

¹²⁵I-UdR 提高内皮抑素基因的抑瘤作用

谢耀萍 杨志杰 李 勇[△] 侯丽丽 李 丽

(哈尔滨医科大学第一临床医学院核医学科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨 ¹²⁵I-UdR 提高内皮抑素基因对大鼠种植瘤模型的抑制效应。**方法:**制作肿瘤株 Walker-256 细胞大鼠皮下种植瘤的动物模型并分为 1-4 组(对照组、¹²⁵I-UdR 组、Endostatin 组和 Endostatin+¹²⁵I-UdR 组),每组 20 只,通过实体瘤内注射,分别给与相同体积生理盐水 ¹²⁵I-UdR、内皮抑素基因及 ¹²⁵I-UdR 和内皮抑素基因混合物,测量肿瘤治疗前体积(V0)和治疗后不同时间体积(Vt),计算 10d、20d 的肿瘤生长率($f=Vt/V0$),观察各组肿瘤在光镜下的变化。**结果:**各组大鼠 10d、20d 肿瘤生长率为:(11.03±1.08、27.35±1.08),(4.02±0.79、7.58±2.98),(3.88±0.26、7.02±2.75),(2.72±1.01、2.94±1.26),2、3、4 组的肿瘤生长率明显小于 1 组(P<0.001);2、3 组之间肿瘤生长率差别不明显(P>0.05),4 组肿瘤生长率小于 2、3 组(P<0.01)。**结论:**通过实体瘤内注射的方法给与 ¹²⁵I-UdR、内皮抑素基因及两者混合物后,能够明显抑制肿瘤的生长,内皮抑素基因和 ¹²⁵I-UdR 联合治疗在抑制肿瘤生长方面作用更加显著。

关键词:基因;治疗;脱氧尿嘧啶核苷;内皮抑素

中图分类号:Q95-3,R730.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)21-4050-04

The Anti-tumor Effect of Combining Endostatin Gene Therapy with ¹²⁵I-UdR on Rats with Implanted Tumor

XIE Yao-ping, YANG Zhi-jie, LI Yong[△], HOU Li-li, LI Li

(First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Department of Nuclear Medicine, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the anti-tumor effect of combining of endostatin gene therapy with ¹²⁵I-UdR on rats with implanted tumor. **Methods:** Immediate Walker-256 cancerous ascetic injection method was used to build up a rat tumor-bearing model, then the rats were randomly divided into groups of 1-4, in which the tumor was treated with saline, ¹²⁵I-UdR, endostatin gene, endostatin gene plus ¹²⁵I-UdR, respectively. The morphological changes and tumor growth rate were detected. **Results:** The tumor growth rate of 10d and 20d in each group was (11.03±1.08, 27.35±1.08), (4.02±0.79, 7.58±2.98), (3.88±0.26, 7.02±2.75), (2.72±1.01, 2.94±1.26), the rates of group 2-4 were less than that of group 1 (P<0.001). There was no distinguished different between the rates of group 2 and 3 (P>0.05). The rate of group 4 was less than those of group 2 and 3 (P<0.01). **Conclusions:** The tumor growth was inhibited significantly after the injaction of ¹²⁵I-UdR, endostatin gene and the composition of ¹²⁵I-UdR and endostatin gene. However, the effect of the endostatin gene plus ¹²⁵I-UdR was obviously better than that of the endostatin gene therapy group or the ¹²⁵I-UdR group for inhibiting tumor growth.

Key words: Gene; Therapy; Deoxyuridine; Endostatin

Chinese Library Classification: Q95-3, R730.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)21-4050-04

前言

在血管抑制基因治疗肿瘤的研究中发现内皮抑素(Endostatin)抑瘤的效果更明显^[1]。肿瘤基因治疗是将目的基因导入靶细胞,使其获得特定的功能,继而执行或介导对肿瘤细胞的杀伤和抑制作用。放射治疗是应用高剂量的电离辐射,作用于肿瘤细胞,导致肿瘤细胞坏死,起到对肿瘤的治疗作用。肿瘤基因-放射治疗是将同时具有电离辐射诱导特性和抗肿瘤作用基因

转入肿瘤细胞,在对肿瘤实施局部放疗的同时,诱导抗肿瘤基因表达^[2],提高肿瘤细胞辐射敏感性,降低肿瘤临近部位正常组织的放射损伤,导致电离辐射和基因治疗对肿瘤细胞的双重杀伤效应。如何将肿瘤基因治疗和放射治疗有机结合成为该领域新的研究课题。本研究观察了 ¹²⁵I-UdR 提高内皮抑素基因在抑制肿瘤方面的作用,以探讨两者在肿瘤治疗中的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠 80 只,由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物实验中心提供,体重为 140~150g。许可证号:SCXK(黑)2005-0002。

1.2 试剂

内皮抑素基因质粒由吉林大学公共卫生学院卫生部放射

作者简介:谢耀萍(1980-),女,硕士,住院医师,研究方向:基因联合放射性药物治疗肿瘤的研究。电话:13654509349,
E-mail:xiyaoping1234@126.com
[△]通讯作者:李勇,男,博士,硕士生导师,副教授,主要从事肿瘤的综合诊断和核素治疗的研究。E-mail:xiyaoping1234@126.com
(收稿日期:2011-05-06 接受日期:2011-05-30)

生物重点实验室惠赠。脂质体 2000 购自美国 Invotrogen 公司。放射性 Na125I 购自成都中核高通同位素股份有限公司,UdR 购自新乡拓新生化科技有限公司。

1.3 实验分组和干预

接种 7d 后,以卡尺测量肿瘤最长径(L)和垂直方向的最大横径(W),计算肿瘤体积(V,mm³)=L× W²/2,将大鼠随机分为肿瘤体积相近的对照组、¹²⁵I-UdR 组、Endostatin 组、¹²⁵I-UdR 联合 Endostatin 组,每组各 20 只。各处理组于肿瘤表面分 3 位点向瘤内注射共 0.2ml 药液:生理盐水、¹²⁵I-UdR (370kBq)、内皮抑素基因质粒 (20μg) 及 ¹²⁵I-UdR 和内皮抑素基因质粒混合物。注射时,注射器进入瘤体内边缓慢退针边推注药液,待瘤体内压力降低后,针尖在瘤内停留 1min 后退出针头,以免压力过高导致瘤体损伤或药液从注射点溢出。试验当日至试验后 2d,所有大鼠均肌肉注射 0.2ml 抗菌素,防止感染。

1.4 模型制备

无菌条件下,取传代大鼠癌性腹水 0.3~0.5ml (细胞数约为 10⁵~10⁶),注射入待接种大鼠右后肢外侧根部皮下。

1.5 肿瘤体积生长率观察

用游标卡尺测量大鼠皮下肿瘤,根据肿瘤最长径(L)和垂直方向的最大横径(W)计算肿瘤体积 V(mm³)=L× W²/2,每 3d 测量一次,大鼠肿瘤生长情况用肿瘤生长率 f 表示,即治疗后不同时间测得肿瘤体积(Vt)与照射前肿瘤体积(V0)之比。比较第 10d、20d 各组间肿瘤生长率(f=Vt/ V0)。

1.6 光镜检查

治疗 20d 后,处死各组大鼠,取肿瘤部位组织,用 10%福尔马林溶液固定,系列脱水后石蜡包埋,切片厚度 4μm,常规 HE 染色,显微镜下观察。

1.7 统计学分析

计量资料以(̄X± S,即均数± 标准差)表示,采用 SPSS13.0 统计软件对各组肿瘤体积生长率变化采用方差分析,组间比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肿瘤生长率(f)的变化

各治疗组的不同时间肿瘤生长率均小于对照组 (P<0.

表 1 不同时间肿瘤生长率的变化 (f=Vt/V0, ̄X± S)
Table 1 Tumor growth rate at different time (f=Vt/V0, ̄X± S)

Group	Tumor growth rate (f)	
	10d	20d
Control group	11.03± 1.08	27.35± 1.08
¹²⁵ I-UdR group	4.02± 0.79*	7.58± 2.98*
Genome	3.88± 0.26*#	7.02± 2.75*#
¹²⁵ I-UdR + Genome	2.72± 1.01*^	2.94± 1.26*^

注:各治疗组与对照组比较, * P<0.001;基因组与 ¹²⁵I-UdR 组比较,#P>0.05; ¹²⁵I-UdR 联合基因组与 ¹²⁵I-UdR 组和基因组比较,^ P < 0.01
Note: The treatment group and control group, * P <0.001; genome with ¹²⁵I-UdR group, # P> 0.05; ¹²⁵I-UdR combined with ¹²⁵I-UdR genomic and genomic comparison group, ^ P <0.01

001)。各治疗组之间,¹²⁵I-UdR 组与基因组之间肿瘤生长率差别不明显 (P>0.05),¹²⁵I-UdR 联合基因组肿瘤生长率小于 ¹²⁵I-U-

dR 组与基因组 (P<0.01),见表 1。

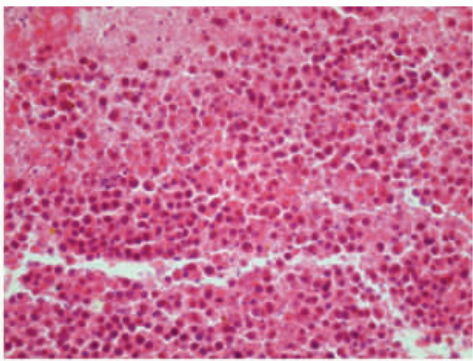


图 1 对照组 HE 染色,肿瘤细胞增生明显伴少量坏死(100×)
Fig.1 Control group, HE staining, tumor cell proliferation Significantly associated with a small amount of necrosis (100×)

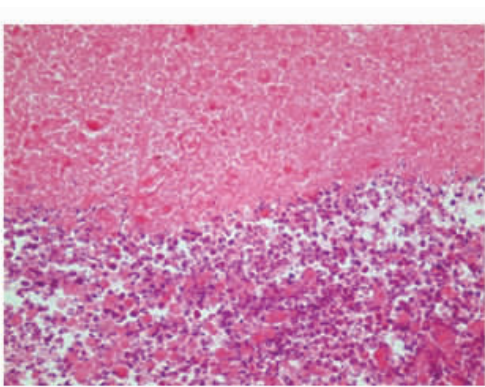


图 2 ¹²⁵I-UdR 组 HE 染色,肿瘤细胞大量坏死(100×)
Fig.2 ¹²⁵I-UdR group HE staining, tumor cell necrosis (100×)

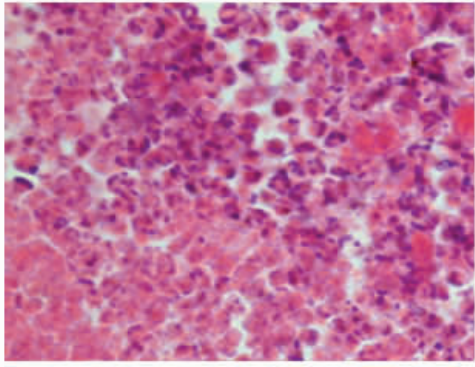


图3 基因组 HE 染色,肿瘤细胞坏死明显(100×)

Fig.3 Genome HE staining, tumor cell necrosis was significantly (100×)

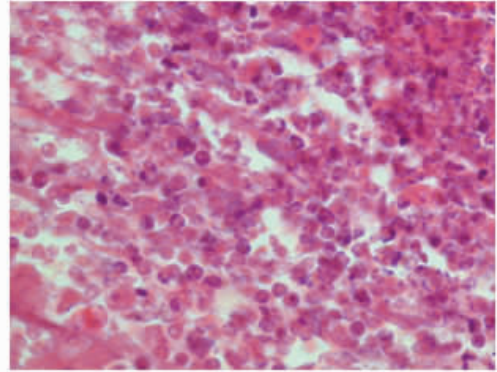


图4 ^{125}I -UdR+ 基因组 HE 染色,肿瘤细胞坏死明显,残存癌细胞稀疏(100×)

Fig.4 ^{125}I -UdR + genome HE staining, tumor necrosis apparent residual cancer cells sparse (100×)

2.2 光镜观察

对照组肿瘤细胞排列紧密,可见少量坏死,新生瘤细胞较多血管丰富,广泛出血(见图1); ^{125}I -UdR 组和基因组细胞坏死明显伴少量新生瘤细胞(见图2和图3); ^{125}I -UdR 联合基因组见瘤细胞广泛坏死,残存的癌细胞排列松散(见图4)。

3 讨论

基因治疗作为治疗疾病的一种新手段,正愈来愈受到人们的重视和关注,尤其是实体瘤的治疗,一直是医学研究的热点^[3-4]。在多种血管生成抑制剂当中,内皮抑素是目前作用最强、实验效果最好的肿瘤血管生成抑制剂,内皮抑素特异性抑制血管内皮细胞的生成,对多种依赖血管生成的实体瘤都有抑制作用,且无耐药性和明显毒副作用,由于内皮抑素在体内代谢快,无法持续发挥抑瘤作用,而内皮抑素基因在转染到肿瘤细胞内后,在肿瘤组织内持续表达内皮抑素,抑制肿瘤组织血管生成,从而在一次注射后,发挥相对长效的抑瘤作用^[5]。本实验结果显示,内皮抑素基因治疗后大鼠肿瘤生长率明显降低,表明内皮抑素基因有效抑制了肿瘤组织内新生血管的生成,在体内发挥着长效抑瘤作用。

放射性药物内照射治疗以其疗效集中,射线剂量小,组织损伤轻等优点正逐渐受到临床的关注。 ^{125}I -UdR 与 DNA 分子结合后, ^{125}I 释放出的俄歇电子产生较强烈电离作用,可导致 DNA 分子出现单链断裂点和双链断裂点,终止 DNA 复制,导致细胞死亡。大量文献证实 ^{125}I -UdR 具有明确抗肿瘤作用^[6-8]。

^{125}I -UdR 联合基因组大鼠的肿瘤生长率在所有观察组中最低,并且较 ^{125}I -UdR 组和基因组有明显差别($P < 0.05$),而病理显示肿瘤细胞大量坏死,新生的肿瘤细胞排列稀疏,这提示内皮抑素基因能够增加放射线的杀伤作用,这与文献报道的外照射治疗联合内皮抑素基因治疗肿瘤的结果相似^[9]。在联合组采用瘤体内直接给予的 ^{125}I -UdR 和 Egr-Endostatin 基因的混和物,是将 ^{125}I 治疗和 Endostatin 基因治疗有机结合,不但发挥 ^{125}I -UdR 的直接杀伤肿瘤细胞作用、Endostatin 基因的局部抗血管生成作用,而且同时发挥放射性药物增强 Endostatin 基因表达的

作用,使两种药物的协同抑瘤作用明显增强。这种治疗方法明显抑制了肿瘤的生长和转移,考虑除两者单独作用外,还基于以下原因: ^{125}I -UdR 破坏了瘤细胞,使携带内皮抑素基因的脂质体更容易进入细胞,增加了基因的转染率,电离辐射可产生细胞毒作用,导致外源性 DNA 容易进入宿主细胞。此外,辐射介导基因转染类似于电穿孔介导基因转染,无细胞特异性。因此,肿瘤基因-放射治疗具有广泛应用前景,既可利用电离辐射靶向性,有效控制肿瘤生长,降低肿瘤负荷,又可促进外源抗癌基因持续、高效表达。而且,本对内皮抑素不敏感的内皮细胞,受到辐射损伤后在修复、增殖过程中会重新对内皮抑素敏感。

综上所述,肿瘤的基因-放射治疗产生了显著的抑瘤作用,其抑瘤效果明显优于单纯的基因治疗和单纯的放疗疗效。已有学者证实 Endostatin 的基因治疗具有明显的抑瘤作用,在此基础上利用射线局部照射可以更有效地实现基因的定位调控表达,同时发挥射线的直接杀伤作用,起到了事半功倍的治疗效果^[10-13]。在本次动物实验中,由于引入了副作用不明显的内皮抑素基因,使得较小的 ^{125}I -UdR 剂量能够取得明显的抑瘤效果,降低了模型动物的放射性损伤,这为肿瘤的治疗提供了一个新的思路^[14-15]。由于条件所限,如何通过控制放射敏感基因和调整放射剂量以及放射间隔时间,进一步提高抗肿瘤效果等问题还需要我们在今后的工作中作进一步观察。但我们相信,随着对作用机制的深入了解,其必定有着更为广泛的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] 金洪永,范恩学,薛建华,等.生长抑素和内皮抑素对小鼠肿瘤血管新生的抑制作用[J].吉林大学学报(医学版),2005,31(2):253-255
Jin hong-Yong, Fan en-xue, Xue Jian-hua, et al. Somatostatin and endostatin on the inhibition of tumor angiogenesis in mice [J]. Jilin University (Medicine Edition), 2005, 31 (2) :253-255
- [2] Yang W, Li XY. Anti-tumor effect of pEgr-interferon-gamma-endostatin gene-radiotherapy in mice bearing Lewis lung carcinoma and its mechanism [J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(4):296-301
- [3] Schmitz V, Tirado LL, Raskopf E, et al. Effective antitumour mono- and combination therapy by gene delivery of angiostatin-like

- molecule and interleukin-12 in a murine hepatoma model[J].Int J Colorectal Dis. 2005, 20(6):494-501
- [4] Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S. Intraperitoneal gene therapy by rAAV provides long-term survival against epithelial ovarian cancer independently of survivin pathway[J].Gene Ther, 2007,14(2):138-146
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. (1995年版)二部.北京:化学工业出版社,广东科技出版社,1995;附录 35,76,79,103
- Ministry of Health Pharmacopoeia Committees's, Republic of China Pharmacopoeia [M]. (1995 edition) two. Beijing:Chemical Industry Press,Guangdong Science and Technology Press, 1995;Appendix 35,76,79,103
- [6] 张海涛, 李德春.¹²⁵I- 脱氧嘧啶核苷内照射治疗肝癌的实验研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005;25(5):807-812
- Zhang Hai-tao, Li De-chun.¹²⁵I-deoxy pyrimidine nucleoside irradiation treatment of liver cancer experimental study [J].Suzhou University (Medical Sciences),2005; 25 (5) :807-812
- [7] 李金泉, 鲍耀东, 周岱等. 125I-UdR 对人脑胶质瘤细胞 SHG44 的杀伤作用[J].核技术,2001,24(11):881-884
- Li Jin-quan, Bao Yao-dong, Zhou Dai, et al.125I-UdR SHG44 human glioma cells in vitro [J].Nuclear technology, 2001,24 (11) :881-884
- [8] 张海涛, 张志德, 李金泉.125I- 脱氧尿嘧啶核苷对肝癌细胞 HepG2 生长的抑制作用[J]. 中华核医学杂志, 2002;22(5):286-287
- Zhang Hai-tao, Zhang Zhi-de, Li Jin-quan.125I-deoxyuridine on growth inhibition of HepG2 hepatoma cells [J].Journal of Nuclear Medicine,2002;22 (5):286-287
- [9] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J].New Engl J Med,1971;285(21): 1182-1186
- [10] 李勇,杨海山,马铎.不同途径给予含血管内皮抑素基因的重组质粒的抑瘤作用研究[J].现代肿瘤医学杂志,2008,16(8):1269-1272
- Li Yong, Yang Hai-shan, Ma Duo. Different ways to give including endostatin recombinant plasmid inhibitory effect of [J].Modern Oncology,2008,16 (8):1269-1272
- [11] Sun X, Vale M, Jiang X, et al. Antisense HIF-1alpha prevents acquired tumor resistance to angiostatin gene therapy [J].Cancer Gene Ther, 2010,17(8):532-540
- [12] Cavallaro C. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression[J].Jneurooncol, 2000, 50(1/2): 63-70
- [13] SIM BK, Macdonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth [J].CancerMetastasisRev, 2000,19(1/2): 181-190
- [14] Tong AW, Nemunaitis J, Su D, et al. Intratumoral injection of INGN 241,a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients[J]. Mol Ther, 2005,11(1):160-172
- [15] Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, et al.Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24;INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study [J].Mol Ther,2005, 11(1):149-159
- (上接第4049页)
- [12] Wang C, Li S, Wang MW. Evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death was mediated by PI3K/Akt/caspase and Fas-L/NF-kappaB signaling pathways and augmented by ubiquitin-proteasome inhibition[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(3): 898-904
- [13] Liu LP, Liang HF, Chen XP, et al.The role of NF-kappaB in Hepatitis b virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs[J]. Cancer Invest, 2010, 28(5): 443-451
- [14] Choi EM, Lee YS. Luteolin suppresses IL-1beta-induced cytokines and MMPs production via p38 MAPK, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation in human synovial sarcoma cell line, SW982 [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(10): 2607-2611