

贝伐单抗与重组人血管内皮抑素对人乳腺癌 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

陈俊青¹, 蓝天¹, 韩娜¹, 王娟², 王晓稼¹

(1.浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2.浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310003)

摘要: [目的] 探讨贝伐单抗、重组人血管内皮抑素对人乳腺癌 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤生长的影响。[方法] 建立人乳腺癌裸鼠移植瘤模型, 随机分为对照组、低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组、低剂量联合组以及高剂量联合组, 用药 3 周。检测裸鼠体重、移植瘤体积、移植瘤重量, 计算抑瘤率。[结果] 与对照组相比, 低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量联合组、高剂量联合组裸鼠移植瘤生长曲线较平缓, 移植瘤重量明显下降 ($P < 0.01$), 抑瘤率分别为 67.69%、68.88%、78.32% 和 79.26%。低剂量联合组与低剂量贝伐单抗组移植瘤重量存在统计学差异 ($P < 0.05$)。低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组移植瘤生长与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。[结论] 贝伐单抗能抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤生长, 低剂量贝伐单抗联合重组人血管内皮抑素能进一步提高抗肿瘤作用。

关键词: 贝伐单抗; 重组人血管内皮抑素; 乳腺癌; 裸鼠移植瘤

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)05-0408-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.05.A013

Effects of Bevacizumab and Recombinant Human Endostatin on Human Breast Cancer MCF-7 Xenografts in Nude Mice

CHEN Jun-qing, LAN Tian, HAN Na, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of bevacizumab and recombinant human endostatin (rhES) on the tumor growth of human breast cancer MCF-7 xenografts in nude mice. [Methods] Human breast cancer xenografts were established from MCF-7 cells, and nude mice were randomly divided into control group, low-dose bevacizumab group, high-dose bevacizumab group, low-dose rhES group, high-dose rhES group, low-dose combination group and high-dose combination group. The body weight of nude mice, tumor volume and tumor weight were measured. The tumor inhibition rate was evaluated. [Results] Tumor weight was significantly decreased in low-dose bevacizumab group, high-dose bevacizumab group, low-dose combination group and high-dose combination group as compared with control ($P < 0.01$). The tumor growth inhibition rates in low-dose bevacizumab group, high-dose bevacizumab group, low-dose combination group and high-dose combination group were 67.69%, 68.88%, 78.32% and 79.26%, respectively. Significant difference in tumor weight between low-dose combination group and low-dose bevacizumab group was observed ($P < 0.05$). There was no significant difference of tumor growth between rhES group and control group ($P > 0.05$). [Conclusion] Bevacizumab has an inhibitory effect on tumor growth of human breast cancer MCF-7 xenografts, and low-dose bevacizumab combined with rhES may enhance the antitumor activity.

Key words: bevacizumab; recombinant human endostatin; breast cancer; nude mice xenografts

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 据估计, 2013 年美国女性乳腺癌新发病例 234 580 例, 死亡病例 40 030 例^[1]。中国肿瘤登记地区 2009 年恶性肿瘤相关数据显示, 乳腺癌已位居女性恶性肿瘤发

病率首位^[2]。尽管乳腺癌的综合治疗取得长足的进步, 肿瘤复发和转移仍然是乳腺癌治疗失败的主要原因。与许多实体瘤相似, 新生血管生成是乳腺癌生长、侵袭和转移的重要因素, 抗肿瘤血管生成治疗已成为乳腺癌靶向治疗的重要研究领域。贝伐单抗是首个被批准用于抗肿瘤血管生成的血管内皮生长因

收稿日期: 2014-02-03; 修回日期: 2014-03-28

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金计划 (2010KYB020)

通讯作者: 王晓稼, E-mail: wxiaojia0803@163.com

子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体, 通过结合 VEGF-A, 阻断 VEGF 介导的血管形成, 抑制肿瘤生长。重组人血管内皮抑素(recombinant human endostatin, rhES)是我国学者研发的抗肿瘤血管生成药物, 主要通过抑制血管内皮细胞增殖迁移以及诱导其凋亡, 抑制肿瘤新生血管形成。肿瘤血管生成机制复杂, 单一药物对肿瘤血管生成的抑制作用可能有限, 不同机制的抗血管生成靶向药物贝伐单抗与重组人血管内皮抑素联合治疗乳腺癌的研究, 目前国内外少有报道。本实验采用人乳腺癌 MCF-7 细胞建立皮下移植瘤裸鼠模型, 探讨贝伐单抗与重组人血管内皮抑素对乳腺癌移植瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自 ATCC 公司, 在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37℃ 恒温、5%CO₂ 的培养箱中培养。BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物责任有限公司[许可证号 SCXK(沪)2007-0005], 雌性, 6 周龄, 体重 18~20g, 饲养于 SPF 级环境中。贝伐单抗注射液购自上海罗氏制药有限公司, 重组人血管内皮抑素注射液购自山东先声麦得津生物制药有限公司。

1.2 人乳腺癌裸鼠模型的建立及实验分组

MCF-7 细胞生长到 70%~80%融合时, 0.25%胰酶消化收集细胞, 调整细胞悬液浓度 $2 \times 10^7/\text{ml}$, 取 100 μl 接种于裸鼠左腋下, 适时观察裸鼠成瘤情况。瘤体长径至约 5mm 大小时, 裸鼠随机分成 7 组, 每组 5 只, 即对照组、低剂量贝伐单抗组(5mg/kg)、高剂量贝伐单抗组(10mg/kg)、低剂量重组人血管内皮抑素组(10mg/kg)、高剂量重组人血管内皮抑素组(20mg/kg)、低剂量联合组(贝伐单抗 5mg/kg+重组人血管内皮抑素 10mg/kg)以及高剂量联合组(贝伐单抗 10mg/kg+重组人血管内皮抑素 20mg/kg)。对照组注射 0.9%生理盐水, 连续 21d; 贝伐单抗给药为 5mg/kg 或 10mg/kg, 腹腔注射, 第 1、4、8、11、15、18 天; 重组人血管内皮抑素给药为 10mg/kg 或

20mg/kg, 皮下注射, 连续 21d。

1.3 移植瘤生长测定

给药后每日游标卡尺测量移植瘤长径(a)和短径(b), 并计算肿瘤体积(V): $V = ab^2/2$, 绘制肿瘤生长曲线。给药第 22d 处死裸鼠, 剥离皮下肿瘤, 并称瘤重, 计算抑瘤率(tumor inhibition rate, TIR)。TIR(%)=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 组间计量资料比较采用独立样本 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠一般状况

MCF-7 细胞接种裸鼠 7d 后, 所有裸鼠接种部位均出现肿瘤结节, 裸鼠乳腺癌移植瘤成瘤率为 100%。所有裸鼠全部成活, 实验组和对照组裸鼠觅食、饮水、活动等状况良好, 无活动下降、腹泻、消瘦等情况。从给药开始到实验结束各组裸鼠平均体重均未降低, 与对照组相比, 各实验组用药前以及用药结束裸鼠体重差异无显著性(P>0.05), 各实验组裸鼠体重变化差异也无显著性(P>0.05)(Table 1)。

2.2 贝伐单抗与重组人血管内皮抑素对裸鼠乳腺癌移植瘤体积的影响

用药第 10d 开始, 低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量联合组、高剂量联合组裸鼠移植瘤生长曲线较平缓, 移植瘤体积增长速度明显低于对照组, 差异有统计学意义(P<0.01)。低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组移植瘤生长曲线较陡直, 移植瘤体积增长与对照组无统计学差异(P>0.05)(Figure 1)。

Table 1 The body weight of nude mice pre-treatment and post-treatment

Group	Pre-treatment (g)	Post-treatment (g)	Change of weight (g)
Control	19.02 $\pm$ 1.75	20.14 $\pm$ 0.34	1.12 $\pm$ 1.89
Low-dose Bevacizumab	18.38 $\pm$ 1.14 [△]	20.80 $\pm$ 1.37 [△]	2.42 $\pm$ 0.89 [△]
High-dose Bevacizumab	18.72 $\pm$ 1.60 [△]	20.34 $\pm$ 0.57 [△]	1.62 $\pm$ 1.49 [△]
Low-dose rhES	16.82 $\pm$ 1.70 [△]	19.14 $\pm$ 2.05 [△]	2.32 $\pm$ 0.99 [△]
High-dose rhES	18.50 $\pm$ 1.08 [△]	20.72 $\pm$ 1.22 [△]	2.22 $\pm$ 1.02 [△]
Low-dose combination	18.26 $\pm$ 1.80 [△]	19.68 $\pm$ 2.26 [△]	1.42 $\pm$ 0.66 [△]
High-dose combination	17.00 $\pm$ 1.22 [△]	19.10 $\pm$ 1.02 [△]	2.10 $\pm$ 1.47 [△]

[△]: compared with control, P>0.05

2.3 贝伐单抗与重组人血管内皮抑素对裸鼠乳腺癌移植瘤重量的影响

实验结束,剥离肿瘤并称移植瘤重量,对照组、低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组、低剂量联合组、高剂量联合组移植瘤重量分别为 $1.504 \pm 0.266\text{g}$ 、 $0.486 \pm 0.050\text{g}$ 、 $0.468 \pm 0.151\text{g}$ 、 $1.338 \pm 0.233\text{g}$ 、 $1.536 \pm 0.835\text{g}$ 、 $0.326 \pm 0.109\text{g}$ 和 $0.312 \pm 0.056\text{g}$,与对照组相比,低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量联合组、高剂量联合组移植瘤重量明显下降 ($P < 0.01$),低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组移植瘤重量与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$) (Figure 2)。高剂量贝伐单抗组与低剂量贝伐单抗组移植瘤重量无显著性差异 ($P > 0.05$),高剂量联合组与低剂量联合组移植瘤重量也无显著性差异 ($P > 0.05$)。与单用贝伐单抗组相比,联合组移植瘤重量有下降,低剂量联合组与低剂量贝伐单抗组存在统计学差异 ($P = 0.018$),高剂量联合组与高剂量贝伐单抗组未达到统计学差异 ($P = 0.062$) (Figure 2)。低剂量贝伐单抗组、高剂量贝伐单抗组、低剂量重组人血管内皮抑素组、高剂量重组人血管内皮抑素组、低剂量联合组、高剂量联合组抑瘤率分别为 67.69%、68.88%、11.04%、-2.13%、78.32% 和 79.26%。

3 讨论

1971年,Folkman^[3]首次提出“肿瘤血管生成”学说,认为实体肿瘤的生长和转移有赖于肿瘤新生血管的生成,并提出通过抑制肿瘤血管生成而抗肿瘤治疗的设想。1996年,Hanahan等^[4]提出“血管生成开关”的概念,认为血管期肿瘤的继续生长必须有新生血管提供氧和营养物质,进一步阐明新生血管与肿瘤细胞生长、浸润和转移有密切的联系。已发现的参与肿瘤新生血管生成的调控因子数目众多,其中

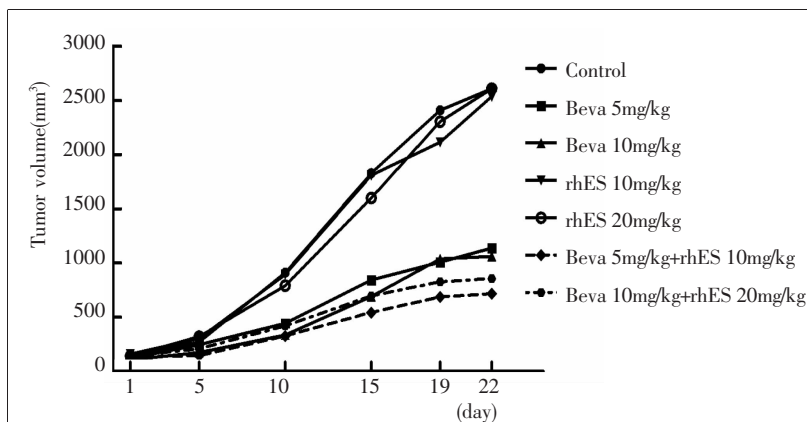


Figure 1 Comparison of tumor growth among different groups

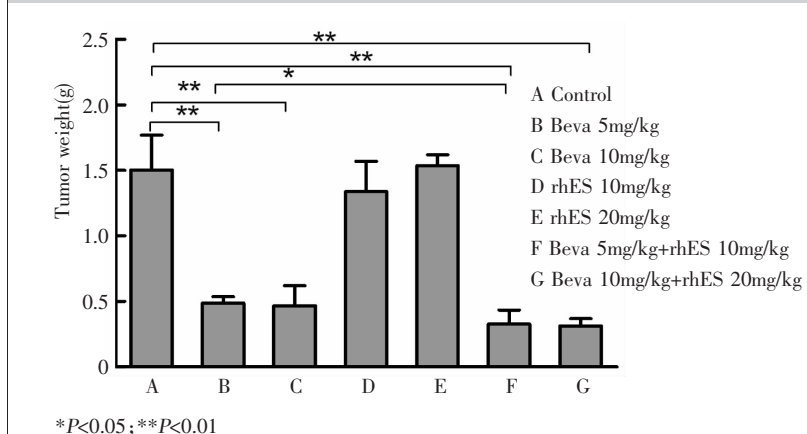


Figure 2 Comparison of tumor weight among different groups

促血管生成因子主要包括血管内皮生长因子、血小板源性生长因子、血管生成素、基质金属蛋白酶等,血管生成抑制因子主要包括内皮抑素、血管抑素、血小板反应素等。VEGF是活性较强的促血管生成因子,可刺激血管内皮细胞增殖迁徙、抑制其凋亡以及调节血管通透性。贝伐单抗作为首个针对VEGF的重组人源化单克隆抗体,主要通过使肿瘤血管退化、抑制血管新生、肿瘤血管正常化等途径抑制肿瘤生长^[5,6]。本实验研究结果显示,与对照组相比,低剂量贝伐单抗组和高剂量贝伐单抗组裸鼠移植瘤生长较缓慢,移植瘤重量明显下降,抑瘤率分别为67.69%和68.88%,提示贝伐单抗对人乳腺癌MCF-7细胞裸鼠移植瘤生长抑制作用明显。一项关于贝伐单抗联合顺铂/吉西他滨一线治疗非鳞癌非小细胞肺癌患者Ⅲ期临床试验显示,7.5mg/kg贝伐单抗与15mg/kg贝伐单抗联合化疗的客观缓解率分别为37.8%和34.6%,疾病进展风险分别降低25%和15%,高剂量

贝伐单抗并没有获得更多的疗效^[7]。本实验中,低剂量贝伐单抗组(5mg/kg)和高剂量贝伐单抗组(10mg/kg)在MCF-7细胞裸鼠移植瘤生长以及抑瘤率均无明显差异,提示贝伐单抗在体内发挥抗肿瘤血管作用可能有一定的剂量范围,过高的剂量并不能进一步提高抗肿瘤效应。

重组人血管内皮抑素是我国学者研发的抗血管生成药物。本研究结果显示,与对照相比,低剂量重组人血管内皮抑素组和高剂量重组人血管内皮抑素组对人乳腺癌MCF-7细胞裸鼠移植瘤生长未见明显抑制作用。赵广章等^[8]报道,单用重组人血管内皮抑素在乳腺癌移植瘤的抑瘤率仅为1.75%,与对照组无显著性差异。肿瘤血管生成机制复杂,涉及多个信号传导通路,单个药物对肿瘤血管生成的抑制作用可能有限,针对不同靶点的多个药物的联合治疗可能较单个药物发挥更大的抗肿瘤效果。Falchook等^[9]报道,26例既往多线化疗的HER2阳性转移性乳腺癌患者接受贝伐单抗联合曲妥珠单抗和拉帕替尼治疗,疾病控制率为50%,毒副反应可耐受。新型多激酶抑制剂索拉非尼不仅能抑制RAF激酶阻断RAF/MEK/ERK信号传导通路而直接抑制细胞增殖,而且能通过抑制VEGFR-2、VEGFR-3、PDGF- β 等受体酪氨酸激酶活性而具有抗血管生成作用。Mina等^[10]在贝伐单抗联合索拉非尼治疗转移性乳腺癌的研究结果显示,18例入组患者,3例获6个月以上SD,中位PFS为2.8个月,研究者认为贝伐单抗联合索拉非尼在转移性乳腺癌的疗效有限,且毒副反应较大。重组人血管内皮抑素能通过多种途径发挥抗肿瘤作用,包括直接诱导内皮细胞凋亡和细胞周期阻滞,抑制内皮细胞增殖和迁徙,以及通过VEGF途径抗肿瘤血管生成。Zhang等^[11]研究发现,重组人血管内皮抑素能下调缺氧诱导因子1(HIF-1)和VEGF表达,增加对肺腺癌放疗的敏感性。Ling等^[12]体内外实验研究表明,重组人血管内皮抑素通过结合VEGFR-2,抑制VEGF诱导的VEGFR-2(KDR/Flk-1)酪氨酸磷酸化以及下游ERK/p38 MAPK/AKT信号的激活,抑制VEGF诱导的人脐静脉血管内皮细胞增殖、迁徙和小管形成。本研究发现,低剂量联合组和高剂量联合组裸鼠移植瘤生长较对照组缓慢,移植瘤重量较对照组明显下降。与单用贝伐单抗组相比,贝伐单抗联合重组人血管内皮

抑素抑瘤率升高。

本研究利用人乳腺癌MCF-7移植瘤裸鼠体内实验发现,贝伐单抗能有效抑制肿瘤生长,不同剂量的贝伐单抗对移植瘤作用无明显差异,贝伐单抗联合重组人血管内皮抑素能进一步提高抗肿瘤作用。贝伐单抗与重组人血管内皮抑素的协同作用及机制,有待于进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Sigel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Chen WQ, Zhang SW, Zheng RS, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2009 [J]. China Cancer, 2013, 22(1): 2-12. [陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国2009年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(1): 2-12.]
- [3] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [4] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [5] Korpanty G, Sullivan LA, Smyth E, et al. Molecular and clinical aspects of targeting the VEGF pathway in tumors [J]. J Oncol, 2010, 2010: 652320-652331.
- [6] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. Science, 2005, 307(5706): 58-62.
- [7] Reck M1, von Pawel J, Zatloukal P, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL) [J]. Ann Oncol, 2010, 21(9): 1804-1809.
- [8] Zhao GZ, Qi XD, Chang ZK. Inhibitory effect of recombinant human endostatin combined with rAd/p53 on graft model of human breast cancer in nude mice [J]. China Oncol, 2007, 17(11): 843-846. [赵广章, 戚晓东, 常志坤. 重组人血管内皮抑素联合重组人p53腺病毒治疗乳腺癌的实验性研究[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(11): 843-846.]
- [9] Falchook GS, Moulder SL, Wheler JJ, et al. Dual HER2 inhibition in combination with anti-VEGF treatment is active in heavily pretreated HER2-positive breast cancer [J]. Ann Oncol, 2013, 24(12): 3004-3011.
- [10] Mina LA, Yu M, Johnson C, et al. A phase II study of combined VEGF inhibitor (bevacizumab+sorafenib) in patients with metastatic breast cancer: Hoosier Oncology Group Study BRE06-109 [J]. Invest New Drugs, 2013, 31(5): 1307-1310.
- [11] Zhang L, Ge W, Hu K, et al. Endostar down-regulates HIF-1 and VEGF expression and enhances the radioreponse to human lung adenocarcinoma cancer cells [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 89-95.
- [12] Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 79-84.