

血管生成抑制剂 YH-16 抑制结肠癌肝转移的研究

周志伟^{1,2}, 万德森^{1,2}, 王国强^{1,2}, 任镜清^{1,2}, 卢震海^{1,2}, 林素暇^{1,3},
唐绍贤^{1,2}, 叶燕丽^{1,4}, 陈功^{1,2}

Inhibitory Effect of Angiogenesis Inhibitor YH-16 on Liver Metastases from Colorectal Cancer

ZHOU Zhi-Wei^{1,2}, WAN De-Sen^{1,2}, WANG Guo-Qiang^{1,2}, REN Jing-Qing^{1,2}, LU Zhen-Hai^{1,2},
LIN Su-Xia^{1,3}, TANG Shao-Xian^{1,2}, YE Yan-Li^{1,4}, CHEN Gong^{1,2}

1. 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060
2. 中山大学肿瘤防治中心 腹科, 广东 广州 510060
3. 中山大学肿瘤防治中心 病理科, 广东 广州 510060
4. 中山大学动物实验中心, 广东 广州 510060

1. State Key Laboratory of Oncology in South China,

Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510060, P. R. China

2. Department of Abdominal Surgery, Cancer Center,

Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510060, P. R. China

3. Department of Pathology, Cancer Center,

Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510060, P. R. China

4. Animal Experimental Center, Sun Yat-sen University,

Guangzhou, Guangdong Province, 510060, P. R. China

通讯作者:周志伟

Correspondence to: ZHOU Zhi-Wei

Tel: 86-20-87343124

Fax: 86-20-85563613

E-mail: zhouzhiw@pub.guangzhou.gd.cn

基金项目:广州市科技攻关项目 (No. 2000-J-012-01)

Grant: Ministry of Major Science and Technology of Guangzhou (No. 2000-J-012-01)

收稿日期:2005-12-27

修回日期:2006-03-07

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** YH-16, a new recombinant angiogenesis inhibitor, has demonstrated synergetic effects with chemotherapy in non-small-cell lung cancer treatment in stage II clinical trial. This study was to investigate the effect of YH-16 on liver metastases from colon cancer. **METHODS:** Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) of YH-16 on vascular endothelial cells and colon cancer cell line CT26 was determined by MTT assay. Furthermore, the mouse mode of colon cancer liver metastases was established by inoculating CT26 cells into the subcapsule of spleen. 60 mice were randomly divided into four groups: control group (0 mg/kg), low-dose YH-16 group (0.40 mg/kg), medium-dose YH-16 group (0.75 mg/kg) and high-dose YH-16 group (1.5 mg/kg). The numbers of liver metastases were examined 2 weeks after drug injection. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by immunohistochemical method in liver metastases, and tumor microvessel density (MVD) was measured by immunostaining using factor VIII monoclonal antibody. **RESULTS:** Proliferation of CT26 and vascular endothelial cells was inhibited by YH-16, which the IC_{50} was $(2.16 \pm 0.28) \mu\text{g/ml}$ and $(0.64 \pm 0.10) \mu\text{g/ml}$, respectively. *In vivo*, the liver metastasis rates in control, low-dose, medium-dose and high-dose groups were 100%、92.3%、80% and 73.3%, respectively ($P < 0.05$). However, YH-16 did not inhibit the growth of spleen tumors of which median volumes were 1.180 cm^3 , 1.201 cm^3 , 0.887 cm^3 and 0.781 cm^3 , respectively ($P > 0.05$). There was no difference of VEGF expression in liver metastases among the four groups. Moreover, MVD was 65.00 ± 9.58 , 58.15 ± 8.81 , 51.60 ± 7.10 and 44.53 ± 11.47 in the four groups. MVD in medium-dose and high-dose YH-16 groups was lower than that in control group and MVD was lower in high-dose group than that in medium-dose and low-dose groups ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Angiogenesis inhibitor YH-16 can inhibit liver metastases from colorectal cancer.

KEYWORDS: Colorectal neoplasms; Liver metastasis; Angiogenesis inhibitor

【摘要】背景与目的:YH-16是新合成的重组人血管内皮抑制素,Ⅱ期临床试验已证实YH-16联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌具有协同作用。本文探讨血管生成抑制剂YH-16对结肠癌肝转移的抑制作用。方法:MTT法测定血管生成抑制剂YH-16对血管内皮细胞和结肠癌CT26细胞的 IC_{50} ;经小鼠脾脏下极包膜下注入CT26细胞建立结肠癌肝转移模型,60只小鼠随机分为对照组、低剂量YH-16组、中剂量YH-16组、高剂量YH-16组,YH-16剂量分别为0 mg/kg、0.40 mg/kg、0.75 mg/kg和1.50 mg/kg,术后2周观察各组小鼠肝转移情况,采用免疫组化方法检测肝转移瘤组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达和肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)。结果:(1)YH-16对结肠癌CT26细胞和血管内皮细胞的 IC_{50} 分别为 $(2.16 \pm 0.28) \mu\text{g/ml}$ 和 $(0.64 \pm$

0.10) $\mu\text{g/ml}$,前者是后者的 3.38 倍;(2)对照组,低、中、高剂量 YH-16 组肝转移率分别为 100.0%、92.3%、80.0%和 73.3%。高剂量 YH-16 组肝转移瘤数目明显低于对照组、低剂量 YH-16 组和中剂量 YH-16 组(P 值均 <0.05);(3)对照组,低、中、高剂量 YH-16 组脾脏肿瘤体积的中位数分别为 1.180 cm^3 、1.201 cm^3 、0.887 cm^3 和 0.781 cm^3 , 四组比较无显著性差异 ($P>0.05$);(4)YH-16 各剂量组肝转移瘤组织中 VEGF 的表达较对照组无明显降低, 四组肝转移瘤的 MVD 分别为 65.00 \pm 9.58、58.15 \pm 8.81、51.60 \pm 7.10 和 44.53 \pm 11.47,中、高剂量 YH-16 组的 MVD 计数较对照组明显降低, 高剂量 YH-16 组 MVD 计数较中剂量和低剂量 YH-16 组明显降低(P 值均 <0.05)。结论:血管生成抑制剂 YH-16 可以明显抑制结肠癌肝转移。

关键词:大肠肿瘤;肝肿瘤/继发性;血管生成抑制剂

中图分类号:R735.3 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2006)07-0818-05

大肠癌是消化系统常见肿瘤,临床上主要采取以手术为主、化疗和放疗为辅的综合治疗,但效果并不理想,近 40 年来患者术后 5 年生存率一直徘徊在 50%~60%。治疗失败的主要原因是肝转移,约 20%~40%的患者在临床确诊时已有肝转移,根治术后肝转移的发生率仍可高达 30%~50%,因大肠癌转移而死亡的患者 50%以上存在肝转移^[1],大肠癌的预后主要与有无远处转移尤其是肝转移密切相关,抑制肝转移将显著提高大肠癌的治疗效果。近年来,随着血管生成抑制剂研究的深入,抗血管生成治疗为肿瘤治疗开辟了一条新途径,其高效低毒的特性使之在肿瘤治疗方面具有广阔的前景,成为肿瘤生物治疗的一个重要补充。YH-16 是新合成的血管生成抑制剂,其对恶性肿瘤的治疗效果目前报道不多。本研究利用结肠癌肝转移动物模型,探讨 YH-16 对结肠癌肝转移的抑制作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周 BALB/c 雌性小鼠 60 只(由中山大学实验动物中心提供,动物合格证号:26~2004A009),体重约 20 克,实验小鼠无特殊病原菌,实验在本校 SPF 级动物实验室进行。

1.1.2 药物 YH-16 由烟台麦得津生物工程股份有限公司生产,羊抗鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)免疫组化试剂盒、羊抗鼠 VIII 因子抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.1.3 细胞株 小鼠结肠腺癌细胞株 CT26 由第二军医大学免疫教研室赠送,人肝静脉内皮细胞

ED25 由中山大学动物实验中心提供。两种细胞均使用 RPMI-1640 细胞培养液(含 10%小牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定 YH-16 对血管内皮细胞和结肠癌细胞的 IC_{50} 将处于指数生长期的 CT26、ED25 细胞配成 $0.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,YH-16 配制成等比的 8 个药物浓度:8 $\mu\text{g/ml}$ 、4 $\mu\text{g/ml}$ 、2 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$,对照组以生理盐水取代药物,各设 4 个复孔。将完成加样的 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和 90%湿度的孵箱中培养 72 h,加入 0.5%MTT 20 μl 继续孵育 5 h,然后除去培养液,加入 100 μl DMSO,黑暗中放置 3 h,使紫蓝色的沉淀还原产物 Formazan 溶解,用酶标读数仪在 570 nm 的波长处测量各孔的吸光度 A 值。根据以下公式计算各个药物浓度的细胞存活抑制率:抑制率=(1-加药细胞 A 值/对照细胞 A 值) $\times 100\%$ 。通过药物浓度和相应的抑制率计算 IC_{50} 。

1.2.2 YH-16 体内抑制结肠癌肝转移的动物实验

将处于指数生长期的细胞加适量生理盐水配成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液。4%水合氯醛(0.1 ml/10 g)腹腔注射麻醉小鼠后,打开腹腔,于脾脏下极的包膜下注入 CT26 细胞悬液 0.1 ml,1 号丝线间断缝合关腹。60 只小鼠随机分为 4 组,每组 15 只:对照组,低剂量 YH-16 组(0.40 mg/kg),中剂量 YH-16 组(0.75 mg/kg),高剂量 YH-16 组(1.50 mg/kg)。全部小鼠术后 2 天开始腹腔内注射药物,隔天一次,对照组以同等量生理盐水代替药物,实验期间小鼠自由进食。

病理观察:接种后 2 周处死小鼠,打开腹腔,观察脾脏有无癌灶,并记录大小、数目,肿瘤体积(V)= $ab^2/2$ (a :肿瘤最大径, b :肿瘤最小径),如有多个肿瘤则计算体积总和。仔细观察肝脏有无转移,并记录转移灶数量,所有转移瘤均经病理切片 HE 染色证实。根据肝转移灶数目分为四个等级,0 级:肝脏无转移病灶;I 级:1~5 个转移病灶;II 级:6~10 个转移病灶;III 级: >10 个转移病灶。

免疫组化方法:对肝转移瘤行 VEGF 和微血管密度(microvessel density, MVD)免疫组化染色(羊抗鼠 VIII 因子抗体染色),所有操作严格按照试剂盒说明进行。VEGF 表达强度参考 Toi 等^[2]的标准,分为阴性(-)、低度表达(+)、中等强度表达(++)和强

阳性表达(+++). MVD 计数参照 Weidner 等^[3]报道的方法,先在低倍镜下(40 倍)确定肿瘤内新生血管最密集区作为“热点”(hotspots)进行血管计数,然后在高倍镜下(200 倍)计数 5 个视野,将 5 个视野的血管平均数作为该切片的 MVD 值。

1.3 统计学处理

所得数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理,肝转移瘤数目、脾脏肿瘤的大小和 VEGF 表达比较采用非参数检验方法,肝转移瘤 MVD 计数的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 YH-16 对 ED25 细胞和 CT26 细胞的 IC₅₀

YH-16 对 CT26 细胞和 ED25 细胞的 IC₅₀ 分别为(2.16±0.28)μg/ml 和 (0.64±0.10)μg/ml,对 CT26 细胞的 IC₅₀ 是 ED25 细胞的 3.38 倍。

2.2 小鼠死亡情况

对照组 2 只小鼠术后 14 天内死于肿瘤,尸体解剖时见肝脏弥漫转移灶;低剂量组 2 只于术后第 1 天死亡,1 只死于肿瘤;中剂量 YH-16 组和高剂量 YH-16 组均未见死亡。

2.3 肝脏转移瘤数目

成功建立了结肠癌肝转移模型,对照组肝转移率达 100.0%,低、中、高剂量 YH-16 组肝转移率分别为 92.3%、80.0%及 73.3%。经检验,高剂量 YH-

16 组肝转移数目少于对照组、低剂量和中剂量 YH-16 组(*P* 值均<0.05),低剂量和中剂量 YH-16 组和对照组比较无显著性差异(*P* 值均>0.05)。各组肝脏转移瘤数目见表 1。

表 1 各组肝脏转移瘤数目

Table 1 The number of liver metastases

Group	Number of mice	Number of liver metastases			
		0	I	II	III
Control group	15	0	4	4	7
Low-dose YH-16 group	13	1	1	1	10
Middle-dose YH-16 group	15	3	2	2	8
High-dose YH-16 group	15	4	9	1	1

Note: In low-dose YH-16 group, 2 mice died from operation, so the numbers of mice were thirteen.

2.4 脾脏肿瘤体积

对照组,低、中、高剂量 YH-16 组脾脏肿瘤体积的中位数分别为 1.180 cm³、1.201 cm³、0.887 cm³ 和 0.781 cm³,四组比较无显著性差异(*P*>0.05)。

2.5 肝转移瘤组织中 VEGF 表达及 MVD 计数

显微镜下观察,肿瘤细胞胞浆内染成棕黄色颗粒认定为 VEGF 表达阳性细胞,经统计分析,对照组、低剂量、中剂量和高剂量 YH-16 组四组间 VEGF 表达无明显差异(*P*>0.05),见表 2 及图 1。在 200 倍光镜视野下计算被抗 VIII 因子抗体染成棕

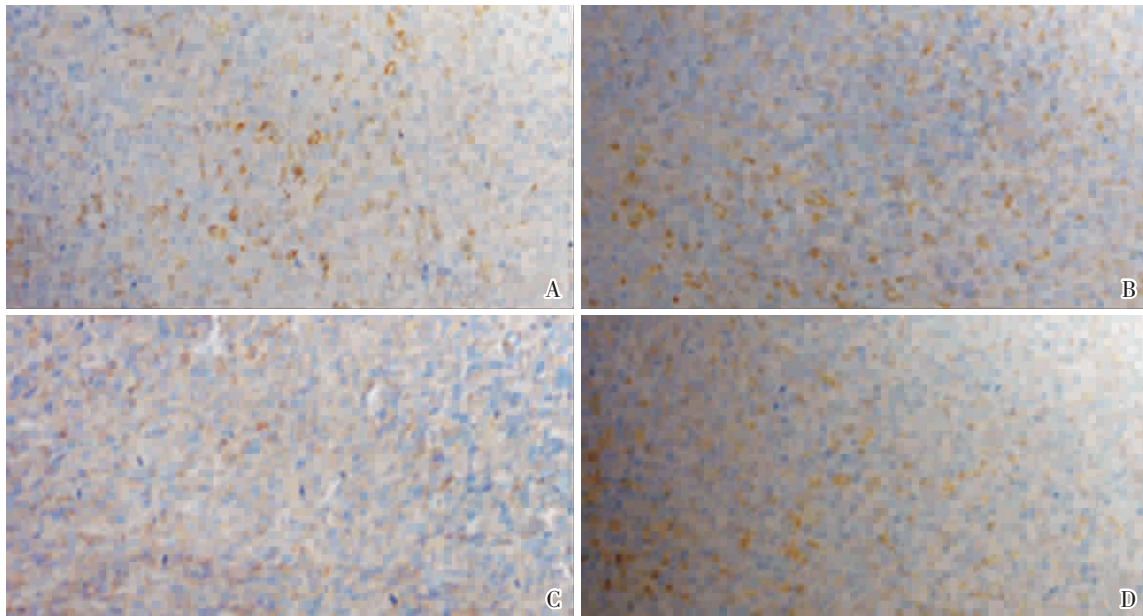


图 1 小鼠肝转移瘤组织中 VEGF 的表达(×200)

Figure 1 The expression of VEGF in liver metastases of mice(×200)

A: Control group; B: Low-dose YH-16 group; C: Middle-dose YH-16 group; D: High-dose YH-16 group
Positive expression of VEGF in cytoplasm of liver metastasis cells showed no difference among the four groups.

色的微血管数量,经统计分析,中剂量、高剂量 YH-16 组 MVD 计数均比对照组明显降低(P 值均 <0.05),高剂量 YH-16 组 MVD 计数较中剂量和低

剂量 YH-16 组明显降低(P 值均 <0.05),低剂量 YH-16 组与对照组、低剂量和中剂量 YH-16 组比较无显著性差异($P>0.05$),见表 2 及图 2。

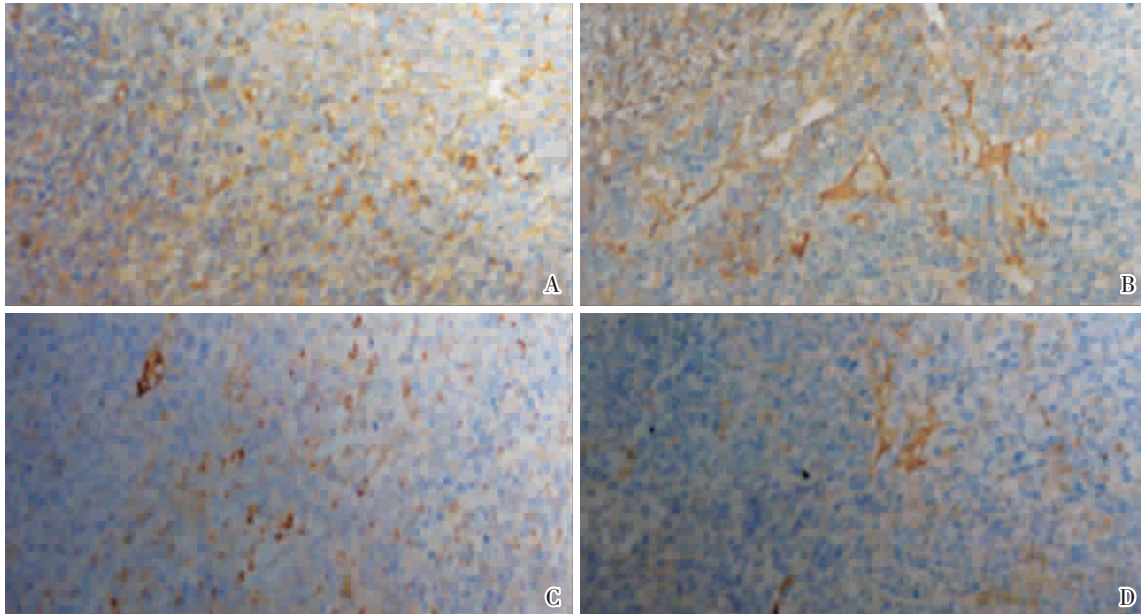


图 2 小鼠肝转移瘤组织中 MVD($\times 200$)

Figure 2 MVD in liver metastases of mice($\times 200$)

A:Control group B:Low-dose YH-16 group; C:Middle-dose YH-16 group; D:High-dose YH-16 group MVD in middle-dose and high-dose YH-16 groups were lower than that in control group, measured by immunostaining using factor VIII monoclonal antibody.

表 2 肝转移瘤组织中 VEGF 表达和 MVD 计数
Table 2 The expression of VEGF and MVD count in liver metastases

Group	Numbers of mice	Expression of VEGF				MVD count ($\bar{x}\pm s$)
		-	+	++	+++	
Control group	15	6	3	2	4	65.00 \pm 9.58
Low-dose YH-16 group	13	5	1	3	4	58.15 \pm 8.81
Middle-dose YH-16 group	15	7	1	3	4	51.60 \pm 7.10
High-dose YH-16 group	15	6	2	4	3	44.53 \pm 11.47

3 讨论

肿瘤生长经历两个阶段:血管前期和血管期,在肿瘤血管前期,肿瘤细胞主要依赖弥散作用获取营养,当肿瘤生长至 1~2 mm³、细胞数达到 10⁷ 左右时,其继续生长就必须由新生血管来提供足够的氧气及营养物质^[4]。肿瘤新生血管不但为肿瘤生长提供氧气和营养、带走代谢产物,而且还通过旁分泌作用分泌促肿瘤生长因子,从而促使肿瘤生长加快。肿瘤细胞分泌的 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,

bFGF)等促血管生长因子亦可促进肿瘤血管内皮细胞增殖。同时,肿瘤细胞还可通过新生血管向周围组织浸润和远处转移,在继发部位形成转移灶,而转移灶的继续生长和转移仍然需要新生血管^[5],且新生血管对转移灶的形成比原发灶更为重要^[6]。因此可通过干扰或阻断肿瘤新生血管形成而达到治疗和控制肿瘤的目的^[7]。

YH-16 是一种胶原 VIII(collagen VIII)C 端 20 ku 的连接蛋白,一种可在大肠杆菌体内高效表达的重组人血管内皮抑制素,主要靶点为血管内皮细胞。我们的研究结果显示,YH-16 对 CT26 细胞的 IC₅₀ 是 ED25 细胞的 3.38 倍,表明 YH-16 主要针对的是血管内皮细胞,而不是癌细胞,其对脾脏肿瘤抑制作用不强的原因可能也在于此。针对肿瘤血管内皮细胞的治疗具有广阔的前景,其优势为:内皮细胞属正常细胞,不象肿瘤细胞那样容易变异,所以不易耐药;所有肿瘤细胞的血管内皮细胞均相同或相似,抗血管治疗可针对所有实体瘤;血管内皮细胞暴露于血流中,药物易于达到靶细胞;选择性作用于血管内皮细胞,全身毒性小。I 期临床

试验^[8]结果表明, YH-16 注射液单次以及连续静脉滴注, 均没有产生明显的不良反应。但由于 YH-16 只能通过抑制肿瘤血管内皮细胞的增生而达到抑制肿瘤生长的目的, 而不能彻底消除肿瘤细胞, 停药后肿瘤继续生长, 故需长期给药, 这样我们就不得不面对如何大量制备和纯化活性蛋白、怎样降低成本、长期药物累积的不良反应以及远期疗效如何等诸多问题。如何克服这一局限性是将来的一个研究方向。

免疫组化结果显示, YH-16 并未降低肝转移瘤 VEGF 的表达, MVD 却明显降低。其作用机理可能是 YH-16 主要通过抑制血管内皮细胞来抑制肿瘤生长, 从而使 MVD 降低。有研究^[9,10]显示, 内皮抑素和血管内皮细胞结合后可促进血管内皮细胞的凋亡, 内皮抑素还可作为配体与粘附分子中的整合素家族成员相结合, 从而抑制整合素介导的血管内皮细胞迁移。但 YH-16 对癌细胞无明显杀伤作用, 并不影响癌细胞本身 VEGF 的自分泌, 相反新生血管生长被抑制后瘤体内相对缺氧加重, 有可能刺激肿瘤细胞分泌 VEGF^[11]。这与非选择性抗癌药物通过杀伤肿瘤细胞引起 VEGF 降低从而导致 MVD 降低的机制有所不同^[12]。本研究结果同时显示, 对照组、低剂量、中剂量和高剂量 YH-16 组的肝转移率为 100%、92.3%、80% 及 73.3%, 虽然低、中剂量 YH-16 组和对照组比较未能显示出统计学差异, 但随着 YH-16 剂量的增加, 肝转移率有逐渐降低的趋势, 同时 MVD 计数逐渐降低, 表明 YH-16 在一定的范围内抑制肝转移存在量效关系, 低、中剂量 YH-16 组肝转移率和对照组比较未能显示出统计学差异可能与样本量较少及非参数检验方法敏感性较低有关, 进一步证实尚需增加小鼠数量进行研究。

我们的研究结果表明, 一定剂量的 YH-16 能明显抑制结肠癌肝转移, 其作用可能是主要通过攻击血管内皮细胞来实现的。YH-16 作为一种高效低毒的药物, 可望为开展大肠癌多学科综合治疗开辟新的途径。但 YH-16 对肿瘤细胞没有直接

杀伤的作用, 对原位肿瘤抑制作用较差。YH-16 联合化疗药能否在不增加化疗不良反应的同时进一步增强化疗对肝转移的抑制作用, 需要进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Kindler H L, Shulman K L. Metastatic colorectal cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2001, 2(6):459-471.
- [2] Toi M, Hloshina S, Takayanagi T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85(10):1045-1049.
- [3] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J pathol*, 1995, 147(1):9-15.
- [4] Mahadevan V, Hart I R. Metastasis and angiogenesis [J]. *Acta Oncol*, 1990, 29(1):97-103.
- [5] Fidler I J, Ellis L M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 185-188.
- [6] Tanaka T, Konno H, Baba S, et al. Prevention of hepatic and peritoneal metastases by the angiogenesis inhibitor FR-118487 after removal of growing tumor in mice [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(1):88-94.
- [7] Kruger E A, Duray P H, Tsokos M G, et al. Endostatin inhibits microvessel formation in the ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(12):183-191.
- [8] 杨林, 王金万, 汤仲明, 等. 重组人血管内皮抑制素 I 期临床研究 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(6):548-553.
- [9] Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22404-22411.
- [10] Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3):1024-1029.
- [11] Velde E A, Vogten J M, Gebbink M F G B, et al. Enhanced antitumour efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model [J]. *Br J Surg*, 2002, 89(10):1302-1309.
- [12] 宋震亚, 彭佳萍, 朱永良, 等. O-(氯乙酰-氨甲酰基) 烟曲霉醇联合 5-氟尿嘧啶对胃癌生长的抑制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2003, 17(1):24-28.

[编辑:杨允贵;校对:庄爱华]