

血管内皮生长因子 C 及膜突蛋白表达与宫颈癌恶性进展的相关性

程 杨¹, 何 勉¹, 李 雯², 刘军秀¹, 刘琼珊¹

(中山大学附属第一医院 1. 妇产科, 2. 外科实验室, 广东 广州 510089)

摘 要:【目的】研究宫颈癌恶变过程中血管内皮细胞生长因子 C (VEGF-C)及膜突蛋白 (moesin)的表达变化,并在培养的宫颈癌细胞中初步探讨 VEGF-C 对膜突蛋白的调控作用。【方法】利用临床上活体取材的不同临床分期的宫颈癌组织标本及正常对照宫颈组织, 蛋白免疫印迹法检测 VEGF-C 及 moesin 蛋白的表达情况。体外培养宫颈癌细胞株 HeLa 细胞, 蛋白免疫印迹法测定 VEGF-C 对 moesin 蛋白的表达和磷酸化的调控作用。【结果】随着宫颈癌临床分期的增高, VEGF-C、moesin 蛋白及磷酸化 moesin 蛋白表达水平均随之增加。与正常宫颈组织比较, 宫颈原位癌(CIN)组织中 VEGF-C、moesin、磷酸化 moesin 蛋白表达分别增加了 $45\% \pm 9\%$ 、 $63\% \pm 12\%$ 、 $74\% \pm 16\%$ ($P < 0.05$); 宫颈鳞癌 I 期各蛋白增高幅度分别为 $94\% \pm 18\%$ 、 $104\% \pm 27\%$ 、 $123\% \pm 30\%$ ($P < 0.01$); 宫颈鳞癌 II 期(未放疗化疗)各蛋白表达增高更为显著, 其幅度分别为 $186\% \pm 24\%$ 、 $246\% \pm 37\%$ 、 $194\% \pm 28\%$ ($P < 0.001$)。在培养的宫颈癌细胞株 HeLa 细胞上, VEGF-C (100 $\mu\text{g/L}$) 处理 24 h 后, 可显著增高 moesin 蛋白、磷酸化 moesin 蛋白的表达。VEGF-C 单克隆抗体可抑制 VEGF-C 对 moesin 蛋白表达及磷酸化的上调作用。【结论】VEGF-C、moesin 蛋白表达与宫颈癌恶性程度密切相关, 推测 VEGF-C 可能通过上调 moesin 表达及其磷酸化水平而促进宫颈癌的恶性进展。

关键词: 宫颈癌; 血管内皮生长因子 C; 膜突蛋白

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)02-0173-04

Vascular Endothelial Growth Factor and Moesin Protein Promote Cervical Cancer Malignant Progression

CHENG Yang¹, HE Mian¹, LI Wen², LIU Jun-xiu¹, LIU Qiong-shan¹

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, 2. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 To study the status of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and moesin expression in cervical cancer malignant progression and to investigate the modulatory effect of VEGF-C on moesin expression. 【Methods】 Cervical cancer samples in different pathological stages were taken from patients and cervical cancer HeLa cells were cultured. The expression level of VEGF-C and moesin in sample tissues and cultured cells were detected by Western blot. 【Results】 The expression levels of VEGF-C and moesin from sample tissues were gradually increased in parallel with the malignant progression of cervical cancer. Compared with control (normal cervix), the magnitude of increase of VEGF-C, moesin as well as phospho-moesin protein expression in CIN were $45\% \pm 9\%$, $63\% \pm 12\%$, and $74\% \pm 16\%$ ($P < 0.05$), respectively. In cervical squamous carcinoma at stage I, they were increased by a magnitude of $94\% \pm 18\%$, $104\% \pm 27\%$, and $123\% \pm 30\%$ ($P < 0.01$), respectively. These proteins were more highly expressed in cervical squamous carcinoma at stage II, with the enhancement of $186\% \pm 24\%$, $246\% \pm 37\%$, and $194\% \pm 28\%$ ($P < 0.001$) respectively compared to control. In cultured cervical cancer HeLa cells, treatment with VEGF-C (100 $\mu\text{g/L}$) for 24 h enhances the moesin expression and phosphorylation,

收稿日期: 2007-11-25

基金项目: 广东省科技计划基金(2007B031513008)

作者简介: 程杨(1976-), 女, 湖南龙山人, 硕士, 现在广州市第一人民医院妇产科工作, chengyang1976@hotmail.com; 何 勉, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: gz87335487@163.net

which is inhibited by VEGF-C monoclonal antibody. 【Conclusions】 The expression level of VEGF-C and moesin protein are tightly relative to cervical cancer malignant progression. VEGF-C may play the important role in cervical cancer progression through upregulation of moesin expression and phosphorylation.

Key words: cervical cancer; vascular endothelial growth factor C; moesin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):173-176]

宫颈癌浸润和转移是造成宫颈癌患者死亡的主要原因。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 家族成员对宫颈癌的生长及转移具有重要影响^[1]。VEGF-C 是 VEGF 家族的新成员, 通过与其酪氨酸激酶活性受体 VEGFR-3 (Flt4)、VEGFR-2 (Flk1) 结合, VEGF-C 可促进血管以及淋巴管内皮细胞的增殖和迁移, 引发新生血管和新生淋巴管形成, 参与多种恶性肿瘤的发生发展进程^[2-5]。研究表明, VEGF-C 在宫颈癌的表达与转移、侵袭和预后密切相关。然而, 在促进新生血管、淋巴管形成的作用之外, VEGF-C 是否能够促宫颈癌细胞本身的转移和侵袭能力, 目前尚未有文献报道。肿瘤转移的首要步骤为细胞迁移。细胞肌动蛋白骨架的重构是细胞迁移的第一步, 这一过程受埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白(ezrin/radixin/moesin, ERM) 家族调控^[6]。Moesin 蛋白作为 ERM 家族成员之一, 在细胞的生长、运动、迁移、有丝分裂以及信号转导等方面发挥重要作用。因此 VEGF-C 与 moesin 在宫颈癌恶性进展中是否有相关性, VEGF-C 是否可通过调控 moesin 蛋白而发挥其促进宫颈癌细胞的侵袭和转移的作用, 值得我们深入探讨。

1 材料和方法

1.1 宫颈癌组织取材及分组

选取 2005 年 6 月 1 日 ~ 2006 年 8 月 1 日期间中山大学附属第一医院诊治的 11 例宫颈上皮内瘤病变(CIN) III, 14 例宫颈鳞癌 I 期, 8 例宫颈鳞癌 II 期(未行放疗和/或化疗), 作为研究对象。同时取同期因子宫肌瘤行子宫切除的正常宫颈组织 10 例作为对照。组织取材后称质量, 在液氮下按 100 μ L/mg 比例加入蛋白裂解液研磨组织。收集提取液, 4 $^{\circ}$ C 离心(1 000 \times g, 10 min), 取上清液, 按 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2 宫颈癌 HeLa 细胞的培养

选用宫颈癌 HeLa 细胞株(中山大学附属第一医院外科实验室提供), 单层贴壁培养于含 120

mL/L 胎牛血清、20 g/L 谷氨酰胺、10 g/L 青霉素及链霉素的 RPMI 1640 培养基中。细胞培养至 90% 融合后, 加入无血清 RPMI 1640 培养基培养 8 h。之后加入药物处理。VEGF-C 单克隆抗体(购自 Santa Cruz)于药物处理前 1 h 加入。

1.3 免疫印迹法

组织或细胞裂解后, 提取蛋白裂解液。蛋白定量后, 按每孔 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电印迹转移法转至硝酸纤维素膜上, 含 5% 小牛血清白蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1 h 后, 分别与抗 VEGF-C 单克隆抗体、抗 moesin 单克隆抗体、抗磷酸化 moesin 单克隆抗体(以上抗体均购自 Santa Cruz)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后与二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体)室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 试剂反应 1 min, 采用凝胶图象分析仪(美国 GENE 公司)拍照并对条带感光密度进行定量分析。

1.4 统计方法

定量结果均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 SPSS 软件 9.0 进行单因素方差分析(One Way ANOVA)以检验各组之间差异, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 VEGF-C 在不同分期宫颈癌组织中的表达

随着宫颈癌临床分期的增高, VEGF-C 蛋白表达水平也随之增加。与正常宫颈组织比较, 宫颈上皮内瘤病变 III 级组织中 VEGF-C 蛋白表达增加了 45% \pm 9% ($P < 0.05$), 鳞癌 I 期 VEGF-C 蛋白表达进一步增高 94% \pm 18% ($P < 0.01$), 鳞癌 II 期 VEGF-C 蛋白表达增高更为显著, 其幅度为 186% \pm 24% ($P < 0.001$)。分子内参 Actin 含量各组之间无差别, 表明各组蛋白上样量一致(图 1)。

2.2 Moesin 及磷酸化 moesin(P-moesin)在不同分期宫颈癌组织中的表达

Moesin 及 P-moesin 蛋白表达也均随宫颈癌组织恶性程度增高而增加。与正常对照组比较, 其增高幅度分别为: CIN 组织 63% \pm 12%、74% \pm 16% ($P < 0.05$); 鳞癌 I 期 104% \pm 27%、123% \pm 30%

($P < 0.01$); 鳞癌 II (未放疗化疗) $246\% \pm 37\%$ 、 $194\% \pm 28\%$ ($P < 0.001$; 图 1)。

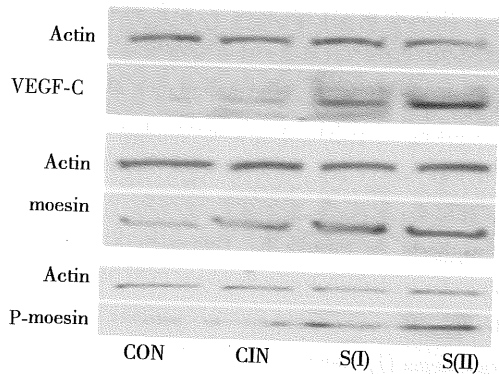


图 1 VEGF-C 在不同分期宫颈癌组织中的表达变化
Fig.1 The status of VEGF-C expression in different stages of cervical cancer tissues

CON: control; CIN: cervical intra-epithelial neoplasia at stage III; S(I): cervical squamous carcinoma at stage I; S(II): cervical squamous carcinoma at stage II.

2.3 VEGF-C 上调 moesin 及 P-moesin 蛋白表达

在培养的宫颈癌细胞株 HeLa 细胞上, VEGF-C ($100 \mu\text{g/L}$) 作用 24 h 后, 可明显增加 moesin 蛋白、P-moesin 蛋白的表达, 其增加幅度分别为 $78\% \pm 12\%$ 、 $92\% \pm 17\%$ ($P < 0.05$)。VEGF-C 单克隆抗体 (终浓度 1:100) 可抑制 VEGF-C 对 moesin 蛋白及 P-moesin 表达的上调作用, 其抑制率分别为 $47\% \pm 9\%$ 、 $63\% \pm 14\%$ ($P < 0.05$; 图 2)。

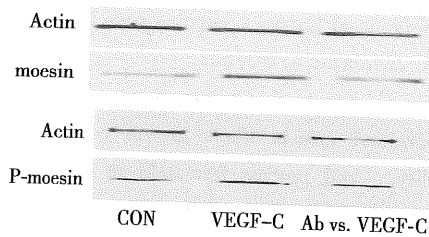


图 2 VEGF-C 作用于 HeLa 细胞 24 h 后对 moesin 及 P-moesin 蛋白表达的影响

Fig.2 The influence of VEGF-C on moesin and moesin expression in HeLa cells

CON: control; VEGF-C: $100 \mu\text{g/L}$; Ab vs VEGF-C: VEGF-C monoclonal antibody (final concentration: 1:100).

3 讨 论

肿瘤向周围淋巴结和远处器官的转移, 为导致

子宫颈癌女性死亡的主要原因。有研究对 420 例 FIGO I b~II b 期病人经盆腔广泛切除和淋巴结清扫术后的 5 年生存率进行了总结, 结果发现, 淋巴结转移阴性者 5 年生存率为 89.3%, 有一枚淋巴结转移者为 69.8%, 而 4 枚以上淋巴结转移者仅为 37.3%^[7]。

宫颈癌转移这一病理生理学过程受多种因素和分子调控。血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 作为一种特异性的血管、淋巴管内皮细胞调节因子, 对宫颈癌的生长及转移具有重要影响。在正常宫颈组织中 VEGF-C 表达量很少, VEGF-C 的表达与宫颈癌组织在子宫肌层浸润的深度、子宫内膜的浸润、盆腔淋巴结的转移和肿瘤血管密度密切相关^[8]。与上述报道结果一致, 本研究结果表明, 正常宫颈组织中 VEGF-C 仅微量表达, 随着宫颈癌恶性程度的增高, VEGF-C 含量逐步显著增加。这一结果证实 VEGF-C 的表达与宫颈癌细胞转移、侵袭能力密切相关。

VEGF-C 促宫颈癌转移的分子机制尚未完全阐明。目前的研究认为, 通过与血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞上受体的结合, 由宫颈癌或癌旁组织细胞分泌的 VEGF-C 可激活丝裂酶原活化蛋白 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路, 刺激新生淋巴管和血管生成, 从而为肿瘤组织提供营养物质, 加速肿瘤的转移过程^[9]。然而, 多种肿瘤组织本身, 如结肠直肠癌细胞、宫颈癌细胞上均有 VEGF 受体的表达^[10-12], 提示 VEGF-C 可直接以肿瘤细胞为靶点, 调控其生物学功能。如在培养的卡波济肉瘤细胞株上发现, VEGF-C 可促进肿瘤细胞本身的迁移和侵袭能力^[13]。

肿瘤转移的首要步骤为细胞迁移, 这一过程由细胞肌动蛋白骨架重构引发和实现。激活的 moesin 蛋白 (磷酸化) 蛋白作为桥梁分子, 介导肌动蛋白与质膜的交联, 引发肌动蛋白骨架的重构, 促进细胞生长、迁移。如在培养的原代神经元细胞中抑制 moesin 的表达, 可抑制神经元肌动蛋白骨架重构, 从而抑制生长锥和神经元轴突的形成^[14]。本研究首次从组织水平上证实, 随着宫颈癌恶性程度的增加, moesin 蛋白表达及磷酸化含量随之增高, 说明 moesin 蛋白表达及其激活在宫颈癌的恶性进程中发挥重要的作用, 并提示在临床上检测该蛋白表达水平可能作为判断宫颈癌恶性程度以及预后的分子标志, 这一观点近年来已在口腔

鳞状上皮细胞癌以及头颈部恶性肿瘤组织中得到了证实^[5]。

本研究进一步证实,在培养的宫颈癌细胞株 HeLa 细胞上,VEGF-C 可促进 moesin 蛋白表达和磷酸化。VEGF-C 单克隆抗体可阻断 VEGF-C 的作用,说明由 VEGF-C 受体引发的下游信号通路在 VEGF-C 调控 moesin 蛋白表达和磷酸化中起到关键作用。这一结果提示,VEGF-C 可能通过调控 moesin 蛋白的表达和磷酸化,引发细胞肌动蛋白重构,进而促进宫颈癌细胞的迁移和转移。

近来的研究表明,小 G 蛋白 RhoA/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)/moesin 为一条重要的细胞内信号转导通路,参与调节肌动蛋白细胞骨架重构。而最新的文献报道显示,VEGF 可通过激活 RhoA/ROCK 信号通路增加血管内皮细胞层的通透性^[1],同时该通路激活也可介导 VEGF 促进血管内皮细胞的迁移的作用。上述的研究背景提示,VEGF-C 有可能通过激活 RhoA/ROCK 信号通路,进而调控 moesin 蛋白的表达和磷酸化。

综上所述,本研究表明,VEGF-C、moesin 蛋白表达与宫颈癌恶性程度密切相关;推测 VEGF-C 可能通过上调 moesin 表达及其磷酸化水平而促进宫颈癌的恶性进展。

参考文献:

- [1] Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies [J]. *Integr Cancer Ther*, 2005, 4(4):315-321.
- [2] Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(12):2879-2887.
- [3] Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2):593-599.
- [4] Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis [J]. *Faseb J*, 2007, 21(4):1003-1012.
- [5] 张惠忠,魏益平,华平,等.非小细胞肺癌血管内皮生长因子-C 和 Survivin 蛋白的表达及其对患者预后的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(6):681-685.
- [6] 程杨,何勉.ERM 蛋白的生物学功能及其与妇科肿瘤的联系 [J]. *国外医学:妇产科学分册*, 2006, 33(5):307-310.
- [7] Girardi F, Haas J. The importance of the histologic processing of pelvic lymph nodes in the treatment of cervical cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 1993, 3(1):12-17.
- [8] Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(4):724-730.
- [9] Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3):209-223.
- [10] Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23):6865-6868.
- [11] Mathur RS, Mathur SP. Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1):206-213.
- [12] Witte D, Thomas A, Ali N, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(3):1463-1466.
- [13] Marchio S, Primo L, Pagano M, et al. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the migration and proliferation of Kaposi's sarcoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(39):27617-27622.
- [14] Paglini G, Kunda P, Quiroga S, et al. Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons [J]. *J Cell Biol*, 1998, 143(2):443-455.
- [15] Madan R, Brandwein-Gensler M, Schlecht NF, et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2006, 28(11):1018-1027.