

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0081-02

Caveolin-1 对 KDR 信号通路的作用

Effects of caveolin-1 on KDR signal transduction pathway

房 凯, 刘 军(中国医科大学基础医学院生物信息学教研室, 沈阳 110001)

[摘要] **目的:** 研究 Caveolin-1 对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体 KDR、p42/44MAPK 的作用。**方法:** 以腺病毒为载体介导在内皮细胞中表达外源 Caveolin-1, 应用 Western-blotting 检测 KDR、p42/44MAPK 的磷酸化水平。**结果:** 与对照组相比, 感染腺病毒表达外源 Caveolin-1 蛋白的内皮细胞中 KDR1054 酪氨酸残基和 p42/44MAPK 磷酸化水平分别降低了 42.3% 和 43.5%。**结论:** Caveolin-1 蛋白抑制 KDR 信号通路, 对内皮细胞增殖可能具有抑制作用。

[关键词] Caveolin-1; 血管内皮生长因子; KDR; 血管生成; 肿瘤

[中图分类号] R730

[文献标志码] A

血管生成在肿瘤生长过程中起重要作用^[1], 而内皮细胞增殖是血管生成的关键。Caveolin-1 是相对分子质量为 22 000 的整合膜蛋白, 在内皮细胞中表达丰富。研究表明, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)刺激内皮细胞时, Caveolin-1 的表达水平降低^[2], 提示 Caveolin-1 与内皮细胞增殖有关。本研究探讨 Caveolin-1 与 KDR 细胞信号通路的关系, 初步阐释 Caveolin-1 在内皮细胞增殖信号传递过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Caveolin-1 单克隆抗体购于 BD Bioscience, 磷酸化 p42/44MAPK 抗体和 p42/44MAPK 抗体购于 Cell Signaling Technology, VEGF 购于 R&D, KDR1054 酪氨酸磷酸化抗体和 GFP 抗体购于 Biosource。

1.2 腺病毒介导人脐静脉内皮细胞表达外源 Caveolin-1 蛋白

新鲜脐带分离内皮细胞, 于 MCDB 培养液传代培养。感染内皮细胞的腺病毒 Ad-Cav-1 (Caveolin-1 腺病毒重组体)、Ad-GFP (GFP 腺病毒重组体)、辅助腺病毒 Ad-tTA 由 Lisanti 教授馈赠^[3]。腺病毒于 AD293 细胞内扩增, CsCl 密度梯度离心分离纯化, 测定 D_{260} , 计算病毒滴度。对照组为感染 Ad-GFP 和 Ad-tTA (各 200 pfu/孔) 表达 GFP 的内皮细胞, 实验组为感染 Ad-Cav-1 和 Ad-tTA (各 200 pfu/孔) 表达外源 Caveolin-1 的内皮细胞。

1.3 Western blotting 检测 KDR 和 p42/44MAPK 的磷酸化水平

将感染腺病毒的内皮细胞接种到六孔板, 每孔

约 9×10^4 细胞, 培养 24 h, 用 0.5% FBS MCDB 培养 16 h, 以 10 ng/ml VEGF 刺激细胞 10 min, 弃培养液, 裂解细胞, 收集裂解蛋白。SDS-PAGE 分离, 转移至尼龙膜。以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 (1:2 000) 过夜, TBST 洗膜 2 次; 加二抗 (1:5 000) 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 液孵育膜 2 min, 暗室中压片显影。图像分析仪灰度扫描分析。检测 KDR1054 酪氨酸残基磷酸化水平的一抗是 KDR1054 酪氨酸残基磷酸化抗体, 检测 p42/44MAPK 磷酸化水平的一抗是抗磷酸化 p42/44MAPK 抗体。

2 结果

2.1 腺病毒介导静脉内皮细胞高表达 Caveolin-1

腺病毒感染脐静脉内皮细胞 24 h 后裂解细胞, 应用单克隆 Caveolin-1 抗体检测内源和外源 Caveolin-1 的表达水平; 作为对照, GFP 单克隆抗体检测 GFP 的表达水平。如图 1 所示, 相对分子质量较小的是内源 Caveolin-1 蛋白, 外源 Caveolin-1 蛋白 (箭头所示) 由于带有 myc 标签而分子质量大于内源性 Caveolin-1 蛋白。

2.2 Caveolin-1 抑制 KDR 和 p42/44MAPK 磷酸化

血清饥饿内皮细胞 16 h 后, 检测不到 KDR1054 酪氨酸残基磷酸化信号, VEGF 刺激 10 min 后, KDR1054 酪氨酸磷酸化水平明显增加, 与对照组表达 GFP 的脐静脉内皮细胞相比, 高表达 Caveolin-1 使 KDR1054 酪氨酸残基磷酸化水平下降 (图 2), KDR1054 酪氨酸残基磷酸化检测信号与 GAPDH 检

[作者简介] 房 凯 (1970-), 男, 辽宁省朝阳市人, 博士, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

[通讯作者] 房 凯, E-mail: fangkai1970@hotmail.com

测信号的灰度值之比下降了 42.3%。而在血清饥饿 16 h 未加入 VEGF 刺激的细胞内,仍检测到少量 p42/44 MAPK 处在活性状态(图 3);加入 VEGF 刺激后,高表达 Caveolin-1 蛋白的内皮细胞磷酸化 p42/44MAPK 与内参照非磷酸化 p42/44MAPK 检测信号灰度值之比下降了 43.5%。

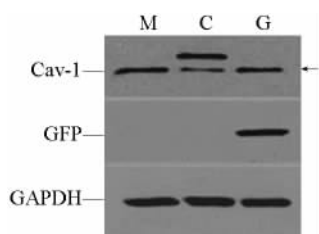


图 1 腺病毒载体介导外源 Caveolin-1 和 GFP 蛋白在内皮细胞中的表达

M: 未感染腺病毒的内皮细胞; C: 感染腺病毒高表达 Caveolin-1 的内皮细胞; G: 感染腺病毒表达 GFP 的内皮细胞

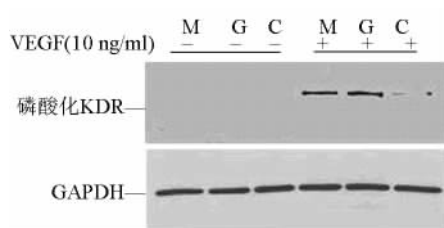


图 2 高表达 Caveolin-1 抑制 VEGF 致 KDR 磷酸化

M: 未感染腺病毒的内皮细胞; G: 感染腺病毒表达 GFP 的内皮细胞; C: 感染腺病毒高表达 Caveolin-1 的内皮细胞

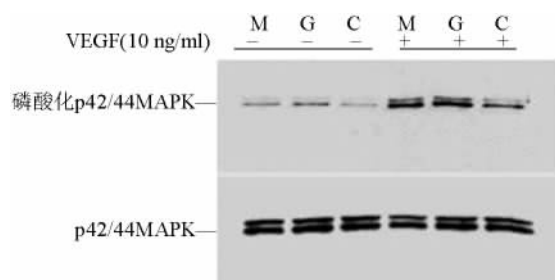


图 3 高表达 Caveolin-1 抑制 VEGF 致 p42/44MAPK 活化

M: 未感染腺病毒的内皮细胞; G: 感染腺病毒表达 GFP 的内皮细胞; C: 感染腺病毒高表达 Caveolin-1 的内皮细胞

3 讨论

在实体肿瘤中,血管生成是肿瘤生长的必须前提之一。血管生成包括内皮细胞的增殖、迁移和分化等过程,其中内皮细胞增殖是关键。正常组织的血管内皮细胞处于增殖静止状态,而肿瘤血管的内皮细胞则处于持续增殖状态。因此通过抑制内皮细

胞增殖,进而抑制血管生成,以此控制肿瘤的生长,是当今肿瘤研究的热点之一^[1]。

VEGF 是目前已知最强的促血管内皮生长因子,其与内皮细胞上受体 Flt-1 和 KDR 结合,其中 KDR 在内皮细胞增殖过程中起主要作用。Labrecque^[4]发现 KDR 中可能与 Caveolin-1 的结合序列为 1091WSFGVLLWEIT1101,并在牛动脉内皮细胞裂解液中检测到 KDR 和 Caveolin-1 形成的免疫共沉淀复合物,表明 KDR 和 Caveolin-1 相结合。VEGF 与 KDR 结合,致 KDR 形成二聚体并在多个酪氨酸残基处发生磷酸化,这些位点调节激酶的活性,其中酪氨酸 1 054 的磷酸化是 KDR 活化所必需^[5]。本实验结果显示,高表达 Caveolin-1 抑制 KDR 酪氨酸 1 054 残基磷酸化。因此,Caveolin-1 可能是通过直接与 KDR 结合来抑制 KDR 的起始活性。VEGF 诱导 KDR 受体磷酸化后,向细胞内传递信号,激活 p42/44MAPK,促进内皮细胞增殖。本研究应用磷酸化 p42/44MAPK 抗体检测 Caveolin-1 的表达对 p42/44 MAPK 活性的影响,结果表明,高表达 Caveolin-1 抑制 p42/44MAPK 的活性。

目前,多种针对 VEGF-KDR 信号通路开发的抗肿瘤血管生成药物正处于临床前期和临床试验期^[6],其中,抗 VEGF 的人源化单克隆抗体 Avastin 已被 FDA 批准临床使用^[7]。Caveolin-1 作为内皮细胞内源的 KDR 活性抑制蛋白,有可能成为抗肿瘤血管生成药用蛋白。

[参考文献]

- [1] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature, 2005, 438(7070): 967-974.
- [2] Liu J, Razani B, Tang S, et al. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(22): 15781-15785.
- [3] Zhang W, Razani B, Altschuler Y, et al. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells(MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20717-20725.
- [4] Labrecque L, Royal I, Suprenant DS, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(1): 334-347.

(下转第 96 页)