维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)06-0610-05

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

姬立芹,赵纯全,干晓琴

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 VEGF-C 反义寡核苷酸(VEGF-C,ASODN)对人卵巢癌细胞 SKOV3 黏附、侵袭能力的影响。方法:以 VEGF-C 基因编码区为靶点合成反义寡核苷酸,脂质体介导转染。MTT 法检测卵巢癌细胞与细胞外基质黏附能力;利用 transwell 小室,检测卵巢癌细胞侵袭人工基底膜的能力;免疫组化法检测细胞中 VEGF-C 蛋白表达,western blot 检测细胞中 MMP-2 蛋白表达。结果:与空白对照组及正义序列转染组相比,ASODN 组对细胞外基质黏附率明显降低($P<0.01$),穿透重组基质膜数目明显下降($P<0.01$),细胞中 VEGF-C、MMP-2 蛋白表达明显下降($P<0.01$)。结论:VEGF-C ASODN 可明显抑制卵巢癌细胞体外实验中的黏附和侵袭能力,下调 MMP-2 的表达可能是其作用途径。

【关键词】卵巢肿瘤;基因治疗;VEGF-C;寡核苷酸类;反义;转染

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-23

Effect of VEGF-C ASODN on adhesion and invasion of ovary cancer cells

JI Liqin, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and the mechanism of VEGF-C antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on the adhesion and invasion of human ovary cancer cell line SKOV3 in vitro. *Methods*: The ASODN sequence targeting the coding region of VEGF-C was synthesized and introduced into ovary cancer cells by liposomes. The expression of VEGF-C protein was detected by inmmnohistochemistry; the adhesion of SKOV3 cells to artifical basement membrane Matrigel was measured by MTT assay. The invasion was evaluated by transwell chambers attached with polycarbonate filters and reconstituted basement membrane (Matrigel). The expression of MMP-2 protein was measured by western blot. *Result*: In ASODN group, the adhesive rate and the invasive cell numbers were decreased markedly ($P<0.01$) compared with the control and sense oligodeoxynucleotide (SODN) group. The VEGF-C protein level was significantly decreased ($P<0.01$). The result of western blot showed a down-regulated MMP-2 expression ($P<0.01$). *Conclusion*: In vitro, the abilities of adhesion and invasion of ovary cancer cells can be suppressed by VEGF-C ASODN. Down-regulating the expressin of MMP-2 may be the mechanism.

【Key words】Ovary neoplasms; Gene treatment; VEGF-C; Oligonucleotides; Antisense; Transfection

卵巢癌患者的死亡率占妇科恶性肿瘤首位,尽管有手术、放化疗等治疗方法,晚期卵巢上皮性癌患者的 5 年生存率仍仅为 28%~35%。基因治疗成为近年来研究的热点。VEGF-C 是血管内皮细胞生长因子(VEGF)家族的新成员,在多数肿瘤细胞中表达[1]。最近的研究发现,VEGF-C/VEGFR-3 在肿瘤中高表达可促进肿瘤细胞的增殖和迁移,对肿瘤的生长、侵袭和转移具有重要调控作用[2]。VEGF-C 在人类多种细胞株中均高表达,本实验采用脂质体介导反义 VEGF-C(VEGF-C,ASODN)转染人卵巢癌细胞 SKOV3,以封闭 VEGF-C 基因的表达,观察其对卵巢癌细胞黏附和侵袭能力的影响,并探讨其相关机制。

作者介绍:姬立芹(1978-),女,硕士生,主要研究方向:妇科肿瘤。

1 材料和方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞株 SKOV3 由重庆医科大学病生教研室提供,RPMI-1640 培养液为 Gibco BRL 公司产品;Matrigel、Transwell 小室为美国 BD 公司产品;正、反义寡核苷酸由上海生物工程公司合成,并硫代磷酸化修饰;阳离子脂质体

维普资讯 http://www.cqvip.com

LipofectamineTM2000（LIP）为美国 Invitrogen 公司产品；兔抗人 VEGF-C 多抗、兔抗人 MMP-2 多抗为 Santa Cruz 公司产品；辣根过氧化物酶标记二抗及显色系统购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SKOV3 细胞接种于含有 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基，置 37℃、5%CO_2 培养箱中常规培养，培养至 80%后进行实验。

1.2.2 脂质体-寡核苷酸（ODN）转染复合物 寡核苷酸（ODN）序列采用硫代硫酸型。ASODN 序列为：5'-AAGAA GCCCA GCAAG TGCAT-3'；正义(SODN)序列：为 5'-ATG-CA CTTGC TGGGC TTCTT-3'。按 Invitrogen 公司 Lipofec-tamineTM2000 说明书，寡核苷酸（ODN）（μg）：LIP（μl）=1：2.5 比例混合配制 ODN/LIP 复合物。

1.2.3 预处理 根据转染复合物的类别分为 3 组：I 组：空白对照组（LIP 转染）；II 组：正义组（SODN 转染）；III 组：反义组（ASODN 转染），终浓度 1000ng/ml，转染 48h 后收集细胞进行检测。

1.2.4 黏附实验 将 96 孔板用 Matrigel5μg 包被，2%BSA 封板处理。每孔加入 5×10^4 个不同预处理卵巢癌细胞，置 37℃、5%CO_2 培养箱培养，分别于 30min，60min，90min，120min 各时间点弃去培养液，PBS 冲洗除去未黏附的细胞，每孔加 MTT20μl，以及无血清 RPMI-1640 200μl，CO_2 培养箱孵育 4h；吸弃上清液，加 DMSO 200μl 振荡 10min 后，自动酶标仪 570nm 测各孔吸光度（A570nm）值，计算细胞黏附率。每组设 6 个复孔，重复 3 次。细胞黏附率=（实验组 A570nm 值/对照组 A570nm 值）×100%。

1.2.5 侵袭实验 将基质胶按 40μl/孔均匀地铺在侵袭小室聚碳酯膜上，成胶 30min 后，置紫外灯下照射过夜，实验前 30min 再次成胶。取不同预处理细胞各 10^4 个（RPMI 1640 液 200μl）分别接种到成胶的侵袭小室上，在 24 孔板内加入 NIH/3T3 细胞上清液（趋化因子），每孔 600μl，37℃，5%CO_2 培养 24h 后取出侵袭小室，用棉签头擦掉基质胶，PBS 液洗 3 次，95%乙醇固定 15min，HE 染色，揭下侵袭小室聚碳酯膜反贴在载玻片上。结果判定：400 倍光镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞数，取均值。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫组织化学检测 VEGF-C 蛋白的表达 取对数生长期细胞制备细胞爬片（10^4 个/孔），分组同预处理，48h 后取出，95%乙醇固定后，按 SP 免疫组化试剂盒步骤系列处理，DAB 显色，细胞浆呈明显棕黄色为阳性，以 PBS 代替一抗做阴性对照。用自动图像分析仪随机计数 200 个细胞，得出平均光密度值（OD）。

1.2.7 western blot 检测细胞 MMP-2 蛋白的表达 收集各组卵巢癌细胞（10^6 个），PBS 漂洗，加入预冷至 4℃的裂解缓冲液，冰浴 20min，离心，取上清行蛋白定量，加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液，沸水煮沸 5min，以 40μl 每道上样，10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转移至 PVDF 膜，4℃封闭过夜，加入 1:250 稀释的 MMP-2 一抗，室温孵育 2h，TBST 洗 3 次，加入辣根过氧化物酶标记二抗（1:2000）孵育 2h，TBST 洗 3 次，加 ECL 化学发光剂，X 光片暗室曝光，常规显影、定影。应用软件对条带进行灰度分析处理，用目的条带与 β-actin 条带的平均灰度质比值表示样本表达强度。

1.2.8 统计学分析 数据用表示，采用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析、q 检验。

2 结 果

2.1 ASODN 转染对卵巢癌细胞黏附能力的影响

随着时间的延长，各处理组细胞的黏附能力增加；同一时间点 ASODN 组细胞黏附能力较其他两组明显减弱，差异有显著性（$P<0.01$），空白对照组和 SODN 组之间比较差异无显著性（$P>0.05$）。见表 1。

表 1 MTT 法检测处理后各组细胞不同时间的黏附率（$\bar{x}\pm s$）

Group	30min	60min	90min	120min
空白对照组	0.293 ± 0.022	0.560 ± 0.017	0.786 ± 0.024	0.953 ± 0.015
SODN 组	0.274 ± 0.041	0.524 ± 0.033	0.753 ± 0.014	0.924 ± 0.018
ASODN 组	0.148 ± 0.012*	0.338 ± 0.024*	0.529 ± 0.017*	0.776 ± 0.027*

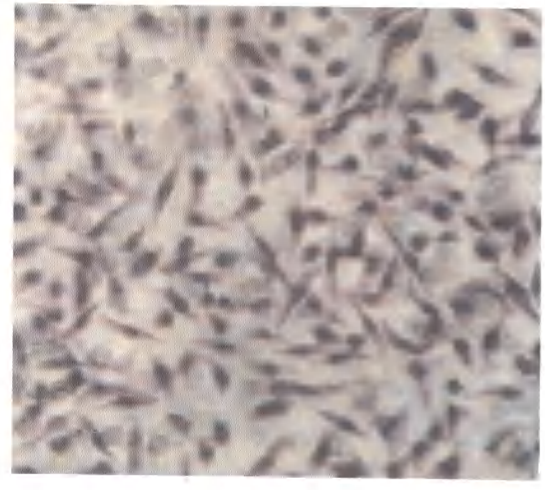
* 与空白对照和 SODN 组比较，ASODN 组 <0.01

2.2 VEGF-C ASODN 转染对卵巢癌细胞侵袭能力的影响

ASODN 组细胞对重组基底膜体外侵袭能力减弱，48h 浸润细胞数目明显减少（64.5±7.3），与空白对照组和 SODN 组（126.1±13.7 和 118.7±10.2）比较差异有显著性（$P<0.01$）。见图 1（A、B、C）。

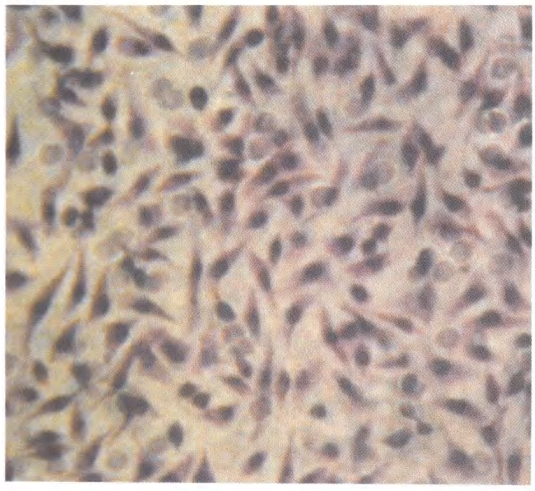
2.3 VEGF-C ASODN 转染对卵巢癌细胞 VEGF-C 蛋白表达的影响

VEGF-C 蛋白的表达主要在细胞浆内，空白对

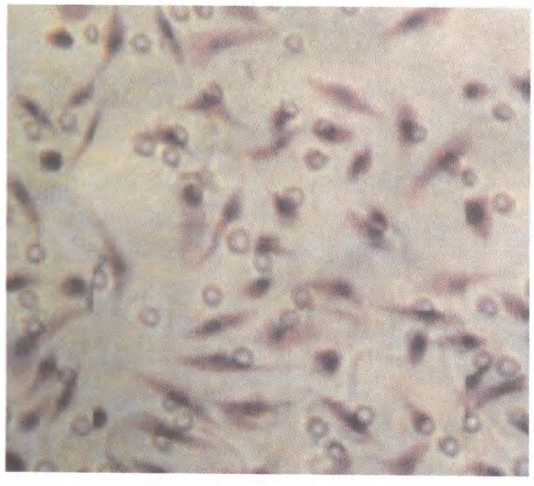


A：空白对照组

维普资讯 http://www.cqvip.com

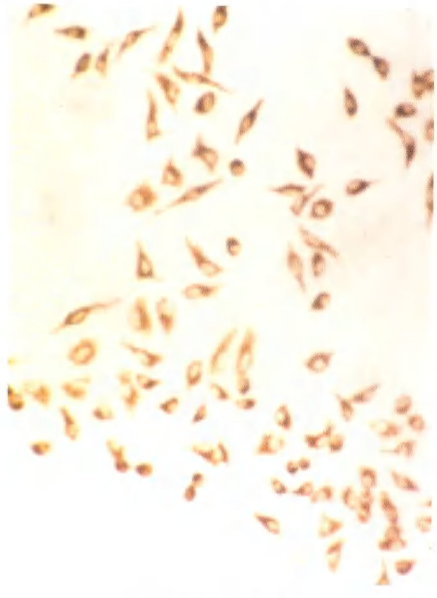


B:SODN 组



C:ASODN 组

图 1 VEGF-C ASODN 对卵巢癌细胞体外侵袭能力的影响（HE 染色×200）



A:空白对照组



B:SODN 组



C:ASODN 组

图 2 ASODN 对 VEGF-C 蛋白表达的影响（SP×200）

照组和 SODN 组呈强阳性表达，ASODN 组 VEGF-C 蛋白表达明显减弱，平均光密度值显著低于前两组（$P<0.01$）。见图 2（A、B、C）、表 2。

2.4 western blot 检测各处理组 MMP-2 蛋白含量的变化

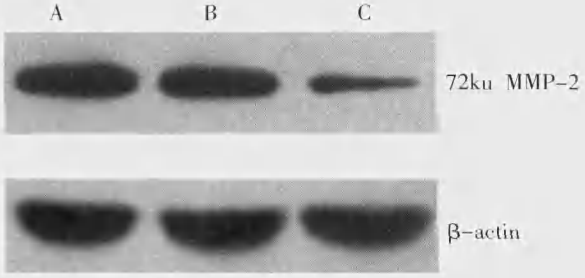
与空白对照组和 SODN 组相比，ASODN 组 X 光片 MMP-2/β-actin 显影平均灰度质比值最小，有显著性差异，前两者之间无明显差异。见图 3、表3。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同处理组细胞内 VEGF-C 蛋白表达平均光密度值变化

Group	MOD($\bar{x}\pm s$)
空白对照组	0.89±0.023
SODN 组	0.86±0.011
ASODN 组	0.56±0.017*

* 与空白对照和 SODN 组比较，ASODN 组 $P<0.01$



A：空白对照组；B：SODN 组；C：ASODN 组

图 3 ASODN 对 MMP-2 蛋白表达的影响

表 3 不同处理组 X 光片 MMP-2 蛋白显影灰度质变化

Group	MMP-2	β-actin	MMP-2/β-actin
空白对照组	83.49 ± 3.53	195.80 ± 5.87	0.426 ± 0.019
SODN 组	80.56 ± 3.78	192.31 ± 4.42	0.419 ± 0.024
ASODN 组	33.40 ± 2.94	191.92 ± 3.52	0.174 ± 0.012*

* 与空白对照和 SODN 组比较，ASODN 组 $P<0.01$

3 讨 论

VEGF-C 是血管内皮生长因子(VEGF)家族的新成员，基因定位于 4q54 染色体上，其受体有 VEGFR-2(KDR)和 VEGFR-3(flt-4)两种，前者主要分布于血管内皮细胞，调节血管生成，后者主要存在于淋巴管内皮上，介导淋巴管生成，是成熟的淋巴管内皮细胞特异性标记物，在肿瘤细胞的淋巴道转移中扮演重要角色。大量临床研究表明，VEGF-C 在多种恶性肿瘤中高表达，与肿瘤的分化程度、病理分型及侵袭能力和淋巴结转移密切相关，是独立的预后不良因素[3]。肿瘤的侵袭、转移是恶性肿瘤主要的死因之一，目前一方面已证明多种实体肿瘤间质中微血管的密度与肿瘤转移有密切关系，另一方面随着淋巴管内皮特异性标志物的发现和淋巴管特异的生长因子、受体和转录调节的研究，肿瘤诱发淋巴管形成对于肿瘤的生长和侵袭、转移的重要意义也为众多肿瘤研究者所重视。VEGF-C 是目前知道的重要的淋巴管形成生长因子，大量动物实验模型证明了 VEGF-C/VEGFR-3 淋巴管形成信号通道在肿瘤生物学行为中的重要意义。Mattila 等[4]以 LYVE-1 作为淋巴管的标记，用转移瘤动物研究发现，高表达 VEGF-C 的乳腺癌其瘤内和瘤周的淋巴管密度明显增加，且其淋巴结的转移明显增强，可能是 VEGF-C 通过促进肿瘤瘤内和瘤周的淋巴管增生而导致局部淋巴结转移。Skobe 等[5]发现转染 VEGF-C 的黑色素瘤细胞的移植肿瘤有明显的瘤内血管和淋巴管生成，瘤周也有丰富的扩张淋巴管，淋巴管的数量和淋巴转移密切相关。Yonemura 等[6]将转染了 VEGF-C 的胃癌肿瘤细胞种植到裸鼠的胃黏膜层，发现瘤内和瘤周有明显的淋巴管生成，数量明显比对照组增多。大量细胞实验也证实 VEGF-C 表达水平与细胞侵袭能力相关，高表达细胞株侵袭能力明显强与低表达或不表达细胞株[7,8]。本实验针对人 VEGF-C 基因编码起始区合成反义寡核苷酸，通过脂质体介导转染，结果显示，VEGF-C ASODN 可以在体外下调 VEGF-C 的表达，同时引起卵巢癌细胞对胞外基质成分的黏附能力下降，对体外重组基底膜的侵袭能力减弱，与空白对照组和正义组有显著差异，提示 VEGF-C 参与了卵巢癌细胞转移相关性生物学行为的调节。

恶性肿瘤的局部浸润是一个由一系列步骤组成的复杂过程，首先是浸润能力强的肿瘤细胞亚克隆与基底膜黏附，然后肿瘤细胞释放或诱导释放蛋白水解酶，降解基底膜和细胞外基质，在趋化因子的作用下进入受降解的基质区域内。在此过程中细胞外基质和基底膜重塑是癌细胞侵袭转移过程中的关键环节，需借助于蛋白水解酶的表达和激活。MMPs 是一类与肿瘤的侵袭和转移关系密切的蛋白水解酶，可活化整合素、降解层粘连蛋白和调节细胞的黏附功能；MMP-2 是该家族的重要成员，在多种人类肿瘤中表达，通过调控肿瘤细胞与基底膜的黏附和破坏由细胞间基质、基底膜组成的细胞外间质屏障参与肿瘤转移过程[9]，其高表达与肿瘤淋巴结转移和侵袭潜能密切相关[10,11]，是影响预后的不良因素，抑制其表达将导致肿瘤细胞转移能力减弱[12,13]。对人淋巴结阳性子宫颈癌的研究发现，基质金属蛋白酶(MMP)与 VEGF-C 水平具有相关性[14]。对 11 株人宫颈癌和 10 株人卵巢癌细胞体外研究发现，不同细胞株 VEGF-C 基因、蛋白表达情况不一，VEGF-C 基因表达水平与肿瘤细胞体外侵袭能

维普资讯 http://www.cqvip.com

力和 MMP-2 基因表达水平及其活性呈正相关，VEGF-C 特异性抗体可剂量依赖性地抑制肿瘤细胞的侵袭能力[7,8]。本实验中，VEGF-C ASODN 调控卵巢癌细胞黏附侵袭能力的同时，下调了 MMP-2 的蛋白表达水平，与上述研究结果一致，说明 VEGF-C 反义寡核苷酸对卵巢癌细胞黏附、侵袭能力的抑制可能与其以一未知机制调节 MMP-2 蛋白的表达有关。

VEGF-C 作为一种较新的 VEGF 家族成员因其特有的功能而备受关注，除了特异的淋巴管生成作用以外，还可以促进肿瘤细胞生长，抑制肿瘤细胞凋亡，促血管生成等，这些都可以直接或者间接促进肿瘤的转移。由于其在肿瘤发展中的重要作用，使得 VEGF-C 成为控制肿瘤生长转移，治疗肿瘤的一个新的理想靶点。

参 考 文 献

[1] Ohta Y,Shridhar V,Bright RK,et al.VEGF and VEGF tape C play an important role in angiogenesis and lymphagiogenesis in human malignant mesotheliona tumours[J].Br J Cancer,1999;81(1):54-61.

[2] Mandriota S J,Jussila L,Jeltsch M,et al.Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis[J].EMBO J,2001;20(4):672-682.

[3] Park B-K,Paik Y H,Park J Y,et al.The clinicopathologic significance of the expression of vascular endothelial growth factor-C in intrahepatic cholangiocarcinoma[J].Am J Clin Oncol,2006;29(2):138-142.

[4] Mattila M M,Ruohola J K,Karpanen T,et al.VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors[J].Int J Cancer,2002;98(6):946-951.

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

[6] Yonemura Y,Endo Y,Tabata K, et al. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer[J].Int J Clin Oncol,2005;10(5):318-327.

[7] Ueda M,Terai Y,Yamashita Y,et al.Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas[J].Int J Cancer,2002;98(3):335-343.

[8] Ueda M,Hung Y C,Terai Y,et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas[J].Clin Cancer Res,2005;11(9):3225-3232.

[9] Curran S,Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis[J].Eur J Cancer,2000;36(13):1621-1630.

[10] Langenskiold M,Holmdahl L,Falk P,et al. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis,2005;20(3):245-252.

[11] Tester AM,Waltham M,Oh SJ,et al.Pro-matrix metallo proteinase-2 transfection increases orthotopic primary growth and experimental metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice[J]. cancer Ras,2004;64(2):652-658.

[12] Di G H,Li H C,Shen Z Z,et al.Analysis of anti-proliferation of curcumin on human breast cancer cells and its mechanism[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi,2003;83(20):1764-1768.

[13] Di GH,Lu JS,Song CG,et al. Over expression of aromatase protein is highly related to MMPs levels in human breast carcinomas[J]. J Exp Clin Cancer Res,2005;24(4):601-607.

[14] Trappen PV,Ryan A,Carroll M,et al.A model for coexpression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumor cell invasion in cervical cancer[J].Br J Cancer,2002;87(5):537-544.

(上接第 609 页)

of free radical-mediated lipid peroxidation in cells[J].Arch Biochem Biophys,1996;334(2):261-267.

[9] Seki S,Kitada T,Yamada T,et al.In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases[J].J Hepatol,2002;37(1):56-62.

[10] Melitor JA,Walker WH,Doerre S,et al.NF-kappa B:a family of inducible and differentially expressed enhancer-binding proteins in human T cells[J].Proc Nalt Acad Sci USA,1990;87(24):10028-10032.

[11] Kaplowitz N.Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury[J].Seminars in Liver Disease,2002;22(2):137-144.

[12] Valenti L,Fracanzani AL,Dongiovanni P,et al.Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease[J].Gastroenterology,2002;122(2):274-280.

[13] 杨朝霞,代东伶,沈 薇.还原型谷胱甘肽对实验性大鼠非酒精性脂肪肝的疗效观察及其分子机制探讨[J].重庆医科大学学报,2005;30(6):803-807.