

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0217-03

VEGF 反义寡核苷酸治疗小鼠 Lewis 肺癌的研究

李春艳^{1*}, 王颖², 林春艳², 崔美芝¹, 李景鹏³(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心, 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 哈尔滨 150001; 3. 东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150001)

* 肺癌与其它实体瘤一样,其生长、转移和预后均依赖血管生成,以新生血管为靶点,抑制肿瘤血管生成,阻断肿瘤的营养来源和迁移通道,已成为癌症治疗的新策略。有研究发现,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)为一高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,可直接诱导肿瘤血管生成^[1]。我们利用近年兴起的反义技术,设计 VEGF 反义寡核苷酸片断,使其特异性封闭肿瘤细胞中的 VEGF mRNA,通过研究它对肿瘤细胞合成 VEGF 及对肿瘤生长的影响,探讨其对肺癌治疗新途径的可能性。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

将指数生长期的 Lewis 肺癌细胞(3LL,购自上海胸科医院胸部肿瘤研究所),经 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化后,加生理盐水制成单细胞悬液后,以每只 0.2 ml 接种于 C₅₇BL/6 小鼠右腋下(约含活细胞数 1 × 10⁶个)。

1.2 VEGF 反义寡核苷酸的设计与合成

根据计算机程序模拟设计互补于 VEGF mRNA 的反义片段,同时针对反义片段设计合正义片段。VEGF 反义寡核苷酸由中科院生物化学研究所生物学重点实验室金由辛教授惠赠,VEGF 正义寡核苷酸由大连宝生物制品公司合成。反义 ODN 序列为:5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGTGC-3'。正义 ODN 序列为:5'-CTATCAGCGCAGCTACTGC-3'。ODN 两端各 3 个磷酸根被硫代。

1.3 VEGF 反义寡核苷酸的治疗方法

利用随机数字表法将 30 只 C₅₇BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只:(1)VEGF 反义寡核苷酸治疗组(VEGF-ASPODN 组):在接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内原位注射溶于 0.2 ml 生理盐水的 VEGF 反义寡核苷酸(约含 ODN 200 μg),每周注射 2 次,共治疗 4 周。(2)VEGF 正义寡核苷酸治疗组(VEGF-SPODN 组):治疗方法同上。(3)对照组:在接种后 24 h 内原位注射生理盐水 0.2 ml,每周注射 2 次,共治疗 4 周。接种后

第 4 天皮下肿瘤开始形成。以后每隔 3 天测量 1 次肿瘤的长径 L 和短径 W。用 Steel 公式计算肿瘤体积:V = LW²/2 (L 为长径, W 为短径),绘制生长曲线。接种后第 28 天将所有小鼠断颈处死,将肿瘤完整取下,测量瘤重,计算每组瘤重的平均值及两个治疗组的抑瘤率。抑瘤率 = (对照组瘤重 - 治疗组瘤重) / 对照组瘤重 × 100%。将肿瘤组织分成几部分,分置于 10% 甲醛、3% 戊二醛和液氮中,分别行肿瘤病理组织学观察,免疫组化及 RT-PCR 检测。

1.4 免疫组化检测 VEGF 蛋白表达

免疫组化染色采用 S-P 法。一抗为鼠抗鼠 VEGF 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc);生物素标记羊抗小鼠 IgG 二抗(免疫组化染色试剂盒,北京中山生物技术有限公司)。

1.5 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达

(1) TRIzol 试剂一步法提取各组肿瘤组织总 RNA。总 RNA 经紫外线分光光度定量,琼脂糖凝胶电泳鉴定。(2)取 5 μg RNA 用于逆转录,方法按 SuperscriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)试剂盒说明并略加改动进行。(3)PCR 引物:VEGF 正义引物:5'-CTG CTC TCT TGG GTG CAC TGG-3'反义引物:5'-CAC CGC CTT GGC TTG TCA CAT-3'。β-actin 正义引物:5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3',反义引物:5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。设计的 VEGF 引物可以检测到的是 VEGF 两种分泌型异构体 VEGF120 和 VEGF164,经 RT-PCR 扩增后 VEGF120 为 431 bp,VEGF164 为 563 bp。β-actin 扩增产物为 540 bp。(4)以 β-actin 为内参,逆转录后行目的基因和 β-actin cDNA 扩增。分别取逆转录产物 2.5 μl 用于 PCR。50 μl 体系包括:10 × PCR buffer 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP mix 4 μl,上、下游引物各 20 pmol, Taq DNA polymerase 0.4 μl,模板 cD-

[基金项目] 黑龙江攻关课题 GDDC190402 项目资助

[通讯作者] 李景鹏, E-mail: Ljinpeng@hotmail.com

* 李春艳, 东北农业大学在读博士

NA2.5 μl, 高压灭菌蒸馏水 36.1 μl。VEGF PCR 条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 进行 30 次循环, 72℃ 延伸 10 min。(5) 取 PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 电泳条带经电泳图像分析扫描仪扫描, 得到 VEGF 与 β-actin 条带各自的峰面积积分值, 计算 VEGF 与 β-actin 比值作为 VEGF 表达水平参数, 对 VEGF PCR 产物相对定量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件统计包, 进行 *t* 检验。

2 结果与讨论

2.1 成瘤性

实验组及对照组在接种部位均有肿瘤生长, 成瘤率为 100%。

2.2 小鼠肿瘤重量的变化

与对照组瘤重比较(7.83 ± 0.78 g)、VEGF-ASPODN 组(4.49 ± 0.43 g)能明显抑制小鼠肿瘤生长(*P* < 0.01)、VEGF-SPODN 组(7.73 ± 0.69 g)则无明显作用(*P* > 0.05)。VEGF-ASPODN 组、VEGF-SPODN 组抑

瘤率分别为 42.7%、5.9%。

2.3 各组瘤组织的病理改变

光镜下观察: 对照组及 VEGF-SPODN 组肿瘤细胞大小不等, 移行性明显, 核分裂相多见, 可见瘤巨细胞, 间质血管丰富。VEGF-ASPODN 治疗组肿瘤细胞形态与以上两组无明显差异, 但核分裂相对减少, 移行性不明显, 周围纤维组织增生, 淋巴细胞浸润, 间质血管明显少于以上两组。透射电镜观察: 超薄切片所见(50 ~ 80 nm): 对照组及 VEGF-SPODN 组癌细胞膜结构清晰, 细胞表面有许多绒毛, 细胞器线粒体发育良好, 线粒体嵴清晰, 蛋白质数目发育适中, 游离核蛋白体丰富, 可以看到多泡体。而 VEGF-ASPODN 治疗组, 核体积小, 染色质块状散布在核内, 细胞表面绒毛脱失, 线粒体空泡变性, 细胞内质网脱颗粒。

2.4 VEGF 蛋白的表达

VEGF 蛋白主要在胞浆中表达。VEGF-ASPODN 组与对照组及 VEGF-SPODN 组相比 VEGF 蛋白表达水平明显下降(*P* < 0.05), VEGF-SPODN 与对照组相比无明显差异(*P* > 0.05)(见图 1)。

图 1 VEGF 在各组肺癌细胞中的表达(SP × 400)

A: 对照组; B: VEGF-ASPODN 组; C: VEGF-SPODN 组

2.5 VEGF mRNA 水平的表达见图 2, 比值的变化见表 1

以 β-actin 为内参, VEGF-ASPODN 组与对照组比较, VEGF mRNA 表达水平明显降低, 而 VEGF-SPODN 组与对照组比较则无明显差异。

本实验结果表明, VEGF 反义寡核苷酸局部注射能够抑制小鼠肺癌的生长。VEGF-ASPODN 组与对照组比较, 肿瘤生长缓慢, 瘤重较轻, 有极显著差异。VEGF-SPODN 组与对照组肿瘤生长速度均较快, 瘤重较大, 无明显差异。但是, VEGF 反义寡核苷酸并不能完全抑制肿瘤生长。光镜及电镜下观察各组瘤组织的病理改变, 发现 ASPODN 组与对照组及 SPODN 组比较, 能明显抑制肿瘤细胞生长, 降低增殖活性。免疫组化及 RT-PCR 结果表明 ASPODN 组 VEGF 蛋白的表达及 VEGF mRNA 表达水平都有明显降低。

图 2 VEGF mRNA RT-PCR 产物电泳图

A: 1. Marker; 2. 对照组; 3. VEGF-SPODN 组; 4. VEGF-ASPODN; B: 各组间 β-actin 表达基本一致, 为 540 bp

表1 VEGF mRNA 与 β -actin 比值变化($\bar{x} \pm s$) (n=6)

组别	VEGF120/ β -actin	VEGF164/ β -actin
对照组	0.4020 \pm 0.032	0.8780 \pm 0.029
VEGF-ASPOD 组	0.1594 \pm 0.025*	0.3073 \pm 0.021*
VEGF-SPODN 组	0.3805 \pm 0.030 $^{\Delta}$	0.8481 \pm 0.020 $^{\Delta}$

* $t > 3.11$, $P < 0.01$ 与对照组及 VEGF-SPODN 组比较; $\Delta t < 2.2$, $P > 0.05$ 与对照组比较

VEGF 是强有丝分裂原,并且具有强趋化作用,能刺激血管内皮细胞和肿瘤细胞的增殖和迁移。本实验中所用的 VEGF 反义寡核苷酸是利用计算机程序模拟设计的特异互补于 VEGF 基因第三外显子的反义寡核苷酸,针对肺癌进行研究。该反义片段通过胞吞方式进入细胞,与 mRNA 特异性结合发挥封闭作用。作用机制如下:①由于形成 DNA-mRNA 结合,产生空间位阻效应,阻止核糖体与 mRNA 结合或阅读 mRNA 时的移动,从而阻碍 mRNA 翻译。②由于形成 DNA-RNA 双螺旋杂交分子,激活体内的 Rnase,该酶能够切割 DNA-RNA 杂交分子中的 RNA 链,因此 mRNA 被快速降解,失去模板功能^[2-3]。这

样,在基因水平上通过阻断 VEGF 的合成,抑制血管的形成来减少肿瘤细胞的血供,进而降低瘤细胞增殖活性。由此可见基因药物治疗肿瘤是完全可行的^[4]。

[关键词] 反义寡核苷酸; VEGF; 肺癌

[中图分类号] R73-36⁺2; R734.2 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Konish T, Huang CL, Adachi M, *et al.* The Ki-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers [J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(3): 501-511.
- [2] He YK, Huang L. Growth inhibition of human papillomavirus 16 DNA positive mouse tumor by antisense RNA transcribed from U6 promoter [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(18): 3993-3999.
- [3] Katoh O, Takahashi T, Oguri T, *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibitsapoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drug by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5565-5569.
- [4] Siew P H, Dustin HO. RNA Mapping: Selection of potent oligonucleotide sequences for antisense experiments [J]. *Methods Enzymol*, 2002, 314(12): 168-183

[收稿日期] 2003-11-18

[修回日期] 2004-04-10

· 科技动态 ·

前列腺素 EP2 受体介导癌症相关的免疫缺陷和 DC 的异常

最近的研究发现 COX 代谢物 PGE2 有较强的免疫抑制效应。PGE2 通过作用于 G 蛋白偶联的 PGE 受体,即 EP1、EP2、EP3 和 EP4 而发生作用。PGE2 也是调节 DC 功能的重要物质。EP2 调节小鼠 B 细胞的激活与分化、T 细胞的发育等。尽管有文献报道肿瘤能够分泌产生 PGE2 以及某些免疫细胞能表达 EP2,但关于 EP2 在调节宿主抗肿瘤免疫中的作用尚无报道。本研究以 BALB/c 小鼠为主要的实验模型对此进行了研究,结果提示 EP2 在介导癌症相关的免疫缺陷和 DC 的异常中有重要的作用。

为探讨 EP2 在调节宿主抗肿瘤免疫中的作用,采用肿瘤细胞接种、ELISA、FACS 和 MLR 等方法,就 EP2 对肿瘤生长速度、宿主存活时间以及 DC 功能的影响等进行了研究。结果显示:野生型(WT)和 EP2^{-/-} BALB/c (KO)小鼠皮下注射 MC26 细胞(直、结肠癌细胞)观察肿瘤生长速度,同时将 C57BL/6 来源的肺癌细胞静脉注射入 C57BL/6 野生型和 EP2^{-/-}小鼠观察存活时间,结果提示与 WT 相比,EP2 KO 荷瘤小鼠肿瘤的生长速度明显降低,并且存活时间明显延长。WT 和 KO 小鼠来源的肿瘤组织用抗体染色、ELISA 方法分析提示这两种类型小鼠的肿瘤血管生成和 VEGF 水平无明显差别。而且 T 细胞的功能也无明显差异。用 FACS 分析 WT 与 KO 小鼠来源的 DC 表达 CD11c, CD86, CD40 和 MHC II 分子的水平,结果提示 PGE₂ 抑制 WT 小鼠来源 DC 的分化,而 KO 小鼠来源的 DC 不受抑制。并且在 MLR 中观察到 PGE2 可以抑制野生型 DC 在 MLR 中刺激 T 细胞增殖的能力,而 EP2^{-/-}的 DC 不受抑制。可见 PGE2 通过作用于 EP2 而抑制 DC 的分化和功能。另外,MC26 接种 WT 和 KO 小鼠后,取腹股沟淋巴结用抗体标记后通过流式细胞仪分析表明到达 KO 荷瘤小鼠引流淋巴结 DC、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的数量明显多于荷瘤 WT 小鼠,而且仅在 KO 小鼠能观察到明显的抗肿瘤 CTL 反应。

总之,EP2 在抑制机体抗肿瘤免疫中有重要的作用,它通过抑制 DC 的分化和功能而减弱机体对肿瘤的免疫应答。

[刘海波 编译,曹雪涛 审阅;(英) *J Clin Invest*, 2003, 111(5): 727-735]