

肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用

王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹

王志华,康熙雄,申宝忠,李莹,哈尔滨医科大学肿瘤研究所
黑龙江省哈尔滨市 150040
张智清,中国疾病预防控制中心病毒学研究所 北京市 100052
国家自然科学基金, No.39270765 和黑龙江省重点攻关课题基金资助,
No.G00C190401
项目负责人:王志华,150040,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号,哈尔滨
医科大学肿瘤研究所. hljwzh@163.com
电话:0451-2620314 传真:0451-6665003
收稿日期:2003-01-10 接受日期:2003-03-26

摘要

目的:探讨大肠癌细胞和组织中 BAI1 基因的表达情况及 BAI1 对血管和肿瘤生长的抑制作用。

方法:提取大肠癌细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒的步骤反转录成 cDNA,PCR 产物行 20 g/L 脂糖凝胶电泳分析。BAI1 对血管和肿瘤生长的抑制作用应用微血管数量(MVQ)和肿瘤移植实验的方法进行。

结果:大肠癌细胞、癌组织中大多数 BAI1 不表达或表达下降,在全部转移的淋巴结中不表达,在小鼠 CC95 大肠癌细胞移植肿瘤内注射 Ad-hBAI1 表达载体可以有效的影响肿瘤的血管生成($P < 0.05$),并抑制肿瘤的生长($P < 0.01$)。

结论:BAI1 在肠癌细胞、组织及转移的淋巴结中表达降低,该 Ad-hBAI1 表达载体可抑制肿瘤新生血管的形成并抑制肿瘤的生长。

王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹. 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):834-836
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/834.asp>

0 引言

肿瘤生长与转移过程中发生着持续而失控的血管生成(angiogenesis),血管生成是肿瘤增生、侵袭、转移的重要环节,研究发现血管生成是一种复杂的过程,包括内皮细胞激活、增生、迁移、血管基底膜破坏,形成新的血管和血管网,并且与已存在的血管网连接,原发肿瘤的血管生长使肿瘤细胞脱落易于转移。基于这一认识,人们逐渐将注意力集中在研究血管生成的生物学基础上,探讨减弱血管生成的递质,评价用抗血管生成物质来阻止肿瘤生长的方案和途径。最近 Nishimri et al^[1]首次发现并克隆出一个新的基因,具有抑制肿瘤血管生成的作用,命名为脑特异性新生血管抑制因子 1(brain-specific angiogenesis inhibitor 1, BAI1),为了进一步证实其作用,本研究观察了大肠癌患者 BAI1 的表达情况,试图寻找用 BAI1 治疗肿瘤的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640 培养液来自 GIBCO 公司;基因重组脑特异性新生血管抑制因子 1 表达载体(Ad-hBAI1)由日本东京大学医科学研究所馈赠。肿瘤组织和细胞株:人直肠癌组织从临床外科手术切除的肿瘤组织中获得,直肠癌细胞株 CC95 由本所培养、建立。实验动物: BALB/C 裸鼠,♀,5-6 周龄,从中国医学科学院动物部获得,在无病原微生物的洁净条件下实验、饲养。

1.2 方法

1.2.1 人大肠癌细胞 BAI-1 的表达 采用异硫氰酸胍一步法提取大肠癌细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒的步骤反转录成 cDNA。BAI1 基因的 PCR 引物:5' 端引物为 5' -ACTCATCCTGCGACGGTGTG-3', 3' 端引物为 5' -TCCCTCAGGTCCTTCATGCG-3'。PCR 参数:94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 次循环,PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 Ad-hBAI1 对新生血管的抑制作用 裸鼠体内接种 1×10^5 CC95 细胞,2 wk 后取出肿瘤组织,观察微血管数量(microvessel quantity, MVQ),确定 BAI1 对肿瘤组织新生血管的抑制情况,方法(1)微血管染色,石蜡切片,HE 染色和免疫组织化学染色 LSAB 法(应用 Pako 公司试剂盒)。方法(2)微血管计数,低倍镜下观察切片全部视野,找到肿瘤血管密度最高区域,在高倍镜下(200 ×)随机选取 5 个高倍视野计数微血管,其均值即为 MVQ。

1.2.3 Ad-hBAI1 对肿瘤生长的抑制作用 BALB/C 裸鼠随机分成 3 组,每组 5 只,每只背部皮下接种 1×10^5 CC95 细胞,第 1、2、3 组在第 1、3、5、7、9 日局部分别注射 RPMI1640、腺病毒载体和腺病毒重组表达载体 Ad-hBAI1(2 μg/次),每天观察并记录肿瘤生长情况。

统计学处理 结果采用未配对计量资料的 t 检验进行统计学分析。P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌细胞 BAI1 的表达 从大肠癌组织、淋巴结和培养细胞 CC95 提取 mRNA,反转录成 DNA,PCR 扩增,电泳分析。临床手术切除的 20 例样品中 7 例阳性,CC95 细胞和其他 13 例阴性,转移性淋巴结无表达,非转移性淋巴结有阳性表达。

2.2 BAI1 抑制肿瘤生长和肿瘤血管生成 按前述方法,2 wk 后经麻醉处死小鼠,免疫组化染色,镜下观察,肿瘤内的血管扭曲、分支紊乱、吻合丰富、管腔不规则。

则, Ad-hBAI1 治疗组的肿瘤内血管增生受到明显抑制(表 1), MVQ 与对照组相比差异显著($P < 0.05$).

表 1 BAI1 表达载体的抗肿瘤血管生成作用

组别	处理	微血管数量(MVQ)
1	RPMI1640	64 ± 16.5
2	Ad-LacZ	59 ± 19.3
3	Ad-hBAI1	37 ± 17.8

$P < 0.05$ vs RPMI 1 640 组和 Ad-LacZ 组.

2.3 Ad-hBAI1对肿瘤生长的抑制作用 每组动物分别给予局部注射 RPMI1640、腺病毒载体和腺病毒重组表达载体, 定期观察肿瘤大小, 进行比较. 给予 Ad-hBAI1治疗注射的实验动物的肿瘤生长速度与对照组相比明显减缓($P < 0.01$, 图 1).

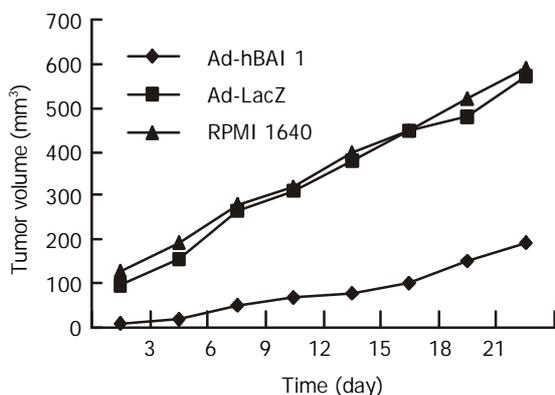


图 1 重组表达载体 Ad-hBAI1 对 CC95 细胞移植肿瘤的生长抑制.

3 讨论

肿瘤血管的新生是受众多血管生成因子严密控制的, 正调节因子包括血管内皮生长因子(VEGF), 成纤维细胞生长因子(FGF), 转化生长因子(TGF), 血管生长素(angionenin)等, 负调节因子包括血小板反应蛋白(TBS)、血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)等, 这些正负因子作为肿瘤血管靶向基因治疗的靶分子受到人们的关注, 有的已进入临床实验阶段^[2-16]. BAI1 是较晚发现的肿瘤血管抑制因子, 该基因在人脑中特异性表达, 编码由 1 584 个氨基酸残基组成的细胞膜蛋白, 含有 5 个血栓海绵蛋白-1(TSP-1)重复序列, 在体外可抑制由基底膜成纤维细胞生长因子(bFGF)诱发的血管新生, 该基因至少有一个功能性的 p53 结合序列诱导 p53 活化, 发挥该抑癌基因的作用^[1], 有研究者发现在结肠癌和肺癌患者的肿瘤组织中 BAI1 的表达明显减低^[17-19]. 最近证明在胃癌转移灶中 BAI1 几乎不表达^[20].

大肠癌是临床上多见的恶性肿瘤, 其发病的确切机制尚未明了, 大量的研究证明其发生伴有多种癌基因的改变^[21-35]. 我们的研究结果证明临床手术切除的 20 例癌组织中大多数 BAI1 不表达或表达下降, 在全部转

移的淋巴结中不表达, 而向小鼠 CC95 大肠癌细胞移植肿瘤注射 Ad-hBAI1 表达载体可以有效的抑制肿瘤的生长, 影响肿瘤的血管生成, BAI1 何以有如此的功效尚未可知, 推测可能和其功能性的 p53 结合序列诱导 p53 抗癌基因活化有关.

总之, 我们的研究证明 BAI1 可抑制肿瘤的新生血管并因而抑制肿瘤的生长, 提示 BAI1 可以作为一个新的目的基因, 在肿瘤血管靶向基因治疗中具有潜在的应用价值.

4 参考文献

- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, Yoshida S, Ono M, Kuwano M, Nakamura Y, Tokino T. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 1997;15:2145-2150
- Mulligan-Kehoe MJ, Kleinman HK, Drinane M, Wagner RJ, Wieland C, Powell RJ. A truncated plasminogen activator inhibitor-1 protein blocks the availability of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *J Biol Chem* 2002;277:49077-49089
- Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, Ozawa H, Okita S, Harada T, Shiraishi K, Ryozaawa S, Okita K. Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis. *Int J Mol Med* 2003; 11:33-39
- Linder-Stragliotto C, Strander H, Munck-Wikland E, Sten-Linder M. Low levels of endostatin in the urine from patients with malignant disease. *Tumour Biol* 2002;23:222-227
- Van Moorselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197:239-250
- Yabushita H, Noguchi M, Kinoshita S, Kishida T, Sawaguchi K, Noguchi M. Angiostatin expression in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1193-1196
- Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM, Noel A. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802-1804
- Te Velde EA, Vogten JM, Gebbink MF, van Gorp JM, Voest EE, Borel Rinkes IH. Enhanced antitumour efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg* 2002;89:1302-1309
- Sacco MG, Soldati S, Mira Cato E, Cattaneo L, Pratesi G, Scanziani E, Vezzoni P. Combined effects on tumor growth and metastasis by anti-estrogenic and antiangiogenic therapies in MMTV-neu mice. *Gene Ther* 2002;9:1338-1341
- Kuhn H, Riedel A, Eichler W, Aust G, Gessner C, Wirtz H. Influence of adenoviral vector on expression of angiogenesis regulating factors in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:461-466
- Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist* 2002;7(Suppl 2):4-11
- Ambati BK, Joussen AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, Gillies S, O'Reilly MS, Adamis AP. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1063-1068
- Kunz M, Hartmann A. Angiogenesis--anti-angiogenesis. Significance for tumor growth and metastasis. *Hautarzt* 2002; 53:373-384
- Indraccolo S, Gola E, Rosato A, Minuzzo S, Habeler W, Tisato V, Roni V, Esposito G, Morini M, Albini A, Noonan DM, Ferrantini M, Amadori A, Chieco-Bianchi L. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther* 2002;9:867-878

- 15 Kim ES, Herbst RS. Angiogenesis inhibitors in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:325-333
- 16 Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, Xiao X. Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther* 2002;9:2-11
- 17 Yoshida Y, Oshika Y, Fukushima Y, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Miura S, Nakamura M. Expression of angiostatic factors in colorectal cancer. *Int J Oncol* 1999;15:1221-1225
- 18 Fukushima Y, Oshika Y, Tsuchida T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 expression is inversely correlated with vascularity and distant metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol* 1998;13:967-970
- 19 Hatanaka H, Oshika Y, Abe Y, Yoshida Y, Hashimoto T, Handa A, Kijima H, Yamazaki H, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Vascularization is decreased in pulmonary adenocarcinoma expressing brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Int J Mol Med* 2000;5:181-183
- 20 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- 21 范应方, 黄宗海. 结直肠癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:427-430
- 22 张振书, 张亚历. 中国大肠癌研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:489-494
- 23 曲娴, 刘建平, 曲宏, 孙红霞. 大肠癌 C-erbB-2 和 EGFR 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:838-839
- 24 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 表皮生长因子受体单克隆抗体抗人结肠癌 LST174 的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:841
- 25 金月玲, 黄培林, 王亚平, 黄照权, 王建东, 孟明. nm23-H1 基因突变与大肠癌转移的相关性. 世界华人消化杂志 2001;9:965-966
- 26 沈志祥, 曹歌, 孙军. 结直肠癌组织 COX-2 mRNA 表达的病理意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1082-1084
- 27 唐朝晖, 邹声泉. DPC4/SMAD4 基因与结肠癌. 世界华人消化杂志 2001;9:1190-1193
- 28 蔡崎, 陆洪芬, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中 CD44v3, v6 蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1255-1258
- 29 许沈华, 冯建国, 李德川, 牟瀚舟, 楼荣灿. 大肠癌患者外周血 CD44 水平与临床病理的相关性研究. 世界华人消化杂志 2000;8:432-435
- 30 郭文君, 吴洪娟, 刘雨清, 张伟栋, 黄文波. Rasp21, GST-pi 在大肠腺瘤癌变中的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:104
- 31 周海波, 张居民, 颜云. 结直肠癌组织中 DPC4 基因的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1140-1142
- 32 孙哲, 高鹤立. P21ras、P16 在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1399-1403
- 33 范如英, 李世荣, 武子涛, 吴霞. 散发性大肠癌组织及粪便 P53 蛋白 K-ras 及 APC 基因的检测. 世界华人消化杂志 2001;9:771-775
- 34 谷化平, 倪灿荣, 詹熔洲. 大肠癌 CD15, CD44v6 和 nm23H1 的 mRNA 表达与转移及预后的相关性. 世界华人消化杂志 2000;8:887-891
- 35 季代金, 曹燕, 张亚历, 姜泊, 余宁, 冯福才, 周殿元. 大肠癌 HT-29, Lovo 细胞 p53 转录表达差异同步研究. 世界华人消化杂志 2000;8:77-79

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李 昆

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李昆, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院 重庆市 400038

项目负责人: 喻智勇, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院. rsyzy@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-65398063

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-02-17

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(As₂O₃)对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用及其机制。

方法: 建立胆管癌 QBC₉₃₉ 细胞株鸡胚移植模型, 接种癌细胞后 9 d 切取标本, 比较 As₂O₃ 作用组和对照组肿瘤生长、血管生成情况, 原位末端标记法检测肿瘤组织细胞凋亡, 免疫组化检测核增生抗原(PCNA)与血管内皮生长因子(VEGF)的表达。

结果: As₂O₃ 作用组肿瘤生长和血管生成受到抑制, 细胞凋亡增多、PCNA 和 VEGF 表达减弱。

结论: As₂O₃ 有抗胆管癌的作用。其机制与诱导细胞凋亡, 抑制癌细胞增生、癌组织 VEGF 表达以及肿瘤血管生成有关。

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李昆. 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):836-838

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/836.asp>

0 引言

胆管癌对目前的化疗药物常常敏感性欠佳^[1]。近年我国在三氧化二砷(As₂O₃)治疗白血病方面取得重大突破, 疗效好而副作用少^[2]; 对其他如食管癌^[3]、大肠癌^[4]等实体瘤也有效。本实验以胆管癌鸡胚移植模型观察 As₂O₃ 对胆管癌生长的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胆管癌 QBC₉₃₉ 细胞株, 由王曙光教授建株^[5]; As₂O₃ 由哈尔滨伊达药业有限公司提供; SABC 免疫组化试剂盒、TUNEL 凋亡试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司; PCNA、VEGF 抗体系 Santa Cruz 公司产品。实验用胚蛋购自第三军医大学微生物教研室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 QBC₉₃₉ 细胞, 接种于含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 100 mL/L 灭活小牛血清的新鲜 RPMI-1640 培养液中, 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 6 d 传代一次。实验采用指数生长期的细胞。

1.2.2 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)的制备^[6] 胚蛋孵育至 7 d 时, 在照卵灯下寻找胚头, 约在胚头右下方 0.5-1 cm