

# 地塞米松对小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤生长及血管内皮生长因子表达的影响

翟羽, 吕占军

## Effect of dexamethasone on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in mouse H<sub>22</sub> model

ZHAI Yu, LU Zhan-jun

Department of Laboratory Animal, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of dexamethasone on tumor growth and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in mouse H<sub>22</sub> model. **Methods** H<sub>22</sub> cells were inoculated subcutaneously into BALB/c mice. Intra-peritoneal injection of dexamethasone began from the day of inoculation. Diameters of tumor were measured every day. Tumor microvessel count was performed by immunohistochemical stain in group with anti-CD31 monoclonal antibody. Proliferation of H<sub>22</sub> cells and ECV-304 cells (human umbilical vein endothelial cell) in vitro were examined by thiazolyl blue assay. VEGF mRNA expression in tumors and cultured cells were analyzed by RT-PCR. **Results** In vivo, treatment with dexamethasone inhibited tumor growth significantly compared with control group. After treatment with dexamethasone, microvessel count and VEGF mRNA expression of tumor decreased markedly vs. control,  $P < 0.01$ . In vitro, dexamethasone inhibited proliferation of ECV-304 cells obviously. When the concentration of dexamethasone was increased, the inhibition enhanced. VEGF mRNA expression of H<sub>22</sub> cells, in vitro, decreased dose-dependently on the concentration of dexamethasone too. **Conclusion** Dexamethasone inhibits tumor growth significantly in mouse H<sub>22</sub> model. Dexamethasone inhibits VEGF mRNA expression of H<sub>22</sub> tumor in vivo and of H<sub>22</sub> cells in vitro. The inhibition of dexamethasone on VEGF mRNA expression of H<sub>22</sub> cell may be an important reason for its anti-angiogenic effect and anti-tumor result.

**Keywords** : Mouse hepatoma H<sub>22</sub>; Dexamethasone; Anti-tumor; Angiogenesis; VEGF

**摘要:**目的 探讨地塞米松对小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤生长及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 BALB/c 小鼠皮下接种 H<sub>22</sub> 肿瘤细胞,腹腔注射地塞米松,每天测肿瘤直径。用抗 CD31 单抗对肿瘤组织做免疫组化微血管计数。噻唑蓝法检测地塞米松对体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞和人脐静脉内皮细胞 ECV-304 增殖的影响。RT-PCR 法测定肿瘤组织和体外培养细胞的 VEGF mRNA 表达。结果 地塞米松可以显著抑制体内 H<sub>22</sub> 肿瘤的生长,给药组肿瘤体积与对照组比较  $P < 0.05$ 。给药组微血管计数和 VEGF mRNA 表达比对照组显著减少。体外实验中,随着地塞米松浓度的增加,ECV-304 细胞的增殖率降低;H<sub>22</sub> 细胞中 VEGF mRNA 表达下降。结论 地塞米松可以显著抑制小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤的生长。地塞米松对体内 H<sub>22</sub> 肿瘤组织和体外 H<sub>22</sub> 细胞的 VEGF mRNA 表达均有显著的抑制作用。地塞米松对肿瘤细胞 VEGF 表达的抑制作用可能是其抗 H<sub>22</sub> 肿瘤及抗血管生成的一个重要原因。

**关键词:**小鼠肝癌细胞系 H<sub>22</sub>;地塞米松;抗肿瘤;血管生成;VEGF

中图分类号:R73-36 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2003)02-0098-04

### 0 引言

地塞米松(dexamethasone)作为抗过敏、抗炎症

药物在临床中广泛应用。有资料表明,地塞米松可以显著抑制大鼠体内 C6、9L 神经胶质瘤的生长,给药组与对照组相比,肿瘤体积及微血管密度明显降低<sup>[1-2]</sup>;还能够抑制体外诱导的人动脉血管平滑肌细胞<sup>[3]</sup>和 大鼠神经胶质瘤细胞<sup>[4]</sup>的血管内皮生长因子

收稿日期:2002-05-29;修回日期:2003-01-06

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学实验动物学部

(VEGF) mRNA 表达,说明地塞米松也具有一定的抗肿瘤和抗血管生成的作用。但目前尚未见有关地塞米松对小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤模型生长及 VEGF 表达影响的报道。本文记述了我们观察地塞米松对小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤生长影响的结果,并对其机制进行了初步的研究,旨在探讨地塞米松治疗肝癌的可能性。

### 1 材料与方 法

1.1 药品、试剂及仪器 地塞米松磷酸钠注射液,连云港正大天晴制药有限公司产品,批号 200011291。大鼠抗小鼠 CD31 抗体,克隆号 390,购自深圳达科为生物技术有限公司。生物素化的兔抗大鼠 IgG,购自北京中山生物技术有限公司。噻唑蓝(MTT)购自华美生物工程公司。VEGF 和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物,购自北京鼎国生物技术发展中心。VEGF 上游引物序列:5' TCGGGCCTCCGAAAC CATGA3';下游引物序列:5' TCCATGAACTTC ACCACTTC3',扩增片段长度 147b p。GAPDH 上游引物序列:5' GGTCGGAGTCAACGGATTTC 3';下游引物序列:5' ATGAGCCCCAGCCTTCTC CAT3',扩增片段长 319b p。自动酶标仪,奥地利 Rainbow 公司产品。冰冻切片机,德国 Leica 公司产品。PCR 仪,英国 Hybaid 公司产品。

1.2 实验动物 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体重 17.23 ±1.11 g,清洁级动物,本部小动物室提供,合格证号:冀医动管字 04082。

1.3 细胞 小鼠肝癌细胞株 H<sub>22</sub>,本室保存。人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 来源于美国 ATCC,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.4 动物模型的建立及处理 BALB/c 小鼠每只左腹股沟皮下接种 H<sub>22</sub> 细胞 1 ×10<sup>7</sup> / 0.2ml,随机分为给药组和对照组,每组 6 只。从分组当天开始,给药组每只小鼠腹腔注射 5m g/kg 地塞米松 0.1ml,对照组每只注射生理盐水 0.1ml,每天 1 次。从接种第 4 天开始测量肿瘤直径,计算肿瘤体积。肿瘤体积(V) = 长 ×宽<sup>2</sup> / 2。第 12 天处死动物。

1.5 微血管计数 新鲜的肿瘤组织做冰冻切片,厚 8 μm,-20 丙酮固定 10min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除内源性过氧化物酶活性,SP 法染色,大鼠抗小鼠 CD31 做一抗。微血管计数的方法,参照文献[5],在低倍镜下,选取五个微血管密度最高的区域,10 ×25 倍放大的视野下,每一个着染的单个内皮细胞或细胞串计为一个微血管。血细胞和大的血管腔不计。

1.6 体外增殖实验 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞分别用 20%NBS -DMEM 和 1%NBS -DMEM 配为 1 ×10<sup>5</sup> / ml,96 孔培养板每孔 100 μl。每孔加入 20 μl 地塞米

松,对照加 20 μl 生理盐水,各孔分别用 20%NBS -DMEM 和 1%NBS -DMEM 补足体积到 200 μl。地塞米松终浓度分别为 9.68 μmol/L,24.21 μmol/L,48.41 μmol/L,96.82 μmol/L,每种处理设 3 个重复孔,37 °C,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h,每孔加入 5mg/ml MTT20 μl,继续培养 4h,离心,1000 转/min,2min,去上清,加二甲亚砷 150μl,待溶解后,酶标仪测 550nm 吸光度。

1.7 VEGFmRNA 表达 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞分别在 20%NBS -DMEM,24 孔培养板,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。每孔终体积为 2ml,细胞密度和加入的地塞米松浓度同增殖实验,每种处理设 4 个重复孔。去上清,加无血清 DMEM 培养 24h,细胞用 PBS 洗 1 次。收集的培养细胞及液氮保存的肿瘤组织 10m g 左右,分别加 1ml0.5% 十二烷基磺酸钠匀浆,加等体积的水饱和酚,冰浴振荡 15min,离心 15000 转/min,4 °C,15min,上清加等体积的异丙醇,-20 °C 过夜,离心后沉淀加适量 75% 乙醇洗 2 次, RNA 沉淀用二乙基焦碳酸酯处理过的重蒸水悬起,取 450n gRNA 为模板,GAPDH 做内参,做 RT-PCR,同管扩增,引物用量参照说明书,40 个循环。PCR 产物做 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色。结果做图象分析,采用同济医科大学 HPIAS-1000 图象分析系统。分别测定给药组及对照组 VEGF 带和 GAPDH 带的光度值,计算 VEGF 的相对表达量。VEGF 相对表达量 =VEGF 带的光度值 / GAPDH 带的光度值。

### 2 结果

2.1 体内抑瘤实验 地塞米松对肿瘤生长的抑制作用,见图 1。将给药组和对照组每天测得的肿瘤体积做配对 t 检验,t =3.23, P =0.0072。

#### 2.2 微血管计数

肿瘤组织免疫组化微血管计数结果,见表 1。给药组比对照组微血管计数减少,差异有统计学意义。

表 1 肿瘤组织免疫组化微血管计数结果(x ±s)

组别	例数	微血管计数	t	P
地塞米松	6	33.40 ±24.86	2.92	0.0097
对照	6	81.20 ±26.91		

2.3 体外增殖实验 地塞米松对体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞增殖的影响,见图 2a,b。高血清浓度中,48.41 μmol/L 和 96.82 μmol/L 地塞米松显著抑制 ECV-304 细胞增殖,P 值均小于 0.05,但对 H<sub>22</sub> 细胞增殖的抑制作用没有统计学意义,低浓度地塞米松(9.68 μmol/L)反而促进 H<sub>22</sub> 细胞增殖。在低血清浓度中地塞米松对 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞增

殖均没有表现出显著抑制作用,低浓度地塞米松(9.68  $\mu\text{mol/L}$ )促进 ECV-304 细胞增殖。

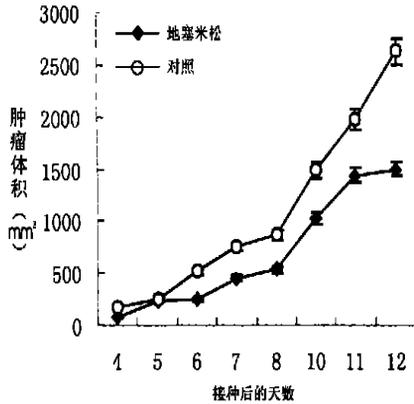
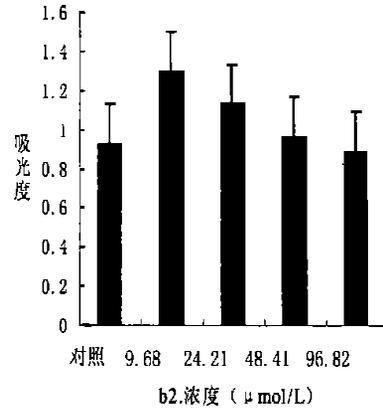
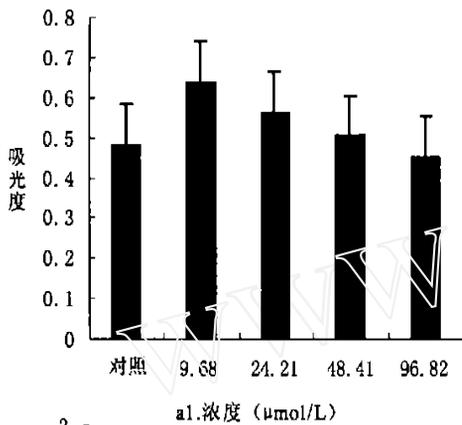


图 1 地塞米松对体内 H<sub>22</sub> 肿瘤生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

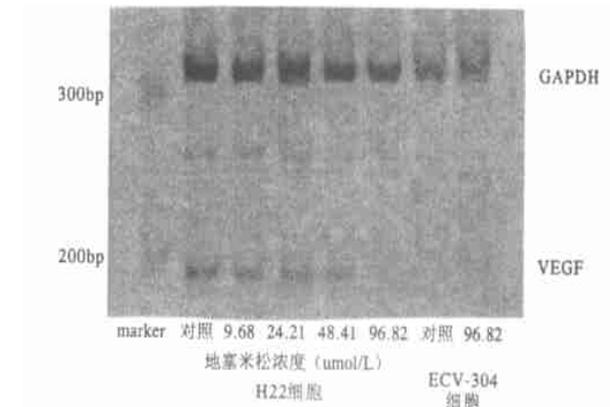
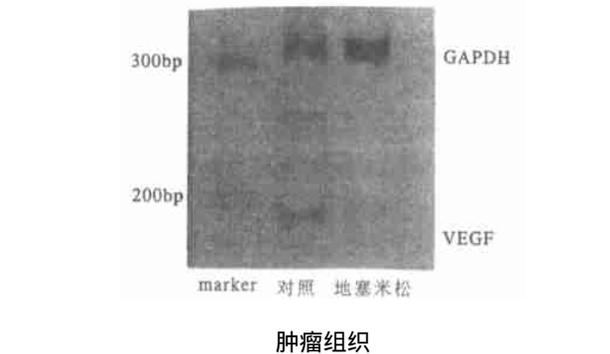
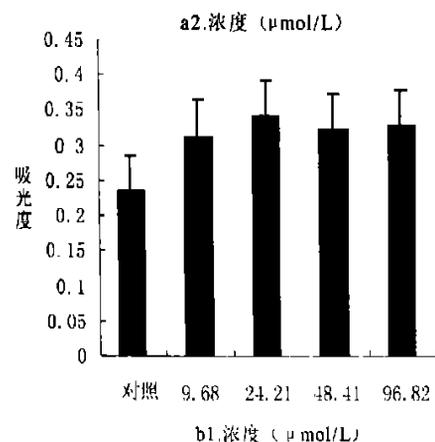
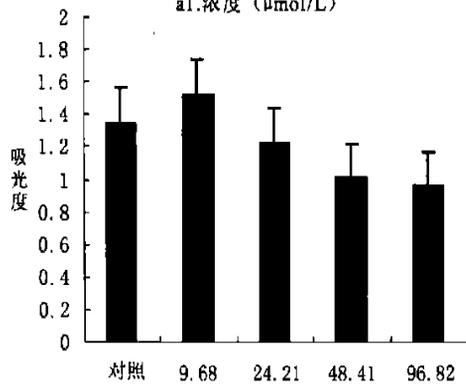


a1: 在 1%NBS-DMEM 中培养的 ECV-304 细胞;a2: 在 20% NBS-DMEM 中培养的 ECV-304 细胞。b1: 在 1%NBS-DMEM 中培养的 H<sub>22</sub> 细胞;b2: 在 20%NBS-DMEM 中培养的 H<sub>22</sub> 细胞

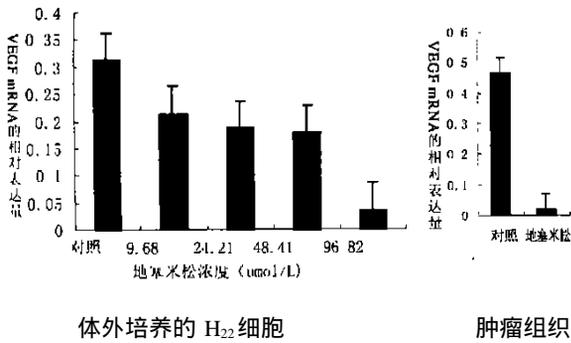
图 2 地塞米松对体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞增殖的影响



2.4 VEGFmRNA 表达 肿瘤组织及体外培养细胞中的 VEGFmRNA 表达,见图 3a。以 GAPDH 为内参,计算 VEGFmRNA 的相对表达量,见图 3b。给药组肿瘤组织中 VEGFmRNA 表达比对照组显著减少,  $t=14.70$ ,  $P=6.23E^{-5}$ 。从 9.68  $\mu\text{mol/L}$  到 96.82  $\mu\text{mol/L}$ , 随浓度的升高,地塞米松对体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞中 VEGFmRNA 表达的抑制作用增强, 24.21  $\mu\text{mol/L}$ , 48.41  $\mu\text{mol/L}$  和 96.82  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松与对照有显著差异,  $P$  值均小于 0.05。ECV-304 细胞不表达 VEGF。



a: 肿瘤组织,体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞中的 VEGF mRNA 表达



b: 肿瘤组织和体外培养的 H<sub>22</sub> 细胞中 VEGFmRNA 的相对表达量

图 3 肿瘤组织和体外培养细胞中的 VEGFmRNA 表达

### 3 讨论

实体瘤的生长依赖新生的血管不断提供养料和氧,因此通过抑制肿瘤细胞诱导的血管生成来干扰肿瘤的生长、浸润和转移,从而治疗肿瘤的策略,在近几年得到了迅速的发展<sup>[6]</sup>。目前,已经发现的血管生成抑制剂数以百计,其中包括一些人们早已熟知的药物,如:地塞米松。肝动脉灌注地塞米松可以有效的抑制大鼠 K12/TRb 结肠癌细胞诱导的血管生成和肝转移<sup>[7]</sup>。关于地塞米松抗肿瘤和抗血管生成的分子机制还没有完全阐明,其作用效果因肿瘤细胞的类型不同会有所不同,作用的机制也有可能不同<sup>[1,2,7]</sup>,到目前为止,地塞米松对肿瘤的治疗作用还没有引起大家的重视。

本文中给小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤模型腹腔注射地塞米松,结果显示,给药组 H<sub>22</sub> 肿瘤的生长被显著抑制,肿瘤体积与对照组比较  $P < 0.05$ 。免疫组化法检测肿瘤组织中的微血管密度,给药组比对照组微血管计数显著减少,说明地塞米松可以抑制体内 H<sub>22</sub> 肿瘤的生长和血管生成。

高血清浓度的体外增殖实验中,随着地塞米松浓度的增加,H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞的增殖率均降低,48.41 μmol/L 和 96.82 μmol/L 地塞米松显著抑制 ECV-304 细胞增殖, $P$  值均小于 0.05;H<sub>22</sub> 细胞对地塞米松的敏感性似乎低于 ECV-304 细胞,细胞增殖虽有下降,但没有统计学意义。低血清浓度下,地塞米松对细胞增殖的抑制作用减弱了,两种细胞增殖与对照相比均无显著差异。从血清浓度的影响和两种细胞的增殖结果,提示地塞米松对细胞生长的抑制作用可能与生长因子有关。黄海东等的研究显示,地塞米松在体外能够抑制 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的人脐静脉内皮细胞生成类毛细血管结构,但不影响内皮细胞增殖<sup>[8]</sup>,似与本文结果不符,本文中低浓度地塞米松(9.68 μmol/L)不仅不抑制细胞增殖,反而促进 H<sub>22</sub> 细胞和 ECV-304 细胞增殖,估计这种差异是由于实验方法和所用药物浓度不同造成的。

地塞米松在体外能够抑制 VEGF 和 bFGF 诱导的人脐静脉内皮细胞生成类毛细血管结构<sup>[8]</sup>;对体外诱导的人血管平滑肌细胞的 VEGF 基因表达有抑制作用<sup>[3]</sup>;在氧诱导的小鼠视网膜病的发生过程中,可抑制伴随血管增生而显著增加的 TNF- $\alpha$  的产生<sup>[9]</sup>。而 VEGF、bFGF 和 TNF- $\alpha$  都是与血管生成密切相关的因子,说明地塞米松可能通过抑制血管生成诱导因子的表达来抑制血管生成及抗肿瘤生长。本文中地塞米松对体外培养细胞 VEGFmRNA 表达的影响结果显示,地塞米松可以抑制 H<sub>22</sub> 细胞中的 VEGFmRNA 表达,且这种抑制作用有随地塞米松浓度升高而增强的趋势。体内实验的结果可见,给药组 VEGFmRNA 表达比对照组显著减少,结合给药组肿瘤组织微血管密度降低的结果,说明地塞米松可以通过抑制 H<sub>22</sub> 细胞表达 VEGF 来抑制体内 H<sub>22</sub> 肿瘤的生长及微血管生成。

综上所述,我们认为地塞米松具有抑制小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤生长和血管生成的作用。地塞米松对肿瘤细胞 VEGF 表达的抑制作用可能是其抗 H<sub>22</sub> 肿瘤及抗血管生成的一个重要原因。

### 参考文献:

- [1] WolffJE, Molenkam pG, HotfilderM, et al. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary-like structures in vitro and angiogenesis in vivo [J]. *Klin Padiatr*, 1997, 209 (4): 275 - 277.
- [2] WolffJE, GuerinC, LaterraJ, et al. Dexamethasone reduces vascular density and plasminogen activator activity in rat brain tumors [J]. *Brain Res*, 1993, 604 (1-2): 79 - 85.
- [3] NauckM, KarakiulakisG, PerruchoudAP, et al. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 341 (2-3): 309 - 315.
- [4] MacheinMR, KullmerJ, RonickeV, et al. Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic glioma cells [J]. *Neuro pathol Appl Neurobiol*, 1999, 25 (2): 104 - 112.
- [5] TjaimaW, VanMarckeE, WeylerJ, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer [J]. *BJ Cancer*, 1998, 78 (2): 170 - 174.
- [6] OehlerMK, BicknellR. The promise of anti-angiogenic cancer therapy [J]. *BJ Cancer*, 2000, 82 (4): 749 - 752.
- [7] ArisawaY, Sutanto-WardE, FortunatoL, et al. Hepatic artery dexamethasone infusion inhibits colorectal hepatic metastases: regional antiangiogenic therapy [J]. *Ann Surg Oncol*, 1995, 2 (2): 114 - 120.
- [8] 黄海东, 刘志红, 刘浩, 等. 霉酚酸及地塞米松对内皮细胞血管生成能力的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81 (13): 801 - 804.
- [9] YossuckP, YanY, TadesseM, et al. Dexamethasone alters TNF- $\alpha$  expression in retinal endothelial cells [J]. *Mol Genet Metab*, 2001, 72 (2): 164 - 167.

(贺文校对)