

Lewis 肺癌小鼠血管内皮生长因子的时间节律性表达^{*}张 燕 何 萍[△] 李立新 马志乾 王瑜玲 苏喜改

(河北省石家庄市第一医院 河北 石家庄 050010)

摘要 目的 检测日间和夜间 Lewis 肺癌小鼠血清中内血管内皮生长因子(VEGF)水平和肺癌组织中 VEGF 蛋白表达的差别,探讨肿瘤血管生成的昼夜节律。**方法** 选择 C₅₇BL 小鼠 30 只,制备 Lewis 肺癌小鼠模型后随机分为日间组(D 组)和夜间组(N 组),在光照-黑暗条件下饲养建立统一同步化日夜节律。随着成瘤过程,应用 ELISA 方法测定两组小鼠模型第 0、3、5、7 天血清中 VEGF 浓度水平;成瘤后第 9 天处死小鼠,应用 Western-blot 法检测瘤体中 VEGF 蛋白的表达,并分别进行相关分析。**结果** 随着成瘤过程,D 组小鼠血清中 VEGF 浓度均显著高于 N 组($P<0.05$);D 组小鼠瘤体组织中 VEGF 蛋白表达灰度值(8.87 ± 1.20)均明显高于 N 组(6.43 ± 1.35),有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Lewis 小鼠休息期(白天)血清中 VEGF 浓度及瘤体中 VEGF 蛋白表达水平均明显高于活动期(夜间),存在着明显的日夜差异,说明肺癌组织的血管生成可能具有一定日夜节律。

关键词 Lewis 肺癌;血管内皮生长因子;肿瘤;近日节律

中图分类号 Q95-3, R734.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012) 26-5057-04

The Explore on Temporal Rhythm Regarding the Expression of VEGF in Lewis Lung Cancer Mouse Model^{*}ZHANG Yan, HE Ping[△], LI Li-xin, MA Zhi-qian, WANG Yu-ling, SU Xi-gai

(Shijiazhuang First Hospital, Shijiazhuang, Hebei, 050010, China)

ABSTRACT Objective: To detect the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum and the expression of VEGF protein in lung cancer tissue at daytime and nighttime, for investigating the circadian rhythm of tumor angiogenesis. **Methods:** Lung cancer mouse model made with 30 C₅₇BL mice were divided into daytime group (D group) and nighttime (N group), which were breed and synchronized to same circadian rhythm. To assay the Concentration of VEGF in serum on day 0, 3, 5, 7. To execute mice on day 9 after forming of tumor and to detect the expression of VEGF protein in lung cancer tissue at daytime and nighttime, then to make analysis respectively. **Results:** The concentration of VEGF in serum and grey scale of VEGF protein in D group were higher than those in N group, and there was significant difference between two groups. **Conclusion:** The circadian rhythm of tumor angiogenesis could exist in lung cancer tissue.

Key words: Lewis lung cancer; VEGF; Tumor; Circadian

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012) 26-5057-04

无论是简单的单细胞生物还是复杂的哺乳动物均存在着近日节律,它使得机体的生理、生化、代谢和行为与外界环境保持一致。肿瘤的发生、生长也不例外,甚至在大多数的抗肿瘤药物应用上,时辰用药也明显影响着疗效。这在许多临床研究中均以证实^[1,2]。

目前研究发现,肿瘤的发生、发展不仅仅在于肿瘤细胞的增殖,更与肿瘤微环境的变化关系密切,而血管生成恰是肿瘤微环境中至关重要的环节。因此近年来抗血管治疗也成为肿瘤治疗的研究热点之一,新的抗血管药物层出不穷^[3]。作为在血管生成中起主要作用的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)其表达和分泌是否也具有一定节律性,如果掌握其表达规律将有利于进一步优化抗血管药物的应用,具有深远的临床意义和指导作用^[4]。本研究即通过比较小鼠模型

血清和肿瘤组织中 VEGF 的分泌和表达水平在昼夜的不同,来探讨 VEGF 表达的近日节律特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与瘤株

Lewis 肺癌瘤株由河北医科大学药理学教研室提供。30 只健康雌性 C57BL/6 小鼠,3-5 周龄,体重 12-19g 清洁级,河北医科大学动物中心提供。其中 6 只作为健康对照。

1.2 实验试剂与仪器

VEGF 试剂盒一抗(1:200)兔抗鼠 VEGF BA0407(武汉博士德公司产品),碱性磷酸酶 标记物羊抗兔 IgG(北京中杉公司产品),硝酸纤维素膜(Milipore 公司产品)。显微镜,电泳仪,凝胶自动成像及分析系统(美国 AlphaInnotech)。

^{*} 基金项目 河北省卫生厅科研基金项目(07142)

作者简介 张燕(1972),女,肿瘤学博士,研究方向 乳腺癌的病因、病理及综合治疗,副主任医师,

电话 13315978336, E-mail 13315978336@163.com

(收稿日期 2012-04-05 接受日期 2012-04-28)

1.3 方法

1.3.1 肿瘤模型的制备和分组 ①小鼠的同步化建立：所有 C57BL/6 小鼠均在光照 - 黑暗 (Light-Dark, LD) 条件下饲养, LD 即采用 12 小时光照 (光照期 6:00-18:00) 与 12 小时黑暗 (18:00-6:00) 交替, 自由饮水进食, 动物房屋室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度为 45%-50%, 同步化 2 周后进行造模。②Lewis 肺癌细胞 (LLC) 悬液制备：以 10%FCS/DMEM 培养液 LLC, 取对数生长期 LLC 反复传代扩增对数生长期细胞至需要量 (1×10^6 /只鼠), 计数, 以无血清培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。③小鼠肺癌模型复制：取制备好的上述细胞悬液, 每只小鼠注射 $100\mu\text{L}$, 即 1×10^6 个细胞 / 只种植于小鼠右前腋下。接种肿瘤细胞后第 6 天, 可观察到直径 3-5mm 大小的皮下肿瘤结节, 第 8 天长至 6-9mm, 成瘤率为 100%。24 只荷瘤小鼠随机分为日间组 (Day 简称 D) 和夜间组 (Night 简称 N), 每组 12 只。

1.3.2 标本获取与处理 ①标本获取 模型复制成功, 于移植处理后第 0、3、5、8 天时, D 组和 N 组小鼠分别于 12:00 点和 24:00 点尾静脉取血, 进行血液学指标的检测; 于 9 天脱颈椎处死, 取肿瘤组织进行处理。②ELISA 法检测血清中 VEGF 水平：置于 37°C 水浴箱孵育 30min 待血清自然析出后 $5000\text{r}/\text{min}$ 离

心 10min, 留取血清 -20°C 保存备 ELISA 法检测 VEGF 水平, 按 ELISA 试剂盒说明书操作。③Western Blot 法检测移植瘤 VEGF 的表达 取约 0.2g 瘤组织块, 匀浆, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 制备分离胶与浓缩胶, SDS-聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳, 转膜, 杂交, 显色, 并以 β -action 内参蛋白作为对照, 扫描照相, 用凝胶成像仪 VIDAS 分析软件, 测定条带的灰度值, 以代表蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据处理用 SPSS10.0 软件包, 进行方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为有差异, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 血清中 VEGF 水平检测结果

第 0 天时可以测到微量的 VEGF, 两组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。第 3 天时两组血清中 VEGF 浓度明显升高, 且 D 组明显高于 N ($P < 0.05$)。第 5 天、第 8 天持续上升, D 组和 N 组差异显著 ($P < 0.05$)。结果说明随着成瘤过程, 血清中 VEGF 浓度持续增高, 且日间 D 组显著高于夜间 N 组, (见图 1, 表 1)。

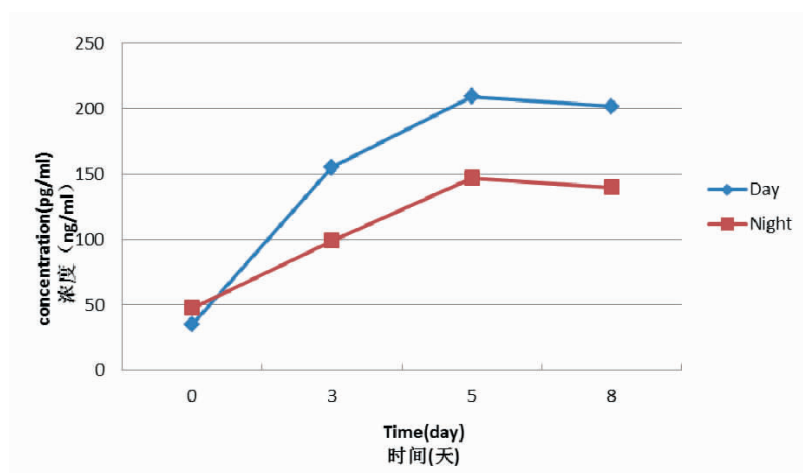


图 1 两组血清中 VEGF 浓度曲线图

Fig.1 The diagram of concentration curves of VEGF in serum

表 1 两组血清中 VEGF 浓度均数

Table 1 The mean of concentration of VEGF in serum in two groups

Day/Group	Day0 (pg/ml)	Day3 (pg/ml)	Day5 (pg/ml)	Day8 (pg/ml)
GroupD	35.02 $\pm$ 9.38	155.28 $\pm$ 1.94	209.37 $\pm$ 2.20	201.94 $\pm$ 7.66
GroupN	47.76 $\pm$ 10.06	99.30 $\pm$ 3.68	147.12 $\pm$ 10.01	139.79 $\pm$ 13.41

2.2 肿瘤组织 VEGF 蛋白表达的差别

电泳后, 所有 VEGF 的扩增产物, 均符合设计的大小, 经 Band Scan 软件扫描, 分析条带的灰度值 (见图 2) 显示, D 组 VEGF 表达的灰度值为 8.22 ± 0.30 , N 组 VEGF 表达的灰度值

为 5.39 ± 0.61 , 二者差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果说明, 肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达存在着日间和夜间的差异, 小鼠的休息期似乎高于活动期。

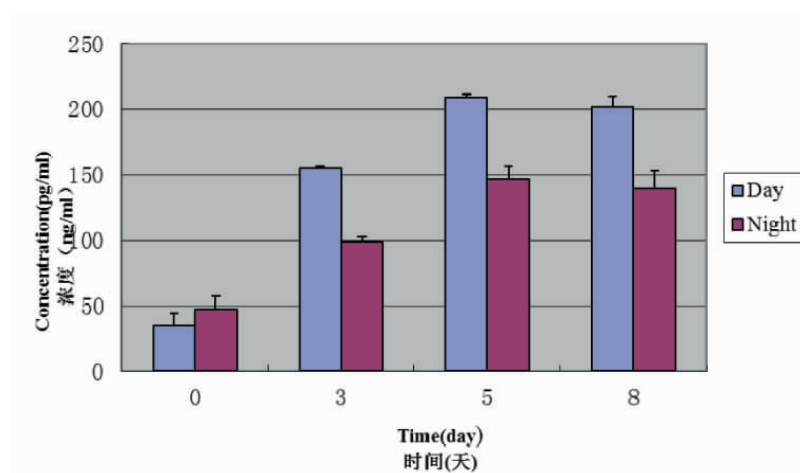


图2 Western blot 法检测肿瘤组织 VEGF 蛋白表达

Fig.2 The expression of VEGF protein in tumor by Western blot

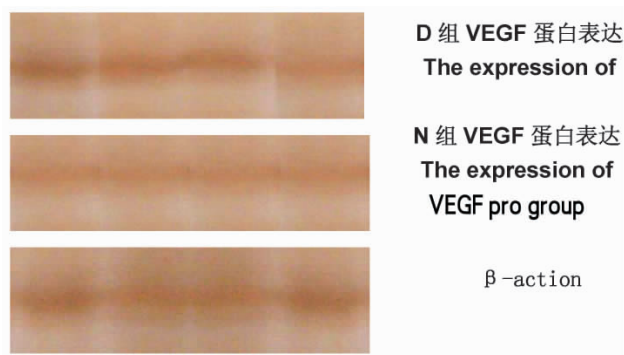


图3 Western blot 法检测肿瘤组织 VEGF 蛋白表达

Fig.3 The expression of VEGF protein in tumor by Western blot

3 讨论

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 也称为血管通透性因子, 它是一高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素, 能诱导内皮细胞增殖, 促进血管生成, 并有明显的血管通透作用。自 1787 年 John Hunter 教授最早作出了血管生成的猜想, 直至 1971 年 Folkman 教授通过研究正式提出了肿瘤血管生成理论^[5]。该理论认为在肿瘤大小不超过 2mm³ 时, 肿瘤组织并无血供, 仅靠弥散功能获取营养, 处于“无血管期”^[6]。之后, 肿瘤细胞能够分泌大量的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 打开“血管生成开关”, 促使供应肿瘤的血管生成, 拥有血供的肿瘤迅速生长, 并得以向远处侵袭、转移^[7]。

VEGF 是目前发现的最重要的促血管生成因子之一, 在肿瘤血管生成过程中发挥关键作用。本研究结果显示, 正常新生大鼠肺组织有一定量 VEGF 表达, 表明 VEGF 是维持正常肺发育所必需的, 与肺组织进一步分化成熟有关。同时, 新生大鼠在低温缺氧和复温复氧过程中, VEGF 蛋白均呈高表达状态, 提示 VEGF 与肺出血形成有关。研究表明, VEGF 参与多种病理生理过程, 与肺水肿、肺出血及肺纤维化均密切相关。目前已有许多研究证实了 VEGF 与肺癌形成的关系, 认为 VEGF 家族具有以下作用: 直接刺激肺血管内皮细胞分化增殖和迁移, 提高

血管通透性, 改变细胞外基质, 诱导血管生成, 诱发恶性胸水形成, 促进淋巴管形成, 促进肿瘤淋巴道转移等^[8,9]。

目前已有多项研究证实了 VEGF 在非小细胞肺癌的阳性表达与肺癌进展和预后的关系^[10,11]。更有深入研究 VEGF 家族成员之一的 VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 在非小细胞肺癌血行转移和淋巴道转移中的作用^[12,13]。我们的研究从动物实验水平再次证实了 VEGF 与肺癌生长和发展的直接关系。

我们在研究中发现, 小鼠血清中 VEGF 水平在肿瘤移植前非常微小, 在第 5 天也就是肿瘤生长至 3-5mm 左右时分泌达高峰, 随着肿瘤继续生长, VEGF 上升幅度逐步减少, 至第 8 天时 VEGF 的水平甚至略低于第五天而进入平台期。对照观察时发现, 肿瘤生长至 12mm-15mm 左右时肿瘤开始出现溃烂, 说明血管生成和能量供给已经不能再满足肿瘤快速生长的需要。VEGF 这种伴随肿瘤生长不同阶段分泌量的节律性变化的也与既往研究所发现的规律相符^[14]。说明 VEGF 是伴随肺癌生长全过程的主要的血管生成促进因素之一, 并且在肿瘤生长血管生成初期分泌上升幅度最大, 肿瘤生长也最迅速, 随着肿瘤增大, 上升幅度增大, 肿瘤增大到一定程度, VEGF 分泌则不再进一步升高。

近日节律存在于大自然的每一个角落, 人体与肿瘤在多种生理活动中都存在着昼夜节律的变化^[15,16]。我们在既往临床观察研究中证实了多种细胞毒药物的时辰应用的价值, 说明了恶性肿瘤节律性研究和探索具有着重要意义^[17,18]。既往有研究认为, 人类肿瘤生成中血管生成在夜间 (即: 休息期) 高于白天 (活动期) (注: 人类和小鼠的活动期和休息期是相反的)^[19,20]。我们在试验中发现了 24 小时中 VEGF 的分泌和蛋白表达存在着一定节律, 而以昼夜 12:00 和 24:00 差异最为显著, 说明这种肺癌组织 VEGF 的分泌和表达的近日节律可能的确存在。

我们的研究中仅仅对比了相差 12 小时的光照和黑暗状态下两个代表性时间点 VEGF 的差别, 而其分泌和作用在 24 小时中还存在怎样动态的变化, 还需要进一步的研究探索, 这对我们进一步的掌握肿瘤的生长特点和生长规律, 了解目前作为肺癌重要治疗靶点之一的 VEGF 的表达规律, 为优化抗血管治疗药物的应用将具有很大的临床指导意义。

参考文献(References)

- [1] Sennino B, Kuhnert F, Tabruyn SP, et al. Cellular source and amount of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in tumors determine response to angiogenesis inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10):4527-4536
- [2] Shiau AL, Teo ML, Chen SY, et al. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(15):245
- [3] Wu L, Huang Z, Qin P, et al. Chemical characterization of a procyanidin-rich extract from sorghum bran and its effect on oxidative stress and tumor inhibition in vivo[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(16):8609-8615
- [4] Nian WQ, Chen FL, Ao XJ, et al. CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line have cancer metastatic stem cell characteristics[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 355(1-2):241-248
- [5] Zhou HJ, Zhang JL, Li A, et al. Dihydroartemisinin improves the efficiency of chemotherapeutics in lung carcinomas in vivo and inhibits murine Lewis lung carcinoma cell line growth in vitro[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(1):21-29
- [6] Reynolds LE, Watson AR, Baker M, et al. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome [J]. *Nature*, 2010, 465(7299):813-817
- [7] Planel S, Salomon A, Jalinot P, et al. A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1 [J]. *Oncogene*, 2010, 29(45):5989-6003
- [8] Sorrentino R, Morello S, Giordano MG, et al. CpG-ODN increases the release of VEGF in a mouse model of lung carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(12):2815-2822
- [9] Ren S, Fengyu, Zuo S, et al. Inhibition of tumor angiogenesis in lung cancer by T4 phage surface displaying mVEGFR2 vaccine[J]. *Vaccine*, 2011, 29(34):5802-5811
- [10] Lee JH, Choi S, Lee Y, et al. Herbal compound famesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2):389-399
- [11] Huh JE, Baek YH, Lee MH, et al. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice[J]. *Cancer Lett*, 2010, 292(1):98-110
- [12] Clere N, Corre I, Faure S, et al. Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(10):2279-2291
- [13] Kim KH, Lee HJ, Jeong SJ, Lee EO, et al. Galbanic acid isolated from *Ferula assafoetida* exerts in vivo anti-tumor activity in association with anti-angiogenesis and anti-proliferation [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(3):597-609
- [14] Matsumoto Y, Zhang Q, Akita K, et al. pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(1):7-13
- [15] Hua H, Wang Y, Wan C, et al. Inhibition of tumorigenesis by intratumoral delivery of the circadian gene mPer2 in C57BL/6 mice[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(9):815-818
- [16] Geusz ME, Blakely KT, Hiler DJ, et al. Elevated mPer1 gene expression in tumor stroma imaged through bioluminescence[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(3):620-630
- [17] Zhang J, Zhu B, Liu Y, et al. High expression of circadian gene mPer2 diminishes radiosensitivity of tumor cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2008, 23(5):561-570
- [18] Zorzet S, Perissin L, Rapozzi V, et al. Seasonal dependency of the effects of rotational stress and cyclophosphamide in mice bearing lewis lung carcinoma[J]. *Brain Behav Immun*, 2002, 16(4):368-382
- [19] Wu M, Zeng J, Chen Y, et al. Experimental chronic jet lag promotes growth and lung metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5):1417-1428
- [20] Hua H, Wang Y, Wan C, et al. Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(7):589-596