

## G4PAMAM/VEGFASODN 抗乳腺癌血管 生成的体外实验研究

赵新汉, 李 丽, 王志宇, 张灵小, 安改丽

(西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤内科, 陕西 西安 710061)

**[摘要]** **目的:** 探讨 G4PAMAM/VEGFASODN 复合物体外对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 VEGF、VEGF mRNA 表达的影响及血管内皮细胞生长的抑制作用。**方法:** 用透射电镜观测 G4PAMAM/VEGFASODN 的粒径, 在不同的酸碱度下观察 G4PAMAM/VEGFASODN 的稳定性; 将 G4PAMAM/VEGFASODN 进行体外转染, 流式细胞仪测定其转染率, 激光共聚焦检测转染阳性细胞, MTT 法检测转染后细胞的存活率; 免疫组化检测 VEGF 蛋白的表达, RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达, MTT 法测定此复合物对血管内皮细胞生长的抑制作用。**结果:** G4PAMAM/VEGFASODN 的直径约 10 nm, 呈较均匀的网状排列; 酸碱度在 5 到 10 的范围内具有较高的稳定性, 不同电荷比的 G4PAMAM/VEGFASODN 均没有出现被解离的现象; 48 h 时 G4PAMAM/VEGFASODN 组在 1:40 的条件下转染率明显高于脂质体组; 各组转染物均对细胞无明显毒性; VEGF 蛋白在 G4PAMAM/VEGFASODN 转染后的 MDA-MB-231 细胞胞浆中的染色强度明显减弱, 阳性表达率显著降低, VEGF mRNA 的表达也受到有效的抑制。**结论:** G4PAMAM/VEGFASODN 复合物稳定性好、转染率高, 是一种有良好应用前景的新型纳米载体基因转移系统; G4PAMAM/VEGFASODN 复合物能够高效特异地抑制目的基因 VEGF 的表达, 为进一步进行体内动物实验提供了依据。

**[关键词]** 乳腺肿瘤/药物治疗; 基因疗法; G4PAMAM; G4PAMAM/VEGFASODN; 乳腺癌; VEGF; VEGF mRNA; 血管内皮细胞

**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)06-0612-10

### Anti-angiogenesis effect of G4PAMAM/VEGFASODN on breast cancer *in vitro*

ZHAO Xin-han, LI Li, WANG Zhi-yu, ZNANG Ling-xiao, AN Gai-li (Department of Medical Ontology, The First Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of G4PAMAM/VEGFASODN compound on expression of VEGF and VEGF mRNA in MDA-MB-231 breast cancer cells and the growth inhibition of vascular endothelial cells. **Methods:** The diameter of G4PAMAM/VEGFASODN

收稿日期: 2008-02-28 修回日期: 2008-10-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572140)

作者简介: 赵新汉(1964—), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤相关基因的基础与临床研究; E-mail: zhaoxinhan@mail.xjtu.edu.cn

granule was measured by transmission electron microscopy, and its stability under different pH was also observed. The efficiency of transfection *in vitro* was detected by flow cytometer and the positively transfected cells were detected by laser scanning confocal microscope. The survival rate and the inhibitory rate of vascular endothelial cells were determined by MTT assay. The expression of protein VEGF was detected by immunohistochemical method and the expression of VEGF mRNA was detected by RT-PCR. **Results:** The diameter of G4PAMAM/VEGFASODN granules was about 10nm and it arranged as homogeneous netlike. Under pH 5~10 G4PAMAM/VEGFASODN presented highly stable and no dissociation was observed with different charge ratios. The 48-hour transfection rate of G4PAMAM/VEGFASODN in charge ratio of 1 : 40 was significantly higher than that of the lipofectamine group. None of the transfection products in each group showed cell toxicity. The staining of VEGF protein in the cytoplasm of MDA-MB-231 cells after G4PAMAM/ASODN transfection weakened markedly, and the positive expression rate decreased. Meanwhile, the VEGF mRNA expression was also decreased. **Conclusion:** With good stability and transfection rate, compound G4PAMAM/VEGFASODN can be a promising new nanometer vector of gene transfer system. The G4PAMAM/VEGFASODN can inhibit the expression of VEGF gene specifically and efficiently, which may be used for *in vivo* animal experiment.

[Key words] Breast neoplasms/drug ther; Gene therapy; G4PAMAM; G4PAMAM/VEGFASODN; Breast cancer; VEGF; VEGFmRNA; Vascular endothelial cell

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008,37(6):612-621. ]

肿瘤基因治疗已成为备受瞩目的研究领域,但这种方式在安全性、靶向性和高效性等方面仍需要不断地改进和提高,其瓶颈在于基因递送载体的研制。以纳米颗粒为基础的非病毒载体系统由于有利于靶向输送、控制释放,以及能保护和稳定被输送物质,已成为基因载体研究的新热点之一<sup>[1]</sup>。其中,PAMAM(polyamidoamine)树状分子介导的基因转染效率较裸DNA及其它非病毒载体显著升高,尤其体现在猴和人的肿瘤细胞株中。在各代PAMAM中,第四代PAMAM(G4PAMAM)与DNA形成的复合物与其它代数在同等条件下形成的复合物相比显示出了更佳的性能,目前尚未见G4PAMAM应用于肿瘤基因治疗的有关报道。血管内皮生长因子(vascular epithelial growth factor, VEGF)被认为是最重要的肿瘤血管生长因子,可以特异性促进血管内皮细胞的增殖,增加血管通透性,促进血管支持物的生成,同时还可抑制肿瘤细胞的凋亡,引起免疫抑制<sup>[2]</sup>。乳腺癌与其他实体瘤一样,其生长、转移、预后均依赖于血管生成。因此,以新生血管为靶点,抑

制肿瘤血管生成,阻断肿瘤营养来源和迁移通道,已成为近年来肿瘤治疗的新策略。反义寡核苷酸技术在调控基因表达,特别是在抑制一些有害基因的表达或失控基因的过度表达方面取得了很大的进展。在抗肿瘤研究中,可设计与有害基因、突变基因或非正常表达基因及其mRNA互补的反义核酸片段,与肿瘤细胞内的目的基因结合,以封闭或阻断目的基因的表达,使进入恶性状态的细胞逆转,进入分化成熟状态,或使癌细胞凋亡。本实验通过人工合成的VEGF反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)片段,封闭乳腺癌细胞中VEGF mRNA,在细胞水平检测ASODN对细胞VEGF表达的抑制作用,为乳腺癌的抗血管生成治疗寻找新的途径。

## 1 材料和方法

1.1 材料 MDA-MB-231细胞系(购于中科院上海研究所),胎牛血清(上海复蒙公司),脂质体(购自Invitrogen公司),噻唑兰(MTT),二甲基亚砷(DMSO, Sigma公司)。小鼠抗人

VEGF 单克隆抗体、免疫组化 SP 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉生物工程有限公司), TRIzol RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司), 反转录试剂盒(MBI 公司), VEGFSODN、VEGFASODN、VEGFMSODN(用 FITC 标记行全硫代修饰)和 VEGF、 $\beta$ -actin 引物(由北京奥科公司合成)。

## 1.2 方法

**1.2.1 转染复合物的制备:** 将 G4PAMAM 胶体溶于消毒三蒸水中, 振荡混匀, 配成 1 mg/ml 的工作液。取 2 OD VEGFASODN(66  $\mu$ g), 用消毒三蒸水将其溶解成 0.1  $\mu$ g/ml 的工作液, 混匀后室温下孵育 10 min; 然后, 将 VEGFASODN 与 G4PAMAM 按 1:10、1:20、1:30、1:40 的电荷比混合, 1  $\mu$ g DNA 含 1.96  $\times 10^{21}$  个碱基, 1  $\mu$ g G4PAMAM 含 2.751  $\times 10^{21}$  个氨基。振荡摇匀, 室温下孵育 20 min, 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

**1.2.2 转染复合物的电镜检测:** 取 G4PAMAM/VEGFASODN 溶液约 2  $\mu$ l 滴于 Formvar+C 膜的铜网上, 30 min 后取出铜网自然干燥后进行透射电镜观察。

**1.2.3 不同酸碱度对 G4PAMAM/VEGFASODN 的影响:** 对不同电荷比的 G4PAMAM/VEGFASODN 复合物, 分别调整酸碱度为 10、7.5, 用 16% 变性的丙烯酰胺凝胶电泳分析结果。

**1.2.4 体外转染率的测定:** 将 MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板, 每孔细胞数 1.5  $\times 10^4$  个/ml, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 使细胞生长进入旺盛期, 用无血清培养基清洗。将其分为单纯细胞组、脂质体组、不同电荷比的 G4PAMAM/VEGFASODN 组, 4 h 后用标准培养基替代无血清培养基, 继续孵育 24 h、48 h、72 h 后弃去培养板内培养基, 用 0.25% 的胰酶消化, 加入 Hanks 缓冲液中止消化, 吹打细胞使其从培养板中脱落, 将细胞悬液分别转移到已编号的离心管中, 离心, 弃去上清, 各管中加入 1 ml PBS 缓冲液, 振荡成悬液, 置于流式细胞仪下进行检测和定量。未消化、离心的细胞先在荧光显微镜下观察后, 在激光共聚焦显微镜下拍照。

**1.2.5 MTT 检测:** 向 96 孔培养板中每孔加

入 MDA-MB-231 细胞悬液 0.5 ml, 细胞浓度为 1  $\times 10^5$  个/ml, 分别用无血清培养基清洗, 设单纯细胞组、脂质体组、不同电荷比的 G4PAMAM/VEGFASODN 组, 4 h 后用标准培养基替代无血清培养基, 继续孵育 24 h、48 h、72 h 收集细胞进行 MTT 分析; 设无转染的细胞为空白对照组。每孔加入 5 g/L MTT 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h 后, 弃上清。用 PBS 洗 2 次, 每孔加入二甲基亚砷 150  $\mu$ l, 水平振荡 10 min 使结晶溶解显色。用多功能微板测试系统于 570 nm 处测定吸光值 A, 计算相对增殖率(RGR),  $RGR(\%) = (\text{实验组 A 值} / \text{空白对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

**1.2.6 免疫组织化学染色:** 细胞培养及处理方法同上, 分别设对照组、G4PAMAM/VEGFASODN 组、G4PAMAM/VEGFASODN 组和 G4PAMAM/VEGFMSODN 组, 以证明 G4PAMAM/VEGFASODN 组和 G4PAMAM/VEGFMSODN 组在抑制蛋白表达方面是否存在差异。转染 48 h 后, PBS 冲洗 2 次, 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 3%  $H_2O_2$  去离子水孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min, 滴加正常山羊血清工作液室温孵育 15 min, 倾去, 勿洗, 滴加一抗(小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体, 以棋盘法从不同比例稀释的抗体中筛选出的抗体最佳稀释浓度为 1:100), 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS 冲洗, 3 min  $\times$  3 次, 滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG, 室温孵育 15 min; PBS 冲洗, 3 min  $\times$  3 次, 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 室温孵育 15 min; PBS 冲洗, 3 min  $\times$  3 次, DAB 显色, 镜下控制反应, 自来水充分冲洗, 苏木素轻度复染细胞核, 常规逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。结果判定: ①按染色强度计分: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为黄褐色或棕褐色。②按阳性染色细胞百分率计分: 高倍镜下每张切片选择 10 个有代表性的视野, 每个视野计数 100 个肿瘤细胞, 共计数 1 000 个细胞, 计算阳性细胞表达率。0 分为阳性细胞数 < 20%, 阳性细胞数 20%~50% 为 1 分, > 50% 为 2 分。将 ①  $\times$  ② 的结果分为以下等级: 0 分为阴性(-), 1 分为弱阳性(+), 2~3 分为阳性(+)

+) , 4分为强阳性(+++)

**1.2.7 RT-PCR反应:** 细胞培养及处理方法同上, 分别设对照组、G4PAMAM/VEGFASODN组、G4PAMAM/VEGFASODN组和G4PAMAM/VEGFMSODN组, 转染48 h后, 按Trizol提取试剂盒的说明书进行细胞总RNA的提取。取 $5 \times 10^6$ 个细胞, 加Trizol 1 ml混匀, 静置5 min, 加入0.2 ml氯仿, 振荡15 s; 静置5 min, 离心吸取上层无色水相, 加入0.5 ml异丙醇; 静置10 min, 离心, 弃上清, 加入1 ml 75%乙醇。依cDNA第一链合成反应试剂盒的说明书进行逆转录反应。总RNA 1  $\mu$ l, 随机引物1  $\mu$ l, 处理水10  $\mu$ l, 混匀, 70 $^{\circ}$ C培养5 min, 冰上冷却, 短暂离心; 加入5 $\times$ reaction buffer 4  $\mu$ l, RNase抑制剂1  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP Mix 2  $\mu$ l, 混匀, 25 $^{\circ}$ C温浴5 min; 加入M-Mulv逆转录酶1  $\mu$ l, 25 $^{\circ}$ C温浴10 min, 42 $^{\circ}$ C培养60 min, 70 $^{\circ}$ C培养10 min。VEGF引物序列: 正义链: CCCACTGAGGAGTCCAACAT; 反义链: CATTACACGTCACGGATC;  $\beta$ -actin引物序列: 正义链: CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG; 反义链: GGAGCAATGATCTTGATCTTC; 后行PCR扩增, 取引物各1  $\mu$ l, Master Mix 12.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O补至25  $\mu$ l, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性, 3 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min; 退火55 $^{\circ}$ C, 50 s; 延伸72 $^{\circ}$ C, 40 s; 循环32次, 再延伸5 min。扩增产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 30 min后于凝胶成像系统扫描并测定灰度值, 以 $\beta$ -actin作为内参照, 计算VEGF与 $\beta$ -actin表达量的比值。

**1.2.8 血管内皮生长抑制实验:** 将MDA-MB-231细胞进行常规培养, 每孔细胞数为 $1 \times 10^4$ 个, 接种于96孔板, 分为5组: 对照组、G4PAMAM组、G4PAMAM/VEGFASODN组、G4PAMAM/VEGFASODN组和G4PAMAM/VEGFMSODN组, 每组设有5个复孔。待细胞完全贴壁后, PBS洗涤3次, 更换细胞液, 分别加入相应复合物, 用不含小牛血清的RPMI 1640培养液配制, 培养72 h后, 收集各组培养液于无菌的冻存管中, 800 r/min离心8 min, 收集上清液, 低温冰箱保存。内皮细胞生长抑制实验也相应分为5组, 每组设有5个复孔。在96孔

板上接种传代至3~5代的牛主动脉血管内皮细胞, 细胞数为 $1 \times 10^4/200 \mu$ l, 细胞贴壁生长后更换200  $\mu$ l含小牛血清的RPMI 1640培养液继续培养24 h, 吸去培养液, 在各组中加入150  $\mu$ l含10%小牛血清的RPMI 1640完全培养液, 再加入相应各组乳腺癌细胞上清液50  $\mu$ l。实验中另设只含200  $\mu$ l 10%小牛血清的RPMI 1640培养液不含牛主动脉血管内皮细胞组。96孔板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中, 继续培养24 h、48 h、72 h后收集牛血管内皮细胞, 行MTT法检测各组内皮细胞生长情况, 用多功能微板测试系统于570 nm处测定吸光值A, 计算相对增殖率(RGR),  $RGR(\%) = (\text{实验组A值}/\text{空白对照组A值}) \times 100\%$ 。

**1.3 统计学处理** 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 12.0统计分析软件进行数据的统计学处理, 实验数据采用重复测量的方差分析进行处理, 组间比较采用LSD-*t*检验方法,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 转染复合物的电镜检测结果** 透射电镜显示, G4PAMAM/VEGFASODN的直径约10 nm, 呈较均匀的网状排列(图1)。

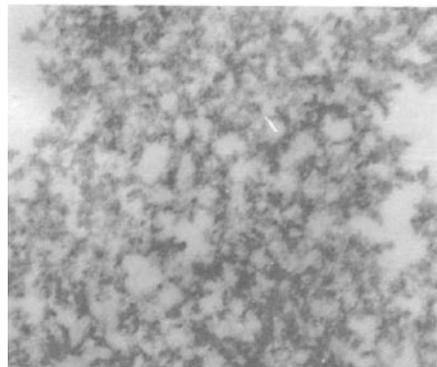
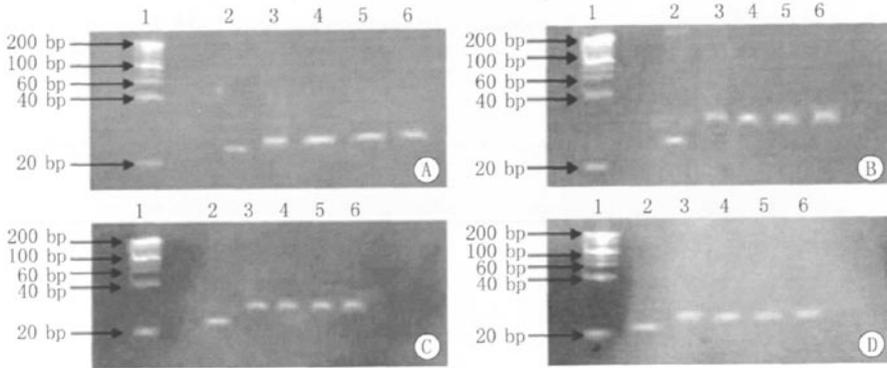


图1 G4PAMAM/VEGFASODN的透射电镜( $\times 100\ 000$ )

Fig. 1 The transmission electron microscope for G4PAMAM/VEGFASODN Magnification=100 000

**2.2 G4PAMAM/VEGFASODN 复合物的酸碱稳定性** 变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,G4PAMAM/VEGFASODN 酸碱度从 5 到 10 的范围内具有较高的稳定性,不同电荷比的

G4PAMAM/VEGFASODN 均没有出现被解离的现象(图 2)。不同酸碱度对不同电荷比的 G4PAMAM/VEGFASODN 复合物的影响证明了此复合物是比较稳定的,能够转染入细胞。



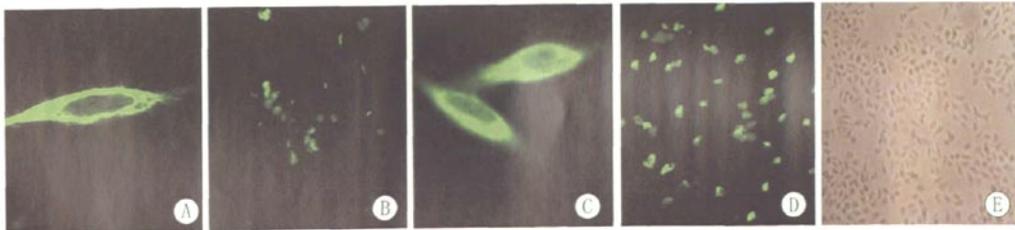
A:1 : 10、B:1 : 20、C:1 : 30、D:1 : 40; 1:Maker 组、2:单纯 ASODN 组、3:单纯 G4PAMAM/VEGFASODN 组、4~6:酸碱度分别为 10、7.5、5 G4PAMAM/VEGFASODN 组

**图 2** 不同电荷比 G4PAMAM/VEGFASODN 酸碱稳定性电泳实验

**Fig. 2** The acid base stability of G4PAMAM/VEGFASODN under different electric charge ratio was analyzed by Degenerative PAGE

**2.3 体外转染率的测定** 在激光共聚焦显微镜下观察到发出绿色荧光的细胞,表明 G4PAMAM 已成功的将 VEGFASODN 导入 MDA-MB-231 细胞株中,并表达出绿色荧光蛋白(图 3)。荧光显微镜下可见在 24 h 时细胞内已有绿色荧光的表达,此后逐渐增多,48 h 后可获得最高的转染效率,72 h 仍可维持较高的表达水平,之后荧光强度有所衰减。当 VEGFASODN

与 G4PAMAM 以 1 : 40 的电荷比混合时,发出绿色荧光蛋白的细胞比其余电荷比混合时明显增多。采用流式细胞仪测定各转染组转染率(表 1、图 4),不同电荷比的复合物组的转染率与脂质体组存在统计学差异( $P < 0.01$ ),G4PAMAM 以 1 : 30 及 1 : 40 的电荷比混合时转染率无明显差异( $P > 0.05$ )。采用重复测量方差分析, $F = 97858.974, P < 0.01$



A:脂质体组转染 MDA-MB-231 单个细胞 48 h GFP 的表达;B:脂质体组转染 MDA-MB-231 细胞株 48 h GFP 的表达;C:1 : 40 G4PAMAM/VEGFASODN 组转染 MDA-MB-231 单个细胞 48 h GFP 的表达;D:1 : 40 G4PAMAM/VEGFASODN 组转染 MDA-MB-231 细胞株 48 h GFP 的表达;E 未转染的 MDA-MB-231 细胞株

**图 3** 不同处理组转染 MDA-MB-231 细胞株 48 h GFP 的表达

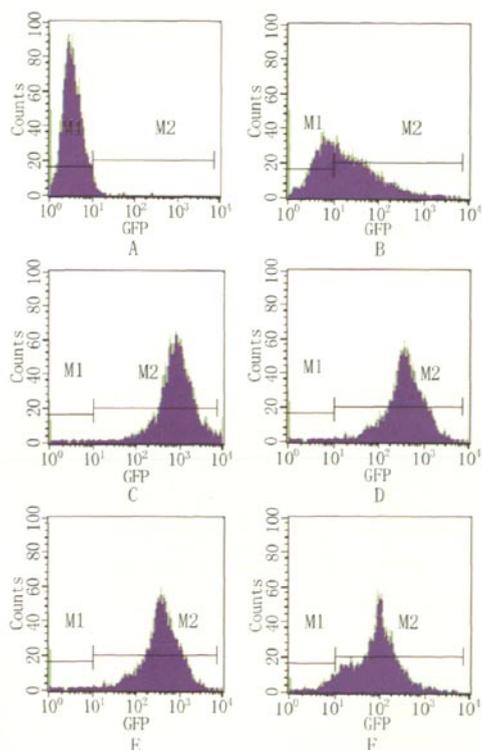
**Fig. 3** GFP expression of MDA-MB-231 cell line in different groups at 48 h after the transfection

表1 采用流式细胞仪测定各转染组转染率

Table 1 Transfection rate was detected by FCM (n=5,  $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	对照组	处理组
脂质体组	1.43±0.06*	56.09±0.69 <sup>△</sup>
G4PAMAM/VEGFASODN 组		
1:10	1.43±0.06	98.08±0.05 <sup>△*</sup>
1:20	1.43±0.06	98.32±0.05 <sup>△*</sup>
1:30	1.43±0.06	98.38±0.05 <sup>△*</sup>
1:40	1.43±0.06	98.74±0.03 <sup>△*</sup>

与对照组比较, <sup>△</sup>P<0.01; 与脂质体组比较, \*P<0.01; 与 1:40 G4PAMAM/VEGFASODN 组比较, \*P<0.01



A: 无复合物作用的MDA-MB-231细胞株的转染率; B: 脂质体组中MDA-MB-231细胞株的转染率; C: 1:10 G4PAMAM/VEGFASODN组; D: 1:20 G4PAMAM/VEGFASODN组; E: 1:30 G4PAMAM/VEGFASODN组; F: 1:40 G4PAMAM/VEGFASODN组

图4 采用流式细胞仪测定各转染组中MDA-MB-231细胞株的转染率

Fig. 4 Detection of the transfection rate of MDA-MB-231 cell line *in vitro* by FCM

2.4 MTT法测定的细胞相对增殖率 MTT法显示各组转染物对细胞有轻度的毒性, G4PAMAM/VEGFASODN 随电荷比增高细胞活力逐渐下降, 随时间延长细胞活力逐渐恢复(表2), 前者可能由于G4PAMAM浓度升高引起。据此结果可看出各组间比较有差异, 不同时间之间也有差异(P<0.01), 对照组与其他组间均有差异(P<0.01), 而两两比较脂质体组、1:10 G4PAMAM/VEGFASODN组及1:20 G4PAMAM/VEGFASODN组之间无差异(P>0.05), 1:30 G4PAMAM/VEGFASODN组和1:40 G4PAMAM/VEGFASODN组之间无差异(P>0.05), 脂质体组及1:10 G4PAMAM/VEGFASODN组均与1:30 G4PAMAM/VEGFASODN组和1:40 G4PAMAM/VEGFASODN组间有统计学差异(P<0.05)。

2.5 免疫组化法检测 VEGF 蛋白的表达 VEGF 阳性主要表现为肿瘤细胞胞浆呈棕黄色, 着色深浅不一。免疫组化法结果显示(表3、图5), 在MDA-MB-231细胞中, 转染前 VEGF 蛋白阳性表达率(%)为49.04±0.47, 阳性染色呈黄褐色, 定位于细胞浆, 少量位于胞核。VEGF 蛋白在 G4PAMAM/VEGFASODN 组转染后的MDA-MB-231细胞胞浆中的染色强度明显减弱, 为淡黄色, 阳性表达率(%)为29.22±0.37, 定位于细胞浆中, 少量位于胞核。G4PAMAM/VEGFASODN组及G4PAMAM/VEGFMSODN组阳性表达率(%)分别为41.34±0.21、39.20±0.34, 定位于细胞浆中, 少量位于胞核。可见, G4PAMAM/VEGFASODN能

表 2 MTT 法测定各处理组的细胞OD值

Table 2 Optical density value of different groups detected by MTT method( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组 别	24 h	48 h	72 h
对照组	1.72±0.10*	2.54±0.09*	2.51±0.08*
脂质体组	1.57±0.06	2.38±0.09	2.36±0.04
G4PAMAM/VEGFASODN 组			
1:10	1.49±0.04	2.38±0.06	2.40±0.10
1:20	1.42±0.10	2.35±0.08	2.40±0.03
1:30	1.42±0.12 <sup>△</sup>	2.29±0.09 <sup>△</sup>	2.33±0.08 <sup>△</sup>
1:40	1.41±0.03 <sup>△</sup>	2.29±0.18 <sup>△</sup>	2.30±0.06 <sup>△</sup>

与脂质体组比较,\* $P<0.05$ ;与1:10 G4PAMAM/VEGFASODN 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ (采用重复测量方差分析,组之间 $F=17.857, P<0.01$ ,时间之间 $F=1025.372, P<0.01$ )

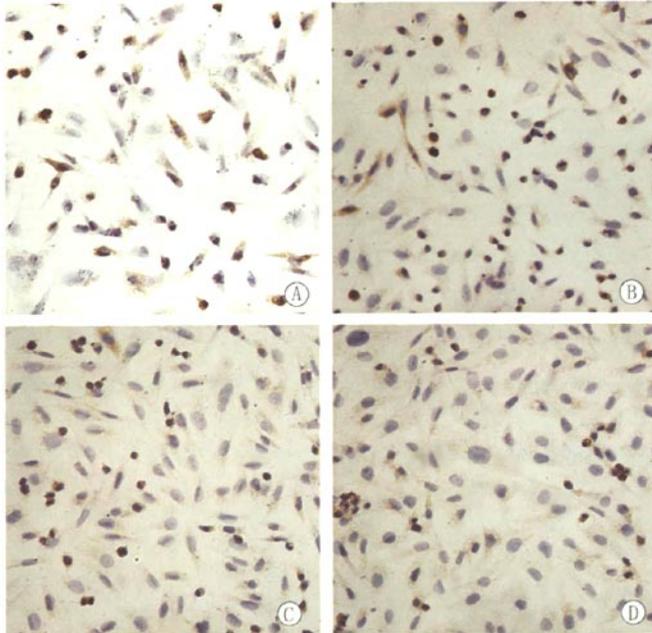
显著抑制MDA-MB-231 细胞中 VEGF 蛋白的表达。(采用重复测量方差分析, $F=2371.139, P<0.01$ )

2.6 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达水平

RT-PCR 法结果显示各组在 200 bp 处有特异性 VEGF 条带,在 150 bp 处有内参照  $\beta$ -actin 条带,VEGF mRNA 在转染前后细胞中的相对表达量见表 4、图 6, G4PAMAM/VEGFASODN 组与转染前比较有明显差异( $P<0.01$ ),各组间比较亦有显著差异( $P<0.01$ )。结果表明,反义 VEGF 基因能明显抑制 MDA-MB-231 细胞中 VEGF mRNA 的表达(采用重复测量方差分析, $F=168.881, P<0.01$ )。

2.7 G4PAMAM/VEGFASODN 对血管内皮细胞生长的作用

血管内皮细胞生长抑制实验显示(表 5),24 h 后 G4PAMAM/VEGFASODN 组表现出明显的细胞毒性,而 G4PAMAM/VEGFASODN 组及 G4PAMAM/VEGFMSODN 组仅有轻中度的细胞毒性,48 h 后则均出现轻度的细胞毒性,G4PAMAM 组仅表现轻度的细胞毒性,72 h 后内皮细胞活力逐渐恢复。各组间比较有差异,不同时间之间也有差异( $P<0.01$ );而两两比较 G4PAMAM 组与 G4PAMAM/



A: VEGF 蛋白在无复合物作用的 MDA-MB-231 细胞株 48 h VEGF 蛋白的表达; B: G4PAMAM/VEGFASODN 作用于 MDA-MB-231 细胞株 48 h VEGF 蛋白的阳性表达; C: G4PAMAM/VEGFASODN 作用于 MDA-MB-231 细胞株 48 h VEGF 蛋白的阳性表达; D: G4PAMAM/VEGFMSODN 作用于 MDA-MB-231 细胞株 48 h VEGF 蛋白的阳性表达

图 5 免疫组化法检测 MDA-MB-231 细胞株中 VEGF 蛋白的表达(SP×400)

Fig. 5 The expression of VEGF protein detected by Immunohistochemistry

表3 MDA-MB-231 细胞 VEGF 蛋白的阳性表达

Table 3 The expression of VEGF protein of MDA-MB-231 cell line detected by immunohistochemistry

组别	转染前	转染后
G4PAMAM/VEGFASODN 组	+++	++
G4PAMAM/VEGFASODN 组	+++	+
G4PAMAM/VEGFMSODN 组	+++	++

VEGFASODN 组之间无差异 ( $P > 0.05$ ), G4PAMAM/VEGFASODN 组与 G4PAMAM/VEGFMSODN 组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); G4PAMAM 组与 G4PAMAM/VEGFASODN 组、G4PAMAM/VEGFMSODN 组及对照组之间均有差异 ( $P < 0.05$ ), 对照组及 G4PAMAM/VEGFASODN 组与其余各组之间均有统计学差异 ( $P < 0.01$ ).

表4 MDA-MB-231 细胞 VEGF mRNA 的阳性表达

Table 4 The expression of VEGF mRNA of MDA-MB-231 cell line detected by RT-PCR

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	转染前	转染后
G4PAMAM/VEGFASODN 组	0.85 ± 0.03	0.76 ± 0.04*
G4PAMAM/VEGFASODN 组	0.85 ± 0.03	0.43 ± 0.03* <sup>△</sup> *
G4PAMAM/VEGFMSODN 组	0.85 ± 0.03	0.70 ± 0.02*

与转染前比较, \* $P < 0.01$ ; 与 G4PAMAM/VEGFASODN 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$ ; 与 G4PAMAM/VEGFMSODN 组比较, \* $P < 0.01$

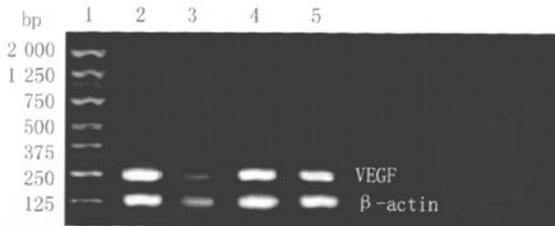
表5 不同处理组作用于 MDA-MB-231 细胞株不同时间的 OD 值

Table 5 Optical density value of MDA-MB-231 cell line with different treatment at different time

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.52 ± 0.05 <sup>▲</sup>	1.19 ± 0.02 <sup>▲</sup>	1.52 ± 0.04 <sup>▲</sup>
G4PAMAM 组	0.40 ± 0.03 <sup>▲</sup>	1.08 ± 0.08 <sup>▲</sup>	1.45 ± 0.06 <sup>▲</sup>
G4PAMAM/VEGFASODN 组	0.39 ± 0.05 <sup>▲</sup>	1.07 ± 0.08 <sup>▲</sup>	1.43 ± 0.06 <sup>▲</sup>
G4PAMAM/VEGFASODN 组	0.32 ± 0.04*	0.90 ± 0.05*	1.35 ± 0.05*
G4PAMAM/VEGFMSODN 组	0.38 ± 0.02 <sup>▲</sup>	0.98 ± 0.09 <sup>▲</sup>	1.38 ± 0.07 <sup>▲</sup>

与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 G4PAMAM/VEGFASODN 组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.01$  (采用重复测量方差分析, 组之间  $F=23.270, P < 0.01$ ; 时间之间  $F=2784.393, P < 0.01$ )



1: Maker; 2: 对照组; 3: G4PAMAM/VEGFASODN 组; 4: G4PAMAM/VEGFASODN 组; 5: G4PAMAM/VEGFMSODN 组

图6 MDA-MB-231 细胞 VEGF mRNA 的表达水平

Fig. 6 The level of VEGF mRNA detected by RT-PCR

### 3 讨论

乳腺癌的发生是以多个癌基因在不同的时间和空间上, 经不同途径激活和不同的抑癌基因失活为基础的多步骤过程。随着医学分子生物学研究的深入和应用以及人们对疾病认识水平的提高, 基因治疗逐渐成为肿瘤生物治疗学中最具潜力的方法之一<sup>[3]</sup>。基因治疗是应用一定的方法将具有功能的外源基因或其他遗传物质导入患者体内, 从而使患者由于基因突变所致的临床症状得到减轻、代偿和纠正

的治疗方案,是继手术、放疗、化疗、免疫治疗之后的第 5 种治疗模式<sup>[4]</sup>。目前对乳腺癌的基因治疗主要集中在免疫基因治疗、肿瘤抑癌基因治疗、凋亡基因治疗、化学基因治疗、基因敲除基因治疗和抗血管生成基因治疗、多基因联合治疗等方面<sup>[6]</sup>。肿瘤基因治疗的实施主要包括以下两个方面:①寻找具有治疗意义的目标基因;②建立有效的靶向基因载体系统。

抗血管形成是肿瘤治疗的一个全新的领域,其中抗肿瘤血管形成基因治疗更具前景。通过抑制 VEGF 而达到抗肿瘤血管形成的目的虽然目前尚处于实验阶段,但已取得了令人鼓舞的结果。Salch 等和 Im 等<sup>[7]</sup>应用 VEGF 反义核酸在裸鼠上进行实验,发现 VEGF 反义核酸技术能有效下调肿瘤细胞的 VEGF 表达,抑制肿瘤的血管形成,有明显的治疗作用,且直接以肿瘤组织内皮细胞为靶细胞的抗血管形成基因治疗,可以避免长期使用肿瘤血管形成抑制因子或促血管形成因子抗体可能诱导肿瘤出现的“耐药现象”,基因治疗的靶向性明确、对正常组织血管形成的影响较小、特异性强和对原发肿瘤和转移瘤都有良好疗效等优点。另外,由于抗肿瘤血管形成基因治疗不受肿瘤细胞周期的影响,故而是其他基因治疗方案的良好补充。目前抗肿瘤血管形成的基因治疗至今还处于体外和动物试验阶段,不少问题仍有待于解决<sup>[8]</sup>,如抗 VEGF 治疗只能使肿瘤缩小,而不能使肿瘤完全消失而达到根治;又如抗肿瘤血管形成治疗必须长期进行,而长期治疗又可能影响伤口愈合和女性月经周期的变化。另外,抗血管形成治疗的器官靶向性问题也未得到很好的解决。

Samoto 等<sup>[9]</sup>发现,VEGF 及其受体是抗血管生成治疗肿瘤的理想靶位。动物实验研究也证实 VEGF 参与肿瘤转移灶的发生发展,VEGF 和受体失活能降低肿瘤细胞转移能力,故而针对 VEGF 及其受体的抗肿瘤血管形成治疗近年来已成为肿瘤抗血管治疗的一个重要靶点。我们将 VEGF 作为反义寡核苷酸药物治疗的靶点,通过抑制 VEGF 的表达来抑制肿瘤细胞的生长,这为基因药物治疗开辟了广阔的前景。同时,为了使 ODN 保持结构稳定性,增加对核酸酶的抗性,采取了对 ODN 的磷酸二酯键骨

架中磷原子硫代修饰方法。

本实验在激光共聚焦显微镜下,观察了培养的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞对全硫代修饰的 VEGFASODN 的摄入及其在细胞内的定位,定量分析了不同电荷比 ASODN 随时间变化的作用规律。结果显示,在 24 h、48 h 及 72 h,MDA-MB-231 细胞内摄入 FITC 标记的 ASODN 含量随着时间的延长,转染效率增加,其最佳转染时间在 48 h 左右,且效果稳定。转染后的 MDA-MB-231 细胞形态基本正常,没有明显的细胞坏死,可能由于 PAMAM 树枝状分子代数较低,分枝少,分子内部含有空腔,毒性较代数更高的分子弱,以及肿瘤细胞具有完整的细胞结构以及旺盛的增殖能力所致。G4PAMAM/VEGFASODN 复合物主要分布于细胞质,荧光强度不均,呈斑点状,提示该复合物达到细胞膜后,即形成由膜包裹的小体,通过内吞作用进入细胞。这样一方面可以保护和稳定被输送物质,另一方面也可以实现控制性释放,有利于治疗基因发挥效应。VEGFASODN 经硫代磷酸化修饰后,具有良好的越膜性,并对内、外源性核酸酶的降解具有较强的耐力。尽管 72 h 后细胞内 ASODN 的含量逐渐下降,但其分布密度仍较大,表明一些 ASODN 已与靶基因结合并发挥着抑制靶基因的作用,且抑制作用可发挥 72 h 以上。

免疫组化法检测结果显示,转染 VEGFASODN 的 MDA-MB-231 细胞 VEGF mRNA 表达水平,显著低于 VEGFSODN、VEGFASODN 和对照组,说明转染入细胞的 VEGFASODN 通过上述机制封闭和抑制了 VEGF mRNA 和蛋白表达。反义 VEGF 基因能够抑制 VEGF mRNA 的表达,阻断 VEGF 的合成与分泌,这点与其他学者的研究结果也是相符的。

本实验尚未进行 VEGF 蛋白的定量检测,仍需作进一步的深入研究。同时 G4PAMAM/VEGFASODN 未能使 MDA-MB-231 细胞完全停止表达 VEGF,只能使其表达水平减弱,对抑制肿瘤微血管生成起到一定作用,要达到更好的抑制效果,还必须联合使用多种方法进行综合治疗。

新型载体G4PAMAM具有粒径小而均一、稳定性高、转染率高等优点,且能够起到靶向治疗作用,除了本身具有纳米粒径而形成的被动靶向作用外,在下一步的体内实验中,我们将建立G4PAMAM/VEGFASODN复合物应用于乳腺癌基因治疗的动物模型,此基础上在G4PAMAM末端加上了Her-2单抗,以使其具有主动靶向性。从而多层次、多角度地证实新的基因运载系统能够有效安全地应用于基因治疗,为其以后早日应用于临床提供依据。

#### References:

- [1] HATTORI Y, DING W X, MAITANT Y. Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC-3 cells [J]. *J Control Release*, 2007, 120(1-2): 122-130.
- [2] HAYES D, MILLER K, SLEDGE G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy [J]. *The Breast*, 2007, 16(2): 17-19.
- [3] EDELSTEIN M L, ABEDI M R, WIXON J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(10): 833-842.
- [4] FLOTTE T R. Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 301-305.
- [5] ALTON E. Progress and prospects: Gene therapy clinical trials (part 1) [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(20): 1439-1447.
- [6] SUSAN M, MELODY A C. Targeting metastatic and advanced breast cancer [J]. *Semin Oncol Nur*, 2007, 23(1): 37-45.
- [7] EADEN J A, ABRANS K R, MAYBERRY J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis [J]. *Gut*, 2001, 48(9): 526.
- [8] PERSANO L, CRESCENZI M, INDRACCOLO S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007, 28(1): 87-114.
- [9] JEMAL A, MURRAY T. Cancer statistics 2003 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2003, 53: 5226.
- [10] DANIEL F H, KATHY M, GEORGE S. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy [J]. *The Breast*, 2007, 16(2): 17-19.
- [11] MOHAMMAD A R, MASAKAZU T. Anti-angiogenic therapy in breast cancer [J]. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 2003, 57(10): 463-470.
- [12] FRANCESCO B, PATRIZIA M, YUVAL S, et al. Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology [J]. *Drug Discovery Today*, 2007, 12(19-20): 806-812.
- [12] KHAN A A, BABU J P, GUPTA G, et al. Identifying B and T cell epitopes and studying humoral, mucosal and cellular immune responses of peptides derived from V antigen of *Yersinia pestis* [J]. *Vaccine*, 2008, 26(3): 316-332.
- [13] DAY L A. Conformations of single-stranded DNA and coat protein in fd bacteriophage as revealed by ultraviolet absorption spectroscopy [J]. *J Mol Biol*, 1969, 39(2): 265-277.
- [14] MALM M, ROLLMAN E, USTAV M, et al. Cross-clade protection induced by human immunodeficiency virus-1 DNA immunogens expressing consensus sequences of multiple genes and epitopes from subtypes A, B, C, and FGH [J]. *Viral Immunol*, 2005, 18(4): 678-688.
- [15] WANG L F, YU M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics [J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5(1): 1-15.
- [16] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[责任编辑 黄晓花]

[责任编辑 张荣连]

(上接第591页)