重庆维普 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2008)09-1084-04

VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠膀胱癌移植瘤的抑制作用研究

高 渝[1],张唯力[1],曾 翔[1],王志刚[2],冉海涛[2],李 攀[2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科;2. 重庆医科大学医学影像学研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察以脂质体为载体介导血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotides,ASODN)转染对裸鼠膀胱癌移植瘤的抑制作用。方法:建立人膀胱癌裸鼠皮下移植瘤模型,以脂质体为载体介导 VEGFASODN 进行转染。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:反义组与正义组的抑瘤率分别为 71.08%和 7.19%,反义组 VEGF 的表达、微血管密度、细胞增殖和凋亡指数与正义组及对照组相比均有明显差异,正义组与对照组之间各检测指标差异无显著性。结论:VEGF 反义寡核苷酸能够抑制人膀胱癌裸鼠皮下移植瘤的生长和微血管的生成,可能成为日后膀胱癌基因治疗的重要方向。

【关键词】血管内皮生长因子;反义寡核苷酸;膀胱癌

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-05

Inhibition of VEGF antisense oligonucleotides on human bladder carcinoma in nude mice

GAO Yu, et al

(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibiting effect of VEGF antisense oligonucleotides carried by liposome on the growth of human bladder carcinoma in nude mice. *Methods*: The nude mice model of human bladder carcinoma was established and VEGF antisense oligonucleotides were carried by liposome to be transfected. The cell proliferation index, microvessel density (MVD) and the expression of VEGF were detected with immunohistochmistry streptavidin-biotin peroxidase(SP) method and the cell apoptosis index was determined with Tunnel technology. *Results*: The growth inhibitory rate in antisense experimental group and sense experimental group were 71.08% and 7.19% respectively. The differences in the cell proliferation index, apoptosis index, microvessel density(MVD) and the expression of VEGF between the antisense experimental group and the sense experimental group or the control group had significances. There was no statistical significance in the detection indexes between the sense experimental group and the control group. *Conclusions*: The VEGF antisense oligonucleotides can inhibit the neovascularization and the growth of bladder carcinoma in nude mice, which might be an important gene therapeutic strategy for the bladder carcinoma in future.

【Key words】 VEGF; Antisense oligonucleotides; Bladder carcinoma

肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管的生成,而 VEGF 是诱导血管生成的最重要的调节因子,它在肿瘤的生长、侵袭和转移中起着至关重要的作用。近年来,以 VEGF 及其受体为靶点的抗肿瘤血管治疗已逐渐受到人们的重视,尤其是在基因水平上使 VEGF 及其受体的表达减少,或阻断其信号转导通路,可以抑制二者生物活性的发挥,从而有望抑制肿瘤血管的生成,阻断肿瘤的血供,达到“饿死”肿瘤的目的。膀胱癌是富含血管的实体肿瘤,研究表明,血管内皮细胞增殖所致的新生血管与膀胱癌的生物侵袭性、恶性程度及临床复发呈正相关[1]。本实验应用 VEGF ASODN 片段,观察其对裸鼠膀胱癌移植瘤生长的抑制作用,为膀胱肿瘤的治疗提供新思路和新途径。

1 材料与方法

作者介绍:高 渝(1981-),男,硕士,研究方向:泌尿系统肿瘤。

通讯作者:张唯力,男,教授,E-mail:66zwl@sina.com。

重庆维普 http://www.cqvip.com

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，用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液（每毫升培养液含 100U 青霉素，100μg 链霉素）常规培养。

1.2 实验动物

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

1.3 主要试剂和仪器

脂质体 2000 购于美国 Invitrogen 公司。VEGF 反义、正义寡核苷酸的合成序列参照李维方等[2]的设计，ASODN 序列：5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGTGC-3'，正义寡核苷酸的序列：5'-CTATCAGCGCAGCTACTGC-3'，由上海生工生物工程公司合成并进行硫代修饰。鼠抗人 VEGF，CD34，Ki67 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。

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 DMEM 培养液，调整细胞悬液的细胞浓度至 1×10^7 个/ml，台盼蓝染色检测活细胞比率>95%。在无菌条件下注射 T24 细胞悬液 0.1ml 于裸鼠右股部外侧皮下。

1.5 实验分组及处理方法

接种 14d 后，随机分为 3 组，每组 6 只：反义组、正义组与对照组。寡核苷酸与脂质体按 1∶3 混合，反义组与正义组均经裸鼠尾静脉注射寡核苷酸 66μg/次，每周 2 次，共 5 次，对照组注射等量生理盐水。

1.6 肿瘤生长的观察

定期用游标卡尺测量肿瘤大小，按公式 $V=ab^2/2$（V：肿瘤体积；a：长径；b：短径）计算出肿瘤的近似体积，并绘制出生长曲线。抑瘤率 =（对照组肿瘤平均体积 - 治疗组肿瘤平均体积）/ 对照组肿瘤平均体积 × 100%。

1.7 肿瘤组织的形态学观察

于治疗结束 48h 后，断颈处死裸鼠，剥离瘤体组织，标本以 4%多聚甲醛固定作组织病理检查。

1.8 检测肿瘤微血管密度(Microvessel density,MVD)及 VEGF 的表达

采用免疫组化 SP 法检测 CD34 的表达，并进行肿瘤微血管计数：采用 Weidner 法，显微镜下先以低倍镜（×100）扫视整个切片，选择阳性着色最多的区域，即所谓"热点"(Hotspot)，再于高倍镜（×400）下计数；计数时不考虑血管有无管腔及是否出现红细胞；共计数 3 个高倍视野，取平均值代表肿瘤 MVD。采用免疫组化 SP 法检测 VEGF 的表达并进行光密度及面密度测定。

1.9 Ki67 的表达

采用免疫组化 SP 法检测 Ki67 的表达，细胞核染成棕黄色为阳性，在每张切片中随机选 5 个高倍（×400）视野，计数 1 000 个细胞，计算阳性细胞百分比，为细胞增殖指数。

1.10 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡

参照 TUNEL 检测说明书，细胞涂片经阻断、通透（组织切片逐级脱蜡、水化，蛋白酶 K 消化）后，分别与 TUNEL 反应混合液及转化剂 -POD37℃孵育，DAB 显色，对比染色，脱水透明后封片观察。实验同时设阳性和阴性对照。结果判定：每张切片计数 300 个细胞，计算阳性细胞百分比，为细胞凋亡指数。

1.11 统计学分析

采用 SPSS11.0 软件包对结果进行统计处理，计量资料数据用均数 ± 标准差表示，组间变量比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠皮下移植瘤的生长情况

分组时各组裸鼠皮下移植瘤大小相近(50～55mm³)，治疗开始后，反义组肿瘤生长速度明显减慢（见图 1），治疗结束后反义组肿瘤体积及抑瘤率与正义组和对照组相比差异均有统计学意义（$P<0.01$）（见表 1）。

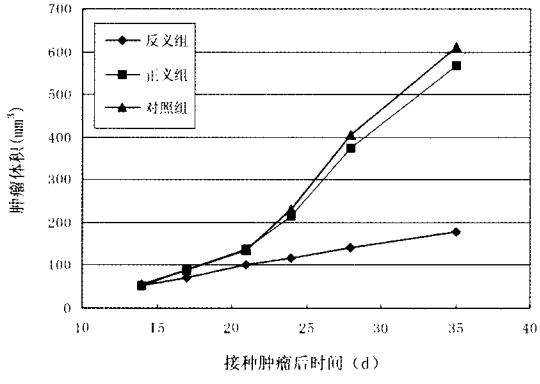


图 1 各组裸鼠皮下肿瘤体积变化曲线

表 1 治疗结束后各组裸鼠皮下肿瘤的抑瘤率

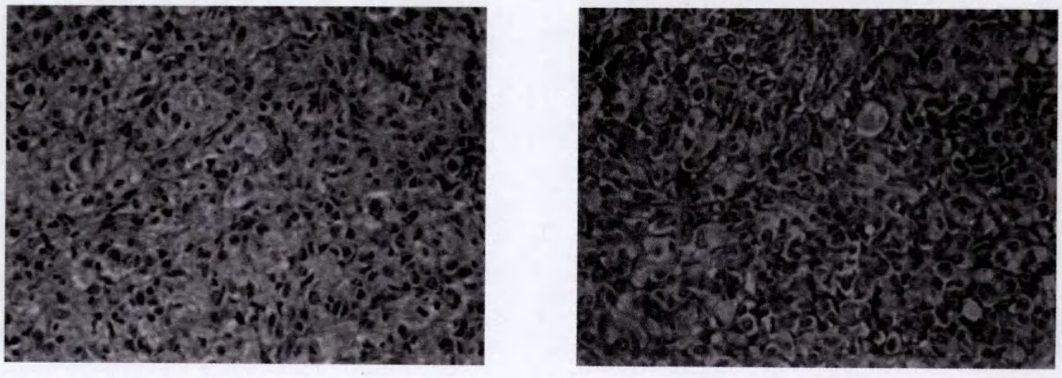
分 组	肿瘤平均体积(mm³)	抑瘤率(%)
反义组	177.56 ± 16.95	71.08
正义组	568.08 ± 26.03	7.19
对照组	612.24 ± 30.48	-

2.2 肿瘤组织的病理学检查

大体形态：反义组肿瘤瘤体较小呈球形，表面光滑，淡红色，质软，瘤体中心坏死较明显，剖面渗血较少；正义组和对照组瘤体显著增大，表面结节状，瘤体中心坏死较少，剖面渗血较多。光镜下形态：反义组肿瘤细胞较小，较稀疏，核分裂象相对较少，微血管减少，正义组和对照组肿瘤细胞丰富密集，紊乱，呈圆形或短梭形，核大深染，胞浆较少，间质见丰富的微血管（见图 2）。

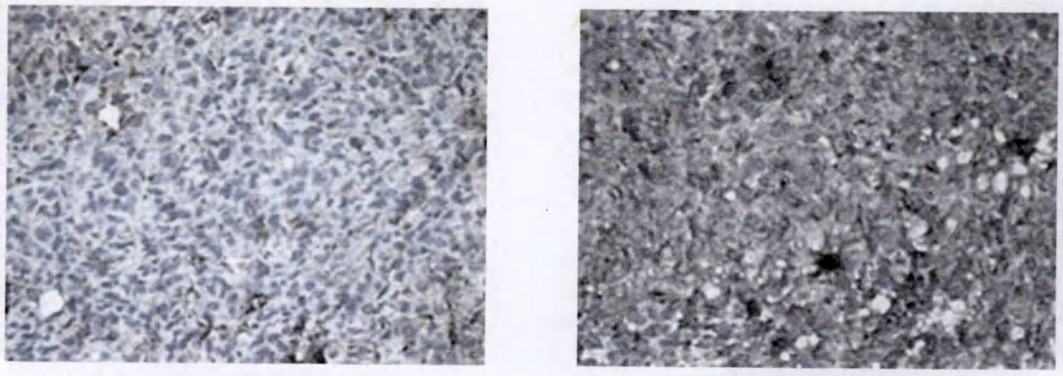
2.3 各组肿瘤组织 VEGF 的表达情况

重庆维普 http://www.cqvip.com



A.反义组(肿瘤细胞较小,核分裂象相对较少)　　B.对照组(肿瘤细胞密集,紊乱,核大深染)

图 2　人膀胱癌裸鼠移植瘤 HE 染色(×400)



A.反义组(VEGF 的阳性表达较少)　　B.对照组(VEGF 的阳性表达较多)

图 3　人膀胱癌裸鼠移植瘤 VEGF 的表达(SP×400)

表 2　裸鼠移植瘤 MVD、VEGF 的表达、细胞增殖及凋亡情况

分 组	MVD	细胞增殖指数(%)	细胞凋亡指数(%)	VEGF 的表达	
				光密度	面密度
反义组	10.67 ± 2.35^{ac}	20.18 ± 3.26^{ac}	50.38 ± 3.92^{bd}	0.17 ± 0.011^{bd}	0.08 ± 0.012^{bd}
正义组	17.74 ± 3.11^{e}	35.54 ± 4.15^{e}	18.56 ± 2.14^{e}	0.27 ± 0.022^{e}	0.28 ± 0.024^{e}
对照组	18.43 ± 2.13	38.78 ± 4.82	16.33 ± 2.46	0.28 ± 0.031	0.29 ± 0.027

注:与空白对照组相比,a:$P<0.05$ b:$P<0.01$;与正义组相比,c:$P<0.05$ d:$P<0.01$ 与空白对照组相比,e:$P>0.05$

VEGF 蛋白的阳性表达呈棕黄色,主要位于肿瘤细胞胞浆内和部分血管内皮细胞。反义组 VEGF 的表达明显被抑制,阳性细胞数明显少于正义组和对照组,并且着色较浅,正义组与对照组之间 VEGF 的表达无明显差异(见图 3,表 2)。

2.4　肿瘤组织细胞凋亡与增殖的情况

反义组可见大量细胞核染成棕黄色的凋亡细胞,而正义组和对照组仅见少量凋亡细胞,反义组的凋亡指数明显高于正义组和对照组,差异具有显著性($P<0.01$)。反义组的增殖指数明显低于正义组和对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)(见表2)。

2.5　肿瘤组织 MVD 情况

CD34 的表达位于肿瘤组织间质内皮细胞,呈棕褐色,反义组 MVD 明显低于正义组和对照组($P<0.05$)(见表 2)。

3　讨　论

肿瘤的生长有赖于新生血管形成,一些恶性肿瘤的生长和转移过程中不断有新生血管的出现,当肿瘤直径达到或超过 1 ~ 2mm 时,逐步形成向肿瘤提供营养物质的新生血管,而 VEGF 则是促进血管

重庆维普 http://www.cqvip.com

生成最为关键的因子。研究表明,VEGF 的高表达与包括膀胱癌在内的许多实体肿瘤的侵润、淋巴结转移及早期复发等密切相关[3~5]。

若能有效减少血管生长因子合成或用特异性抗体对抗这些因子及其受体,或是增加血管生成抑制因子含量,或是直接针对杀伤未成熟的肿瘤血管内皮细胞,都能产生抑制肿瘤血管生成的作用,从而达到治疗肿瘤的目的。目前抗肿瘤血管生成的策略包括基因治疗、抗 VEGF/VEGFR 单克隆抗体、VEGF片段、可溶性 VEGFR、小分子抑制物等。国内外研究表明,通过基因治疗能够有效抑制肿瘤细胞或是移植瘤的生长[6~8]。而 ASODN 技术已成为较成熟的基因治疗手段之一。ASODN 技术的基本原理是根据核酸碱基互补的原则,设计出能与靶基因特定区域结合的含 15~20 个碱基的 DNA 或 RNA 片段,通过序列特异性与靶 mRNA 结合而阻断 mRNA 翻译,在转录和翻译水平上调节相关基因的表达[9]。研究表明VEGF ASODN 在体内和体外均可减少 VEGFmRNA 的表达及 VEGF 蛋白的合成,从而减少血管内皮细胞增殖[10,11]。

本研究建立了人膀胱癌裸鼠皮下移植瘤模型,以脂质体介导 VEGF ASODN 对人膀胱癌裸鼠皮下移植瘤进行治疗。研究结果显示,反义组的肿瘤体积和抑瘤率明显低于正义组及对照组,且反义组裸鼠移植瘤组织 VEGF 的表达,微血管数目以及肿瘤细胞增殖指数也明显低于正义组及对照组,而反义组肿瘤组织的细胞凋亡指数较正义组及对照组明显增加。正义组与对照组之间各检测指标结果无明显差别。说明 VEGF ASODN 抑制了裸鼠移植瘤细胞内 VEGF 的表达,降低了其对组织中血管内皮细胞的促分裂、生长和迁移作用,从而减少了肿瘤新生血管的生成,肿瘤细胞增殖减少,而细胞凋亡率明显增加,从而抑制了肿瘤的生长。

抗血管生成基因疗法是抗血管生成治疗的进一步发展,与其他治疗方法相比,具有设计简单、特异性强、生理毒性小的优点[12],尤其以 VEGF 及VEGFR 为靶点的抗肿瘤血管基因治疗成为近年来肿瘤治疗的一个重要方向。本研究结果初步提示,在基因水平上通过抑制 VEGF 的表达来抑制膀胱癌新生血管的生成从而达到治疗膀胱癌的方法是可行的,为膀胱癌的综合治疗提供新的手段,具有广阔的前景。

参 考 文 献

[1] 都书琪,杨春明,孔垂泽,等.VEGF 及;PD-ECGF 在膀胱癌的表达及与肿瘤血管生成的关系[J].中国医科大学学报,2002;31(2):108-109.

[2] 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.

[3] 高砚春,吴诚义.COX-2、VEGF-C 在乳腺癌中的表达及与淋巴转移的关系[J].重庆医科大学学报,2007;32(9):915-918.

[4] 王永来,刘彩刚,陈 双,等. HIF-1α 与 VEGF 在子宫内膜癌组织血管生成中的作用[J]. 中华肿瘤防治杂志,2007;14(15):1156-1158.

[5] Liu XF,Zhou XT,Zou SQ. Inhibition of hepatitis C virustransfected cholangiocarcinoma by antisense oligodeoxy-nucleotide in nude mice[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2004;3(1):115-119.

[6] Im SA,Kin JS,Gomez-Manzano C,et al. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovir us mediated antisense-VEGF[J]. Br J Cancer,2001;84(9):1252-1257.

[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] Ghosh C,Iversen PL. Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev,2000;10(4):263-274.

[10] Napdeone F,Terri DS. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. Endocrine Reviews,1997;18(1):4-25.

[11] Forster Y,Meye A,Krause S,et al. Antisense-mediated VEGF suppression in bladder and breast cancer cells[J]. Cancer Lett,2004;212(5):95-103.

[12] Folkman J. Antiangiogenic gene therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(16):9064-9066.

(责任编辑:关蕴良)

《重庆医科大学学报》

欢迎投稿,欢迎订阅

邮发代号 78-132