

· 专栏论著 ·

抗人血管内皮生长因子单克隆抗体抑癌作用的形态学观察及作用机制探讨

房思炼 王大章 杨西川 何志秀 张杰 郑光勇

摘要 目的:研究抗人血管内皮生长因子(VEGF)单抗 E₁₁抑制颊癌组织的形态学改变,并探讨 E₁₁抑癌效应的机制。方法:接种人类鳞癌的 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。接种后第 18 天处死,取颊癌组织进行光镜及透射电镜观察。结果:E₁₁组颊癌组织中血管分布稀少、存在囊性变坏死区及癌细胞坏死、凋亡等。此外还有血管内皮细胞变性、凋亡及血管壁受破坏、管腔变窄和堵塞等血管系统的异常改变。而生理盐水组癌组织血管丰富,颊癌组织结构完整。结论:抗人 VEGF 单抗是通过抑制颊癌的血管生成而产生抑癌效应。

关键词 血管内皮生长因子 单克隆抗体 肿瘤 血管生成 形态学

Morphological Observation of Buccal Mucosa Carcinoma Inhibited by Monoclonal Antibodies of Human Vascular Endothelial Growth Factor

Fang Silian

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

Wang Dazhang, Yang Xichuan, He Zhixiu, et al

West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The purpose of this study was to investigate the mechanism of the inhibited effects of anti-human vascular endothelial growth factor (VEGF) monoclonal antibodies E₁₁ on the growth of buccal mucosal carcinoma. **Methods:** E₁₁ was hypodermic and celiac injected into BALB/c nu/nu mice, which were transplanted with buccal carcinoma. The saline was injected as the negative control. Mice were killed on the 18th day and the pathological alteration of tumor was evaluated. **Results:** Microscopically, massive necrosis and decreased vascular density was observed in tumor tissues treated with E₁₁. Correspondent with the aforementioned phenomena, degeneration and apoptosis was also found in the tumor cells. For the first time, degeneration and destruction of the vascular endothelial cells in the tumor tissues treated with E₁₁ were observed using microscopy and transmission electron microscopy examination. **Conclusion:** The study demonstrated that E₁₁ inhibited the tumor angiogenesis by blocking the action of VEGF and resulted in significant inhibitory effects on the tumor growth. The result would offer a therapeutic base to the clinical application of the anti-human VEGF monoclonal antibodies.

Key words: VEGF angiogenesis tumor monoclonal antibody morphology

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¹。常见的人类肿瘤均可高水平

表达 VEGF²,致肿瘤内血管增生,促使肿瘤迅速生长。本课题组在荷人类鳞癌裸鼠体内成功应用抗人 VEGF 单抗 E₁₁与颊癌组织中的 VEGF 结合,阻断 VEGF 促肿瘤血管生成作用,抑制颊癌血管生成,产生较明显的抑瘤生长效应^{3,4}。本研究旨在对抑癌实验中的 E₁₁给药组、生理盐水组的颊癌组织行形态学观察,探讨抗人 VEGF 单抗 E₁₁产生抑癌效应的机制,为开展该单抗的应用性研究提供依据。

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,何志秀,郑光勇),四川大学华西医院(张杰)

1 材料和方法

1.1 主要材料

抗人 VEGF 单克隆抗体的制备见参考文献 3。BALB/c 裸小鼠、人颊粘膜鳞状细胞癌 BCaCD885 细胞株的来源见参考文献 4。

1.2 人类癌动物模型的建立及抑瘤实验的分组

人类癌动物模型的建立及抑瘤实验的分组设计见参考文献 4。

1.3 光镜观察

肿瘤标本用 10% 甲醛固定后,石蜡包埋,常规切片,HE 染色后,光学显微镜下观察。

1.4 透射电镜观察

颊癌实质区(非坏死区)切取一块约 5 mm × 5 mm × 4 mm 的癌组织,置入 4 pH 7.4 的 3% 戊二醛(预固定)。样本经 PBS 清洗 3 次后,在生理盐水中过夜。次日在 1% 锇酸(pH 7.4)中固定 2 h,丙酮梯度脱水,618 环氧树脂包埋,45 ~ 70 聚合 72 h,半薄切片(1 μm)光镜下定位,行超薄切片,铀-铅双重染色,透射电镜下观察,摄片记录。

2 结果

2.1 光镜观察

生理盐水组颊粘膜鳞癌组织结构完整,血管丰富,血管结构正常,管腔呈充盈状态(图 1)。E₁ 腹腔给药和瘤周皮下注射两组颊癌组织光镜表现相似,癌组织中血管分布稀少(图 2),并有癌组织囊性变区域(图 3)及变性坏死区;且还观察到血管壁结构受到破坏,呈纤维素样坏死,管腔中血栓形成而致管腔堵塞(图 4)。

2.2 透射电镜观察

生理盐水组颊癌细胞体积较大,胞质密度高,细胞器正常;核内染色质丰富,多数核内可见核仁;细胞间以桥粒相连接,细胞表面微绒毛丰富。血管内皮细胞结构清晰,胞浆内存在丰富的胞饮,核内染色质均匀分布,细胞处于明显的增生状态;微血管腔呈充盈状态(图 5)。

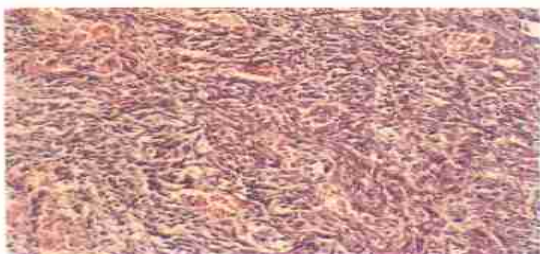


图 1 生理盐水组颊癌组织血管丰富 HE × 200

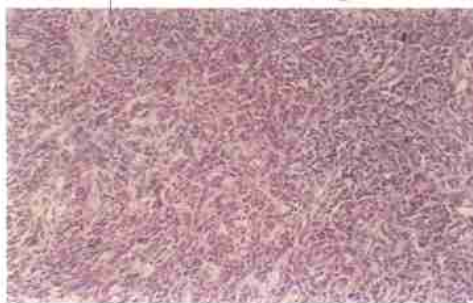


图 2 E₁ 给药后颊癌组织内血管分布稀少 HE × 200

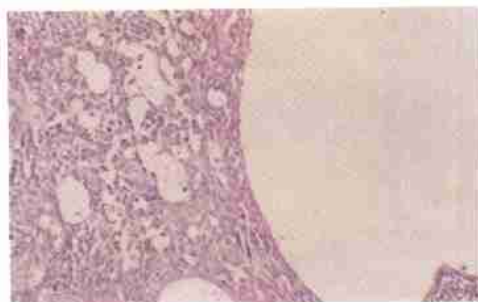


图 3 E₁ 给药后颊癌组织存在大量的囊性变区 HE × 200

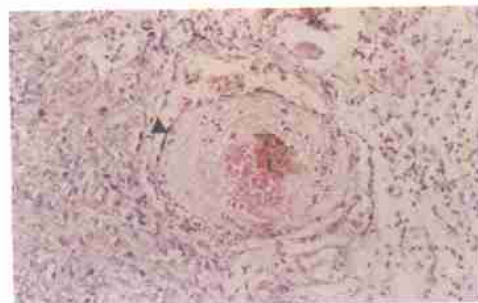


图 4 E₁ 给药后颊癌组织中血管内皮细胞大部分呈纤维素样坏死,部分残存(▲),血管壁处于崩解状态,管腔内血栓形成 HE × 200

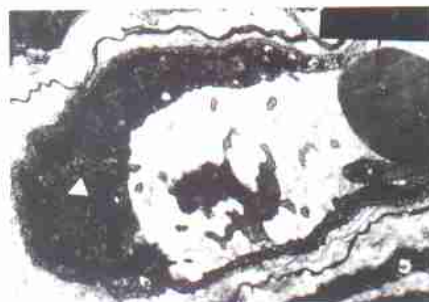


图 5 生理盐水组颊癌组织中的血管内皮细胞(▲)结构完整清晰,胞浆内有丰富的胞饮存在,核内染色质均匀分布,微血管腔呈充盈状态 SEM × 10000

两种方式 E₁ 给药后颊癌组织中多数癌细胞不规则,细胞核和核仁均较模糊;胞浆内可见脂肪滴、线粒体肿胀、内质网上核糖体脱落及有大量水分凝聚等细胞变性的异常改变。部分癌细胞膜失去连

续性,微绒毛消失,核溶解,呈明显的细胞坏死状态(图6、7)。部分颊癌细胞皱缩变形,以细胞核为明显,可见染色质高度凝集、固缩,形成凋亡发生后的细胞残体。血管内皮细胞的胞浆内细胞器数量减少,无胞饮存在,微血管腔狭窄甚至闭塞。此外,血管内皮细胞肿胀变性,细胞器严重受损,不能辨认其结构,管腔变窄甚至管腔内血栓形成(图8、9);以及血管壁受破坏变粗糙而呈绒毛状突起等血管系统的异常改变。

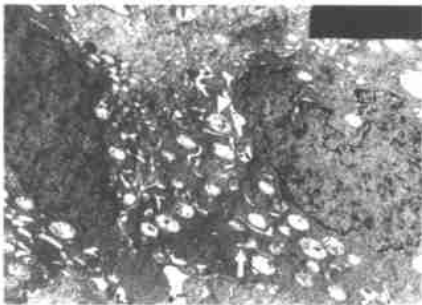


图6 E₁₁给药后颊癌细胞不规则,细胞形态、细胞核均较模糊,细胞边界不清,微绒毛消失,胞浆内可见线粒体肿胀(▲),内质网上核糖体(↑)脱落,细胞呈变性状态 SEM ×6000



图7 E₁₁给药后颊癌细胞膜失去连续性,胞浆内可见内质网上核糖体(↑)脱落、脂肪滴(◇)等变性的异常改变,并有大量水分积聚,形成空白区(△),核溶解,细胞呈坏死状态 SEM ×6000

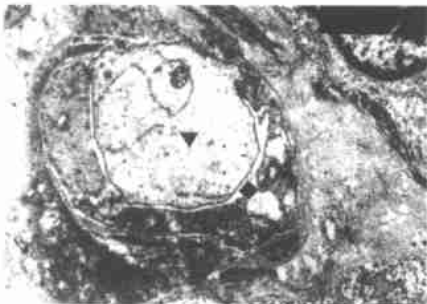


图8 E₁₁给药后颊癌组织中血管内皮细胞(▲)肿胀变性并突入管腔,胞浆内很少细胞器分布,微血管腔(■)因明显受到堵塞而减小 SEM ×10000

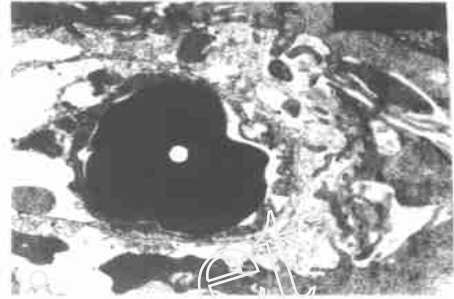


图9 E₁₁给药后颊癌组织中的血管内皮细胞(▲)的结构模糊,线粒体(●)肿胀,胞饮明显减少,微血管腔内血栓(○)形成 SEM ×10000

3 讨 论

作者首次用抗人 VEGF 单抗 E₁₁ 进行了抑制移植性人类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⁴。而对该抑瘤实验的癌组织进行深入的形态学研究,将有助于揭示单抗 E₁₁ 抑癌生长的机制。在以往的研究中,多只注意光镜下细胞的改变,而未平行观察超微结构水平的改变。本研究通过光镜观察证实,两种方式 E₁₁ 给药后颊癌组织血管生成受到明显抑制,其血管分布明显少于生理盐水组,并相应伴有因缺乏血供和营养而导致的肿瘤组织的囊性变及坏死。同时,本研究还率先应用透射电镜观察,进一步证实 E₁₁ 给药后颊癌细胞中存在细胞器结构破坏、细胞变性及颊癌细胞的坏死、凋亡等因肿瘤血供受抑制而引起的超微结构的改变。同时血管不仅分布稀少,而且还有血管内皮细胞结构不完整、管腔狭窄甚至闭塞等超微结构的异常改变。而生理盐水组肿瘤组织的血管丰富,血管系统的结构完整。这些发现充分说明 E₁₁ 给药后颊癌组织的血管生成在数量上和质量上均受到了明显抑制。学者 Kim⁵ 的研究同样证实抗 VEGF 单抗给药组的肿瘤组织血管密度明显低于阴性对照组。而 Borgstrom 等⁶ 在荷瘤小鼠体内应用抗 VEGF₁₆₅ 单抗后,运用活体内电视显微镜原位观察技术,直接观察到肿瘤的血管生成明显减少,导致肿瘤生长受到抑制。此外,本课题组的相关研究已证实 E₁₁ 给药组颊癌组织中的 VEGF 明显减少(另文发表)。结合以上研究结果,笔者认为抗人 VEGF 单抗 E₁₁ 抑制颊癌生长的机制就是通过阻断 VEGF 促肿瘤血管生成的作用,从而充分抑制颊

(下转第 146 页)

参考文献

- 1 Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair genes. *Science*, 2001, 29(5507):1284~1294
- 2 Yu Z, Chen J, Ford BN, et al. Human DNA repair systems: an review. *Environ Mol Mutagen*, 1999, 33(1):3~20
- 3 Peltomaki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology*, 1997, 113(4):1146~1158
- 4 Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muri-Torre kindreds for msh2 mutations. *Genomics*, 1994, 24(3):516~526
- 5 Shitoh K, Konishi F, Miyaki M, et al. Pathogenesis of non-familial colorectal carcinomas with high microsatellite instability. *J Clin Pathol*, 2000, 53(11):841~845
- 6 Abe Y, Masuda H. Genetic alterations of sporadic colorectal cancer with high-level microsatellite instability, especially characteristics of primary multiple colorectal cancers. *J Surg Oncol*, 2000, 74(4):249~256
- 7 杨志波,刘倩,任常山.膀胱癌微卫星不稳定及 hMSH2 基因突变研究. *中国医科大学学报*, 1999, 28(6):415~416
- 8 Ohwada M, Suzuki M, Saga Y, et al. Mutational analysis of

- transforming growth factor beta receptor type and DNA mismatch repair genes in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Oncol Rep*, 2000, 7(4):789~792
- 9 Sud R, Wells D, Talbot IC, et al. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 126(2):111~119
- 10 Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*, 2000, 87(2):200~203
- 11 HL-Naggar AK, Hurr K, Huff V, et al. Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol*, 1996, 148(6):2067~2072
- 12 Field JK, Kiaris H, Howard P, et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*, 1995, 71(5):1065~1069
- 13 Wang Y, Irish J, MacMillan C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer*, 2001, 93(3):353~360

(2001-12-29 收稿)
(本文编辑 刘怡)

(上接第 140 页)

癌血管生成,导致肿瘤组织缺乏必要的血供和营养,而使肿瘤生长受到明显抑制。

此外,本研究中还首次在光镜下观察到, E₁₁ 给药后颊癌组织同时还存在血栓形成及血管壁崩解破坏等血管系统结构受破坏的改变。与此相对应,血管系统的超微结构也存在着异常改变,如血管内皮细胞肿胀变性、血管壁受破坏而呈绒毛状突起及血栓形成等。究其原因,这是由于 VEGF 除可促进肿瘤的血管生成,且还有维持肿瘤血管的形态和结构的作用⁷,所以当抗人 VEGF 单抗阻断 VEGF 作用后,肿瘤血管系统缺乏 VEGF 重要的维持作用,导致其形态和结构受到明显破坏。这一发现提示抗人 VEGF 单抗不仅可以抑制肿瘤新生血管的增生,而且可以破坏肿瘤原有血管系统的结构。这对于抗人 VEGF 单抗的广泛应用具有重要的指导意义。因此,本研究结果为开展应用该单抗进行以血管为靶的导向疗法来治疗口腔颌面部乃至其它部位的癌瘤提供了重要的理论依据。

参考文献

- 1 Antoso A, Del-Porto F, Di MC, et al. Vascular endothelial

- growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 1997, 1(1-3):17~25
- 2 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997, 18(1):4~25
- 3 杨西川,王大章,李虹,等.抗人血管内皮生长因子合成肽的 MA_B 杂交瘤细胞株的建立. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(3):208
- 4 房思炼,王大章,杨西川,等.抗人血管内皮生长因子单克隆抗体抑制人颊鳞癌生长的实验研究. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(2):89~91
- 5 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
- 6 Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, et al. Complete inhibition of angiogenesis and growth factor neutralizing antibodies. Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res*, 1996, 56:4032~4039
- 7 Potgens A. Analysis of the tumor vasculature and metastatic behavior xenografts of human melanoma cell lines transfected with vascular permeability factor. *Am J Pathol*, 1995, 146:197~209

(2001-08-18 收稿)
(本文编辑 刘怡)