

• 实验研究 •

肿瘤抑素抗肿瘤相关肽治疗人喉鳞状细胞癌裸鼠
模型的实验研究*王超¹ 李秋影¹ 姚鸿超¹ 刘鸣¹ 肖玉丽¹ 金德均¹

【摘要】 目的:研究肿瘤抑素抗肿瘤相关肽对裸鼠喉癌皮下移植模型的抑瘤作用,探讨其抑瘤机制及人喉癌生物治疗新方法。**方法:**建立人喉癌 Hep-II 细胞株裸鼠皮下接种模型,应用肿瘤抑素抗肿瘤相关肽治疗,观察肿瘤生长情况。对治疗后的肿瘤组织进行病理学检查、免疫组织化学检查及电镜观察,计数微血管密度。**结果:**在治疗组与对照组之间,平均鼠净重、瘤重、瘤体积及瘤重/鼠净重比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),治疗组抑瘤率为 51.58%。病理学检查及电镜观察表明,治疗组肿瘤生长受到抑制,细胞分裂少见,可见肿瘤细胞的坏死凋亡,新生血管明显减少,其微血管密度明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**肿瘤抑素抗肿瘤相关肽可显著抑制人喉癌裸鼠模型肿瘤的生长和发展。

【关键词】 肿瘤抑素;喉肿瘤;细胞凋亡

【中图分类号】 R739.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1781(2012)06-0277-03

Anti-tumor peptide of tumstatin in the treatment of the transplantable
model of human laryngeal squamous carcinoma in nude mice

WANG Chao LI Qiuying YAO Hongchao LIU Ming XIAO Yuli JIN Dejun

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150086, China)

Corresponding author: WANG Chao, E-mail: hljwangchao@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To study the effect of anti-tumor peptide of tumstatin on tumor growth of human laryngeal squamous carcinoma in nude mice and the underlying mechanism. **Method:** Nude mice model bearing laryngeal carcinoma were established by using human laryngeal squamous carcinoma cell line (Hep-II). The animals were given tumstatin or PBS for 10 consecutive days. The volumes of the subcutaneous tumor were observed. The microstructure in which the general 2-step immunohistochemical examination was adopted and ultra-micro-structural changes of carcinoma after administration of tumstatin were observed under light and electron microscopes for pathology examination. **Result:** The differences was statistically significant in the net mice weight, tumor weight, tumor volume and tumor weight/net mice weight between the treatment group and the control group ($P < 0.01$). The restrained percentage of tumor was 51.58%. The necrosis and apoptosis of the tumor cells and the angiogenesis reduction were found under light and electron microscope in the treatment group. MVD of the treatment group was lower than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tumstatin can significantly restrain the development of laryngocarcinoma.

Key words tumstatin; laryngeal neoplasms; apoptosis

肿瘤抑素是继血管生成抑素和内皮抑素之后最新发现的基底膜来源人胶原肿瘤血管生成抑制因子。肿瘤抑素有 2 个活性区:一个是靠近 C 端的 185~203 位氨基酸组成的 19 肽具有直接抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用;另一个是接近 N 端的 54~132 位氨基酸组成的 78 肽通过抑制肿瘤血管生成而具有抗肿瘤细胞生长的作用,因此肿瘤抑素具有良好的临床应用前景^[1-2]。本研

究通过动物实验观察肿瘤抑素抗肿瘤相关肽(19 肽)抗喉癌的效果,并初步探讨其抑瘤机制,为肿瘤抑素的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c-nu 裸鼠 20 只(本校动物实验中心提供),5~6 周龄,雌雄各半,体重 20 g 左右。无菌条件饲养,保持一定湿度、温度(25~28℃)。

1.2 头颈部鳞状细胞癌(简称鳞癌)Hep-II 细胞悬液制备

Hep-II 细胞株由本院耳鼻咽喉科实验室液氮保存。常规复苏培养,取对数生长期 Hep-II 细胞,

* 基金项目:哈尔滨医科大学附属二院博士科研基金(No: BS2008-19)

¹ 哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻咽喉头颈外科(哈尔滨,150086)

通信作者:王超, E-mail: hljwangchao@yahoo.com.cn

胰酶消化成单个细胞, RPMI-1640 液洗涤, 吹打成悬液, 用 PBS 调细胞数至 1×10^9 个/L, 备用。

1.3 实验试剂

肿瘤抑素抗肿瘤相关肽(19 肽)由本校生物化学教研室提供, 根据蛋白标准曲线测定蛋白浓度, -20°C 保存备用。实验前 4°C 溶化, 注射器反复抽吸, 备用。

1.4 人喉癌裸鼠动物模型的建立

每只裸鼠于右肩胛近腋窝处皮下接种喉癌 Hep-II 细胞悬液 0.2 ml。观察接种部位液体吸收、肿瘤生长过程及裸鼠状况, 待约 20 d, 肿瘤长至直径约 1 cm 时, 分组实验。

1.5 肿瘤抑素治疗

将 20 只裸鼠用抽签法随机分为 2 组, 每组 10 只。治疗组每日瘤周皮下注射重组肿瘤抑素活性肽 4.3 mg/kg^[3], 注射部位距离肿瘤边缘 3 mm, 对照组给予同等量 PBS 液, 连续给药 10 d, 每 3 d 测量鼠重, 肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积。停药后 1 周处死动物, 剥离肿瘤, 称重, 计算抑瘤率。抑瘤率 = $(1 - \text{治疗组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$, 瘤体积 = $a^2 \times b \times 0.5$ (a 为短径, b 为长径)^[4]。

1.6 免疫组织化学检测

剥离肿瘤, 分成 2 份, 一份液氮保存用于电镜观察; 一份常规固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色。通用型二步法免疫组织化学染色方法: 切片脱蜡至水。3% 过氧化氢孵育 5 min, 阻断内源性过氧化物酶活性。滴加一抗, 室温或 37°C 孵育 30~60 min, PBS 冲洗, 每次 2 min, 冲洗 3 次, 滴加通用型 IgG 抗体 (Fab 段) 一辣根过氧化物酶多聚体, 室温或 37°C 孵育 10 min, PBS 冲洗, 每次 2 min, 冲洗 3 次, 应用 DAB 液显色。蒸馏水冲洗, 复染, 脱水, 封片。微血管密度 (microvessel density, MVD) 采用 CD34 为一抗, 低倍镜下 ($\times 100$) 观察确定血管密度最高的区域, 然后高倍镜 ($\times 400$) 计数 10 个视野中肿瘤内微血管数, 以平均每高倍镜 ($\times 400$) 视野血管数表示 MVD。每只动物选取 1 张切片进行免疫组织化学实验操作, 计数后按动物数量平均得出各组平均值。

1.7 透射电镜观察

标本经 4% 戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 切片, 透射电镜观察并拍

照。

1.8 统计学分析

应用 t 检验, 采用 SAS 统计软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 肿瘤抑素抗肿瘤相关肽对人喉癌裸鼠动物模型作用的观察

20 只裸鼠均接种成功, 1 周左右可见皮下肿瘤形成, 并随时间延长不断长大。对照组肿瘤持续增长, 体积明显增大, 小鼠状态差, 渐消瘦。治疗组小鼠状态良好, 体重无明显减轻, 瘤体生长缓慢。治疗期间全部动物均无死亡。

2.2 肿瘤抑素抗肿瘤相关肽对人喉癌裸鼠模型治疗效果

2 组裸鼠的鼠净重、瘤重、瘤体积和瘤重/鼠净重比均差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$, 表 1)。治疗组抑瘤率为 51.58%。2 组裸鼠的生长曲线见图 1。

2.3 病理学检查结果

苏木精-伊红染色可见, 对照组肿瘤细胞生长良好, 细胞分裂相多见, 坏死区少见; 而治疗组肿瘤细胞出现大片坏死灶 (图 2、3)。免疫组织化学检测显示, 治疗组 MVD 明显下降 ($t = 8.0621$, $P < 0.01$, 表 1, 图 4、5)。

2.4 透射电镜分析

电镜可见, 对照组肿瘤细胞有少量微绒毛, 核仁明显, 细胞核表面伸出核突, 细胞质内线粒体清晰, 游离核蛋白体丰富, 粗面内质网不发达, 核膜结构完好 (图 6); 治疗组细胞微绒毛消失, 细胞核内染色质电子密度增高, 细胞质内膜结构减少, 内有脂滴出现, 线粒体电子密度增大, 嵴不清, 可见凋亡小体 (图 7)。

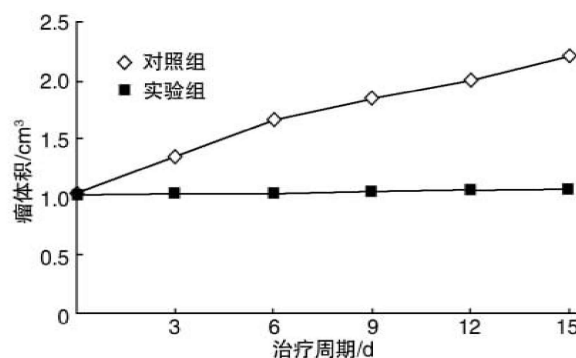


图 1 人喉癌裸鼠移植模型肿瘤生长情况

表 1 肿瘤抑素治疗喉癌荷瘤鼠模型的疗效

$\bar{x} \pm s$

组别	鼠数/只	瘤重/g	鼠净重/g	瘤体积/cm ³	瘤重/鼠净重	MVD
治疗组	10	0.76 ± 0.18	19.01 ± 0.95	1.07 ± 0.18	0.056 ± 0.01	7.5 ± 1.6
对照组	10	1.95 ± 0.28	13.41 ± 1.81	2.21 ± 0.39	0.168 ± 0.05	14.2 ± 2.1

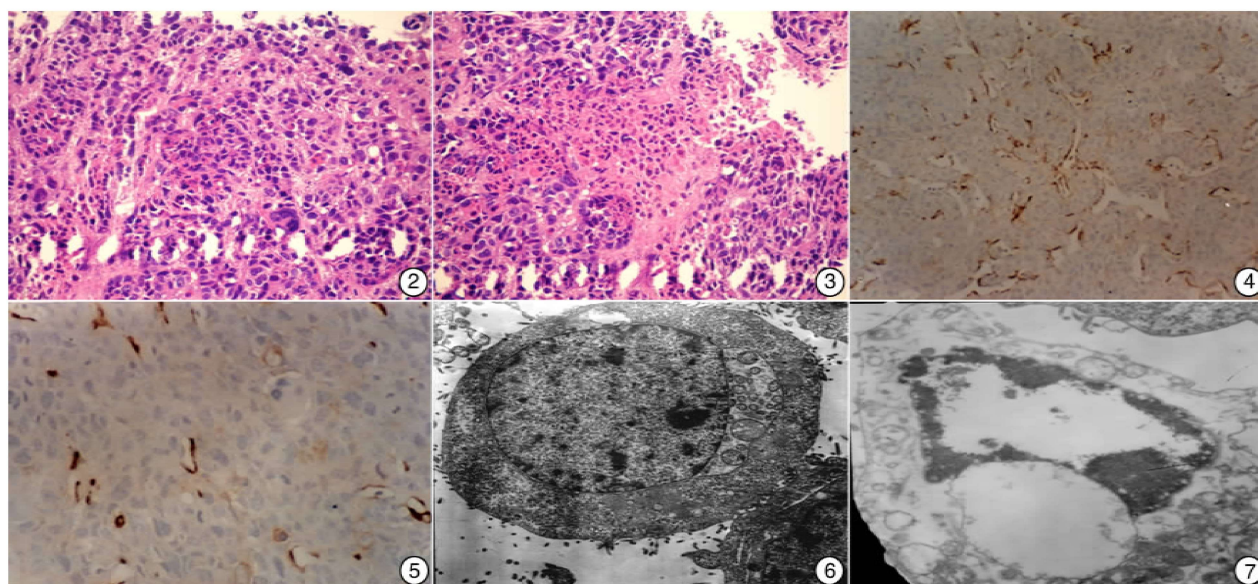


图2 对照组肿瘤细胞生长旺盛,坏死少见 苏木精-伊红 $\times 200$; 图3 治疗组肿瘤细胞坏死明显,出现大片坏死灶 苏木精-伊红 $\times 200$; 图4 对照组肿瘤组织中 MVD 多见 免疫组织化学二步法 $\times 200$; 图5 治疗组肿瘤组织中 MVD 减少 免疫组织化学二步法 $\times 200$; 图6 对照组细胞形态完整,结构清晰 $\times 4000$; 图7 治疗组细胞核浓缩,胞内出现大量脂滴 $\times 4000$

3 讨论

肿瘤抑素是近年发现的一种新型、高效的血管生成抑制剂。近年来研究证明,肿瘤抑素能够抑制黑色素瘤细胞、纤维肉瘤细胞、骨肉瘤细胞、卵巢癌、前列腺癌等的增殖。但其对喉癌细胞的治疗作用并未见报道。

本实验中,我们将喉鳞癌 Hep-II 细胞移植接种于裸鼠,成功的建立了人喉鳞癌裸鼠移植模型。通过实验着重观察了肿瘤抑素抗肿瘤相关肽(19肽)抑制肿瘤生长的效果。实验表明,应用肿瘤抑素活性肽在 10 d 的治疗周期中肿瘤生长受到明显抑制,治疗组与对照组之间肿瘤生长情况存在着显著差异,说明肿瘤抑素抗肿瘤相关肽抑瘤作用显著。肿瘤抑素抗肿瘤相关肽的给药量每日为 4.3 mg/kg,约为内皮抑素给药量的 1/5(内皮抑素治疗量为 20 mg/kg),仅给药 10 d,抑瘤率即高达 51.58%。相同效果的治疗周期及用量明显低于内皮抑素^[5]。

通过病理学检查发现,接受肿瘤抑素抗肿瘤相关肽治疗的小鼠肿瘤组织出现大片坏死,细胞内出现凋亡小体,而对照组则肿瘤细胞增殖活跃,核分裂像明显,坏死少见。透射电镜结果显示,治疗组肿瘤细胞超微结构发生明显变化,细胞呈坏死、凋亡改变,而对照组则生长良好,细胞增殖活跃。提示肿瘤抑素抗肿瘤相关肽可能通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到抑瘤作用。

免疫组织化学检测结果表明,MVD 在治疗组明显减低,表明血管内皮生成受到抑制,肿瘤血管

数量明显减少,由此可以证明,肿瘤抑素抗肿瘤相关肽可以通过抑制血管内皮细胞的增殖和生长而导致肿瘤局部营养供应不足,使肿瘤细胞生长受到抑制。

由于肿瘤抑素相对分子质量小、可以静脉给药、使用安全,极有可能继内皮抑素之后成为一种新的通过抑制血管生成治疗肿瘤的药物。本实验为肿瘤抑素抗肿瘤相关肽应用于喉癌治疗提供了理论依据,为其应用于临床做出了初步的探索,但对于其具体机制还有待于做进一步研究。

参考文献

- [1] HE Y, JIANG Y, LI Y J, et al. 19-peptide, a fragment of tumstatin, inhibits the growth of poorly differentiated gastric carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25: 935-41.
- [2] YAN Y, XU W, QIAN H, et al. Tumstatin45-132-TNFA α suppresses tumour growth through anti-angiogenic effects and cytotoxicity [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2010, 23: 119-127.
- [3] 王淑静,付雪,徐建永,等.肿瘤抑素相关肽抗肿瘤活性研究[J].中国肿瘤,2005,14(3):186-188.
- [4] 王建亭,龚树生,刘英鹏.蛋白激酶 CK2 α 特异性 siRNA 对人喉癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,23(6):267-270.
- [5] 姚鸿超,金德均,孙亚男,等.内皮抑素治疗人喉癌裸鼠模型的实验研究[J].中华耳鼻咽喉科杂志,2004,39(7):394-398.

(收稿日期:2011-05-05)