

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0010-04

人血管生成素-1 对血管内皮细胞增殖及凋亡影响的研究

王 钧, 吴开春, 张德新, 么立萍, 樊代明 (第四军医大学西京医院消化科, 西安 710032)

[摘 要] **目的:** 探讨人血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang-1)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖和凋亡的影响,以进一步研究其生物学作用及其在肿瘤发生中的作用机制。**方法:** 构建 pcDNA3.1-V₃-HisC-Ang-1 真核表达载体,并瞬时转染 293 细胞;取新生儿脐带经胶原酶消化等方法分离培养 HUVEC;分别通过 MTT 比色和细胞计数法,分析 Ang-1 瞬时转染上清对 HUVEC 增殖的影响;通过流式细胞仪分析在血浆饥饿实验条件下,Ang-1 对 HUVEC 凋亡的影响。**结果:** 成功克隆了 Ang-1 基因,构建了其正义真核表达载体,并在 293 细胞中瞬时表达;成功进行了 HUVEC 的原代分离及传代培养;MTT 法检测 HUVEC 增殖结果:只加培养液组、加空载体转染上清组、加 Ang-1 转染上清组 HUVEC OD₄₉₀ 值分别为 0.36 ± 0.11, 0.40 ± 0.03, 0.68 ± 0.10 (P < 0.05);细胞计数法检测结果依次为: (10.13 ± 2.06) × 10⁴, (8.7 ± 1.73) × 10⁴, (15.03 ± 1.98) × 10⁴ (P < 0.05)。流式细胞仪检测 HUVEC 凋亡率依次为: 21%, 19% 和 6%。**结论:** Ang-1 能显著促进血管内皮细胞体外增殖,抑制血浆饥饿时 HUVEC 的凋亡。

[关键词] 血管生成素; 血管生成; 增殖; 凋亡; 脐静脉内皮细胞;

[中图分类号] R730.23 [文献标识码] A

The Effect of Human Angiopoietin-1 on the Proliferation and Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cell

WANG Jun, WU Kai-chun, ZANG De-xin, YAO Li-ping, FAN Dai-ming (Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of human Angiopoietin-1 (Ang-1) on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods:** The recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-V₃-HisC-Ang1 was constructed and was used to transiently transfect to 293 cells. HUVEC was separated from new born fetal cord. The supernatants from transfected 293 cells were harvested, and then added to HUVEC culture. The proliferation and apoptosis of HUVEC was measured by MTT colorimetry assay analysis, cell counting and flow cytometry, respectively. **Results:** Proliferation of HUVEC cells cultured with supernatants of Ang-1 transfected group was higher than those untreated and mock transfected group, results of which were 0.68 ± 0.10, 0.36 ± 0.11, 0.40 ± 0.03 in the MTT assays; and were (15.03 ± 1.98) × 10⁴, (10.13 ± 2.06) × 10⁴ and (8.7 ± 1.73) × 10⁴ respectively in the cell counts. The apoptotic percentage of HUVEC cells cultured with supernatants from Ang-1 transfected group was lower than those of untreated or mock transfected group, results of which were 6%, 21% and 19% respectively in FACS analysis. **Conclusions:** Human Ang-1 can significantly promote stimulate the proliferation and reduce the apoptosis of endothelial cells.

[Key words] angiopoietin; angiogenesis; proliferation; apoptosis; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

* 血管生成在人体正常的生长发育以及许多疾病的发生发展中发挥重要作用,近年来大量证据表明,血管生成与肿瘤的形成及转移密切相关。许多因子参与血管的生成及调控,血管生成素(angiopoietin, Ang)及其受体 Tie-2 是新近发现的与血管生成、重塑及肿瘤转移密切相关的分子^[1]。血管生成素包括血管生成素-1,

2,3,4 等,其中血管生成素-1,2 和血管生成素关系密切。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 30130260)和军队“十五”重点基金(编号:01Z087)

[作者简介] 王 钧(1975-), 男, 宁夏银川人, 硕士, 医师, 主要从事肿瘤血管抑制治疗研究

[通讯作者] 吴开春, Email: kaicwu@fmmu.edu.cn

为研究血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang-1)在血管生成中的作用,我们克隆了 Ang-1 基因,并研究了其对血管内皮细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

新鲜人胎盘组织,脐带取自西京医院妇产科正常分娩妇女。293 细胞、大肠杆菌 DH5 α 菌株由本研究所保存。M199 细胞培养液及 Trizol 试剂购自 GibcoBRL 公司。真核表达载体 pcDNA3.1-V₅-His C 及含绿色荧光蛋白基因的 pEGFP-C1 载体购自 Invitrogen 公司,由本研究所保存。MTT 试剂购自北京原平皓公司。IV 型胶原酶为 Sigma 公司产品。根据 Ang-1 编码区序列全长由 Primer5.0 软件设计引物(具体序列参见文献[2]),由上海 Sangon 公司合成。Omega E. Z. N. A plasmid Miniprep Kit 购自宝泰克生物公司。

1.2 Ang-1 基因的克隆及其重组真核表达载体的构建^[2]

通过反转录 PCR 的方法,由 Ang-1 高表达的新鲜人胎盘组织提取总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链,在适当条件下进行 PCR 扩增。获得 Ang-1 的编码基因。测序证实后通过定向克隆法,构建重组正义真核表达载体,利用目的片段上自带的 EcoR I 位点及载体上的同一酶切位点进行单酶切鉴定。以 Omega E. Z. N. A plasmid Miniprep Kit 无菌条件下提取酶切证实的重组质粒,用于细胞转染。

1.3 人脐静脉内皮细胞的分离及培养

取 25 cm 长,新生儿脐带,采用张保庚等^[3]的方法进行 HUVEC 原代及传代培养,根据培养的细胞呈单层铺路石状排列和免疫组化法第 VIII 因子阳性鉴定为血管内皮细胞。取稳定生长的第 3~6 代细胞用于实验。

1.4 pcDNA3.1-V₅-His C -Ang-1 真核表达载体的瞬时转染

待培养于 6 孔板的 293 细胞 80% 融合时,以构建好的真核表达载体转染,设 pcDNA3.1-V₅-His C 空载体转染组为对照。转染方法参照 LipofectamineTM 2000 说明书。转染时,以 pEGFP-C1 载体为报告基因监测转染效率,以保证收集的转染上清有较高的转染效率。细胞转染 36 h 后,将细胞培养上清以 2 000 r/min 离心后无菌收集, -20℃ 保存,以进行下一步试验。

1.5 MTT 法测定 HUVEC 增殖指标

以每孔 5×10^3 /L 细胞将 HUVEC 接种于 96 孔培养板,过夜后用 PBS 洗 2 遍,以 1:1 比例分别加入收集的空载体转染组或 Ang-1 转染组细胞培养上清及含 10% 血清的 M199 培养液共 200 μ l,以只加含 10% 血

清的 M199 培养液孔为对照,每种细胞设 3 个复孔。在 37℃, 5% CO₂ 孵箱中继续培养 48 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ l 继续孵育 4 h,终止培养。吸弃上清,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测分析仪测定 A_{490nm} 值。以只加培养液,不加细胞的空白对照孔调零。

1.6 细胞计数法检测人 Ang-1 对 HUVEC 增殖的影响

根据 Cao^[4] 等的方法进行。以 Ang-1 转染组、空载体转染组及 293 未转染组细胞的培养上清,行 72 h HUVEC 增殖实验。具体方法如下:收获指数生长期的 HUVEC,以每孔 3×10^4 /L 细胞接种于 24 孔板,每组 3 个孔,用含 10% 小牛血清的 M199 在 5% CO₂ 37℃ 条件下培养 24 h,然后分别换成 1:1 稀释的 M199 与上述各培养介质,继续培养 72 h 后,0.125% 胰酶消化,用细胞计数器进行细胞计数,并统计比较,探讨人 Ang-1 蛋白对血管内皮细胞的增殖影响。

1.7 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

根据 Gerber 等^[5] 的方法进行。血浆饥饿实验前 24 h,将每孔 1×10^4 /L HUVEC 接种于 6 孔板,实验前用 PBS 将细胞洗 2 遍,以 1:1 加入含 0.1% 牛血清白蛋白但无血清的培养液及 Ang-1 或空载体转染细胞上清,以只加无血清培养液、未加转染上清的细胞作为对照。每组设 3 个复孔,37℃ 培养过夜后,加入 5 μ l Annexin V-FITC 于含 1.5 mmol/L CaCl₂ 的细胞培养液中,37℃ 孵育 10 min 后用含 1.5 mmol/L CaCl₂ 的培养液洗涤 2 次,用橡皮刮棒收集细胞,加入 490 μ l 的结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μ l PI,轻轻混匀,4℃ 孵育 10 min,上机分析。

2 结果

2.1 人 Ang-1 基因的克隆及重组载体构建

经反转录 PCR,扩增得到长约 1 900 bp 的片段,与预期一致。测序证实后,定向构建重组 Ang-1 真核表达载体。用 EcoR I 单酶切,切出片段的大小与预期一致,说明重组正义真核表达载体 pcDNA3.1-V₅-HisC-Ang-1 构建成功^[2]。

2.2 人 Ang-1 促进 HUVEC 增殖的作用

以 MTT 掺入为指标,间接反映细胞的增殖情况。结果如(图 1)所示,只加培养液组(A) OD₄₉₀ 值为 0.36 ± 0.11 ,加空载体转染上清组(B)为 0.40 ± 0.03 ,加 Ang-1 转染上清组(C)为 0.68 ± 0.10 ,Ang-1 能够显著促进 HUVEC 的增殖,而空载体转染组上清对 HUVEC 增殖无明显影响。(P=0.004, C vs A; P=0.007, C vs B; P=0.617, A vs B)。

2.4 Ang-1 对 HUVEC 凋亡的影响

Annexin V/PI 双染色结果表明,经血浆饥饿试验,3 组细胞:只加无血清培养液 M199 组、加空载体转染上清组、加 Ang-1 转染上清组细胞凋亡率分别为:21% ,19% 和 6% ,说明 Ang-1 载体转染组细胞上清可显著抑制 HUVEC 凋亡(图 3)。

图 1 重组人 Ang-1 瞬时转染 293 细胞培养上清对 HUVEC 增殖的影响

Fig.1 The effect of recombinant Angiopoietin-1 on proliferation of HUVEC

(* P < 0.05, Ang1 vs M199 or PcDNA3.1)

2.3 内皮细胞增殖实验

由(图 2)知,内皮细胞计数 A 组为(10.13 ± 2.06) × 10⁴/L, B 组为(8.7 ± 1.73) × 10⁴/L, C 组为(15.03 ± 1.98) × 10⁴/L。(P = 0.02, C vs A; P = 0.007, C vs B; P = 0.398, A vs B)。细胞计数结果同样表明,Ang-1 转染组上清有刺激内皮细胞增殖的作用(P < 0.05)。

图 2 内皮细胞增殖实验

Fig.2 Cell number of HUVEC exposed to various culture media

(* P < 0.05, ang1 vs M199 or PcDNA3.1)

图 3 重组人 Ang-1 瞬时转染 293 细胞培养上清对 HUVEC 凋亡的影响
Fig.3 The effect of recombinant Angiopoietin-1 on apoptosis of HUVEC

A: M199; B: PcDNA3.1; C: Ang1

3 讨论

血管生成在机体正常生理、病理过程及肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用。血管生成受组织、细胞所处环境的影响,如内皮细胞在促血管生成因子作用下的趋化、增殖效应。VEGF 是目前发现最强的、研究最多的促血管生成因子。但在针对 VEGF 的治疗取得一定效果的同时,人们发现尚存在着部分对阻断 VEGF 途径无生物反应的肿瘤,而这些肿瘤常表达 Tie-2,表

明 Tie-2 是部分肿瘤血管化的主要信息途径,或者说 VEGF 和 Ang 系统通过各自受体途径共同调控血管生成^[6]。

Tie-2 是血管内皮特异性表达的酪氨酸激酶型受体,主要表达于肺血管内皮以及卵泡、创口肉芽组织等血管生成活跃的血管内皮。Ang-1 是 Tie-2 受体的激活配体,促进后者的磷酸化,进而吸引间质细胞等支持细胞包绕在血管内皮细胞周围,调节血管从内皮细胞层形成多细胞的精细血管结构的血管成熟过程,

并通过细胞与细胞、细胞与基质等相互作用维持血管结构。Ang1 的这一作用是与 VEGF 对内皮细胞作用不同的, VEGF 增加血管内皮细胞基底膜的可渗透性, 增加血管通透性。

有实验证实, 转基因使小鼠皮肤高表达 Ang-1, 实验小鼠较正常小鼠拥有更大、更多、分支更复杂的血管, 而通过转基因方法使 Ang-1 或其受体基因失活如负性显性突变时, 转基因小鼠胚胎不能正常发育, 死于血管网络形成后的血管结构的重塑障碍^[7]。将证实能分泌 Ang-1 蛋白的脑胶质瘤细胞培养上清与内皮细胞利用 Transwell 系统做三维共孵育试验, 结果显示内皮细胞在 Matrigel 中形成典型的条索样结构, 而加了 Ang-1 单抗的内皮细胞的毛细血管样结构显著减少。因此, Ang-1 具有促进血管内皮细胞迁移和形成管状结构的作用^[8]。本实验在检测血管内皮细胞增殖时, 为了避免 MTT 试验或细胞计数 2 种方法单独使用可能带来的偏差, 根据既往文献报道同时采取了这 2 种方法, 结果基本一致。结果显示, 将 Ang-1 瞬时转染 293 细胞, 其培养上清对内皮细胞具有刺激其增生的作用, 可能系 Ang-1 蛋白对内皮细胞的趋化、聚集作用所致, 是对内皮细胞的直接刺激作用。

凋亡及死亡的细胞均表现膜磷脂酰丝氨酸(PS)外翻, 以致 AnnexinV 染色阳性, 而活细胞 AnnexinV 染色阴性, 但细胞凋亡早期细胞膜仍保持完整性。因此, 同活细胞一样, PI 染料不能通过细胞膜而表现为 PI 染色阴性, 而凋亡晚期及死亡细胞则为 PI 染色阳性。这样 AnnexinV/PI 双参数法检测早期凋亡既可检测早期凋亡, 又可区分凋亡与死亡细胞, 是目前流式细胞定量检测凋亡的首选方法。经 PI/AnnexinV 双染后即可区分不同的细胞: 左下象限 PI⁻, AnnexinV⁻ 为活细胞; 右下象限 PI⁻, AnnexinV⁺ 为凋亡细胞; 右上象限 PI⁺, AnnexinV⁺ 为凋亡晚期及死亡细胞; 左上象限 PI⁺, Annexin⁻ 为机械损伤的细胞。

血浆饥饿诱导的凋亡实验常被用来检测某些物质的抗凋亡效应, 如 Gu 等人^[9] 研究发现层黏连蛋白-10/11 可逆转血浆饥饿诱导的人肺腺癌细胞系 A549 和子宫颈癌腺癌细胞系 HeLa S3 凋亡, 加入 Caspase 广谱抑制剂 z-VAD, 可使血浆饥饿诱导的凋亡显著减少。因此认为血浆饥饿诱导的凋亡是 Caspase 依赖性。Gerber 等人^[5] 发现 VEGF 可部分逆转血浆饥饿诱导的内皮细胞凋亡。本实验流式细胞仪检测结果证明 Ang-1 对血管内皮细胞具有抗凋亡作用, 可能系通过与其受体 Tie-2 结合后, 导致后者的磷酸化, 继而激活 PI-3 激酶、AKT, 抑制细胞 caspase 家族的活化所致。

Ang-1 及其受体 Tie-2 与肿瘤发生及血管生成密切相关。目前认为, Ang-1 促进肿瘤发展与侵袭作用也是通过促进血管生成从而发挥作用的, 我们的另一试验证实, 利用反义核酸技术封闭 Ang-1 的表达可部分阻断 SGC7901 胃癌细胞裸鼠皮下移植瘤的生长, 其机制可能系抑制新生肿瘤的血管生成所致(另文发表)。

总之, 本实验从人胎盘组织中, 克隆得到 Ang-1 编码基因, 构建了其真核表达载体, 并在 293 细胞中进行了瞬时转染, 发现转染细胞的培养上清对血管内皮细胞有促进增殖及抑制凋亡作用, 为进一步研究 Ang-1 对血管生成及肿瘤发生的影响打下了坚实的基础。

[参考文献]

- [1] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, by secretion-trap expression cloning[J]. *Cell*, 1996, 87(7): 1161-1169.
- [2] 王钧, 吴开春, 张德新, 等. 人血管生成素-1 基因的克隆及原核、真核表达载体的构建[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(2): 158-160.
- [3] 张宝庚, 陈铁镇, 张晶范, 等. 人脐静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养[J]. *中华心血管病杂志*, 1985, 13(1): 52-54.
- [4] Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, *et al.* Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(5): 1055-1063.
- [5] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/akt signal transduction pathway[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30336-30343.
- [6] Siemeister G, Schirmer M, Weindel K, *et al.* Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: Inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(13): 3185-3191.
- [7] Suri C, McClain J, Thurston G, *et al.* Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1[J]. *Science*, 1998, 282(5388): 468-471.
- [8] Audero E, Cascone I, Zanon I, *et al.* Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(4): 536-541.
- [9] Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, *et al.* Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19922-19928.

[收稿日期] 2003-04-14

[修回日期] 2003-07-20