

基础研究 ·

抗人血管内皮生长因子单克隆抗体抑制 人类鳞癌生长的实验研究

房思炼 王大章 杨西川 李虹 郑光勇 张静仪

摘要 目的:研究抗人血管内皮生长因子(VEGF)单抗 E₁抑制移植性人类鳞癌血管生成,从而抑制颊癌生长的作用效果。方法:接种人类鳞癌 BCa CD885 细胞株的 BALB/c 裸小鼠分别通过腹腔或瘤周皮下注射抗人 VEGF 单抗或生理盐水。每隔 3 d 测量瘤体积 1 次,接种后第 18 天处死裸鼠并称取瘤重,计算抑瘤率。结果:不同给药途径的抗人 VEGF 单抗对颊癌的生长均有明显的抑制作用,与生理盐水组相比较有显著性差异,其抑瘤率分别为 60.1%、69.9%。腹腔、瘤周皮下两种注射方式比较,瘤周皮下组的抑瘤效果更为显著。结论:肿瘤中的 VEGF 是抗肿瘤血管生成的理想靶目标,而抗人 VEGF 单抗又是该抑瘤新途径的理想选择,具有潜在的重要临床应用价值。

关键词 血管内皮生长因子 单克隆抗体 肿瘤生长 血管生成 动物模型

An Experimental Study on the Inhibitory Effects of Anti-human Vascular Endothelial Growth Factors on the Growth of Buccal Mucosa Carcinoma

Fang Silian

Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences

Wang Dazhang, Yang Xichuan, Li Hong, et al

West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The purpose of this study was to apply the anti-human VEGF monoclonal antibody E₁, which was generated against a synthetic peptide from the NH₂ of the human VEGF (residues 1-26), to against VEGF in buccal carcinoma, and to examine the inhibition effect of the antibody on the carcinoma growth. **Methods:** E₁ was hypodermic and celiac injected, with 200 μg each from the first to the 15th day, into BALB/c nu/nu mice, which were transplanted with human buccal carcinoma. The saline was injected as the negative control. Mice were killed on the 18th day. The tumor weight was determined and the inhibition rate was calculated. **Results:** The growth of BCaCD885 carcinoma was dramatically inhibited in the E₁ group. There was a significant difference in tumor weight between the saline group and the E₁ groups during the observation period. The tumor growth inhibition rate in the mice hypodermically injected with E₁ reached 69.9%. **Conclusion:** The anti-human VEGF monoclonal antibody E₁ significantly inhibits tumor growth by blocking the action of VEGF, and without obvious side effects, therefore the anti-human VEGF monoclonal antibody could be applied clinically in the anti-angiogenic treatment of solid tumors.

Key words: vascular endothelial growth factor tumor growth angiogenesis monoclonal antibodies animal models

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39970798)

作者单位:510120 中山大学附属第二医院口腔颌面外科(房思炼原华西医科大学口腔医学院口腔颌面外科博士研究生,现在中山大学从事博士后研究),四川大学华西口腔医学院(王大章,杨西川,郑光勇,张静仪),四川大学华西基础医学院微生物教研室(李虹)

1971年,Folkman¹首次提出“肿瘤生长依赖于血管生成”的概念。如果肿瘤组织没有血管系统传递氧、营养和代谢产物,肿瘤特别是实体瘤的生长会处于停滞状态,而肿瘤血管生成与血管生长因子的调控有关。目前,许多研究²表明,血管内皮生

长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是最重要的血管内皮细胞特异的促血管生成调控因子。常见的人类肿瘤均可高水平表达 VEGF³, 从而启动肿瘤血管化期, 导致肿瘤内血管生成, 促使肿瘤迅速生长。本研究旨在应用抗人 VEGF 单抗 E₁₁⁴ 阻断移植性人颊鳞癌组织中 VEGF 发挥作用, 抑制颊癌血管生成, 进而达到抑制颊鳞癌生长的目的。

1 材料和方法

1.1 主要材料

BALB/c 裸小鼠, 18~20 g (原华西医科大学实验动物中心提供)。单抗 E₁₁ 是以人 VEGF 合成肽为免疫原制备的抗人 VEGF 单克隆抗体, IgG_{2b}, 对 VEGF 有良好特异性和亲和力, 由本课题组制备及纯化⁴。人颊粘膜鳞状细胞癌 BCa CD885 细胞株 (卫生部口腔医学生物学重点实验室提供)。

1.2 人颊癌动物模型的建立及抑瘤实验的分组设计

在 15 只裸鼠颈背部皮下接种人颊粘膜鳞癌细胞株 BCa CD885, 其接种量为每只 1 × 10⁷ 个细胞/0.2 ml。接种后随机分为 3 组, 每组 5 只, 接种次日起开始注射给药, 具体方法见表 1。第 18 天处死裸鼠。

表 1 人颊鳞癌 BCa CD885 裸鼠模型抑瘤实验分组

组别	鼠数 (只)	给药种类	每次给药剂量	给药途径、方式及时间
A	5	生理盐水	0.2 ml	腹腔注射, 接种后第 1~15 天给药, 每天 1 次
B	5	E ₁₁	200 μg/0.2 ml	同上
C	5	E ₁₁	200 μg/0.2 ml	瘤周皮下注射, 余同上

1.3 观察指标

裸小鼠一般情况观察。肿瘤生长变化: 当肿瘤可触及时, 每隔 3 d 测量体积 1 次, 瘤体积计算方法: 短径² × 长径 × 1/2; 据此描绘肿瘤生长曲线。目视大体观察肿瘤情况。抑瘤率: 接种后第 18 天处死裸鼠, 称取瘤重, 并根据公式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重 (mg)} - \text{实验组平均瘤重 (mg)}}{\text{对照组平均瘤重 (mg)}} \times 100\%$$

1.4 统计学处理

瘤重数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SAS 统计软件包进行方差分析, 两两比较采用 SNK 法。

2 结 果

2.1 裸鼠一般情况观察

生理盐水组裸鼠于接种颊癌后第 11 天开始, 活动明显减少, 逐渐消瘦, 体重下降, 皮肤失去光

泽。而 E₁₁ 给药组裸鼠在实验期间未见有明显生活状态的改变, 活动正常, 食欲旺盛。

2.2 各实验组移植性人颊癌的生长曲线

各实验组移植性人颊癌 BCa CD885 的生长曲线见图 1。从图 1 可见生理盐水组颊癌呈持续性生长, 在移植第 9 天后生长明显加快。E₁₁ 组颊癌生长速率均较慢, 生长受到明显抑制, 尤其是瘤周皮下给药组更为显著。而在停止给药两天后, E₁₁ 组颊癌生长呈加快趋势。

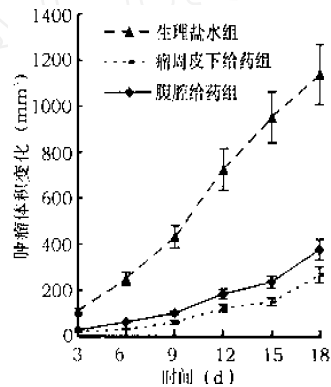


图 1 各实验组移植性人颊粘膜鳞癌生长体积的变化

2.3 大体观察

各组实验动物大体观察可见: 生理盐水组颊癌体积明显大于抗人 VEGF 单抗 E₁₁ 组, 且肿瘤与背部皮肤粘连, 基底浸润; 切面呈灰白色, 似鱼肉状, 无坏死。E₁₁ 组肿瘤则界限清楚, 易剥离, 切面中央可见坏死后引起的囊性变。

2.4 各实验组瘤重比较及 E₁₁ 对人颊癌的抑瘤率

各组裸鼠瘤重及 E₁₁ 对人颊癌抑瘤率见表 2, 由表 2 可见 E₁₁ 瘤周皮下、腹腔注射组颊癌的瘤重均低于生理盐水组, 经统计学分析, 差异有显著性 (P < 0.05)。E₁₁ 瘤周皮下组抑瘤率最高, 为 69.9%。

表 2 抗人 VEGF 单抗对移植性人颊癌的抑瘤率

组别	成瘤率	肿瘤重量 (g)	抑瘤率 (%)	P* 值	P# 值
生理盐水组	5/5	1.33 ± 0.14			
E ₁₁ 瘤周皮下给药组	5/5	0.40 ± 0.08	69.9%	< 0.05	
E ₁₁ 腹腔给药组	5/5	0.53 ± 0.09	60.1%	< 0.05	> 0.05

注: P* 值是 E₁₁ 各给药组瘤重分别与生理盐水组瘤重相比较所得, P# 值是 E₁₁ 腹腔给药组瘤重与 E₁₁ 瘤周皮下给药组瘤重相比较所得

3 讨 论

肿瘤特别是实体瘤的生长分为两个时期: 血管

前期(肿瘤细胞的克隆性增殖期)和血管化期¹,两者的区别是前者没有血供,而后者建立了自己的血供系统。一些研究⁵结果已证实了以上学说,并发现颊癌组织在血管前期,由于没有血供,其营养的传送是靠组织间弥散实现的。而进入血管化期,颊癌细胞具有明显的诱导血管生成的作用,瘤内血管广泛增生,建立起肿瘤血供系统,颊癌生长呈现血管生成依赖性。因此,采用抑制肿瘤血管生成的抗癌新途径,可以达到抑制颊癌生长的目的。

研究⁶表明,机体从静止的血管网到肿瘤的血管再生与促血管生成因子的增多从而打破平衡有关。目前认为在众多的促血管生成因子中,VEGF的增多起着关键作用²。VEGF作为血管内皮细胞特异的有丝分裂原⁷,刺激血管内皮细胞的分裂、增殖和移动,且可增加毛细血管的通透性、促进血管内皮细胞外肿瘤新基质的形成和参与能量转运³。大量研究证实,人类许多种类的肿瘤组织均有VEGF高水平表达^{3,8},而对20例人颊鳞癌组织的检测表明,VEGF表达阳性率高达80%,颊癌细胞胞浆、颊癌组织内及边缘的血管内皮细胞呈现VEGF阳性反应⁹。目前认为正是由于肿瘤组织中过量的VEGF表达,启动肿瘤血管生成表型,导致肿瘤血管生成,从而促进肿瘤的生长。因此肿瘤中的VEGF是抑制肿瘤血管生成的理想靶目标。

根据这一理论,本研究首次用抗人VEGF单抗E₁₁进行了抑制移植性人颊鳞癌生长的体内实验。结果表明,该单抗可明显抑制颊癌的生长,两实验组瘤重均低于对照组($P < 0.05$),瘤周皮下、腹腔注射给药组抑瘤率分别为69.9%、60.5%。同时治疗期间,未发现该单抗有明显的毒副作用,说明应用单抗E₁₁具有较高的安全性。

自1993年Kim¹⁰报道首次应用抗人VEGF₁₆₅单抗对横纹肌肉瘤A673、多形性恶性胶质瘤G55和平滑肌肉瘤SKLMS-1等3种移植瘤进行抑瘤生长实验获得成功以来,陆续有应用抗人VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅单抗抑制人纤维肉瘤HT-1080、大肠癌等恶性实体瘤生长的报道。复习文献,尚未见到应用抗人VEGF单抗抑制口腔颌面部恶性实体瘤生长的报道。本研究结果证实抗人VEGF单抗对人颊癌——口腔颌面部高发的恶性肿瘤有较明显的抑瘤作用。此外,本课题组制备的抗人VEGF单抗E₁₁

是以人VEGF的合成肽(按VEGF的N端1-26氨基酸顺序设计)为免疫原而制备,因此可识别人VEGF的各种同功异构体。与目前其他以一种VEGF同功异构体为免疫原的抗人VEGF单抗相比,单抗E₁₁可能具有更强的中和VEGF的作用。

本研究中E₁₁瘤周皮下给药组抑瘤率高于腹腔给药组,说明局部应用抗人VEGF抗体可以提高抑瘤效果,笔者认为其原因可能是局部给药可克服阻碍肿瘤摄取抗人VEGF单抗的某些障碍,如血液稀释、生理清除及与血循环中的VEGF结合。据此分析,在临床应用中,如采用营养动脉分支插管局部灌注给药,将可显著提高治疗癌瘤的效果。

本研究结果为建立以血管为靶的导向疗法治疗口腔颌面部乃至其它部位的癌瘤提供了实验依据。笔者认为,在将来的临床应用中,有可能以抗VEGF单抗为核心的抑制肿瘤血管生成这一抗癌新途径与手术、化疗和放疗相结合,建立新的肿瘤综合治疗方案,进一步提高恶性肿瘤的治疗水平。

参考文献

- 1 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182~1186
- 2 Amrosio A, Del-Porto F, Di MC, et al. Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neovascularization. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 1997, 1(1-3): 17~25
- 3 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997, 18(1): 4~25
- 4 杨西川,王大章,李虹,等. 抗人血管内皮生长因子合成肽的MAb杂交瘤细胞株的建立. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(3): 208
- 5 李龙江. 颊粘膜鳞癌血管生成的实验及临床研究. 博士学位论文. 成都:华西医科大学, 1994: 67~78
- 6 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86: 353~356
- 7 Connolly DT, Hewelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 1989, 84: 1470
- 8 Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost*, 1997, 78(1): 672~677
- 9 王大章,杨西川,何志秀,等. 血管内皮生长因子在颊癌组织中的表达和分布. *中华医学杂志*, 1998, 78(11): 845
- 10 Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*, 1993, 362(6423): 841~844

(2001-08-18 收稿)

(本文编辑 刘怡)