

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.30.001

慢性应激对内皮抑素重组腺病毒抗肿瘤疗效的影响*

张 杰¹,黄伯彦²,门海涛^{1△}

(1.重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 400016;2.四川大学华西医院肿瘤中心,成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨慢性应激对内皮抑素重组腺病毒(Ad-hE)的抗肿瘤疗效是否产生影响。**方法** 小鼠皮下接种 Lewis 肺癌细胞(LL/2)后分别接受 Ad-hE、慢性束缚应激、 β -肾上腺素受体(β -AR)阻断剂普萘洛尔等处理,记录肿瘤生长曲线。检测小鼠血清血管内皮生长因子(VEGF)水平,检测肿瘤组织中血管内皮细胞。LL/2 细胞体外接受去甲肾上腺素(NE)或普萘洛尔处理,检测细胞上清液中 VEGF 水平及肿瘤细胞缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达。**结果** 小鼠在接受 Ad-hE 治疗的基础上再接受慢性应激 21 d 后,其负荷的肿瘤体积及瘤质量分别达到了(2 513.02 $\pm$ 357.78)mm³和(0.70 $\pm$ 0.13)g,血清中 VEGF 水平为(195.00 $\pm$ 17.70)ng/mL,肿瘤组织中微血管数量为 72.33 $\pm$ 6.20。而单纯接受 Ad-hE 治疗的小鼠以上各值分别为(207.65 $\pm$ 35.00)mm³、(0.11 $\pm$ 0.03)g、(70.00 $\pm$ 5.70)ng/mL 及 11.00 $\pm$ 2.0,差异均有统计学意义($P<0.01$)。NE 在体外可以诱导 LL/2 细胞分泌 VEGF 并上调 HIF-1 α 表达。普萘洛尔可以阻断慢性应激以及 NE 的上述效应。**结论** 慢性应激可能通过 β -AR-HIF-1 α -VEGF 信号通路削弱 Ad-hE 的抗肿瘤疗效。

[关键词] 应激;去甲肾上腺素;普萘洛尔;缺氧诱导因子 1, α 亚基;血管内皮生长因子 A

[中图法分类号] R73-36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)30-3845-04

The effect of chronic stress on anti-tumor efficacy of endostatin recombinant adenovirus*

ZHANG Jie¹,HUANG Boyan²,MEN Haitao^{1△}

(1. Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Cancer Center, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether chronic stress has an effect on the anti-tumor effect of endostatin recombinant adenovirus (Ad-hE). **Methods** Mice were subcutaneously inoculated with lung cancer cells (LL/2) which treated with Ad-hE, chronic restraint stress, and β -adrenergic receptor (β -AR) blocker propranolol. Tumor volume was observed and analyzed. The serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level was measured in mice, and the level of vascular endothelial cells in tumor tissues was detected. LL/2 cells were treated with norepinephrine (NE) or propranolol in vitro to detect the expression of VEGF and the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the cell supernatant. **Results** The tumor volume, tumor weight, VEGF in serum and vessel density in tumor tissues of mice after receiving both chronic restraint stress and Ad-hE were (2 513.02 $\pm$ 357.78)mm³, (0.698 $\pm$ 0.130)g, (195.0 $\pm$ 17.7)ng/mL and 72.33 $\pm$ 6.20, respectively. However, the results of mice which only received Ad-hE were (207.65 $\pm$ 35.00)mm³ ($P<0.01$), (0.11 $\pm$ 0.03)g ($P<0.01$), (70.00 $\pm$ 5.70)ng/mL ($P<0.01$) and 11 $\pm$ 2 ($P<0.01$), respectively, the differences between two groups were statistically significant. NE induced secretion of VEGF and up-regulated the expression of HIF-1 α in LL/2 cells in vitro. In addition, propranolol could block the effect above which induced by chronic restraint stress and NE. **Conclusion** Chronic stress may attenuate the anti-tumor efficacy of Ad-hE through the β -AR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway.

[Key words] stress; norepinephrine; propranolol; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; vascular endothelial growth factor A

内皮抑素(endostatin)可以抑制内皮细胞增殖、迁移及诱导其凋亡,发挥抗肿瘤新生血管生成的作用,从而抑制肿瘤生长。笔者团队在前期研究中成功构建内皮抑素重组腺病毒(Ad-hE),发现荷瘤小鼠通过尾静脉注射 Ad-hE 后,血清中内皮抑素的水平可较长时间保持在高水平,肿瘤内血管内皮细胞的增殖明

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81703083,81402402)。作者简介:张杰(1986—),住院医师,博士,主要从事肿瘤社会心理学方向的基础与临床研究。△ 通信作者,E-mail:men.hitao@gmail.com。

显减弱,肿瘤生长受到显著抑制^[1]。但据报道,肿瘤患者在面对“癌症”诊断时,大多数会有长期的负性情绪而处于一种“慢性应激”状态^[2],促进以去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)为代表的压力相关激素释放^[3]。NE 可以激活 β -肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β -AR)后上调乏氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)等因子表达,促进肿瘤新生血管生成、侵袭及转移等,而 NE 的这些效应可以用 β -AR 阻断剂普萘洛尔(propranolol)进行阻断^[4-6]。本研究拟通过构建荷瘤小鼠慢性束缚应激模型,探索慢性应激对 Ad-hE 疗效的影响,并试图探讨其中可能存在的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司;NE 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;普萘洛尔购自 Enzo 公司;兔抗鼠 HIF-1 α 、兔抗鼠 CD31 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自中杉金桥生物技术有限公司;ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;冰冻切片包埋剂(OCT)购自瑞士 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 小鼠 Lewis 肺癌细胞 LL/2 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。细胞汇合率在 70%~80% 左右时进行细胞传代、扩增,按 5×10^4 /孔将 LL/2 细胞接种于六孔板,于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中孵育过夜。过夜后细胞已贴壁,此时将细胞上清液弃去并替换为不含血清的 DMEM 新鲜培养基,再次孵育过夜。次日吸弃细胞培养上清液,将不含血清的 DMEM 培养基按以下分组加入相应试剂后分别处理各组细胞:(1)单纯细胞培养基(Control 组);(2) 10 μ mol/L NE(NE 组);(3) 10 μ mol/L 普萘洛尔(Prop 组);(4) 10 μ mol/L NE + 10 μ mol/L 普萘洛尔(NE+Prop 组)。普萘洛尔在加入 NE 前 1 小时加入,每孔液体总量控制在 2 mL。处理 48 h 后收集细胞上清液,用于 ELISA 检测。提取细胞蛋白用于 Western blot 检测。

1.2.2 HIF-1 α 蛋白检测 细胞经上述处理 48 h 后弃去上清液并提取总蛋白, Nanodrop 超微量分光光度计测量蛋白浓度,配置好十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶倒入制胶器具,待自然凝固后上层加入 SDS-PAGE 浓缩胶,将梳子插入浓缩胶。待胶体凝固后拔出梳子,将胶体盛放于电泳缓冲液,加入制备好的蛋白进行电泳。浓缩胶 80 V 电泳,当蛋白开始分离时调整电压为 120 V,蛋白分离后停止电泳。将分离的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,转膜电压条件 100 V 90 min。5% 脱脂牛

奶封闭蛋白,兔抗鼠 HIF-1 α 抗体 4℃ 孵育过夜。第 2 天 TBST 清洗条带后,室温孵育羊抗兔二抗 2 h,再次用 TBST 清洗条带。加入化学发光显影液后立即于化学发光成像仪下曝光,观察 NE 及普萘洛尔对细胞 HIF-1 α 表达的影响。

1.2.3 荷瘤小鼠慢性束缚应激模型的建立及分组 采用 4~6 周雌鼠 C57BL/6,均购自四川大学华西实验动物中心。本研究中动物实验通过华西医院动物实验伦理审查,所有关于小鼠实验操作均严格遵循四川大学动物伦理委员会动物伦理学原则。培养中的 LL/2 细胞经胰酶消化、离心后,用无血清培养基制备细胞悬液,调整数量为 5×10^6 /mL,将 100 μ L 细胞悬液接种于小鼠右侧背部皮下。待小鼠皮下可扪及结节后将小鼠分组,每组 5 只分别接受:(1)Ad-hE 治疗(Ad-hE 组);(2)Ad-hE 联合慢性束缚应激(Ad-hE+Res 组);(3)Ad-hE 联合 β -AR 阻断剂普萘洛尔(Ad-hE+Prop 组);(4)Ad-hE 联合慢性束缚应激及普萘洛尔阻断(Ad-hE+Prop+Res 组)。Ad-hE 剂量为 1×10^9 /PFU,尾静脉注射。慢性束缚应激方式为小鼠固定于束缚管中可自由呼吸但身体无法移动,每天 2 h。普萘洛尔处理剂量为每天 1 μ mol/100 g,腹腔注射,其余组则腹腔注射等体积磷酸盐缓冲液(PBS)。每 3 天用游标卡尺记录皮下肿瘤长径和短径,计算肿瘤体积(mm^3)=长径 $\times$ 短径² $\times 0.52$ 。21 d 后麻醉小鼠并断颈处死,留取血清妥善保存用于 ELISA 检测。剥离皮下肿瘤组织、称质量、包埋于 OCT 妥善保存用以制备切片及免疫组织化学检测。

1.2.4 ELISA 将上述收集的细胞培养上清液、小鼠血清加入 ELISA 试剂盒中的板条,加入相应标准品、标准品稀释液,封闭反应孔,于 37℃ 孵箱孵育 90 min。洗涤液洗板 5 次后加入生物素化抗体,37℃ 孵箱孵育 60 min。洗板 5 次后加入酶结合工作液,37℃ 孵箱避光孵育 30 min。再次洗板 5 次后加入显色底物 37℃ 孵箱避光孵育 15 min,加入终止液于酶标仪 450 nm 检测光密度($OD_{450 \text{ nm}}$)值。以 OD 值作纵坐标,标准品浓度作横坐标,绘制标准品曲线,计算细胞上清液及小鼠血清中 VEGF 水平。该试验严格按照其说明书操作步骤进行。

1.2.5 免疫组织化学检测 肿瘤组织中血管内皮细胞标志物 CD31 包埋于 OCT 的肿瘤组织于冰冻切片机中制备约 5 μ m 厚冰冻切片,采用 4℃ 丙酮固定切片,0.3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶。孵育兔抗鼠 CD31 一抗及 HRP 标记的羊抗兔二抗, DAB 显色、苏木素复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明切片、树胶封片。于显微镜下观察,随机选取 5 个视野计数微血管数量。

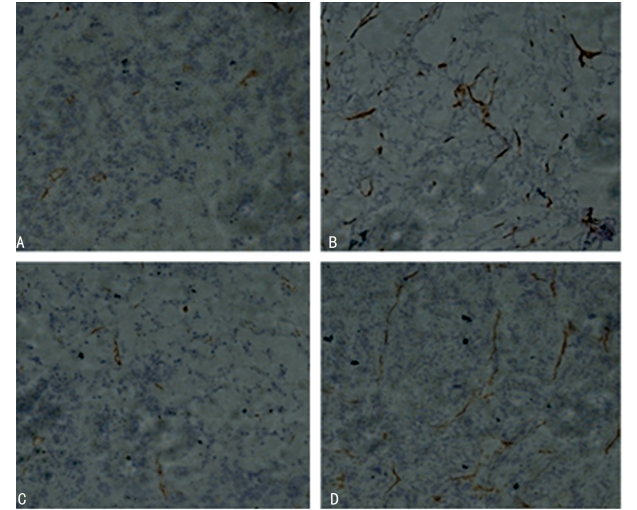
1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点收集的小鼠肿瘤体积的比较采用重复测量方差分析;其余数据均

采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA), 各组之间的两两比较采用 LSD (方差齐性)、Dunnett 法 (方差不齐), 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢性应激对 Ad-hE 抗肿瘤生长的影响 Ad-hE+Res 组小鼠在慢性应激 21 d 后的肿瘤体积达到了 $(2\,513.02\pm357.78)\text{mm}^3$, 而 Ad-hE、Ad-hE+Prop 及 Ad-hE+Prop+Res 组小鼠的肿瘤体积分别为 (207.65 ± 35) 、 (275.08 ± 25.09) 、 $(696.84\pm126.63)\text{mm}^3$, 将各时间点肿瘤体积进行重复测量方差分析后显示 Ad-hE+Res 组小鼠的肿瘤体积明显大于其他组 ($P<0.01$)。Ad-hE+Res 组小鼠的肿瘤质量在慢性应激 21 d 后为 $(0.70\pm0.13)\text{g}$, 而 Ad-hE、Ad-hE+Prop 及 Ad-hE+Prop+Res 组小鼠的肿瘤质量则分别为 (0.11 ± 0.03) 、 (0.10 ± 0.02) 、 $(0.24\pm0.06)\text{g}$, Ad-hE+Res 组小鼠的肿瘤质量明显大于其他组 ($P<0.01$)。而接受慢性应激时予以 Prop 进行干预 (Ad-hE+Prop+Res 组), 虽然肿瘤体积及肿瘤质量仍大于 Ad-hE 组 ($P=0.021, 0.017$) 及 Ad-hE+Prop 组 ($P=0.031, 0.012$), 但却明显小于 Ad-hE+Res 组 ($P<0.01$)。

2.2 慢性应激对 Ad-hE 抗肿瘤新生血管生成的影响 Ad-hE+Res 组小鼠的皮下肿瘤内微血管数量为 72.33 ± 6.20 , 明显多于其他组 (Ad-hE、Ad-hE+Prop 及 Ad-hE+Prop+Res 组分别为 11.00 ± 2.00 、 9.33 ± 2.16 、 $32.17\pm3.31, P<0.01$), Ad-hE+Prop+Res 组小鼠的肿瘤内微血管数虽然多于 Ad-hE 组 ($P<0.01$) 及 Ad-hE+Prop 组 ($P<0.01$), 却明显小于 Ad-hE+Res 组 ($P<0.01$)。见图 1。



A: Ad-hE 组; B: Ad-hE+Res 组; C: Ad-hE+Prop 组; D: Ad-hE+Prop+Res 组

图 1 慢性束缚应激促进肿瘤内血管生成

2.3 慢性应激对 VEGF 分泌的影响 Ad-hE+Res 组小鼠的血清 VEGF 水平为 $(195.00\pm17.70)\text{ng/mL}$,

明显高于 Ad-hE、Ad-hE+Prop 及 Ad-hE+Prop+Res 组, 分别为 $[(70.00\pm5.70)$ 、 (70.60 ± 11.15) 、 $(121.00\pm9.41)\text{ng/mL}, P<0.01]$, Ad-hE+Prop+Res 组小鼠的 VEGF 水平高于 Ad-hE 组 ($P<0.01$) 及 Ad-hE+Prop 组 ($P<0.01$), 但依然小于 Ad-hE+Res 组 ($P<0.01$)。而体外试验中, Control、NE、Prop 及 NE+Prop 各组的细胞上清液中 VEGF 水平分别为 (45.60 ± 5.32) 、 (183.20 ± 7.12) 、 $(46.80\pm6.83)\text{pg/mL}$ 及 $(48.00\pm5.01)\text{pg/mL}$, NE 组 LL/2 细胞上清液中 VEGF 的水平显著高于其他各组 ($P<0.01$), NE+Prop 则与 Control 组 ($P=0.546$) 和 Prop 组 ($P=0.762$) 差异无统计学意义。

2.4 NE 对 HIF-1 α 表达的影响 LL/2 细胞经 NE 处理 48 h 后, 采用 Western blot 检测细胞 HIF-1 α 蛋白表达。NE 组 HIF-1 α 表达高于其他各组 (Control、NE、Prop、NE+Prop 组分别为 583.67 ± 9.45 、 968.33 ± 21.5 、 577.00 ± 14.42 、 568.67 ± 4.51), Prop 可以在蛋白表达水平抑制 NE 的作用, 见图 2。

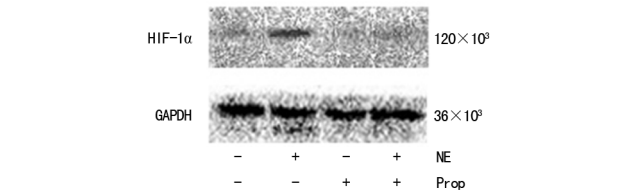


图 2 去甲肾上腺素上调 LL/2 细胞 HIF-1 α 表达

3 讨 论

实体瘤的发生发展离不开新生血管生成, “抗肿瘤新生血管能够抑制实体瘤生长”这一理论已经得到公认。然而, 以血管生成抑制剂的代表贝伐单抗 (Bevacizumab) 为例, 单药抗新生血管治疗在动物实验上取得了成功, 在临床试验中的疗效却并不令人满意, 需要联合化疗等直接针对肿瘤细胞的治疗手段才可能有效。这提示存在着某些有别于实验动物的因素, 可能影响了肿瘤患者抗新生血管治疗的疗效。

与实验动物不同, 大多数患者在面对“癌症”诊断或治疗的时候往往会处于慢性应激状态, 甚至有部分患者会觉得心理压力的影响比躯体症状的影响更大^[2]。研究已经证实慢性应激会促进肿瘤的发生发展, 而诱导肿瘤新生血管生成则是其中一个机制^[5,7]。其中, NE 被认为是与肿瘤相关的最重要的应激相关激素 (SRH) 之一, 也被认为可以用于哺乳动物上模拟慢性应激的效应^[8]。故慢性应激应该是肿瘤患者抗肿瘤治疗疗效欠佳的影响因素之一。笔者团队前期研究证实慢性应激可以刺激肿瘤细胞分泌 VEGF 进而影响小分子靶向药物舒尼替尼的疗效^[3]。本研究试图验证慢性应激是否同样可以影响 Ad-hE 的抗肿瘤效果。如结果所示, 在 Ad-hE 治疗的 LL/2 移植瘤模型中, 慢性应激使小鼠肿瘤负荷增加, 血清中 VEGF 水平增高, 肿瘤组织中微血管密度增多。这说

明慢性应激的确可以影响 Ad-hE 的抗肿瘤疗效。

据报道,β-AR 作为 HIF-1α 的上游信号,激活后可以通过诱导 HIF-1α 的表达进而促进 VEGF 的分泌^[6,9]。笔者团队的研究也证明荷瘤小鼠接受慢性应激后,外周血及肿瘤组织中的 VEGF 分泌均增加^[3]。本研究中 LL/2 细胞经 NE 处理后,HIF-1α 的蛋白表达明显增加,而一旦预先使用 β-AR 阻断剂普萘洛尔处理,其表达水平则与对照组类似,这也证明了 NE 可以通过激活 β-AR 进而上调 HIF-1α。由于 HIF-1α 已经证实可以刺激 VEGF 的分泌,故笔者推测 β-AR-HIF-1α-VEGF 是参与慢性应激影响 Ad-hE 疗效的一条信号通路。

慢性应激的动物模型较多,本研究采用的是已经广泛应用于动物研究的慢性束缚应激模型,该模型作为经典的慢性应激模型,已经证实可以诱导小鼠体内 NE 和 VEGF 水平的增高,可以引发小鼠的焦虑样行为^[3,10]。慢性应激对肿瘤而言,可以通过多种途径减弱机体抗肿瘤免疫的能力^[11],还能通过诱导肿瘤新生血管生成导致肿瘤生长、侵袭^[7],甚至还有研究表明慢性应激也是导致肿瘤耐药的一大因素^[12]。另外,越来越多的证据表明,NE 作为慢性应激状态下释放的主要激素,还能诱导肿瘤细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[6,13]。由此可见,慢性应激对机体的影响是多方面的。而且,在本研究中的体内试验部分,β-AR 拮抗剂普萘洛尔虽然起了一定阻断作用,但却没有完全拮抗慢性应激的作用。然而在体外试验中,NE 可以明显促进肿瘤细胞 VEGF 的分泌,普萘洛尔则可以完全抑制这种效应。这意味着 β-AR 信号通路只是参与其中的一个环节,也提示慢性应激涉及多种压力相关激素,本研究中所探讨的机制也可能只是其中的一条信号通路。

总的来说,本研究在荷瘤小鼠身上验证了慢性应激可以促进肿瘤生长、诱导肿瘤新生血管生成,削弱 Ad-hE 抗肿瘤作用的疗效。并结合体外研究初步探讨了 β-AR-HIF-1α-VEGF 是涉及其中的一条信号通路。本研究也提示肿瘤患者的社会心理压力是临床工作中不可忽视的一部分,对肿瘤患者及时的心理干预可能对其良好的预后有着重要的作用。

参考文献

[1] NING T, YAN X, LU Z J, et al. Gene therapy with the angiogenesis inhibitor endostatin in an orthotopic lung cancer murine model[J]. Hum Gene Ther, 2009, 20(2): 103-111.

[2] DENG Y T, ZHONG W N, JIANG Y. Measurement of distress and its alteration during treatment in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Head Neck, 2014, 36(8):1077-1086.

[3] LIU J, DENG G H, ZHANG J, et al. The effect of chronic stress on anti-angiogenesis of sunitinib in colorectal cancer models[J]. Psychoneuroendocrinology, 2015, 52(1): 130-142.

[4] SURMAN M, JANIK M E. Stress and its molecular Consequences in cancer progression[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017, 71:485-499.

[5] DENG G H, LIU J, ZHANG J, et al. Exogenous norepinephrine attenuates the efficacy of sunitinib in a mouse cancer model[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33(1):21.

[6] SHAN T, CUI X J, LI W, et al. Novel regulatory program for norepinephrine-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric adenocarcinoma cell lines[J]. Cancer Sci, 2014, 105(7):847-856.

[7] WU X, LIU B J, JI S M, et al. Social defeat stress promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase signaling in a mouse model of lung carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1):1405-1412.

[8] ENTSCHLADEN F, DRELL T L, LANG K, et al. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters[J]. Lancet Oncol, 2004, 5(4):254-258.

[9] QIAN D, LIN H Y, WANG H M, et al. Involvement of ERK1/2 pathway in TGF-beta1-induced VEGF secretion in normal human cytotrophoblast cells[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 68(2):198-204.

[10] LIN Q, WANG F F, YANG R, et al. Effect of chronic restraint stress on human colorectal carcinoma growth in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e61435.

[11] SOMMERSHOF A, SCHEUERMANN L, KOERNER J, et al. Chronic stress suppresses anti-tumor TCD8⁺ responses and tumor regression following cancer immunotherapy in a mouse model of melanoma[J]. Brain Behav Immun, 2017, 65:140-149.

[12] LITZELMAN K, VERMA M. Epigenetic regulation in biopsychosocial pathways[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1238(1238):549-567.

[13] ZHANG J, DENG Y T, LIU J, et al. Norepinephrine induced epithelial-mesenchymal transition in HT-29 and A549 cells in vitro[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(2):423-435.