

# VIP 增强 VEGF mRNA 在非小细胞肺癌细胞中的表达

赵正源 程庆书 李小飞 王小平 刘锴

**【摘要】** 背景与目的 研究发现血管内皮生长因子(VEGF)和血管活性肠肽(VIP)均对肿瘤的生长具有促进作用,但VIP通过何种方式来促进肿瘤的生长还不清楚。本研究的目的是观察VIP对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞中VEGF mRNA表达的影响。方法 应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测VEGF mRNA在NSCLC细胞系和小细胞肺癌(SCLC)细胞系中的表达及VIP对其表达的影响。结果 在NSCLC细胞系A549、GLC-82、H157、H460和SCLC细胞系H446中检测到了VEGF mRNA的表达。VIP能促进VEGF mRNA在A549和H157细胞中的表达,在VIP作用8h和16h时,VEGF mRNA的表达水平达到最高,显著高于VIP作用0h时( $P < 0.01$ )。结论 VIP可能通过增强VEGF mRNA在肺癌细胞中的表达和分泌,促进肺癌新生血管的生成,参与肿瘤的生长。

**【关键词】** 非小细胞肺癌 血管活性肠肽 血管内皮生长因子 RT-PCR 血管形成

**【中图分类号】** R734.2

**Vasoactive intestinal peptide enhances the expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small cell lung cancer cells** ZHAO Zhengyuan, CHENG Qingshu, LI Xiaofei, WANG Xiaoping, LIU Kun. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi 710038, P. R. China

Corresponding author: ZHAO Zhengyuan, E-mail: zhenyuan@pub. xaonline.com

**【Abstract】** **Background and objective** Some researches have found that the development of tumor could be encouraged by vascular endothelial growth factor (VEGF) and vasoactive intestinal peptide (VIP), but how about the mode of VIP? The aim of this study is to examine the effects of VIP on expression of VEGF mRNA in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** Expression of VEGF mRNA was detected in NSCLC and small cell lung cancer (SCLC) cell lines by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. **Results** VEGF mRNA was detected in NSCLC cell lines A549, GLC-82, H157, H460 and SCLC cell line H446. VIP could enhance the expression level of VEGF mRNA in NSCLC cell lines A549 and H157. The expression level of VEGF mRNA reached a peak at 8 h and 16 h after VIP administration, which was significantly higher than that at 0 h ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** VIP may promote the angiogenesis of lung cancer through increasing the expression and secretion of VEGF in lung cancer cells, and thus plays an important role in the pathogenesis of lung cancer.

**【Key words】** Non-small cell lung cancer Vasoactive intestinal peptide Vascular endothelial growth factor RT-PCR Angiogenesis

同其他实体瘤一样,肺癌的生长和转移也离不开新生血管的生成。作为促血管生长因子家族主要成员之一的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),在促进肿瘤的新生血管生成过程中发挥着重要作用<sup>[1,2]</sup>。许多研究表明肺癌细胞能产生VEGF,通过旁分泌机制作用于血管内皮细胞,

促进肿瘤血管的生成<sup>[3,4]</sup>。但是VEGF在肺癌细胞中的生成受到诸多因素的影响。已知肺内存在许多生物活性多肽,如在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中存在血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)<sup>[5]</sup>。这些多肽对肿瘤的生长也起着重要的作用,但是其机制还不清楚。本研究利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术观察了VIP对NSCLC细胞中VEGF mRNA表达的影响,以探讨VIP和VEGF在NSCLC形成中的相互作用。

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院胸外科(通讯作者:赵正源, E-mail: zhenyuan@pub. xaonline.com)

## 1 材料与方法

**1.1 材料** NSCLC 细胞系 NCI-H157 (鳞癌) 和 NCI-H460 (大细胞肺癌) 由加州大学洛杉矶分校 Dr. Chen ZW 惠赠, NSCLC 细胞系 A549 (腺癌)、GLC-82 (腺癌) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 细胞系 H446 为我校解剖学教研室提供。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、TRIzol 试剂购自美国 Gibco BRL 公司。DTT、RNasin、oligo(DT)<sub>12-15</sub> 和 M-MLV 反转录酶为 Invitrogen 公司产品。Taq DNA 聚合酶为日本 Takara 公司产品。VIP 购自美国 Sigma 公司。引物由上海博亚生物技术公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将各细胞系复苏后分别加入含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、0.1 g/L 链霉素和 1.2 mg/L 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 恒温箱内培养, 4~6 天传代一次, 进入对数生长期后, 收集细胞, 提取细胞总 RNA。

其中, NSCLC 细胞系 A549 和 NCI-H157 在达到对数生长期后, 分别接种于 35 mm 培养皿中, 3×10<sup>5</sup> 细胞/培养皿, 继续培养 24 h。向每个培养皿中加入终浓度为 0.1 μmol/L 的 VIP, 分别培养 0、2、4、8、16 和 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA。

**1.2.2 细胞系总 RNA 的提取** 利用 TRIzol 试剂裂解细胞后, 加入 0.2 ml 氯仿, 震荡混匀, 以 6 000 g 离心 10 min。取上层水相, 加等体积异丙酮混合, 室温孵育 10 min。于 4℃ 以 13 000 g 离心 15 min, 弃上清。沉淀块用 700 mg/L 乙醇冲洗后, 以 20 μl DEPC 处理的去离子水溶解, 并用分光光度计测量 RNA 浓度, 于 -80℃ 保存备用。

**1.2.3 反转录合成 cDNA** 在 50 μl 的反应体积中加入 2 μg 总 RNA、5× 反应缓冲液 10 μl、10 mmol/L dNTPs 5 μl、RNasin (4×10<sup>5</sup> U/L) 0.5 μl、oligo(DT)<sub>12-15</sub> 0.25 μg、M-MLV 反转录酶 (2×10<sup>4</sup> U/L) 2 μl、0.1 mol/L DTT 0.5 μl, 置 37℃ 孵育 1 h, 然后在 65℃ 加热 5 min, 储存于 -20℃。

**1.2.4 引物设计及合成** 按照已报道的人 VEGF mRNA 序列设计相应的特异性引物 (上游: 5'-ACC CAT GGC AGA AGG AGG AG-3'; 下游: 5'-ACG CGA GTC TGT GTT TTT GC-3')。同时合成 β-actin 引物 (上游: 5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C-3'; 下游: 5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC A-3'), 作为 PCR 反应时的内参照。VEGF 和 β-actin 扩增产物的大小分别为 433 bp 和 265 bp。

**1.2.5 PCR 扩增** 在 25 μl 的反应体积中加入合成的 cDNA 0.1 μg、10× PCR 缓冲液 2.5 μl、dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μl、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5 μl、各引物 (20 μmol/L) 1 μl、Taq DNA 聚合酶 (5×10<sup>6</sup> U/L) 0.5 μl。热循环条件: 93℃ 1 min, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 进行 1 个循环; 93℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 进行 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min。

**1.2.6 结果分析** 取各扩增产物 10 μl, 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色后, 用 UVP 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带进行光子强度测定。将 VEGF 阳性条带的密度与 β-actin 条带密度的比值作为 VEGF mRNA 的相对表达量。对获得的数据进行配对 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 VEGF mRNA 在肺癌细胞系中的表达** RT-PCR 方法在各细胞系中均检测到了大小为 433 bp 的阳性条带, 与从 VEGF 引物所推导的 PCR 产物的大小一致。但 VEGF mRNA 在各细胞系中的表达量存在差异, 在 NSCLC 细胞系 A549、H157 和 SCLC 细胞系 H446 中有较高水平的表达, 而在 NSCLC 细胞系 GLC-82 和 H460 中的表达较弱 (图 1)。

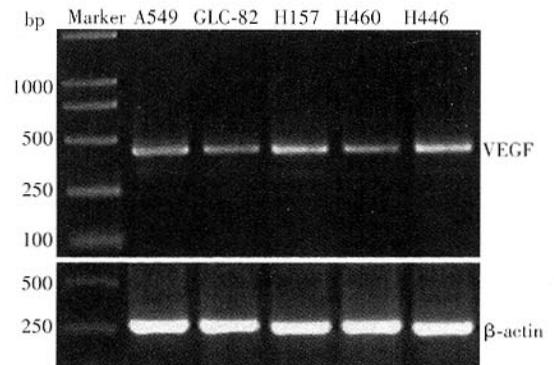


图 1 VEGF mRNA 在不同肺癌细胞系中的表达

Fig 1 Expression of VEGF mRNA in different lung cancer cell lines

**2.2 VIP 对 VEGF mRNA 在 NSCLC 细胞系 A549 和 H157 中表达的影响** 向腺癌细胞系 A549 和鳞癌细胞系 H157 中加入 VIP 后, VEGF mRNA 在两种细胞系中的表达水平上调, 而且呈现相似的时程依赖性特点 (图 2)。在 VIP 作用 8 h 和 16 h 时, VEGF mRNA 的表达水平最高, 与 VIP 作用 0 h 时相比有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。VIP 作用 4 h 和 24 h 时, VEGF mRNA 的表达水平也明显高于 0 h 时 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。作为内对照的 β-actin 的表达水平在各时间点基

本一致,表明在 PCR 反应中所加的模板量是相等的。

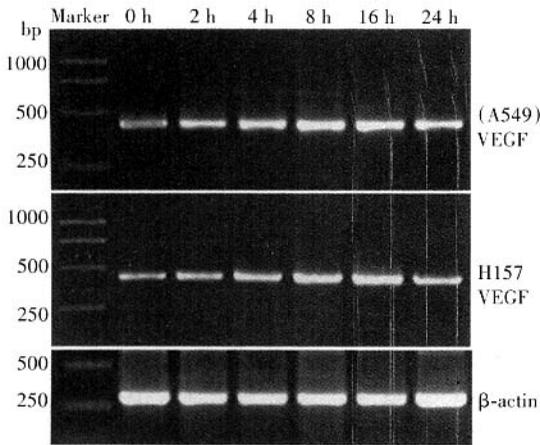


图 2 VIP 对 VEGF mRNA 在 A549 和 H157 细胞系中表达的影响

Fig 2 Effect of VIP on expression of VEGF mRNA in A549 and H157 cell lines

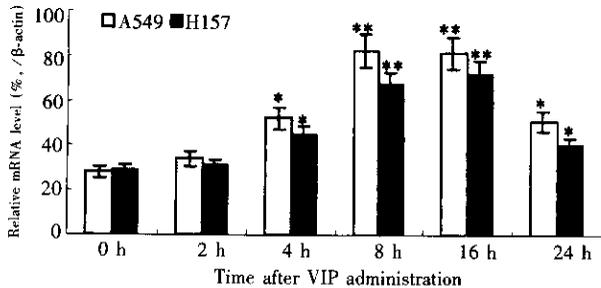


图 3 VIP 作用不同时间后 VEGF mRNA 在细胞系中的相对表达量

Fig 3 Relative expression level of VEGF mRNA in cell lines at different time points after VIP treatment

Compared to 0 h, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$

### 3 讨论

VEGF 是一种高效多功能的细胞因子,对血管内皮细胞的增殖、迁移、基膜水解和血管构建具有强的调控作用。肿瘤细胞的 VEGF 表达是肿瘤血管生成和血管通透性增加的重要原因。有报道证实,VEGF 在包括肺癌在内的多种肿瘤中有高表达<sup>[1~3]</sup>。本研究证明,VEGF mRNA 在多种 NSCLC 细胞系和 SCLC 细胞系中有表达,表明 VEGF 存在于多种组织类型的肺癌中,在肺癌的血管生成和转移中发挥着重要作用。VEGF mRNA 在不同细胞系中的表达水平也存在着差异,提示 VEGF 在参与不同类型肺癌的新生血管的形成过程中具有不同的作用。

VIP 广泛地存在于人体的多种组织中,如心血管系统、消化系统和神经系统等。在肺内,VIP 受体分布于肺毛细血管的内皮细胞上<sup>[5]</sup>。有研究表明,肺癌细胞能产生 VIP,是肺癌细胞的自分泌生长因子<sup>[4,6]</sup>。给

予 VIP 受体的拮抗剂能够抑制肺癌细胞的生长,表明 VIP 在肺癌的生长中起着重要作用<sup>[7]</sup>。但是 VIP 通过怎样的方式来实现其促进肿瘤生长的作用仍不清楚。在本研究中观察到,VIP 能促进 VEGF mRNA 在 NSCLC 细胞系 A549 和 H157 中的表达,而且呈时程依赖性的特点,表明 VIP 能增强 VEGF 在肺癌细胞中的表达,促进其分泌,提示 VIP 能促进肺癌的血管生成,这可能是 VIP 参与肺癌生长的机制之一。

从本研究结果还可以看到,VIP 既可以促进 VEGF mRNA 在 NSCLC 腺癌细胞系 A549 中的上调表达,也可以增强 VEGF 在鳞癌细胞系 H157 中的表达,提示 VIP 对 VEGF 在多种组织类型的 NSCLC 细胞的表达均有作用。因此,有针对性地开发与 VIP 及其类似物或特异性的 VIP 受体拮抗剂相关的药物,用于 NSCLC 的治疗,可能具有潜在的临床应用前景。在本研究中,我们没有观察 VIP 对其他类型的肺癌细胞如 SCLC 细胞中 VEGF 表达的影响,这部分的工作有待于进一步开展。另外,VIP 通过怎样的信号通路来调节 VEGF mRNA 在 NSCLC 细胞中的表达,尚需深入研究。

### 参 考 文 献

- Underiner TL, Ruggeri B, Gingrich DE. Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Curr Med Chem*, 2004, 11 (6) : 731-745.
- Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 2003, 23(6C) : 4715-4720.
- Shepherd FA, Sridhar SS. Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 41(Suppl 1) : S63-S72.
- Moody TW, Hill JM, Jensen RT. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides*, 2003, 24(1) : 163-177.
- Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, et al. Neuropeptides as auto-crine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(6) : 495-509.
- Maruno K, Said SI. Small-cell lung carcinoma: inhibition of proliferation by vasoactive intestinal peptide and helodermin and enhancement of inhibition by anti-bombesin antibody. *Life Sci*, 1993, 52 (24) : PL267-271.
- Moody TW, Zia F, Draoui M, et al. A novel VIP antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (10) : 4345-4349.

(收稿:2004-09-21 修回:2004-12-22)

(本文编辑 李蓓兰)