

TGF- β_1 对 VEGF 在膀胱肿瘤血管生成中的调节作用

刘 竞, 李 康, 邱明星

四川省医学科学院·四川省人民医院 泌尿外科(成都 610072)

【摘要】 目的 采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默转化生长因子基因 ($TGF-\beta_1$), 观察 RNAi 的基因沉默效应及对人膀胱癌细胞株 (EJ 细胞) 中血管内皮生长因子基因 ($VEGF$) 表达的影响, 探讨 $TGF-\beta_1$ 对 $VEGF$ 在膀胱肿瘤血管生成中的调节作用。方法 构建基因 $TGF-\beta_1$ 特异性 siRNA 表达载体, Real time-PCR 及 ELISA 筛选出抑制效率最高的靶序列, 分成 EJ 细胞组、对照组 ($TGF-\beta_1$ 组)、重组质粒组 ($TGF-\beta_1$ siRNA 表达载体组), 转染 EJ 细胞后, Real time-PCR 检测 $VEGF$ mRNA 的水平。结果 成功构建基因 $TGF-\beta_1$ 特异性 siRNA 表达载体, Real time-PCR 及 ELISA 筛选出最佳抑制效果的序列 [$TGF-\beta_1$ mRNA 表达水平为 0.92 ± 0.19 ; 其细胞培养上清液中 $TGF-\beta_1$ 蛋白表达水平为 (50.08 ± 5.85) pg/mL] 转染后, 各组的 $VEGF$ mRNA 表达水平以重组质粒组最低 ($P < 0.05$); $VEGF$ mRNA 的表达随 $TGF-\beta_1$ 基因沉默而减少 ($P < 0.05$)。结论 抑制 $TGF-\beta_1$ 基因能下调 $VEGF$ 基因的表达, $TGF-\beta_1$ 基因可能通过诱导 $VEGF$ 基因的表达实现对膀胱肿瘤血管生成的调控。

【关键词】 转化生长因子 β_1 血管内皮生长因子 RNA 干扰 血管生成 膀胱肿瘤

Down-regulation Effect of TGF- β_1 on Expression of VEGF in Bladder Cancer Cell Line LIU Jing, LI Kang, QIU Ming-xing. Department of Urology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

【Abstract】 Objective To explore the down-regulation effect of transforming growth factor- β_1 ($TGF-\beta_1$) on the expression of vascular endothelial growth factor ($VEGF$) in bladder cancer cell line EJ cell strain. Methods The siRNA expression vectors of $TGF-\beta_1$ gene were constructed, the highest inhibition target sequence was screened and selected by Real time-PCR and ELISA, and then the vectors were transfected into EJ cells, the expression level of $VEGF$ mRNA was detected by Real time-PCR. Results $TGF-\beta_1$ targeting expression vectors were successfully constructed, Real time-PCR and ELISA screened the highest inhibition target sequence (the lowest expression level of $TGF-\beta_1$ mRNA was 0.92 ± 0.19 ; ELISA result was 50.08 ± 5.85). The relative expression level of $VEGF$ mRNA in $TGF-\beta_1$ siRNA group was the lowest, indicating that the expression of $VEGF$ was decreased by silencing $TGF-\beta_1$ gene. Conclusion Inhibition of $TGF-\beta_1$ gene expression could down regulate the expression of $VEGF$ in bladder neoplasm.

【Key words】 Transforming growth factor- β_1 Vascular endothelial growth factor RNA interference Angiogenesis Bladder neoplasm

膀胱肿瘤具有高复发的特点, 其生长与转移依赖血管的生成, 目前针对肿瘤新生血管形成机制及能降低膀胱癌复发的新疗法是研究热点^[1]。血管生成受大量促血管生长因子和抗血管生成因子的调节。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , $TGF-\beta_1$) 是具有介导新血管生长的双重活性细胞因子^[2], 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, $VEGF$) 是目前作用及特异性最强的促进血管内皮生长的细胞因子, 体外实验证实 $TGF-\beta_1$ 可诱导成纤维细胞和上皮细胞表达 $VEGF$, 推测 $TGF-\beta_1$ 可能通过上调肿瘤细胞 $VEGF$ 的表达而间接促进肿瘤的血管生成^[3]。本研究采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默 $TGF-\beta_1$ 基因, 观察其对入膀

胱癌细胞株 (EJ) 中 $VEGF$ mRNA 表达的影响, 探讨 $TGF-\beta_1$ 对 $VEGF$ 在膀胱肿瘤血管生成中的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Pgenesil-1 质粒、RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (NEB 公司), EJ 细胞株及 RPMI-1640 培养基、胎牛血清及 ELISA 试剂盒 (上海生物工程技术有限公司), RT-PCR 试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 $TGF-\beta_1$ siRNA 最佳序列筛选 根据

GenBank 公布的人 TGF-β₁ cDNA 基因全长序列设计 3 种 TGF-β₁ siRNA (表 1), 构建 Pgenesil-1-TGF-β₁ siRNA 重组质粒, 由上海文乐生物科技有限公司合成、鉴定。复苏 EJ 细胞株, 取第 5 代细胞进行转染。分为 EJ 细胞组 (只加培养基)、脂质体组 (Lip, 阴性对照组) 及转染 3 种不同 TGF-β₁ siRNA 表达载体的转染组 (A、B、C)。脂质体组及 A、B、C 组转染前 1 d 加入含 0.1% 小牛血清无抗生素培养基同步 24 h 后, 细胞生长汇合达 80%~90% 时, 将相应质粒用无血清无抗生素的 1640 培养基稀释, 按照脂质体 2000 的说明转染 EJ 细胞, 转染 6 h 后, 更换为含血清无抗生素的培养基, 培养 24 h 后, 分别提取各组细胞总 RNA, RNA 逆转录合成 cDNA。引物由上海生博司设计合成, 序列如下: 上

游引物 5'-CTACTACGCCAAAGAA GTCACC-3', 下游引物 3'-GAAATCGGCCCTGTAcCGTCTCT-5', Real-time PCR 检测各组细胞 TGF-β₁ mRNA 表达, 通过对退火温度、引物浓度、模板浓度的优化, 综合扩增效率、熔解曲线等因素确定最优反应条件为 20 μL 反应体系, 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, β-actin 为内参。反应结束后使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件分析 PCR 过程各检测样本的 threshold cycle (Ct) 值, 通过 2^{-ΔΔCt} 计算 TGF-β₁ mRNA 的相对表达水平。

基因转染 24 h 后, 取细胞培养上清液, 采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA 法), 按试剂盒操作说明检测 TGF-β₁ 蛋白表达, 酶标仪

表 1 3 种 TGF-β₁ siRNA 序列
Table 1 Sequence of three TGF-β₁ siRNA

Gene	Sequence
TGF-β ₁ -1	5'-GATCCCTGCTCAGTGACAGCAGATTT CAAGACGT CTTT GCT GTCACA AGAGCAGTTTTTTGTGCGACA-3' 3'-GGACGAGAACACTGTCGTTTCTAAGTTCTGCAGTACGA CAGTGTCTCGTCAATCAGCTGTTTCTCGA-5'
TGF-β ₁ -2	5'-CATGGATTCACTAAACCGGGCCGGATG CAAACCTT CA AACTGTGGTGCTGAAGTGCCCGGAAAAAG-3' 3'-GGAAGTCGAGGTGTCTCTTCTTAAAGTTCTGCAAGAAGA GACACCTCGACTTCAAAAAGTCCCGGTAGT-5'
TGF-β ₁ -3	5'-GGCCTGCCCTACATTTGGAGACTTCATAAGGCGCATGCT TCAAGACGGATACTGTCTTAAGTAT-3' 3'-CCGGGACGGGATGTAAACCTCTGAA GTATTCCGC GTA C GAAGTTCTGCCTATGGACAGTAATGCCG-5'

在 450 nm 波长下测定吸光度值, 计算样品浓度。

1.2.2 Real-time PCR 检测 VEGF mRNA 表达水平 分为 EJ 细胞组 (只加培养基)、TGF-β₁ 组、重组质粒组 (TGF-β₁ siRNA 表达载体组)。TGF-β₁ 组采用 10 ng/mL 不含 siRNA 序列的 TGF-β₁ 基因 (购于上海文乐生物科技有限公司) 转染, 重组质粒组选择抑制效率最高的 TGF-β₁-3 siRNA 转染 EJ 细胞。TGF-β₁ 组及重组质粒组在细胞 70%~80% 融合时转染。所有组转染 24 h 后弃上清液收集细胞检测 VEGF mRNA 表达。取对数生长期细胞提取总 RNA 后行 real-time RT-PCR, 采用 50 μL 反应体系, 反应条件为: 94 °C 3 min 预变性, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 20 s, 64 °C 30 s, 40 个循环, β-actin 为内参。目的基因及内参 PCR 引物由上海生博医学生物工程科技公司设计合成。见表 2。以 2^{-ΔΔCt} 为 VEGF 的相对表达量。

1.3 统计学方法

表 2 基因引物序列
Table 2 Sequence of primers

Gene	Primers	Product size (bp)
VEGF	Forward 5'-ATGAACTTTCTGCTGTCTTGG-3'	86
	Reverse 3'-TCACCGCCTCGGCTTGTGTCACA-5'	
β-actin	Forward 5'-GATTGGAATCTGGCTACT-3'	73
	Reverse 5'-TAGGGCTGAAGACAGGG-3'	

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。α=0.05。

2 结果

2.1 TGF-β₁ siRNA 的基因干扰效率评价

2.1.1 各组 TGF-β₁ mRNA 的表达水平 TGF-β₁ mRNA 在脂质体组表达与 EJ 细胞组比较差异无统计学意义 (P>0.05), 表明转染的空白质粒对 TGF-β₁ mRNA 的表达无明显干扰; 在转染 3 个不同 TGF-β₁ siRNA 的 EJ 细胞内 TGF-β₁ mRNA 表达均有下降 (P<0.05), 其中以 C 组最明显 (P<0.01), 表明所设计的 3 种 TGF-β₁ siRNA 对 TGF-β₁ mRNA 的表达均具有抑制作用, TGF-β₁-3 siRNA 序列具有最佳抑制效果。见表 3。

2.1.2 各组 TGF-β₁ 蛋白表达 TGF-β₁ 蛋白表达在脂质体组与 EJ 细胞组间差异无统计学意义 (P>0.05), 表明转染空白质粒对 TGF-β₁ 蛋白表达无明显干扰。与 EJ 细胞组和脂质体组比较, 转染 3 个不同 TGF-β₁ siRNA 的 EJ 细胞 TGF-β₁ 蛋白表达均下降 (P<0.05), ELISA 检测也印证了所设计的 3 种 TGF-β₁ siRNA 对 TGF-β₁ 蛋白的表达均具有抑制作用, 以 C 组抑制最明显。见表 3。

表 3 各组细胞 TGF- β_1 mRNA 和蛋白表达的比较Table 3 mRNA and protein expressions of TGF- β_1

Group	n	mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Protein (pg/mL)
EJ	8	3.42±0.27	130.12±16.84
Lip	8	3.27±0.34	121.12±13.56
A	8	1.06±0.12 $\star\star\star\#$	57.96±7.56 $\star\star\star\#$
B	8	1.28±0.35 $\star\star\star\#$	64.28±9.39 $\star\star\star\#$
C	8	0.92±0.19 $\star\star\star\star\star$	50.08±5.85 $\star\star\star\star\star$

$\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, vs. EJ group; $\star\star\star P < 0.05$, $\star\star\star\star P < 0.01$, vs. lip group; $\# P < 0.05$, vs. C group. A: TGF- β_1 -1; B: TGF- β_1 -2; C: TGF- β_1 -3

2.2 各组 VEGF mRNA 表达水平

VEGF mRNA 在 TGF- β_1 组中表达量较 EJ 细胞组中增加 [(3.87±0.16) vs. (2.18±0.13), $P < 0.05$], 即 TGF- β_1 可增加 EJ 细胞中 VEGF mRNA 表达。在 TGF- β_1 siRNA 表达载体组中 VEGF 表达量 (0.73±0.09) 较 EJ 细胞组 ($P < 0.05$) 和 TGF- β_1 组减少 ($P < 0.01$), 表明 EJ 细胞中 VEGF mRNA 的表达随 TGF- β_1 基因沉默而减少。

3 讨论

TGF- β_1 对正常细胞及癌变早期细胞具有抑制作用, 可诱导细胞凋亡; 随着肿瘤逐渐发展 TGF- β_1 抑制生长和诱导凋亡的作用逐渐丧失, 通过一系列信号传导通路的改变, 促进肿瘤的演进与转移^[4,5]。研究发现膀胱移行细胞癌患者血清 TGF- β_1 含量升高, 癌组织 TGF- β_1 mRNA 表达阳性率为 100%, 推测内源性 TGF- β_1 促进膀胱癌细胞体外生长增殖, 促进肿瘤细胞外间质形成、肿瘤血管形成及抑制机体抗肿瘤免疫反应等, 与膀胱癌发生、发展关系密切^[6,7]。TGF- β_1 还可通过诱导 VEGF、成纤维细胞生长因子 (FGF) 等细胞因子表达而间接促进肿瘤细胞生长^[8]。VEGF 通过与其特异性受体 (VEGFR) 结合, 引起一系列信号转导^[9], 刺激血管内皮细胞增殖和血管通透性增加, 促进新生血管生成。而阻断 VEGF/VEGFR 信号途径, 则可抑制肿瘤新生血管的形成, 延缓肿瘤的生长速度, 该信号通路在肿瘤的生长和转移中发挥重要作用^[10,11]。

膀胱癌为实体肿瘤, 其发生发展依赖血管生成。研究发现膀胱癌组织中的 TGF- β_1 与 VEGF 在肿瘤的血管生成过程中具有协同作用^[12]。亦有报道认为其阳性表达可作为膀胱癌早期复发及预后的指标^[13,14]。由于血管内皮细胞表面无 TGF- β_1 受体, TGF- β_1 对血管内皮细胞无直接生物学作用, 因此 TGF- β_1 可能通过上调其它促血管生成因子 (如 VEGF, b-FGF) 的表达而间接促进肿瘤的血管生成。

本研究通过构建 TGF- β_1 基因特异性 siRNA 表达载体, 转染 EJ 细胞, 通过 real-time RT-PCR 检测 VEGF 基因水平, 发现在 EJ 细胞中, VEGF 表达量在转染 TGF- β_1 后上调, 而转染 TGF- β_1 siRNA 后 VEGF 的表达量下调。推测 TGF- β_1 可能通过上调 VEGF 的表达, 促使膀胱癌新生血管的生成, 参与膀胱癌的发生发展过程。

综上, 本研究从基因水平研究 TGF- β_1 对 VEGF 基因表达变化的影响, 为进一步揭示膀胱肿瘤新生血管生成机制, 阐释其复发机制提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Beecken WD, Engl T, Jonas D, et al. Expression of angiogenesis inhibitors in human bladder cancer may explain rapid metastatic progression after radical cystectomy. *Int J Mol Med*, 2009; 23(2): 261-266.
- 2 Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, et al. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*, 1999; 103(2): 197-206.
- 3 Schmid SA, Gaumann A, Wondrak M, et al. Lactate adversely affects the *in vitro* formation of endothelial cell tubular structures through the action of TGF-beta1. *Exp Cell Res*, 2007; 313(12): 2531-2549.
- 4 Robson CN, Gnanapragasam V, Byrne RL, et al. Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *J Endocrinol*, 1999; 160(2): 257-266.
- 5 唐正严, 杨罗艳, 张永等. Smad4 与 TGF- β_1 在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义. *中南大学学报(医学版)*, 2006; 31(3): 363-366.
- 6 Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, et al. Expression of transforming growth factors beta1, beta2 and beta3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer*, 1997; 75(12): 1753-1760.
- 7 范海涛, 白利群, 陈秀玲等. 人膀胱癌中 TGF- β_1 及其信号转导分子的表达及意义. *肿瘤*, 2006; 26(2): 181-183.
- 8 Xiong B, Gong LL, Zhang F, et al. TGF beta1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol*, 2002; 8(3): 496-498.
- 9 Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD. Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer Res*, 2013; 33(6): 2381-2390.
- 10 Kano MR, Bae Y, Iwata C, et al. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104(9): 3460-3465.
- 11 Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene*, 2004; 23(24): 4232-4237.
- 12 左杰, 史启铎, 孙光. TGF- β_1 在膀胱移行细胞癌中的表达及其对血管生成的调节作用. *透析与人工器官*, 2007; 18(2): 19-21.
- 13 Slaton JW, Millikan R, Inoue K, et al. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol*, 2004; 171(2 Pt 1): 570-574.
- 14 Huang YJ, Qi WX, He AN. Prognostic value of tissue vascular endothelial growth factor expression in bladder cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013; 14(2): 645-649.

(2013-07-25 收稿, 2013-09-25 修回)

编辑 余琳