

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2016.04.005

• 基础研究 •

不同剂量贝伐单抗在荷结肠癌细胞裸鼠中对伊立替康分布的影响

徐琦¹, 刘碧霞¹, 顾琳慧², 张爽爽³, 周卫民⁴, 吴筱丹⁵, 应杰儿¹, 冯建国²**Effects of Different Doses of Bevacizumab on Irinotecan Distribution in Nude Mice Bearing Human Colon Cancer Cell Xenografts**XU Qi¹, LIU Bixia¹, GU Linhui², ZHANG Shuangshuang³, ZHOU Weimin⁴, WU Xiaodan⁵, YING Jieer¹, FENG Jianguo²

1. Department of Abdominal Medical Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Institute of Cancer Research, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 3. Editorial Board, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 4. Animal Experiment Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 5. Drug Testing Center, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Corresponding Author: YING Jieer, E-mail: jieerying@aliyun.com; FENG Jianguo, E-mail: mysnae@126.com

Abstract: Objective To investigate the effects of different doses of bevacizumab on irinotecan distribution in nude mice bearing human colon cancer cell xenografts. **Methods** DLD-1 human colon cancer cells were inoculated into 24 nude mice, which were randomly divided into four groups: control group, with 0.9% NaCl on d1, 5, 9 and irinotecan on d10; test group 1 to 3, with bevacizumab 2.5, 5 and 10 mg/kg respectively on d1, 5, 9 and irinotecan on d10. Tumor volume and irinotecan concentration in peripheral blood and xenograft tumor tissues in the four groups after treatment were analyzed. **Results** No significant difference in tumor volume was observed among groups. Irinotecan concentration in peripheral blood in the three test groups was significantly higher than that in the control group, and increased in a dose-dependent manner[(432.33±104.76), (409.69±267.15) and (719.21±253.00) vs. (299.69±83.63)ng/ml], moreover, there were significant difference between test group 3 and test group 2, control group ($P=0.045, 0.010$). Irinotecan concentrations in tumor tissues from the test groups were lower than that in the control group, and there was significant difference between test group 3 and control group ($P=0.047$). **Conclusion** Bevacizumab might influence irinotecan distribution in nude mice bearing colon cancer cells in a dose-dependent manner.

Key words: Bevacizumab; Irinotecan; Nude mice; Xenograft; Colon cancer

摘要: 目的 观察不同剂量贝伐单抗对荷结肠癌细胞裸鼠中伊立替康分布的影响。**方法** 接种人结肠癌DLD-1细胞的裸鼠24只, 随机分为4组。对照组: 0.9%氯化钠溶液+伊立替康; 实验1组: 2.5 mg/kg贝伐单抗联合伊立替康治疗; 实验2组: 5 mg/kg贝伐单抗联合伊立替康治疗; 实验3组: 10 mg/kg贝伐单抗联合伊立替康治疗。观察不同组经处理后的肿瘤大小, 外周血及肿瘤组织内伊立替康浓度的差异。**结果** 对照组及3个实验组间肿瘤体积差异比较无统计学意义。外周血中伊立替康的浓度在3个实验组中均明显高于对照组, 且浓度随着贝伐单抗剂量增加而增加[(432.33±104.76)、(409.69±267.15)、(719.21±253.00) vs. (299.69±83.63) ng/ml]。其中实验3组与实验2组、对照组的差异有统计学意义

($P=0.045, 0.010$)。肿瘤组织内伊立替康的浓度在3个实验组均明显低于对照组, 其中实验3组与对照组的差异有统计学意义($P=0.047$)。**结论** 贝伐单抗的治疗能改变伊立替康在荷结肠癌细胞裸鼠中分布, 并与贝伐单抗的剂量有关。

关键词: 贝伐单抗; 伊立替康; 裸鼠; 移植瘤; 结肠癌

中图分类号: R735.3⁺5

文献标识码: A

收稿日期: 2015-04-07; 修回日期: 2015-12-02

基金项目: 浙江省医药卫生优秀青年科技人才专项科研基金(2008QN004)

作者单位: 1. 310022 杭州, 浙江省肿瘤医院腹部肿瘤内科; 2. 310022 杭州, 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所; 3. 310022 杭州, 浙江省肿瘤医院杂志社; 4. 310053 杭州, 浙江省中医药大学动物实验中心; 5. 310027 杭州, 浙江大学药物测试中心

通信作者: 应杰儿, E-mail: jieerying@aliyun.com; 冯建国, E-mail: mysnae@126.com

作者简介: 徐琦(1982-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事腹部肿瘤内科治疗和基础研究

0 引言

新生血管形成是肿瘤发生、发展和转移的重要基础, 抗血管生成治疗是晚期结肠癌患者的重要治疗策略^[1]。贝伐单抗是全球首个被批准用于抗肿瘤血管生成的药物, 国内外多个 I~III 期临床试验显示贝伐单抗安全有效、无剂量限制性毒性, 与化疗联合疗效增加而毒性无协同^[2-4]。Hurwitz 等的 III 期临床试验显示每两周 5 mg/kg 贝伐单抗明显增加结直肠癌一线化疗方案 IFL 的疗效, E3200 研究则提示每两周 10 mg/kg 贝伐单抗明显增加结直肠癌二线化疗方案 FOLFOX4 的疗效^[2-3]。在这两项研究中我们看到两个剂量水平的贝伐单抗均能明显增加结直肠癌患者化疗的疗效。贝伐单抗的疗效和剂量之间是线性关系还是增加到一定剂量后进入平台期目前并不清楚。

有研究发现由单核细胞分化而来的浸润到肿瘤组织内的肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 与肿瘤细胞间有相互调节作用^[5]。肿瘤细胞释放的趋化因子, 包括 VEGF 能够趋化单核细胞进入肿瘤组织分化成 TAMs, 并能调节其活性; 而 TAMs 分泌的趋化因子 (MIP) 和细胞因子 (IL-6、IL-1 等) 介导肿瘤局部炎性反应, 导致肿瘤组织肿胀, 组织间隙液体压力增加, 使化疗药物不易进入肿瘤组织内发挥其抗肿瘤作用^[6-7]。以往研究显示贝伐单抗能使肿瘤血管正常化, 减少组织间隙液体压力, 增加进入肿瘤内的化疗药物^[8-12]。本实验利用人结肠癌 DLD-1 细胞建立皮下移植瘤裸鼠模型, 观察不同剂量贝伐单抗对肿瘤生长的抑制作用及对伊立替康分布的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞

贝伐单抗注射液 (瑞士 Roche 公司), 盐酸伊立替康注射液 (美国辉瑞公司)。2795 型高效液相色谱系统、Quattro Premier 串联质谱 (MS) 检测器 (美国 Waters 公司); Heraeus 1.0 高速低温离心机、生物安全柜等、D-37520 Biofuge 高速离心机 (德国 Kendro 公司); LDZ5-2 型离心机 (北京医用离心机厂); AT201 十万分之一分析天平 (瑞士 METTLER-TOLEDO 公司); RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司), 10% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 人结肠癌 DLD-1 细胞购于中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养传代。伊立替康对照品 (批

号: 160711012, 纯度: > 98%) 由江苏恒瑞制药有限公司提供; 内标苯磺贝他斯汀对照品 (天津田边制药有限公司提供, 批号: 06-02, 纯度: > 99.0%)。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠荷瘤及实验分组

BALB/c-nu/nu 裸鼠 (浙江中医药大学实验动物中心) 24 只, 3~4 周龄, 雌 12 只, 雄 12 只, 平均体重 16~20 g, 饲养于 SPF 级环境中。取对数生长期的 DLD-1 细胞, 调整细胞悬液浓度为 5×10^7 个/毫升, 取 0.2 ml 接种于裸鼠腋下。待肿瘤细胞生长半月左右, 瘤体长径至 5 mm³ 大小时进行分组实验。随机分为 4 组, 每组各 6 只。对照组: 0.9% 氯化钠溶液分别于第 1、5、9 天静脉注射, 伊立替康 66.7 mg/kg 于第 10 天注射; 实验 1 组: 2.5 mg/kg 贝伐单抗联合伊立替康化疗; 实验 2 组: 5 mg/kg 贝伐单抗联合伊立替康化疗; 实验 3 组: 10 mg/kg 贝伐单抗联合伊立替康化疗。实验组贝伐单抗均分别于第 1、5、9 天注射, 伊立替康 66.7 mg/kg 于第 10 天注射。最后 4 组分别于第 10 天伊立替康给药后半小时处死裸鼠, 留取外周血并取皮下肿瘤。

1.2.2 移植瘤大小观察

裸鼠处死后测量肿瘤长径和短径, 肿瘤体积 = 长径 × 短径²/2。

1.2.3 外周血及肿瘤组织内伊立替康浓度测定

摘除眼眶留取裸鼠外周血, 置于肝素化抗凝试管中, 3 000 r/min, 离心 5 min, 分离血浆, 于 -70℃ 冰箱中保存待用。留取皮下肿瘤, 用于肿瘤组织内伊立替康浓度检测, 于 -70℃ 冰箱中保存待用。LC-MS/MS 法测定裸鼠血浆及肿瘤组织中伊立替康浓度。

1.3 统计学方法

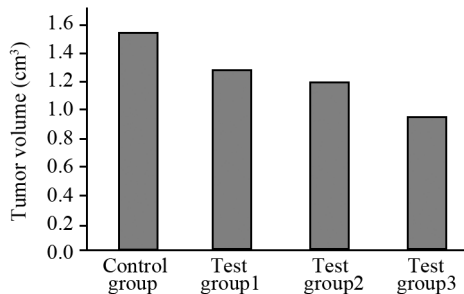
采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析, 所得成组资料数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 检验水准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠移植瘤大小的比较

治疗结束后, 测量瘤体长径和短径, 计算肿瘤体积。对照组、实验 1 组、实验 2 组和实验 3 组肿瘤体积分别为: (1.54 ± 0.21)、(1.33 ± 0.46)、(1.21 ± 0.64) 和 (1.02 ± 0.34) cm³。实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.953$)。实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组三

组间比较,差异也无统计学意义 ($P=0.804$),见图1。



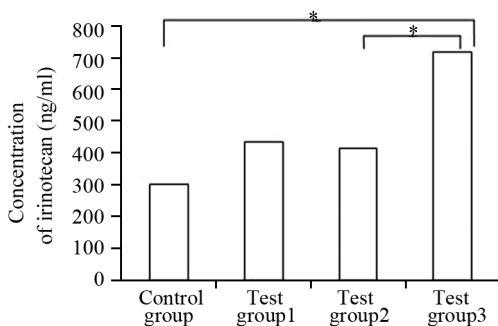
Control group: 0.9%NaCl+irinotecan; Test group1: 2.5mg/kg bevacizumab+irinotecan; Test group2: 5mg/kg bevacizumab+irinotecan; Test group3: 10mg/kg bevacizumab+irinotecan

图1 不同浓度贝伐单抗对移植瘤体积大小的影响

Figure1 Effects of different concentrations of bevacizumab on tumor volume of xenografts

2.2 外周血及肿瘤组织内伊立替康浓度测定

伊立替康给药30 min后在对照组、实验1组、实验2组、实验3组的外周血伊立替康浓度分别为 (299.69 ± 83.63)、(432.33 ± 104.76)、(409.69 ± 267.15)、(719.21 ± 253.00) ng/ml。实验1组、实验2组、实验3组的浓度均明显高于对照组,其中实验3组与对照组的差异有统计学意义 ($P=0.010$)。实验1组、实验2组、实验3组三组间的比较,实验3组明显高于实验1组和实验2组,其中实验3组与实验2组间的差异有统计学意义 ($P=0.045$),见图2。



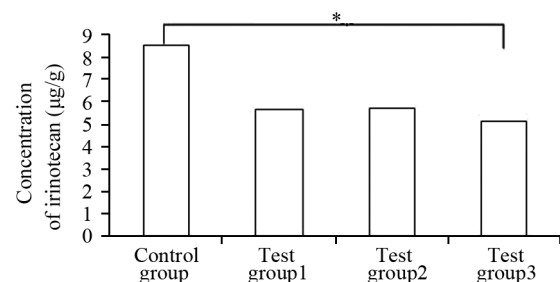
*: $P<0.05$, compared with control group and test group 2

图2 不同浓度贝伐单抗对移植瘤外周血伊立替康浓度的影响

Figure2 Effects of different concentrations of bevacizumab on irinotecan concentration in peripheral blood of xenografts

肿瘤组织内伊立替康的浓度在对照组、实验1组、实验2组、实验3组分别为 (8.47 ± 2.60)、(5.62 ± 3.12)、(5.73 ± 1.79)和 (5.11 ± 3.26) $\mu\text{g/g}$ 。实验1组、实验2组、实验3组的浓度均明显低于对照

组,其中实验3组与对照组的差异有统计学意义 ($P=0.047$)。实验1组、实验2组、实验3组三组间的比较,差异无统计学意义 ($P=0.941$),见图3。



*: $P<0.05$, compared with control group

图3 不同浓度贝伐单抗对移植瘤组织伊立替康浓度的影响
Figure3 Effects of different concentrations of bevacizumab on irinotecan concentration in tumor tissues of xenografts

3 讨论

研究显示贝伐单抗能使肿瘤血管正常化,改变组织间隙液体压力,改善药物转运。Dani等^[13]用10 mg/kg的贝伐单抗治疗直肠癌细胞移植瘤,与0.9%氯化钠溶液组相比,贝伐单抗治疗后第5天组织间隙液体压力明显降低,肿瘤细胞对化疗药物的摄取增加。Dickson等^[10]研究显示贝伐单抗能增加成神经细胞瘤移植瘤模型中托泊替康和依托泊苷肿瘤内水平。Yanagisawa等^[14]报道贝伐单抗能增加乳腺癌裸鼠移植瘤中紫杉醇的浓度,而对外周血及肝脏紫杉醇的浓度无影响。本研究显示肿瘤组织内伊立替康的药物浓度在3个剂量水平的贝伐单抗实验组中均明显低于0.9%氯化钠溶液组,外周血伊立替康药物浓度在3个剂量水平的贝伐单抗实验组均明显高于0.9%氯化钠溶液组。本研究数据与既往文献报道不一致,分析其原因可能与贝伐单抗和伊立替康的给药时间间隔有关。本研究在贝伐单抗给药3次后(首次给药后10天)给予伊立替康,可能此时肿瘤局部血管已趋于正常,同时新生血管减少,从而导致肿瘤局部药物浓度下降,外周血药物浓度增加。Dickson等^[10]研究中超声造影成像显示肿瘤内灌注在贝伐单抗给药初期增加,在1周时反而减少,亦支持本研究的数据。本研究3个剂量水平间的比较显示10 mg/kg组对伊立替康分布的影响最大,尤其是外周血伊立替康浓度,10 mg/kg组与5 mg/kg的差异亦达到统计学意义。该结果显示不同剂量的贝伐单抗对伊立替康的分布影响不同,是否能转换成临床疗效的差异有待于进一步研究。随着贝伐单抗的给药及剂量增加,结肠癌DLD-1细胞

移植瘤体积逐渐减小,但差异均无统计学意义,提示单药抗肿瘤作用活性不强,与临床观察到的单药疗效相符^[3-4]。

本研究结果显示贝伐单抗的治疗能改变伊立替康在裸鼠内的分布,不同剂量的贝伐单抗产生的作用不同。随着贝伐单抗药物疗效的出现,肿瘤局部炎性因子、血管状态、肿瘤灌注等改变,药物的分布会发生变化,其确切机制仍需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Mihalache A, Rogoveanu I. Angiogenesis factors involved in the pathogenesis of colorectal cancer[J]. *Curr Health Sci J*, 2014, 40(1): 5-11.
- [2] 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 (23): 2335-42.
- [3] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(12): 1539-44.
- [4] Dotan E, Meropol NJ, Burtneß B, *et al.* A phase II study of capecitabine, oxaliplatin, and cetuximab with or without bevacizumab as frontline therapy for metastatic colorectal cancer. A Fox Chase extramural research study[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2012, 43(4): 562-9.
- [5] Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection[J]. *Cancer Lett*, 2008, 267(2): 204-15.
- [6] Voronov E, Carmi Y, Apte RN. The role of IL-1 in tumor-mediated angiogenesis[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 114.
- [7] Carmi Y, Dotan S, Rider P. The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response[J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3500-9.
- [8] Etienne-Grimaldi MC, Formento P, Degeorges A. Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 71(6): 921-8.
- [9] Navid F, Baker SD, McCarville MB, *et al.* Phase I and clinical pharmacology study of bevacizumab, sorafenib, and low-dose cyclophosphamide in children and young adults with refractory/recurrent solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(1): 236-46.
- [10] Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, *et al.* Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13): 3942-50.
- [11] Leguerney I, Lassau N, Koscielny S, *et al.* Combining functional imaging and interstitial pressure measurements to evaluate two anti-angiogenic treatments[J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(1): 144-56.
- [12] Turley RS, Fontanella AN, Padussis JC, *et al.* Bevacizumab-induced alterations in vascular permeability and drug delivery: a novel approach to augment regional chemotherapy for in-transit melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(12): 3328-39.
- [13] Dani M, Vojnovic B, Newman R, *et al.* Bevacizumab, a vascular endothelial growth factor (VEGF) specific antibody reduces interstitial fluid pressure (IFP) in human rectal cancer xenograft (HT29) by day 5: is this evidence for rescheduling its timing relative to chemotherapy?[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(18 Suppl): 4043.
- [14] Yanagisawa M, Yoroze K, Kurasawa M, *et al.* Bevacizumab improves the delivery and efficacy of paclitaxel[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(7): 687-94.

[编辑: 刘红武; 校对: 周永红]