

内皮抑素抑制肿瘤血管生成的数值模拟¹⁾

赵改平^{*,2)} 陈二云[†] 沈力行^{*} 郇鸣阳^{*} 吴洁^{**} 许世雄^{**} 丁皓^{*}

^{*}(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093) [†](上海理工大学能源与动力工程学院, 上海 200093)

^{**}(复旦大学力学与工程科学系, 上海 200433)

摘要 数值模拟抗血管生成药物内皮抑素对肿瘤血管生成的抑制效应. 建立内皮抑素作用下肿瘤内外血管生成的二维、三维离散数学模型, 模型中考虑内皮抑素的抑制作用、内皮细胞自身的增殖、促血管生成因子 TAF 和 Fibronectin 对内皮细胞产生的趋化性和趋触性以及内皮细胞自身扩散引起的随机性运动, 数值模拟肿瘤内外微血管网的生成过程. 模拟结果表明, 抗血管生成药物内皮抑素对肿瘤内外血管生成的速度、成熟度以及血管分支数量均有明显的抑制作用, 从而有效地抑制肿瘤新生血管的形成. 该模型能够较好地模拟内皮抑素对肿瘤血管内皮细胞迁移与增殖的抑制效应, 为临床抗血管生成治疗肿瘤提供有益的信息.

关键词 内皮抑素, 肿瘤, 血管生成, 抑制效应, 数学模型

中图分类号: R318.01, TB115 **文献标识码:** A **文章编号:** 0459-1879(2009)05-0794-07

引 言

肿瘤的生长、侵袭和转移与血管生成 (angiogenesis) 密切相关. 1971 年, 哈佛医学院的 Folkman^[1] 首次提出抗血管生成治疗肿瘤 (anti-angiogenesis therapy tumor) 的设想. 抗血管生成治疗是通过不同类型的抗血管生成药物, 有针对性地阻断或抑制新生血管的形成, 从而切断肿瘤营养供给, 抑制肿瘤细胞增殖, 达到治疗肿瘤的目的, 为肿瘤治疗开辟了一条有希望的新途径, 并已成为国内外研究的热点之一.

抗血管生成药物内皮抑素 (Endostatin) 是 O'Reilly 等^[2] 于 1997 年首次从小鼠内皮细胞瘤 (EOMA) 培养液中分离出来, 它是 XVIII 型胶原蛋白羧基末端的片段, 是一种内源性新血管生成抑制剂, 相对分子质量为 20 000, 含 184 个氨基酸, 该蛋白质具有强烈抑制内皮细胞增殖的活性, 能有效抑制新血管的生成. Fu 等^[3] 从人肝脏 cDNA 文库中筛选克隆也发现并且获得 Endostatin. 许多研究表明^[4~6] Endostatin 可直接抑制内皮细胞的有丝分裂或与其受体结合抑制内皮细胞的增生; 也可与肝素样的硫酸蛋白结合抑制血管生成; 或通过抑制某些抗凋亡蛋白促使内皮细胞凋亡加速; 也可通过抑制血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板源生长因子 (PDGF)

和转化生长因子 (TGF) 等促血管生长因子, 从而抑制内皮细胞的增殖和肿瘤的生长. 尽管目前对 Endostatin 抑制效应的机制尚未完全理解, 但动物实验已证明 Endostatin 具有高效抑制肿瘤血管生成, 进而抑制肿瘤生长、侵袭和转移的作用.

在肿瘤内外血管生成及抗血管生成研究的基础上^[7~9], 本文采用数值模拟的方法进一步研究抗血管生成药物 Endostatin 对肿瘤内外血管生成的抑制效应. 模型中考虑抗血管生成药物 Endostatin 的抑制作用、内皮细胞自身的增殖、扩散以及 TAF 和 Fibronectin 对内皮细胞产生的趋化性和趋触性运动, 在内皮细胞的微观尺度上模拟肿瘤内外微血管网的生长过程.

1 数学模型

模型假设内皮细胞的迁移运动主要包括随机、趋化和趋触性运动^[10], 并且考虑抗血管生成药物 Endostatin 的抑制作用以及内皮细胞自身的增殖. 设单位面积上内皮细胞密度为 n , TAF 浓度为 c , Fibronectin 的浓度为 f , 抗血管生成药物 Endostatin 浓度为 e , 则内皮细胞的守恒控制方程为

$$\frac{\partial n}{\partial t} = J(n, c, f) + P(n, c) \left(1 - \frac{\varepsilon_{\max} e}{e C_{50} + e} \right) \quad (1)$$

2008-03-04 收到第 1 稿, 2009-04-08 收到修改稿.

1) 国家自然科学基金 (10772051), 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (571215), 博士科研启动费基金 (10D214) 和上海市自然科学基金 (09ZR1422500) 资助项目.

2) E-mail: zgp_06@yahoo.com.cn

其中 $J(n, c, f)$ 表示内皮细胞随机、趋化和趋触性运动项, $\varepsilon_{\max}$ 表示 Endostatin 对内皮细胞增殖的最大抑制效用, eC_{50} 表示能够诱使 50% 最大抑制效用的 Endostatin 浓度, $P(n, c)$ 表示与内皮细胞有丝分裂相关的增殖项, 其表达式为 [11]

$$P(n, c) = \alpha_r(1 - n/n_0)nH(c) \quad (2)$$

其中 α_r 是与内皮细胞最大有丝分裂率相关的正常数, n_0 是初始母血管上内皮细胞的浓度, $H(c)$ 是与 TAF 浓度分布密切相关的“开关”函数, 表达式为

$$H(c) = \begin{cases} 0, & c \leq c^* \\ (c - c^*)/c_0, & c > c^* \end{cases} \quad (3)$$

其中, c^* 为 TAF 的阈值浓度, c_0 为初始 TAF 浓度, “开关”函数反映了当 TAF 浓度高于某一定值时, 内皮细胞即可发生增殖, 而低于某一定值时, 内皮细胞将处于静息状态.

考虑抗血管生成药物 Endostatin 对内皮细胞增殖作用的抑制, Plasma-endostatin 动力学过程的线性形式为 [12]

$$V_p \partial e / \partial t = -Cl_e e + U_{I,ex} + U_{I,en}$$

其中, V_p 为血浆体积, Cl_e 为血浆中 Endostatin 的清除率, $U_{I,ex}$ 为外部 Endostatin 的注射速率, $U_{I,en}$ 为内部 Endostatin 的产生率. 当 $U_{I,ex} \gg U_{I,en}$ 时 [13], 则上述方程可简化为

$$\partial e / \partial t = (-Cl_e e + U_{I,ex}) / V_p \quad (4)$$

TAFs 和 Fibronectin 的时间演化

$$\partial c / \partial t = -\lambda nc \quad (5)$$

$$\partial f / \partial t = \omega n - \mu n f \quad (6)$$

其中 λ 为内皮细胞对 TAFs 的消耗率, ω 和 μ 分别为内皮细胞对 Fibronectin 的分泌率和消耗率.

对方程 (1), (4)~(6) 进行无量纲化, 得如下方程组

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - \nabla \cdot \left(\frac{\chi}{1 + \sigma c} n \nabla c \right) - \nabla \cdot (\rho n \nabla f) + \beta_r(1 - n)nH(c) \left(1 - \frac{\varepsilon_{\max} e e_0}{eC_{50} + e e_0} \right) \quad (7)$$

$$\partial c / \partial t = -\eta nc \quad (8)$$

$$\partial f / \partial t = \beta n - \gamma n f \quad (9)$$

$$\partial e / \partial t = -\gamma_e e + \gamma_u U_{I,ex} \quad (10)$$

其中

$$D_n = \frac{D_0}{D_c}, \quad \chi = \frac{\chi_0 c_0}{D_c}, \quad \sigma = \frac{c_0}{\kappa_1}$$

$$\rho = \frac{\rho_0 f_0}{D_c}, \quad \beta_r = \frac{\alpha_r L^2}{D_c}, \quad \eta = \frac{\lambda n_0 L^2}{D_c}$$

$$\beta = \frac{\omega n_0 L^2}{f_0 D_c}, \quad \gamma = \frac{\mu n_0 L^2}{D_c}, \quad \gamma_e = \frac{Cl_e L^2}{D_c V_p}$$

$$\gamma_u = \frac{L^2}{D_c e_0 V_p}, \quad H(c) = \begin{cases} 0, & c \leq c^* \\ c - c^*, & c > c^* \end{cases}$$

采用 Euler 有限差分方法离散上述方程组, 可得二维、三维离散形式, 其中三维离散形式 (二维离散形式略) 如下

$$\begin{aligned} n_{l,m,j}^{q+1} = & n_{l,m,j}^q P_0 + n_{l+1,m,j}^q P_1 + n_{l-1,m,j}^q P_2 + \\ & n_{l,m+1,j}^q P_3 + n_{l,m-1,j}^q P_4 + n_{l,m,j+1}^q P_5 + \\ & n_{l,m,j-1}^q P_6 \end{aligned} \quad (11)$$

$$a_{l,m,j}^{q+1} = a_{l,m,j}^q (1 - k\gamma n_{l,m,j}^q) \quad (12)$$

$$c_{l,m,j}^{q+1} = c_{l,m,j}^q (1 - k\eta n_{l,m,j}^q) \quad (13)$$

$$e_{l,m,j}^{q+1} = e_{l,m,j}^q (1 - k\gamma_e) + k\gamma_u U_{I,ex} \quad (14)$$

在上述三维离散模型中, 内皮细胞可以沿着互相垂直的 6 个方向以及静止来运动, 在每一步的迭代过程中, 求解上述离散方程组, 获得 P_0 到 P_6 共 7 个运动方向上的运动概率, 然后构造 7 个运动范围, 随后产生一个均匀分布的随机数, 随机数的范围在 0~1 之间, 根据产生的随机数落在某个特定的区间上, 来确定内皮细胞下一时刻的运动方向, 二维离散模型的求解类似. 模拟中相应的边界条件和初始条件以及模型中各参数取值详见文献 [10,12].

2 血管生成模拟结果

图 1 和图 2 分别为数值模拟肿瘤内外血管生成二维、三维时空演化图. 模拟区域离散化为均匀网格, 空间离散步长的实际长度近似于一到两个内皮细胞的长度, 母血管位于模拟区域的一侧, 最初母血管上随机分布 5 个芽尖, 由于随机性, 并非所有芽尖均发展成为充分的血管网, 在三维模型中仅有 3 根芽尖成功地长入肿瘤内部, 模拟的总时间为 16 d.

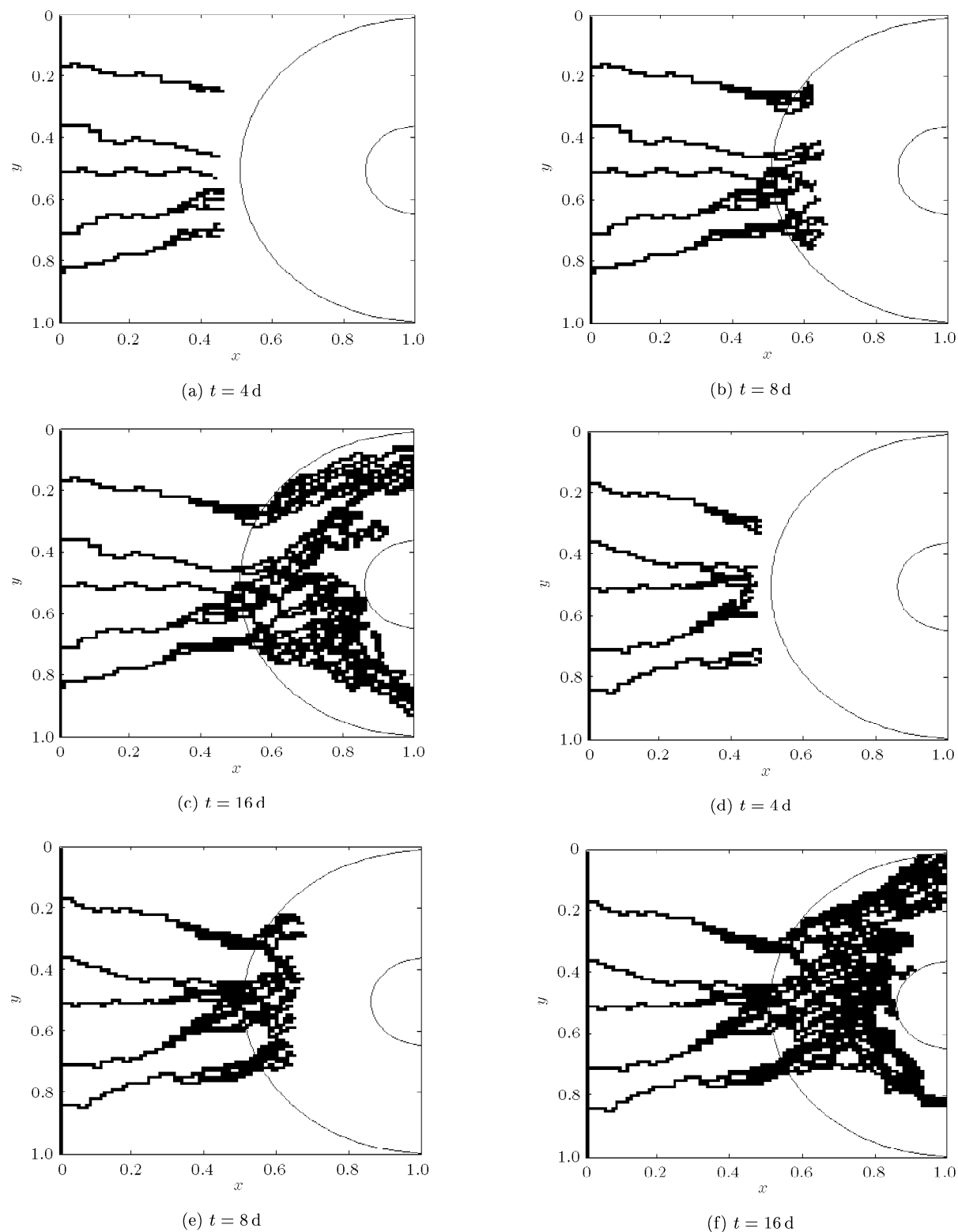


图 1 二维肿瘤血管生成的时空演化图

(图 (a),(b),(c) 为注射抗血管生成药物 Endostatin 时, 微血管网的生成过程;

图 (d),(e),(f) 为未注射 Endostatin, 其它条件完全相同的对照组图)

Fig.1 Spatiotemporal evolution of 2D tumor microvascular network growth to (a) 4 days; (b) 8 days; (c) 16 days under the effects of Endostatin and (d) 4 days; (e) 8 days; (f) 16 days under otherwise identical conditions, but without the effects of Endostatin

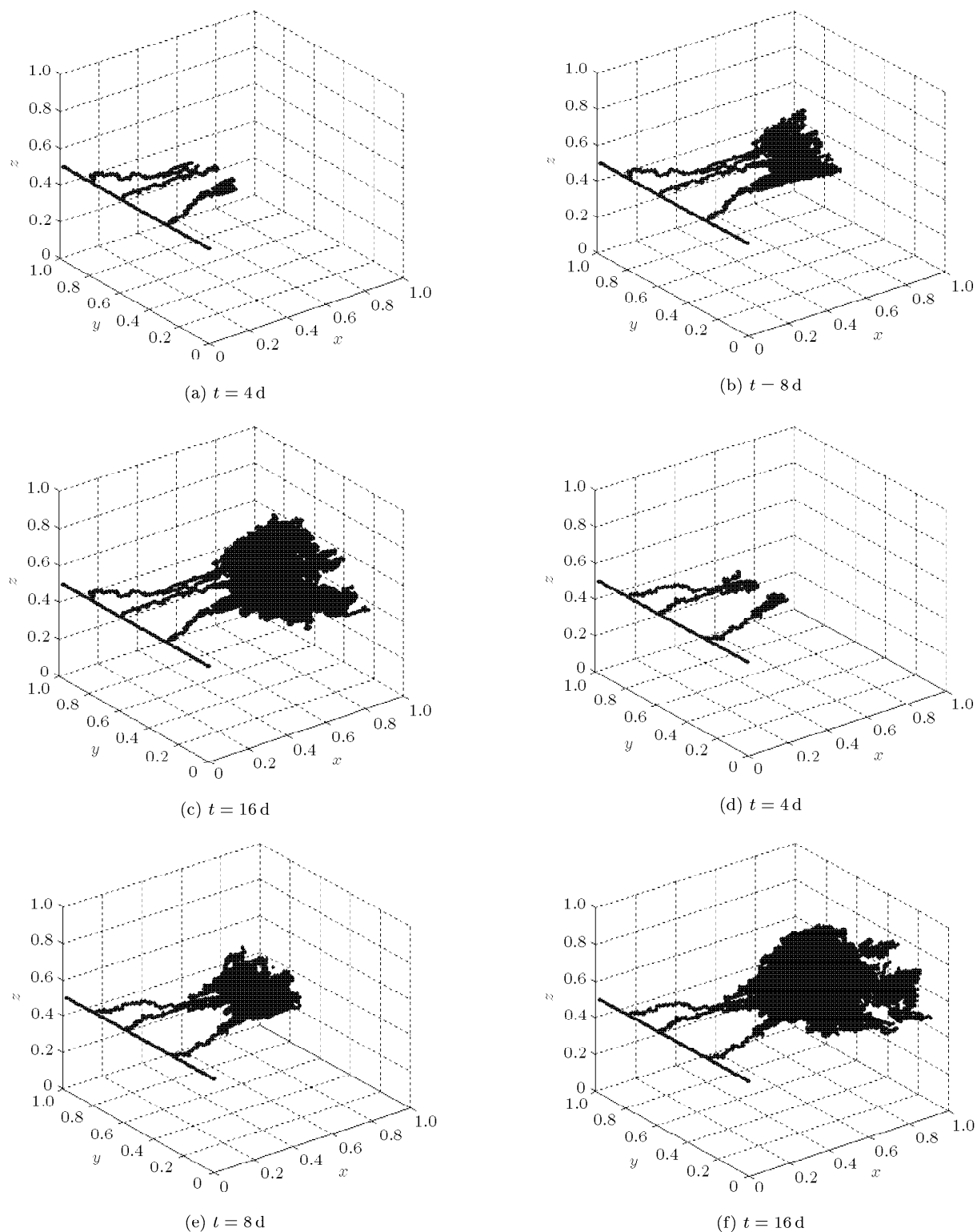


图 2 三维肿瘤血管生成的时空演化图

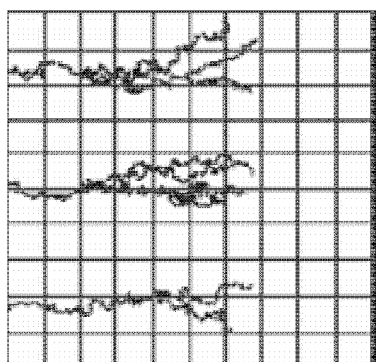
(图 (a),(b),(c) 为注射抗血管生成药物 Endostatin 时, 微血管网的生成过程;

图 (d),(e),(f) 为未注射 Endostatin, 其它条件完全相同的对照组图)

Fig.2 Spatiotemporal evolution of 3D tumor microvascular network growth to (a) 4 days; (b) 8 days; (c) 16 days under the effects of Endostatin and (d) 4 days; (e) 8 days; (f) 16 days under otherwise identical conditions, but without the effects of Endostatin

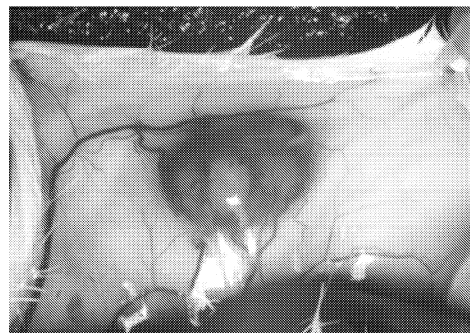
当以 $20\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量持续注射抗血管生成药物 Endostatin 时, 血管生长到 4d, 8d 和 16d 时, 肿瘤微血管网生成的二维、三维数值模拟结果分别如图 1 和图 2 中 (a)~(c) 所示. 其中图 1 和图 2 中 (d)~(f) 分别为对应于图 (a)~(c) 的对照组图, 它们表示未注射抗血管生成药物 Endostatin, 其它条件完全相同的情况下, 肿瘤微血管网的生长过程. 由模拟结果可以看出, 对照组中肿瘤内外毛细血管生长旺盛, 新生血管数量较多, 血管存在着大量的分支和融合, 生成的肿瘤内外微血管网络结构比较密集, 并且血管网络具有良好的生长速度和成熟度. 当持续的注射抗血管生成药物 Endostatin 时, 数值模拟生成的肿瘤内外微血管网络结构比较稀疏, 新生血管芽尖数量减少, 在相同的生长天数下毛细血管总数量有明显的下降, 并且微血管网络向四周扩张和生长的速度变缓, 新生血管的成熟度也有所下降. 表明抗血管生成药物 Endostatin 对肿瘤血管壁上内皮细胞的迁移和增殖有明显的抑制效应, 从而抑制肿瘤微血管网的生成和生长, 进而可抑制肿瘤的生长、侵袭和转移.

本文数值生成的肿瘤内部和外部微血管网与目前实验研究和数值模拟获得的肿瘤内外微血管网分布符合较好. Tee 等^[12]数值研究 Endostatin 作用下肿瘤外部微血管网的二维模拟结果 (图 3(a)) 显示, 肿瘤新生血管从宿主血管壁长出, 朝向肿瘤生长, 几乎平行排列, 不断向肿瘤靠拢时, 新血管呈树状分叉, 并且分叉数量逐渐增多, 本文的模拟结果和 Tee 等人的模拟结果相似, 均与实验研究的结果相符 (见图 3(b), Steven 等人通过实验研究获得的肿瘤微血管网分布). 图 3(b) 的实验研究结果显示, 当新生血管进入肿瘤内部时, 血管出现扭曲、环路、排列方向参差不齐等特征, 并且肿瘤内部微血管分布



(a) Tee 等^[12]数值模拟结果

(a) Numerical simulation result from Ref.[12]



(b) Steven 等的实验研究结果

(b) Experimental result from Dr. Steven Stacker et al.

图 3 数值模拟和实验研究获得的肿瘤内外微血管网分布
Fig.3 Numerical simulation result and experimental result of the microvascular network outside and inside of the tumor

明显不均匀, 新生血管主要集中在肿瘤边缘区域形成富血管区, 为肿瘤提供丰富的血液灌注; 在靠近肿瘤中心区域有突然变细而中断的血管, 其内部的血液灌注较低, 形成中心坏死核; 富血管区域与坏死核之间是血管网较稀疏的半坏死区域. 本文数值模拟生成的微血管网基本上体现了肿瘤血管生长的异常特征和内部的分层结构, 模型在一定程度上能够产生相对比较真实的肿瘤内外微血管网, 可为临床研究提供有益的信息.

3 结 论

肿瘤血管生成是一个非常复杂的病理过程, 它取决于多个系统和多种因素的相互作用. 近年来, 利用抗血管生成药物抑制肿瘤血管生成, 切断肿瘤营养供应, 遏制肿瘤生长和转移, 已发展成为重要的抗癌策略. 本文在 Tee 等数值模拟肿瘤外部抗血管生成二维模型的基础上, 提出了抗血管生成药物 Endostatin 对血管内皮细胞抑制效应的二维和三维离散数学模型, 数值模拟了肿瘤内部和外部微血管网的生长过程. 结果表明 Endostatin 对肿瘤血管内皮细胞迁移和增殖有明显的抑制效应, 可有效地抑制肿瘤新生血管的形成, 降低肿瘤血管化程度, 进而抑制肿瘤的生长和转移, 与临床抗血管生成 Endostatin 药物治疗肿瘤的研究结果相符.

肿瘤的生长过程中伴随着血管生成, 血管生成成为肿瘤生长提供营养、氧气和血液灌注, 激活肿瘤内静息的癌细胞, 促进癌细胞的增生和迁移. 反过来, 癌细胞的增生, 促使肿瘤内微血管间的距离增

大, 压力也相应增大, 导致部分血管塌瘪, 血管网络出现重构, 血管半径不断变化. 本文模型目前还没有考虑血管管径变化、血管塌瘪以及血液流动等诸多因素的影响. 因此, 耦合研究药物作用下肿瘤血管生成和血液动力学是必要的, 也是我们进一步有待开展的工作.

抗血管生成药物 Endostatin 是以血管内皮细胞为靶点, 特异性的作用于肿瘤血管内皮细胞, 抑制其增殖和迁移, 使肿瘤血管内皮细胞退化、萎缩、逐渐凋亡, 从而阻断肿瘤组织新血管的生成. Endostatin 对肿瘤血管生成有明显的抑制效应, 尽管目前对其作用机制尚未完全清楚, 但 Endostatin 作为一种血管抑制剂, 为肿瘤治疗开辟了一种新的途径, 特别是结合手术、放疗、化疗、介入治疗、物理治疗、免疫治疗和基因治疗等其他治疗方法, 可取得更好的疗效. 因此, 抗血管生成药物 Endostatin 必将在肿瘤治疗方面有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 1971, 285(10): 1182~1186
- 2 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88: 277~285
- 3 Fu Gengfeng, Li Xi, Hou Yayi, et al. Bifidobacterium longum as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 12(2): 133~140
- 4 Dixlius J, Cross M, Matsumoto T, et al. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. *Cancer Research*, 2002, 62(7): 1944~1947
- 5 Furumatsu T, Yamaguchi N, Nishida K, et al. Endostatin inhibits adhesion of endothelial cells to collagen I via $\alpha(2)\beta(1)$ integrin, a possible cause of prevention of chondrosarcoma growth. *J Bio Chem*, 2002, 131(4): 619~626
- 6 Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Research*, 2000, 60: 5410~5413
- 7 Zhao Gaiping, Wu Jie, Xu Shixiong, et al. Numerical simulation of blood flow and interstitial fluid pressure in solid tumor microcirculation based on tumor-induced Angiogenesis. *Acta Mechanica Sinica*, 2007, 23(5): 477~483
- 8 Zhao Gaiping, Wu Jie, Xu Shixiong, et al. Numerical simulation of hemodynamics in the host blood vessel and microvascular network Generated from tumor-induced Angiogenesis. *Journal of Hydrodynamics*, 2006, 18(6): 641~652
- 9 赵改平, 高昊, 吴洁等. 抗血管生成因子 Angiostatin 与 Endostatin 作用下肿瘤血管生成的二维数值模拟. 医用生物力学, 2006, 21(4): 272~279 (Zhao Gaiping, Gao Hao, Wu Jie, et al. 2D numerical simulation of effect of antiangiogenic factors Angiostatin and Endostatin on tumor-induced angiogenesis. *Journal of Medical Biomechanics*, 2006, 21(4): 272~279 (in Chinese))
- 10 Anderson ARA, Chaplain MAJ. Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. *Bull Math Biol*, 1998, 60(5): 857~899
- 11 Chaplain MAJ, Stuart AM. A model mechanism for the chemotactic response of endothelial cells to tumour angiogenesis factor. *IMA J Math Appl Med Biol*, 1993, 10: 149~168
- 12 Tee D, DiStefano III J. Simulation of tumor-induced angiogenesis and its response to anti-angiogenic drug treatment: mode of drug delivery and clearance rate dependencies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130: 15~24
- 13 Mundhenke C, Thomas JP, Wilding G, et al. Tissue examination to monitor antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 3366~3374

(责任编辑: 刘俊丽)

NUMERICAL SIMULATION OF INHIBITORY EFFECTS OF ENDOSTATIN ON TUMOR ANGIOGENESIS¹⁾

Zhao Gaiping^{*,2)} Chen Eryun[†] Shen Lixing^{*} Li Mingyang^{*} Wu Jie^{**} Xu Shixiong^{**} Ding Hao^{*}

^{*}(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology,
Shanghai 200093, China)

[†](School of Energy and Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

^{**}(Department of Mechanics and Engineering Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract The inhibitory effects of anti-angiogenic drug Endostatin on tumor angiogenesis are simulated by adopting 2D and 3D discrete mathematical models, which are used to describe the formation of capillary networks inside and outside the tumor. In the discrete mathematical models, five factors were mainly taken into account the influence of the migration of endothelial cells: (i) proliferation and (ii) random motility of the endothelial cells; (iii) chemotaxis in response to tumor angiogenic factor (TAF) released by the tumor; (iv) haptotaxis in response to fibronectin gradients in the extracellular matrix, especially the inhibitory action of anti-angiogenic drug Endostatin, and (v) inhibitory effects of Endostatin. Meanwhile, spatiotemporal evolution of 2D and 3D tumor microvascular networks is performed. The simulation results indicate that anti-angiogenic drug Endostatin obviously has the inhibitory effects on the rate of blood vessels growth, the bifurcation amount and the development of the microvascular network inside and outside the tumor. Furthermore, the microvascular networks generated by the present mathematical models have relatively realistic structure and morphology inside and outside the tumor. These results may provide beneficial information for anti-angiogenesis treatment of tumor and further clinical research.

Key words endostatin, tumor, angiogenesis, inhibitory effects, mathematical model

Received 4 March 2008, revised 8 April 2009.

1) The project supported by the National Natural Science Foundation of China (10772051), Foundation for Excellent Young High Education Teacher of Shanghai (571215), Scientific Research of Doctor Priming Foundation of China(10D214) and Shanghai Natural Science Foundation (09ZR1422500).

2) E-mail: zgp.06@yahoo.com.cn