

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0281-05

VEGF 反义寡核苷酸对 Lewis 肺癌细胞的抑制作用

王 颖, 李春艳, 林春艳 (哈尔滨医科大学第一临床医学院实验诊断科, 哈尔滨 150001)

[摘 要] **目的:** 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)反义寡核苷酸对 C57BL/6 小鼠肺癌细胞的抑制作用。**方法:** 制作 C57BL/6 小鼠皮下肺癌模型 40 只, 分为 VEGF 反义寡核苷酸(ASODN)治疗组、VEGF 正义寡核苷酸(SODN)治疗组、VEGF 错义寡核苷酸(MODN)治疗组及对照组。接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内, 用 ASODN、SODN 及 MODN 皮下注射进行治疗, 对照组只注射生理盐水, 观察小鼠肿瘤的生长情况以及组织形态学改变, 标本常规石蜡切片, H-E 染色, 用免疫组化方法检测 VEGF 蛋白表达。**结果:** 对照组、ASODN 组、SODN 组、MODN 组平均瘤重分别为(7.33 ± 0.71)g、(4.56 ± 0.38)g、(7.59 ± 0.32)g 和(7.62 ± 0.39)g, ASODN 组、SODN 组、MODN 组抑瘤率分别为 43.8%、5.5%、3.1%。光镜下观察, VEGF-ASODN 能明显抑制肿瘤细胞生长, 降低增殖活性。免疫组化结果表明, ASODN 组 VEGF 的表达水平明显低于 SODN 组、MODN 组及对照组($P < 0.05$)。CD34 免疫组化结果表明, ASODN 组 MVD 为 8.25 ± 2.12, 与对照组(14.78 ± 3.51)、SODN 组(13.71 ± 3.62)及 MODN 组(12.81 ± 2.56)比较, ASODN 组 MVD 明显减少($P < 0.01$)。**结论:** 原位注射 VEGF 反义寡核苷酸能抑制小鼠肺癌生长。

[关键词] 反义寡核苷酸; 血管内皮生长因子; 肺癌

[中图分类号] R733.3 [文献标识码] A

Inhibitory effect of VEGF antisense oligonucleotides on synthesis of VEGF by Lewis lung cancer cells

WANG Ying, LI Chun-yan, LIN Chun-yan (Department of Laboratory Diagnosis, First Clinical College, Harbin Medical University, Haerbin 150001, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the inhibitory effect of VEGF antisense oligonucleotides (ASODN) on growth of Lewis lung cancer in C57BL/6 mice. **Methods:** Lewis lung cancer cells were cultured and implanted subcutaneously into 40 C57BL/6 mice, which were then divided into 4 groups: VEGF-ASODN treatment group, VEGF-SODN treatment group, VEGF-MODN treatment, and control group (normal saline). Mice in different groups were treated 24 hours after cell inoculation. The weight and volume of subcutaneous tumors was measured and the morphological changes of tumor cells was observed under microscope. VEGF protein and microvessel density were examined by immunohistochemistry. Partial tumor tissues were kept in liquid nitrogen. **Results:** The average tumor weights of the control, VEGF-ASODN, VEGF-SODN and VEGF-MODN groups were (7.33 ± 0.71)g, (4.56 ± 0.38)g, (7.59 ± 0.32)g, and (7.62 ± 0.39)g, respectively. The inhibition rates of tumor growth in VEGF-ASODN, VEGF-SODN and VEGF-MODN group were 43.8%, 5.5% and 3.1%, respectively. VEGF-ASODN obviously inhibited the tumor cell growth and decelerated the tumor cell proliferation. Immunohistochemistry results showed that the expression of VEGF in ASODN group was remarkably lower than those in SODN group, MODN group and control group ($P < 0.05$). The microvessels density (MVD) in the VEGF-ASODN, control, VEGF-SODN, and VEGF-MODN group were 8.25 ± 2.12, 14.78 ± 3.51, 13.71 ± 3.62, and 12.81 ± 2.56, respectively, with that of VEGF-ASODN remarkably lower than those of other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Lewis lung cancer cells can be inhibited by the VEGF antisense oligonucleotides inoculated into tumor in the C57BL/6 mice.

[**Key words**] antisense oligonucleotides; vascular endothelial growth factor; lung cancer

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 281-285]

血管基底膜及血管周围基质的选择性降解以及内皮细胞趋化移动的复杂过程, VEGF 可间接或直接地作用于每一个环节, 以促进血管新生^[1-2]。目前, 反义

[基金项目] 黑龙江省“九五”攻关课题资助项目(GDDC190402)
[作者简介] 王颖(1970 -), 女, 黑龙江人, 主治医师, 主要从事分子生物学方面研究
[通讯作者] 林春艳, E-mail: zj961234@yahoo.com.cn

核苷酸在调控基因表达,特别是在抑制一些有害基因的表达和失控基因的过度表达方面取得了很大的进展。反义核苷酸通过与靶 mRNA 结合抑制相应癌基因表达,从而使癌细胞的恶性表型得到控制^[3]。肺癌与其他实体瘤一样,其生长、转移、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,阻断肿瘤营养来源和迁移通道,这已成为近年来癌症治疗的新策略^[4]。本实验以 VEGF 作为反义核酸基因治疗的靶点,特异性地封闭肿瘤细胞中 VEGF mRNA,通过研究它对肿瘤细胞合成 VEGF 和自身增殖的影响,探讨其作为肺癌治疗新途径的可能性。

1 材料与方 法

1.1 细胞和实验动物

小鼠 Lewis 肺癌细胞株,购自上海胸科医院胸部肿瘤研究所。实验动物为近交系清洁级健康 C57BL/6 小鼠 40 只,雄性,体重 14~18 g,购自哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心(批号为:SCXK 黑 20020002)。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 干粉培养基,新生小牛血清购自 Hyclone 公司;胰酶、EDTA 购自 Gibco 公司;IV 型胶原酶购自 Sigma 公司,鼠抗鼠 VEGF 单抗(Santa Cruz Biotechnology, Inc),兔抗鼠 CD34 单克隆抗体(武汉博士德公司),免疫组化染色试剂盒(北京中山生物工程有 限公司);VEGF 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。

1.3 动物模型的建立

取生长良好的 Lewis 肺癌细胞(细胞汇合达 80%),经 2.5 g/L 胰酶 + 0.2 g/L EDTA 消化液消化后,加磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,离心 1 500 r/min 5 min,弃上清。加生理盐水制成单细胞悬液,细胞密度为 1×10^6 个/ml,以 0.2 ml/只接种于 C57BL/6 小鼠右腋下(约含活细胞数 1×10^6 个)。

1.4 基因药物的设计与合成^[3]

根据计算机程序模拟设计出互补于 VEGF mRNA 第 3 外显子 22 个碱基的反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleic acid, ASODN),同时针对反义片段分别设计正义和错义寡脱氧核苷酸(sense oligodeoxynucleic acid, SODN; mismatch oligodeoxynucleic acid, MODN)。ASODN: 5'-G* C* A* GTAGCTACGCTGAT-AG* T* G* C-3'; SODN: 5'-C* T* A* TCAGCGCAGC-TAC* T* G* C-3'; MODN: 5'-G* C* G* GAGCCAG-GTCTAG* C* T* T-3'(5'及 3'末端 * 表示进行硫代的碱基,即由硫原子取代磷酸基中的一个氧原子,形成硫代

磷酸化寡核苷酸)。

1.5 VEGF 反义寡核苷酸的治疗方法

利用随机数字表将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。(1)VEGF-ASODN 组:在接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内原位注射含 VEGF-ASODN 200 μ g 的生理盐水 0.2 ml,每周注射 2 次,共治疗 4 周。(2)VEGF-SODN 组:在接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内原位注射含 VEGF-SODN 200 μ g 的生理盐水 0.2 ml,治疗时间同上。(3)VEGF-MODN 组:在接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内原位注射含 VEGF-MODN 200 μ g 的生理盐水 0.2 ml,治疗时间同上。(4)对照组:在接种 Lewis 肺癌细胞后 24 h 内原位注射生理盐水 0.2 ml,治疗时间同上。

1.6 测量瘤重计算抑瘤率

接种后第 28 天将所有小鼠处死,将肿瘤完整取下,测量肿瘤重量。计算每组瘤重的平均值及各个治疗组的抑瘤率,抑瘤率 = (对照组瘤重 - 治疗组瘤重)/对照组瘤重 \times 100%

1.7 各组瘤组织的病理改变观察

将肿瘤组织切成 1 cm³ 左右小块,放于 4% 甲醛溶液中固定。标本常规石蜡切片,H-E 染色,光镜下观察小鼠肿瘤的组织形态学改变。

1.8 免疫组化方法检测 VEGF 蛋白表达

VEGF 抗原免疫组化染色采用 S-P 法,切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精至水化。3% H₂O₂ 室温孵育以消除内源性过氧化物酶的活性,加入微波修复液置于微波炉中进行抗原修复 2 次,滴加封闭用正常血清工作液,室温孵育 10~15 min。加入适当比例稀释的一抗(鼠抗鼠 VEGF 单抗),4℃ 过夜。加入生物素化二抗工作液(兔抗鼠 CD34 单克隆抗体),室温孵育 25 min。加入辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 25 min,DAB 显色剂显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,放入二甲苯中固定,封片。

采用双盲法 2 人阅片,以细胞质着色呈清晰棕黄色为阳性,首先 100 \times 视野筛选 VEGF 表达最强区,然后 200 \times 视野连续计数 400 个肺癌细胞。VEGF 染色按阳性细胞比例分为:“+”为阳性细胞 < 25%;“++”为阳性细胞数 25%~50%;“+++”为阳性细胞 > 50%。

1.9 免疫组化法检测肿瘤组织微血管密度(MVD)

抗 CD34 单抗免疫组化检测方法见参考文献[3]。MVD 计数按 Weidner 方法进行,低倍镜下(100 \times)找出微血管最密集区,之后在 200 \times 下(0.739 mm³/视野)计数 5 个视野的 CD34 染成棕色的血管数目,取其平均值作为微血管密度。微血管的计数标准:(1)单个阳性染色的血管内皮细胞;(2)单个阳性染色的血管内

皮细胞簇;(3)血管干上的分枝结构。

1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 统计软件进行 t 检验、秩和检验和 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 VEGF 反义寡核苷酸对肿瘤生长的抑制

ASODN 组肿瘤重量为 (4.56 ± 0.38) g, 与对照组 (7.33 ± 0.71) g、SODN 组 (7.59 ± 0.32) g 及 MODN 组 (7.62 ± 0.39) g 比较,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。ASODN 组抑瘤率为 43.8%, 与 SODN 组 (5.5%)、MODN 组 (3.1%) 比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.2 肿瘤组织的病理改变

大体观察:对照组、SODN 组及 MODN 组瘤组织大,切面呈鱼肉状,易出血,与周围组织粘连紧密,不易剥离。ASODN 治疗组瘤组织小,血运差,与周围组织界限清楚,易剥离,部分组织中央可见液化坏死灶。光镜下观察:对照组、SODN 组、MODN 组肿瘤细胞大小不等,核分裂相多见,可见瘤巨细胞,间质血管丰富。ASODN 治疗组肿瘤细胞形态与以上 3 组无明显差异,但核分裂相减少,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 3 组,可见大片坏死组织(图 1)。

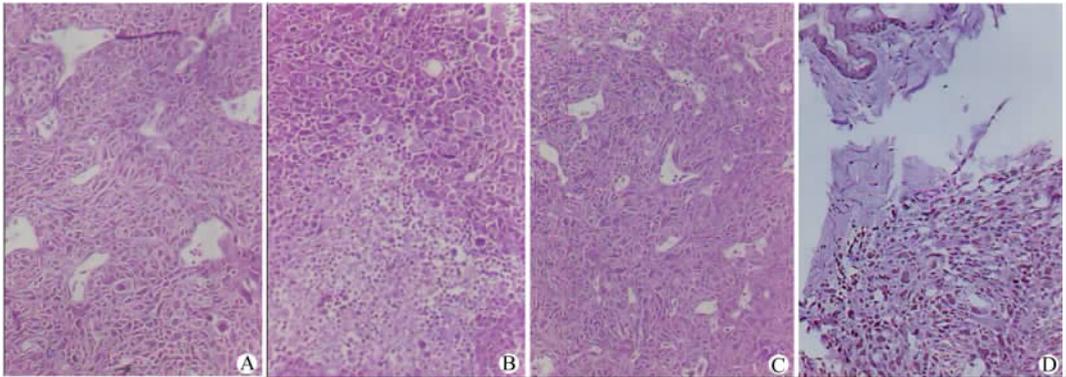


图 1 各组肿瘤组织的病理变化 (H-E, $\times 400$)

Fig. 1 Pathological changes of tumor tissue in each group (H-E, $\times 400$)

A: Control group; B: ASODN group; C: MODN group; D: SODN group

2.3 VEGF 反义寡核苷酸对 VEGF 蛋白表达的抑制

免疫组化切片中,4 组动物肿瘤细胞质中均可见阳性着色颗粒。细胞膜及细胞核中未见阳性颗粒,ASODN 组癌细胞质多呈 VEGF 弱阳性着色或中度阳性着色;

SODN 组及对照组癌细胞质则多呈强阳性着色。ASODN 组与对照组、SODN 组及 MODN 组相比,VEGF 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$) (图 2,表 1)。

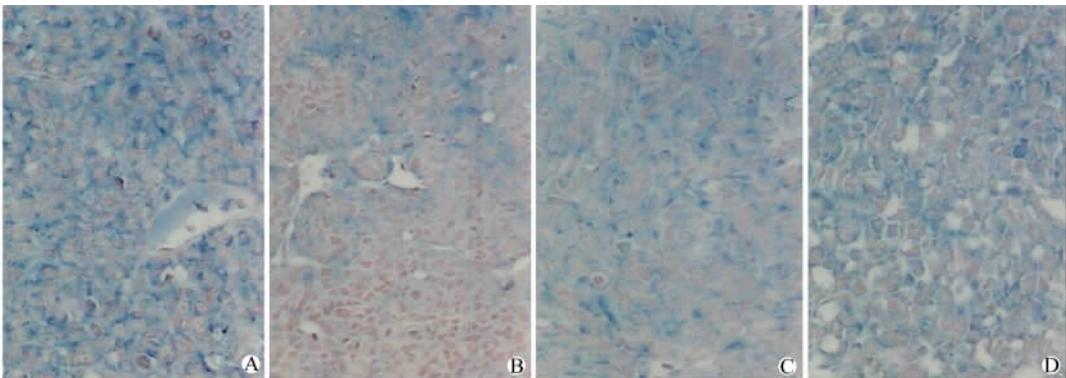


图 2 VEGF 在各组肺癌组织中的表达 (S-P, $\times 400$)

Fig. 2 Expression of VEGF in lung cancer tissue

A: Control group; B: ASODN group; C: MODN group; D: SODN group

表 1 VEGF 在各组肺癌组织中的表达

Tab. 1 Expression of VEGF in lung cancer tissue (n = 10)

Groups	+	++	+++
Control	1	2	7
ASODN	5	3	2*
SODN	1	3	6
MODN	2	2	6

* P < 0.05 vs Control, SODN or MODN group

2.4 VEGF 反义寡核苷酸对肿瘤组织微血管的抑制

CD34 免疫组化结果表明: 对照组、SODN 组及 MODN 肿瘤组织内可见形态不规则的新生血管, 肿瘤浸润边缘的微血管较肿瘤内部密集。ASODN 组新生血管数目较少。ASODN 组 MVD 为 8.25 ± 2.12, 与对照组 (14.78 ± 3.51)、SODN 组 (13.71 ± 3.62) 及 MODN 组 (12.81 ± 2.56) 比较, ASODN 组 MVD 明显减少 (P < 0.01) (图 3)。

3 讨论

研究发现, 肿瘤细胞可以合成与分泌 VEGF, VEGF 在肿瘤组织中的表达水平比肿瘤组织周围的正常组织

要高, 并与肿瘤的恶性程度相关, 这一现象先后在膀胱癌、宫颈癌、结肠癌及骨肉瘤中得到证实^[5]。大量研究表明, VEGF 是诱导肿瘤血管发生的主要调节因素^[6]。免疫组化染色显示, VEGF 可分别或同时出现于肿瘤细胞浸润的基质及肿瘤血管中, 也可同时出现于肿瘤细胞和肿瘤血管。正如肿瘤细胞的增殖依赖于同时生长的血管一样, 肿瘤细胞的转移及其在转移部位的生长也依赖于血管新生^[7]。

反义核酸(antisense nucleic acid)是一段与靶基因的某段序列互补的天然存在或人工合成的核苷酸序列。它可通过碱基配对与细胞内核酸特异结合形成杂交分子, 从而在转录和翻译水平调节靶基因的表达, 具有合成方便、序列设计简单、容易修饰、选择性高、亲和力高等特点^[8]。根据来源不同, 反义核酸可分 3 类: ①用重组 DNA 技术构建表达载体在细胞内转录出反义核酸; ②人工合成的反义寡核苷酸; ③利用诱导物诱生细胞内的反义核酸。目前最广泛应用的是反义寡核苷酸。反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)是短序列的单链 DNA, 在体外化学合成, 与细胞内特异的靶序列互补。ASODN 比通过表达载体导入的方式应用广泛, 而且由于它可以作为反义药物应用于临床, 因此, ASODN 的研究已引起了广泛的重视。

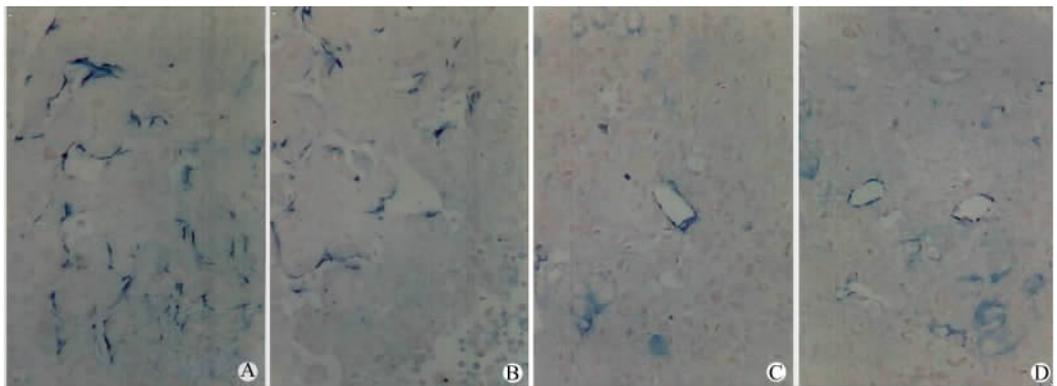


图 3 肿瘤组织内微血管显示 CD34 阳性(S-P, ×400)

Fig. 3 Microvessels of tumor tissue was CD34 positive (S-P, ×400)

A: Control group; B: ASODN group; C: MODN group; D: SODN group

目前, 反义核酸在调控基因表达, 特别是在抑制一些有害基因的表达和失控基因的过度表达上取得了很大的进展, 反义核酸通过与靶 mRNA 结合抑制相应癌基因表达, 从而使癌细胞的恶性表型得到控制。1978 年, Zamecnik 等首次提出反义寡聚 DNA 可用于疾病治疗。80 年代中期, 由于天然反义 RNA 研究的进展, 为 ASODN 治疗疾病提供了依据。反义寡聚 DNA 的基本作用原理与反义 RNA 相同, 但与反义 RNA 相比, 有以

下多种优点^[9]: ①ASODN 要稳定得多, 在体内和体外条件下均较难被核酸酶降解; ②它的合成成本比反义 RNA 低 1 到几个数量级; ③ASODN 的一些作用方式是反义 RNA 所没有的, 包括反义 ASODN 与靶 mRNA 形成 DNA-RNA 复合物, 可诱导内源 RNase H 切割其中的 RNA 链; 反义 ASODN 与靶基因的前体 mRNA 的特殊序列形成双链, 阻碍前体 mRNA 的加帽、拼接、加 polyA 尾及核质转运过程; 或与成熟 mRNA 结合, 阻碍其翻

译;④通过反义 ASODN 的作用,能明确封闭基因位点。因此 ASODN 被认为是极具发展前景的一类核酸药物。

本实验利用反义技术设计了针对小鼠肺癌细胞 VEGF 的反义基因片段,在制作的动物模型上观察基因药物对肿瘤生长的抑制作用。实验结果表明,VEGF-ASODN 组与对照组、VEGF-SODN 组、VEGF-MODN 组相比,肿瘤生长缓慢,瘤重较轻,有极显著差异($P < 0.01$)。反义治疗组在小鼠体内成瘤的速度和微血管数目方面均明显低于正义治疗组及对照组,说明反义寡核苷酸可以通过抑制肿瘤组织的血管形成来减少肿瘤组织营养成分和供给,从而抑制肿瘤的生长。小鼠人肺癌移植瘤细胞内 VEGF 的表达和分泌减少,降低了对组织中血管内皮细胞的促进分裂、生长和迁移作用,同时也抑制了其促血管通透性的作用,减少了组织中血浆等基质成分的渗出,消除了血管内皮细胞及肿瘤细胞赖以生存的基础,从而达到了抑制肿瘤生长的效果。本课题的研究为应用反义寡核苷酸作为抗肿瘤治疗的新手法提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Konish T, Huang CL, Adachi M, *et al.* The K-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] Ho SP, Britton DH, Bao Y, *et al.* RNA mapping: Selection of potent oligonucleotide sequences for antisense experiments[J]. *Methods Enzymol*, 2002, 314(12):168-183.
- [3] Gunningham SP, Currie MJ, Han C, *et al.* Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: Regulation by the von hippel-lindau gene and hypoxia[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7):3206-3211.
- [4] Lang S, Hartner A, Sterzel RB, *et al.* Requirement of cyclin D1 in mesangial cell mitogenesis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(8):1398-1408.
- [5] 谷仲平. 血管内皮生长因子与肺癌[J]. *国外医学:外科学分册*, 2002, 29(4): 232-234.
- [6] Triantafilou M, Triantafilou K, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(8): 2218-2226.
- [7] 孙 玲, 邹 雄. 血管内皮生长因子在肿瘤中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤防治杂志*, 2001, 8(2): 194-196.
- [8] 任正刚, 金由辛, 薛 琼, 等. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸抑制裸鼠人肝癌模型的作用观察[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(1): 65-66.
- [9] Shi W, Siemann DW. Inhibition of renal cell carcinoma angiogenesis and growth by antisense oligonucleotides targeting vascular endothelial growth factor[J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(1): 119-126.

[收稿日期] 2006 - 05 - 08

[修回日期] 2006 - 07 - 10

[本文编辑] 郁晓路

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , O^{--} , Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 *; 核子激发态用正体 m, 也可用 *) 标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锗)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。