

# VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提, 新疆医科大学附属医院肝胆胰外科 新疆乌鲁木齐市 830011  
李海军, 2005年浙江大学医学院医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事肝胆胰肿瘤的基础与临床研究。  
通讯作者: 庞作良, 830011, 新疆乌鲁木齐市北京南路30号, 新疆医科大学附属医院肝胆胰外科。lhjun3408@163.com  
电话: 0991-7819111 传真: 0991-7819096  
收稿日期: 2006-12-26 接受日期: 2007-01-27

## Effects of vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and kinase insert domain-containing receptor and vascular endothelial growth factor protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*

Hai-Jun Li, Zuo-Liang Pang, Mao-La-Ai-Sha Mai-Mai-Ti

Hai-Jun Li, Zuo-Liang Pang, Mao-La-Ai-Sha Mai-Mai-Ti, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Correspondence to: Zuo-Liang Pang, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lhjun3408@163.com  
Received: 2006-12-26 Accepted: 2007-01-27

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of oligofectamine-mediated vascular endothelial growth factor (VEGF) antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) transfection on the mRNA expression of VEGF, fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) and kinase insert domain-containing receptor (KDR) as well as VEGF protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*.

**METHODS:** Gallbladder carcinoma GBC-SD cells were transfected with VEGF ASODN and scrambled oligodeoxynucleotide (SODN) by Oli-

gofectamine mediation. The mRNA expression of VEGF, Flt-1 and KDR in GBC-SD cells of each group were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the excretion of VEGF protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** Semi-quantitative RT-PCR revealed that VEGF, Flt-1 and KDR mRNA expression in groups of ASODN (VEGF165:  $0.686 \pm 0.033$ ,  $0.569 \pm 0.049$ ,  $0.489 \pm 0.036$ ,  $0.716 \pm 0.017$ ; VEGF165:  $0.462 \pm 0.046$ ,  $0.338 \pm 0.034$ ,  $0.219 \pm 0.022$ ,  $0.471 \pm 0.038$ ; Flt-1:  $0.694 \pm 0.019$ ,  $0.562 \pm 0.045$ ,  $0.435 \pm 0.042$ ,  $0.724 \pm 0.026$ ; KDR:  $0.667 \pm 0.063$ ,  $0.490 \pm 0.033$ ,  $0.301 \pm 0.029$ ,  $0.665 \pm 0.068$ ) and ASODN + Oligofectamine (VEGF165:  $0.601 \pm 0.021$ ,  $0.465 \pm 0.042$ ,  $0.416 \pm 0.023$ ,  $0.662 \pm 0.035$ ; VEGF121:  $0.408 \pm 0.014$ ,  $0.286 \pm 0.019$ ,  $0.157 \pm 0.021$ ,  $0.418 \pm 0.037$ ; Flt-1:  $0.609 \pm 0.018$ ,  $0.442 \pm 0.049$ ,  $0.314 \pm 0.015$ ,  $0.614 \pm 0.029$ ; KDR:  $0.523 \pm 0.048$ ,  $0.432 \pm 0.027$ ,  $0.218 \pm 0.036$ ,  $0.524 \pm 0.037$ ) were significantly inhibited 24, 48, 72 and 96 hours after transfection in comparison with those in the control group ( $P < 0.05$ ), and the inhibitory effect of ASODN + Oligofectamine was stronger ( $P > 0.05$ ). ELISA results discovered that VEGF protein excretion was markedly decreased in the culture media of ASODN ( $281.26 \pm 18.62$ ,  $526.44 \pm 34.95$ ,  $791.13 \pm 20.99$ ) and ASODN + Oligofectamine ( $250.7 \pm 14.57$ ,  $506.09 \pm 19.14$ ,  $711.79 \pm 19.91$ ) group ( $P < 0.05$ ) as compared with that in the control group, and ASODN + Oligofectamine was more efficient ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** VEGF ASODN can inhibit VEGF, Flt-1 and KDR mRNA expression and VEGF protein excretion of GBC-SD cells, and the effect may be strengthened by Oligofectamine mediation.

**Key Words:** Gallbladder carcinoma cell line GBC-SD; Vascular endothelial growth factor; Fms-like tyrosine kinase-1; Kinase insert domain-containing receptor; Antisense oligodeoxynucleotide; Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain

### 背景资料

胆囊癌恶性程度高, 预后差, 目前外科手术疗效不尽人意, 近年来抗血管形成疗法作为一种崭新的抗癌策略已成为研究的焦点, ASODN是目前迅速发展新型的基因治疗药物, 本文利用Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染人胆囊癌细胞, 探讨其对VEGF, Flt-1和KDR在mRNA和蛋白水平表达的影响, 为将来采用VEGF ASODN对胆囊癌进行基因治疗积累理论基础和实验依据。

reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Li HJ, Pang ZL, Mai-Mai-Ti MLAS. Effects of vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and kinase insert domain-containing receptor and vascular endothelial growth factor protein excretion of gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1225-1231

## 摘要

**目的:** 体外研究Oligofectamine介导的VEGF反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)转染对人胆囊癌GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响。

**方法:** 运用Oligofectamine介导的VEGF反义寡核苷酸(ASODN)和错义寡核苷酸(Scrambled Oligodeoxynucleotide, SODN)转染人胆囊癌细胞GBC-SD, 半定量RT-PCR检测转染后各组细胞不同时间的VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达变化, ELISA测定转染后各组细胞培养上清液VEGF蛋白浓度。

**结果:** 半定量RT-PCR发现ASODN组及ASODN+Oligofectamine组24, 48, 72, 96 h VEGF (ASODN组VEGF165:  $0.686 \pm 0.033$ ,  $0.569 \pm 0.049$ ,  $0.489 \pm 0.036$ ,  $0.716 \pm 0.017$ ; ASODN组VEGF121:  $0.462 \pm 0.046$ ,  $0.338 \pm 0.034$ ,  $0.219 \pm 0.022$ ,  $0.471 \pm 0.038$ ; ASODN+Oligofectamine组VEGF165:  $0.601 \pm 0.021$ ,  $0.465 \pm 0.042$ ,  $0.416 \pm 0.023$ ,  $0.662 \pm 0.035$ ; ASODN+Oligofectamine组VEGF121:  $0.408 \pm 0.014$ ,  $0.286 \pm 0.019$ ,  $0.157 \pm 0.021$ ,  $0.418 \pm 0.037$ )、Flt-1 (ASODN组:  $0.694 \pm 0.019$ ,  $0.562 \pm 0.045$ ,  $0.435 \pm 0.042$ ,  $0.724 \pm 0.026$ ; ASODN+Oligofectamine组:  $0.609 \pm 0.018$ ,  $0.442 \pm 0.049$ ,  $0.314 \pm 0.015$ ,  $0.614 \pm 0.029$ )及KDR (ASODN组:  $0.667 \pm 0.063$ ,  $0.490 \pm 0.033$ ,  $0.301 \pm 0.029$ ,  $0.665 \pm 0.068$ ; ASODN+Oligofectamine组:  $0.523 \pm 0.048$ ,  $0.432 \pm 0.027$ ,  $0.218 \pm 0.036$ ,  $0.524 \pm 0.037$ ) mRNA的表达显著低于Control组( $P < 0.05$ ), 且ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN强( $P > 0.05$ )。ELISA测定结果显示ASODN组( $281.26 \pm 18.62$ ,  $526.44 \pm 34.95$ ,  $791.13 \pm 20.99$ )及ASODN+Oligofectamine组( $250.7 \pm 14.57$ ,  $506.09 \pm 19.14$ ,  $711.79 \pm 19.91$ ) 24, 48, 72 h VEGF蛋白的分泌浓度均显著低于Control组( $394.23 \pm 16.26$ ,  $711.6 \pm 26.21$ ,  $933.85 \pm 28.65$ )( $P < 0.05$ ), 且

ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN强( $P > 0.05$ )。

**结论:** Oligofectamine介导的VEGF ASODN能抑制GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌。

**关键词:** 胆囊癌细胞GBC-SD; 血管内皮生长因子; fms样酪氨酸激酶1; 含激酶插入区受体; 反义寡核苷酸; 半定量RT-PCR; 酶链免疫吸附试验

李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提. VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(11):1225-1231  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1225.asp>

## 0 引言

VEGF是高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂因子, 在肿瘤的生长和转移中起重要作用. 抑制VEGF及其受体信号转导通路的任何一个环节, 就可防止肿瘤的进展与转移. ASODN有专一序列的寡聚脱氧核苷酸, 能特异阻断靶基因的复制、转录和翻译, 可在基因水平抑制VEGF的分泌, 已成功地运用于神经胶质瘤<sup>[1-2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>、胰腺癌<sup>[4]</sup>和胃癌<sup>[5]</sup>等多种肿瘤<sup>[6-9]</sup>. 本实验体外运用Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染人胆囊癌细胞GBC-SD, 通过RT-PCR和ELISA测定VEGF ASODN对GBC-SD细胞VEGF及其受体Flt-1和KDR在mRNA水平的表达, 并检测GBC-SD细胞VEGF蛋白分泌, 从分子水平考察VEGF ASODN抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长、促进凋亡的基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胆囊癌细胞株GBC-SD(中科院上海细胞生物学研究所), RPMI1640培养基, 2.5 g/L胰蛋白酶(含EDTA)(Gibco公司), Oligofectamine™ Reagent(20 μmol/L) (Invitrogen公司), VEGF反义寡核苷酸、VEGF错义寡核苷酸, VEGF, Flt-1, KDR与β-actin引物(上海生工生物工程公司)。

**1.2 方法** 人胆囊癌GBC-SD细胞用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液(含青霉素和链霉素各100 mg/L), 37°C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养. 待细胞长满瓶底70%-80%时采用2.5 g/L胰酶(含0.2 g/L EDTA)消化传代, 3-4 d传代1次, 传代后24-48 h处于指数生长期的细胞备实验用. 细胞经4 g/L台盼蓝染色, 拒染率>95%。

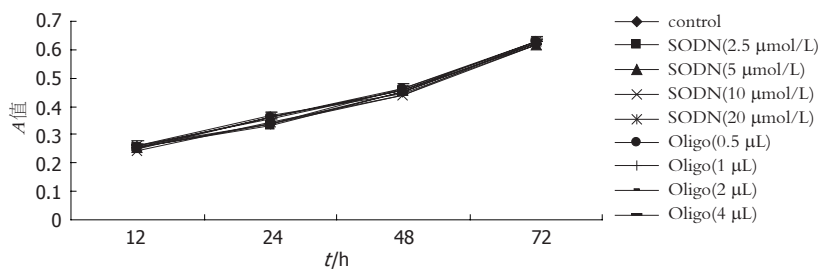


图 1 不同浓度SODN和Oligofectamine对GBC-SD细胞的影响.

**同行评价**  
 本文研究了VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响, 文章具有一定的科学性、创新性和可读性, 能较好的反映我国肝胆病学临床和基础研究的先进水平.

表 1 引物序列及目的片段的长度

| 名称      | 方向       | 引物序列                            | 目的片段的长度          |
|---------|----------|---------------------------------|------------------|
| VEGF    | forward: | 5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3'   | 403 bp (VEGF165) |
|         | reverse: | 5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3' | 535 bp (VEGF121) |
| Flt-1   | forward: | 5'-CAAGTGGCCAGA GGCATGGAGTT-3'  | 498 bp           |
|         | reverse: | 5'-GATGTAGTCTTTACCATCCTGTTG-3'  |                  |
| KDR     | forward: | 5'-TATAGATGGTGAACCCGGA-3'       | 555 bp           |
|         | reverse: | 5'-TTTGTCACTGAGACAGCTTGG-3'     |                  |
| β-actin | forward: | 5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3'      | 305 bp           |
|         | reverse: | 5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'      |                  |

1.2.1 寡核苷酸合成 VEGF反义寡核苷酸及错义寡核苷酸序列参照文献[10], VEGF反义寡核苷酸(ASODN)序列为: 5'-TGGCTTGAAGATGTACTCGAT-3', VEGF错义寡核苷酸(SODN)序列为: 5'-TACGTAGTATGGTGTACGATC-3', 全硫代修饰, 保存于-70℃待用. Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染参照Oligofectamine™ Reagent说明书和参考文献[11-14]进行.

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 SODN和Oligofectamine™对GBC-SD细胞的毒性试验 实验设对照组、2.5, 5, 10和20 μmol/L SODN组及0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine组. GBC-SD细胞37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>度培养箱培养24 h后, 无血清RPMI1640换液, 并分别加入SODN(终浓度为2.5, 5, 10和20 μmol/L)和0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine. 12, 24, 48和72 h后, 用MTT法检测细胞活力, 并绘制各组细胞的生长曲线.

1.2.3 Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染 指数生长期GBC-SD细胞, 以5×10<sup>6</sup>/L细胞密度接种96孔板中. 混合5 μL Oligofectamine和10 μL 20 μmol/L SODN或10 μL 20 μmol/L ASODN, 制备成无血清转染液, 并加入细胞中, 培养4 h后, 吸弃转染液, 加入含小牛血清培养液继续培养, 此时设为0 h点.

1.2.4 RT-PCR法检测GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的变化 实验设对照组、SODN组、Oligofectamine+SODN组、ASODN组和

Oligofectamine+ASODN组. Oligofectamine™介导的寡核苷酸转染如前所述. 分别于转染后24, 48, 72和96 h提取总RNA, 逆转录后, PCR扩增各目的基因. 将扩增的RT-PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 用IS1000凝胶数字成像系统拍照, 采用Magnitec Ltd.公司Band Leader Applacation 3.0图像分析软件分析电泳条带灰度, 分析GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA变化. 引物相关参数见表1.

1.2.5 ELISA检测VEGF蛋白分泌的变化 分别收集各组24, 48和72 h的培养液上清, 采用双抗夹心ELISA法检测其中的VEGF蛋白分泌, 具体方法按ELISA试剂盒说明书进行.

**统计学处理** 实验数据中计量资料以mean±SD表示, 多组资料的统计学检验采用方差分析, 各组均数间的相互比较采用Student-Newman-keuls法, 所有统计学检验均采用统计学软件SPSS11.0进行, P<0.05为有显著性差异.

2 结果

2.1 MTT法测定的SODN和Oligofectamine™对GBC-SD细胞的毒性试验 在12, 24, 48和72 h 4个作用时相点, 对照组、2.5, 5, 10和20 μmol/L SODN组及0.5, 1, 2和4 μL Oligofectamine组GBC-SD细胞生长无明显差异(P>0.05), 可见在试验浓度范围内, SODN和Oligofectamine对GBC-SD细胞均未见明显毒性. 各组细胞的生长

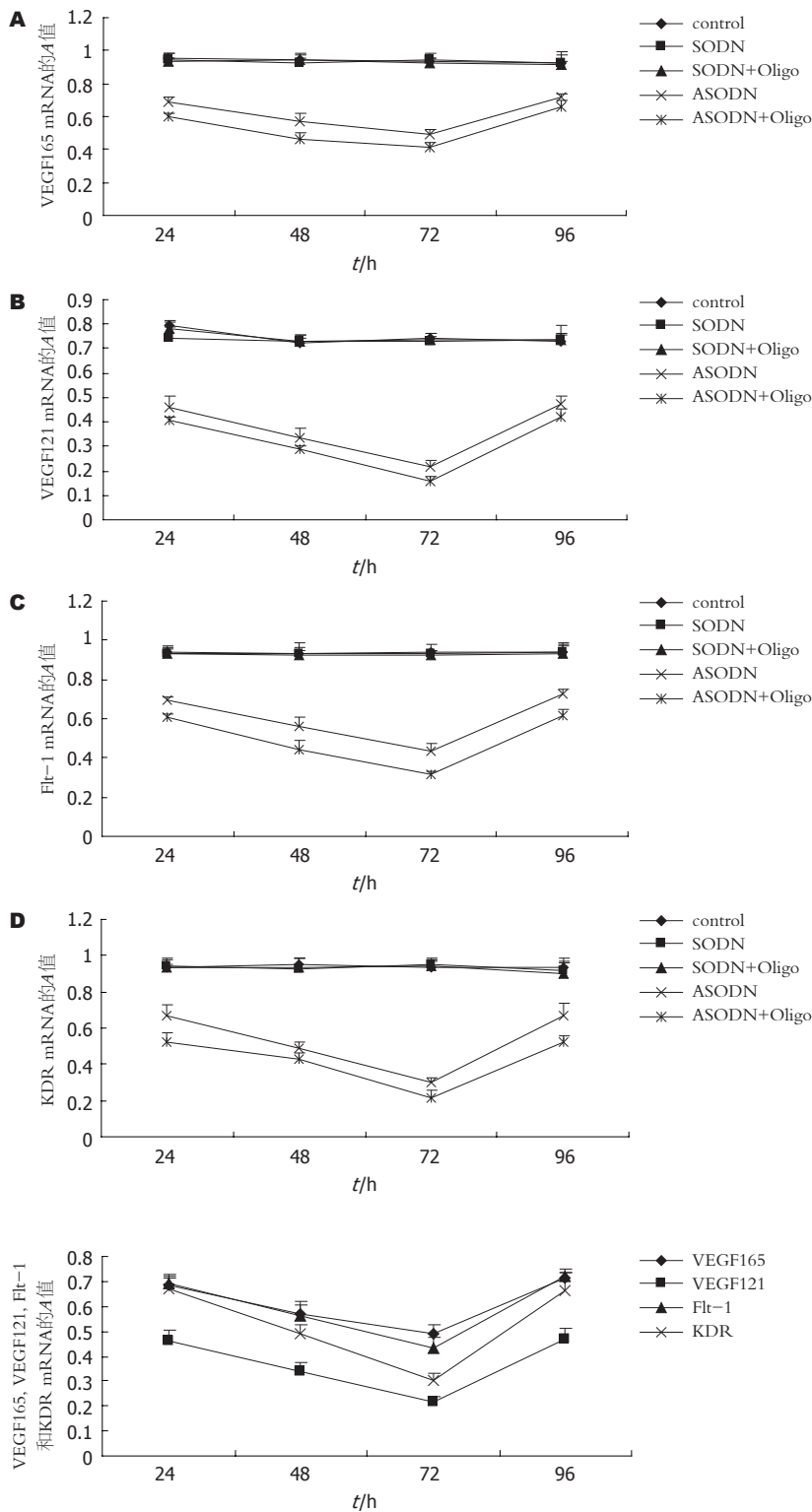


图 2 各组不同时间 VEGF165, VEGF121, Flt-1, KDR mRNA 表达情况. A: VEGF165; B: VEGF121; C: Flt-1; D: KDR.

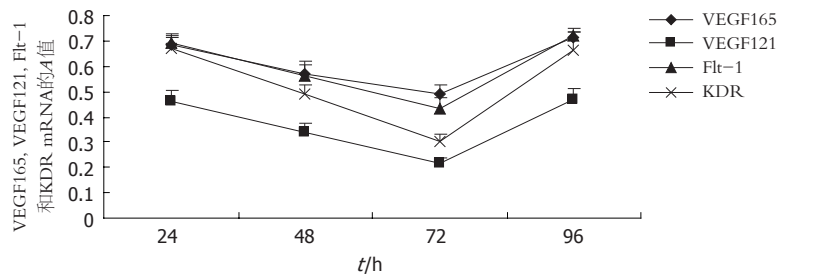


图 3 VEGF ASODN 直接转染后不同时间 VEGF165, VEGF121, Flt-1 和 KDR mRNA 表达情况.

曲线如图1所示.

2.2 各组GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA水平的表达情况 RT-PCR扩增产物均经电泳, DNA分子标志标定, 确认为目的条带. 24, 48, 72和96 h GBC-SD细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA的表达水平在SODN组、SODN+Oligofectamine组和control组无明显差别( $P > 0.05$ ), 而ASODN组及ASODN+Oligofectamine组则

明显低于control组( $P < 0.05$ ). ASODN组及ASODN+Oligofectamine组VEGF, Flt-1及KDR mRNA在同组不同时间作用点的表达水平也存在差异, 48和72 h组的抑制程度显著强于24 h组( $P < 0.05$ ), 而96 h组与24 h组之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 可见VEGF ASODN及ASODN+Oligofectamine抑制VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的作用在24-72 h左右逐渐增强, 在

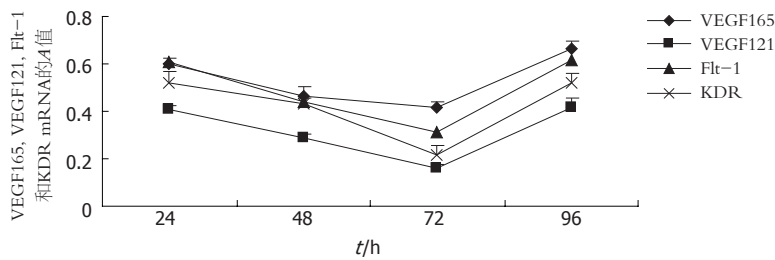


图 4 Oligofectamine介导的VEGF ASODN转染后不同时间VEGF165, VEGF121, Flt-1和KDR mRNA表达情况.

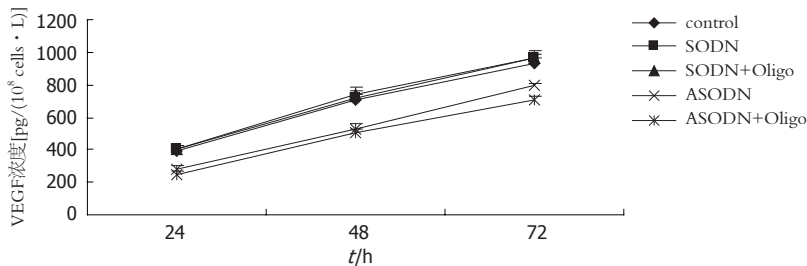


图 5 各组GBC-SD细胞培养液上清VEGF浓度.

72 h抑制作用最强, 在72h后抑制作用开始逐渐减弱, 且ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN组更明显, 虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )(图2-4).

**2.3 ELISA检测VEGF分泌的变化** ELISA检测结果显示, 24, 48和72 h GBC-SD细胞培养上清液中VEGF蛋白浓度在SODN组、SODN+Oligofectamine组和control组无明显差别( $P>0.05$ ), 而ASODN组及ASODN+Oligofectamine组则明显低于control组( $P<0.05$ ), 且ASODN+Oligofectamine组的VEGF蛋白浓度比ASODN组低, 虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )(图5).

### 3 讨论

VEGFR有3种属于酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKs)超家族, 命名为VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(KDR/F1k-1), VEGFR-3(Flt-4). Flt-4分布在淋巴管内皮细胞, Flt-1和KDR/F1k-1则主要在血管内皮细胞内表达<sup>[14]</sup>. KDR/F1k-1激活后能使毛细血管通透性增高, 促进内皮细胞增生及迁移; 而Flt-1激活后可促进内皮细胞分化形成血管, 同时对Flt-1所引起的生物学效应起缓冲作用<sup>[15-16]</sup>. 正常情况下, 这些受体表达水平很低, 大多数组织中不能检测出, 但在病理情况下, 如各种肿瘤等, 常可在其附近血管内皮细胞中检测到受体高度表达. 以往的研究证明在许多人体肿瘤组织中存在VEGF及其受体的异常过度表达<sup>[17]</sup>. VEGF mRNA在肿瘤细胞内表达, 内皮细胞不表达VEGF, 但肿瘤内皮细胞过度表达Flt-1 mRNA和KDR mRNA, 说

明VEGF主要是旁分泌. 但通过对AIDS-Kaposi肉瘤的研究发现<sup>[18]</sup>, VEGF受体的表达除血管内皮外还出现于肿瘤细胞, 用VEGF ASODN可特异地阻抑VEGF蛋白产生, 并可以剂量依赖的方式抑制肉瘤细胞生长. 这提示VEGF可能以自分泌、旁分泌两种方式刺激肿瘤细胞的生长. 不管是何种分泌方式, 在诱导肿瘤生长、转移过程中, VEGF表达的增高是始动因素. VEGF通过与其特异性受体(VEGFR)结合, 引起一系列的信号转导, 释放多种细胞因子与生长因子, 刺激血管内皮细胞增殖和迁移, 促进新生血管生成, 在肿瘤的生长和转移中起重要作用. 抑制VEGFR信号转导通路的任何一个环节, 就可防止肿瘤的进展与转移. 肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成, 而新生血管的形成受与酪氨酸激酶受体(RTKs)结合的特异性生长因子的调控. VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR)都是细胞表面的RTKs, 是信号转导通路的主要环节, 影响细胞的增生、分化、黏附、迁移和代谢. 许多研究提示Flt-1和KDR所引起的信号转导级联反应有所不同, KDR有明显促有丝分裂和化学趋化活性, 在血管通透性升高和血管生成过程中起主要作用, 而Flt-1在血管生成中的调节作用可能与调节内皮细胞间作用、内皮细胞与基底膜作用以及内皮细胞的迁移相关<sup>[10,19-21]</sup>.

ASODN是能与特定的DNA或RNA以碱基互补配对的方式结合, 并阻止其转录和翻译的短核酸片段, 是目前迅速发展的新型的基因治疗药物<sup>[22-23]</sup>. 阳离子脂质体(cationic liposomes)能与带负电荷的核酸物质形成复合物, 可提高细胞对ASODN的摄取, 增加生物利用度, 同时可在

一定程度上降低核酸酶对其的降解,在基因治疗中具有独特的应用价值<sup>[24-31]</sup>。Oligofectamine是一种新型的专门用于寡核苷酸转染的阳离子脂质体,其效率高于市售的Lipofectamine。

半定量RT-PCR结果显示,VEGF ASODN及ASODN+Oligofectamine抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达的作用在24-72 h左右逐渐增强,在72 h是抑制作用最强,在72 h后抑制作用开始逐渐减弱,且VEGF ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN更明显,虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ ),而SODN组和SODN+Oligofectamine组则无抑制作用,表明VEGF ASODN在mRNA水平能显著抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF及其受体Flt-1及KDR的表达。ELISA结果表明,VEGF ASODN及ASODN+Oligofectamine在蛋白水平抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的VEGF的表达,且VEGF ASODN+Oligofectamine的抑制作用比ASODN更明显,虽然两组在统计学上的差异并不显著( $P>0.05$ )。可见VEGF ASODN能够特异性封闭VEGF基因并抑制VEGF及其受体Flt-1和KDR表达,阻断其在促进肿瘤新生血管生成通路的信号转导,从而能够抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长增殖,促进细胞凋亡, Oligofectamine作为一种专门用于寡核苷酸转染的阳离子脂质体,能显著提高VEGF ASODN抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的增殖效应,并且这种作用是序列特异性的,而不是脂质体本身的作用或非序列特异性效应。因此Oligofectamine可作为一种低毒载体应用于介导ASODN对胆囊癌的治疗。

从本实验的设计提示VEGF ASODN抑制胆囊癌细胞GBC-SD VEGF的表达,以及其受体Flt-1和KDR表达,即抑制自分泌的方式达到抑制胆囊癌细胞GBC-SD生长增殖,促进细胞凋亡的效果。也表明胆囊癌细胞GBC-SD存在VEGF自分泌的方式,是否还具有旁分泌的方式,即肿瘤内皮细胞过渡表达Flt-1和KDR mRNA,需要进一步检测实体肿瘤内皮细胞mRNA及蛋白水平Flt-1和KDR表达情况。总之,VEGF ASODN通过抑制VEGF的表达来抑制人胆囊癌细胞GBC-SD的增殖效应。本实验的结果为将来采用VEGF ASODN对胆囊癌进行基因治疗积累一定的理论基础和实验依据。

#### 4 参考文献

- 李维方, 张光霁, 朱诚, 金由辛, 卢亦成. VEGF反义寡核苷酸抑制荷瘤大鼠胶质瘤血管生成的作用和效果. 解放军医学杂志 2003; 28: 144-145
- 李维方, 周定标, 余新光, 金由辛. 联合VEGF反义寡核苷酸和PDGF三链形成寡核苷酸抑制大鼠脑胶质瘤生长. 第二军医大学学报 2006; 27: 160-164
- Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Cho MS, Seong CM, Lee SN, Hong YK, Yung WK. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF. *Br J Cancer* 2001; 84: 1252-1257
- 邵成浩, 胡贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2916-2918
- 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋. VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 655-659
- 刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红. 胰腺癌组织VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1810-1812
- 王江, 窦科峰. 胆囊癌组织hPTTG1和bFGF表达与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 680-684
- 牛新捷, 王作仁, 张云峰, 吴胜利. 胆囊癌组织微血管密度的临床意义. 世界华人消化杂志 2002; 10: 109-110
- 吴汉平, 冯敢生, 田元. 反义VEGF寡核苷酸与碘油混合肝动脉注入转染鼠肝癌的可行性. 世界华人消化杂志 2004; 12: 23-26
- Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001; 98: 1904-1913
- Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 26969-26979
- Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem* 2002; 277: 46791-46798
- Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 4003-4009
- Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230
- Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 2001; 159: 993-1008
- Lu D, Jimenez X, Zhang H, Wu Y, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and

- kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res* 2001; 61: 7002-7008
- 17 Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, Noie T, Inoue K, Kubota K, Takayama T. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1682-1686
- 18 Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y, Gill PS. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 979-984
- 19 Langer I, Vertongen P, Perret J, Fontaine J, Atassi G, Robberecht P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34: 386-393
- 20 Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117-5124
- 21 Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000; 19: 2138-2146
- 22 Varga LV, Toth S, Novak I, Falus A. Antisense strategies: functions and applications in immunology. *Immunol Lett* 1999; 69: 217-224
- 23 Weiss B, Davidkova G, Zhou LW. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 334-358
- 24 Akhtar S, Hughes MD, Khan A, Bibby M, Hussain M, Nawaz Q, Double J, Sayyed P. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44: 3-21
- 25 Thomas SM, Zeng Q, Dyer KF, Suscovich TJ, Kanter PM, Whalen JD, Watkins SF, Grandis JR. Tissue distribution of liposome-mediated epidermal growth factor receptor antisense gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 518-528
- 26 Zhang Y, Jeong Lee H, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 2002; 4: 183-194
- 27 Ghosh C, Iversen PL. Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10: 263-274
- 28 Arora V, Cate ML, Ghosh C, Iversen PL. Phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers inhibit expression of human cytochrome P450 3A4 and alter selected drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 757-762
- 29 Geller BL, Deere JD, Stein DA, Kroeker AD, Moulton HM, Iversen PL. Inhibition of gene expression in *Escherichia coli* by antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3233-3239
- 30 Moulton HM, Hase MC, Smith KM, Iversen PL. HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13: 31-43
- 31 Tilley LD, Hine OS, Kellogg JA, Hassinger JN, Weller DD, Iversen PL, Geller BL. Gene-specific effects of antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer-peptide conjugates on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in pure culture and in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2789-2796

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志的同行评价

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.(世界胃肠病学杂志社2007-04-18)