

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.007

· 基础研究 ·

携带 hIFN- γ 的内皮祖细胞增强肿瘤化疗后维持治疗的效果

王 钰¹, 刘广贤², 卓海龙², 白文林¹, 吴 煜¹, 周 霖¹, 楼 敏¹, 曾 珍¹, 常秀娟¹, 徐建明²(1. 解放军第302医院 肿瘤科, 北京 100039; 2. 解放军第307医院 肿瘤科, 北京 100071)

[摘要] 目的: 观察携带 hIFN- γ 基因的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells carrying hIFN- γ , EPC-hIFN- γ) 在肿瘤化疗后维持治疗的效果。方法: LoVo 大肠癌细胞加入喜树碱-11(camptothecin-11, CPT-11), 再分别加入 hIFN- γ 或(和)西妥昔单抗(cetuximab, C225), MTT 法观察其对 LoVo 细胞的抑制作用。荷瘤裸鼠在给予 CPT-11 后, 再给予 EPCs-hIFN- γ 或(和)C225, 观察对肿瘤的抑制作用和对裸鼠生存期的影响。结果: 在体外, 肿瘤细胞中加入 CPT-11 后再加入 hIFN- γ 或(和)C225 可进一步抑制肿瘤细胞的生长。荷瘤裸鼠在给予 CPT-11 50 mg/kg 后, 分别给予 EPCs-hIFN- γ 、C225 或者 EPCs-hIFN- γ + C225, 均可以进一步抑制肿瘤的生长[肿瘤平均体积(2024.28 ± 1048.40) mm³ vs (764.94 ± 720.14) mm³、(233.85 ± 186.97) mm³、(186.95 ± 133.43) mm³、(163.9 ± 173.39) mm³, $P < 0.05$), 均可进一步延长荷瘤裸鼠的生存期(中位生存期 34.2 d vs 39.4 d、44.5 d、48.5 d、51.3 d, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 其中以 CPT-11 + EPCs-hIFN- γ + C225 的治疗效果最好。结论: EPCs-hIFN- γ 用于化疗后维持治疗可以抑制肿瘤细胞生长, 延长荷瘤小鼠的生存。

[关键词] 大肠肿瘤; hIFN- γ ; 内皮祖细胞; 免疫治疗

[中图分类号] R735.3⁺4; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0521-04

Endothelial progenitor cells carrying hIFN- γ enhances efficacy of cancer maintenance therapy after chemotherapy

WANG Hong¹, LIU Guang-xian², ZHUO Hai-long², BAI Wen-lin¹, WU Yu, ZHOU Lin¹, LOU Min¹, ZENG Zhen¹, CHANG Xiu-juan¹, XU Jian-ming²(1. Department of Oncology, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Department of Oncology, No. 307 Hospital of PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the efficacy of endothelial progenitor cells carrying hIFN- γ (EPCs-hIFN- γ) in cancer maintenance therapy after chemotherapy. **Methods:** MTT was used to examine the inhibitory effects of hIFN- γ and/or C225 against colorectal cancer LoVo cells after treatment with CPT-11. The *in vivo* inhibitory effects of EPCs-hIFN- γ and/or C225 on LoVo tumors and their effects on survival of LoVo tumor-bearing nude mice were investigated after mice had been treated with CPT-11. **Results:** *In vitro*, hIFN- γ and/or C225 further inhibited the growth of cancer cells after CPT-11 treatment. *In vivo*, after 50 mg/kg CPT-11 treatment, EPCs-hIFN- γ , C225 and EPCs-hIFN- γ + C225 inhibited the growth of tumors in LoVo tumor-bearing nude mice (mean tumor volumes: [2024.28 ± 1048.40] mm³ vs [764.94 ± 720.14], [233.85 ± 186.97], [186.95 ± 133.43], [163.9 ± 173.39] mm³; $P < 0.05$). EPCs-hIFN- γ , C225 and EPCs-hIFN- γ + C225 treatment also increased the survival of tumor-bearing mice (median survival: 34.2 d vs 39.4, 44.5, 48.5, 51.3 d; $P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** EPC-hIFN- γ can inhibit the tumor growth and prolong the survival of tumor-bearing mice in cancer maintenance therapy after chemotherapy.

[Key words] colorectal neoplasmas, hIFN- γ , endothelial progenitor cell, immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 521-524]

[基金项目] 全军“十一五”科技攻关项目(No. 06G140)。Project supported by “the 11th Five-year Plan” of Key Science and Technology Foundation of PLA(No. 06G140)

[作者简介] 王钰(1971-), 男, 山东省淄博市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事肿瘤的综合治疗研究, E-mail: wanghongd@126.com

[通信作者] 徐建明(XU Jian-Ming, corresponding author), E-mail: jmxu2003@yahoo.com.cn

免疫治疗在抗肿瘤有效后的维持或者手术后的辅助治疗方面更具优势,因为此时的肿瘤负荷较小、肿瘤细胞处于相对静止期,该状态下的免疫治疗能巩固其他治疗的疗效,抑制肿瘤的生长、转移或复发。本课题前期研究^[1]已经证实,携带干扰素基因的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells carrying hIFN- γ , EPC-hIFN- γ)可以靶向性地分布到肿瘤局部,通过肿瘤局部分泌的干扰素抑制肿瘤的生长,延长荷瘤裸鼠的生存。本研究尝试在细胞毒性化疗药物作用后给予 EPC-hIFN- γ , 观察其对裸鼠结肠癌移植瘤维持治疗的效果。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

裸鼠(nu/nu)购自军事医学科学院实验动物中心[动物合格证号为 SCXK(京)2007-0001], 体重 19~21 g, 雌性。人骨髓取自我院健康骨髓捐献者。结肠癌细胞株 LoVo 购自中科院细胞库, 本室传代保存。Ad5-hIFN- γ 购自上海新元生物科技公司, VEGF165 购自 Peptotech 公司, 低糖 DMEM (DMEM-LG) 购自美国 Gibco 公司, 特级胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司, MTT 粉、hIFN- γ 和 DMSO 购自 Sigma 公司, 西妥昔单抗 (cetuximab, C225) 购自 Merck 公司。喜树碱-11 (camptothecin-11, CPT-11) 由德国 Aventis 公司馈赠。

1.2 MTT 法检测 hIFN- γ 和 C225 对 Lovo 细胞活性的影响

取 LoVo 细胞加入 96 孔板, 每孔 $1 \times 10^3/200 \mu\text{l}$, 培养过夜, 肿瘤细胞贴壁后开始实验。实验分组: 第 1 组为空白对照组, 第 2 组为 CPT-11 组 (CPT-11 $1 \mu\text{mol/L}$, 第 1 天), 第 3 组为 CPT-11 + hIFN- γ 组 (CPT-11 $1 \mu\text{mol/L}$, 第 1 天; hIFN- γ 500 IU/ml, 第 2~4 天), 第 4 组为 CPT-11 + C225 组 (CPT-11 $1 \mu\text{mol/L}$, 第 1 天; C225 20 $\mu\text{g/ml}$, 第 2~4 天), 第 5 组为 CPT-11 + hIFN- γ + C225 组 (CPT-11 $1 \mu\text{mol/L}$, 第 1 天; hIFN- γ 500 IU/ml + C225 20 $\mu\text{g/ml}$, 第 2~4 天)。CPT-11 和 C225 浓度参考文献^[2-3]。每组设 6 个平行孔。按照文献所述方法进行 MTT 实验。在加入 hIFN- γ 培养 4 d 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT $10 \mu\text{l}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO $150 \mu\text{l}$, 振荡 10 min, 选波长 492 nm, 用酶标仪检测 D 值。肿瘤细胞的活性以实验组 D 值与对照组 D 值的百分比表示。实验重复 3 次。

1.3 内皮祖细胞的诱导和 Ad5-hIFN- γ 转染

本课题前期研究^[1]中已经证实, 健康捐献者骨

髓在体外用 VEGF 可以诱导出内皮祖细胞 (EPCs)。携带基因的复制缺陷性 5 型腺病毒对 EPCs 的感染效率较高, 可表达携带的基因。因此, 本研究先诱导 EPCs, Ad5-hIFN- γ (MOI = 150) 感染 EPCs, 制备 EPC-hIFN- γ 。

1.4 EPC-hIFN- γ 对裸鼠结肠癌移植瘤的治疗实验

给 50 只 nu/nu 裸鼠肋部皮下注射 LoVo 结肠癌细胞, 每只注射细胞 $1 \times 10^6/200 \mu\text{l}$ 。在注射 8 d 后肿瘤直径约 2 mm 时, 将成瘤的 48 只裸鼠分为 5 个组: 第 1 组为空白对照组 ($n = 9$), 给予 PBS $100 \mu\text{l}$ IV, 1 周 1 次。第 2 组为 CPT-11 组 ($n = 9$), 给予 CPT-11 50 mg/kg IP, 1 周 2 次, 第 1 周。第 3 组为 CPT-11 + EPCs-hIFN- γ 组 ($n = 10$), 给予 CPT-11 50 mg/kg IP, 1 周 2 次, 第 1 周; EPCs-hIFN- γ 1×10^6 IV, 每周 1 次, 第 2~4 周。第 4 组为 CPT-11 + C225 组 ($n = 10$), 给予 CPT-11 50 mg/kg IP, 1 周 2 次, 第 1 周; C225 0.5 mg IP, 1 周 2 次, 第 2~4 周。第 5 组为 CPT-11 + EPCs-hIFN- γ + C225 组 ($n = 10$), 给予 CPT-11 50 mg/kg IP, 1 周 2 次, 第 1 周^[4-5]; EPCs-hIFN- γ 1×10^6 IV, 每周 1 次; 同时 C225 0.5 mg IP, 1 周 2 次, 第 2~4 周。用卡尺每周测量各组小鼠肿瘤的最长径 (a) 和短径 (b), 以 $V = 1/2 ab^2$ 计算肿瘤体积, 并与对照组比较。每只小鼠从治疗开始到死亡的时间记为生存期, 比较各组生存期的差别。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。体外肿瘤细胞活性和体内肿瘤大小的比较用 one-way ANOVA 方法, 荷瘤裸小鼠生存期分析用 Kaplan-meier 处理。 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hIFN- γ 和 C225 对 LoVo 细胞活性的影响

各组 LoVo 细胞与药物培养 4 d 后, MTT 法检测 LoVo 细胞活性。各实验组 LoVo 细胞活性与对照组相比, LoVo 细胞活性均降低 ($P < 0.05$)。与第 1 组 (空白对照组) 相比, 各实验组细胞的存活率分别: 第 2 组 (CPT-11 组) 为 $(92.77 \pm 2.72)\%$; 第 3 组 (CPT-11 + hIFN- γ) 组为 $(82.44 \pm 4.57)\%$; 第 4 组 (CPT-11 + C225) 组为 $(85.16 \pm 2.96)\%$; 第 5 组 (CPT-11 + C225 + hIFN- γ) 组为 $(80.68 \pm 9.14)\%$ 。第 2 组与其他各实验组的细胞存活率也存在统计学差别 ($P < 0.05$), 而第 3、第 4 和第 5 组之间细胞存活率的差别没有统计学意义。

2.2 CPT-11/EPC-hIFN- γ /C225 联合对荷瘤裸鼠肿

瘤的抑制作用

各实验组在给予 CPT-11 50 mg/kg 后,与空白对照组相比移植瘤生长明显减缓,在治疗 1 周末(2 次 CPT-11 50 mg/kg 后),各实验组的移植瘤体积与对照组相比差别有统计学意义($P < 0.05$)。以后各实验组按计划分别给予 EPCs-hIFN- γ 、C225 或者 EPCs-hIFN- γ + C225,每周观察肿瘤的大小。与单纯给予 CPT-11 组相比,给予 EPCs-hIFN- γ 、C225 或者 EPCs-hIFN- γ + C225 组均可以进一步减缓肿瘤的生长。在治疗 4 周后,各组肿瘤的平均体积:第 1 组为($2\,024.28 \pm 1\,048.40$) mm^3 ;第 2 组为(764.94 ± 720.14) mm^3 ;第 3 组为(233.85 ± 186.97) mm^3 ;第 4 组为(186.95 ± 133.43) mm^3 ;第 5 组为(163.9 ± 173.39) mm^3 。统计分析显示,各实验组肿瘤体积与空白对照组相比,差别有统计学意义($P < 0.05$);第 2 组肿瘤体积与第 3、第 4 和第 5 组的差别有统计学意义($P < 0.05$)。第 3、第 4 和第 5 组之间肿瘤体积的差别没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 CPT-11/EPC-hIFN- γ /C225 联合用药对荷瘤裸鼠生存的影响

从每只荷瘤裸鼠治疗开始到死亡的天数记为生存时间。第 1 组的中位生存时间为 34.2 d,95% 可信区间为 32.8 ~ 35.6 d;第 2 组的中位生存时间为 39.4 d,95% 可信区间为 37.1 ~ 41.8 d;第 3 组的中位生存期为 44.5 d,95% 可信区间为 42.9 ~ 46.1 d;第 4 组的中位生存期为 48.5 d,95% 可信区间为 46.5 ~ 50.4 d;第 5 组中位生存期为 51.3 d,95% 可信区间为 49.8 ~ 52.8 d。Kaplan-meier 分析(图 1)显示,各组生存期之间的差别具有统计学意义;两两比较显示,各实验组生存期均比对照组延长($P < 0.01$),第 3、第 4 和第 5 组生存期较第 2 组延长($P < 0.01$),第 4 组和第 5 组生存期较第 3 组延长($P < 0.01$),第 4 组和第 5 组生存期的差别没有统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

目前,很多肿瘤患者就诊时已处于肿瘤晚期。其中的多数患者,尤其对于年老体弱的肿瘤患者,治疗的目标重点是延缓肿瘤的进展,减轻病痛,提高生活质量,延长生命。对于这部分患者,在制定治疗方案的时候,既要考虑控制肿瘤的进展,又要注意保护患者的体能、减轻病痛,让患者与肿瘤能更久的共存。这部分患者在经过数个周期的化疗后,如果病情能够保持稳定,但如再经过后续的强烈化疗,患者体能受损,很难判断持续进行强化疗是否对患者有

益。很多学者提出^[6-10],如果晚期肿瘤患者在数个周期化疗后,病情表现为有效或者稳定,可以尝试应用比较温和的治疗手段,比如分子靶向药物等通过维持治疗来维持疗效,有利于患者体力恢复,提高生活质量。

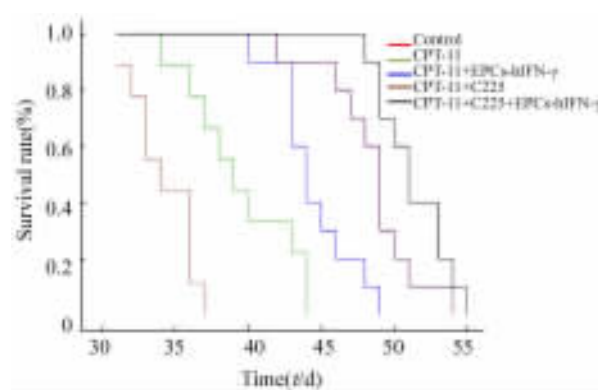


图 1 CPT-11/EPCs-hIFN- γ /C225

联合用药对荷瘤裸鼠生存的影响

Fig. 1 Effect of CPT-11/EPCs-hIFN- γ /C225 on survival of tumor-bearing nude mice

表皮生长因子受体(EGFR)在很多肿瘤细胞高表达,与肿瘤预后相关。西妥昔单抗(cetuximab, C225)可以与 EGFR 紧密结合,阻断生长因子的信号转导,抑制肿瘤细胞增殖。C225 还可以通过抑制 VEGF 生成来抗血管生成,间接抑制肿瘤生长。前期研究^[11]发现,靶向药物吉非替尼联合化疗的作用存在明显的方案依赖性,即化疗起效后序贯给予靶向药物疗效更好。这是因为在化疗结束后,残存肿瘤细胞从静止期进入增殖期,生长因子受体表达升高,这时给予生长因子受体抑制剂会更好地抑制肿瘤细胞增殖。结肠癌 LoVo 细胞的 EGFR 高表达,本研究体外培养的 LoVo 细胞在给予 CPT-11 后,序贯给予 C225,可以提高对肿瘤细胞的抑制效果。在裸鼠的肿瘤模型中,先给予 CPT-11,在肿瘤生长受到抑制后,序贯给予 C225 也更好地抑制了肿瘤生长。进一步观察发现,序贯给予 C225 后,裸鼠的生存期也有明显延长。本研究结果证实,C225 联合 CPT-11 的疗效也是方案依赖性的。

本课题前期研究^[1]证实,静脉注射 EPCs-hIFN- γ 可以靶向分布到肿瘤局部,在肿瘤局部分泌 hIFN- γ ,通过诱导肿瘤细胞凋亡、调节细胞周期、抗增殖作用抑制肿瘤细胞的生长,延长荷瘤裸鼠的生存期。本研究中,与荷瘤裸鼠单纯给予 CPT-11 相比,在给予 CPT-11 后序贯给予 EPCs-hIFN- γ 维持治疗,肿瘤

的生长受到明显抑制, 荷瘤裸鼠的生存期也明显延长, 其联合用药效应与 CPT-11 后序贯给予 C225 组的肿瘤大小和生存都没有统计学差别, 说明 EPCs-hIFN- γ 可以用于肿瘤的维持治疗。本研究进一步研究了给予 CPT-11 后, 联合给予 C225 和 EPCs-hIFN- γ 对肿瘤的影响。结果显示, 两者联合维持治疗组的肿瘤体积最小, 小鼠生存时间最长。但单纯 EPCs-hIFN- γ 维持治疗组和单纯 C225 维持治疗组的肿瘤体积减少和生存时间延长的效果均不是很明显。单纯 EPCs-hIFN- γ 维持治疗的肿瘤抑制作用不强和生存期较短的原因比较复杂, 可能与以下几个因素有关: (1) 输入的 EPCs-hIFN- γ 数量不足, 在肿瘤中产生的 hIFN- γ 未达到最佳抑制浓度; (2) 单纯依靠 hIFN- γ 可能难以有效抑制肿瘤的生长, 只有通过多种细胞因子的共同作用, 改变肿瘤局部的微环境, 对肿瘤的抑制作用才会更好; (3) 每组样本量较小。

本研究用 EPCs 携带 hIFN- γ 基因进行肿瘤的维持治疗, 抑制了肿瘤的生长, 延长了荷瘤裸鼠的生存期, 是肿瘤免疫治疗的良好措施, 值得继续进行深入研究。

[参 考 文 献]

[1] 王 钺, 刘广贤, 徐建明, 宋三泰. 内皮祖细胞作为基因载体肿瘤靶向实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(13): 761-765.

[2] Balin-Gauthier D, Delord JP, Rochemaux P, Mallard V, Thomas F, Hennebelle I, et al. *In vivo* and *in vitro* antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006, 57(6): 709-718.

[3] Allegrini G, Goulette FA, Darnowski JW, Calabresi P, et al. Thrombospondin-1 plus irinotecan: A novel antiangiogenic-chemotherapeutic combination that inhibits the growth of advanced human colon tumor xenografts in mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53(3): 261-266.

[4] Prewett M, Deevi DS, Bassi R, Fan F, Ellis LM, Hicklin DJ, et al. Tumors established with cell lines selected for oxaliplatin resistance respond to oxaliplatin if combined with cetuximab [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 15 (24): 7432-7440.

[5] Kim S, Prichard CN, Younes MN, Yazici YD, Jasser SA, Bekele BN, et al. Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 600-607.

[6] Xu JM, Han Y, Li YM, Zhao CH, Wang Y, Angelo P. Phase II trial of sequential gefitinib after minor response or partial response to chemotherapy in Chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2006, 16(6): 288-233.

[7] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.

[8] Ocvirk J, Brodowicz T, Wrba F, Ciuleanu TE, Kurteva G, Beslija S. Cetuximab plus FOLFOX6 or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer: CECOG trial [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16 (25): 3133-3143.

[9] Cripps C, Winquist E, Devries MC, Stys-Norman D, Gilbert R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer [J]. *Curr Oncol*, 2010, 17(3): 37-48.

[10] Campanella C, Mottolise M, Cianciulli A, Torsello A, Merola R, Sperduti I, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number in 101 advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy plus cetuximab [J]. *J Transl Med*, 2010, 16(8): 36-43.

[11] Xu JM, Azzariti A, Colucci G, Paradiso A. The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines [J]. *Cancer Chem Pharm*, 2003, 52(6): 442-448.

[收稿日期] 2010 - 06 - 20 [修回日期] 2010 - 09 - 01
[本文编辑] 韩 丹

• 读者 • 作者 • 编者 •

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此, 请作者书写统计学符号时注意以下要求: (1) 样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X, 也不用 Mean 或 M; (2) 标准差用英文小写 s , 不用 SD; (3) 标准误用英文小写 s_x , 不用 SE; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊文小写 ν ; (9) 样本数用英文小写 n ; (10) 概率用英文大写 P ; (11) 以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)