

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.06.013

多靶点抑制剂联合细胞毒药物治疗恶性胶质瘤的疗效研究

武志^{1*}, 刘建雄²

Experimental Study of Efficacy of Multi-target Inhibitor Combined with Cytotoxic Treatment on Malignant Glioma

WU Zhi^{1*}, LIU Jianxiong²

1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China; 2. Department of Neurosurgery, Gansu Provincial Hospital (*: Present: Department of Neurosurgery, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000)

Corresponding Author: LIU Jianxiong, E-mail: tai_neng@126.com

Abstract: Objective To investigate the influence of multi-target inhibitor vandetanib combined cytotoxic drugs carmustine (BCNU) on the proliferation and invasion of rat glioma cell C6. **Methods** The MTT assay was used to test the impact of drugs on cell viability and changes of cell morphology were observed by HE staining. Rat glioma cell C6 model was established by situ injection, and six days later they were divided into the vandetanib group [50 mg/(kg·d)], BCNU group [25 mg/(kg·d)], the combination group (vandetanib + BCNU) and the control group. Dose the rats 7 times every other day for 2 weeks, then take the rats' brain after the decapitation, section the tumor tissues and calculate the volume of the tumor. Immunohistochemical SP assay was used to mark tumor vascular endothelial cells, and detect the microvessel density (MVD) in transplanted tumors and the expression of MMP1 protein related to tumor invasiveness. Apoptotic index was tested by TUNEL technique. **Results** The combination group was much remarkable to promote the apoptosis than that of the BCNU group ($P<0.01$). Compared with the control group, tumor volumes of the BCNU group decreased by ($P<0.05$) The expression of MMP1 in xenografts was weak positive(++) , and there was no significant change in MVD, but the apoptosis rate of transplanted tumor cells was 62.6% ($P<0.05$). Tumor volume of the combination group was decreased about 56% and the expression of MMP1 was negative(+), and MVD decreased by 53% ($P<0.05$). **Conclusion** The combination therapy can not only significantly inhibit the growth of glioma cell C6, but also decrease the expression of MMP1 related to neoplasm invasiveness. Therefore, it provides experimental basis for the joint multi-target inhibitors and cytotoxic drugs in clinical treatment of malignant glioma.

Key words: C6 rat glioma; Multi-target inhibitors; Cytotoxic drugs; Efficacy studies

摘要: 目的 研究多靶点抑制剂凡德他尼联合卡莫司汀(BCNU)对 C6 鼠胶质瘤增殖及侵袭的影响。**方法** 传代培养 C6 大鼠胶质瘤细胞, MTT 比色法检测药物对细胞活性的影响, HE 染色观察细胞形态的变化。原位注射法建立 C6 大鼠胶质瘤模型, 6 天后分为凡德他尼组、BCNU 组、联合药物组(凡德他尼 + BCNU)及空白组, 隔天给药 7 次, 两周后断头法处死大鼠取脑, 计算肿瘤体积, 做肿瘤组织切片; SP 法标记肿瘤血管内皮细胞, 检测移植瘤中微血管密度(MVD); 检测与肿瘤侵袭性有关的 MMP1 蛋白表达; TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡指数。**结果** 联合药物组促进肿瘤细胞凋亡效果显著高于 BCNU 组 ($P<0.01$)。与空白组比较, BCNU 组移植瘤体积下降了 34.0% ($P<0.05$), 移植瘤中 MMP1 表达为(++) , MVD 无明显变化, 细胞凋亡率为 62.6% ($P<0.05$); 联合药物组移植瘤体积下降了 56.0% ($P<0.05$), 移植瘤中 MMP1 表达阳性(+), MVD 减少了 53% ($P<0.05$), 细胞凋亡率为 82.0% ($P<0.05$)。

收稿日期: 2012-06-28; 修回日期: 2012-09-28
基金项目: 甘肃省科技攻关资助项目(GS02-A49-014-06)

作者单位: 1. 750000 银川, 宁夏医科大学; 2. 甘肃省人民医院神经外科(*: 现工作单位: 730000 兰州, 甘肃省人民医院神经外科)

通信作者: 刘建雄, E-mail: tai_neng@126.com
作者简介: 武志(1984-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事神经外科临床工作及脑胶质瘤的基础与临床研究

结论 联合用药不仅能明显抑制 C6 大鼠胶质瘤细胞移植瘤生长, 还能降低与肿瘤侵袭能力有关的 MMP1 蛋白表达, 这为临床上多靶点抑制剂与细胞毒药物联合治疗恶性胶质瘤提供了实验依据。

关键词: C6 大鼠胶质瘤; 多靶点抑制剂; 细胞毒药物; 疗效研究

中图分类号: R730.264 文献标识码: A

0 引言

脑胶质瘤是一种最常见的颅内肿瘤,尽管近年来在手术、放疗及化疗等方面已经取得了很大进展,但由于肿瘤呈浸润性生长,脑胶质瘤患者总的预后并没有明显改善^[1-2]。近年来多分子靶点联合治疗已成为抗肿瘤研究的热点,并取得了一定疗效。多靶点抑制剂(凡德他尼)虽然可以明显减少肿瘤血管的生成,但不能有效杀伤肿瘤,而抗肿瘤血管生成药物可降低肿瘤耐药性^[3]。卡莫司汀(carmustine,又称 BCNU)是恶性胶质瘤的一线化疗药物,虽然能明显抑制肿瘤细胞,但其不良反应较大,一般不单独应用。因此,两种药物的联合应用可能成为既能显著杀伤肿瘤细胞,又能降低 BCNU 的用量,并减轻不良反应的恶性胶质瘤治疗的理想化疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠 C6 胶质瘤细胞株(宁夏医科大学颅脑实验室冻存);凡德他尼、卡莫司汀(大连美仑公司);DMEM 培养液、胎牛血清(杭州四季青公司);MTT、胰酶(Sigma 公司);Wistar 大鼠(甘肃中医学院动物实验中心);兔抗鼠 CD34 的单克隆抗体、兔抗鼠 MMP1 的多克隆抗体和 HRP 标记羊抗兔 IgG(北京博奥森公司);Tunel 凋亡试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 C6 细胞株在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养,72~96 h 后按 1:3 比例传代,传 3 代后用于实验。

1.2.2 MTT 检测药物对 C6 大鼠胶质瘤细胞活性的影响 C6 细胞以每孔 1×10^4 的浓度接种于 96 孔板,待培养 12 h 贴壁后,凡德他尼组加入 5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4 个浓度的凡德他尼,BCNU 组加入 2.5、5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5 个浓度的 BCNU。联合用药组内同时加入无细胞毒性浓度(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的凡德他尼和上述 5 个浓度的 BCNU,每个浓度 4 孔。对照组不加药。孵育 48 h,随后每孔加入 20 μl MTT(5 mg/ml),避光孵育 4 h,每孔加入 100 μl 的 DMSO,振荡仪上振动 10 min,置酶标仪上 490 nm 波长处测定吸光度值(OD 值),参考波长为 630 nm。细胞生长抑制率 = $(1 - \text{实验组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 建立 C6 大鼠胶质瘤模型^[4] 雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 200~300 g,用 10% 水合氯醛(0.4 ml/100 g 体质量,腹腔注射麻醉);固定于立体定向仪上,沿中缝略偏右纵向切开头皮,暴露颅骨标

志,牙钻钻开颅骨,用微量注射器向右侧基底节(前囟后 1.6 mm,中线旁 3.4 mm,深 6.8 mm)注射 C6 细胞悬液 10 μl (约 1×10^5 个细胞),注射时间为 5 min,留针 15 min,缓慢拔出针头,防止细胞悬液外溢。

1.2.4 实验分组 接种肿瘤细胞 6 天后,将 20 只大鼠随机分为 4 组,每组 5 只。BCNU 组注射 BCNU 25 mg/kg,隔日腹腔给药,持续 2 周;凡德他尼组注射凡德他尼 50 mg/(kg·d),隔日管饲,持续 2 周;联合药物组隔日腹腔注射 BCNU 25 mg/kg 及管饲凡德他尼 50 mg/(kg·d),持续 2 周;空白组腹腔注射相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液,持续 2 周。

1.2.5 肿瘤体积的测量 在治疗 2 周后,断头法处死 Wistar 大鼠,取出大脑组织,低温速冻, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用恒冷切片机做冠状位切面 5 μm 厚的冷冻连续切片,包埋在玻璃片上,作普通 HE 染色。用组织块等距抽样法取相距 150 μm 的切片,经体视显微镜观察,取肿瘤面积最大的一张切片,用目镜测微尺测量肿瘤最短径(a)和最长径(b),根据公式算肿瘤体积 $V = a^2 \times b / 2$,比较各组间肿瘤体积是否有差异。

1.2.6 移植瘤中微血管密度(microvessel density, MVD)检测 按 SP 法,CD34 来标记肿瘤血管内皮细胞。阳性标准按 Weidner^[5]的方法。以染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为 1 个血管计数。然后在低倍镜下($\times 100$)观察确定每例切片中 4 个微血管密度最高区域,在高倍镜下($\times 200$)用目镜网格测微尺计数每个视野在网格内的 MVD,取其平均值作为该例肿瘤的 MVD 值。

1.2.7 检测肿瘤中 MMP1 蛋白的表达^[6-7] SP 法来检测 MMP1 蛋白,其与肿瘤侵袭性相关,染色阳性为胞质棕黄色。对切片随机选取 10 个不同高倍镜视野($\times 200$),计数阳性细胞百分率(阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。按染色强度(SI)和阳性细胞百分率(PP)的乘积计算免疫反应积分(IRS)作为标记指数,即 $IRS = SI \times PP$ 。SI 计分:0 分为无色;1 分为淡棕黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。PP 计分:0 分为阳性细胞百分率 $\leq 5\%$;1 分为 $5\% \sim 25\%$;2 分为 $25\% \sim 50\%$;3 分为 $50\% \sim 75\%$;4 分为 $> 75\%$ 。计算 IRS 得分:0~2 分为阴性(-);3~4 分为弱阳性(+);5~6 分为阳性(++);7~8 分为强阳性(+++)。按照 IRS 评分标准来判断 MMP1 蛋白的表达情况。

1.2.8 检测肿瘤细胞凋亡指数 TUNEL 法检测肿瘤细胞的凋亡情况,凋亡细胞为棕褐色。普通光学显微镜下用目镜网格测微尺任 10 个视野($\times 200$)下计算阳性细胞数。凋亡指数(apoptosis index, AI) = 阳性细胞数/见到的所有肿瘤细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理。数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 *t* 检验及方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 药物对 C6 细胞的体外增殖抑制作用

高浓度的凡德他尼 ($>15 \mu\text{g/ml}$) 与空白组相比对 C6 细胞有明显抑制作用 [$20 \mu\text{g/ml}$ 的抑制率为 $(42.30 \pm 6.12)\%$, $P < 0.01$]; 而低浓度 ($\leq 15 \mu\text{g/ml}$) 的凡德他尼对 C6 细胞增殖未见明显抑制作用, $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $15 \mu\text{g/ml}$ 凡德他尼的抑制率分别为 $(5.18 \pm 4.35)\%$ 、 $(6.23 \pm 3.45)\%$ 、 $(6.78 \pm 4.54)\%$ ($P > 0.05$)。用对 C6 细胞无明显毒性的凡德他尼 ($10 \mu\text{g/ml}$) 联合 BCNU 组对 C6 细胞的增殖抑制作用比 BCNU 组明显增强 ($P < 0.01$, $n = 4$), 表明凡德他尼和 BCNU 联合用药, 增加了 BCNU 对 C6 细胞的细胞毒作用, 见表 1。

2.2 Wistar 大鼠颅内移植瘤模型大体观察

颅内原位移植 Wistar 大鼠, 接种 14 天后处死, 完整取出 Wistar 鼠脑, 多数鼠脑外表观察无特殊, 部分鼠脑肿瘤向脑表面生长, 于脑表面可见色泽苍白的肿瘤。将 Wistar 鼠脑冠状位切片, HE 染色, 在体视显微镜下观察, 能见到肿瘤浸润生长, 同周围脑组织无明显分界, 周围脑组织结构受压移位, 见图 1。

2.3 原位移植瘤体积变化

$10 \mu\text{g/ml}$ 凡德他尼组肿瘤体积 $(14.25 \pm 1.20) \text{ mm}^3$ 较空白对照组缩小 0.5% 与空白对照组 $(14.32 \pm 2.35) \text{ mm}^3$ 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); $10 \mu\text{g/ml}$ BCNU 组肿瘤体积 $(9.45 \pm 0.65) \text{ mm}^3$ 较空白对照组缩小 34% , 与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合药物组肿瘤体积 $(6.30 \pm 2.05) \text{ mm}^3$ 较空白对照组缩小 56% , 与空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。可见联合药物组能明显缩小肿瘤体积, 且明显优于单用 BCNU 组 ($P < 0.05$)。

2.4 移植瘤中微血管密度(MVD)

与对照组比较, 凡德他尼组移植瘤中 MVD 减少了 51% ($P < 0.05$), 联合药物组 MVD 减少了 53% ($P < 0.05$), 而 BCNU 组 MVD 无明显减少 ($P > 0.05$)。CD34 染色切片上可见对照组及 BCNU

组肿瘤血管丰富, 管腔扩张; 凡德他尼组及联合药物组肿瘤血管稀疏, 管腔小几乎闭塞。结果显示凡德他尼能抑制肿瘤血管生成, 见图 2。

2.5 肿瘤中 MMP1 蛋白的表达

当与对照组比较, 凡德他尼组移植瘤 MMP1 表达下降, 移植瘤中 MMP1 表达阳性 (+); BCNU 组 MMP1 表达增强, 移植瘤中 MMP1 表达为 (++) ; 联合药物组移植瘤 MMP1 表达下降, 移植瘤中 MMP1 表达阳性 (+)。结果表明凡德他尼能够降低与肿瘤侵袭能力有关的 MMP1 蛋白表达, 而细胞毒药物 BCNU 不能降低 MMP1 蛋白表达, 见图 3。

2.6 移植瘤细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI) 变化
与对照组 (3.23 ± 1.35) 比较, BCNU 组 (65.83 ± 5.65) 诱导细胞 AI 增加了 62.6% ($P < 0.05$), 联合用药组为 (85.23 ± 7.05), AI 增加了 82% ($P < 0.05$), 而凡德他尼组为 (4.58 ± 1.20), AI 增加不明显 ($P > 0.005$), 不同药物组移植瘤细胞凋亡情况, 见图 4。

3 讨论

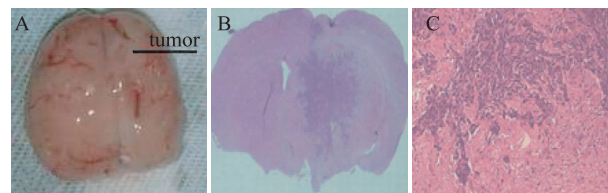
本实验通过检测并比较空白组、BCNU 组、凡德他尼组及联合药物组移植瘤体积, 移植瘤中微血管密度, 与肿瘤侵袭性有关的 MMP1 蛋白表达, 肿瘤细胞凋亡指数 (AI)。与 BCNU 组相比, 联合药物组移植瘤体积下降明显 ($P < 0.05$), 移植瘤中微血管密度下降显著 ($P < 0.05$), 与肿瘤侵袭性有关的 MMP1 蛋白表达下降, 肿瘤细胞凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$)。

凡德他尼是口服的小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 可同时作用于肿瘤细胞 EGFR、VEGFR 和 RET 酪氨酸激酶, 还可选择性的抑制其他酪氨酸激酶, 以及丝氨酸/苏氨酸激酶, 多靶点联合阻断信号转导, 因此是一种多通道肿瘤信号转导抑制剂, 目前应用于甲状腺癌的临床化疗中, 还没有将其用于脑胶质瘤的实验及临床报道。本实验进一步证明了与单用 BCNU 相比, 联合用药不仅能明显抑制 C6 大鼠胶质瘤细胞移植瘤生长, 还能降低与肿瘤侵袭能力有关的 MMP1 蛋白表达, 这样可以在保证药物对肿瘤杀伤效果的前提下, 减少细胞毒药物用量, 从而减低细胞毒药物的不良反应。

表 1 凡德他尼和 BCNU 联合用药对 C6 细胞生长抑制率的影响 (%)

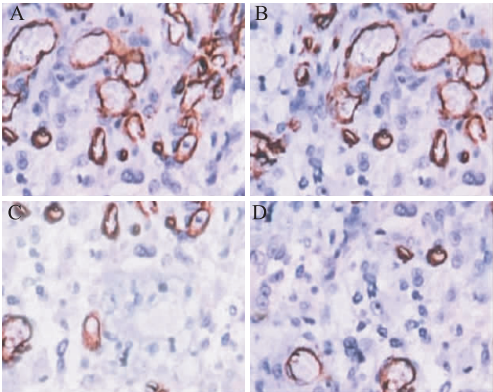
Table 1 Effect of vandetanib and BCNU joint medication on the growth inhibition rate of C6 cell (%)

Drug	2.5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$
BCNU	13.49 $\pm$ 4.35	16.40 $\pm$ 3.34	24.42 $\pm$ 3.68	47.13 $\pm$ 4.85	56.66 $\pm$ 3.71
BCNU + vandetanib	24.74 $\pm$ 6.03	32.05 $\pm$ 5.51	41.16 $\pm$ 4.15	68.46 $\pm$ 4.56	78.06 $\pm$ 3.04



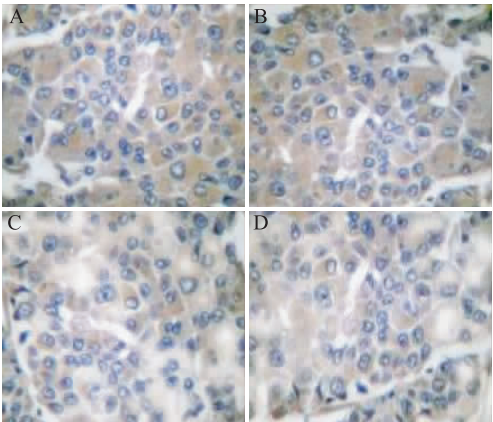
A: remove the complete Wister rat brain; B: section the intracranial orthotopic 14 days Wister rat brain (HE);C: under the stereomicroscope, there was visible tumor invasiveness in the surrounding normal brain tissues (HE ×40)

图 1 Wistar 大鼠颅内移植瘤模型形态学观察
Figure 1 Morphological observation of intracranial xenograft model



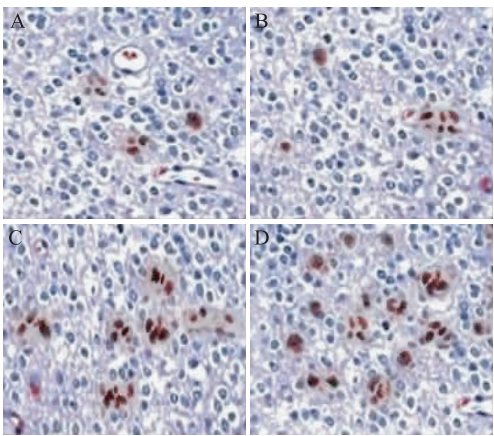
A:control group; B: BCNU group; C: vandetanib group; D: combined drug group
Microvessel density (MVD) of xenograft tumors: the control group (14.0 ± 0.8), BCNU group (13.6 ± 0.5), vandetanib group (6.8 ± 0.4 , $P < 0.05$), the combination drug group (6.6 ± 0.6 , $P < 0.05$). There was no significant difference between the vandetanib group and the combination drug group ($P > 0.05$) (SP ×200)

图 2 不同药物组移植瘤中微血管密度情况
Figure 2 Microvessel density of transplanted tumor in different drug groups



A:control group; B: BCNU group; C: vandetanib group; D: combined drug group
MMP1 expression of transplanted tumors in control group was positive (+); tumor invasiveness in vandetanib group and combined drug group reduced, and MMP1 expression was weakly positive (+);MMP1 expression of transplanted tumors in the BCNU group was positive (++) , and tumor invasiveness increased (SP ×200)

图 3 不同药物组移植瘤中 MMP1 蛋白的表达情况
Figure 3 MMP1 protein expression of xerografts in different drug groups



A: control group; B: BCNU group; C: vandetanib group; D: combined drug group
Compared with the control group, combined drug group and BCNU group significantly stimulates the apoptosis of the tumor cells (brown apoptotic cells). The apoptosis of the combination group increased remarkably, compared with that of BCNU group, while there wasn't obvious change in the vandetanib group(SP ×200)

图 4 不同药物组移植瘤细胞凋亡情况
Figure 4 The change of apoptotic cells in different drug groups transplanted tumor

参考文献:

[1] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, *et al.* Primary brain tumours in adults[J]. Lancet,2003,361(9354):323-31.

[2] Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, *et al.* Changing paradigms—an update on the multidisciplinary management of malignant glioma[J]. Oncologist ,2006,11(2):165-80.

[3] Yao J, Huang Q, Diao Y, *et al.* Experimental study of glioma the SP cells resistant target molecules ABCG2[J]. Zhongguo Shen Jing Zhong Liu Za Zhi, 2008,6 (1) :10-4. [姚进,黄强,刁艺,等. 胶质瘤 SP 细胞耐药靶分子 ABCG2 的实验研究[J]. 中国神经肿瘤杂志,2008,6(1):10-4.]

[4] Li ZM, Bi XY,Zhang CX, *et al.* Rat C6 glioma animal experimental model [J]. Zhongguo Bi Jiao Yi Xue Za Zhi, 2003, 13 (6) :367-70. [李志满,毕晓颖,张春霞,等. 大鼠 C6 胶质瘤动物实验模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2003,13(6):367-70.]

[5] Weidner N. Curmnt pathologic methods for measuring Intzatu-moral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Res Treat,1995,36(2):169-80.

[6] Prewett M, Huber J, Li Y, *et al.* Antivascular endothelial growth factor receptor(fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors[J]. Cancer Res,1999,59(20):5209-18.

[7] Park S, Jung HH, Park YH, *et al.* ERK/MAPK pathways play critical roles in EGFR ligands-induced MMP1 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,407(4):680-6.