

血管内皮生长因子受体-3 对宫颈癌细胞凋亡的效应研究

刘 琰,杨婉华,马湘一,陈 睿,汪 蕊,卢运萍,马 丁,王世宣

The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 on the Apoptosis of Cervical Cancer

LIU Yan, YANG Wan-hua, MA Xiang-yi, CHEN Rui, WANG Rui, LU Yun-ping, MA Ding, WANG Shi-xuan

Cancer Biology Research Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: WANG Shi-xuan, E-mail: sxwang@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) on the apoptosis of cervical cancer cells. **Methods** VEGFR-3 antisense gene eukaryotic expression vector was constructed and transfected to human cervical cancer cell line, HeLa cell line by electroporation. The expression level of VEGFR-3 protein before and after transfection was determined by Western Blot and the apoptosis of HeLa cell line was observed by Hoechst33258 and flow cytometry. **Results** After the transfection of the antisense VEGFR-3 plasmid, the expression level of VEGFR-3 protein decreased significantly, and the apoptotic rate of HeLa cells increased, compared with the control ($P < 0.01$). **Conclusion** Antisense VEGFR-3 transfection may induce the apoptosis of the human cervical cancer cells. Thus VEGFR-3 might be a potential target for gene therapy.

Key words: VEGFR-3; Antisense nucleic acid; Apoptosis; Cervical cancer

摘要:目的 研究血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)在人宫颈癌细胞凋亡过程中的作用。方法 用基因重组方法构建人反义 VEGFR-3 基因真核表达载体,用电穿孔法转染人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞。采用 Western Blot 分析转染前后细胞中 VEGFR-3 蛋白的变化。利用 Hoechst33258 染色和流式细胞仪观察转染后 HeLa 细胞的凋亡情况。结果 转染反义 VEGFR-3 质粒后, HeLa 细胞 VEGFR-3 的蛋白表达水平明显下降,细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$)。结论 抑制 VEGFR-3 的表达可促进宫颈癌细胞的凋亡,VEGFR-3 可能是肿瘤基因治疗的一个潜在新靶点。

关键词: VEGFR-3;反义核酸;凋亡;宫颈癌

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)09-0659-03

0 引言

血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)属于酪氨酸激酶受体家族,在胚胎发生的初始阶段存在于所有的内皮细胞,随后定位于小静脉和淋巴管,是成熟淋巴管内皮细胞的特异性标志物^[1]。VEGFR-3 主要通过与其配体 VEGF-C、VEGF-D 结合后,促进淋巴内皮细胞的增殖、分化,诱导淋巴管生成,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[2]。在肿瘤组织中可见肿瘤周边的新生淋巴管、扩张的淋巴管、有癌栓的淋巴

管内皮细胞 VEGFR-3 呈高表达^[3]。

现有研究表明 VEGFR-3 在多数肿瘤细胞上也有相应表达^[4],但关于其在肿瘤细胞中的效应及作用机制尚不清楚。我们自行设计了 VEGFR-3 的反义重组质粒,通过电穿孔转染法瞬时转染人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞,观察反义封闭 VEGFR-3 后 HeLa 细胞凋亡情况的变化,对 VEGFR-3 在宫颈癌细胞中的作用及其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂与仪器 培养基 DMEM、Trizol 购自美国 Gibco BRL 公司;胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;M-MLV 逆转录酶、pGEM-T 载体购自美国 Promega 公司;PCR 引物购自上海博亚生物技术有限公司;兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体、

收稿日期:2006-03-01;修回日期:2006-03-22
基金项目:国家重点基础研究发展规划项目 973 (2002CB513107)
作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医院妇科肿瘤
通讯作者:王世宣,E-mail:sxwang@tjh.tjmu.edu.cn
作者简介:刘琰(1982-),女,硕士,主要从事恶性肿瘤侵袭和转移机制及分子阻遏的研究

兔抗人 α -actin 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司; ECL 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.1.2 细胞培养 人宫颈癌细胞株 HeLa 购自美国典型物种保藏中心(ATCC), 培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 置饱和湿度 5% CO₂, 37℃ 恒温培养箱中培养。

1.2 VEGFR-3 反义核酸载体的构建

1.2.1 VEGFR-3 目的基因的制备 根据 NCBI Genebank 登录的 VEGFR-3 的 cDNA 序列, 利用 Primer5.0 设计 VEGFR-3 胞外 1~3 区的引物, 上游引物设计 BamH 酶切位点, 下游引物设计 EcoR 酶切位点, 上游引物序列为: 5'-GGA TCCGACG GCCTGGTGA GTGACTA-3' 下游引物序列为: 5'-GAA TTCCTTTGA GCCACTCGACGCTGA TGA-3'。按 Trizol 说明书从胎盘组织中提取总 mRNA (由华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科提供), 再以 RT-PCR 方法大量扩增 VEGFR-3 目的片段。PCR 循环条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环, 全部循环结束后, 于 72℃ 做 10 min 终止前延伸。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物纯化试剂盒纯化目的片段。

1.2.2 反义 VEGFR-3 重组质粒的构建 按常规分子生物学方法, 将目的基因和载体连接。连接产物转化, 挑取阳性克隆, 少量摇菌后酶切初步鉴定、测序。

1.3 基因转染及细胞分组

参考《分子克隆》采用电穿孔转染法, 将电击完的细胞转移至已加入适量培养基的 35mm 培养皿中, 培养皿置于含 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱, 24h 后观察转染效率。

细胞分组: 空白组(不做处理的 HeLa 细胞), 对照组(转染空质粒 pEGFP-C1 的 HeLa 细胞), 实验组(转染反义质粒的 HeLa 细胞)。

1.4 WesternBlot 分析转染前后细胞 VEGFR-3 蛋白的表达

分别提取空白组细胞、转染空载体及转染反义质粒 48h 的 HeLa 细胞总蛋白, 参考《分子克隆》实验方法, 按 ECL 显色试剂盒说明书曝光成像。

1.5 转染细胞生物学效应的观察

1.5.1 Hoechst33258 观察转染前后细胞形态学的变化 将空白组、对照组和实验组的 HeLa 细胞分别置于预先放入玻片的六孔板中, 待 24 h 后取出玻片, PBS 漂洗, 固定, 待干燥后由 Hoechst33258 室温避光染色 30min, 封片后荧光显微镜观察。

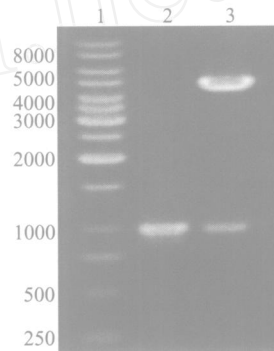
1.5.2 流式细胞法检测 HeLa 细胞凋亡率 分别收集空白组、对照组和实验组 48h 后的 HeLa 细胞, 常规方法进行 PI 染色后, 上机检测。

1.6 统计分析 HeLa 细胞凋亡率以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验在 SPSS 11.5 统计软件上分析差异显著性, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFR-3 反义表达载体构建及鉴定

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 970bp 处有明显扩增条带, 其大小与预期目的基因片段相吻合, 构建的 VEGFR-3 反义表达载体经 BamH, EcoR 双酶切产生了两条带: 载体 pEGFP-C1 片段(4.7kb) 和目的片段(970bp)。对酶切正确的质粒进行测序, 结果表明其序列与插入方向正确, 见图 1。



1: 1kb DNA 标准; 2: VEGFR-3 PCR 产物(970bp); 3: 双酶切产生的条带, 可见目的条带(970bp)和载体片段(4.7kb)

图 1 构建质粒的酶切鉴定

2.2 电穿孔法转染 HeLa 细胞效率的鉴定

荧光显微镜下观察, 对照组和实验组的 HeLa 细胞可见绿色荧光, 通过高倍镜(200×)计数至少 3 个视野 EGFP 发光的细胞数与该视野总细胞数的比值来得到基因的转染率, 本研究基因转染率约为 30%~40%。

2.3 VEGFR-3 蛋白的表达

Western blot 分析转染反义表达载体前后 HeLa 细胞中 VEGFR-3 蛋白的表达结果显示, 三组细胞中均有 VEGFR-3 蛋白表达(120 KD), 但空白组和对照组比较无显著差异, 而实验组 HeLa 细胞 VEGFR-3 蛋白表达明显减弱, 见图 2。

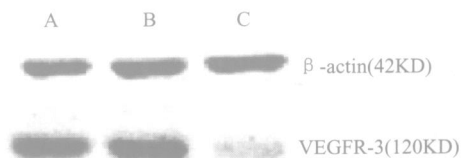


图 2 Western Blot 检测空白组(A), 对照组(B)及实验组(C)中 VEGFR-3 的表达

2.4 Hoechst33258 染色

荧光显微镜下 (x200) 观察, 未经处理 HeLa 细胞和转染空载体的 HeLa 细胞核较大, 呈弥散均匀荧光, 而转染反义 VEGFR-3 重组质粒的细胞核较小, 可见浓染致密的颗粒状荧光, 并呈现凋亡核固缩形态 (图略)。

2.5 流式细胞仪对 HeLa 细胞凋亡的分析

反义 VEGFR-3 重组质粒或空载体转染 HeLa 细胞 48h 后, 应用流式细胞仪对 HeLa 细胞进行凋亡分析, 结果显示: 转染反义质粒后, HeLa 细胞凋亡率由 (0.48 ± 0.02) % 增加至 (8.6 ± 0.21) %, 与空白组和对照组相比, 差异均具有极显著性 (P < 0.01), 见表 1。

表 1 质粒转染后 HeLa 细胞凋亡的变化

| 组别 | HeLa 细胞的凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$) |
|-----|------------------------------------|
| 空白组 | 0.48 ± 0.02 |
| 对照组 | 0.78 ± 0.03 |
| 实验组 | 8.60 ± 0.21 * |

注: * 与对照组相比, P < 0.01

3 讨论

VEGFR-3 属于酪氨酸激酶受体家族, 为一个高度糖基化的单链跨膜蛋白, 分子量为 180kD, 有 3 部分组成, 一个胞外区 (配体结合区), 一个跨膜区和一个胞内区 (蛋白激酶活化区)。其中胞外区为 7 个免疫球蛋白样超二级结构, 而且第 2 个 Ig 同源区为其与配体结合的区域^[5]。VEGFR-3 和其特异性配体 VEGF-C/ VEGF-D 结合后, 发生磷酸化, 可能通过激活 PI3K/Akt 和 p42/p44 MAPK 信号通路, 对淋巴管内皮细胞产生特异性的致分裂作用, 促使淋巴内皮细胞分裂增殖, 促进淋巴管新生^[6]。

国内外多数研究表明, VEGF-C/ VEGFR-3 在肿瘤周边的新生淋巴管内皮细胞呈高表达, 与肿瘤的淋巴结转移呈高度相关; VEGF-C 可通过与 VEGFR-3 结合而促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 阻断 VEGF-C 或 VEGFR-3 的作用, 能够抑制肿瘤的淋巴道转移^[7-9]。

VEGFR-3 在多数肿瘤细胞的表面也有相应的表达, 这可能与肿瘤细胞自分泌各种生长因子有关, 但其对肿瘤细胞的效应目前尚不清楚。多数研究表明, VEGFR-3 胞外 1~3 区为其与配体结合所必需区段, 阻断该区的表达, 就可抑制 VEGFR-3 和配体的结合, 进而阻断其后续的信号传导通路^[10]。因此, 本实验设计了带有报告基因 GFP 的 VEGFR-

3 胞外 1~3 区的反义核酸, 转染人宫颈癌 HeLa 细胞, 转染后的细胞经 Western Blot 检测其 VEGFR-3 蛋白表达明显减弱; 同时发现, 转染 VEGFR-3 反义核酸的 HeLa 细胞与空载体的 HeLa 细胞相比, 差异具有极显著性 (P < 0.01), 提示 VEGFR-3 在肿瘤细胞的增殖分化中同样也起到重要的作用。

总之, 我们的研究结果提示, VEGFR-3 反义核酸可以促进宫颈癌细胞的凋亡, 推测可能是通过降低宫颈癌细胞 VEGFR-3 的表达, 继而抑制 VEGFR-3 所介导的信号通路发挥作用。虽然其作用机制还需进一步探讨, 但我们认为, 应用 VEGFR-3 反义核酸既可阻断肿瘤的淋巴道转移, 又可促使肿瘤细胞凋亡, 不失为未来临床抗肿瘤治疗的一个新的选择。

参考文献:

- [1] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(8): 3566-3570.
- [2] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [J]. EMBO J, 1996, 15(2): 290-298.
- [3] Terhi Karpanen, Kari Alitalo, Lymphatic Vessels as Targets of Tumor Therapy[J]. J Exp Med, 2001, 194(6): F37-F42.
- [4] Adhemar Longatto Filho, Albino Martins, Sandra Maria Araujo Costa, et al. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels [J]. Pathology-Research and Practice, 2005, 201(2): 93-99.
- [5] Klagsbrun M, D Amore PA, Vascular endothelial growth factor and its receptors [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1996, 7(3): 259-270.
- [6] Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. EMBO J, 2001, 20(17): 4762-4773.
- [7] Yulong He, Terhi Karpanen, Kari Alitalo. Role of lymphangiogenic factor in tumor metastasis [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2004, 1654(1): 3-12.
- [8] Bronislaw Pytowski, Jeremy Goldman, Kris Persaud, et al. Complete and Specific Inhibition of Adult Lymphatic Regeneration by a Novel VEGFR-3 Neutralizing Antibody [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(1): 14-21.
- [9] JianMin Lin, Alshad S Lalani, Thomas C, et al. Inhibition of Lymphogenous Metastasis Using Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of a Soluble VEGFR-3 Decoy Receptor [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 6901-6909.
- [10] Yulong He, Kenrichi Kozaki, Terhi Karpanen, et al. Suppression of Tumor Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Signaling [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(11): 819-825.

[编辑: 贺文]