基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0358-03

胃癌裸鼠移植瘤生长过程中反义血管内皮生长因子 -C 的作用

朱 鹏,张剑波,王继见
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:通过观察胃癌裸鼠移植瘤的生长过程,研究反义血管内皮生长因子 -C(Anti-sense vascular endothelial growth factor-C,Anti-sense VEGF-C)基因转染胃癌细胞后对其在裸鼠的成瘤性和肿瘤脉管生成中的作用。方法:将 30 只裸鼠随机分成 3 组,将转染了 anti-sense VEGF-C 基因、转染空白质粒及未转染质粒的人胃癌细胞系 SGC-7901 3 种细胞的细胞悬液,分别接种于 3 组裸鼠皮下,使之在裸鼠皮下产生肿瘤结节,观察肿瘤生成的速度并对肿瘤组织中的微淋巴管及微血管进行检测。结果:转染 anti-sense VEGF-C 基因裸鼠肿瘤生长速度明显减慢且瘤体较小($P<0.05$)。第 1、2、3 周,转染 anti-sense VEGF-C 组肿瘤组织中微淋巴管密度较其他 2 组明显减少 ($P<0.05$):转染 anti-sense VEGF-C 组分别为 4.0 ± 2.2/HF、6.0 ± 3.1/HF 和 9.0 ± 2.7/HF;转染空白质粒组分别为 6.0 ± 8.7/HF、9.0 ± 3.5/HF 和 18.0 ± 7.2/HF;未转染质粒组分别为 7.0 ± 4.9/HF,9.0 ± 6.4/HF 和 19.0 ± 6.5/HF。但新生血管生成的数量 3 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:anti-sense VEGF-C 转染对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠成瘤性及肿瘤淋巴管生成有明显的抑制作用,但对肿瘤新生血管的形成影响不大。VEGF-C 可能参与了胃癌新生淋巴管的形成过程。

【关键词】裸鼠;移植瘤;反义血管内皮生长因子 -C;成瘤性;脉管生成
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-04

Effects of antisense VEGF-C gene on vegetation process of implanted gastric tumor SGC-7901 in nude mice

ZHU Peng, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of tumorigenicity and vascular generation of nude mice on antisence vascular endothelial growth factor-C(antisense VEGF-C) gene transinfection of human gastric carcinoma cell by observing the vegetation process of implanted gastric tumor. *Methods*:30 nude mice were divided into three groups randomly:transgenic anti-sense VEGF-C group, transgenic pure liposome group and non-transgenic group. The cell suspension of gastric carcinoma cells SGC-7901 non-transinfected or transinfected by anti-sense VEGF-C gene or pure liposome were subcutaneously injected into those mice. After injection, the size and growth velocity of those neoplasma were detected. The Microlymphatic vessel density (MLVD) and microvessel density (MVD) of tumor were detected too. *Results*:The neoplasma grew more slowly and was smaller in the mice in those transinfected by anti-sense VEGF-C gene than in non-transgenic ones($P<0.05$). At the end of the 1st, 2nd and 3rd week, there was significant difference between the anti-sense VEGF-C group and the other groups on lymphangiogenesis of the tumor ($P<0.05$). the MLVD in the anti-sense VEGF-C group was 4 ± 2.2/HF, 6 ± 3.1/HF and 9 ± 2.7/HF respectively. In the transgenic pure liposome group, it was 6 ± 8.7/HF, 9 ± 3.5/HF and 18 ± 7.2/HF respectively. In the non-transgenic group, it was 7.0 ± 4.9/HF, 9.0 ± 6.4/HF and 19.0 ± 6.5/HF respectively. But it had little difference on angiogenesis of the tumor in the 3 groups($P>0.05$). *Conclusions*: The antisense VEGF-C gene suppress the tumorigenicity and lymphangiogenesis in the human SGC-7901 gastric carcinoma cell apparently .but it had little effects on angiogenesis of the tumor. VEGF-C might participate the lymphangiogenesis of the gastric tumor.

【Key words】Nude mice; Transplantable tumor ; Antisense vascular endothelial growth factor-C; Tumorigenicity ; Vascular generation

基因治疗已经成为丧失手术机会的肿瘤患者的新的治疗手段。肿瘤基因治疗的发展,有赖于发现更多,更有效的靶点,采用多基因联合治疗。我们在研究中发现[1]血管内皮生长因子 -C(Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)可能可以作为胃癌基因治疗的新靶点。其通过调节组织新生微血管和淋巴管,影响胃癌生长、转移及预后。于是在前期试验中[2,3]成功合成反义血管内皮生长因子 -C 重组质粒(pCI-neo

作者介绍:朱 鹏(1972-),男,副教授,博士后,
研究方向:胃肠道肿瘤。

基金项目:重庆医科大学科研创新基金(编号:CX200503)。

-anti VEGF-C),并将其转染到人胃癌细胞系 SGC-7901 中,发现其 VEGF-C 蛋白的表达明显减少,且可抑制胃癌细胞的体外生长。本实验分别将转染了 pCI-neo-anti VEGF-C、pCI-neo 空载体以及未转染的人胃癌细胞系 SGC-7901 注入裸鼠皮下成瘤,观察反义 VEGF-C 基因转染人胃癌细胞系 SGC-7901 后对其体外成瘤性和脉管生成的影响,进一步研究血管内皮生长因子 -C 在胃癌脉管生成和转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

BALB/c-nu 30 只,雌性,4~5 周龄(华中科技大学同济医学院动物实验中心)。人胃癌细胞系 SGC-7901(上海复旦大学附属肿瘤医院)、转染空载体质粒及真核表达质粒 pCI-neo-anti VEGF-C 的人胃癌细胞系 SGC-7901(质粒均在前期试验中成功构建并转染[2])。兔抗人 VEGF-C 单克隆抗体、山羊血清、羊抗兔多抗、链霉抗生物素蛋白 - 生物素 - 过氧化物酶复合体法(即用型 SABC)免疫组织化学试剂盒、血管内皮细胞标记物 CD105、血管内皮生长因子受体 VEGFR-3(北京中山金桥公司)。

1.2 裸鼠胃癌移植瘤模型的建立

将 30 只裸鼠随机分成 3 组:转染 anti-sense VEGF-C 组、转染空白质粒组以及未转染质粒组,每组 10 只。按前期试验方法[3],取对数生长期内已培养传代的人胃癌细胞系 SGC-7901,转染空载体质粒的 SGC-7901 以及转染 pCI-neo-anti VEGF-C 的 SGC-7901 3 种细胞的细胞悬液 0.2 ml(1×10^7 个 /ml),分别接种于 3 组裸鼠皮下,建立异种肿瘤移植的裸鼠胃癌模型。每 2 d 注射 1 次,连续 3 次。

1.3 裸鼠移植瘤动态检测

在裸鼠皮下形成移植瘤后,每隔 2 d 测量肿瘤结节并计算肿瘤体积,动态观察裸鼠皮下肿瘤形成情况。肿瘤体积(V)$=L \times t_2 \times 1/6\pi$。L 为肿瘤最大径,t 为最小径。分别于注射后每周(1~7 周)或动物死亡后切取肿瘤组织,制成石蜡切片备用。

1.4 移植瘤微脉管密度(Microvessel density,MVD)检测

将制备好的石蜡切片按 SABC 法进行免疫组织化学检测[1]。按试剂盒说明书操作检测 CD105 和血管内皮生长因子受体 -3(Vascular endothelial cell growth factor receptor 3, VEGFR-3),计算新生微血管和淋巴管的密度。先于 100 倍视野下确定 4 个脉管密集区域,然后在 200 倍视野下计数 4 个区域的新生微脉管数,取其平均数作为该标本新生微脉管密度。判断标准:CD105 主要表达在血管内皮细胞的胞膜和胞质,染色后出现棕黄色颗粒。对有平滑肌组织包绕者视为血管。VEGFR-3 阳性染色淋巴管和血管胞质均出现棕黄色颗粒,位于肿瘤组织间质。淋巴管管壁细胞多呈裂隙状,内无红细胞。

1.5 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS15.0 统计分析软件进行 t 检验。

2 结 果

2.1 裸鼠移植瘤生成变化

3 种细胞注射到皮下 3 d 左右,3 组均有肿瘤结节形成,随时间延长瘤体逐渐增大,头 3 周肿瘤生长较快,4 周后瘤体生长速度明显减慢。转染 anti-sense VEGF-C 组明显比转染空白质粒组以及未转染质粒组肿瘤生长慢而小,接种后第 6、18、30 d 时(表 1),肿瘤体积差异均有统计学意义($P<0.05$)。而未转染质粒组和转染空白质粒组相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 移植瘤微淋巴管及微血管密度测定结果

从第 4 周开始,各组小鼠开始死亡,转染空白质粒组与未转染质粒组死亡小鼠数量较多,且根据标本检查结果提示 4 周后肿瘤细胞中微淋巴管及微血管增生均不明显,故选择头 3 周肿瘤标本进行统计学分析。第 1、2、3 周,肿瘤细胞中微淋巴管密度,转染 anti-sense VEGF-C 组与未转染质粒组、转染空白质粒组淋巴管密度差异均有统计学意义($P<0.05$);而转染空白质粒组与未转染质粒组相比较淋巴管密度差异无统计学意义($P>0.05$)。肿瘤细胞中微血管密度,3 组标本在第 1、2、3 周时微血管密度差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 2、表 3)。

另外见转染空白质粒组和未转染质粒组的移植瘤组织细胞异型性明显,表现为瘤细胞呈巢状或条索状分布,间质中纤维组织少,瘤细胞大小不等,细胞核大深染,核仁明显。病理性核分裂象多见。转染 anti-sense VEGF-C 组移植瘤组织细胞呈稀疏的条索状生长,纤维间质增多,瘤细胞变小(图 1~3)。

表 1 不同时间裸鼠体内生成瘤体的大小(mm^3)

组别	第 6 d	第 18 d	第 30 d	P
转染 anti-sense VEGF-C 组	51.7 ± 11.8	85.1 ± 18.1	159.7 ± 53.7	
未转染质粒组	68.3 ± 15.1	156.2 ± 55.6	486.7 ± 101.9	<0.05
转染空白质粒组	68.1 ± 12.4	154.3 ± 54.7	482.8 ± 58.4	<0.05

表 2 不同时间裸鼠移植瘤微淋巴管密度(/HF)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周	P
转染 anti-sense VEGF-C 组	4.0 ± 2.2	6.0 ± 3.1	9.0 ± 2.7	
未转染质粒组	7.0 ± 4.9	9.0 ± 6.4	19.0 ± 6.5	<0.05
转染空白质粒组	6.0 ± 8.7	9.0 ± 3.5	18.0 ± 7.2	<0.05

表 3 不同时间裸鼠移植瘤微血管密度(/HF)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周	*P*
转染 anti-sense VEGF-C 组	3.0 ± 2.4	5.0 ± 2.1	8.0 ± 1.7	
未转染质粒组	4.0 ± 1.5	6.0 ± 1.3	9.0 ± 1.2	>0.05
转染空白质粒组	4.0 ± 1.8	6.0 ± 2.7	10.0 ± 1.3	>0.05

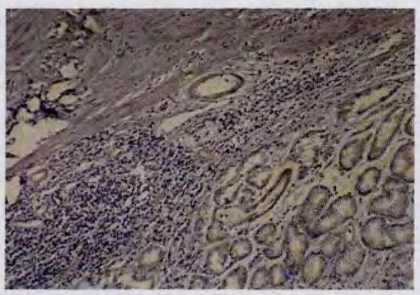


图 1 未转染质粒组裸鼠胃癌移植瘤免疫组化(大量微血管及微淋巴管 SP × 200)

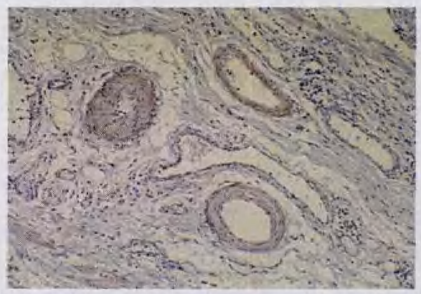


图 2 转染空白质粒组裸鼠胃癌移植瘤免疫组化(大量微血管及微淋巴管 SP × 200)

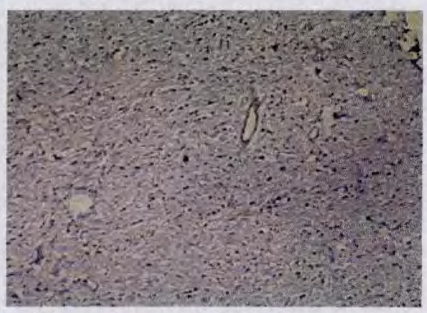


图 3 转染 anti-sense VEGF-C 组裸鼠胃癌移植瘤免疫组化(大量微血管及少量微淋巴管 SP × 200)

3 讨 论

胃癌的淋巴途径转移是其转移的重要途径，也是判断患者预后和确定治疗方案的重要依据。胃癌细胞通过淋巴管扩散是其主要的生物学特征之一。长期以来，由于缺乏特异性淋巴管内皮细胞生成因子和标记物，对肿瘤细胞发生淋巴转移相关机制的研究受到限制。近年来发现的 VEGF-C 是 VEGF 家族的一个新成员[4,5]，可特异性地激活淋巴管内皮的生长因子受体 VEGFR-3，促进实体瘤内淋巴管的新生并促进肿瘤细胞的淋巴结转移。

VEGF-C 在肿瘤转移的不同阶段都具有重要的作用。许多肿瘤细胞都高表达 VEGF-C，并且其表达水平与肿瘤淋巴结转移成正相关，我们在前期研究中也证实了这一点[1,4,5]。应用淋巴管特异性标记物 VEGFR-3 进行免疫染色，发现 VEGF-C 可调节肿瘤外周淋巴管生成，不仅诱导形成新的淋巴管，还可以使现存的淋巴管增生，引起外周淋巴管直径增加，并且可诱导新生淋巴管与已存淋巴管愈合，使肿瘤细胞从新生淋巴管进入淋巴结发生转移，通过淋巴系统向全身其他器官扩散。VEGF-C 高表达促进肿瘤转移的机制可能是促进淋巴管内皮增生，淋巴管数目增多，增大了瘤细胞与淋巴管内皮接触的表面积，增加脉管的通透性，改变淋巴管内皮黏附特性或表面趋化因子的表达。

本研究用转染反义 VEGF-C 的人胃癌细胞 SGC-7901 在裸鼠皮下成瘤，实验结果表明：转染反义 VEGF-C 组移植瘤生长速度明显慢于未转染质粒组，并且肿瘤细胞活性及侵袭力明显低于转染空白质粒组。因此笔者认为 VEGF-C 可能具有促进肿瘤细胞生长的作用，但其作用机制还有待于进一步研究。实验结果显示，转染 anti-sense VEGF-C 组移植瘤组织中微血管密度和新生血管的数量在第 1、2、3 周时同转染空白质粒组和未转染质粒组相比无显著性差异，说明 VEGF-C 没有直接促进肿瘤新生血管形成的作用。而转染 anti-sense VEGF-C 组移植瘤组织中新生淋巴管密度在第 1、2、3 周时与转染空白质粒组和未转染质粒组相比具有显著性差异，说明 VEGF-C 具有促进肿瘤新生淋巴管形成的作用，这与国内外文献报道[4-6]相一致。本研究利用反义技术通过封闭 VEGF-C 的基因表达阻遏了裸鼠胃癌移植瘤的恶性表型，抑制了移植瘤的生长及其新生淋巴管的形成，为胃癌的基因临床治疗提供了初步的实验依据。

参 考 文 献

[1] 彭庆弟，朱 鹏，时 德.VEGF-C 表达与微血管和淋巴管的关系及其在胃癌转移中的作用[J].重庆医科大学学报，2008，33(2):159-162.

[2] 朱 鹏，张剑波，代远斌，等.血管内皮生长因子 -C 正、反义真核表达载体的构建及鉴定[J].解放军医学杂志，2008，33(12):1455-1458.

[3] 朱 鹏，张剑波，王继见，等.外源性反义血管内皮生长因子 -C 基因稳定转染对人胃癌细胞 SGC-7901 体外生长的影响[J].重庆医科大学学报，2009，34(5):558-561.

[4] Van T P O.Lymphatic dissemination of tumor cells and the formation of micrometastases[J].Lancet Oncol，2002，3(1):44-52.

[5] Skobe M.Concurrent induction of lymphangiogenesis，angiogenesis，and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma[J].Am Pathol，2001，159(3):893-903.

[6] Padm T P.Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics[J].Science，2002，296(5):1883-1886.

（责任编辑：冉明会）