目(H201035)

作者单位:1. 210003 南京,南京市第二医院肿瘤科;2. 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

通信作者:钱晓萍, E-mail: qianxiaoping211@hotmail.com

作者简介:万莉(1979-),女,硕士,住院医师,主要从事肿瘤抗血管生成的研究

1 材料和方法

1.1 材料

人肺癌 A549 细胞系本实验室常规培养。HUVEC 经人脐带原代分离。内皮细胞培养液 (EGM-2): Lonza 公司。RPMI 1640: Gibco 公司。Transwell 小室: Corning 公司。Annexin V-FITC 试剂盒: Invitrogen 公司。冷磷酸缓冲液 (PBS): 自配。酒石酸长春瑞滨注射液: 江苏豪森药业股份有限公司。受精鸡蛋购自南京源创禽业发展有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的原代分离 PBS 冲洗新鲜新生儿脐带 (约 20 cm) 的脐静脉, 0.25% 胰酶消化 7 min, RPMI 1640 冲洗, 1000 r/min 离心 5 min, 收集 HUVEC, EGM-2 重悬接种于培养皿, 置 37°C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。取第 3~6 代用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖实验 RPMI 1640 和 EGM-2 分别调整 A549 和 HUVEC 细胞浓度至 3.2×10^4 /ml 和 2.6×10^4 /ml 接种于 96 孔板, 常规孵育 24 h; 化疗组: 加入含药培养液 50 μ l (终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ng/ml 长春瑞滨) 继续孵育 48 h; 热疗组^[2]: 加入等量不含药培养液后置于电热恒温水浴箱中, 43°C 作用 30 min; 化疗联合热疗组: 加入等量含药培养液 (同化疗组) 后置于恒温水浴箱中 43°C 作用 30 min, 再常规孵育 47.5 h; 对照组: 加入等量不含药培养液; 设空白对照组, 每组 3 个复孔。20 μ l MTT 孵育 4 h 后弃上清液, 加入 200 μ l DMSO 震荡 10 min, 酶标仪于 490 nm 波长下测吸光度值, 计算细胞增殖抑制率。

1.2.3 迁移实验 在 Transwell 下室加入 600 μ l EGM-2 完全培养液; 收集含 0.5% 胎牛血清 EGM-2 孵育 12 h 的 HUVEC 并调整至 4×10^6 /ml, 每室 50 μ l 接种于上室; 在药物组上室加入 50 μ l 含药物的 0.5% 胎牛血清 EGM-2 培养液 (终浓度为 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨), 对照组上室加入等量不含药培养液; 孵育 12 h 后取出小室, 甲醛固定、结晶紫染色、PBS 漂洗, 取下微孔膜置于载玻片, 显微镜下观察拍照, 随机计数 5 个视野, 取平均数为趋化细胞数, 计算细胞迁移抑制率。

1.2.4 小管形成实验 参照 Chalupowica 等^[3]的方法, 构建 HUVEC 培养模型模拟新生血管生成。用无血清 EGM-2、纤维蛋白原及凝血酶制作底层凝胶; 收集 HUVEC, 无血清 EGM-2 重悬至 2.5×10^4 /ml 接种于底层凝胶上; 孵育 24 h 后换入含不同浓度长春瑞滨的培养液 (终浓度为 0.1、0.4、0.8 ng/ml), 对照组换入等量不含药培养液; 继续孵

育 1 h 后移去培养液, 在细胞上制作含上述各浓度长春瑞滨的顶层凝胶, 对照组不含药物; 在顶层凝胶上加入 1 ml EGM-2 完全培养液继续孵育 23 h; 显微镜下观察拍摄小管形成情况, 随机 5 个视野计算小管形成长度。

1.2.5 流式细胞仪检测 HUVEC 凋亡率 收集对照组及药物组 (0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨) 作用 48 h HUVEC, 100 μ l Buffer 重悬, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 混匀后避光 15 min, 加入 400 μ l Buffer 振荡后上机检测。

1.2.6 鸡胚绒毛尿囊膜实验 在孵育第 7 天的受精鸡蛋顶端蛋壳上开窗, 暴露尿囊膜, 放置甲基纤维素薄片, 在薄片上滴加 10 μ l 含不同浓度药物的 0.9% 氯化钠溶液 (0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨), 以不含药物的 0.9% 氯化钠溶液为阴性对照, 以 0.5 mg/ml 地塞米松为阳性对照; 每 24 h 追加等量药物, 72 h 后解剖鸡胚, 剪下薄片周围 3 cm 直径区域的尿囊膜, 显微镜下观察薄片周围毛细血管生长情况。每组 10 个鸡胚计数尿囊膜新生血管数, 计算抑制率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件统计包, 对实验数据作单因素方差分析, 进行 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 长春瑞滨及联合热疗对细胞增殖的影响

采用 Weeb 系数^[4]判定长春瑞滨联合热疗产生的相互作用, 预估效应 $C = A + B - A \times B$, 其中 A、B 分别指长春瑞滨、热疗对细胞增殖的抑制率, 当实际抑制率 $> C$ 时, 联合处理表现为协同作用; 当实际抑制率 = C 时, 联合处理表现为相加作用; 当 $C >$ 实际抑制率 $> A$ 和 B 时, 联合处理表现为叠加作用。

相同条件下, 小剂量长春瑞滨 (0.1~1) ng/ml 对 HUVEC 增殖抑制率高于对 A549 增殖抑制率, 差异具有统计学意义 ($P = 0.000$), 见图 1。0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 ng/ml 长春瑞滨对 HUVEC 增殖抑制率依次为 25.76%、32.50%、39.17%、45.23%、53.95%、62.27%, 抑制作用随药物浓度增加而增强 ($r = 0.993$, $P = 0.000$); 热疗对 HUVEC 增殖抑制率为 22.44%; 0.1、0.2、0.4、0.6 ng/ml 长春瑞滨联合热疗对 HUVEC 增殖抑制率依次为 29.50%、35.78%、42.68%、48.77%, 表现为叠加效应; 0.8、1.0 ng/ml 长春瑞滨联合热疗对 HUVEC 增殖抑制率分别为 64.85%、70.83%, 表现为协同效应。

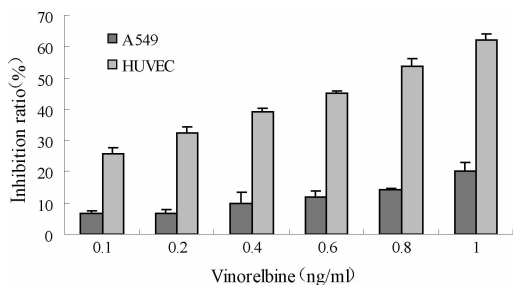


图 1 长春瑞滨作用 48 h 对 A549 和 HUVEC 细胞增殖的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effects of vinorelbine on the cell proliferation of HUVEC and A549 cells after 48 h treatment

2.2 长春瑞滨对 HUVEC 迁移能力的影响

0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨作用 HUVEC 12 h 的平均细胞迁移数分别为 (349.20 ± 24.06)、(262.00 ± 17.89)、(185.20 ± 22.03), 与对照组 (439.60 ± 27.12) 相比, 细胞迁移数明显减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨对 HUVEC 迁移抑制率分别为 20.56%、40.40%、57.87%, 抑制强度与浓度呈正相关 ($r = 0.954, P = 0.000$)。

2.3 长春瑞滨对 HUVEC 小管形成的影响

与对照组相比, 药物组形成网管样结构的宽度和长度都明显减少, 同时管腔也趋于不完整, 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨抑制小管形成率分别为 29.07%、41.63%、56.83%, 抑制作用与药物浓度相关 ($r = 1.000, P = 0.017$)。

2.4 长春瑞滨对 HUVEC 细胞凋亡的影响

0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨作用 48 h, HUVEC 细胞凋亡率分别为 22.30%、30.10%、37.05%, 与对照组凋亡率 15.60% 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 长春瑞滨对体内 CAM 血管生成的影响

与 0.9% 氯化钠溶液阴性对照组相比, 药物组 CAM 新生血管数目减少 ($P < 0.05$)。0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨抑制血管生成率分别为 21.05%、

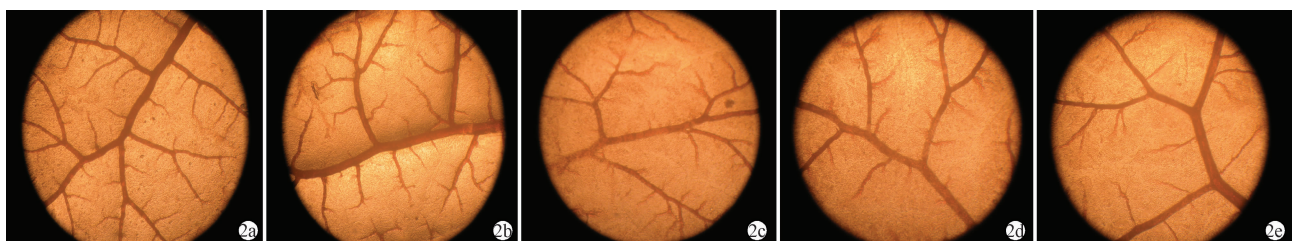
28.95%、42.11%, 抑制作用与其浓度相关 ($r = 0.998, P = 0.039$), 且抑制率均高于地塞米松阳性对照组 (19.08%), 见图 2。

3 讨论

肿瘤血管生成源于两大方面^[5-6]: 一方面通过已存在血管内皮细胞芽生长形成, 另一方面由骨髓来源的成血管细胞募集到新生血管形成位点分化为内皮细胞参与新生血管形成, 为肿瘤生长、转移及复发提供极其重要的通路。以血管内皮细胞为靶点的抗血管生成治疗, 具有靶点基因型稳定、不易产生耐药性、不良反应低等优点, 受到肿瘤界学者的密切关注。近年来研究发现, 一些传统细胞毒药物如环磷酰胺^[7]、紫杉醇^[8]在小剂量应用时具有抗血管生成作用, 联合热疗^[9]具有协同效应, 为肿瘤有效治疗提供了广阔平台。

本实验观察到, 小剂量长春瑞滨 (0.1~1.0) ng/ml 对 HUVEC 和 A549 增殖抑制具有差异细胞毒作用。小剂量长春瑞滨能够抑制 HUVEC 增殖, 且联合热疗具有叠加或协同效应。(0.1~0.8) ng/ml 长春瑞滨呈剂量依赖性抑制 HUVEC 迁移及阻遏其形成毛细网管样结构, 表现出药物对细胞趋化活性及分化能力的抑制作用。(0.1~0.8) ng/ml 长春瑞滨诱导 HUVEC 凋亡率在 22.30%~37.05% 之间, 表现出药物具有阻断内皮细胞 DNA 合成从而抑制血管生成的功能。此外, CAM 实验显示小剂量长春瑞滨能够抑制体内新生血管形成, 且抑制作用与药物浓度呈正相关。考虑到地塞米松^[10-11]具有抗 CAM 血管生成的作用, 因此我们在 CAM 实验中设定其为阳性对照, 并观察到小剂量长春瑞滨对 CAM 血管生成抑制率均高于地塞米松阳性对照组 (19.08%)。

综上所述, 小剂量长春瑞滨在体内外具有抗血管生成作用, 其机制可能与其干扰 HUVEC 增殖、抑制 HUVEC 迁移、阻止 HUVEC 小管形成及诱导 HUVEC 凋亡相关; 小剂量长春瑞滨联合热疗具有



2a: negative control (NS); 2b: positive control (0.5 mg/ml Dexamethasone); 2c: 0.1 ng/ml Vinorelbine; 2d: 0.4 ng/ml Vinorelbine; 2e: 0.8 ng/ml Vinorelbine

图 2 不同处理方法对鸡胚尿囊膜血管生成的影响 (×100)

Figure 2 Effects of different treatment on antiangiogenesis of CAM (×100)

抗 HUVEC 增殖的叠加或协同作用。

参考文献:

[1] Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine [J]. *Blood*, 1999, 94 (12): 4143-4155.

[2] Roca C, Primo L, Valdembri D, et al. Hyperthermia inhibits angiogenesis by a plasminogen activator inhibitor 1-dependent mechanism [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1500-1507.

[3] Chalupowica DG, Chowdhury ZA, Bach TL, et al. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation [J]. *J Cell Biol*, 1995, 130 (1): 207-215.

[4] Yeh YA, Herenyiova M, Weber G, et al. Quercetin: synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 1995, 57(13): 1285-1292.

[5] Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1525-1531.

[6] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance [J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(4): 498-508.

[7] Bottini A, Generali D, Brizzi MP, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(22): 3623-3628.

[8] Pasquier E, Carré M, Pourroy B, et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3 (10): 1301-1310.

[9] 钱晓萍, 刘宝瑞, 李敏, 等. 奥沙利铂联合热疗对血管生成的抑制作用 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(11): 826-829.

[10] Matsumura M, Kakishita H, Suzuki M, et al. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting Nf-KappaB in vascular smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2001, 69(9): 1067-1077.

[11] Polytaichou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38 (5): 501-508.

[编辑:周永红;校对:刘红武]

• 简讯 •

《中国癌症杂志》2012 年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊,读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容:国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊,并为中国科技论文统计源期刊,先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊,大 16 开,80 页铜版纸(随文彩图),每月 20 日出版,单价 8 元,全年 96 元。国际标准刊号 1007-3639,国内统一标准刊号 CN31-1727/R,邮发代号 4-575。

读者可在当地邮局订阅,漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主编:沈镇宙

主任:秦娟

联系地址:上海市东安路 270 号复旦大学附属肿瘤医院内《中国癌症杂志》编辑部

邮编:200032

电话:(021)64188274;(021)64175590-3574

E-mail:zgazzz@163.com

网址:WWW.china-oncology.com

《中国癌症杂志》编辑部