

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.011

· 基础研究 ·

bFGF 单抗联合放疗对小鼠 B16 移植瘤的协同抑制作用

曾世彬¹, 徐萌¹, 潘兰红¹, 向军俭², 邓宁², 李丹², 王盼盼²(1. 暨南大学附属第一医院 肿瘤科, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学生命科学院 抗体工程研究中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨碱性成纤维细胞因子单克隆抗体(basic fibroblast growth factor monoclonal antibody, bFGF-mAb)联合放疗对小鼠 B16 移植瘤的抑制效应。方法: 制备并提纯小鼠 bFGF-mAb, 建立荷 B16 黑素瘤小鼠模型并随机分为对照组、放疗组、bFGF-mAb 组及联合治疗组。各组经相应治疗后, 测量移植瘤体积; 治疗 20 d 后处死小鼠, 取移植瘤称瘤质量, 计算抑瘤率。TUNEL 法检测移植瘤细胞凋亡率, 免疫组化检测移植瘤组织 bFGF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达率及肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)。结果: bFGF-mAb 治疗、放疗、联合治疗的抑瘤率分别为 30.49%、12.17% 和 48.76%, 联合治疗组的抑瘤率明显高于其他组($P < 0.05$); 与放疗组比较, 联合治疗组的放射增敏率为 2.37。联合治疗组移植瘤细胞凋亡率较放疗组、bFGF-mAb 组及对照组明显增多[(58.56 ± 6.47)% vs (17.21 ± 2.86)%、(28.45 ± 5.47)%、(10.62 ± 1.73)%; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$], 其 bFGF、VEGF 表达水平下降, MVD 明显减少($P < 0.05$)。结论: bFGF-mAb 联合放疗对 B16 移植瘤具有协同抑瘤效应, 通过降低肿瘤组织 bFGF 和 VEGF 表达、抑制血管新生、促进瘤细胞凋亡提高放疗敏感性。

[关键词] 黑素瘤; 成纤维细胞因子单克隆抗体(bFGF-mAb); 放射治疗; 血管内皮生长因子(VEGF); 肿瘤微血管密度(MVD)

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0175-06

Synergistic inhibitory effects of bFGF monoclonal antibody combined with radiotherapy on B16-transplanted tumors in mice

ZENG Shi-bin¹, XU Meng¹, PAN Lan-hong¹, XIANG Jun-jian², DENG Ning², LI Dan², WANG Pan-pan²(1. Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China; 2. Research Center of Antibody Engineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of basic fibroblast growth factor monoclonal antibody (bFGF-mAb) combined with radiotherapy against B16-transplanted tumors in mice. **Methods:** bFGF-mAb was prepared and purified. B16-transplanted melanoma tumor models were established and the mice were randomly divided into 4 groups: control group, radiotherapy group, bFGF-mAb group, and bFGF-mAb combined with radiotherapy group. Tumor volumes were measured in different treatment groups. Twenty days after treatment, the tumors were collected and weighted, and the inhibitory rates of tumor growth were calculated. TUNEL staining was used to detect the apoptosis rate of transplanted tumors; immunohistochemical method was used to examine the positive expression of bFGF, vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) in transplanted tumor tissues. **Results:** The inhibitory rate of tumor growth in the combined treatment group was significantly higher than those in radiotherapy group and bFGF-mAb treatment group (48.76% vs 12.17%, 30.49%, $P < 0.05$). The radiotherapy sensitization enhancement ratio of the combined treatment group was 2.37 times that in the radiotherapy group. The apoptosis rate of transplanted tumor cells in the combined treatment group was significantly increased compared with those in the control, radiotherapy, bFGF-mAb treatment

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(No. 2009AA022112)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2009AA022112)

[作者简介] 曾世彬(1979-),男,江西省赣州市人,硕士,主要从事肿瘤分子诊治的研究工作。E-mail: zsp2165@tom.com

[通信作者] 徐萌(XU Meng, corresponding author), E-mail: xumengdoctor@yahoo.com

groups ([58.56 ± 6.47]% vs [17.21 ± 2.86]% , [28.45 ± 5.47]% , [10.62 ± 1.73]% ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$) , with bFGF, VEGF expression and MVD being significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** bFGF-mAb combined with radiotherapy have synergistic inhibitory effect on the growth of B16-transplanted melanoma tumors, and it can increase the radio-sensitivity of tumor cells by reducing the expressions of bFGF and VEGF, decreasing angiogenesis, and promoting apoptosis.

[**Key words**] melanoma; bFGF monoclonal antibody(bFGF-mAb); radiotherapy; vascular endothelial growth factor (VEGF); microvessel density(MVD)

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 175-180]

黑素瘤是原发于皮肤的高度恶性肿瘤,是目前发病率增长最快的恶性肿瘤中之一。黑素瘤对大多数化疗药物耐药且抵抗放射治疗,预后欠佳,Ⅲ、Ⅳ期患者5年生存率低于10%。靶向药物联合放、化疗,可以取得较单一治疗更为明显的疗效而备受关注。目前,伊马替尼(imatinib)、索拉非尼(sorafenib)、贝伐单抗(bevacizumab)等靶向药物治疗黑素瘤的Ⅱ期临床试验结果显示患者客观缓解率显著提高^[1-3]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在大多数黑素瘤细胞系中高表达,其具有促进黑素瘤细胞转化、增殖及新生血管形成的作用^[4]。研究^[5]表明,bFGF单克隆抗体(bFGF monoclonal antibody, bFGF-mAb)在体内发挥中和作用,靶向于bFGF/FGFR系统,通过抑制bFGF产生显著的抑瘤效应。本研究旨在将bFGF-mAb的靶向中和作用与放疗的电离辐射作用联合起来,探索两者联合治疗黑素瘤的疗效及其机制。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料

BALB/c 小鼠 16 只,均为雌性;C57BL/6 小鼠 32 只,雌雄各半。小鼠体重约 18~20 g,7~8 周龄,购自南方医科大学实验动物中心(实验动物许可证号:SCXK 粤 2006-0015)。B16 黑素瘤细胞由暨南大学抗体工程研究中心冻存。弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司,Protein G 柱购自美国 GE 公司,VEGF(C-1)(Sc-7269)、FGF-2(Sc-79)、CD31(ZM-0042)抗体、免疫组化试剂盒(PV-6005)、DAB 显色增强剂(ZLI-9032)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(ZK-8004)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。全数字化高能医用电子直线加速器购自德国西门子公司。

1.2 制备和提纯 bFGF-mAb^[6]

弗氏不完全佐剂预免疫 BALB/c 小鼠,0.33 ml/只。复苏、培养本室已建株分泌 bFGF-mAb 杂交瘤细胞,取对数生长期细胞制成 2×10^6 /ml 的细胞

悬液,腹腔注射预免疫 7 d 的小鼠,1 ml/只。注射 bFGF-mAb 杂交瘤细胞 7~12 d 后腹水形成,抽取腹水,经辛酸-硫酸铵初纯化,再以 Protein G 纯化,BCA 法测定 bFGF-mAb 浓度,-20℃ 冻存备用。

1.3 B16 小鼠荷瘤模型的建立

B16 黑素瘤细胞复苏后培养,取对数生长期细胞,用 PBS 液调成 2×10^6 /ml 细胞悬液。取 32 只 C57 BL/6 小鼠,将 0.2 ml/只(即 4×10^5 个)细胞悬液注射于小鼠右下肢根部皮下,观察肿瘤生长情况。待右下肢接种后约 12 d,移植瘤生长至直径 7~8 mm 时分组治疗。

1.4 放疗联合 bFGF-mAb 治疗小鼠 B16 移植瘤

将 32 只荷瘤小鼠随机分为对照组、放射治疗组、bFGF-mAb 治疗组、联合治疗组四组。对照组不作任何处理;bFGF-mAb 组瘤周皮下注射 bFGF-mAb,900 μg/只,每 3 d 注射 1 次,共 3 次;放疗组采用 X 射线照射瘤体,常规分割、单次大剂量放疗;联合治疗组先采用上述 bFGF-mAb 治疗,第 9 天后实施上述放疗。小鼠 X 射线照射野边缘超出肿瘤边缘至少 5 mm。放疗参数:6 MV,X 射线瘤体局部缩野照射源皮距 100 cm,开野 6 cm × 7 cm,1 次/d,5 Gy/次,5 次/周,共 8 次,总剂量 40 Gy^[7]。

1.5 放疗联合 bFGF-mAb 治疗 B16 移植瘤的疗效观察

各组实验小鼠每 2 d 测量移植瘤最大长径 L 和最大横径 W ,瘤体体积 $V = 3/4\pi \times (W/2)^2 \times L/2$,计算各组的瘤体体积,并绘制肿瘤生长曲线。第 20 天处死荷瘤小鼠并剥取瘤体,称瘤质量,计算各组平均瘤质量及抑瘤率。抑瘤率(%) = $(1 - \text{实验组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}) \times 100\%$ 。

1.6 放疗联合 bFGF-mAb 治疗移植瘤的肿瘤生长延迟时间及放射增敏率

放射增敏率(sensitization enhancement ratio, SER)是指肿瘤放射治疗过程用来衡量某种增敏方法效能大小的指标。肿瘤生长延迟时间(tumor growth delay, TGD),指联合治疗组、单纯放疗组肿瘤

体积增长到实验开始的 10 倍所需要时间 D1、D2 与对照组肿瘤增长至同样大小所需时间 D0 的差值。 $SER = \text{联合治疗增敏组 TGD} / \text{放疗组 TGD}$ 。

1.7 TUNEL 法检测 B16 移植瘤组织细胞的凋亡

按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (ZK-8004) 说明书操作,凋亡细胞核将被染成棕黄色。随机选取 10 个高倍镜视野,计数 1 000 个肿瘤细胞中阳性细胞数,计算凋亡率。凋亡率 (%) = (凋亡细胞数/细胞总数) × 100%

1.8 免疫组织化学检测移植瘤组织 VEGF、bFGF 和肿瘤微血管密度 (MVD)

采用 S-P 法进行免疫组化染色。常规切片、脱腊水化、抗原修复、封闭,分别加入兔抗鼠一抗 bFGF、VEGF 单抗 (1:100) 以及兔抗鼠/人 CD31 抗体 (1:200),4 °C 孵育过夜,DAB 显色。同时以 PBS 液取代一抗作阴性对照。

VEGF、bFGF 的判定标准:VEGF、bFGF 以见到肿瘤细胞或间质细胞胞质染黄色至棕色为阳性。在低倍镜 (40 倍) 下选取阳性细胞最密集区,然后在 200 倍视野下计数 1 000 个细胞,计算阳性细胞占肿瘤细胞的百分率;在高倍镜下 (400 倍) 观察细胞染色程度、定位及形态;不着色记为阴性。

MVD 计数标准:CD31 染色标记血管内皮细胞,以见到染黄色至棕色为阳性标准;内皮细胞呈管状、空泡状、小囊状或无管腔条索状记 1 根微血管,计数过程参照 Veidner 评判方法^[9]。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件统计,以 χ^2 检验、方差分析进行统计分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放疗联合 bFGF-mAb 治疗显著抑制 B16 移植瘤的生长

治疗前各组 B16 移植瘤体积无显著性差异。从治疗的第 12 天开始,对照组移植瘤平均体积明显大于 bFGF-mAb 组及联合治疗组,与放疗组比较体积变化不显著;联合治疗组移植瘤比 bFGF-mAb 组及放疗组体积明显缩小 ($P < 0.05$, 图 1)。与对照组比较,联合治疗组、放疗组移植瘤体积增长到实验开始的 10 倍的 TCD 分别为 5.7 d、2.4 d, SER 为 2.37,即联合治疗组的放射治疗敏感性是单独放疗组的 2.37 倍。

治疗第 20 天,与对照组平均瘤质量比较,bFGF-mAb 组、放疗组、联合治疗组的抑瘤率分别为

30.49%、12.17%、48.76%,联合治疗组与 bFGF-mAb 组、放疗组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 2)。结果说明,放疗联合 bFGF-mAb 治疗显著抑制 B16 移植瘤的生长,bFGF-mAb 可提高 B16 移植瘤对放射的敏感性。

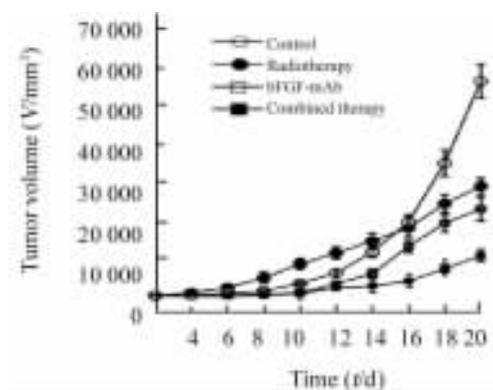


图 1 放疗联合 bFGF-mAb 抑制 B16 移植瘤的生长
Fig. 1 Radiotherapy combined with bFGF-mAb inhibited growth of B16-transplanted tumors

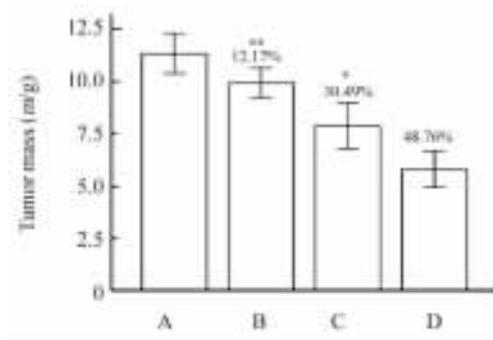


图 2 bFGF-mAb 联合放疗对 B16 移植瘤增殖的抑制
Fig. 2 Radiotherapy combined with bFGF-mAb therapy inhibited proliferation of B16-transplanted tumors

A: Control group; B: Radiotherapy group;
C: bFGF-mAb group; D: Combined group
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs D group

2.2 bFGF-mAb 联合放疗促进 B16 移植瘤细胞的凋亡

TUNEL 法染色镜下可见凋亡细胞明显固缩,核致密、深染,为棕黄色、多叶状或新月状颗粒,多集聚在核周边;非凋亡细胞核呈蓝色 (图 3)。对照组 B16 移植瘤细胞凋亡率为 (10.62 ± 1.73)%、bFGF-mAb 组为 (28.45 ± 5.47)%、放疗组为 (17.21 ± 2.86)%、联合治疗组为 (58.56 ± 6.47)%。联合治疗组较 bFGF-mAb 组及放疗组 B16 移植瘤细胞凋亡明显增加 ($P < 0.05$)。

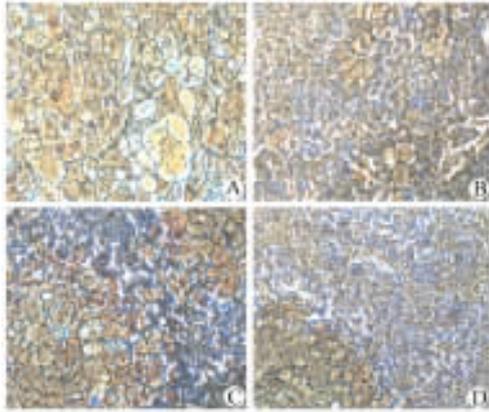


图 3 bFGF-mAb 联合放疗促进 B16 移植瘤细胞凋亡(×400)
 Fig. 3 bFGF-mAb combined with radiotherapy promoted apoptosis of B16-transplanted tumor cells(×400)

A: Control group; B: Radiotherapy group;
 C: bFGF-mAb group; D: Combined group

2.4 bFGF-mAb 联合放疗治疗后 B16 移植瘤组织中 bFGF、VEGF 及 MVD 的变化

结果如图 4 和表 1 所示, B16 移植瘤组织中 VEGF、bFGF 主要表达于胞质, 呈棕黄色的颗粒, 绝大多数细胞表达强度为中等阳性到强阳性。与对照组比较, 放疗组移植瘤组织中 bFGF、VEGF 表达水平下降($P < 0.01$); bFGF-mAb 组 bFGF 表达水平明显下降($P < 0.01$), 而 VEGF 表达水平无明显变化($P > 0.05$); 联合治疗组 bFGF、VEGF 表达水平较其单独治疗组均有显著下降($P < 0.01$)。

CD31 染色血管内皮细胞标记为棕黄色, 显示移植瘤内微血管数量; bFGF-mAb 组血管密度较高; 放疗组次之; 联合治疗组最低, 坏死区所占比例大; 而对照组微血管数量多, 分布最密聚(图 4)。结果提示, 联合治疗可有效抑制 B16 移植瘤的血管生成。

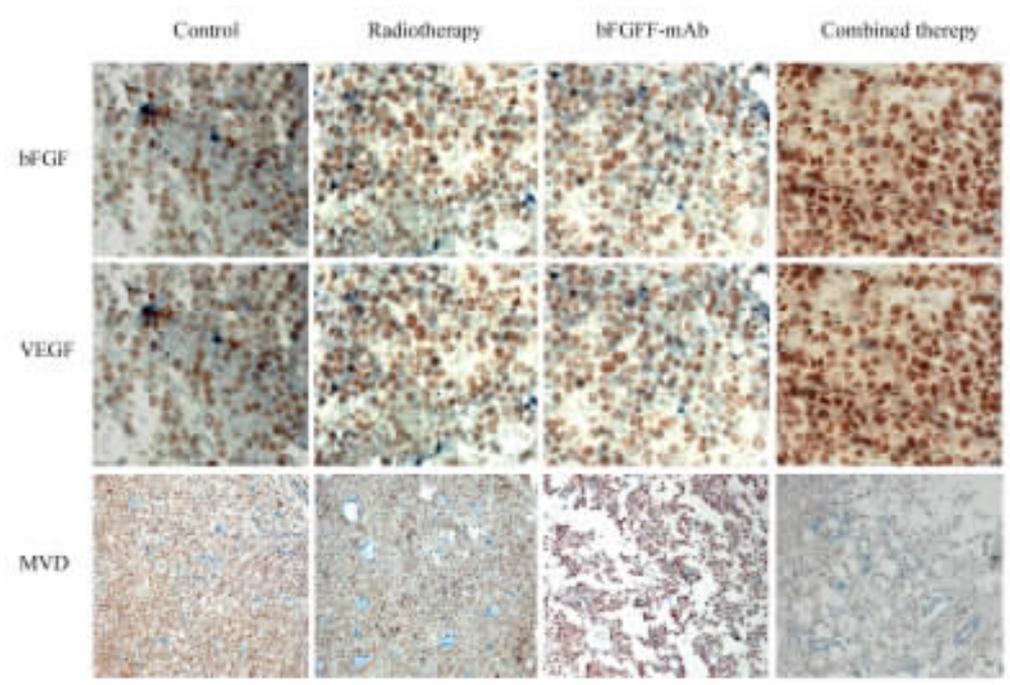


图 4 bFGF-mAb 联合放疗抑制移植瘤组织中 bFGF、VEGF 表达和肿瘤血管生成(S-P, ×200)

Fig. 4 bFGF-mAb combined with radiotherapy inhibited bFGF, VEGF expressions and tumor angiogenesis of B16-transplanted tumors(S-P, ×200)

3 讨论

黑色素瘤恶性程度高, 除早期黑色素瘤患者手术切除可取得一定的疗效外, 中晚期患者放疗、化疗的有效率很低, 患者生存期短。目前国内外联合应用靶向药物治疗黑色素瘤取得了明显疗效^[10-11]。

bFGF 在黑色素瘤细胞中通过旁分泌或自分泌机制高表达, 与 VEGF、PDGF、IL-8 等协同促进肿瘤细胞增殖、转移及新生血管形成^[12-13]。bFGF 与 VEGF 可促进肿瘤血管生成, 两者协同促进血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)增殖、迁移, 并维持血管结构稳定^[14-15]。bFGF 既可直接作用于 VEC,

也可以浓度依赖方式上调 VEC 胞膜 VEGFR 的表达,间接发挥促血管新生的作用^[16-17]。

表 1 各组 B16 移植瘤组织中
bFGF、VEGF 表达率及 MVD

Tab. 1 bFGF and VEGF expression rates and MVD
of B16-transplanted tumors in different groups

Group	bFGF(%)	VEGF(%)	MVD
Control	67.3 ± 9.4**	57.2 ± 7.1**	68.5 ± 17.2**
Radiotherapy	34.3 ± 6.3 ^{△△}	28.5 ± 4.7* ^{△△}	42.8 ± 6.2 ^{△△}
bFGF-mAb	20.6 ± 4.6 ^{△△}	42.3 ± 5.1 ^{△△}	58.5 ± 13.4 ^{△△}
Combined	11.4 ± 2.4	17.5 ± 3.4	24.7 ± 6.5

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs combined group; $\Delta P < 0.05$,
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group

bFGF-mAb 既可中和游离的 bFGF,降低组织中 bFGF 浓度,也可与已经同膜受体结合的 bFGF/FGFR 复合物结合,阻断 bFGF 与其受体的结合及后续细胞信号转导,抑制 bFGF 诱导的肿瘤细胞增殖及新生血管生成^[18]。放射治疗抗肿瘤作用机制是电离辐射损伤细胞 DNA,促进肿瘤细胞及 VEC 凋亡^[19-20]。黑素瘤对放射治疗抵抗的分子机制是高表达的 bFGF、VEGF 等细胞因子能增强电离辐射损伤的修复作用,而中和 bFGF 能抑制 bFGF 诱导的 VEC 增殖,增强电离辐射促 VEC 凋亡作用^[21]。

本实验中 bFGF-mAb 治疗组通过瘤周皮下注射 bFGF-mAb 给药,在体内持续发挥中和瘤内 bFGF 的作用,阻断其与 bFGFR 结合,使 bFGF 无法发挥促进血管新生及肿瘤生长的作用,因而产生较高的抑瘤效应(30.49%)。放疗组采用大剂量分割放疗,总剂量达 40 Gy,治疗后瘤内 bFGF 和 VEGF 表达水平虽均下降,但抑瘤率仍较低(12.17%),提示黑素瘤有一定程度的放疗抵抗。联合治疗组采用瘤周皮下注射 bFGF-mAb 持续中和瘤内 bFGF,在此基础上联合应用放疗进一步降低 bFGF、VEGF 等细胞因子表达水平,致瘤内 bFGF 和 VEGF 表达水平较其他实验组均明显降低,增强对 B16 细胞及血管内皮细胞的放疗损伤。免疫组化实验结果证实,联合组移植瘤内新生血管少,MVD 最低,肿瘤处于“饥饿”状态;TENUL 染色显示 B16 移植瘤细胞凋亡最显著,因而产生最显著的抑瘤效应(48.76%),放射增敏率达 2.37。

bFGF-mAb 联合放疗抗血管治疗提高黑素瘤疗效的机制基于以下几方面的病理基础^[21]:(1)大多

数血管生成因子是细胞内放疗抵抗因子;(2)血管内皮细胞对电离辐射的敏感性决定了肿瘤对放疗的敏感性;(3)肿瘤乏氧是放疗抵抗的重要因素;(4)对放疗抵抗的肿瘤干细胞的生长依赖促血管生成因子。因此,bFGF-mAb 与放疗联合应用在 B16 移植瘤小鼠体内产生显著协同抑瘤效应的机制为两者联合应用有效地降低了移植瘤内 bFGF、VEGF 的表达,抑制肿瘤血管新生,促进瘤细胞凋亡,提高了对放射治疗的敏感性。bFGF-mAb 和放疗协同的分子机制,特别是其与黑素瘤乏氧状况及干细胞变化的关系值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Mc Dermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, et al. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: A report from the 11715 study group [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(13): 2178-2185.
- [2] Kim KB, Eton O, Davis DW, et al. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(5): 734-740.
- [3] Vihinen PP, Hernberg M, Vuoristo MS, et al. A phase II trial of bevacizumab with dacarbazine and daily low-dose interferon-alpha 2a as first line treatment in metastatic melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2010, 20(4): 318-325.
- [4] Okada Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(3): 263-267.
- [5] Li D, Wang H, Xiang JJ, et al. Monoclonal antibodies targeting basic fibroblast growth factor inhibit the growth of B16 melanoma *in vivo* and *in vitro* [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(2): 457-463.
- [6] 刘李登,王宏,向军俭,等. bFGF 单抗与顺铂体外联合抑制黑素瘤 B16 细胞增殖效应的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(1):1-4.
- [7] Strojjan P. Role of radiotherapy in melanoma management [J]. *Radiol Oncol*, 2010, 44(1): 1-12.
- [8] 崔念基,卢泰祥,邓小武,等. 实用临床放射肿瘤学 [M]. 广州:中山大学出版社,2005:176.
- [9] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [10] Queirolo P, Acquati M. Targeted therapies in melanoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(7): 524-531.
- [11] 王运良,任秀宝. 恶性黑素瘤的靶向治疗 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2009, 36(2): 149-151.
- [12] Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, et al. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma [J]. *Cytokine*, 2000, 12(6): 547-554.
- [13] Rofstad EK, Halsor EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17):

- 4932-4938.
- [14] Tsunoda S, Nakamura T, Sakurai H, et al. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(4): 541-548.
- [15] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, 22(4): 201-207.
- [16] Demirkesen C, Büyükpınarbaşı N, Ramazanoglu R, et al. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: A comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor [J]. *Pathology*, 2006, 38(2): 132-137.
- [17] Fontijn D, Bosch LJW, Duyndam MCA, et al. Basic fibroblast growth factor-mediated overexpression of vascular endothelial growth factor in 1F6 human melanoma cells is regulated by activation of PI-3K and p38 MAPK [J]. *Cell Oncol*, 2009, 31(3): 179-190.
- [18] Rusnati M, Presta M. Fibroblast growth factors/ fibroblast growth factor receptors as targets for the development of antiangiogenesis strategies [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(20): 2025-2044.
- [19] Ria R, Portaluri M, Russo F, et al. Serum levels of angiogenic cytokines decrease after antineoplastic radiotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2004, 216(1): 103-107.
- [20] Tsai JH, Makonnen S, Feldman M, et al. Ionizing radiation inhibits tumor neovascularization by inducing ineffective angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(12): 1395-1400.
- [21] Moyal ECJ. Optimizing antiangiogenic strategies: Combining with radiotherapy [J]. *Targ Oncol*, 2008, 3(1): 51-56.
- [收稿日期] 2010-11-25 [修回日期] 2011-01-18
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

CD44 变异体通过稳定 xc^- 系统的 xCT 亚基调节细胞的氧化还原状态来促进肿瘤细胞的生长

CD44 是针对胞外基质的主要黏附分子,功能涉及淋巴细胞归巢、活化、肿瘤侵袭和转移以及调控 T 细胞应答等。已往研究将其作为肿瘤干细胞的分选标志,揭示 CD44 具有新的功能。由于转录后 mRNA 的剪接,CD44 分子有多种亚型表达,其中 CD44 标准体主要表达在造血细胞和正常上皮,而 CD44 变异体在上皮型肿瘤近膜端的胞外区大量插入表达,其与肿瘤功能的相关性还未知。作者前期研究已经指出 CD44 变异体在小鼠胃肠道肿瘤中是有差异性表达的,尤其在高增殖细胞和在低周期循环的干细胞上大量表达,而在分化程度高的胃肠肿瘤细胞上是不表达的。鉴于此,CD44 在肿瘤的发生、维持以及迁移中有可能发挥作用。

此外,研究表明肿瘤干细胞内含有的活性氧含量低于其他肿瘤细胞,从而对活性氧介导的损伤有较好的抵抗。而肿瘤干细胞内高水平的还原性谷胱甘肽提高了对抗肿瘤药物的抗性和促进了肿瘤的生长。 xc^- 系统是胱氨酸-谷氨酸转运子,胞内半胱氨酸的含量很大程度由该转运子功能所决定。该转运子的轻链亚基 xCT 赋予该转运子底物特异性,从而使得该转运子能够摄取胞外的胱氨酸用于胞内的还原性谷胱甘肽的合成,对于胞内氧化还原状态的平衡起着重要作用。在 xCT 亚基缺陷的情况下,即使低水平的氧化应激也会引起 p38MAPK 信号通路的活化。一些肿瘤中,xCT 亚基涉及到肿瘤细胞的增殖和多种药物抗性。因此,作者试图研究 CD44 变异体调节 xCT 亚基介导的胱氨酸转运来调控肿瘤胞内氧化还原状态的功能及相关机制。

作者采用 5 株 CD44 表达量有所差异的人胃肠道肿瘤细胞系(HCT116、HT29、KATO III 高表达 CD44、MKN28、AGS 不表达或者低表达 CD44)及胃肠道肿瘤转基因小鼠模型 Gan mice 作为研究对象,其中 Gan mice 小鼠 Wnt 信号通路及前列腺素 E2 信号通路是活化的,能形成大且分化良好(肠型)的胃肠肿瘤,生存期为 30~50 周。通过活性氧探针 DCFH-DA、流式细胞术、免疫组化、共聚焦激光扫描显微镜技术、RT-PCR、cDNA 微阵列分析、蛋白印迹法、RNA 干扰技术、BrdU 法等检测,发现 CD44 变异体与细胞膜表面的谷氨酸-胱氨酸转运子 xCT 亚基相互作用并增加其稳定性,从而控制胞内还原性谷胱甘肽的含量。

作者阐明了 CD44 变异体能够与胱氨酸转运子相互作用稳定其表达,从而调节胞内还原性谷胱甘肽的含量,消除了 p38MAPK-p21CIP1/WAF1 途径介导的生长抑制效应,促进胃肠肿瘤干细胞对氧化应激的抵抗,并且不依赖抗氧化基因表达,从而能抵抗放疗化疗等常规的临床治疗手段。作为肿瘤干细胞的表面标志,CD44 能够起到保护肿瘤干细胞免受肿瘤微环境中高浓度的活性氧的损伤,促进其增殖。

[蒋正平 摘译,韩岩梅 审阅. Shimoto T, Nagano O, Yae T, et al. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 387-400.]