

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )04-0041-05

## VEGF 反义 RNA 对人食管癌细胞抑制作用的研究

潘立峰, 李巧霞, 单保恩, 王俊霞( 河北医科大学第四医院科研中心, 石家庄 050011 )

[ 摘要 ] **目的:** 研究血管内皮生长因子( VEGF )反义 RNA 对人食管癌细胞的抑制作用, 探讨以 VEGF 反义 RNA 进行食管癌基因治疗的可行性。**方法:** 采用脂质体法将反义 VEGF cDNA 质粒转入食管癌细胞 TE-1; 用 MTT 法检测细胞增殖情况; 用免疫组化法检测 VEGF 蛋白表达; 原位杂交和 RT-PCR 技术检测 VEGF mRNA 的表达。流式细胞术检测细胞的凋亡率和周期分布。**结果:** 被反义 VEGF cDNA 质粒转染的食管癌细胞有外源性 VEGF 反义基因的整合及表达, 该细胞的 VEGF mRNA 及蛋白表达水平降低, 但细胞生长速率无明显改变, 未发生明显凋亡现象; 接种裸鼠后, 形成肿瘤的时间明显延长, 肿瘤的体积和重量明显减小。**结论:** VEGF 反义 RNA 可抑制食管癌细胞 VEGF 表达和裸鼠体内的肿瘤生长。该表达体系为食管癌基因治疗的进一步研究奠定了基础。

[ 关键词 ] 血管内皮生长因子; 反义 RNA; 基因转染; 食管癌

[ 中图分类号 ] R730.54 [ 文献标识码 ] A

## The Inhibitory Effect of VEGF Antisense RNA on the Growth of Esophageal Cancer Cells *in vitro*

PAN Li-feng, LI Qiao-xia, SHAN Bao-en, WANG Jun-xia( The Research Center of the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of VEGF antisense RNA on the growth of human esophageal cancer cells *in vitro*, in order to further investigate the feasibility of VEGF antisense RNA gene therapy of esophageal cancer. **Methods:** The plasmid carrying with VEGF antisense cDNA was transfected into esophageal cancer cells, and confirmed its expression by RT-PCR. The expression level of VEGF mRNA and VEGF protein was examined in antisense group by insitu hybridization and immunohistochemistry staining. The cell growth rate was detected by MTT assay. Apoptotic rate in transfected cells was detected by FCM assay. **Results:** The expression of exogenous antisense VEGF mRNA was confirmed in transfected cells, and the VEGF protein and endogenous VEGF mRNA were dramatically decreased. The growth rate of transfected cells was not inhibited. Apoptotic cells were not found in transfected cells. Latent period of the tumor formation of the antisense group was lengthened, while body weight, volume of tumors was significantly smaller than that of empty vector group and control group. **Conclusions:** VEGF antisense RNA could decrease the expression of VEGF of esophageal cancer and cell proliferation *in vivo*, which may apply a useful theory basis for gene therapy of esophageal cancer.

[ Key words ] VEGF; antisense RNA; transfection; esophageal cancer

血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )是一种重要的促血管生成的细胞因子, 参与肿瘤细胞的增殖、分化、转移等过程, 并与多种肿瘤的发生、发展有密切的关系。食管癌是常见的消化道肿瘤, 细胞的增殖与其他肿瘤一样也是血管依赖性的。许多研究表明, VEGF 在人食管癌中呈高表达状态, VEGF 可能在食管癌的血管形成及发展中起重要

作用<sup>[1]</sup>。因此我们设想如能将其反义基因转移至食管癌细胞以抑制 VEGF 基因表达, 即可引起细胞生物学

[ 基金项目 ] 河北省自然科学基金( No. 301398 )

[ 作者简介 ] 潘立峰( 1970- ), 博士研究生, 河北唐山山人, 主要从事消化系统恶性肿瘤的基因治疗研究

[ 通讯作者 ] 单保恩, E-mail: baoenshan@ yahoo. com. cn

的变化,有可能为食管癌的基因治疗提供一定的实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

含反义 VEGF cDNA 序列(570 bp)的质粒 pcDNA3.1-VEGF(-)及空载体质粒 pcDNA3.1 由第四军医大学李明教授惠赠; Trizol 试剂、G418 和 Lipofectamine<sup>TM2000</sup>为 GIBCO 公司产品;兔抗人 VEGF 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。VEGF 原位杂交试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒购于博士德公司。RT-PCR 试剂盒、Rnasin 购于北京华美生物工程公司。

### 1.2 细胞培养及转染

人食管癌细胞株 TE-1 由本室保存,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基在 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 条件下进行培养。参照 Lipofectamine<sup>TM2000</sup> 使用说明书,将 pcDNA3.1-VEGF(-)和 pcDNA3.1 质粒转入 TE-1 细胞中,转染 pcDNA3.1-VEGF(-)和 pcDNA3.1 的细胞分别命名为 TE-1-A(反义组)和 TE-1-E(空载体组)细胞,未转染的瘤细胞为对照组(TE-1-wt)。转染 48 h 后,将细胞用 DMEM 培养基按 1:4 稀释后进行传代,培养 24 h,换含 G418(400 μg/ml)的培养液进行抗性筛选 2 周,对照组细胞全部死亡,TE-1-A 和 TE-1-E 组均有细胞克隆形成。挑取单细胞阳性克隆继续在含 G418(200 μg/ml)的培养液中扩大培养。

### 1.3 反义 VEGF 基因在食管癌细胞中的表达

采用 RT-PCR 法,证实反义 VEGF 基因是否在 TE-1 细胞中表达。VEGF 引物序列,上游 5'-GAAGTGCTGAAGTTCATGGATGTC-3'; 下游: 5'-CGATCGTTCTGTATCAGT CTTTCC-3'; β-actin 引物序列; 上游: 5'-GAGAGATGACCCAGATCATGT-3'; 下游: 5'-ACTCCATGCCAGGAAGGAAGG-3'(引物由上海生物工程公司合成)。取各组细胞 1 × 10<sup>7</sup> 用 Trizol 试剂提取总 RNA,进行 RT-PCR 反应,反应总体积为 30 μl,应用 β-actin 作为内对照。反应条件: 37℃ 60 min, 94℃ 变性 5 min, 94℃ 30 s, 72℃ 45 s, 58℃ 30 s(循环 35 次),延伸 72℃ 5 min。取扩增产物,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,经 EB 染色,用凝胶成像分析系统分析结果,并计算目的基因片段的相对表达值。计算方法为: VEGFmRNA 相对表达值 = VEGF 吸光值/β-actin 吸光值。

### 1.4 VEGF 蛋白的表达分析

采用免疫组化 SABC 法,按试剂盒使用说明书进行操作。收集对数生长期各组细胞,作细胞爬片,用 3% 过氧化氢去除内源性酶,加入兔抗人 VEGF 单克隆抗体。分别用已知阳性的食管癌组织切片作阳性对

照,正常小鼠和兔血清及 PBS 代替一抗作阴性对照; DAB 显色,苏木精复染,光镜观察结果。细胞浆或核呈棕黄色颗粒状分布者为 VEGF 阳性染色。

### 1.5 VEGFmRNA 的原位杂交检测

用经地高辛标记 VEGF 寡核苷酸探针,按试剂盒使用说明书进行操作。收集对数生长期各组细胞,作细胞爬片,用 3% 过氧化氢去除内源性酶,加胃蛋白酶暴露 mRNA 片段,预杂交后加入含寡核苷酸探针的杂交液进行杂交; DAB 显色,苏木精复染,光镜观察结果。

### 1.6 细胞增殖反应检测(MTT 法)

取对数生长期各组细胞接种于 96 孔板,每孔 1 × 10<sup>3</sup> 个细胞,均做 6 个复孔,37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl/孔,孵育 4 h,弃上清,加入 DMSO 150 μl/孔,振荡 20 min,使结晶充分溶解,在酶联仪上检测各组细胞 570 nm 波长的 OD 值。

### 1.7 细胞凋亡及细胞周期分析

取对数生长期各组细胞,制成单细胞悬液,用 70% 冷乙醇固定过夜,经 EB 染色后用流式细胞仪进行细胞凋亡及细胞周期分析。

### 1.8 裸鼠体内致瘤性测定

分别将各组 TE-1 细胞 2 × 10<sup>6</sup> 个接种于 4~6 周龄的 Balb/c 裸鼠左前肢皮下,每组 5 只裸鼠。连续观察 4 周,记录成瘤时间及瘤体大小变化。

### 1.9 统计学处理

用 SPSS11.5 软件对所有数据进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 获得 VEGF 反义 cDNA 转染阳性细胞克隆

将 VEGF 反义 cDNA 转染 TE-1-wt 细胞,经 G418 抗性培养 2 周后,未经转染对照组细胞全部死亡,而 TE-1-A 和 TE-1-E 细胞开始呈克隆状生长,挑出单克隆后,在 400 μg/ml G418 筛选压力下继续生长。结果见图(1)。

图 1 G418 抵抗性 TE-1 阳性细胞克隆

Fig.1 The anti-G418 positive clone of TE-1 cell

## 2.2 反义 VEGF 基因在各组食管癌细胞中的表达

经 RT-PCR 检测结果显示, TE-1-E 和 TE-1-wt 细胞的 VEGFmRNA 表达明显高于 TE-1-A。TE-1-A 内源性 VEGFmRNA 的表达被显著抑制, 结果见图(2)。

## 2.3 VEGF 蛋白和 mRNA 在食管癌细胞中表达

经免疫组化染色检测结果显示, TE-1-A 细胞较 TE-1-E 和 TE-1-wt 细胞浆内棕色颗粒着色变浅, VEGF 阳性细胞数减少(图3)。经原位杂交后光镜下显示, TE-1-wt 和 TE-1-E 组细胞浆内可见黄色杂交颗粒; 而 TE-1-A 组细胞浆内杂交黄色颗粒强度明显减弱, 证明该组细胞中 VEGFmRNA 表达减少, VEGF 阳性表达细胞数也明显减少(图4)。

## 2.4 食管癌细胞的生物学特性变化

经 MTT 法分析, TE-1-A、TE-1-E 和 TE-1-wt 各组细胞的增殖反应无明显差异, 结果见表1。经流式

细胞分析, 各转染组细胞均无明显细胞凋亡现象, 细胞周期分布无显著性差异( $P > 0.05$ ; 图5, 表2)。

图2 不同食管癌细胞 VEGF mRNA 表达的 RT-PCR 分析结果

Fig. 2 The expression of VEGF mRNA from different tissues analysis with RT-PCR

Lane 1: Marker; Lane 2: TE-1-wt cell;  
Lane 3: TE-1-E cell; Lane 4 and lane 5: TE-1-A cell

图3 不同食管癌细胞经抗 VEGF 单克隆抗体染色后的免疫组化结果

Fig. 3 Immunohistochemistry staining of different groups cells with VEGF polyclonal antibody (200 ×)

A: TE-1-wt cell; B: TE-1-E cell; C: TE-1-A cell

图4 不同食管癌细胞 VEGF mRNA 表达的原位杂交分析结果(400 ×)

Fig. 4 Expression of VEGFmRNA in different groups cell analysis by *in situ* hybridization assay (400 ×)

A: TE-1-wt cell; B: TE-1-E cell; C: TE-1-A cell

图5 不同食管癌细胞凋亡的流式细胞分析结果

Fig. 5 Apoptosis rates in different cell groups analysis with FCM

A: TE-1-wt cell; B: TE-1-E cell; C: TE-1-A cell

表1 不同食管癌细胞增殖活性分析(OD  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The proliferation activity of difference esophagase cell types

Days	n	TE-1-wt	TE-1-A	TE-1-E	P
1	6	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.05	>0.05
2	6	0.79 ± 0.14	0.80 ± 0.11	0.79 ± 0.11	>0.05
3	6	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.06	0.92 ± 0.05	>0.05
4	6	1.20 ± 0.09	1.07 ± 0.04	1.09 ± 0.05	>0.05
5	6	1.70 ± 0.07	1.66 ± 0.10	1.67 ± 0.10	>0.05
6	6	2.19 ± 0.09	2.14 ± 0.10	2.17 ± 0.06	>0.05

表2 不同食管癌细胞细胞周期分析( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Analysis of cell cycle in difference cell types

Cell types	G0/G1 phase (%)	S phase (%)	G2/M phase (%)
TE-1-wt	64.40 ± 3.46	18.99 ± 2.60	16.61 ± 3.73
TE-1-A	67.44 ± 6.18	16.58 ± 4.15	15.98 ± 3.98
TE-1-E	67.29 ± 1.58	17.24 ± 1.48	15.41 ± 1.83

\* No significance difference between TE-1-A and others (TE-1-wt and TE-1-E) ( $P > 0.05$ ).

2.5 裸鼠体内致瘤性差异

将各组瘤细胞接种裸鼠7 d后,接种 TE-1-wt 及 TE-1-E 细胞的10只裸鼠均长出肿瘤,接种 TE-1-A 细胞的5只裸鼠在接种第12天起开始长出肿瘤,第32天处死动物,称量瘤体重量,TE-1-A 组的瘤体体积和重量均较 TE-1-wt 组及 TE-1-E 组明显减小,结果见表

(3)。

表3 荷瘤小鼠体内形成肿瘤的体积和重量( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Latent period and tumor weight of the tumor formation

Cell types	Case	Latent period (d)	Tumor weight (g)
TE-1-wt	5	5.7 ± 2.5	2.71 ± 0.25
TE-1-A	5	11.6 ± 1.8*	0.98 ± 0.17*
TE-1-E	5	5.5 ± 2.1	2.61 ± 0.14

\* Significance difference between TE-1-A and others (TE-1-wt and TE-1-E) ( $P < 0.05$ ).

3 讨论

VEGF 在肺癌、胃癌、乳腺癌和食管癌等多种肿瘤中均有表达。食管癌组织中 VEGF 的表达水平明显高于正常组织,且表达水平与肿瘤分级及 TNM 分期呈正

相关,淋巴结转移阳性者 VEGF 水平明显高于阴性者<sup>[2]</sup>。VEGF 的表达和微血管密度( Intratumoral microvessel density, MVD)在伴淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组<sup>[3]</sup>。Inoue 等<sup>[4,6]</sup>认为在食管鳞状细胞癌中 VEGF 的表达与患者的预后密切相关。近年来的研究表明,VEGF 通过与其特定的受体结合而发挥作用,阻断 VEGF 或其受体的表达可抑制肿瘤血管生成,从而阻止肿瘤的生长与转移<sup>[7-8]</sup>。

反义基因治疗是利用反义核酸在基因转录或翻译阶段抑制某些异常基因的表达,使肿瘤细胞进入正常分化轨道或导致瘤细胞凋亡,具有高特异性、高生物活性和低毒性等优点,是肿瘤基因治疗的重要组成部分。由于 VEGF 参与肿瘤形成过程中的血管形成,因此产生了许多阻断 VEGF 的基因治疗策略。目前已有应用 VEGF 反义 RNA 对其他肿瘤抑制作用的动物实验的报告<sup>[9-11]</sup>,但对食管癌抑制作用的研究国内外尚未见报道。本研究采用 Lipofectamine<sup>TM2000</sup>介导成功地将含反义 VEGFcDNA 的质粒转染人食管癌细胞 TE-1,经 G418 抗性筛选,获得携带真核表达载体 pcDNA3.1-VEGF(-)的食管癌细胞。应用原位杂交和 RT-PCR 方法检测发现,转染 VEGF 反义 cDNA 后,食管癌细胞的内源性 VEGFmRNA 表达受到抑制,但有 VEGF 反义 RNA 的表达。VEGF 蛋白表达的检测也支持这一结果。细胞增殖实验结果显示,转染 VEGF 反义 RNA 的食管癌细胞及转染 pcDNA3.1 质粒的细胞与未转染细胞的增殖速度相似,差异无显著性,说明 VEGF 反义 RNA 仅下调食管癌细胞内源性 VEGF 基因表达。这可能是由于 VEGF 的主要作用是作用于血管内皮,而不是直接抑制细胞增殖。我们也选择裸鼠进行体内致瘤性实验,结果发现,转染 VEGF 反义 RNA 后,食管癌细胞在裸鼠体内致瘤时间延长,瘤体重量较小。这可能因为经 VEGF 反义 RNA 封闭后的食管癌细胞,在裸鼠体内肿瘤细胞的 VEGF 表达量明显减少,导致瘤内血管生成减少(结果未显示,将另文发表),减少了对肿瘤的供养,抑制了肿瘤的生长和转移。反之,对照组及空载体组瘤细胞在裸鼠体内 VEGF 的表达量不但没有减少,反而增加,从而诱导体内血管大量的增生(结果未显示,将另文发表),促进了肿瘤的生长速度及体积的增加。此结果进一步证实,肿瘤的生长需要大量的血管提供养分,血管生成是肿瘤生长和转移的前提条件。

以上结果显示,反义 VEGFcDNA 转染后抑制了

食管癌细胞 VEGF 表达,以及在体内的成瘤潜伏期,减小了肿瘤的体积和重量。该表达体系为食管癌基因治疗的进一步研究奠定了基础。

## [参考文献]

- [1] Sato J, Shinada Y, Wtanade G, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cad-herin in the process of lymph node metastasis in esophageal cancer [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(9): 1366-1369.
- [2] Kitadai Y, Haruma K, Tokuyomi T, *et al.* Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(9): 2195-2200.
- [3] Keith W, Millock MD, Julian W, *et al.* Do angiogenesis and growth factor expression predict prognosis of esophageal cancer? [J]. *Am Surg*, 2000, 66(4): 401-405.
- [4] Inoue K, Oreki Y, Suganuma T, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous carcinoma [J]. *Cancer*, 1997; 79: 206-213.
- [5] Ajani JA, Movsas B, Schwarz R, *et al.* NCCN practice guideline for upper gastro-intestinal carcinomas [J]. *Oncology*, 1998, 12: 179-181.
- [6] Gabrilovich DJ, Chen HL, Grigis KR, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells [J]. *Natl Med*, 1996, 2(10): 1096-1099.
- [7] Ke LD, Fueyo J, Cheu X, *et al.* A novel approach to glioma gene therapy: Down regulation of the vascular endothelial growth factor in glioma cells using ribozymes [J]. *Int J Oncol*, 1998, 12(6): 1391-1396.
- [8] Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: Induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(14): 8761-8766.
- [9] Nakashima T, Hudson JM, Clayman GL. Antisense inhibition of vascular endothelial growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2000, 22(5): 483-488.
- [10] Ellis LM, Staley CA, Liu W, *et al.* Down regulation of vascular endothelial growth factor in human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(2): 1052-1057.
- [11] Saleh M, Stacker SA, Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in a antisense vascular endothelial growth factor sequence [J]. *Cancer Res*, 1996, 59(2): 393-402.

[收稿日期] 2004-08-30

[修回日期] 2004-10-17

[本文编辑] 王莹, 韩丹