DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.018
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2020 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-2020-03

CXCR4在胶质瘤血管内皮细胞和ECV304细胞中的表达及其意义

杨世昕[1],卞修武[1],蒋雪峰[1],王清良[1],王吉民[2] ([1]第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038;[2]Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center of Cancer Research, Natural Cancer Institute at Frederick, MD 21702-1201, USA)

提 要:目的 检测人胶质瘤血管内皮细胞以及体外培养的血管内皮样细胞系ECV304趋化因子受体CXCR4的表达,观察其配体SDF-1对血管内皮样细胞迁移的影响,以探讨趋化因子受体CXCR4在肿瘤血管生成中的可能作用及其机制。方法 通过免疫组化方法检测人胶质瘤血管内皮细胞CXCR4蛋白的表达,采用RT-PCR、免疫细胞化学方法检测血管内皮样细胞系ECV304上CXCR4 mRNA和CXCR4蛋白的表达,并采用48孔趋化板观察SDF-1诱导体外培养血管内皮样细胞的迁移作用。结果 在胶质瘤血管内皮细胞和血管内皮样细胞系ECV304上均检测到趋化因子受体CXCR4的表达,体外实验显示SDF-1能诱导血管内皮样细胞发生明显的迁移。在30、50 ng/ml的实验浓度范围内,诱导血管内皮样细胞的迁移作用呈明显量效关系。结论 胶质瘤血管内皮细胞和血管内皮样细胞系ECV304上存在CXCR4表达,CXCR4激活能诱导内皮细胞的迁移。

关键词:趋化因子受体;CXCR4;血管生成
中图法分类号:R392.11;R364.3;R730.264 文献标识码:A

Expression of CXCR4 in endothelial cells of glioma and ECV304 cells and the significance

YANG Shi-xin[1], BIAN Xiu-wu[1], JIANG Xue-feng[1], WANG Qin-liang[1], WANG Ji-min[2] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center of Cancer Research, Natural Cancer Institute at Frederick, MD 21702-1201, USA)

Abstract: Objective To investigate the expression of CXCR4 in endothelial cells in glioma and ECV304 cells cultured *in vitro* and its roles in angiogenesis. Methods The expression of CXCR4 in ECV304 cells were detected by RT-PCR and immunocytochemistry. The expression of chemokine receptor CXCR4 in the endothelial cells in glioma was detected by immunohistochemistry. The migration of ECV304 induced by SDF-1β was observed by 48-well chemotaxis chamber. Results CXCR4 was expressed in the endothelial cells of glioma and cultured ECV304 cells. The chemotactic migration of ECV304 could be induced by SDF-1. SDF-1 at a concentration between 30 ng/ml and 50 ng/ml induced the chemotactic migration of ECs in a dose-dependent manner. Conclusion The results confirm that CXCR4 is expressed in the endothelial cells of glioma and the activation of CXCR4 may induce the migration of endothelial cells.

Key words: chemokine receptor; CXCR4; angiogenesis

趋化因子受体CXCR4与血管生成密切相关,为了了解该受体在胶质瘤血管生成中的调节作用及其可能机制,本实验采用免疫组化方法检测中国人胶质瘤手术标本胶质瘤血管内皮细胞上CXCR4的表达情况,然后从基因和蛋白水平检测了体外培养的血管内皮系ECV304细胞上CXCR4趋化因子受体的表达,并观察其配体SDF-1对血管内皮样细胞的迁移作用,以此探讨该受体在胶质瘤血管生成中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

血管内皮样细胞系ECV304(引自美国组织培养库,ATCC CRI-1998)在含10%新生小牛血清、双抗(青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml)的DMEM(Hyclone公司产品)中常规培养。

基金项目:国际抗癌联盟(UICC)资助项目(661/2002)
Supported by the International Union Against Cancer (661/2002)
作者简介:杨世昕(1968-),男,江西省永丰县人,博士,主治医师,主要从事移植免疫、肿瘤病理方面的研究,现在空军九江庐山疗养院。电话:13193066103
通信作者:卞修武,电话:(023)68752247
收稿日期:2003-12-30;修回日期:2004-05-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　组织标本

15 例人脑胶质瘤标本均选自第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 1995— 1999 年存档的石蜡包埋组织。按 1993 年 WHO 脑肿瘤分类及分级标准, 经病理组织学检查确诊为Ⅱ级 9 例, Ⅲ~ Ⅳ级 5 例。蜡块连续切片, 厚 4 μm, 贴于涂有多聚赖氨酸防脱片胶的载玻片, 烤片后备用。

1.3　RT-PCR 法

血管内皮样细胞系 ECV304 细胞 CXCR4 mRNA 表达用 Tri-Pure 试剂盒(Promega 公司)提取各组细胞总 RNA, 紫外光栅分光光度计测定总 RNA 浓度。取 4 μg 总 RNA 进行逆转录(鼎国试剂盒), 再取 1 μg 逆转录产物进行 PCR 扩增。CXCR4 的引物序列[1] 为: 5′-AATCTTCCTGCCCACCATCT-3′ 和 5′-GACGCCAA-CATAGACCACCT-3′, 扩增片段为 367 bp。以β-actin 的 PCR 作为参照(扩增片段长度为 540 bp)。

1.4　人胶质瘤血管内皮细胞以及 ECV304 细胞 CXCR4 检测

采用 Evision$^{+™}$ System 试剂盒(美国 Gene Tech)二步法染色。ECV304 细胞用 0.4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 37 ℃, 20 min。正常山羊血清封闭后加 5 μg/ml 鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体(sigma) 4 ℃过夜, 再与 Evision$^{+™}$(抗鼠 IgG) 37 ℃孵育 30 min, DAB 显色 5~10 min, 苏木精复染、脱水、封片。石蜡切片常规脱蜡至水, 浸泡于 10 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中, 置微波炉内加热(300 W), 煮沸 10 min 以修复抗原, 以下步骤与细胞相同。结果的观察标准为: CXCR4 免疫组化阳性为胞膜和胞质呈棕黄色染色。

1.5　48 孔趋化板检测 ECV304 迁移

依照文献[2] 方法, 在 48 孔趋化板中进行。10 μm 孔径的多聚酯滤膜预先经 50 μg/ml 鼠胶原于 4 ℃包被 24 h。在下室孔中加入 0.5% BSA DMEM 培养基、0.5% BSA 配制 10、20、30、50、100、150 ng/ml 的 SDF-1(Sigma)。然后在上室中加入 8×10^5/ml 胶质瘤细胞悬液, 放置于湿盒中 37 ℃ 5 h。然后将膜移开, 用刮板将滤膜上层面的细胞刮除, 滤膜下层的细胞采用试剂盒(Protocol Hema3, Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) 进行染色和固定。将滤膜固定在载玻片上, 在光学显微镜下(× 400) 记数求穿膜平均细胞数。每 3 个孔取均数计算结果。结果以细胞迁移系数(cell migration index)表示: 细胞迁移系数= 实验组细胞迁移数/对照组细胞迁移数。

1.6　统计学分析

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

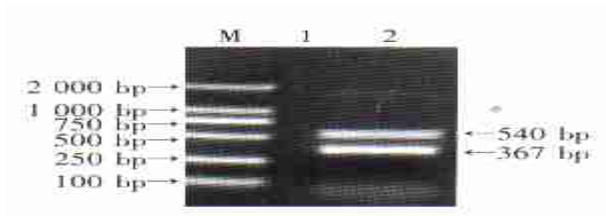
2　结果

2.1　ECV304 细胞 CXCR4 mRNA 的表达

ECV304 细胞内存在 CXCR4 mRNA 信号表达(图 1)。

2.2　免疫组化染色结果

ECV304 细胞为胞膜和胞浆着色呈棕黄色, 见图 2。胶质瘤(Ⅱ级)组织中胶质瘤血管内皮细胞存在 CXCR4 阳性染色, 见图 3。



M: Marker; 1: β-actin control; 2: Expression of CXCR4 mRNA in ECV304

图 1　ECV304 细胞 CXCR4 mRNA 表达检测结果

Fig 1　Expression of CXCR4 mRNA in ECV304 cell line (RT-PCR)

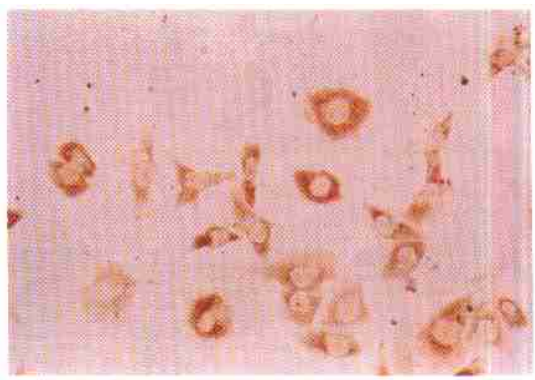


图 2　ECV304 细胞中 CXCR4 表达　(Evision$^{+™}$ System × 200)

Fig 2　CXCR4 expression in ECV304 cells

(Evision$^{+™}$ System × 200)

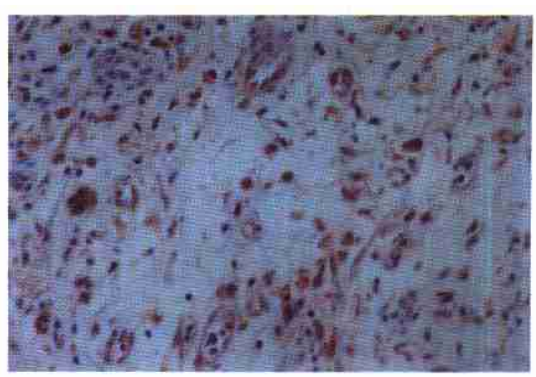


图 3　免疫组织化学检测显示胶质瘤组织(WHO Ⅱ级)所有瘤细胞、内皮细胞阳性染色　(Evision$^{+™}$ System × 400)

Fig 3　CXCR4 immunohistochemical quantification and localization in glioma specimens (WHO Grade Ⅱ, CXCR4 overall staining in glioma cells (+) and neovessel endothelial cells (+)

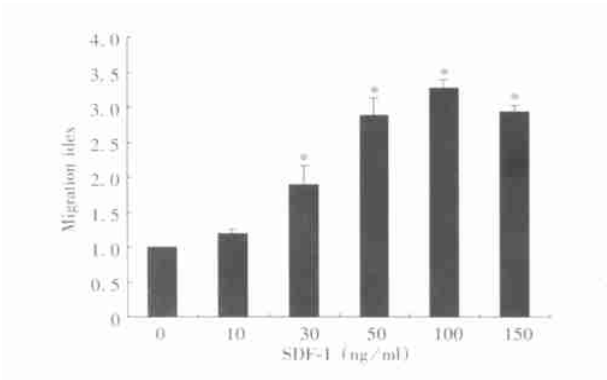
(Evision$^{+™}$ System × 400)

2.3　SDF-1 诱导 ECV304 细胞迁移的结果

当下室未加入 SDF-1 趋化因子, ECV304 细胞迁移细胞数为分别为 10 个左右, 下室用 10~100 ng/ml 浓度的 SDF-1 能够显著诱导迁移细胞数分别为(12.41±4.31)、(18.64±3.25)、(29.57±5.24)、(33.63±5.34)、(29.35±5.27)。在 30~100 ng/

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

ml 浓度内 SDF1 诱导 ECV304 细胞趋化呈剂量依赖关系，达到最大迁移效果的 SDF1 浓度为 100 ng/ml，见图 4。



*：$P<0.05$ *vs* 10 ng/ml

图 4 不同浓度 **SDF-1** 诱导血管内皮样细胞 **ECV304** 迁移

Fig 4 Comparison of the effects of various concentrations of SDF-1 on the migration of ECV304 cells

3 讨论

研究血管生成和消退规律及其机制，对认识血管生成在疾病发生、发展中的作用，针对血管生成进行有效的治疗具有十分重要的意义。近年研究表明趋化因子和趋化因子受体在血管生成过程中发挥着重要而复杂的作用，有些趋化因子及其受体能够促进血管生成，有的则能抑制血管生成[3]。在肿瘤血管生成中，内皮细胞向肿瘤细胞移行是实现肿瘤血管生成的重要环节。肿瘤细胞释放某些趋化因子能够吸引内皮细胞向瘤组织内移行，促进肿瘤内的血管生成[4]。

最早研究表明 CXCR4 表达在 T 淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞[5]，并能够介导这些细胞的趋化作用。已有研究表明，在很多的内皮细胞上存在 CXCR4 表达，包括人脐带血管内皮细胞、牛动脉内皮细胞、牛肺动脉内皮细胞[6,7]。

胶质瘤血管十分丰富，但其生成机制尚不清楚。确定某些特殊的趋化因子受体在调节血管形成中的作用，重要的一步就是检测这些趋化因子受体在与血管生成有关的细胞上是否表达。本实验检测恶性程度不同胶质瘤组织中 CXCR4 的表达情况，结果在瘤血管内皮细胞上也存在 CXCR4 阳性表达。这提示 CXCR4 可能与胶质瘤瘤血管生成存在联系。

建立胶质瘤瘤血管内皮细胞体外模型，进一步研究 CXCR4 胶质瘤血管上的功能，对揭示胶质瘤发生、发展的机制可能具有十分重要的意义。由于胶质瘤血管内皮细胞的原代分离、培养十分困难，而且不能永久传代难以满足本实验需求。因此在本研究中需要选择一种能够表达 CXCR4 的具有内皮细胞特征的细胞系作为研究胶质瘤血管内皮细胞功能的体外细胞模型。ECV304 具有内皮细胞特征的细胞系[3,8]，通过 RT-PCR 和免疫组化在血管内皮样细胞 ECV304 细胞中检测到 CXCR4 基因、蛋白的强表达。这提示 ECV304 细胞可以用于检测 CXCR4 与血管生成相互联系的细胞模型。

本研究我们观察到 SDF-1 在 30、100 ng/ml 的实验浓度范围内，能够诱导血管内皮样细胞 ECV304 发生迁移运动，且该作用呈明显量效关系。

在肿瘤血管生成中，内皮细胞向肿瘤细胞移行是实现肿瘤血管生成的重要环节。通过本实验我们推测在胶质瘤中，胶质瘤瘤细胞产生的趋化因子 SDF-1 能够与血管内皮细胞存在趋化因子受体 CXCR4 结合[9]，促使血管内皮细胞能够朝胶质瘤细胞微环境趋化迁移，这可能是胶质瘤调节血管生成的一个重要原因。

通过本研究认识趋化因子受体 CXCR4 在内皮迁移的重要作用，不仅让我们能够从趋化因子受体的角度认识胶质瘤血管生成的生物学特征及其可能机制，而且对于制定以趋化因子受体为靶点的肿瘤抗血管生成治疗提供参考。

参考文献：

[1] Huber T B, Reinhardt H C, Exner M, *et al*. Expression of functional CCR and CXCR chemokine receptors in podocytes[J]. J Immunol, 2002, 168(12): 6244-6252.

[2] Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, *et al*. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding[J]. EMBO J, 1999, 18(16): 4414-4423.

[3] Bernardinia G, Ribattib D, Spinettic G, *et al*. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis[J]. Immunol Meth, 2003, 273(1-2): 83-101.

[4] Balkwill G. Chemokine biology in cancer[J]. Seminars Immunol, 2003, 15(1): 49-55.

[5] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic[J]. Nature, 1998, 392(6676): 565-568.

[6] Volin M V, Joseph L, Shockley M S, *et al*. Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium[J]. Biochem Biophys Res, 1998, 242(1): 46-53.

[7] Feil C, Augustin H G. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(1): 38-45.

[8] Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, *et al*. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1990, 26(3Pt1): 265-274.

[9] Rempel S A, Dudas S, Ge S, *et al*. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma[J]. Clini Cancer Res, 2000, 6(1): 102-111.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net