

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.009

阿帕替尼联合放疗对 HeLa 细胞 Ki-67 表达的影响 及与生长抑制相关性研究*

彭红菊, 刘伟, 张建文[△], 岳宏程, 傅少志

(西南医科大学附属医院肿瘤科, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨阿帕替尼联合放射治疗(简称放疗)对宫颈癌 HeLa 细胞 Ki-67 表达的影响, 以及与肿瘤生长抑制率的相关性。方法 将建立的 BALB/c-nu 荷瘤鼠随机分为对照组、单纯放疗组和阿帕替尼联合放疗组(联合组)。免疫组化 SP 法检测 Ki-67 表达。结果 联合放疗组和放疗组 Ki-67 阳性表达率分别为 $(14.40 \pm 2.72)\%$ 和 $(66.78 \pm 5.01)\%$, 较对照组的 $(92.83 \pm 4.04)\%$, 分别降低 84.49% 和 28.06% ($P < 0.05$)。联合组比放疗组降低 78.44% ($P < 0.05$)。联合组和放疗组肿瘤体积分别为 $(1156.38 \pm 110.75) \text{ mm}^3$ 和 $(1641.60 \pm 153.15) \text{ mm}^3$, 较对照组的 $(2437.03 \pm 223.16) \text{ mm}^3$, 分别缩小 52.55% 和 32.64% ($P < 0.05$), 联合放疗组比放疗组缩小 29.56% ($P < 0.05$)。联合放疗组肿瘤生长抑制率(TGIR)为 57.00%, 显著高于放疗组的 34.83% ($P < 0.05$)。结论 阿帕替尼联合放疗可明显抑制宫颈癌 Ki-67 阳性表达率, 提高肿瘤生长抑制率。建议其可用于 Ki-67 高表达率的宫颈癌患者。

关键词:阿帕替尼; 宫颈癌; HeLa 细胞; 放射治疗; Ki-67; 肿瘤生长抑制

中图分类号: R969.4; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)05-0027-03

Effect of Apatinib Combined with Radiotherapy on the Expression of Ki-67 in HeLa Cells and Its Correlation with Growth Inhibition

PENG Hongju, LIU Wei, ZHANG Jianwen, YUE Hongcheng, FU Shaozhi

(Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To investigate the effect of apatinib combined with radiotherapy on the expression of Ki-67 in HeLa cells of cervical cancer and its correlation with the tumor growth inhibition rate(TGIR). **Methods** BALB/c-nu tumor-bearing mice were randomly divided into the control group, simple radiotherapy group and apatinib combined radiotherapy group(combined group). The Ki-67 expression was detected by immunohistochemical streptavidin peroxidase(SP) method. **Results** The positive expression rates of Ki-67 in the combined group and the radiotherapy group were $(14.40 \pm 2.72)\%$ and $(66.78 \pm 5.01)\%$, which decreased 84.49% and 28.06% compared to $(92.83 \pm 4.04)\%$ in the control group($P < 0.05$), the combined group decreased 78.44% compared to the radiotherapy group($P < 0.05$). The tumor volumes of in the combined group and the radiotherapy group were $(1156.38 \pm 110.75) \text{ mm}^3$ and $(1641.60 \pm 153.15) \text{ mm}^3$, which reduced 52.55% and 32.64% compared to $(2437.03 \pm 223.16) \text{ mm}^3$ in the control group ($P < 0.05$), the combined group reduced 29.56% compared to the radiotherapy group($P < 0.05$). The TGIR of the combined group was 57.00%, which was significantly higher than 34.83% of the radiotherapy group($P < 0.05$). **Conclusion** Apatinib combined with radiotherapy can obviously inhibit the positive expression rates of Ki-67 for cervical cancer and improve TGIR. It is recommended that this therapeutic regimen can be used for cervical cancer patients with high expression of Ki-67.

Key words: apatinib; cervical cancer; HeLa cells; radiotherapy; Ki-67; tumor growth inhibition

宫颈癌(cervical cancer)是女性常见恶性肿瘤, 发展中国家发病率高^[1], 2009 和 2010 年位居中国肿瘤的第 10 位^[2-3]。阿帕替尼(apatinib)为新一代口服抗血管生成药物, 在胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤中均具有良好的抗肿瘤作用^[4-7], 但与放射治疗(简称放疗)联合应用的报道较少。本研究中探讨阿帕替尼联合放疗治疗宫颈癌对 Ki-67 阳性表达率的抑制作用, 以及 Ki-67 阳性表达率变化与肿瘤生长抑制率的关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物、仪器与试剂

细胞、动物: 对数生长的 HeLa 细胞株(西南医科大学附属医院); 健康 BALB/c-nu 雌性裸小鼠(4~5 周龄、体质量 18~20 g, 重庆腾鑫华阜生物科技公司, 动物许可证编号为 SCXK<京>2014-0004, SPF 级饲养)。

仪器: 直线加速器(Elekta); 石蜡切片机(德国莱卡仪器有限公司); 新型 BGZ 系列 II 型高精度烤箱(上海

*基金项目: CSCO-恒瑞肿瘤研究基金[Y-HR2016-046]。

第一作者: 彭红菊, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为肿瘤放化疗综合治疗, (电子信箱)1019186773@qq.com。

[△]通信作者: 张建文, 男, 硕士研究生, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为肿瘤放化疗综合治疗, (电子信箱)zhangjianwen66@126.com。

博讯实业有限公司);移液器(德国艾本德公司);倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司)。

试药:甲磺酸阿帕替尼片[江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H20140103,规格按阿帕替尼($C_{24}H_{23}N_5O$)计每片250 mg],化学名称为N-[4-(1-氰基环戊基)苯基]-2-(4-吡啶甲基)氨基-3-吡啶甲酰胺甲磺酸盐,分子式为 $C_{24}H_{23}N_5O \cdot CH_3SO_3$,相对分子质量为493.58。DMEM高糖完全培养基(美国Hyclone公司,胎牛血清:双抗:DMEM培养基体积比为10:1:90,配制10%的完全培养基);10%胎牛血清(美国Hyclone公司);0.25%胰酶(上海碧云天公司);青霉素-链霉素抗体(上海碧云天公司);Ki-67抗体(美国BioWorld公司);DMSO(美国Sigma公司)。

1.2 方法

荷瘤小鼠模型建立及分组:取HeLa细胞株,接种于小鼠右后肢根部皮下,观察记录裸鼠一般状态、体重、成瘤情况及瘤体积变化。待肿瘤体积达到100~150 mm³时,荷瘤鼠随机分为3组,每组12只。对照组予生理盐水0.1 mL/d灌胃第1天至第7天;单纯放疗组(放疗组)连续观察7 d,第7天开始放疗($D_t = 8 \text{ Gy}/F \times 1 \text{ 次} \times 1 \text{ d}$);阿帕替尼联合放疗组(联合组)将配制好的阿帕替尼溶液(质量浓度为40 g/L),每只裸鼠按200 mg/(kg·d)剂量给予灌胃,连续灌胃7 d,第7天灌胃完成后2 h行放疗($D_t = 8 \text{ Gy}/F \times 1 \text{ 次} \times 1 \text{ d}$)。于实验完成后第2天各组处死6只,采集肿瘤标本,用于Ki-67检测,余6只用于观察肿瘤体积变化。

阿帕替尼溶液配制:取阿帕替尼片(规格为每片250 mg),按40 mg阿帕替尼:1 mL 0.9%氯化钠注射液比例配制成质量浓度为40 g/L的阿帕替尼灌胃液,于开始灌胃前30 min配制备用。

Ki-67表达检测:采用免疫组化SP法检测,细胞核染色呈棕黄色或褐色判为阳性。随机选取各组肿瘤组织切片中高倍镜下5个视野,并计数Ki-67阳性细胞个数,计算5个视野下阳性细胞数占总细胞数的比例即为Ki-67阳性表达率。

肿瘤体积和肿瘤生长抑制率计算:各组于实验结束后第1天开始,每隔2 d测量各组移植瘤最大直径(A, mm)与最小直径(B, mm),直至第25天。计算各组肿瘤体积(TV)平均值,作为各组最终用于评价TV,根据最终TV计算肿瘤生长抑制率(TGIR), $TV = A \times B^2/2$; $TGIR = (TV_{\text{对照组}} - TV_{\text{联合组}})/TV_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件分析。计量数据以均数±标准差($\bar{X} \pm s$)表示,行独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ki-67阳性表达率

联合组Ki-67阳性表达率低于15%,放疗组高于60%,分别比对照组降低84.49%和28.06%;联合组Ki-67阳性表达率比放疗组降低78.44%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表1和图1。

表1 各组Ki-67表达情况比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	阳性表达率($\bar{X} \pm s, \%$)	P_1 值/ t_1 值 [△]	P_2 值/ t_2 值 [*]
对照组	92.83 ± 4.04		
放疗组	66.78 ± 5.01	0.00/7.01	
联合组	14.40 ± 2.72	0.00/16.81	0.00/15.91

注:△为与对照组比较,*为与放疗组比较。下表同。

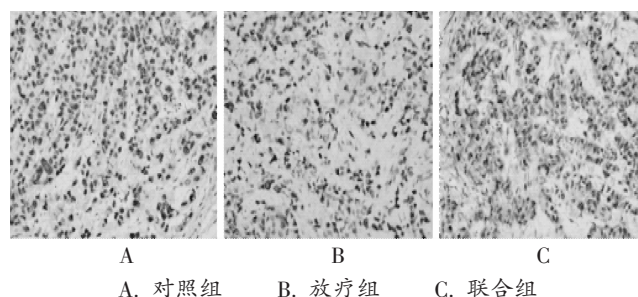


图1 肿瘤Ki-67表达情况(×400)

2.2 肿瘤体积和TGIR

联合组肿瘤体积最小,对照组最大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合组和放疗组肿瘤体积分别比对照组缩小52.55%和32.64%,联合组比放疗组缩小29.56%。联合组TGIR最高,比放疗组高22.17%。详见表2。

表2 各组肿瘤体积和TGIR比较($n=6$)

组别	肿瘤体积($\bar{X} \pm s, \text{mm}^3$)	TGIR(%)	P_1 值/ t_1 值	P_2 值/ t_2 值
对照组	2 437.03 ± 223.16			
放疗组	1 641.60 ± 153.15	34.83	0.01/5.09	
联合组	1 156.38 ± 110.75	57.00	0.00/8.90	0.01/4.45

3 讨论

Ki-67是反映肿瘤细胞增殖活性的指标,在脑膜瘤、结直肠癌、乳腺癌、膀胱癌、宫颈癌等多种肿瘤中均有不同程度表达^[8-12]。世界卫生组织(WHO)Ⅱ级脑膜瘤中,Ki-67的平均表达值为13%(1%~47%)^[18]。结直肠癌中,Ki-67表达阳性表达率≥20%^[19]。组织学检测宫颈上皮内瘤变1,2,3级Ki-67阳性表达率分别为2.13%,19.93%和23.22%,宫颈癌中Ki-67阳性表达率为69.72%~75.0%^[12-13]。提示宫颈癌是具有高度增殖活性的肿瘤。本研究中,宫颈癌HeLa细胞Ki-67阳性表达率为(92.83 ± 4.04)%,高于文献[12-13]报道,预示宫颈癌HeLa细胞是具有高增殖活性。

肿瘤组织中Ki-67阳性表达率高低与预后有相关

性。WHO II级脑膜瘤术后放疗与Ki-67表达研究显示,局部复发患者Ki-67平均表达值为15%,无复发患者Ki-67平均表达值为12%,Ki-67>13%显著影响局部控制率^[8]。三阴乳腺癌新辅助化疗,病理完全缓解和无效的Ki-67表达显著截止值为20%^[14]。结直肠癌中Ki-67表达与TNM分期密切相关,TNM分期越高,Ki-67表达越高,Ki-67高表达的5年无复发生存率为53%,Ki-67低表达为89%^[9]。宫颈癌Ki-67阳性表达中位总生存期55个月,阴性表达60个月,局部控制率分别为80.7%和89.2%^[15]。因此,宫颈癌Ki-67阳性表达对生存期和局部控制率均有影响。

降低肿瘤组织中Ki-67表达水平,有可能改善患者预后。宫颈癌研究中,卡铂+紫杉醇联合化疗,可使Ki-67阳性表达率由化疗前的76.00%降至化疗后的20.00%^[16]。本研究结果提示,宫颈癌单纯放疗对Ki-67阳性表达率抑制非常有限,在放疗基础上联合阿帕替尼可明显抑制Ki-67阳性表达率,预示阿帕替尼联合放疗能明显抑制宫颈癌HeLa细胞增殖活性。

肿瘤体积越大,负荷越大,肿瘤生长越快,肿瘤生长抑制率越低,无论是化疗、手术治疗,还是放疗,首要结果是降低肿瘤负荷,提高肿瘤生长抑制率。因此,肿瘤生长抑制情况与抗肿瘤治疗相关^[17],紫杉醇、他莫昔芬等与肿瘤生长抑制研究较多相关^[18-19]。本研究结果提示,阿帕替尼联合放疗能使宫颈癌HeLa细胞肿瘤体积明显缩小,效应远大于单纯放疗,肿瘤生长抑制率提高。宫颈癌阿帕替尼联合放疗可能存在明显协同作用。

综上所述,宫颈癌阿帕替尼联合放疗可明显抑制Ki-67阳性表达率,抑制宫颈癌HeLa细胞增殖活性,导致肿瘤体积缩小,提高肿瘤生长抑制,可能存在明显协同抗肿瘤作用,Ki-67阳性表达率降低是可能机制。建议Ki-67阳性表达率较高的宫颈癌患者临床使用。

参考文献:

[1] JUNG KW, WON YJ, KONG HJ, et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010[J]. Cancer Res Treat, 2013, 45(1): 1-14.
[2] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1): 48-58.
[3] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(3): 106-112.
[4] YU WC, ZHANG KZ, CHEN SG, et al. Efficacy and Safety of apatinib in patients with intermediate/advanced hepatocellular carcinoma: a prospective observation study[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(3): e9704.
[5] ZHAO C, ZHANG Q, QIAO W. Significant efficacy and well safety of apatinib combined with radiotherapy in NSCLC: Case report[J].

Medicine (Baltimore), 2017, 96(50): e9276.

[6] ZHAO TT, XU H, XU HM, et al. The efficacy and safety of targeted therapy with or without chemotherapy in advanced gastric cancer treatment: a network meta-analysis of well-designed randomized controlled trials[J]. Gastric Cancer, 2018, 21(3): 361-371.
[7] HU X, ZHANG J, XU B, et al. Multicenter phase II study of apatinib, a novel VEGFR inhibitor in heavily pretreated patients with metastatic triple-negative breast cancer[J]. Int J Cancer, 2014, 135(8): 1961-1969.
[8] CHOI Y, LIM DH, YU JI, et al. Prognostic Value of Ki-67 Labeling Index and Postoperative Radiotherapy in WHO Grade II Meningioma[J]. Am J Clin Oncol, 2018, 41(1): 18-23.
[9] WANG L, LIU Z, FISHER KW, et al. Prognostic value of programmed death ligand 1, p53, and Ki-67 in patients with advanced-stage colorectal cancer[J]. Hum Pathol, 2018, 71: 20-29.
[10] ZENZOLA V, CABEZAS-QUINTARIO MA, ARGUELLES M, et al. Prognostic value of Ki-67 according to age in patients with triple-negative breast cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20(11): 1448-1454.
[11] WARLI SM, KADAR DD, SIREGAR GP, et al. Ki-67 Expression as a Predictive Factor of Muscle Invasion in Bladder Cancer[J]. Open Access Maced J Med Sci, 2018, 6(2): 260-262.
[12] 黄辉, 赵丹洋, 刘美莲, 等. Ki-67与宫颈癌患者预后的相关性研究[J]. 华夏医学, 2016, 29(5): 44-47.
[13] CELEWICZ A, CELEWICZ M, WEZOWSKA M, et al. Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer[J]. Pol J Pathol, 2018, 69(1): 42-47.
[14] ÁCS B, ZÁMBÓ V, VÍZKELETI L, et al. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. Diagn Pathol, 2017, 12(1): 20.
[15] 赵丹洋, 刘美莲. Ki-67与宫颈癌不同辅助治疗方案的远期疗效比较[J]. 福建医科大学学报, 2016, 50(3): 195-200.
[16] 于春霞, 李霞, 周琦. 宫颈癌新辅助化疗前后Survivin、VEGF和Ki-67的变化及临床意义[J]. 中国临床研究, 2016, 29(6): 814-816.
[17] TERRANOVA N, TOSCA EM, BORELLA E, et al. Modeling tumor growth inhibition and toxicity outcome after administration of anticancer agents in xenograft mice: A Dynamic Energy Budget (DEB) approach[J]. J Theor Biol, 2018, 450: 1-14.
[18] YUAN S, SUN Q, CHEN Y, et al. A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Tamoxifen and Endoxifen to Predict Their Distribution and Effects on Inhibition of Tumor Growth[J]. Drug Metab Lett, 2017, 11(2): 93-101.
[19] HU J, FU S, PENG Q, et al. Paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles combined with chronomodulated chemotherapy on lung cancer: In vitro and in vivo evaluation[J]. Int J Pharm, 2017, 516(1-2): 313-322.

(收稿日期:2018-07-11)