

血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌

邵成浩, 胡先贵, 刘 瑞, 张怡杰, 唐 岩, 曹贵松

邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普外科 上海市 200433
国家自然科学基金资助项目, No. 30200275
项目负责人: 邵成浩, 200433, 上海市第二军医大学附属长海医院普外科.
schhao@133sh.com
电话: 021-25072074
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 探讨抗血管生成基因转染治疗胰腺癌的可行性。

方法: 构建反向插入VEGF₁₆₅cDNA的复制缺陷型腺病毒载体, 体外转染SW1990细胞, MTT法检测重组腺病毒转染对细胞生长的影响。Northern blot和ELISA检测转染前后SW1990细胞VEGF的mRNA水平和蛋白表达。裸鼠皮下种植瘤体内注射重组腺病毒, CD31染色观察反义VEGF重组腺病毒转染对裸鼠种植瘤微血管密度和肿瘤生长速度的影响。

结果: 重组腺病毒体外转染并不影响SW1990细胞的生长速度。Northern blot和ELISA检测在mRNA水平和蛋白水平证实反义VEGF重组腺病毒转染对体外培养的SW1990细胞内源性VEGF表达有明显的下调作用。体内实验表明反义VEGF重组腺病毒转染可减少肿瘤内微血管数量, 肿瘤生长受到抑制。

结论: 反义VEGF₁₆₅重组腺病毒可以抑制胰腺癌的血管生成和肿瘤的生长, 为抗血管生成的基因治疗奠定了基础。

邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2916-2918
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2916.asp>

0 引言

胰腺癌细胞能过度表达并分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), VEGF表达与胰腺癌的微血管数量、肿瘤的局部进展和肝脏转移密切相关, 高VEGF表达的患者预后不良^[1-3]。我们构建反向携带VEGF₁₆₅cDNA的重组腺病毒载体, 观察VEGF₁₆₅反义核酸对胰腺癌裸鼠皮下种植瘤的生长及血管生成的影响, 为抗胰腺癌血管生成的基因治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 含有513 bp的人全长VEGF₁₆₅cDNA基因片断的质粒由长海医院心脏外科研究所黄盛东博士惠赠; 腺病毒表达载体试剂盒购自日本Takara公司; 限制性内切酶等各种工具酶购自BioLabs公司; 质粒纯化试剂盒和

RNA抽提试剂盒购自Qiagen公司; 胎牛血清购自Gibco公司; PCR引物由上海生工公司合成; VEGF ELISA试剂盒购自美国R&D公司; 免疫组化一抗购自福建迈新公司; EnVision 二步法免疫组化试剂盒购自Daco公司; 报告基因大肠杆菌Lac-Z重组腺病毒(Ad-LacZ)由长海医院心脏外科研究所董书强博士惠赠; 人胚肾细胞株293(ATCC CRL-1573)购自美国ATCC; 人胰腺癌细胞标准株SW1990为本院消化内科实验室保存并提供; 健康纯种SPF级BALB/C 6周龄♀裸鼠18只, 购自上海药物研究所实验中心。

1.2 方法 反义VEGF重组腺病毒(Ad- α VEGF)的制备方法见文献^[4]。对数生长期拟传代的SW1990细胞, 消化重悬后用培养液调整细胞浓度为 10^3 /孔, 接种于96孔板。细胞分3组, 每组设3排平行复孔。用 10^7 PFU的Ad- α VEGF, Ad-LacZ各10 μ L (MOI = 100)加入各组的每孔细胞转染1 h, PBS作对照组。再分别加入培养液, 终体积为200 μ L。3, 5 d更换培养液。以转染当天为0 d, 以后各组每天取3孔, 吸除培养液, 加入MTT液15 μ L, 放入培养箱中孵化4 h。吸除MTT液, 加入DMSO 150 μ L, 振荡10 min后, 在96孔酶标仪570 nm处读取OA值。结果取均值。扩增VEGF₁₆₅pBV220质粒, 碱裂解法抽提质粒, EcoRI/BamHI双酶切质粒DNA, 酶切产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳后获得长度为513 bp的cDNA探针, 割胶回收, 最后电泳判断所得VEGFcDNA探针浓度为约10 mg/L, -20 $^{\circ}$ C保存备用。探针标记: 按随机引物标记盒说明书进行, 即1.5 mL离心管中加TE40 μ L, 探针5 μ L(约50 ng), 引物P1, P2各2 μ L, 离心混匀, 100 $^{\circ}$ C水浴变性5 min, 冰浴2 min, 转移到标记试管中, 混匀, 加入 $[\alpha$ -³²P]dCTP 5 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C水浴20 min, 加入0.2 mol/L的EDTA 5 μ L终止反应, 备用。

1.2.1 反义VEGF对SW1990 VEGFmRNA表达的影响 对数生长期拟传代的SW1990细胞, 消化重悬后按密度为 2×10^6 接种于15 cm的培养平皿中, 细胞过夜培养。用MOI = 100即 10^9 PFU的Ad- α VEGF 200 μ L转染细胞1 h后加入10 mL培养液。分别于1, 2, 3, 4, 5, 6 d消化、离心收集细胞沉淀液氮冷冻备RNA抽提。按Qiagen公司试剂盒说明行细胞总RNA抽提。制备含甲醛的10 g/L琼脂胶, 加入20 mg的样本总RNA, 电泳后转到尼龙膜, 55 $^{\circ}$ C预杂交6 h, 弃预杂交液, 加入杂交液, 将标记好的VEGF探针, 95 $^{\circ}$ C变性5 min, 加入杂交管中, 杂交18 h。洗膜后用X光片放射自显影, 经显影、定影、水洗后, 室温凉干, 计算机图像分析仪扫

描分析,测定各点杂交信号的面积和灰度,用同一样品的GAPDH杂交信号值作对照。

1.2.2 反义VEGF转染后SW1990细胞VEGF蛋白的表达 对数生长期拟传代的SW1990细胞,消化重悬后用培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /孔.接种于4块6孔板,加入培养液2 mL.细胞过夜培养,分3组,每组3孔.吸尽培养液,用100 MOI,即 10^8 PFU的Ad- α VEGF、Ad-LacZ各10 μ L转染细胞1 h后加入2 mL培养液,用100 mL/L的小牛血清RPMI1640培养液作对照组(mock infection).分别于3, 5, 7, 9 d收集培养上清.收集上清前36 h,吸除培养液,用2 mL无血清培养液洗3次,加入无血清培养液2 mL孵育6 h.吸除培养液,用2 mL无血清培养液洗1次.加入1 mL含20 mL/L小牛血清RPMI1640培养液孵育24 h.吸取上清液,放入Eppendorf管中-70 $^{\circ}$ C冻存.采用人VEGF ELISA检测试剂盒.严格按照试剂盒操作说明书进行,最后用Bio-Rad3550-UV型酶标仪在波长450 nm校正波长570 nm条件下读取OA值.样品VEGF浓度从VEGF标准曲线查得.结果取均值。

1.2.3 裸鼠皮下种植瘤模型实验 SW1990细胞数 1×10^{10} /L, 0.2 mL (5×10^6)注射于18只6周龄裸鼠颈部皮下.种植瘤生长1 wk后,按裸鼠荷瘤体积的大小分为3部分,各部分间随机编号,用系统抽样法分为3组,每组各6只.分别为:PBS对照组、Ad-LacZ对照组和Ad- α VEGF治疗组.抽取经调整滴度为 10^9 PFU的重组腺病毒100 μ L,在肿瘤长径注射点处多方向瘤内注射,对照组注射等量的Ad-LacZ和PBS.隔日1次,共4次.转染1 mo后颈椎脱臼法处死裸鼠,切取肿瘤,常规病理切片,行CD31染色检测肿瘤的微血管密度。

统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,组内显著性检验采用 t 检验,采用SPSS10.0软件实施统计。

2 结果

2.1 反义VEGF重组腺病毒对SW1990细胞表达VEGF的影响 按公式计算VEGFmRNA表达的相对量,即 $VEGFmRNA = (VEGFmRNA \text{ 杂交信号面积} \times \text{杂交信号灰度}) / (GAPDH \text{ 杂交信号面积} \times \text{杂交信号灰度})$,图像分析仪扫描杂交信号的密度(图1 A, B).结果表明,反义VEGF后转染3 d,肿瘤细胞内源性VEGFmRNA表达下降,4 d达高峰,5 d开始回升.使用美国R&D公司VEGF ELISA检测试剂盒定量检测肿瘤细胞分泌到培养上清中VEGF蛋白,(表1)。

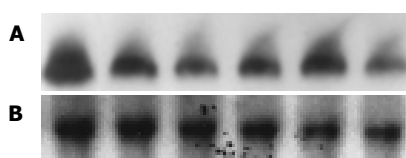


图1 Northern blot结果. A: VEGFmRNA; B: GAPDHmRNA.

表1 SW1990细胞上清的VEGF (ng/L for 10^5 cell/d, $n = 3$)

分组	第3d	第5d	第7d	第9d
Ad- α VEGF	633.3 \pm 90.9	913.6 \pm 65.4	652.0 \pm 42.1	683.6 \pm 33.6
Ad-LacZ	860.7 \pm 72.2	1 515.7 \pm 329.6	2 020.7 \pm 126.5	2 346.7 \pm 126.5
未转染组	813.0 \pm 68.2	1 479.7 \pm 92.1	1 903.7 \pm 117.6	2 202.7 \pm 37.6

2.2 反义VEGF对肿瘤体积增长速度的影响 瘤体内直接注射重组腺病毒,隔日用游标卡尺测量肿瘤的长、短径,按公式肿瘤体积=长径 \times 短径 $^2 \times 0.4$ 计算肿瘤的体积.结果,治疗组和对照组的肿瘤体积均有增加,反义VEGF组比LacZ组、PBS对照组肿瘤增幅明显减少($P < 0.01$,图2).LacZ组与PBS对照组之间无明显差异($P > 0.05$).提示治疗组裸鼠肿瘤生长受到抑制。

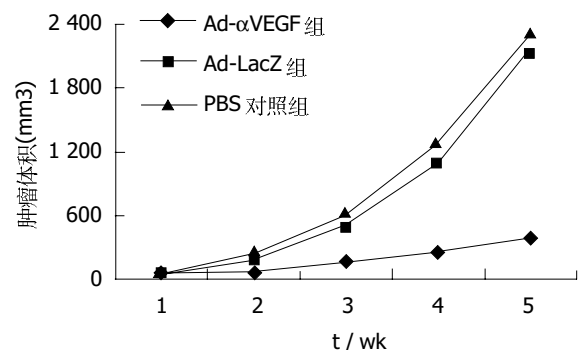


图2 肿瘤细胞裸鼠体内生长曲线。

2.3 反义VEGF对裸鼠肿瘤微血管生成的影响 CD31染色定位于血管内皮细胞,经免疫组化染色的微血管呈棕黄色,微血管计数参照Weidner *et al* [15]报道的方法. Ad- α VEGF组、LacZ组、PBS对照组肿瘤MVD分别为 12 ± 3 , 26 ± 5 , 25 ± 4 ,反义VEGF组肿瘤微血管密度明显少于LacZ组和对照组($P < 0.01$),LacZ组与对照组之间无明显差别($P > 0.05$).

3 讨论

我们的前期研究已证实VEGF表达水平能反映胰腺癌细胞的恶性程度,可作为胰腺癌分化、转移与预后分析的指标[3].以VEGF及其受体为靶点的抗血管治疗是目前研究的一个热点,多项研究表明,阻断VEGF信号传导能抑制胰腺癌的发展、浸润和转移[6-8].反义RNA系将某种特异基因cDNA反向连接到质粒或病毒等表达载体上,导入肿瘤细胞后转录出反义RNA,他与相应信使RNA(mRNA)形成双链后阻止其翻译和表达,在mRNA水平阻断靶基因的表达[9-11].我们采用复制缺陷性腺病毒介导的反义核酸技术,探讨阻断VEGF的表达对胰腺癌的血管生成和肿瘤生长的影响。

MTT检测结果表明,转染Ad- α VEGF、Ad-LacZ和对照组细胞增生速度无明显差别,没有发现反义VEGF转染、LacZ转染对肿瘤细胞生长有抑制或促进作用,提示腺病毒转染反义VEGF和LacZ基因对SW1990

细胞的体外生长没有影响. 反义 VEGF 转染能否下调 SW1990 细胞表达 VEGF 是实验的关键. Northern blot 是定量检测 mRNA 的最常用方法. 实验结果表明反义 VEGF 能明显下调肿瘤细胞内源性 VEGF 的表达, 转染后 3、4 d 抑制作用达高峰. ELISA 结果在蛋白分泌水平上证实反义 VEGF 转染可以下调 SW1990 细胞分泌 VEGF 蛋白, 反义 VEGF 转染后, 肿瘤细胞培养上清中分泌型 VEGF 蛋白含量下降, 5-7 d 达最高点.

体内实验结果表明, 反义 VEGF 治疗组肿瘤的生长速度比 Ad-LacZ 对照组和 PBS 对照组明显减慢, 用 CD31 染色标记肿瘤内微血管, 发现反义 VEGF 治疗组瘤体内微血管密度明显少于对照组. 上述结果提示反义 VEGF 能通过抑制肿瘤细胞 VEGF mRNA 的表达, 肿瘤细胞内 VEGF 的蛋白表达和分泌减少, 其特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的作用下降, 导肿瘤内血管生成受抑制, 肿瘤的生长减慢. 我们使用腺病毒介导的反义 VEGF 可以抑制胰腺癌种植瘤的血管生成和生长; 同时也说明, VEGF 可能是胰腺癌血管生成的主要调节因子, 缺少 VEGF 不能被其他血管生成因子, 如表皮生长因子或碱性成纤维细胞生长因子等所完全补偿. 本实验结果为今后继续开展胰腺癌的抗血管生成基因治疗奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, Hartel M, Sturm JW, Richter A, Post S. High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2002;25:122-129
- 2 Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 2003;26:344-349
- 3 邵成浩, 胡先贵, 刘延玲, 刘瑞, 张怡杰, 胡志浩, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子在胰腺癌中表达及其临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:546-548
- 4 邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 唐岩, 曹贵松, 黄盛东, 李白翎, 仲剑平. 腺病毒介导的反义血管内皮生长因子基因转染治疗胰腺癌的实验研究. *第二军医大学学报* 2002;23:995-998
- 5 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887
- 6 Baker CH, Solorzano CC, Fidler IJ. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2002;62:1996-2003
- 7 Buchler P, Reber HA, Ullrich A, Shiroiki M, Roth M, Buchler MW, Lavey RS, Friess H, Hines OJ. Pancreatic cancer growth is inhibited by blockade of VEGF-R11. *Surgery* 2003;134:772-782
- 8 Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 2004;64:2030-2038
- 9 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 10 Gu S, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, Chen LL, Zhang L. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:535-539
- 11 Forster Y, Meyre A, Krause S, Schwenzer B. Antisense-mediated VEGF suppression in bladder and breast cancer cells. *Cancer Lett* 2004;212:95-103

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.

World Journal of Gastroenterology 电子版

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下 7 个栏目组成. (1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2) 出版: 出版, 版权, 征订. (3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项. (6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.