

中和性VEGF单抗的制备及其对肺癌的抑制作用

张利红¹ 刘祥磊¹ 谷银芳² 孙蕴淳² 陈旭东³ 蔡茂怀³ 张发民⁴ 林峰^{2*} 吴炯^{1,2*}

(¹浙江理工大学生命科学学院, 新元医药与生物技术研究所, 杭州 310018; ²理查罗伯茨生物科技研究院, 宜兴 214200; ³盐城市第二人民医院, 盐城 224003; ⁴武汉华世通生物医药科技有限公司, 武汉 430074)

摘要 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可诱导血管生成, 对肿瘤的生长和转移至关重要。目前, VEGF已成为新药研发的主要靶标, 这类新药可通过阻断微血管的形成和生长达到抑制肿瘤细胞的生长或是维持肿瘤处于休眠期的目的。该研究制备了中和性VEGF单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)并探讨其对肺癌裸鼠模型血管生成的抑制作用。利用可编码VEGF全长蛋白的重组质粒免疫Balb/c小鼠, 获得中和性VEGF McAb, 并利用VEGF±VEGF McAb诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HuVEC)。通过Western blot法检测VEGFR-2磷酸化水平(活化状态), 进而测定VEGF McAb的中和性。VEGF McAb可以抑制VEGF对VEGFR-2酪氨酸磷酸化的激活作用。该研究将A549肺癌细胞接种于裸鼠构建肿瘤模型, 探讨了VEGF McAb抗血管生成的效果。结果表明, 50 µg VEGF McAb治疗组动物模型的瘤重抑制率为51.5%, 瘤体抑制率为62.5%。VEGF McAb不仅可以抑制VEGF对人脐静脉内皮细胞VEGFR-2介导的信号转导作用, 且可有效抑制小鼠肺癌模型中肿瘤的生长。

关键词 血管生成; VEGF McAb; VEGFR-2; 肺癌

Production of VEGF Neutralizing McAb And Its Inhibitory Effect on Lung Cancer

Zhang Lihong¹, Liu Xianglei¹, Gu Yinfang², Sun Yunchun², Chen Xudong³, Cai Maohuai³,

Zhang Famin⁴, Lin Feng^{2*}, Wu Jiong^{1,2*}

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Richard J. Roberts Institute of Biotechnology, Yixing 214200, China; ³Yancheng Second People's Hospital, Yancheng 22403, China;

⁴Wuhan Hua Shi Tong Biomedical Science and Technology Limited Company, Wuhan 430074, China)

Abstract Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenesis-inducing factor playing a pivotal role in cancer growth and metastasis, and it has been the main target for developing new drugs to inhibit neoplastic growth or to keep tumor dormancy by blocking the formation and expansion of new capillaries. In this study, we developed a VEGF neutralizing monoclonal antibody (McAb) and investigated its antiangiogenic effect in a lung cancer nude mice model. The VEGF neutralizing McAb was obtained by immunizing Balb/c mice with plasmid DNA encoding VEGF full-length protein, its neutralizing activity was tested by exposing HuVEC to various concentrations of VEGF with or without addition of the VEGF McAb, and VEGFR-2 phosphorylation (activation) status was determined by Western blot. The VEGF McAb could suppress VEGFR-2 tyrosine phosphorylation activated by VEGF. Moreover, its anti-angiogenesis effect was studied using a nude mouse model with A549 lung cancer

收稿日期: 2014-12-01 接受日期: 2015-02-04

国家自然科学基金(批准号: 81272687)和浙江省自然科学基金(批准号: LZ13H160004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843182, E-mail: 1790840554@qq.com; Tel: 0571-86843181, E-mail: jwu1867@yahoo.com

Received: December 1, 2014 Accepted: February 4, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ13H160004)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-86843182, E-mail: 1790840554@qq.com; Tel: +86-571-86843181, E-mail: jwu1867@yahoo.com

网络出版时间: 2015-04-07 11:05

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150407.1105.001.html>

cell inoculation, 50 μg VEGF McAb treatment led to a 51.5% inhibition ratio of tumor weight and the tumor growth inhibition rate was 62.5%. Together, our results demonstrate that the VEGF neutralizing McAb may not only significantly suppress VEGFR-2 mediated signaling but also inhibit the growth of lung cancer in a mouse model.

Keywords angiogenesis; VEGF McAb; VEGFR-2; lung cancer

目前,恶性肿瘤的死亡率已占据各种疾病的首位,其最重要的生物学特性是侵袭性生长和转移,一般实体瘤在诊断时就有2/3左右已经存在转移,而转移也恰恰是肿瘤治疗失败的主要原因。肿瘤的转移被认为是低效的过程,因为瘤细胞离开原位瘤到达循环系统并建立转移沉积斑需要克服许多障碍,如逃避免疫监督、被远处的毛细血管床捕捉等^[1]。从许多皮下肿瘤生长的动物实验中已推断出,新生血管促进了肿瘤转移。在抗肿瘤治疗中,靶向治疗为当前研究的热门领域,其中抗血管内皮生长因子的单抗药物受到了极大的关注。

血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)基因位于染色体6p21.3,大小为14 Kb左右^[2]。目前,其六种亚型(VEGF₁₂₁, 145, 165, 183, 189, 206)已被发现,大小在121~206个氨基酸之间^[2-4]。大量研究证实,多种恶性肿瘤的血管生成和转移伴随着VEGF的高自分泌^[5]。血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial cell growth factor receptor-2, VEGFR-2)是位于血管内皮细胞表面的酪氨酸激酶受体,该受体由七个类似免疫球蛋白结构域的胞外部分和一个跨膜结构域以及含有部分酪氨酸激酶的胞内结构域组成,VEGFR-2在没有与VEGF结合时是以无活性的单体存在的,一旦VEGFR-2的细胞外结构域与VEGF结合,两个单体受体分子在膜上形成二聚体,两个受体的胞内结构域的尾部相互接触,就激活了它们的蛋白激酶的功能,结果使尾部的酪氨酸残基磷酸化。细胞内细胞信号蛋白同尾部磷酸化部位结合后被激活,进而激活下游的信号通路,引起细胞内一系列的生化反应,如细胞增殖和血管生成^[6]。高表达的VEGF促进血管生成进而决定了肿瘤内的微血管密度和血液供应,这对肿瘤从1 mm³长到2 mm³阶段尤为重要。

本研究利用DNA免疫方法制备中和性VEGF单克隆抗体,并对其进行了广泛的免疫学鉴定,进一步比较其与Avastin(贝伐珠单抗)的生物活性,探讨其对A549肺癌小鼠模型的抗肿瘤作用。结果证明,本研究制备的抗体可中和VEGF活性导致VEGFR-2介

导的细胞信号传导抑制,并对小鼠中A549肿瘤生长有明显的抑制作用。同时,实验也发现,该抗体的VEGF中和作用优于Avastin,为该单克隆抗体的应用及后续临床试验研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Balb/c小鼠及裸鼠由杭州中医药大学实验动物中心提供;新生儿脐带由宜兴市妇幼保健医院提供;鼠抗人VIII因子抗体及CD31抗体购自Abcam公司;VEGF蛋白、VEGFR-2蛋白、兔抗人VEGFR-2抗体、兔抗人P-VEGFR-2抗体由江苏众森源生物技术有限公司提供;人类重组蛋白VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D购自RayBiotech公司;VEGF₁₆₅购自Perprotech公司;SP-9002免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥公司;Alamar Blue购自Invitrogen公司;SP2/0骨髓瘤细胞株、A549细胞、HEK293-6E细胞、pYD11质粒为本实验室保存;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司;DMEM、RPMI-1640购自Thermo公司;顺铂购自Sigma公司;Sepromax A40 plus protein A affinity material购自Galak公司。

1.2 VEGF McAb的制备

1.2.1 DNA免疫 从江苏众森源生物技术有限公司获赠带有VEGF(NM_001171628)全部编码序列的质粒,用PCR方法扩增片段,与载体pYD11^[7](图1)连接,构建得到pYD11-VEGF表达载体。取pYD11-VEGF质粒30 μg 溶于40 μL PBS中,对Balb/c小鼠进行肌肉DNA免疫^[8-10]。两周后再次免疫,同时小鼠尾部取血,用间接ELISA方法检测小鼠血清中的VEGF特异性抗体效价,在此期间持续免疫直到小鼠血清中VEGF特异性抗体效价达到1:10 000时处死小鼠,获取脾脏。

1.2.2 杂交瘤细胞的融合与筛选 收集小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0计数按5:1比例加入15 mL离心管中混匀,用常规方法使用PEG介导细胞融合并进一步将其在HAT培养基中进行选择培养,两周后进行阳性克隆筛选及鉴定。筛选获得可特异性分泌

抗VEGF抗体的克隆株, 然后取2只Balb/c经产鼠, 每只腹腔注射0.5 mL的液体石蜡致敏, 3 d后每只小鼠腹腔注射 5×10^6 阳性杂交瘤细胞, 制备腹水, 并进一步用A蛋白亲和层析法纯化腹水中的单克隆抗体^[11]。

1.2.3 单克隆抗体的特异性鉴定、效价测定及亲和常数K的计算 利用电穿孔法将pYD11、pYD11-VEGF质粒转入HEK293-6E细胞^[12], 待VEGF基因在细胞中表达48 h后制备细胞裂解物, 通过Western blot对VEGF单克隆抗体进行鉴定。应用间接ELISA法分别测定VEGF McAb(VEGF monoclonal antibody)与VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D等家族蛋白的交叉反应。以稀释至1 $\mu\text{g/mL}$ 的VEGF蛋白包被ELISA板, 将VEGF McAb 1:2 000稀释, 加入第一列后按1:2行梯度稀释, 间接ELISA法测定单抗效价。将VEGF蛋白稀释至1 000 ng/mL, 包被ELISA板第一行, 同时按1:2列梯度稀释包被; 将VEGF McAb 1:10 000稀释, 加入第一列, 按1:2行梯度稀释, 间接ELISA法测定 D_{450} 值后按公式 $K=(n-1)/2(n \text{ Ab}'-\text{Ab})$ ^[13-14]计算抗体亲和常数K值。Ab、Ab': 抗原浓度为Ag、Ag'时产生半数吸光值的抗体浓度(mol/L); $n=\text{Ag}/\text{Ag}'$ 。

1.3 VEGF McAb与Avastin生物活性比较

1.3.1 HuVEC的分离及鉴定 从医院获得健康新生儿的脐带, 参考Marin等^[15]的方法消化分离人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial

cells, HuVEC), 并借鉴Jaffe等^[16]的方法进行后续的HuVEC培养。HuVEC培养1 d后, 在倒置相差显微镜上观察细胞形态。

24孔板中放入经过处理的盖玻片, 接种HuVEC细胞悬液, 培养过夜后采用免疫细胞化学染色的方法鉴定。细胞一抗为鼠抗人VIII因子抗体, 按照北京中杉金桥SP-9002免疫组化染色试剂盒的使用说明进行后续操作。

1.3.2 VEGF McAb与Avastin抑制VEGF与VEGFR-2结合能力的比较 用500 ng/mL VEGF包被ELISA板, 加入初始浓度为2 g/mL的带有histag标签的VEGFR-2, 同时加入或不加入浓度为500 ng/mL Avastin或VEGF McAb, 3倍稀释。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1 h。洗涤后, 分别加入100 μL HRP标记的抗histag的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1 h。洗涤后, 加入100 μL 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育15 min, 50 μL 2 mol/L硫酸终止反应。 D_{450} 读数后, 分析单克隆抗体对VEGF与其受体VEGFR-2结合的阻抗作用。

1.3.3 HuVEC增殖抑制实验 取生长状态良好的HuVEC, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 。再接种于96孔细胞培养板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 置孵箱中培养24 h。然后换0.5%血清含量的培养基, 继续培养72 h。加入不同浓度梯度的VEGF抗体, 起始浓度为10 $\mu\text{g/mL}$, 2倍稀释, 每个浓度取3个平行孔。同时, 加入终浓度为100 ng/mL

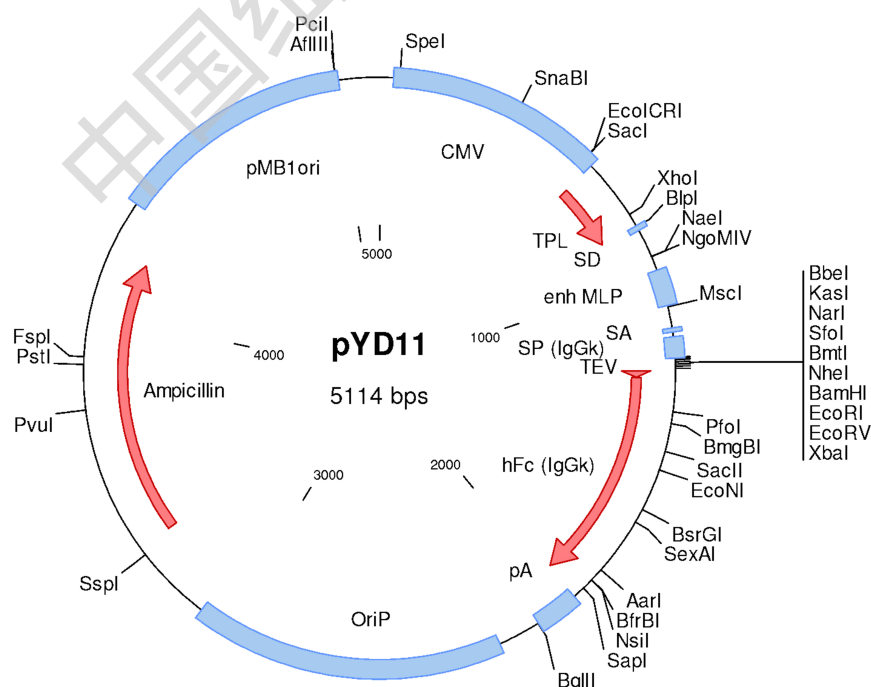


图1 pYD11质粒图谱(根据参考文献[7]修改)

Fig.1 The map of pYD11 plasmid (modified from reference [7])

的VEGF₁₆₅, 培养24 h后, 用化学发光试剂盒Alamar Blue(Invitrogen公司)检测^[17]。Alamar Blue检测试剂的主要成分是一种氧化还原指示剂[oxidation-reduction (REDOX) indicator], 该指示剂被细胞摄取后可以从蓝色无荧光状态被还原为红色的荧光状态, 检测到的光密度或荧光与活细胞的数目成正比, 可较灵敏地检测细胞的增殖情况。

1.3.4 VEGF McAb抑制VEGF诱导HuVEC VEGFR-2 (Tyr1054/9)磷酸化效果观察 每个培养皿接种 2×10^5 HuVEC, 密度为70%左右时用预热至37 °C的Hank's液洗涤1次, 再用无血清的基础培养基饥饿培养12 h后, 弃上清, 加入用PBS稀释的VEGF与VEGF McAb预处理的VEGF制剂各诱导组, 37 °C诱导1 min后裂解细胞, 细胞裂解物用超声波破碎仪破碎^[18]。通过Western blot鉴定HuVEC VEGFR-2磷酸化程度的变化。

1.4 动物肿瘤实验

购买裸鼠后, 消化处于对数生长期的A549细胞, 调节细胞浓度为 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$, 每只裸鼠腋窝皮下注射200 μL A549细胞悬液^[19]。将长出肉眼可见肿瘤的裸鼠平均分成3组, 分别从作为第1 d开始瘤旁注射药物和测量肿瘤大小(2次/周)。每组裸鼠注射药剂用量为: PBS 200 μL , VEGF McAb 50 μg , 顺铂(cisplatin) 80 μg , 抗体和顺铂用200 μL PBS溶解。肿瘤体积按公式 $(V)=1/2ab^2$ 计算, a为肿瘤长半径, b为短半径。

连续给药和测量7周后, 取出裸鼠体内肿瘤称重, 并将肿瘤浸泡在4%中性甲醛中进行固定, 肿瘤固定48 h后进行免疫组化实验。按照公式瘤体抑制率 $(\%)=(1-\text{实验组肿瘤体积}/\text{对照组肿瘤体积}) \times 100\%$, 以及瘤重抑制率 $(\%)=(1-\text{实验组肿瘤重量}/\text{对照组肿瘤重量}) \times 100\%$, 计算瘤体抑制率与瘤重抑制率。

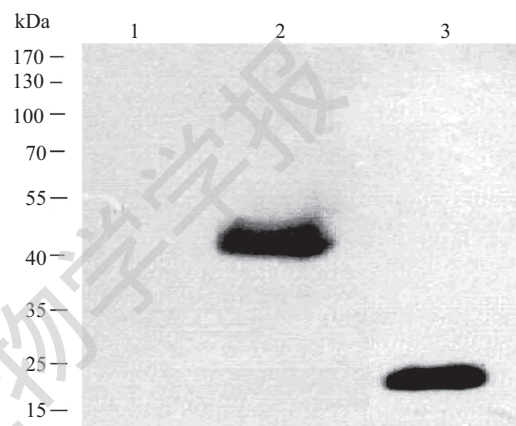
计量材料实验数据以“均值 $\pm$ 标准差”表示。采用Origin 7.5数据分析软件和Image-pro Plus 6.0图形分析软件进行分析。以t分布检验进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 获得VEGF McAb细胞株

DNA免疫Balb/c小鼠4次后, 小鼠血清中的VEGF抗体效价达到1:12 800, 再用VEGF蛋白加

强免疫1次, 随后处死小鼠获取脾脏, 对脾细胞与SP2/0杂交瘤细胞进行融合、筛选阳性克隆, 将阳性克隆经过3次细胞亚克隆后筛选出1株可稳定分泌VEGF中和性抗体的杂交瘤细胞株。将扩增的阳性杂交瘤细胞注入经产鼠腹腔, 12 d后抽取腹水, 利用Sepromax A40 plus亲和层析柱纯化腹水后得到浓度为4.4 mg/mL的VEGF McAb。Western blot结果表明, 腹水中抗体可以特异性结合商品化的VEGF蛋白(17 kDa); pYD11-VEGF转染HEK293-6E细胞后表达重组蛋白VEGF-hFc(IgGk), 免疫球蛋白G的



腹水纯化后Western blot鉴定分析图。泳道1为pYD11质粒转染HEK293-6E细胞裂解物阴性对照鉴定结果; 泳道2为pYD11-VEGF质粒转染HEK293-6E细胞裂解物; 泳道3为VEGF蛋白阳性对照。

Analysis of purified ascetic fluid by Western blot. Lane 1 was negative control, cell lysate of HEK293-6E transfected with pYD11; Lane 2 was cell lysate of HEK293-6E transfected with pYD11-VEGF; Lane 3 was positive control VEGF protein.

图2 抗体鉴定

Fig.2 Identification of antibody

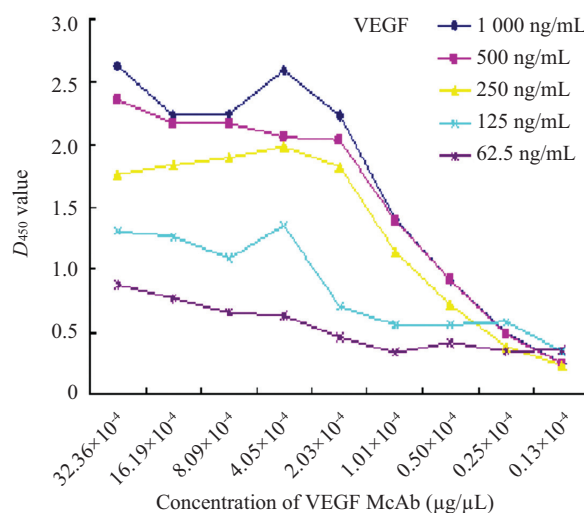
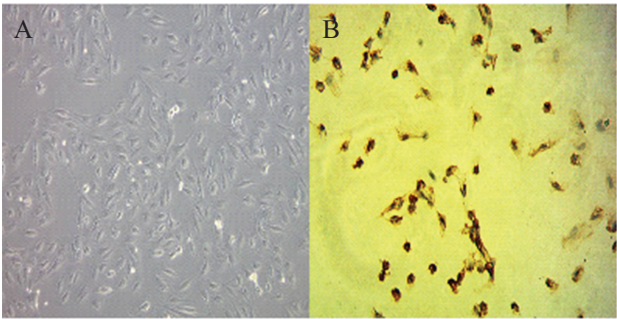


图3 抗原抗体反应折线图

Fig.3 Response curve of binding of VEGF McAb to VEGF



A: 培养1 d后的HuVEC显微照片(200×); B: HuVEC的免疫组化显微照片。鼠抗人Ⅷ因子抗体孵育细胞, DAB染色, 胞质显示棕黄色的为阳性细胞(400×)。

A: photomicrograph of 1-day old cultured HuVEC (200×); B: immunocytochemistry photomicrograph of cultured HuVEC. Cells were incubated with mouse anti human Ⅷ factor followed by DAB dying. Cytoplasm of postive cells were stained with claybank (400×).

图4 纯化的HuVEC形态观察

Fig.4 Characterization of purified HuVEC

k型轻链约25 kDa, VEGF-hFc(IgGk)蛋白为42 kDa, 与图2中该细胞裂解物结合VEGF McAb的条带大小一致; pYD11原质粒转染HEK293-6E细胞作为阴性对照组如图2所示, 没有特异性条带, 可以判断腹水中为VEGF McAb。经间接ELISA方法鉴定VEGF McAb与其家族蛋白VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D无交叉反应, 表明制备的单克隆抗体是特异性的。经后续的ELISA方法测定与计算VEGF McAb效价达到1:800 000(图3), 与蛋白VEGF的亲和能力常数 $K=1.288\times10^9$ 。

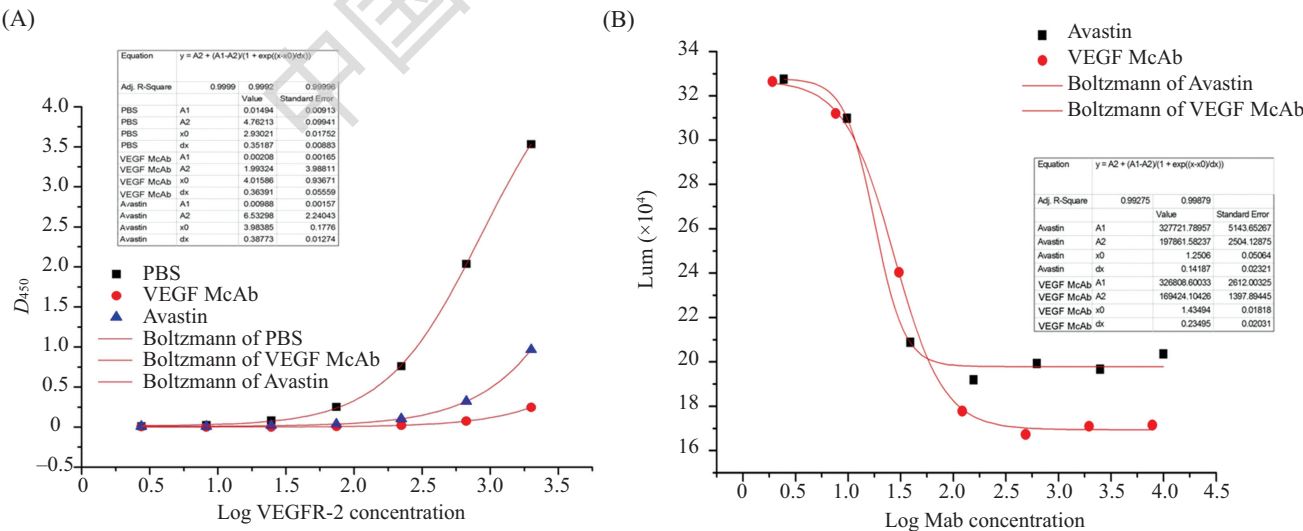
2.2 HuVEC的鉴定

HuVEC分离1 d后放置于倒置显微镜下观察形态。视野中可见HuVEC呈多角形, 中心有单个细胞核, 单层生长, 边缘模糊, 排列紧凑呈铺路石样(图4A)。HuVEC内含有Ⅷ因子, 利用该特性进行免疫细胞化学染色鉴定。免疫组化结果如图4B所示, 在显微镜下可看到棕黄色颗粒图, 阳性细胞约为95%。结果说明, 本研究分离HuVEC的方法可行, 排除了大量成纤维母细胞及平滑肌细胞的混入, 分离得到的细胞可应用于后续实验。

2.3 VEGF McAb与Avastin生物活性比较

作为配体的VEGF与受体VEGFR-2之间存在高亲和性, 本研究用ELISA方法检测了VEGF McAb与Avastin阻遏VEGFR-2与VEGF蛋白结合的能力。结果表明, 两者都可较大幅度阻遏VEGFR-2与VEGF蛋白的结合, 如图5A所示, D_{450} 读数越低, 单克隆抗体对VEGF与VEGFR-2结合的阻抗越明显。进一步的数据分析得出, 在同等单克隆抗体浓度下, VEGF McAb抑制VEGF与VEGFR-2结合的能力比Avastin高8倍左右。

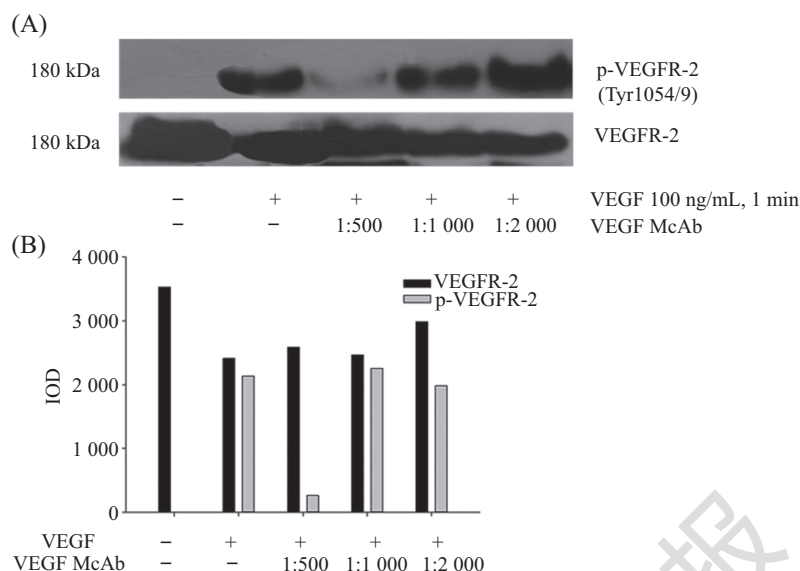
本研究还设计了体外细胞实验研究VEGF McAb与Avastin阻遏HuVEC(含有膜蛋白VEGFR-2)增殖的能力。结果如图5B所示, 两者都可抑制HuVEC的增殖。单克隆抗体浓度较低时, 培液中的细胞生长因子VEGF₁₆₅可与VEGFR-2结合促进



A: 测量单克隆抗体对VEGF与其受体VEGFR-2结合的阻抗作用; B: HuVEC增殖抑制实验测定单克隆抗体拮抗VEGF的能力。
A: measuring the impedance of the monoclonal antibody to the combination of VEGF and its receptor VEGFR-2; B: the antagonism between monoclonal antibody and VEGF by HuVEC viability assay.

图5 VEGF McAb与Avastin生物活性比较

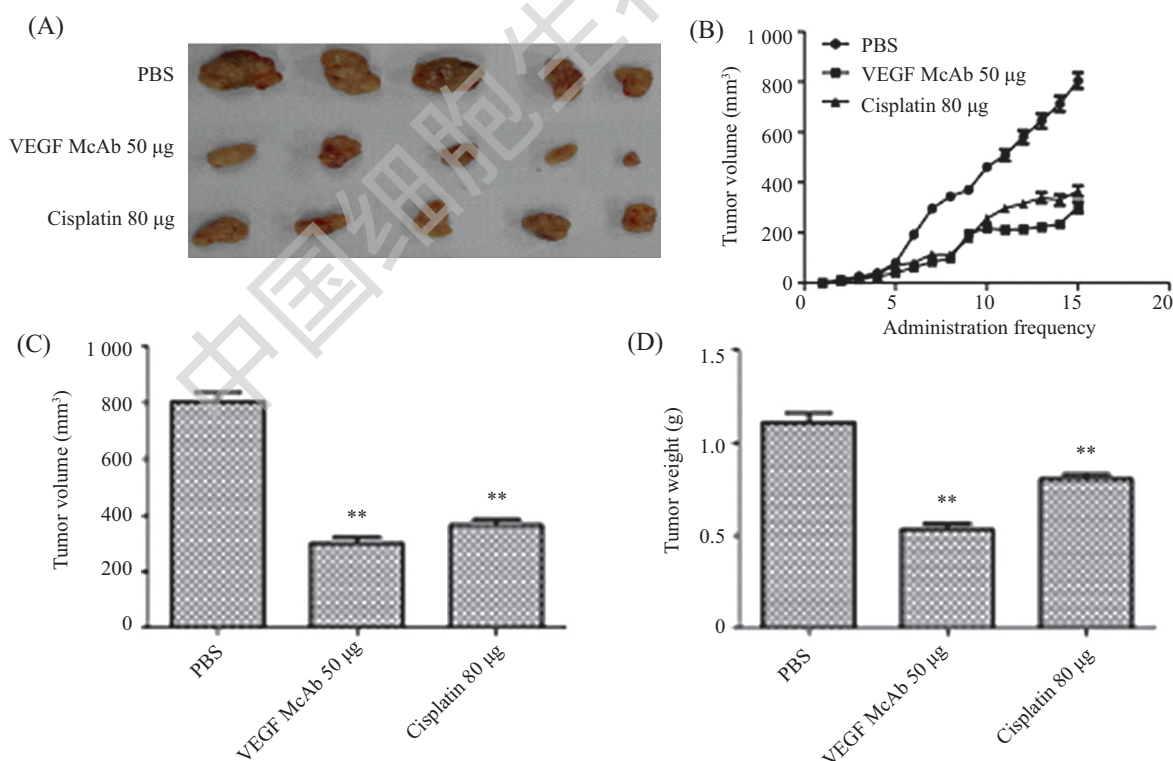
Fig.5 Biological activity comparison of VEGF McAb and Avastin



A: 血清饥饿处理的HuVEC, 经不同配比的VEGF±VEGF McAb诱导后裂解, Western blot分析VEGFR-2磷酸化程度的变化; B: 灰度分析得出的柱状图。

A: Western blot analysis of p-VEGFR-2 with lysates derived from serum-starved HuVEC pretreated with VEGF±VEGF McAb control; B: histogram corresponding to the gray analysis level of the above.

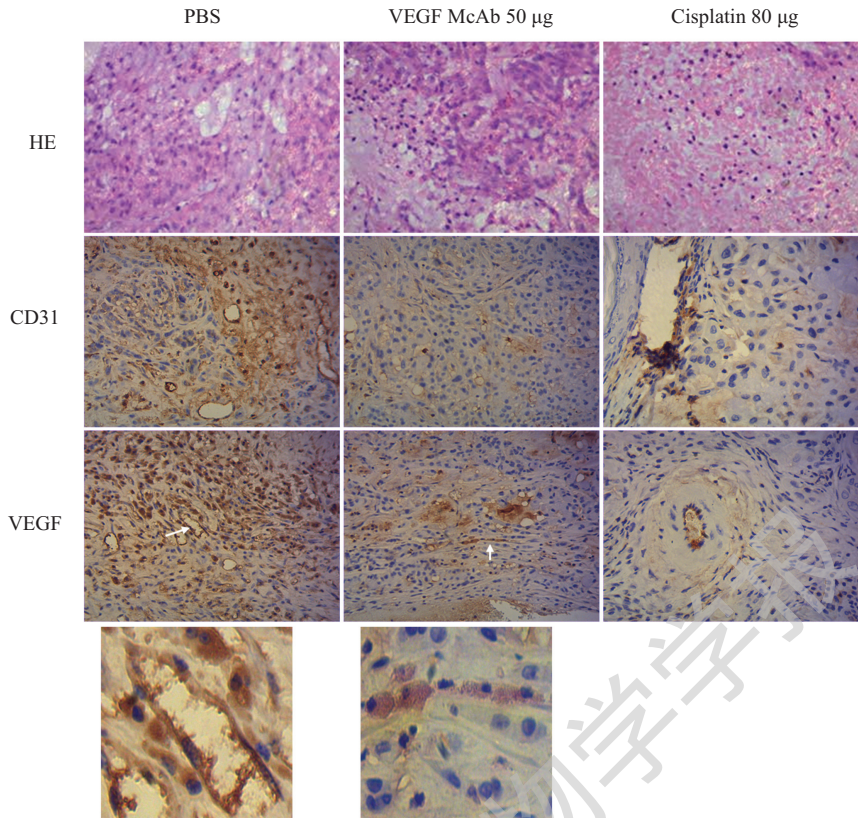
图6 HuVEC中p-VEGFR-2的诱导生成
Fig.6 An inducible p-VEGFR-2 forms in HuVEC



A: 实验裸鼠肿瘤; B: 裸鼠肿瘤体积变化曲线($n=5$); C: 实验结束时肿瘤体积($n=5$); D: 实验裸鼠肿瘤重量($n=5$)。数值以均值±标准误表示, ** $P<0.01$, 与PBS组比较。

A: tumors of animals; B: the variation trend of tumor volume ($n=5$); C: tumor volume when the experiment ended ($n=5$); D: tumor weight of naked mouse. Results were presented as mean±S.D., ** $P<0.01$ compared with PBS group.

图7 VEGF McAb及顺铂抑制肿瘤生长
Fig.7 VEGF McAb and cisplatin inhibited the growth of tumors



HE: 裸鼠注射顺铂80 μg组细胞存在较多细胞凋亡(200×); CD31: PBS组阳性有较多微血管存在(200×); VEGF: PBS组呈强阳性, VEGF 50 μg组及顺铂80 μg组弱阳性(200×); 下方图片为白色箭头标注的局部放大图(400×)。
HE: nude mouse injected with 80 μg cisplatin had more cell apoptosis (200×); CD31: nude mouse injected with PBS demonstrated more microvascular exist (200×); VEGF: nude mouse injected with PBS showed higher concentrations of VEGF, however, smaller were seen with VEGF 50 μg and cisplatin 80 μg control (200×). White arrows indicated the nether amplification of figures (400×).

图8 免疫组化法检测肿瘤组织中CD31及VEGF的表达

Fig.8 The expression of CD31 and VEGF in tumor by immunohistochemical method

HuVEC增殖此时测得的荧光亮度(luminance, Lum)最强。随着单克隆抗体浓度的增加Lum读数逐渐下降, 单克隆抗体对细胞增殖的抑制越明显。进一步的数据分析得出, 在同等单克隆抗体浓度下, VEGF McAb抑制HuVEC增殖的能力比Avastin高3倍左右。

2.4 VEGF对HuVEC膜蛋白VEGFR-2(Tyr1054/9)磷酸化诱导受VEGF McAb抑制的效果观察

从前一实验结果可知, VEGF McAb可阻遏VEGF与VEGFR-2结合进而抑制HuVEC的增殖, 为进一步确定VEGF与VEGFR-2的作用机理, 本研究使用PBS稀释的VEGF±VEGF McAb诱导HuVEC, 然后制备细胞裂解物, 观察VEGFR-2的自身磷酸化情况。结果如图6所示, 不添加VEGF与VEGF McAb时, VEGFR-2几乎以无磷酸化的形式存在; 添加VEGF浓度为100 ng/mL而不添加VEGF McAb时, VEGFR-2以磷酸化的活性形式存在且磷酸化程度最高(VEGFR-2蛋白片段上第1 054位和1 059位的2个酪氨酸是

自磷酸化位点); VEGF浓度为100 ng/mL而VEGF McAb按1:500的比例加入时, VEGFR-2的磷酸化受到较大程度抑制; 而随着VEGF McAb剂量减少(1:1 000、1:2 000), VEGFR-2的磷酸化受抑制程度降低。通过该实验可以进一步证明VEGF中和性抗体可抑制VEGF与VEGFR-2结合以及后续的受体磷酸化, 从而发挥生长抑制的作用, 抑制血管内皮细胞的增殖。

2.5 动物实验结果

统计记录的肿瘤体积测量数据可以发现, PBS对照组与VEGF McAb 50 μg治疗组的肿瘤体积差异随着时间的延长呈增大趋势(图7B)。VEGF McAb 50 μg治疗组与顺铂组的数据通过双样本t检验, $P<0.01$, 差异有统计学意义(图7C和图7D)。经计算, 50 μg VEGF McAb治疗组较PBS组瘤重抑制率为51.5%, 瘤体抑制率为62.5%; 80 μg顺铂组较PBS组, 瘤重抑制率为23%, 瘤体抑制率为54.5%。

肿瘤组织的免疫组化结果如图8所示。HE染色显示, 80 μg 顺铂组出现较多细胞凋亡, 核染色质致密浓缩, 胞核深染; CD31与VEGF是内皮细胞生成标志物, CD31免疫组化结果表明, PBS组肿瘤有较多微血管存在, 而50 μg VEGF McAb治疗组与顺铂组微血管数量较少; PBS组肿瘤VEGF强阳性, 50 μg VEGF McAb治疗组与顺铂组VEGF表达弱阳性。

3 讨论

VEGF是一种特异性的促进血管内皮细胞生长及促进血管形成的生长因子, 其与特异性的受体结合可激活一系列的细胞信号通路。本研究构建了可表达人VEGF蛋白的pYD11-*VEGF*质粒, 并通过DNA免疫的方法制备了VEGF中和性单克隆抗体。DNA免疫是近年发展起来的一种新型抗体制备法, 不仅能更为有效地激发机体的免疫应答, 而且克服了传统蛋白免疫的缺陷, 但DNA免疫较蛋白免疫更耗时间, 这可能与DNA免疫需经过特异性蛋白质表达有关^[20]。

Avastin是在美国第一个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的单抗药物, 它包含了人源抗体的结构区和可结合VEGF的鼠源单抗的互补决定区。本研究比较了VEGF McAb与Avastin的生物活性, 包括抑制VEGF与VEGFR-2结合及抑制HuVEC增殖能力的研究。结果表明, VEGF McAb与Avastin都可较大程度阻遏VEGFR-2与VEGF蛋白的结合, 并可抑制HuVEC的增殖, 在同等单克隆抗体浓度下, VEGF McAb抑制VEGF与VEGFR-2结合的能力比Avastin高8倍左右(图5A), VEGF McAb抑制HuVEC增殖的能力比Avastin高3倍左右, VEGF McAb显示了比Avastin更高的生物活性(图5B)。

VEGF与VEGFR-2结合后, 受体的蛋白激酶功能区被激活, 结果使受体尾部的酪氨酸残基磷酸化, 进而激活一系列下游信号通路, 促进新生血管生成^[6]。本研究的实验已证实, VEGF McAb可较大程度阻遏VEGFR-2与VEGF蛋白的结合, 并抑制HuVEC的增殖。为了进一步明确VEGF与VEGFR-2的作用机理, 本研究设计实验观察了VEGF McAb抑制VEGF诱导HuVEC VEGFR-2(Tyr1054/9)磷酸化的效果(图6)。结果显示, 不添加VEGF与VEGF McAb时, VEGFR-2几乎以无磷酸的形式存在; VEGF浓度为100 ng/mL而不添加VEGF McAb时, VEGFR-2发生磷酸化, 且

磷酸化程度最高; VEGF浓度为100 ng/mL而VEGF McAb稀释度为1:500时, VEGFR-2的磷酸化受到较大程度抑制; 而随着VEGF McAb剂量减少(1:1 000、1:2 000), VEGFR-2的磷酸化受抑制程度降低。

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤, 其中80%~85%的病例为非小细胞肺癌(nonsmall cell lung cancer, NSCLC)。在中国大陆, 肺癌的发病率和病死率一直居恶性肿瘤首位^[21]。本研究用非小细胞肺癌A549细胞注射裸鼠成瘤, 并注射药物VEGF McAb(50 μg /200 μL)与顺铂(80 μg /200 μL), 对照组为PBS 200 μL 。结果表明, 50 μg VEGF McAb组较PBS组瘤重抑制率为51.5%, 瘤体抑制率为62.5%; 80 μg 顺铂组较PBS组瘤重抑制率为23%, 瘤体抑制率为54.5%。从免疫组化结果(图8)中可以看出, PBS对照组肿瘤有较多微血管存在(CD31阳性), VEGF表达强阳性; 50 μg VEGF McAb组与80 μg 顺铂组肿瘤中血管形成显著减少, VEGF表达弱阳性。肿瘤经治疗后, 肿瘤细胞中VEGF表达降低, 与已发表的研究结果^[22-24]一致, 但与Warren等^[1]的结果不完全一致。Hong等^[23]发现, 乳腺癌患者中对Avastin治疗有反应者VEGF下降的更明显, 而Warren等^[1]发现, 人结肠癌经抗VEGF抗体治疗后肿瘤血管形成减少, 但肿瘤细胞中VEGF表达情况与对照组一致, 并无明显下调。这些结论的不一致, 可能原因有VEGF在肿瘤组织中的分布不均一、取材不同以及VEGF的基础表达值与治疗后的变化趋势对疗效的反应程度不同等。

本实验制备的VEGF McAb较Avastin有更高的生物活性, 但鉴于Avastin为重组人源化单抗, 所以没有在动物肿瘤模型中进行两者抗肿瘤活性的比较, 后续的实验将比较人源化后VEGF McAb与Avastin的抗肿瘤活性, 同时考虑到HAHA(human anti-human)效应^[25], 也要比较人源化与未人源化的VEGF McAb的抗肿瘤作用。该VEGF中和性抗体最终将成为一种更有效的抗肿瘤血管生成药物。

参考文献 (References)

- 1 Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95(4): 1789-97.
- 2 Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt5): 853-65.
- 3 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its

- receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
- 4 Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92(6): 735-45.
- 5 Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010; 140(2): 268-79.
- 6 Cai X, Garen A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(14): 6537-41.
- 7 Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, de Crescenzo G, Durocher Y. The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(12): 2069-77.
- 8 Zhang Q, Zhu J. A monoclonal antibody against transmissible gastroenteritis virus generated via immunization of a DNA plasmid bearing TGEV S1 gene. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2013; 32(1): 50-4.
- 9 Costagliola S, Many MC, Denef JF. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest* 2000; 105(6): 803-11.
- 10 Wang S, Lu S. DNA immunization. *Curr Protoc Microbiol* 2013; 31(18): 301-24.
- 11 Russo C, Callegaro L, Lanza E. Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. *J Immunol Methods* 1983; 65(1/2): 269-71.
- 12 Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, *et al.* Transient gene expression in HEK293 Cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol Bioeng* 2005; 90(3): 332-44.
- 13 Beaty JD, Beaty GB, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods* 1987; 100(1/2): 173-9.
- 14 Loomans EE, Roelen AJ, van Damme HS, Bloemers HP, Gribnau TC, Schielen WJ. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1995; 184(2): 207-17.
- 15 Marin V, Kaplanski G, Gres S. Endothelial cell culture: Protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods* 2001; 254 (1/2): 183-90.
- 16 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973; 52(11): 2745-56.
- 17 Mayer T, Jagla B, Wyler MR, Kelly PD, Aulner N, Beard M. Cell-based assays using primary endothelial cells to study multiple steps in inflammation. *Methods Enzymol* 2006; 414: 266-83.
- 18 Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 2008; 456(7223): 809-13.
- 19 Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95(4): 1789-97.
- 20 Khan Kh. DNA vaccines: Roles against diseases. *Germs* 2013; 3(1): 26-35.
- 21 中华人民共和国卫生部. 2008年中国卫生统计年鉴. 北京: 中国协和医科大学出版社(National health commission of the People's Republic of China. National health statistics year book 2008. Beijing: Peking Union Medical College Press) 2008, 214-5.
- 22 Han ES, Burger RA, Darcy KM. Predictive and prognostic angiogenic markers in a gynecologic oncology group phase II trial of bevacizumab in recurrent and persistent ovarian or peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 119(3): 484-90.
- 23 Hong YS, Cho HJ, Kim SY. Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 246-55.
- 24 Wedam SB, Low JA, Yang SX. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(5): 769-77.
- 25 Jones JL, Phuah CL, Cox AL, Thompson SA, Ban M, Shawcross J. IL-21 drives secondary autoimmunity in patients with multiple sclerosis, following therapeutic lymphocyte depletion with alemtuzumab (Campath-1H). *J Clin Invest* 2009; 119(7): 2052-61.