

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

血管生成抑制剂联合长春瑞滨增强人肺腺癌 973 裸鼠移植瘤
放射敏感性的在体动物实验研究

高春玲

工作完成日期 2014-6-15

报告提交日期 2014-7-13

厦门大学

2014 年 7 月

血管生成抑制剂联合长春瑞滨增强人肺腺癌 973 裸鼠移植瘤放射敏感性的在体动物实验研究

The study *in vivo* enhanced radiosensitivity of human lung adenocarcinoma 973 xenograft in nude mice by angiogenesis inhibitor combined with vinorelbine

博 士 后 姓 名 高春玲

流动站（一级学科）名称 厦门大学生命科学院

专 业（二级学科）名称 分子生物学

研究工作起始时间 2010 年 9 月

研究工作期满时间 2014 年 7 月

厦 门 大 学

2014 年 7 月

厦门大学博士后研究报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 三 年解密后适用本授权书；

电子版在 三 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘 要

目的

研究重组人血管内皮抑素 (Endostar) 和长春瑞滨 (NVB) 单独或联合应用以及重组人血管内皮生长抑制因子 (rhVEGI-192) 是否对人肺腺癌 973 裸鼠移植瘤具有放射增敏作用, 并就其相关机制进行初步探讨。

方法

建立人肺腺癌 973 裸鼠移植瘤模型, 待荷瘤裸鼠移植瘤最大径增至 0.5cm 时随机分组, 每组 8 只。给药方法采用腹腔注射, Endostar 20mg/kg/只, rhVEGI-192 5mg/kg /只, 对照组给予等量生理盐水, 每 d 给药 1 次, 连续给药 14d。含 NVB 组, 于照射前 24h 给予 NVB 2mg/kg。照射采用 6MV-X 线进行, 照射剂量分别为 10Gy、15Gy 和 20Gy, 照射时间分别为用药第 1d、第 7d 和第 14d。隔日使用游标卡尺测量移植瘤的大小, 计算移植瘤生长延缓天数, 获得增敏系数 (EF), 利用增敏系数评价 Endostar、NVB、rhVEGI-192 的放射增敏作用。获取移植瘤组织进行免疫组化和免疫蛋白印迹法 (Western blot) 检测各组移植瘤 MVD 数量及 VEGF、PTEN、HIF-1a 和 VEGI 表达情况, 初步探讨发生放射增敏作用的机制。

结果

第 1d 照射时, 10Gy+Endostar 组的 EF 值为 1.1, 15Gy+Endostar 组的 EF 值为 1.9; 第 7d 照射时, Endostar+10Gy 组的 EF 值为 2, Endostar+20Gy 组对移植瘤杀灭作用巨大, 肿瘤几乎消失, 无法获得倍增时间。表明重组人血管内皮抑素对 973 裸鼠移植瘤具有明显的放射增敏作用, 且其放射增敏作用具有放射剂量依赖性, 这种增敏效果与照射剂量呈正相关。第 7d 照射时重组人血管内皮抑素的放射增敏作用明显强于第 1d 照射。

本研究 Western blot 检测显示第 7d、第 14d 和第 48d 时, 照射确实显著促进了 VEGF 表达上调, Endostar 明显抑制了 VEGF 蛋白表达, Endostar+10Gy 组第 7d 开始 VEGF 表达明显下调, 第 14d 时最显著, 至第 48d 时 VEGF 表达抑制作用仍非常明显, 提示 Endostar 用药第 14d 时照射, Endostar 的放射增敏作用可能明显强于第 7d 照射。

免疫组织化学检测显示第 7d Endostar 组 MVD 为 3.2 ± 0.84 ，空白对照组的 MVD 为 7.0 ± 3.5 ，两组差异明显 ($p=0.024 < 0.05$)。第 14d Endostar 组 MVD 为 3.0 ± 0.0 ，空白对照组为 MVD 为 5.3 ± 1.5 ，第 14d 两组差异明显 ($p=0.037 < 0.05$)，第 48d 空白对照组的 MVD 为 3.0 ± 0 ，Endostar 组 MVD 为 4.2 ± 1.3 ，第 48d 两组 MVD 无明显差异 ($p > 0.05$)。可见 7-14d，Endostar 组 973 移植瘤血管密度明显下降，重组人血管内皮抑素使 973 移植瘤血管正常化的窗口期为 7-14d，14d 最明显。第 7d 仅 Endostar 组与空白对照组的微血管密度具有显著性差异 ($P < 0.05$)，其余各组均无明显差异 ($P > 0.05$)；第 48d 各组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。第 14d 时，与空白对照组相比，10Gy 组和 Endostar 组均具有显著性差异 ($P < 0.05$)，Endostar+10Gy 组分别与空白对照组、10Gy 组和 Endostar 组相比，均具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。表明第 7d 时开始 Endostar 具有降低移植瘤微血管密度作用，停药后移植瘤血管密度又增加，逐渐达到了空白组的血管密度。提示如果第 14d 照射，Endostar 可能更明显降低了移植瘤微血管密度，产生较第 7d 照射更强的放射增敏效应。

各组在各时间点的 VEGF 表达和 MVD 数目表明重组人血管内皮抑素通过显著下调 VEGF 表达，进而降低移植瘤血管密度是重组人血管内皮抑素对 973 裸鼠移植瘤放射增敏作用主要机制之一。

NVB+Endostar+10Gy 组第 7d 照射时的 EF 值为 1，第 1d 照射时的 EF 值为 0.1，NVB+Endostar+15Gy 组第 1d 照射时的 EF 值为 0.3。表明重组人血管内皮抑素和长春瑞滨同时联合照射时，无论第 1d 还是第 7d 进行照射，重组人血管内皮抑素和长春瑞滨均丧失了原本各自的放射增敏作用，对 973 裸鼠移植瘤发生了拮抗作用。

rhVEGI-192 与 6MV X-ray 联合作用于人肺腺癌 973 裸鼠移植瘤时，rhVEGI-192+10Gy 组的放射增敏系数为 1.5，表明 rhVEGI-192 对肺腺癌 973 移植瘤具有明显的放射增敏作用。

结论

1. 重组人血管内皮抑素对人肺腺癌裸鼠移植瘤具有明显的放射增敏作用；
2. 重组人血管内皮抑素对人肺腺癌裸鼠移植瘤的放射增敏作用具有实效性。第 7d 照射其放射增敏作用强于第 1d 照射，第 7d 照射是重组人血管内皮抑素与放射线较好的结合模式，MVD 数目和 VEGF 表达情况提示第 14d 照射时重组

人血管内皮抑素的放射增敏作用可能更强，第 14d 照射可能是重组人血管内皮抑素与放疗的最佳结合模式；

3. 免疫组化和 Western blot 结果初步揭示了重组人血管内皮抑素通过显著下调 VEGF 表达, 进而降低移植瘤微血管密度, 是其对 973 裸鼠移植瘤的放射增敏作用的主要机制之一；

4. 重组人血管内皮抑素和长春瑞滨联合使用时, 丧失了对 973 移植瘤各自原有的放射增敏作用, 二者产生了拮抗作用；

5. rhVEGI-192 对肺腺癌 973 裸鼠移植瘤具有明显的放射增敏作用。

关键词：放射增敏作用；重组人血管内皮抑素（恩度）；血管内皮生长抑制因子；拮抗作用

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

OBJECTIVE

To study the radiosensitization of human recombinant endostatin (Endostar), vinorelbine (NVB) and human recombinant vascular endothelial growth factor inhibitor 192 (VEGI-192) for human lung adenocarcinoma 973 xenograft in nude mice and its mechanism.

METHODS

Xenograft models were established by injecting human lung adenocarcinoma 973 cells to nude mouse. When the tumors reached a maximum diameter of 0.5cm, the mice were randomized into the groups, 8 in each group. Which were treated with various regimens: the control group (saline i.p. qd x 14); the treated groups (Endostar 20mg/kg, i.p. qd x 14; rhVEGI-192 5mg/kg, i.p. qd x 14; Endostar 20mg/kg, i.p. qd x 14 + NVB 2mg/kg, i.p. d1, d7, d14 before irradiation 24h). The irradiation groups were respectively received the dose of 10 Gy, 15Gy and 20Gy on 1st day, 7th day and 14th day. The tumor volume were estimated by using vernier calipers every other day, the growth delay time and the radiosensitization coefficient (EF) was calculated. The EF was used to evaluate the radiation enhancement of Endostar, rhVEGI-192 and NVB. The tumor tissue was analyzed to detect the vascular density by immunohistochemistry. In addition, the tumor tissues were assessed by Western blot analysis, and detected the expression of VEGF, PTEN, HIF-1a and VEGI. Which showed the radiosensitizing mechanism.

RESULTS

The EF of 10Gy+Endostar group and 15Gy+Endostar group was respectively 1.1 and 1.9 irradiated on the 1st day; Irradiated on the 7th day, the EF of 10Gy+Endostar group was 2.0, and the xenografts of 20Gy+Endostar group almost disappeared and

did not work out the doubling time because of killing tumor significantly. The results showed that Endostar could enhance obviously the radiosensitizing effect in a dose-dependent manner for 973 xenografts, and the sensitizing effect had positive correlation to irradiation dose. The radiosensitizing effect of Endostar irradiated on the 7th day was stronger than that irradiated on the 1st day.

In this study, Western blot assay showed that the expression of VEGF was up-regulated significantly by irradiation and was down-regulated significantly by Endostar on the 7th day, 14th day and 48th day, the expression of VEGF in Endostar+10Gy group was down-regulated significantly since the 7th day, the most significant on the 14th day, still significantly on the 48th day. These results suggested that the radiosensitizing effect of Endostar irradiated on the 14th day might be stronger than that irradiated on the 7th day when Endostar was injected for 14 days.

Immunohistochemistry analysis showed that the microvessel density (MVD) of the Endostar group and control group were 3.2 ± 0.84 and 7.0 ± 3.5 , respectively, on the 7th day ($p=0.024 < 0.05$); the MVD was obvious difference between the control group (5.3 ± 1.5) and the Endostar group (3.0 ± 0.0) on the 14th day ($p=0.037 < 0.05$). On the 48th day, the MVD of the control group was 3.0 ± 0 , and that of Endostar group was 4.2 ± 1.3 ($p > 0.05$). It was thus clear that the MVD of the 973 xenografts in Endostar group was evidently reduced during the 7th to 14th days, the window period that Endostar normalized the vessel of 973 xenografts was 7th to 14th days, especially on 14th day. On the 7th day, the MVD was obvious difference between the Endostar group and the control group ($P < 0.05$), the MVD were no significant difference among the other groups ($p > 0.05$); on the 48th day, the MVD were no significant difference among these groups ($p > 0.05$); on the 14th day, the MVD of 10Gy group and Endostar group was significant difference compared with control group, respectively ($p < 0.05$), the MVD of Endostar+10Gy group was very significant difference compared with the control group or 10Gy group or Endostar group ($p < 0.01$). These results showed that the MVD started to decrease after using Endostar for 7 days, after stopping the treatment the MVD of the Endostar group increased

gradually to that of the control group. These results also indicated that Endostar might lessen obviously the MVD of xenograft and the radiosensitizing effect of Endostar irradiated on 14th day was stronger than that on the 7th day.

Both the express of VEGF and the amount of MVD showed Endostar significantly downregulated the express of VEGF, decreased the MVD of xenograft, and then enhanced the radiosensitizing effect of Endostar. Which was one of the radiosensitization mechanisms of Endostar.

Irradiated on the 7th day, the EF of the NVB+Endostar+10Gy group was 1.0, irradiated on the 1st day, the EF of NVB+Endostar+10Gy group was 0.1, the EF of NVB+Endostar+15Gy group was 0.3. The results illustrated that Endostar and NVB both lost respectively their radiosensitizing effect and generated the antagonistic effect for 973 xenografts no matter irradiated on the 1st or on the 7th day if Endostar and NVB combined with irradiation.

When rhVEGI-192 combined with 6MV X-ray on human lung adenocarcinoma 973 xenograft, the EF of rhVEGI-192+10Gy group was 1.5, which showed that rhVEGI-192 could enhanced obviously the radiosensitizing effect.

CONCLUSIONS

1. Endostar could enhance obviously the radiosensitizing effect for human lung adenocarcinoma 973 xenograft;

2. The radiosensitizing effect of Endostar had the effectiveness. The radiosensitizing effect of Endostar irradiated on the 7th day was stronger than that on the 1st day, Endostar combined with X-ray irradiated on the 7th day was a better regimen; Both the express of VEGF and the amount of MVD showed the radiosensitizing effect of Endostar irradiated on 14th day maybe stronger than that irradiated on the 7th day, Endostar combined with X-ray irradiated on the 14th day maybe the best regimen;

3. Endostar downregulated the express of VEGF, decreased the vascular density of 973 xenograft, and then enhanced the radiosensitizing effect of Endostar;

4. Endostar and NVB both lost respectively their radiosensitizing effect and generated the antagonistic effect for 973 xenografts when Endostar and NVB combined with irradiation;

5. rhVEGI-192 could enhance obviously the radiosensitizing effect for human lung adenocarcinoma 973 xenograft.

Keywords: radiosensitizing effect; human recombinant endostatin (endostar); human recombinant vascular endothelial growth factor inhibitor 192 (VEGI-192); antagonistic effect

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 次

| | |
|---|-----------|
| 1 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 肿瘤与血管 | 1 |
| 1.2 重组人血管内皮抑素 | 2 |
| 1.2.1 重组人血管内皮抑素分子学特点 | 3 |
| 1.2.2 重组人血管内皮抑素的作用机制 | 3 |
| 1.2.3 ENDOSTATIN 的抗肿瘤作用 | 4 |
| 1.2.4 ENDOSTATIN 的双向药效特点 | 5 |
| 1.2.5 ENDOSTATIN 与放射线的联合应用 | 5 |
| 1.3 血管内皮生长抑制因子 (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR INHIBITOR, VEGI) | 7 |
| 1.3.1 VEGI 的发现 | 8 |
| 1.3.2 VEGI 的结构及分布 | 8 |
| 1.3.3 VEGI 基因表达的调控 | 9 |
| 1.3.4 VEGI 在肿瘤中的功能及相关机制 | 9 |
| 1.3.5 VEGI 在恶性肿瘤放射治疗中的展望 | 11 |
| 1.4 长春瑞滨 | 12 |
| 1.5 实验方案设计 | 12 |
| 1.5.1 研究目的和意义 | 12 |
| 1.5.2 研究目标 | 13 |
| 1.5.3 研究内容 | 13 |
| 2 第二章 重组人血管内皮抑素放射增敏作用在体动物实验研究 | 14 |
| 2.1 材料和方法 | 14 |
| 2.1.1 材料 | 14 |
| 2.1.2 方法 | 15 |
| 2.2 结果与分析 | 17 |
| 2.2.1 实验 1 重组人血管内皮抑素与放射线结合模式的预实验 | 17 |
| 2.2.2 实验 2 重组人血管内皮抑素联合第 1d 照射的移植瘤生长抑制实验研究 | 18 |
| 2.2.3 实验 3 重组人血管内皮抑素第 7d 联合放射线对移植瘤生长抑制的 | |

| | |
|--|-----------|
| 实验研究····· | 21 |
| 2.3 讨论····· | 24 |
| 2.4 小结····· | 25 |
| 3 第三章 重组人血管内皮抑素联合放射线对人肺腺癌裸鼠移植瘤模型作用机理研究····· | 26 |
| 3.1 材料和方法····· | 26 |
| 3.1.1 材料····· | 26 |
| 3.1.2 方法····· | 29 |
| 3.2 结果与分析····· | 33 |
| 3.2.1 免疫组织化学检测 CD34 表达····· | 33 |
| 3.2.2 WESTERN BLOT 检测情况····· | 35 |
| 3.3 讨论····· | 38 |
| 3.4 小结····· | 40 |
| 4 第四章 重组人血管内皮生长抑制因子对人肺腺癌裸鼠移植瘤放射效应影响的动物实验····· | 41 |
| 4.1 材料和方法····· | 41 |
| 4.1.1 材料····· | 41 |
| 4.1.2 方法····· | 42 |
| 4.2 结果与分析····· | 43 |
| 4.2.1 荷瘤鼠的一般情况····· | 43 |
| 4.2.2 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····· | 43 |
| 4.2.3 重组人血管内皮生长抑制因子的移植瘤生长曲线····· | 43 |
| 4.3 讨论····· | 44 |
| 4.4 小结····· | 44 |
| 结 论····· | 45 |
| 存在的问题与展望····· | 46 |
| 参 考 文 献····· | 47 |
| 致 谢····· | 56 |
| 博士生期间发表的学术论文····· | 57 |

| | |
|--------------------|----|
| 博士后期间获得的科研成果 | 58 |
| 个人简历..... | 60 |
| 联系地址..... | 61 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1 第一章 前言

手术、放疗和化疗是杀灭恶性肿瘤的主要方法，由于很多恶性肿瘤明确诊断时已是中晚期，这三大主要治疗手段的疗效不甚理想。近 10 年分子靶向治疗如火如荼的展开，在很多恶性肿瘤的治疗中展现了不菲的近期效果，但由于分子靶向药物耐药等因素的存在，使很多分子靶向药物明显丧失了它的抗肿瘤效果。血管在肿瘤生长过程中起到重要作用，我们试图探索靶向血管生长的抗血管生成药物联合放疗、化疗的抗肿瘤作用及机制。

1.1 肿瘤与血管

血管生成，是从现有的血管形成新的毛细血管，参与了肿瘤的生长和转移^[1]。当肿瘤大小超过 $1\sim 2\text{mm}^3$ ^[2]时，血管生成就成为肿瘤进展必不可少的过程^[3-7]。Folkman 等^[2]首次提出，当肿瘤体积 $>1\text{mm}^3$ ，肿瘤生长所需的养料和氧以及代谢废料的运出必须通过形成新血管，只靠扩散作用无法满足肿瘤生长需求。如果没有生成新的血管，大部分肿瘤将停止生长，处于休眠状态，肿瘤的直径不超过 $2\sim 3\text{mm}$ ^[8]。血管在肿瘤生长与转移过程中具有重要意义逐渐被人们认识^[9]。而如何控制新生血管的形成呢？有人提出了“血管生成开关平衡假说”^[10]，这个假设的内容是血管生成的开关由血管内皮抑制剂和诱导剂的平衡控制着血管生成的开关^[10,11]如图 1 所示。

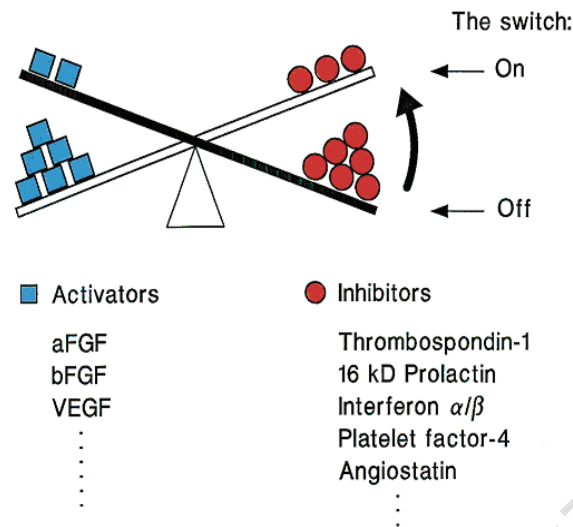


图 1.1 血管生成开关平衡假说

三个实验的线索支持这个假说^[10]。第一条线索来自体外生物测定。在增殖和趋化实验检测中,毛细血管内皮细胞的碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子可以引发毛细血管内皮细胞积极的反应。如果越来越多如 TSP-1 的抑制剂被加入,则反应被阻断。这表明,当抑制剂的浓度有足够高的时候,激活血管增生的信号被阻断,保持血管生成开关关闭。第二条线索来自研究人类肿瘤细胞,恢复 p53 肿瘤抑制功能导致上调 TSP,终止包括肿瘤细胞自身合成和加入的 bFGF 两者的血管生成诱导,从而阻断血管新生。第三条线索来自胰腺胰岛模型血管生成开关,在这模型中两个强有力的血管生成因子酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)在正常胰岛细胞(非转基因鼠)和肿瘤(转基因鼠)上持续表达。值得注意的是,尽管这些有力的表达血管新生诱导剂,在正常胰岛中没有新生血管生成。这很可能是血管生成抑制剂使表达血管内皮生长因子和酸性成纤维细胞生长因子的正常胰岛细胞血管生成开关保持关闭。如果这样的话,去除这些抑制剂将打破平衡和触发肿瘤血管生成的开关。

1.2 重组人血管内皮抑素

1997年, O' Reilly 等从小鼠血管内皮瘤细胞培养血清中分离出一种血管生成抑制剂,命名为 Endostatin, 它可特异地抑制毛细血管内皮细胞增殖^[12]。在美国,重组人血管内皮生长抑素(Endostatin)被 FDA 批准用于临床。2005年 国家食品药品监督管理局批准国产新型重组人血管内皮抑素(Endostar, 恩度)上市,这是世界上首个成功上市的血管内皮抑素抗癌新药。目前在临床上与化疗

的联合应用取得了一定的疗效^[13]。

1.2.1 重组人血管内皮抑素分子学特点

重组人血管内皮抑素是一种内源性抗血管生成蛋白,是 XVIII 胶原酶的 20KD C 末端的氨基酸片段, 包括一个茎环结构和 β 一片层。在 Endostatin 分子中, 有 42% 的疏水性氨基酸残基。而且在 Endostatin 的表面, 有对肝素高度亲和力的精氨酸残基。人源的 Endostatin 和鼠源的 Endostatin 有很高的同源性, 两者的氨基酸残基大部分完全一致, 约占 86%。但是, 人源的 Endostatin 与鼠源的 Endostatin 相对比, 人源的 Endostatin C 端多了一个赖氨酸残基^[11], N 端比鼠源的 Endostatin 少了 12 个残基。在 Endostatin 的分子中, 有一个和肝素的亲和力很高的碱性区域, 这个碱性区域由 11 个精氨酸残基构成, 也是 Endostatin 发挥作用的关键区域。Yam-aguchi 等^[14]研究发现, 如果 Endostatin 的浓度较低时, 肝素结合位点对重组人血管内皮抑素的作用没有影响, 当 Endostatin 的浓度增加到一定程度时, 肝素结合位点就成为了主要的作用位点, 影响到 Endostatin 的作用。Fu 等^[15]研究提示: Endostatin 分子中的疏松结构和肝素结合位点结合后将更利于 Endostatin 发挥它的生物学作用。被水解处理后激活。重组人血管内皮抑素抑制内皮细胞增殖, 转移, 侵袭, 和血管形成。重组人血管内皮抑素的抑制活动结合 $\alpha_5\beta_1$ 和对 glypican-1 和 glypican-4 的低亲和力或者和内皮细胞上的未分类的因子结合。封闭 VEGF/VEGFR 的信号通路, 抑制基质金属蛋白酶, 例如 MMP-2 和下调 c-myc 和周期素-D1 这些都是重组人血管内皮抑素减少内皮细胞生存, 转移, 和侵袭的原因^[16]。

1.2.2 重组人血管内皮抑素的作用机制

1. 重组人血管内皮抑素抑制内皮细胞的增殖, 特异性地针对新生血管生成, 一个很重要的发现即 Nucleolin 不在静止的内皮细胞的表面表达, 而在欲增殖的人类微血管内皮细胞的表面表达, 这些细胞表面的 nucleolin 可以结合重组人血管内皮抑素并把它转运到细胞核, 在那里 Endostatin 抑制 nucleolin 的磷酸化。磷酸化的 Nucleolin 是内皮细胞增殖的关键。因此, Endostatin 对静止的内皮细胞没有增殖抑制的作用, 对非血管内皮细胞系细胞、平滑肌细胞等也没有增殖抑制作用^[17];

2. 诱导内皮细胞的凋亡, 细胞凋亡是多细胞生物体维持组织稳态、消除不必要的或已经损坏的细胞的一个重要的过程。一些证据表明, 在成人血管, 内皮细胞凋亡可能限制血管生成和导致血管的衰退^[18]。尤其是在肿瘤组织中, 内皮细

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库