

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)05-0461-04

重组小鼠血管抑素基因转染抗血管生成治疗胆囊癌的实验研究

张吉成¹ 陈燕凌¹ 张德新² 陈宏明¹ 杨定忠³ 王作仁³ (¹ 福建医科大学附属协和医院肝胆外科, 福建 福州 350001, ² 第四军医大学西京医院全军消化病研究所, 陕西 西安 710033, ³ 西安交通大学第一医院肝胆外科, 陕西 西安 710061)

Experimental study of antiangiogenic therapy with mouse angiostatin gene transduction in gallbladder cancer

ZHANG Ji-Cheng¹, CHEN Yan-Ling¹, ZHANG De-Xin², CHEN Hong-Ming¹, YANG Ding-Zhong³, WANG Zuo-Ren³

¹Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China, ²Institute of Gastrointestinal Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ³Department of Hepatobiliary Surgery, First Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of mouse angiostatin gene transfected into gallbladder cancer cells, antiangiogenic activity of angiostatin protein and inhibitory effect of angiostatin on implanted gallbladder carcinoma of nude mice. **METHODS:** The recombinant vector pcDNA3.1(+)-angiostatin was transfected into gallbladder cancer cells GBC-SD with liposome lipofectamine2000. Angiostatin protein expression was examined by Western blot in the stable cell lines by G418 and its inhibitory effect on the vascular endothelial cells ECV-304 was observed *in vitro*. The nude mice were divided into 2 groups: angiostatin group and control group implanted with GBC-SD/pcDNA3.1(+)-angiostatin cells and GBC-SD cells respectively. The carcinoma volume and microvessel density (MVD) of each group were compared and analyzed. **RESULTS:** After 30 d of transfection and selection with G418, macroscopic resistant cell clones were formed. Western blot showed that angiostatin protein was expressed and secreted by GBC-SD/pcDNA3.1(+)-angiostatin cells. The angiostatin protein could inhibit the proliferation of vascular endothelial cells ECV-304 dependent on bFGF ($P < 0.01$). In addition, the nude mice experiment showed that tumorigenic capability of the GBC-SD/pcDNA3.1(+)-angiostatin cells had been reduced significantly ($P < 0.01$). Immunohistochemistry study demonstrated that MVD of the angiostatin group

was lower than that of the control group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Angiostatin gene transduction may have potential value in the treatment of gallbladder cancer in the future.

【Keywords】 gallbladder neoplasms; angiostatin; antiangiogenesis; gene transfection

【摘要】目的: 研究重组小鼠血管抑素基因真核表达质粒转染的胆囊癌细胞表达具有抑制血管内皮细胞生长活性的血管抑素蛋白, 以及对裸鼠种植性胆囊癌生长的抑制作用。方法: 应用脂质体 lipofectamine2000 将重组小鼠血管抑素基因的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-angiostatin 转染胆囊癌细胞株 GBC-SD, G418 抗性筛选, 以 Western blot 检测血管抑素的表达, 以血管内皮细胞增殖分析检测其生物学活性, 接种裸鼠并比较肿瘤体积和肿瘤微血管密度(MVD)。结果: 得到表达血管抑素的胆囊癌细胞克隆, 其培养上清能有效抑制 bFGF 刺激的血管内皮细胞增殖 ($P < 0.01$); 血管抑素组裸鼠肿瘤体积小于野生细胞对照组 ($P < 0.01$), 免疫组化检测显示血管抑素组裸鼠肿瘤微血管密度(MVD)低于野生细胞对照组 ($P < 0.05$)。结论: 血管抑素基因转染对裸鼠种植性胆囊癌的生长有抑制作用, 这是血管抑素组肿瘤组织内新生血管形成受到抑制而减少所致。

【关键词】 胆囊肿瘤; 血管抑素; 抗血管生成; 基因转染

【中图分类号】 R735.8 **【文献标识码】** A

0 引言

胆囊癌预后极差, 故积极探索胆囊癌的基因治疗具有非常重要的意义。肿瘤的生长依赖于丰富的血供, 通过抑制肿瘤新生血管形成就可以使肿瘤缺血坏死达到治疗目的。血管抑素(angiotatin)是1994年O'Reilly等^[1]发现的能强烈抑制血管内皮细胞生长和新生血管形成的蛋白质。为此, 我们拟应用重组小鼠血管抑素基因的真核表达质粒转染胆囊癌细胞株, 检测血管抑素的蛋白表达, 并观察其对血管内皮细胞的作用和对裸鼠种植性胆囊癌生长的影响。探索血管抑素在胆囊癌血管抑制基因治疗中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* DH5 α 菌和 pcDNA3.1(+)由陕西省人民医院病毒室保存。血管抑素 angiotatin cDNA基因片断和兔抗 HAtag 多克隆抗体由第四军医

收稿日期 2006-05-10; 接受日期 2006-06-05

基金项目 福建省自然科学基金(C0540008)

通讯作者: 王作仁. Tel (029) 85324009 Email zjc1986@hotmail.com

作者简介: 张吉成. 博士 副主任医师. Tel (0591) 83357896 Ext. 8418

Email jczhang8@126.com

大学西京医院张德新博士惠赠。基因测序:上海申友生物技术公司。脂质体 lipofectamine2000, G418 和 DMEM 培养基: Gibco 公司。λdsDNA/*Hind* III 标准物和各种限制性核酸内切酶: 华美公司或 New England Biolabs 公司。质粒提取和胶回收试剂盒: 上海华舜公司。Balb/c 裸鼠: 第四军医大学实验动物中心, SPF 条件下饲养。胆囊癌细胞株 GBC-SD: 中科院上海细胞生物学研究所, 在含 150 mL/L 小牛血清、高糖 DMEM 培养液中, 37°C, 50 mL/L CO₂ 条件下培养。血管内皮细胞系 ECV-304: 第四军医大学口腔医院, 在含 100 mL/L 胎牛血清、高糖 DMEM 培养液中, 37°C, 50 mL/L CO₂ 条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1(+)-angiostatin 质粒构建和基因转染 经酶切、回收和连接将血管抑素 angiostatin cDNA 基因片段装入真核表达载体 pcDNA3.1(+), 转化、挑选抗性克隆和提纯质粒, 经酶切鉴定和基因测序证实。连续培养胆囊癌细胞株 GBC-SD, 脂质体 lipofectamine2000 基因转染, 设置实验组(血管抑素组) pcDNA3.1(+)-angiostatin 1.2 μg/脂质体 3 μL, 阴性对照组(空载体对照组) pcDNA3.1(+)-1.2 μg/脂质体 3 μL, 空白对照组脂质体 3 μL。转染 48 h 后换用含筛选浓度新霉素 G418 (400 mg/L) 的选择培养液培养。1 wk 后空白对照组细胞全部死亡, 实验组和阴性对照组 4 wk 后均出现肉眼可见的细胞克隆, 随机挑选抗性克隆, 待细胞扩增后移至培养瓶用 200 mg/L G418 培养液扩大培养。另取野生 GBC-SD 细胞为对照, 同时测定该 3 组肿瘤细胞的体外生长曲线: 用不含 G418 的 150 mL/L 小牛血清、高糖 DMEM 培养液培养, 取对数生长期的细胞 1×10^4 接种于 24 孔培养板中, 每日计数 3 孔中的细胞数绘制生长曲线。

1.2.2 血管抑素的表达及生物学活性 用 Western blot 法检测血管抑素的表达, 无血清培养液培养细胞 5 d, 收集培养上清, 用 lysine-sepharose 纯化, 120 g/L 丙烯酰胺凝胶变性蛋白电泳 SDS-PAGE, 用硝酸纤维素膜 300 V 恒压电转移 2 h, 按 Western blot kit 说明书操作: 蛋白封闭液封闭膜 30 min, 一抗为兔抗 HA-tag 多克隆抗体 (1:150), 孵育 40°C 过夜; 二抗为辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG (1:400), 室温孵育 1 h, DAB 显色。用血管内皮细胞增殖分析法检测血管抑素的生物学活性: 取对数生长期的 ECV-304 细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶 2 g/L EDTA 消化后, 用培养液(含 100 mL/L FBS 的 DMEM) 调细胞密度为 1.0×10^8 /L, 接种于 24 孔板, 每孔接种 0.5 mL, 于 37°C, 50 mL/L CO₂ 条件下培养 24 h, 换用含 1 μg/L bFGF 的新鲜培

养液, 并加入含血管抑素的培养液上清继续培养 24 h, 进行 MTT 比色法检测, 于 570 nm 处测其 A 值。对照组为空白载体转染的 GBC-SD 胆囊癌细胞的培养液上清。

1.2.3 裸鼠肿瘤生长体积测定 将 Balb/c 裸鼠(鼠龄 4~6 wk) 11 只随机分成 2 组, 在裸鼠背部皮下注射 1×10^{10} /L 对数生长期细胞悬液 0.2 mL, 血管抑素组 6 只, 野生 GBC-SD 细胞对照组 5 只, 分别注射 GBC-SD/pcDNA3.1(+)-angiostatin 细胞和 GBC-SD 细胞, 观察 30 d 后处死荷瘤裸鼠, 切取肿瘤并测量其长径 a 和短径 b (单位 mm), 按公式 $1/2 \times ab^2$ 计算肿瘤的体积。

1.2.4 肿瘤微血管密度(MVD)免疫组化 将以上 2 组肿瘤标本制备成石蜡切片, 按 SABC 法进行免疫组化染色, 一抗为兔抗鼠 vWF mAb, 工作浓度 1:200, 二抗为 1:200 稀释的辣根过氧化酶标记羊抗兔 IgG, 经 DAB 显色, 血管内皮细胞被染成棕黄色。盲法对染色结果进行评估, 随机计数 10 个 200 倍视野下的血管数, 取其平均值作为改只裸鼠肿瘤的 MVD 值, 计算出同组裸鼠肿瘤的平均 MVD 值。

统计学处理: 用 SPSS 12.0 进行数据处理, t 检验。 $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

2 结果

2.1 pcDNA3.1(+)-angiostatin 质粒构建和基因转染 鼠源性血管抑素 cDNA 基因片段包括鼠纤溶酶原 N 端分泌信号肽(SS)、激活前肽(PA)、Kring1-4 (K1-4) 和融合流感病毒血凝素抗原标记肽(HA-tag)。酶切鉴定电泳结果显示 *Xba* I + *Hind* III 双酶切和 *Bam* H I 单酶切载体 pcDNA3.1(+)-angiostatin 后均释放出大小约 1.4 kb 的基因片段, 且 *Hind* III 线性化载体大小约 7.0 kb, 符合预测结果(图 1)。进一步测序证实所得质粒上的目的基因碱基序列与 GenBank 上的序列(序列号为 J04766)完全一致。阅读框架正确, HA-tag 的碱基序列为 5'-TACCCATACGAT-GTTCGGATTACGCTAGCCTC-3', 编码 HA-tag 的氨基酸序列 YPYDVPDYASL。以上说明 pcDNA3.1(+)-angiostatin 序列正确。用 400 mg/L 的 G418 筛选 1 wk 后, 空白对照组细胞全部死亡, 实验组和空载体对照组有部分细胞存活, 4 wk 后 2 组均出现细胞克隆, 单个克隆扩大培养, 光镜下观察, 可见实验组和空载体对照组间细胞形态无明显差异。细胞生长曲线显示: 血管抑素组、空载体对照组和野生 GBC-SD 组 3 组细胞生长速度和倍增时间无明显差异, 说明 pcDNA3.1(+)-angiostatin 基因转染不直接抑制体外胆囊癌细

胞的生长和增殖(图2)。

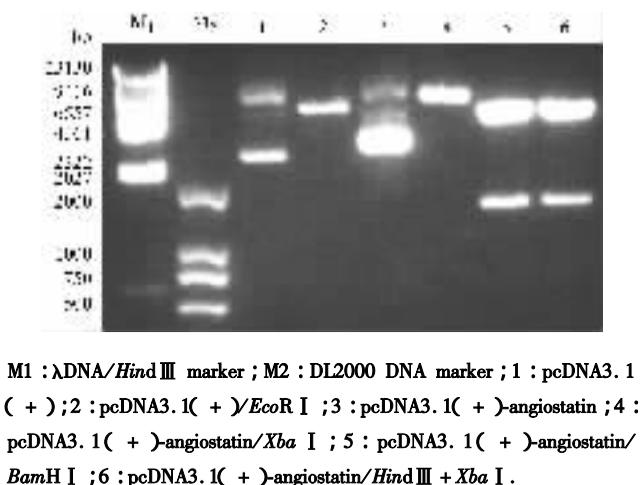


图1 pcDNA3.1(+)-angiostatin 质粒酶切鉴定

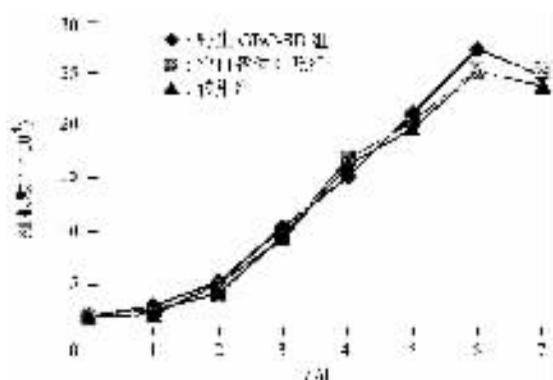


图2 各组细胞生长曲线

2.2 血管抑素的表达及生物学活性 Western blot 检测结果显示实验组即转染 pcDNA3.1(+)-angiostatin 质粒的 GBC-SD 细胞分泌上清中有 M_r 58 000 的目的蛋白表达。而野生 GBC-SD 细胞和空载体转染的 GBC-SD 细胞无此蛋白条带。进一步用 ECV-304 细胞进行 MTT 试验, 结果实验组为 0.471 ± 0.026 , 空载体对照组为 1.099 ± 0.051 ($P < 0.01$), 证明实验组分泌的上清能有效抑制 bFGF 刺激的血管内皮细胞增殖, 且这种作用是特异性针对内皮细胞的。显微镜下观察发现: 实验组的 ECV-304 细胞数量减少, 细胞生长状况较差, 细胞发生圆缩或脱落漂浮, 形态发生改变, 但仍然为贴壁细胞的状况。

2.3 裸鼠肿瘤的体积 接种后, 野生细胞对照组 1 wk 时可见突出于皮下的肿瘤, 瘤体生长相对较快; 血管抑素组 9 d 皮下开始出现肉眼可见的小结节, 肿瘤生长相对缓慢。30 d 时血管抑素组裸鼠肿瘤体积小于野生细胞对照组 (mm^3 , 748.3 ± 230.5 vs 1844.6 ± 349.2 , $P < 0.01$)。

2.4 肿瘤 MVD 检测 经 vWF mAb 免疫组化染色,

血管内皮细胞染成棕黄色; 血管抑素组裸鼠肿瘤微血管密度 (MVD) 低于野生细胞对照组 (18.8 ± 5.8 vs 31.2 ± 9.0), 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

新生血管形成对于肿瘤的发生、生长和转移都是必需的, 抑制这个过程就能抑制肿瘤生长。血管抑素 (angiostatin) 是 1994 年 O'Reilly 等发现的能强烈抑制血管内皮细胞生长和血管新生的 M_r 为 38 000 的蛋白质^[1], 是纤溶酶原 (plasminogen) 的酶解产物, 包含纤溶酶原的前 4 个 Kringle 区, 但完整的纤溶酶原不表现血管形成抑制活性。本实验所用的鼠血管抑素 cDNA 不仅包含纤溶酶原的前 4 个 Kringle 区, 即第 1a. a 和第 466a. a 之间的片段, 而且还含有激活前肽和 HA 标记肽的序列, 因此, 其在胆囊癌细胞中表达的目的蛋白的 M_r (58 000) 比 O'Reilly 等^[1]最初报道的血管抑素的 M_r (38 000) 要大。通过抑制血管新生来治疗肿瘤成为攻克肿瘤的又一策略, O'Reilly 等将这种疗法称为休眠疗法 (dormancy therapy), 即通过长期阻断血管形成来抑制恶性肿瘤的生长及转移^[2]。动物实验证实: 此方法能抑制纤维肉瘤^[3]、黑色素瘤^[4]、胃癌^[5]和肝癌^[6]等肿瘤, 具有无耐受性、无毒性、抑瘤谱广泛和易达靶细胞等优点, 若能应用转基因方法将血管抑素基因转入靶细胞, 使其自分泌和(或)旁分泌血管抑素, 不仅可降低成本, 还可在肿瘤局部造成药物的高浓度, 增强治疗效果。

本实验应用脂质体 lipofectamine2000 将重组小鼠血管抑素基因的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-angiostatin 转染胆囊癌细胞株 GBC-SD。实验结果表明, pcDNA3.1(+)-angiostatin 基因转染不直接抑制体外胆囊癌细胞的生长和增殖, 但转染阳性质粒的 GBC-SD 细胞可分泌血管抑素蛋白, 且该蛋白具有抑制血管内皮细胞增殖的活性。裸鼠动物实验结果说明血管抑素基因转染对裸鼠种植性胆囊癌的生长有抑制作用, 肿瘤微血管密度 (MVD) 检测结果进一步提示这种抑制作用是由于血管抑素组肿瘤组织内新生血管形成受到抑制而减少所致。初步显示, 脂质体介导的血管抑素基因转染在胆囊癌的血管抑制基因治疗中有潜在临床应用价值。然而血管抑素在肿瘤细胞中的表达并未能完全阻止肿瘤组织内新生血管的形成和肿瘤的生长, 原因可能有: 本实验血管抑素的表达水平没有高到足以完全抑制肿瘤血管生成, 另一方面肿瘤血管生成受多种抑制和刺激因子的调控。因此, 要真正地将血管抑素基因转染用于胆囊癌的治疗, 尚有大量的科研和临床工作要做。

【参考文献】

- [1] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma[J]. Cell, 1994, 79(2): 185-188.
- [2] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice[J]. Nat Med, 1996, 2(6): 689-692.
- [3] Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, et al. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases[J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1055-1063.

- [4] Ambs S, Dennis S, Fairman J, et al. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5773-5777.
- [5] Wu J, Shi YQ, Wu KC, et al. Angiostatin up-regulation in gastric cancer cell SGC7901 inhibits tumorigenesis in nude mice[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(1): 59-64.
- [6] 陶开山, 襄科峰. 重组人血管抑素表达载体的构建及在人肝癌细胞系中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(18): 1668-1672.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)05-0464-01

支气管-肺泡灌洗术治疗肺部炎症 20 例

秦文婧, 孟德荣, 冯志军

(河南大学第一附属医院呼吸内科, 河南 开封 475001)

【关键词】支气管镜; 肺泡灌洗; 肺部炎症

【中图分类号】R452 【文献标识码】B

0 引言 纤维支气管镜(简称纤支镜)在临床上已被广泛应用,其适应证也不断扩展,作为呼吸系统的治疗手段亦日益广泛,并取得了满意疗效^[1-2]。随着支气管肺泡灌洗术的广泛应用^[3],局部灌洗及应用抗菌药物治疗肺部疾病成为一门新的治疗学。我院自 2002-10/2006-10 用支气管肺泡灌洗加局部用药治疗肺部炎症 20 例,效果良好。

1 临床资料 20 例均为住院患者,其分布是慢性支气管炎并感染 10 例,急性肺脓肿 4 例,支气管扩张并感染 5 例,术后肺不张 1 例。其中男 16 例,女 4 例,年龄 35~70 岁,病程 10 d~2 mo。所有患者均行 X 线胸片、CT、血常规、痰培养等明确诊断。临床症状都有不同程度的发热、咳嗽、咳脓臭痰,甚至部分患者有咯血,体征为肺部有湿罗音,血常规示白细胞数增高。入院前曾应用抗菌药物 7 d 以上,效果差。全部病例均给予抗感染、止咳、祛痰、平喘等治疗,病情无明显好转情况下行纤支镜下支气管肺泡灌洗术。具体方法:纤支镜按常规插入,依纤支镜所见或 X 线胸片、CT 选择病变部位,先吸净支气管腔内分泌物,将纤支镜前端插入病变或段支气管开口处,予 37℃ 灭菌生理盐水冲洗,每次 10~20 mL,后经纤支镜负压抽吸,反复进行,总量 100~200 mL。灌洗后局部注入丁胺卡那霉素或甲硝唑。根据病情 1~2 次/wk,治疗 2~3 次,视病情操作中予吸氧、多功能监测,治疗前、后复查血常规及 X 线胸片、CT。20 例患者在应用支气管肺泡灌洗术后,体温均恢复正常,咳嗽、咳痰等症状明显减轻,白细胞计数及分类均恢复

正常,8 例湿罗音消失,1 例完全治愈。例如 1 例肺不张患者术后肺完全复张,5 例支气管扩张并感染患者 4 例炎症基本吸收。胸部影像学检查显示其余患者的炎症均明显好转。术中无一例出现意外。

2 讨论 本组 20 例患者,对常规给药及抗菌药物治疗 7 d 以上不能控制,采用支气管肺泡灌洗加局部药物注入,结合全身用药均取得满意效果^[4]。特别是对于急性肺脓肿患者,较传统的全身应用抗菌药物 8~12 wk 的疗程^[5]明显缩短。究其原因,这些病多为一些致病力较强的细菌及耐药菌或几种细菌混合所致的感染,临床用药治疗比较棘手。全身应用抗菌药物时,一方面,支气管腔内痰液中抗菌药物浓度低;另一方面,存在血-支气管屏障、肺泡、毛细血管屏障、组织包裹、脓液的理化性质及炎症引起的支气管黏膜充血、水肿和痰液引流不畅等因素常造成全身用药疗效不佳^[6]。采用支气管肺泡灌洗术治疗时,支气管镜插入病灶部位,易于吸出炎性分泌物,通过反复灌洗和吸引,充分引流管腔中的痰液,起到局部清洗作用,更重要的是局部注药可提高局部药物浓度,直接达到杀菌作用,再结合全身用药,内外并治。另外,灌洗时对病灶局部刺激及患者咳嗽反射,利于炎性分泌物排出,改善局部血循环,利于病灶吸收好转,而且气道通畅,不利于细菌、特别是厌氧菌的繁殖。总之,采用支气管肺泡灌洗术治疗肺部炎症,临床观察效果好,成为肺部炎症治疗的又一重要方法。其简便、安全,有较高的临床应用价值,若无纤支镜检查禁忌症时,值得临床推广应用。

【参考文献】

- [1] 吴福善,肖和平,唐神洁. 经纤支镜灌洗治疗肺结核的近期疗效观察[J]. 中国内镜杂志, 2001, 7(4): 13-14.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会支气管镜组. 纤维支气管镜(可弯曲支气管镜)临床应用指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 23(3): 134-135.
- [3] 黄芳,王香玲,蒯斌霞等. 支气管肺泡灌洗液中 3 种肿瘤标志物的含量检测及意义[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(16): 1499-1500.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4): 202.
- [5] 叶任高. 内科学[M]. 6 版,北京:人民卫生出版社, 2004: 31-34.
- [6] 刘昌起. 呼吸疾病治疗学[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2000: 95.

编辑 许福明

收稿日期 2006-11-15; 接受日期 2006-12-24

作者简介 秦文婧, 学士, 主治医师. Tel (0378) 5661649 Email: qinwenjing007@163.com