

Bevacizumab 联合吉西他滨对荷肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

万 骋¹ 崔 斐² 张 苗¹ 罗荣城^{2△}

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院肾内科 江苏 南京 210008 2 南方医科大学南方医院肿瘤中心 广东 广州 510515)

摘要 目的 探讨抗血管生成药物 Bevacizumab 联合吉西他滨对人肝癌裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用。方法 构建人肝癌细胞 HepG2 裸鼠皮下移植瘤模型,随机分为空白对照组、Bevacizumab 组、吉西他滨组和联合用药组。观察用药前后肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线,应用免疫组化检测肿瘤微血管密度(MVD),Western Blot 检测 Bcl-2 蛋白的表达。结果 Bevacizumab 和吉西他滨单药均能抑制肿瘤生长,两药联合疗效明显增强($P=0.000$)。与对照组和吉西他滨组相比,Bevacizumab 组和联合用药组能明显抑制肿瘤血管生成,MVD 值均明显降低,以联合用药组最为明显(P 均 0.000)。Bevacizumab 和吉西他滨单药均能下调 Bcl-2 的表达,两药联合下调作用明显增强。结论 Bevacizumab 联合吉西他滨能增强对人肝癌裸鼠移植瘤的生长及微血管生成的抑制作用,其机制可能与调控 Bcl-2 的表达有关。

关键词 肝细胞癌;Bevacizumab;吉西他滨;微血管密度;Bcl-2

中图分类号 Q95-33,R35.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)10-1865-03

Bevacizumab Combined with Gemcitabine Inhibit the Growth of Hepatocellular Carcinoma Tumor Xenografts in Nude Mice

WAN Cheng¹, CUI Fei², ZHANG Miao¹, LUO Rong-cheng^{2△}

(1 Nephrology Department, Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China;

2 Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Objective: To investigate inhibitory effect of Bevacizumab combined with gemcitabine against HepG2 hepatocellular carcinoma (HCC) tumor xenografts. **Methods:** Established HepG2 HCC xenograft models. Mice were divided into four groups: untreated control group, Bevacizumab treated group, gemcitabine treated group and combination treatment group. Tumor volumes were recorded and microvessel density (MVD) was examined by immunohistochemistry. The expression of Bcl-2 was evaluated by western blot. **Results:** Bevacizumab and gemcitabine alone inhibits the growth of HepG2 HCC tumor xenografts. The efficacy of combination was significantly better than Bevacizumab or gemcitabine administered alone ($P=0.000$). The immunohistochemistry results showed that the MVD were reduced in Bevacizumab group, especially in combination groups ($P=0.000$). In addition, Bevacizumab and gemcitabine alone reduced Bcl-2 expression in tumor tissues, especially in combination groups. **Conclusion:** Bevacizumab combined with gemcitabine can greatly inhibit the growth and angiogenesis of tumor in HCC xenograft models via an inhibition of Bcl-2 expression possibly.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Bevacizumab; Gemcitabine; Microvessel density; Bcl-2

Chinese Library Classification: Q95-33, R35.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1865-03

Bevacizumab(Avastin, Genentech 公司)是一种针对 VEGF 的重组人源化单克隆抗体,现已成为抗肿瘤的重要治疗方法,包括肝细胞癌^[1,2]。近年来很多临床研究表明 Bevacizumab 联合化疗药物后抗肿瘤效果更好,但目前其机制不是很清楚。本研究应用人肝癌细胞 HepG2 裸鼠皮下移植瘤模型,探讨 Bevacizumab 与化疗药物吉西他滨的联合作用及可能机制,旨在为这种新型生物化疗模式的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物

人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海细胞生物学研究

所,常规传代培养。BALB/C 裸鼠购自南方医科大学动物中心,4~6 周龄,雌雄各半,体重 20g 左右。所有裸鼠均于 SPF 条件下分笼饲养。

1.2 主要药物及试剂

Bevacizumab 注射液(Avastin, Roche 公司);盐酸吉西他滨注射液(泽菲,江苏豪森药业);兔抗人 CD34(广州华拓生物公司);PV 二步法免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物公司);Bcl-2 抗体购自美国 cell signal 公司。

1.3 荷瘤裸鼠模型的建立

常规培养人肝癌 HepG2 细胞至对数生长期时,用 0.25% 的胰酶消化并离心收集细胞,用 PBS 制成细胞悬液,调整细胞浓度为 2.5×10^7 /ml。用带 6 号针头的注射器抽取 0.2 ml 人肝癌 HepG2 细胞悬液接种裸鼠,每只裸鼠注射部位为裸鼠右腋下皮部,方便观察,注射肿瘤细胞悬液(0.2 ml/只),含活细胞 5×10^6 /0.2 ml。

1.4 实验分组及给药治疗

作者简介: 万骋(1983-),女,硕士,住院医师,研究方向:肿瘤生物治疗, E-mail: wancheng126@yahoo.com.cn

△通讯作者: 罗荣城,主任医师,博士生导师, E-mail: lrc@nfhoc.com

(收稿日期:2011-10-26 接受日期:2011-11-23)

取已成瘤的 20 只荷瘤裸鼠,按完全随机数表($n=20$)随机科学分组,共分成 4 组,每组 5 只。其中 A 组:空白对照组,予以无菌生理盐水,0.2 ml/只;B 组:Bevacizumab 组,5 mg/kg;C 组:吉西他滨组,100 mg/kg;D 组:Bevacizumab 5 mg/kg+吉西他滨 100 mg/kg 联合组。各组给药均为 2 次/周,共 4 周,腹腔注射。

1.5 观察指标

肿瘤体积(V)的测量:自接种后第 19 天起,每周用游标卡尺测量皮下移植瘤的长径(a)和短径(b),按公式($V=ab^2/2$)计算瘤体积,绘制生长曲线。计算抑瘤率,抑瘤率($\%$)=(1-实验组平均瘤体积/对照组平均瘤体积) $\times 100\%$ 。4 组荷瘤裸鼠连续给药 4 周后停药一周,取出皮下移植瘤。微血管密度(MVD)采用标准 EnVisionTM 法进行免疫组化流程染色,按 Weidner^[3]微血管计数方法计数其微血管量。在 100 倍镜下观察全部视野,选取肿瘤血管密度最高的区域,即“热点”,然后在 400 倍镜下计数 3 个高倍视野内微血管数,计数 3 次,取其平均值作为 MVD 值。

1.6 Western Blot 检测 Bcl-2 蛋白

提取荷人肝癌 HepG2 裸鼠组织蛋白,各组取等量总蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳,并转印到 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的封闭液中封闭特异性抗原,加入封闭液稀释的 HRP-兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体 1:30,4℃孵育过夜。次日 TBST 洗膜,将膜投入 DAB/Nicl 显色液中,显色数分钟,以自来水终止反应。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件行统计学处理。对照组与各治疗组间移植瘤体积比较采用重复测量数据的方差分析;对照组与各治疗组间微血管密度(MVD)的比较采用单因素方差分析(LSD 法)。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 Bevacizumab 联合吉西他滨抑制人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤生长

第 28 天,空白对照组、Bevacizumab 组、吉西他滨组、Bevacizumab+吉西他滨组的移植瘤体积分别为:(1.26 ± 0.34)、(0.72 ± 0.36)、(0.55 ± 0.10)、(0.13 ± 0.05) cm^3 ,各治疗组的抑瘤率分别为 40.35%、45.61%、84.21%。从图 1 可见,各治疗组治疗后体积与对照组相比增长均较缓慢,其中 Bevacizumab+吉西他滨组最为明显。各治疗组与空白对照组比较均有显著性差异(P 值分别为 0.002、0.001、0.000),Bevacizumab+吉西他滨组与 Bevacizumab、吉西他滨组之间均有显著差异(P 值分别为 0.004、0.010)。各治疗组裸鼠均未出现明显毒副反应。因此,Bevacizumab 与吉西他滨均可延缓肿瘤的生长,而且 Bevacizumab 联合吉西他滨可显著增加二者单药的疗效。

2.2 Bevacizumab 联合吉西他滨对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤微血管密度的影响

空白对照组、Bevacizumab 组、吉西他滨组、Bevacizumab+吉西他滨组的 MVD 分别为 29.40 $\pm$ 2.07、18.40 $\pm$ 2.07、28.00 $\pm$ 1.58、12.80 $\pm$ 1.92。与对照组比较,单药吉西他滨组 MVD 无显著差异(P=0.267),单药 Bevacizumab 组及联合吉西他滨组的 MVD 均减少,与对照组比较差异均有统计学意义(P 值均为 0.000);

Bevacizumab 联合吉西他滨组的 MVD 减少较 Bevacizumab 组更为显著,差异有统计学意义(P=0.000)。

2.3 Western Blot 检测 Bcl-2 的表达

结果如图 2 所示,Bcl-2 基因编码分子量为 28KD 的蛋白质,4 组均在分子量为 28KD 处出现特异性反应条带,其中空白组的 Bcl-2 的表达明显强于其余三组的表达,其中以联合组的 Bcl-2 的表达最弱。

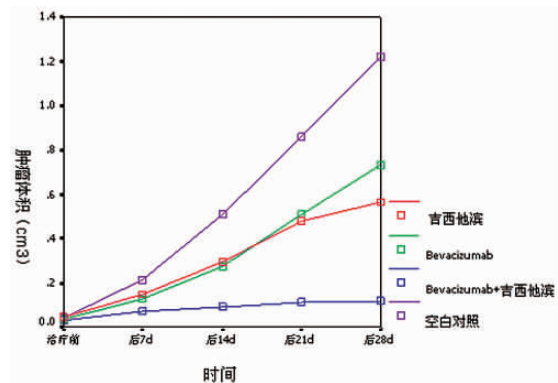
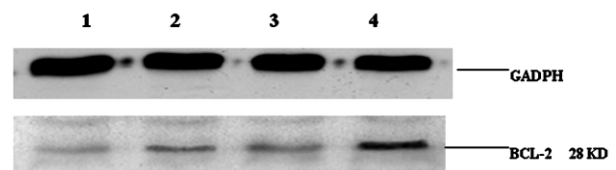


图 1 Bevacizumab 联合吉西他滨对荷人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤生长的影响

Fig.1 Effects of Bevacizumab combined with Gemcitabine on growth of HepG2 cell Xenografts in nude mice



1.联合用药组 2.吉西他滨 3.Bevacizumab 4.空白对照组

图 2 Western Blot 法检测 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 2 Expression of Bcl-2 protein by Western Blot

3 讨论

原发性肝癌(肝细胞癌 HCC)是全世界最具挑战性的恶性肿瘤之一,超过 70%的患者在确诊时已无手术治疗的指征。传统化疗药物对大部分患者疗效差,可能与化疗耐药有关^[4]。Bevacizumab 抗肿瘤治疗已有一定的疗效,而且研究表明 Bevacizumab 可增加传统化疗药物治疗实体瘤的疗效,包括结肠癌和非小细胞肺癌^[5,6]。Xiong YQ^[7]等研究表明 Bevacizumab 联合阿霉素可明显抑制荷肝癌裸鼠移植瘤的生长,减少移植瘤组织的微血管密度(MVD)。吉西他滨治疗肝癌单药有效率在 20% 以下,而一项三期临床实验表明^[2] Bevacizumab 联合吉西他滨和奥沙利铂用于 33 例晚期肝癌,有效率为 20%。

在本研究的动物实验中,Bevacizumab 与吉西他滨均可抑制人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤的生长(P 值分别为 0.002、0.001),但 Bevacizumab 联合吉西他滨可显著增加二者单药时的抑制作用(P 值分别为 0.004、0.010)。本结果充分显示了 Bevacizumab 和吉西他滨联合抑制人肝癌细胞裸鼠移植瘤生长的协同作用。微血管密度(microvessel density, MVD)被认为是一

种反映肿瘤血管生成的重要指标。Bevacizumab 组和联合用药组镜下少见新生血管生成,二组 MVD 与对照组比较显著减少(P 值均为 0.000),且联合用药组的 MVD 较单药 Bevacizumab 组减少更显著($P=0.000$)。这一实验结果也验证了 Bevacizumab 主要是通过抑制新生血管形成而发挥疗效的。当 Bevacizumab 联合化疗药物吉西他滨后,其对移植瘤生长的抑制作用较二者单药时均增强。对此目前提出的理论有:一、过度表达的 VEGF 会产生不规则的、高密度的、高通透性的血管,这会引起肿瘤间流体静压增高,这些不正常的现象都会抑制化疗药物渗透入肿瘤^[8]。而 Bevacizumab 可通过减少大分子 VEGF 的渗透(进而形成的间隙液体压力)而使血管正常化,从而促进化疗药物的灌注^[9]。因此,Bevacizumab 可能促进吉西他滨进入肿瘤内部,从而增强单一疗法对荷肝细胞癌裸鼠的疗效。二、血管生成抑制可造成远离已生成血管的肿瘤细胞的死亡,从而缩小了肿瘤体积,使得化疗药物更容易通过肿瘤组织而发挥作用^[10]。三、最新研究表明^[7],Bevacizumab 可通过抑制抗凋亡蛋白 survivin 的表达而增加肿瘤对化疗药物的敏感性。本研究也对二者联合协同作用进行了初步研究。

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡过程,该过程的紊乱与肿瘤的关系尤为密切。Bcl-2 为抑制凋亡基因,其表达与恶性肿瘤发生发展和生物学行为密切相关^[11,12]。李清龙^[13]等研究发现 Bcl-2 蛋白在肝癌组织中有较高的阳性表达率,同时在不同分化程度的肝癌组织中,Bcl-2 蛋白阳性表达率亦不相同,因此认为 Bcl-2 蛋白的表达可能与肝癌的发生及预后有关。VEGF 在肿瘤组织内除自身高表达外,还能够上调 Bcl-2 的表达,从而保护细胞不因血管生长抑制因子的作用而凋亡。Gerber 等^[14]认为 Bcl-2 基因可能是 VEGF 的靶基因,因而对 VEGF 表达的调控可以间接地调控 Bcl-2 的表达。当生长因子缺乏时,内皮细胞和(或)肿瘤细胞可相继经历程序性细胞死亡(PCD)或凋亡。Harmey^[15]也认为,VEGF 对肿瘤细胞而言还扮演着生存因子的角色(如:诱导 Bcl-2 表达以抑制凋亡)。那么 Bevacizumab 就有可能通过封闭 VEGF 来调控 Bcl-2 及内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡。目前,关于这方面研究的报道较少。而在本研究中,空白组的 Bcl-2 的表达明显强于 Bevacizumab 联合(或)吉西他滨组,而 Bevacizumab 联合吉西他滨组最弱。结果说明,无论化疗药物还是 Bevacizumab,均可以下调 Bcl-2 的表达,而当两药联合时,Bcl-2 的表达下降更为明显,提示两种药物协同作用的机制可能与下调 Bcl-2 蛋白的表达从而促进细胞凋亡有关。

综上所述,Bevacizumab 联合吉西他滨对人肝癌细胞裸鼠移植瘤的生长抑制具有协同作用,其机制可能与细胞凋亡相关,还需进一步深入研究其分子机制,这为抗血管生成药物联合传统化疗药物治疗肝细胞癌提供充分的理论依据,以显示其较好的治疗前景。

参考文献(References)

- [1] Finn RS, Zhu AX. Targeting angiogenesis in hepatocellular carcinoma: focus on VEGF and bevacizumab [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9:503-509
- [2] Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, et al. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24:1898-1903
- [3] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med, 1991, 324(1):1-8
- [4] Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2002, 35:519-524
- [5] 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: 2335-2342
- [6] Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22: 2184-2191
- [7] Xiong YQ, Sun HC, Zhu XDJ, et al. Bevacizumab enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma to adriamycin related to inhibition of survivin expression [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(3): 505-512
- [8] G. Klement, S. Baruchel, J. Rak, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity[J]. J. Clin. Invest, 2000, 105 : 15-R24
- [9] Jain RK, Duda DG, Clark JW, et al. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2006, 3: 24-40
- [10] Satoh H, Ishikawa H, Fujimoto M, et al. Combined effects of TNP-470 and paclitaxel in human non-small cell lung cancer cell lines[J]. Anticancer Res, 1998, 18: 1027-1030
- [11] 刘金洋, 李康华, 廖前德. 骨肉瘤中 BCL-2、Fas 蛋白表达的相关性研究[J]. 医学临床研究, 2006, 23 (4): 581-582
Liu Jin-yang, Li Kang-hua, Liao Qian-de. The study on Bcl-2, Fas protein expression of osteosarcoma [J]. J Clin Res, Sep, 2006, 23 (4): 581-582
- [12] Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma [J]. Acta Oncol, 2000, 39 (2): 151-156
- [13] 李清龙, 李永国, 杨竹林. 慢性肝病及肝癌组织中 Bcl-2 蛋白表达及意义[J]. 医学临床研究, 2007, 9(24): 1501-1503
Li Qing-long, Li Yong-guo, Yang Zhu-lin. Expression and Biological Significances of Bcl-2 Oncoprotein in Chronic Liver Diseases and Hepatocarcinomas[J]. J Clin Res, Sep, 2007, 9(24): 1501-1503
- [14] Langer CJ, Natale RB. The emerging role of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Semin Oncol, 2005, 32(6 Suppl 10): S23-29
- [15] Sandler AB, Gray R, Brahmer J, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NCT004865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial-E4599 [J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2005, 23: 2(Absr-LBA4)