基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0558-04

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

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:观察以 pCI-neo 为载体的血管内皮生长因子 -C(Vascular endothelial growth factor -C,VEGF-C)反义基因转染的人胃癌细胞 SGC-7901 中 VEGF-C 蛋白的表达,并研究其对人胃癌细胞体外生长的影响。方法:应用重组质粒 pCI-neo-anti VEGF-C 和 pCI-neo 空载体质粒,以脂质体转染法转染体外培养的人胃癌细胞株,以未转染组为对照,经 G418 筛选抗性克隆,扩大培养后,再用免疫组化和 Western-blot 分析 VEGF-C 基因及蛋白的表达,最后用 MTT 法分析其对细胞生长的抑制作用。结果:免疫组化和 Western-blot 均显示 pCI-neo-anti VEGF-C 转染组无 VEGF-C mRNA 及其蛋白的表达,MTT 检测表明 pCI-neo-anti VEGF-C 转染组活细胞数较其它各组均低($P<0.05$)。结论:pCI-neo-anti VEGF-C 成功转染人胃癌细胞 SGC-7901 且可封闭 VEGF-C mRNA,使已转染 pCI-neo-anti VEGF-C 的人胃癌细胞 VEGF-C 蛋白的表达减少,并能抑制胃癌细胞 SGC-7901 的体外生长,为进一步研究 VEGF-C 的生物学功能及胃癌的基因治疗研究创造了条件。

【关键词】人胃癌细胞株;反义寡核苷酸类;血管内皮生长因子 -C;基因转染
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-06

Effects of exogenous antisense VEGF-C gene on growth of human gastric carcinoma cell line SGC-7901 in vitro

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

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of VEGF-C protein in human gastric cancer cells SGC-7901 those transfected by pCI-neo-antisense VEGF-C and investigate whether antisense VEGF-C gene could inhibit the growth of human gastric carcinoma cell line in vitro. *Methods*: By the liposome infection protocol, We transfected two different plasmids including pCI-neo and pCI-neo antisense VEGF-C into human gastric cancer cell line SGC-7901 cultured in vitro. Then those resistant clones were selected by G418 and expanded in DMEM culture medium. Then we used Immunohistochemical method and Western-blot to detect target genes and its expression. The cell viability was detected by MTT assay. We took the untransfected group as the control. *Results*: The immunohistochemical method and Western-blot showed that there were no expression of VEGF-C mRNA and its protein in the group that transfected by plasmid pCI-neo antisense VEGF-C. MTT assay showed that the group of transfected with antisense VEGF-C had a lower cell viability than other groups ($P<0.05$). *Conclusion*: The target genes were successfully transfected and the expression of VEGF-C mRNA and its protein in SGC-7901 cells could be inhibited by pCI-neo-antisense VEGF-C. The study also showed that antisense VEGF-C gene could suppress the growth of human gastric cells in vitro. These results created the condition for further study of the biologic functions of VEGF-C and gene therapy for gastria carcinoma.

【Key words】Cell line of gastric carcinoma; Antisense oligonucleotides; Vascular endothelial factor-c growth(VEGF-C); Gene transfection

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤,基因治疗可能成为那些已丧失手术时机患者的第五大治疗手段。胃癌的基因治疗,要想取得突破性进展,有赖于发现更多,更有效的靶点,采用多基因联合治疗。因此,寻找新的针对胃癌的目的基因是亟待研究的课题。

我们在试验中得出[1]:血管内皮生长因子-C(Vascular endothelial growth factor-C,VEGF-C)通过调节组织新生微血管和淋巴管,影响胃癌生长、转移及

作者介绍:朱 鹏(1972-),男,副教授,博士,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(CX200503)。

预后。本实验选择高表达 VEGF-C 并且有较强血管形成能力的人胃癌细胞系 SGC-7901，转染前期试验[2]成功合成的以 pCI-neo 为载体的反义 VEGF-C 基因（pCI-neo-anti VEGF-C gene）。观察转染前后人胃癌细胞中 VEGF-C 的表达，采用 MTT 法观察其对人胃癌细胞体外生长的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pCI-neo-anti VEGF-C（重组质粒由前期试验成功构建[2]）、人胃癌细胞系 SGC-7901（中科院上海细胞所）、鼠抗人 VEGF-C 单克隆抗体（R&D Systems）、FITC 标记的羊抗鼠 IgG、兔抗人 VEGF-C、HRP 标记的羊抗兔 IgG（北京中山金桥公司）、BCA 蛋白质定量检测试剂（SK3021，上海生工生物工程技术服务有限公司）、pEGFP-N1（Clontech）、DMEM 高糖型培养基（Gibco）、G418（Promega）、DMSO（sigma）、Lipofectamine2000 及无血清培养基 OPTI-MEMZ（Gibco）、B 型去内毒素超纯质粒小量快速提取试剂盒（北京博大泰克生物基因技术有限责任公司）。

1.2 重组质粒 pCI-neo-anti VEGF-C 和 pCI-neo 空载体质粒的制备与浓缩

将前期试验[2]培养的过夜细菌细胞用 B 型去内毒素超纯质粒小量快速提取试剂盒提取质粒。产物测 $OD_{260/280}$ 定量，保存于 -20℃备用。

1.3 SGC-7901 细胞的培养及转染

按说明书制备好 Lipofectamine2000 和质粒 DNA 的混合物转染液，并转染至呈对数生长期的人胃癌细胞系 SGC-7901 细胞，培养 64 h 后，更换选择性培养基 G418 进行筛选并构建出稳定表达的细胞系。转染细胞按 1:10 稀释传代，约 10~14 d 后出现细胞克隆，在培养瓶中扩增培养，连续稳定传代 2 个月。

1.4 免疫印迹检测 VEGF-C 反义核酸对 SGC-7901 细胞 VEGF-C 表达的影响

样品分为 3 组：未转染组、转染 pCI-neo 空质粒组、转染反义质粒组。提取细胞胞浆总蛋白，-70℃冻存。BCA 蛋白质定量检测试剂（SK3021）盒定量蛋白质，在预热的酶标仪上测定 A562，根据标准曲线计算出蛋白浓度。制备电泳凝胶（分离胶浓度为 12%），进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE。样品蛋白质充分变性后行转印与免疫印迹。

1.5 免疫组化检测 VEGF-C 反义核酸对 SGC-7901 细胞 VEGF-C 表达的影响

样品分为 4 组：只加两种抗体的阴性对照组、未转染组、转染 pCI-neo 空质粒组、转染反义质粒组。添加兔抗人 VEGF-C 抗体和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 后显色、洗涤、复染、分化、脱水、透明、封片并拍照。

1.6 MTT 实验

将扩大培养后的各组细胞分别以每孔 5×10^4 个 /ml 接种于 96 孔板，每组 3 个复孔，每孔体积 100 μl。在 5%CO_2，37℃及饱和湿度条件下培养孵育后，每孔加入 100 μl DMSO。振荡 15 min，以酶标仪检测 570 nm 波长下其光吸收值，其增殖能力大小以平均 OD 值分析。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

0.25%胰酶和 0.02%EDTA 消化收获培养的转染及对照组细胞（含悬浮及贴壁细胞）。FCM 法对凋亡细胞进行定量检测。将细胞用两种染色同时染色后，可以检测出非凋亡的活细胞（Annexin V 阴性 /PI 阴性），凋亡细胞（Annexin V 阳性 /PI 阴性）及坏死细胞（Annexin V 阳性 /PI 阳性）。最后计算凋亡细胞比率。

1.8 统计学方法

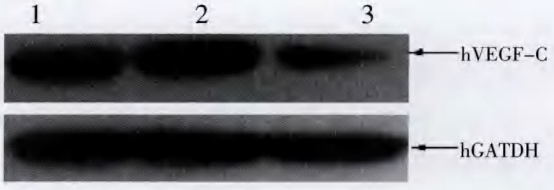
数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，统计分析采用 t 检验及 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 转染细胞株的筛选及 VEGF-C 反义核酸效果的检测

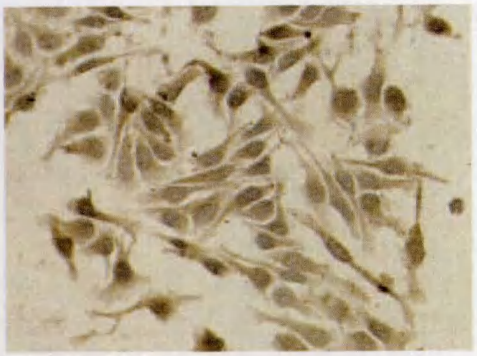
2.1.1 脂质体转汰转染 转染了人反义 VEGF-C 基因的细胞在含有 1 mg/ml 的 G418 的作用下，5 d 后大部分细胞死亡，再接着筛选 2 d，可见对照孔未转染细胞几乎全部死亡，而转染细胞孔中有抗性细胞逐渐扩增；降低 G418 浓度至 400 μg/ml，持续筛选 2 周后，得到 8 个抗 G418 阳性克隆，取出单个克隆细胞，转入 96 孔板中培养，待生长融合后转至 24 孔板，继续用 G418 400 μg/ml，压力筛选扩大培养，稳定传代 2 个月后对各实验组和未转染组进行检测。

2.1.2 Western-Blot 结果 通过免疫印迹（Western-Blot）检测未转染组、转染 pCI-neo 空质粒组、转染反义质粒组中 VEGF-C 的表达，以内参抗体GAPDH（KC-5G5）作为内参对照，结果显示转染反义质粒组中 VEGF-C 表达强度明显降低，结果如下。

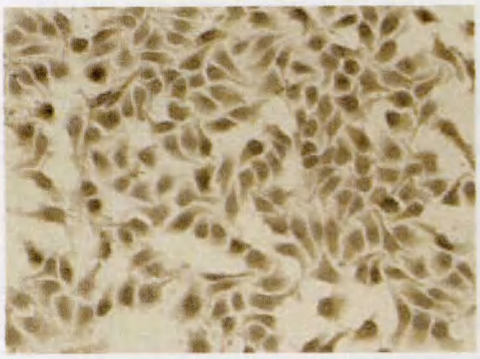


1. 未转染组；2. 空白质粒转染组；3. 反义 VEGF-C 转染组

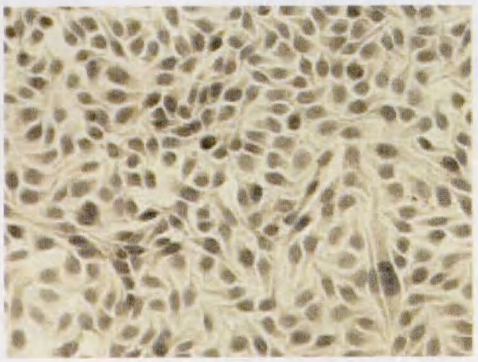
图 2 免疫印迹检测 VEGF-C 的表达



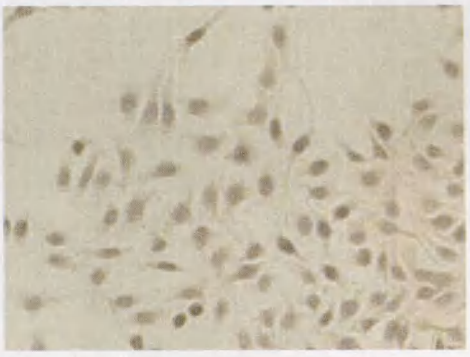
A. SGC-7901 细胞 VEGF-C 表达(SP ×200)



B. 转染空白质粒的 SGC-7901 细胞 VEGF-C 表达(SP ×200)



C. 转染了反义质粒的 SGC-7901(SP ×200)



D. 阴性对照组(SP×200)

图 3 免疫组化检测 VEGF-C 的表达

2.1.3 免疫组化检测 VEGF-C 蛋白表达结果 未转染组及转染空白质粒组阳性信号位于胞质胞浆中，呈清晰棕黄色颗粒弥漫分布，提示 VEGF-C 蛋白表达。而转染 pCI-neo-anti VEGF-C 组细胞胞浆胞核呈蓝色，提示无 VEGF-C 蛋白表达，说明转染的反义核酸封闭了 VEGF-C 的表达。

2.2 MTT 法检测人胃癌细胞体外增殖能力

用 MTT 法检测未转染组、转染空白质粒组、转染反义质粒组细胞体外增殖的能力（表 1）。发现 pCI-neo-anti VEGF-C 转染组与其它两组细胞差异有统计学意义（$P<0.05$），而 pCI-neo 空载体质粒转染组细胞与未转染组细胞之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果显示反义血管内皮生长因子-C 基因转染能够抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的生长。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

pCI-neo-anti VEGF-C 转染组早期凋亡细胞百

表 1 3 组肿瘤细胞体外增殖能力的比较

Cell line	n	OD($\bar{x} \pm s$)
人胃癌细胞株 SGC-7901	5	0.509 9 ± 0.130 2
转染 pCI-neo 人胃癌细胞株	5	0.480 4 ± 0.154 8
转染 pCI-neo-anti VEGF-C 人胃癌细胞株	5	0.278 7 ± 0.078 7

表 2 FITC-PI 双染流氏细胞术检测

	构成比(%)				
	UL	UR	LL	LR	P 值
未转染组	0.19	2.85	94.74	1.17	$P<0.01$
pCI-neo 转染组	1.56	3.77	91.15	3.55	$P<0.01$
pCI-neo-anti VEGF-C 转染组	1.06	10.80	66.44	21.68	

UL：损伤细胞；UR：晚期凋亡细胞和继发坏死细胞；LL：活细胞；LR：早期凋亡细胞，P 值为各组分别与 PCI-neo-anti VEGF-C 转染组比较结果

分数与晚期凋亡和继发坏死细胞百分数均明显高于未转染组及 pCI-neo 空载体质粒转染组，而活细胞百分数明显低于未转染组及 pCI-neo 空载体质粒转染组（表 2）。经用 χ^2 检验，差异有统计学意义（$P<0.01$）。表明反义血管内皮生长因子-C 基因转染能促进肿瘤细胞（人胃癌细胞株）凋亡。

3 讨 论

3.1 转染方法的选择

用于基因转染的方法有多种，如磷酸钙沉淀法、DEAE-葡萄糖介导法、电穿孔法、脂质体介导法和基因枪法等。上述几种方法各具优点，不同宿主细胞对各种方法的敏感性也各异。本实验采用脂质体介导法转染人胃癌细胞系取得成功，与以往应用磷酸钙或腺病毒作为载体比较[3]，脂质体载体转染具有方便、高效、稳定的特点。其它常用的转染方法转染细胞效率低，转染率多在 20%左右，而脂质体转染肿瘤细胞效率较高，在 50%左右。其原因在于脂质体是由脂质双分子层组成的封闭囊泡，无毒、无免疫原性。其作为基因载体可以携载各种基因片段，保护基因不被核酸酶降解且脂质体的脂质双层分子可以掺入糖脂和抗体等归巢装置（Homing devices），因此脂质体作为基因转染的载体在基因治疗研究上具有广阔的应用前景。

3.2 转染细胞的筛选及检测

宿主细胞经转染后，仅部分细胞能摄取质粒而表达外源基因，多数细胞不表达外源基因。在表达外源基因的细胞中，绝大部分仅为暂时表达，因质粒存在于胞浆中，其随细胞分裂而逐渐丢失。只有极少数质粒能整合于宿主细胞基因组中而得以稳定表达。即使在所谓稳定表达的细胞中，整合的基因也经常丢失。因此，对转染后的细胞进行培养中，须去除不表达外源基因的细胞而保留表达目的基因的细胞，所有基因工程中所选用的外源基因的载体均有用作筛选的基因。本实验中 pCI-neo 质粒采用 neo 基因作为筛选基因。

G418 是一种抗生素，其能结合于真核细胞核糖体上，通过影响蛋白质合成而导致细胞死亡。因此，将 G418 作为筛选加至培养基中，能使 G418 敏感的细胞死亡。neo 基因产物能使 G418 失活，从而使表达 neo 基因产物的细胞能在含 G418 的培养基中存活。

在本实验中，人胃癌细胞 SGC-7901 经 pCI-neo-anti VEGF-C 转染后，若质粒能稳定整合于细胞基因组中，则细胞能够在含 G418 的筛选培养基中长期存活并增殖，否则，细胞将死亡。Western-blot 及免疫组化 SP 法证实未转染组及转染空白质粒组高表达 VEGF-C 蛋白，而转染反义 VEGF-C 组不表达或弱表达。这充分地说明了反义 VEGF-C 对人胃癌细胞 SGC-7901 中 VEGF-C 蛋白质表达具有直接而明显的抑制作用，反义基因封闭了 VEGF-C 基因的表达。这与国外学者报道[4]一致。这些变化主要是由于反义 RNA 与 VEGF-C mRNA 结合阻碍了其翻译过程，封闭了 VEGF-C 分子的表达。

3.3 本实验的价值及展望

我们前期[1]用免疫组化等方法证实了胃癌组织中 VEGF-C 高表达，且 VEGF-C 的表达与胃癌组织的病理分期（有无转移、浸润程度）和新生淋巴管密度相关，还与促血管生成素-2 有协同作用。本试验将前期构建的人反义血管内皮生长因子-C 真核表达载体（pCI-neo-anti VEGF-C）成功转染人胃癌细株 SGC-7901，封闭胃癌细胞 VEGF-C 基因及蛋白的表达。通过 MTT 实验表明：稳定转染反义 VEGF-C 基因的细胞组 OD 值显著低于其余两组。证实了反义 VEGF-C 基因转染人胃癌细胞 SGC-7901 后，可以使胃癌细胞的生长受到抑制。在试验中我们同时应用了空载体质粒 pCI-neo 转染作为实验对照，其 MTT 结果与未转染组差异无统计学意义，从而排除了载体毒性，使本实验的设计更加科学，其结果也更有说服力。

另外，流式细胞仪结果提示：转染反义 VEGF-C 的人胃癌细胞系 SGC-7901 其早期凋亡细胞百分数及晚期凋亡和继发性坏死细胞百分数均明显高于未转染组及 pCI-neo 空载体质粒组，而活细胞百分数明显低于其它两组。表明反义 VEGF-C 基因转染可以促进胃癌细胞 SGC-7901 发生凋亡。

反义核酸技术是肿瘤基因治疗的策略之一，其基本原理是根据碱基互补原则，用人工合成的或生物表达的特定互补的 DNA 或 RNA 片段（反义核酸）以抑制或封闭专一靶基因表达的技术。国内外很多学者[3-6]致力于反义核酸技术治疗恶性肿瘤的研究。由于一直缺少淋巴管特异性的标记物使肿瘤淋巴管转移的研究受到阻碍。近几年，国内外许多实验研究显示[7,8]：肿瘤细胞分泌的 VEGFR-3 的配体VEGF-C 或 VEGF-D 不但可诱导肿瘤周边的淋巴管新生

基础研究 文章编号：0253-3626(2009)05-0562-05

齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞生长的影响

潘 敏，刘纯伦，方晓杰，石建华
（重庆医科大学附属第一医院消化内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察 5-脂氧合酶抑制剂齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响，初步探讨齐留通影响胃癌细胞生长的机制。方法：MTT 法测定齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响；TUNEL 染色法计数细胞凋亡率；RT-PCR和免疫细胞化学检测齐留通处理前后 SGC-7901 细胞 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 mRNA 和其蛋白表达的改变。结果：齐留通以时间剂量依赖的方式抑制 SGC-7901 细胞生长；TUNEL 染色法显示 6.2×10^{-5} mol/L、3.1×10^{-5} mol/L 齐留通作用 72 h 后细胞凋亡率为 19.6%±6.3% 和 28.9%±2.3%，均显著高于对照组 0.6%±0.1%（$P<0.01$）；RT-PCR 和免疫细胞化学显示 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通作用胃癌 SGC-7901 细胞 72 h 后，可显著促进 Bax、caspase-3 mRNA 和其蛋白的表达（$P<0.05$），抑制 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达（$P<0.05$）。结论：齐留通能抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖，并通过促进 Bax 和 caspase-3的表达，抑制 Bcl-2表达，诱导其凋亡，从而抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长。

【关键词】齐留通；胃癌；SGC-7901 细胞；5-脂氧合酶抑制剂；凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-25

作者介绍：潘 敏（1982- ），女，硕士，
研究方向：消化道肿瘤。
通讯作者：刘纯伦，男，副教授，E-mail：lcl728@medmail.com.cn。
基金项目：重庆市卫生局课题（05-2-155）。

（由于肿瘤团块内压力太大，阻碍了肿瘤内淋巴管的生长），而且可促使淋巴管内肿瘤的生长和转移，在淋巴管转移通路中具有举足轻重的作用。VEGF-C 可以作为肿瘤新生淋巴管的特异性标记物。我们前期的实验也证实了这一点[1]。故我们期望针对 VEGF-C 这一新靶点设计一段反义核苷酸来观察其抗肿瘤生长及转移的作用。本实验证实：反义 VEGF-C 在体外有抑制人胃癌细胞生长，促进其调亡的作用，为我们下一步实验研究反义 VEGF-C 基因转染对人胃癌细胞成瘤性和新生淋巴管生成的影响奠定了基础。但反义 VEGF-C 基因转染在体内是否能抑制肿瘤细胞的生长，促进肿瘤细胞的凋亡，其又是通过什么途径来发挥其生物学特性的等一系列问题还有待于进一步研究。

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] Krishnan J，Kirkin V，Steffen A，et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor（VEGF）-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasisin immunocompetent rats [J]. Cancer Res，2003，63(3)：713-722.

[4] Hung C J，Ginzinger D G，Zameger R，et al. Expression of vascular endothelial growth factor C in benign and malignant thyroid tumors[J]. J Clin Endocrinol Meta，2003，88(8)：3694-3699.

[5] Onogawa S，Kitadai Y，Tanaka S，et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph nodemetastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma[J]. Cancer Sci，2004，95(1)：32-39.

[6] 高 渝，张唯力，曾 翔，等.VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠膀胱癌移植瘤的抑制作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(9)：1084-1087.

[7] Koyama Y，Kaneko K，Akazawa K，et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor D messenger RNA expression in breast cancer：association with lymph node metastasis[J]. Clin Breast Cancer，2003，4(5)：354-360.

[8] Jennbacken K，Vallbo C，Wang W，et al. Expression of vascular endothelial growth factor C（VEGF-C）and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis [J]. Prostate，2005，65(2)：110-116.

（责任编辑：冉明会）