



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.022
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4079.shtml

· 简要论著 ·

VEGF 反义核苷酸抑制胃癌生长及血管生成的在体实验研究

王殿栋, 段建中, 辛佳音

(包头医学院第二附属医院 肿瘤外科, 内蒙古 包头 014030)

摘要

目的: 探讨脂质体介导 VEGF 反义核苷酸对裸鼠胃癌肿瘤生长以及肿瘤血管生成的抑制作用, 为临床应用反义核苷酸技术治疗胃癌提供理论依据。

方法: 用人胃癌细胞 SGC-7901 建立裸鼠胃癌模型后, 将胃癌裸鼠分为治疗组与对照组, 治疗组腹腔内注射脂质体介导 VEGF 反义核苷酸, 对照组注射生理盐水, 连续注射 4 周。10 周后处死裸鼠, 比较两组肿瘤生长、转移情况以及肿瘤毛细血管密度等。

结果: 与对照组比较, 治疗组肿瘤的体积、质量明显减小、肿瘤周围的毛细血管密度、腹腔转移率明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: 脂质体介导 VEGF 反义核苷酸对胃癌的生长转移以及血管生成等均有明显抑制作用。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1420-1422]

关键词

胃肿瘤; 血管内皮生长因子; 寡核苷酸类, 反义; 小鼠, 裸

中图分类号: R735.2

血管内皮生长因子 (VEGF) 是可以刺激血管内皮细胞大量增殖, 增加血管通透性的一种基因。恶性肿瘤的发生发展有赖于肿瘤内部以及瘤体周围的大量新生血管的生成。大量的血供给肿瘤的生长以及转移带来了营养支持。诸多文献已报道, 肺癌、胰腺癌、肝癌以及胃癌等组织中 VEGF 的表达量明显增多。反义核苷酸技术是一新型技术。以碱基配对原理为基础, 人工合成寡聚脱氧核糖核酸或突变基因等, 从而阻止相关类型基因的表达。本研究是利用 VEGF 反义核苷酸 (VEGF-ASOND) 来抑制 VEGF 的表达, 控制与其相关的肿瘤血管生长, 从而达到控制肿瘤的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901 细胞由包头医学院第

一附属医院侯培珍教授惠赠。5 周龄裸鼠购买于上海斯莱克实验动物公司, 体质量在 20~22 克之间, 共 50 只。阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 购自 invitrogen 公司。VEGF-ASOND 由上海生工生物技术有限公司合成, 其序列为 5'-GCA GTA GCT GCG CTG ATA GAC A-3', 其原理为针对 VEGF mRNA 第 3 外显子的单链区按碱基互补原则设计。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 SGC-7901 用含有 10% 小牛血清的 1640 培养液在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养, 反复传代到细胞生长至对数生长期。用 0.25% 胰蛋白酶消化, 用灭菌 PBS 将细胞密度调到 1×10^7 个/mL 用于建立动物模型。

1.2.2 胃癌裸鼠模型的建立 将备用的单细胞悬液 0.2 mL 用注射器注入裸鼠腋窝皮下。SPF 级下饲养裸鼠, 待肿瘤长到直径约 1 cm 后无菌下完整取出肿瘤, 选鱼肉样周围肿瘤组织将其切成直径约 2 mm 大小的瘤块; 将瘤块再置于另只裸鼠腋窝皮下; 如此方法反复传代肿瘤 3 次; 最后切成直径约 2 mm 大小的瘤块置于生理盐水中备用。裸鼠 30 只, 用 20 mg/mL 浓度的水合氯醛注射液 0.2~0.3 mL 腹

收稿日期: 2014-04-23; 修订日期: 2014-09-08。

作者简介: 王殿栋, 包头医学院第二附属医院主治医师, 主要从事消化道肿瘤外科方面的研究。

通信作者: 王殿栋, Email: wangdiandong@126.com

膜腔麻醉; 所有操作遵循无菌原则; 手术野常规酒精消毒, 取左侧肋弓下斜切口, 逐层入腹腔, 将胃轻轻拉出, 用手术针尖轻轻划开胃浆膜层, 长度约 2 mm; 再用 8-0 丝线将上述备好的小瘤块穿透胃全层缝挂于浆膜破损的胃壁区; 将胃还纳入原位, 缝合腹膜及皮肤; 术毕。继续 SPF 级下饲养裸鼠。

1.2.3 阳离子脂质体介导 VEGF-ASOND 复合物制备 根据 Lipofectamine™2000 使用说明, 按 1 μg:2 μL 的比例将 VEGF-ASOND 与脂质体配制成阳离子脂质体基因复合物。将 Lipofectamine™2000 加入 50 μL 的 OPTI-MEMI 无血清培养基中混匀, 室温下静置 5 min, 配制成脂质体体积分数为 2 μL/mL 的 A 液; 取 VEGF-ASOND 加入 50 μL 的 OPTI-MEMI 无血清培养基

中混匀, 配制成 20 μmol/L 的 B 液, 将 A 液和 B 液混匀室温下静止 25 min, 制成阳离子脂质体基因复合物, 其脂质体终浓度为 1 μL/mL, VEGF-ASOND 的终浓度为 10 μmol/L。

1.2.4 胃癌裸鼠的分组与处理 将 30 只健康裸鼠随机分成治疗组和对照组。于接种胃癌瘤块后 3 d 开始给予干预。治疗组腹腔内注射脂质体介导 VEGF-ASOND 复合物, 浓度为 10 μmol/L, 每次注射 100 μL, 每周注射 1 次, 共连续注射 4 周; 同样方法给予对照组同时注入同等的生理盐水。然后继续 SPF 级下饲养裸鼠。按预实验经验, 10 周时处死两组裸鼠。观察肿瘤本身情况、腹腔内转移情况以及腹水情况等 (图 1), 并收集相应标本。



图 1 两组裸鼠瘤块移植后情况 A: 治疗组成瘤裸鼠照片 (原发灶); B: 对照组成瘤裸鼠 (原发灶及转移灶、腹水)

1.3 实验观察指标

1.3.1 肿瘤体积以及抑瘤率 处死裸鼠后, 解剖出胃癌原发灶标本, 计算其体积, 依相关文献计算公式为: 肿瘤体积 = $1/2 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$ [1]; 计算抑瘤率公式为: 抑瘤率 = $(\text{对照组瘤重} - \text{治疗组瘤重}) / \text{对照组瘤重} \times 100\%$ [2]。

1.3.2 周围组织毛细血管密度 取原发灶周围组

织, 进行常规病理切片, HE 染色, 依据相关文献指导, 先在低倍镜下找到血管密集区, 再在 $200 \times$ 下随机取 3 个不同的视野进行计数, 然后求其平均数为最终结果 [3]。

1.3.3 腹水形成或腹腔内转移结节 处死裸鼠后, 在取原发肿瘤之前, 要观察并收集有无腹水或转移结节。所有结节行病理检查证实是否为转移灶 (图 2)。

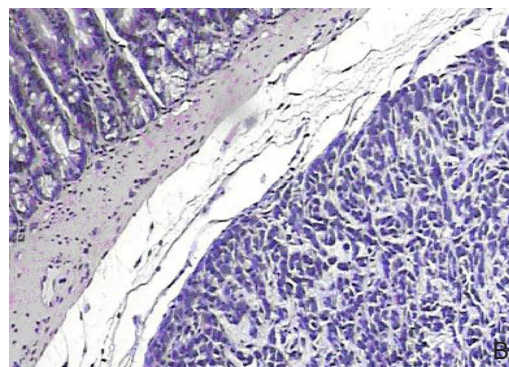
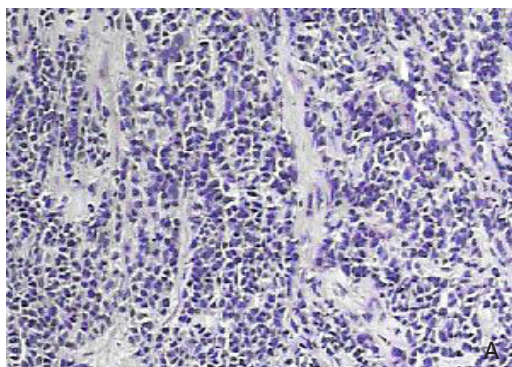


图 2 移植瘤病理切片 (HE $\times 200$ 倍) A: 原发灶; B: 转移灶

2 结果

2.1 裸鼠人胃癌模型建立情况

共建立了 30 只裸鼠胃癌模型, 术后第 1 天死亡 2 只, 均为对照组裸鼠, 其余均顺利成瘤。在 4 周左右所有裸鼠在上腹部均可触及到模型质硬肿块。28 只裸鼠中有 9 只在 8~10 周有腹水及腹腔内转移结节形成, 9 只中 7 只为对照组, 2 只为治疗组。

2.2 肿瘤体积、质量及微血管密度

治疗组的体积、肿瘤质量均明显小于对照组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 抑瘤率为 43.0%; 治疗组微血管密度明显小于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 两组移植瘤体积、质量及微血管密度比较

组别	n	瘤体积 (mm ³)	瘤质量 (g)	微血管密度
治疗组	15	289.73 ± 13.48 ¹⁾	1.57 ± 0.62 ¹⁾	25.08 ± 4.96 ¹⁾
对照组	13	320.63 ± 22.59	2.75 ± 0.76	32.53 ± 2.39

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 腹腔内转移情况

治疗组 15 只裸鼠有 9 只发生腹腔内转移, 发生率为 60.0%; 对照组内 13 只有 11 只发生转移, 发生率为 85.0%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤的发生发展和多基因表达或缺失等密切相关。所以通过各种手段去抑制或促进某些相关基因的表达就可达到抑制肿瘤的生长。反义核苷酸技术以碱基配对原理为基础, 人工合成寡聚脱氧核糖核酸或突变基因等, 从而阻止相关类型基因的表达, 达到治疗肿瘤的目的^[4]。本研究利用与肿瘤血管生成相关的 VEGF-ASOND 去抑制肿瘤的发生发展。从肿瘤的体积、质量以及转移等多方面去观察, 都起到了抑制肿瘤的作用。当然, 在临床上可能治疗效果远不如动物实验模型, 其主要原因是肿瘤是一多方面个因素共同作用的结果。

肿瘤的生成依赖于血管的生长, 给予肿瘤丰富的血供。而 VEGF 是促进血管生成的主要因子^[5]。若将 VEGF 的基因表达受到抑制, 其血管生成必将抑制。缺乏 VEGF 的持续作用致使肿瘤血管稀疏和管径缩小使血流在整个血管网内灌流减少甚

至停滞。所以针对 VEGF 的抗血管生成治疗抑制了新生血管生成, 减少了肿瘤的血管密度和缩小了血管管径, 直接导致了血流的灌注减少和断流, 就能抑制肿瘤细胞的生长以及在血管中的运动, 从而也达到了抑制肿瘤浸润的治疗目的。

利用反义核酸的分子生物学技术手段来抑制肿瘤扩散转移的恶性行为^[6], 这种针对性治疗方案可大大减少治疗的副反应, 避免了非特异性杀伤治疗对机体的损害, 具有很大的优势^[7]。但是, 反义核酸技术所涉及的一些问题目前仍待解决, 如修饰、特异性导向、安全性以及药代动力学等。相信随着研究的不断深入反义核苷酸应用于肿瘤临床治疗将为期不远。

参考文献

- [1] 李维方, 张光霁, 朱诚, 等. VEGF 反义寡核苷酸抑制 C6 胶质瘤细胞 VEGF 表达的作用和效果 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(2):156-158.
- [2] 朱金海, 黄建富, 陈燕凌, 等. PCNA、VEGF 反义寡核苷酸联合治疗裸鼠肝癌的研究 [J]. 中华外科杂志, 2001, 39(11):875-877.
- [3] 江鹏飞, 丁世华, 桂水清, 等. 大肠锯齿状腺瘤和腺癌组织 HIF-1 α 表达及其与 VEGF 和血管密度相关性的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(5):348-350.
- [4] Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, et al. Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(3):325-332.
- [5] Gupta VK, Jaskowiak NT, Beckett MA, et al. Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance [J]. Cancer J, 2002, 8(1):47-54.
- [6] 方松清, 曾谷清, 刘彦. VEGF 反义寡核苷酸抑制裸鼠骨肉瘤生长的实验研究 [J]. 中南医学科学杂志, 2006, (1):21-23.
- [7] Wong SC, Yu H, Mochhala SM, et al. Antisense telomerase induced cell growth inhibition, cell cycle arrest and telomerase activity down-regulation in gastric and colon cancer cells [J]. Anticancer Res, 2003, 23(1A):465-469.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王殿栋, 段建中, 辛佳音. VEGF 反义核苷酸抑制胃癌生长及血管生成的在体实验研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1420-1422. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.022
Cite this article as: WANG DD, DUAN JZ, XIN JY. VEGF antisense oligodeoxynucleotide inhibits tumor growth and vascular formation: an in vivo experimental study [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1420-1422. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.022