

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI: 10.11699/cyxb20130513

促血管生成素 2 在胃癌中的表达及其反义基因转染
对人胃癌细胞 SGC-7901 的影响

曾 松,王继见,朱 鹏

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科,重庆 400010)

【摘要】目的:探讨促血管生成素 2(angiotensinogen,Ang2)在胃癌组织中的表达及其与肿瘤病理分期的联系;观察反义 Ang2 基因转染对人胃癌细胞 SGC-7901 的影响。**方法:**用 Western blot 法检测 Ang2 蛋白在 10 例胃癌组织及 10 例正常胃黏膜组织中的表达,用免疫组化法检测 53 例不同病理分期的胃癌组织中 Ang2 蛋白的表达;应用脂质体转染法将既往实验合成^[1]的 pEGFP-N1-anti Ang2 转染体外培养的人胃癌细胞 SGC-7901,以空载体(pEGFP-N1)转染组和未转染组作对照,RT-PCR 及免疫组化检测转染后 Ang2 基因及蛋白的表达,MTT 法和流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测反义 Ang2 基因转染对细胞生长和细胞凋亡的影响;分别用上述 3 组细胞注射于裸鼠皮下,对比观察肿瘤生成的速度和肿瘤组织中的血管生成数量。**结果:**Ang2 蛋白在正常胃黏膜组织中不表达,在不同病理分期的胃癌组织中均呈阳性表达($F=166.76, P<0.000 1$);RT-PCR 及免疫组化显示反义 Ang2 基因转染组无 Ang2 mRNA 及 Ang2 蛋白的表达,MTT 法检测显示反义 Ang2 基因转染组细胞体外增殖能力明显低于其他两组($F=10.39, P=0.002 4$),FCM 检测显示其活细胞比率明显低于其他两组($\chi^2=3 188.980 5, P<0.000 1$);转染了反义 Ang2 基因的胃癌细胞成瘤速度较其它两组明显减慢[第 6 天($F=10.18, P=0.000 5$)、第 18 天($F=7.80, P=0.002 1$)及第 30 天($F=79.58, P<0.000 1$)],肿瘤组织中血管生成的数量较其它两组明显减少[第 1 周($F=15.18, P<0.000 1$)、第 2 周($F=3.50, P=0.044 4$)、第 3 周($F=39.02, P<0.000 1$)]。**结论:**胃癌组织中 Ang2 的表达与胃癌血管生成及胃癌侵袭能力密切相关;反义 Ang2 基因转染可封闭人胃癌细胞 SGC-7901 中 Ang2 mRNA 及 Ang2 蛋白的表达,抑制其体外生长,促进其凋亡;并对其体外成瘤性及其新生血管的生成有明显的抑制作用。

【关键词】新生血管形成;促血管生成素 2;反义真核表达载体;人胃癌细胞株;基因转染

【中国图书分类法分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-24

作者介绍:曾 松,Email:462168892@qq.com,

研究方向:胃肠道肿瘤。

通信作者:朱 鹏,Email:526679209@qq.com。

基金项目:重庆医科大学科研创新基金资助项目(编号: CX200503)。

参 考 文 献

- [1] Paredes L A, Blanco G C, Elizondo E M, et al. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer[J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43(9): 479-484.
- [2] 周彩存, 徐崇锐. 原位 RRM1 和 ERCC1 蛋白表达水平预测吉西他滨为基础化疗方案对非小细胞肺癌的疗效[J]. 循证医学, 2010, 10(1): 26-27.
- [3] 陈 芹, 周彩存, 张 颖. ERCC1、RRM1 和 BRCA1 在非小细胞肺癌中的表达及预后意义[J]. 肿瘤, 2007, 27(9): 719-722.
- [4] Azuma K, Sasada T, Kawahara A, et al. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel[J]. Lung Cancer, 2009, 64(3): 326-333.
- [5] Wang L, Wei J, Qian X, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 97.
- [6] Rosell R, Danenberg K D, Alberola V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 1318-1325.
- [7] Zheng Z, Chen T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer[J]. N Engl J Med, 2007, 356(8): 800-808.
- [8] 冷雪峰, 洗 磊, 陈铭伍, 等. 非小细胞肺癌组织中 ERCC1 及 TUBB3 基因 mRNA 的表达及其临床意义[J]. 肿瘤预防与治疗, 2012, 25(1): 1-5.
- [9] Leng X F, Xian L, Chen M W, et al. The Expression and Significance of ERCC1 and TUBB3 Gene mRNA in non-small cell lung cancer[J]. Journal of Cancer Control and Treatment, 2012, 25(1): 1-5.

(责任编辑: 关蕴良)

Expressions of angiopoietin2 in gastric carcinoma and effects of antisense angiopoietin2 cDNA on human gastric carcinoma cell line SGC-7901

ZENG Song, WANG Jijian, ZHU Peng

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To study the expressions of angiopoietin2 (Ang2) in gastric carcinoma tissues and its relationship with pathological stage and to investigate the biological effects of antisense Ang2 cDNA (pEGFP-N1-anti-Ang2 cDNA) on human gastric carcinoma cell line SGC-7901. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect expressions of Ang2 protein in 53 samples of gastric carcinoma tissues and Western blot was used to detect expressions of Ang2 protein in 10 samples of gastric carcinoma and 10 normal gastric tissues. Two different plasmids including pEGFP-N1 and pEGFP-N1-antisense Ang2 cDNA were transferred separately into an in vitro cultured human gastric carcinoma cell line SGC-7901 by using Lipofectamine2000 transfection technique. mRNA and protein expressions of Ang2 after transfection in 53 samples of gastric carcinoma tissue were determined by RT-PCR and immunohistochemical method. Effects of antisense Ang2 cDNA on cell viability and apoptosis were determined by MTT assay and flow cytometry (FCM). The three kinds of gastric carcinoma cells were subcutaneously injected into 30 nude mice and were divided into three groups. Velocity of tumor formation and amount of angiogenesis in tumor tissues were detected. **Results:** Ang2 protein was positively expressed in gastric carcinoma tissues at different pathological stages ($F=166.76, P<0.0001$), while was unexpressed in normal gastric tissues. Based on RT-PCR and immunohistochemical method, SGC-7901 cell transfected antisense Ang2 gene did not express Ang2 mRNA and its protein. MTT assay demonstrated that the group transfected with antisense Ang2 gene had much lower proliferative capacity than other groups ($F=10.39, P=0.0024$). FCM demonstrated that the group transfected with antisense Ang2 gene also had an decreased cell viability than the other groups ($\chi^2=3188.9805, P<0.0001$). Tumor formation was slower in cell transfected with antisense Ang2 gene than in other groups (the 6th d: $F=10.18, P=0.0005$; the 18th d: $F=7.80, P=0.0021$; the 30th d: $F=79.58, P<0.0001$). Average number of newly formed vessels was fewer in mice transfected with antisense Ang2 gene than in the other groups (the 1th week: $F=15.18, P<0.0001$; the 2nd week, $F=3.50, P=0.0444$; the 3rd week, $F=39.02, P<0.0001$). **Conclusions:** Ang2 plays an important role in the angiogenesis and tumor formation. mRNA and protein expression of Ang2 in SGC-7901 cells can be inhibited by antisense Ang2 gene. Antisense Ang2 gene can suppress the in vitro growth of human gastric carcinoma cells as well as the growth and angiogenesis in the human SGC-7901 gastric carcinoma.

[Key words] angiogenesis; angiopoietin2; antisense oligonucleotides; cell line of human gastric carcinoma; gene transfection

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤。胃癌的转移和术后复发是影响患者预后的主要因素。血管生成及增生是肿瘤生长、转移的基本要素,而促血管生成素 2 (angiopoietin2, Ang2) 是最为重要的血管生长调节因子。故本研究将 Ang2 基因作为靶基因,采用胃癌切除标本研究其在胃癌组织中的表达,并将既往实验构建^[1]的反义 Ang2 基因真核表达载体,稳定转染人胃癌细胞株 SGC-7901,观察其是否对 SGC-7901 有抑制作用。将转染了反义 Ang2 基因的 SGC-7901 在裸鼠皮下成瘤后,观察其对胃癌成瘤性和对血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 临床资料 53 例胃癌标本选自 2011 年 2 月-2011 年

8 月,重庆医科大学附属第二医院胃肠外科手术切除并经病理检查确诊的组织。其中男性 37 例,女性 16 例,年龄 35~76 岁,平均 62.4 岁。病理分期: I 期 12 例, II 期 16 例, III 期 20 例, IV 期 5 例。另取 10 例正常胃黏膜作对照。

1.1.2 主要试剂 人胃癌细胞系 SGC-7901 (上海复旦大学附属肿瘤医院), 空载体质粒 pEGFP-N1 (购自 Clontech 公司), 编码人反义 Ang2 基因的高效真核表达质粒 pEGFP-N1-anti Ang2 (既往实验构建^[1])。Ang2 鼠抗人单克隆抗体, 兔抗鼠多抗链霉素抗生素蛋白-生物素-过氧化物酶复合体法 (即用型 SABCD) 免疫组织化学试剂盒 (武汉博士德试剂公司产品), 胎牛血清 (Gibco), pEGFP-N1 (Clontech), DMEM 高糖型培养基 (Gibco), G418 (Promega), DMSO (sigma), MTT (Amresco), Lipofectamine2000 及无血清培养基 OPTI-MEMZ (Gibco)。实验动物: BALB/C 裸鼠 30 只, 雌性, 4~5 周龄, 饲养在恒温的半屏蔽系统中, 饮水及饲养均经灭菌处理 (重庆医科大学动物实验中心)。

1.2 研究方法

1.2.1 Western blot 分析 随机取 10 例胃癌标本及 10 例正

常胃黏膜组织,各约 0.1 g。经蛋白质提取,电泳,转膜及免疫印迹显色。

1.2.2 免疫组化检测胃癌标本及正常胃黏膜组织中 Ang2 的表达 取材,标本经 4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋。切片厚度 4 μm 。采用 SABC 法免疫组化染色。正常胃黏膜组织作为阴性对照。每张切片分别取上、下、左、右及中心共 5 个视野,经 HPIAS1000 彩色图像分析系统测量每个视野中细胞的平均吸光度(absorbance, A),取其平均值作为该切片的代表值。

1.2.3 人胃癌 SGC-7901 细胞的基因转染及筛选 将冻存人胃癌细胞株 SGC-7901 复苏,然后进行细胞的传代培养。以梯度浓度法确定 G418 对人胃癌细胞株 SGC-7901 的筛选浓度为 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (mg/ml)。以脂质体转染法将 pEGFP-N1-anti Ang2 及 pEGFP-N1 空载体质粒对胃癌细胞 SGC-7901 进行转染。转染后将细胞进行 G418 筛选,稳定传代 2 个月,最后进行各项检测。由此,实验分为 3 组:未转染组、空载体转染组及反义 Ang2 基因转染组。

1.2.4 RT-PCR 检测反义 Ang2 基因对胃癌细胞 Ang2 mRNA 表达的影响 3 组细胞各约 2×10^6 个,用 Gibco 公司的 Trizol Reagent 提取总 RNA,然后进行逆转录 PCR 扩增测 Ang2 mRNA 表达。参照 Ang2 cDNA 序列设计引物 A,其序列如下:上游引物 5'-GTGGAAGCCCAAGTATTA-3',下游引物 5'-TCAGCCTCGGGTTCATCT-3',预期扩增长度为 1 319 bp 的 DNA 片段。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,30 个循环后,PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 免疫组化检测反义 Ang2 基因对胃癌细胞 Ang2 蛋白表达的影响 将 3 组细胞各以 2×10^5 个/ml 接种在预先放入无菌载玻片的 6 孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、10%胎牛血清培养 48 h,用冷丙酮固定细胞,然后经行免疫组化染色,观察。

1.2.6 MTT 法检测反义 Ang2 基因对胃癌细胞生长的影响 将 3 组细胞分别以每孔 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板,每组 5 个复孔,每孔体积 100 μl 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养,以含 10%胎牛血清培养 24 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h,弃培养液,每孔加入 100 μl DMSO。振荡 15 min,以酶标仪检测 550 nm 波长下其光吸收值,其增殖能力大小以平均 A 值分析。

1.2.7 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测反义 Ang2 基因对胃癌细胞凋亡的影响 0.25%胰酶 0.02% EDTA 消化收获培养的各组细胞,收集细胞,并调整细胞浓度为 10^6 个/ml。取 100 μl 细胞悬液,先加入 5 μl FITC-Annexin V、10 μl PI (50 $\mu\text{g/L}$)室温下避光反应 15 min 后,加入反应缓冲液 400 μl 终止反应,FCM 方法对活细胞、损伤细胞、晚期凋亡细胞和继发性坏死细胞、早期凋亡细胞进行定量检测,计算活细胞比率。

1.2.8 裸鼠胃癌移植瘤模型的建立 将 30 只裸鼠随机分成 3 组,每组 10 只,整个实验期间,3 组动物自由摄食、饮水。分

别取 70%~80%的对数生长期上述 3 组细胞,制成 1×10^7 个/ml 的细胞悬液 0.2 ml,用 0.5 ml 注射器接种于每只裸鼠皮下,以建立异种肿瘤移植的裸鼠胃癌模型,因此 30 只裸鼠亦被分成了 3 组。每隔 2 d 注射 1 次,连续 3 次,以后可视情况再加强注射。

1.2.9 裸鼠移植瘤动态检测 在裸鼠皮下形成移植瘤后,动态观察裸鼠皮下肿瘤形成情况。于接种后每隔 2 d 测量肿瘤结节并计算肿瘤体积,其体积的计算方法是用游标卡尺测量肿瘤最大径(L)和最小径(t),肿瘤体积为 $V = L \times t^2 \times 1/6\pi$ 。并于注射后分别 1、2、3 周取肿瘤组织,以 10%福尔马林固定,24 h 内石蜡包埋备用。

1.2.10 裸鼠移植瘤微血管密度(microvessel density, MVD)测定 将上面取得的肿瘤组织制备成石蜡切片按 SABC 法进行血管免疫组化检测。在低倍视野下选取肿瘤血管最丰富的部位,200 $\times$ 视野范围内选择 4 个视野进行血管计数,计算平均 MVD。

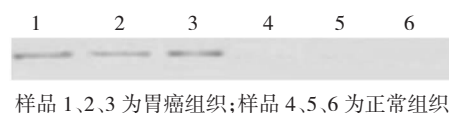
1.3 统计学方法

所有数据均采用 SAS 9.13 软件进行统计分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,多组之间两两比较采用 SNK-q 法;计数资料以率的形式表达,采用 χ^2 检验进行统计分析,多组之间两两比较采用 Bonferroni 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 结果

Western blot 显示在随机抽取的 10 例胃癌组织提取物中检测出 Ang2 蛋白的表达;而在正常胃黏膜组织中未检测出 Ang2 蛋白的表达(图 1)。



样品 1、2、3 为胃癌组织;样品 4、5、6 为正常组织

图 1 Western blot 检测胃癌及正常胃黏膜组织 Ang2 蛋白表达
Fig.1 Ang2 protein expressions in gastric carcinoma and normal gastric mucosa tissues detected by Western blot

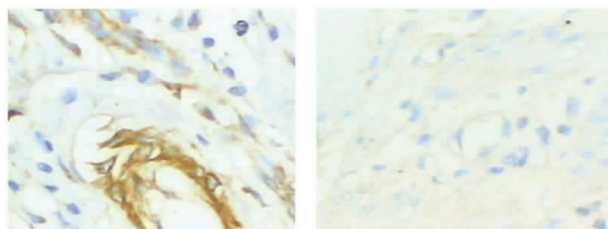
2.2 免疫组化结果

在胃癌组织中 Ang2 蛋白大量阳性表达,血管内皮细胞及肿瘤细胞中均可见棕黄色颗粒状物质,主要位于细胞质,阳性细胞在癌组织中广泛分布;而在正常胃黏膜组织中,免疫组化染色未检测出 Ang2 蛋白的表达(图 2)。Ang2 蛋白的表达强度随肿瘤病理分期的进展而增强,各病理分组间平均 A 值与正常组织平均 A 值的差异有统计学意义($F=166.76$, $P<0.0001$)(表 1)。

2.3 转染细胞株的筛选及反义 Ang2 基因转染效果

2.3.1 细胞转染及筛选结果 脂质体转染法将 pEGFP-N1-anti Ang2 及 pEGFP-N1 空载体质粒对胃癌细胞 SGC-7901 进行转染后,3 种细胞在含有 1 mg/ml 的 G418 作用下,5 d 后

大部分细胞死亡,紧接着筛选 2 d,可见未转染细胞孔中细胞几乎全部死亡,而转染细胞孔中有抗性细胞逐渐扩增;降低 G418 浓度至 400 $\mu\text{g/ml}$,持续筛选 2 周后,得到 8 个抗 G418 阳性克隆,取出单个克隆细胞,继续用 G418 400 $\mu\text{g/ml}$,压力筛选扩大培养,稳定传代 2 月后对各组进行 RT-PCR 及免疫组化检测。



A. 胃癌组织 Ang2 蛋白的表达 B. 正常胃黏膜组织 Ang2 蛋白无表达

图 2 免疫组化检测胃癌及正常胃黏膜组织 Ang2 蛋白表达

Fig.2 Ang2 protein expressions in gastric carcinoma and normal gastric mucosa tissues detected by immunohistochemical method

表 1 胃癌病理分期与 Ang2 蛋白表达强度的关系

Tab.1 Relationship between pathological stages of gastric carcinoma and expressions of Ang2 protein

胃癌病理分期	例数 (n)	平均 A 值
正常组织	10	0.075 5 $\pm$ 0.015 99
I 期	12	0.162 5 $\pm$ 0.032 51 ^a
II 期	16	0.241 1 $\pm$ 0.038 45 ^a
III 期	20	0.304 7 $\pm$ 0.045 62 ^a
IV 期	5	0.554 7 $\pm$ 0.050 29 ^a

注:a,表示与正常组织比较,各病理分组的平均 A 值差异具有统计学意义, $F=166.76, P<0.000 1$

2.3.2 RT-PCR 检测结果 通过 RT-PCR,在未转染组细胞和空载体转染组细胞中均可扩增出 1 319 bp 的 Ang2 DNA 片段。而在反义 Ang2 基因转染组细胞中不能扩增出上述 DNA 片段(图 3)。提示转染的反义核酸封闭了人胃癌细胞 SGC-7901 Ang2 mRNA 的表达。

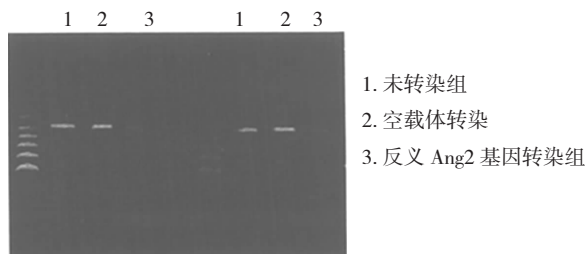


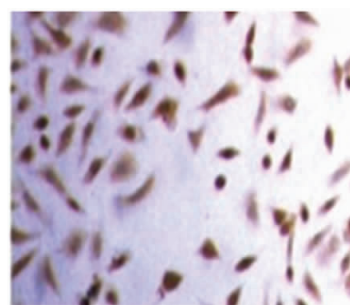
图 3 RT-PCR 检测 3 组细胞 Ang2 mRNA 的表达

Fig.3 Ang2 mRNA expressions in three groups detected by RT-PCR

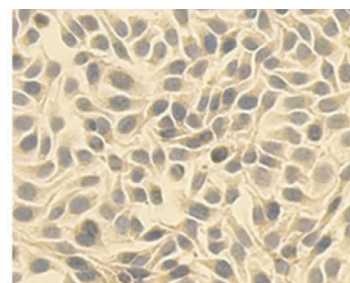
2.3.3 免疫组化结果 未转染组细胞和空载体转染组细胞胞质中,呈清晰棕黄色颗粒弥漫分布,表明有 Ang2 蛋白表达。而反义 Ang2 基因转染组细胞质、胞核呈蓝色,表明无 Ang2 蛋白表达(图 4)。提示转染的反义核酸封闭了人胃癌细胞 SGC-7901 Ang2 蛋白的表达。



A. 未转染组



B. 空载体转染组



C. 反义 Ang2 基因转染组

图 4 免疫组化检测 3 组细胞 Ang2 蛋白表达

Fig.4 Ang-2 protein expressions in three groups detected by immunohistochemical method

2.4 MTT 法检测结果

发现反义 Ang2 基因转染组细胞体外增殖能力明显低于其它两组,差异具有统计学意义($F=10.39, P=0.002 4$)。而空载体转染组细胞与未转染组细胞之间无明显差异(表 2)。提示反义 Ang2 基因转染能够抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的体外生长。

表 2 3 组肿瘤细胞体外增殖能力 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 In vitro cell proliferation abilities of three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	A 值
未转染组	5	0.517 6 $\pm$ 0.112 8 ^a
空载体转染组	5	0.426 5 $\pm$ 0.094 5 ^a
反义 Ang-2 基因转染组	5	0.256 4 $\pm$ 0.063 2

注:a,各组与反义 Ang2 基因转染组细胞体外增殖能力差异具有统计学意义, $F=10.39, P<0.002 4$

2.5 FCM 检测结果

反义 Ang2 基因转染组的早期凋亡细胞百分数与晚期凋

亡和继发坏死细胞百分数高于其它两组,活细胞百分数明显低于其它两组且其差异具有统计学意义 ($\chi^2=3\ 188.980\ 5, P<0.000\ 1$)。空载体转染组细胞与未转染组细胞之间活细胞百分数无明显差异(表 3)。提示反义 Ang2 基因转染可促进人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡。

2.6 鼠移植瘤形成情况

3 组细胞注射到皮下后 3 d 左右可有肿瘤结节形成,随时间延长瘤体逐渐增大。移植瘤瘤体大体测量结果见表 4。反义 Ang2 基因转染组明显比未转染组和空载体转染组肿瘤生成慢,接种后第 6 天 ($F=10.18, P=0.000\ 5$)、18 天 ($F=7.8, P=0.002\ 1$) 及 30 天 ($F=79.58, P<0.000\ 1$) 时,肿瘤体积差异均有统计学意义。而未转染组和空载体转染组相比较,在第 6、18、30 天时差异无统计学意义。提示反义 Ang2 基因转染

人胃癌细胞 SGC-7901 后,能抑制其移植瘤组织细胞的生长。

2.7 鼠移植瘤 MVD 测定结果

未转染组和空载体转染组移植瘤组织细胞异型性明显,表现为瘤细胞呈巢状或条索状分布,间质中纤维组织少,瘤细胞大小不等,核大深染,核仁明显,病理性核分裂像多见。反义 Ang2 基因转染组移植瘤组织细胞呈稀疏的条索状生长,纤维间质增多,瘤细胞变小(图 5)。

反义 Ang2 基因转染组肿瘤组织中 MVD 明显比未转染组和空载体转染组小,第 1 周 ($F=15.18, P<0.000\ 1$)、第 2 周 ($F=3.50, P=0.044\ 4$)、第 3 周 ($F=39.02, P<0.000\ 1$), MVD 差异均有统计学意义。未转染组和空载体转染组之间 1、2、3 周 MVD 差异无统计学意义(表 5)。提示反义 Ang2 基因转染人胃癌细胞 SGC-7901 后,能抑制移植瘤新生血管的形成。

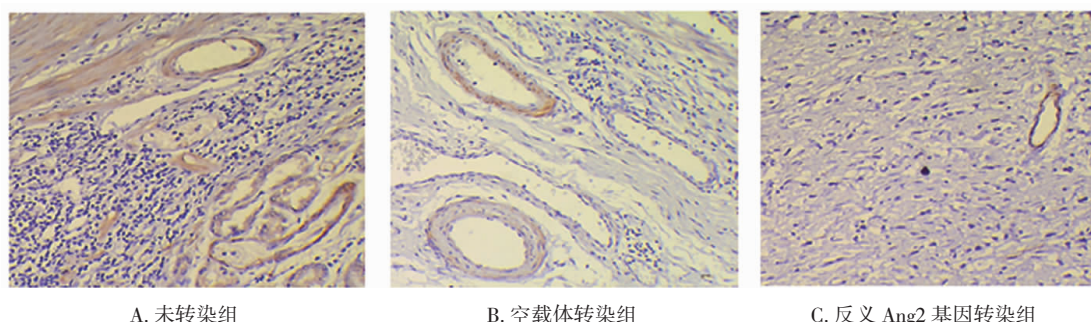


图 5 裸鼠移植瘤免疫组化

Fig.5 Immunohistochemistry of transplantation tumor of nude mice

表 3 3 组肿瘤细胞中活细胞比率的比较 (%)

Tab.3 Comparison of cell viability among three groups (%)

组别	LL	UL	UR	LR	χ^2 值	P 值
未转染组	92.73 ^a	1.24	3.85	2.18	3 188.980 5	< 0.000 1
空载体转染组	92.55 ^a	1.52	2.78	3.15		
反义 Ang-2 基因转染组	67.44	1.18	9.80	21.58		

注:LL,活细胞;UL:损伤细胞;UR:晚期凋亡细胞和继发坏死细胞;LR:早期凋亡细胞;a,各组与反义 Ang2 基因转染组活细胞比率差异有统计学意义, $\chi^2=3\ 188.980\ 5, P<0.000\ 1$

表 4 不同时间裸鼠移植瘤体积 ($\text{mm}^3, n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 Volume transplantation tumor of nude mice at different time points ($\text{mm}^3, n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	第 6 天	F 值	P 值	第 18 天	F 值	P 值	第 30 天	F 值	P 值
未转染组	65.1 ± 14.2 ^a			144.8 ± 31.2 ^b			512.7 ± 101.9 ^c		
空载体转染组	68.1 ± 12.4 ^a	10.18	0.000 5	154.3 ± 54.7 ^b	7.80	0.002 1	501.7 ± 75.6 ^c	79.58	< 0.000 1
反义 Ang2 基因转染组	45.2 ± 10.7			92.8 ± 15.4			186.4 ± 35.6		

注:第 6 天,a,各组与反义 Ang2 基因转染组裸鼠移植瘤体积差异具有统计学意义, P 均 < 0.05;第 18 天,b,各组与反义 Ang2 基因转染组裸鼠移植瘤体积差异具有统计学意义, P 均 < 0.05;第 30 天,c,各组与反义 Ang2 基因转染组裸鼠移植瘤体积差异具有统计学意义, P 均 < 0.05

表 5 不同时间裸鼠移植瘤组织 MVD ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.5 Microvessel density of transplantation tumor of nude mice at different time points ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	F 值	P 值	第 2 周	F 值	P 值	第 3 周	F 值	P 值
未转染组	8.0 ± 2.3 ^a			9.0 ± 2.0 ^b			21.0 ± 4.2 ^c		
空载体转染组	7.0 ± 2.7 ^a	15.18	< 0.000 1	10.0 ± 2.3 ^b	3.50	0.044 4	20.0 ± 3.1 ^c	39.02	< 0.000 1
反义 Ang2 基因转染组	3.0 ± 0.8			6.0 ± 1.5			10.0 ± 2.4		

注:第 1 周,a,各组与反义 Ang2 基因转染组肿瘤组织中 MVD 差异具有统计学意义, P 均 < 0.05;第 2 周,b,各组与反义 Ang2 基因转染组肿瘤组织中 MVD 差异具有统计学意义, P 均 < 0.05;第 3 周,c,各组与反义 Ang2 基因转染组肿瘤组织中 MVD 差异具有统计学意义, P 均 < 0.05

3 讨论

Folkman^[2-3]研究表明,实体肿瘤的发生为无血管期和血管期。当肿瘤直径 ≤ 2 mm时,肿瘤细胞间通过弥散作用吸取养份,此时不诱生血管生长因子,且很少发生转移,常称为无血管期或血管前期;但当肿瘤进一步增大时,则需要新生毛细血管来提供充足的血液,此时肿瘤诱导巨噬细胞产生血管生长因子,从而使内皮细胞分裂加快,血管生成,肿瘤得以长大,此期称为血管期。无血管期的恶性肿瘤处于休眠状态,肿瘤直径一般不超出 2~3 mm,一旦肿瘤细胞获得血管生成能力,即诱导血管生成,肿瘤随之迅速生长。新生血管数越多,恶性肿瘤脱落进入血液循环的机会越多,转移至淋巴结的概率越大。血管生成是恶性肿瘤转移的必备条件,肿瘤血管生成过程是一系列源于微血管内皮细胞的复杂连锁反应,当切断肿瘤组织的营养供给线及新生血管的形成被阻断时,即使是巨大的肿瘤也会被抑制。所以,肿瘤细胞的增生,以及肿瘤的生长和转移必须先有毛细血管的增多^[4],阻断肿瘤血管的生成可以达到抑制肿瘤生长和转移目的,这一点越来越多地被人们所研究^[5-6]。

Ang 已经被证实是肿瘤血管生成过程中非常重要的调控因子。Ang 是血管内皮细胞上特异性酪氨酸激酶受体 Tie2 的天然配体,直到 1996 年被分离提纯出来。目前已发现 Ang1、Ang2、Ang3、Ang4 4 种构型^[7]。其中起主要作用的是 Ang1 和 Ang2,它们两者之间的氨基酸结构具有 60% 的同源性。生理情况下,Ang1 和血管内皮细胞上 Tie2 受体结合后使其磷酸化激活,受体活化后可通过多种途径调节血管内皮细胞和周围间质细胞如成纤维细胞、血管平滑肌细胞等的相互作用,维持血管结构的稳定性和渗透性并促进新生血管成熟化。Ang2 是 Ang1 的拮抗剂,Ang2 和受体结合后对 Ang1 产生竞争性抑制,并不使受体磷酸化。成熟机体中有血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等血管生成促进因素存在时,Ang2 竞争性抑制 Ang1 的作用,促进血管结构的松解,消除血管基底膜和周围间质细胞对血管形成的限制,并增加血管内皮细胞对 VEGF 等血管生成促进因素的敏感性,从而内皮细胞分裂增生形成新的毛细血管。Ang2 在成熟机体中仅在血管生成较活跃的组织如胎盘、子宫等中表达丰富,而在稳定组织中则极少表达^[8]。Ang2 在多种

肿瘤组织中表达增加,其表达程度与肿瘤新生血管的形成有一定关系。有多篇资料显示 Ang2 具有促进肿瘤血管生成的作用^[9-10]。研究表明在人肺癌^[11]、卵巢癌^[12]、结直肠癌^[13]等肿瘤中 Ang2 的表达均增强。阻断 Tie2 及其天然配体 Ang2 可以在一定程度上抑制肿瘤的转移^[14-15]。

本实验第 1 部分研究发现,与正常胃黏膜组织的阴性表达相对比,Ang2 蛋白在胃癌组织中呈异常的阳性表达。且该蛋白在胃癌不同的临床病理分期中表达强度不同;随肿瘤临床病理分期的进展,Ang2 蛋白的表达逐渐增强。以上发现说明 Ang2 和胃癌的关系密切,在胃癌的发生、发展过程中发挥了重要的作用。本研究认为可以通过阻断 Ang2 的表达来阻断胃癌新生血管的形成,从而抑制胃癌细胞的生长。所以在第 1 部分实验的基础上,应用反义核酸技术,设计了后两部分实验。本实验的第 2 部分在之前的研究已经成功构建了人反义 Ang2 真核表达载体 (pE-G FP-N1-anti Ang2) 的基础上,将其成功转染人胃癌细胞 SGC-7901,发现其能封闭其 Ang2 基因及蛋白的表达。MTT 检测证实,反义 Ang2 基因转染人胃癌细胞 SGC-7901 后,其生长受到抑制;流式细胞检测结果显示,反义 Ang2 基因转染可促进胃癌细胞 SGC-7901 凋亡。本实验第 3 部分分别用未转染的、转染空载体质粒的和转染了反义 Ang2 基因的人胃癌细胞 SGC-7901 注射于裸鼠皮下产生肿瘤结节,观察肿瘤生成的速度并对肿瘤组织中的微血管进行检测。实验结果表明,反义 Ang2 基因转染能抑制人胃癌细胞 SGC-7901 在裸鼠皮下成瘤性,并抑制瘤体新生血管形成。

以上结果说明 Ang2 与胃癌血管增生及其侵袭能力关系密切。它可能是肿瘤新生血管形成的起始因素,还对肿瘤血管增生起到了促进和维持的作用,使肿瘤进一步发展,是肿瘤进展的重要调节因素。本研究认为可能是以下原因。肿瘤局部微环境的缺氧状态及肿瘤细胞分泌的某些生长因子可以促进 Ang2 的合成^[16]。缺氧状态也是引起 VEGF 增多的原因之一^[17]。另有证据表明,Ang2 对血管的作用与 VEGF 的存在关系密切,二者具有协同作用^[18]。因此可以推测 Ang2 和 VEGF 的协同作用可能是新生血管形成的始动环节之一。肿瘤对氧气和营养物质的需要促使 Ang2 和 VEGF 的合成增加,促进新生血管形成以满足需要。有多篇资料显示 Ang2 可能在肿瘤血管生成的早期起到重要作用,可以作为肿

瘤新生血管形成的标志之一^[19-21]。所以 Ang2 可能参与了肿瘤新生血管生成的始动环节,而 Ang1 则是生理情况下和肿瘤血管生成的中、后期促进新生血管成熟化的重要因素。

本研究结果还为探索反义核酸技术用于胃癌治疗奠定了一定的基础。反义技术是肿瘤基因治疗的策略之一,其基本原理是根据碱基互补原则,用人工合成的或生物表达的特定互补的 DNA 或 RNA 片段(反义核酸)以抑制或封闭靶基因表达的技术。国内外很多学者致力于反义核酸技术治疗胃癌的研究^[22-24]。针对 Ang2 这一靶点设计 1 段反义核苷酸来观察其抗肿瘤生长的作用。本实验证实反义 Ang2 基因转染可封闭人胃癌细胞 SGC-7901 Ang2 mRNA 及蛋白的表达,抑制其体外生长;并对其体外成瘤性及其新生血管的生成有明显的抑制作用。其又是通过什么途径来发挥其生物学特性的等一系列问题还有待于进一步研究。

总之,Ang2 在胃癌的发生、发展过程中发挥了重要的作用,它促进胃癌新生血管形成,为胃癌生长及转移提供最基本的条件。可以通过抑制 Ang2 的表达,达到抑制胃癌生长、转移的目的。

参 考 文 献

- [1] 朱 鹏,郑朝新,陈道达.人促血管生成素-2 反义真核表达载体的构建及鉴定[J].咸宁学院学报(医学版),2005,19(1):11-13.
- [2] Zhu P,Zheng C X,Chen D D.Construction and identification of human angiopoietin-2 antisense eukaryotic expression trager[J].Journal of Xianning University (Medical Sciences),2005,19(1):11-13.
- [3] Folkman J.Tumor angiogenesis;therapeutic implications[J].N Engl J Med,1971,285(21):1182-1186.
- [4] Folkman J.What is the evidence that tumors dependent?[J].J Natl Cancer Inst,1990,82(1):4-6.
- [5] Weis S M,Cheresh D A.Tumor angiogenesis;molecular pathways and therapeutic targets[J].Nat Med,2011,17(11):1359-1370.
- [6] Wang H,Marchal G,Ni Y,et al.Multiparametric MRI biomarkers for measuring vascular disrupting effect on cancer[J].World J Radiol,2011,3(1):1-16.
- [7] Ichihara E,Kiura K,Tanimoto M.Targeting angiogenesis in cancer therapy[J].Acta Med Okayama,2011,65(6):353-362.
- [8] Valenzuela D M,Griffiths J A,Rojas J,et al.Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans[J].Pros Natl Acad Sci USA,1999,96(5):1904-1909.
- [9] Asahara T,Chen D,Takahashi T,et al.Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2,modulate VEGF-induced postnatal neovascularization[J].Circ Res,1998,83(3):233-240.
- [10] Park J H,Park K J,Kim Y S,et al.Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer[J].Chest,2007,132(1):200-206.
- [11] Sallinen H,Heikura T,Laidinen S,et al.Preoperative angiopoietin-2 serum levels;a marker of malignant potential in ovarian neoplasms and poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J].Int J Gynecol Cancer,2010,20(9):1498-1505.
- [12] Goede V,Coutelle O,Neuneier J,et al.Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy[J].Br J Cancer,2010,103(9):1407-1414.
- [13] De Palma M,Naldini L.Angiopoietin-2 TIEs up macrophages in tumor angiogenesis[J].Clin Cancer Res,2011,17(16):5226-5232.
- [14] Mazzeri R,Pucci F,Moi D,et al.Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells[J].Cancer Cell,2011,19(4):512-526.
- [15] Holopainen T,Saharinen P,D'Amico G,et al.Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis[J].J Natl Cancer Inst,2012,104(6):461-475.
- [16] Hu B,Cheng S Y.Angiopoietin-2;development of inhibitors for cancer therapy[J].Curr Oncol Rep,2009,11(2):111-116.
- [17] Simon M P,Tournaire R,Pouyssegur J.The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1[J].J Cell Physiol,2008,217(3):809-818.
- [18] Oladipupo S,Hu S,Kovalski J,et al.VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting[J].Proc Natl Acad Sci USA,2011,108(32):13264-13269.
- [19] Hashizume H,Falcón B L,Kuroda T,et al.Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth[J].Cancer Res,2010,70(6):2213-2223.
- [20] Lin Z,Liu Y,Sun Y,et al.Expression of Ets-1,Ang-2 and maspin in ovarian cancer and their role in tumor angiogenesis[J].J Exp Clin Cancer Res,2011,30:31.
- [21] Llovet J M,Peña C E,Lathia C D,et al.Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J].Clin Cancer Res,2012,18(8):2290-2300.
- [22] Melen-Mucha G,Niedziela A,Mucha S,et al.Elevated peripheral blood plasma concentrations of tie-2 and angiopoietin 2 in patients with neuroendocrine tumors[J].Int J Mol Sci,2012,13(2):1444-1460.
- [23] Yang S M,Fang D C,Yang J L,et al.Antisense human telomerase reverse transcriptase could partially reverse malignant phenotypes of gastric carcinoma cell line in vitro[J].Eur J Cancer Prev,2008,17(3):209-217.
- [24] Shieh J J,Liu K T,Huang S W,et al.Modification of alternative splicing of Mcl-1 pre-mRNA using antisense morpholino oligonucleotides induces apoptosis in basal cell carcinoma cells[J].J Invest Dermatol,2009,129(10):2497-2506.
- [25] Zhao F,Zhang Q,Kang C,et al.Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression by RNA interference inhibits SGC7901 gastric adenocarcinoma cell growth and invasion in vitro and in vivo[J].Med Oncol,2010,27(3):774-784.

(责任编辑:冉明会)