

抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗抑制上皮性卵巢癌血管及肿瘤生成的实验研究

杨丽华¹⁾, 周轶平²⁾, 苏莹¹⁾, 胡万芹¹⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院妇产科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学云南省天然药物药理中心实验室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗诱导血管内皮细胞凋亡, 抑制上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 血管及肿瘤生长的作用效应. **方法** 将 EOC 细胞株 TYK 细胞接种于鸡胚尿囊膜 (chick chorioallantoic membrane, CAM) 建立 EOC CAM 模型, 细胞接种后 12 h, 分别加入抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 抗体 (实验组) 和生理盐水 (对照组). 5 d 后, 应用图像分析系统检测 2 组 CAM 血管数目 (number, N)、血管面积 (area, A)、血管面积比 (vessel area, VA/A) 及肿瘤组织面积 (tissue, T). 脐静脉内皮细胞株 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) ECV304 接种于玻连蛋白 (vitronectin, Vn) 表面, 2 h 后加入抗 $\alpha V \beta 3$ 抗体, 计数 0、12 h、24 h、48 h、72 h 细胞凋亡率. **结果** 实验组 N、A、VA/A 及 T 分别为 (16.80 \pm 0.71) 根; (10.02 \pm 4.48) mm²; 25.50 \pm 11.41; (8.25 \pm 4.15) mm², 显著小于对照组的 (42.20 \pm 15.32) 根; (26.15 \pm 8.35) mm²; 66.62 \pm 17.64; (34.26 \pm 15.83) mm² ($P < 0.05$). 抗 $\alpha V \beta 3$ 单抗诱导 HUVEC 时间依赖性细胞凋亡, 其 24 h、48 h 和 72 h 的凋亡率显著高于 IgG 对照组. **结论** 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗通过诱导血管内皮细胞凋亡而抑制卵巢癌血管及肿瘤生长, 整合素 $\alpha V \beta 3$ 可作为卵巢癌治疗的一个有效靶点.

[关键词] 整合素 $\alpha V \beta 3$; 抗体; EOC; 血管生成

[中图分类号] R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 06-0028-04

The Experiment Research on the Inhibiting Effect of Angiogenesis and Tumor in EOC by Integrin $\alpha V \beta 3$ Antibody

YANG Li-hua¹⁾, ZHOU Yi-ping²⁾, SU Ying¹⁾, HU Wan-qin¹⁾

(1) Dept. of Obstetric and Gynecology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the apoptosis induction effect of vascular endothelial cells and the inhibiting effect of angiogenesis and tumor growth in EOC by anti-integrin $\alpha V \beta 3$ antibody. **Methods** The EOC TYK cells were implanted into CAM to establish the EOC CAM model, Anti-integrin $\alpha V \beta 3$ antibody (experiment group) and NS (control group) were added respectively into CAM at 12h after cells implanted. N, A, VA/A and T of CAM in two groups were determined by image analysis on 5 d. HUVEC ECV304 cells were implanted on the Vn surface, the cell apoptosis rate were counted at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h. **Results** The N, A, VA/A and T were 16.80 \pm 0.71, 10.02 \pm 4.48 mm², 25.50 \pm 11.41 and 8.25 \pm 4.15 mm² respectively in experiment group, which were significantly lower than those in control group, which were 42.20 \pm 15.32, 26.15 \pm 8.35 mm², 66.62 \pm 17.64 and 34.26 \pm 15.83 mm² respectively ($P < 0.05$). The HUVEC were induced to apoptosis by integrin $\alpha V \beta 3$ antibody in a time dependent manner, the apoptosis rate at 24 h, 48 h and 72 h in integrin $\alpha V \beta 3$ antibody group were significantly higher than those in IgG group. **Conclusion** Integrin $\alpha V \beta 3$ antibody inhibits angiogenesis and tumor growth in EOC by inducing vascular endothelial cells apoptosis, which might be a

[基金项目] 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2009ZC113M)

[作者简介] 杨丽华 (1972~), 女, 云南丽江市人, 医学博士, 副教授, 主要从事妇科肿瘤临床与研究工作.

[通讯作者] 胡万芹. E-mail:1427293307@qq.com

treatment target of EOC.

[Key words] Integrin $\alpha V \beta 3$; Antibody; Epithelial ovarian cancer; Angiogenesis

抑制上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 是严重威胁妇女健康和生命的恶性肿瘤, 发病率为妇科恶性肿瘤第二位, 死亡率高居妇科恶性肿瘤首位, 虽然在过去的几十年里卵巢癌标准治疗得到了明显改进, 但因为细胞毒性化疗耐药问题, 仍有较多女性死于卵巢癌^[1]. 因此, 研究新的作用靶点及治疗策略具有重大意义. 据报道, 整合素 $\alpha V \beta 3$ 与恶性黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌等多种肿瘤的侵蚀、转移及其肿瘤血管生成有关, 是细胞因子或肿瘤诱导的新生血管形成过程中必不可少的物质, 在血管生成的多个步骤起重要作用^[2,3]. 故本研究通过人卵巢癌 CAM 血管及组织生成模型, 应用整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗阻断其作用后, 观察卵巢癌血管生成及组织生长情况, 同时观察整合素 $\alpha V \beta 3$ 对血管内皮细胞生长的影响, 以探讨抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 抗体对 EOC 血管及肿瘤生长的影响以及其作为 EOC 治疗作用靶点的可行性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗 (批号: 18060620)、玻连蛋白 (批号: 1921060710) 为 Pharmingen International 产品, 购至深圳精美有限责任公司; NS 为云南省第一制药厂生产.

1.1.2 实验器材 CO_2 培养箱为德国 Heraeus 公司生产; YJ-1450 型净化工作台 (SW-CI-IF) 为苏州安泰空气技术有限公司产品; 303 型电热恒温培养箱为上海沪南科学仪器联营厂生产; Q970 型图像分析系统, 英国剑桥仪器公司生产; 照相机为日本 Cannon 生产; 低温高速离心机为德国 Heraeus 公司生产, 分别为 15R 型和 Megafugel 1.0R 型; BH-2 型倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司生产.

1.1.3 实验动物及细胞株 鸡胚为德国伊沙鸡种, 购自昆明实验养鸡场. 人卵巢癌细胞系 TYK 引自日本东京医科大学, 由山东大学医学院齐鲁医院提供. 脐静脉内皮细胞株: ECV304, 购至广州弗尔博生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 人卵巢癌 CAM 血管生成模型的建立 TYK 细胞生长于 15% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链

霉素 100 $\mu g/mL$ 的 PRI-1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}C$ 温密闭式、5% CO_2 的培养箱中培养. 将指数生长期的 TYK 细胞以 1×10^7 只鸡胚窗法接种于 10 日龄发育良好的受精鸡胚尿囊膜上^[4].

1.2.2 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 抗体对 CAM 上人卵巢癌血管生成及肿瘤生长的影响 24 只鸡胚, 分为 2 组, 实验组 ($n=12$), 阴性对照组 ($n=12$). 细胞接种后 12 h, 实验组 CAM 上加入抗整合素 $\alpha V \beta 3$, 25 $\mu g/20 \mu L$ CAM, 阴性对照组加入 NS, 20 $\mu L/CAM$. 5 d 后, 用 HP I AS 2000 图像分析系统检测两组 CAM 血管数目 (number, N)、血管面积 (area, A)、血管面积比 (vessel area, VA/A) 及肿瘤组织面积 (tissue, T), 观察血管及肿瘤的变化.

1.2.3 整合素 $\alpha V \beta 3$ 对血管内皮细胞生存的影响 将 Vn (5 $\mu g/mL$) 覆盖于玻片表面, 4 $^{\circ}C$ 过夜; 取指数生长期的 ECV304 细胞, 以 $1 \times 10^7/mL$, 加细胞悬液于玻片上, 100 $\mu L/片$. 37 $^{\circ}C$ 孵育 2 h 后, 加入抗 $\alpha V \beta 3$ 抗体 (25 $\mu g/mL$), 对照组加入小鼠 IgG 抗体. 37 $^{\circ}C$ 培养箱中继续培养, 培养 0、12 h、24 h、48 h、72 h, HE 染色, 在光学显微镜下观察细胞形态, 计数细胞凋亡率. 凋亡百分比计数, 先在低倍镜 (40 \times 10) 下全面观察切片以确定凋亡细胞最多处, 在再高倍镜 (40 \times 40) 下. 以细胞固缩成圆形, 和聚集、靠边或断裂者为凋亡的细胞. 记录 5 格视野内的凋亡细胞百分比, 取其平均值作为该切片的凋亡率.

1.3 统计学处理

应用 SPSS 版统计软件包的单因素方差分析及最小显著差法进行两两比较. 检验水准为 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗对 CAM 上人卵巢癌血管及肿瘤组织生长的影响

TYK 细胞接种于 CAM 后 12 h, 实验组 CAM 上加入抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 抗体, 5 d 后 N、A、VA/A、T 均显著低于对照组 ($P<0.05$), 见表 1.

2.2 整合素 $\alpha V \beta 3$ 对血管内皮细胞生存的影响

种植于 VN 表面的 ECV304 细胞, 加入抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单克隆抗体 LM609 后, 引起时间依赖的内皮细胞凋亡, 24 h、48 h 和 72 h 凋亡率显著高于非特异性免疫抗体小鼠 IgG 抗体组 ($P<0.05$), 见表 2.

非特异性免疫抗体小鼠 IgG 作用于 ECV304 细胞 72 h 细胞形态, 细胞基本保持铺路石样生长, 未见明显凋亡细胞特征 (HE × 200), 见图 1. 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗 LM609 作用于 ECV304 细胞

72 h 细胞形态, 细胞铺路石样结构消失, 细胞皱缩成圆形, 核聚集, 靠边, 出现细胞凋亡的形态学变化 (HE × 200), 见图 2.

表 1 抗 $\alpha V \beta 3$ 单抗对 CAM 上人卵巢癌血管和肿瘤生长的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of the anti- $\alpha V \beta 3$ antibody on EOC angiogenesis and tumor growth in CAM ($\bar{x} \pm s$)

组别	N (根)	A(mm ²)	VA/A	T (mm ²)
对照组	42.20 ± 15.32	26.15 ± 8.35	66.62 ± 17.64	64.26 ± 15.83
实验组	18.80 ± 0.71*	10.02 ± 4.48*	25.50 ± 11.41*	8.25 ± 4.15*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 整合素 $\alpha V \beta 3$ 对 ECV304 细胞生存的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The effect of integrin $\alpha V \beta 3$ on ECV304 cells survival ($\bar{x} \pm s$)

分组	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IgG 抗体组	0	1.21 ± 0.11	2.15 ± 1.22	5.24 ± 2.19	6.17 ± 2.43
LM609 组	0	5.34 ± 1.98	10.39 ± 5.32*	35.99 ± 10.35*	40.6 ± 12.54*

与 IgG 抗体组比较, * $P < 0.05$.

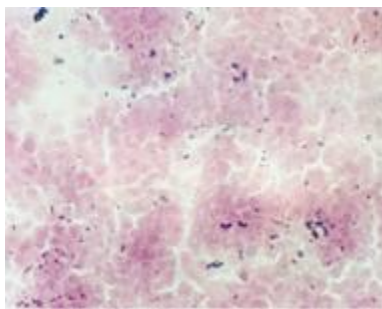


图 1 小鼠 IgG 抗体对 ECV304 细胞的影响

Fig. 1 The effect of mouse IgG antibody on ECV304 cells

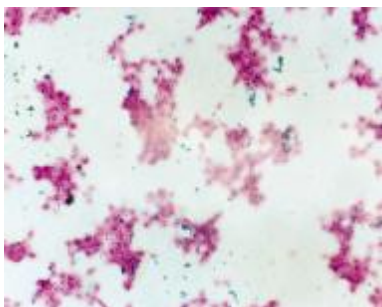


图 2 抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 抗体对 ECV304 细胞的影响

Fig. 2 The effect of anti-integrin $\alpha V \beta 3$ antibody on ECV304 cells

3 讨论

肿瘤血管形成是肿瘤细胞诱发毛细血管新生以及肿瘤中毛细血管网的形成, 为实体瘤的后续生

长及转移提供物质基础的过程^[4]. 血管生成过程中需要内皮细胞相互粘附并与细胞外基质粘附才能形成新微血管, 内皮细胞对细胞外基质识别和迁移的能力依赖于粘附分子中的整合素家族, 整合素是广泛分布于细胞膜表面的一类重要的细胞粘附分子, 主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互粘附, 并介导细胞与细胞外基质之间的双向信号传导, 对细胞的生长、增殖、分化和凋亡起重要的调控作用^[6]. 多种整合素表达于有腔和无腔的内皮细胞表面, 参与内皮细胞迁移和毛细血管样管道形成. 其中, 整合素 $\alpha V \beta 3$ 又称玻璃粘连蛋白受体, 是一个具有多种功能的整合素, 它可以介导细胞黏附到许多细胞外基质蛋白上, 如纤维蛋白原、胶原和层粘连蛋白. 但在正常情况下, 血管处于静止状态, $\alpha V \beta 3$ 也处于低水平表达; 而在肿瘤和创伤愈合的活跃新生血管中高表达^[7].

本课题组前期研究发现整合素 $\alpha V \beta 3$ 与人 EOC 血管生成、浸润、转移密切相关^[8], 为了探讨整合素 $\alpha V \beta 3$ 能否作为卵巢癌治疗的作用靶点以及其治疗效应, 笔者建立了 EOC CAM 模型, 应用抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单克隆抗体, 观察其对卵巢癌血管生成及肿瘤组织生成的影响. 发现, 应用抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单克隆抗体后能显著抑制卵巢癌血管生成及肿瘤组织生长, 同时, 笔者体外实验发现应用抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗能诱导血管内皮细胞凋亡. 推测抗整合素 $\alpha V \beta 3$ 单抗通过诱导血管内皮细胞凋亡而抑制肿瘤血管生成, 从而影响肿瘤生长. 因

此, 整合素 $\alpha V \beta 3$ 可作为一个卵巢癌治疗靶点, 与卵巢癌常规治疗方案配伍应用.

[参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58: 71 - 96.
- [2] HAUBNER R, WESTER H J. Radiolabelled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10 (13): 1 439 - 1 440.
- [3] OXBOEL J, BINDERUP T, KNIGGE U, et al. Quantitative gene-expression of the tumor angiogenesis markers vascular endothelial growth factor, integrin αV and integrin $\beta 3$ in human neuroendocrine tumors [J]. Oncol Rep, 2009, 3: 769 - 777.
- [4] SACHARIDOU A, STRATMAN A N, DAVIS G E. Molecular mechanisms controlling vascular lumen formation in three-dimensional extracellular matrices[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 195(1-2): 122 - 143.
- [5] ROBINSON S D, HODIVALA - DILKE K M. The role of $\beta 3$ -integrins in tumor angiogenesis: context is everything [J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(5): 630 - 637.
- [6] BAHAR H, BENAYAHU D, YAFFE A, et al. Molecular signaling in bone regeneration[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2007, 2: 87 - 101.
- [7] HODIVALA-DILKE K. $\alpha V \beta 3$ integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(5): 514 - 519.
- [8] 杨丽华, 李玛琳, 王凯峰, 等. bFGF、 $\alpha V \beta 3$ 和 NF κB 在 hOEC 中的表达及其与血管生成关系的研究 [J]. 昆明医学院学报, 2005, 27(2): 19 - 23.
(2012 - 02 - 21 收稿)

(上接第 27 页)

伞形科、芸香科、菊科、豆科、茄科等植物. 香豆素类化合物具有抗肿瘤、抗艾滋病、抗氧化、抗炎、抗微生物、抗凝血等多方面的生物活性^[6]. 本研究对滇产隆萼当归的化学成分进行了提取分离, 获得 6 个线型呋喃类香豆素类化合物及阿魏酸. 经过初步的体外抗肿瘤活性筛选, 发现阿魏酸对所测试的两株人肿瘤细胞无细胞毒活性. 6 个线型呋喃类香豆素化合物中, 2 和 6 能明显抑制两株人肿瘤细胞的增殖, 并且其 IC_{50} 值小于 2 $\mu g/mL$, 低于或接近阳性对照药顺铂. 1, 3 在较高浓度时能抑制肿瘤细胞的增殖, 而 3, 4 则无明显的作用. 6 个化合物的母核相同, 除了 1 外, 在 5 位和 8 位均有取代基, 但取代基的类型有较大差异, 这种差异造成了其活性的差异, 进一步的活性比较研究可望对它们的构效关系作出分析. 2 和 6 具有良好的细胞毒活性, 其抗肿瘤活性有深入研究的价值.

[参考文献]

- [1] 宋萍萍, 孙明毅, 徐增莱, 等. 三种当归属植物的化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 833 - 835.
- [2] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 63 - 596.
- [3] 王雪梅, 李应东. 当归有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 甘肃中医, 2009, 22(11): 50 - 51.
- [4] 徐露, 董志. 当归多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 激光杂志, 2008, 29(4): 89 - 90.
- [5] 杨艳秋, 杨伟民. 当归活性成分阿魏酸钠干预老年冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛患者血液抗氧化能力和保护血内皮细胞功能[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 101 - 103.
- [6] 吴龙火, 李培, 刁勇, 等. 天然香豆素的抗癌机制研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(10): 1 174 - 1 177.

(2012 - 02 - 20 收稿)