第二军医大学学报 2010年5月第31卷第5期 http://www.ajsmmu.cn
Academic Journal of Second Military Medical University, May 2010, Vol. 31, No. 5

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00504

·论 著·

一氧化氮释放型阿司匹林对荷瘤小鼠前列腺癌血管形成的抑制作用

程继文,蒙清贵,陆浩源,王植柔,白先忠*
广西医科大学附属肿瘤医院泌尿外科,南宁 530021

[摘要] **目的** 探讨一氧化氮释放型阿司匹林(NO-ASA)对小鼠皮下种植前列腺癌的生长及肿瘤血管形成的抑制作用。**方法** 皮下荷前列腺癌小鼠体内注射NO-ASA后监测肿瘤生长情况;处死小鼠后以ELISA法检测小鼠血清VEGF的表达,实时定量PCR法检测肿瘤中VEGF mRNA的表达,免疫组化法检测肿瘤中CD34的表达并量化微血管数目,以未注射NO-ASA的皮下荷前列腺癌小鼠为对照。受精鸡胚尿囊膜(HET-CAM)试验检测NO-ASA在体外对血管形成的影响。**结果** 小鼠体内注射NO-ASA后皮下种植的前列腺癌的生长受到抑制,小鼠血清以及肿瘤组织的VEGF表达明显降低,肿瘤组织中的CD34表达减少,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。NO-ASA对受精鸡卵尿囊膜上的血管生长也有明显抑制作用。**结论** NO-ASA可抑制前列腺癌肿瘤生长和血管形成。

[关键词] 前列腺肿瘤;一氧化氮释放型阿司匹林;血管生成;血管内皮生长因子
[中图分类号] R 737.25 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2010)05-0504-04

Inhibitory effect of nitric oxide-donating aspirin against prostatic cancer angiogenesis in tumor-bearing mice

CHENG Ji-wen, MENG Qing-gui, LU Hao-yuan, WANG Zhi-rou, BAI Xian-zhong*
Department of Urinary Surgery, Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

[**Abstract**] **Objective** To study the inhibitory effect of nitric oxide-donating aspirin(NO-ASA) on prostatic cancer growth and angiogenesis in subcutaneously-injected tumor in mice. **Methods** The tumor-bearing mice were subcutaneously injected with NO-ASA, and the tumor growth was observed. ELISA was used to assay the expression of VEGF in mouse sera; real-time PCR was used to examine the expression of VEGF mRNA in tumor tissues; immunohistochemistry was used to detect CD34 expression and to quantify the number of microvessels in the tumor; and Hen's egg test chorioallantoic membrane (HET-CAM) was employed to detect the *in vitro* angiogenesis. **Results** NO-ASA inhibited the prostate cancer growth in mice. The expression of VEGF was greatly decreased in the serum and tumor tissues, and CD34 expression was significantly decreased in the tumor tissues compared with the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). NO-ASA also greatly inhibited the angiogenesis in HET-CAM. **Conclusion** NO-ASA can inhibit prostate cancer growth and angiogenesis.

[**Key words**] prostatic neoplasms; nitric oxide-donating aspirin; angiogenesis; vascular endothelial growth factor
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5): 504-507]

通过抑制肿瘤血管生成来抑制肿瘤生长的治疗策略在肺癌、胃癌等多种肿瘤中已有临床应用,而在前列腺癌中尚缺乏相关的成熟方案,而且基础研究不多。目前的研究表明,一氧化氮(NO)释放型阿司匹林(NO-donating aspirin, NO-ASA)是很有前景的具有抑制肿瘤血管生成作用的非甾类抗炎药[1]。NO-ASA有3种异构体[2],分别为meta-、ortho-、para-NO-ASA,其中para-和ortho-两种NO-ASA的作用效果相近且都优于meta-NO-ASA。已有报道显示NO-ASA在结肠癌、胰腺癌等多种肿瘤中有较好的抑制肿瘤生长的作用[3-5]。鉴于此,本研究以腋窝皮下种植前列腺癌RM-1细胞成瘤C57小鼠为研究对象,观察NO-ASA对肿瘤及肿瘤血管的抑制作用,为寻找前列腺癌治疗新思路提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 *动物及试剂* 小鼠前列腺癌细胞株RM-1购自上海麦莎生物科技有限公司,动物许可号:SCXX(沪)2007-0005。6周龄雄性C57小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,体质量(22±2)g,标准条件

[收稿日期] 2009-12-09 [接受日期] 2010-01-29
[基金项目] 广西青年科学基金(0991075). Supported by Science Foundation for Young Scientists of Guangxi (0991075).
[作者简介] 程继文,硕士,主治医师. E-mail: chengjiwen1977@vip.sina.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0771-5308334, E-mail: xzbai@peoplemail.com.cn

饲养。NO-ASA、小鼠抗人血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒购自 Sigma 公司。抗鼠 CD34 单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司。VEGF、β-actin 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。TRIzol RNA 提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。50～60 g SPF 级受精鸡卵购于北京梅里亚维通实验动物技术有限公司,RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司。

1.2 细胞培养 小鼠前列腺癌 RM-1 细胞,采用 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 5%CO_2、饱和湿度下 37℃的培养箱中培养,2～3 d 换液 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 实验分组和模型制备 将 16 只小鼠随机分实验组和对照组(n=8)。每只小鼠于腋窝皮下接种 RM-1 细胞 1×10^6个。接种肿瘤细胞 1 周后开始经尾静脉注射给药,每周 2 次,共 6 次。实验组每只小鼠单次给予浓度为 1.5 mol/L 的 NO-ASA(para-型)200 μl;对照组给予等量的生理盐水。于第 21 天处死小鼠后完整剥离肿瘤并测定肿瘤的体积、质量;将肿瘤分为 2 份,于液氮冻存及制备石蜡标本。

1.4 免疫组化法测定皮下种植瘤微血管密度 采用 CD34 二步免疫组化法(SP 法),按试剂说明书操作。先于 100 倍光镜下寻找肿瘤中心微血管密度最高的 3 个区域,在 200 倍镜下计算肿瘤微血管数目的均值。计数黄染形成环形的内皮细胞,本过程按盲法操作。

1.5 ELISA 法测定小鼠血清中 VEGF 含量 小鼠处死前眼球取血置于 1.5 ml 离心管中,常温下静置 30 min,1 760×g 离心 5 min,收集上清置－70℃超低温冰箱保存,检测前按 1∶40 稀释,依照 ELISA 试剂盒操作流程测定血浆 VEGF 浓度。

1.6 实时定量 PCR 检测小鼠皮下种植瘤 VEGF 的表达 小鼠 VEGF 上游引物 5′-GAA CGC TTG CCT TAT GAT-3′,下游引物 5′-TGC TCC CTC TTT CAA CAT-3′;内参 β-actin 上游引物 5′-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3′,下游引物 5′-CGG ACT GTT ACT GAG CTG CGT TTT A-3′。反应条件:PCR 活化 95℃ 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s(信号检测),循环 40 次。

1.7 体外受精鸡卵尿囊绒膜试验(HET-CAM)检测血管形成 将受精鸡卵 20 只分为实验组和对照组(n=10)。先在气室顶端打 1～2 mm 小孔,然后在距胚头前 1 cm、两条卵黄静脉之间的卵壳投影部位(或正对鸡胚的位置),用铅笔画出 1 cm ×1.5 cm 长方形区,75%乙醇消毒后,用牙科细砂轮沿长方形取得边线磨切透卵壳,用眼科镊子揭去长方形蛋壳,剪除长方框内的卵壳膜。选近胚头 1 cm 处两条前卵黄静脉之间的相对无血管区,将无菌明胶海绵小块(2 mm ×2 mm ×2 mm)若干,分别浸入 1.5 mol/L 的 NO-ASA(实验组)和生理盐水(对照组)中,使之充分饱和,然后置于相对无血管区,用透明胶纸封闭卵壳口,37℃孵育 2 d 后观察鸡胚血管生长情况。

1.8 统计学处理 实验结果使用 GraphPad Prism 4 软件自动进行统计分析。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 检测肿瘤的成瘤性 16 只小鼠均成瘤,成瘤率为 100%,在 RM-1 细胞接种 14 d 时可触及肿瘤。各组小鼠实验期间精神、饮食正常,实验结束时 16 只小鼠均存活。于第 21 天处死小鼠,肿瘤完整剥离后,可见实验组的肿瘤明显小于对照组(图 1),对照组和实验组的肿瘤平均质量分别为(1.49±0.15)、(1.07±0.21)g,体积分别为(2.43±0.27)、(1.94±0.19) cm^3,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 肿瘤组织中 CD34 表达情况 图 2 显示,实验组的肿瘤组织与对照组相比其微血管形成明显减少,对照组新生微血管与实验组新生血管的数目分别为每个视野(11.64±3.87)、(3.86±1.77)个,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 NO-ASA 对小鼠血清和肿瘤组织内 VEGF 表达的影响 注射 NO-ASA 后,血清 VEGF 蛋白的表达明显下降,ELISA 结果显示对照组与实验组血清中 VEGF 分别为(1.12±0.22)、(0.61±0.11)ng/ml,两组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤组织中 VEGF mRNA 表达结果与小鼠血清 VEGF 的表达相似,对照组与实验组 VEGF mRNA 的表达分别为 0.84±0.27、0.24±0.14,组间差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 HET-CAM 试验检测 NO-ASA 对鸡胚血管形成的影响 图 3 表明实验组的血管明显少于对照组。在此基础上我们将直径≥2 mm 的主支血管和第一分支血管称为Ⅰ级血管,直径<2 mm 的第一分支血管称为Ⅱ级血管,对鸡胚血管图进行量化得到对照组与实验组Ⅰ级血管＋Ⅱ级血管总量分别为(35±9)、(16±5)个,结果也显示实验组的血管明显少于对照组($P<0.05$)。

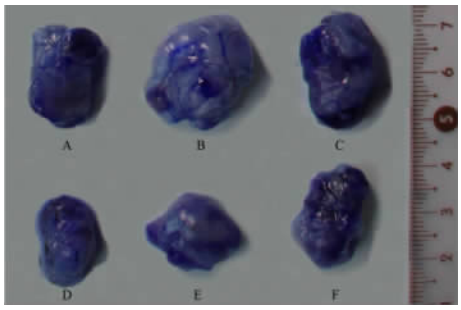

图 1　NO-ASA 对皮下种植瘤大小的影响

Fig 1　Effect of nitric oxide-ASA on tumor size

NO-ASA：Nitric oxide-donating aspirin. A-C：Control group；D-F：NO-ASA treatment group

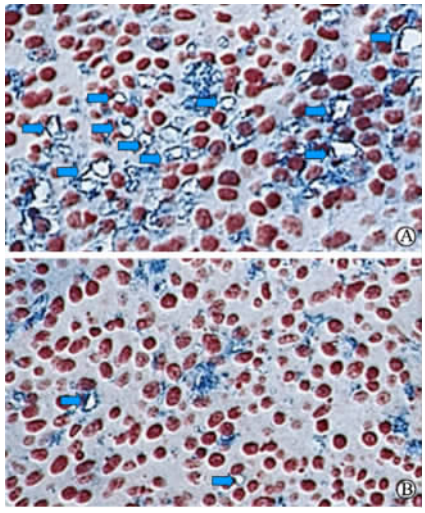

图 2　对照组(A)与实验组(B)肿瘤组织 CD34 染色情况

Fig 2　CD34 expression in control (A) and NO-ASA treatment(B) group(SP)

NO-ASA：Nitric oxide-donating aspirin. Arrows showing the angiogenesis. Original magnification：×200

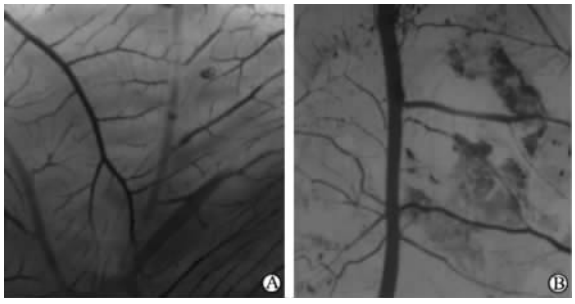

图 3　HET-CAM 法检测 NO-ASA 体外对血管形成的影响

Fig 3　Effect of NO-ASA on *in vitro* angiogenesis by HET-CAM

NO-ASA：Nitric oxide-donating aspirin. A：Control group；B：NO-ASA treatment group

3　讨　论

NO 生理功能广泛，许多病理过程与缺乏 NO 有关。这一事实构成了 NO 替代治疗的生理学基础。药理上将 NO 连接到药物分子上获得释放 NO 的药物，例如 NO-非甾类消炎药[6-7]和 NO 释放型他汀类药物[8]等。研究表明 NO-ASA 很有希望作为一种抑癌剂或一线化疗药物辅助剂应用于临床，目前已经发现其对胰腺癌、结肠癌、肺癌和舌癌细胞等有抑制作用。研究表明 NO-ASA 防治肿瘤的作用机制可能有以下几个方面：(1)通过氧化应激反应诱导细胞凋亡，如调节器官组织当中的一氧化氮合酶的作用，间接调节肿瘤的生长[9]；(2)抑制癌细胞的 COX 活性[10-11]；(3)影响多种信号转导途径，如有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的活化[12]；(4)减少核受体过氧化物酶体增殖物激活受体的表达[13]。但其具体的抑癌机制目前还没有得到充分阐明。

本实验中我们发现，给予荷瘤小鼠注射 NO-ASA 后可以影响肿瘤的生长，肿瘤体积相对于对照组明显缩小；同时我们发现肿瘤组织中的微血管生成减少，表现为组织切片 CD34 染色的血管内皮细胞减少，提示 NO-ASA 的抑癌作用可能与血管生成抑制有关。VEGF 是一种重要的与血管生成有关的细胞因子，它的高表达不仅可以直接促进微血管的形成，也可以上调或影响其他与血管生长相关的细胞因子的表达，如血管生成素、IL-6、IL-8、TGF-β、MCP-1 等[14]，检测 VEGF 表达情况可间接提示 NO-ASA 对血管生成的作用。Ouyang 等[15]在人结肠癌 HT-29 小鼠移植模型中也证实，NO-ASA 可以影响结肠癌移植瘤中 VEGF 的表达。我们后续的实验在前列腺癌动物移植模型中也得到了相似的结论(资料待发表)，进而证实了这种推测：NO-ASA 通过抑制小鼠体内或肿瘤内 VEGF 的表达，影响了肿瘤部位微血管的生成，导致肿瘤营养代谢受限制，进而影响肿瘤细胞的生长，从而发挥了抑癌作用。由于 NO 与炎症之间可以相互影响、相互调控，而炎症又与肿瘤的血管形成密切相关，因此我们猜想 NO-ASA 对血管的作用可能是通过炎症介导来实现的，但尚需进一步的研究予以证明。

[参 考 文 献]

[1] Yeh R K, Chen J, Williams J L, Baluch M, Hundley T R, Rosenbaum R E, et al. NO-donating nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) inhibit colon cancer cell growth more potently than traditional NSAIDs: a general pharmacological property[J]? Biochem Pharmacol, 2004, 67: 2197-2205.

[2] Kashfi K, Borgo S, Williams J L, Chen J, Gao J, Glekas A, et al. Positional isomerism markedly affects the growth inhibition of colon cancer cells by nitric oxide-donating aspirin *in vitro* and *in vivo*[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312: 978-988.

[3] Williams J L, Nath N, Chen J, Hundley T R, Gao J, Kopelovich L, et al. Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention[J]. Cancer Res, 2003, 63: 7613-7618.

[4] Spiegel A, Hundley T R, Chen J, Gao J, Ouyang N, Liu X, et al. NO-donating aspirin inhibits both the expression and catalytic activity of inducible nitric oxide synthase in HT-29 human colon cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70: 993-1000.

[5] Hundley T R, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth *via* mitogen-activated protein kinase activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316: 25-34.

[6] Rigas B. The use of nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of colorectal neoplasia[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2007, 23: 55-59.

[7] Williams J L, Kashfi K, Ouyang N, del Soldato P, Kopelovich L, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits intestinal carcinogenesis in Min (APC (Min/+)) mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313: 784-788.

[8] 万 英，陈传意，周剑涛，邱雄泉. 释放一氧化氮型他汀类药的血管保护作用[J]. 西北药学杂志，2006，21：190-191.

[9] Gao J, Liu X, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 17207-17212.

[10] Ouyang N, Williams J L, Tsioulias G J, Gao J, Iatropoulos M J, Kopelovich L, et al. Nitric oxide-donating aspirin prevents pancreatic cancer in a hamster tumor model[J]. Cancer Res, 2006, 66: 4503-4511.

[11] Rao C V, Reddy B S, Steele V E, Wang C X, Liu X, Ouyang N. et al. Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxym ethane-treated rats: effects on molecular targets[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 1530-1538.

[12] Hundley T R, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth *via* mitogen activated protein kinase activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316: 25-34.

[13] Ouyang N, Williams J L, Rigas B. NO-donating aspirin isomers downregulate peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) delta expression in APC(min/+) mice proportionally to their tumor inhibitory effect: implications for the role of PPAR delta in carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2006, 27: 232-239.

[14] Forooghian F, Das B. Anti-angiogenic effects of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1α[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 144: 761-768.

[15] Ouyang N, Williams J L, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits angiogenesis by suppressing VEGF expression in HT-29 human colon cancer mouse xenografts[J]. Carcinogenesis, 2008, 29: 1794-1798.

[本文编辑] 尹 荼

· 消 息 ·

我校“世界卫生组织基因合成与表达合作中心”获准进入Ⅱ期建设

依托我校基础部病原生物学教研室的“世界卫生组织基因合成与表达合作中心”(以下简称“合作中心”)，经过第一个任期(2005－2009 年)的建设，完成了指定建设任务，达到了预期目标。

根据 WHO 规定，世界卫生组织合作中心在一个任期结束后需提出第二个任期申请，并经过 WHO 总部和西太平洋地区委员会评审获准后，方可再任命。据此，“合作中心”主任潘卫庆教授于 2008 年底赴日内瓦 WHO 总部进行了工作汇报，并于 2009 年初递交了第二个任期的申请。

WHO 负责该“合作中心”的部门(疫苗研发部，IVR)对“合作中心”前 4 年的工作总结和开展Ⅱ期建设的任务和目标进行了全面评估，并递交 WHO 西太平洋地区委员会进行评审。2009 年 7 月 28 日 WHO 西太平洋地区主任正式致函我校刘振全校长，同意该“合作中心”进入第二个任期建设，提出了Ⅱ期建设任务和目标。第二个任期时间为 2009 年 7 月 28 日至 2013 年 7 月 27 日。

“合作中心”Ⅱ期建设的主要任务包括：(1)利用“合作中心”已建立的技术平台，开展 WHO 优先的热带病疫苗研发，包括多价疟疾疫苗、血吸虫被膜蛋白疫苗等；(2)建立中国不同地区疟原虫种群遗传数据库，建立疟原虫溯源检测技术，为全球消除疟疾规划提供技术支持；(3)通过与“WHO 疫苗研发部”和“WHO 热带病培训和研究特别规划署”的合作，参与全球热带病研究与防治的合作网络；(4)举办分子生物学和生物技术在热带病研究中应用的各种培训班，为全球从事热带病研究或获得 WHO 资助的个人和实验室提供技术支持，特别是能为发展中国家或疾病流行地区的研究能力建设和提高提供支持。