

论著·基础研究

恩度治疗恶性腹腔积液动物模型的剂量依赖性疗效评估*

严俊,王纯,闵新

(上海市嘉定区中心医院肿瘤科,上海 201800)

摘要:**目的** 探究重组人血管内皮抑制素注射液(商品名:恩度)治疗恶性腹腔积液的剂量依赖性并评估其疗效。**方法** 建立裸鼠 H22 肿瘤腹腔积液动物模型,随机分为对照组、恩度 5 mg/kg 剂量组、恩度 10 mg/kg 剂量组和恩度 20 mg/kg 剂量组,每组 18 只动物。每天给予不同剂量恩度或生理盐水。治疗结束后每组取 6 只动物腹腔积液样品进行蛋白浓度、红细胞数量、肿瘤细胞数量的检测,其余动物观察各组荷瘤寿命,对照组基本死亡的时间为实验结束的时间点。**结果** 恩度 10 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量组裸鼠的体重质量增长速度、腹围增长速度和腹腔积液量显著低于对照组动物,同时该两组动物存活时间显著延长($P<0.05$)。10 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量组动物腹腔积液中蛋白浓度、肿瘤细胞数量和红细胞数量均显著低于对照组动物($P<0.05$)。**结论** 恩度可以显著减少腹腔积液的形成,同时降低腹膜通透性,以延长恶性腹腔积液动物存活时间。在该实验条件下,10 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量的恩度治疗效果基本相同。

关键词:重组人血管内皮抑制素; 恩度; 恶性腹腔积液; 疗效
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.15.002 **中图法分类号:**R246.5
文章编号:1673-4130(2018)15-1798-04 **文献标识码:**A

Dose-dependent efficacy evaluation of Endostar administration of malignant peritoneal effusion mice*

YAN Jun, WANG Chun, MIN Xin

(Department of Oncology, Jiading District Central Hospital, Shanghai 201800, China)

Abstract:**Objective** To explore the dose-dependency of Endostar administration of malignant peritoneal effusion and to evaluate its efficacy. **Methods** Establishment of mouse H22 tumor ascites animal model. Animals were randomly divided into control group, Endostar 5 mg/kg dose group, Endostar 10 mg/kg group and Endostar 20 mg/kg group, each group of 18 animals, which were administrated with different doses of Endostar or saline every day. At the end of the treatment, 6 animals each group were sacrificed and the protein content, erythrocytes number and tumor cells number were observed. The survival time was observed in the resident animals. The endpoint was identified as when all animal in control group were died. **Results** The body weight growth rate, abdominal girth growth rate and ascites volume of the mice in 10 mg/kg and 20 mg/kg groups were significantly lower than those of the control group($P<0.05$). The survival time of the two groups was significantly prolonged. The protein concentration, the number of tumor cells and the number of erythrocytes in the ascites of 10 mg/kg and 20 mg/kg groups were significantly lower than those in the control group($P<0.05$). **Conclusion** Endostar can significantly reduce the formation of ascites, and the peritoneal permeability, which may contribute in extending the survival time of malignant ascites. Under the present conditions, the efficacy of Endostar was 10 mg/kg and 20 mg/kg.

Key words: recombinant human endostatin; Endostar; malignant peritoneal effusion; efficacy evaluation

恶性腹腔积液是肿瘤细胞腹膜内扩散后产生的
腹腔积液。腹腔积液是多种癌症的临床表现,包括卵
巢癌(37%)、胰胆管癌(21%)、胃癌(18%)、食管癌
(4%)、结肠直肠癌(4%)和乳腺癌(3%)^[1-2]。恶性腹

* 基金项目:上海市嘉定区科委项目(2014-KW-01)。
作者简介:严俊,男,副主任医师,主要从事晚期恶性肿瘤综合诊治的研究。
本文引用格式:严俊,王纯,闵新.恩度治疗恶性腹腔积液动物模型的剂量依赖性疗效评估[J].国际检验医学杂志,2018,39(15):1798-1801.

腔积液可能造成患者腹胀、疼痛、恶心、呕吐、厌食、呼吸困难、肢体水肿、失眠、疲劳,严重影响患者的生活质量。化疗是腹腔积液癌症患者常见的一线治疗手段。腹腔给予放疗药物、化疗药物和腹腔静脉分流术曾被用于治疗恶性腹腔积液^[3]。但是以上疗法能够缓解腹腔积液患者的症状,却无法延长患者生存期。重复的腹腔穿刺也容易造成疼痛、蛋白质流失、血容量下降、感染、腹膜炎及肠穿孔等症状抗血管生成剂,如血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂和基质金属蛋白酶抑制剂的临床前和临床实验表明这些药物可能用于治疗恶性腹腔积液中起作用^[4-7]。但治疗恶性腹腔积液的疗法仍需大量实验确认。

内皮抑素是胶原蛋白 XⅧ 的羧基末端蛋白水解片段,也是内源性血管生成抑制剂^[8]。此外,它是一种广谱、低毒、多靶点血管生成抑制剂,可抑制多达 65 种类型的肿瘤^[9]。然而,内皮抑素的抗肿瘤作用尚未在Ⅱ期临床实验中得到证实。重组人血管内皮抑制素注射液(商品名:恩度)是大肠杆菌中表达和纯化的改良性内皮抑素^[10]。2005 年被中国食品药品监督管理局批准用于非小细胞肺癌的治疗^[11]。尽管恩度在治疗各种晚期恶性肿瘤方面取得了临床疗效^[12-13]。但关于恩度治疗恶性腹腔积液的有效性证据仍较为有限。本研究的目的在于确定恩度的新型适应症,为其用于治疗恶性腹腔积液相关的晚期癌症提供理论依据和实践经验。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 选取肝癌细胞系 H-22(购自中科院上海科学研究所细胞库)体外培养。将 H-22 细胞复苏,加入含 10% 胎牛血清(购自美国 Thermo-Fisher 公司)的 RPMI1640 培养基(购自美国 Gibco 公司),并将细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱(美国 Thermo Scientific)中培养待用。

1.2 恶性腹腔积液动物模型建立 实验选用 3 周龄的 BALB/c 裸鼠(购于本院实验动物中心),雌雄各半。自由饮水,给予灭菌大裸鼠专用饲料。将处于对数生长期的 H-22 细胞制成混悬液,腹腔注射给予 BALB/c 裸鼠(3×10^5 个细胞/200 μ L)。

1.3 分组及动物处理 将构建后荷瘤鼠随机分为 4 组,每组 18 只,给药容量为 0.2 mL,给药期间隔天测量腹围及体质量。给药用恩度购自山东烟台先声麦得津生物工程股份有限公司。空白对照组:不给予恩度处理,代之以等量生理盐水注射;恩度高剂量组:腹腔注射给予每天 20 mg·/kg 恩度,连续给药 15 d;恩度中剂量组:腹腔注射给予每天 10 mg/kg 恩度,连续给药 15 d;恩度低剂量组:腹腔注射给予每天 5 mg/kg 恩度,连续给药 15 d。

1.4 腹腔积液体积、蛋白浓度、红细胞数量、肿瘤细胞检测 治疗结束后,每组取 6 只裸鼠,在无菌条件下开腹,用无菌离心管采集腹腔积液并测量体积,留取样品,并进行总蛋白浓度、红细胞数量、肿瘤细胞,其余动物观察各组荷瘤寿命,以对照组基本死亡为实验结束的节点。总蛋白浓度检测使用全自动生化检测仪(美国 Beckman Coulter 公司 AU5800 型)进行检测。将收集的腹腔积液每个样本取 0.5 mL 加入肝素管中,稀释 10 倍后,采用血球计数板(美国 Millennium Sciences 公司)计数肿瘤细胞数和红细胞数。

1.5 裸鼠生存期观察 记录每只裸鼠生存时间,以开始治疗为第 1 天,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并按下列公式计算裸鼠生命延长率:生命延长率=(治疗组平均生存时间/对照组平均生存时间-1)×100%。

1.6 统计学处理 本研究采用 SPSS21.0 软件进行数据统计及分析。连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 One-way ANOVA,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸鼠体质量及腹围分析 给药期间各组裸鼠体质量变化曲线见图 1。重复测量 ANOVA 分析显示,与对照组相比,给予 10 mg/kg($P < 0.001$)和 20 mg/kg($P < 0.001$)剂量恩度的裸鼠体质量增长速度明显小于对照组。给药期间各组裸鼠腹围变化曲线见图 2。重复测量 ANOVA 分析显示,与对照组相比,给予 10 mg/kg($P < 0.001$)和 20 mg/kg($P < 0.001$)剂量恩度的裸鼠体质量增长速度明显小于对照组。

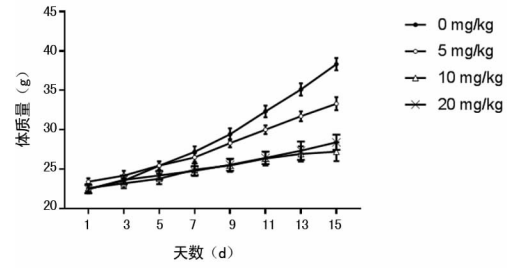


图 1 给药期间各组裸鼠体质量变化曲线

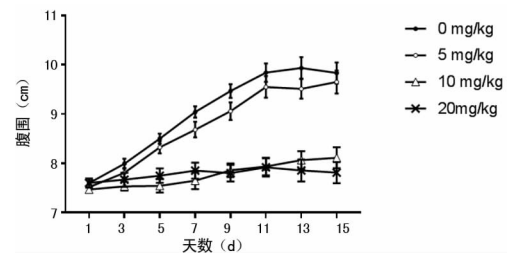


图 2 给药期间各组裸鼠腹围变化曲线

2.2 裸鼠平均腹腔积液量、腹腔积液蛋白浓度、肿瘤

细胞计数及红细胞计数 采用 One-way ANOVA 对各组裸鼠平均腹腔积液量、腹腔积液蛋白浓度、肿瘤细胞计数及红细胞计数进行分析。结果显示,各组裸鼠腹腔积液量组间差异有统计学意义(图 3A, $F_{3,20}=10.94, P<0.001$);两两分析显示,10 mg/kg ($P<0.001$)及 20 mg/kg ($P=0.029$)恩度组与 0 mg/kg 剂量组裸鼠腹腔积液量差异有统计学意义。各组裸鼠腹腔积液中蛋白浓度组间有差异有统计学意义(图 3B, $F_{3,20}=19.17, P<0.001$);两两分析显示,10 mg/kg ($P<0.001$)及 20 mg/kg ($P<0.001$)恩度组与 0 mg/kg 剂量组裸鼠腹腔积液中蛋白浓度差异有统计学意义。各组裸鼠腹腔积液中肿瘤细胞数量组间比较差异有统计学意义(图 3C, $F_{3,20}=13.57, P<0.001$);两两分析显示,10 mg/kg ($P<0.001$)及 20 mg/kg ($P=0.009$)恩度组与 0 mg/kg 剂量组裸鼠腹腔积液中蛋白浓度差异有统计学意义。各组裸鼠腹腔积液中红细胞数量在组间有统计学差异(图 3D, $F_{3,20}=12.81, P<0.001$);两两分析显示,10 mg/kg 恩度组与 0 mg/kg 剂量组裸鼠腹腔积液中蛋白浓度差异有统计学意义($P<0.001$)。

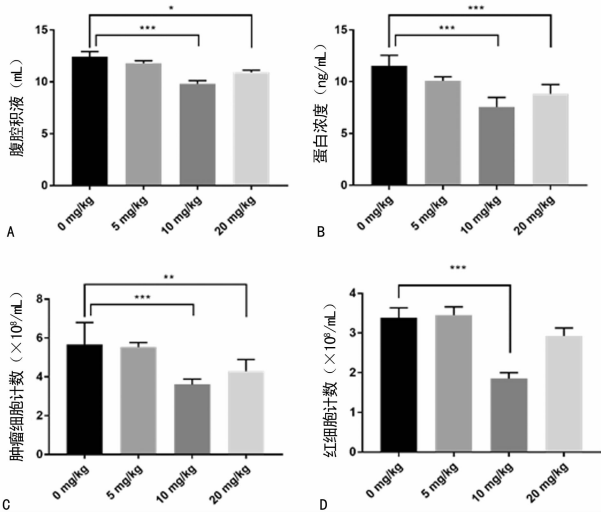


图 3 各组裸鼠腹腔积液量、腹腔积液中蛋白浓度、肿瘤细胞计数及红细胞计数

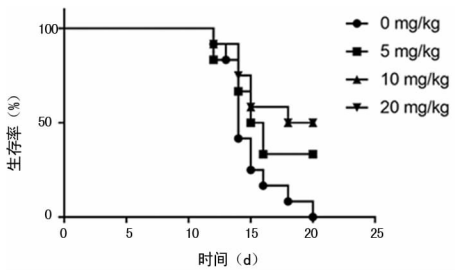


图 4 各组裸鼠生存曲线

2.3 裸鼠平均生存期 对各组裸鼠生存时间进行分析,结果显示,0、5、10 和 20 mg/kg 剂量组裸鼠的中

位生存时间分别为 14、15.5、19 和 19 d。Logrank 分析显示恩度对于裸鼠的生存时间有显著延长作用(图 4, $P=0.009$)。

3 讨 论

本研究旨在研究恩度是否可以影响恶性腹腔积液的生成并延长生存期。实验采用了裸鼠作为模型。结果显示,恩度可减少裸鼠产生的腹腔积液体积,同时降低腹腔积液中肿瘤细胞和 RBC 的数量,延长注射恩度裸鼠的生存时间。

本实验采用的是 H22 肿瘤细胞移植裸鼠体内建立动物腹腔积液模型。肝癌 H22 细胞株是最常用的腹腔积液型细胞株之一,广泛应用于裸鼠肿瘤动物模型的复制。据文献报道,H22 注射于裸鼠体内,腹腔积液形成率可高达 100%,且肿瘤细胞在腹腔内游离性生长。本实验结果可见对照组动物均产生含有肿瘤细胞的腹腔积液,无药物干预情况下荷瘤裸鼠腹围、肿瘤细胞百分比等均一性较好,可认为裸鼠造模成功。

对于恶性腹腔积液形成的分子机制加深理解,可能为开发新的更有效的针对恶性腹腔积液的疗法提供理论依据。有研究认为,肿瘤诱导的血管生成及血管通透性增加可能是形成腹腔积液的两个重要因素^[14-15]。本研究中,10 mg/kg 和 20 mg/kg 恩度剂量组裸鼠腹腔积液中红细胞比例明显低于对照组裸鼠及 5 mg/kg 恩度剂量组裸鼠。这说明恩度可以有效的减少红细胞渗漏入腹腔积液。之前研究表明肿瘤细胞分泌的 VEGF 在恶性腹腔积液的形成过程中起到重要作用,在癌症患者的胸腔积液和腹腔积液中,也可检测到高浓度的 VEGF^[16-17]。已有研究表明,内皮抑制素的作用与 VEGF 有关,VEGF 是血管生成的重要调节剂^[18],而恩度正是通过与内皮抑制素相似的机制产生抗血管生成的效应。与内皮抑制素不同,恩度增加了 9 种氨基酸,从而可以有效提高蛋白质的半衰期,并与锌结合^[19]。与之前研究相同,本研究中发现的恩度可减少裸鼠产生的腹腔积液体积,同时降低腹腔积液中 RBC 的数量和蛋白浓度^[5]。之前研究中也发现恩度仅能抑制腹腔积液的形成,不能抑制肿瘤的生长^[5],但本研究中发现,给予恩度 10 mg/kg 及 20 mg/kg,可以显著减少腹腔积液中肿瘤细胞的数量。当然,腹腔积液中肿瘤细胞数量减少并不一定代表着肿瘤生长减缓,因此关于恩度对于肿瘤生长的作用,仍需进一步研究确认。

4 结 论

恩度可以显著减少腹腔积液的形成,同时降低腹膜通透性,以延长恶性腹腔积液动物存活时间。在本研究的中,10 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量的恩度治疗效

果基本相同。本研究证实了恩度作为治疗恶性腹腔积液的治疗作用的可能性,为进行恩度多中心临床实验提供了动物实验数据基础。

参考文献

- [1] SADA E, Follana P, Peyrade F, et al. Pathogenesis and management of refractory malignant ascites [J]. Bull Cancer, 2011, 98(6): 679-687.
- [2] SMITH E M, JAYSON G C. The current and future management of malignant ascites[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2003, 15(2): 59-72.
- [3] BECKER G, GALANDI D, BLUM H E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(5): 589-597.
- [4] ZHAO W, CHEN D, CHEN J, et al. Effects of intracavitary administration of Endostar combined with cisplatin in malignant pleural effusion and ascites[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(1): 623-628.
- [5] WEI H, QIN S, YIN X, et al. Endostar inhibits ascites formation and prolongs survival in mouse models of malignant ascites[J]. Oncol Lett, 2015, 9(6): 2694-2700.
- [6] MULDER S F, BOERS-SONDEREN M J, HEIJDEN H D, et al. A phase II study of cediranib as palliative treatment in patients with symptomatic malignant ascites or pleural effusion[J]. Target Oncol, 2014, 9(4): 331-338.
- [7] ZHU Y, WU H, LIU R. Diagnostic values of sVEGFR-1 and endostatin in malignant pleural effusions in patients with lung cancer[J]. Clin Lab, 2017, 63(9): 1371-1378.
- [8] HELJASVAARA R, AIKIO M, RUOTSALAINEN H A. Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation-Lessons learned from model organisms and human patients[J]. Matrix Biology, 2017, 57(1): 55-75.
- [9] MOHAJERI A, SANAEI S, KIAFAR F, et al. The challenges of recombinant endostatin in clinical application: focus on the different expression systems and molecular bio-engineering[J]. Adv Pharm Bull, 2017, 7(1): 21-34.
- [10] REN Z, WANG Y, JIANG W, et al. Anti-Tumor effect of a novel soluble recombinant human endostatin: administered as a single agent or in combination with chemotherapy agents in mouse tumor models[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107823.
- [11] YUE T, KAI Z, HONG T, et al. Characterization of a monoPEG20000-Endostar[J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(3): 331-336.
- [12] Zhang Q, Cao J, Xue K, et al. Recombinant human endostatin in combination with CHOP regimen for peripheral T cell lymphoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 145-151.
- [13] RONG B, CAI X, LIU H, et al. Thoracic perfusion of recombinant human endostatin (Endostar) combined with chemotherapeutic agents versus chemotherapeutic agents alone for treating malignant pleural effusions: a systematic evaluation and meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 888-900.
- [14] YIN T, WANG G, HE S, et al. Malignant pleural effusion and ascites induce Epithelial-Mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties via the vascular endothelial growth factor (VEGF)/phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway[J]. J Biol Chem, 2016, 291(52): 26750-26761.
- [15] YANG L, ZHANG Y, CHENG L, et al. Mesenchymal stem cells engineered to secrete pigment Epithelium-Derived factor inhibit tumor metastasis and the formation of malignant ascites in a murine colorectal peritoneal carcinomatosis model[J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(3): 267-277.
- [16] HIRAYAMA N, TABATA C, TABATA R, et al. Pleural effusion VEGF levels as a prognostic factor of malignant pleural mesothelioma[J]. Respir Med, 2011, 105(1): 137-142.
- [17] ABDEL-RAZIK A, MOUSA N, ELALFY H, et al. A novel combination of C-Reactive protein and vascular endothelial growth factor in differential diagnosis of ascites [J]. J Gastrointest Cancer, 2017, 48(1): 50-57.
- [18] MOSTMANS Y, CUTOLO M, GIDDELO C, et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(8): 774-786.
- [19] HAN Q, FU Y, ZHOU H, et al. Contributions of Zn(II)-binding to the structural stability of endostatin[J]. FEBS Lett, 2007, 581(16): 3027-3032.

(收稿日期: 2018-01-15 修回日期: 2018-04-12)