基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0281-04

肾细胞癌组织与正常组织中 VEGF165b 的差异表达及其意义

姜翠苹,王德林,彭 波
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究血管内皮生长因子 165b(Vascular endothelial growth factor 165b,VEGF165b)在肾细胞癌(Renal cell carcinoma,RCC)组织和正常组织中的表达情况,初步探讨其与肾细胞癌发生发展的关系。方法:(1)用 S-P 免疫组化法检测 30 例肾细胞癌组织和 29 例正常肾组织中 VEGF165b 蛋白的表达情况;(2)用 RT-PCR 法分别检测 32 例肾细胞癌组织和 30 例正常肾组织中 VEGF165b mRNA 的表达情况。结果:(1)正常肾组织中 VEGF165b 蛋白表达率为 96.55%(28/29),肾细胞癌组织中 VEGF165b 蛋白的表达率为 20.00%(6/30),表达差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)正常肾组织中 VEGF165b mRNA 阳性表达率为 93.33%(28/30),肾细胞癌组织中 VEGF165b mRNA 的阳性表达率为 18.75%(6/32),具有统计学意义($P<0.05$)。结论:VEGF165b 在肾细胞癌组织中的表达低于正常肾组织的表达,这种表达差异可能与肾癌发生、发展的机制有关。

【关键词】肾肿瘤;VEGF165b;免疫组织化学;逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)
【中国图书馆分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-09

The differential expression of VEGF165b in the renal cell carcinoma and normal renal tissues and its clinical significance

JIANG Cui-ping, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the differential expression of VEGF165b in the renal cell carcinoma (RCC) and normal renal tissues and its role in the development of RCC. *Methods*: S-P immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF165b protein in 30 specimens of paraffin-embedded RCC tissues and 29 specimens of paraffin-embedded normal renal tissues. RT-PCR was performed to detect the expression of VEGF165b mRNA in 32 specimens of fresh RCC tissues and 30 specimens of fresh normal renal tissues. *Results*: Among 29 of normal renal tissues, 28 specimens had positive expression of VEGF165b protein, with the positive rate of 96.55% (28/29) that was significantly higher than 20.00% (6/30) in RCC tissues ($P<0.05$). The positive rate of VEGF165b mRNA in normal renal tissues was 93.33%(28/30), while that of RCC tissues was only 18.75% (6/32). The positive expression rate of VEGF165b mRNA in RCC tissues was significantly lower than that in normal renal tissues ($P<0.05$). *Conclusion*: VEGF165b might play a role in inhibiting development of RCC. Vascular endothelial growth factor 165b,

【Key words】Kidney neoplasms; Vascular endothelial growth factor 165b; Immunohistochemistry; Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

作者介绍:姜翠苹(1980-),女,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤,女性泌尿系疾病。
通讯作者:王德林,男,副教授,E-mail: dlwangws@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2005BB5033)。

2003,2(4):398-403.

[9] Milde-Langosch K, Roder H, Andritzky B, et al. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(2): 139-152.

[10] Blacque OE, Worrall DM. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types Ⅰ and Ⅲ collagen[J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 10783-10788.

[11] Ito R, Nakayama H, Yoshida K, et al. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality[J]. Oncol Rep, 2004, 12(5): 985-990.

[12] Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(11): 5673-5678.

[13] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146): 526-529.

[14] Xia W, Lau YK, Hu MC, et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Oncogene, 2000, 19(20): 2398-2403.

[15] Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, et al. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer correlation with clinical features [J]. Int J Cancer, 2001, 95(5): 337-342.

(责任编辑:关蕴良)

实体肿瘤的生长、浸润和转移依赖于肿瘤新生血管的形成，而新生血管的形成又依赖于肿瘤血管生长因子，在已证实的血管生长因子中，血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）是最重要的血管生长因子，血管内皮生长因子的表达是大多数肿瘤细胞无限增值的必要条件[1,2]。近年来发现的 VEGF 新变构体血管内皮生长因子 165b（Vascular endothelial growth factor 165b，$VEGF_{165}b$）具有抑制血管生成，从而抑制肿瘤生长的作用[3,4]。本实验采用免疫组织化学染色及 RT-PCR 方法检测 $VEGF_{165}b$ 在肾细胞癌和肾正常组织中的表达情况，初步探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收集重庆医科大学附属第一医院 2005 年 4 月至 2008 年 6 月间手术标本共 32 例，病理确诊，全部病例术前均未行放射、化学治疗；其中男性 23 例，女性 9 例。年龄 36~86 岁，平均 58 岁。肾正常组织：取自远离癌组织的正常肾组织。每例取新鲜标本 2 块，一块用 10%福尔马林液固定，石蜡包埋后，切片行免疫组织化学检测；另一块于离体后立即放入液氮速冻待检。

1.2 材料与试剂

鼠抗人 VEGF165b 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司，免疫试剂盒、DAB 显色试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司，总 RNA 提取试剂 RNAiso Reagent 及 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司，GoldView 购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测

1.3.1 免疫组织化学法 采用免疫组织化学二步法，4 μm 石蜡切片常规脱蜡、水化，3%过氧化氢孵育 15 min，PBS 冲洗，热修复抗原，加 1∶200 稀释的一抗 4℃过夜，加二抗 37°孵育 30 min，PBS 冲洗，DAB 显色，苏木精复染，中性树胶封片。

1.3.2 结果判定 $VEGF_{165}b$ 蛋白位于细胞质，表现为细胞质内出现棕褐色均匀细颗粒。判定标准：每例标本随机选取 10 个高倍视野，计数 100 个细胞中阳性反应细胞数，阳性表达率（PI）=（阳性细胞数/100）×100%，取其表达率平均值，PI>5%为阳性，PI<5%为阴性；PI 在 5%~24%之间为弱阳性；PI≥25%为阳性。

1.4 RT-PCR 法检测

1.4.1 引物合成 引物设计参照文献[5,6]。$VEGF_{165}b$ 上游引物：5'-GAGATGAGCTTCCTACAG-CAC-3'，下游引物：5'-TCAGTCTTTCCTGGTGAGAGATCTGCA-3'，222 bp；β-actin 上游引物：5'-GACTACCTCATGAAGATCCT-3'，下游引物：5'-GCG-GATGTCCACGTCACACT-3'，313 bp。引物由大连宝生物公司合成。

1.4.2 组织总 RNA 提取 以总 RNA 提取试剂 RNAiso Reagent 提取总 RNA，按试剂说明书操作。所提取总 RNA 完整性经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，可见明显 18 S 和 28 S 条带。用紫外分光光度计定量并检测其纯度，A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0 者可用于逆转录反应，-80℃保存备用。

1.4.3 RT-PCR 方法 RT-PCR 按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒操作步骤进行。冰浴中在反应管内依次加入 2 μl MgC_{l2}（25 mmol/L）、1 μl 10×RT Buffer、2.75 μl RNase Free dH_2O、1 μl dNTP Mixture、0.25 μl RNase Inhibitor、0.5 μl AMV Reverse Transcriptase，0.5 μl Random 9 mers（50 pmol/μl），2 μl 总 RNA，反应体系共 10 μl，混匀，RT 反应条件为：30℃ 10 min，45℃ 30 min，99℃ 5 min，5℃ 5 min，1 个循环。PCR 反应体系为：5 μl 5×PCR Buffer、Takara ExtaqHs 0.125 μl、5 μl cDNA、0.25 μl 上游引物（20 pmol/μl）、0.25 μl 下游引物（20 pmol/μl），用灭菌蒸馏水补足 25 μl，混匀，PCR 反应条件为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，64℃ 30 s，72℃ 1 min，40 个循环；72℃ 10 min。取 PCR 扩增产物 5 μl 在 1.5%琼脂凝胶（GoldView 染色）电泳，电泳结束后置于紫外光灯下观察结果，条带位于 222bp 为 $VEGF_{165}b$ mRNA 表达阳性，条带位于 313bp 为 β-actin mRNA 表达阳性。

1.5 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计分析软件对资料进行统计学分析，根据资料类型采用 Fisher 确切概率法，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 $VEGF_{165}b$ 的免疫组织化学检测结果

$VEGF_{165}b$ 阳性表达为细胞质内均匀分布棕褐色颗粒。$VEGF_{165}b$ 蛋白在绝大多数正常肾组织中表达（图 1），而在肿瘤组织中表达降低或者无表达（图 2，图 3）。29 例肾正常组织中 28 例 $VEGF_{165}b$ 阳性表达，阳性率为 96.55%；30 例 RCC 组织中 $VEGF_{165}b$ 多为阴性表达，仅 6 例为弱阳性表达（20.00%）。两者间差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1），提示 $VEGF_{165}b$ 蛋白在 RCC 组织中表达下调。

表 1 $VEGF_{165}b$ 蛋白在 RCC 组织与正常肾组织中的表达

组织类型	阳性	阴性	合计
肾正常组织	28	1	29
肾癌组织	6	24	30
合计	34	25	59

2.2 $VEGF_{165}b$ 的 RT-PCR 检测结果

$VEGF_{165}b$ 及内参 β-actin PCR 产物琼脂糖凝胶

电泳，其大小与预先设计引物大小一致（图 3）。30 例正常肾组织中 28 例表达 $VEGF_{165}b$ mRNA，阳性率为 93.33%；32 例 RCC 组织中 6 例为阳性表达，阳性率为 18.75%。两者差别具有统计学意义（$P<0.05$，表 2），提示 RCC 组织中 $VEGF_{165}b$ mRNA 表达下调。

表 2　$VEGF_{165}b$ mRNA 在 RCC 组织与正常肾组织中的表达

组织类型	阳性	阴性	合计
肾正常组织	28	2	30
肾癌组织	6	26	32
合计	34	28	62

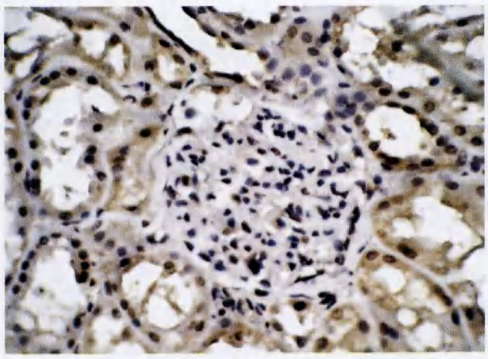


图 1　$VEGF_{165}b$ 在正常肾组织中阳性表达（SP，×400）

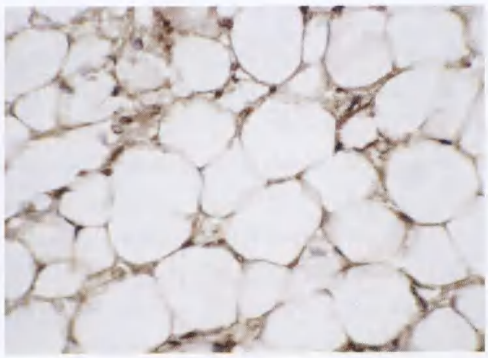


图 2　$VEGF_{165}b$ 在 RCC 组织中弱阳性表达（SP，×400）

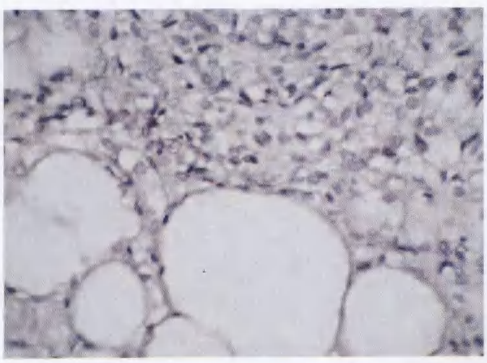


图 3　$VEGF_{165}b$ 在 RCC 组织中阴性表达（SP，×400）

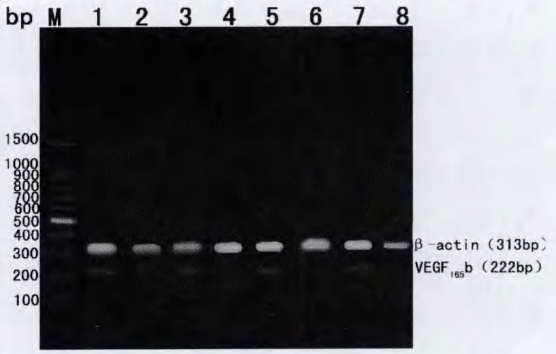


图 4　$VEGF_{165}b$ mRNA RCC 组织及正常肾组织中的表达

3　讨　论

$VEGF_{165}b$ 是 VEGF-A 的剪接变构体，因它与 $VEGF_{165}$ 具有相同的氨基酸数目而结构不同，故将它命名为 $VEGF_{165}b$[7]。研究发现，$VEGF_{165}b$ 是一种循环蛋白，具有以下功能及生物特性[5,8,9]：(1) $VEGF_{165}b$ 可抑制 $VEGF_{165}$ 介导的人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVEC）增殖和迁移；(2) $VEGF_{165}b$ 可抑制 $VEGF_{165}$ 介导的血管扩张；(3) $VEGF_{165}b$ 抑制 $VEGF_{165}$ 介导的血管生成：$VEGF_{165}b$ 羧基末端的改变并不影响其与受体结合，$VEGF_{165}b$ 与 $VEGF_{165}$ 具有相同的血管内皮生长因子受体 2（Vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）结合亲和力；$VEGF_{165}$ 通过激活内皮细胞内 VEGFR-2，使细胞通过细胞外基质迁移、凋亡、内皮细胞增殖及体内毛细血管的顺应性所必需的 p42/p44 丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinase，MAPK）和丝氨酸/苏氨酸激酶（Serine/threonine-protein kinase，AKT）磷酸化；而 $VEGF_{165}b$ 竞争性结合 VEGFR-2，抑制 VEGFR-2 激活，抑制 MAPK 和 AKT 磷酸化，从而抑制血管生成的信号途径，达到抑制 $VEGF_{165}$ 介导的血管生成；(4) 在体内 $VEGF_{165}$ 通过 VEGFR-2 信号传导途径慢性持续性增加微血管的通透性，而 $VEGF_{165}b$ 通过 VEGFR-1 信号途径短暂增加血管通透性，而且 $VEGF_{165}b$ 增加血管通透性的作用强于 $VEGF_{165}$；(5) $VEGF_{165}b$ 抑制裸鼠体内 A375 黑色素瘤的生长。上述发现表明 $VEGF_{165}b$ 可能具有抑制肿瘤增殖、迁移及肿瘤血管形成的作用。

最新研究发现 $VEGF_{165}b$ 过量表达可以抑制体内结肠直肠癌[10]、肾癌、前列腺癌、尤文肉瘤生长[11]，抑制乳腺血管生成[12]。人 $VEGF_{165}b$ 重组体能抑制裸

鼠体内结肠癌的生长并降低肿瘤血管密度，但对肝功能及血液动力学方面无不良影响，这为 $VEGF_{165}b$ 通过抗血管生成作用治疗肿瘤提供了理论依据[13]。另有研究提示 $VEGF_{165}b$ 表达下调可能成为判断肿瘤预后不良的标志[14]。上述研究结果进一步证实 $VEGF^{165}b$ 可能具有抗血管生成从而抑制肿瘤生长的作用，有希望成为治疗肿瘤的有效药物，成为判断肿瘤预后的指标。

本研究为探讨 $VEGF_{165}b$ 在肾癌发生、发展中的作用，分别以石蜡组织以及新鲜肾组织为研究对象，采用免疫组织化学技术和 RT-PCR 技术，从蛋白水平及 mRNA 水平检测 $VEGF_{165}b$ 在肾癌组织及正常肾组织中的表达情况。免疫组织化学结果显示，29 例肾正常组织中 $VEGF_{165}b$ 蛋白阳性表达率为 96.55%；30 例 RCC 组织中 $VEGF_{165}b$ 蛋白多为阴性表达，少数为弱阳性表达（20.00%）。肾癌组织 $VEGF_{165}b$ 蛋白表达的阳性率明显低于肾正常组织（$P<0.05$），与 Woolard 等[7]研究结果相同。RT-PCR 结果显示，30 例正常肾组织中有 28 例表达 $VEGF_{165}b$ mRNA，阳性表达率为 93.33%；32 例肾癌组织中仅有6 例为阳性表达，阳性率为 18.75%。RCC 中 $VEGF_{165}b$ mRNA 表达明显低于肾正常组织中的表达（$P<0.05$），与 Bates 等[4]研究肾癌中 $VEGF_{165}b$ mRNA 表达的结果相同。上述结果表明，RCC 组织中 $VEGF_{165}b$ mRNA 和 $VEGF_{165}b$ 蛋白表达明显降低，可能是肾癌发生发展的重要因素之一。

综上所述，在肾癌组织中，$VEGF_{165}b$ 无论是在蛋白水平还是在 mRNA 水平表达都有所下降，$VEGF_{165}b$ 在 RCC 组织中的异常低表达表明 $VEGF_{165}b$ 可能具有抑制肾肿瘤发生、发展的作用，$VEGF_{165}b$ 表达水平可能成为判断肾癌预后的标志。

参 考 文 献

[1] 吴小候，罗春丽，蔡晓钟.膀胱移行细胞癌尿脱落细胞 VEGF 表达的研究[J]. 重庆医科大学学报，2002，27(1)：45-47.

[2] 张 尧，吴小俊，陈矢禹，等.肾细胞癌 MMR9，VEGF 的表达及其临床意义[J]. 重庆医学，2007，36(13)：1298-1300.

[3] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine[J]. Nature, 2005, 438(7070): 932-936.

[4] Siemann D W, Chaplin D J, Horsman M R. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease[J]. Cancer, 2004, 100 (12): 2491-2499.

[5] Bates D O, Cui T G, Doughty J M, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62: 4123-4131.

[6] Ohnami S, Matsumoto N, Nakano M, et al. Identification of genes showing diferential expression in antisense k-ras-transduced pancreatic cancer cells with suppressed tumorigenicity[J]. Cancer Res, 1999, 59: 5565-5571.

[7] Konopatskaya O, Churchill A J, Harper S J, et al. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF inhibits retinal neovascularization in mice[J]. Molecular Vision, 2006, 12: 626-632.

[8] Woolard J, Wang W Y, Bevan H S, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression[J]. Cancer Res, 2004, 64: 7822-7835.

[9] Glass C A, Harper S J, Bates D O. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo[J]. J Physiol, 2006, 572: 243-257.

[10] Varey A H R, Rennel E S, Qiu Y, et al. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro-and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy[J]. Br J Cancer, 2008, 98: 1366-1379.

[11] Rennel E, Waine E, Guan H, et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice[J]. Br J Cancer, 2008, 98(7): 1250-1257.

[12] Qiu Y, Bevan H, Weeraperuma S, et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b[J]. FASEB J, 2008, 22(4): 1104-1112.

[13] Rennel E S, Hamdollah-Zadeh M A, Wheatley E R, et al. Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(13):1883-1894.

[14] D í az R, Peña C, Silva J, et al. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis[J]. Int J Cancer, 2008, 123(5): 1060-1067.

（责任编辑：冉明会）