

网络出版时间: 2011 - 9 - 27 10: 45 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20110927.1045.201110.1434_024.html

新型酪氨酸激酶抑制剂 BSSD-1 对斑马鱼血管生成及大肠癌 HT29 裸鼠肿瘤的抑制作用

韩利文^{1,2}, 王思锋¹, 王加宁¹, 何秋霞¹, 陈贯虹¹, 袁延强¹, 陈锡强¹, 刘可春¹

(1. 山东省科学院生物研究所 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014;

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2011.10.024

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)10-1434-05

中国图书分类号: R-332; R322.12; R364.3; R735.340.22; R979.1

摘要: 目的 探讨化合物 BSSD-1 对斑马鱼新生血管的影响以及对大肠癌 HT29 裸鼠肿瘤的抑制作用。方法 采用 24

收稿日期: 2011-06-14, 修回日期: 2011-07-05

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(No SY2008C179); 山东省科技发展计划资助项目(No 2006GG3202038)

作者简介: 韩利文(1980-), 男, 博士生, 助理研究员, 研究方向: 斑马鱼药物筛选及药物代谢动力学, Tel: 0531-82605331, E-mail: hanliwen08@yahoo.com.cn;

刘可春(1964-), 男, 博士, 研究员, 通讯作者, Tel: 0531-82605352, E-mail: hliukech@keylab.net

hpf (hours post fertilization) 健康 TG(VEGFR2: GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼作为实验动物模型, 加入不同剂量 BSSD-1 与胚胎共同孵育 24 h, 在荧光显微镜下观察背部节间血管(intersegmental vessels, ISV) 生成情况, 并计数评价抑制程度; 进而建立人大肠癌 HT29 细胞裸小鼠模型, 观察 BSSD-1 不同剂量作用下对裸鼠肿瘤的抑制作用, 根据瘤体积及瘤重, 计算相对肿瘤增殖率和肿瘤生长抑制率。结果 化合物 BSSD-1 在 0.25 ~ 25.0 mg · L⁻¹ 范围抑制斑马鱼背部节间血管生成具有剂量相关性, 12.5 mg · L⁻¹ 抑制率可达 98.8%; 裸鼠肿瘤抑制试验中, 大、中、小剂量组肿瘤生长抑制率试验结果分别为 31.1%、40.0% 和 40.0%, 统计学处理 3 组差异均有显著性。结论 BSSD-1 可以抑制荷瘤裸鼠移植瘤的生长, 该作用与抑制肿瘤新生血管生成有关。

关键词: BSSD-1; 斑马鱼; 抗肿瘤作用; 节间血管; 血管生成; HT29; 大肠癌

Effects of Astragaloside IV on airway remodeling in a murine model of chronic asthma

DU Qiang¹, ZHANG Qian², SHEN Li¹, CAI Jian-kang¹, HUANG Mao³, Yin Kai-sheng³

(1. Dept of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China; 2. Dept of Respiratory Medicine, Changzhou No. 2 People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou Jiangsu 213003, China; 3. Dept of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Aim** To observe the effects of Astragaloside IV on the airway remodeling in a murine model of chronic asthma. **Methods** 48 BALB/c mice were randomly divided into 4 groups, namely Control group, Asthma group (OVA group), Astragaloside IV group and Budesonide group with 12 mice in each group. BALB/c mice sensitized to ovalbumin (OVA) were chronically challenged with aerosolized OVA for eight weeks. Mice in the Astragaloside IV group were intragastrically administered with Astragaloside IV (50 mg · kg⁻¹) daily for 8 consecutive weeks. Mice in the Budesonide group were exposed to an aerosol of budesonide (8 ml) daily for 8 consecutive weeks. 24 hours after the last OVA challenge, pulmonary functions were measured to evaluate the resistance of expiration in 6 mice of each group. Cells in BAL fluid (BALF) were counted. The sections were stained with either hema-

toxylin & eosin to assess the inflammatory cell infiltrates, and Masson's trichrome to determine subepithelial fibrosis in the lungs. The levels of VEGF in BALF were measured by ELISA. The expression of α -SMA and VEGF protein in lungs was detected by immunohistochemistry. **Results** Treatment with Astragaloside IV markedly inhibited the airway inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR) and remodeling. Astragaloside IV significantly decreased the level of VEGF in BALF. In addition, Astragaloside IV obviously attenuated the protein expression of α -SMA and VEGF in lungs. **Conclusions** Astragaloside IV can suppress the progression of airway remodeling in a murine model of chronic asthma. Partly, the effects might be due to inhibition of the expression of VEGF.

Key words: Astragaloside IV; asthma; mice; airway remodeling; VEGF; α -SMA

血管生成 (angiogenesis) 是指在原有的毛细血管和(或)微静脉基础上通过血管内皮细胞的迁移和增殖,从已存在的血管处以芽生或非芽生(套迭)形式形成新的、以毛细血管为主的血管系统过程。血管生成是许多促进或抑制血管生成的分子参与调节的一个平衡过程^[1-2]。大量研究表明,血管生成对恶性肿瘤的生长和转移起着至关重要的作用^[3-5]。抑制肿瘤新生血管生成已经成为肿瘤生物靶向治疗的重要研究方向。

斑马鱼 (zebrafish, *Danio rerio*) 是原产于印度、孟加拉国的一种热带鱼,成鱼体长 3~5 cm。自 1994 年冷泉港集会以及《Nature》和《Science》杂志发表专题评述^[6-7]到 2009 年斑马鱼全基因组测序的完成,斑马鱼已经成为一种公认的新型模式生物,正逐渐拓展和深入到生命体的多种系统的发育、功能和疾病的研究中。和其他脊椎动物一样,斑马鱼的第一个血管原细胞也来源于中胚层。血管原细胞迁移到中线部位后形成血管索,进而分化为成血管细胞和造血细胞,成血管细胞进一步分化形成轴向血管、背部主动脉和后主静脉,该血管生成过程已被证明与人类肿瘤新生血管生成过程极其相似^[8]。另外斑马鱼最大特点在于其胚胎透明可视,在胚胎发育早期的血管生成过程可以在显微镜下方便观察到,因此是一种理想的活体抗血管生成药物的筛选模型。国内外利用斑马鱼血管生成模型已经开展了大规模的血管生成抑制的筛选^[9-10]。

BSSD-1 是一种新型的酪氨酸激酶抑制剂,化学名为 1-(4-氯苯胺基)-4-(4-甲基吡啶基)-2,3-二氮杂萘琥珀酸盐,已经申请获得我国发明专利保护^[11]。本文通过斑马鱼药物筛选模型考察了化合物 BSSD-1 抑制新生血管生成的作用,并进一步考察 BSSD-1 在荷瘤裸鼠模型中对人大肠癌 HT29 细胞肿瘤的抑制作用,初步揭示了化合物 BSSD-1 在抗肿瘤方面的应用潜力。

1 材料与仪器

1.1 材料 TG(VEGFR2: GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼为山东省科学院生物研究所药物筛选研究室提供。裸小鼠: SPF 级 BALB/c nu, ♂, 中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供,许可证编号: SCXK 京 2005-0013。人大肠癌 HT29 细胞系,由山东省医学科学院基础所提供。

BSSD-1: 由山东省科学院生物研究所生物化工研究室提供,淡黄色针状结晶, HPLC 测定含量 98.3%。麻醉药 Tricaine (MS222): Sigma 公司产品;阳性对照药呋氯尿嘧啶 (FT207): 齐鲁制药厂生产

(批号: 20010215); RPMI 1640 培养基: 美国 Gibco BRL 公司产品(批号: 31800-022); 胎牛血清: 中国医学科学院血液研究所提供(批号: 2006 年 8 月); 链霉蛋白酶 (Pronase E): 上海源聚生物科技有限公司(批号: 000607); 其余试剂为分析纯。

1.2 仪器 SZX16 型荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统(日本 Olympus 公司); XSJ-D 型倒置显微镜(重庆光电仪器公司产品); Forma 3111 型水套式 CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司); 斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼胚胎获取 ♀♂ 斑马鱼分开喂养, 照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行, 定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体 (*Artemia nauplii*)。采卵时, 取健康性成熟的斑马鱼, 按 ♀♂ 1/1 或 1/2 的比例放入交配缸内, 次日 9~10 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和清洗后, 移入斑马鱼胚胎培养用水 (含 5 mmol · L⁻¹ NaCl, 0.17 mmol · L⁻¹ KCl, 0.4 mmol · L⁻¹ CaCl₂, 0.16 mmol · L⁻¹ MgSO₄) 中 28℃ 下控光培养。

2.2 BSSD-1 对转基因斑马鱼模型血管生成的抑制作用 在受精卵发育 24 h 时, 使用 1 g · L⁻¹ Pronase E 溶液脱去卵膜。在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎, 移入 24 孔培养板中, 每孔 8 枚。将 BSSD-1 用二甲基亚砜 (DMSO) 配成 5 g · L⁻¹ 母液, 用蒸馏水稀释成 500 mg · L⁻¹ 样品液, 取一定体积至培养孔中, 然后用培养水加至 2 ml, 使 BSSD-1 终浓度分别为 0.25、1.25、2.5、12.5、25 mg · L⁻¹, 对照为 1% DMSO。然后加盖, 置于光照培养箱 (28℃) 让胚胎继续发育。在 48 hpf 时, 荧光显微镜观察并计数斑马鱼体节间血管 (intersegmental vessels, ISV) 数, 计算抑制率, 并观察胚胎死亡畸形情况。抑制率/% = (正常对照组血管数 - 给药组血管数) ÷ 正常对照组血管数 × 100%。

2.3 BSSD-1 对转基因斑马鱼 48 hpf 胚胎的血管的影响 根据“2.2”中剂量范围, 选择 1.25、12.5、25 mg · L⁻¹ 3 个剂量组观察药物对已经形成的血管的影响。24 孔板的样孔中预先加入各实验组溶液 (对照组为 1% DMSO), 再挑选健康 48 hpf 胚胎, 随机放入样孔中, 每个实验组 10 个胚胎。随后于光照培养箱中恒温 (28℃) 孵育, 并分别于施药后 72 hpf 观察并记录各实验组胚胎的心脏形态、循环系统血流、心率等指标。

2.4 BSSD-1 对荷瘤 (人大肠癌 HT29 细胞) 裸鼠的抑制作用 BSSD-1 根据剂量要求用 0.5% 羧甲

基纤维素钠配成所需浓度的混悬液,备用。将人大肠癌 HT29 细胞进行常规传代、增殖培养至所需细胞量后胰酶消化收集细胞,取细胞悬液置显微镜下计数调整细胞数,于裸小鼠右腋皮下接种。接种量: 2.0×10^7 个细胞/0.2ml/只。种瘤后 3 d 局部可触及微小瘤块时,用游标卡尺分别测量瘤体积,随机分组分别为阴性对照组 10 只,阳性对照组 10 只,受试物大、中、小剂量组各 10 只,受试物剂量分别为 100、75 和 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,阳性对照组为 FT207 110 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每天灌胃给药,连续给药 27 d,灌胃体积均为 0.5 ml。对照组灌胃给同体积无菌蒸馏水。于试验 d 0、6、10、20、27 测量各组肿瘤体积,同时称量鼠重。肿瘤体积计算公式 $V = 1/2 \times a \times b^2$,其中 a、b 分别为瘤体的长、宽。根据测量结果计算相对肿瘤体积 (RTV), $\text{RTV} = V_t/V_0$, V_0 为分组时 (d 0) 测得肿瘤体积, V_t 为每次测得肿瘤体积,评价指标为相对肿瘤增殖率 T/C (%),计算公式为 T/C (%) = $T(\text{RTV})/C(\text{RTV}) \times 100$ 。末次给药后 24 h 处死动物,解剖瘤块称瘤重及体重,计算肿瘤生长抑制率。疗效评价公式: 肿瘤生长抑制率/% = $(C - T)/C \times 100\%$, T 为给药组平均瘤重, C 为对照组平均瘤重。

2.5 数据统计 应用 SPSS13.0 对实验所得数据进行方差分析,血管数以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。

3 结果

3.1 BSSD-1 对斑马鱼药物筛选模型血管生成的抑制作用 文献显示斑马鱼节间血管的发育时间为 24 ~ 48 hpf^[10],本实验观察的现象与文献报道相同,斑马鱼胚胎 24 hpf 时节间血管尚未出现,到 48 hpf 时节间血管发育完全,见 Fig 2。

不同浓度的药物对斑马鱼胚胎的节间血管的影响见 Fig 1 2 (Fig 1 横坐标为药物剂量,纵坐标为节间血管数)。正常节间血管在荧光显微镜下呈均匀等距纵向排列,在受到药物抑制后,在局部会出现血流消失、血管缺失、血管变细,甚至全部缺失。对于 24 hpf 处理的胚胎,到 48 hpf 时, BSSD-1 在低浓度 0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 即体现一定抑制斑马鱼胚胎新生节间血管的趋势,随着浓度逐渐增大,抑制作用逐渐增强, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制率达到 98.8% (Fig 1 2),与对照组相比,差异有显著性。同时,在斑马鱼模型加药孵育的过程中,实验组胚胎无死亡, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组出现 2 只心囊略膨大、水肿现象。

3.2 BSSD-1 对斑马鱼心脏及已形成血管的影响 发育 24 hpf 的斑马鱼胚胎,心跳出现。发育 48 hpf 的胚胎,心脏区已形成,跳动增强, 48 hpf 时加药可观察药物对斑马鱼胚胎心脏毒性以及对血管的影

响^[11]。72 hpf 时观察各组节间数、计数 15 s 心率,结果表明 BSSD-1 各剂量组节间血管数心率与对照组相比,差异均无统计学意义,见 Tab 1。各给药组实验过程中未见胚胎畸形或死亡。

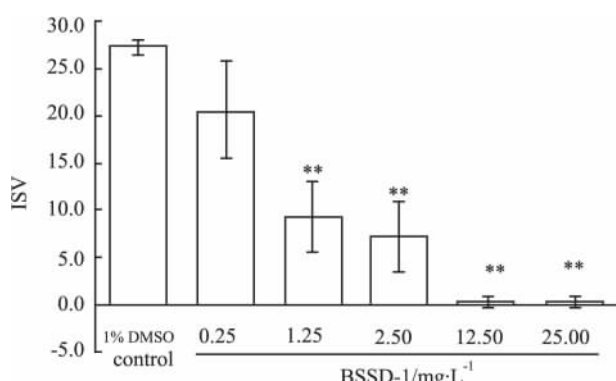


Fig 1 Growth of ISV of zebrafish larva after treatment of different concentrations of BSSD-1 ($n = 8$)

** $P < 0.01$ vs control group

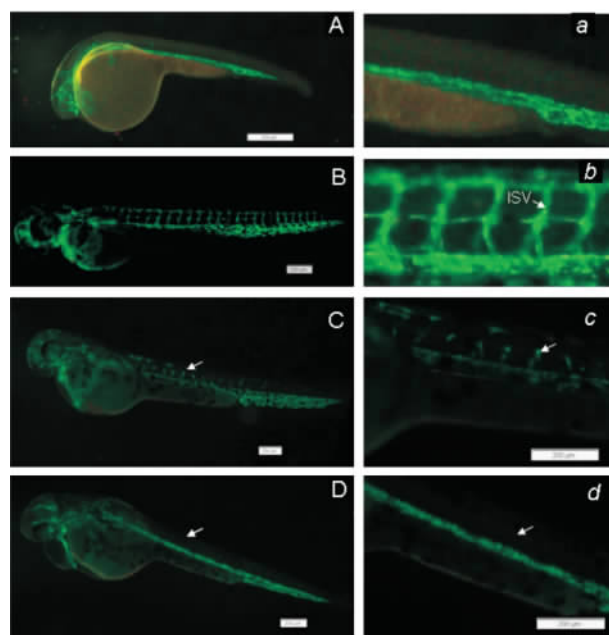


Fig 2 Lateral view of TG(VEGFR2: GFP) zebrafish showing ISV growth after treatment with BSSD-1 for 24 h

(A ,a): Vehicle-treated control at 24 hpf; (B ,b): vehicle-treated control at 48 hpf; (C ,c): Zebrafish larva treated with 1.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSSD-1; (D ,d): Zebrafish larva treated with 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSSD-1. The magnified views of A-D are shown in a-d, respectively. white arrow indicates ISV. White scale indicates 200 μm

3.3 BSSD-1 对荷瘤裸鼠的抑瘤作用 采用肿瘤重量计算肿瘤生长抑制率的数据表明,化合物 BSSD-1 在高、中、低剂量组都具有明显的抑制肿瘤生长的作用,抑制率分别为 31.1%、40.0%、40.0%,统计结果显示高剂量组 (100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和低剂量组 (50

mg · kg⁻¹) 差异具有显著性 ($P < 0.05$) ,中剂量组 (75 mg · kg⁻¹) 与对照组比差异具有显著性 ($P < 0.01$,Tab 2) 。测量肿瘤体积计算的相对肿瘤增殖率数据表明,化合物 BSSD-1 各剂量组相对肿瘤增殖率分别为 61.6%、89.3% 和 47.8% ,统计学处理仅小剂量组 (50 mg · kg⁻¹) 差异有显著性 ($P < 0.05$,Fig 3) 。化合物 BSSD-1 在 100 ~ 50 mg · kg⁻¹ 剂量范围内连续给药 27 次,试验动物健康(阳性对照组,受试物小剂量组均因操作失误致死动物各 1 只) ,对 BSSD-1 给药耐受性良好。

Tab 1 Changes of ISV and heart rate of 48 hpf zebrafish larva treated with BSSD-1 ($\bar{x} \pm s$ $n = 8$)

	Dose /mg · L ⁻¹	ISV	Heart rate/15 s
Control	-	25.6 ± 1.5	37.8 ± 0.8
BSSD-1	1.25	25.3 ± 1.2	36.8 ± 5.9
	12.5	24.6 ± 2.2	38.8 ± 1.9
	25	24.4 ± 2.8	39.8 ± 1.2

Tab 2 Inhibition rate of tumor growth of BSSD-1 in nude mice bearing HT29 colorectal cancer cell($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

	Dose /mg · kg ⁻¹	Body weight /g		Tumor weight /g	Inhibition rate of tumor growth /%
		0 d	27 d		
Control	-	21.1	22.1	1.35 ± 0.31	-
FT207	110	20.9	21.5	0.57 ± 0.44**	57.8
BSSD-1	100	21.0	20.9	0.93 ± 0.51*	31.1
	75	20.7	21.5	0.81 ± 0.33**	40.0
	50	20.6	21.5	0.81 ± 0.39*	40.0

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

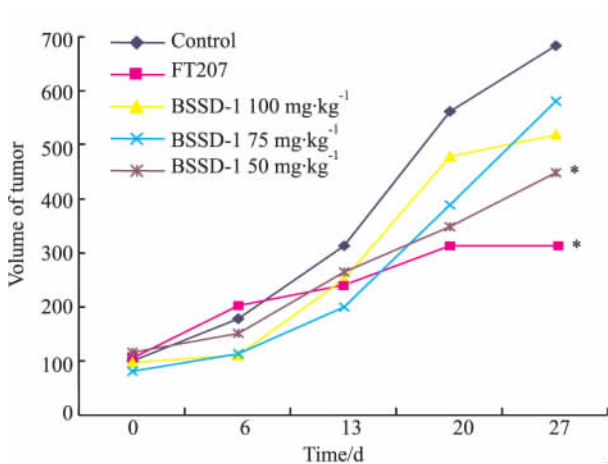


Fig 3 Change of volume of tumor in nude mice bearing HT29 colorectal cancer cell with BSSD-1 administration time
* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

目前国内普遍使用的血管抑制的筛选模型是鸡胚绒毛尿囊膜模型 (CAM) ,然而 CAM 法存在试验

周期长、操作繁琐、血管计数易受主观因素影响等问题^[12]。斑马鱼作为新型的新生血管抑制活体筛选模型具有明显优势: 斑马鱼是脊椎动物,基因与人的具有很高的保守性,在蛋白质水平上,其关键部位的同源性几乎是 100 %;一对成年鱼每周产卵一次,每次产 200 ~ 400 个卵,更易获得实验材料;实验周期短 24 ~ 72 h 即可观察活性结果,发育速度远快于老鼠;实验费用更低,仅为老鼠的 0.1% ~ 1%;样品用量少 (μg 级) ,给药容易 (溶于培养用水即可) 。

本实验所使用的为血管内皮生长因子 II 型受体 (VEGFR2) 标记绿色荧光的转基因斑马鱼,化合物 BSSD-1 处理斑马鱼胚胎后,荧光减弱或消失,表明药物抑制了 VEGFR2 的表达。同时在斑马鱼实验中还发现,化合物 BSSD-1 安全性较高,对于 24 hpf 斑马鱼胚胎的血管生成抑制的同时,未见死亡与明显发育畸形;对于 48 hpf 斑马鱼胚胎的心率、血管、发育表型等方面均未见明显异常,说明 BSSD-1 对于已经形成的血管无明显影响。

化合物 BSSD-1 是针对肿瘤血管生成合成的酪氨酸激酶抑制剂,通过专属性抑制肿瘤新生血管,抑制实体肿瘤的生长,作用机制与细胞毒类抗肿瘤药有本质不同。在裸鼠肿瘤抑制作用试验中,采用肿瘤重计算肿瘤生长抑制率和利用肿瘤体积计算肿瘤相对增殖率都是常用的评价方法,一般当肿瘤生长抑制率 > 40% ,经统计学处理差异有显著性 ($P < 0.05$) ,评定受试物有一定疗效;相对增殖率 ≤ 60% ,并经统计学处理 $P < 0.05$ 为有效。本化合物 BSSD-1 中剂量 (75 mg · kg⁻¹) 和低剂量 (50 mg · kg⁻¹) 的肿瘤生长抑制率达到 40% ($P < 0.01$) ,40% ($P < 0.05$) ;肿瘤相对增殖率仅低剂量达到 47.8% ,且 $P < 0.05$ 。经分析认为与采用游标卡尺测量瘤径时不准确有关。但本结果可初步说明 BSSD-1 对大肠癌 HT29 有明显抑制作用,但量效依赖性不明显,需要进一步扩大瘤株进行实验。综上,化合物 BSSD-1 具有明显的抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用,该作用与抑制 VEGF II 型受体有关,初步的实验结果表明该化合物安全性较高,具有较大的应用前景。

参考文献:

[1] Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature ,2000 ,407(6801) : 249 - 57.
[2] Ballas M S, Chachoua A. Rationale for targeting VEGF, FGF, and PDGF for the treatment of NSCLC [J]. Onco Targets Ther , 2011 4: 43 - 58.
[3] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. Nat Med ,1995 1: 27 - 31.

- [4] Koder Y , Katanasaka Y , Kitamura Y , et al. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymphnode metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3 [J]. *Breast Cancer Res* , 2011 , **13**(3) : R66.
- [5] 谢 斌 , 位晓丹 , 高志芹 , 等. 肝动脉栓塞化疗联合恩度治疗对兔 VX2 肝移植瘤生长及血管生成的影响 [J]. 中国药理学通报 2011 **27**(6) : 844 – 8.
- [5] Xie B , Wei X D , Gao Z Q , et al. Effects of TACE combined with Endostar on angiogenesis and the growth of transplanted VX2 hepatic tumor in rabbits [J]. *Chin Pharmacol Bull* , 2011 **27**(6) : 844 – 8.
- [6] Concordet J P , Ingham P. Catch of the decade [J]. *Nature* , 1994 , **369** : 19 – 20.
- [7] Kahn P. Zebrafish hit the big time [J]. *Science* , 1994 **264** : 904 – 5
- [8] Herold J , Pipp F , Fernandez B , et al. Transplantation of monocytes: a novel strategy for *in vivo* augmentation of collateral vessel growth [J]. *Hum Gene Ther* , 2004 , **15**(1) : 1 – 12.
- [9] Crawford A D , Liekens S , Kamuhabwa A R , et al. Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: isolation of angiogenesis inhibitors from east african medicinal plants [J]. *PLoS One* , 2011 **6**(2) : 14694 – 9.
- [10] 夏小燕 , 刘可春 , 王思锋 , 等. 大青叶靛玉红的抗血管生成活性研究 [J]. 中国药理学杂志 2010 **45**(3) : 187 – 9.
- [10] Xia X Y , Liu K C , Wang S F , et al. Studies on anti-angiogenic activity of indirubin from folium isatidis [J]. *Chin Pharm J* , 2010 **45**(3) : 187 – 9.
- [11] 王加宁 , 陈贯虹 , 刘可春 , 等. 1-(4-氯苯胺基)-4-(4-甲基吡啶基)-2,3-二氮杂萘的合成与应用: 中国, ZL 200610045239. 6 [P]. 2006 – 12 – 13.
- [11] Wang J N , Chen G H , Liu K C , et al. Synthesis and application of 1-(4-Chlorophenylamino)-4-(4-Methylpyridyl)-Phthalazine: China , ZL 200610045239. 6 [P]. 2006 – 12 – 13
- [12] 吴家明 , 陆 茵 , 郝 明 , 等. 血管生成实验模型研究进展 [J]. 中国药理学通报 2008 **24**(1) : 11 – 4.
- [12] Wu J M , Lu Y , Gao M , et al. The advances of angiogenesis assay models [J]. *Chin Pharmacol Bull* , 2008 **24**(1) : 11 – 4

Inhibitory effect of a norel tyrosine kinase inhibitor BSSD-1 on angiogenesis of zebrafish embryo and tumor growth of HT-29 colon cancer xenografts in nude mice

HAN Li-wen^{1,2} , WANG Si-feng¹ , WANG Jia-ning¹ , HE Qiu-xia¹ ,
CHEN Guan-hong¹ , YUAN Yan-qiang¹ , CHEN Xi-qiang¹ , LIU Ke-chun¹
(1. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences , Key Laboratory for Biosensor
of Shandong Province , Jinan 250014 , China; 2. School of Chinese Materia
Medica , Tianjin University of Traditional Chinese Medicine , Tianjin 300193 , China)

Abstract: **Aim** To investigate inhibitory effect of BSSD-1 on angiogenesis zebrafish model and tumor growth of HT-29 colon cancer xenografts in nude mice.

Methods Healthy transgenic zebrafish Tg(VEGFR2: GFP) at 24 hpf was used as animal model. Growth of intersegmental vessels (ISV) of larva trunk was scored under fluorescence microscope after different concentrations of BSSD-1 were added into medium of zebrafish and fertilized with zebrafish embryos for 24 h. Furthermore , the model of colonic cancer of nude mice were replicated by injecting HT29 colonic cancer cell subcutaneously. Every nude mouse was lavaged after the first injection for 27 d , and the relative tumor proliferation rates (RTV) and inhibition rates of tumor growth were counted based on the change of tumor vol-

ume and tumor weight of nude mice. **Results** BSSD-1 with the dose range of 0. 25 ~ 25. 0 mg • L⁻¹ showed inhibition effect on angiogenesis of zebrafish model in the dose dependent manner , and the inhibition rate was up to 98. 8% when its concentration was 12. 5 mg • L⁻¹. In the nude mice test , the inhibitory rate of three BSSD-1 groups were 31. 1% , 40. 0% and 40. 0% , respectively , and there were significant differences between BSSD-1 groups and model group. **Conclusion** The results show that BSSD-1 can obviously inhibit the growth of HT-29 colon cancer in nude mice , which is mediated by anti-angiogenesis effect.

Key words: BSSD-1; zebrafish; anti-tumor; intersegmental vessel; angiogenesis; HT29; colon cancer