文章编号:1000-5404(2008)16-1557-04

论著

血管抑素下调人舌鳞癌细胞血管内皮生长因子的表达

刘志刚,陈芳育,蒋立辉,王 涛 (重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

摘 要:目的 探讨血管抑素(angiostatin,AS)对人舌鳞癌细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响。**方法** 将Tca8113人舌鳞癌细胞移植到18只裸鼠皮下,用随机数字表法将裸鼠分成3组(每组6只)。PBS组:注射PBS;AS(250 ng)组:注射250 ng纯化AS;AS(30 μg)组:注射30 μg纯化AS,腹腔注射,2次/d,同时测量肿瘤的大小,2次/周。21 d后处死小鼠,将取出的每个肿瘤2等分,一半用免疫组织化学检测VEGF及其两个受体(VEGFR1、VEGFR2)和CD34,用TUNEL法检测肿瘤细胞的凋亡;另一半用半定量RT-PCR检测VEGF、VEGFR1和VEGFR2的mRNA表达。**结果** AS(250 ng)组和AS(30 μg)组中,细胞凋亡指数(AI)明显增加($P<0.05$);而肿瘤体积、微血管密度(MVD,用CD34抗体标记并用来评价肿瘤血管生成)及VEGF、VEGFR1和VEGFR2在蛋白质和mRNA的水平表达,都有明显降低($P<0.05$),且AS(30 μg)组更为显著。**结论** AS下调人舌鳞癌细胞VEGF的表达且呈剂量依赖性。

关键词: 血管抑素;血管内皮生长因子;舌鳞癌
中图法分类号: R73-36;R730.23;R739.86 **文献标识码:** A

Angiostatin down-regulates vascular endothelial growth factor expression in human tongue squamous cell carcinoma cells

LIU Zhi-gang, CHEN Fang-yu, JIANG Li-hui, WANG Tao (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of angiostatin on vascular endothelial growth factor expression in human tongue squamous cell carcinoma cells. **Methods** Subcutaneous xenografts of human tongue squamous cell carcinoma (Tca8113) cell line in BALB/c nude mice were employed and eighteen mice were randomly divided into three groups (6 mice each): the PBS group injected with PBS, the AS group injected with 250 ng purified angiostatin, and the AS group injected with 30 μg purified angiostatin. Reagents were injected intraperitoneally twice daily and tumor volume was calculated twice weekly for 21 d, then animals were sacrificed and each tumor specimen was divided into two parts after surgical resection. The first part was submitted to both immunocytochemistry for VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and CD34, and TUNEL apoptosis assay. The second part was prepared for semi-quantitative RT-PCR analysis of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 mRNA abundance. **Results** There was an increase of apoptotic index (AI) ($P<0.05$) in the AS (250 ng) group and in the AS (30 μg) group and there was a decrease of protein and mRNA expression levels of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2, tumor volume and MVD (tumor angiogenesis was estimated by using CD34 antibody to determine microvessel density) ($P<0.05$). These changes were more obvious in the the AS (30 μg) group than in the AS (250 ng) group ($P<0.05$). **Conclusion** Angiostatin down-regulates vascular endothelial growth factor expression in human tongue squamous cell carcinoma cells in a dose-dependent manner.

Key words: angiostatin; vascular endothelial growth factor; tongue squamous cell carcinoma

血管抑素(angiostatin, AS)是纤溶酶原的内源性裂解片段[1,2],是目前已知的最强的血管生成抑制因子(angiogenesis inhibitors)之一。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是对血管内皮细胞具有高度特异性的丝分裂原,是目前已知最强的血管生成因子(angiogenesis activators)之一,其最主要的成员为VEGF-A(VEGF-A包括VEGF121、

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(0200050062[X11007])
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research of Chongqing Municipal Education Commission (0200050062[X11007])
作者简介:刘志刚,男,湖北省孝感市人,硕士研究生,主要从事口腔颌面外科肿瘤方面的研究。电话:13062397077,E-mail:lzg8273@hotmail.com
通信作者:陈芳育,电话:13808359888
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-09-26

VEGF165 等)。VEGF-A 的生物活性主要是通过同两个酪氨酸激酶受体的相互作用得以实现的,这两个受体是 VEGER1(Flt-1)和 VEGER2(Flk-1/KDR)[3]。人舌癌是最常见的口腔癌,其中又以鳞状细胞癌多见。Hajitou 等[4]认为 AS 下调 VEGF 的表达具有肿瘤类型依赖性,且目前国内少见对舌鳞癌进行相关研究的报道。因此,本研究对 AS 与 VEGF 在舌鳞癌细胞中的关系进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人舌鳞癌细胞株 Tca8113 由四川大学华西校区细胞生物学教研室提供。6~8 周龄 BALB/c 裸小鼠均为雄性,共 18 只,体质量(18±2)g,购自北京医科大学实验动物中心。纯化人血管抑素购于 Haemtech 公司,RNAlater 样品储存液购自 BD 公司,兔抗人多克隆抗体 VEGF、Flt-1、KDR 及 CD34 购自武汉博士德生物工程有限公司,S-P 9001 免疫组化染色试剂盒和 ZLI-9032 浓缩型 DAB 试剂盒购自中杉金桥公司,凋亡试剂盒 POD 购自 Roch 公司,总 RNA 提取试剂(RNAiso Regent)、RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 人舌鳞癌 Tca8113 裸鼠移植瘤模型的建立 在 37℃、5% CO_2的培养箱中,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液对 Tca8113 细胞进行常规培养传代。收集正处于指数增生期的第 6 代 Tca8113 细胞系,并用 0.01 mol/L PBS 液稀释,调整细胞数为 2×10^7 ml^{-1}。在每个裸鼠背部近中线处的皮下注射 2×10^6个 Tca8113 细胞。

1.2.2 实验动物分组 用随机数字表法将 18 只裸鼠分成 3 组,每组 6 只。PBS 组注射 100 μl PBS,AS(250 ng)组注射 250 ng 纯化 AS(溶解于 100 μl 的 PBS 液中),AS(30 μg)组注射 30 μg[5]纯化 AS(溶解于 100 μl 的 PBS 液中),腹腔注射,2 次/d。注射从肿瘤细胞移植当天开始,持续 21 d。

1.2.3 取肿瘤标本 记录每只裸鼠肿瘤的长径和短径,2 次/周,肿瘤体积计算公式[6]:肿瘤体积 = $\pi ab^2/6$,a 为长径,b 为短径。

经过 21 d 的注射后即断颈处死裸鼠,取出肿瘤,并将每个肿瘤切成 2 等分,一半保存在 4% 多聚甲醛中送本校组胚实验室制作成石蜡切片,另一半剪成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后按 RNAlater 样品储存液说明书保存。

1.2.4 免疫组织化学观察

1.2.4.1 操作 按 S-P 9001 免疫组化染色试剂盒中说明书分别对 Tca8113 肿瘤石蜡切片中的 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 和 CD34 进行染色。VEGF、VEGFR1、VEGFR2 和 CD34 一抗的效价均为 1∶100;显色剂用 ZLI-9032 浓缩型 DAB 试剂盒,阳性表达的标准是细胞质被染成棕黄色。

1.2.4.2 结果观察 ①VEGF、VEGFR1、VEGFR2 阳性表达的观察:用成都金盘电子科大多媒体技术有限公司 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统进行分析,主要参数是平均积分光密度(AIOD),即为阳性积分光密度/管壁面积,单位为 IOD/μm^2。②微血管密度计数(microvessel density,MVD):用 CD34 抗体对微血管进行标记。先在光学显微镜选取 3 个微血下管数量最多的区域,即“热点”,再在 200 倍视野下计数 3 个“热点”中微血管数量的总和然后除以 3,即为 MVD 的值[7]。

1.2.5 TUNEL 法检测 按凋亡试剂盒说明书进行操作。阳性标准是细胞核被染成棕黄色。凋亡指数(AI)即是在光学显微镜 200 倍下随机挑选 10 个视野,计数 100 个细胞核中阳性细胞所占的百分比。

1.2.6 半定量 RT-PCR 检测

1.2.6.1 提取总 RNA 剪取 50~100 mg 的 Tca8113 肿瘤组织,按 RNAlater 样品储存液和 RNAiso Regent 说明书进行,并用 20 μl RNase-free 水溶解 RNA,沉淀后备用。

1.2.6.2 反转录反应 检测 RNA 的浓度、纯度及完整性后将符合条件的 RNA 样品予以保留,并将其用 RNase-free 水稀释成 500 ng/μl 的工作液,然后按 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 说明书配制反转录反应液,并在 Mastercycler96 常规 PCR 仪进行反转录反应,反应条件为 42 ℃ 30 min、99 ℃ 5 min 和 5 ℃ 5 min。

1.2.6.3 聚合酶链反应[8] 引物设计见表 1,稀释成 20 μmol/L的工作液。按 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 说明书配制 PCR 反应液,并加入到反转录反应液反应结束后的体系中,然后在 Mastercycler 96 常规 PCR 仪按如下条件进行 PCR 反应:94 ℃温育 2 min 后进入循环过程,即 94 ℃变性 1 min,60 ℃退火 2 min,72 ℃ 延伸 3 min,共 30 个循环。循环结束后于 72 ℃ 温育 10 min,最后 4 ℃保持。

表 1 基因特异性引物序列设计

基因		引物序列
VEGF	正义链	5′-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3′
	反义链	5′-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3′
VEGFR1	正义链	5′-CAAGTGGCCAGAGGCATGGAGTT-3′
	反义链	5′-GATGTAGTCTTTACCATCCTGTTG-3′
VEGFR2	正义链	5′-GAGGGCCTCTCATGGTGATTGT-3′
	反义链	5′-TGCCAGCAGTCCAGCATGGTCTG-3′
β-actin	正义链	5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′
	反义链	5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′

1.2.6.4 结果分析 电泳结束后用 Bio-Rad 的 GelDocXR 凝胶成像系统成像,用 Quantity One 软件进行分析,分析方法用条带轨迹定量法(trace tracking)。半定量值即是用目的 DNA 的曲线下面积光密度值总和与内参 β-actin 的曲线下面积光密度值总和之比,以此来反映目的 mRNA 的相对转录量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行双侧 t 检验。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

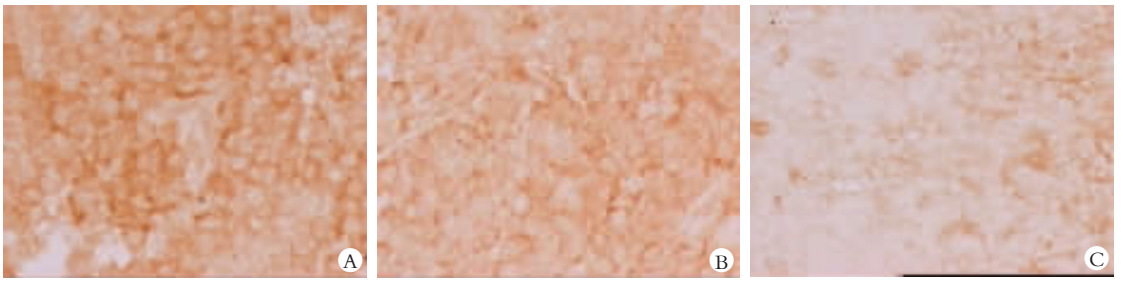
2.1.1 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的免疫组化染色 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 主要表达在肿瘤细胞质中,故 PBS 组、AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组中 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的免疫组化染色结果是肿瘤细胞质都被染成棕黄色。染色强度 PBS 组最强,AS(250 ng)组次之,AS(30 μg)组最弱。见表 2、图 1。

2.1.2 CD34 免疫组化染色 CD34 主要表达在血管内皮细胞质中,CD34 免疫组化染色的阳性结果是血管内皮细胞质被染成棕黄色,故可以显示肿瘤的微血管并进行微血管计数。微血管计数的结果是:PBS 组最多,AS(250 ng)组次之,AS(30 μg)组最少。见表 2、图 2。

表 2　PBS 组、AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组肿瘤体积、MVD、AI、AIOD 和 RT-PCR 半定量值($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积(mm^3)	MVD(个)	AI(%)	AIOD(IOD/μm^2)			RT-PCR 半定量值			
				VEGF	VEGFR1	VEGFR2	VEGF165	VEGF121	VEGFR1	VEGFR2
PBS 组	1 511.0 ± 110.1	150.5 ± 12.1	1.0 ± 0.4	0.107 5 ± 0.006 1	0.083 7 ± 0.000 7	0.159 6 ± 0.000 7	0.470 ± 0.011	0.260 ± 0.021	0.321 ± 0.017	0.602 ± 0.017
AS(250 ng)组	813.0 ± 83.8[a]	50.2 ± 10.0[a]	4.5 ± 0.7[a]	0.048 1 ± 0.006 5[a]	0.029 0 ± 0.000 7[a]	0.079 6 ± 0.000 6[a]	0.250 ± 0.014[a]	0.081 ± 0.013[a]	0.040 ± 0.011[a]	0.352 ± 0.011[a]
AS(30 μg)组	515.0 ± 51.9[ab]	25.5 ± 6.5[ab]	72.0 ± 0.9[ab]	0.001 8 ± 0.000 4[ab]	0.000 9 ± 0.000 2[ab]	0.003 2 ± 0.000 2[ab]	0.108 ± 0.011[ab]	0.042 ± 0.017[ab]	0.020 ± 0.015[ab]	0.168 ± 0.013[ab]

a:$P<0.05$,与 PBS 组比较; b:$P<0.05$,与 AS(250 ng)组比较



A:PBS 组;B:AS(250 ng)组;C:AS(30 μg)组

图 1　3 组 VEGF 在肿瘤细胞的免疫组化染色结果　(S-P×400)

2.2　TUNEL 法检测凋亡的结果

肿瘤细胞凋亡后细胞核形成凋亡小体,经 TUNEL 法染色后呈棕黄色。凋亡指数 PBS 组(1.0 ± 0.4)最小,AS(250 ng)组(4.5 ± 0.7)次之,AS(30 μg)组(72.0 ± 0.9)最大。见表 2、图 3。

2.3　RT-PCR 产物

PBS、AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组中 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的 RT-PCR 电泳图显示了所有预期的扩增产物大小(VEGF165、VEGF121:535、403 bp;VEGFR1:498 bp;VEGFR2:709 bp;β-actin:534 bp)和扩增产物相对表达量(总吸光度值)。相对表达量 PBS 组最多,AS(250 ng)组次之,AS(30 μg)组最少。见表 2 及图 4。

AS(250 ng)和 AS(30 μg)组中,AI 明显增加($P<0.05$),而肿瘤体积[分别为(813.0 ± 83.8)、(25.5 ± 6.5)mm^3,PBS 组为(1 511.0 ± 110.1)mm^3]和微血管密度计数(MVD)[分别为(50.2 ± 10.0)、(25.5 ± 6.5)个,PBS 组为(150.5 ± 12.1)个]以及 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 在蛋白质及 mRNA 水平表达都有明显降低($P<0.05$),且 AS(30 μg)组更为显著。见表 2。

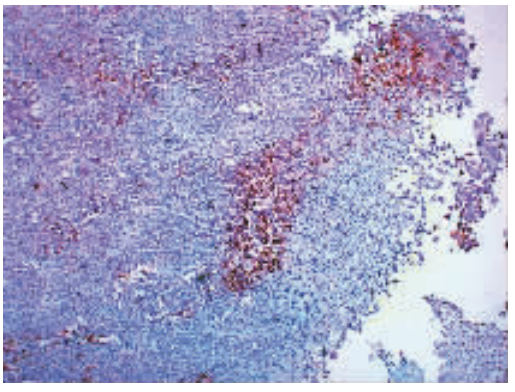


图 2　AS(250 ng)组 CD34 在血管内皮细胞的免疫组化染色结果　(S-P×200)

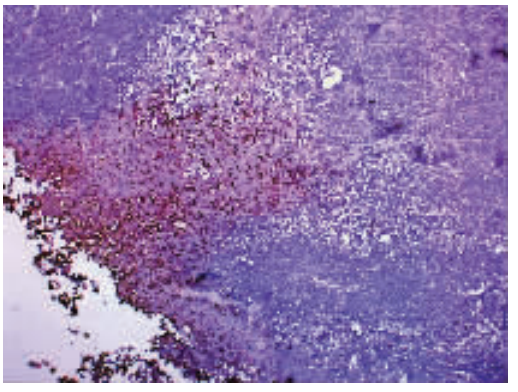
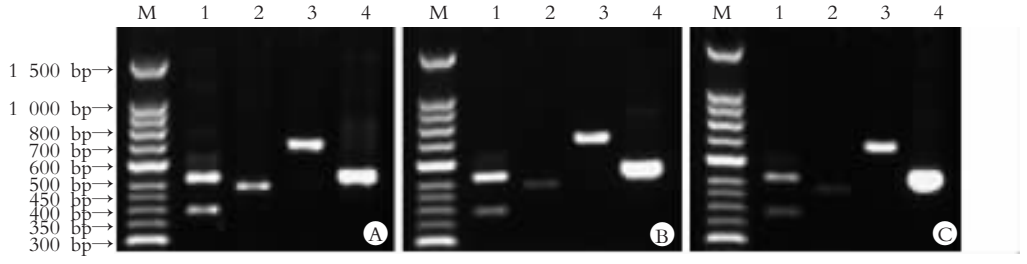


图 3　TUNEL 法检测肿瘤细胞的凋亡情况　(TUNEL×200)



A: PBS 组; B: AS(250 ng)组; C:AS(30 μg)组　M: DNA 标准; 1:VEGF165(535 bp)和 VEGF121(403 bp); 2:VEGFR1(418 bp); 3:VEGFR2(709 bp); 4: β-actin(534 bp)

图 4　3 组中 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的 RT-PCR 电泳图

3 讨论

AS 能够抑制肿瘤的生长和血管生成,这在不同种类的肿瘤实验中都得到了证明[4,5]。本实验中,AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组相对于 PBS 组,在肿瘤体积和 MVD 方面都有明显的减小(或减少)($P<0.05$),而 AS(30 μg)组比 AS(250 ng)组又更为明显($P<0.05$),说明 AS 也能抑制 Tca8113 舌鳞癌的生长和血管生成。

"血管生成切换"[1]是解释 AS 抑制 Tca8113 舌鳞癌的生长和血管生成的理论基础,认为血管生成因子(angiogenic factors)和血管生成抑制因子(angiostatic factors)共同调控血管生成。对于肿瘤而言,是血管生成还是血管抑制,取决于血管生成信号的总和与血管抑制信号的总和之间的抗衡。而 VEGF 是最为重要的血管生成因子,AS 是最为重要的血管生成抑制因子,因此,二者在肿瘤中的对抗,对于肿瘤的血管生成无疑起着决定性的作用。本实验使用了 AS,所以最终抑制了舌鳞癌的血管生成,而血管生成的抑制必然导致其生长的抑制。

关于 AS 和 VEGF 之间的关系,Hajitou 等[4]认为:AS 下调 VEGF 的表达具有肿瘤类型依赖性,即某些种类的肿瘤中 AS 下调 VEGF 的表达,而在另外一些种类的肿瘤中 AS 并不下调 VEGF 的表达。目前已知 AS 下调 C6、9L、PDVA 和 EF43. fgf-4 肿瘤中 VEGF 的表达,不能下调 EC-4、U87 肿瘤中 VEGF 的表达。

AS 是否能够下调 Tca8113 舌鳞癌中 VEGF 的表达?我们的实验数据表明:AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组相对于 PBS 组,在 VEGF 及其两个受体 VEGFR1、VEGFR2 的表达方面(在蛋白质水平和 mRNA 水平上)都有明显的减少($P<0.05$),而 AS(30 μg)组比 AS(250 ng)组又更为明显($P<0.05$)。据此可推测,AS 能够下调 Tca8113 舌鳞癌中 VEGF 的表达,而且呈剂量依赖性[9]。

AS 下调肿瘤中 VEGF 的表达的机制目前尚少见报道。VEGF 主要是由肿瘤细胞合成和分泌的,可以肯定,肿瘤细胞在数量上的减少应该是 AS 下调肿瘤中 VEGF 的表达的原因之一。那么,AS 是如何减少肿瘤细胞的或者说是如何杀灭肿瘤细胞的?我们认为有两个方面的机制:其一,肿瘤生长依赖于血管生成,而 AS 能够通过各种机制[1]抑制肿瘤的血管生成,血管数量的减少必然导致肿瘤细胞氧气和营养物质供应不足以及代谢产物蓄积,从而导致部分肿瘤细胞最终死亡。其二,最近,Chi 等[10]研究发现 AS 在细胞外低 pH 值条件下能够通过肿瘤细胞表面的 ATP 合酶而对肿瘤细胞起直接的细胞毒作用,并发现 AS 对肿瘤细胞的直接细胞毒作用导致肿瘤细胞的大量凋亡。而本实验数据表明:AS(250 ng)组和 AS(30 μg)组相对于 PBS 组,在肿瘤细胞的 AI 都有明显的增多($P<0.05$),而 AS(30 μg)组比 AS(250 ng)组又更为明显($P<0.05$)。这两方面的机制相互配合,结果导致大量的肿瘤细胞被杀灭。大量的肿瘤细胞被杀灭则必然导致 VEGF 表达的下调。

本研究表明 AS 能够下调 Tca8113 舌鳞癌中 VEGF 的表达,而且呈剂量依赖性。从我们的实验可以看出,在 AS 的作用下,VEGF 的变化与肿瘤 TUMOR VOLUME 和 MVD 的变化是一致的,而与 AI 的变化是相反的,而且呈剂量依赖性。所以,VEGF 表达的变化程度可以作为评价 AS 治疗 Tca8113 舌鳞癌疗效的一个指标。VEGFR1、VEGFR2 也可以作为评价 AS 治疗 Tca8113 舌鳞癌疗效的一个指标。

参考文献:

[1] Wahl M L, Kenan D J, Gonzalez-Gronow M, *et al*. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated[J]. J Cell Biochem, 2005, 96 (2): 242 - 261.

[2] Hanford H A, Wong C A, Kassan H, *et al*. Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells[J]. Cancer Res, 2003, 63 (14): 4275 - 4280.

[3] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions[J]. Clin Sci (Lond), 2005, 109(3): 227 - 241.

[4] Hajitou A, Grignet C, Devy L, *et al*. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1802 - 1804.

[5] Beerepoot L V, Witteveen E O, Groenewegen G, *et al*. Recombinant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: a pharmacokinetic and long-term safety study[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4025 - 4033.

[6] An P, Lei H, Zhang J, *et al*. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library[J]. Int J Cancer, 2004, 111(2): 165 - 173.

[7] Kyzas P A, Stefanou D, Agnantis N J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip[J]. Oral Oncol, 2004, 40(9): 941 - 947.

[8] Masood R, Cai J, Zheng T, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors[J]. Blood, 2001, 98(6): 1904 - 1913.

[9] 季 平, 李庆妹, 张福军, 等. RNAi 沉默 c-erbB-2、c-raf-1 表达对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的干预作用[J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29(5): 567 - 571.

[10] Chi S L, Pizzo S V. Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 875 - 882.

(编辑 薛国文)