

地非三唑抑制血管新生作用的研究

李晴宇,王刚(浙江省杭州市第一人民医院药剂科,杭州 310006)

摘要:目的 从细胞、器官、整体三个水平观察地非三唑抑制血管的新生作用。方法 细胞水平用 MTT法测定地非三唑对人脐静脉内皮细胞的增殖抑制作用;器官水平上利用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管新生模型,观察地非三唑抑制 CAM血管新生的情况;并在整体水平上采用家兔角膜血管新生模型,于缝线后第 3d用地非三唑于结膜囊注射给药,每天观察角膜血管新生情况。结果 地非三唑能有效抑制人脐静脉 EVC304细胞的增殖,其 IC_{50} 根据药物作用时间的不同,维持在 $9 \sim 15 \mu g \cdot mL^{-1}$;并能使 CAM新生血管明显减少甚至消失,对家兔角膜新生血管也有同样抑制作用。结论 地非三唑能抑制血管新生作用。

关键词:血管新生;地非三唑;鸡胚尿囊膜;家兔角膜

中图分类号:R972 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)08-0688-04

作者简介:李晴宇,女,主管药师

Tel:13355780144

E-mail: lqy2899@tom.com

LI Qing-yu, WANG Gang (Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of antiangiogenesis of DL111-IT *in vivo* and *in vitro*. **METHODS** To detect the inhibition ratio of DL111-IT on endothelial cells with the method of MTT. The different concentrations of DL111-IT were injected onto the 6th day chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), and antiangiogenesis activities were assayed 72h later. Use suturation on cornea to induce the vascularization. On the third day after suturation, the rabbits were divided into four groups and gave drugs of different concentrations. The growth of neogenetic vessels of each eye was carefully observed daily during the following 21 days after suturation. **RESULTS** DL111-IT could inhibit the growth of neogenetic vessels effectively, IC₅₀ of endothelial cells were ranged from 9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ according to different time of drug action. The number of neogenetic vessels on the CAM were declined and it also showed the same inhibition effect on the rabbit cornea. **CONCLUSION** DL111-IT could inhibit angiogenesis.

KEY WORDS: angiogenesis; DL111-IT; CAM; rabbit cornea

肿瘤细胞的恶性生物学行为主要表现在无休止性生长和向周围组织浸润转移^[1]。这一行为产生的关键是由于肿瘤细胞能分泌和释放促血管生长因子 (tumor angiogenesis factor, TAF), 刺激内皮细胞生长, 诱导宿主血管长入瘤体内, 在肿瘤组织间形成毛细血管及淋巴管网络, 从而使肿瘤组织能及时获得各种营养及排出废物, 促进其自身的分裂与增殖, 并为肿瘤细胞向周围组织转移提供了通路。因此, 如能抑制肿瘤细胞诱导的新生血管的形成, 将阻断肿瘤细胞的供养和排泄通路, 抑制其无休止的生长, 同时亦能降低其向周围组织转移的可能性。近年的临床研究表明, 抑制血管的新生作用已成为肿瘤药物治疗中的一个新趋向。

地非三唑^[2] (Contragestazol, DL111-IT), 化学名为 3-(2-乙基苯基)-5-(3-甲氧苯基)-H-1, 2, 4-三氮唑, 是一种非激素类终止妊娠药, 高效低毒, 药物为非水溶性。对于 DL111-IT 抗早孕作用机制的研究表明, DL111-IT 能抑制子宫蜕膜组织的生长与增殖, 使细胞胞体萎缩, 空泡化。根据病理组织学变化规律, 蜕膜组织与肿瘤组织的一个共同生物学特性就是能诱发新血管的生成而为细胞自身生长提供合适的环境^[3-4]。因此, 我们在本实验中将地非三唑作为血管生成抑制剂加以研究, 从细胞、器官以及整体三个水平研究地非三唑抑制血管的新生作用, 为进一步研究其抑制肿瘤组织诱导血管新生的作用及其机制研究作铺垫。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

地非三唑 (DL111-IT, 仙居制药有限公司提供); MTT (购于华美生物制品公司, 用 RPMI-1640 液配成 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用); 细胞培养基; DMSO (市售分析纯试剂); 地非三唑注射液 (购于仙居制药有限公司, 批号 000603, 规格 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 空白茶油 (购于仙居制药有限公司, 批号 001001, 规格 2 mL)。

1.2 动物与材料

孵育至第 5 天的鸡胚 (购于杭州常青名鸡养殖场); 人脐静脉 EVC304 细胞株 (购于上海细胞所); 家兔 12 只, 雌雄各

半; BIO-TEK ELx800 型酶标仪。

1.3 实验方法

1.3.1 鸡胚绒毛尿囊膜 (Chorioallantoic membrane, CAM) 血管生成试验 鸡胚开窗方法参考姜志刚的“假气室”法^[5]并加以改进。暴露尿囊膜后, 用透明胶纸封闭卵壳开口, 继续置 37℃ 温箱中孵育观察 24 h。取开窗成功的鸡胚, 随机分成 6 组, 给药组分别给予浓度为 0.5, 2.5, 12.5, 25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DL111-IT 溶液, 每胚 20 μL 。并行设立溶剂对照组每胚给予 DMSO 20 μL , 空白对照组不加任何处理。加药后, 再用透明胶纸封闭卵壳开口, 继续置 37℃ 温箱中孵育观察 72 h。每 24 h 观察一次, 注意血管的生长状况。待鸡胚孵育至第 10 天, 去除封口的透明胶纸, 用 1:1 的甲醇: 丙酮固定液固定尿囊膜 15 min, 然后剪取尿囊膜置盛有生理盐水的表面皿中, 展开, 平铺在滤纸上, 拍照, 进行血管计数。

1.3.2 血管内皮细胞增殖试验^[6] 取处在对数生长期的人脐静脉 EVC304 细胞用胰酶消化, 800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 用细胞培养基稀释细胞至 2×10^4 个 / mL, 此细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h。每孔各加入 DL111-IT 的 DMSO 溶液 10 μL , 使最终浓度分别为 16, 14, 12, 10, 8, 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时设 DMSO 溶剂对照组, 空白对照组 (只加细胞培养液 1 mL, 不接种细胞)。继续培养 24 ~ 72 h, 每隔 24 h, 取一板做 MTT 实验。每孔加 MTT 液 (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 60 μL , 继续培养 4 h, 吸去孔内培养液, 每孔再加 0.5 mL DMSO 液, 室温下将培养板轻微震荡 10 min, 使结晶物溶解。酶标仪检测各孔 OD 值 ($\lambda = 570 \text{nm}$), 用空白对照组调零。记录各结果, 根据公式 抑制率 (%) = (1 - 实验孔 OD₅₇₀ / 对照孔 OD₅₇₀) $\times 100\%$, 求得各浓度组的抑制率, 绘制浓度 抑制率图, 求算 IC₅₀ 值。

1.3.3 家兔眼角膜血管生成试验 参考赵长松^[7]等的实验方法, 建立给药前家兔角膜血管新生模型, 并将 12 只家兔随机分成 4 组。每组家兔两侧眼球分别给予药物的剂量为 3 $\text{mg} / 0.6 \text{mL}$, 1 $\text{mg} / 0.6 \text{mL}$, 0.3 $\text{mg} / 0.6 \text{mL}$, 以及空白茶油对照组 0.6 mL, 于上方结膜囊注射给药。用药后每 3 d 观察一

次,共观察 21 d。在最后一次观察时,给兔角膜拍照,观察血管新生情况。

2 结果

2.1 地非三唑能抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成

在各组实验的 10 枚鸡胚中,药物对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的抑制效应见表 1。结果显示:25 mg·mL⁻¹浓度组尚可见稀疏血管的网状阴影,无血色;12.5 mg·mL⁻¹浓度组鸡胚尿囊膜血管部分抑制,只可见少数细小血管;2.5 mg·mL⁻¹浓度组的尿囊膜上还能见到较粗血管;0.5 mg·mL⁻¹浓度组的鸡胚的血管较丰富,溶剂组和空白组其尿囊膜上血管丰富,呈辐射状生长。其鸡胚存活率随着尿囊膜血管被抑制程度而逐渐增加。

表 1 地非三唑对鸡胚绒毛尿囊膜血管的抑制作用

Tab 1 Antiangiogenesis effect of DL111-IT on CAM				
Dose Group (mg/single)	No. of chicken embryo	Total of neogenic vessel	Inhibition rate* /%	ID50 /mg (95% confidence)
0.5	10	0	100	
0.25	10	23	88.32	
0.05	10	84	57.36	0.039
0.01	10	162	17.77	(0.013 ~ 0.100)
Solvent	10	197	0	
Control	10	190	0	

注: * 与溶剂组数据比较

Note: * Contrast with the value of solvent group

2.2 地非三唑抑制人脐静脉 EVC304 细胞增殖

经 MTT 实验后发现,溶剂对照组中,内皮细胞贴壁良好,细胞都呈现多角形,排列紧密;在中低剂量组中,各有不同数量的细胞死亡,脱壁,漂浮在细胞培养液中,细胞膜回缩成圆形,细胞排列松散;高剂量组中的内皮细胞的细胞膜大部分都已破裂,呈现不完整的细胞形态。实验所得资料见下表 2,结果表明,药物浓度和其抑制内皮细胞增殖的作用呈明显的量效关系。给药 24 h,48 h 及 72 h 后,其 IC₅₀ 分别为 15.7,11.4 和 8.7 μg·mL⁻¹。本实验重复 3 次。

表 2 DL111-IT 对人脐静脉 EVC304 细胞株的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 2 Inhibition ratio of DL111-IT on endothelial EVC304 cells

药物浓度 /μg·mL ⁻¹	药物作用时间 /h		
	24	48	72
6	7.75 ± 5.53	18.89 ± 11.79	27.30 ± 8.84
8	16.33 ± 3.41	33.37 ± 1.80	44.34 ± 6.20
10	21.34 ± 0.80	44.23 ± 0.76	59.95 ± 0.98
12	30.76 ± 3.28	51.26 ± 3.55	65.14 ± 4.49
14	45.08 ± 5.88	52.54 ± 4.41	65.92 ± 1.18
16	51.52 ± 1.93	55.49 ± 6.36	68.75 ± 4.73

2.3 地非三唑对家兔眼角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 形成的抑制效应

从给药后每 3 d 一次的观察发现,新生血管主要是沿着缝线方向生长,且较局部。在缝线后第 10 天,空白组家兔在靠近缝线处的球结膜与角膜交界处出现睫状新生血管,并有细小血管伸入角膜内,约 1 ~ 2 mm 长;在缝线后第 17 天,角膜上的新生血管清晰可见,约 8 ~ 12 mm 长,较粗,共有 20 ~ 30 条,新生血管主要是沿着缝线方向生长,且较局部。低剂量组球结膜缘睫状血管丛清晰,角膜上只能观察到 2 ~ 3 条较粗血管;中剂量组中,睫状血管丛稀疏,偶见角膜上有较细新生血管;高剂量组球结膜缘无血管丛出现,角膜亦无新生血管。各组角膜血管的生长状况见图 1。

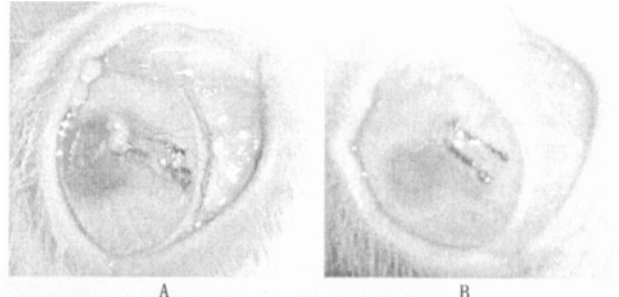


图 1 地非三唑对家兔角膜新生血管形成的抑制效应

A. 溶剂对照组 (茶油); B. 中剂量组 (1 mg/0.6 mL)

Fig 1 Antiangiogenesis effect of DL111-IT on CNV of rabbits

A. Solvent control group; B. Middle dosage group (1 mg/0.6 mL)

3 讨论

肿瘤细胞增殖和转移的重要因素是它能产生、释放促血管生长因子 (TAF),诱导内皮细胞增殖从而形成新生血管,为肿瘤细胞的增殖提供合适的环境,同时为其转移提供通路。因此,如能抑制新生血管的形成,将是肿瘤治疗的一个有效途径,也是目前肿瘤治疗研究中的一个新趋向。特别是针对目前肿瘤临床治疗中所采用的新辅助化疗的方法,通过抑制新生血管的形成,可降低实体肿瘤的分期 (down staging),使大的实体瘤退缩^[8],使一些原不能手术切除的肿瘤转化为能手术切除,同时抑制转移灶的形成^[9]。

地非三唑 (DL111-IT) 是一种非水溶性的抗早孕药物。目前将其作为一种直接的抗肿瘤药物已有部分研究,本实验则从抑制血管新生方面进行了探索性的研究。经过实验表明,地非三唑不论从细胞、器官还是整体水平,都有有效抑制血管新生的作用。特别是从细胞研究中发现,地非三唑对人脐静脉 EVC304 内皮细胞的 IC₅₀ 仅为 9 ~ 15 μg·mL⁻¹,表明其在血管新生抑制方面的潜力。这也为研究地非三唑在抑制肿瘤细胞诱导的新生血管方面的作用打下了基础。

值得注意的是,由于抗血管生成治疗很可能是一个长期的治疗过程,因此血管生长抑制剂必须是高效低毒的。DL111-IT 已被证实是一种高效低毒的非激素类终止妊娠药,进一步表明该药在抑制肿瘤诱导的血管新生方面良好的开发和应用前景。

参考文献

[1] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other dis-

- eases. Nature, 2000, 407(6801): 247-257.
- [2] SHENTU J Z, ZHOU H J, FANG R Y. Effects of DL111-IT or combined with Ru486 on uterine polyamines biosynthesis in rats during early gestation. Contraception, 2001, 63: 283-287.
- [3] 王介东, 张树成, 王弘毅, 等. 人蜕膜和绒毛膜组织在鸡胚绒毛尿囊膜的种植和在体培养观察. 生殖与避孕, 1998, 18(1): 22.
- [4] REDMER D A, GRAZUL A T, KIRSCH J D, *et al.* Angiogenic activity of bovine corpora lutea at several stages of luteal development. J Reprod Fertil, 1998, 82: 627.
- [5] 姜志钢, 鄂征. 鸡胚绒毛尿囊膜检测肿瘤促血管生长作用改良技术方法. 解剖学杂志, 1989, 12(2): 142.
- [6] 程宝莺. 动物细胞培养技术 [M]. 131-132.
- [7] 赵长松, 沉远萍. 实验性兔角膜新生血管的防治研究 [J]. 同济医科大学学报, 1996, 10, 25(5): 399-401.
- [8] KUERER H M. Ann Surg Oncol, 1998, 5: 673-680.
- [9] GOLDIE J H, GOLDMAN A J. A mathematical model for relating the drug sensitivity of tumors their spontaneous mutation rate [J]. Cancer Treat Rep, 1979, 63 (11-12): 1727-1733.

收稿日期: 2007-02-15