

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.016

· 短篇论著 ·

贝伐单抗抑制人非小细胞肺癌 A549-luc 细胞裸鼠移植瘤的生长及浸润

Bevacizumab inhibits growth and invasion of A549-luc human NSCLC xenograft in nude mice

李煜姝¹, 郭彩玲², 温良鹤¹, 徐玉清¹ (1. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 肿瘤内科, 黑龙江 哈尔滨, 150086; 2. 哈尔滨医科大学微生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨, 150086)

[摘要] **目的:**探讨贝伐单抗(bevacizumab)对人非小细胞肺癌 A549-luc 细胞小鼠移植瘤生长、浸润的影响。**方法:**将稳定表达荧光素酶的人肺癌细胞系 A549-Luc 接种于裸鼠皮下,成瘤后随机分为对照组、低剂量贝伐单抗组及高剂量贝伐单抗组。对移植瘤进行生物发光成像,并与体积测量结果拟合;检测移植瘤质量和体积,计算贝伐单抗的抑瘤率。**结果:**生物发光成像观察结果显示,贝伐单抗组移植瘤发光区域和荧光强度较对照组均显著降低,且荧光高峰值出现较晚,高剂量贝伐单抗组的抑制效果更为显著。随着治疗时间的延长,贝伐单抗组移植瘤体积增长速度小于对照组($P < 0.05$),高剂量贝伐单抗组移植瘤体积缩小更为显著($P < 0.05$)。贝伐单抗组移植瘤细胞浸润程度和对肺组织的破坏程度均低于对照组,高剂量贝伐单抗组抑瘤率为 77.3%,高于低剂量组的 52.3%($P < 0.05$)。**结论:**贝伐单抗可以有效抑制活体内非小细胞肺癌 A549-luc 细胞移植瘤的生长和浸润。

[关键词] 生物发光成像技术;贝伐单抗;非小细胞肺癌;肿瘤浸润

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0543-04

贝伐单抗(bevacizumab)作为首个抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的抗血管生成药物,在非小细胞肺癌等恶性肿瘤分子靶向治疗中具有可靠的疗效性和安全性。相关研究^[1]表明,贝伐单抗可以通过对肿瘤血管的作用间接抑制肿瘤的生长及转移,但其作用机制、毒副作用、最佳用药剂量及肿瘤细胞对其治疗的抵抗等方面尚未完全明确^[2-3]。人肺腺癌细胞系 A549-Luc 细胞为非小细胞肺癌细胞株,侵袭性高,对化疗敏感性差。本研究以人 A549-Luc 细胞为研究对象,建立了该细胞小鼠皮下移植瘤模型,利用生物发光成像技术(bioluminescence imaging, BLI)对不同剂量贝伐单抗治疗后 A549-Luc 移植瘤在活体内生长、浸润进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

A549-Luc 由本实验室保存^[4],贝伐单抗购于美国罗氏公司(Avastin, Roche),荧光素底物购自北京龙脉得生物技术有限公司。BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号码:SCXK(沪)2007-0005],13~15 g,4 周龄,雄性。

1.2 A549-Luc 皮下移植瘤模型的建立及分组

收集 A549-Luc 细胞,调整密度至 5.5×10^6 /ml,接种于裸鼠双侧近腋部皮下,0.2 ml/只,SPF 环境

饲养。待成瘤后将裸鼠随机分为 3 组,每组 6 只:对照组、低剂量贝伐单抗组(11 mg/kg)及高剂量贝伐单抗组(22 mg/kg),0.1 ml/只,每周 1 次共 3 周。确认成瘤后,用游标卡尺对各组裸鼠肿瘤长径和短径进行测量,每周 2 次。计算肿瘤体积(肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$)。

1.3 A549-Luc 细胞移植瘤生物发光区域及其强度的测量

运用精诺真 IVIS lumina II 成像系统对每只裸鼠进行生物发光成像^[4],运用活体图像软件对 A549-Luc 细胞移植瘤发光区域及强度进行分析,计算绝对光子数,每周 1 次。

1.4 移植瘤及肺组织的病理学观察

A549-Luc 细胞接种裸鼠后 49 d,断颈处死各组裸鼠,称重移植瘤并计算贝伐单抗抑瘤率:抑瘤率(%) = (对照组瘤重 - 实验组瘤重)/对照组瘤重 \times 100%。取移植瘤及肺组织固定、脱水、石蜡包埋、连

[基金项目] 吴阶平医学基金会临床科研专项基金资助(No. 320.6751.1215)。Project supported by the Wu Jie-pin Medical Foundation for Clinical Research (No. 320.6751.1215)

[作者简介] 李煜姝(1985-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,主要从事肿瘤生物治疗方向的研究。E-mail: liyushu318@gmail.com

[通信作者] 徐玉清(XU Yu-qing, corresponding author),E-mail: xyuqing@yahoo.com

续切片及常规 H-E 染色,显微镜下进行病理组织学观察。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计学软件,组间比较采用重复测量的方差分析,两两比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立 A549-Luc 细胞皮下移植瘤模型

A549-Luc 细胞接种裸鼠 21 d 后,所有裸鼠接种部位均出现质地较硬的肿瘤结节,成瘤率为 100%。

2.2 贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤生物发光强度的影响

BLI 观察结果(图 1)显示:7 d 时 A549-Luc 细胞移植瘤组织所在区域即可见生物发光,肿瘤细胞浸润主要集中在发光区域的中心(红色区域)。贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤生长及浸润有抑制作用,发光区域和强度均比对照组降低,并且高剂量贝伐单抗组抑制效果更为显著。成像从开始至观察结束(63 d)均未见远处转移灶。

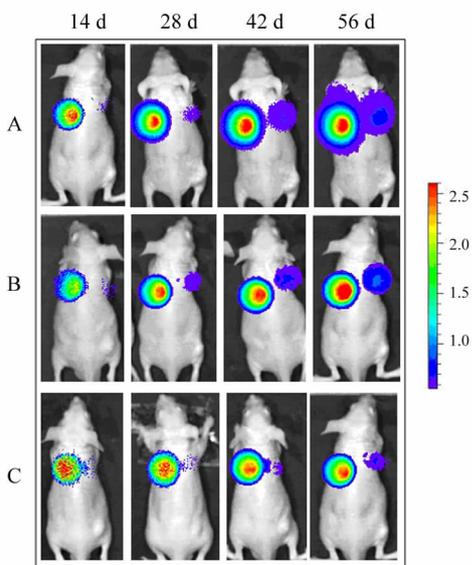


图 1 BLI 观察不同组 A549-Luc 细胞裸鼠移植瘤的生物发光
A:对照组;B:低剂量贝伐单抗组;C:高剂量贝伐单抗组

发光区域荧光强度分析结果显示,各组裸鼠移植瘤生物发光发光区域及区域中心荧光值均随时间延长而逐步增大,且 3 组数值间差异显著($F = 6.351, P = 0.004$)。与对照组相比,贝伐单抗组的荧光值被显著抑制,且高剂量贝伐单抗组抑制效果更明显($F = 2.047, P = 0.056$)。同时,贝伐单抗组荧

光值增长幅度比对照组小,且荧光高峰值出现的时间也延迟。对照组荧光值 28 d 后即呈现出较快的增长趋势,49 d 时达到高峰,数值为($7.17 \times 10^8 \pm 9.80 \times 10^6$);低剂量贝伐单抗组荧光值在 42 d 后才呈现出较大增长趋势,63 d 时达高峰值($7.14 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^7$);高剂量贝伐单抗组数值变化趋势与低剂量贝伐单抗组一致,但峰值最低,为($3.79 \times 10^8 \pm 1.25 \times 10^7$)。

2.3 贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤体积的影响

实验结果显示,从 24 d 开始直到治疗结束后的 3 周内,3 组间 A549-Luc 细胞移植瘤体积均存在差异($F = 6.018, P = 0.000$),其中贝伐单抗组移植瘤体积增长速度明显小于对照组,且高剂量贝伐单抗组对移植瘤体积的抑制更为显著($F = 2.932, P = 0.041$)。

2.4 贝伐单抗对 A549-Luc 细胞裸鼠移植瘤质量的影响

处死各组荷瘤鼠后对肿瘤质量进行称量并计算贝伐单抗抑瘤率,结果显示:贝伐单抗治疗组 A549-Luc 细胞裸鼠移植瘤重量显著下降,且高剂量贝伐单抗组抑瘤率高于低剂量贝伐单抗组($77.3\% vs 52.3\%, F = 8.903, P = 0.000$)。

2.5 贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤细胞生长和浸润的影响

镜下观察可见,对照组 A549-Luc 细胞移植瘤细胞呈弥漫分布,形态不规则,癌组织排列成团状;高倍镜下可以看到肿瘤细胞胞质丰富,细胞核大、深染、畸形,核分裂相易见。高剂量贝伐单抗组和低剂量贝伐单抗组中肿瘤细胞呈团状的癌灶明显减少,肿瘤细胞相对较小,细胞核分布稀疏,着色较浅,并有大量淋巴细胞浸润(图 2)。对照组小鼠肺组织的网状结构有断裂,有大量浸润的癌细胞及淋巴细胞,即将形成癌灶,贝伐单抗组肺组织结构稍不规整,有少量散在的癌细胞及淋巴细胞浸润于正常组织(图 3)。

3 讨论

贝伐单抗可以通过作用于肿瘤血管而抑制肿瘤生长及远处转移^[5],但传统的实验研究大多是通过体积测量和处死实验动物进行肿瘤组织及器官的病理学切片观察。生物发光成像技术可以灵敏地检测到最少 100 个活细胞的生物发光^[6]。本研究利用生物发光成像技术,在不处死实验动物的前提下,成功评价了贝伐单抗对 A549-Luc 细胞在活体内生长、浸润的影响,与传统实验方法相比,其具有更高的灵敏

性、连续性及准确性。

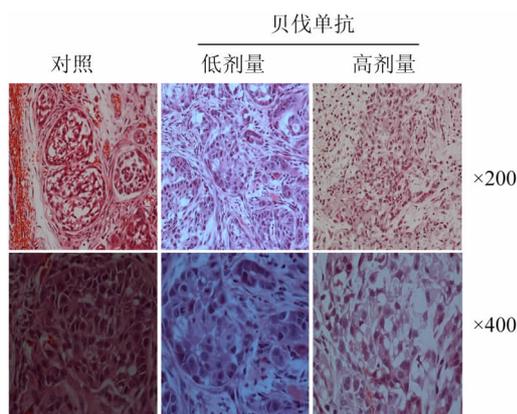


图2 贝伐单抗对 A549-Luc 细胞裸鼠移植瘤组织的影响(H-E)

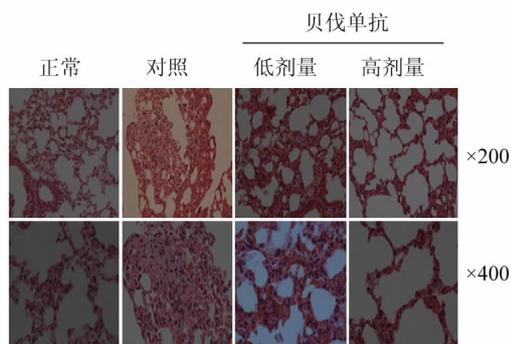


图3 贝伐单抗对 A549-Luc 荷瘤小鼠肺组织的影响(H-E)

对移植瘤细胞生物发光区域及中心荧光值强度的分析表明:在肉眼尚未能观察移植瘤的早期(7 d),BLI 即可以通过生物发光灵敏地检测到肿瘤细胞,因此 BLI 可以作为研究肿瘤细胞早期生物学行为及药物应用的有效手段。同期比较结果显示,贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤在裸鼠体内的生长及浸润有明显的抑制作用,延迟了肿瘤进展时间,22 mg/kg 贝伐单抗组的效果更为显著。分析移植瘤体积与 BLI 所得荧光数据,结果表明:贝伐单抗组特别是高剂量组显著抑制了移植瘤的生长,与 BLI 成像结果一致。二者 49 d 内呈一定的线性关系,这进一步证实了 BLI 观察结果的正确性。与体积测量相比较,BLI 避免了一些非肿瘤细胞组织对测量结果的影响,并可以实现对肿瘤细胞的定量分析,具有更好的准确性。但由于生物发光成像需要 ATP、O₂、荧光素等参与,当肿瘤大于一定程度,坏死,缺氧等复杂环境会影响 BLI 成像^[7]。本研究后期肿瘤体积依然在增长,表面出现了坏死、破溃,荧光值相应呈现出衰减的趋势,原因也在于此。

为进一步证实贝伐单抗对肿瘤细胞生长、浸润的影响,本研究在治疗结束一周后处死各组荷瘤小鼠,对肿瘤组织进行了病理组织学观察。结果表明,对照组肿瘤细胞恶性程度较高,贝伐单抗组,特别是高剂量贝伐单抗组肿瘤细胞浸润程度以及对肺组织的破坏程度均低于对照组。这与 BLI 观察的结果一致,再次证实贝伐单抗对 A549-Luc 细胞移植瘤在活体内生长、浸润有抑制作用。

肿瘤微环境中 VEGF 除作用于血管内皮细胞外,还可与肿瘤细胞上的 VEGFR 结合,激活下游的一系列信号通路而促进肿瘤细胞增殖,抑制其凋亡^[8]。本研究证实:作为 VEGF 的单克隆抗体,贝伐单抗对肿瘤细胞的生长、浸润有抑制作用,分析原因,一是由于贝伐单抗通过抑制肿瘤血管生成,从而减少了氧气及营养物质的输送,抑制了肿瘤的生长;二是通过抑制 VEGF 自分泌途径,抑制了肿瘤细胞的增殖,促进了肿瘤细胞的凋亡。已有研究^[9]证实,贝伐单抗可以通过抑制 VEGF-VEGFR-PI3K/Akt/HIF-1 alpha 信号转导途径,抑制结肠癌细胞的增殖。PI3K/Akt 可以通过调节下游的 Bcl-2、caspase、IKK/NF- κ B、mTOR/HIF-1 等在控制细胞增殖和凋亡方面发挥重要作用,大多数非小细胞肺癌患者的 Akt 表达明显升高,且 VEGF 可以通过激活 PI3K/Akt 通路,促进其侵袭及转移。本研究定量分析了肿瘤细胞在体内的增殖情况,证实贝伐单抗在活体内可以抑制 A549 细胞的增殖和肿瘤生长。A549 细胞自身高表达 VEGF 与 VEGFR^[10],因此,贝伐单抗可能是通过抗 VEGF-VEGFR-PI3K/Akt 信号途径抑制 A549 细胞在活体内的增殖,促进其凋亡,但其具体作用机制有待于进一步探究。

目前临床上贝伐单抗治疗人非小细胞肺癌的标准用药方案为 7.5 mg/kg,q21d。在一项 II 期临床试验显示,高剂量贝伐单抗(10 mg/kg)治疗结直肠癌患者的效果不如低剂量贝伐单抗组(5 mg/kg),产生这种现象的原因尚不明确^[11]。有报道^[12-14]显示,高剂量贝伐单抗可能引起 VEGF 代偿性增加,而高水平的 VEGF 通过自分泌及旁分泌作用途径,可能引起肿瘤对贝伐单抗治疗的抵抗。因此,贝伐单抗的最佳给药剂量及周期有待于进一步研究。以往的动物实验对此没有统一的标准和详细的探讨,本研究中按人和小鼠的等效剂量换算公式^[15]确定,低剂量组给药剂量为高剂量剂量的 1/2,从而探究了不同剂量的贝伐单抗对活体内非小细胞肺癌浸润的影响。结果显示,11 mg/kg 和 22 mg/kg 的贝伐单抗给药,裸鼠均可耐受,并抑制了 A549-Luc 细胞在

活体内的浸润和增殖,且以 22 mg/kg 效果更为显著,此实验结果对于指导临床有参考价值。

本研究成功运用 BLI 技术对 A549-Luc 细胞移植瘤在活体内生长情况进行了直观、定量的分析,结果表明贝伐单抗特别是高剂量(22 mg/kg)贝伐单抗可以显著抑制 A549-Luc 细胞移植瘤在小鼠体内的生长及浸润,为深一步分析肿瘤微环境中贝伐单抗对肿瘤细胞可能的作用及更好地应用于临床治疗非小细胞肺癌提供了实验基础。

[参考文献]

[1] Shih T, Lindley C. Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies [J]. Clin Ther, 2006, 28 (11): 1779-1802.

[2] Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: A meta-analysis [J]. JAMA, 2011, 305(5): 487-494.

[3] Feige JJ. Tumor angiogenesis: Recent progress and remaining challenges [J]. Bull Cancer, 2010, 97(11): 1305-1310.

[4] Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, et al. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different *in vivo* models [J]. Cancer Lett, 2005, 217(2): 243-253.

[5] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy [J]. Nat Med, 2001, 7(9): 987-989.

[6] Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(8): 733-744.

[7] Sarraf-Yazdi S, Mi J, Dewhirst MW, et al. Use of *in vivo* bioluminescence imaging to predict hepatic tumor burden in mice [J]. J Surg Res, 2004, 120(2): 249-255.

[8] Mcgrath-Morrow SA, Cho C, Zhen L, et al. Vascular endothelial

growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(5): 420-427.

[9] Calvani M, Trisciuglio D, Bergamaschi C, et al. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 285-291.

[10] Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, et al. Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and induce cell growth inhibition in non-small cell lung cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 22-30.

[11] Kabbinnar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(1): 60-65.

[12] Kotimaa AA, Zainana AM, Pulkkinen E, et al. Endothelium-specific overexpression of human vascular endothelial growth factor-D in mice leads to increased tumor frequency and a reduced lifespan [J]. J Gene Med, 2012, 14(3): 182-190.

[13] Zhang L, Hannay JA, Liu J, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells: Implications for tumor growth, metastasis, and chemoresistance [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8770-8778.

[14] Hsieh CY, Chen CA, Chou CH, et al. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: Implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis [J]. J Biomed Sci, 2004, 11(2): 249-259.

[15] Chambers SK, Clouser MC, Baker AF, et al. Overexpression of tumor vascular endothelial growth factor A may portend an increased likelihood of progression in a phase II trial of bevacizumab and erlotinib in resistant ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(21): 5320-5328.

[收稿日期] 2012 -06 -23 [修回日期] 2012 -08 -11
[本文编辑] 韩丹,周玲琳

• 读者 • 作者 • 编者 •

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万~10 万,不能写成 5~10 万;3 × 10⁹ 至 5 × 10⁹ 应写成 3 × 10⁹ ~ 5 × 10⁹,或(3~5) × 10⁹,不能写成 3~5 × 10⁹;60% 至 70% 不能写成 60~70%,应写成 60%~70%;25.5 ± 0.5 mg 应写成(25.5 ± 0.5)mg。(5) 带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 4 mm × 2 mm × 3 mm,不能写成 4 × 2 × 3 mm 或 4 × 2 × 3 mm³。

(本刊编辑部)