

内皮抑素对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)及体外微血管模型的作用及其可能的机制^{*}

肖 辉 阙 轩 金德均 王 超 刘兴汉

(哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻喉科 黑龙江 哈尔滨 150086 哈尔滨医科大学生化教研室 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:探讨内皮抑素对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)及体外微血管模型的作用及其可能的机制。方法:1. MTT法检测不同浓度(10~ 50 μ g/ml)内皮抑素作用72h和30 μ g/ml内皮抑素作用不同时间(24~ 72h)对HUVEC细胞的影响;2. 电镜观察HUVEC细胞超微结构的变化;3. 光镜下观察内皮抑素(30 μ g/ml)对体外人造血管模型的影响。结果:1. MTT检测显示,内皮抑素(20~ 50 μ g/ml)能抑制HUVEC细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$),具有剂量-时间依赖性。2. 电镜观察, HUVEC细胞内皮抑素作用组均出现凋亡改变。3. 光镜观察,内皮抑素能抑制新生血管的形成,并能破坏新生的血管网。结论:内皮抑素能抑制人脐静脉血管内皮细胞HUVEC的增殖,并具有时间-剂量依赖性,机制可能为诱导细胞凋亡。提示,内皮抑素可能通过诱导HUVEC的凋亡抑制其增殖,并能破坏新生的血管。内皮抑素可能以此抑制机体肿瘤的生长与转移。

关键词: 内皮抑素; 脐静脉内皮细胞; 凋亡

中图分类号: R73- 3 **文献标识码:** A

The inhibitory mechanism of endostatin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

XIAO Hui, KAN Xuan, JIN De-jun

(Department of otorhinolaryngology, the second hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the inhibitory effect and the possible mechanism of endostatin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods:** By means of MTT assay, the influences of endostatin with different concentrations (10~ 50 μ g/ml) and endostatin (30 μ g/ml) with different time (24~ 72h) on the HUVEC cells were studied. The changes of HUVEC cells' ultrastructures were examined by electron microscope. The influences of endostatin (30 μ g/ml) on the ectogenetic artificial blood vessel models were observed by photic microscope.

Result: The growth of HUVEC cells was significantly inhibited by endostatin (20~ 50 μ g/ml) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with dose- time- dependence. Apoptosis was observed in the groups of HUVEC cells with endostatin by electron microscope. Endostatin could not only inhibit the formation of neonatal blood vessels but also destroy the formation of neonatal blood vessel nets. **Conclusion:** Endostatin can inhibit the proliferation of HUVEC cells with time- dose- dependence and it's mechanism maybe induces the apoptosis. It is pointed out that Endostatin can inhibit the proliferation of HUVEC cells, probably inducing the apoptosis, which can destroy the neonatal blood vessels. Endostatin perhaps inhibits the growth and the transformation of human carcinoma according to this mechanism.

Key words: Endostatin; HUVEC; Apoptosis

肿瘤生长和转移离不开新生血管。实体瘤在未有新生血管生长时,其大小不会超过数个mm³,此时称血管前期;而一旦肿瘤内血管生成,则体积可呈指数增长,并使其获得转移能力,称血管期。血管新生对肿瘤的发生、发展和转移密切相关,因此研究开发针对肿瘤血管生成的抗肿瘤药物是限制肿瘤生长和防止其转移的有效策略。在目前发现的众多抗血管生成的活性物质当中,内皮抑素是迄今发现作用最强、实验效果最好的血管生成抑制剂,本实验通过研究内皮抑素对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)及体外微血管模型的作用,探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 内皮抑素 HUVEC 细胞生长的影响

1.1.1 细胞培养: 将人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 分别培养

于含 10% 小牛血清的 RPMI- 1640 培养液中,另加青、链霉素各 100 μ g/ml,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。待细胞达到培养瓶底面(进入对数生长期),用 0.25% 的胰蛋白酶消化并吹打成单个核细胞,离心分散悬浮于 PBS 中记数,并分别制成 1×10^5 /ml 的细胞悬液待用。

1.1.2 MTT 比色法检测内皮抑素对 HUVEC 细胞增殖的影响: 调整 HUVEC 细胞浓度为 1×10^5 /ml 分别接种于 96 孔培养板中,100 μ l/孔,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养 48h,细胞形成单层细胞后其上清后加入浓度分别为 10 20 30 40 50 μ g/ml 的内皮抑素,每个药物浓度设 3 个复孔,同时设空白对照组和细胞对照组,作用 72h 后酶标仪 492nm 读取吸光度(A)。另取一块 96 孔板,加入 HUVEC 细胞后,加入 30 μ g/ml 的内皮抑素,分别作用 24h 48h 72h 后同一酶标仪下读取吸光度(A)。

1.1.3 透射电镜观察细胞超微结构的影响: 调整 HUVEC 细胞

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助(D0340)

作者简介: 肖辉,男,(1972-),硕士研究生,主治医师

E-mail: ybhz@163.com; 电话: 13009853631

(收稿日期: 2006- 04- 16 接受日期: 2006- 05- 20)

浓度为 2×10^5 /ml, 分别接种培养瓶中, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 及饱和湿度培养箱中培养, 待细胞成层后, 加入 $30 \mu\text{g/ml}$ 的内皮抑素, 设细胞对照组, 待细胞出现 $50\% - 75\%$ 病变时, 用胰酶消化, PBS 冲洗, 4% 戊二醛固定, 送电镜室待检。

1.2 内皮抑素对体外人造血管模型的影响

1.2.1 体外人造血管模型建立: 取人工基底膜 (Matrigel) 放置 4°C 冰浴中, 将使用的 24 孔培养板、加样枪头等使用用品保持在 0°C 。将混匀后的 Matrigel 加入到 24 孔培养板中, 每个孔加 $127 \mu\text{L}$, 摊平, 放置 37°C 30 分钟。用胰酶-EDTA 消化 HUVEC 细胞, 每孔放置 5×10^4 个细胞, 同时加入 $\text{bFGF} 5 \text{ ng/ml}$, 置 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养, 不同时间观察血管网形成个数。不同时间于倒置相差显微镜观察并拍摄。

1.2.2 内皮抑素对血管形成的影响: 按照上述培养血管模型法, HUVEC 细胞放入 Matrigel 中 3 小时后 (血管网未形成之前), 将内皮抑素 ($30 \mu\text{g/ml}$) 放入 24 孔板中, 同时设细胞对照

组, 培养观察。
1.2.3 内皮抑素对新生血管网的影响: 在 24 孔培养板建立体外血管模型, 经 24 小时形成血管网后加入内皮抑素 ($30 \mu\text{g/ml}$), 设细胞对照组, 培养观察。
1.3 数据处理和统计学检验
数据分析应用 SPSS 12.0 软件处理。数据均以表示, 两组之间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示实验组与对照组差异的显著性。

2 结果

2.1 内皮抑素对 HUVEC 细胞活力的影响
2.1.1 对 HUVEC 细胞增殖的影响: $20 - 50 \mu\text{g/ml}$ 的内皮抑素作用组明显抑制 HUVEC 细胞生长 (表 1), $24 - 72 \text{ h}$ 的内皮抑素作用组细胞亦显著受到抑制 (表 2), 总体表现为剂量-时间依赖性。

表 1 内皮抑素(不同浓度)对 HUVEC 细胞的增殖抑制作用(A 值)

Tablve 1 The effects of endostatin(different concentrations) on HUVEC cells(A value)

组别	对照组	实验组				
		(内皮抑素浓度 $\mu\text{g/ml}$)				
		10	20	30	40	50
HUVEC	0.546±0.075	0.512±0.079	0.386±0.062 [*]	0.269±0.067 ^{* *}	0.256±0.082 ^{* *}	0.230±0.065 ^{* *}

注: 与对照组比较* $P < 0.05$ P ≥ 0.01

表 2 $30 \mu\text{g/ml}$ 内皮抑素(不同作用时间) HUVEC 细胞的增殖抑制作用

Table 2 The effects of proliferation and inhibition of endostatin($30 \mu\text{g/ml}$, at different time) on HUVEC cells

组别	对照组	实验组(作用时间, h)		
		24	48	72
HUVEC	0.575 ± 0.051	0.441 ± 0.065	0.354 ± 0.071	0.281 ± 0.056

注: 与对照组比较 P 均 < 0.05

2.1.2 对 HUVEC 细胞超微结构的影响: 正常对照组, 细胞质膜的表面有非常丰富的微绒毛结构, 细胞核椭圆形偏于细胞的一端, 核内染色质稀松散在, 无核区胞质内线粒体小而圆, 基质的密度较大。内皮抑素组, 可见到凋亡早期和晚期的细胞, 凋亡细胞体积明显变小, 核膜结构完好, 细胞内膜有轻微的变性。

2.2 内皮抑素对体外人造血管模型的影响

2.2.1 体外人造血管模型的建立: 在有 $\text{bFGF} 5 \text{ ng/ml}$ HUVEC 培养过程中, 细胞从散在分布逐渐聚集, 形成条索状, 最后形成网状结构。1 小时 HUVEC 细胞聚集成条索状 (图 1), 5 小时形成树枝状, 10 小时形成网状结构 (图 2)。

2.2.2 对血管形成的抑制作用: 加入内皮抑素后, 5h, 10h, 20h 观察, HUVEC 细胞没有形成网状血管结构, 以原有散在的细胞形态存在于培养板中 (图 3)。

2.2.3 对新生血管网的损伤作用: 在 24 小时建立 HUVEC 血管网后, 加入内皮抑素 ($30 \mu\text{g/ml}$)。6 小时可以看到血管网断裂, 12 小时可以看到断裂后的细胞聚集团块 (图 4)

3 讨论

抗血管生成治疗是近年来新兴的肿瘤治疗方法, 它通过抑制血管的新生而阻断肿瘤细胞获得营养, 能够有效的抑制肿瘤的生长和转移。与传统的治疗方法相比较, 抗血管生成治疗有如下优点: ①只对活化状态血管产生抑制作用, 对正常

静止的血管组织没有影响。②长期反复应用不易产生耐药性, 无不良反应。③系统用药很容易接触到血管内皮细胞而起作用^[4]。内皮抑素是最新发现的一种血管抑制剂, O' Reilly 研究表明, 内皮抑素对多种肿瘤, 如 Lewis 肺癌, T241 纤维肉瘤, BOMA 血管内皮瘤, B16F10 黑色素瘤的生长均有抑制作用。

3.1 内皮抑素对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的影响

我们通过 MTT 实验检测不同药物浓度 HUVEC 增殖的影响。结果显示内皮抑素能显著性抑制 HUVEC 细胞的生长, 各时间点的 P 值均 < 0.05 , 且呈剂量-时间依赖性。然后, 进行透射电镜观察。结果显示, HUVEC 内皮抑素作用组, 可见到凋亡早期和晚期的细胞, 凋亡细胞体积明显变小, 核膜结构完好, 细胞内膜有轻微的变性, 与文献报道一致。推测其作用机制以促进凋亡为主。

3.2 内皮抑素对肿瘤生长的可能作用机制

细胞有增殖、分化和凋亡三方面的特征。在维持正常组织的生长平衡过程中, 三者相互协调, 共同调解。其中细胞凋亡在细胞衰老与更新、保持细胞数目的相对恒定方面起着重要作用。在有机体内, 细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡是维持机体稳态的重要方式, 两者的失衡将导致基因变异的积累, 细胞生长周期的延长, 最终导致癌症的发生。治疗喉癌就是杀伤和清除喉癌细胞, 诱导癌细胞凋亡是治疗癌症的一条有效途径。

3.3 内皮抑素血管生成作用的影响

在以往治疗肿瘤的基础研究与临床研究中,学者们把目光投入到药物对肿瘤细胞的直接作用上,而对间接抑制肿瘤作用研究甚少。1991年 Folkman 首次提出了“肿瘤生长依赖于血管生成”的观点,人们对抗肿瘤的概念有了进一步的认识:抗肿瘤一是直接针对肿瘤细胞,二是抑制供应肿瘤组织血管的生成。当肿瘤组织大于1-2mm³时,需要新生血管为其继续增殖提供足够的氧气和营养物质。因此抑制肿瘤细胞生长,同时抑制肿瘤内的血管生成受到广泛关注。

本实验成功建立了体外人造血管模型,在图6中我们看到体外培养12h-24h后散在的HUVEC细胞形成了网状结构,与Roberto F报道一致。这对抗血管生成药物的筛选具有非常重要的意义,并为研究血管抑制剂的作用及作用机制提供了理想的实验模型。实验结果显示,内皮抑素不但对新生的血管有抑制作用,对新生的血管网亦具有同样的破坏作用。但在临床实践中,发现的多为存在较长时间,血管已经成熟的肿瘤,对此内皮抑素的抑制作用究竟能发挥到何等地步尚待研究。

总之,本实验通过对内皮抑素作用于HUVEC细胞的一系列实验指标的观察,得到如下结论。内皮抑素可能通过诱导HUVEC的凋亡抑制其增殖,并能破坏新生的血管。内皮抑素

可能以此抑制癌症的生长与转移。我们的实验证实了最初的设想,但其具体作用机制尚有待进一步研究。但这些结果显示,利用血管生成因子抑制剂进行的抗血管生成疗效在不久的将来可能成为一种治疗癌症的新策略。希望以此能为癌症的临床治疗提供更坚实的理论基础与更广泛的临床思路。此外,关于肿瘤的治疗,主张肿瘤的综合治疗,就药物治疗方面而言,具体有关内皮抑素与其它抗血管生成抑制剂及传统的化疗药物的比较或联合应用抑制癌症的情况,亦未有人进一步探讨,我们将在今后的实验中做更进一步的努力。

参考文献

[1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285

[2] Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin[J]. FASEB-J, 2001, 15(6): 1004-1053

[3] Huang X, Wong MK, Zhao Q, et al. Soluble recombinant endostatin purified from Escherichia coli: antiangiogenic activity and antitumor effect[J]. Cancer Res, 2001, 61(2): 478-481

[4] Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia[J]. Drugs, 1999, 58(1): 17

(图1-图4请见封3)

(上接第28页)

2.3 药动学参数计算

用3P97药物动力学程序处理自微乳化胶囊和市售片的平均血药浓度数据^[4]。根据AIC值最小法判断SV自微乳化胶囊和市售片的隔室模型,结果表明SVA在犬体内均符合单室一级吸收模型,权重系数为1/C₂。各参数均由3P97计算可得,结果见表1。

表1 犬口服自微乳化胶囊与市售片后的SVA的药代动力学数据(n=10)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of SVA from SV SMEDDS (n=10)

Parameters	Average±SD (T)	Average±SD (R)
A/ng·mL ⁻¹	169.07±37.48	95.04±53.13
K _a /h ⁻¹	0.52±0.07	0.37±0.08
K _e /h ⁻¹	1.18±0.24	0.57±0.09
T _{1/2} (K _a)/h	0.61±0.12	1.25±0.20
T _{1/2} (K _e)/h	1.35±0.17	1.98±0.50
T _{max} /h	1.41±0.20	2.65±0.42
C _{max} /ng·mL ⁻¹	46.22±7.17	12.43±2.51
AUC _{0-∞} /ng·mL ⁻¹ ·h	174.03±38.87	76.17±10.86
Fr/%	227.5	

3 讨论

SMEDDS通常被设计为单剂量的胶囊剂。其内容物有液体和固体两种,现在比较多的是液体的内容物制备成软胶囊的形式。但其含有大量的表面活性剂和助表面活性剂,对明胶软胶囊囊壳的要求较高,影响软胶囊的稳定性。一般而言,

固体形式的SMEDDS可以有更大的含药量^[5],固体内容物对囊壳的影响较小,相比较更为稳定,并且由于生产技术与普通胶囊一致,节约生产成本,有利于SMEDDS系统的工业化生产。

由于SV为前体药物,SVA是其在体内最主要的活性代谢物,所以考察SVA的体内数据具有实际意义及临床价值。以SVA的AUC计算自乳化胶囊对市售片的相对生物利用度Fr,得出Fr(SVA)为227.5%,并对SVA的AUC进行方差分析^[6],SVA的AUC周期间无显著性差异(P>0.05),而制剂间、个体间有显著性差异(P<0.05)。进一步采用双单侧检验可知,结果显示自乳化胶囊与市售片之间显著性差异。由此可见,SV自乳化胶囊可快速有效地促进体内辛伐他汀的吸收,显著提高其生物利用度。

参考文献

[1] 梁毅. 2002年~2004年调血脂药物应用分析[J]. 海峡药学, 2005, 17(2): 142-143

[2] Shah N.H, Carvajal MT, Malick AW, et al. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs[J]. Int J Pharm, 1994, 106(1): 15-23

[3] Hill RM. A quantified analysis of the dielectric dispersion in a simple emulsion system[J]. Int J Pharm, 2001, 227(1-2): 139-148

[4] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 241

[5] Pouton C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery system[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 25(4): 47-58

[6] 陈家鼎, 刘婉如, 汪仁官编. 概率统计讲义[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 348

(正文请见第 24 页)

内皮抑素对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 及体外微血管模型的作用及其可能的机制

肖辉 阚轩 金德均 王超 刘兴汉

(哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻喉科, 黑龙江, 哈尔滨 150086 哈尔滨医科大学生化教研室, 黑龙江, 哈尔滨 150086)

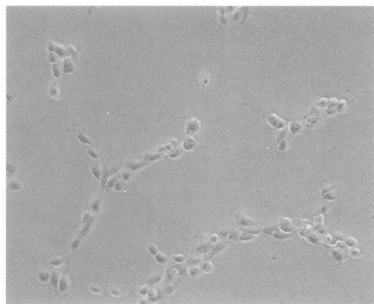


图1 成索的 HUVEC 1×200
1 小时 HUVEC 细胞聚集成条索状
Figure 1.Chain HUVEC 1×200
HUVEC cells gathered into chains at 1 hour.

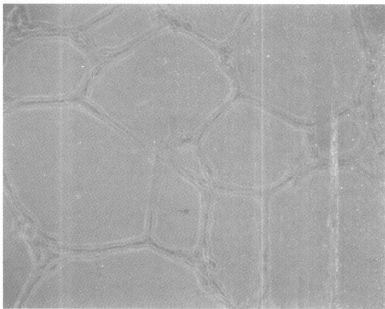


图2 成网的 HUVEC 1×200
5 小时形成树枝状, 10 小时形成网状结构
Figure 2. Netted HUVEC 1×200
Formed into the branch-like at 5 hours,netted,at 10 hours.

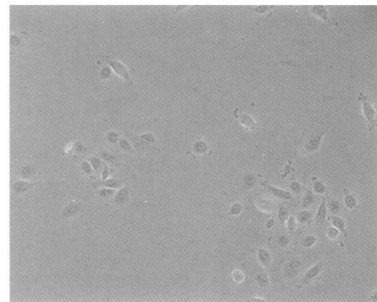


图3 用药后 6 小时的 HUVEC 1×200
Figure 3.Six hours of HUVEC after medication 1×200

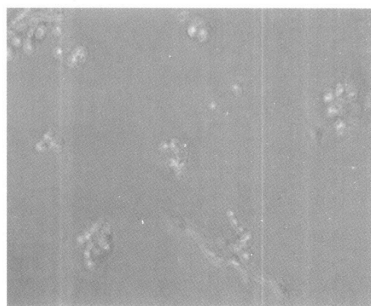


图4 用药后 12 小时的 HUVEC 1×200
12 小时可以看到断裂后的细胞聚集团块
Figure 4. Twelve hours of HUVEC after medication 1×200
At 12 hours,split cell gathered pieces can be seen.

(正文请见第 36 页)

局限性前列腺癌病理分期比较的临床研究进展

董青川 王禾 任静² 宦怡² 李欣¹

(1 第四军医大学西京医院泌尿外科 西安 710032 2 第四军医大学西京医院放射科)

图1 轴位常规 MRI T2 加权像示前列腺肿瘤与包膜边界清楚, 未见突破
Figure 1: no breakthrough of prostate cancer in T₂ weight MRI (axial view)



图2 轴位 DCE-MRI (箭头处) 可见前列腺肿瘤突破右半包膜
Figure2: prostate cancer breakthrough the right partial veil (arrowhead) in DCE-MRI (axial view)



图3 轴位常规 MRI T₂ 加权像示前列腺肿瘤与精囊腺分界清楚
Figure 3: no seminal vesicle infiltration of prostate cancer in T₂ weight MRI (axial view)

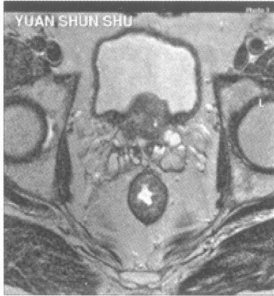


图4 轴位 DCE-MRI (箭头处) 可见前列腺肿瘤侵入精囊
Figure4: prostate cancer infiltrate seminal vesicle (arrowhead) in DCE-MRI (axial view)

