

· 论著 ·

人直肠癌组织中脑特异性新生血管抑制因子1表达及该因子抗肿瘤血管生成作用的观察

张辉，王志华，王红梅，康熙雄

【摘要】

目的 探讨直肠癌组织中脑特异性血管生长抑制因子1(BAI1)基因的表达情况及BAI1对肿瘤血管生成和肿瘤生长的作用。

方法 提取20例直肠癌患者(II期6例, III期14例)手术切除的直肠癌、无转移淋巴结、有转移淋巴结组织和直肠腺癌细胞株CC95总RNA, 应用逆转录聚合酶链反应方法检测BAI1的表达。将背部皮下接种CC95细胞(1×10^5 个)的BALB/C裸鼠随机分成3组, 每组10只, 分别在接种后第1、3、5、7、9天于荷瘤部位注射RPMI1640、腺病毒载体(Ad-LacZ)或基因重组BAI1表达腺病毒载体(Ad-hBAI1), 每次0.2 ml, 载体含量2 μ g。每组中5只裸鼠于接种后第15天断颈处死, 取肿瘤组织行抗VIII因子抗体染色, 观察微血管密度(MVD); 另5只接种后每天观察肿瘤体积的变化, 共观察21 d。

结果 20例患者中, 7例(临床II期6例、III期1例)肿瘤组织BAI1表达呈阳性, 13例无表达; 无转移淋巴结均呈阳性表达, 有转移淋巴结均无表达。CC95细胞均无BAI1表达。在BALB/C裸鼠肿瘤移植实验中, Ad-hBAI1组肿瘤组织内血管增生受到明显抑制, MVD(6.2 ± 2.3)明显低于RPMI1640组(16.7 ± 1.9)和Ad-LacZ组(13.4 ± 4.3)(均为 $P<0.05$); 肿瘤生长速度明显低于RPMI1640组和Ad-LacZ组(均为 $P<0.01$)。

结论 BAI1在人直肠癌及转移的淋巴结组织中表达降低; 局部注射Ad-hBAI1表达载体可抑制肿瘤血管生成并抑制肿瘤的生长。

【关键词】 直肠肿瘤; 腺癌; 新生血管形成; 脑特异性血管生长抑制因子1

中国医药生物技术, 2006, 1(1):28-31

www.cmbp.net.cn

肿瘤生长与转移过程中发生着持续而失控的血管生成(angio genesis), 血管生成是肿瘤增殖、侵袭、转移的重要环节^[1]。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,

探寻对血管生成有抑制作用的介质, 以及用抗血管生成物质来阻止肿瘤生长的方案和途径^[2-4]。1997年Nishimori等^[5]克隆出一个具有抑制肿瘤血管生成作用的新的基因, 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, 我们观察了直肠癌患者癌组织和直肠腺癌细胞株BAI1的表达情况, 并观察了BAI1对荷直肠腺癌裸鼠肿瘤血管生长的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 腺病毒载体(Ad-LacZ)及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; RPMI1640培养液, 购自美国Gibco公司。

1.1.2 肿瘤组织和细胞株 人直肠癌组织及无转移、有转移淋巴结取自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院20例直肠癌患者的手术切除标本, 计直肠癌标本20份、无转移淋巴结淋巴结标本65份、有转移淋巴结标本45份。20例患者中男性12例, 女性8例; 年龄35~54岁; 临床分期II期6例, III期14例, 病理报告均为腺癌。

直肠腺癌细胞株CC95(1995年自黑龙江省肿瘤医院采取直肠癌患者手术标本、经50代以上传代培养建立的人直肠腺癌细胞株)由哈尔滨医科大学肿瘤防治研究所培养、建立。

1.1.3 实验动物 健康BALB/C裸鼠, 雌性, 5~6周龄, 从中国医学科学院实验动物研究所获得, 在无病原微生物的洁净条件下饲养。

基金项目: 黑龙江省重点攻关课题(G00C190401)

作者单位: 150036 哈尔滨, 哈尔滨医科大学肿瘤防治研究所[张辉(现在黑龙江省中西医结合研究院), 王志华, 王红梅]; 首都医科大学附属天坛医院(康熙雄)

通讯作者: 王志华, Email: hljwzh000@163.com

收稿日期: 2006-09-26

1.2 方法

1.2.1 BAI1 表达的检测 采用异硫氰酸胍一步法^[6], 提取直肠癌、无转移淋巴结、有转移淋巴结组织和CC95 细胞总RNA, 按逆转录PCR试剂盒的步骤逆转录成cDNA。BAI1 基因的上游引物为 5'ACTCATCCTGCGACGGTGTG 3', 下游引物为 5'TCCCT CAGGTCTTCATGCG 3'。PCR参数: 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 2 min, 30 次循环。取PCR产物行 2%琼脂糖凝胶电泳分析。可见到清晰电泳条带者为阳性表达。

1.2.2 Ad-hBAI1 对肿瘤血管生成的作用 BALB/C 裸鼠 15 只, 每只背部皮下接种CC95 细胞 1×10^5 个后随机分为 3 组, 每组 5 只, 分别于接种后第 1、3、5、7、9 天在荷瘤部位注射RPMI1640(RPMI1640 组)、Ad-LacZ(Ad-LacZ组)或Ad-hBAI1(Ad-hBAI 组), 每次 0.2 ml, 载体含量 2 μ g。第 15 天断颈处死各组裸鼠, 取出肿瘤组织, 4%甲醛固定, 石蜡包埋、切片后, 行抗VIII因子抗体染色, 观察微血管密度(microvessel density, MVD), 即在微血管密度最大区, 取 5 个 200 倍视野的微血管计数计算均数^[7]。

1.2.3 Ad-hBAI1对肿瘤生长的作用 裸鼠荷瘤处理和分组方法同上, 分为RPMI1640 组、Ad-LacZ 组和Ad-hBAI组, 每组 5 只。接种CC95 细胞后每天观察并记录肿瘤生长情况, 共观察 21 d。肿瘤体积计算公式: $V=LW^2 \times 0.52$ (L 表示最大径, W 表示最小径)。

1.3 统计学分析

各组裸鼠肿瘤组织 MVD 和体积数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用未配对计量资料的 t 检验进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

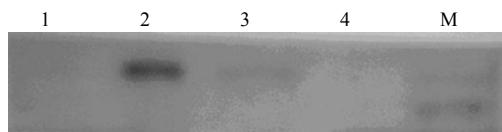
2.1 不同组织和细胞中 BAI1 的表达

20 例直肠癌患者中 7 例(临床 II 期 6 例、III 期 1 例)的肿瘤组织 BAI1 表达呈阳性, 13 例无表达(图 1); 患者的淋巴结组织(图 2, 3)中, 无转移者均呈阳性表达, 有转移者均无表达(图 1)。CC95 细胞均无 BAI1 表达(图 1)。

2.2 BAI1 对荷瘤裸鼠肿瘤血管生成的影响

RPMI1640 组和 Ad-LacZ 组裸鼠肿瘤组织内血管扭曲、分支紊乱、吻合丰富、管腔不规则(图 4), MVD 分别为 16.7 ± 1.9 和 13.4 ± 4.3 ; 而 Ad-hBAI1 组裸鼠肿瘤组织内血管增生受到明显抑制(图 5),

MVD 为 6.2 ± 2.3 , 明显低于 RPMI1640 组($P < 0.05$)和 Ad-LacZ 组($P < 0.05$)。



1: 转移淋巴结; 2: 肿瘤组织; 3: 无转移淋巴结; 4: CC95 细胞; M: DNA 标志物

1: Metastatic lymph node; 2: Tumor tissues; 3: Non-metastatic lymph node; 4: CC95 cells; M: DNA markers

图 1 直肠癌患者手术切除肿瘤组织 BAI1 RT-PCR 产物的凝胶电泳图

Figure 1 The gel electrophoresis map of BAI1 RT-PCR in excised tumor tissues from patients with colorectal cancer.

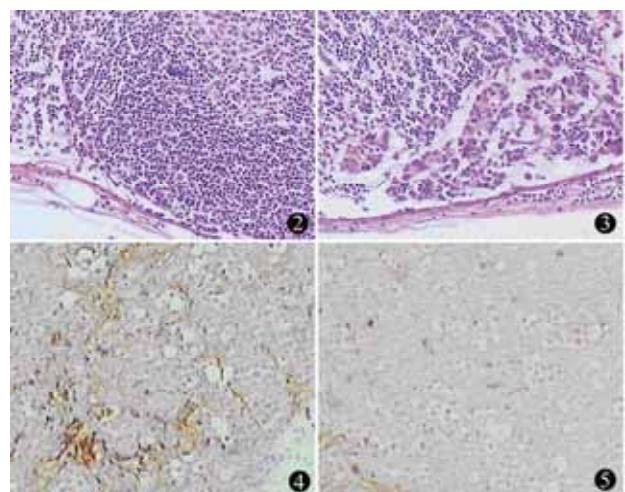


图 2 直肠癌患者手术切除的无转移淋巴结标本 HE $\times 100$

图 3 直肠癌患者手术切除的转移淋巴结标本 HE $\times 100$

图 4 Ad-LacZ 组裸鼠 CC95 细胞移植肿瘤标本抗VIII因子抗体染色图片, 可见较多的血管生成 $\times 200$ **图 5** Ad-hBAI1 组裸鼠 CC95 细胞移植肿瘤标本抗VIII因子抗体染色图片, 显示血管生成受到抑制 $\times 200$

Figure 2 Histological feature of non-metastatic lymph nodes sample excised from patient with colorectal cancer. HE $\times 100$

Figure 3 Histological feature of metastatic lymph nodes sample excised from patient with colorectal cancer. HE $\times 100$

Figure 4 The figure of tumor sample from the nude mice inoculated with CC95 cells was stained with anti-factor VIII antibody in Ad-LacZ group, which shows that many tumor angiogenesis was seen. $\times 200$ **Figure 5** The figure of tumor sample from the nude mice inoculated with CC95 cells was stained with anti-factor VIII antibody in Ad-hBAI1 group, which shows that tumor angiogenesis was inhibited. $\times 200$

2.3 Ad-hBAI1 对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

结果见图6。Ad-hBAI1组裸鼠的肿瘤生长速度明显低于RPMI1640组和Ad-LacZ组，差异均有统计学意义($P<0.01$)。

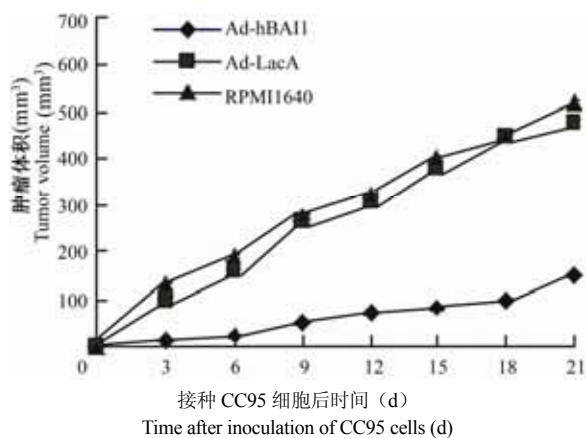


图6 Ad-hBAI1对裸鼠CC95细胞移植肿瘤生长的抑制作用

Figure 6 The inhibiting effect of Ad-hBAI1 on the growth of tumor in nude mice inoculated with CC95 cells

3 讨论

肿瘤血管的新生受众多血管生成因子的严密控制，这些调节因子作为肿瘤基因治疗的靶分子受到人们的关注，有的已进入临床试验阶段^[8-10]。BAI1基因在人脑中特异性表达，编码由1584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，至少有1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^[11]。Kaur等^[11]应用BAI1抗体研究显示BAI1广泛表达在正常脑组织，而28例胶质瘤患者的瘤细胞却表达缺失。Nakamura^[12]认为BAI1是p53的靶向基因，证明p53的生物学功能是通过影响下游基因(downstream gene)而实现的，如与凋亡有关的GML(glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule-like protein)、p53凋亡诱导蛋白1(p53-apoptosis inducing protein-1)和STAG1(stromal antigen 1)，与DNA修复有关的p53R2，与血管生长有关的BAI1等。有研究者发现在结肠癌和肺癌患者的肿瘤组织中BAI1表达明显减低^[13-15]，而在胃癌转移灶中BAI1几乎不表达^[16]。

直肠癌是临幊上较为多见的恶性肿瘤，其发病机制尚未明了。大量的研究证明其发生伴有多种癌基因的改变，显示肿瘤血管生成受这些基因水平的调控，而肿瘤获得血管生成能力是从无血管期进入

血管期进行生长、浸润、转移的关键一步。如果没有新生血管来供应充足的氧气和营养物质，肿瘤不能得以生长和转移，临幊上大量见到的肿瘤由于体积过大而出现暂时的生长停滞或中心坏死便是对这一问题的很好解释。本研究中临床标本的检测结果显示20例直肠癌患者中13例临床III期患者手术切除的癌组织无BAI1表达，在全部转移的淋巴结中不表达，而荷瘤裸鼠实验结果显示BAI1可以抑制肿瘤的新生血管形成和生长，证实BAI1属于抗血管生长因子家族的成员。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。

BAI1何以有如此的功效尚未可知，推测可能与其功能性的p53结合序列诱导p53抗癌基因活化有关^[17, 18]。需要进一步开展的工作是阐明BAI1和p53表达、调控以及二者间相互作用、相互影响的分子学机制，这是摆在医学科研工作者面前的一个崭新课题。

参考文献

- Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, et al. Crystal structure of angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5A resolution. *EMBO J*, 1988, 17(6):1656-1664.
- Ding YH, Javaherian K, Lo KM, et al. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1998, 95(18):10443-10448.
- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M J, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, 274(17):11721-11726.
- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, et al. A novel brain-specific p53-target gene, BAI 1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene*, 1997, 15(18):2145-2150.
- Davis LG, Kuehl WM, Battey JF. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Norwalk: Appleton Lange, 1994:117.
- Walker RA, Dearing SJ, Gallacher B. Relationship of transforming growth factorbeta 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*, 1994, 69(6):1160-1165.
- Mulligan-Kehoe MJ, Kleinman HK, Drinane M, et al. A Truncated Plasminogen Activator Inhibitor-1 Protein Blocks the Availability of Heparin-binding vascular endothelial growth factor A isoforms. *J Biol Chem*, 2002, 277(50):49077-49089.
- Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis. *Int J Mol Med*, 2003, 11(1):33-39.
- Lee JH, Koh JT, Shin BA, et al. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol*, 2001, 18(2):355-361.

- [11] Kaur B, Brat DJ, Calkins CC, et al. Brain angiogenesis inhibitor 1 is differentially expressed in normal brain and glioblastoma independently of p53 expression. Am J Pathol, 2003, 162(1):19-27.
- [12] Nakamura Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. Cancer Sci, 2004, 95(1):7-11.
- [13] Yoshida Y, Oshika Y, Fukushima Y, et al. Expression of angiostatic factors in colorectal cancer. Int J Oncol, 1999, 15(6):1221-1225.
- [14] Hatanaka H, Oshika Y, Abe Y, et al. Nakamura M. Vascularization is decreased in pulmonary adenocarcinoma expressing brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI 1). Int J Mol Med, 2000, 5(2):181-183.
- [15] Fukushima Y, Oshika Y, Tsuchida, et al. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 expression is inversely correlated with vascularity and distant metastasis of colorectal cancer. Int J Oncol, 1998, 13(5):967-970.
- [16] Lee JH, Koh JT, Shin BA, et al. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. Int J Oncol, 2001, 18(2):355-361.
- [17] Kang X, Xiao X, Harata M, et al. Antiangiogenic activity of BAI 1 in vivo: implications for gene therapy of human glioblastomas. Cancer Gene Ther, 2006, 13(4):385-392.
- [18] Yoon Kc, Ahn KY, Lee JH, et al. Lipid-mediated delivery of brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene reduces corneal neovascularization in an in vivo rabbit model. Gene Ther, 2005, 12(7):617-624.

Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 1 in human rectal cancer tissues and its effect on tumor angiogenesis

ZHANG Hui, WANG Zhi-hua, WANG Hong-mei, KANG Xi-xiong

【Abstract】

Objective To explore the expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) gene in rectal cancer tissues and its effect on growth and angiogenesis of the tumor.

Methods Tissue samples of rectal cancer, non-metastatic lymph nodes, and metastatic lymph nodes were collected from 20 patients with rectal cancer (6 with stage II and 14 with stage III). The total RNA was extracted from rectal adenocarcinoma cell line (CC95) and the tissues from the patients, and reversely transcribed to cDNA using RT-PCR to detect the expression of BAI1 gene. Thirty BALB/C nude mice inoculated with CC95 cells (1×10^5) on the back were randomly divided into 3 groups (10 in each). RPMI1640, adenoviral vector (Ad-LacZ), and recombinant adenoviral vector expressing human BAI1 gene (Ad-hBAI1) were injected locally to the tumors in the mice of the three groups respectively on day 1, 3, 5, 7, and 9 (2 ml/time, containing 2 μ g vectors). On the fifth day after the inoculation, 5 mice of each group were killed; the tumor tissues were excised from the mice and stained with anti-factor VIII antibodies to determine the microvessel density (MVD). The other 5 mice of each group were observed for 21 days to record the change of the tumor volume.

Results The BAI1 gene was expressed in 7 (6 with stage II and 1 with stage III) of the 20 rectal cancer tissue samples and all the non-metastatic lymph nodes, but in none of the metastatic lymph nodes and CC95 cells. The MVD in the Ad-hBAI1 group (6.2 ± 2.3) was significantly lower than that in the RPMI1640 (16.7 ± 1.9) and Ad-LacZ (13.4 ± 4.3) groups, showing that Ad-hBAI1 markedly inhibited the angiogenesis of the tumor (both $P < 0.05$). The growth rate of the tumor in the Ad-hBAI1 group was also significantly lower than that in the RPMI1640 and Ad-LacZ groups (both $P < 0.01$).

Conclusions BAI1 is lowly expressed in human rectal cancer tissues and the metastatic lymph nodes. Local injection of Ad-BAI1 recombinant vector can inhibit the angiogenesis and growth of the tumor.

【Key words】 Rectal neoplasms; Adencarcinoma; Neovascularization; Brain-specific angiogenesis inhibitor 1

Author Affiliations: Institute of Oncology, Harbin Medical University, Harbin 150040, China

Corresponding Author: WANG Zhi-hua, Email: hljwzh000@163.com