

· 基础研究 ·

局部热化疗对大鼠胶质细胞移植瘤血管再生及 VEGF 表达的影响

方胜 王晓霞 裴永恩 袁先厚

【摘要】目的 研究局部热化疗对鼠胶质细胞移植瘤血管再生及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨其治疗胶质瘤的机制。**方法** 在鼠胶质细胞移植瘤动物模型上,分组进行局部热疗、化疗和热化疗。用FVIII-RA染色标记血管内皮细胞,以微血管密度作为定量检测指标。用免疫组化S-P法检测VEGF蛋白表达;电镜观察肿瘤微血管结构的变化。**结果** 热疗、化疗、热化疗组与对照组比较,VEGF蛋白表达减低($P < 0.01$),且热化疗有协同作用($P < 0.01$)。VEGF表达与MVD间呈正相关($r = 0.9798, P < 0.001$)。热化疗后肿瘤微血管外径变小,血管壁变厚,血管减少,血管内皮细胞紧密连接增多,细胞连接间隙减小,有的血管甚至只能发现完整的基膜而缺乏内皮细胞。**结论** ①热疗、化疗和热化疗能抑制肿瘤血管再生,且阿霉素与热疗有协同作用;②热化疗能降低肿瘤VEGF合成与分泌,破坏与减少肿瘤血管再生,作为胶质瘤辅助治疗有良好的临床应用前景。

【关键词】 胶质瘤; 热化疗; 血管再生; 大鼠

The effects of localized thermochemotherapy on angiogenesis and the expression of VEGF protein of C6 gliomas in rat FANG Sheng*, WANG Xiao-xia, PEI Yong-en, YUAN Xian-hou. * Department of Neurosurgery, Central Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, China

【Abstract】Objective To study the effects of localized thermochemotherapy on angiogenesis and the expression of VEGF protein of C6 gliomas in rats, and explore the mechanisms of angiogenesis inhibition by localized thermochemotherapy. **Methods** Following the establishment of animal models, 40 rats harboring the C6 gliomas were randomly allocated to 4 groups, the rats in the fore 3 groups were treated by localized thermochemotherapy, hyperthermia and chemotherapy, respectively, the remaining group served as control. The expression of VEGF and FVIII-RA protein were detected by S-P immunohistochemistry. The vascular structure in rat's glioma was observed by immunohistochemistry and electron microscopy technique. **Results** As compared with the control group, the expression of VEGF protein was decreased in the hyperthermia and chemotherapy groups, as well as in the thermochemotherapy group. The expression of VEGF was positively correlated with the microvessel density in the tumor ($r = 0.9798, P < 0.001$). Electron microscopic observation also showed that angiogenesis was inhibited by interstitial localized thermochemotherapy in rat's gliomas. **Conclusion** Hyperthermia, chemotherapy and thermochemotherapy could inhibit angiogenesis in tumor. The chemotherapy agent adriamycin (ADM) showed remarkable synergic effects with hyperthermia in C6 glioma of rat. Both the synthesis and secretion of VEGF could be inhibited by thermochemotherapy.

【Key words】 Glioma; Thermochemotherapy; Angiogenesis; VEGF

肿瘤组织病理学将肿瘤成分分为肿瘤实质(即肿瘤细胞)及间质(即胶原纤维、毛细血管等)成分。Folkman^[1]提出肿瘤形成后如果没有新生血管网长入,在体积为 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 大小时就停止生长,此时肿瘤细胞的生长与死亡处于平衡,肿瘤呈休眠状态。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)又名血管通透因子(vascular permeability

factor, VPF)是近年来发现的一种大分子活性物质,在血管通透性改变及血管内皮细胞增殖和血管形成中发挥重要的特异性生物作用,与肿瘤的生长、浸润和转移密切相关^[2,3]。我们在大鼠胶质细胞移植瘤动物模型热化疗的实验中,通过对肿瘤微血管密度(microvessels density, MVD)及VEGF表达的分析对比研究,探讨热化疗是否抑制其胶质瘤的血管再生及其有关机制。

材料及方法

一、实验动物及分组

40只Wistar健康大鼠购自湖北省卫生防疫站实验动物中心,体重约200~250g,雌雄不限。实验时按随机原则将其分为四组,即对照组、化疗组、热疗组和

基金项目:湖北省卫生厅2001年重点指令性计划资助项目(WJ01577)

作者单位:435000 黄石,黄石市中心医院神经外科,现工作单位为529000 江门,广东省江门市人民医院神经外科(方胜);黄石市中心医院神经外科(裴永恩),心血管内科(王晓霞);湖北医科大学附二院神经外科(袁先厚)

热化疗组各 10 只。大鼠 C6 胶质瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。鼠 VEGF 单克隆抗体 (Ab-3) 为 Neomarrers 公司产品,第八因子相关抗原 (FVIII-RA) 抗体均购于福州。

二、大鼠胶质瘤的热疗、化疗、热化疗及取材方法

C6 细胞在培养瓶中生长至 90% 融合时 (第 3 天),胰酶消化,用不含血清的 DMEM 培养液吹打,使其脱落,收集细胞,低速离心,调整细胞悬液浓度约 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ 个/ml。在无菌条件下,将其注射至 Wistar 大鼠背部皮下约 0.1 ml,注射细胞时缓慢进行并留针数分钟。肿瘤生长过程中,每 2 d 观察大鼠皮下胶质瘤的成瘤及生长情况,并测量肿瘤的最大直径 (a) 和最大宽径 (b)。当肿瘤生长至 22 d,直径约 1.5 ~ 2.0 cm 时,将 40 只大鼠进行随机分组。

对照组瘤体内注射 0.3 ml 生理盐水 (室温 27℃),不作治疗。热疗组瘤体内注射 0.3 ml 热生理盐水 (43℃) 后用 2 450 MHz 微波对准瘤体辐射,每次 20 min,隔日 1 次,共 5 次。化疗组用阿霉素 0.3 mg (ml) 作瘤体内注射,隔日 1 次,共 5 次。热化疗组注射 0.3 ml (mg) 阿霉素 (43℃) 热化疗液后,用 2 450 MHz 微波对准瘤体辐射,约 20 min,隔日 1 次,共 5 次。治疗结束后第 2 天,经腹腔注射 1% 戊巴比妥 (35 mg/kg 体重) 麻醉大鼠,在无菌条件下取出皮下 C6 细胞移植瘤组织,摄相后,于分析天平上称取瘤重,置入 4% 中性甲醛中固定,并常规石蜡包埋。

三、免疫组织化学染色方法

将胶质瘤石蜡标本块切片,5 μ m 厚,贴于经多聚赖氨酸浸泡过的载玻片上。用二甲苯脱蜡后常规梯度酒精水化。切片浸泡于柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中,置于医用微波炉 (92 ~ 98℃) 中加热 15 min。根据实验设计,每例标本取 2 张切片,分别滴加 1 滴 VEGF 单抗和 FVIII-RA 抗体;另取 1 张切片滴加 1 滴 PBS 液,作为阴性对照。放置于 4℃ 冰箱中过夜 (12 ~ 15 h) 或在室温下孵育 1 ~ 2 h。详细步骤严格按福州迈新生物技术开发公司提供的 S-P 试剂盒说明进行。DAB 显色,苏木素溶液轻度复染细胞核。

VEGF 染色结果的判定:VEGF 阳性细胞定位于胞浆或胞膜中,呈棕黄色或浅黄色。计数 10 个视野不少于 1 000 个细胞内的阳性细胞数,计数阳性细胞百分比 (%)。

微血管计数:在 40 倍物镜下,根据 FVIII-RA 标记的血管内皮细胞,在切片的不同方位选取 5 个视野、计数微血管的量,求其平均值。即每个视野总微血管数作为微血管密度。

四、透射电镜的观察

鼠胶质细胞移植瘤生长第 32 天,各实验组分别选 2 只动物,在称重前迅速切取大小约 0.5 ~ 1.0 mm³ 的

肿瘤组织标本,立即浸入预冷的 2.5% 戊二醛前固定液中,固定 4 ~ 12 h 后用 1% 锇酸磷酸缓冲液进行后固定,多次漂洗后,梯度酒精逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,经醋酸双氧铀和柠檬铅染色后,在日立 H-600 型透射电镜下观察肿瘤微血管结构的变化。

五、统计学方法

测定值用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数采用方差分析,相关分析采用直线回归分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水平。

结 果

一、皮下移植瘤生长曲线

根据测量的肿瘤最大直径 a 值和最大宽径 b 值,按公式计量其体积 (V), $V = a \cdot b^2 / 2$, 绘制生长曲线。

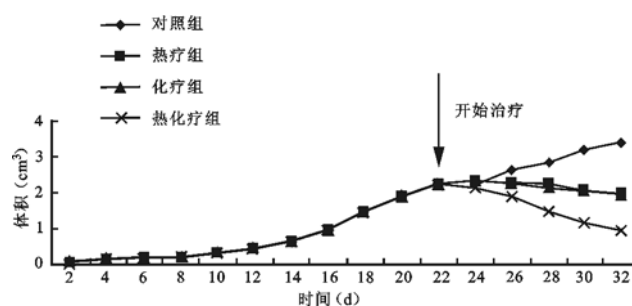


图 1 各组大鼠皮下 C6 移植瘤生长曲线图

从曲线可以看出,对照组瘤体随瘤龄延长其体积明显增大;热疗后瘤体缩小;化疗组瘤体也缩小;热化疗后,瘤体缩小更明显。瘤体生长均受到抑制。进一步比较肿瘤接种后 32 d 瘤体重量,结果表明热化疗组瘤体较其他组均有减轻, $P < 0.01$;热疗、化疗组较对照组也明显减轻, $P < 0.01$;而热疗组与化疗组比较,差异无显著性, $P > 0.05$ 。

二、透射电镜观察

治疗组血管减少,血管外径变小,血管壁增厚,有的血管甚至只能发现完整的基膜而缺乏内皮细胞;血管内皮细胞间紧密连接增多,而细胞连接间隙减小 (图 2a, b)。

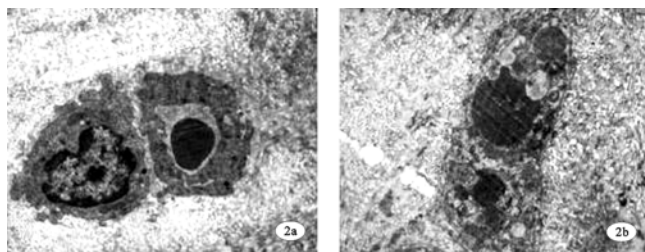


图 2 治疗组大鼠移植瘤电镜组织学表现

2a 肿瘤细胞明显减少,体积缩小,核固缩、边聚。肿瘤血管外径变小,管壁增厚,数量减少,血管内皮细胞紧密连接增多,内皮细胞连接间隙减小 (热化疗组 TEM $\times 6000$); 2b 肿瘤血管外径变小,管壁增厚;部分血管内皮细胞出现胞质空泡化,有的甚至只有基膜而缺乏内皮细胞 (热化疗组 TEM $\times 8000$)

三、VEGF 表达与 MVD 计数

对照组肿瘤细胞中 VEGF 蛋白阳性表达的平均百分率为 48.85%, MVD 平均值为 19.26 ± 11.05 个(见图 3a~d、图 4a~d)。热疗、化疗和热化疗后 VEGF 蛋白表达和 MVD 均较对照组表达降低, $P < 0.01$ 。热化疗组 VEGF 蛋白表达和 MVD 较热疗组或化疗组降低, $P < 0.01$ 。而热疗组与化疗组 VEGF 蛋白表达和 MVD 比较, 差异均无统计学意义, $P > 0.05$ (表 1)。

四、VEGF 与 MVD 的相关性分析

进行直线回归分析后, 发现 VEGF 蛋白表达与 MVD 间存在正相关性($r = 0.9798$, $P < 0.001$)。

表 1 各组 VEGF 表达与 MVD 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF (%)	MVD (个)
对照组	10	48.85 ± 11.25	19.26 ± 11.05
热疗组	10	$36.22 \pm 10.26^{\Delta}$	$11.29 \pm 8.26^{\Delta}$
化疗组	10	$40.27 \pm 10.52^{\Delta}$	$15.24 \pm 8.89^{\Delta}$
热化疗组	10	$29.26 \pm 9.82^{\Delta*}$	$7.21 \pm 4.52^{\Delta*}$

注: Δ 与对照组相比较, $P < 0.01$; * 与热疗组、化疗组比较, $P < 0.01$

讨 论

1971 年, 美国哈佛大学医学院儿科医生 Howen 曾经在《新英格兰医学杂志》上发表了一则闻名于世的医学理论, 即“肿瘤没有血管网络去滋养它们和带走新陈代谢废物就不能生长, 抑制血管生长可能是治疗癌症的一种方法”。在许多肿瘤中, 血管的多少与肿瘤转移、临床预后直接相关, 即肿瘤血管越丰富, 转移的机率越高, 临床预后越差。

血管内皮细胞不像肿瘤细胞那样易突变, 因而很少产生耐药。每 10~100 个肿瘤细胞需要 1 个血管内皮

细胞。也就是说抑制 1 个血管内皮细胞可使 10~100 个肿瘤细胞的生长受到影响。因此抑制肿瘤血管形成阻止肿瘤生长还具有放大效应^[4]。本研究证实热疗、热化疗后, 肿瘤血管内皮细胞间紧密连接增多, 而细胞连接间隙减小; 血管壁变厚、血管外径变小; 有的血管甚至只能发现完整的基膜而缺乏内皮细胞; 血管密度明显减少。这提示热疗和间断热化疗通过减少肿瘤的血管形成, 破坏其血流供应而达到抑制肿瘤增殖的作用。

VEGF 是由分子量相似的两个亚单位以二硫键连接的同源二聚体糖蛋白, 分子量为 34~45 KD^[5]。VEGF 可特异性地作用于血管内皮细胞膜上的两种酪氨酸激酶受体 Flt-1 和 Flk-1/KDR, 介导细胞内酪氨酸激酶磷酸化, 从而发挥其促进血管内皮细胞分裂增殖, 诱导血管形成和增加血管通透性的作用^[2,3,6]。近年来, 有学者在肿瘤细胞膜上也发现了 VEGF 受体的存在。并证明 VEGF 尚有促进肿瘤细胞增殖的功能^[7,8]。Kim 等^[9]将 G55 胶质瘤细胞注入裸鼠体内 1 周后, 通过腹腔注射给予各种剂量的 VEGF 单克隆抗体及对照抗体, 结果证实用 100 mg VEGF 抗体治疗时肿瘤重量减少 80%, 血管密度亦相应减少。本实验发现, 各实验组 VEGF 均降低($P < 0.01$), 且热化疗组 VEGF 降低更明显($P < 0.01$), 提示热化疗能抑制肿瘤细胞合成与分泌 VEGF, 一方面减少 VEGF 对血管内皮细胞刺激所引起的过度增生, 另一方面也减少肿瘤分泌 VEGF, 抑制肿瘤细胞自身的增殖。

为了深入探讨 VEGF 促血管内皮细胞的作用以及热化疗的治疗机制, 我们选用 FVIII-RA 免疫组化染色来标记血管内皮细胞, 以微血管密度 (MVD) 作为定量

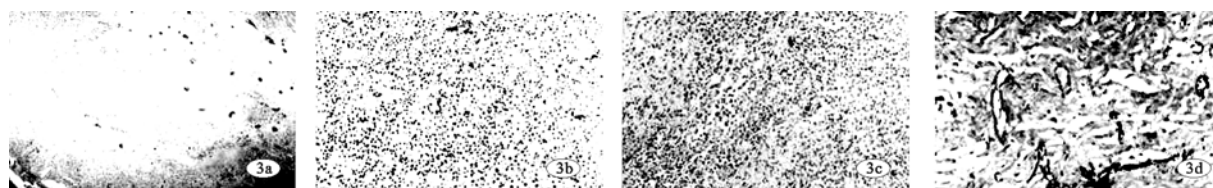


图 3 各组大鼠移植瘤血管再生表现

3a 肿瘤 FVIII-RA 标记血管内皮细胞, 血管丰富(对照组 S-P 法 $\times 40$); 3b 血管减少(化疗组 S-P 法 $\times 100$); 3c 血管破坏并减少(热疗组 S-P 法 $\times 100$); 3d 血管破坏并减少(热化疗组 S-P 法 $\times 200$)

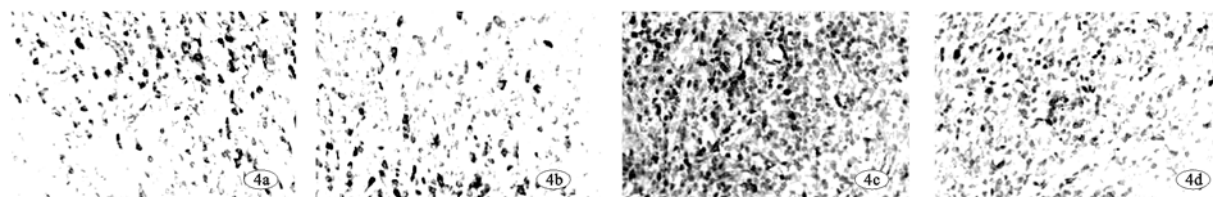


图 4 各组大鼠移植瘤 VEGF 表达情况

4a 肿瘤 VEGF 表达位于细胞浆, 细胞浆呈棕黄色或浅黄色, 蛋白表达(+++)(对照组 S-P 法 $\times 400$); 4b 肿瘤 VEGF 蛋白表达(++) (化疗组 S-P 法 $\times 400$); 4c 肿瘤 VEGF 蛋白表达(+) (热疗组 S-P 法 $\times 400$); 4d 肿瘤 VEGF 蛋白表达(+) (热化疗组 S-P 法 $\times 400$)

检测指标,判断 VEGF 与胶质瘤血管之间的相关性。本实验研究结果提示,胶质瘤经热疗、化疗或热化疗后血管密度均有不同程度的降低($P < 0.01$),且热化疗后肿瘤血管密度降低更明显($P < 0.01$)。经 VEGF 蛋白表达与 MVD 间直线回归分析后,提示热化疗治疗胶质瘤后,肿瘤 VEGF 合成与分泌明显减少,血管再生受到明显抑制($P < 0.001$)。这说明热化疗治疗胶质瘤也通过减少肿瘤的 VEGF 合成和分泌,破坏与减少肿瘤血管再生,达到抑制肿瘤增殖的治疗作用。

参 考 文 献

- 1 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, 1: 27-31.
- 2 Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58: 613-627.
- 3 Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, et al. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain

- tumors. *Am J Pathol*, 1995, 146: 368-378.
- 4 Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am*, 1996, 275: 150-154.
- 5 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161: 851-858.
- 6 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1029-1039.
- 7 Herold-Mende C, Steimer HH, Riede D, et al. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest*, 1999, 79: 1573-1582.
- 8 Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, et al. Early induction of angiogenic signals in gliomas of GFAP-V-src transgenic mice. *Am J Pathol*, 1999, 154: 581-590.
- 9 Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993, 362: 841-844.

(收稿日期:2002-12-13)

(本文编辑:熊芝兰)

· 病例报道 ·

高压氧治疗中出现类似氧中毒症状 1 例

王勤周 陆薇 王者晋

患者女,16岁,学生,2001年5月25日CO中毒致昏迷,小便失禁,无大便失禁,无恶心呕吐。外院抢救3h后清醒,继而在空气加压舱中作高压氧治疗,每日1次。7d后出现左手不自主抖动,呈小幅度颤抖,频率5~6次/s,左上肢及右下肢无力,跛行。在第14次高压氧治疗中,出现口唇麻木、四肢肌肉颤动、头部不适等过度换气综合征,怀疑为惊厥型氧中毒的前驱期而终止治疗。1个月后以CO中毒后遗症锥体外系损害收入我科,查体:神志清楚,言语流利,左眼球外展不能,露白约0.3cm,左手及右下肢不自主抖动,肌力V级,左手握力减低,四肢肌张力、腱反射正常,病理反射阴性。继续在空气加压舱0.2MPa压力下行高压氧治疗,第4、5次治疗中出现不适感,心慌、出汗,经呼吸舱内压缩空气,精神放松后症状消失,第6次高压氧治疗中,出现四肢及下颌不自主抖动、胸闷心慌、头痛、恶心、出汗伴过度换气症状,遂减压出舱,10min后症状不能缓解,给予安定10mg肌注,静滴平衡盐后症状逐渐消除。停止高压氧治疗进行临床观察,发现患者的抖动形式多样,有功能色彩,与情绪有关,抗帕金森药物治疗无效。推测患者除CO中毒外,尚伴有神经官能症,遂给以暗示、抗焦虑、抗抑郁治疗,病情有明显好转。再进行余下的5次高压氧治疗时,第1次又出现轻度肢体抖动、虚汗、胸闷不适,鼓励其精神放松,调整吸氧时呼吸频率及幅度后,再未出现上述状况,后4次治疗过程中状态一直良好。

讨论 关于高压氧治疗过程中发生氧中毒的病例,曾有多例报道,一度夸大了高压氧治疗的毒副作用,给医患双方都造成一定的影响。高压氧治疗的毒副作用包括:氧中毒、气压伤、

减压病和氮麻醉等。惊厥型氧中毒,又称急性氧中毒。吸入相当于0.2~0.3MPa以上的氧气,经过一定时间就有可能发生。一般情况下惊厥型氧中毒分为前驱期、惊厥期和昏迷期。在前驱期,大多数患者首先出现口唇或面部肌肉颤动及面色苍白,继而可有恶心、出汗、眩晕、流涎、头向后仰,也可出现视力障碍、听觉异常,还可表现为心悸、指(趾)麻木、情绪反常(忧虑和心烦意乱)或欣快感^[1]。有时上述氧中毒的前驱症状只表现其中几种,有时会直接进入惊厥期。但是,在严格执行操作规范,避免其诱发因素等前提下,0.2MPa空气加压舱中氧中毒发生的可能性非常小^[2]。本例患者所出现的症状,与其神经官能症密切相关,经暗示和抗焦虑、抗抑郁治疗,在后来的高压氧治疗中表现越来越好,据此可以肯定其在前一阶段高压氧治疗中表现出来的症状,并非氧中毒,而应考虑为神经官能症样发作,只不过其表现与氧中毒非常相似。此病例提示,对伴有神经官能症需进行高压氧治疗的患者,在严格执行治疗方案的过程中,应鼓励其精神放松,吸氧频率及幅度不能过快过深,在避免癔病性过度换气综合征的同时,还应密切观察患者在临床及治疗过程中的表现。若出现上述症状,不能轻易定性为氧中毒。

参 考 文 献

- 1 房广才,主编. 临床高压氧医学. 北京:华文出版社,1995. 152.
- 2 刘子藩,易治,主编. 实用高压氧医学. 广州:广东科技出版社,1990. 117.

(收稿日期:2003-03-15)

(本文编辑:阮仕衡)