DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.019

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1062-03

人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立及其VEGF的表达

李忠俊,程绍钧 (第三军医大学医学检验系核医学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤动物模型,研究血管内皮生长因子(VEGF)在人浸润性膀胱癌的表达水平,探讨应用抗-VEGF抗体抑制血管生成治疗膀胱癌的应用前景。方法 裸鼠皮下接种人浸润性膀胱癌T24细胞建立动物模型;应用S-P免疫组织化学技术检测人浸润性膀胱癌T24细胞及其裸鼠移植瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果 裸鼠皮下接种T24细胞的成瘤率为94.4%;T24细胞及其移植瘤组织表达VEGF为胞浆强阳性。结论 VEGF诱导的血管生成是人浸润性膀胱癌组织的重要新生血管生成途径,为应用抗-VEGF抗体进行膀胱癌的诊断与治疗的研究创造了前提条件。

关键词:膀胱癌;血管内皮生长因子
中图法分类号:R349.21;R737.14 文献标识码:A

Establishment of a Nude mice transplantation tumor model with human invasive bladder cancer and the VEGF expression on inocuated tumor

LI Zhong-jun, CHENG Shao-jun (Department of Nuclear Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a nude mice transplantation tumor model with human invasive bladder cancer, study the expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the inocuated human invasive bladder cancer and explore the potential application of anti-VEGF antibody to inhibit angiogenesis. Methods A nude mice model with human bladder cancer was established by subcutaneously inoculating T24 cells. The VEGF expression level in T24 cells and transplantation tumor tissue was measured by immunohistochemical method. Results The VEGF expression of T24 cell and T24 tumor xenograft was strongly positive in cytoplasm and the successful rate of the tumor transplantation was 94.4%. Conclusion VEGF-induced angiogenesis is an important route of angiogenesis in human invasive bladder cancer tissue and found a base for the treatment and diagnosis of bladder cancer using anti-VEGF antibody.

Key words: bladder cancer; vascular endothelial growth factor

肿瘤的血管新生(Angiogenesis, AG)是指在毛细血管和毛细血管后微静脉上出现新毛细血管生长,是肿瘤细胞诱导的毛细血管形成和肿瘤中血液循环建立的复杂过程,肿瘤的生长和转移必须依赖于新生血管的生成,整个过程中血管生成因子及相关因子尤其是血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)起着关键作用[1,2]。在目前已纯化分离出20余种血管生成因子及相关因子中,VEGF是唯一的以特异的旁分泌方式作用于血管内皮细胞,促进其增殖、迁移、诱导新生血管生成的生长因子,其调控作用较强,且特异性较高。自1989年发现血管内皮生长因子/血管通透性因子(Vascular permeability factor, VPF)以来,得到了广泛的研究,尤其在肿瘤疾病中的研究取得不少成就[3]。我们建立了人膀胱癌裸鼠移植瘤模型,应用免疫组化染色法研究人膀胱癌移植瘤VEGF的表达及其生物学意义。

作者简介:李忠俊(1974—),男,湖南省隆回县人,硕士,医师,主要从事肿瘤的放射免疫显像与治疗方面的研究,发表论文5篇,现在附属新桥医院输血科,重庆 400037。电话:(023)68755794

收稿日期:2000-03-11;修回日期:2000-08-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　材料来源

1.1.1　细胞系　　T24 细胞为侵润性人膀胱癌, 新桥医院泌尿外科易善红硕士惠赠。

1.1.2　实验动物　　BALB/ c nu/nu 裸小鼠, 本校实验动物中心提供。鼠龄 4～6 周, 体重 15～20 g, 雌雄不拘, 在无特定病原体(Specific-pathogen free, SPF)条件下的层流架中饲养。

1.1.3　主要试剂　　鼠抗人血管内皮生长因子单克隆抗体(Sc-7269)为 Sant Cruz 公司产品, 工作浓度 1∶50; S-P 免疫组化试剂盒由北京中山生物技术有限公司出品。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　　人膀胱癌 T24 细胞以 DMEM 完全培养液(10% 小牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ ml)常规培养[4]。

1.2.2　免疫组化检测 T24 细胞 VEGF 的表达　　6 孔培养板中每孔放入一片无菌盖玻片, 接种 T24 细胞, 待细胞贴壁生长后以 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min, 0.01 mol/ L、pH 7.4 PBS 洗涤 5 min, 洗 3 次, 作 S-P 法染色。

1.2.3　荷人膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立　　培养的对数生长期膀胱癌 T24 细胞以 0.25% 胰蛋白酶 37 ℃消化, 加入无血清 DMEM 培养液制备细胞悬液, 调整细胞悬液的细胞浓度至 1×10^7/ml。台盼蓝染色检测活细胞比率应大于> 95%。

裸小鼠 18 只, 无菌条件下注射 T24 细胞悬液于裸小鼠皮下, 定期观察肿瘤的大小及成瘤率。

1.2.4　荷人膀胱癌裸鼠移植瘤 VEGF 表达的检测　　裸小鼠接种 T24 细胞后 4 周待肿瘤长至体积 1 cm^3 大小, 10% 乌来糖麻醉动物, 剥离肿瘤包块, 14% 甲醛固定, 制作石蜡包块, 切片厚 4 μm, S-P 免疫组化染色法检测肿瘤组织内 VEGF 的表达。结果判断: 以阴性对照片为参考, 胞浆内出现棕黄色者为阳性, 否则为阴性。表达强度: 应用图像分析系统测量组织切片的光密度, 定量表示组织表达 VEGF 的阳性强度。

2　结果

2.1　免疫组化检测人膀胱癌 T24 细胞表达 VEGF

免疫组化染色, 镜下可见 T24 细胞表达 VEGF, 胞浆呈棕黄色, 着染阳性。

2.2　荷人膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性

裸小鼠皮下接种 T24 细胞之后, 成瘤率为 94.4%。肝、肾、肺、心等脏器大体检查及病理切片均未见明确的转移灶形成。

2.3　免疫组化对动物模型移植瘤和各正常组织 VEGF 表达的检测

免疫组化结果显示, 人膀胱癌裸鼠移植瘤表现为胞浆型阳性细胞。正常组织除肾 VEGF 表达为弱阳性外, 其余组织 VEGF 表达为阴性。各种组织切片经图像分析系统测定的平均光密度(Average optical density, AOD)数值见图 1。人膀胱癌裸鼠移植瘤 AOD 值明显高于其余正常组织, t 检验差异非常显著($P<0.001$)。

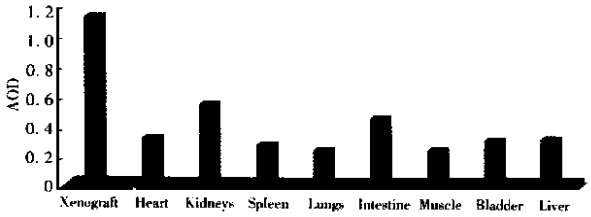


图 1　动物模型各组织 AOD 数值

Fig 1　AOD value of tissues from nude mice bearing T24 bladder cancer

3　讨论

实体肿瘤的发生、发展过程中 AG 几乎贯穿其过程中, VEGF 等血管生成因子诱发的 AG 是肿瘤生长、恶化、转移的必要步骤: 一方面肿瘤的发生需要新生血管生成才能完成肿瘤的增殖; 肿瘤细胞血行播散, 从微血管侵犯而发生远处转移, 必须有肿瘤细胞经过新生血管的不完整血管壁的渗透入血液才能完成肿瘤细胞转移; 肿瘤侵袭性生长时, 内皮细胞释放蛋白水解酶, 加强肿瘤细胞的侵袭能力; 在肿瘤细胞到达远处形成转移灶的过程中同样发生 AG。有研究表明当肿瘤生长越过 2 mm^3 时即需要新生血管供应氧份与营养才可迅速生长, 表现出侵袭和转移特性[5,6]。

膀胱癌的生物学行为复杂多变, 且其易复发、多发和浸润、转移等特点, VEGF 诱导的 AG 发生于膀胱癌的整个发生、发展过程。有研究表明, 浸润性膀胱癌患者中, 肿瘤血管密度低者的 4 年生存率明显高于肿瘤血管密度高者(2.5 倍)[6]。膀胱癌组织中 $VEGF_{121}$ mRNA 表达明显增加: 是正常膀胱组织的 10 倍。VEGF 表达与 PT1 G1/2 期膀胱癌患者 3 个月内复发率成正比, 敏感性达 100%, 特异性为 88%[7]。Crew 等[8,9]研究证实 VEGF 在 55 例膀胱癌患者肿瘤组织中有表达; VEGF 表达高水平的患者出现早期复发, 出现浸润性表型转变, 且肿瘤组织 VEGF 表达明显高于正常组织。在膀胱癌患者尿液中也检测到来源于膀胱癌组织的 VEGF, VEGF 与患者的复发密切相关, 这表明尿液检测 VEGF 可以做为膀胱癌早期检测与预测复发的一种无创伤性检测手段[8,9]。本次实验中膀胱癌 T24 细胞表达 VEGF 为胞浆着染阳性, 说明 T24 细胞合成 VEGF 这一重要血管生成诱导因子。T24 细胞接种裸鼠皮下建立人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的成瘤率为 94.4%。免疫组化结果表明, 移植瘤表达 VEGF 呈强阳性, 其 AOD 值明显高于其余正常组织。结果提示: 荷瘤裸鼠模型体内正常组织未有 VEGF 诱导的血管生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成活性；而肿瘤组织则具较强 VEGF 诱导的血管生成活性，意味着在膀胱癌的发生、发展过程中 VEGF 诱导的血管生成是其主要的新生血管生成途径，其与膀胱癌的生长、转移有着密切关系。

由于 AG 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用，许多学者着手研究抗 AG 来治疗肿瘤及预防复发与转移已取得一定进展。抗 AG 治疗肿瘤是通过切断肿瘤赖以生长、转移的营养、氧份以及迁移通道，使肿瘤停止生长、转移，同时也可能促进了肿瘤细胞的凋亡。应用人 $VEGF_{121}$ 多克隆抗体抑制导入人 $VEGF_{121}$ cDNA 的 Hala 细胞及 PLC/PRF/5 肝癌细胞在裸鼠体内生长成功[10]。Kim 等[11]也在研究中发现，注射 $VEGF_{165}$ 单抗抑制了裸鼠移植瘤的生长。Asano 等[12]研究结果显示：经裸鼠静脉注射抗 VEGF 单抗 MV303 几乎完全抑制 HT1080 移植瘤的生长，并有效抑制肿瘤的肺转移。由于肿瘤 AG 与众多生长因子相关，应用单一血管形成因子的拮抗剂或血管形成因子单抗治愈肿瘤的可能性较小，联合抗血管疗法与化疗、放射免疫治疗等疗法，发挥强有力的协同作用是临床抗 AG 治疗肿瘤研究的重点。我们应用于实验的人膀胱癌表达 VEGF 为强阳性，为应用抗 VEGF 单抗联合放免治疗膀胱癌提供了前提条件。

参考文献：

[1] Strohmeyer D, Strohmeyer T. Angiogenesis—principles and significance in urologic tumors[J]. Urology, 1996, 35(5): 357—362.
[2] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis[J]. J Biol Chem, 1992, 267(16): 10 931—10 934.
[3] Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cell secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161(2): 851—858.
[4] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，1996. 102—176.
[5] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J] ? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4—6.
[6] Dickinson A J, Fox S B, Persad R A, *et al*. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas[J]. Br J Urol, 1994, 74(6): 762—766.
[7] O' Brien T, Cranston D, Fuggle S, *et al*. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(3): 510—514.
[8] Crew J P, O' Brien T, Bradburn M, *et al*. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57(23): 5 281—5 285.
[9] Crew J P, O' Brien T, Bicknell R, *et al*. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates[J]. J Urol, 1999, 161(3): 799—804.
[10] Kondo S, Asano M, Matsuo K, *et al*. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients[J]. Biochem Biophys Acta, 1994, 1 221(2): 211.
[11] Kim K J, Li B, Winer J, *et al*. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*[J]. Nature, 1993, 362(6423): 841—844.
[12] Asano M, Yukita A, Matsumoto T, *et al*. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor 121[J]. Cancer Res, 1995, 55(22): 5 296—5 301.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)11-1064-01

硫芥中毒对大鼠淋巴细胞的影响

Effects of sulfur mustard on the rat lymphocytes *in vitro*

王仕丽，杨清武，魏相德，董兆君 （第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室，重庆 400038）

本实验以培养淋巴细胞为研究对象，探讨硫芥对淋巴细胞毒性作用的敏感性。

作者简介：王仕丽(1962—)，女，四川省绵阳市人，实验师，主要从事神经性毒剂的急性毒性方面的研究。电话：(023)68752356

收稿日期：2000-07-15；修回日期：2000-10-30

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器

Wistar 大鼠，雌雄不拘，体重 180～320 g，本校实验动物中心提供标准动物；硫芥，为军事医学科学院六所提供，纯度 97.5%；

（下转 1068 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net