

自分泌血管内皮细胞生长因子对HL-60细胞生物学活性的影响

已知血管内皮细胞生长因子(VEGF)是新生血管形成的主要调控因子之一,在恶性肿瘤发生发展中,通过刺激血管内皮的生长,促进肿瘤细胞的增殖及转移。越来越多的研究结果显示,恶性血液病患者骨髓微血管生成增加,并存在VEGF过度表达,其与白血病的发生、演变及预后密切相关[1][2]。本研究旨在探索白血病细胞自分泌VEGF对自身增殖及凋亡的作用,利用脂质体转染技术将VEGF₁₆₅ cDNA转染入HL-60细胞株,造成VEGF₁₆₅的高表达,观察转染后细胞增殖、集落形成和凋亡的变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及质粒来源 髓系白血病细胞系HL-60购自武汉细胞库。在37℃、5% CO₂和饱和湿度条件下,常规培养于含10%FCS的RPMI1640完全培养基。真核表达载体pcDNA3.1-?9?neo/VEGF₁₆₅ cDNA重组子由周忠江博士构建[3],并惠赠含有该质粒及含空载体pcDNA3.1?9?neo质粒的DH5 α 菌种。VEGF₁₆₅ cDNA插入在EcoRV/Kpn I位点,表达载体具G418及氨苄青霉素抗性。

1.1.2 主要试剂 第2代阳离子脂质体lipofec tamine、RPMI1640培养液及G418购自Gibco BRL; MTT购自上海生工公司;人VEGF ELISA试剂盒购自深圳晶美生物工程公司;Annexin-V-Flous试剂盒购自Boehringer Mannheim。

1.2 方法

1.2.1 脂质体介导VEGF₁₆₅ cDNA转染及克隆筛选

将 2×10^6 个处于对数生长期的HL-60细胞悬浮于0.8 ml 无血清RPMI-1640液中,3~5 μ g质粒DNA与10 μ l脂质体lipofec tamine分别溶于100 μ l同样培养液中;然后将两液混合,室温放置15 min以形成脂质体-DNA复合物。将此混合物加入细胞悬液中,37℃、5% CO₂条件下培养48 h后换为含有G418(400 μ g/ml)的完全培养基,逐步降低G418浓度至200 μ g/ml维持,筛选出稳定克隆。转染了pcDNA3.1--neo/VEGF₁₆₅ cDNA的命名为HL-60/VEGF₁₆₅,转染pcDNA3.1--neo空载体的命名为HL-60/neo。

1.2.2 PCR、RT-PCR及ELISA鉴定转染克隆 RT-PCR及PCR所用试剂及方法参照文献[4]。取处于对数生长期转染克隆细胞,按 3×10^4 /ml细胞浓度培养3 d,用ELISA方法[4]测定培养液上清中VEGF蛋白浓度。

1.2.3 转染克隆细胞增殖能力检测实验

1.2.3.1 MTT法测定细胞生长曲线 取处于对数生长期HL-60/VEGF₁₆₅及HL-60/neo细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,96孔板中每孔加入100 μ l(即 1×10^4 个细胞),分别于培养0、24、48和72 h后每孔加入20 μ l MTT液(5 mg/ml);继续培养4 h后,加入含有0.01% HCl的10%SDS溶解细胞,弃上清。上酶标仪在570 nm波长处测定每孔的D(λ),每个时间段测定20孔求平均值。以时间为横轴,以D(λ)值为纵轴绘制生长曲线。

1.2.3.2 集落形成试验 培养体系含0.7%甲基纤维素、10%FCS和10%混合脐带血浆。按每皿500个细胞接种,每组设3个平行样本。37℃、5% CO₂和饱和湿度条件下培养12 d,倒置显微镜下计数细胞集落(细胞数 ≥ 50 个为集落),计算集落形成率。集落形成率=(集落数/500) \times 100%

1.2.4 转染克隆细胞凋亡 细胞接种密度 1×10^5 /ml,于培养第3天收集细胞。用预冷的PBS洗涤2次后,弃去上清;用Binding buffer重悬细胞,调整细胞密度至 $(2 \sim 5) \times 10^5$ /ml。取195 μ l细胞悬液加入5 μ l Annexin V,混匀后于暗室孵育10 min;再次洗涤细胞,弃去上清,用190 μ l $1 \times$ Binding buffer重悬细胞后,加入10 μ l PI(20 μ

g/ml)。流式细胞仪检测。

1.2.5 统计方法 应用SPSS 8.0统计软件, 均数比较采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 转染细胞的鉴定及其VEGF蛋白的表达

PCR扩增出HL-60/VEGF₁₆₅细胞转染的VEGF₁₆₅ cDNA扩增条带, 而对对照组HL-60/neo细胞未见扩增条带(图1)。RT-PCR结果(图 2)中可见HL-60/VEGF₁₆₅的VEGF mRNA表达量比HL-60/neo明显增加, 证实VEGF₁₆₅ cDNA已成功转入HL-60细胞中。转染细胞以 3×10^4 /ml接种浓度培养3 d, ELISA法检测HL-60/VEGF₁₆₅、HL-60/neo细胞培养上清中VEGF蛋白浓度分别为 (399.07 ± 12.45) 和 (184.45 ± 10.53) ng/L(n=5, P<0.01), 说明HL-60/VEGF₁₆₅细胞VEGF蛋白的表达量比HL-60/neo细胞显著增高。

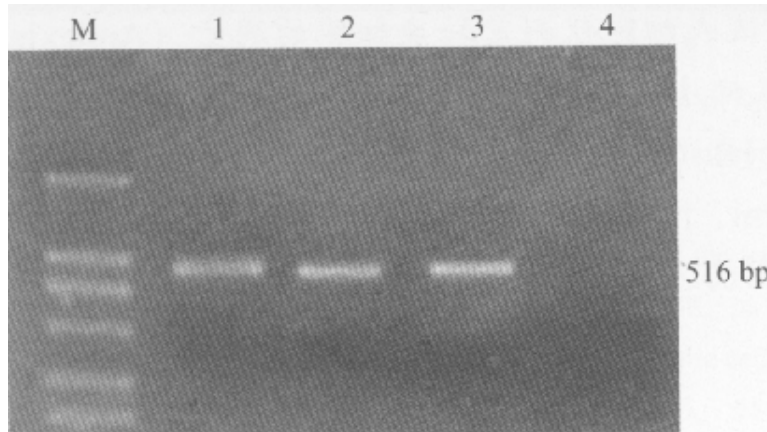


图1 PCR鉴定HL-60转染克隆

Fig.1 Identification of VEGF₁₆₅ cDNA in HL-60 cells by PCR
M: DNA marker; Lanes 1, 2, 3: HL-60/VEGF₁₆₅; Lane 4: HL-60/neo

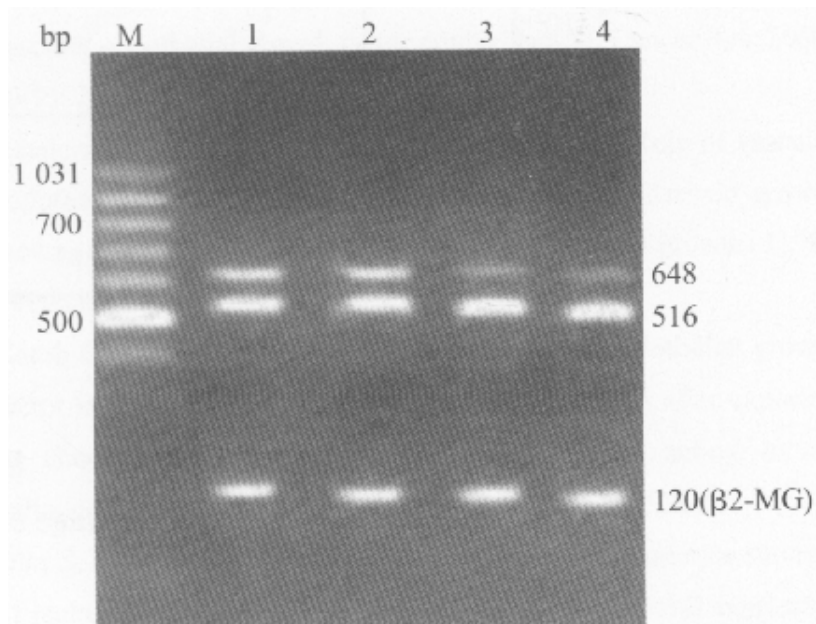


图2 转染细胞VEGF mRNA表达

Fig.2 VEGF mRNA expression of the transfected cells
M: DNA marker; Lanes 1, 2: HL-60/VEGF₁₆₅; Lanes 3, 4: HL-60/neo

2.2 集落形成实验

HL-60/VEGF₁₆₅、HL-60/neo集落数分别为(157.00 ±17.00)/500细胞和(110.00±12.90)/500细胞(n=3, P<0.05)。集落形成率分别为(31.40±3.40)%和(22.07±2.60)% (图3)。

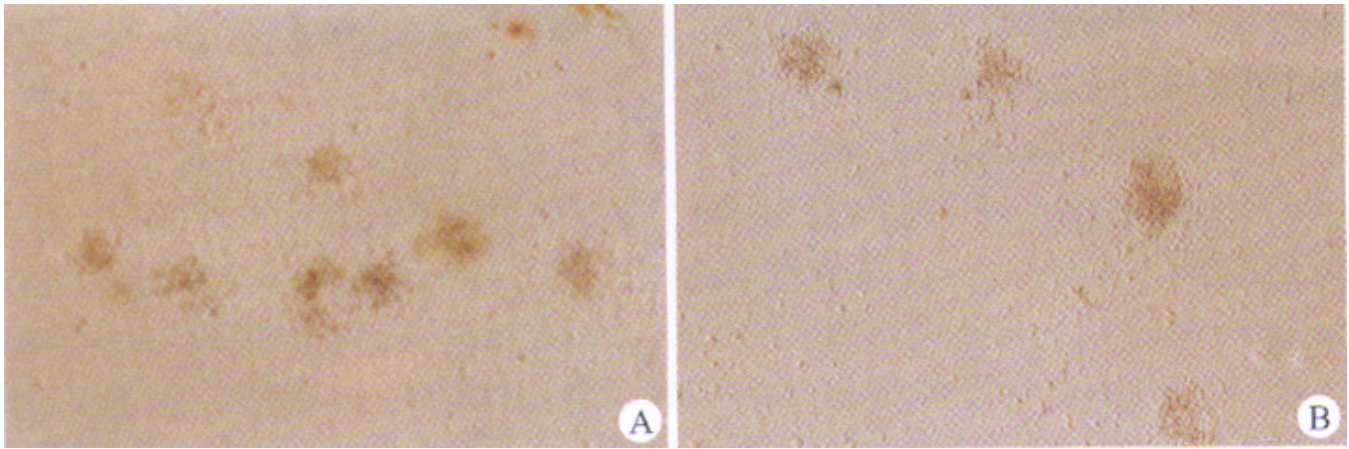


图3 转染细胞集落培养 (原放大倍数: ×10)
Fig.3 Colony forming assay of the transfected cells (Original magnification: ×10)
A: HL-60/VEGF₁₆₅; B: HL-60/neo

2.3 转染细胞的生长曲线

细胞生长曲线(图4)显示, HL-60/VEGF₁₆₅细胞增殖速度明显快于对照组HL-60/neo细胞 (n=20, P<0.01)。

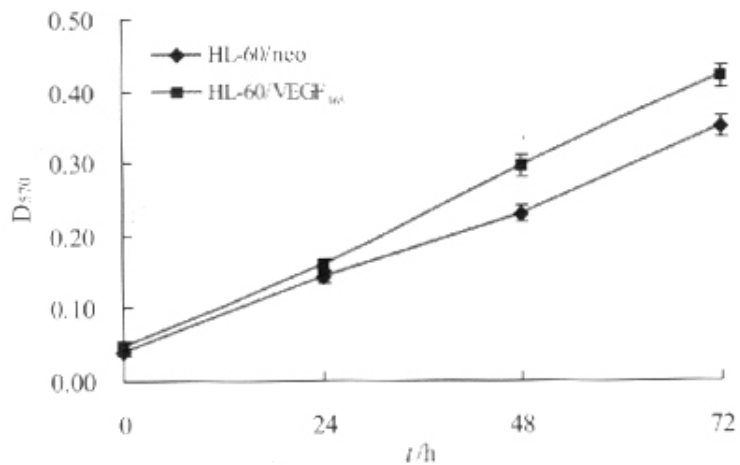


图4 转染细胞增殖曲线
Fig.4 Proliferation curves of transfected cells

2.4 流式细胞仪测定转染细胞的凋亡(Annexin V及PI双标法)(图5)

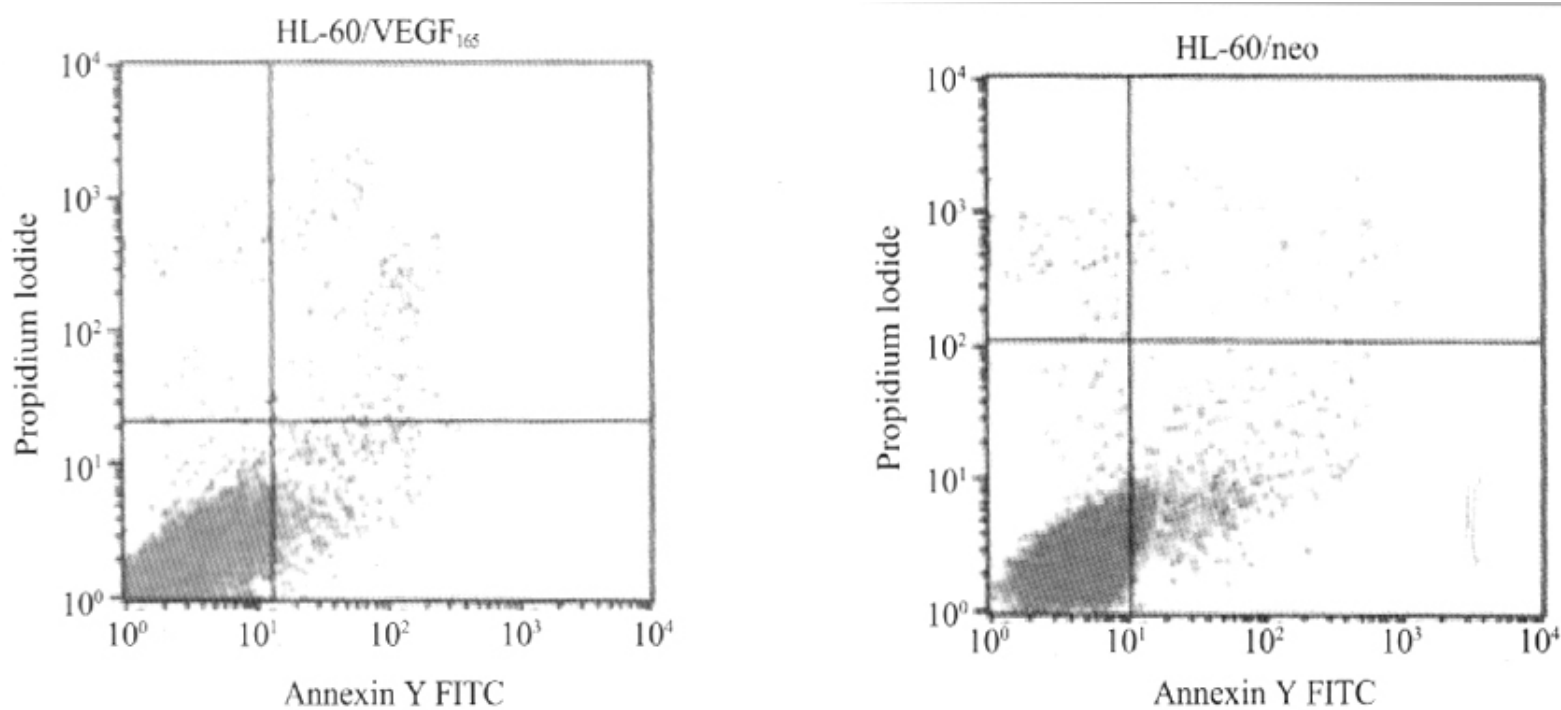


图5 转染细胞凋亡率

Fig.5 Percentage of apoptotic cells in the transfected cells

HL-60/VEGF₁₆₅、HL-60/neo细胞接种密度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，于培养第3天收集细胞，测得凋亡率分别为 $(3.18 \pm 0.33)\%$ 和 $(6.61 \pm 0.50)\%$ ($n=3$)。

3 讨论

人类VEGF基因定位于染色体6p21.3[5]，其中编码VEGF的基因长约14 kb，由8个外显子和7个内含子交替组成。由于不同的剪切方式形成4种同型异构体：VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁、VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆[6][7]。在人体多数组织以表达VEGF₁₆₅和VEGF121为主，尤其是VEGF₁₆₅，它是一种典型的外分泌蛋白。VEGF是新生血管形成的主要调控者之一，它通过与血管内皮细胞上高亲和力的受体相结合而发挥作用，在体内是一种内皮细胞特异性的促分裂原和血管生长因子。VEGF₁₆₅和VEGF121不仅是内皮细胞特异性丝裂原，而且促进血管通透性的增加，VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆则只促进血管通透性增加。现在大量的研究已证实，多种实体肿瘤组织均有VEGF高表达，在实体肿瘤的生长和转移中起重要作用[8]。与实体肿瘤相似，白血病患者骨髓中VEGF过度表达，大量微血管新生，并刺激内皮细胞分泌的多种细胞因子，如粒细胞集落刺激因子、白细胞介素-6和白细胞介素-10等影响白血病细胞增殖，通过旁分泌方式促进造血系统肿瘤生长[9]。有学者研究发现，正常人造血祖细胞及白血病细胞能分泌VEGF，且部分细胞株高表达VEGF的受体FLT-1，提示VEGF不仅通过刺激血管内皮细胞的生长为血液系统肿瘤生长提供必要的物质，可能还存在自分泌作用[10][11]。Ratajczak等[12]在证实这种自分泌作用的同时，观察到VEGF能促进白血病HEL细胞增殖、CML及AML患者白血病细胞集落的形成，推测在一定程度上VEGF可能刺激白血病细胞增殖。我们利用脂质体转染技术将VEGF₁₆₅ cDNA转染入HL-60细胞株，通过RT-PCR及ELISA方法鉴定转染的HL-60细胞高表达VEGF mRNA及蛋白产物，所得结果不仅提示已经成功地将VEGF₁₆₅ cDNA转染入HL-60细胞株，同时还证明转入VEGF₁₆₅ cDNA使VEGF的表达明显增高。MTT试验和集落形成试验发现，转染VEGF₁₆₅ cDNA后的HL-60细胞增殖和集落形成的活力明显增加。流式细胞仪检测显示转染后的细胞凋亡明显减少。这些结果证明，高表达VEGF₁₆₅能促进白血病细胞增殖和集落的形成，抑制白血病细胞凋亡。因此我们认为，VEGF作为肿瘤血管新生的关键因子之一，不仅通过刺激血管内皮细胞的生长而促进造血系统肿瘤的生长，而且可能在一定程度上赋予白血病细胞恶性增殖的能力及抗细胞凋亡的能力。

有关VEGF促进白血病细胞增殖及抗凋亡的机制，Kato[13]、Dias[14]认为VEGF可以诱导白血病细胞和内皮细胞Bcl-2的高表达，从而抑制细胞凋亡。Kuramoto[15]发现锌指结构基因ZK7与VEGF抑制白血病细胞凋亡的作用有关。而我们的实验也证实自分泌VEGF影响细胞的凋亡。是否由于细胞凋亡的减少而造成白血病细胞的大量堆积，从而在MTT

及细胞集落形成实验中表现出白血病细胞增殖和集落形成的增加尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2000, 95(1): 309-13.
- [2] Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 1999, 94(11): 3717-21.
- [3] 周忠江, 刘伊丽, 吴平生, 等. 带信号肽人血管内皮生长因子基因VEGF₁₂₁及VEGF₁₆₅载体的克隆[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(2): 111-3.
Zhou ZJ, Liu YL, Wu PS, et al. Cloning of expression vector for VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ genes encoding human vascular endothelial growth factor[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(2): 111-3.
- [4] 徐丹, 孟凡义, 张燕. 血管内皮生长因子在急性髓系白血病细胞中的表达[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(4): 357-9.
Xu D, Meng FY, Zhang Y. Expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow cells of patients with acute myeloid leukemia[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(4): 357-9.
- [5] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3[J]. *Circulation*, 1996, 93(8): 1493-5.
- [6] Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA[J]. *Mol Endocrinol*, 1991, 5(12): 1806-10.
- [7] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor[J]. *Biol Chem*, 1991, 266(18): 11947-54.
- [8] Fidler I, Ellis L. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis[J]. *Cell*, 1994, 79(2): 185-8.
- [9] Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 728-33.
- [10] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi 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): 5687-92.
- [11] Fusetti L, Pruneri G, Gobbi A, et al. Human myeloid and lymphoid malignancies in the non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mouse model: frequency 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): 2527-34.
- [12] Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PlGF) in regulating human haemopoietic cell growth[J]. *Br J Haematol*, 1998, 103(4): 969-79.
- [13] Katoh O, Takahashi T, Oguri T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5565-9.
- [14] Dias S, Shmelkov SV, Lam G, et al. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition[J]. *Blood*, 2002, 99(7): 2532-40.
- [15] Kuramoto K, Uesaka T, Kimura A, et al. ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 425-30.

参考文献:

- [1] Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angio- genesis in patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 95(1): 309-13.
- [2] Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 1999, 94(11): 3717-21.
- [3] 周忠江, 刘伊丽, 吴平生, 等. 带信号肽人血管内皮生长因子基因VEGF₁₂₁及VEGF₁₆₅载体的克隆[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 111-3.
- Zhou ZJ, Liu YL, Wu PS, et al. Cloning of expression vector for VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ genes encoding human vascular endothelial growth factor[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 111-3.
- [4] 徐丹, 孟凡义, 张燕. 血管内皮生长因子在急性髓系白血病细胞中的表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(4): 357-9.
- Xu D, Meng FY, Zhang Y. Expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow cells of patients with acute myeloid leukemia[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(4): 357-9.
- [5] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M. Assignment of the vascular endo- thelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3[J]. Circulation, 1996, 93(8): 1493-5.
- [6] Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and charac- terization of alternative splicing of RNA[J]. Mol Endocrinol, 1991, 5(12): 1806-10.
- [7] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor[J]. Biol Chem, 1991, 266(18): 11947-54.
- [8] Fidler I, Ellis L. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis[J]. Cell, 1994, 79(2): 185-8.
- [9] Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 728-33.
- [10] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hema- topoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation[J]. Cancer Res, 1995, 55(23): 5687-92.
- [11] Fusetti L, Pruneri G, Gobbi A, et al. Human myeloid and lymphoid malignancies in the non-obese diabetic/severe combined immuno- deficiency mouse model: frequency 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): 2527-34.
- [12] Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PlGF) in regulating human haemopoietic cell growth[J]. Br J Haematol, 1998, 103(4): 969-79.
- [13] Katoh O, Takahashi T, Oguri T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5565-9.
- [14] Dias S, Shmelkov SV, Lam G, et al. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition[J]. Blood, 2002, 99(7): 2532-40.
- [15] Kuramoto K, Uesaka T, Kimura A, et al. ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 425-30.