

[文章编号] 1000- 4718(2006)11- 2198- 04

全反式维甲酸对结肠癌不同增殖潜能细胞株 VEGF 表达的影响*

殷平¹, 王效民^{2a}, 王斌³, 纪毅馨¹(厦门大学¹附属中山医院病理科, ²附属中山医院普通外科, ³医学院病理教研室, 福建 厦门 361004)

[摘要] 目的: 探讨全反式维甲酸对结肠癌不同增殖潜能细胞株 VEGF 表达的作用; 研究 VEGF 在结肠癌侵袭和转移中的作用。方法: 采用细胞培养观察、ATRA 干预、MTT 和 FACS 方法确定结肠癌细胞株 CW-2 和 LS174T 的生长增殖状况, 用 Northern blotting 方法检测结肠癌中 VEGF mRNA 的表达量, 用免疫细胞化学观察细胞 VEGF 蛋白的表达。结果: MTT 生长曲线显示结肠癌细胞株 LS174T 的生长增殖比 CW-2 快; FACS 结果显示 LS174T 细胞的 S 期细胞较 CW-2 细胞数多; Northern blotting 和免疫细胞化学检测在 CW-2 中有明显的 VEGF 表达, 但在高增殖细胞株 LS174T 中 VEGF 的表达更明显。结论: VEGF 在结肠癌细胞株中有较高的表达。在高增殖结肠癌细胞株 VEGF 表达更明显。ATRA 可能通过抑制 VEGF 表达, 而抑制结肠癌细胞的增生。

[关键词] 结肠肿瘤; 内皮生长因子; 维甲酸; 肿瘤转移

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of all trans retinoic acid on VEGF expression in colorectal carcinoma cell strain with different proliferation potential

Y N Ping¹, WANG Xiao-min², WANG Bin³, JI Yi-xin¹

(¹ Department of Pathology, ² Department of surgery, Zhongshan Hospital, ³ Department of Pathophysiology, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361004, China. E-mail yinping20022002@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AM:** To investigate the Effects of ATRA on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in colorectal carcinoma cell strain with different proliferative potential and to study the role of VEGF in colorectal carcinoma with invasion and metastasis. **METHODS** The state of proliferation in CW-2 and LS174T cell strain were investigated by using cell culture, ATRA intervention, MTT and FACS. Quantitative expression of VEGF mRNA in colorectal carcinoma was detected by Northern blotting. The protein expression of VEGF was observed by immunohistochemistry. **RESULTS** Growth curve of MTT showed that proliferation of LS174T cell strain was faster than those of CW-2. FACS showed that the cells in S phase of LS174T cell strain were more than those of CW-2. Detection by Northern blotting and immunohistochemistry showed that the expression of VEGF mRNA in LS174T cell strain was obviously higher than those in CW-2. Furthermore, ATRA at a dose of 10^{-5} mol/L significantly inhibited cell proliferation and VEGF expression in LS174T cell strain. **CONCLUSION:** VEGF promotes angiogenesis and increases blood supply in colorectal carcinoma, which is closely correlated with tumor growth. All-trans retinoic acid (ATRA) may restrain cell proliferation of colorectal carcinoma through down regulation of VEGF expression.

[KEY WORDS] Colonic neoplasms; Endothelial growth factors; Tretinoin; Neoplasms metastasis

现已明确血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 是肿瘤血管生成最重要的生长因子^[1]。大量的临床和实验研究表明 VEGF 还通过多种途径促进肿瘤生长、发展和转移。本研究拟采用 MTT、RT-PCR、Northern blotting 和免疫细胞化学等方法探讨 VEGF 在不同增殖潜能结肠癌细胞株中的丰度表达; 并采用全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 对不同增殖潜能结肠癌细胞株 CW

-2 和 LS174T 的作用来研究 ATRA 对结肠癌细胞株生长增殖和对 VEGF 表达的影响。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

结肠癌细胞株 CW-2 和 LS174T 购于中科院上海生化细胞生物研究所。用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液进行培养, 37 °C、5% CO₂、饱和湿

[收稿日期] 2005-03-15 [修回日期] 2005-05-25

* [基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目 (No D00-63)

△ 通讯作者 Tel: 0592-2292482 E-mail: yinping20022002@yahoo.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度条件下常规培养, 2 d换 1 次培养液。取对数生长期细胞进行实验。

2 MTT观察细胞生长曲线

两株细胞分别设立 6 个实验组: (1)空白对照组: 培养的细胞不做任何处理; (2)3 个 ATRA 组: 分别加入 ATRA(全反式维甲酸, 购于 Sigma 公司), 使培养液中 ATRA 的浓度分别为 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L; (3)乙醇对照组: 加入与 ATRA 组等量无水乙醇。每组细胞接种到 96 孔板上, 细胞进行计数换算成 1×10^5 cells/well 每组共设 8 个复孔; (4)培养液对照组: 单纯含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液。每孔培养液 90 μ L, ATRA 组加入 10 μ L 不同浓度的 ATRA, 培养 24 h 加入 MTT(5 g/L)溶液 20 μ L (已过滤除菌), 避光振荡 5 min 后, 置培养箱中培养 4 h 后取出, 弃去液体, 在各孔中加入 100 μ L 的 DM-SO, 避光 15 min 后, 用酶标仪检测 570 nm 波长下每孔细胞吸光度(A)值, 共检测 4 d 取其平均值。制作细胞生长曲线。

3 FACS检测细胞周期

CW-2 和 LS174T 细胞长至 80%, 用 Hanks 洗涤细胞生长面, 弃去上清液, 加入 0.25% 的胰酶 2 mL 消化细胞, 直至细胞完全消化下来, 转入离心管中离心, 用 PBS 调整细胞数为 5×10^6 cells/L, 用细吸管将其迅速喷射到 4 $^{\circ}$ C 的 70% 乙醇中, 混匀, 取固定后的 10^6 个细胞用 PBS 洗 2 次, 加入 RNA 酶至终浓度为 50 mg/L 和 PI 至终浓度为 50 mg/L, 于 PBS 中配成 1 mL 细胞悬液, 氩离子激光器 (Argon Laser, 2 W) 为光源的 Becton-Dickinson 公司 FACS420 型流式细胞仪上检测被 PI 标记的细胞, 激发波长为 488 nm, 用 590 nm 长通滤光片检测 DNA-PI 荧光, 检测期间校正仪器 CV 值为 5% 以内, 测量结果输入 HP-300Consort30 计算机进行处理, 进行细胞周期分析。

4 Northern blotting检测

结肠癌细胞株 CW-2 和 LS174T 分别设立 3 个实验组: (1)ATRA 组: 加入 ATRA, 使 ATRA 的浓度为 10^{-5} mol/L; (2)乙醇对照组: 加入与 ATRA 组等量无水乙醇; (3)空白对照组: 培养的细胞不做任何处理。当癌细胞长满 80% 瓶底面积时, 去除含血清培养液, 用不含血清的培养液洗 3 次后, 采用 Trizol Kit(Gibco-BRL 公司)抽提总 RNA。以 RT-PCR 扩增产物为探针, 用 [α - 32 P] dCTP(北京亚辉公司)随机引物法标记 VEGF 和 β -actin 的 cDNA 探针。RNA 变性电泳及转膜、预杂交、杂交等按常规方法进行^[2]。用 Cyclone 同位素扫描仪 (Packard 公司)确定 Northern blotting 的吸光度。

5 免疫细胞化学染色

免疫细胞化学所用试剂均为单克隆抗体、浓缩型。所用抗体鼠抗人 VEGF (稀释倍数 1:50); 试剂

由美国 NeoMarker 公司生产。超敏 S-P 浓缩 (小鼠) 单克隆抗体染色试剂盒 (浓缩型, 稀释倍数 1:200), 购于福州迈新生物试剂公司。DAB (美国 Sigma 公司生产) 显色。免疫组化染色步骤参照试剂盒说明书。用迈新生物公司提供已知的 VEGF 阳性结肠癌组织切片作阳性对照。用 PBS 替代 I 抗作阴性对照。

6 统计学处理

MTT 和 Northern blotting 的吸光度所获得数据用 SPSS 10.0 统计软件包进行 χ^2 检验。其相关性用 Spearman 秩相关分析。

结 果

1 结肠癌不同细胞株增殖能力的比较

两株细胞均呈上皮样贴壁依赖性生长, 其中 CW-2 细胞为圆形, 体积较大, 胞浆丰富, 核大且圆形居中, 细胞之间黏附性高, 成膜状生长; 而 LS174T 细胞为多角不规则状和圆形, 细胞体积较小, 折光性较强, 细胞黏附性较差。从每天对细胞株的观察看 LS174T 细胞明显比 CW-2 细胞生长快。同一细胞株不同浓度的 ATRA 对细胞增殖有一定抑制作用。

MTT 比色法是利用活细胞的线粒体脱氢酶类可将 MTT 转变成蓝紫色的甲瓩类反应, 通过测定一定波长 (570 nm) 的吸光度可客观、真实地反映活细胞数和细胞代谢强度。从细胞生长曲线表达看, LS174T 细胞生长曲线陡峭, 而 CW-2 细胞生长曲线走向平缓, 因此 LS174 细胞增殖能力明显较 CW-2 细胞快。比较生长 4 d 的细胞数及 MTT 吸光度, 发现 LS174T 细胞与 CW-2 细胞间差异显著, 实验结果提示 LS174T 细胞生长分裂快 ($P < 0.05$)。ATRA 对细胞的生长增殖有抑制作用, 其抑制程度与 ATRA 的浓度成正比, 不同浓度的 ATRA 对细胞的抑制程度有显著差异 ($P < 0.05$)。其中 ATRA 对于生长较慢的 CW-2 细胞抑制作用较弱 (图 1)。而对于生长较快的 LS174T 细胞生长抑制作用明显 (图 2)。

2 结肠癌不同细胞株生长周期的比较

LS174T 细胞株 G_0/G_1 期为 (51.82 ± 0.57)%, S 期次之: (39.04 ± 2.35)%, G_2 期最少 (9.15 ± 1.13)%, 而 CW-2 细胞株处于 G_0/G_1 期为 (60.30 ± 0.58)%, S 期次之: (30.46 ± 2.35)%, G_2 期最少 (9.21 ± 1.13)%。两株细胞的分裂增殖状态不同, CW-2 和 LS174T 细胞株在细胞周期进程上有差别, LS174T 细胞 G_1 期细胞数比 CW-2 细胞 G_1 期少, 在细胞周期中 LS174T 细胞株生长较快。

3 结肠癌不同细胞株 Northern blotting 检测显示 VEGF mRNA 的比较

两株细胞经用 Cyclone 同位素扫描仪确定 Northern blotting 的吸光度。两株细胞的 β -actin mRNA

显示稳定的表达,同一细胞不同实验组之间 β -actin mRNA 的量无显著差异 ($P > 0.05$)。而生长较快、恶性程度较高的结肠癌细胞株 LS174T 比 CW-2 细胞株 VEGF mRNA 表达量明显增多,两者的 Northern blotting 的吸光度有显著差异 ($P < 0.05$)。CW-2 细胞株经 10^{-5} mol/L ATRA 处理后与乙醇对照组、空白对照组 3 组间均可见 VEGF mRNA 条带,3 组间 VEGF mRNA 的 Northern blotting 吸光度与相应对照组 β -actin mRNA 之间相比后有显著差异 ($P < 0.05$)。增殖较快的 LS174T 细胞, ATRA 有明显诱导细胞内 VEGF mRNA 量的改变, 10^{-5} mol/L 的 ATRA、乙醇对照组、空白对照组 3 组之间 VEGF mRNA 表达有显著差异 ($P < 0.05$, 图 3 图 4)。

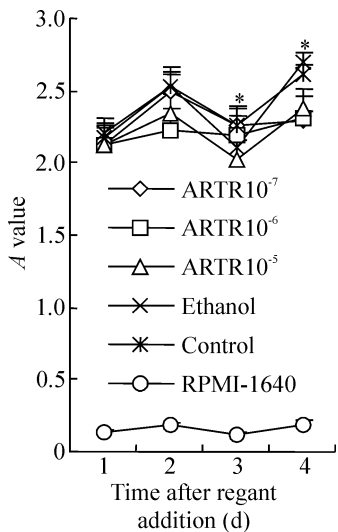


Fig 1 MTT results show the effects of ATRA on CW-2 colon cancer cell strain. * $P < 0.05$ vs ethanol control and vacuity control $\bar{x} \pm s$ $n = 8$

图 1 CW-2 结肠癌细胞 MTT 检测结果

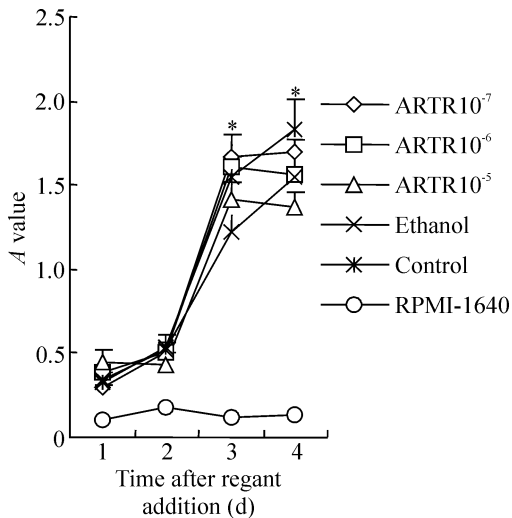


Fig 2 The effects of ATRA on LS174T colon cancer cell strain (MTT results). * $P < 0.01$ vs ethanol control and vacuity control $\bar{x} \pm s$ $n = 8$

图 2 LS174T 结肠癌细胞 MTT 检测结果

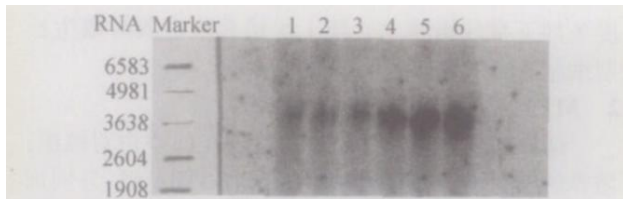


Fig 3 VEGF mRNA expression in CW-2 and LS174T cell strains. 1: CW-2 (ATRA, 10^{-5} mol/L); 2: CW-2 (ethanol control); 3: CW-2 (vacuity control); 4: LS174T (ATRA, 10^{-5} mol/L); 5: LS174T (ethanol control); 6: LS174T (vacuity control).

图 3 CW-2 和 LS174T 细胞 VEGF mRNA 表达量

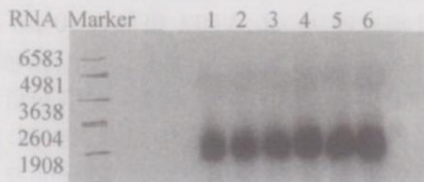


Fig 4 β -actin mRNA expression in CW-2 and LS174T cell strains. 1: CW-2 (ATRA, 10^{-5} mol/L); 2: CW-2 (ethanol control); 3: CW-2 (vacuity control); 4: LS174T (ATRA, 10^{-5} mol/L); 5: LS174T (ethanol control); 6: LS174T (vacuity control).

图 4 CW-2 和 LS174T 细胞 β -actin mRNA 表达量

4 结肠癌细胞株免疫细胞化学检测 VEGF 蛋白的结果

两株细胞的细胞免疫化学都显示 VEGF 为阳性,其中 LS174T 细胞的染色强度较 CW-2 细胞染色增强,显示了结肠癌细胞可以产生 VEGF 蛋白。VEGF 蛋白的表达强度与其 mRNA 的表达量成正比(图 5 图 6)。

讨 论

VEGF 作为主要的直接作用于血管内皮细胞的血管形成因子在肿瘤的生长和转移中有重要作用。VEGF 在一些正常组织中低表达或不表达,但在许多人类肿瘤组织中及培养的肿瘤细胞株中均有明显的表达,其表达水平和肿瘤组织的血管化程度及恶性程度呈正相关^[3]。我们的结果也显示在 CW-2 和 LS174T 细胞株中都检测出较高表达的 VEGF,因此,VEGF 是一种在肿瘤中表达较高的细胞因子。有研究报道通过阻断 VEGF 或其受体的表达可抑制肿瘤血管形成,从而达到阻止肿瘤生长与转移的目的。因此,VEGF 对肿瘤血管生成具有重要作用^[4]。

VEGF 具有正相调节促进肿瘤血管形成作用^[5]。血管生成受血管生成促进因子和血管生成抑制因子的平衡关系决定^[6]。基因表达的改变也可影响血管生成,加上血管生成需要的蛋白和酶及细胞粘附因子的作用形成新生血管网^[7]。Ellis 等^[8]将反义 c-sr 转染人结肠癌细胞,通过阻断酪氨酸激酶的活

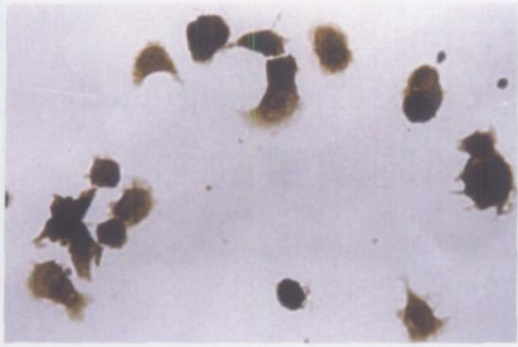


Fig 5 Expression of VEGF protein in colon carcinoma cell line CW-2 (IHC, $\times 400$).

图5 结肠癌 CW-2 细胞株 VEGF 蛋白表达

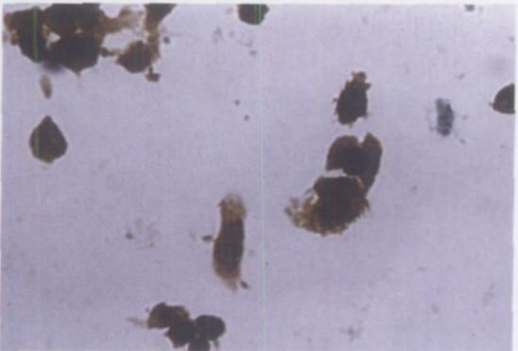


Fig 6 Expression of VEGF protein in colon carcinoma cell line LS174T (IHC, $\times 400$).

图6 结肠癌 LS174T 细胞株 VEGF 蛋白表达

性阻止 VEGF 信号转导, 使结肠癌的生长明显抑制。我们的结果也证实了以上观点, 即 VEGF 在结肠癌的浸润和转移中有重要作用, 在增殖能力弱的结肠癌 CW-2 中 VEGF 的蛋白和 mRNA 表达量低; 在增殖能力强的结肠癌 LS174T 中 VEGF 的表达量高。对于以上结果, 我们认为在人结肠癌细胞株中可以检测到较高的 VEGF 表达。增殖能力强、生长速度快的结肠癌 VEGF 表达量较高; 而增殖能力弱、生长速度慢的结肠癌 VEGF 表达较低。因此, VEGF 在结肠癌中是一种高表达的促进肿瘤血管生成、增加血供、促进癌细胞生长、侵袭和转移有重要作用^[10]。Saleh 的实验也证实了这一观点, 即通过转染阻断神经胶质细胞瘤细胞 VEGF 表达后, 将该细胞种植于裸鼠皮下, 发现转染细胞的成瘤率、瘤重、瘤内血管密度明显低于非转染组。文献报道富含 VEGF 的乳腺癌患者存活率较低。

另外, 全反式维甲酸是研究较多的抗肿瘤抑制剂, 具有诱导白血病细胞分化和逆转的功能, 其作用的机制可能是与癌细胞表面的维甲酸受体相互作用或抑制细胞表面的多种黏附蛋白发挥作用^[10, 11]。其细胞毒性作用的场所主要在细胞核内, 通过抑制细

胞生长并改变核基质蛋白的成分, 而核基质在细胞核功能组成中起重要作用, 它能局限性浓缩涉及核酸代谢的调节因子。有关 ATRA 在实体瘤研究的报道近年来有明显增多, 但在抑制结肠癌增殖方面的报道较少。本结果表明, 在体外进行细胞培养时, ATRA 对结肠癌细胞体外增殖也有一定抑制作用, 但抑制作用的强度不同, 这可能与选择合适的 ATRA 浓度有关。因此, 有关 ATRA 对结肠癌等实体瘤中的治疗作用和抑制血管形成作用还需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Lee JC, Chow NH, Wang ST, et al Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients [J]. Eur J Cancer 2000 36(2): 748-753
- [2] 黄培堂, 主译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002 549-552
- [3] 何天源, 陈诗书. 血管内皮生长因子与血管生成 [J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1997 19(5): 236-239
- [4] Ke LD, Fueyo J, Cheu X, et al A novel approach to glioma gene therapy down-regulation of the vascular endothelial growth factor in glioma cells using ribozymes [J]. Int J Oncol 1998 12(6): 1391-1396
- [5] Claffey KP, Brown LF, Aguila LF, et al Expression of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis and experimental metastasis [J]. Cancer Res 1996 56(2): 172-181
- [6] Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, et al Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression [J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38527-38535
- [7] Ferrara N, Davis-Singh T. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. Endocr Rev 1997 18(1): 4-25
- [8] Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al Down regulation of vascular endothelial growth factor in human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src [J]. J Biol Chem, 1998, 273(2): 1052-1057.
- [9] 陆婉玲, 杜凤岚, 陈明伟. 血管内皮生长因子与肿瘤的关系 [J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2000, 20(3): 195-197.
- [10] 殷平, 李才, 孙波, 等. 不同增殖能力结肠癌细胞株 NOS mRNA 表达的比较研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2004 20(5): 883-886
- [11] Kohler JA, Meson J, Ellenshaw C, et al A randomized trial of 13-cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy [J]. Brit J Cancer 2000 83(3): 1124-1129.