

[文章编号 1000-1182(2005)04-0322-03]

MAb225 对 Tca8113 舌鳞癌细胞 放射敏感性的影响

王明国¹, 王中和², 高萍¹, 郜青¹, 李迎¹, 蔡以理²

(1. 济南市中心医院 口腔科, 山东 济南 250012;

2. 上海第二医科大学附属第九人民医院 口腔颌面外科, 上海 200011)

[摘要] 目的 探索表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体 MAb225 对舌鳞癌细胞 Tca8113 的放射敏感性的调控作用。方法 不同浓度的 MAb225 处理 Tca8113 舌鳞癌细胞, 通过集落形成实验单靶多击模型拟合放射生存曲线, 分析细胞的增敏比(SERD₀)和存活分数(SF2)的变化。同时, 建立裸鼠移植瘤模型, 单独及联合应用 MAb225 和放射处理裸鼠移植瘤, 通过生长延缓实验观察肿瘤生长变化, 并进行统计学分析。结果 MAb225 有明显的放射增敏作用, 0.5 mg/L MAb225 作用后的 SERD₀ 为 1.23, 在一定的范围内, 其增敏作用与剂量存在正相关; MAb225 明显提高放射对裸鼠移植瘤的杀伤作用($P < 0.05$)。结论 MAb225 可以提高舌鳞癌细胞 Tca8113 的放射敏感性。

[关键词] 表皮生长因子受体; 单克隆抗体; 放射; 鳞癌

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A

Effect of MAb225 on Radiosensitivity of Tca8113 Tongue Squamous Cell Carcinoma WANG Ming-guo¹, WANG Zhong-he², GAO Ping¹, GAO Qing¹, LI Ying¹, CAI Yi-li². (1. Oral Department of Jinan Central Hospital, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China)

Abstract Objective The purpose of this study was to invest the effect of epidermal growth factor receptor monoclonal antibody MAb225 on radiosensitivity of tongue squamous cell carcinoma cell Tca8113. **Methods** Tca8113 cells were treated with different concentrations of MAb225. Radiation dose survival curve was generated from clonogenic survival assay. SERD₀ and survival fraction (SF2) was analysed by single hit multi-target (SHMT) radiobiological model using RADMEDIC software. Nude mice with Tca8113 tumor xenografts were treated with MAb225, radiation treatment or both of them. Tumor responses were assessed by tumor growth delay, and *t* test was used for statistical analysis. **Results** MAb225 enhanced the radiosensitivity of Tca8113 cells. SERD₀ of Tca8113 cells treated with 0.5 mg/L MAb225 was 1.23. The survival fraction of cells treated with MAb225 was significantly decreased. Tumor radioresponse could be enhanced by MAb225 ($P < 0.05$). **Conclusion** MAb225 could enhance radiosensitivity of tongue squamous cell carcinoma cell.

Key words epidermal growth factor receptor; monoclonal antibody; radiosensitivity; squamous cell carcinoma

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种酪氨酸激酶生长因子家族的跨膜糖蛋白,其通过酪氨酸激酶活性所介导的信号传导是最重要的细胞生长信号系统之一。EGFR在包括头颈部鳞癌在内的多种上皮性恶性肿瘤中高表达,其高表达往往与肿瘤的预后不良密切相关。应用抗EGFR的单克隆抗体 MAb225 可以竞争性的阻断配体的结合从而抑制其正常的信号传导。近来研究表明^{1,2},EGFR高表达的肿瘤具有一些耐受的特征,对

传统的化疗和放疗有一定的抗性,在一些报道中建议改变EGFR的功能或表达来影响肿瘤细胞对常规治疗方案的反应。口腔颌面部鳞状细胞癌具有中度的放射抗性,放射后的局部复发是治疗失败的主要原因。本研究应用EGFR的单克隆抗体 MAb225 处理Tca8113舌鳞癌细胞系,检测其放射敏感性的变化,并观察 MAb225 联合放射对裸鼠移植瘤的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 肿瘤细胞系来源、实验动物和主要试剂

Tca8113 细胞系由上海第二医科大学附属第九人民医院口腔颌面外科实验室建系保种。本实验使用的为第206代,其群体倍增时间为(38.8 ± 4.4) h。BALB/c(nu/nu)裸鼠由上海市肿瘤研究所实验动物

[收稿日期 2004-12-20; 修回日期 2005-04-27]

[基金项目] 上海市口腔研究所基金资助项目(Y0215)

[作者简介] 王明国(1972-),男,山东人,主治医师,博士

[通讯作者] 王明国, Tel: 0531-85695171

部提供。EGFR的单克隆抗体(MAb225)为美国NEW-MARKER公司产品, -20℃保存。

1.2 细胞实验

1.2.1 Tca8113细胞形态学观察 将Tca8113细胞分为对照组(不作任何处理)、MAb225组、放射组、MAb225联合放射组。MAb225给予的浓度为0.5 mg/L,放射给予6 Gy。4组细胞均培养72 h后倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 Tca8113细胞克隆形成实验 指数生长期Tca8113细胞接种于培养瓶中,培养液中分别加入浓度为0.25、0.50、1.00 mg/L的MAb225,同时设不加MAb225的为对照组,每组4个平行管,分别采用剂量为2、4、6、8 Gy的⁶⁰Co照射,照射后细胞培养14 d。

14 d后中止培养,弃去培养液,PBS浸洗2次,用纯甲醇/冰醋酸5 ml固定,加适量吉姆萨应用染色液染色,流水缓慢洗去染色液,空气干燥以备计数。将平皿倒置并叠加于一张带网格的透明胶片,肉眼直接或在显微镜下计数克隆数,细胞数50个以上为一个集落。每组实验均重复3次。

1.2.3 数据模型分析和图像拟合 应用RADMEDIC软件包对克隆形成实验的集落数行数据模型分析和单靶多击模型分析并拟合,得到不同浓度MAb225处理后Tca8113细胞的放射生存曲线,据此计算对照组和不同浓度MAb225组的D₀值(63%细胞致死放射剂量)、放射增敏比和2 Gy时的细胞存活分数(survival fraction, SF)。放射增敏比(sensitizing enhancement ratio of D₀, SERD₀)为对照组D₀除以MAb225处理组D₀。SF₂即常规照射剂量2 Gy时的SF。

1.3 动物实验

1.3.1 荷瘤裸鼠模型的制备 取对数期生长的Tca8113细胞,台盼蓝染色确认活细胞达95%以上,无血清RPMI 1640培养液清洗并稀释细胞浓度为每毫升5×10⁶个,每只裸鼠注射0.2 ml,注射于5只裸鼠的腋下区,3周后分别在无菌条件下取出接种瘤体,在生理盐水中分割成1.5 mm直径大小肿块,用20号穿刺针把瘤块移植于20只裸鼠两侧臀部的皮下组织内,14 d后肿瘤直径达6 mm左右时开始实验。采用自身对照的方法,将裸鼠随机分为两组,每组10只。第1组左侧肿瘤不处理,右侧给予MAb225处理;第2组左侧给予放射治疗,右侧给予MAb225联合放射治疗。采用3点给药法,MAb225处理的每只裸鼠注射MAb225 0.5 mg。放射裸鼠给予外照射,其步骤为:将裸鼠固定其四肢于木板上,充分显露肿瘤,照射野为1.5 cm×1.5 cm,应用⁶⁰Co照射源以剂量率100 cGy/min给予单次照射18 Gy,照射结束后继续圈养8周至实验结束。

1.3.2 生长延缓测定 自照射之日起,每周2次测量肿瘤的最小径a、最大径b,按照公式 $V = a^2b / 6$ 计算肿瘤体积,取均值,绘制肿瘤生长曲线。应用SAS 6.12的t检验对各组肿瘤在第4、6、8周末时的体积进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同处理下Tca8113细胞的形态学改变

Tca8113细胞培养72 h时,对照组细胞密集排列,呈铺路石样表现,数量最多(图1);MAb225组,细胞排列疏松,单个细胞面积大,细胞总数少;放射组,细胞数量较多,但有较多的坏死细胞,坏死细胞脱落,皱缩;MAb225联合放射组,细胞不仅数量减少,而且有较多的坏死细胞(图2)。

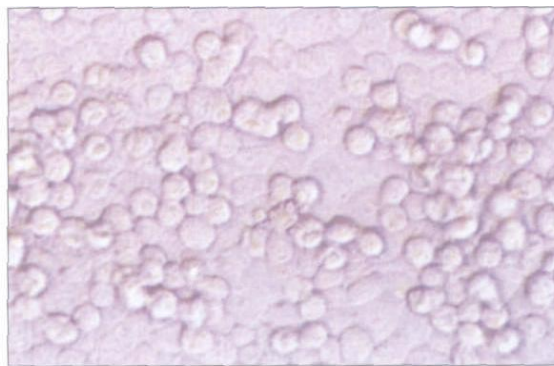


图1 培养72 h对照组Tca8113细胞 倒置显微镜 ×200

Fig 1 Control group Tca8113 cell cultivated for 72 h inverted microscope ×200

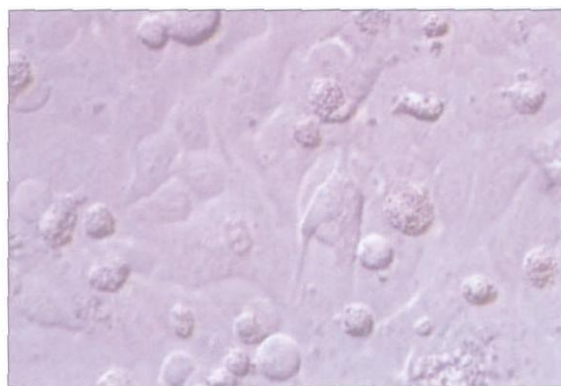


图2 培养72 h MAb225联合放射组Tca8113细胞 倒置显微镜 ×200

Fig 2 MAb225 associated with radiation group Tca8113 cell cultivated for 72 h inverted microscope ×200

2.2 Tca8113细胞放射生存曲线

不同浓度MAb225处理后的Tca8113细胞的放射生存曲线如图3所示。在0.25 mg/L浓度时增敏作用不很明显, SER仅为1.06, 0.5 mg/L的SER为1.23, 1 mg/L的SER为1.36。表明MAb225的放射增敏作用和药物浓度密切相关, MAb225的浓度增加,放射敏感效应加强。

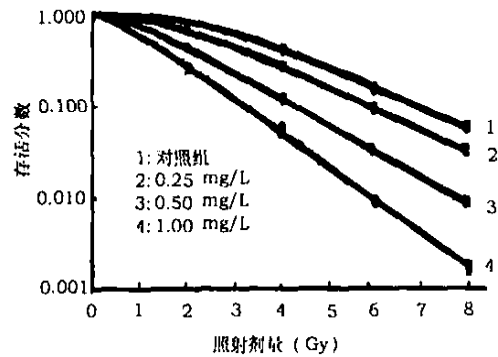


图3 不同浓度MAb225处理后的Tca8113细胞的放射生存曲线
Fig 3 Radiation survive curve of Tca8113 cell treated with MAb225 of different concentrations

2.3 不同浓度MAb225作用下Tca8113细胞的存活分数

对照组、0.25 mg/L、0.5 mg/L、1.00 mg/L组的SF2分别为0.76、0.716、0.41、0.373。与对照组相比，在0.25 mg/L的MAb225处理时SF2的变化并不明显，但从0.25 mg/L到0.5 mg/L SF2有显著的降低。

2.4 MAb225对裸鼠移植瘤生长延缓的作用

不同处理组裸鼠移植瘤的生长曲线见图4，可以看出对照组肿瘤的生长明显快于其他3组的生长，单纯放疗组和单纯的MAb225组的肿瘤生长明显快于放疗联合MAb225组的肿瘤。不同时间不同处理组裸鼠移植瘤体积的比较见表1，统计分析表明，在4周末、6周末、8周末分别测定各组的平均体积，对照组与MAb225组间、放疗组与联合组间均有显著性差异($P < 0.05$)。

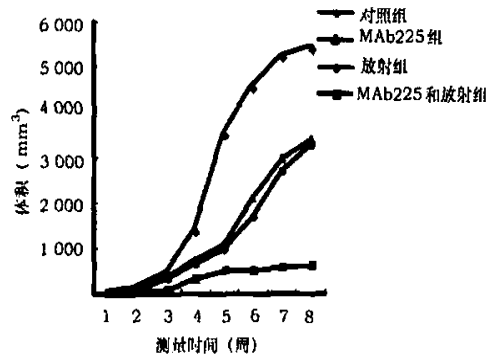


图4 裸鼠移植瘤的生长曲线

Fig 4 Growth curve of tumor on nude mice

表1 不同时间不同处理组裸鼠移植瘤体积的比较
(mm³, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of tumor volume in different times and treatments (mm³, $\bar{x} \pm s$)

时间	对照组	MAb225处理组	放疗组	放疗和MAb225处理组
4周末	1 417 ±126	741 ±115	671 ±169	366 ±153
6周末	4 520 ±355	2 134 ±229	1 763 ±209	545 ±186
8周末	5 436 ±783	3 481 ±486	3 019 ±403	653 ±305

3 讨论

头颈部鳞状细胞癌对放射具有中度的敏感性，在根治放射剂量6 000~7 000 cGy照射后，仍有部分肿瘤细胞不能被杀死，提高放射治疗对肿瘤细胞的杀伤对于提高头颈部肿瘤的治愈率有重要意义。

现代放射分子生物学技术的发展使通过调节肿瘤细胞内的某些分子靶来调节肿瘤细胞的放射敏感性成为可能。EGFR是一种跨膜的酪氨酸激酶受体，它的主要功能是调节细胞的增殖和粘附，但近来众多的研究表明，EGFR是一个多功能的细胞因子，EGFR的高表达与多种实体性肿瘤的发展和预后不良密切相关³。EGFR与头颈部鳞癌关系密切，大约80%的头颈部鳞癌存在着EGFR的高表达，每个鳞癌细胞表面大约有40×10⁵~494×10⁵个EGFR，而在癌周正常组织细胞表面的EGFR在10 000个左右⁴。Grandis等⁵应用多元回归分析对头颈部鳞癌的研究发现，在年龄、肿瘤部位、T分期、N分期、分化程度、EGFR水平、肿瘤生长因子水平7个因素中，与肿瘤的预后关系密切的程度依次为肿瘤部位、EGFR水平和肿瘤生长因子。

近来许多研究表明^{6,7}，EGFR的表达与细胞和肿瘤对放射的耐受存在正相关。Sheridan等⁷发现在体外培养的来自头颈癌患者的细胞中，表达高水平的EGFR的肿瘤细胞比表达低水平EGFR的肿瘤细胞更为放射耐受。Milas等⁸发现在不同组织学来源的裸鼠移植瘤中，EGFR的差别可达21倍，表达高水平EGFR的肿瘤存在更明显的放射耐受。外源性EGFR加入培养细胞中可以保护细胞免于放射的杀伤，而应用EGFR的抗体可以抵消这种作用⁹。

本实验将EGFR单克隆抗体MAb225加入体外培养的Tca8113细胞中，应用经典的克隆形成实验观察细胞放射后的生存情况，并用单靶多击模型拟合细胞放射生存曲线，计算放射增敏比，发现MAb225在0.5 mg/L水平就可以显著的提高鳞癌细胞的放射敏感性，在一定的范围内，其增敏作用与剂量存在正相关。从照射2 Gy时的存活分数可以看出，MAb225可以显著的提高放射对肿瘤细胞的杀伤。采用放射延缓实验观察MAb225在裸鼠体内对放疗的影响，发现MAb225可以明显提高放射对肿瘤的杀伤，单纯放疗组肿瘤和联合治疗组肿瘤的生长之间存在显著性差异。

胞对成骨细胞功能的影响。实验以成骨细胞早期功能表达的指标 ALP 和成骨细胞成熟的标志 OC 为观察指标,结果表明,单独培养的成骨细胞与两种细胞比例为 2:1 时 ALP 的活性及 OC 含量明显高于其他两组,而此两组细胞的 ALP 活性和 OC 含量则无显著性差异。可以看出,当两种细胞以 2:1 的比例直接共培养时,可以促进成骨细胞的增殖和功能表达,同时可以考虑将其应用于组织工程血管化骨的进一步研究中。

[参考文献]

- 1] Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healingJ. Am J Pathol, 1998, 152(6):1445.
- 2] 杨志明主编. 组织工程基础与临床M. 成都:四川科学技术出版社,2000:239-249.
(Yang ZM. Base and clinic of tissue engineering M. Chengdu: Sichuan Technology Publishing Company, 2000:239-249.)
- 3] Philippe P, Frank P, Simone MP, et al. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in ratsJ. Plast Reconstr Surg, 2003, 111(6):1932-1941.
- 4] 刘刚,胡蕴玉,颜永年,等. 型胶原修饰的多孔材料聚乙醇酸-乳酸共聚物对兔骨髓间充质干细胞粘附和增殖及成骨细胞基因表达的影响J. 中华医学杂志, 2003, 83(7):580-583.

(Liu G, Hu YY, Yan YN, et al. Effects of collagen coating on the porous poly-lactide-co-glycolid on adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cellsJ. Natl Med J China, 2003, 83(7):580-583.)

- 5] Wang DS, Mirua M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cellsJ. Endocrinology, 1997, 138(7):2953-2962.
- 6] Wang DS, Yamazaki K, Shizume K, et al. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cellsJ. J Bone Miner Res, 1996, 11(4):472-479.
- 7] 余希杰,杨志明,解慧琪,等. 血管内皮细胞对体外培养成骨细胞特性的影响J. 中华实验外科杂志, 2001, 18(4):355-356.
(Yu XJ, Yang ZM, Xie HQ, et al. The influence of biological characteristics of osteoblasts cocultured with endothelial cells *in vitro* J. Chin J Exp Surg, 2001, 18(4):355-356.)
- 8] 朱伟南,杨志明,李秀群,等. 兔骨膜成骨细胞与肾血管内皮细胞间接共培养的体外研究J. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(5):307-310.
(Zhu WN, Yang ZM, Li XQ, et al. Experimental study on rabbit periosteal osteoblasts and renal vascular endothelial cells indirect co-culture *in vitro* J. Chin J Rep Rec Surg, 2002, 16(5):307-310.)

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第 324 页)

前期研究已证实,MAb225 可以抑制口腔鳞癌细胞的增殖¹⁰。本实验结果表明,MAb225 可以抑制肿瘤细胞的增殖,同时提高细胞的放射敏感性。因此,MAb225 在肿瘤的治疗中发挥重要的作用。但 MAb225 如何提高肿瘤细胞放射敏感性的机制尚不完全明了,可能与凋亡及 DNA 损伤后的修复有关¹¹,尚待进一步研究。

[参考文献]

- 1] Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapyJ. Endocrine-Related Cancer, 2001, 8(1):3-9.
- 2] Shin DM, Donato NJ, Perez-Soler R, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy with C225 and Cisplatin in patients with head and neck cancerJ. Clin Cancer Res, 2001, 7(5):1204-1213.
- 3] Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapyJ. Clin Cancer Res, 1997, 3(12):2703-2707.
- 4] Kiyota A, Shintani S, Mihara M, et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27KIP1 and p15INK4B and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell linesJ. Oncology, 2002, 63(1):92-98.
- 5] Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF- and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient

survivalJ. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(11):824-832.

- 6] Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, et al. Epidermal growth factor receptor: An independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiationJ. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996, 34(4):809-815.
- 7] Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, et al. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neckJ. Radiat Oncol Invest, 1997, 5(4):180-186.
- 8] Milas L, Mason K, Hunter N, et al. *In Vivo* enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibodyJ. Clin Cancer Res, 2000, 6(2):701-708.
- 9] Balaban N, Moni J, Shannon M, et al. The effect of ionizing radiation on signal transduction: Antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiationJ. Biochim Biophys Acta, 1996, 1314(1-2):147-156.
- 10] 王明国,王中和,胡海生. EGFRmAb 抑制口腔鳞癌细胞增殖的研究J. 上海口腔医学, 2003, 12(3):100-102.
(Wang MG, Wang ZH, Hu HS. Inhibiting effect of EGFR monoclonal antibody on proliferation of oral squamous cell carcinomaJ. Shanghai J Stomatol, 2003, 12(3):100-102.)
- 11] Azria D, Larbouret C, Robert B, et al. Radiotherapy and inhibitors of epidermal growth factor receptor: Preclinical findings and preliminary clinical trialsJ. Clin Cancer Res, 2004, 10(19):6487-6501.

(本文编辑 汤亚玲)