

• 应用基础研究 •

重组人血管内皮生长抑制因子对人肺腺癌裸鼠移植瘤的放射效应影响*

程小峰[△], 高春玲[△], 谈文娟, 王笑良, 张蓓蓓, 张娇, 章志勇

361001 福建 厦门, 厦门大学附属成功医院(中国人民解放军第 174 医院)

放射治疗科(程小峰、高春玲、王笑良、张蓓蓓、张娇、章志勇)

361001 福建 厦门, 厦门大学医学院(谈文娟)

[摘要] 目的: 探讨重组人血管内皮抑制因子(recombinant human vascular endothelial growth inhibitor-192, rh-VEGI-192) 对人肺腺癌裸鼠移植瘤的放射增敏作用。方法: 采用原核表达 rhVEGI-192, 获得目的蛋白。通过肿瘤倍增时间, 计算药物的增敏系数。通过建立人肺腺癌裸鼠移植瘤模型, 荷瘤裸鼠随机分为 4 组: 对照组、10Gy、rh-VEGI-192、rhVEGI-192 + 10Gy。采用 6MV-X 线进行照射, 照射剂量为 10Gy。获得移植瘤标本, 利用免疫印迹法检测移植瘤中 VEGF (vascular endothelial growth factor) 的表达变化。结果: SDS 电泳结果显示, 目的蛋白位于 22kD 左右。10Gy 照射时, 重组人血管内皮抑制因子的 EF (enhancement factor) 值为 1.5。和空白对照组相比, rhVEGI-192 组和 10Gy 组移植瘤的生长受到抑制($P < 0.001$), rhVEGI-192 + 10Gy 组移植瘤生长显著抑制($P < 0.001$), rhVEGI-192 + 10Gy 组移植瘤较 10Gy 组有明显生长抑制。和空白组相比, rhVEGI-192 组 VEGF 表达减少, 而 10Gy 组 VEGF 表达变化不明显, rhVEGI-192 + 10Gy 组 VEGF 表达明显减少。rhVEGI-192 + 10Gy 和 rhVEGI-192 组相比, VEGF 表达减少。结论: rhVEGI-192 联合照射能够减少 VEGF 的表达。这可能是 rhVEGI-192 的增敏机制之一。

[关键词] 肺腺癌; rhVEGI-192; VEGF

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A doi: 10.3969/j.issn.1674-0904.2018.02.001

引文格式: Cheng XF, Gao CL, Tan WJ, et al. The effects of radiation effects of rhVEGI-192 for human lung adenocarcinoma nude mouse transplantation tumor [J]. J Cancer Control Treat, 2018, 31(2): 73-77. [程小峰, 高春玲, 谈文娟, 等. 重组人血管内皮生长抑制因子对人肺腺癌裸鼠移植瘤的放射效应影响 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2018, 31(2): 73-77.]

The Effects of Radiation Effects of rhVEGI-192 for Human Lung Adenocarcinoma Nude Mouse Transplantation Tumor*

Cheng Xiaofeng¹, Gao Chunling^{1△}, Tan Wenjuan², Wang Xiaoliang¹,
Zhang Beibei¹, Zhang Jiao¹, Zhang Zhiyong¹

(¹Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University & the 174th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Xiamen 361001, Fujian, China;

²Medical College of Xiamen University, Xiamen 361001, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the mechanism of radiosensitivity of rhVEGI-192 on human lung adenocarcinoma grafted in nude mice. **Methods:** Tumor-bearing model was established by injecting 973 cells to nude mice. Mice bearing tumor were randomly divided into four groups: control group, rhVEGI-192 group, radiation group, rhVEGI-192 + 10Gy group. In radiation group, mice were treated with 6MV X-ray on the tumor. A dose of 10 Gy was applied. VEGF which expressed in tumor are detected by western blot. **Results:** EF of rhVEGI-192 + 10Gy group were 1.5. Compared with control group, tumor growth in rhVEGI-192 group and 10Gy group was inhibited($P < 0.001$), tumor growth in rh-

VEGI-192 group + 10Gy group was inhibited significantly($P < 0.001$). Compared with 10Gy group, tumor growth in rh-VEGI-192 + 10Gy group was inhibited significantly ($P < 0.001$). Compared with control group, VEGF level were decreased in rhVEGI-192 group, rhVEGI-192 + 10Gy group.

[收稿日期] 2017-04-21 **[修回日期]** 2017-11-25

[基金项目] * 中国人民解放军南京军区医学科技创新项目(编号: No. 12MA061)

[通讯作者] [△]高春玲, E-mail: chunlinggao@sina.com

VEGF level were the same with 10Gy group. Compared with rhVEGI-192 group, VEGF level was decreased in rhVEGI-192 + 10Gy group. **Conclusion:** rhVEGI-192 + radiation can decrease mouse tumor VEGF level, down-regulation VEGF is the radioenhancement mechanism of rhVEGI-192.

[Key words] Lung adenocarcinoma; rhVEGI-192; VEGF

血管内皮抑制因子(VEGI)是一种新型的抗血管生成抑制剂,能够凋亡增殖的血管内皮细胞,抑制新生血管形成。VEGI 主要由血管内皮细胞和树突状细胞分泌,为多功能性小分子蛋白,发挥抑制新生血管形成的功能^[1-2]。VEGI 有 3 种同工型,最早发现的 VEGI-174,又称为 TL1,后来又发现了由全长基因序列编码的 VEGI-251 (TLIA) 和 VEGI-192 这 3 种同工型在结构和功能上均具有一定的差异。可溶性的 VEGI 对结肠癌等恶性肿瘤表现出较好的反应率。体外实验表明,VEGI 能显著抑制牛动脉内皮细胞与人脐静脉内皮细胞的增殖。此外,VEGI 还能抑制内皮细胞形成血管状结构。体内实验研究显示,VEGI 蛋白的胞外区(23~174 位氨基酸)显著抑制同系移植的大肠癌 MC-38 的生长,且肿瘤血管化程度显著降低;同样,在浆细胞瘤异体肿瘤移植模型中,以上 VEGI 胞外区可有效抑制异体移植的肿瘤生长^[3]。

VEGI-192 是最晚被发现的 VEGI 亚型,能强有力地抑制新生血管生成,显著抑制肿瘤生长,并且对肝肾几乎无毒性^[4]。Wu 等^[5]研究发现无论在体或者体外,VEGI-192 都能够有效的抑制 MDA-MB-435 乳腺癌细胞的增殖。在本研究中,我们试图通过 973 肺腺癌裸鼠移植瘤模型,评估 rhVEGI-192 对放射线有无增敏效应,并初步研究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物及细胞株

雄性裸鼠 4~5 周龄,体重 20g 左右,购自厦门大学实验动物中心。研究获得厦门大学医学院医学伦理委员会同意,动物饲养及给药处理严格遵守国家动物饲养和使用安全规范。rhVEGI-192 菌株由李鲁远教授惠赠,蛋白由实验室自主提取。细胞株为 973 细胞株,厦门大学抗癌研究中心惠赠。

1.2 rhVEGI-192 的制备

将融化后的细菌轻轻吹吸混匀,向每个离心管中加入 50ul 细菌和 500ul 高压无菌的 LB(Luria-Bertani broth) 培养基中,混匀后置于 37℃,50rpm 培养 1h,使细菌复苏。将已复苏的细菌轻轻吹吸混匀,吸取 200ul 转接到 200ml 含有氨苄西林(50ug/ml)的 LB 培养基,混匀后置于 28℃,200rpm,培养过夜。

从摇床中取出锥形瓶,向 LB 培养基中加入诱导剂(isopropylthio-galactoside),混匀后置于 37℃,2000rpm 培养 2h。破碎菌体,溶解包涵体。用 10 倍沉淀重量的洗涤缓冲液(PH 8.0)重悬,8000rpm 4℃,离心 20min,弃上清,可重复此过程 6~8 次。用 8M 尿素的裂解液(PH 8.0)溶解包涵体。离心,保留上清,将包涵体溶液和镍柱(Ni-Agarose)混合,然后用洗涤缓冲液洗涤杂蛋白。最后用洗脱缓冲液先进行洗脱并收集目的蛋白。将装有目的蛋白溶液的生物透析袋放入 4M 尿素溶液中透析 6h。将装有目的蛋白溶液的生物透析袋放入 2M 尿素溶液中透析 4h。将装有目的蛋白溶液的生物透析袋放入 1M 尿素溶液中透析 6h。将装有目的蛋白溶液的生物透析袋放入 0M 尿素溶液中透析 3h。rhVEGI-192 的浓缩与过滤后使用。

1.3 实验分组及给药方法

随机将 32 只小鼠分成 4 个实验组,每组 8 只:空白组;rhVEGI-192 组;10Gy 组;rhVEGI-192 + 10Gy 组。将呈指数增长的 973 细胞消化后制成浓度为 3×10^6 /mL 个细胞的悬液。每只鼠右下肢大腿皮下注入 0.1mL 细胞悬液,隔日观察,待移植瘤长足够大小入组。根据实验分组和裸鼠体重计算给药剂量,采用腹腔注射给药方法,rhVEGI-192 给药方式为 5mg/kg, d,用生理盐水稀释。根据实验分组方法和每只裸鼠体重计算给药剂量,然后腹腔注射已经稀释好的药液,对照组注射同等体积的生理盐水。当肿瘤直径增长至 0.5cm 时开始用药,每天 1 次,连续 14 天。

1.4 放射方法

采用 Varian 600 直线加速器 6MV-X 线放射。将荷瘤裸鼠装入一自制的有机玻璃盒内,并将其用橡皮圈固定在一塑料板上,肿瘤暴露在正中,裸鼠其他部分采用铅块遮挡,肿瘤表面放置 1.5cm 有机玻璃板,在直线加速器下进行放射。肿瘤直径长至 0.5cm 时分组,于给药第 7 天放射,放射剂量为 10Gy。

1.5 Western blot 检测细胞 VEGF 的表达

接种移植瘤的裸鼠在用药第 28 天,分别取各组的移植瘤标本。放在装有裂解液的研钵中研碎,然后冰上放置半小时。高速离心 30min,去掉沉淀,取

上清,测定蛋白浓度。电泳,转膜 5% 的脱脂奶粉封闭, TBST 洗 3 次,每次 5 分钟。加 VEGF 抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 5 分钟。加入 2 抗,室温孵育半小时, TBST 洗 3 次,每次 5 分钟。加入 AB 显影液,压片,曝光。通过测定 β -actin 浓度,来调节样品上样量。

1.6 统计方法

统计方法应用 SPSS11.5 软件计算,采用 Mann-whitney μ 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤鼠的一般情况

在整个实验过程中空白对照组裸鼠进食、活动未见异常, 5~6 只裸鼠右下肢肿瘤局部皮肤可见溃烂; 而单独照射和联合治疗组裸鼠活动及进食未受影响, 2~3 只裸鼠右下肢肿瘤皮肤溃烂现象。

2.2 目的蛋白的表达

本实验采用原核表达 rhVEGI-192,用包涵体经 Ni-Agarose 亲和层析纯化, SDS-PAGE 凝胶电泳扫描鉴定包涵体(图 1)。目的蛋白位于 22kD 左右(箭头所指)的位置,与预期结果相符。使用蛋白凝胶 Glyko BandScan 分析得到目的蛋白的纯度在 78% 以上。可以明确所纯化的蛋白为目的蛋白。

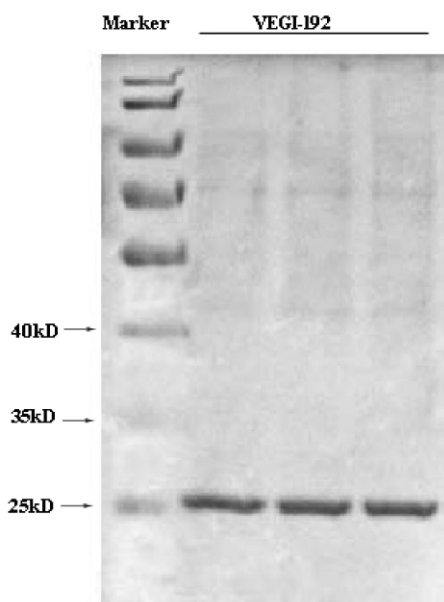


图 1 VEGI-192 纯化蛋白凝胶电泳图

2.3 重组人血管内皮生长抑制因子对肺腺癌移植瘤的放射增敏系数

如表所示, rhVEGI-192 + 10Gy 组的放射增敏系数为 1.5,证实 rhVEGI-192 有明显的放射增敏作用(见表 1)。

表 1 重组人血管内皮生长抑制因子对肺腺癌移植瘤的放射增敏作用

| 组别 | 肿瘤倍增时间 (天) | AGD | NGD | EF |
|---------------------|------------|-----|-----|-----|
| 空白对照组 | 2 | - | - | - |
| 10Gy 组 | 8 | 6 | - | - |
| rhVEGI-192 组 | 9 | 7 | - | - |
| rhVEGI-192 + 10Gy 组 | 17 | 15 | 9 | 1.5 |

倍增时间(T_d):移植瘤体积增至 2 倍所要的时间;绝对生长延迟时间(T_{AGD}):X 线照射组的移植瘤体积与空白对照组的移植瘤体积均增至 2 倍所需的时间之差;标准化生长延迟时间(T_{NGD}):X 线照射组 + 用药组移植瘤体积与单纯用药组移植瘤体积均增至 2 倍所需的时间之差;放射的增敏系数(EF):为 TNGD 与 TAGD 的比值,当 SER 的比值 > 1 时,说明有放射增敏作用。

2.4 重组人血管内皮生长抑制因子的移植瘤生长曲线

rhVEGI-192 组移植瘤的生长较空白对照组受到抑制($P = 0.000$),10Gy 照射组生长较空白对照组受到抑制($P = 0.000$),rhVEGI-192 + 10Gy 组移植瘤生长较空白组生长显著抑制($P = 0.000$),rh-VEGI-192 + 10Gy 组移植瘤较 10Gy 组有明显生长抑

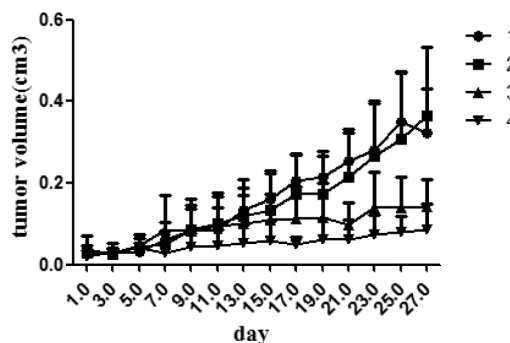


图 2 第 7 天照射 10Gy 各组肿瘤的生长曲线
1,空白组;2,10Gy 组;3,VEGI 组;4,VEGI-192 + 10Gy 组

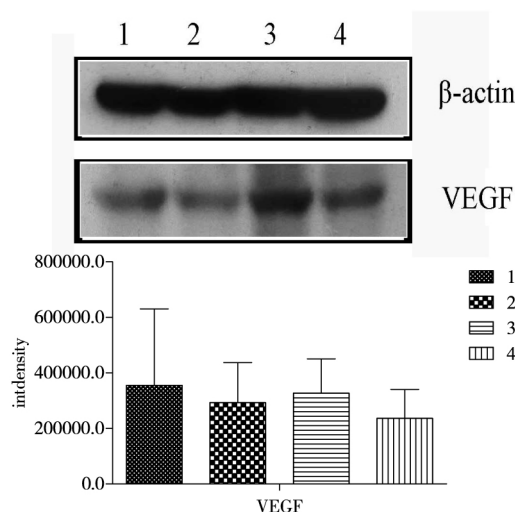


图 3 VEGF 表达分析

1. 空白组 2. rhVEGI-192 3. 10Gy 组 4. rhVEGI-192 + 10Gy

制 ($P = 0.000$)。根据各组裸鼠肿瘤体积 绘制移植瘤生长曲线(见图 2)。

2.5 Western blotting 检测 VEGF 蛋白的表达

通过 Western blotting 检测 VEGF 的表达,以 β -actin 作为参照,如图 3 所示,在 actin 相对等量的情况下,和空白组相比,10Gy 组表达变化不明显,rh-VEGI-492 表达减少,rhVEGI-492 + 10Gy 组和空白相比,表达更少(见图 3)。

3 讨论

自从 Folkman 教授发现肿瘤生长对血管的依赖现象后,关于血管靶向治疗增敏的研究一直不断被开发,并在近几年出现了井喷式的现象,不断有血管靶向药物被开发出来,其中代表性的药物有贝伐单抗,NRP-1 mAb,VEGI^[6-8]也是其中之一。Zhang 等^[9-11]研究发现 VEGI 能够通过激活 JNK-GATA3 信号通路,上调 miR-29b 抑制 VEGF 基因表达。Qi 等^[12]研究发现 TL1A 能够通过抑制内皮前体细胞而抑制血管生成。这些研究均发现 VEGI 对血管内皮的抑制作用。

本实验研究发现,VEGI 联合放疗组较单照组肿瘤有轻度生长抑制,证实了联合 VEGI 的放射增敏效果。进一步计算 VEGI-492 + 10Gy 组的放射增敏系数为 1.5,放射增敏系数大于 1,进一步证实 VEGI-492 和放疗联合对肺 973 移植瘤具有明显的放射增敏作用,起到了增敏的效果。

Western blotting 检测第 28 天肿瘤标本 VEGF 的表达,治疗组 VEGF 普遍下降,rhVEGI-492 联合照射组合 rhVEGI-492 单药组相比,VEGF 表达减少。说明联合应用进一步抑制了肿瘤细胞的 VEGF 的表达,起到了协同的作用。通过抑制 VEGF,使肿瘤的生长抑制更加明显。

目前恶性肿瘤放射增敏的机制主要有 4 种:增加肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞 DNA 修复效能,调控细胞周期检测,改善肿瘤细胞缺氧。有文献证实^[13]放疗能诱导肿瘤细胞 VEGF 表达。这种高表达提示肿瘤内部处于缺氧状态,肿瘤对放疗不敏感,而高表达的 VEGF 保护了血管内皮细胞免于放射致死性杀伤。为肿瘤进一步生长提供了可能。

VEGI 能够通过一系列通路调节 VEGF 水平。首先,TNFSF15 同时下调 mFlt1 和上调 sFlt1 在血管内皮祖细胞中的水平,从而调节 VEGF 和 PlGF 的表达。其次,VEGI 能够激活 P38 和 JNK 从而使增殖的血管内皮细胞凋亡。另外,VEGI 还能使 G0/G1

期的血管内皮细胞停滞在早 G1 期。同时,VEGI 能够抑制血管内皮祖细胞分化^[14]。达到抑制新生血管形成和重塑已有的血管^[15]。从而使肿瘤细胞的生长受到抑制。并且改善了肿瘤细胞内部的杂乱的血管情况。

Tian 等^[14]研究开发了 rhVEGI-492,显示 rh-VEGI-492 能够引起内皮细胞的凋亡,抑制内皮细胞的增值,从而抑制新生血管生成。本实验研究证实了 rhVEGI-492 的通过抑制 VEGF 发挥放疗增敏的作用。目前关于 VEGI,有进一步研究发现它能够通过增强免疫力抑制肿瘤生长^[16],并且血清中 VEGI 的水平对肿瘤的预后相关^[17],具体机制有待进一步研究。

作者声明:本文第一作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;

利益冲突:本文全部作者均认同文章无相关利益冲突;

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统学术不端检测;

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

[参考文献]

- [1] Ma WH, Shao YH, Yang WD, et al. Evaluation of 188Re-labeled NGR-VEGI protein for radioimaging and radiotherapy in mice bearing human fibrosarcoma HT-1080 xenografts [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(7): 9121-9129.
- [2] Maninder SV, David QS, Stephan RT, et al. Differential levels of TL1a affect the expansion and function of regulatory T cells in modulating murine colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(3): 548-559.
- [3] Tomasz JS, Tania FR, John RF, et al. Triggering of TNFRSF25 promotes CD81 T-cell responses and anti-tumor immunity [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(9): 2606-2611.
- [4] Itay L, Marianna Z, Amir A, et al. Directed evolution of a soluble human DR3 receptor for the inhibition of TL1A induced cytokine secretion [J]. *Plos One*, 2017, 12(3): e0173460.
- [5] Wu J, Jiang Y, Yang W, et al. Dual function of RGD-modified VEGI-492 for breast cancer treatment [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(4): 796-804.
- [6] Marisi G, Scarpi E, Passardi A, et al. Circulating VEGF and eNOS variations as predictors of outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving bevacizumab [J]. *Sci Rep*, 2017, 27(1): 1293.
- [7] 张皎,高春玲. 血管内皮生长因子抑制剂及在放疗中的作用的相关研究进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2014, 27(1): 52-56.

- [8] 谈文娟,高春玲. NRP-1 在肿瘤中的作用及机制研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2015, 28(6): 356-360.
- [9] Zhang K, Cai HX, Gao S, et al. TNFSF15 suppresses VEGF production in endothelial cells by stimulating miR-29b expression via activation of JNK-GATA3 signals[J]. Oncotarget, 2016, 7(43): 69436-69449.
- [10] Zhang Z, Li LY. TNFSF15 Modulates Neovascularization and Inflammation[J]. Cancer Microenviron, 2012, 5(3): 237-247.
- [11] Liang PH, Tian F, Lu Y, et al. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI; TNFSF15) inhibits bone marrow-derived endothelial progenitor cell incorporation into Lewis lung carcinoma tumors[J]. Angiogenesis, 2011, 14(1): 61-68.
- [12] Qi JW, Qin TT, Xu LX, et al. TNFSF15 inhibits vasculogenesis by regulating relative levels of membrane-bound and soluble isoforms of VEGF receptor 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(34): 13863-13868.
- [13] Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, et al. Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation[J]. Cancer Res, 1999, 59: 3374-3378.
- [14] Tian F, Paulina H, Li LY, et al. Inhibition of endothelial progenitor cell differentiation by VEGI[J]. Blood, 2009, 113(21): 5352-5360.
- [15] Christian P, Chun HG, Gareth W, et al. Reduced vascular endothelial growth inhibitor(VEGI) expression is associated with poor prognosis in breast cancer patients[J]. Angiogenesis, 2006, 9(2): 73-81.
- [16] Han S, Liu L, Xu FY, et al. A case-control study about the association between vascular endothelial growth inhibitor gene polymorphisms and breast cancer risk in female patients in Northeast China[J]. Chin J Cancer Res, 2016, 28(4): 435-443.
- [17] Wang J, Andrew J. Sande G, et al. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) is an independent indicator for invasion in human pituitary adenomas[J]. Anticancer Res, 2013, 33(9): 3815-3822.

《肿瘤预防与治疗》2018 年征订启事

《肿瘤预防与治疗》是《中国科技论文统计源期刊》(即《中国科技核心期刊》),CN51-1703/R,ISSN1674-0904,大16开,双月刊,双月25日出版。

本刊主要报道国内外肿瘤防治研究领域的新成果、新进展。开设栏目有专家述评、国际交流、应用基础研究、临床研究、临床经验与技术交流、综述与讲座、短篇与个案报道等。所征稿件内容:肿瘤流行病学、基础研究、肿瘤病理、临床诊治经验、病例报告、肿瘤护理、国外研究动态等。

敬请读者及作者踊跃投稿,欢迎订阅,每期定价10.00元,全年订价60.00元。需订阅者请到当地邮局订阅,邮发代号62-142,错过订阅时间可直接向编辑部订阅,款汇至成都市武侯区人民南路四段55号《肿瘤预防与治疗》编辑部。邮编610041;电话:028-85420233;

E-mail: zlyfyzl@163.com; 网址: www.zlyfyzl.cn; qq: 973469379

欢迎订阅,欢迎使用网上投稿。

《肿瘤预防与治疗》编辑部