DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.021
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0413-03

论著

抗VEGF抗体对骨肉瘤OS-732细胞血管生成及其肿瘤细胞增殖、凋亡的影响

李颖嘉,王 东,高奉浔 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨阻断血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的血管生成作用对骨肉瘤OS-732细胞及血管内皮细胞增殖、凋亡的影响。方法 应用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型,通过解剖显微镜血管计数,光镜HE染色,原位末端标记及PCNA免疫组化检测观察VEGF抗体对骨肉瘤血管生成及肿瘤增殖,凋亡状态的影响。结果 VEGF抗体组肿瘤区血管数目及瘤细胞数显著低于PBS对照组,肿瘤细胞凋亡指数显著高于PBS对照组,增殖指数两组差异不明显,同时VEGF抗体组凋亡的微血管内皮细胞增多,增殖期微血管内皮细胞少见。结论 VEGF抗体能显著抑制骨肉瘤OS-732血管生成,抑制内皮细胞增殖,促进内皮细胞凋亡,可能是VEGF抗体发挥抗血管生成作用的途径之一,并可能通过抑制血管形成而促进肿瘤细胞凋亡,最终达到抑制瘤细胞生长的作用。

关键词:血管内皮生长因子;骨肉瘤;抗体;增殖;凋亡
中图法分类号:R329.28;R392.1;R738.1 文献标识码:A

Effects of anti-VEGF antibody on angiogenesis and proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell line OS-732

LI Ying-jia, WANG Dong, GAO Feng-xun (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of anti-VEGF antibody on angiogenesis and on the proliferation and apoptosis of the osteosarcoma OS-732 cells and the vascular endothelial cells. Methods The effects of polyclonal antibody against VEGF on OS-732 induced angiogenesis were observed by a stero-microscope and light microscope in a tumor model of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). Furtheremore, the proliferation and apoptosis of tumor cells and vascular endothelial cells were examined by TdT-mediated dUTP nick and labelling (TUNEL) and immunohistochemical staining by using monoclonal antibody for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Results The number of both the newly formed vessels in the tumor and the tumor population were significantly decreased in the anti-VEGF antibody group as compared with that of the PBS control group. The apoptotic index for tumor cell was higher in the anti-VEGF antibody treated group than that in the negative control group, but the proliferation index was not significantly different between them. At the same time, increased apoptotic cells and decreased proliferation in vascular endothelial cells were also noted. Conclusion VEGF antibody can inhibit the neovascularization of OS-732, probabaly by the mechanism of inhibiting the proliferation and promoting the apoptosis of vascular endothelial cells, further might be contributive to the apoptosis of tumor cells and result in suppression of tumor growth.

Key words: vascular endothelial growth factor; osteosarcoma; antibody; proliferate; apoptosis

细胞过度增殖和凋亡抑制是转化细胞的共同特点,二者平衡失调导致细胞无限蓄积和肿瘤形成[1]。近年来关于增殖和凋亡影响肿瘤生物学行为方面已有报道,但多数研究主要集中于增殖、凋亡在肿瘤发生、发展中的作用,而对于增殖、凋亡与肿瘤血管形成关系的报道甚少。本室继往的研究证实VEGF抗体能够显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜上骨肉瘤OS-732的血管形成并影响肿瘤细胞生长[2],为进一步探讨VEGF抗体抗血管生成作用与瘤细胞增殖、凋亡之间的关系,本研究采用免疫组化技术及原位末端标记技术检测给予VEGF抗体后细胞增殖及凋亡的变化,以期为从抗血管生成途径治疗骨肉瘤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株和细胞培养

人骨肉瘤细胞株OS-732,购自北京积水潭医院骨科实验室,于含10%新生小牛血清的RPMI-1640培养液中,37 ℃、5% CO_2、95%空气、饱和湿度下,CO_2孵箱内培养。

1.2 VEGF抗体来源

VEGF抗体为Santa Cruz产品,是亲和纯化的抗GST融合蛋白的兔源性多克隆抗体,GST融合蛋白包含有人源性VEGF序列。本抗体能与鼠、兔及人源性VEGF起反应,可识别3种剪切形式的VEGF,包括VEGF165、VEGF189、VEGF121,其中142~185氨基酸序列具有特异性。

1.3 胚蛋孵化及瘤细胞接种

胚蛋经福尔马林熏蒸消毒20 min后置于37.8 ℃,相对湿度为60%~80%恒温孵箱中,胚头斜向上方,孵育至9 d时制备CAM,制备方法参考付生法[3]的方法。胚蛋20只,随机分为2组,每组10只。暴露已制备好的CAM,选择近胚头1 cm处的两条前卵黄静脉间的相对无血管区接种对数生长期OS-732细胞,每只5×10^6/100 μl,共接种20只。接种24 h后,以甲基纤维素碟为载体,治疗组每只给予VEGF抗体10 μg/100 μl,对照组每只给予PBS 100 μl。给予VEGF抗体或PBS后第8天于解剖显微镜下以测微尺确定接种区周围5 mm范围并计数血管数目,同时观察有无出现接种区周围血管向致瘤区弯曲、靠近、呈放射状集中,即"血管辐辏现象"。

1.4 组织切片及原位铺片的制备

给予VEGF抗体8 d后CAM常规4%多聚甲醛原位固定,

基金项目:全军"九五"青年基金资助项目(96Q074)
作者简介:李颖嘉(1968-),女,四川省乐至县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤血管生成方面的研究,发表论文8篇,现在第一军医大学南方医院超声诊断科,广州 510515。电话:(020)85142100
收稿日期:2000-05-24;修回日期:2000-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

取膜，石蜡包埋，4 μm 连续切片，行 HE 及免疫组化、TUNEL 检测。另取部分标本平铺于大玻片，染色、脱水、透明，各步骤较常规 HE 染色处理时间延长。

1.5 PCNA 免疫组化及原位细胞凋亡检测

PCNA 单克隆抗体 PC10 购自 DaKo 公司，工作浓度为 1∶50，免疫组化染色采用 SP 法。TUNEL 试剂盒购自宝灵曼公司，参照说明进行。细胞增殖指数（Proliferation index，PI）及凋亡指数（Apoptotic index，AI）的测定：每张切片选择 5 个阳性染色最明显的高倍视野（× 400），每个视野计数 100 个肿瘤细胞中的阳性细胞数，取均值。

1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，方差分析确定均数间差异显著性，χ^2 检验确定率间差异显著性。

2 结果

2.1 VEGF 抗体对人 OS-732 骨肉瘤细胞诱导血管及肿瘤生长的抑制作用

给予 VEGF 抗体后第 8 天，肿瘤诱导的血管生成受到明显抑制，VEGF 抗体组血管数目（30.0±4.6）显著低于 PBS 对照组（51.0±6.9，$P<0.01$），此时治疗组有 2 例（2/10）出现血管辐辏现象，PBS 对照组出现 8 例，两组比较有统计学差异（$P<0.05$）。VEGF 抗体组肉眼成瘤率 0%（0/10），较 PBS 对照组肉眼成瘤率 40%（4/10）为低，但无统计学差异。镜下两组均成瘤，但 VEGF 抗体组瘤细胞明显减少，分布稀疏，肿瘤边缘区及瘤细胞之间新生小血管少。而 PBS 对照组可见瘤细胞弥漫分布，肿瘤边缘区大量宿主血管向瘤区集中伴有较多的新生微血管形成，瘤细胞之间新生血管丰富。

2.2 细胞增殖及凋亡的变化

凋亡细胞核呈黄色或棕黄色全着色，胞浆一般不着色或淡着色，结合凋亡细胞形态特征注意将其与坏死细胞区别。凋亡细胞中可见浓缩的核质紧贴于核膜，或核质出现均匀染色。此外，切片中常可见到凋亡小体，散在分布。坏死细胞呈片状分布，伴有炎症反应，TUNEL 显示其胞核和胞浆全着色。PCNA 阳性染色定位于细胞核，呈棕黄色颗粒或弥漫分布。VEGF 抗体组肿瘤细胞凋亡指数较 PBS 对照组显著增高（$P<0.01$），增殖指数 VEGF 抗体组较 PBS 对照组稍低，但无统计学差异（$P>0.05$），见表 1、图 1、2。VEGF 抗体组还可见较多呈 TUNEL 阳性着色的内皮细胞，内皮细胞 PCNA 阳性着色少见；PBS 对照组内皮细胞 TUNEL 着色极少见，但易见 PCNA 阳性着色。

表 1 CAM OS-732 细胞凋亡及增殖的变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of apoptotic index and proliferation index of OS-732 tumor cells on the chick embryo chorioallantoic membrane（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	AI（%）	PI（%）
PBS-control	10	3.75±0.73	45.12±5.12
Anti-VEGF	10	16.98±4.81**	47.34±3.57

**：$P<0.01$ *vs* PBS-control

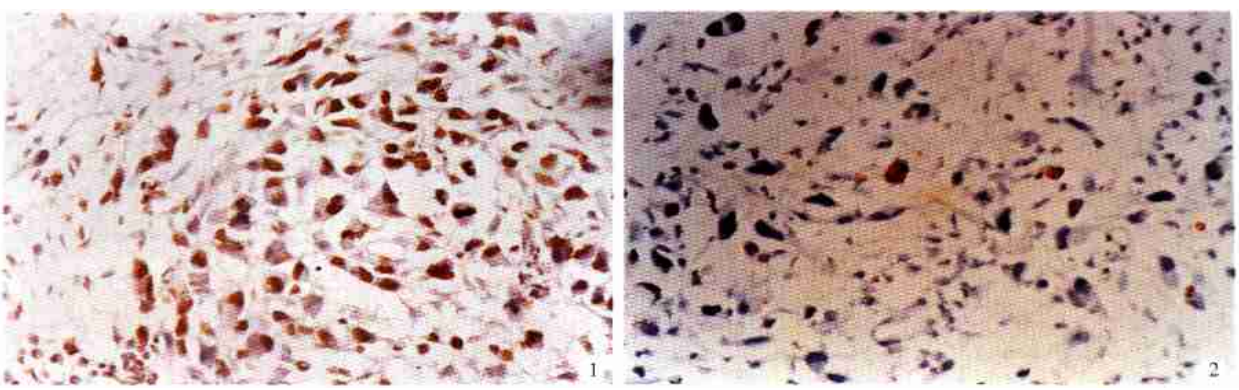


图 1 VEGF 抗体组可见较多凋亡的肿瘤细胞 （TUNEL× 400）

Fig 1 Many apoptotic tumor cells were found in anti-VEGF group （TUNEL× 400）

图 2 PBS 对照组凋亡的肿瘤细胞少 （TUNEL× 400）

Fig 2 Fewer apoptotic tumor cells were found in PBS-control group （TUNEL× 400）

3 讨论

目前关于肿瘤血管形成与肿瘤增殖、凋亡关系的研究甚少，已有的报道多侧重于探讨肿瘤血管形成可能导致肿瘤细胞过度增殖的问题上[4]。新近 Lu 等[5]研究 101 例胃癌中增殖、凋亡与肿瘤内微血管密度的关系，首次证实了肿瘤细胞凋亡与血管形成呈显著负相关，高度血管化的肿瘤其凋亡指数显著低于低血管化肿瘤，与此同时其增殖指数并无明显差异，提示肿瘤诱导血管形成可能导致肿瘤细胞凋亡抑制。研究表明缺氧可能是连接肿瘤细胞凋亡及新生血管形成的关键环节，予以缺氧刺激可筛选出凋亡抵抗细胞。业已证实缺氧可上调 VEGF 表达而促进肿瘤血管形成，因此有理由推测阻断 VEGF 的血管生成作用可能通过促进肿瘤细胞凋亡的途径而最终抑制肿瘤生长。本室继往的研究结果显示对于高表达 VEGF 并具有较强血管生成能力的骨肉瘤 OS-732，给予 VEGF 多克隆抗体后肿瘤内血管数目显著减少，肿瘤细胞减少[2]。本实验结果进一步表明 VEGF 抗体在抑制 OS-732 血管生成及肿瘤细胞生长的同时，肿瘤细胞的增殖指数并没有明显改变（$P>0.05$），而肿瘤细胞的凋亡指数显著增长（$P<0.01$），证实了上述推测。有作者研究表达 Rip-Tag 的转基因小鼠胰岛细胞瘤，发现该肿瘤细胞显示极低水平的凋亡发生，这种低水平的凋亡依赖于持续

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不断的血管生成。以基因剔除的方法阻断血管刺激因子 IGF-Ⅱ的正常表达或分别给予重组的血管生成抑制剂 IFN-α, minocycline 及 TNP-470, 均导致肿瘤内血管密度减少, 肿瘤奇迹般缩小, 与此同时处于增殖期的肿瘤细胞数并未减少, 但肿瘤细胞凋亡指数明显提高[6], 我们的实验结果与之一致。目前对此现象的解释认为血管形成通过旁分泌机制调控了肿瘤细胞凋亡发生, 由血管内皮细胞、巨噬细胞及其它一些宿主细胞产生的血管生长因子通过介导血管形成而支持肿瘤细胞生长, 抑制肿瘤细胞凋亡[7,8]。间接提示阻断血管生长因子的血管生成作用可能通过促进肿瘤细凋亡的途径而影响肿瘤生长。

本实验还发现给予 VEGF 抗体后在增多的凋亡肿瘤细胞附近可见较多凋亡的微血管内皮细胞, 处于增殖期的内皮细胞少见。抑制 VEGF 的作用能够促进内皮细胞凋亡而导致血管消退, Alon 等[9] 在新生儿视网膜病变的研究中有类似的报道。Alon 发现将新生鼠暴露于高氧环境后 VEGF 表达降低的同时凋亡的内皮细胞增加, 视网膜血管形成减少, 相反在暴露于高氧的起始时期给予眼内注射 VEGF 可以抑制内皮细胞凋亡而使视网膜血管重建。本结果提示抑制内皮细胞增殖, 促进内皮细胞凋亡可能是 VEGF 抗体发挥抗血管生成作用的途径之一。

对于高度血管化肿瘤, 封闭 VEGF 功能有很大治疗意义已在横纹肌肉瘤, 恶性胶质瘤, 平滑肌肉瘤等多种肿瘤实验性动物模型中取得显著抑瘤效果。本结果在证实 VEGF 抗体对人骨肉瘤 OS-732 血管形成及肿瘤生长抑制作用的同时进一步探讨其机制, 表明 VEGF 可能成为抗骨肉瘤血管生成治疗的一个理想靶点。

参考文献:

[1] King K L, Cidlowski J A. Cell cycle and apoptosis: comman pathways to life and death[J]. J Cell Biochem, 1995, 58(2): 175—180.

[2] 李颖嘉, 王　东, 高奉浔. VEGF 抗体对骨肉瘤 OS-732 血管生成的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(7): 495—498.

[3] 付生法. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术[J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17(4): 294.

[4] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(18): 3 964—3 968.

[5] Lu C, Tanigawa N. Spontaneous apoptosis is inversely related to intra-tumoral microvessel density in gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 1997, 57(2): 221—224.

[6] Christofori G, Naik P, Hanahan D. Deregulation of both imprinted and expressed alleles of the insulin like growth factor Ⅱ gene during β-cell tumorigenesis[J]. Nat Genet, 1995, 10(2): 196—201.

[7] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorgensis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353—364.

[8] Tanaka S, Wands J R. Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor β1-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 1996, 56(15): 3 391—3 394.

[9] Alon T, Hemo I, Itin A, *et al*. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity[J]. Nat Med, 1995, 1(10): 1 024—1 028.

（编辑　薛国文）

（上接 412 页）

3　讨论

E-cadherin 为一种钙依赖性的跨膜糖蛋白, 参与形成和维护正常细胞间的联结, 是介导细胞间联结最重要的一类分子。上皮钙粘蛋白(E-cadherin)主要存在于人和动物的上皮细胞, 是维护上皮细胞形态和结构的完整性和极性的重要分子[1]。人类 E-cadherin 基因定位于 16 号染色体 q22.1。E-cadherin 在人类癌肿中的表达情况已有较多的报道, 尽管其研究结果不尽一致, 但已证实和癌肿生物学行为之间存在必然联系。其内在本质是 E-cadherin 表达下降, 致其介导的细胞粘附特性减弱, 从而继发一系列的癌细胞浸润、播散、转移的病理过程。

1989 年, Behrens[2] 发现 E-cadherin 的粘附功能丧失可使细胞获得高侵袭表型。无侵袭力的 MDCK 细胞表面表达较多的 E-cadherin 分子。体外试验从正反两方面充分证明 E-cadherin 确有抑制侵袭转移功能[3,4]。大量临床研究也证明, 临床各主要肿瘤, 包括乳腺癌[5] 等, E-cadherin 丧失或下调与肿瘤细胞高侵袭转移性、肿瘤病期进展和病人预后不良密切相关[1]。因此, E-cadherin 具有肿瘤转移抑制功能, E-cadherin 基因是一个重要的肿瘤转移抑制基因。

本研究发现, E-cadherin 在肝细胞癌的阳性率为 33.33%, 显著低于癌旁肝组织的 E-cadherin 阳性率 77.78%, 说明 E-cadherin 表达异常可能与肝细胞癌的发生有一定关系。而转移组 E-cadherin 的阳性率 16.7% 明显低于未转移组 42.9%（$P<0.05$), 提示, E-cadherin 的下调使肝癌细胞出现高侵袭转移表型, 同种细胞间的粘附减弱或丧失, 癌细胞扩散, 向其他部位转移。对 E-cadherin 在侵袭转移中作用的深入研究可望找到新的治疗方法。

关键词: 肝癌; E-cadherin; 肿瘤浸润
中图法分类号: R735.7　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Birchmeier W. Cadherin expression in carcinomas: role of the formation of cell junction and the prevention of invasiveness[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1 198(1): 11—26.

[2] Behrens J, Mareel M M, Van Roy F M, *et al*. Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cell acquire invasive properities after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion[J]. J Cell Biol, 1989, 108(6): 2 435—2 447.

[3] Frixen U H, Behrens J, Sachs M. E-cadherin-medicated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells[J]. J Cell Biol, 1991, 113(1): 173—185.

[4] Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogentic regulator[J]. Science, 1991, 251(5 000): 1 451—1 455.

[5] Moll R, Mitze M, Frixen U H, *et al*. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinoma[J]. Am J Pathol, 1993, 143(6): 1 731—1 742.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net