

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.06.015

VEGF 及 EGFR 抑制剂联合放疗对裸鼠鳞状细胞癌增殖的抑制作用

马虹,张盛,董小荣

Therapeutic Efficacy of VEGFR and EGFR Inhibitor Combined with Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma in Nude Mice

Ma Hong,Zhang Sheng,Dong Xiaorong

Department of Oncology,Union Hospital,Tongji Medical College,Huazhong University of Science and Technology,Wuhan 430023,China

Abstract: Objective To evaluate the antitumor efficacy of a combination of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase activity inhibitor—ZD6474 and radiotherapy for human tumor xenograft model (FaDu,squamous cell carcinoma) and to investigate whether the effects of the treatments were related to changes in tumor microvessel density, proliferation and apoptosis. **Methods** Tumor-bearing nude mice received either vehicle or ZD6474 with or without irradiation (4 treatment-groups: control; ZD6474 alone; radiotherapy (RT) alone; ZD6474 + RT). The antitumor efficacy of the different treatment modalities was evaluated by the tumor sizes. For the different treatment-groups the tumor vascularisation was evaluated by immunofluorescence analysis of CD34 positive vessel segments (tumor vascular density) and the proliferative capacity and apoptotic degree of the tumor tissue were analysed by the quantification of Ki67 positive nuclei and capase-3 positive cell. **Results** The tumor growth delay induced by the combined treatment (ZD6474 + RT) was more significant than that induced by ZD6474 or radiotherapy alone. ZD6474 clearly reduced neoangiogenesis. Moreover,proliferative and apoptosis of the tumor tissue was significantly decreased and increased, respectively by ZD6474($P<0.05$). **Conclusion** When irradiation combined with VEGFR and EGFR blockade, significant enhancement of antiangiogenic, antivasular, and antitumor effects were observed. These data provided supports for clinical trials of biologically targeted and conventional therapies in the treatment of cancer.

Key words: Vascular endothelial growth factor; Epidermal growth factor receptor; Radiotherapy; Nude mice model

摘要:目的 探讨 VEGF 及 EGFR 抑制剂 ZD6474 联合放疗抗肿瘤效果,并探讨其对肿瘤微血管生成,细胞增殖及凋亡影响的机制。**方法** 建立裸鼠鳞状细胞癌荷瘤模型,随机均分成 4 组:对照组、放疗组(RT)、ZD6474 组、联合治疗组(ZD6474 + RT)观察肿瘤大体增殖情况,用免疫荧光法检测肿瘤组织 CD34 表达、细胞增殖相关抗原 Ki67,凋亡抗原 capase-3 表达,计数微血管密度(MVD),肿瘤增殖及凋亡。**结果** VEGF 及 EGFR 抑制剂同步联合放疗组相较于单药治疗及单纯放疗明显延迟肿瘤增殖时间,同时通过针对 CD34、Ki67、caspase-3 免疫荧光染色,显示明显减少微血管密度,降低肿瘤增殖、提高细胞凋亡($P<0.05$)。**结论** VEGF 及 EGFR 抑制剂与放疗同步,从机制上抑制肿瘤新生血管形成,抑制肿瘤增殖,从而增进放疗疗效。

关键词: 血管内皮生长因子;表皮生长因子;放疗;裸鼠模型

中图分类号:R73-36⁺2;R730.55 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)06-0676-04

0 引言

相较于正常组织,肿瘤组织内在微循环结构功能呈现异常,表现为大量新生微小血管,并伴随相应增加血流量及氧流量,使肿瘤组织呈现乏氧环境,是放射抗拒原因之一,因此改善肿瘤组织微循环结构,是实现放射增敏途径^[1]。目前研究已发现,靶向

VEGF 及 EGFR,具有抑制肿瘤血管生成作用,与放疗联合具有放射增敏作用^[2]。ZD6474^[3]是一种新型兼具靶向 VEGF 及 EGFR 双通道药物,其与放疗联合效果及机制尚不明确。本研究建立 FaDu 鳞状细胞癌裸鼠荷瘤模型,研究 VEGF 及 EGFR 抑制剂 ZD6474 联合放疗抗肿瘤效果,并从机制上了解对肿瘤微血管生成,细胞增殖及凋亡影响。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗人 Ki-67 单克隆抗体、兔抗人 capase-3 单

收稿日期:2011-07-04;修回日期:2011-10-23

作者单位:430030 武汉,华中科技大学附属同济医科大学协和医院肿瘤中心

作者简介:马虹(1975-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤诊断治疗工作

克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体、*nu/nu* 裸鼠,雌性,共 40 只,8~12 周龄,体重:20~25 g、FaDu 鳞状细胞癌细胞株、ZD6474 均来自德国萨尔大学放射肿瘤实验室。

1.2 实验动物分组及处理

1.2.1 裸鼠鳞状细胞癌荷瘤模型的建立 FaDu 鳞状细胞癌细胞悬浮于含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液,37℃、5%CO₂ 饱和湿度下培养传代维持单层细胞生长,收集培养肿瘤细胞与 RPMI 1640 以 1:1 比例制成瘤细胞悬液,细胞密度约为 2×10⁷/ml,用于动物实验。取 40 只裸鼠,植入前 48 h 给予所有裸鼠单次 4 Gy 全身放疗,抑制排斥反应,以 1 ml 注射器吸取 0.1 ml 相应肿瘤细胞注入小鼠右后腿皮下,观察 5~7 天,待肿瘤直径达 1 cm,进行以下研究。

1.2.2 实验动物分组及用药治疗 将 40 只裸鼠随机分为 4 组:对照组;ZD6474 组(50 mg/(kg·d) 每日一次经灌胃给药);放疗组(RT,2 Gy/d,连续 5 天 d1~5);联合组(ZD6474 + RT:采用常规分割放疗剂量 2 Gy/d,连续 5 天 d1~5;ZD6474 以 50 mg/(kg·d)经灌胃给药,均于每日放疗前 2 h 给予)。治疗期间定期观察裸鼠的生活状态及裸鼠体重变化情况。

1.3 观测指标及方法

1.3.1 肿瘤体积测定 从治疗开始,隔日以卡尺测量获得肿瘤最长径 *L* 及最短径 *W*,依据公式^[4]:肿瘤体积 = (*L* × *W*²)/2 mm³ 记录肿瘤生长时间,体积,待肿瘤达到 2.5 cm³ 时停止,比较所需时间差别。

1.3.2 免疫荧光染色检测肿瘤组织 CD34、Ki67、capase-3 表达 于上述分组治疗完成后 5 天,于每组中随机选择 4 只裸鼠,完整分离肿瘤组织后,用 10%中性甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4 μm,通过荧光标记的 CD34、Ki67、caspase-3 抗体特异性标记,PI 进行核染色,免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜观察组织内 CD34、Ki67、caspase-3 表达。

1.3.3 MVD 测定 CD34 是骨髓祖细胞抗原,同时表达在内皮细胞,近年来已用于监测、诊断肿瘤新生血管^[5]。通过荧光标记显现 CD34 阳性内皮细胞,于 100 倍荧光显微镜下观察,在肿瘤区域选择 4 个血管密集区,随后在 600 倍镜下计数上述 4 个不同区域血管数,取平均值,为该切片 MVD 值^[6]。

1.3.4 细胞增殖测定 增殖抗原 Ki67 能监测除 G₀ 期细胞增殖状态。通过免疫荧光染色显现 Ki-67 阳性肿瘤细胞,计数 500~1 000 个肿瘤细胞 Ki67 阳性肿瘤细胞数,计算 Ki67 指数(Ki67 Labeling index Ki67LI)^[7]。

1.3.5 细胞凋亡测定 通过 caspase-3 免疫荧光染

色标记凋亡,荧光显微镜下,在 100 倍视野下选择阳性细胞分布均匀 5 个区域,计数阳性细胞数,取其平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,定量检测结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间均数比较,两组间比较采用组间 *q* 检验,以 *P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤增殖大体观察评价

于肿瘤细胞植入后 1 周,所有动物均存活,可于裸鼠后腿部触及肿瘤结节,平均直径在 1 cm,依据研究分组治疗。于肿瘤体积达到 2.5 mm³,动物被处死,记录生长所需时间。结果显示,对照组经 28 天达到所需体积,而 ZD6474 组、RT 组及联合组分别需要 40、45 及 49 天,联合治疗组明显延长肿瘤增殖所需时间,见图 1、表 1。

表 1 各实验组肿瘤增殖时间、MVD、Ki67 指数和 caspase-3 阳性细胞表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of days of tumor growth, MVD, Ki67 LI and caspase-3 positive apoptosis cells in groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	Days of tumor growth(d)	MVD	Ki67 LI	caspase-3
Control	27.5 ± 1.2	30.9 ± 1.4	(50 ± 1)%	3.7 ± 0.3
RT	40.0 ± 0.7**	21.6 ± 1.7**	(21 ± 2)%**	5.8 ± 0.3**
ZD6474	45.2 ± 3.0	17.5 ± 2.3	(15 ± 1)%△	5.2 ± 0.3△△
ZD6474 + RT	48.9 ± 2.8	12.5 ± 0.6	(9 ± 1)%	11.5 ± 0.5

Note;the difference between the days of tumor growth,MVD,Ki67 and capase-3 was obvious,*P* < 0.01;comparison between(ZD6474 + RT) and RT;* : *P* < 0.05; * * : *P* < 0.01; comparison between (ZD6474 + RT)and ZD6474;△ : *P* < 0.05;△△ : *P* < 0.01;LI:labeling index;RT:radiotherapy

2.2 肿瘤组织微血管评价

结果显示,对照组每视野下微血管密度(MVD)为(30.9 ± 1.4),RT 及 ZD6474 组均减少 MVD 值,而联合组相较于前二组进一步减少组织新生血管形成,见图 2、表 1。

2.3 肿瘤细胞增殖评价

对照组中肿瘤细胞 Ki67 呈现高表达,Ki67 指数高,细胞增殖活跃;RT 及 ZD6474 组 Ki67 阳性表达减少,细胞增殖受抑制,联合治疗组则 Ki-67 表达相较于前二组明显下降,细胞增殖活性明显受抑,结果见图 3、表 1。

2.4 肿瘤细胞凋亡情况

结果显示,RT 组及 ZD6474 组细胞凋亡数增加,超过对照组;联合治疗组进一步增加细胞凋亡,说明 ZD6474 与放疗同步,增进放疗疗效,结果见图 4、表 1。

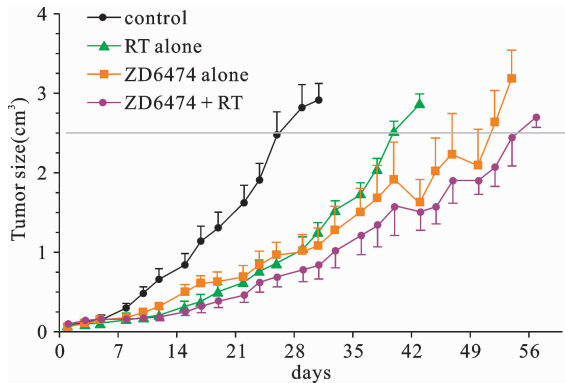


图 1 不同分组治疗下肿瘤体积随时间增殖变化的情况
Figure 1 Growth inhibition of FaDu tumors in nude mice in different treated groups

3 讨论

肿瘤增殖及转移是一个依赖血管生成过程^[8]。早在 1971 年,Folkman^[9]研究发现缺乏充足血供,肿瘤生长体积将低于 2 mm³,而这正是营养物质通过血管向周围组织弥散最大距离,如果需要进一步增殖,则需要新生血管形成,因此提出,抑制肿瘤血管生成在肿瘤发生、发展各个阶段均可有效发挥抗肿瘤作用。

研究已发现,肿瘤组织内在微环境异常及乏氧状态能刺激 VEGF 及 EGFR 表达,VEGF 及其受体家族中 VEGFR-2 在调控肿瘤血管生成中起至关重要作用,是诱导血管新生的正向调控者,VEGF 与其受体 VEGFR-2 结合能刺激血管内皮细胞及内皮祖细胞增殖、迁移、抑制凋亡、促进内皮网状结构形成并诱导血管高渗透性^[10];而 EGFR 则通过其下游 MAPK 信号通路促进多种生长因子如: TGF- α 、TGF- β 、bFGF 等分泌,均进一步促进 VEGF 表达,从而诱导肿瘤血管生成^[11]。因此多项临床研究已显示不论靶向 VEGF/VEGFR 信号系统或 EGFR 信号系统均显示良好抗肿瘤活性。ZD6474 是 VEGF 及 EGFR 双通道抑制剂,能同时抑制 VEGF 及 EGFR 信号转导,在前期临床研究,单药已显示良好抗肿瘤效果。体外研究中,ZD6474 能抑制内皮细胞增殖,同时与放疗联合时能增强内皮细胞放射敏感度^[12]。

目前血管生成抑制剂联合放疗治疗模式有多种,包括血管生成抑制剂先于放疗给予,与放疗同步或是放疗后序贯给予,何为最佳治疗模式尚无定论,多数研究倾向于与放疗同步疗效优于其他两种模式^[13-14]。可能解释在于,阻断 VEGF/VEGFR 信号

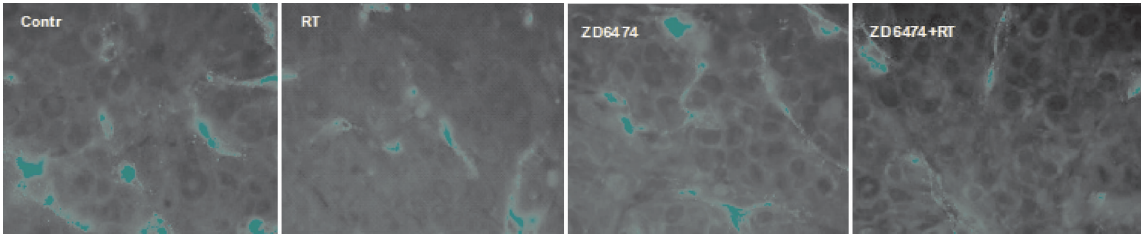


图 2 不同分组治疗干预下肿瘤组织 CD34 表达情况(免疫荧光染色 $\times 600$)
Figure 2 CD34 representative immunostaining as a marker of endothelial cells to analysis of blood vessel(Immunostaining $\times 600$)

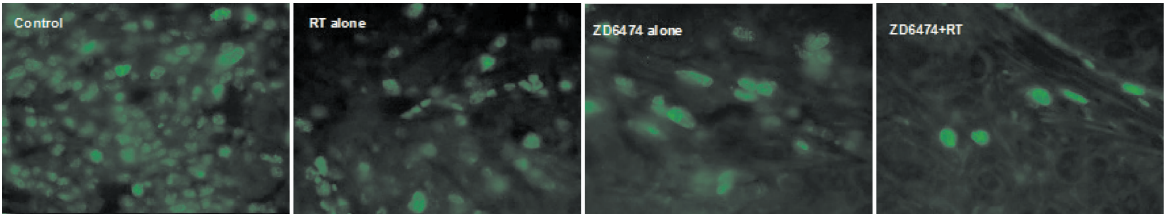


图 3 不同分组治疗干预下肿瘤组织增殖抗原 Ki67 表达情况(免疫荧光染色 $\times 600$)
Figure 3 Representative immunostaining of Ki67 in tumor by different treatment(Immunostaining $\times 600$)

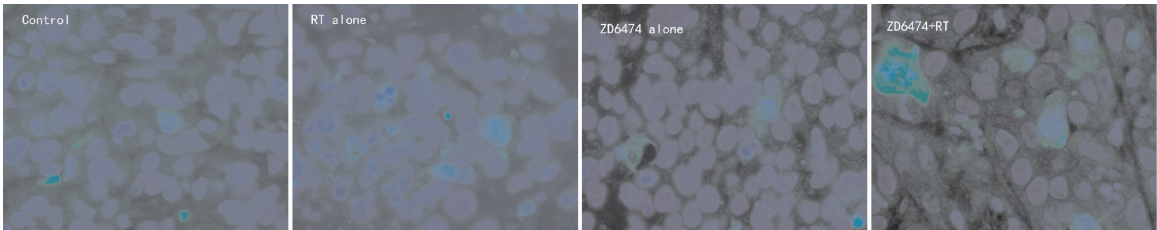


图 4 不同分组治疗干预下肿瘤组织凋亡抗原 caspase-3 表达情况(免疫荧光染色 $\times 600$)
Figure 4 Positive immunostaining for caspase-3 in tumor(Immunostaining $\times 600$)

能导致肿瘤组织内血管结构出现短时正常化,称为窗口期,在此期间内组织氧压、渗透性均得到改善及优化,从而增进放射治疗疗效^[15]。在本研究中,我们建立 FaDu 细胞(鳞状细胞癌)裸鼠肿瘤模型,采用 ZD6474 与放疗同步方式,ZD6474 于每日放疗前 2 小时给予,观察 ZD6474 同步放疗在抑制肿瘤增殖作用。结果显示相较于单药治疗及单纯放疗组,联合治疗组明显延迟肿瘤增殖时间,差别明显。同时通过针对 CD34、Ki67、caspase-3 免疫荧光染色检测组织内微血管密度、增殖及细胞凋亡,结果显示 VEGF 及 EGFR 抑制剂同步联合放疗组相较于单药治疗及单纯放疗明显减少微血管密度,降低肿瘤增殖、提高细胞凋亡,说明 VEGF 及 EGFR 抑制剂与放疗同步联合明显增进放疗疗效。

我们研究显示,VEGF 及 EGFR 抑制剂与放疗联合,特别是与放疗同步,从机制上抑制肿瘤新生血管形成,抑制肿瘤增殖,从而增进放疗疗效,结论与其他研究者结论符合。我们研究为临床常规治疗及生物靶向治疗提供进一步支持。

参考文献:

[1] Scagliotti G, Govindan R. Targeting angiogenesis with multi-targeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Oncologist*, 2010, 15(5):436-46.

[2] Huang SM, Li J, Armstrong EA, et al. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa) [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15):4300-6.

[3] Frederick B, Gustafson D, Bianco C, et al. ZD6474, an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity in combination with radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 64(1):33-7.

[4] Hessel F, Krause M, Helm A, et al. Differentiation status of human squamous cell carcinoma xenografts does not appear to correlate with the repopulation capacity of clonogenic tumour cells during fractionated irradiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80(10):719-27.

[5] Schaerer L, Schmid MH, Mueller B, et al. Angiogenesis in cutaneous lymphoproliferative disorders: microvessel density discriminates between cutaneous B-cell lymphomas and B-cell pseudolymphomas[J]. *Am J Dermatopathol*, 2000, 22(2):140-3.

[6] Sano D, Kawakami M, Fujita K, et al. Antitumor effects of ZD6474 on head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(2):289-95.

[7] Archer CD, Parto M, Smith IE, et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(6):1035-41.

[8] Shikada Y, Yonemitsu Y, Koga T, et al. Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16):7241-8.

[9] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182-6.

[10] Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2):145-7.

[11] Park JS, Qiao L, Su ZZ, et al. Ionizing radiation modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependent pathways[J]. *Oncogene*, 2001, 20(25):3266-80.

[12] Heymach JV. ZD6474 - clinical experience to date[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(Suppl 1):S14-20.

[13] Gustafson DL, Frederick B, Merz AL, et al. Dose scheduling of the dual VEGFR and EGFR tyrosine kinase inhibitor vandetanib (ZD6474, Zactima) in combination with radiotherapy in EGFR-positive and EGFR-null human head and neck tumor xenografts[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(2):179-88.

[14] Siemann DW, Horsman MR. Targeting the tumor vasculature: A strategy to improve radiation therapy[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004, 4(2):321-7.

[15] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. *Science*, 2005, 307(5706):58-62.

[编辑:安 凤;校对:黄园玲]