DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.014

VEGF抗体对骨肉瘤OS-732血管生成的抑制作用*

李颖嘉** 王 东 高奉浔 陈 俐 (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:研究血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor VEGF)抗体的抗骨肉瘤血管生成作用。方法:应用鸡胚尿囊膜(Chick embryo chorioallantoic membrane,CAM)模型观察VEGF抗体对骨肉瘤血管生成及肿瘤生长的影响。结果:VEGF抗体组血管数目在给予抗体后第2、4、6、8天均显著低于PBS对照组($P<0.05$或$P<0.01$),光镜下瘤细胞减少,新生血管腔减少。结论:VEGF抗体对骨肉瘤治疗具有良好的应用前景。

关键词 血管内皮生长因子;骨肉瘤;抗体;鸡胚尿囊膜

中图法分类号 R392.11;R738.1

实体瘤的生长和转移是依赖于血管生成的[1,2],因此干扰和阻断肿瘤血供是有效的治疗方法。我们过去的研究表明肿瘤内微血管密度(Intratumoral microvessel density,MVD)与骨肉瘤的转移和预后有关[3],在多种血管生成相关因子中,VEGF持续高表达,证明VEGF是人体骨肉瘤重要的血管生成相关因子之一。据此,本实验以VEGF为靶点,选择高表达VEGF的骨肉瘤细胞株OS-732接种鸡胚尿囊膜(CAM)并给予VEGF抗体,观察其对骨肉瘤血管生成的抑制作用,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 材料

人骨肉瘤OS-732细胞株购自北京积水潭医院骨科实验室。VEGF抗体是亲和纯化的抗GST融合蛋白的兔源性多克隆抗体,其中GST融合蛋白包含有人源性VEGF序列。本抗体为Santa Cruz产品,购自北京中山生物技术公司。

1.2 胚蛋来源及制备

胚蛋源于西南农业大学养鸡场,天平称重选择大小相仿的纯种华联蛋,经福尔马林熏蒸消毒20 min后置于37.8 ℃,相对湿度为60%~80%的恒温孵箱中,胚头斜向上方,孵育至9 d时制备鸡胚尿囊膜,制备方法参考付生法[4]的方法并加以改进。

1.3 瘤细胞接种及实验分组

胚蛋30只,随机分为3组,每组10只。暴露已制备好的CAM,选择近胚头1 cm处两条前卵黄静脉之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,共接种两组。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。甲基纤维素碟的制备参考付生法[4]的方法。另设空白对照组,开窗后不给予任何措施,用以排除胚蛋开窗后污染、操作技术等非处理因素对实验结果的干扰。上述3组鸡胚分别在给予VEGF抗体或PBS后第2、4、6、8天于解剖显微镜下以测微尺确定接种区周围5 mm范围并计数该范围内的血管数目,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 原位铺片及石蜡切片的制备和观察

CAM常规4%多聚甲醛原位固定15 min,以接种区为中心取膜,部分标本常规石蜡包埋,切片HE染色,另取部分标本平铺于透明大玻片上,苏木素染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,各步骤较常规HE染色处理时间延长。光镜下观察肿瘤细胞生长情况、肿瘤区内部新生血管的分布、数量及与周围宿主血管的关系。

1.5 统计学处理

实验数据用SPLM软件处理,方差分析确定均数间差异显著性,Fisher确切概率法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生成的抑制作用

图1示不同时相点VEGF抗体对人OS-732骨肉瘤细胞诱导血管生成的抑制作用。给予VEGF抗体后第2~6天,肿瘤诱导的血管生成受到明显抑制,VEGF抗体组血管数目显著低于PBS对照组($P<0.05$或$P<0.01$),并在第2~4天接近正常空白对照组($P>0.05$),而此期亦为OS-732骨肉瘤细胞诱导

* 全军"九五"青年基金项目,No. 96Q074

** 李颖嘉,女,29岁,住院医师,硕士研究生

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

血管生成能力最强的时期，第 6 天后血管抑制作用减弱，VEGF 抗体组血管密度上升幅度较 PBS 对照组稍缓，第 8 天时血管密度仍远低于 PBS 对照组（$P<0.01$），但高于空白对照组（$P>0.05$）。给予 VEGF 抗体第 2 天治疗组无 1 例(0/10)出现血管辐辏现象，PBS 对照组已出现 4 例(4/10)，但两组间比较无统计学差异。第 8 天时治疗组有 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（$P<0.05$）。空白对照组始终无 1 例出现血管辐辏现象，见表 1，图 2 A、B、C。

2.2 原位铺片及组织切片 HE 染色观察

原位铺片及组织切片 HE 染色光镜下观察 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，其内新生小血管少，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，瘤细胞之间新生血管丰富，见图 2 D、E。

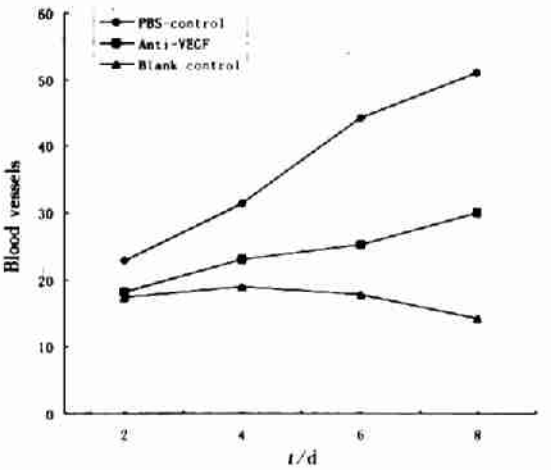


图 1 VEGF 多克隆抗体对鸡胚尿囊膜骨肉瘤 OS-732 血管生成的抑制作用

Fig 1 Effect of polyclonal antibody against VEGF on the angiogenesis of chick embryo chorioallantoic membrane induced by OS-732

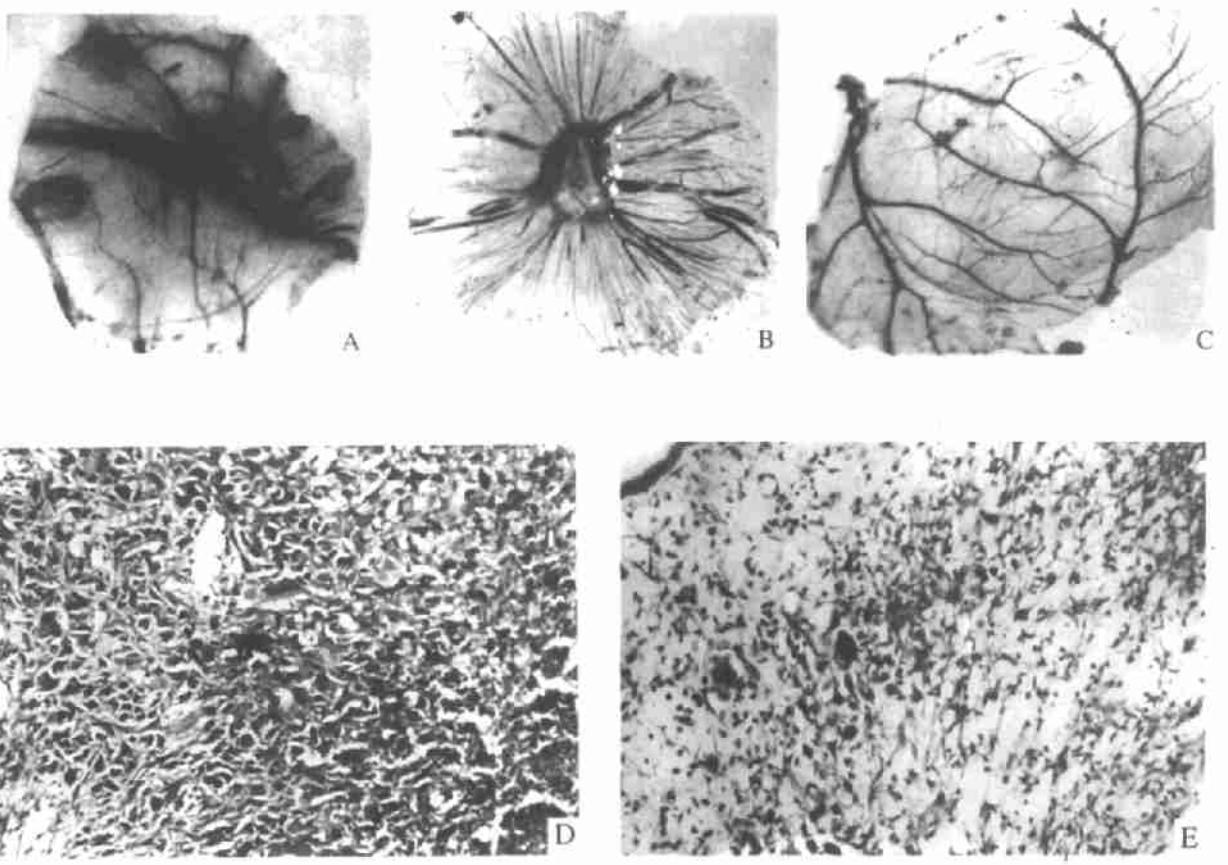


图 2 给予 VEGF 抗体 8 d 后，抗体对鸡胚尿囊膜骨肉瘤 OS-732 的生长及肿瘤血管生成的抑制作用

Fig 2 Inhibition of growth and neovascularation of OS-732 on the chick embryo chorioallantoic membrane by a polyclonal antibody against VEGF 8 days after treatment (A) Anti-VEGF group; (B) PBS control group; (C) Blank control group; (D) Anti-VEGF group (HE×200); (E) PBS control group (HE×200)

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

表 1　VEGF 多克隆抗体对鸡胚尿囊膜骨肉瘤 OS-732 的生长及血管生成的抑制作用

Tab 1　Inhibition of growth and neovascularization of OS-732 on the chick embryo chorioallantoic membrane by a polyclonal antibody against VEGF

Group	Grossly tumorigenic rate	Tumorigenic rate (by microscopy)	Blood vessels converge rate	Blood vessels count			
				2nd day	4th day	6th day	8th day
PBS-control	4/10	10/10	8/10	22.9±5.4	31.4±6.6	44.2±10.3	51.0±6.9
Anti-VEGF	0/10	10/10	2/10	18.2±3.4	23.4±5.3	25.2±5.5	30.0±4.6
Blank control	0/10	0	0	17.4±2.5	19.0±2.8	17.7±2.6	14.3±3.3

3　讨论

业已证明大多数实体恶性肿瘤能分泌多种促血管生长因子，诱导血管生成，支持肿瘤生长[5]。肿瘤诱生的血管无论在病理、生理还是形态功能上都有着特征性，这些都为传统的化疗药物构成了“血瘤屏障”，使得肿瘤细胞得以逃逸化疗药物的杀伤[6]。识别肿瘤血管生成过程与正常血管生成过程的差异，选择性攻击肿瘤血管特异性靶部位，将大大加速肿瘤治疗进程。VEGF 是从牛垂体滤泡星状细胞培养物中纯化分离出来的强烈的内皮细胞有丝分裂原，通过与内皮细胞上的酪氨酸激酶受体 fltl 和 KDR/flkl 特异性结合，使受体自身磷酸化而激活细胞内信号传导通路，产生生物效应如诱导内皮细胞增殖、迁移，调节内皮细胞整合素及蛋白酶激活因子的表达，增加微血管通透性，促进血浆蛋白外漏，基底膜降解，导致新的基质及新生血管腔形成。在迄今发现的 20 多种多肽类血管生长因子中，VEGF 是针对内皮细胞特异性最高，促血管生长作用最强的关键调节因子[7]，在多种原发性恶性肿瘤组织中均呈高表达[8]；新近 Takahashi[9] 发现 VEGF 高表达与结肠癌转移的发生有密切联系，提示 VEGF 在原位肿瘤的形成和生长及转移瘤的形成中均起着举足轻重的作用。已经证实其它多种血管生长因子是通过直接或间接诱导、刺激 VEGF 表达而发挥作用的，如 TGF-α、bFGF、TGF-β、TNF-α、KGF 等均可上调 VEGF 的表达[10,11]。因此，VEGF 是阻断肿瘤血供的理想靶点。Kim KJ 利用 VEGF 单抗成功地抑制了横纹肌肉瘤、恶性胶质瘤、平滑肌肉瘤在裸鼠体内的生长；Asano[12] 利用 $VEGF_{121}$ 单抗 MV_{303} 不仅抑制了体外培养的人脐静脉内皮细胞生长及 BALB/C 鼠体内人纤维肉瘤细胞株 HT-1080 的生长，而且抑制了 BALB/C 鼠转移瘤的形成。我们的实验证实 VEGF 多克隆抗体对骨肉瘤细胞 OS-732 的血管生成及肿瘤细胞的生长也有抑制作用，且 VEGF 多克隆抗体作用较 VEGF 单抗可能更全面，较小剂量时即能比较完全地阻断 VEGF 的作用。

本实验采用 CAM 模型，结合解剖显微镜下血管计数、大体观察及原位铺片的组织病理学观察，证实了 VEGF 抗体能够显著抑制骨肉瘤细胞 OS-732 的血管生成并影响肿瘤细胞生长。早在 70 年代，Wolf 就观察到肿瘤细胞能够诱导血管生成，“吸引”宿主血管主干向致瘤区弯曲、靠近，呈放射状集中的现象，骨肉瘤细胞 OS-732 诱导血管生成过程与之符合，且这一过程能被 VEGF 抗体抑制。进行抗肿瘤血管生成研究，CAM 模型能够同时观察肿瘤区血管变化及瘤细胞生长状态，效果直观而清晰。

本实验还发现在停止一次性给予抗体 6 d 后，抗体对肿瘤血管的抑制作用有减弱趋势，除可能跟抗体作用维持时间有关外，还由于肿瘤血管生成是一复杂的多步骤过程，调控因素甚多，单一阻断一种血管生长因子的作用并不能够完全达到抑瘤作用。因此联合应用多种血管生成抑制剂将为抗肿瘤血管生成治疗开辟更广阔的治疗前景。

参考文献

1　Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutic implication. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182

2　Folkman J. Angiogenesis. J Biol Chem, 1992, 267(16): 10931

3　王　东，高奉浔，陈　俐，等. 骨肉瘤微血管密度与预后的研究. 中华病理学杂志，1997，26(5)：266

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

5　Folkman J, Klaysbum M. Angiogenesis factors. Science, 1987, 235(4787): 442

6　Hori K L. Characterization of heterogeneous distribution of tumor blood in the rat. Jpn J Cancer Res, 1991, 82(1): 109

7　Ferrara N. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev, 1997, 18(1): 4

8　Brown L F, Berse B, Jackman R W, *et al*. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth

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

factor) and its receptors in breast cancer. Human Pathol, 1995,26(1):86

9 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. Cancer Res,1995,55(18):3964

10 Li J, Hampton T, Morgan J. Stretch induced VEGF expression in the heartsource. J Clin Invest,1997,100(1):18

11 Brown L F, Detmar M, Claffey K, *et al*. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. Exs,1997,79:233

12 Asano M, Yukija A, Matsumopo T, *et al*. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth foctor/vascular permeability factor 121. Cancer Res,1995, 55(22):5196

(收稿:1998-10-21;修回:1999-04-13)

(编辑 王 红)

Inhibitory effects of antibody against vascular endothelial growth factor on angiogenesis induced by OS-732*

Li Yingjia, Wang Dong, Gao Fenxun, Chen Li (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effects of antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF) on angiogenesis induced by OS-732. Methods: After the tumor model was established on the chick embryo chorioallantic membrane the effects of a polyclonal antibody against VEGF on angiogenesis and tumor growth were examined. Results: The number of the newly formed vessels upon the tumor was significantly decreased in the anti-VEGF antibody group as compared with the PBS control group on days 2, 4, 6 and 8 after the anti-VEGF antibody was given ($P<0.05$ or 0.01). Optical microscopy showed the decrease in the tumor population and newly formed vessels. Conclusion: The anti-VEGF antibody may be potentially useful for clinical treatment of osteosarcoma.

Key words vascular endothelial growth factor; antibody; osteosarcoma; chick embryo chorioallantoic membrane

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96Q074

(上接 494 页)

表 1 宫颈糜烂程度与疗效的关系

程度	疗效				治愈率
	例数	痊愈	有效	无效	
Ⅰ度	30	27	1	2	90.0%
Ⅱ度	34	13	17	4	38.2%
Ⅲ度	14	5	5	4	35.8%
合计	78	45	23	10	87.2%

表 2 宫颈糜烂类型与疗效关系

类型	疗效				治愈率
	病例	痊愈	有效	无效	
单纯型	33	27	4	2	81.8%
颗粒型	29	13	12	4	44.8%
乳头型	16	5	7	4	31.3%
合计	78	45	23	10	87.2%

单纯型糜烂的治愈率显著高于其它两型($P<0.01$),而后两型之间差异无显著意义($P>0.05$)。

3 讨论

近年来,病理学和生物学的研究表明,慢性宫颈炎与单纯疱疹病毒和人乳头瘤病毒感染有关。奥平栓是一种具有抗病毒作用的生物制品,其主要成分为 α-干扰素,通过与靶细胞膜上受体结合,使细胞膜发生变化,进而激活细胞内抗病毒蛋白基因,抗病毒蛋白基因按照"正中的法则"指导合成抗病毒蛋白,由抗病毒蛋白发挥抗病毒作用,使单纯疱疹病毒和人乳头瘤病毒的侵染得到控制,达到治愈慢性宫颈炎病因的目的[2,3]。该药使用方便,无副作用易推广应用。

关键词 慢性宫颈炎;α-干扰素

中图法分类号 R711.3

参考文献

1 乐 杰 主编. 妇产科学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 1997.254~256

2 钱止维. 人.D 型基因工程干扰素治疗宫颈糜烂. 中华妇产科杂志,1987,22(4):335

3 王大琬. 外用人 α_1 型基因工程干扰素治疗慢性宫颈炎 673 例疗效观察. 中国免疫学杂志,1990,6(1):21

(收稿:1999-01-09;修回:1999-05-29)

(编辑 张大春)

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