

siRNA 抑制人舌癌细胞 VEGF 表达对 MMP-9 蛋白表达的影响

郝 洁, 于大海, 李 敬, 曹 莹

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30360111)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

作者简介: 郝 洁(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 口腔颌面部肿瘤。E-mail: haojie1004@126.com

通讯作者: 于大海(1968-), 男, 博士, 教授, 科室主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 恶性肿瘤淋巴道转移机理以及治疗研究。

E-mail: yudahai813@yahoo.com.cn

【摘要】 目的 利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制人舌癌 Tca8113 细胞血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 观察其对培养细胞和移植瘤基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 蛋白表达的影响。方法 以稳定转染携带 VEGF-siRNA 真核表达载体的人舌癌 Tca8113 细胞 (VEGF-siRNA1、VEGF-siRNA2) 为实验组, 以转染空载体人舌癌 Tca8113 细胞及未转染的人舌癌 Tca8113 细胞为实验对照组和空白对照组, 将各组细胞分别接种于裸鼠皮下, 用免疫细胞/组织化学法分别测定各组培养细胞和移植瘤 VEGF 及 MMP-9 的蛋白表达。结果 在培养细胞和移植瘤中, 与实验对照组和空白对照组相比, VEGF-siRNA1 组和 VEGF-siRNA2 组 VEGF 染色平均灰度值高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组培养细胞中均未见 MMP-9 表达; 各组移植瘤 MMP-9 染色平均灰度值之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 以 siRNA 干扰沉默人舌癌 Tca8113 细胞 VEGF 基因, 可明显抑制细胞及移植瘤内 VEGF 蛋白表达, 但是对 MMP-9 蛋白的表达无明显影响。

【关键词】 小干扰 RNA; 舌癌; 基质金属蛋白酶; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 Q 753 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)06-0545-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.01

The expression of MMP-9 after the expression of VEGF suppressed by siRNA in human tongue squamous cell carcinoma HAO Jie, YU Da-hai, LI Jing, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human tongue squamous cell carcinoma (Tca8113) in vitro and in vivo, after the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) suppressed by vector-based small interfering RNA (siRNA). **Methods** The eukaryotic expression vector taken as an experimental control and two siRNA targeting VEGF constructed in the vector (VEGF-siRNA1, VEGF-siRNA2) were transfected into human tongue squamous cell carcinoma cell lines (Tca8113). The non-transfected Tca8113 cells were used as negative control. The transfected cells and non-transfected cells were injected subcutaneously on the back of the twenty nude-mice which were divided into four groups randomly ($n = 5/\text{group}$), respectively. The expression of VEGF and MMP-9 in the cultured cells and the xenograft tumors were detected by immunocytochemistry and immunohistochemistry. **Results** Compared with the experimental and negative controls, the VEGF expressions were decreased ($P < 0.05$) in two experimental groups of the cultured cells and xenograft tumors. There was no obvious MMP-9 staining in four groups of cultured cells. There were no significant differences of the MMP-9 expression among four groups of xenograft tumor ($P > 0.05$). **Conclusion** VEGF-siRNA can down-regulate the expression of VEGF in the human tongue squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. However, it may not influence on the expression of MMP-9 efficiently.

【Key words】 Small interfering RNA (siRNA); Tongue squamous cell carcinoma; Matrix metalloproteinases (MMPs); Vascular endothelial growth factor (VEGF)

近年来,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在口腔癌中的作用逐渐受到人们的关注。MMPs通过降解基底膜及细胞外基质(ECM),为血管内皮的迁移和新生血管的延伸创造了必要条件。有学者在对头颈部鳞状细胞癌的研究表明在肿瘤的发展、浸润和转移中,MMP-9蛋白表达与VEGF蛋白表达呈显著正相关,认为MMPs与VEGF可有协同作用^[1]。在前期实验^[2]我们构建两对携带针对VEGF的siRNA的真核表达载体(VEGF-siRNA1,VEGF-siRNA2)分别转染人舌癌Tca8113细胞,建立稳定转染细胞,并成功抑制VEGF基因表达。本实验,我们建立已稳定转染VEGF-siRNA的Tca8113细胞的裸鼠移植瘤模型,并分别检测培养细胞和移植瘤组织内VEGF及MMP-9的蛋白表达变化,了解抑制VEGF蛋白表达对MMP-9蛋白表达的影响。探讨VEGF及MMP-9在口腔癌生长过程中作用机制的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人舌癌细胞株 Tca8113 由中国典型培养物保藏中心提供;Balb/c 裸鼠由北京实验动物研究中心提供;RPMI 1640 培养液(北京 Thermo 公司);小牛血清(杭州四季青公司);鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(浓缩型,SANTA CRUZ 公司),兔抗人 MMP-9 多克隆抗体(即用型,北京中衫金桥公司),二步法免疫组化试剂盒(天津津脉公司)。

1.2 细胞培养 将稳定转染载体携带 VEGF-siRNA 的 Tca8113 细胞(VEGF-siRNA1 组、VEGF-siRNA2 组),稳定转染空载体的 Tca8113 细胞(实验对照组)及未转染的 Tca8113 细胞(空白对照组)^[2],以含青霉素、链霉素和 10% 小牛血清的 RPMI 1640 为培养液,常规培养。

1.3 裸鼠移植瘤模型建立及标本处理 实验用裸鼠,雌性,4~6 周龄,重量 20~26 g,随机分 4 组,每组 5 只,在 25~27℃ 恒温、恒湿(45%~50%)的半屏障系统环境下饲养。收集对数生长期的各组细胞悬液,以 5×10^6 个/ml,0.1 ml/只,分别于每组裸鼠背部皮下接种成瘤。接种后 47 d,处死裸鼠,剥离肿瘤。每个瘤体取部分新鲜组织以 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋切片。

1.4 细胞爬片及免疫细胞/组织化学染色 对数生长期的各组细胞的爬片,以 10% 中性甲醛溶液固定半小时后,SP 二步法免疫细胞化学染色;移植瘤组织切片常规 SP 二步法免疫组织化学染色,鼠抗人

VEGF 单克隆抗体 1:100,兔抗人 MMP-9 多克隆抗体(即用型)。阳性结果判定:肿瘤胞浆或胞膜出现淡至棕黄或棕褐色颗粒为阳性细胞。避开中央坏死区域,400 倍镜下随机取 5 个不连续视野,采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对肿瘤细胞阳性着色平均灰度进行定量测定(平均灰度值越大阳性值越小)。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,作单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组培养细胞免疫细胞化学染色结果 各组培养细胞 MMP-9 免疫细胞化学染色,均未见阳性表达(如图 1 示)。

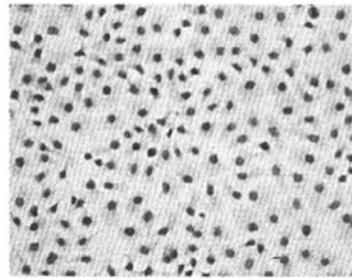


图 1 MMP-9 免疫细胞化学染色(SP, ×400)

2.2 各组移植瘤 VEGF 表达比较 VEGF 表达的阳性颗粒主要位于肿瘤细胞的胞浆内,少数肿瘤血管内皮细胞胞浆内也可见阳性颗粒(如图 2 示)。

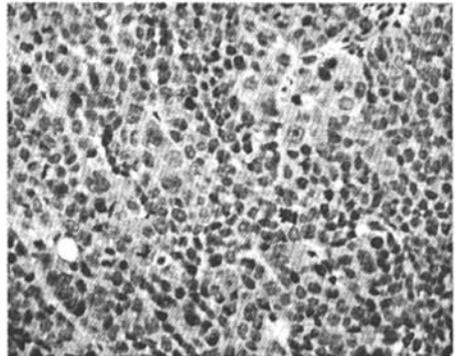


图 2 移植瘤 VEGF 免疫组化染色(SP, ×400)

实验组 VEGF 表达较两对照组明显下降,VEGF-siRNA1 与实验对照组比较有明显差异($q = 3.89, P < 0.05$),与空白对照组比较有显著差异($q = 4.21, P < 0.05$);VEGF-siRNA2 与实验对照组比较有显著差异($q = 3.93, P < 0.05$),与空白对照组比较有显著差异($q = 4.25, P < 0.05$),而实验对照组和

空白对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

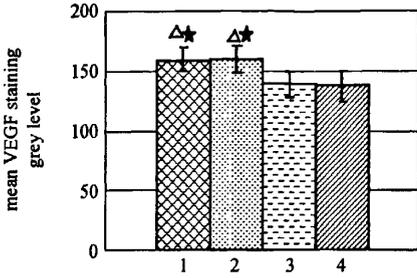


图3 各组 VEGF 免疫组化平均灰度值比较
注:1:VEGF-siRNA1 组; 2:VEGF-siRNA2 组;
3:实验对照组; 4:空白对照组

与空载体组比较, $\Delta P < 0.05$; 与空白对照组相比较, $* P < 0.05$

2.3 各组移植瘤 MMP-9 表达比较 MMP-9 表达主要位于肿瘤细胞以及间质细胞的胞浆中。各组阳性细胞染色较浅(如图4示)。各组平均灰度值之差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5。

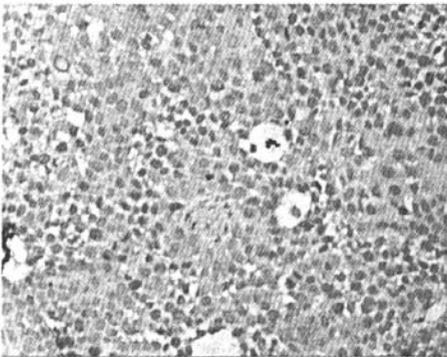


图4 移植瘤 MMP-9 免疫组化染色(SP, $\times 400$)

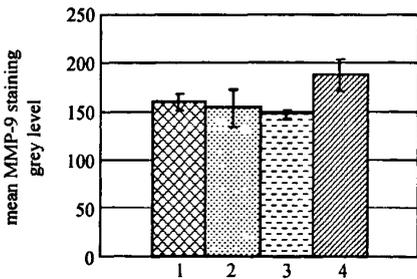


图5 各组 MMP-9 平均灰度值比较
注:1:VEGF-siRNA1 组; 2:VEGF-siRNA2 组;
3:实验对照组; 4:空白对照组

3 讨论

3.1 近期的研究发现 VEGF 与 MMPs 在肿瘤的血管生成及浸润转移过程中存在一定的内在联系,但是研究结果有较大分歧。Wang 等^[3]的体外实验研

究发现,人低分化胃癌细胞(BGC823)与 VEGF 共孵育后,条件培养基中 MMP-9 原酶含量增加,且呈现与 VEGF 剂量依赖性。Bair 等^[4]研究发现,当恶性口腔鳞状上皮细胞癌细胞单独培养时, MMP 的表达很低;但与人包皮成纤维细胞共培养时, MMP 的表达增高,认为 MMP 的表达受到细胞表面受体调节,是细胞与细胞,细胞与基质相互作用的结果。Hong 等^[5]的研究发现,在神经胶质瘤细胞中以 RNAi 干扰 VEGF 使其表达抑制后,并没有影响 MMP-9 的作用,认为内源性 VEGF 表达的下调,不会影响神经胶质瘤的生长及浸润。本实验结果显示,人舌癌 Tca8113 培养细胞,在转染 siRNA 后,细胞 VEGF 表达受抑制^[2],但转染组与未转染组均未检测到 MMP-9 表达(可能尚有微量表达,但就我们目前所使用的免疫细胞化学技术,尚未能检出);而在移植瘤中各组均可见 MMP-9 蛋白的表达,并且在肿瘤的边缘区域以及间质细胞中有较密集表达。与 Bair 等^[4]的研究发现一致,因此我们认为人舌癌细胞 MMP-9 的表达与细胞间的作用有一定关系。

3.2 我们的前期实验已证实,以 siRNA 干扰沉默人舌癌 Tca8113 细胞 VEGF 基因,可明显抑制细胞 VEGF 蛋白表达^[2];并在体外移植瘤实验中观察并检测证实,经 siRNA 转染后 Tca8113 细胞成瘤后,移植瘤的增殖减慢、生长受抑制,并且移植瘤 VEGF 蛋白表达明显降低^[6,7]。但在本实验中观察到抑制 VEGF 蛋白表达后,各组移植瘤 MMP-9 蛋白表达变化未呈现出明显差异,所以 MMP-9 蛋白的表达并没有受到 VEGF 蛋白表达抑制的影响。与 Hong 等^[5]的研究结果基本一致。另外, Wang 等^[3]的研究还发现,在 BGC823 细胞表面 VEGFR-2 表达强阳性,而 VEGFR-1 为阴性表达,考虑为细胞异质性的因素,认为在 BGC823 细胞中, VEGF 可能主要是通过 VEGFR-2 结合,将胞外信息传入胞内,引起 MMPs 合成与分泌的变化;而 Lalla 等^[8]研究发现,在头颈部鳞状细胞癌中均有 VEGFR-1、2、3 的表达,但是在肿瘤相关的纤维母细胞中却没有发现 VEGFR-2 的表达; Bair 等^[4]的研究结果,认为 MMP-9 的表达与成纤维细胞有关,结合以上研究结果,加之我们的研究结果,我们推测在人舌癌细胞中 MMP 蛋白表达可能并不受到 VEGF 的调节。因此,在人舌癌细胞中单纯抑制 VEGF 蛋白的表达并不能抑制 MMP-9 蛋白的表达,至少是影响甚微,提示在人舌癌 Tca8113 细胞中, VEGF 与 MMP-9

蛋白表达并无明显相关性;临床研究中 VEGF 与 MMP-9 表达呈现出的相关性^[2]应尚有其他调节机制。结合各学者的研究结论,我们认为 VEGF 与 MMP 在人舌癌的血管生成及肿瘤浸润转移中的作用受多种因素调节影响。

参考文献

1 Riedel F, Gotte K, Schwalb J, et al. Expression of 92 - kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2000, 17 (6): 1099 - 1105.

2 于大海,曹莹,姚志文,等.载体携带小干扰 RNA 抑制 Tca8113 细胞 VEGF 的表达[J].华西口腔医学杂志,2008,26(5):550 - 552.

3 Wang L, Zhang LH, Li YL, et al. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003, 83(9): 782 - 786.

4 Bair EL, Massey CP, Tran NL, et al. Integrin - and cadherin - mediated induction of the matrix metalloprotease matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2001, 270(2): 259 - 267.

5 Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, et al. Decrease of endogenous vascular endothelial growth factor may not affect glioma cell proliferation and invasion [J]. J Exp Ther Oncol, 2007, 6(3): 219 - 229.

6 于大海,曹莹,李敬,等. RNA 干扰沉默血管内皮生长因子抑制人舌癌细胞增殖的实验研究[J].广西医科大学学报,2008,25(3):329 - 332.

7 曹莹,于大海,李敬,等. VEGF - siRNA 对人舌癌 Tca8113 细胞体内及体外生长影响的初步研究[J].广西医学,2008,30(5): 617 - 619 .

8 Lalla RV, Boisoineau DS, Spiro JD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129(8): 882 - 888.

[收稿日期 2009 - 04 - 27][本文编辑 谭毅 黄晓虹]



人舌癌移植瘤模型中血管内皮细胞来源的实验研究

朱名毅, 姚金光, 黄英华, 蔡捷, 邝晓聪

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30860326),广西自然科学基金资助项目(No. 桂科自 0640202),广西教育厅资助项目[桂教科研(2005)47号]

作者单位:530021 南宁,广西医科大学病理生理学教研室(朱名毅,黄英华,邝晓聪);广西医科大学科学实验中心(蔡捷);533000 百色,右江民族医学院口腔科学教研室(姚金光)

作者简介:朱名毅(1982 -),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤干细胞与肿瘤血管关系

通讯作者:邝晓聪,男,副教授,研究方向:癌干细胞研究。E-mail: bskxc@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 观察人舌癌裸鼠皮下移植瘤模型中肿瘤新生血管内皮细胞的来源。方法 通过皮下移植人舌癌 Tca8113 - M1 细胞建立人舌癌裸鼠移植肿瘤模型,并于肿瘤生长至直径 1cm 时切除肿瘤,对移植瘤进行病理组织学观察,利用免疫组织化学方法检测移植瘤内新生血管内皮细胞的来源,抗体为鼠抗人单克隆抗体 CD34 和大鼠抗小鼠单克隆抗体 CD34;并进行微血管密度(microvessel density, MVD)计数及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达检测。结果 右腋窝皮下接种人舌癌 Tca8113 - M1 细胞 2 周后,6 只裸鼠的肿瘤直径都达到 1 cm 以上,切片 HE 染色可见肿瘤组织病理形态为鳞状上皮细胞癌, MVD 平均值为 10.72 ± 2.12,其中肿瘤新生血管内皮细胞大鼠抗小鼠 CD34 免疫组化结果是阳性,而鼠抗人 CD34 阴性。VEGF 在 6 例移植瘤标本中均阳性表达,平均阳性率为(67 ± 5.6)%。结论 人舌癌移植瘤模型中血管内皮细胞主要来源于宿主裸鼠,并且可能与肿瘤细胞分泌的 VEGF 诱导有关。

[关键词] 舌癌; Tca8113 - M1 细胞; 血管生成; 血管内皮细胞

[中图分类号] Q 343 [文献标识码] A [文章编号] 1674 - 3806(2009)06 - 0548 - 04

doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2009.06.02