

## 研究报告

## 某些肿瘤组织中血管内皮生长因子基因的表达\*

修波\*\* 于昕 李惠芳 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

**摘要** 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factors, VEGF) 是新发现的生长因子, 特异作用于血管内皮细胞, 促进其增殖及新生血管的生成, 已确认, 它和实体肿瘤的生长有着十分密切的关系. 文章报道, 利用分子杂交技术分析胃癌、肾癌、结肠癌和膀胱癌及其癌旁相应组织中 VEGF mRNA 的表达. 结果发现, 癌组织较其癌旁组织中 VEGF mRNA 的表达增高. SGC-7901 细胞加 TPA 1h 后则明显促进 VEGF mRNA 的表达. 转染含人反义 N-ras<sub>1</sub> DNA 片段重组质粒的人膀胱癌 BIU-87 细胞系可抑制 VEGF mRNA 表达.

**关键词** 血管内皮生长因子, 点杂交, 肿瘤, SGC-7901 细胞系, mRNA 表达

VEGFs 是一类新发现的生长因子<sup>[1]</sup>, 目前发现人体内可能有来自同一个基因的四种由 mRNA 的不同剪接而构成的 VEGFs, 分别含 121, 165, 189 和 206 个氨基酸<sup>[2]</sup>. 它们对血管内皮细胞有高效、特异的促有丝分裂作用<sup>[1]</sup>, 在体内可刺激血管的发生与生长<sup>[3]</sup>. 由于该因子还有提高血管壁通透性的作用, 因此早先将其称为血管通透性因子 (vascular permeability factor)<sup>[4]</sup>. 与其它生长因子不同, VEGF 以旁分泌方式特异作用于血管内皮细胞促进增殖, 而这种增殖作用又十分强烈, 因此在与血管内皮细胞增殖相关的生理和病理过程中占有重要地位, 和实体肿瘤的关系密切. 本项研究利用点杂交 (Dot blot) 方法, 对几种肿瘤和其癌旁组织, 以及体外培养的肿瘤细胞的 VEGF mRNA 表达进行了研究, 同时对其转录水平的调控进行了初步探讨.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 VEGF cDNA 探针由北京医科大学心血管基础研究所分子生物学研究室提供.

1.1.2 人膀胱移行细胞癌 BIU-87 细胞系由北京医科大学泌尿研究所提供. 人胃淋巴瘤癌 SGC-7901 细胞系由北京医科大学免疫教研室提供.

1.1.3 肿瘤组织取自外科手术切除的标本, 切除后即刻放液氮保存.

1.1.4  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP 购自北京福瑞生物工程公司, 随机引物探针标记试剂盒购自 Promega 公司.

1.1.5 TPA (Phorbol ester, 佛波酯)、异硫氰酸胍购自美国 Sigma 公司.

1.1.6 硝酸纤维素膜, 进口分装, 购自华美试剂公司. 其它试剂均为进口或国产分析或优级纯产品.

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养及处理 SGC-7901 和 BIU-87 细胞系用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养. 用 0.02% EDTA 洗细胞一次, 再加 0.2% 胰酶

\* 得到美国 CMB 资助.

\*\* 青岛医学院生物化学教研室, 青岛 266021.

收稿日期: 1993-07-20, 修回日期: 1993-09-11

消化, 按 1:3 传代. 在 SGC-7901 细胞生长旺盛、状态良好并铺满 70% 培养瓶时, 先用无血清培养液洗三次, 再用无血清培养液饥饿培养 24h. 然后加含 TPA (60ng/ml) 的无血清培养液. BIU-87 细胞重组质粒的转化, 筛选及鉴定详见参考文献 [7].

### 1.2.2 组织和细胞总 RNA 的提取及定量

总 RNA 的提取用异硫氰酸胍一步法<sup>[6]</sup>. 样品用 0.4% SDS 溶解, 在 65℃ 水浴中热变性 10min. 冰浴中迅速冷却, 然后放 -70℃ 冰箱中保存. 取适量 RNA 样品, 在紫外分光光度计上分别测定其 260 和 280nm 的 A 值,  $A_{260}/A_{280} \approx 2$ . RNA 样品浓度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} \times \frac{1}{1000}$ .

1.2.3 cDNA 探针同位素标记按 Promega 公司随机引物试剂盒说明书进行.

1.2.4 总 RNA 鉴定电泳、变性电泳和点杂交方法 (见北京医科大学生化教研室编“实验讲义”) 分子杂交用简易杂交体系 (见 Bio-Rad 公司生产的 Zeta-Probe 尼龙膜使用说明书) 65℃ 杂交 24h.

## 2 结 果

### 2.1 SGC-7901 细胞总 RNA 鉴定电泳和肿瘤组织总 RNA 的变性电泳

由图 1 和图 2 可见, 总 RNA 呈三条明显带, 分别为 28S, 18S 和 5S RNA, mRNA 由各种分子量组成, 分散于三条主带之间.

### 2.2 几种人肿瘤组织中 VEGF mRNA 的表达

结果如图 3 所示. 图 3 分别是胃癌/癌旁 (1/2)、肾癌/癌旁 (3/4) 和结肠癌/癌旁 (5/6) 组织中 VEGF mRNA 点杂交结果. 由图可见上述几种肿瘤中的 VEGF mRNA 表达均高于其周围相应组织.

### 2.3 TPA 对 SGC-7901 细胞 VEGF mRNA 表达的调节

结果如图 4 所示. 可见体外培养的 SGC-7901 细胞, 加 TPA 后有明显促进 VEGF

mRNA 表达作用, 4h 最为明显 (c), 8h 稍有下降 (d).

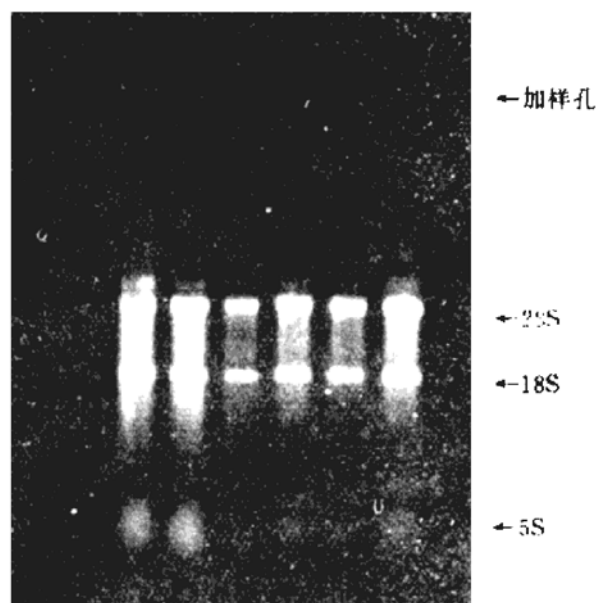


图 1 0.7% 琼脂糖 RNA 鉴定电泳  
各孔分别加 5 $\mu\text{g}$  SGC-7901 细胞总 RNA, 在加有 EB 的琼脂糖凝胶中 40V 恒压电泳 2h.

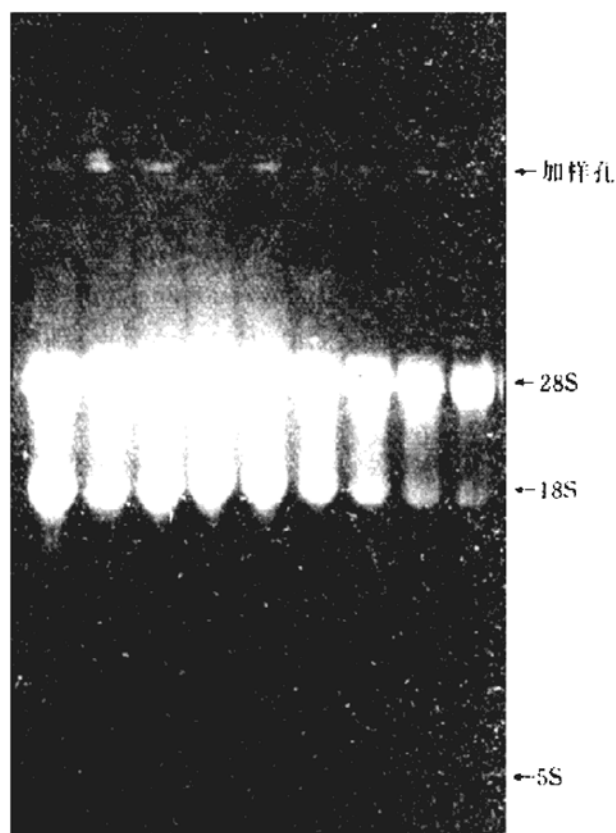


图 2 1% 琼脂糖 RNA 变性电泳  
各孔分别加肿瘤组织总 RNA 30 $\mu\text{g}$ , 在加有 EB 的变性电泳胶中 50V 恒压电泳 3h.

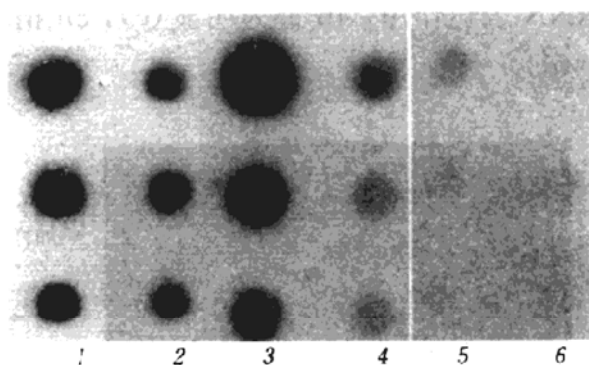


图3 几种人肿瘤和其癌旁组织

#### VEGF mRNA 点杂交图

每组样品自上而下的总 RNA 上样量分别是 20, 10 和 5 $\mu$ g, 用简易杂交体系 65 $^{\circ}$ C 杂交

24h, 底片在-70 $^{\circ}$ C 放射自显影 3d.

1, 2 胃癌/癌旁; 3, 4 肾癌/癌旁; 5, 6 结肠癌/癌旁.

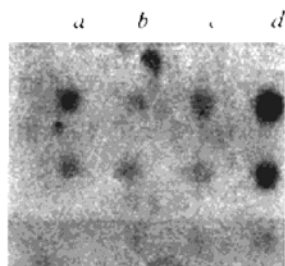


图4 TPA 诱导 SGC-7901 细胞

#### VEGF mRNA 表达的点杂交图

a: 含血清培养的 SGC-7901 细胞. b: 无血清培养 24h 后的 SGC-7901 细胞. c, d: 在 b 的基础上加 TPA (60ng/ml) 8h 和 4h.

每组样品自上而下的总 RNA 上样量分别是 20, 10 和 5 $\mu$ g, 杂交条件同图 3, 底片 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 4d.

### 2.4 反义 N-ras<sub>1</sub> 基因片段表达质粒转染对 BIU-87 细胞 VEGF mRNA 表达的影响

BIU-87 细胞和转染含反义、正义 N-ras<sub>1</sub> 重组表达质粒及转染空载质粒的 BIU-87 细胞总 RNA 分别与 VEGF cDNA 进行点杂交, 结果如图 5 所示. 可见转染有反义 N-ras<sub>1</sub> 片段重组质粒的 BIU-87 细胞 (A) 较正义 (S) 和空载质粒的 (M) BIU-87 细胞 VEGF mRNA 表达降低, 提示反义 ras<sub>1</sub> 癌基因可抑制 BIU-87 细胞中 VEGF mRNA 的表达.

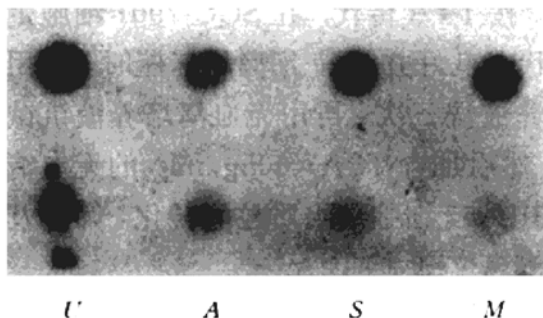


图5 N-ras<sub>1</sub> 癌基因对 BIU-87 细胞 VEGF mRNA 表达影响的点杂交图

U: BIU-87 细胞. A: 转染含反义 N-ras<sub>1</sub> DNA 片段表达质粒 (pGV<sub>1</sub>-MT-N-ras<sub>1</sub>) 的 BIU-87 细胞. S: 转染含正义 N-ras<sub>1</sub> 表达质粒的 BIU-87 细胞. M: 转染含空载质粒的 BIU-87 细胞.

每组样品自上而下的总 RNA 上样量分别是 20 和 10 $\mu$ g, 用传统杂交体系 45 $^{\circ}$ C 杂交 24h, 底片 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 4d.

## 3 讨 论

自 1989 年发现 VEGF 以来, 由于独特的生物活性而使其研究倍受瞩目. 众所周知, 新生血管的形成是正常组织发育和恶性肿瘤生长过程中的重要环节. 据报道, 胚胎发育期的组织和许多恶性肿瘤中均有 VEGF mRNA 的高表达<sup>[9-11]</sup>. 体内实验表明, VEGF 可促进瘤体的生长<sup>[3]</sup>. 抑制 VEGF 的活性可明显抑制某些恶性肿瘤的生长, 而且抑制作用与肿瘤恶性程度及血管丰度呈正相关<sup>[11]</sup>.

本实验用分子杂交技术分析了 4 种人肿瘤及其周围非癌相应组织中 VEGF mRNA 的 VEGF mRNA 的表达. 结果显示, 肿瘤较相应非癌组织中 VEGF mRNA 表达明显增高, 这和国外对中枢神经系统的肿瘤研究是一致的<sup>[10]</sup>, 说明 VEGF mRNA 在实体肿瘤中的高表达有普遍性.

TPA 作为蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂, 能促进多种癌基因和生长因子基因的表达<sup>[8]</sup>. 本实验结果表明 TPA 也促进了 VEGF mRNA 的表达. 本室报道, 转染含反义 N-ras<sub>1</sub> 片段表达质粒的 BIU-87 细胞, 其细胞增殖速率抑制,

N-ras mRNA 及 P<sup>21ras</sup> 表达降低, 软琼脂培养能力下降<sup>[7]</sup>. 本实验进一步表明, 反义 N-ras<sub>1</sub> 也可抑制 BIU-87 细胞中 VEGF mRNA 的表达. 有关反义癌基因抑制肿瘤细胞中 VEGF 基因表达的机理尚待研究.

### 参 考 文 献

- 1 Ferrara N, Henzel W J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **161**: 851
- 2 Wouck K A, Ferrara N, Winer G *et al.* *Mol Endocrinol*, 1991; **5**: 1806
- 3 Ferrara N, Winer J, Burton T *et al.* *J Clin Invest*, 1993; **91**: 160
- 4 Senger D R, Galli S J, Dvorak A M *et al.* *Science*, 1983; **219**: 983
- 5 Kim K J, Li Bing, Winer J *et al.* *Nature*, 1993; **362**: 841
- 6 Chomczynski P, Sacchi N. *Analytical Biochem*, 1987; **162**: 156
- 7 李惠芳, 周爱儒. 中华泌尿外科杂志, 1994; 待发表
- 8 葛正龙, 周爱儒. 生物化学杂志, 1992; **8** (5): 565
- 9 Breier G, Albrecht U, Sterrer S *et al.* *Development*, 1992; **114**: 521
- 10 Berkman R A, Merrill M J, Reinhold W C *et al.* *J Clin Invest*, 1993; **91**: 153
- 11 Kim K J, Li Bing, Winer J *et al.* *Nature*, 1993; **362**: 841

## TGF $\alpha$ 反义寡聚核苷酸对膀胱癌 BIU 87 细胞株的作用\*

孙丛梅 王 东 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

**摘要** 报道了23碱基组成的TGF $\alpha$ 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸对人膀胱移行细胞癌BIU87细胞增殖及其TGF $\alpha$  mRNA表达的作用. 结果表明: TGF $\alpha$ 反义寡聚核苷酸抑制体外培养的BIU 87细胞的增殖、DNA合成和TGF $\alpha$  mRNA的表达, 进一步证明了TGF $\alpha$ 在BIU 87细胞恶性增殖中的重要作用.

**关键词** 寡聚核苷酸, 转化生长因子 $\alpha$ , BIU 87细胞株, 反义寡聚核苷酸

转化生长因子(transforming growth factor  $\alpha$  TGF $\alpha$ )与肿瘤细胞的关系十分密切. 在人的多种肿瘤组织, 癌细胞及转化细胞如涎腺癌细胞株<sup>[1]</sup>、放射线转化细胞<sup>[2]</sup>、肾癌组织中均发现有TGF $\alpha$ 的高表达. TGF $\alpha$ 最主要的生物学功能是促进细胞转化, 在肿瘤发生与发展中起重要作用. BIU 87细胞株是我国以人膀胱乳头状移行上皮癌组织体外传代建立, 并能在体外长期传代培养的细胞株. 经各项鉴定表明有恶性细胞特性<sup>[3]</sup>. 本实验室已对BIU 87细胞中TGF $\alpha$ 的表达和正调控进行了研究, 结果表明: BIU 87细胞中TGF $\alpha$  mRNA有较高表达, 并与肿瘤恶性增殖有关<sup>[4]</sup>.

尽管对TGF $\alpha$ 及其表达调控促进因素的研究进行了大量工作, 但对TGF $\alpha$ 表达调控中抑

制因素的研究尚缺乏直接证据. 反义寡聚核苷酸以其作用的特异性而具备明显的优越性. 目前已对CSF-1<sup>[5]</sup>, bFGF<sup>[6]</sup>, TGF $\beta$ <sup>[7]</sup>设计了有效的反义寡聚核苷酸, 通过抑制这些生长因子的表达而抑制了肿瘤的发生、发展. 但有关TGF $\alpha$ 表达的研究尚未见报道. 本文以BIU 87细胞株为对象, 合成了23碱基组成的TGF $\alpha$ 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸, 并研究了其对细胞生长、DNA合成以及TGF $\alpha$  mRNA表达的作用, 旨在进一步揭示TGF $\alpha$ 在BIU 87细胞恶性增殖中的重要作用, 为肿瘤基因治疗提供实验基础.

自然科学基金和国家教委博士点基金项目.

收稿日期: 1993-11-04, 修回日期: 1994-03-05

plasm. activates the special transcription factors to attach the *cis*-elements existing on the upstream of ISGs in nucleus and then induces gene expression. The paper reviewed mainly on the signalling pathway and the products which play antiproliferative action of ISGs expression.

**Key words** interferon (IFN), IFN-stimulated genes (ISGs), IFN-stimulated response elements (ISRE), antiproliferation

**cDNA Cloning of Dopamine Receptors.** Xing Cheng. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 418—421

Molecular cloning studies on five types of dopamine receptors were summarized. The five types of dopamine receptors are members of family of the G protein-coupled receptors, and divided into two classes by pharmacologic and biochemical criteria: (a) D<sub>1</sub>R and D<sub>5</sub>R mediating the activation of adenylyl cyclase through G protein (G<sub>s</sub>) and (b) D<sub>2</sub>R, D<sub>3</sub>R, D<sub>4</sub>R, inhibiting the activation of adenylyl cyclase through the G protein (G<sub>i</sub>). The gene structure, distribution of their mRNA in the brain and location on chromosomes between the two classes of dopamine receptors were compared.

**Key words** dopamine receptors, cDNA cloning of dopamine receptors, dopamine receptor genes

**Fluorescence Digital Imaging Using a Charge-Coupled Device Camera and Its Biological Applications.** Hu Kunsheng. (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 421—425

A system, using a cooled slow-scan charge coupled device camera attached to a fluorescence microscope, allows a series of images to be stored, up to 500 fluorescent spots (labelling particles) per image can be identified by position and intensity. The movement of the spots can be traced. The tracking method allows the mobility to be analysed. The receptors of influenza virus and low density lipoprotein on fibroblast have three different types of motion: random motion, directed motion and motion limited to a domain. The high sensitivity of the system leads to short exposures and little photobleaching during the observations. The measurement principle of this system and its biological applications were described.

**Key words** charge-coupled device, fluorescence imaging, lateral diffusion, motion track, cell fussion

**Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Some Tumors.** Xiu Bo, Yu Xin, Li Huifang, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 426—429

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a specific mitogen on endothelial cells and promotes angiogenesis. It has been identified that VEGF is very closely linked to the growth of solid tumors. With Dot blot technique, expression of the VEGF mRNA in cancers of stomach, kidney, bladder and colon are investigated. The results showed that the expression of the VEGF mRNA is higher in tumors than in peritumors. There is significant expression of VEGF mRNA in SGC-7901 cells after adding TPA 4h. Human bladder carcinoma cell line BIU-87 transfected with antisense N-ras exon 1 DNA fragment inhibit VEGF

mRNA expression.

**Key words** vascular endothelial growth factor. Dot blot. tumor. SGC-7901 cell line. mRNA expression

**The Inhibition of BIU87 Cell Proliferation and TGF $\alpha$  mRNA Expression by an TGF $\alpha$  Antisense Oligodeoxynucleotide.** Sun Congmei. Wang Dong. Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 429—432

Two 23-mer unmodified oligodeoxynucleotides have been synthesized, one to hybridize with the region across the transcription initiation site of TGF $\alpha$  cDNA called antisense, and the second with an identical base composition, but the nucleotide sequence randomized. The random oligodeoxynucleotide was used to control for any non-specific effects of the oligodeoxynucleotides. TGF $\alpha$  antisense inhibited cell proliferation and DNA synthesis from 31% to 44% and 25.8% to 88.0% respectively. This effect is specific and dose-responed. However, at the same condition, the inhibition by random is only 10% to 17% and 17% to 27%. This effect is not dose-responed. By RNA dot blot analysis, the addition of 3  $\mu$ mol/L TGF $\alpha$  antisense and random upon BIU87 cells resulted in 61.4% and 42.5% inhibition in TGF $\alpha$  mRNA expression respectively. These results suggested that TGF $\alpha$  may play an important role in the proliferation of BIU87 cell line and provide a rational basis for the development of selective cancer therapeutical approaches.

**Key words** oligodeoxynucleotide. TGF $\alpha$  (transforming growth factor $\alpha$ ). BIU87 cell. antisense oligodeoxynucleotide

**Purification and Renaturation of Recombinant Fusion Protein IL6/IL2.** Zhao Chunhua. Ling Shigan. Mao Ning. Tang Peihshien. (*Institute of Basic Medical Science, AMMS, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 432—435

The expressed CH925 was aggregated into inclusion bodies (IB) in *E. coli* cytoplasm. The IBs were isolated by centrifugation and sonication. CH925 were refolded and reoxidated in a glutathione redox system following denaturation of the IBs in 7mol/L guanidine hydrochloride. The specific activities of IL2 and IL6 assayed by CTLL-2 and 7TD1 cell line were  $2.2 \times 10^6$ U/mg and  $2.3 \times 10^8$ U/mg, respectively, following renaturation. The renatured CH925 was chromatographed through DEAE-Sephacryl column and Sephacryl column. The active fractions were pooled and applied to HPLC with reversed-phase C-18 column, while CH925 was eluted through 10%—70% acetonitrile gradient. It showed only one protein peak and SDS-PAGE confirmed that the purified CH925 was almost homogeneous.

**Key words** fusion protein IL6/IL2. denaturation. renaturation. protein purification

**Effects of C-17 Deletion in the Spacer on the Strength of  $\beta$ -Lactamase Gene Promoter.** Sun Naien. Wang Yan. Xie Wei. Zhu Dexu. (*National Laboratory of Medicine Biotechnology, Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 436—439

The C : G base-pair at position -17 in the spacer of  $\beta$ -lactamase gene promoter was removed by restriction with BspH I. partial filling-in with Klenow fragment, and trimming with mung bean nuclease. The  $\beta$ -lactamase activities of both bacteria harboring the wild-