DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.009
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
678 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0678-04

血管内皮生长因子及其Flt-1受体在白血病细胞中的表达

张 伶[1],陈 辉[2],李 维[3],涂植光[1],冯文莉[1],黄宗干[4] (重庆医科大学:[1]检验系临床血液学教研室,[2]临床学院检验科,[4]临床学院血液科,重庆 400016;[3]重庆市血液中心输血研究室,重庆 400015)

提 要:目的 探讨人白血病细胞系血管内皮生长因子(VEGF)及其Flt-1受体的表达,进一步阐明VEGF在白血病细胞异常增殖中的作用机制。方法 以人脐静脉血管内皮细胞系ECV304作为对照,采用RT-PCR半定量技术和免疫组化检测体外培养的人白血病细胞系K562和HL-60中VEGF及Flt-1的表达。采用MTT试验观察VEGF反义寡核苷酸(VEGF-AS)对白血病细胞体外增殖的影响。结果 K562和HL-60细胞同时表达VEGF和Flt-1 mRNA和蛋白。VEGF-AS能够抑制白血病细胞体外增殖。结论 在白血病细胞异常增殖中自分泌VEGF可能起着重要作用。

关键词:VEGF;Flt-1受体;K562细胞;HL-60细胞
中图法分类号:R733.72;R392.11;R73-354 文献标识码:A

Expressions of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in human leukemic cells

ZHANG Ling[1], CHEN Hui[2], LI Wei[3], TU Zhi-guang[1], FENG Wen-li[1], HUANG Zong-gan[4] ([1]Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, [2]Department of Medical Laboratory, College of Clinical Medicine, [4]Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China; [3]Research Section of Blood Transfusion, Chongqing blood center, Chongqing 400015, China)

Abstract: **Objective** To explore the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor Flt-1 in human leukemic cell lines (HL-60 and K562 cells) cultured *in vitro* and to clarify the effect of VEGF on the abnormal proliferation of leukemic cells. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to examine the expressions of mRNA and protein for both VEGF and Flt-1 in the two human leukemic cell lines, taking ECV304 (human umbilical vein endothelial cells) as the control cells. MTT test was used to examine the effect of VEGF antisense oligodeoxynucleotide (VEGF-AS) on the proliferation of leukemic cells. **Results** The expressions of mRNA and protein of both VEGF and Flt-1 were found in the two human leukemic cell lines. VEGF-AS could inhibit the proliferation of human leukemic cell lines *in vitro*. **Conclusion** The autocrine VEGF may play an important role in the abnormal proliferation of leukemic cells.

Key words: vascular endothelial growth factor; Flt-1 receptor; HL-60 cell; K562 cell

已知血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的血管生长因子之一,通过与VEGF受体(Flt-1和KDR)特异性结合而发挥作用。实体肿瘤细胞过度表达VEGF,参与肿瘤的血管新生,是肿瘤增殖和转移的基础。最近的研究表明,VEGF在大部分白血病患者骨髓细胞高表达,其中某些白血病细胞同时还表达VEGF的KDR受体,提示VEGF可能在白血病的发生、发展中也起重要作用[1,2]。为探明VEGF及其Flt-1受体在白血病发生中的可能作用,我们采用RT-PCR技术和免疫组化染色法观察K562、HL-60两株人白血病细胞系中VEGF及其Flt-1受体的表达,并用MTT试验观察VEGF反义寡核苷酸对白血病细胞体外增殖的影响,旨在初步探讨VEGF在白血病细胞异常增殖中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人CML急变细胞系K562和人早幼粒细胞系HL-60为本室保存。人脐静脉内皮细胞系ECV304由本校张雪梅博士提供。细胞培养液RPMI1640和小牛血清为Hyclone公司的产品。RT-

基金项目:重庆市卫生局青年人才基金资助项目(00-3003)
Supported by the Foundation for Young Scholars of Bureau of Public Health of Chongqing (00-3003)

作者简介:张 伶(1970-),女,重庆市人,硕士,讲师,主要从事白血病免疫基因治疗方面的研究。电话:(023)68485938

收稿日期:2003-04-10;修回日期:2003-11-20

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

PCR 试剂除 M-MLV 逆转录酶为 Promega 产品外, 其余试剂均购自上海 Sangon 公司。兔抗人 VEGF, Flt-1 多克隆抗体及 SABC 免疫组化试剂盒, 均购自博士德公司。MTT 为 Sigma 产品。全硫代修饰的 VEGF 反义寡核苷酸(VEGF-AS)、VEGF 错义寡核苷酸(VEGF-MS)以及引物都由上海生工生物技术公司合成纯化。引物序列见表 1。

表 1　PCR 引物序列和 PCR 产物长度(bp)

Tab 1　Sequences of PCR primers and length of PCR products (bp)

Gene	Sequence	Length (bp)
GAPDH	F5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′	208
	R5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′	
VEGF	F5′-TCGGGCCTCCGAAACCATGA-3′	516
	R5′-CCTGGTGAGAGATCTGGTTC-3′	648
Flt-1	F5′-ATTTGTGATTTTGGCCTTGC-3′	550
	R5′-CAGGCTCATGAACTTGAAAGC-3′	
VEGF-AS	5′-TGGCTTGAAGATGTACTCGAT-3′	
VEGF-MS	5′-TACGTAGTATGGTGTACGATC-3′	

1.2　细胞培养

3 种细胞都在含 100 ml/L BCS 的 RPMI1640 培养液中, 37 ℃、饱和湿度, 5% CO_2 条件下常规培养, K562 和 HL-60 每 3 ~4 天换液传代培养。ECV304 用 2.5 g/L 胰蛋白酶按贴壁细胞常规传代换液培养。

1.3　RT-PCR

1.3.1　总 RNA 的提取　　取 2×10^6 个细胞用 TRIZOL 提取细胞总 RNA, 加适量的 DEPC 水溶解。用 1.5% 琼脂糖电泳鉴定 RNA 的纯度并观察其降解情况, 并用 DNA/RNA 紫外检测仪测定其含量。

1.3.2　RNA 逆转录　　按 M-MLV 逆转录酶说明书进行。取 2 μg RNA 溶于 11 μl DEPC 水中, 加入 oligo(dT)18 1 μl, 70 ℃反应 5 min 后置冰中冷却, 再加入 5× RT Buffer 5 μl, 10 mmol/L dNTPs 1.5 μl, RNasin 0.5 μl, M-MLV 逆转录酶 1 μl, DEPC 水补足 25 μl 体积, 37 ℃反应 60 min, cDNA 置 −20 ℃备用。

1.3.3　PCR　　各基因引物序列见表 1。引物由上海 Sangon 合成、纯化。VEGF 和 Flt-1 的 PCR 体系 25 μl 包括 10× Mg-Free Buffer 2.5 μl, 2 mmol/L 4× dNTP 2.5 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μl, 10 pmmol/L 引物各 1.5 μl, *Taq* 酶 1.5 U, cDNA 2 μl。置 PCR 扩增仪(PTC200, Peltier Thermal Cycler)上扩增。VEGF 的 PCR 条件为 95 ℃预变性 5 min, 然后变性、退火、延伸分别为 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 2 min, 72 ℃ 3 min, 循环 35 次后, 72 ℃延伸 10 min。Flt-1 的 PCR 条件为: 94 ℃ 5 min, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s 后, 再 94 ℃ 1 min, 65 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min, 30 个循环后 72 ℃延伸 7 min。PCR 产物以含 0.5 mg/L 溴化已锭(EB)的 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析仪分析结果。实验中分别设立空白对照(不加模板 cDNA)及各样本的 GAPDH 对照。

1.4　免疫组化染色

收集对数生长期细胞作染色。K562 和 HL-60 两种悬浮细胞用 0.01 mol/L PBS 洗涤后离心涂片。ECV304 贴壁细胞用胰蛋白酶消化后, 取细胞悬液滴于 6 孔板中的盖玻片上, 待细胞长满全片的 50% ~70% 取出, 用 PBS 洗涤。3 种细胞皆用 4% 多聚甲醛固定 30 min。以 PBS 代替一抗作为空白对照, 参照 SABC 试剂盒中的说明书, 分别进行 VEGF、Flt-1 的免疫组化染色。

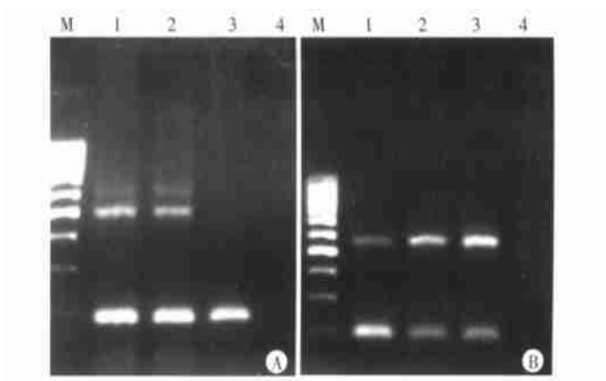
1.5　MTT 试验检测 VEGF-AS 对白血病细胞体外增殖的影响

白血病细胞以 5×10^4/ml 浓度接种在 96 孔培养板中, 每孔 200 μl。处理组分别加入不同终浓度(0、1.25、2.5、5、10、15 μmol/L)的 VEGF-AS 或 VEGF-MS, 胎牛血清浓度为 2%。作用 72 h 后, 每孔再加入 20 μl MTT 工作液(5 mg/ml), 继续培养 4 h 弃上清后, 加入二甲亚砜, 37 ℃避光摇动 10 min, 测定 D_{570} 值。每组各设 3 个复孔, 计算均值。细胞增殖率按(处理组 D_{570}/空白组 D_{570})× 100% 公式计算。

2　结果

2.1　各细胞系 VEGF 和 Flt-1 mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示, K562 和 HL-60 细胞表达 VEGF mRNA 的 2 种片段 516 bp(VEGF121)和 648 bp(VEGF165), ECV304 细胞则无阳性条带出现。同时白血病细胞也表达 Flt-1 mRNA (550 bp)。分析电泳图像并计算 Flt-1 与内参 GAPDH 积分光密度图像扫描 *A* 值之比, Flt-1 阳性表达对照 ECV304 细胞为 1.32, HL-60 细胞为 1.11, 而 K562 细胞 Flt-1 表达较弱, 比值为 0.91。所有片段与预计扩增产物的大小一致。各样本空白对照均无阳性条带出现, 内参 GAPDH 均在相应位置出现明显的扩增条带(208 bp), 表明提取各细胞中 RNA 的质量及 RT-PCR 过程均较良好, 见图 1。



A: VEGF; B: Flt-1; M: Marker (700, 600, 500, 200 bp); 1: K562 (648, 516, 208 bp); 2: HL-60 (648, 516, 208 bp); 3: ECV304 (208 bp); 4: Blank control

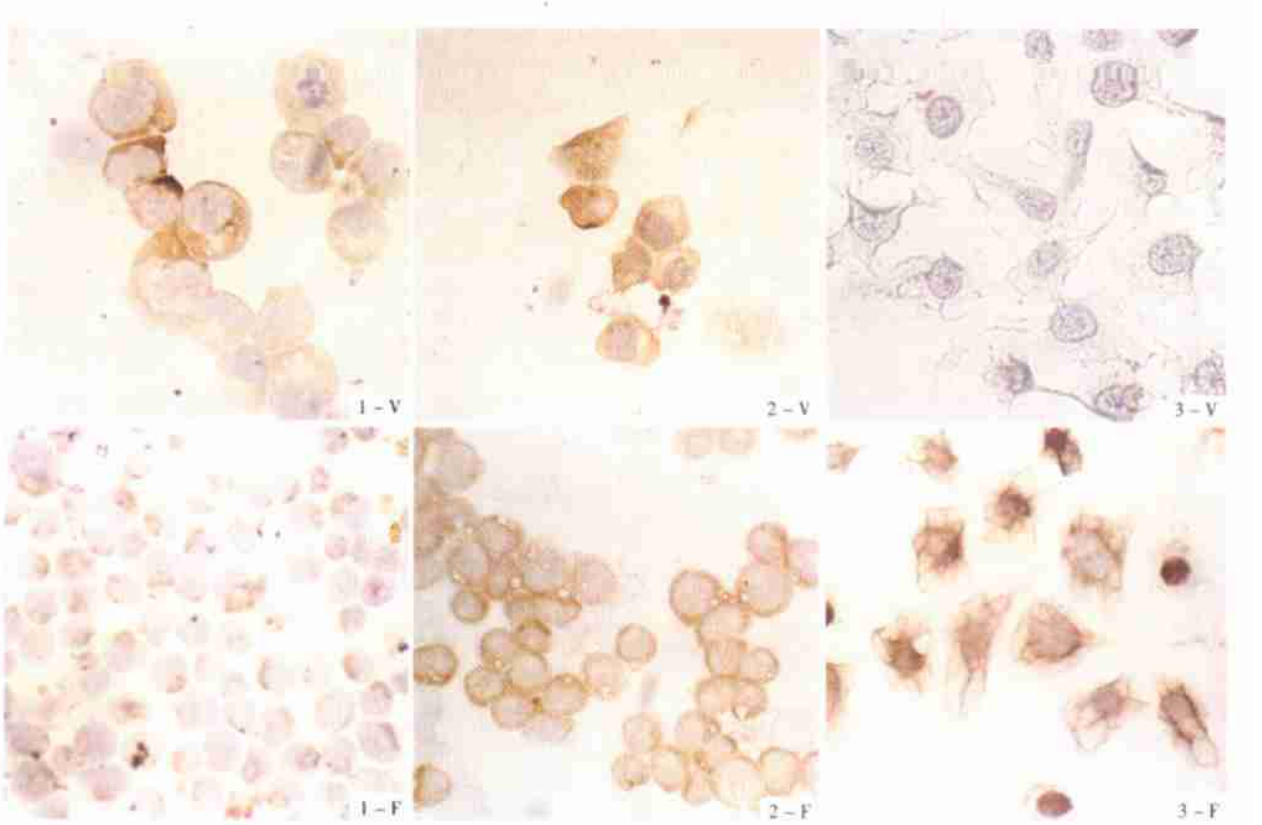
图 1　人白血病细胞系 VEGF 和 Flt-1 mRNA 表达

Fig 1　Expressions of VEGF and Flt-1 mRNA in human leukemic cell lines

2.2　各细胞系 VEGF 和 Flt-1 蛋白的表达

结果显示 HL-60 和 K562 细胞表达 VEGF 和 Flt-1 蛋白, 其阳性结果示胞浆呈棕黄色。ECV304 细胞则只表达 Flt-1 蛋白而无 VEGF 表达, 见图 2。未加一抗的空白对照标本均呈阴性(图略)。

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



1：K562；2：HL-60；3：ECV304；V：VEGF；F：Flt-1

图2 人白血病细胞系 **VEGF** 和 **Flt-1** 蛋白表达 （SABC×400）

Fig 2 Expressions of VEGF and Flt-1 proteins in human leukemic cell line lines （SABC×400）

2.3 VEGF-AS 抑制白血病细胞体外增殖

MTT 试验结果显示，VEGF-AS 能够抑制 HL-60 和 K562 细胞体外增殖，且随着 VEGF-AS 浓度的增加，白血病细胞增殖率呈剂量依赖性降低。终浓度为 5 μmol/L 的 VEGF-AS 能够使白血病细胞增殖率下降一半。而同一条件下 VEGF-MS 作用后并未明显影响白血病细胞增殖。

3 讨论

实体瘤细胞过量分泌 VEGF，通过与分布在血管内皮细胞上的 VEGF 受体（KDR 和 Flt-1）结合，刺激内皮细胞特异性的有丝分裂和促进血管通透性增加以调控肿瘤的血管新生。目前已在部分急性髓性白血病（AML）、慢性髓性白血病（CML）、急性淋巴细胞性白血病（ALL）以及多发性骨髓瘤患者的骨髓细胞发现有 VEGF 的过量表达，同时部分骨髓组织存在血管新生现象。有文献报道部分人白血病细胞同时还表达 VEGF KDR 受体，白血病细胞存在 VEGF-KDR 受体的自分泌环[3]。同时 Aguayo 等[4] 发现 VEGF 的另一个受体 Flt-1 在 B 细胞性的慢性淋巴细胞白血病细胞上有表达。提示过量分泌的 VEGF 可能不仅仅参与了白血病的血管新生。因此有必要证实白血病细胞和体外培养的人白血病细胞系是否都表达 VEGF，以及白血病细胞是否同时还存在 VEGF-Flt-1 受体自分泌环，进一步探明 VEGF 在白血病细胞异常增殖中的作用机制。为此我们以 ECV304 为对照细胞，采用免疫组化染色方法和 RT-PCR 技术从 mRNA 及蛋白水平证实 K562 和 HL-60 这 2 种白血病细胞同时表达 VEGF 及其受体 Flt-1。RT-PCR 实验中我们参考文献[5] 设计的一对引物其序列对应于 VEGF 的 5′和 3′非翻译区，从这 2 种白血病细胞中扩增出了 VEGF mRNA 的 2 个片段，且以 VEGF 121（516 bp）表达最强，而 Bellamy 等[6] 采用不同的引物也证实 K562 和 HL-60 白血病细胞主要表达 VEGF 121 的 mRNA。为探明 VEGF 在白血病细胞增殖中的作用，我们采用与人 VEGF 第三外显子（E3）mRNA 互补的 VEGF 反义寡核苷酸序列（VEGF-AS）处理白血病细胞，同时以不与人基因组其它序列同源的 VEGF 错义寡核苷酸（VEGF-MS）为对照。MTT 试验结果显示 VEGF-AS 能以剂量依赖性方式抑制白血病细胞体外增殖，而 VEGF-MS 则无此作用。VEGF-AS 特异性下调

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

VEGF 表达可以抑制白血病细胞增殖, 提示白血病细胞分泌的 VEGF, 一方面可通过血管内皮细胞上的 VEGF 受体参与血管新生, 另一方面还可能通过白血病细胞上表达的 Flt-1 受体或 KDR 受体参与自身增殖调控。关于 VEGF 在白血病细胞增殖中的可能作用, 早先 Fusetti 等[7] 在移植鼠体内发现 VEGF 可以自分泌或旁分泌方式影响人恶性造血前体细胞的凋亡和植入。最近 Broggini[8] 发现新型抗肿瘤药物 Aplidine 可阻断 MOLT-4 白血病细胞系的 VEGF-Flt-1 受体自分泌环, 从而抑制白血病细胞生长和诱导凋亡。此外, Oyama 等[9] 还发现 Flt-1 受体可能参与了 VEGF 对人 $CD34^+$ 造血细胞向树突状细胞分化过程的调控。因此白血病细胞 VEGF 及其 Flt-1 受体的共同表达在白血病发生中的确切作用尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, *et al*. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. 2Blood, 2000, 96(6): 2240－2245.

[2] Chen H, Treweeke A T, West D C, *et al*. *In vitro* and *in vivo* production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells[J]. 2Blood, 2000, 96(9): 3181－3187.

[3] Dias S, Hattori K, Zhu Z P, *et al*. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration[J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 511-521.

[4] Aguayo A, Manshouri T, O'Brien S, *et al*. Clinical relevance of Flt1 and Tie1 angiogenesis receptors expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)[J]. Leuk Res, 2001, 25(4): 279－285.

[5] Fiedler W, Graeven U, Ergun S, *et al*. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia[J]. Blood, 1997, 89(6): 1870－1875.

[6] Bellamy W T, Richter L, Frutiger Y, *et al*. Expression of vascular endothelial cell growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 728－733.

[7] Fusetti L, Pruneri G, Cobbi A, *et al*. Human myeloid and lymphoid malignancies in the non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mouse model: frequence of apoptotic cells in solid tumors and efficiency and speed of engraftment correlate with vascular endothelial growth factor production[J]. Cancer Res, 2000, 60(9): 2527－2534.

[8] Broggini M, Marchini S V, Galliera E, *et al*. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4[J]. Leukemia, 2003, 17(1): 52－59.

[9] Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, *et al*. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells[J]. J Immunol, 1998, 160(3): 1224－1232.

（编辑　张大春）

（上接 677 页）

表 2　各年龄组疗效

年龄组	例数	痊愈(%)	有效(%)	无效(%)
＜1 岁	15	80 *	13.3	6.7
1～6 岁	41	73.2 *	21.9	4.9
7～18 岁	14	57.1 *	35.7	7.2
＞18 岁	6	50 *	33.3	16.7

各年龄组痊愈率比较, *: $P<0.01$

草莓状血管瘤 60 例, 痊愈 49 例, 有效 11 例, 效果最佳; 海绵状血管瘤 9 例, 痊愈 3 例, 有效 4 例, 无效 2 例, 效果较差; 鲜红斑痣 7 例, 痊愈 1 例, 有效 3 例, 无效 3 例, 效果不佳。

3　讨论

^{90}Sr-^{90}Y 敷贴治疗是一种 β 射线敷贴治疗。^{90}Sr 半衰期为 26.8 年, 它在释放出能量为 0.65 MeV 的 β 粒子后衰变为 ^{90}Y, 此 β 射线较弱, 在组织中最大射程为 2.69 mm; 而 ^{90}Y 再经衰变, 释放能量为 2.16 MeV 的 β 粒子后成为稳定元素 ^{90}Zr, 其 β 射线较强, 在组织中最大射程为 11 mm, 所以 ^{90}Sr-^{90}Y 敷贴治疗的 β 射线主要是 ^{90}Y 衰变释放的[2]。由于 β 射线有较强的电离能力, 较弱的穿透能力, 一定剂量的 β 射线作用于病变部位, 通过其产生的电离辐射生物效应: 减低细胞分裂速度、延长细胞分裂周期、萎缩闭塞微血管等, 可达到治疗目的[3]。

皮肤血管瘤(先天性血管瘤)临床上分为 3 型: 鲜红斑痣、草莓状血管瘤(毛细血管瘤)和海绵状血管瘤。由于草莓状血管瘤多居于皮内, 主要为明显增生的内皮细胞构成, 对射线敏感, 所有治疗效果最好。而鲜红斑痣和海绵状血管瘤由疏松的基质和成熟的内皮细胞构成的扩张血管共同组成, 对射线不敏感, 效果较差。

年龄小的患者疗效较好, 成人患者疗效差是因为血管瘤组织的血管内皮细胞对射线的敏感性随年龄的增长而降低。

^{90}Sr-^{90}Y 敷贴治疗, 疗效确切, 患者局部反应轻微且不留瘢痕。对婴幼儿, 特别是面积较小的草莓状毛细血管型血管瘤特别适宜。部分患者治疗过程出现局部水肿充血、灼痛, 色素沉着等现象, 要根据病情调整照射剂量, 一般 3～6 个月后可消失, 不会留下痕迹。

关键词: 皮肤血管瘤; 敷贴治疗; ^{90}Sr-^{90}Y。

中图法分类号: R817.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 卢倜章, 秦明秀. 放射性核素治疗学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1994. 223－224.

[2] 张德重, 傅烨生. ^{90}Sr 敷贴治疗皮肤血管瘤的疗效观察[J]. 同位素, 2000, 13(3): 190－191.

[3] 赵　辨. 临床皮肤病学[M]. 第 2 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 1988. 1031.

（编辑　刘洪娥）

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