泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1176-04

超声微泡介导 VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠膀胱癌移植瘤生长的抑制作用

高 渝[1],肖 亚[1],黄赤兵[1],张唯力[2],王志刚[3]

(1. 第三军医大学附属新桥医院泌尿外二科,重庆 400037;2. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010;
3. 重庆医科大学医学影像学研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨利用超声辐照微泡造影剂介导血管内皮生长因子(Vascular endotheliar growth factor,VEGF)反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotides,ASODN)对人膀胱癌裸鼠移植瘤的抑制效应。方法:人膀胱癌裸鼠皮下移植瘤模型建立后,将成瘤后的裸鼠随机分为 3 组:UM+ASODN 组每只裸鼠尾静脉注射微泡造影剂与 VEGF-ASODN 混合物,并对移植瘤体用超声波进行辐照;UM 组每只裸鼠尾静脉注射微泡造影剂并以同样的条件进行体外超声辐照;单纯对照组每只裸鼠尾静脉注射生理盐水,各组处理每隔 2 d 进行 1 次,共计 5 次。观察裸鼠移植瘤生长情况,免疫组化 SP 法测 Ki67、CD34、VEGF 的表达,计算微血管密度、细胞增殖指数,TUNEL 法测细胞凋亡指数。结果:UM+ASODN 组裸鼠皮下肿瘤生长速度较对照组明显减慢,肿瘤组织 VEGF 的表达及微血管密度较对照组降低($P<0.05$);与对照组相比,UM+ASODN 组肿瘤细胞的凋亡增加($P<0.01$),而细胞增殖减少($P<0.05$)。结论:超声微泡介导的 VEGF 反义寡核苷酸转染能有效抑制膀胱癌裸鼠皮下移植瘤的生长。

【关键词】超声微泡;血管内皮生长因子;膀胱肿瘤;反义寡核苷酸

【中国图书分类法分类号】R737.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

Inhibitory effects of VEGF antisense oligodeoxynucleotides on bladder carcinoma in nude mice mediated by ultrasound microbubble

GAO Yu, et al

(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of inhibition of vascular endothelial growth factor(VEGF) antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) on human bladder carcinoma in nude mice mediated by ultrasound microbubble. *Methods*: The mice were randomly divided into 3 groups when transplantation tumor was established: For UM+ASODN group, mixture of microbubble and VEGF-ASODN was inject into every mice from caudal vein plus ultrasound tumor local irradiation. For UM group, microbubble was inject into very mice from caudal vein plus local irradiation with the same condition. For control group, physiological saline was inject into every mice from caudal vein.The treatment was performed every 3 days with total 5 times.The volume change of mouse subcutane tumors was observed.Evaluate the expression of VEGF and CD34 and Ki67 with immunohistochemistry dyeing and calculate the microvessel density (MVD) and cell proliferation index;TUNEL assay was used to analyse the apoptosis of tumor cells. *Results*: The growth speed of nude mice tumor in UM+ASODN group was obviously slower than control group; The expression of VEGF and The MVD in UM+ ASODN group was lower than control group($P<0.05$); To contrast with control group, the apoptosis of tumor in UM+ ASODN group was increased($P<0.01$), but the proliferate of tumor in UM+ ASODN group was decreased ($P<0.05$). *Conclusion*: VEGF antisense oligonucleotides mediated by ultrasound microbubbe can efficiently inhibit the growth of human bladder carcinoma in nude mice.

【Key words】Ultrasound microbubbles; VEGF; Bladder tumor; Antisense oligonucleotides

膀胱癌是泌尿外科最常见的恶性肿瘤,其手术后复发率高,多需辅以放、化疗、免疫治疗等辅助治疗以预防或推迟其复发,但效果均不够满意。研究表明,肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤新生血管的生成,而血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是促进微血管生长的最重要的因子,如能有效抑制其表达,便可减少肿瘤血管新生,达到抑制肿瘤生长、发展及转移的目的。目前从基因

作者介绍:高 渝(1981-),男,住院医师,硕士,
研究方向:泌尿系统肿瘤。

水平上抑制 VEGF 及 VEGFR 表达的抗血管生成的研究逐渐受到人们的关注，但是如何将目的基因安全和靶向地转染人靶细胞并得到高表达仍是肿瘤基因治疗领域的难点。我们利用超声微泡介导 VEGF 反义寡核苷酸（Antisense oligodeoxynucleotides，ASODN）转染作用于人膀胱癌裸鼠移植瘤模型，探讨超声微泡介导 VEGF 反义寡核苷酸转染抑制膀胱肿瘤的生长及其作用机制，为膀胱肿瘤的治疗提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养

人膀胱癌 T24 细胞株由重庆医科大学基础研究所惠赠，常规复苏后，用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液（每毫升培养液含 100 U 青霉素，100 μg 链霉素）常规培养，每 2~3 d 用 0.1%的胰酶消化后传代。

1.2 主要试剂和仪器

超声微泡造影剂及 CGZZ 型超声基因转染仪（超声波发射频率 300 ~ 1 000 kHz，声强范围 0.25 ~ 2.5 W/cm²）由重庆医科大学超声影像学研究所研制。VEGF、Ki67、CD34 鼠单克隆抗体及 S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司；TUNEL 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。VEGF 反义核苷酸的合成序列参照李维方等[11]的设计（5'-GCAGTAGCT-GCGCTGATAGTGC-3'），由上海生工生物工程公司合成并进行硫代修饰。

1.3 实验动物

Balb/c 裸小鼠 18 只，雌性，鼠龄 5~6 周，体重 18~20 g，购于重庆医科大学实验动物中心，在 SPF 条件下饲养。

1.4 人膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立

取对数生长期 T24 细胞以 0.25%胰蛋白酶 37℃消化，加入无血清培养液，台盼蓝染色检测活细胞比率＞95%，调整细胞悬液的细胞浓度至 1.0×10^7 个 /ml。在无菌条件下于裸鼠右股部外侧皮下注射 T24 细胞悬液，每只 0.1 ml，接种后在 SPF 条件下常规饲养。

1.5 实验分组及处理方法

接种 T24 细胞 14 d 后，将成瘤后的裸鼠随机分为 3 组（每组 6 只）：超声 + 微泡 +VEGF 反义寡核苷酸（UM+ASODN）组、UM 组和单纯对照组。UM+ASODN 组每只裸鼠经尾静脉注射超声微泡与 VEGF 反义寡核苷酸混合物 0.3 ml（含 VEGF-ASODN 约 66 μg）后，立即用超声转染仪以频率 1 MHz，功率 0.75 W/cm²，紧贴移植瘤体进行体外照射，照射 10 s 间隔 10 s，共 2 min；UM 组每只裸鼠经尾静脉注射微泡造影剂 0.3 ml 后，立即用超声转染仪以相同条件进行体外照射；单纯对照组每只裸鼠经尾静脉注射 0.9%生理盐水 0.3 ml。以上处理每隔 2 d 进行 1 次，共 5 次。定期测量各组裸鼠皮下肿瘤体积大小。治疗结束 48 h 后，断颈处死裸鼠，分离出肿瘤组织，采用免疫组化法检测 VEGF、CD34、Ki67 的表达，计算微血管密度（MVD）及细胞增殖指数；采用 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡。

1.6 统计学分析

利用 SPSS12.0 软件分析，各组数据采用（$\bar{x} \pm s$）表示，多组计量资料数据比较采用方差分析，$P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠皮下移植瘤生长情况

分组处理时各组裸鼠皮下移植瘤大小相近（50 ~ 60 mm³），治疗开始后，UM+ASODN 组肿瘤生长速度明显减慢，而单纯对照组与 UM 组肿瘤生长速度加快（见图 1）。治疗结束后 UM+ASODN 组肿瘤平均体积与 UM 组和单纯对照组相比均有显著性差异（$P<0.01$），UM+ASODN 抑瘤率为 67.22%

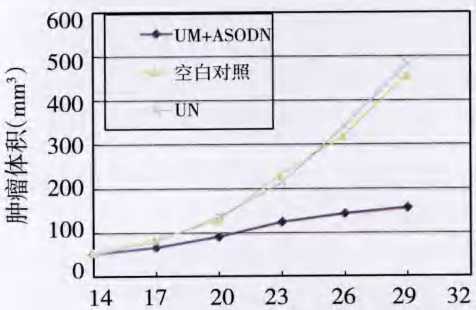


图 1 裸鼠皮下肿瘤生长曲线

表 1 裸鼠皮下肿瘤的平均体积与抑瘤率

分组	肿瘤平均体积（mm³）	抑瘤率（%）
UM+ASODN 组	158.44 ± 20.25[ab]	67.22
UM 组	482.33 ± 72.96	--
单纯对照组	454.84 ± 65.36	--

注：与单纯对照组相比，[a]：$P<0.01$；与 UM 组相比，[b]：$P<0.01$

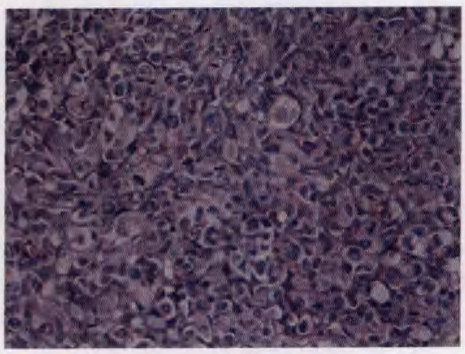
（见表 1），治疗期间各组均无动物死亡。

2.2 肿瘤组织的病理学检查

大体形态：UM 组和单纯对照组瘤体较大，可见分叶结节状，表面有迂曲血管，剖面渗血较多；UM+ ASODN 组肿瘤瘤体较小呈球形，表面血管相对较少，淡红色，质软，瘤体中心坏死灶较多，剖面渗血较少。光镜下形态：UM 组和单纯对照组肿瘤细胞较大，密集聚集呈巢状团块（图 2），而 UM+ ASODN 组肿瘤细胞较小，较稀疏，核分裂象相对较少（图 3）。

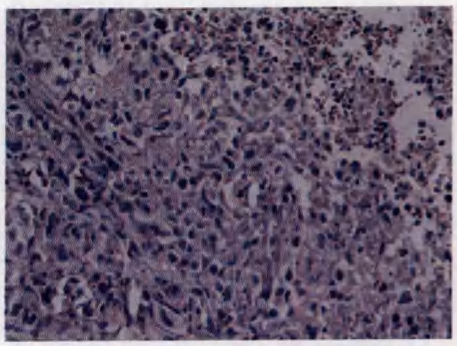
2.3 VEGF 的表达

VEGF 的阳性表达呈棕黄色，主要位于肿瘤细胞胞浆内及部分血管内皮细胞。UM+ASODN 组的 VEGF 表达明显被抑制（图 4），阳性细胞数明显少于 UM 组和单纯对照组（图 5），并且着色较浅。用图像分析系统对免疫组织化学结果进行光密度和面密度分析，结果显示 UM+ASODN 组平均光密



肿瘤细胞较大

图 2 对照组裸鼠肿瘤（HE，×400）



肿瘤细胞较小，核分裂相相对较少

图 3 UM+ASODN 组裸鼠肿瘤（HE，×400）

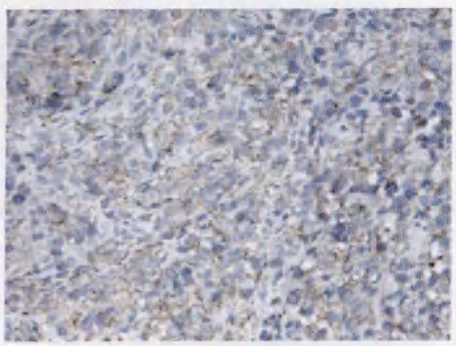


图 4 UM+ASODN 组裸鼠肿瘤 VEGF 的表达

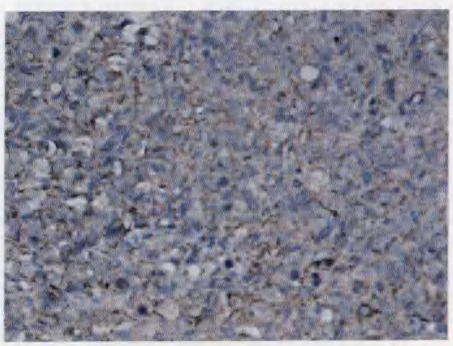


图 5 对照组裸鼠肿瘤 VEGF 的表达

度与面密度值明显降低且较 UM 组和单纯对照组差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4 CD34 的表达情况及微血管密度（Microvessel density，MVD）

免疫组化法检测 CD34 的表达呈棕褐色，主要位于肿瘤组织间质内皮细胞；UM+ ASODN 组 CD34 阳性细胞数较 UM 组和单纯对照组减少，且显示的微血管形态相对规则。根据免疫组化染色 CD34 抗原标记肿瘤内皮细胞计算 MVD：UM+ASODN 组 MVD 明显低于 UM 组和单纯对照组（$P<0.05$）。

2.5 肿瘤细胞增殖及凋亡情况

根据 Ki67 表达阳性的细胞数计算肿瘤细胞增殖指数：结果显示 UM+ASODN 组细胞增殖指数明显低于 UM 组和单纯对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；光镜下见肿瘤组织中凋亡细胞呈黄褐色染色，表现为核染色质的浓缩、边聚、碎裂等，可见 UM+ASODN 组凋亡细胞数明显较 UM 组和单纯对照组增多，根据凋亡细胞阳性数计算凋亡指数：结果显示 UM+ASODN 组细胞凋亡指数明显高于 UM 组和单纯对照组，差异具有统计学意义（$P<0.01$）（表 2）。

表 2 肿瘤细胞增殖及凋亡情况

分组	细胞增殖指数(%)	细胞凋亡指数(%)
UM+ASODN 组	19.31 ± 3.48^{ac}	40.18 ± 9.38
UM 组	36.95 ± 6.13	50.70 ± 6.80^{bd}
单纯对照组	14.61 ± 4.91	13.86 ± 4.95

注：与单纯对照组相比，[a].$P<0.05$，[b].$P<0.01$；与 UM 组相比，[c]$P<0.05$，[d].$P<0.01$

3 讨 论

3.1 血管内皮生长因子在肿瘤生长中的作用

肿瘤生长离不开血管生成，当肿瘤达到一定体积就要依赖于肿瘤细胞分泌的血管生成因子诱导血管生成来支持肿瘤进一步发展和转移[2]。在血管生成过程中，VEGF 是作用最强的因子之一，是一种高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂素，通过与其特异性受体 VEGFR 结合，引起一系列信号传导，刺激血管内皮细胞增殖和血管通透性增加，从而促进新生血管生成。

膀胱癌是泌尿外科最常见的恶性肿瘤，其生物学行为复杂多变，突出表现为易复发、多发、浸润和转移等。与大多数实体肿瘤一样，在膀胱癌的整个发生、发展过程中血管生成几乎贯穿于始终。Yang 等[3]取 161 例膀胱癌样本用免疫组化的方式研究 VEGF 基因的表达情况，同时取 32 例正常膀胱粘膜为对照组。结果显示正常组和病例组之间 VEGF 基因的表达差异有统计学意义，随着临床分期分级的增高，VEGF 基因表达的阳性率明显提高。Santos[4]用免疫组化方式研究 66 个浅表乳头状膀胱肿瘤患者中 VEGF 的表达以及血管新生的存在，VEGF 的免疫组化阳性率出现在所有样本中，说明 VEGF 与膀胱癌的发生发展密切相关。

3.2 以 VEGF 为靶点的抗肿瘤治疗策略

由于实体肿瘤离开新生血管的支持不能生长或播散，若抑制肿瘤新生血管的生长，便可使肿瘤因缺血、缺氧而部分死亡，进而阻止其继续生长以及向身体其他部位转移[5]。因此通过抑制血管生成的途径进行抗肿瘤治疗成为新兴的肿瘤治疗方案。与传统的抗肿瘤治疗方案相比，抗肿瘤血管治疗

则具有许多优点:①具有一定的广谱性,因为不同类型实体瘤的生存和生长均需要血液供应,其血管结构也大致相同;②肿瘤血管内皮细胞仍属正常二倍体细胞,因而不会像肿瘤细胞那样易于对治疗药物产生耐药突变;③相对于细胞毒性药物具有较高的特异性;④具有放大效应,肿瘤血管内皮的有限损害就可造成大量肿瘤细胞的生长抑制;⑤肿瘤抗血管治疗与化疗、放疗及放射免疫疗法等联合使用可以增强其抗肿瘤治疗的效应[6]。目前世界上正在广泛开展以 VEGF 为靶点的抗肿瘤血管生成治疗方法的研究,其中从基因水平上抑制 VEGF 及 VEGFR 表达的抗血管生成策略初显成效,国内外研究表明,以 VEGF 及其受体为靶点的基因治疗能够有效抑制肿瘤细胞或是移植瘤的生长[7-9]。

在本实验中,我们设计了 VEGF 反义寡核苷酸序列,通过体内转染 VEGF 反义寡核苷酸,探讨其对人膀胱癌裸鼠移植肿瘤的抑制效应。从裸鼠皮下肿瘤生长曲线可以看出,转染了 VEGF 反义寡核苷酸的实验组肿瘤生长速度明显较对照组减慢;UM+ASODN 组治疗结束后肿瘤平均体积也明显小于单纯对照组与 UM 组,差异有统计学意义($P<0.01$),UM+ASODN 组抑瘤率为 67.22%,提示转染 VEGF 反义寡核苷酸可能通过下调肿瘤组织 VEGF 的表达抑制了肿瘤新生血管的生成,导致肿瘤组织因缺血、缺氧造成部分坏死,进而使其生长转移的速度减慢。本实验进一步检测了肿瘤细胞增殖指数及凋亡指数,结果显示,UM+ASODN 组肿瘤细胞增殖指数较单纯对照组和 UM 组明显降低($P<0.05$),而 UM+ASODN 组肿瘤细胞凋亡指数却较另外两组明显增加($P<0.01$)。表明裸鼠皮下肿瘤转染了 VEGF 反义寡核苷酸之后,肿瘤细胞凋亡增加,细胞增殖却减少,因此通过病理检查我们能够观察到与对照组相比较转染了 VEGF 的实验组肿瘤组织坏死灶相对较多。证明了转染 VEGF 反义寡核苷酸能够有效抑制人膀胱癌裸鼠移植瘤的生长,推测其机制可能是下调了肿瘤组织 VEGF 的蛋白表达,致使肿瘤血管新生减少,干扰血供,进而导致肿瘤细胞凋亡/增殖比例增高,最终抑制肿瘤的生长。

3.3 超声微泡在基因转移中的应用

超声微泡造影剂作为一种新型的体内基因转染载体,将表面粘附或内部包裹有目的基因的超声造影剂经静脉注射后,在靶细胞或组织给予一定条件的超声照射,可明显提高体内局部组织、细胞的基因转染和表达,有望成为一种安全、简便、高效、具有一定靶向性的体内转染方法。冉海涛等[10]研究超声空化作用对体外培养细胞细胞膜的生物学效应,发现超声破坏微泡所产生的空化效应使细胞膜上出现可逆性小孔,致细胞膜的通透性增高。空化效应瞬间产生的"激震波"(Shockwave)使细胞膜表面出现可逆性小孔,提高了细胞膜的通透性,外源基因因此能较容易地经细胞膜上的小孔进入细胞内,从而增强外源基因的摄取、转染和表达。国内外已有相关报道,超声微泡造影剂能够增强基因对肝细胞、心肌细胞、血管内皮细胞、骨骼肌等的转染效率[11-14]。

在本实验中我们采用微泡造影剂作为载体,通过低强度超声在体外定位辐照微泡对裸鼠皮下移植瘤进行 VEGF 反义寡核苷酸转染,结果显示,UM+ASODN 组 VEGF 的表达较单纯对照组和 UM 组明显降低($P<0.05$),表明超声辐照微泡造影剂有效的介导了 VEGF 反义寡核苷酸的转染,致使肿瘤组织 VEGF 蛋白表达减少。说明超声微泡可能为基因的转染提供一种新的有效手段,当然,如何解决好超声波使用剂量与微泡浓度及组织损伤的关系,以及构建有组织特异性和靶向性的载体还有待进一步探讨。

本实验的初步研究结果表明,利用超声辐照微泡造影剂介导 VEGF 反义寡核苷酸转染能够有效下调人膀胱癌裸鼠移植瘤组织 VEGF 的表达,减少肿瘤组织新生血管的生成,继而导致肿瘤细胞凋亡增加而增殖减少,最终达到抑制肿瘤生长的效应,随着超声微泡造影剂携带基因治疗研究的进一步发展,将有望为膀胱癌的综合治疗提供一种新的思路和手段。

参 考 文 献

[1] 李维芳, 张光霁, 朱 诚, 等. VEGF 反义寡核苷酸抑制 C 胶质瘤细胞 VEGF 表达的作用和效果[J].第二军医大学学报,2002,23(2): 156-158

[2] Folkman J. Seminars in medicine of beth israel hospital. clinical applications of research in angiogenesis [J].N Engl J Med,1995,333:1757-1763.

[3] Yang C C,Hu K C,Yeh W M.The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression[J].Urol Oncol,2004,22 (1):1-6.

[4] Santos L,Costa C,Pereira S,et al. Neovascularisation is a prognostic factor of early recurrence in T_1/G_2 urothelial bladder tumours [J]. Ann Oncol,2003,14(9): 1419-1424.

[5] Folman J.What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J]? J Natl Cancer Inst,1990,82(1):4-6.

[6] Burke P A, DeNard S J.Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy [J]. Rev Oncol Hemat,2001,39(1-2):155-171.

[7] 张海燕,高大新,李 萍,等. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸抑制甲状腺癌血管生成的效应[J].中华内科杂志,2005,44(4):280-284.

[8] 陈基善,张雅洁,胡帅尔,等. VEGF-A/VEGF-C 反义脱氧寡核苷酸对乳腺癌生长及其脉管生成的影响[J]. 癌症,2007,26(9):972-976.

[9] 姬立芹,赵纯全,干晓芹. VEGF- C 反义寡核苷酸对卵巢癌细胞 SKOV3 的黏附、侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(6):610-614.

[10] 冉海涛,任 红,王志刚,等.超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志,2003,12(8):499-501.

[11] 冉海涛,任 红,王志刚,等.超声波与微泡声学造影剂增强体外培养肿瘤细胞基因转染实验研究[J]. 中国医学影像技术,2005,21(8):1151-1154.

[12] 凌智瑜,王志刚,冉海涛,等.超声微泡造影剂对心肌组织毛细血管通透性的影响实验研究[J].中国超声医学杂志,2004,20(5):327-330.

[13] Nie F,Xu H X,Tang Q,et al.Microbubble-enhanced ultrasound exposure improves gene transfer in vascular endothelial cells[J].World J Gastroenterol,2006,12 (46):7508-7513.

[14] Leong-Poi H, Kuliszewski M A, Lekas M, et al. Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated VEGF165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle[J].Circ Res,2007,101(3):295-303.

(责任编辑:冉明会)