

血管内皮生长因子及其受体在舌癌细胞中表达及意义

马 健¹, 黄洪章¹, 傅玉茹², 潘朝斌¹

(中山大学附属第二医院 1. 口腔颌面外科; 2. 林百欣医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨人舌癌细胞株血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 KDR、Flt-1 的表达, 进一步认识 VEGF 在舌癌生长过程中的作用机制。【方法】以人脐静脉血管内皮细胞 ECV304 和小鼠成纤维细胞系 L929 作为对照, 应用免疫组化染色和 RT-PCR 方法, 检测体外培养的人舌癌细胞系 Tca8113、GNM 中 VEGF 及其受体的表达。【结果】GNM、Tca8113 中皆有 VEGF 表达, Tca8113 表达 KDR 和 FLT-1, GNM 表达 KDR。【结论】在舌癌的生长过程中可能存在 VEGF 的自分泌机制。

关键词: 血管内皮生长因子; 受体; 舌肿瘤

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)05-0459-04

Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in Human Tongue Carcinoma Lines

MA Jian¹, HUANG Hong-zhang¹, FU Yu-ru², PAN Chao-bin¹

(1. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, 2. Lin Bai-xin Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors in human tongue carcinoma cell lines Tca8113 and GNM. 【Methods】Immunohisto-chemical staining and reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the mRNA and expressions of VEGF and its receptor: VEGFR1(Flt-1) and VEGFR2(KDR) in two human tongue carcinoma cell lines: Tca8113 and GNM, compared with that of ECV-304(human umbilical vein endothelial cells) and L929 (mouse fibroblast). 【Results】GNM、Tca8113 express VEGF protein. mRNA and proteins of KDR and Flt-1 could be detected in Tca8113, KDR mRNA and proteins could be detected in GNM. 【Conclusion】The expressions of FLT-1 and KDR suggest that VEGF may be an autocrine growth factor for human tongue carcinoma, at least for cell lines *in vitro*.

Key words: vascular endothelial growth factor; receptor; tongue neoplasms

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(5):459~462]

肿瘤的血管形成受多种调控因子的调节, 其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为重要的血管生长因子, 也称为血管通透因子(vascular permeability factor, VPF), 具有对血管的内皮细胞的增殖、基底膜的水解、迁移和血管的构建的较强的调控作用^[1, 2]。VEGF有特异

受体 VEGFR1(fms-like tyrosine kinase receptor, FLT-1)和 VEGFR2(kinase insert domain-containing receptor, KDR), VEGF的作用通过受体实现^[3]。血管内皮生长因子受体通常表达于内皮细胞, 最近发现 VEGF受体不仅表达于内皮细胞表面, 而且也表达于非内皮细胞, 尤其肿瘤细胞。国内有肝癌细胞

收稿日期: 2003-04-28

基金项目: “211工程”基金资助项目(中山医科大学 99074); 中山医科大学启动基金资助项目(072014)

作者简介: 马 健(1971-), 男, 广西南宁人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事肿瘤基因治疗。

株 VEGF 及其受体表达报道^[4], 国外报道见头颈肿瘤中有 VEGF 受体表达^[5], 国内未有舌肿瘤 VEGF 受体表达情况。我们在 2002 年 7 月至 10 月间通过免疫组化方法和 RT-PCR 对舌癌细胞株 GNM 和 Tca8113 细胞系中 VEGF 及其受体进行检测, 为进一步研究 VEGF 在舌癌生长的机制提供了一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人舌癌细胞株 Tca8113, 上海第二医科大学口腔医学院建立, 本室保存; 人舌癌细胞株 GNM, 武汉大学口腔医学院建立, 本室保存。小鼠成纤维细胞系 L929 由中山大学附属第二医院医学研究中心保存。人脐血管内皮细胞系 ECV304, 购自中科院上海细胞生物研究所。细胞培养基 RPMI1640, 小牛血清为 Hyclone 公司的产品。兔抗人 VEGF 抗体, 兔抗人 Flt-1 抗体, 兔抗人 KDR 抗体及 SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司。细胞总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。MMLV 逆转录酶购自 Promega 公司, Rnasin Inhibitor、La Taq 聚合酶购自大连宝生物 Takara 公司, OligodT 购自上海博彩生物公司。

1.2 细胞培养

Tca8113、GNM、L929 和 ECV304 细胞在 RPMI1640 + 体积分数 10% 小牛血清的培养液中培养, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中常规培养传代。

1.3 免疫组化染色

将 4 种细胞悬液分别滴加到六孔板中的盖玻片(盖玻片使用前稀盐酸处理, 体积分数 75% 的乙醇浸泡 20 min), 培养 4 h, 待细胞贴壁后加入适量的培养液, 培养 48 h 后取出盖玻片, 以 0.01 mol/L PBS 冲洗, 再以 100 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 以 PBS 代替一抗作空白对照, 参照 SABC 试剂盒中的说明书, 分别行 VEGF、KDR 和 Flt-1 的免疫组化染色。免疫组化阳性表达的标准, 细胞浆中胞浆染成棕黄色, 同时作空白对照, 胞浆无染成棕黄色。

1.4 引物设计合成

参照人 KDR、Flt-1 mRNA 的序列设计引物, 上海博亚生物技术公司合成, 引物序列如下:

Flt-1 正链: 5'-CAA GTG GCC AGA GGC ATG GAG TT -3' (+3262 ~ +3284); Flt-1 负链: 5'-GAT GTA GTC TTT ACC ATC CTG TTG-3' (+3736 ~ +3759)。KDR 正链: 5'-GAG GGC CTC TCA TGG TGA TTG T-3' (+2954 ~ +2975); KDR 负链: 5'-TGC CAG CAG TCC AGC ATG GTC TG-3' (+3640 ~ +3662)^[6]。

1.5 RNA 提取及 RT-PCR

用 4 种细胞各 2×10^6 个, 用 Trizol 提取细胞的总 RNA, 测定 RNA 浓度, 取 2 μ g RNA 溶于 DEPC 处理水, 加入 OligodT 0.5 μ L 后, 70 °C 5 min, 取出后迅速放在冰上 1 min, 加入 200 U/ μ L MMLV 逆转录酶 1 μ L, 40 U/ μ L Rnasin 0.5 μ L, 5xRT buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 42 °C 60 min 合成 cDNA 第一链, 65 °C 5 min 灭活逆转录酶。取 cDNA 5 μ L, GC buffer 12.5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 3 μ L, 正链引物终浓度 0.8 μ mol/L, 负链引物终浓度 0.8 μ mol/L, 5 U/L LA Taq 0.5 μ L, 补加水到 25 μ L。循环参数: 95 °C 9 min, 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后拍照。试验中分别设立空白对照和各样本的 β -actin 对照。

2 结果

2.1 各细胞系免疫组化结果

根据免疫组化染色结果, Tca8113 和 GNM 细胞 VEGF 有表达(图 1, 图 2), 而 ECV304 和 L929 细胞无表达。Tca8113 细胞有 KDR 和 Flt1 表达(图 3 图 4), GNM 细胞中有 KDR 表达(图 5), ECV304 细胞中 KDR 和 Flt-1 均表达(图 6, 图 7), L929 细胞这两种受体无表达。

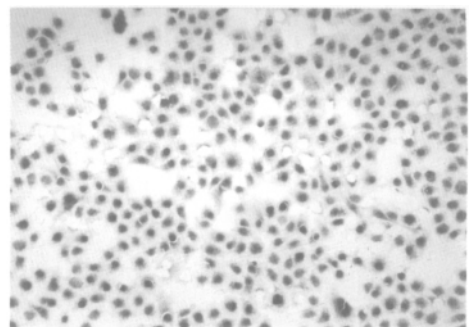


图 1 Tca8113 细胞株 VEGF 染色图
Fig. 1 VEGF staining of Tca8113 cell lines ($\times 100$)

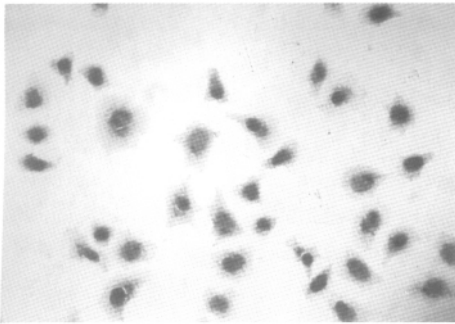


图 2 GNM 细胞株 VEGF 染色

Fig. 2 VEGF staining of GNM cell lines(× 400)

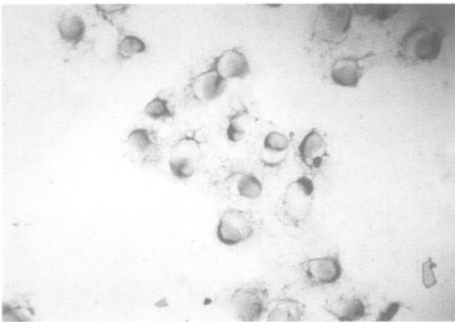


图 3 Tca8113 细胞株 KDR 染色

Fig. 3 KDR staining of Tca8113 cell lines(× 400)

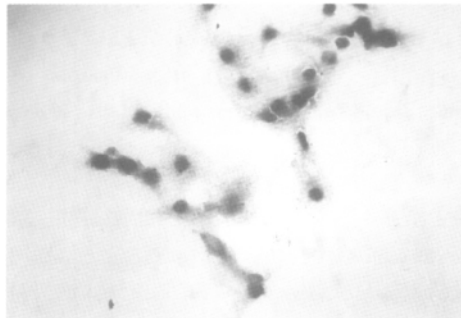


图 4 Tca8113 细胞株 Flt-1 染色

Fig. 4 Flt-1 staining of Tca8113 cell lines(× 400)

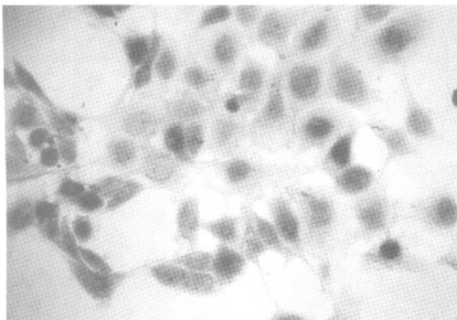


图 5 GNM 细胞株 KDR 染色

Fig. 5 KDR staining of GNM cell lines(× 400)

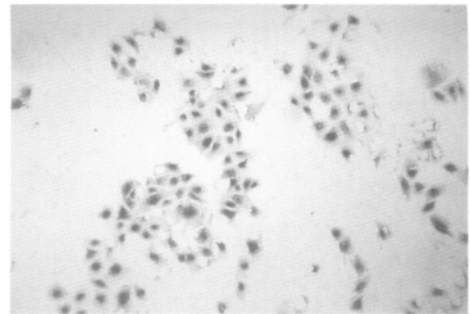


图 6 ECV304 细胞株 Flt-1 染色

Fig. 6 Flt-1 staining of ECV304 cell lines(× 100)



图 7 ECV304 细胞株 KDR 染色

Fig. 7 KDR staining of ECV304 cell lines(× 100)

2. 2 RT-PCR 结果

KDR 扩增出 700 bp 条带, Flt-1 扩增出 500 bp 条带。RT-PCR 的结果显示, ECV-304 细胞中 FLT-1, KDR mRNA 表达; Tca8113 细胞 Flt-1 mRNA 和 KDR mRNA 表达; GNM 细胞 KDR mRNA 表达; 而

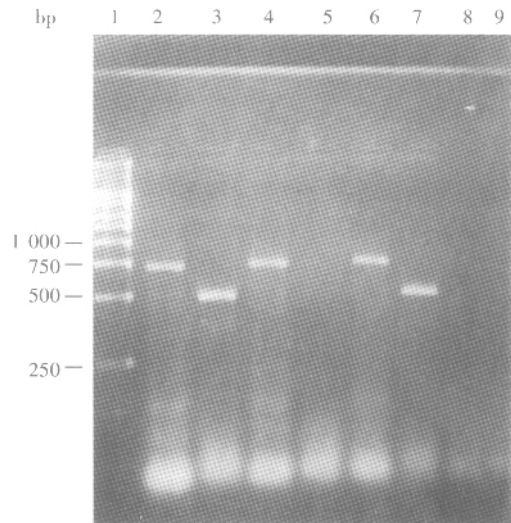


图 8 RT-PCR 结果

Fig. 8 Results of RT-PCR

Lane 1: Marker; Lane 2: ECV304 KDR; Lane 3: ECV304 Flt-1; Lane 4: GNM KDR; Lane 5: GNM Flt-1; Lane 6: Tca8113 KDR; Lane 7: Tca8113 Flt-1; Lane 8: L929 KDR; Lane 9: L929 Flt-1

L929 细胞和空白对照组无阳性条带。各样本出现 β -actin 阳性条带, 表明 RNA 提取过程和 RT-PCR 反应正常(图 8)。

3 讨 论

实体肿瘤的进展需要充足的血管供应, 一方面血管供应氧、营养物质, 另一方面肿瘤还通过血管转移。肿瘤血管生成中, VEGF 及其受体起重要作用。大多数肿瘤细胞有 VEGF 表达, 在肝癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤。VEGF 受体的表达位于内皮细胞, 近来报道 VEGF 受体位于非血管内皮细胞, 尤其肿瘤细胞, 有可能 VEGF 以自分泌形式作用于肿瘤细胞。

VEGF 受体由胞外区、跨膜区和胞内区 3 部分组成, 与配体结合的活性部位位于胞外区, 胞内区具有酪氨酸蛋白激酶活性。VEGFR1 表达于滋养层细胞, 单核细胞肾小球膜细胞。VEGFR2 可表达于造血干细胞巨核细胞^[6]。肿瘤细胞卵巢癌, 恶性黑色素瘤可表达高水平的 VEGFR1 和 VEGFR2。

外源性 VEGF 能刺激黑色素瘤细胞增殖, Masood^[7]用 VEGF 反义核甘酸阻断 VEGF mRNA 和抑制 Kaposi 肉瘤细胞生长, 第一次证明了 VEGF 作为肿瘤细胞生长的自分泌刺激因子。胃癌 MGC803 的研究中, 外源 rhVEGF165 可导致 MGC 细胞生长, 抗 VEGF 或 VEGFR2 抗体可阻滞 VEGF 的生长效应, 当过量的抗 VEGF 的抗体使用时, 没能观察到进一步的抑制效应, 说明抗体不能阻滞内源性的 VEGF 的生长作用^[8]。

本研究通过免疫组化和 RT-PCR, 对两种舌癌细胞系中 VEGF 及其受体表达进行了分析, 实验结果显示 Tca8113 和 GNM 细胞中 KDR 表达阳性, Tca8113 细胞中 Flt-1 表达阳性, 这表明在舌癌细

胞的生成中, 可能存在 VEGF 的自分泌调节。

参考文献:

- [1] Dvorak H F, Orenstein N S, Carvalho A C, *et al.* Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products[J]. *Immunol*, 1979, 122 (1):166.
- [2] 郑丰平, 袁世珍, 王俊雅, 等. 血管内皮生长因子表达与结直肠癌血管生成、转移的关系[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(1):73.
- [3] Ferrara N, Houck K, Jakeman L, *et al.* Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins[J]. *Endocrine Rev*, 1992, 13 (1):18.
- [4] 王宏光, 李开宗, 窦科峰, 等. 血管内皮生长因子及其受体在肝癌细胞中的表达及意义 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 17(4):359.
- [5] Neuchrist C, Erovic B M, Handisurya A, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. *Laryngoscope*, 2001, (111): 1834.
- [6] Katoh O, Tauchi H, Kawaiishi K, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene. KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5687.
- [7] Masood R, Cai J, Zheng T, *et al.* Vascular endothelial growth factor /vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 979.
- [8] Tian X J, Song S M, Wu J, *et al.* Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(3): 505.

(编辑 刘清海)

(上接第 458 页 form page 458)

Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(7): 2632.

- [6] Forbes J R, Cox D W. Functional characterization of missense mutation in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(6): 1663.
- [7] Iida M, Terada K, Sambongi Y, *et al.* Analysis of functional domains of Wilson's disease protein(ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Lett*, 1998, 428 (3): 281.
- [8] Dancis A, Yuan D S, Haile D, *et al.* Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*:

an unexpected role for copper in iron transport[J]. *Cell*, 1994, 76(2): 393.

- [9] Klomp A E, Tops B B, Van Denberg I E, *et al.* Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1(hCTR1) [J]. *Biochem J*, 2002, 364(2): 497.
- [10] Forbes J R, Cox D W. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(13): 1927.

(编辑 刘清海)