

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.014

小剂量长春瑞滨抗血管生成化疗的实验研究

万 莉

(东南大学医学院附属南京市第二医院肿瘤科, 南京 210003)

【摘要】目的:探讨长春瑞滨在体内外的抗血管生成活性及其可能的作用机制。方法:以人肺腺癌 A549 细胞为对照,采用 MTT 法、Transwell 小室趋化实验、体外小管形成实验及流式细胞术(Flow cytometry, FCM),观察长春瑞滨对人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)细胞增殖、迁移、形成毛细网管样结构的能力及细胞凋亡的影响;利用鸡胚绒毛尿囊膜(Chicken chorioallantoic membrane, CAM)模型,观察长春瑞滨对体内 CAM 新生血管的抑制作用。结果:小剂量(0.1~1.0 ng/ml)长春瑞滨作用 48 h,对 HUVEC 和 A549 细胞增殖抑制具有差异细胞毒作用($P=0.000$)。0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨对 HUVEC 作用 12 h 的迁移抑制率在 20.56%~57.87% 之间,与对照组相比,细胞迁移数明显减少($P<0.05$, $F=72.979$, $P=0.000$)。0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨对 HUVEC 作用 24 h 的小管形成抑制率在 29.07%~56.83% 之间,与对照组相比,小管形成数目明显减少且管腔结构趋于不完整,差异具有统计学意义($P<0.05$, $F=75.794$, $P=0.000$)。0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨作用 48 h,诱导 HUVEC 细胞凋亡率在 22.30%~37.05% 之间,高于对照组细胞凋亡率 15.60% ($P<0.05$; 注:与对照组相比,在 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨组的相应 $P=0.036$, $P=0.013$, $P=0.012$)。体内实验显示,0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨能够抑制 CAM 新生血管形成,抑制率在 21.05%~42.11% 之间,且抑制作用随药物浓度增加而增强。结论:①小剂量长春瑞滨在体外具有抑制血管内皮细胞增殖、迁移、小管形成及诱导细胞凋亡的作用。②小剂量长春瑞滨在体内具有抑制 CAM 血管形成的作用。

【关键词】长春瑞滨;人脐静脉内皮细胞;Transwell;流式细胞术;鸡胚绒毛尿囊膜;抗血管生成

【中国图书分类号】R73-36⁺1

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-12

Experimental study of low doses of Vinorelbine in inhibiting angiogenesis

WAN Li

(Department of Oncology, the Affiliated Nanjing Second Hospital, Southeast University)

【Abstract】Objective: To investigate the antiangiogenic ability and mechanism of Vinorelbine in vitro and in vivo. **Methods:** In vitro, MTT colorimetric assay was used to observe the effect of Vinorelbine on the proliferation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human pulmonary adenocarcinoma A549 cells. Transwell cabin test and out-body canaliculization test were used to observe the impact of Vinorelbine on cell migration and capillary-like tube formation ability, and the apoptosis rate of HUVEC was calculated by flow cytometry (FCM). In vivo, the chicken chorioallantoic membrane (CAM) model was used to check whether the neovascularization of CAM could be suppressed. **Results:** Low dose Vinorelbine (0.1~1.0 ng/ml) could inhibit the proliferation of A549 and HUVEC after 48 h treatment, and the inhibition had significant differences ($P=0.000$). The number of migrating HUVEC was decreased as compared with that in the control group ($P<0.05$, $F=72.979$, $P=0.000$), and the inhibition rate of migration was between 20.56%~40.40% when treated with 0.1~0.8 ng/ml Vinorelbine for 12 h. The number of tubules was reduced and the lumen lost its integrity as compared with that in the control group ($P<0.05$, $F=75.794$, $P=0.000$), and the inhibition rate of tube formation was between 29.07%~56.83% when treated with 0.1~0.8 ng/ml Vinorelbine for 24 h. When HUVEC was incubated with 0.1~0.8 ng/ml Vinorelbine for 48 h, the apoptosis rate was between 22.30%~37.05%. At the same time, the apoptosis rate was higher than that of 15.60% in the control group ($P<0.05$); Note: compared with that of the control, P value for 0.1, 0.4 ng/ml, and 0.8 ng/ml Vinorelbine was $P=0.036$, $P=0.013$, and $P=0.012$ respectively). We also observed that Vinorelbine, at concentrations of 0.1, 0.4 ng/ml, and 0.8 ng/ml, suppressed the neovascularization of CAM in vivo, and the inhibition rate was between 21.05%~42.11%. Moreover, the inhibition rate was enhanced as the drug concentration increased. **Conclusion:** ① In vitro, low dose Vinorelbine can inhibit the cell proliferation, migration, and tube formation of HUVEC, and has the ability of inducing apoptosis of HUVEC. ② In vivo, low dose Vinorelbine demonstrates antiangiogenic ability of CAM.

【Key words】 Vinorelbine; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); Transwell; flow cytometry (FCM); chorioallantoic membrane (CAM); antiangiogenic

作者简介: 万 莉(1979-),女,主治医师,硕士,

研究方向:肿瘤抗血管生成治疗。

长春瑞滨是 1 种半合成长春花生物碱,具有阻滞微管蛋白聚合及诱导微管解聚从而使细胞分裂停止于有丝分裂中期的作用。长春瑞滨与长春碱同属于长春花生物碱类,但两者结构存在一些差异,已有实验证明长春碱^[1]在小剂量运用时具有抗血管生成作用,本实验旨在通过体内外实验探讨长春瑞滨的抗血管生成能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 内皮细胞培养液 (EGM-2) 及胎牛血清系 Lonza 公司产品, RPMI1640 培养液、细胞消化酶及四甲基偶氮唑盐 (MTT) 系 Gibco 公司产品, 新生牛血清系兰州民海生物工程公司产品, 二甲基亚砷 (DMSO) 系上海凌峰公司产品, 冷磷酸缓冲液 (PBS) 自配。Transwell 小室 (24 孔、膜上孔径 8 μm) 购系 Corning 公司产品, 甲基纤维素 M20 及纤维蛋白原系 Amersco 公司产品, 凝血酶系 Sigma 公司产品, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒系 Invitrogen 公司产品。酒石酸长春瑞滨注射液购自江苏豪森药业股份有限公司。受精 6 d 鸡蛋购自南京源创禽业发展有限责任公司。

1.1.2 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞系本实验室常规培养, 生长于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 完全培养液中, 取对数生长期用于实验。人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 经人新鲜脐带原代分离, 生长于含 10% 胎牛血清的 EGM-2 内皮细胞完全培养液。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的获取和培养 参照 Jaffe 等^[2]的方法并改良, 取新鲜新生儿脐带 (约 20 cm), PBS 冲洗脐静脉内壁至干净, 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 7 min, 收集消化液, RPMI1640 培养液冲洗内壁, 冲洗液一并收集, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集 HUVEC 以 EGM-2 完全培养液重悬接种于培养皿, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。取第 3 ~ 6 代用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞体外增殖实验 RPMI1640 和 EGM-2 分别调整 A549 和 HUVEC 细胞浓度至 3.2×10^4 个/ml 和 2.6×10^4 个/ml 接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度孵育 24 h 后, 加入含药物的培养液 (终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ng/ml 长春瑞滨), 对照组加入等量不含药物的培养液, 同时设只含培养液的空白对照组, 每组设 3 个复孔, 继续孵育 48 h, 加入 20 μl MTT 孵育 4 h 后弃去上清液, 加入 200 μl DMSO 震荡 10 min, 酶标仪 490 nm 波长下测吸光度 (Absorbance, A), 计算细胞增殖抑制率: 细胞抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 体外迁移实验 参照 Uriarte 等^[3]的方法, 将 Transwell 小室内套倒置, 底面用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纤维粘连蛋白溶液 100 μl 包被, 风干; 下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 EGM-2; 常规消化含 0.5% 胎牛血清 EGM-2 培养 12 h 的 HUVEC, 并

用该培养液调整细胞密度至 4×10^6 个/ml, 按每室 50 μl 接种于上室; 并在药物组上室中加入 50 μl 含药物的 0.5% 胎牛血清 EGM-2 培养液 (浓度为 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨), 对照组上室中加入等量不含药物的 0.5% 胎牛血清 EGM-2 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育; 12 h 后棉签棒拭去膜上表面细胞, 下表面用 10% 甲醛固定 30 min, PBS 漂洗, 结晶紫染色 20 min, 再 PBS 漂洗干净, 取下微孔膜使底面朝上置于载玻片, 显微镜下观察、拍照, 随机计数 5 个视野, 取平均数作为趋化细胞数, 计算细胞迁移抑制率。

1.2.4 体外小管形成实验 参照 Chalupowica 等^[4]的方法, 构建 HUVEC 培养模型模拟新生血管生成, 具体为: 无血清 EGM-2 调整 20 mg/ml 纤维蛋白原溶液至 1.0 mg/ml, 按每孔 225 μl 加入 24 孔板, 再按每孔 18 μl 添加 12.5 U/ml 凝血酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 聚合成底层凝胶; 收集 HUVEC, 无血清 EGM-2 重悬成 2.5×10^4 个/ml 的细胞悬液, 每孔 1 ml 加于上述底层凝胶上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育; 24 h 后换入含不同浓度长春瑞滨的培养液 (终浓度分别为 0.1、0.4、0.8 ng/ml), 对照组换入等量不含药物的培养液; 继续孵育 1 h 后移去培养液, 在该层细胞上按底层凝胶方法制作含上述各浓度长春瑞滨的顶层凝胶, 对照组不含药物, 在顶层凝胶上加入 1 ml 含 10% 胎牛血清的 EGM-2 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育; 23 h 后观察拍摄小管形成情况。

1.2.5 双标记流式细胞仪检测 HUVEC 凋亡率 收集对照组及药物组 (0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨) 作用 48 h 的 HUVEC, 100 μl Buffer 重悬, 顺序加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染料, 混匀后避光 15 min, 加入 400 μl Buffer 缓冲液, 振荡后流式细胞仪检测。

1.2.6 体内鸡胚绒毛尿囊膜实验 (Chicken chorioallantoic membrane, CAM) 75% 乙醇擦拭孵育第 7 天的鸡受精卵, 在气室顶端蛋壳上开窗 (直径约 1 cm), 放置甲基纤维素薄片于暴露的尿囊膜上, 滴加 10 μl 含不同浓度药物的生理盐水溶液于薄片上, 并以不含药物的生理盐水为阴性对照, 以 0.5 mg/ml 地塞米松为阳性对照, 无菌贴膜封闭窗口继续孵育; 每 24 h 追加等量药物, 72 h 后 10% 甲醛固定 10 min, 将薄片周围 3 cm 直径区域的尿囊膜剪下, 显微镜下观察薄片周围毛细血管生长情况, 按每组 10 个鸡胚计数尿囊膜新生血管数 (B), 计算药物对其抑制率, 抑制率 = (生理盐水组 B 数 - 药物组 B 数) / 生理盐水组 B 数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 统计学处理 统计分析采用 SPSS 15.0 软件统计包, 对实验数据作单因素方差分析, 进行 Student's t -检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 长春瑞滨对 A549 和 HUVEC 细胞体外增殖的影响

小剂量长春瑞滨 (0.1 ~ 1.0 ng/ml) 作用 48 h 对 HUVEC 增殖抑制率为 25.76% ~ 62.27%, 与药物浓度呈正相关 ($r = 0.993$, $P = 0.000$); 相同条件下, 药物对 HUVEC 抑制率高于对 A549 抑制率, $P < 0.05$ ($P = 0.000$), 两者间存在差异细胞

毒作用(见图 1)。

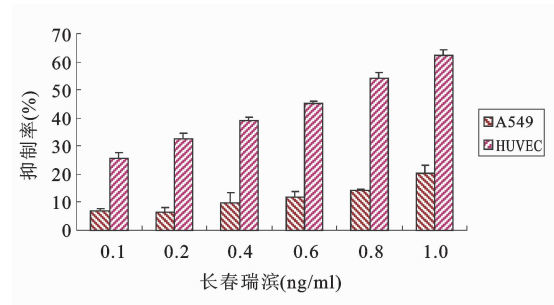
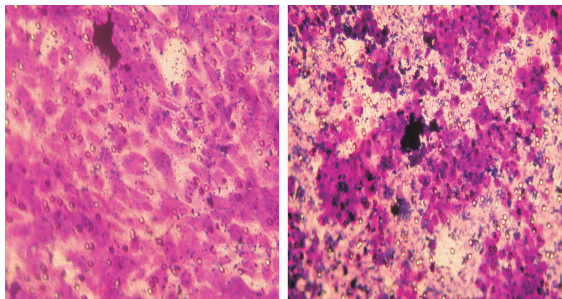


图 1 长春瑞滨作用 48 h 对 A549 和 HUVEC 细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effects of Vinorelbine on the cell proliferation of HUVEC and A549 cells after 48 h treatment

2.2 长春瑞滨对 HUVEC 体外迁移能力的影响

经 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨作用 12 h,平均细胞迁移数分别为 349.20 ± 24.06 、 262.00 ± 17.89 、 185.20 ± 22.03 ,与对照组(439.60 ± 27.12)相比,药物组细胞迁移数明显减少($P < 0.05$,见图 2, $F = 72.979$, $P = 0.000$);0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨抑制 HUVEC 迁移率分别为 20.56%、40.40%、57.87%,抑制强度与浓度呈正相关($r = 0.954$, $P = 0.000$)。



A. 对照组 B. 0.8 ng/ml 长春瑞滨

图 2 长春瑞滨作用 12 h 后对 HUVEC 迁移的影响 (100 ×)

Fig.2 Effect of Vinorelbine on the migration ability of HUVEC after 12 h treatment (100 ×)

2.3 长春瑞滨对 HUVEC 小管形成的影响

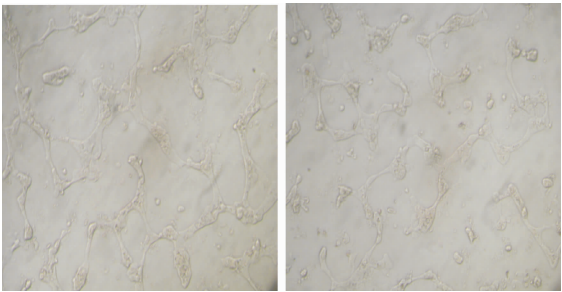
作用 HUVEC 24 h,对照组能形成较致密的毛细管网腔样结构,而药物组形成的网管样结构的宽度和长度都明显减少,同时小管管腔也趋于不完整,即小剂量长春瑞滨能够抑制 HUVEC 形成小管样结构($P < 0.05$, $F = 75.794$, $P = 0.000$),且抑制作用与药物浓度呈正相关($r = 1.000$, $P = 0.017$),抑制率在 0.1、0.4、0.8 ng/ml 浓度组分别为 29.07%、41.63%、56.83% (见图 3)。

2.4 长春瑞滨对 HUVEC 细胞凋亡的影响

HUVEC 经 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨作用 48 h,细胞凋亡率分别为 22.30%、30.10%、37.05%,与对照组凋亡率 15.60% 相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$,见图 4。注:与对照组相比,在 0.1、0.4、0.8 ng/ml 长春瑞滨组的相应 $P = 0.036$ 、 $P = 0.013$ 、 $P = 0.012$)。

2.5 长春瑞滨对体内 CAM 血管生成的影响

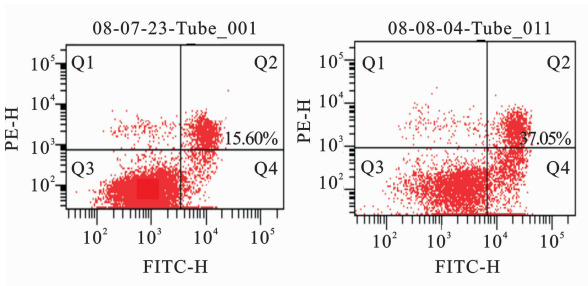
如表 1 所示,与生理盐水组相比,长春瑞滨药物组的 CAM 新生血管数目减少($P < 0.05$, $F = 43.556$, $P = 0.000$);长春瑞滨抑制新生血管形成率与其浓度呈正相关($r = 0.998$, $P = 0.039$),且抑制率均高于地塞米松阳性对照组 (见图 5)。



A. 对照组 B. 0.8 ng/ml 长春瑞滨

图 3 长春瑞滨作用 24 h 对 HUVEC 小管形成的影响 (100 ×)

Fig.3 Effect of Vinorelbine on the tube formation ability of HUVEC after 24 h treatment (100 ×)



A. 对照组 B. 0.8 ng/ml 长春瑞滨

图 4 长春瑞滨作用 48 h 对 HUVEC 细胞凋亡率的影响

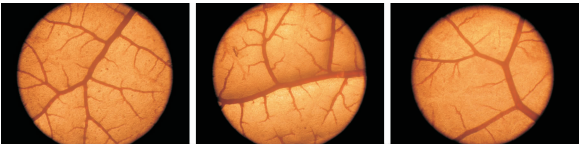
Fig.4 Quantification of the apoptotic rate of HUVEC after treating with Vinorelbine for 48 h

表 1 长春瑞滨对鸡胚尿囊膜新生血管的影响

Tab.1 CAM angiogenesis after treatment with Vinorelbine

组别	新生血管数 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
生理盐水阴性对照组	30.40 ± 4.62	...
0.5 mg/ml 地塞米松阳性对照组	24.60 ± 1.95	19.08
长春瑞滨 0.1 ng/ml	24.00 ± 1.00	21.05
长春瑞滨 0.4 ng/ml	21.60 ± 1.14	28.95
长春瑞滨 0.8 ng/ml	17.60 ± 1.14	42.11

注:“...”表示无数据



A. 阴性对照组 B. 阳性对照 (0.5 ng/ml 地塞米松) C. 0.8 ng/ml 长春瑞滨

图 5 不同处理方法对鸡胚尿囊膜血管生成的影响 (100 ×)

Fig.5 Effects of different methods on antiangiogenesis of CAM (100 ×)

3 讨论

肿瘤血管生成来源于两个方面^[5,6]:一方面通过已存在血管内皮细胞芽生成,另一方面由骨髓来源的成血管细胞募集到新生血管形成位点分化为内皮细胞参与新生血管形成,为肿瘤生长、转移及复发提供了极其重要的通路。

以血管内皮细胞为靶点的抗血管生成治疗,具有靶点基因型稳定、不易产生耐药性、毒副作用低等特点,受到肿瘤界学者的密切关注。近年来研究发现,某些化疗药物在小剂量应用时,作用靶点不是肿瘤细胞而是血管内皮细胞,通过遏制肿瘤血供而使其生长受阻,这种治疗模式被界定为小剂量化疗 (Low dose metronomic chemotherapy) 或抗血管生成化疗 (Antiangiogenic chemotherapy)^[7,8]。一些传统细胞毒药物如长春碱^[1,9]、卡培他滨^[9]、环磷酰胺^[10]、紫杉醇^[11,12] 在小剂量应用时的抗血管生成作用,为肿瘤有效治疗提供了广阔平台。

长春瑞滨是抗瘤谱较广的临床常用化疗药,对肺癌、乳腺癌、卵巢癌等有较好治疗作用,但由于其存在明显的骨髓抑制、神经及皮肤毒性等限制其临床应用,因此,我们研究小剂量长春瑞滨在体内外是否具有抗血管生成作用,以期对年老体弱等不能耐受大剂量化疗或耐药细胞肿瘤病人提供新的治疗模式。

本实验观察到,小剂量长春瑞滨 (0.1~1.0 ng/ml) 对 HUVEC 增殖抑制作用大于对 A549 细胞增殖抑制,表现出差异细胞毒性;0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨呈剂量依赖性抑制 HUVEC 迁移及阻遏 HUVEC 形成毛细管网样结构,表现出药物对细胞趋化活性及分化能力的抑制作用;0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨诱导 HUVEC 凋亡率在 22.30%~37.05% 之间,表现出药物具有阻断内皮细胞 DNA 合成从而抑制血管生成的功能。此外,CAM 实验显示 0.1~0.8 ng/ml 长春瑞滨能够抑制体内新生血管形成,且抑制作用与药物浓度呈正相关;考虑到地塞米松^[12,13] 具有抗 CAM 血管生成的作用,因此在 CAM 实验中设定其为阳性对照,并观察小剂量长春瑞滨 (0.1~0.8 ng/ml) 对 CAM 血管生成抑制率均高于地塞米松阳性对照组 (19.08%)。

综上所述,小剂量长春瑞滨在体内外具有抗血管生成作用,其机制可能与其干扰 HUVEC 增殖、抑制 HUVEC 迁移、阻止 HUVEC 形成毛细管网样结构及诱导 HUVEC 凋亡相关。长春瑞滨这一活性的发现,为其在临床更为广阔的抗瘤应用带来了希望,但

我们也认识到,本实验对其抗血管生成机理只进行了初步探讨,为了更系统地评价长春瑞滨抗血管生成活性,还需要大量后续的研究如采用荷瘤鼠动物实验观察其抗血管生成作用及深入研究其抗血管生成机制,为其真正由实验走向临床打下坚实的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Young S D, Whissell M, Noble J C, et al. Phase II clinical trial results involving treatment with low-dose daily oral cyclophosphamide, weekly vinblastine, and rofecoxib in patients with advanced solid tumors[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(10): 3092-3098.
- [2] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745-2756.
- [3] Uriarte S M, Molestina R E, Miller R D, et al. Effects of fluoroquinolones on the migration of human phagocytes through Chlamydia pneumoniae-infected and tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelial cells[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2538-2543.
- [4] Chalupowicz D G, Chowdhury Z A, Bach T L, et al. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation[J]. J Cell Biol, 1995, 130(1): 207-215.
- [5] Ingram D A, Caplice N M, Yoder M C. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells[J]. Blood, 2005, 106(5): 1525-1531.
- [6] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance[J]. Cell Mol Med, 2004, 8(4): 498-508.
- [7] Murray A, Little S J, Stanley P, et al. Sorafenib enhances the in vitro anti-endothelial effects of low-dose metronomic chemotherapy[J]. Oncology Reports, 2010, 4(24): 1049-1058.
- [8] Jiang H, Tao W, Zhang M, et al. Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice[J]. Cancer Investigation, 2010, 1(28): 74-84.
- [9] Fedele P, Orlando L, Schiavone P, et al. 18 safety and efficacy of low dose metronomic chemotherapy with capecitabine in heavily pretreated metastatic breast cancer (MBC) patients[J]. Cancer Treatment Reviews, 2010, 3(36): 100.
- [10] Bottini A, Generali D, Brizzi M P, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22): 3623-3628.
- [11] Pasquier E, Carre M, Pourroy B, et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(10): 1301-1310.
- [12] Keren M, Anat E B, Dina P, et al. Antiangiogenic antitumor activity of HPMa Copolymer-Paclitaxel-Alendronate conjugate on breast cancer bone metastasis mouse model[J]. Molecular Pharmaceutics, 2011, 4(8): 1052-1062.
- [13] Polyarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity[J]. Free Radical Research, 2004, 38(5): 501-508.

(责任编辑:冉明会)