

文章编号:1005-6947(2008)10-0983-05

· 基础研究 ·

VEGF-ASODN 转染对胃癌细胞 VEGF 和 survivin 表达的影响

郑斌¹, 杨策尧², 段体德²

(1. 昆明医学院附属延安医院 乳腺科, 云南 昆明 650051; 2. 昆明医学院附属第一医院 肝胆外科, 云南 昆明 650032)

摘要:目的 观察血管内皮细胞生长因子反义寡核苷酸(VEGF-ASODN)转染胃癌细胞 SGC-7901 对血管内皮生长因子(VEGF)和生存素(survivin)表达的影响。方法 人工合成硫代磷酸化 VEGF-ASODN。实验分为 5 组:对照组, 错义组, 实验 1 组(转染浓度为 100 ng / mL), 实验 2 组(转染浓度为 400 ng / mL)及实验 3 组(转染浓度为 700 ng / mL)。转染后实时荧光定量 RT-PCR 检测细胞 RNA 起始拷贝数; ELESA 法检测细胞及培养上清液 VEGF 蛋白含量; Western-blot 法检测细胞生存素蛋白表达量; 流式细胞仪检测细胞凋亡; 细胞生长曲线检测转染对细胞生长的影响。结果 3 个实验组 VEGF mRNA 水平和 VEGF 蛋白表达量及培养上清液 VEGF 蛋白含量均明显降低, survivin 蛋白的表达水平随转染浓度的升高而降低, 转染 VEGF-ASODN 能使胃癌细胞凋亡增加、细胞生长减缓。结论 VEGF-ASODN 转染胃癌细胞 SGC-7901 能显著抑制细胞 VEGF 的表达, 促进细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(10): 983-987]

关键词: 胃肿瘤/病理学; 血管内皮细胞生长因子, 反义寡核苷酸; 血管内皮生长因子; 生存素; 转染
中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** A

Influence of VEGF antisense oligonucleotide on expression of VEGF and survivin in gastric cancer cells

ZHENG Bin¹, YANG Ceyao², DUAN Tide²

(1. Department of Breast, the Affiliated Yanan Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650051, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To observe the effects of VEGF antisense oligonucleotide transfected to SGC-7091 cell line on expression of VEGF and survivin of the cell. **Methods** The VEGF-ASODN was synthesised artificially. There were five groups in this experiment: control group, missense group and three various concentration groups. After transfection, RNA copies were detected by real-time PT-PCR, VEGF protein in cell and culture supernate was detected by ELESA, survivin protein was measured by Western-blot, and apoptosis was detected by FCM. Growth of cells was evaluated by growth curve. **Results** VEGF-ASODN tranfection reduced the VEGF mRNA and VEGF protein expression in gastric cancer cells and supernate remarkably. It also reduced survivin protein expression and increased apoptosis in gastric cancer cells. **Conclusions** Transfection with VEGF-ASODN to gastric cancer cells SGC-7901 can reduce the expression of VEGF, and can increase apoptosis and suppress the proliferation of gastric cancer cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(10): 983-987]

收稿日期: 2007-05-23; 修订日期: 2008-03-15。

作者简介: 郑斌, 男, 重庆人, 云南省昆明医学院附属延安医院副主任医师, 主要从事胃癌的临床基础方面的研究。

通讯作者: 段体德 E-mail: tdduan@163.com

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; VEGF-ASODN, VEGF; survivin; Transfection

CLC number: R 735.2

Document code: A

胃癌转移可通过血液、淋巴管及癌细胞脱落种植而发生。肿瘤细胞脱离原发灶后,可通过血液循环而发生远处转移。当转移灶大于1~2 mm时,必须有新生血管的长入,才能支持转移灶生长^[1]。在新生血管的形成过程中 VEGF 起着重要作用,它可促进血管内皮细胞生长、诱导血管再生。本研究拟采用血管内皮生长因子反义寡核苷酸(VEGF-ASODN)转染胃癌细胞 SGC-7901,检测其对 VEGF 和生存素(survivin)表达的影响,探索 VEGF-ASODN 在抑制血管生长、胃癌转移和复发等方面的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

VEGF-ASODN 序列根据人 VEGF mRNA 核苷酸序列设计,反义序列为 5'-TGGCTGAAGATG-TACTCGAT-3',错义序列为 5'-GCCACTC-CTCGACTCTCGTC-3';硫代磷酸化修饰,由大连宝生物公司合成。阳离子脂质体为 Invitrogen 产品。VEGF PCR 扩增引物序列:上游引物为 5'-aggcgagcagcttgagta-3',下游引物为 5'-aggaagaggagactctgcgc-3',探针 5'-cgcaacaagctgtcagcttagca-3'为双标记荧光探针,由大连宝生物合成,survivin 一抗和 β -actin 一抗、二抗由 Invitrogen 提供,逆转录酶、Taq DNA 聚合酶等由晶美公司提供。流式细胞仪及试剂为美国 BD 公司产品。

1.2 实验分组

1.2.1 实验组 先用脂质体将带荧光的 VEGF-ASODN 转染 SGC-7901 细胞(浓度为 400 ng/mL)进行预实验,18~48 h 在荧光显微镜下观察,以确定转染阳性细胞及条件。然后用脂质体将 VEGF-ASODN 转染 SGC-7901 细胞,转染浓度分别为 100 ng/mL(实验 1 组),400 ng/mL(实验 2 组),700 ng/mL(实验 3 组)。

1.2.2 转染错义寡核苷酸组 转染 ASODN 浓度为 400 ng/mL。

1.2.3 对照组 培养细胞不转染任何 ASODN。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测 VEGF mRNA 收集转染、孵育 24 h 后的 3 个实验组、错义组及对照组细胞,生理盐水洗涤。在收集的细胞中加入 1 mL 的 TRIzol 液提取总 RNA 并逆

转录为 cDNA。在 PCR 管中加入 Mg²⁺ 7 μ L,10 \times 缓冲液 5 μ L, dNTP4 μ L, Probe 0.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq 酶 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, H₂O 29.1 μ L, 94 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环。用外标定量法制作 VEGF 标准曲线并计算各实验组 VEGF mRNA。

1.3.2 免疫酶联吸附试验(ELESA)检测蛋白含量(试剂盒 VEGF ELISA KIT 购自晶美生物工程有限公司,按说明书进行检测)

1.3.3 免疫印迹(Western-blot)检测 Survivin 蛋白(主要试剂由 Invitrogen 提供)取转染后细胞加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂提取总蛋白。将蛋白在 12% PAGE 胶中进行电泳、转膜、丽春红染色、封闭,加入 survivin 一抗、 β -actin 一抗;洗膜、加二抗、洗膜、加入 ECL 显色(化学发光法),胶片暗室内暴光,显影,定影。通过计算机将胶片暴光结果折算为蛋白含量。

1.3.4 流式细胞仪(美国 BD 公司产品,型号 FACSCalibur)检测细胞周期变化及细胞凋亡 分别检测正常组、错义组及 3 个实验组的细胞周期变化及细胞凋亡。

1.3.5 细胞生长曲线 检测转染 VEGF-ASODN (100 ng/mL)对细胞生长的影响。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS11.5 软件包进行统计学处理分析。均数两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 胃癌细胞 SGC-7901 VEGF 蛋白表达

胃癌细胞 SGC-7901 VEGF 蛋白呈低表达(图 1)。

2.2 细胞转染带荧光的 VEGF-ASODN

在荧光显微镜下观察,转染(转染浓度为 400 ng/mL)24 h 后,培养细胞大部呈现绿色荧光,位于胞浆(图 2-3)。

2.3 细胞转染后 VEGF mRNA 拷贝数的改变

对照组、错义组与 3 个实验组间的 VEGF mRNA 表达差异均有显著性($P < 0.05$);对照组与错义组差异无显著性($P > 0.05$);3 个实验组间两两比较差异亦有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

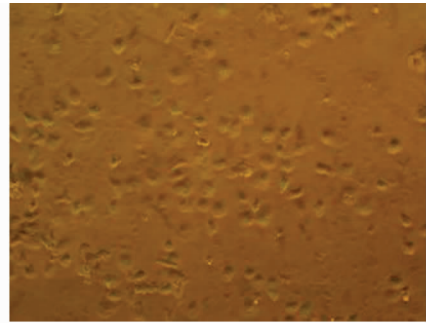
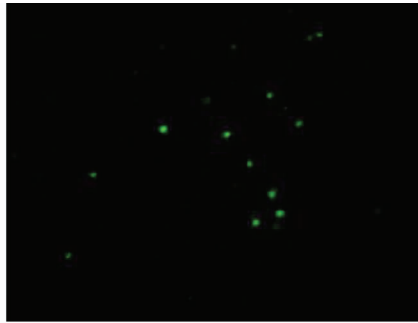
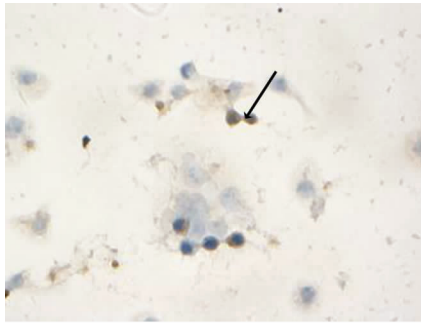


图1 转染组细胞免疫组化染色(光镜 ×400),箭头所示胞浆显示棕色的为阳性细胞
图2 转染细胞暗视野(荧光显微镜 ×100)
图3 转染细胞明视野(荧光显微镜 ×200)

表1 逆转录-聚合酶链反应测VEGF mRNA

组别	实验组			对照组	错义组
	100 ng/mL(1组)	400 ng/mL(2组)	700 ng/mL(3组)		
拷贝数	39323	25510	1075	82166	81993

2.4 细胞转染后 survivin 蛋白的改变

对照组与3个实验组 survivin 蛋白比较,差异均有显著性 ($P < 0.05$),3个实验组间两两比较差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表2) (图4)。

左侧显示为 Marker,呈蓝色,上方黑色条带为

β -actin 暴光后结果,其大小为 42 kD,为内参照,用于调整不同样本的起始蛋白含量,下方黑色条带为 survivin 暴光后结果,其大小为 16.5 ~ 18.6 kD。

表2 Western-blot 检测 survivin 蛋白

组别	实验组			对照组
	100 ng/mL(1组)	400 ng/mL(2组)	700 ng/mL(3组)	
蛋白含量	632027.67	475908.00	322427.67	797417.00

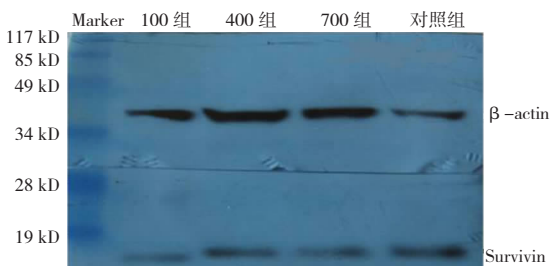


图4 Western-blot 实验结果

2.5 细胞转染后细胞 VEGF 蛋白含量及培养上清液 VEGF 蛋白含量

2.5.1 细胞 VEGF 蛋白含量 对照组,100 ng/mL 组与 700 ng/mL 组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),100 ng/mL 组与 400 ng/mL 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),其他组间比较差异无显著性 (表3)。

2.5.2 培养上清液中 VEGF 蛋白含量 对照组,100 ng/mL 组,400 ng/mL 组 3 组之间差异均无显著性 ($P > 0.05$),但 3 组与 700 ng/mL 组间比较差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表4)。

表3 细胞 VEGF 蛋白含量测定 (pg/mL)

组别	100 ng/mL	400 ng/mL	700 ng/mL	对照组
蛋白含量	97.4840 ^{1),2)}	90.5850 ¹⁾	84.5845 ¹⁾	125.8095

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与 700 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

表4 培养液上清 VEGF 蛋白含量测定 (pg/mL)

组别	100ng/mL	400ng/mL	700ng/mL	对照组
蛋白含量	130.1355 ¹⁾	121.4715 ¹⁾	95.1025	134.6725 ¹⁾

注:1)与 700ng/mL 组比较, $P < 0.05$

2.6 细胞转染后细胞凋亡及细胞周期的变化

3个实验组与对照组、错义组的凋亡率比较差异均有显著性($P < 0.05$),对照组与错义组比较差异无显著性;3个实验组之间的差异亦无显著性($P > 0.05$)(表5)(图5)。

表5 各组细胞凋亡及细胞周期的变化(%)

组别	100 ng/mL	400 ng/mL	700 ng/mL	错义组	对照组
凋亡率	35.11	31.83	35.08	5.73	0
G ₀ /G ₁ 期	62.59	53.74	60.72	93.97	42.78
G ₂ 期	3.94	7.02	3.10	5.86	2.77
S期	33.48	39.24	36.18	0.17	54.45

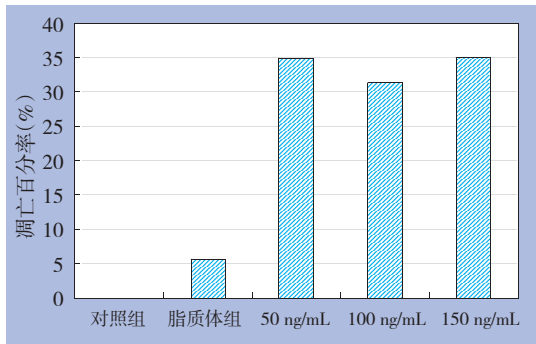


图5 示不同转染浓度、脂质体及对对照组凋亡率直方图

2.7 生长曲线

转染组(100 ng/mL)生长曲线较对照组平缓,细胞的生长受到明显的抑制(图6)。

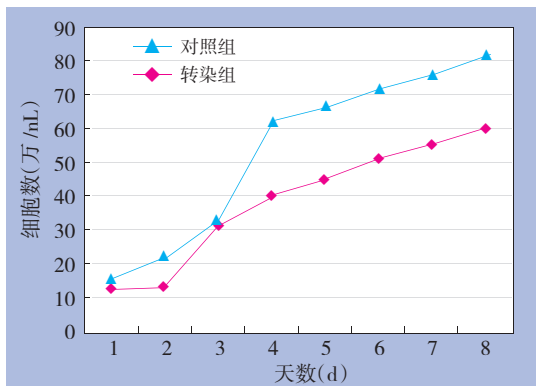


图6 细胞生长曲线图

3 讨论

应用 ASODN 进行肿瘤基因治疗是目前生物治疗的主要方法之一。其原理是 ASODN 能与细胞内某一特定的基因核苷酸序列互补,与细胞内

DNA 模板、mRNA 模板以碱基配对方式结合;结合后可激活细胞内核糖核酸酶,将其消化破坏,还可干扰 mRNA 代谢过程中加帽、剪接、翻译起始和延长等步骤,干扰目的基因的复制、转录和翻译等过程,达到抑制其生物学功能的目的。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,主要的功能是选择性增强血管内皮细胞有丝分裂、刺激内皮细胞增殖并促进血管形成^[1],因此在肿瘤新生血管的形成过程中,VEGF 是最重要的因素,它与其它因素配合,共同完成血管的出芽、修剪、成熟等过程。VEGF 及其受体在很多不同肿瘤的血管生成中发挥作用^[2]。内皮细胞有丝分裂原 VEGF 在肿瘤细胞中高表达、其受体在肿瘤血管发生中高表达,因此 VEGF 水平升高与肿瘤转移及预后密切相关^[3-4]。

本实验结果显示 VEGF-ASODN 能显著降低胃癌细胞的 VEGF mRNA 表达量,随着转染浓度的增加,mRNA 拷贝数量逐渐降低,各组间比较差异显著($P < 0.05$)。转染后对胃癌细胞内 VEGF 蛋白浓度亦有影响,对照组及 100 ng/mL 组与 700 ng/mL 组比较差异显著($P < 0.05$),对照组与 100 ng/mL 组比较差异不显著,说明较低转染浓度对 VEGF 表达量影响较小,反之则影响较显著。由于 VEGF 蛋白是分泌型蛋白,细胞合成蛋白后分泌至细胞外发挥作用。本实验结果显示 3 个实验组培养上清液中 VEGF 蛋白的含量降低,且为浓度依赖性。VEGF 蛋白主要由肿瘤细胞和新生血管内皮细胞分泌,促进血管的新生。因此阻断新生血管形成可阻碍肿瘤的生长。

survivin 基因几乎在所有恶性肿瘤中有表达,在肿瘤发生过程中处于表达失控状态。survivin 的主要作用是抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖。因此它已成为倍受关注的抗肿瘤治疗的新靶点^[5]。体外实验表明,survivin 通过直接或间接方式干涉 caspase 的功能而抑制细胞凋亡,主要是抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性,阻断细胞的凋亡过程^[6]。

survivin 参与血管形成过程,它可能作为一种抗凋亡保护基因参与血管形成。有学者推测它可能是 VEGF 与 VEGFR 信号传导通路的下游信号分子 PKc 或 AKt 的作用底物。抑制 survivin 的表达可能会减少肿瘤组织新生血管形成、防止肿瘤细胞浸润及转移。段体德等^[7]研究的 survivin-ASODN 对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用也证实了这一论点。

有学者发现在体内新生血管形成过程中,内皮细胞的 survivin 水平受 VEGF 的诱导而显著提高。VEGF 促使 survivin 蛋白浓度升高,从而保护血管内皮细胞免于凋亡是其作用机制。因而 VEGF 具有抗凋亡和促进新生血管生长的作用^[8]。本实验发现在胃癌细胞 SGC-7901 中, survivin 蛋白浓度随转染 VEGF-ASODN 浓度的增加而逐渐降低,说明 VEGF 蛋白具有促进 survivin 蛋白的合成、保护肿瘤细胞免于凋亡、促进肿瘤细胞生长的双重作用。

在 HeLa 细胞的功能研究中发现,抑制 survivin 蛋白的水平导致纺锤体出现缺陷,诱发细胞凋亡^[9]。胃癌细胞能抵抗凋亡与其较高水平表达 survivin 相关,是促使胃癌细胞增生的原因之一。本实验 G₀ / G₁ 期和 G₂ 期的细胞转染组明显高于对照组。提示由于转染 VEGF-ASODN 而抑制 SGC-7901 细胞 survivin 的表达,并使胃癌细胞聚集于 G₀/G₁ 和 G₂ 期。survivin 可能单独或与其他未发现的调节机制共同作用,以一种细胞周期依赖的方式,影响细胞死亡机制^[10]。

综上所述,本实验应用 VEGF-ASODN 转染胃癌细胞后能发挥两方面的作用,一是降低 VEGF 蛋白浓度,二是降低 survivin 蛋白浓度;从两方面阻断新生血管形成、诱使肿瘤细胞和血管内皮细胞凋亡,从而达到预防和治疗肿瘤转移复发的目的。本实验为临床提供了一种防治肿瘤复发转

移的新思路。

参考文献:

- [1] 郑江华. 血液中血管内皮生长因子和肿瘤的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(1): 50-51.
- [2] Hashimoto M, Ohsawa M, Ohnishi A, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma[J]. Lab Invest, 1995, (73): 859-863.
- [3] Plate KH. Control of tumor growth via inhibition of tumor angiogenesis[J]. Adv Exp Med Biol, 1998, 451: 57-61.
- [4] Chan AS, Leung SY, Wong MP, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma and ependymoma[J]. Am J Surg Pathol, 1998, (22): 816-826.
- [5] Buolamwimi JK. Novel anticancer drug discovery[J]. Curr Opin Chem Biol, 1999, 3(4): 500-509.
- [6] 王新华, 文红波. Survivin 研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2006, (15)11: 861-862.
- [7] 段体德, 刘德权, 扬策尧. Survivin 反义寡核苷酸对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑制作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(9): 691-695.
- [8] Mehdi Mesri, Maneul MR, Elizabeth J, *et al.* Suppression of vascular endothelial growth-mediated endothelial cell protection by surviving targeting[J]. Am J Pathol, 2001, (158): 1757-1765.
- [9] Li F, Ambrosini G, Chu EY, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving[J]. Nature (Lond), 1998, (396): 580-584.
- [10] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, (407): 770-776.

欢迎参加中美国际肝胆胰外科学术论坛

湖南省医学会肝胆外科学专业委员会与中国普通外科杂志社联合举办、湖南省人民医院承办“中美国际肝胆胰外科学术论坛”将于2008年11月14日—18日(14日全天报到)召开,地点:湖南省长沙市新华大酒店(总台0731-4308615)。这次会议诚邀美国及中国港澳台知名专家就“肝胆胰外科疾病”这一主题进行深入的学术论坛与交流。学术内容:(1)肝胆胰肿瘤诊治新进展;(2)难治性胆石病的诊治策略;(3)重症胰腺炎的诊治新进展;(4)门静脉高压症的诊断与治疗;(5)医源性胆道损伤的预防与诊治策略;(6)器官移植与细胞移植新进展;(7)微创外科新进展;(8)介入治疗在肝胆外科中的应用;(9)围手术期营养支持治疗;参会代表授予国家级I类继续医学教育学分10分。联系人:湖南省人民医院周海峰 邮编:410005 电话:0731-2278292, 2278158 E-mail:zhf85268@163.com