

不同剂量贝伐单抗联合伊立替康对荷人结肠癌 DLD-1 裸鼠皮下移植瘤生长的影响

The Effect of Different Doses of Bevacizumab and Irinotecan on Tumor Growth in Nude Mice Bearing Human Colon Cancer DLD-1 // LUO Cong, YING Jie-er, XU Qi, et al.

罗 聪, 应杰儿, 徐 琦, 冯建国, 钟海均, 朱利明, 刘碧霞
(浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 观察不同剂量贝伐单抗与伊立替康联合对人结肠癌裸鼠皮下移植瘤生长及肿瘤血管生成的影响。[方法] 接种人结肠癌 DLD-1 细胞的裸鼠 21 只, 随机分为 4 组: 无菌生理盐水对照组 (A 组), 5mg/kg 贝伐单抗联合伊立替康化疗组 (B 组), 10mg/kg 贝伐单抗联合伊立替康化疗组 (C 组) 和单纯伊立替康化疗组 (D 组) (A、B、C 组每组各 5 只, D 组 6 只, 各组伊立替康剂量均为 66.7mg/kg)。于 $d_{1,5,9}(q4d \times 3)$ 分别给药, 治疗第 10d 处死裸鼠, 观察肿瘤生长情况, 计算抑瘤率, 免疫组化法检测肿瘤组织微血管密度 (MVD), 评价肿瘤坏死情况。[结果] A、B、C、D 组肿瘤体积分别为: $646.24 \pm 397.33 \text{ mm}^3$, $240.11 \pm 147.44 \text{ mm}^3$, $346.21 \pm 298.59 \text{ mm}^3$, $399.11 \pm 254.09 \text{ mm}^3$ 。B、C 两组比较, 肿瘤体积差异未达到统计学意义 ($P=0.208$)。与 A 组比较, B、C、D 组抑瘤率分别为 62.85%、47.91%、39.59%。A、B、C、D 各组微血管密度 (microvessel density, MVD) 分别为 7.000 ± 0.71 、 4.940 ± 0.58 、 5.080 ± 1.25 、 5.557 ± 2.04 , 经 Dunnett t 检验, 与 A 组比, B、C 组肿瘤 MVD 均有显著性差异 (P 值分别为 0.028、0.039), 而 D 组与 A 组, 及 B 组与 C 组在 MVD 表达上差异未达到统计学意义 (P 值分别为 0.086、0.083)。移植瘤组织 HE 染色后发现各组肿瘤组织内均有不同程度的坏死。其中, 对照组多以轻中度坏死为主, 用药后坏死面积均增加, 各组坏死分级经秩和检验, $\chi^2=4.73$, $P=0.193$ 。两两间比较, P 值均大于 0.05, 各治疗组间的坏死差异并不明显。治疗组肿瘤细胞的凋亡较明显。[结论] 不同剂量贝伐单抗联合伊立替康对荷 DLD-1 裸鼠移植瘤有抑制作用, 联合用药有显著协同作用, 推测其作用机制可能与抑制肿瘤微血管形成、诱导细胞凋亡和死亡增加有关。5mg/kg 及 10mg/kg 贝伐单抗对移植瘤体积及 MVD 上的作用差异不显著。

关键词: 贝伐单抗; 伊立替康; 结肠肿瘤; 血管生成抑制剂; 小鼠, 裸

中图分类号: R73-36*1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0042-04

新生血管形成是肿瘤发生、发展和转移的重要基础, 抗血管生成治疗是晚期结肠癌患者的重要治疗策略。而抗血管生成抑制剂贝伐单抗 (bevacizumab, avastin) 联合氟尿嘧啶为主的化疗方案, 是目前转移性结直肠癌一线治疗的主流^[1]。国外多个大规模 I~III 期临床研究显示贝伐单抗安全有效、无剂量限制性毒性, 与化疗联合疗效明显增加而毒性无协同。Hurwitz 等^[2]进行的随机 III 期临床用贝伐单抗联合依立替康/5-氟尿嘧啶/甲酰四氢叶酸钙 (IFL 方案) 一线治疗转移性结直肠癌, IFL 方案+安慰剂组和 IFL 方案+贝伐单抗 [5mg/(kg·2w)] 治疗组的有效率分别为 34.8% 和 44.8% ($P=0.004$), 中位生存期分别为 15.6 和 20.3 个月 ($P<0.001$), 提示 5mg/(kg·2w) 的贝伐单抗明显增加结直肠癌一线化疗方案 IFL 的疗效。E3200^[3] 研究比较了单独应用 FOLFOX4 或联合高剂量贝伐单抗 [10mg/(kg·2w)] 二线治疗进展期结直肠癌患者的疗效, 结果近期疗效分别为 8.6% 和

22.7% ($P<0.0001$), 中位生存期分别为 12.5 和 10.7 个月 ($P=0.0024$), 提示 10mg/(kg·2w) 的贝伐单抗明显增加结直肠癌二线化疗方案 FOLFOX4 的疗效。在这两个临床研究中我们看到两个剂量水平的贝伐单抗均能明显增加结直肠癌患者化疗的疗效, 不良反应主要为高血压、出血、蛋白尿, 但发生率均 $<10\%$, 与剂量无明显关系。因此贝伐单抗的疗效和剂量之间是线性关系还是增加到一定剂量后进入平台期仍需进一步的研究。本实验利用人结肠癌 DLD-1 细胞建立皮下移植瘤裸鼠模型, 观察应用不同剂量贝伐单抗联合伊立替康对肿瘤生长的抑制作用, 并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

贝伐单抗注射液 (瑞士 Roche 公司), 盐酸伊立替康注射液 (美国辉瑞)。RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司), 10% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); CD31

基金项目: 浙江省医药卫生优秀青年科技人才专项基金计划资助 (2008QN004)

收稿日期: 2012-04-17; **修回日期:** 2012-05-15

为 GOAT 来源的抗小鼠多克隆抗体,工作浓度为 1:60(美国 Santa Cruz 公司);人结肠癌 DLD-1 细胞,购于中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养传代。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠荷瘤及实验分组

BALB/c-nu/nu 裸鼠 (浙江中医药大学实验动物中心)21 只,3~4 周龄,雌 10 只,雄 11 只,平均体重 16~20g,饲养于 SPF 级环境中。取对数生长期的 DLD-1 细胞,调整细胞悬液浓度 $5 \times 10^7/\text{ml}$,取 0.2ml 接种于裸鼠腋下。待肿瘤细胞生长半月左右,瘤体长径至 5mm 大小时进行分组实验。随机分 5 组:空白对照组(A 组):0.9%生理盐水;低剂量贝伐单抗联合伊立替康化疗组(B 组):贝伐单抗 5mg/kg+伊立替康 66.7mg/kg;高剂量贝伐单抗联合伊立替康化疗组(C 组):贝伐单抗 10mg/kg+伊立替康 66.7mg/kg;单纯伊立替康化疗组(D 组):伊立替康 66.7mg/kg。最后 A、B、C 组每组各 5 只,D 组 6 只裸鼠。分别于 d_{15,9} 注射,于第 10d 处死裸鼠,取皮下肿瘤。

1.2.2 移植瘤生长观察

用药期间每日测量体重、肿瘤长径和短径,肿瘤体积=长径×短径²/2。实验治疗第 10d 处死动物,剥离肿瘤,测量肿瘤的长径和短径,计算抑瘤率(tumor-inhibition rate, TIR), $TIR = (\text{对照组肿瘤体积} - \text{各处理组肿瘤体积}) / \text{对照组肿瘤体积} \times 100\%$ [4]。

1.2.3 病理组织学观察及坏死分级

常规 HE 病理染色观察,评价移植瘤坏死的程度和范围。按切片内肿瘤组织坏死面积占切片内癌组织面积的百分比将坏死分成 4 个等级,≤25% 为 (+),25%~50% 为 (++) ,50%~75% (+++) ,≥75% 为 (++++)[5]。

1.2.4 肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)

CD31 标记阳性细胞为肿瘤血管内皮细胞,按 Weidner [6] 微血管计数法计算微血管数目。在 200 倍的视野下,每张切片选取 5 个血管密度最高区域内的微血管,共计数 4 张切片,最后取平均数即为 MVD。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

等级资料比较采用秩和检验,两两间比较采用 Mann-Whitney *U* 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠移植瘤的生长观察

治疗结束后,测量瘤体长径和短径,计算肿瘤体积,按照公式计算 TIR, A、B、C、D 组肿瘤体积分别为: $646.24 \pm 397.33 \text{ mm}^3$ 、 $240.11 \pm 147.44 \text{ mm}^3$ 、 $346.21 \pm 298.59 \text{ mm}^3$ 、 $399.11 \pm 254.09 \text{ mm}^3$ 。可见低剂量贝伐单抗联合伊立替康组肿瘤生长抑制最明显。但 B、C 两组比较,肿瘤体积差异未达统计学意义 ($P = 0.208$)。B、C、D 组抑瘤率分别为: 62.85%、47.91%、39.59% (Figure 1)。

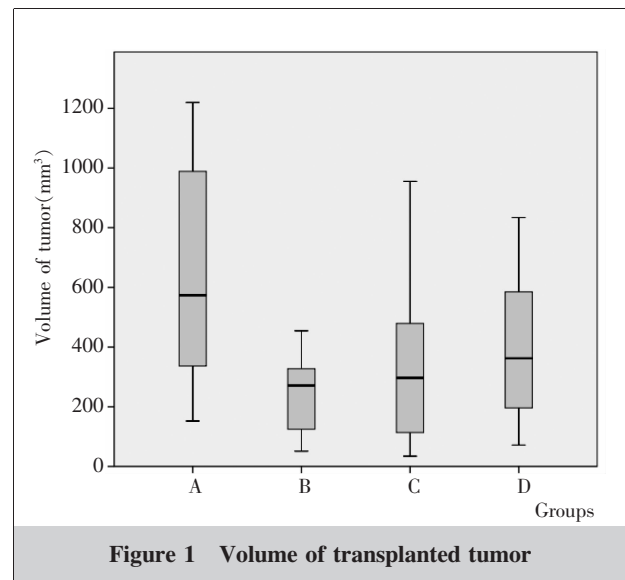


Figure 1 Volume of transplanted tumor

2.2 移植瘤组织的病理学观察

病理学观察:移植瘤质地细嫩,剖面呈鱼肉状。对照组肿瘤细胞弥漫分布,肉瘤样排列,细胞核大深染,核分裂相易见,坏死组织少见,在移植瘤的周边和瘤内可见较多丰富的扩张血管;治疗组肿瘤细胞相对稀疏,坏死组织多见,肿瘤细胞的凋亡较明显(HE 染色下细胞核染色质浓缩,碎裂,空泡形成),部分组别的移植瘤样本坏死严重,仅在移植瘤的边缘见少量的肿瘤细胞。各治疗组间的坏死差异并不明显。HE 染色后发现各组肿瘤组织内均有不同程度的坏死(Figure 2)。其中,对照组 A 组多以轻中度坏死为主:(+)2 只,(++)2 只,(+++)1 只。用药后坏死

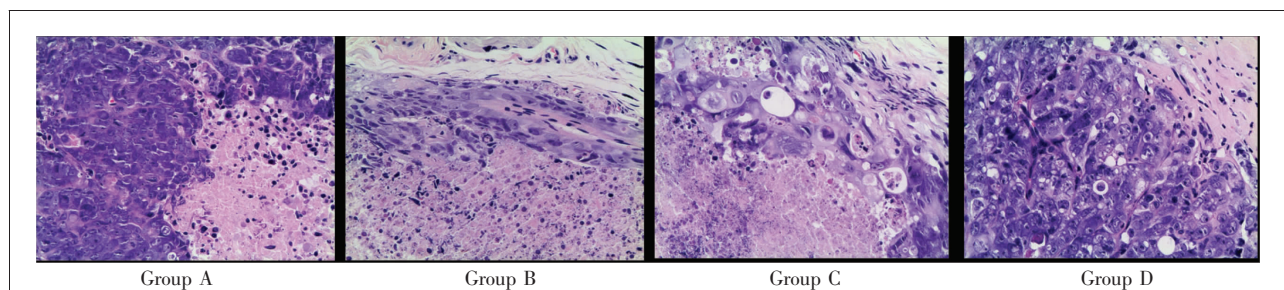


Figure 2 Necrosis and apoptosis of transplanted tumors in 4 groups (×200)

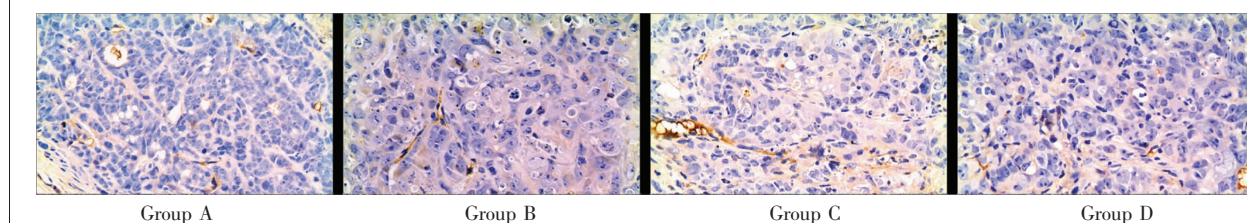


Figure 3 MVD of transplanted tumors in 4 groups (×200)

面积均增加, B组:(+)1只,(++)2只,(+++)1只,(+++++)1只; C组:(+)1只,(++)1只,(+++)1只,(+++++)2只; D组:(+)1只,(++)3只,(+++)2只。等级资料秩和检验结果: $\chi^2=4.73, P=0.193$ 。两两间比较采用Mann-Whitney U 秩和检验, P 值均大于0.05。

2.3 细胞 MVD

CD31 阳性产物呈黄褐色, 定位于血管内皮细胞质。A、B、C、D 组各组的微血管数分别为: 7.00、4.94、5.08、5.56。经 Dunnett t 检验, 与对照组 A 组相比, 使用贝伐单抗的 B、C 组 MVD 均有显著性差异 (P 值分别为 0.028、0.039), 而单用化疗的 D 组与 A 组无统计学差异 (P 值为 0.086) (Figure 3, 4)。

3 讨论

肿瘤血管形成与生理情况下不同, 实体瘤中血管形成不受严格控制, 导致无限制生长^[7,8]。各种分子刺激(如缺氧、酸中毒、致癌信号、生长因子、性激素、细胞因子等)均能诱导实体瘤新血管的形成。这些刺激主要是为了丰富肿瘤的血供, 以确保肿瘤的持续生长, 但这种过度的刺激下生成的血管与正常组织的血管网相比, 结构是高度异常的^[9]。这些杂乱无章的肿瘤血管不仅防止了化疗药物传递到细胞无法靠近肿瘤血管, 并且血管的血浆渗漏性增加肿瘤

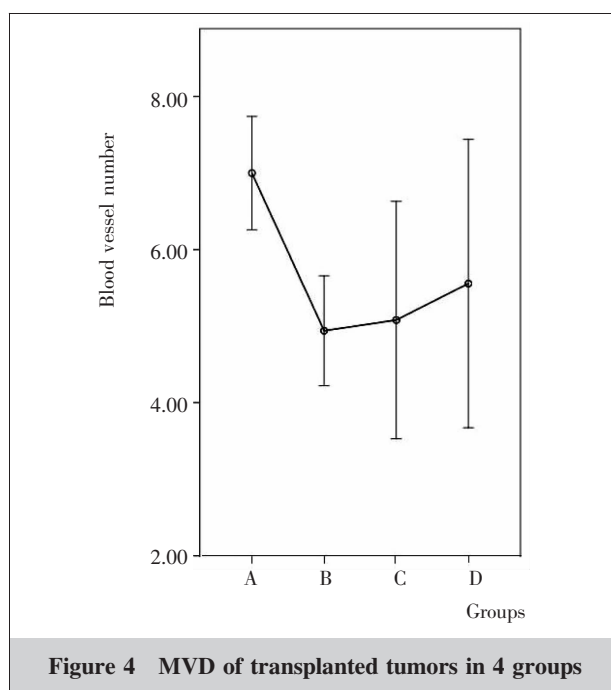


Figure 4 MVD of transplanted tumors in 4 groups

内的压力能进一步减少药物渗透到肿瘤组织的能力。贝伐单抗能与 VEGF-A 结合, 阻止其与 VEGFR 相互作用, 起到抗血管形成的作用, 进而抑制肿瘤生长^[10,11]。这一效应是多方面的, 包括使肿瘤血管退化、使肿瘤血管正常化和抑制血管新生等。I 期研究显示, 直肠癌患者接受贝伐单抗单次注射后 12 d, 即可出现微血管密度显著降低。Dani 等^[12]用 10mg/kg 的

贝伐单抗治疗直肠癌细胞移植瘤,与生理盐水对照组相比,贝伐单抗治疗后第5d组织间隙液体压力明显降低,从而增加肿瘤细胞对化疗药物的摄取。临床前试验显示,贝伐单抗可使肿瘤血管正常化,降低瘤内组织间压,降低血管通透性,有利于化疗药物分布^[13];贝伐单抗的抗VEGF作用可抑制肿瘤血管新生。这些效应使得贝伐单抗治疗可提高化疗疗效,维持疾病稳定、延缓疾病进展,从而延长患者生存。

本研究发现,高、低剂量贝伐单抗与伊立替康联合及伊立替康单药均能显著抑制结肠癌移植瘤的生长,其抑瘤率分别为62.85%、47.91%、39.59%。联合用药能增加伊立替康的抑瘤作用。该结论与Kuroda等^[14]报道的裸鼠原位神经母细胞移植瘤中的研究结论一致,该研究也同样提示贝伐单抗与伊立替康联合抗肿瘤作用较伊立替康单药强。我们的研究中,肿瘤标本病理组织学观察显示,肿瘤细胞坏死、凋亡明显。但各给药组坏死无统计学差别。免疫组化显示使用贝伐单抗的B、C组肿瘤血管密度降低,说明贝伐单抗抑制肿瘤新生血管内皮细胞的增殖和生长,可导致肿瘤局部营养和血供不足,肿瘤细胞生长受抑且发生凋亡。与单纯伊立替康化疗相比,联合贝伐单抗后抑瘤率有所增加,推测贝伐单抗能通过使肿瘤血管正常化,降低瘤内组织间压,降低血管通透性,从而使化疗药物伊立替康能更好到达肿瘤中,协同化疗药物抗肿瘤作用。

本研究对高低剂量的贝伐单抗与伊立替康联合对移植瘤的抑制作用提示,5mg/kg与10mg/kg的贝伐单抗对移植瘤的抑制作用及MVD上的差别未达统计学意义。增加贝伐单抗的剂量并不能使MVD进一步降低,抑瘤率也有所下降。说明贝伐单抗的疗效和剂量之间并非线性关系,而是在体内有最合适的剂量。笔者推测可能与贝伐单抗的作用机制有关。贝伐单抗是抗VEGF人源化单抗,而肿瘤表达VEGF-A在一定的范围,过多的单抗进入体内并不能进一步抑制肿瘤血管的形成,甚至有可能通过与别的配体结合而激活肿瘤内异常的信号传导通路。其作用机制复杂,有待进一步体内研究。

参考文献:

- [1] Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, et al. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer[J]. *Colorectal Dis*, 2012, 14(2):e31-47.
- [2] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(23): 2335-2342.
- [3] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(12): 1539-1544.
- [4] Zhong ZY, Wang D, Qing Y, et al. Studies on the inhibitory effect of bevacizumab on angiogenesis in osteosarcoma and the synergetic effect of bevacizumab with radiotherapy in nude mice [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2009, 34(6):733-736.[仲召阳, 王东, 卿毅, 等. 贝伐单抗抑制骨肉瘤血管生成及与放疗的协同作用研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(6): 733-736.]
- [5] Zhang HQ, Li SY, Fu Y, et al. Clinical and pathological changes of Kang-Lai-Te injection in treatment of primary lung cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 1999, 26(6):477-478.[张海青, 李世业, 付瑜, 等. 康莱特注射液治疗原发性肺癌的临床及病理学观察[J]. *中国肿瘤临床*, 1999, 26(6):477-478.]
- [6] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24):1875-1887.
- [7] Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(7):505-514.
- [8] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [9] Teicher, B.A. Antiangiogenic agents and targets: a perspective[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(1):6-12.
- [10] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [11] Sharma PS, Sharma R, Tyagi T. VEGF/VEGFR pathway inhibitors as anti-angiogenic agents: present and future[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(5):624-653.
- [12] Dani M, Vojnovic N, Newman R, et al. Bevacizumab, a vascular endothelial growth factor (VEGF) specific antibody reduces interstitial fluid pressure (IFP) in human rectal cancer xenograft (HT29) by day 5: is this evidence for rescheduling its timing relative to chemotherapy? [J]. *Clin Oncol*, 2007, 25(18S): 4043.
- [13] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. *Science*, 2005, 307(5706):58-62.
- [14] Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, et al. Antitumor effect of NK012, a 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin incorporating polymeric micelle, on U87MG orthotopic glioblastoma in mice compared with irinotecan hydrochloride in combination with bevacizumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 521-529.