

免疫抑制剂对小鼠膀胱癌进程和转移的不同效应*

刘永^{1)**,**} 王丰^{2)**} 袁琳³⁾ 胡宏惠³⁾ 唐孝达¹⁾

¹⁾上海交通大学附属第一人民医院移植泌尿外科, 上海 200080;

²⁾上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海 200080; ³⁾上海交通大学附属第一人民医院病理科, 上海 200080)

摘要 利用稳定表达绿色荧光蛋白的高度恶性膀胱癌细胞株 BTT-T739-gfp 建立皮下肿瘤模型, 对比分析在常规免疫抑制剂量下, 环孢素、雷帕霉素在肿瘤发展和转移方面的不同效应及其可能的作用机制。24 只 T739 小鼠随机分为对照组、环孢素组、雷帕霉素组。环孢素、雷帕霉素剂量分别为 10 mg/(kg·day)、1.5 mg/(kg·day), 腹腔注射。观察荷瘤小鼠生存情况, 计算荷瘤容积变化, 以及肿瘤在肺和肝脏的转移情况, 分析其作用的可能机制。结果显示, 常规免疫抑制剂量下, 与对照组和环孢素组比较, 雷帕霉素具有明显的抗肿瘤效应。雷帕霉素可显著提高荷瘤小鼠的生存, 观察期末, 对照组、环孢素组及雷帕霉素组小鼠荷瘤生存率分别为 62.5%、50%、100%, 环孢素组与雷帕霉素组差异显著, 在观察期内与对照组、环孢素组比较, 雷帕霉素可显著抑制负荷肿瘤的容积。雷帕霉素应用后, 肿瘤内血管显著减少, 肿瘤细胞分泌 VEGF 的能力明显降低, 与肿瘤血管形成有关基因 VEGF、HIF-1 α 的转录活化明显受到抑制。结果证实雷帕霉素具有显著的抗肿瘤效应, 这一作用与其抑制肿瘤内血管形成明显相关。抑制 VEGF-A、HIF-1 α 等促进血管形成因子的转录、表达是其主要的作用方式之一。

关键词 肿瘤, 免疫抑制剂, 雷帕霉素, 环孢素, 血管形成

学科分类号 R73-3, R392.5

随着器官移植受者长期存活率的提高, 恶性肿瘤的形成和复发成为移植受者死亡的主要原因。研究显示, 支气管肺泡癌患者接受肺移植后肿瘤复发率为 57%^[1], 而胆管癌患者接受肝移植后 2 年内有 51% 的患者发生肿瘤复发^[2]。保守分析, 接受免疫抑制治疗的患者其恶性肿瘤的发生率是常人的 3~4 倍, 在个别类型肿瘤中甚至高达 20~500 倍^[3]。造成这一结果的主要原因为: 器官移植受者免疫监视功能的损伤, 慢性抗原刺激, 潜在致癌病毒的活化, 以及免疫抑制剂的直接致癌效应^[4]。研究进一步提示, 随着免疫抑制强度和时间的增加, 肿瘤发生率将进一步增加^[5]。为提高移植受者的长期存活率, 恰当、合理应用免疫抑制剂, 选择低致癌作用, 甚至具有抗肿瘤效应的免疫抑制是治疗的关键。

在免疫抑制剂常规用量下, 移植临床常用的环孢素、雷帕霉素在肿瘤发展和转移中作用如何? 是否具有抗肿瘤作用以及可能的效应机制? 目前缺乏系统研究。本研究通过异位移植的实体肿瘤模型, 对此展开体内研究, 为移植后肿瘤患者的治疗提供指导, 为今后肿瘤治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

T739 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~30 g, 恒温 (25~27℃)、恒定湿度 (45%~50%) 环境中饲养。

1.2 肿瘤细胞株

本研究采用稳定表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 BTT-T739-gfp 细胞株。源于 T739 小鼠, 通过使小鼠长期饮用含 N-丁基-N-(4-羟丁基) 亚硝胺 (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, BBN) 的水, 诱发形成为高度恶性膀胱移行细胞癌。BTT-T-739-gfp 是通过脂质体介导绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-N1 转染并经 G418 筛选获得的可长期稳定表达 GFP 的细胞株。采用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 (Gibco 公司) 培养基, 37℃, 5% CO₂ 培养。

* 上海市器官移植临床医学中心课题 (Qy-040101-10), 上海市卫生局青年科研基金 (局 021/05) 和上海市青年科技启明星计划 (04QMX1417) 资助项目。

** 共同第一作者。*** 通讯联系人。

Tel: 021-63240090-5631, E-mail: koucaiqq@gmail.com

收稿日期: 2007-05-10, 接受日期: 2007-08-09

1.3 小鼠皮下肿瘤模型

将 1×10^6 BTT-T739-gfp细胞接种于同系T739小鼠右后腿皮下,一周后在雌雄小鼠中随机分组,测量肿瘤最大径(a)、最小径(b)与高度(c),根据公式 $v=0.52 \times a \times b \times c$ 计算负荷肿瘤的基线容积,其后每2天测量上述3个径值,计算肿瘤体积,观察荷瘤小鼠生存状况.根据每组小鼠负荷肿瘤的平均容积绘制肿瘤生长曲线并计算各组小鼠荷瘤生存率.16天后处死小鼠,取肿瘤标本进行常规病理、免疫组织化学及分子生物学分析.

1.4 实验药物

环孢素A (cyclosporine, CsA, 瑞士诺华制药有限公司), 雷帕霉素(Rapamycin, Rapa, 美国惠氏-百官制药有限公司).

1.5 实验分组

本研究分为3组,每组8只小鼠,雌雄各半.分别为对照组,环孢素组(CsA组,下同)及雷帕霉素组(Rapa组,下同).对照组为腹腔注射50 μ l生理盐水, CsA组、Rapa组小鼠接受实体器官移植时环孢素和雷帕霉素常规应用剂量,分别为10 mg/(kg·day)、1.5 mg/(kg·day),腹腔注射.

1.6 肿瘤组织基本病理学特征及微血管密度与血管内皮细胞生长因子-A (VEGF-A) 表达检测

采用中性福尔马林固定肿瘤组织,常规石蜡切片,HE染色.微血管密度(microvessel density, MVD)采用抗血管内皮细胞VIII因子单克隆抗体(Dako)染色并计数.参照Weidner^[6]的方法,先在低倍显微镜下扫描整个视野,选择内皮细胞染色最多、微血管形成最丰富的区域,然后转至高倍镜下($\times 400$)计数10个视野的微血管数(条),取其均值,即为MVD计数值.VEGF-A表达情况的检测是通过抗VEGF-A单克隆抗体(Santa Cruz公司)免疫组织化学染色,计数10个高倍镜视野中VEGF-A染色的程度分布特征,结果判断标准:阴性(-),肿瘤组织完全不着色或阳性细胞数 $<5\%$;弱阳性(+),肿瘤组织阳性细胞数 $6\% \sim 50\%$;阳性(++),肿瘤组织阳性细胞数 $51\% \sim 75\%$;强阳性(+++),肿瘤组织阳性细胞数 $>75\%$.为避免结果偏移,分析过程由专业病理医师盲法完成.

1.7 血管形成相关基因表达的分析

利用实时定量RT-PCR法检测血管形成相关基因的表达.将肿瘤组织在TRIZOL试剂(Invitrogen公司)中用组织匀浆器研磨,并裂解后按操作说明书抽提总RNA.以2 μ g的总RNA为模板,通过

Reverse Transcription System (Promega 公司)制备cDNA.以1 μ l cDNA为模板,通过实时荧光定量PCR检测VEGF-A和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的mRNA水平,同时扩增GAPDH基因作为内参照.PCR反应在DNA Engine Opticon 2 system荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司)上进行.每一个反应会得到一个 $C(t)$ 值,代表检测到荧光信号的循环数,反应样品中某个基因的模板量, $C(t)$ 值越小,说明检测到荧光信号的循环数越早,模板量就越多.每个反应的 $C(t)$ 值与同一样品内参基因GAPDH的 $C(t)$ 值相减以达到反应的均一化,得到的差 $\Delta C(t)$ 代表该基因表达的相对量.不同样品间某个基因表达的差异依照公式 $2^{-\Delta C(t)}$ 计算,每个反应有3个复孔.PCR扩增引物序列见表1.

Table 1 Primer sequence used in realtime RT-PCR

Gene names	Forward primer(F), reverse primer(R)	Product size/bp
mVEGF-A	F: 5' agtcccatgaagtgaacag 3' R: 5' gatgtgtctctctgacgtg 3'	200
mHIF-1 α	F: 5' -gaaatggccagtgagaaaa 3' R: 5' tatcgaggctgtgtcgactg 3'	297
mGAPDH	F: 5' aactttggcattgtggaagg 3' R: 5' acacattgggggtaggaaca 3'	223

1.8 统计学处理

多组均数之间的比较用单因素ANOVA Bonferroni法进行单因素方差分析.两组之间均数的比较用Independent-Sample T试验,利用Fisher精确检验及Log-Rank法进行生存分析.

2 结 果

2.1 不同免疫抑制剂对肿瘤生长的影响

将 1×10^6 BTT-T739-gfp细胞接种于同系T739小鼠右后腿皮下,一周后在雌雄小鼠中随机分组并根据公式 $v=0.52 \times a \times b \times c$ 计算负荷肿瘤的容积.结果显示对照组、环孢素组和雷帕霉素组负荷肿瘤的基线容积分别为: $(0.1062 \pm 0.0264) \text{ cm}^3$, $(0.0783 \pm 0.06153) \text{ cm}^3$, $(0.09614 \pm 0.0439) \text{ cm}^3$, $P = 0.46$,说明各组小鼠负荷肿瘤容积无显著性差异,实验动物具有同源性.接受治疗后,每2天测量上述肿瘤的3个径值,计算肿瘤容积,发现,前4天,各组小鼠肿瘤容积维持分组时的趋势,其后环孢素组小鼠肿瘤生长加速,第6天时其平均容积已超过雷帕霉素组,接近对照组.第8天起,雷帕霉素组肿瘤容积与对照组、环孢素组差距明显加大.在第12天时雷帕霉素组与对照组、环孢素组肿瘤容积为:

(1.2527 ± 0.5374) *vs* (2.0788 ± 0.8735) cm^3 及 (2.1422 ± 0.9008) cm^3 ($P = 0.048$, $P = 0.035$), 第 14 天时为, (1.5597 ± 0.8370) cm^3 *vs* (3.0499 ± 1.1013) 及 (3.8257 ± 1.8887) cm^3 ($P = 0.041$, $P = 0.04$), 差异显著; 环孢素组与对照组在肿瘤容积比较上虽未出现统计学上的显著性差异, 但从我们短期研究结果显示其已超越对照组, 呈现较为明显增长趋势(图1). 国外研究^[7]提示, 环孢素有促进肿瘤生长的作用, 与我们的结果类似. 综合上述结果说明, 雷帕霉素在体内对肿瘤的生长具有显著的抑制作用, 环孢素具有促进肿瘤生长的趋势. 至于在第16天这种显著差异消失, 主要与上述对照组和环孢素组荷瘤小鼠死亡较多, 而存活小鼠多为荷瘤容积相对较小有关.

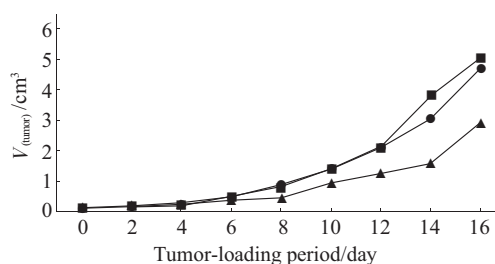


Fig. 1 The different effects of immunosuppressants on tumor growth

●—●: Control; ▲—▲: Rapamycin; ■—■: Cyclosporine.

2.2 不同免疫抑制剂对荷瘤小鼠生存的影响

随访16天显示, 对照组、环孢素组及雷帕霉素组存活率分别为 62.5% (5/8), 50% (4/8), 100%

(8/8), 环孢素组和雷帕霉素组差异显著 ($P = 0.03846$). Log-Rank分析尽管在生存时间上未出现显著差异, 但已表现出较为明显发展趋势, 即接受雷帕霉素治疗的小鼠荷瘤生存时间明显延长, 接受环孢素治疗的荷瘤小鼠生存率最低. 不仅如此, 我们还发现, 与对照组、环孢素组比较, 雷帕霉素组肿瘤生长缓慢, 荷瘤容积较小, 大多数瘤体在较早期即出现坏死和溃疡.

2.3 肿瘤组织病理学特征变化

2.3.1 肿瘤基本病理学特征及肿瘤内血管数的变化. 雷帕霉素组肿瘤细胞核异型性、病理性核分裂程度较对照组、环孢素组轻. 应用血管内皮细胞Ⅷ因子单抗标记肿瘤局部微血管内皮细胞, 分析不同免疫抑制剂对肿瘤内血管形成的影响, 结果显示经雷帕霉素治疗后肿瘤内微血管平均数明显少于对照组 ($P = 0.008$) 和环孢素组 ($P = 0.003$) (图 2 a~c, 表 2), 差异具有显著性. 这说明在我们模型中, 从皮下注射肿瘤细胞发展为明显的实体肿瘤, 血管形成发挥关键性作用, 也就是说血管形成在T739膀胱癌的发展中具有重要作用. 其次, 雷帕霉素治疗后肿瘤生长明显抑制, 肿瘤局部微血管显著减少, 充

Table 2 Analysis of microvessels in tumors

Groups	Microvessel average/HP
Control group	$3.65 \pm 2.34\#$
CsA group	$3.95 \pm 0.91^*$
Rapa group	1.15 ± 0.42

#: Rapa group *vs* control group, $P = 0.008$; *Rapa group *vs* CsA group, $P = 0.003$.

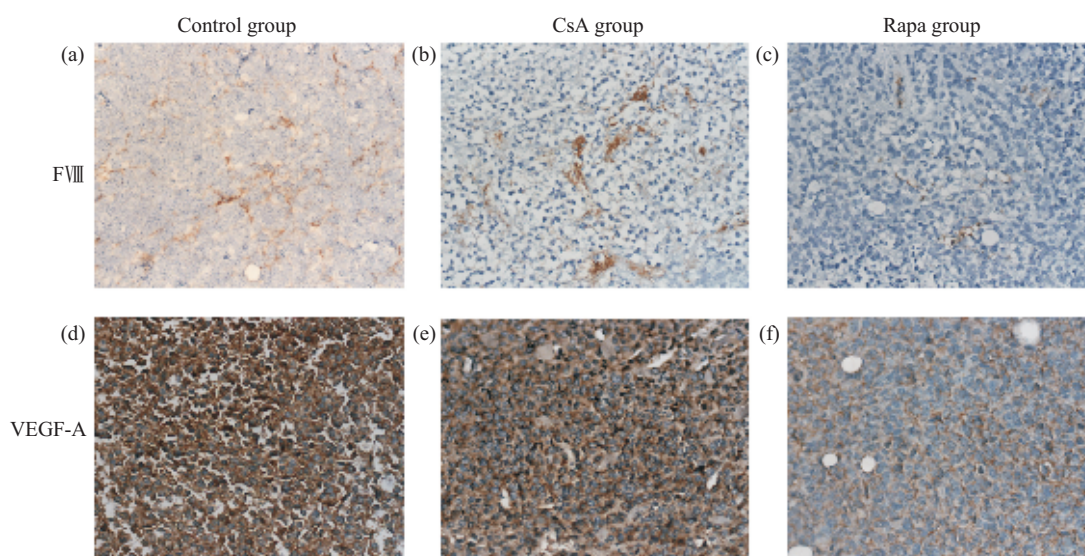


Fig. 2 The results of immuno-histochemistry analysis

The numbers of microvessels dyed by FVIII in Rapa group (c) is less than ones in control group (a) and CsA group (b), ($\times 400$). The intensity of VEGF-A dying in Rapa group (f) is weaker than that in control group (d) and CsA group (e), ($\times 400$).

分说明雷帕霉素是通过抑制肿瘤血管形成从而抑制肿瘤发展的.

2.3.2 肿瘤组织内 VEGF-A 染色的变化. 抗 VEGF-A 抗体免疫组织化学染色, 进一步发现, 雷帕霉素治疗的肿瘤细胞 VEGF-A 染色程度在 50% 以下, 以 “+” 为主, 较对照组、环孢素组都在 85% ~100%, 主要集中于 “+++”, 降低幅度非常明显, 尽管在统计学未达到显著差异, 但已显现较为明显的发展趋势(图 2 d~f). 说明雷帕霉素抗肿瘤效应是通过抑制肿瘤血管形成实现的, 这一过程与抑制肿瘤组织分泌 VEGF-A, 阻断 VEGF 等促进肿瘤新生血管形成因子的作用有关.

2.4 不同免疫抑制剂对肿瘤组织 VEGF-A 和 Hif-1α 的 mRNA 水平的影响

实时荧光定量 RT-PCR 检测肿瘤组织内与血管新生相关基因 VEGF-A 及 HIF-1α 的表达水平, 结果见图 3. 与病理结果相符, 雷帕霉素可从转录水平抑制 VEGF 表达, 与对照组比较降低约 49.4%; 不

仅如此, 作为 VEGF 转录表达主要调控子之一, 转录因子 HIF-1α 也参与这一过程, 并受到雷帕霉素的抑制, 与对照组比较也有约 50.9% 的下调幅度. 而环孢素对 VEGF、HIF-1α 的转录表达未见抑制作用, 相反, 对 VEGF 甚至有上调作用, 这可能是由于环孢素直接作用或通过 TGF-β 促进 VEGF 的转录表达^[7].

2.5 不同免疫抑制剂对肿瘤转移至肺和肝脏的影响

利用肿瘤细胞株稳定表达绿色荧光蛋白的特性, 在荧光显微镜下可观察和统计新鲜离体的整个肺部、肝脏肿瘤转移情况(图 4、表 3). 各组小鼠在肺部、肝脏都出现不同程度的转移, 荧光显微镜下肺部转移灶表现为肿瘤细胞的弥漫性浸润, 而在肝脏则为相对孤立的转移灶. 在对照组、环孢素组肺部肿瘤转移广泛, 弥散整个肺叶, 约占 80%~100% 肺部面积, 其中又以环孢素组浸润面积更大. 接受雷帕霉素治疗的小鼠肺部转移较为局限, 浸润范围不足整个肺部面积的 50%(图 4). 在肝脏, 对照组和环孢素组转移灶数量显著多于雷帕霉素组 ((10.86±3.44), (12.75±3.56) vs (4.38±1.85) $P=0.001$, $P=0.000$), 且转移灶面积较大, 散在分布.

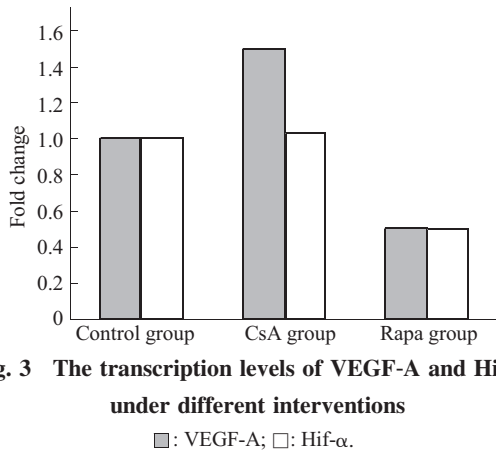


Fig. 3 The transcription levels of VEGF-A and Hif-1α under different interventions
■: VEGF-A; □: Hif-α.

Table 3 Tumor metastasis in lung and liver

Groups	<i>n</i>	Lung metastasis tumor infiltration range/%	Liver metastasis metastases
Control group	8	80~100	10.86 ± 3.44*
CsA group	8	80~100	12.75 ± 3.56#
Rapa group	8	<50	4.38 ± 1.85

*Control group *vs* Rapa group, $P=0.001$; # CsA group *vs* Rapa group, $P=0.000$.

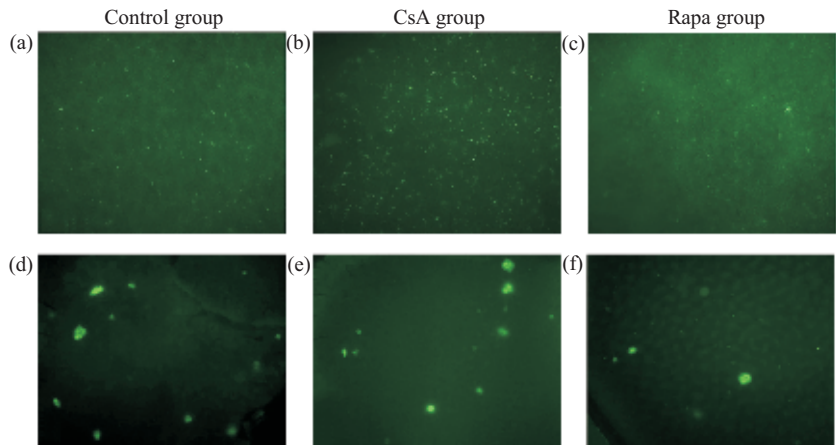


Fig. 4 Metastatic analysis of lung (a,b,c) and liver (d,e,f) under the fluorescent microscope
Metastatic cells showing green fluorescence in Rapa group (c,f) were less than those in control group (a,d) and CsA group (b,e). ×50

3 讨 论

移植后肿瘤是严重影响患者和移植物长期存活的主要因素之一,作为移植临床常用的一线免疫抑制剂,环孢素和雷帕霉素预防移植物排斥反应的作用已经得到肯定,在移植术后长期维持治疗期间其对肿瘤发展和进程影响如何是一个值得深入研究的问题.近期研究显示,环孢素可加速皮肤癌和淋巴细胞增殖性疾病的发展^[8],与普乐可复、骁悉等联合应用将进一步增加移植后肿瘤的发生.但并非所有免疫抑制剂皆为肿瘤发生的促进因子,最近《新英格兰医学杂志》报道,转换为以雷帕霉素为主的免疫抑制方案后可促使移植后kaposi肉瘤(皮肤)病变消退^[9].与国外情况有所不同,我国患者移植后肿瘤多为实体瘤,深入分析不同免疫抑制剂对实体瘤发生、发展的影响,对提高移植患者生存和预防肿瘤的发生具有极强的指导意义.为此,我们利用小鼠膀胱癌模型研究与临床常规免疫抑制剂量相当的条件下,环孢素、雷帕霉素对肿瘤生长和转移方面的效应.结果显示,环孢素、雷帕霉素在对抗膀胱癌生长和转移方面存在相反的效应:雷帕霉素可以显著抑制肿瘤的发展和转移,而环孢素缺乏抗肿瘤效应,甚至具有促进肿瘤生长和转移的作用.

造成上述结果的根本原因是因为环孢素和雷帕霉素作用涉及的信号通路不同.环孢素通过阻断钙调磷酸酶(calcineurin)发挥作用,长期作用可导致转化生长因子 β (TGF- β)表达增加^[10],它可通过TGF- β 促使细胞以自治方式^[7]或与低氧环境协同促进肿瘤的进展^[11].雷帕霉素通过抑制mTOR发挥作用,从而阻断磷酸肌醇3激酶(PI3K)信号通路引发的各种效应作用,而这一通路在肿瘤的发展中具有重要作用^[12,13].

根据本研究的结果,我们发现在肿瘤治疗方面,环孢素和雷帕霉素至少在2个方面存在最根本的不同. a. 雷帕霉素可明显提高荷瘤小鼠的生存.结果显示,雷帕霉素直接抑制肿瘤的生长,降低了荷瘤的容积和远处转移,更深层上是雷帕霉素通过阻断mTOR途径减少了体内细胞的蛋白质合成,使体内某些细胞蛋白质总合成量减少15%~20%^[14,15],显著抑制细胞增殖和代谢等重要病理过程,从而直接影响代谢活跃组织或细胞,如肿瘤组织等的代谢过程和重要病理过程的发展. b. 本研

究显示,雷帕霉素显著抑制肿瘤内血管的形成,肿瘤局部VEGF-A等促血管形成因子分泌明显减少,进一步分析发现,雷帕霉素通过抑制低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、VEGF-A的转录表达发挥作用,而环孢素则促进VEGF-A转录活化,从而导致2种免疫抑制剂在肿瘤治疗方面的不同效应.说明抑制肿瘤内血管形成是雷帕霉素抗肿瘤的主要效应机制,VEGF-A是这一病理过程中的主要效应分子之一.但对HIF-1 α 、VEGF-A基因表达的抑制程度及肿瘤局部血管形成的影响提示,雷帕霉素对肿瘤的作用不仅仅局限于HIF-1 α -VEGF信号通路,可能从更上游通过阻断PI3K-Akt-TOR通路干预多种生长因子促进肿瘤血管形成的效应,发挥抗肿瘤的作用^[16].而环孢素则通过增加TGF- β 、白细胞介素-6及VEGF等生长因子产生,促进肿瘤新生血管形成、肿瘤细胞的生长和转移^[7],甚至与肿瘤局部低氧环境协同促进肿瘤的进展^[9].

肿瘤血管形成的研究是肿瘤研究的一个重要里程碑,50年前,Thomlison等^[7]就观察到肿瘤细胞围绕血管呈簇状生长,其后病理生理研究发现氧在组织中的弥散距离约为180 μm ,距离毛细血管180 μm 之外的肿瘤组织易因缺氧而坏死.本研究中,雷帕霉素治疗后肿瘤局部微血管密度减少,肿瘤在较小容积时表面即出现溃疡、坏死,肿瘤细胞分泌VEGF降低,充分提示抑制肿瘤内血管形成是雷帕霉素抗肿瘤的一个重要作用机制.最近,Phung等^[18]证实雷帕霉素可阻断血管内皮细胞内PI3K-Akt信号通路从而抑制肿瘤内病理性血管形成.不仅如此,延长应用雷帕霉素可阻断某些肿瘤细胞内TOR复合体2(TOR complex 2, TORC2)信号通路产生抗肿瘤效应^[19],这与以往认为雷帕霉素仅对TOR复合体1(TOR complex 1, TORC1)信号通路敏感不同,说明只要采取合理的治疗措施,无论是在内皮细胞还是肿瘤细胞,雷帕霉素可同时阻断TORC1、TORC2信号通路发挥最大的抗肿瘤效果.在我们的实验中,采用每日连续给药的治疗方式,在荷瘤小鼠存活和肿瘤抑制方面取得良好效果,进一步验证了在常规免疫抑制剂量和给药方式下,雷帕霉素可取得良好的抗肿瘤效应.说明在移植临床,相对于环孢素,雷帕霉素在预防针对移植物排斥反应的同时,在肿瘤治疗方面具有极大的推广和发展空间.进一步优化用药策略充分发挥其抗排斥、抗肿瘤的双重效应是今后研究的方向.

参考文献

- 1 Garver R I Jr, Zorn G L, Wu X, *et al.* Recurrence of bronchioloalveolar carcinoma in transplanted lungs. *N Engl J Med*, 1999, **340** (14): 1071~1074
- 2 Mayer C G, Penn I, James L. Liver transplantation for cholangiocarcinoma: result in 207 patients. *Transplantation*, 2000, **69** (8): 1633~1637
- 3 Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. In: Terasaki P I, ed. *Clinical Transplants*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1998. 147~158
- 4 Ondrus D, Pribylincova V, Breza J. The incidence of tumours in renal transplant recipients with long-term immunosuppressive therapy. *Int Urol Nephrol*, 1999, **31** (4): 417~422
- 5 Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, *et al.* Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporine regimen. *Lancet*, 1998, **351** (9103): 623~628
- 6 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, **36** (2): 169~180
- 7 Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, *et al.* Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, 1999, **397** (6719): 530~534
- 8 Dantal J, Souillou J P. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med*, 2005, **352** (13): 1371~1373
- 9 Stallone G, Schena A, Infante B, *et al.* Sirolimus for kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 2005, **352** (13): 1317~1323
- 10 Khanna A, Li B, Stenzel K H, *et al.* Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. *Transplantation*, 1994, **57** (4): 577~582
- 11 Sanchez-elsner T, Bitella L M, Velasco B, *et al.* Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*, 2001, **276** (42): 38527~38535
- 12 Mamane Y, Petroulakis E, Lebacquer O, *et al.* mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, 2006, **25** (48): 6416~6422
- 13 Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2** (7): 489~501
- 14 Huang S, Houghton P J. Resistance to rapamycin: a novel anticancer drug. *Cancer Metastasis Rev*, 2001, **20** (1~2): 69~78
- 15 Wullschlegel S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006, **124** (3): 471~484
- 16 Sabatini D M. mTOR and cancer: insight into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6** (9): 729~734
- 17 Thomlinson R H, Gray L H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 1955, **9** (4): 539~549
- 18 Phung T L, Ziv K, Dabydeen D, *et al.* Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell*, 2006, **10** (2): 159~170
- 19 Sarbassov D D, Ali S M, Sengupta S, *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 2006, **22** (2): 159~168

The Different Effects of Immunosuppressants on Progress and Metastasis of Mice Bladder Cancer*

LIU Yong^{1)**,**}, WANG Feng^{2)**}, YUAN Lin³⁾, HU Hong-Hui³⁾, TANG Xiao-Da¹⁾

¹⁾Department of Urology and Renal Transplantation Affiliated No.1 People's Hospital Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China;

²⁾Central Experimental Laboratory Affiliated No.1 People's Hospital Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China;

³⁾ Department of Pathology, Affiliated No.1 People's Hospital Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract The different effects of cyclosporine and rapamycin on tumor progress and metastasis and their mechanisms were investigated. BTT-T739-gfp cell line stably expressed green fluorescence protein was intracutaneously inoculated into 24 mice. One week later, the mice were randomly divided into 3 groups and treated intraperitoneally by normal saline (as control), cyclosporine and rapamycin respectively. Survival rate and tumor volume were measured. The tumor metastasis, pathological angiogenesis and expression of angiogenesis-associated genes were analyzed. The metastasis analysis in lung and liver were also accomplished under the fluorescent microscope. Compared with the normal saline and cyclosporine, the general immunosuppressive dosage of rapamycin effectively inhibited the progress and metastasis of the established tumors. It was the rapamycin that improved the survival rate of tumor-bearing mice and decreased the developmental velocity of tumor volume, to which was significantly different from the control and cyclosporine groups on the 12th day and 14th day. Experimentally, rapamycin inhibited tumor growth through angiogenesis and metastases repression in the established mouse model. From a mechanistic perspective, rapamycin showed anti-angiogenic activities related to decrease of VEGF-A production which was a result of the down-regulation on the transcriptional level of VEGF-A and its transcription activator HIF-1 α . It implied that conventional immunosuppressants showed different therapeutic roles on established tumors. Rapamycin, not cyclosporine could inhibit the tumor growth and metastasis of which was referred to anti-angiogenesis.

Key words neoplasm, immunosuppressant, cyclosporine, rapamycin, angiogenesis

*The work was supported by grants from Shanghai Medical Centre of Organ Transplantation (QY-040101-10), Foundation of Young Scientists of The Health Bureau of Shanghai (024Y05) and Shanghai Rising-Star Program (04QMX1417).

**LIU Yong and WANG Feng have contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-21-63240090-5631, E-mail: koucai99@gmail.com

Received: May 10, 2007 Accepted: August 9, 2007