

· 论 著 ·

局部热化疗对大鼠皮下移植胶质瘤细胞增殖和血管再生的影响

谭社练^{*}, 欧英雄, 赵伯端, 方 胜, 杨本生, 赵鹏洲

(广东省江门市人民医院神经外科, 江门 529051)

[摘要] 目的: 研究局部热化疗对大鼠皮下移植胶质瘤血管再生的影响, 探讨其作为胶质瘤辅助治疗的可行性。方法: 将传代培养的C6细胞接种于大鼠背部皮下, 肿瘤生长至1.5~2.0 cm直径时, 分组进行局部热疗、化疗和热化疗。继续观察皮下肿瘤生长情况, 测量瘤体体积和质量; 用免疫组化S-P法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、胰岛素样生长因子I(IGF-I)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达; 用因子VIII相关抗原(FVIII-RA)染色标记血管内皮细胞, 以微血管密度(MVD)作为定量检测指标。用H-E染色法、电镜观察肿瘤增殖状况和肿瘤微血管结构的变化。结果: 热疗、化疗、热化疗与对照组比较: 瘤体缩小, 质量减轻; PCNA、IGF-I、VEGF蛋白表达降低($P < 0.01$), MVD降低($P < 0.01$), 且热化疗较单纯热疗和化疗降低更明显($P < 0.01$)。热化疗后肿瘤细胞增殖明显受抑制, 微血管外径变小, 血管壁变厚, 血管减少, 血管内皮细胞紧密连接增多, 细胞连接间隙减小, 有的血管甚至只能发现完整的基膜而缺乏内皮细胞。结论: 热疗、化疗、热化疗能抑制肿瘤血管再生与肿瘤增殖, 且热化疗有协同作用; 热化疗抑制胶质瘤的PCNA合成与表达, 以及抑制IGF-I的合成与分泌是其抑制肿瘤增殖的机制之一; 热化疗能降低肿瘤VEGF合成与分泌, 破坏与减少肿瘤血管再生。作为胶质瘤辅助治疗有良好的临床应用前景。

[关键词] 胶质瘤; 热化学疗法; 血管再生; 细胞增殖

[中图分类号] R 730.264

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)07-0773-04

Effects of localized thermochemotherapy on angiogenesis and proliferation of C6 gliomas in rats

TAN She-Lian^{*}, OU Ying-Xiong, ZHAO Bo-Duan, FANG Sheng, YANG Ben-Sheng, ZHAO Peng-Zhou (Department of Neurosurgery, the People's Hospital of Jiangmen, Jiangmen 529051, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effects of local thermochemotherapy on angiogenesis and proliferation of C6 gliomas in rats, and to explore the feasibility of using it as a new therapeutic method for gliomas. **Methods:** C6 glioma cells were injected subcutaneously into rats, which were randomly assigned into 4 groups and treatment were initiated on 22 d after tumor inoculation. When the tumor diameter reached 1.5 to 2.0 cm, local thermochemotherapy, hyperthermia and chemotherapy were given respectively. The volume and weight of subcutaneous tumor were measured; PCNA, IGF-I, VEGF and FVIII-RA protein expression were measured by S-P immunohistochemical staining. Glioma cells proliferation were measured by H-E staining and electron microscopic technique. The vascular structure in rat glioma were measured by immunohistochemical staining and electron microscopy technique. **Results:** Compared with the control group, the tumor volume of hyperthermia, chemotherapy and thermochemotherapy groups were decreased ($P < 0.01$). The expression of PCNA, IGF-I and VEGF protein were decreased, and MVD were decreased too ($P < 0.01$). Electron microscopic method showed that proliferation and angiogenesis were inhibited by interstitial localized-thermochemotherapy in rat gliomas. **Conclusion:** Hyperthermia, chemotherapy and thermochemotherapy inhibits tumor angiogenesis and proliferation. Adriamycin (ADM) has marked synergistic effects with hyperthermia in C6 glioma of rats. One of mechanisms of proliferation inhibition is the decreased expression of PCNA and IGF-I protein. The mechanisms for angiogenesis inhibition are decreased VEGF expression, microvessel damage, and decreased tumor MVD. Thermochemotherapy may be a therapeutic method for gliomas.

[KEY WORDS] glioma; thermochemotherapy; angiogenesis; proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 773-776]

〔1〕 肿瘤血管再生在肿瘤生长、转移中发挥重要的作用。Kolkman^{〔1〕}提出肿瘤形成后如果没有新生血管网长入, 在1~2 mm³就停止生长, 此时肿瘤细胞的增殖与死亡处于平衡, 肿瘤呈休眠状态。热化疗能抑制肿瘤增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤耐药的产生^{〔2~5〕}。我院通过动物肿瘤瘤体内注射化疗药、热疗、热化疗与对照组的对比研究, 探讨热化疗对鼠胶质瘤血管再生及细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 40只Wistar健康大鼠购自湖北省卫生防疫站实验动物中心, 体质量200~

〔作者简介〕 谭社练(1950-), 男(汉族), 主治医师

^{*}Corresponding author. Tel: (0)13824091711

250 g, 雄雌不限。大鼠 C6 胶质瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。鼠增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体、胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor I, IGF-I) 鼠单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; 鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体 (Ab-3) 为 Neomarkers 公司产品; 因子 VIII 相关抗原 (FVIII-RA) 抗体购于福州迈新生物技术开发公司。

1.2 大鼠胶质瘤的热疗、化疗、热化疗及取材方法 C6 细胞在培养瓶中生长至 90% 融合时 (第 3 天), 胰酶消化, 用不含血清的 DMEM 培养液吹打, 使其脱落, 收集细胞, 低速离心, 调整细胞悬液密度约 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}/\text{ml}$ 。在无菌条件下, 将其注射至 Wistar 大鼠背部皮下约 0.1 ml, 注射细胞时缓慢进行并留针数分钟。肿瘤生长过程中, 每 2 d 观察大鼠皮下胶质瘤的成瘤及生长情况, 并测量肿瘤的最大直径 (a) 和最大宽径 (b)。当肿瘤生长至第 22 天, 直径约 1.5~2 cm 时, 随机将 40 只大鼠分为 4 组, 即对照组、热疗组、化疗组、热化疗组各 10 只。对照组瘤体内注射 0.3 ml 生理盐水 (室温 27°C); 热疗组瘤体内注射 0.3 ml 热生理盐水 (43°C) 后用 2450 MHz 微波对准瘤体辐射, 每次 20 min, 隔日 1 次, 共 5 次; 化疗组用多柔比星 (阿霉素) 0.3 mg (0.3 ml) 作瘤体内注射, 隔日 1 次, 共 5 次; 热化疗组瘤体内注射 0.3 ml (0.3 mg) 多柔比星 (43°C) 热化疗液后, 用 2450 MHz 微波对准瘤体辐射, 约 20 min, 隔日 1 次, 共 5 次。治疗结束后第 2 天, 经大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥 (35 mg/kg) 麻醉大鼠, 在无菌条件下取出皮下 C6 细胞移植瘤组织, 摄像, 于分析天平上称量后, 置入 4% 中性甲醛中固定, 并常规石蜡包埋。

1.3 免疫组织化学染色方法 将胶质瘤石蜡标本块切片, 5 μm 厚, 贴于经多聚赖氨酸浸泡过的载玻片上。用二甲苯脱蜡后常规梯度乙醇水化。切片浸泡于柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 置于医用微波炉 (92~98°C) 中加热 15 min。根据实验设计, 每例标本 2 张切片, 分别滴加 1 滴 PCNA 单抗、IGF-I 单抗、VEGF 单抗和 FVIII-RA 抗体; 阴性对照片 1 张, 滴加 1 滴 PBS 液。放置于 4°C 冰箱中过夜 (12~15 h) 或在室温下孵育 1~2 h。详细步骤严格按 S-P 试剂盒说明进行。DAB 显色。苏木精溶液轻度复染细胞核, PCNA 以细胞核呈现棕黄色为阳性细胞,

IGF-I 以细胞质出现棕黄色为阳性细胞, VEGF 以胞质或胞膜呈棕黄色或浅黄色为阳性细胞。随机观察 10 个高倍视野, 计数阳性细胞百分比。

微血管计数: 在 40 倍物镜下, 根据 FVIII-RA 标记的血管内皮细胞, 在切片的不同方位选取 5 个视野, 计数微血管的量, 求其平均值作为微血管密度 (microvessels density, MVD)。

1.4 透射电镜下肿瘤相关指标的观察和检测 各实验组分别选 2 只动物, 在称量前迅速切取大小约 0.5~1 mm³ 的肿瘤组织标本, 称量后立即浸入预冷的 2.5% 戊二醛前固定液中, 固定 4~12 h 后用 1% 锇酸磷酸缓冲液进行后固定, 多次漂洗后, 梯度乙醇逐级脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后, 在日立 H-600 型透射电镜下观察肿瘤细胞和微血管结构的变化。

1.5 统计学处理 测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数采用方差分析, 相关分析采用直线回归分析。

2 结果

2.1 皮下胶质瘤生长曲线 根据测量的肿瘤最大直径 a 和最大宽径 b 值, 按公式计量其体积 (V), $V = a \times b^2 / 2$, 绘制生长曲线 (图 1)。从曲线可以看出, 对照组瘤体随瘤龄延长其体积明显增大; 热疗后瘤体缩小; 化疗组瘤体也缩小; 热化疗后, 瘤体缩小更明显。瘤体生长均受到抑制。肿瘤接种后第 32 天 (治疗第 10 天), 对照组、热疗组、化疗组、热化疗组的瘤体质量分别为 (2.95 ± 0.36) 、 (1.95 ± 0.34) 、 (1.86 ± 0.40) 、 (1.09 ± 0.21) g。结果表明热化疗组瘤体较其他组均有减轻 ($P < 0.01$); 热疗、化疗组较对照组也明显减轻 ($P < 0.01$); 而热疗组与化疗组比较无显著差异。

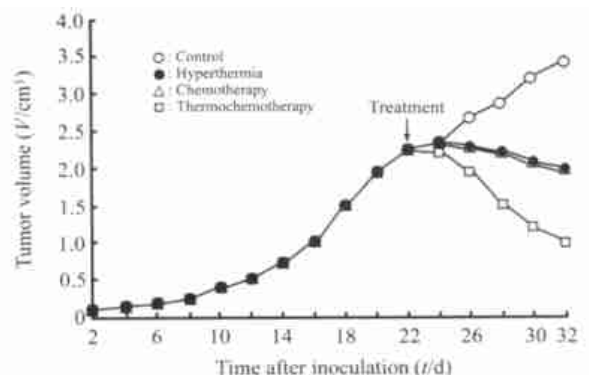


图 1 各组皮下胶质瘤生长曲线

Fig 1 Growth curve of subcutaneous gliomas in different groups

2 2 PCNA、IGF-Ⅰ、VEGF 蛋白表达与MVD 计数 热疗、化疗、热化疗后 PCNA、IGF-Ⅰ、VEGF 蛋白表达与MVD 均较对照组表达降低 ($P < 0.01$)。热化疗组 PCNA 和 IGF-Ⅰ 蛋白表达 VEGF 蛋白表达与MVD 较热疗或化疗组降低 ($P < 0.01$)。而热疗与化疗组 PCNA、IGF-Ⅰ、VEGF 蛋白表达与MVD 比较,无统计学意义。见表 1。进行直线回归分析后,发现 VEGF 蛋白表达与MVD 间存在正相关性($r = 0.9798, P < 0.001$)。

表 1 各组 PCNA、IGF-Ⅰ、VEGF 蛋白表达及MVD 计数
Tab 1 PCNA, IGF-Ⅰ, VEGF protein expression andMVD in different groups

(n= 10, $\bar{x} \pm s$)				
Group	PCNA (%)	IGF-Ⅰ (%)	VEGF (%)	MVD
Control	74.19±12.12	39.25±12.02	48.85±11.25	19.26±11.05
Hyperthermia	45.42±10.21**△△	22.22±10.25**△△	36.22±10.26**△△	11.29±8.20**△△
Chemotherapy	46.25±11.96△△	24.26±10.28△△	40.27±10.52△△	15.24±8.89△△
Themochemotherapy	22.29±7.26**	16.28±8.22**	29.26±9.82**	7.21±4.52**

** $P < 0.01$ vs control; △△ $P < 0.01$ vs themochemotherapy

2 3 透射电镜观察 对照组肿瘤细胞生长活跃,可见病理性核分裂象(图 2A)。凋亡细胞在治疗各组中均可找到。早期凋亡细胞核中染色质不规则凝聚,形成不均匀的团块,核膜伸出指状突起,胞质中可见到完整细胞器。典型的凋亡细胞胞质浓缩,胞膜包绕胞质内容物后伸出小泡,并脱落为凋亡小体。治疗组血管减少,血管外径变小,血管壁变厚,有的血管甚至只能发现完整的基膜而缺乏内皮细胞;血管内皮细胞间紧密连接增多,而细胞连接间隙减小。热疗或热化疗后,特别是间断加热 5 次后,肿瘤细胞数量明显减少,坏死或凋亡后的肿瘤细胞被增生的胶原纤维细胞所替代(图 2B~2D)。

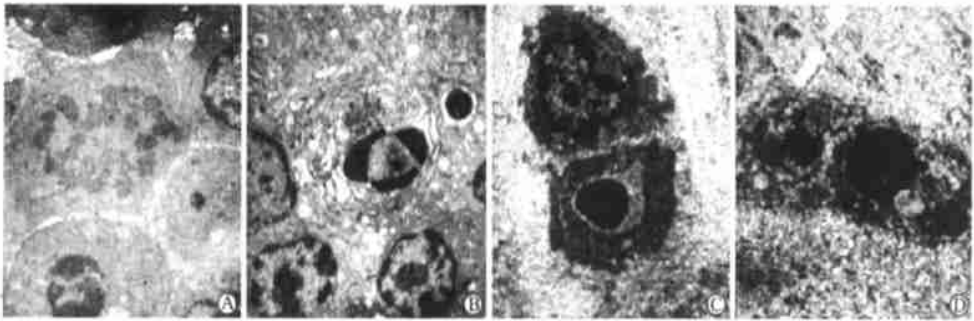


图 2 各组肿瘤透射电镜观察
Fig 2 TEM of tumor in different groups

A: Control group. Endomitosis was clearly visible in rapidly growing gliomas($\times 6000$); B: Chemotherapy group. Apoptosis with nuclear chromatin condensation, fragmentation, cell shrinkage and budding were clearly visible after treatment in rat gliomas($\times 6000$); C: Hyperthermia group. Glioma cells and the volume of tumor were decreased. The vessel diameter became smaller and basic membrane became thicker($\times 6000$); D: Themochemotherapy group. Tumor microvessel density was decreased. The vessel diameter became smaller and basic membrane became thicker. There were no vascular endothelial cells in tumor microvessels($\times 8000$)

3 讨论

PCNA 是一种相对分子质量为 36 000 的多肽,仅在增殖细胞中合成与表达,作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,直接参与 DNA 的合成。在细胞周期的 G₁ 后期 PCNA 合成增加, S 期达到高峰, G₂ 期开始下降,而在 M 期与 G₀ 期几乎无 PCNA 合成。PCNA

指数越高,处于 S 期的细胞越多,染色体排列紊乱的危险性愈高^[6]。胶质瘤的临床病理恶性程度增高, PCNA 指数也增高。因此被用于研究恶性肿瘤的细胞增殖和判断其恶性程度,对肿瘤的治疗及预后的判断有重要意义。本实验肿瘤生长曲线及形态学观察显示热疗、化疗、热化疗均使瘤体缩小,质量减轻,且热化疗有协同作用($P < 0.01$)。热疗或热化疗后,

特别是间断加热 5 次后, 肿瘤细胞数量明显减少, 坏死或凋亡后的肿瘤细胞被增生的胶原纤维所替代。胶质瘤经热疗、化疗、热化疗后 PCNA 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 且热化疗组 PCNA 表达降低更明显 ($P < 0.01$)。推测热化疗抑制肿瘤增殖的机制可能是抑制 PCNA 的合成与表达, 从而也就抑制了 DNA 合成, 阻止肿瘤细胞质和细胞核的复制, 抑制细胞有丝分裂。

IGF-Ⅰ 是细胞增殖的多功能调控因子, 由 70 个氨基酸的多肽组成。正常体内主要由肝脏合成, 大部分存在于血液, 与特异性蛋白 (IGFBP) 结合的形式存在。IGF-Ⅰ 通过 IGF-Ⅰ 受体 (IGF-ⅠR) 介导, 在细胞转化和肿瘤生长中起着潜在有丝分裂原和抗凋亡的作用^[7], 继而导致肿瘤形成和生长。本实验结果表明热化疗组 IGF-Ⅰ 表达降低更明显 ($P < 0.01$)。也就证实热化疗可能抑制肿瘤细胞自分泌或旁分泌的 IGF-Ⅰ 合成与表达, 从而达到抑制肿瘤细胞有丝分裂与分化, 起到治疗肿瘤的作用。

VEGF 是由相对分子质量相似的两个亚单位通过二硫键连接的同源二聚体糖蛋白, 分子量为 34 000~45 000。VEGF 可特异性地作用于血管内皮细胞膜上的两种酪氨酸激酶受体 Flt-1 和 Flk-1/KDR, 介导细胞内酪氨酸激酶磷酸化, 从而发挥其促进血管内皮细胞分裂增殖, 诱导血管形成和增加血管通透性的作用, 与肿瘤的生长、浸润和转移密切相关^[8]。本实验发现各实验组 VEGF 均降低 ($P < 0.01$), 且热化疗组 VEGF 降低更明显 ($P < 0.01$), 提示热化疗能抑制肿瘤细胞合成与分泌 VEGF, 一方面减少 VEGF 对血管内皮细胞刺激所引起的过度增生, 另一方面也减少肿瘤自分泌 VEGF, 抑制肿瘤细胞自身的增殖。

为了深入探讨 VEGF 促血管内皮细胞的作用以及热化疗的治疗机制, 我们选用 FVIII-RA 免疫组化染色来标记血管内皮细胞, 以微血管密度 (MVD) 作为定量检测指标, 判断 VEGF 与胶质瘤血管之间的相关性。Kim 等^[9]将 G55 胶质瘤细胞注入裸鼠体内 1 周后, 通过腹腔注射给予各种剂量的 VEGF 单克隆抗体及对照抗体, 结果证实 VEGF 抗体用 100 mg 治疗时使肿瘤质量减少 80%, 血管密度亦相应减少。本实验研究提示胶质瘤经热疗、化疗、热化疗后血管密度均有不同程度的降低 ($P < 0.01$), 且热

化疗后肿瘤血管密度降低更明显 ($P < 0.01$)。经 VEGF 蛋白表达与 MVD 间直线回归分析后, 提示热化疗治疗胶质瘤后, 肿瘤 VEGF 合成与分泌明显减少, 血管再生受到明显抑制 ($P < 0.001$)。这说明热化疗治疗胶质瘤也通过减少肿瘤的 VEGF 合成和分泌, 破坏与减少肿瘤血管再生, 达到抑制肿瘤增殖的治疗作用。

【参考文献】

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] Liu RY. Proliferative potential and apoptosis in rat glioma cell lines after hyperthermia[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1998, 38(4): 196-201.
- [3] 方胜, 袁先厚, 裴永恩, 等. 热化疗诱导胶质瘤细胞凋亡的实验研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(4): 199-202.
Fang S, Yuan XH, Pei YE, et al. C6 glioma cell apoptosis induced by hyperthermia combined with antineoplastic agents in vitro[J]. *Zhonghua Wuli Yixue Yu Kangfu Zazhi (Chin J Phys Med Rehabil)*, 2002, 24(4): 199-202.
- [4] 方胜, 袁先厚, 裴永恩, 等. 脑胶质瘤手术加局部热化疗研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(7): 408-411.
Fang S, Yuan XH, Pei YE, et al. A study on the therapeutic effect of thermochemotherapy for patients with glioma[J]. *Zhonghua Wuli Yixue Yu Kangfu Zazhi (Chin J Phys Med Rehabil)*, 2002, 24(7): 408-411.
- [5] 方胜, 王晓霞, 裴永恩, 等. 局部热化疗对鼠胶质细胞移植瘤细胞增殖及其蛋白表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25(5): 263-266.
Fang S, Wang XX, Pei YE, et al. Effects of localized thermochemotherapy on cellular proliferation and the expression of PCNA and IGF-Ⅰ protein of C6 gliomas in rat[J]. *Zhonghua Wuli Yixue Yu Kangfu Zazhi (Chin J Phys Med Rehabil)*, 2003, 25(5): 263-266.
- [6] Mottolese M, Natali PG, Coli A, et al. Comparative analysis of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor expression in glial tumours: correlation with histological grading[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(3B): 1951-1956.
- [7] Werner H. Dysregulation of the type IGF receptor as a paradigm in tumor progression[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 141(1-2): 1-5.
- [8] Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(6): 613-627.
- [9] Kim JK, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 841-844.

【收稿日期】 2003-12-08

【修回日期】 2004-04-08

【本文编辑】 孙岩