

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )04-280-05

## 血管内皮生长因子及其受体 KDR 在前列腺癌细胞中的表达研究

缪应业, 刘家云, 苏明权, 沈建军, 郝晓柯 ( 第四军医大学西京医院检验科, 西安 710032 )

[ 摘要 ] 目的: 探讨血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )及其受体( KDR )在前列腺癌细胞中的表达及意义。方法: 免疫细胞化学和 Western blot 检测体外培养的 LNCaP, PC-3, PC-3M, DU-145 和 22RV1 前列腺癌细胞中 VEGF 及其受体 KDR 的蛋白表达, RT-PCR 检测 mRNA, ELISA 检测前列腺癌细胞培养上清 VEGF 蛋白含量。结果: 免疫细胞化学染色显示 VEGF 和 KDR 在前列腺癌细胞 LNCaP, PC-3, PC-3M, DU-145 和 22RV1 中均有表达, 但表达水平略有差别。LNCaP, PC-3 和 DU-145 细胞中 VEGF 和 KDR 蛋白表达及其 mRNA 的含量显著高于 PC-3M 和 22RV1 (  $P < 0.01$  )。细胞培养上清中 VEGF 蛋白含量结果与免疫细胞化学染色结果相同。结论: VEGF 及其受体 KDR 在前列腺癌细胞中的表达量不近相同, 但二者的表达对研究前列腺癌的发生发展及其机理有重要意义。

[ 关键词 ] 血管内皮生长因子; KDR; 前列腺癌

[ 中图分类号 ] R737.25 [ 文献标识码 ] A

## Expression and Significance of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors ( KDR ) in Prostate Cancer Cell Lines

MIAO Ying-ye, LIU Jia-yun, SU Ming-quan, SHENG Jian-jun, HAO Xiao-ke ( Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China )

[ Abstract ] Objective: To investigate the expression of VEGF and its receptor ( KDR ) in prostate cancer cell lines. Methods: Immunocytochemical staining and Western blot and reverse transcriptase-polymerase chain reaction( RT-PCR ) were employed to test the expression of VEGF and its receptor KDR in five human prostate cancer cell lines, LNCaP, PC-3, PC-3M, DU-145, 22-RV1. ELISA was employed to test VEGF concentration in culture supernatant of prostate cancer cell lines. Results: All five prostate cancer cell lines expressed VEGF and KDR. The expression of protein and mRNA in PC-3, DU-145 and LNCaP cell lines was higher than that in PC-3M and 22RV1 cell lines (  $P < 0.01$  ). The result of the VEGF concentration in cell culture supernatants is as same as that of immunocytochemical staining. Conclusion: Although they were expressed differentially, both VEGF and KDR were present in prostate cancer cell lines. The expression of VEGF and KDR might be related with the pathogenesis and progress of prostate cancer.

[ Key words ] vascular endothelial growth factor; KDR; prostate cancer

肿瘤血管形成受多种调控因子的调节, 其中血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )作为最重要的血管生长因子之一, 对血管内皮细胞的增殖、基底膜水解、迁移和血管构建的调控作用较强, 且特异性高。其对血管形成的调控作用, 是通过存在于血管内皮细胞上的两个特异性受体: 血管内皮生长因子受体-1, 又称 fms 样酪氨酸激酶( vascular endothelial growth factor, VEGFR1/fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1 )和血管内皮生长因子受体 II, 又称激酶功能区受体( vascular endothelial growth factor II, VEGFR2/ki-

nase domain receptor, KDR )而完成的, 即 VEGF 通过旁分泌起作用。然而, 近年来陆续发现, 在一些肿瘤细胞上也存在 VEGF 受体的表达, 提示肿瘤中可能存在的自分泌机制。有研究表明, 人前列腺癌组织中有 VEGF 和 KDR 表达, 且 VEGF 和 KDR 表达与前列腺癌

[ 基金项目 ] 国家 863 计划资助项目( 2001AA215321 )

[ 作者简介 ] 缪应业( 1975- ), 男, 云南宣威人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究

E-mail: myy7591@fmmu.edu.cn

[ 通讯作者 ] 郝晓柯, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

细胞的生长和转移密切相关<sup>[1-2]</sup>。本研究采用免疫组织化学、Western blot 法及 RT-PCR 对 PC-3, PC-3M, DU-145, LNCaP, 22RV1 人前列腺癌细胞中 VEGF 及其受体 KDR 的表达进行了检测;采用 ELISA 检测前列腺癌细胞培养上清 VEGF 含量。为评价 VEGF 自分泌途径在前列腺癌的发生发展作用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株、试剂盒及引物

人前列腺癌细胞由本实验室保存,细胞培养基 RPMI-1640 为 Sigma 公司,小牛血清为杭州四季青公司,兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自博士德公司,小鼠抗人 KDR 单克隆抗体购自 R&D 公司,Elivision<sup>TM</sup> plus 免疫细胞化学检测试剂盒及阳性片为迈新公司产品;免疫印记所用二抗(羊抗兔和羊抗鼠)、DAB 显色液和 VEGF(h)ELISA Kit 均购自武汉博士德公司;GAPDH 内参(100 μg/100 μl)及其抗 GAPDH 单抗均购自上海康成生物有限公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。电转印仪为 Bio-RAD 公司 Mini2-D cell 电转印仪。DU800 核酸蛋白分析仪为贝克曼公司产品。引物由 TaKaRa 生物有限公司合成。

### 1.2 细胞培养

PC-3, PC-3M, DU-145, LNCaP, 22RV1 细胞均用含 10% 的小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 在 37℃, 50 ml/L CO<sub>2</sub> 培养箱中常规传代培养。

### 1.3 免疫细胞化学染色

将以上 5 种细胞的细胞悬液,接种于培养皿中的玻片上培养 4 h。待细胞贴壁后,加入适量的培养液孵育 48 h。取出玻片固定、洗涤,加 VEGF 和 KDR 一抗,湿盒内 4℃ 过夜,加二抗,湿盒内 37℃ 孵育 30 min,二氨基联苯(DAB)显色,并经苏木素复染,迈新公司阳性片为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 免疫细胞化学技术检测 VEGF 和 KDR 表达

在高倍镜下,每张染色片随机观察几个视野,计数 100 个细胞,染色深度以多数细胞为准,阴性细胞记 0 分,显色为黄色记 1 分,显色棕黄色记 2 分,显色棕褐色记 3 分,合计即为该细胞的免疫细胞化学染色阳性分值,每种细胞计 5 次求均数。

### 1.5 培养上清 VEGF 含量测定

将 5 种前列腺癌细胞分别接种于六孔板(每孔 5 × 10<sup>5</sup>),培养基和培养条件如前,培养 24 h 后收集培养上清,以双抗体夹心法 ELISA 检测 VEGF 含量。步骤简述如下:培养上清液经离心沉淀后,取 50 μl 加入测试孔,按说明书加入各种试剂,室温孵育 2 h,酶联免疫

仪于 450 nm 读取吸光度,与同批建立的标准曲线进行对比,确定培养上清中 VEGF 含量。

### 1.6 Western blot 法检测 VEGF 和 KDR 蛋白表达

取前列腺癌细胞,经单去污剂裂解液处理,DU800 核酸蛋白分析仪定量后,等量分装置 -70℃ 冰箱保存备用。取样品加入等量上样缓冲液,沸水浴 10 min,离心后以每泳道 20 μl 上样,并同时上样等体积的 GAPDH 蛋白内参(稀释比例为 1:500),进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,检测样品中 GAPDH 蛋白,根据样品中 GAPDH 蛋白与内参显色条带差异,调整样品的上样量,至内参 GAPDH 蛋白量一致,进行 Western blot 实验。电泳、转膜,分别滴加一抗:兔抗人 VEGF 多抗(1:800)、鼠抗人 KDR 单抗(1:1 000)和鼠抗 GAPDH 单抗(1:1 000);二抗:羊抗兔 IgG2HRP(1:800)和羊抗鼠 IgG2HRP(1:1 000),孵育,DAB 显色。

### 1.7 RT-PCR 检测 VEGF 和 KDR mRNA

抽提细胞总 RNA,用 Promega RT-PCR 一步法成套试剂盒检测 VEGF 和 KDR 的 mRNA,按操作手册进行操作,引物按照人 VEGF 和 KDR 的序列而设计。引物的序列如下:VEGF 引物,正义链 5'-GAAGTGGT-GAAGTTCATGGATGTC-3',反义链 5'-CGATCGTTCTG-TATCAGTCTTTCC-3',扩增片断为 570 bp;KDR 引物,正义链 5'-AAGCGGTCAACAAAGTCGTCG-3',反义链 5'-TCATAAGGCAGTCGTTCA-3'扩增片断为 877 bp;内参照物选用 β-actin, invitrogen 公司推荐,正义链 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3',反义链 5'-CAAA-CATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'扩增片断为 353 bp。扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,电泳条带经电泳图像分析扫描仪扫描,得到 VEGF, KDR 和 β-actin 条带各自的峰面积积分值,计算 VEGF 与 β-actin, KDR 与 β-actin 比值作为 VEGF 和 KDR 表达参数,对 VEGF PCR 和 KDR PCR 产物相对定量。

### 1.8 统计学分析

结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS10.0 软件进行方差分析和 LSD-*t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 免疫细胞化学染色结果

前列腺癌细胞 PC-3, PC-3M, DU-145, LNCaP 和 22RV1 均表达 VEGF 和 KDR,VEGF 阳性物质分布于胞质中,呈棕黄色(图 1);KDR 阳性物质分布于细胞膜和细胞质中,呈棕黄色(图 2),阴性呈蓝色。其结果显示,VEGF 和 KDR 在 5 种前列腺癌细胞系中均有表达但表达水平有差别。

### 2.2 VEGF 和 KDR 免疫细胞化学染色阳性分值结果

VEGF 和 KDR 免疫细胞化学染色阳性分值(表 1),PC-3,DU-145 和 LNCaP 与 PC-3M 和 22RV1 相比,有显著统计学差异( $P < 0.01$ );说明 VEGF 和 KDR 在

不同的前列腺癌细胞系中表达水平不同,在 PC-3,DU-145 和 LNCaP 中表达相对较高。

图 1 5 种前列腺癌细胞 VEGF 的免疫细胞化学染色结果

Fig.1 Immunocytochemistry staining of VEGF in 5 prostate cancer cell lines (400 × )

A: DU-145; B: LNCaP; C: PC-3; D: PC-3M; E: 22RV1; F: Negative control

图 2 5 种前列腺癌细胞 KDR 的免疫细胞化学染色结果

Fig.2 Immunocytochemistry staining of KDR in 5 prostate cancer cell lines (400 × )

A: DU-145; B: LNCaP; C: PC-3; D: PC-3M; E: 22RV1; F: Negative control

### 2.3 培养上清 VEGF 含量

5 种前列腺癌细胞培养上清 VEGF 含量结果表明,PC-3,DU-145 和 LNCaP 与 PC-3M 和 22RV1 相比,有显著统计学差异( $P < 0.01$ ),说明 VEGF 和 KDR 在不同的前列腺癌细胞系中表达水平不同,在 PC-3,DU-145

和 LNCaP 中表达相对较高(表 2)。

### 2.4 Western blot

在相对分子质量 23 kD(VEGF)、150 kD(KDR)附近,PC-3,PC-3M,DU-145,LNCaP 和 22RV1 均呈现阳性条带,结果与预期相符。通过与内参 GAPDH(36

kD)相比较,结果显示 PC-3, DU-145 和 LNCaP 细胞系中的蛋白总量相对较高,而 22RV1, PC3M 中的 VEGF 和 KDR 蛋白总量相对较低(图 3,图 4)。

表 1 5 种前列腺癌细胞 VEGF 和 KDR 免疫细胞化学染色阳性分值结果

Tab.1 Positive score results of VEGF and KDR immunocytochemistry staining in prostate cancer cells

Cell lines	n	Score( $\bar{x} \pm s$ )	
		VEGF	KDR
DU145	5	50.52 ± 5.32	39.27 ± 4.32
LNCaP	5	53.09 ± 3.89	43.78 ± 3.22
PC3	5	56.42 ± 3.25	45.65 ± 3.23
PC3M	5	38.45 ± 4.51*	29.82 ± 4.65*
22RV1	5	40.66 ± 6.31*	32.66 ± 5.13*

\*  $P < 0.01$ , compared with DU145, LNCaP, PC3

表 2 5 种前列腺癌细胞培养上清 VEGF 蛋白含量

Tab.2 VEGF concentration in culture supernatants of prostate cancer cell

Cell lines	n	VEGF( pg / ml )
DU145	6	510 ± 32
LNCaP	6	560 ± 45
PC3	6	498 ± 32
PC3M	6	320 ± 29*
22RV1	6	265 ± 30*

\*  $P < 0.01$ , compared with DU145, LNCaP, PC3

图 3 5 种前列腺癌细胞 VEGF 的 Western blot 结果

Fig.3 Western blot results of VEGF in prostate cancer cells

M: Marker; 1: DU-145; 2: LNCaP; 3: PC-3; 4: PC-3M; 5: 22RV1

### 2.5 RT-PCR 结果

5 种前列腺癌细胞皆有 VEGF 和 KDR 的 mRNA 表

达,大小分别为 570 bp 和 877 bp,与预计扩增产物的大小一致,各样本  $\beta$ -actin 对照,均在相应位置 353 bp 处出现明显的扩增条带,表明提取各细胞中 RNA 的质量及 RT-PCR 过程均较良好(图 5,图 6),与  $\beta$ -actin 比值变化见表 3。PC-3, DU-145 和 LNCaP 三者之间结果没有显著统计学差异,而这三者与 PC-3M 和 22RV1 相比,有显著统计学差异( $P < 0.01$ ),说明 VEGF 和 KDR 在不同的前列腺癌细胞系中表达水平不同,在 PC-3, DU-145 和 LNCaP 中表达相对较高。

图 4 5 种前列腺癌细胞 KDR 的 Western blot 结果

Fig.4 Western blot results of KDR in prostate cancer cells

M: Marker; 1: DU-145; 2: LNCaP; 3: PC-3; 4: PC-3M; 5: 22RV1

图 5 5 种前列腺癌细胞 VEGF 的 RT-PCR 结果

Fig.5 RT-PCR results of VEGF mRNA in prostate cancer cells

M: Marker; 1: 22RV1; 2: PC-3M; 3: PC-3; 4: DU-145; 5: LNCaP; 6: Negative control

### 3 讨论

VEGF 家族目前主要包括 VEGF(即 VEGFA) 胎盘生长因子和 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 和 VEGF-E, 其中 VEGF 又称血管通透因子,具有刺激内皮细胞增殖和增加微血管通透性的双重功效,并可动员骨髓来源的内皮祖细胞,在血管发生(vasculogenesis)与血管新生中均起关键作用,与肿瘤血管新生及转移的关系也最为密切<sup>[3,4]</sup>。研究表明,VEGF 表达水平与肿瘤微血管密度、恶性程度和转移情况呈高度正相关,而与患者

的预后则呈显著负相关。我们的结果显示 5 种前列腺癌细胞系均表达 VEGF, 说明 VEGF 高表达是肿瘤细胞重要的生物学特征。

图 6 5 种前列腺癌细胞 KDR 的 RT-PCR 结果  
Fig. 6 RT-PCR results of KDR mRNA in prostate cancer cells

M: Marker; 1: 22RV1; 2: PC-3M; 3: PC-3;  
4: DU-145; 5: LNCaP; 6: Negative control

表 3 5 种前列腺癌细胞系 VEGF mRNA 和 KDR mRNA 与  $\beta$ -actin 比值  
Tab. 3 Relative value of VEGF mRNA and KDR mRNA compared with  $\beta$ -actin

Cell lines	VEGF / $\beta$ -actin	KDR / $\beta$ -actin
DU145	2.34 $\pm$ 0.13	1.05 $\pm$ 0.09
LNCaP	2.65 $\pm$ 0.14	1.15 $\pm$ 0.10
PC3	2.81 $\pm$ 0.18	1.25 $\pm$ 0.06
PC3M	0.91 $\pm$ 0.11 *	0.56 $\pm$ 0.05 *
22RV1	0.84 $\pm$ 0.12 *	0.48 $\pm$ 0.07 *

\*  $P < 0.01$ , compared with DU145, LNCaP, PC3

VEGFR 家族的成员包括: VEGFR1( Flt-1 ), VEGFR2( KDR/Flk-1 ), VEGFR3( Flt-4 )。这一家族的受体在细胞外存在 7 个免疫球蛋白样的结构域, 在胞内酪氨酸激酶区则含有一段亲水插入序列, 属受体酪氨酸激酶的血小板衍生生长因子受体亚家族。其中前两者可分别激活血管内皮细胞迁移或增殖与存活信号, Flt-4 则与淋巴管新生有关。实体瘤主要表达 KDR, 提示肿瘤细胞分泌的 VEGF 不仅以旁分泌方式作用于血管内皮细胞并诱导血管新生, 也可通过自分泌途径与自身表面的受体结合而促进细胞生长或迁移、抑制细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。实体肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管生成, 如果没有血管生成, 实体肿瘤将很难生长, 本研究结果显示, 5 种前列腺癌细胞系均表达 VEGF 及 KDR, VEGF 及 KDR 在 PC-3, DU-145 和 LNCaP 中表达与国外报道一致<sup>[7-8]</sup>, 而在 PC-3M 和 22RV1 中的表达国内外很少有报道。VEGF 和 KDR 蛋白和 mRNA 的表

达水平经方差分析显示表达水平不全相同(  $P < 0.01$  ), 采用多样本均数间的多重比较 LSD-*t* 检验, PC-3, DU-145 和 LNCaP 三者之间以及 PC-3M 和 22RV1 两者之间结果没有显著统计学差异(  $P > 0.05$  ), 而这三者与 PC-3M 和 22RV1 相比, 有显著统计学差异(  $P < 0.01$  ), 说明 VEGF 和 KDR 蛋白和 mRNA 在不同的前列腺癌细胞中表达水平不同, PC-3, DU-145 和 LNCaP 细胞中的表达相对较高。PC-3, DU-145 和 PC-3M 是人雄激素非依赖性前列腺癌细胞, LNCaP 和 22RV1 与之相反; PC-3 和 PC-3M 来源于前列腺癌骨转移细胞, DU-145 来源于前列腺癌脑转移细胞, LNCaP 来源于前列腺癌淋巴转移细胞, 22RV1 来源于 CWR22R 在去势裸鼠上连续传代。这 5 种前列腺癌细胞中 VEGF 和 KDR 的表达差异与肿瘤恶性程度和转移情况的相关性有待进一步研究。本研究表明 VEGF 不仅作为旁分泌因子刺激血管内皮细胞增殖, 同时还可能作为自分泌因子通过直接作用于肿瘤细胞自身的 VEGFR, 而促进肿瘤细胞的生长, 说明 VEGF 及其受体 KDR 在前列腺癌的发生发展及其血管形成中, 起着重要的作用, 为前列腺癌的抗血管生成治疗提供了新的靶点和思路。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Strohmeier D, Rossing C, Bauerfeind A, *et al.* Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer[ J ]. *Prostate*, 2000, 45( 3 ): 216-224.
- [ 2 ] Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, *et al.* Angiogenesis and prostate cancer: *in vivo* and *in vitro* expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells[ J ]. *Urology*, 1998, 51( 1 ): 161-167
- [ 3 ] Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[ J ]. *Oncogene*, 2000, 19( 49 ): 5598-5605.
- [ 4 ] Bruns CJ, Liu W, Davis DW, *et al.* Vascular endothelial growth factor is an *in vivo* survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases [ J ]. *Cancer*, 2000, 89( 3 ): 488-499.
- [ 5 ] Dias S, Hattori K, Zhu Z, *et al.* Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration[ J ]. *J Clin Invest*, 2000, 106( 4 ): 511-521.
- [ 6 ] Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, *et al.* A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 3 ): 854-859.
- [ 7 ] Frankenberry KA, Somasundar P, McFadden DW, *et al.* Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells[ J ]. *Am J Surg*, 2004, 188( 5 ): 560-565.
- [ 8 ] Dai J, Kitagawa Y, Zhang J, *et al.* Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein[ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64( 3 ): 994-999.

[ 收稿日期 ] 2005 - 07 - 26

[ 修回日期 ] 2005 - 09 - 10

[ 本文编辑 ] 王莹