

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.05.004

ANGPT1、ANGPT2、VEGF 在急性髓系白血病小鼠模型中的表达研究*

杨红¹, 田凤瑛², 周泽平¹, 邵亮³, 张铀^{1△}

(1. 昆明医科大学第二附属医院血液科, 昆明 650101; 2. 云南省昆明市延安医院儿科 650051; 3. 武汉大学中南医院血液科, 武汉 430071)

摘要:目的 通过构建急性髓系白血病(AML)小鼠模型,从 mRNA 水平研究促血管生成素(ANGPT)1、ANGPT2、血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平与急性髓系白血病的关系。方法 NOD/SCID 小鼠腹腔接种 HL-60 细胞,建立 AML 小鼠模型,称模型组,未经处理的 NOD/SCID 小鼠作对照组。用病理组织学及流式细胞学方法鉴定小鼠模型是否成功。实时荧光定量 PCR (RQ-PCR)技术检测 ANGPT2、ANGPT1 及 VEGF mRNA 在 AML 小鼠肿瘤组织中的表达水平。应用 Spearman 相关分析法分析 ANGPT2 mRNA 表达水平与小鼠生存期的关系。结果 成功构建 AML 小鼠模型。RQ-PCR 结果显示模型组肿瘤组织的 ANGPT2、VEGF mRNA 的表达水平较正常对照组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 ANGPT1 mRNA 的表达水平两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。ANGPT2 mRNA 表达水平与 AML 小鼠生存期呈负相关。结论 ANGPT2 mRNA 在 AML 小鼠中高表达且与 AML 小鼠生存期呈负相关,ANGPT2 表达与 AML 病情进展及预后相关。

关键词:急性髓系白血病;小鼠模型;促血管生成素;血管内皮生长因子

中图分类号:R733.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)05-0586-04

A study of the expression of ANGPT1, ANGPT2 and VEGF in mouse model of acute myeloid Leukemia*

Yang Hong¹, Tian Fengying², Zhou Zeping¹, Shao Liang³, Zhang You^{1△}

(1. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China; 2. Department of Pediatrics, Kunming Yan'an Hospital, Kunming, Yunnan 650051, China; 3. Department of Hematology, the Affiliated Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To construct mouse model of acute myeloid leukemia and detect the expression of ANGPT1, ANGPT2 and VEGF gene on the cells its as well as the clinical significance. Methods The HL-60 cells were transfected to NOD/SCID mouse through abdominal injection to construct mouse model of acute myeloid leukemia. Then identify mouse model by histopathology and Flow Cytometry. The expression of ANGPT2, ANGPT1 and VEGF mRNA in the tumor tissues of mouse model was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of ANGPT2 will be analyzed on the survival time of mouse model by Spearman's correlation method. Results Mouse model has been successfully identified by histopathology and Flow Cytometry. The expression of ANGPT2 and VEGF in mouse mode was significantly detected, which was that of higher than normal group ($P < 0.05$). The expression of ANGPT1 was lower than that of ANGPT2 and VEGF, there was no significant difference between ANGPT1 and normal groups ($P > 0.05$). The higher expression of ANGPT2 in mouse model had a short survival time in mouse with acute myeloid leukemia. Conclusion This study showed that ANGPT2 mRNA was over-expressed in acute myeloid leukemia. The increasing expression of ANGPT2 mRNA may lead to poor prognosis in mouse with acute myeloid leukemia.

Key words: acute myeloid leukemia; mouse model; ANGPT; vascular endothelial growth factor

急性髓系白血病(AML)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一。目前尚缺乏疗效好且不良反应小的治疗方案。研究发现,血管增生在 AML 的致病机理中发挥重要作用,其中促血管生成素-酪氨酸激酶受体(ANGPT-TIE)通路是主要的血管增生信号通路之一。研究发现,ANGPT2 在实体瘤组织和血液系统肿瘤患者外周血中高表达。目前发现 ANGPT2 与 AML 的预后密切相关。本研究通过构建急性髓系白血病小鼠模型,从 mRNA 水平研究 ANGPT1、ANGPT2、血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平与 AML 的关系,探讨 ANGPT2 对 AML 预后的影响,为靶向 ANGPT2 治疗 AML 提供理论及实验基础。

1 材料与方

1.1 动物、细胞与材料 NOD/SCID 小鼠购自北京维通利华

实验动物技术有限公司,雄性,周龄 3 周(<5 周),体质量约 5 g 左右,饲养于昆明医科大学 SPF 级实验动物实验室。HL-60 细胞全称为 HL-60 人骨髓细胞白血病细胞,购自中国科学院上海细胞库。主要实验试剂有 IMDM 培养基和胎牛血清购自上海哈灵生物科技有限公司,总 RNA 提取试剂盒、Quantitect SYBR Green PCR 试剂盒、PrimeScript™ RT Master Mix 购自 TaKaRa 公司,其他试剂为市售分析纯。PCR 引物序列由上海生工生物技术服务有限公司设计及合成。

1.2 方法

1.2.1 HL-60 细胞的培养 细胞用 10% 小牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素、RPMI-1640 培养液,置 25 cm² 塑料培养瓶内,每瓶培养基的体积为 8 mL;培养条件 37 ℃,饱和湿度,5% CO₂,取对数生长期 HL-60 细胞进行

* 基金项目:云南省应用基础研究计划项目-联合专项(2011FB198)。作者简介:杨红(1977—),主治医师,硕士,主要从事血液系统疾病的临床研究。△ 通讯作者,E-mail:youzhangmd@aliyun.com。

实验。

1.2.2 AML 小鼠模型的构建 取传代后处于对数生长期的 HL-60 细胞株,在倒置显微镜下用细胞计数板进行计数,将 1×10^7 个细胞在已局部消毒的 NOD/SCID 小鼠的左下腹进行腹腔接种。

1.2.3 急性髓系白血病 NOD/SCID 小鼠模型的鉴定

1.2.3.1 观察 NOD/SCID 小鼠的一般情况 动态观察小鼠精神、食欲、体质量、活动能力、毛发情况、腹腔积液、皮下肿瘤大小、生存时间等情况。

1.2.3.2 流式细胞分析检测骨髓细胞 CD33 阳性率 髓系细胞表面抗原 CD33 在人白血病细胞系 HL-60 上表达的阳性率可达 99%。将濒临死亡的小鼠脱颈椎处死,小鼠置于 75% 乙醇中浸泡 5~10 min,分离胫骨、股骨,将分离好的胫骨、股骨放入装有 PBS 的培养皿,剪断干骺端后用 1 mL 注射器吸取少许 PBS 反复冲洗骨髓腔,装入有 EDTA 抗凝剂的离心管中,经 PBS 洗 2 次后,加入抗人 CD45 和 CD33 抗体同时加入小鼠血清,4 °C 避光染色 30 min,再经 PBS 洗 2 次,流式细胞仪检测, Midfilt 软件分析细胞分布。

1.2.3.3 病理学检查 取濒死小鼠及死亡小鼠的实体瘤、肝、脾、肺、脑等脏器用 10% 甲醛固定后,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察形态学改变,以明确小鼠的死亡原因。

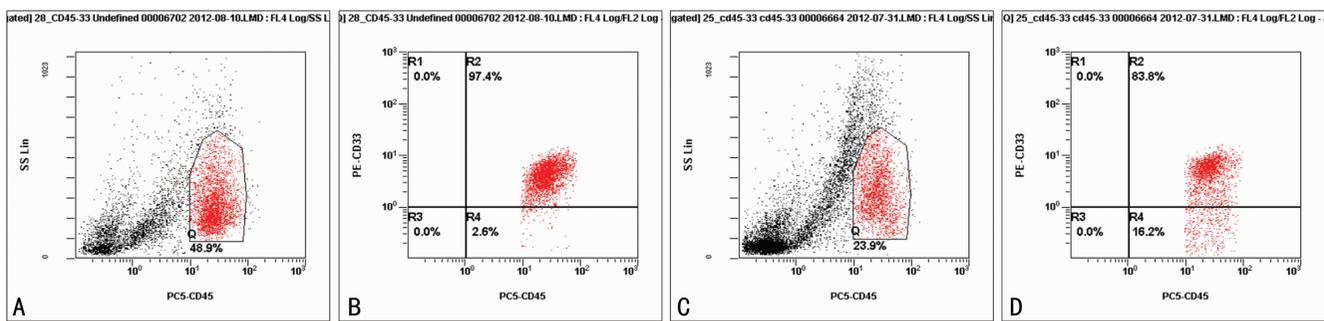
1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR,RQ-PCR)检测 AML 小鼠肿瘤组织中 ANGPT2、ANGPT1 以及 VEGF mRNA 的表达水平 采用 Promega 公司 SV 总 RNA 分离纯化试剂盒提取 RNA,紫外分光光度计评价所提取 RNA 的浓度和纯度(A260/A280 > 1.8)。采用 Prime-Script™ RT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒逆转录 cDNA。利用 Primer 软件设计扩增引物,由上海生工生物技术服务有限公司设计及合成,具体序列如下。ANGPT1 基因,上

游引物:5'-TGC ACT AAA GAA GGT GTT TTG CT-3',下游引物:5'-CCG GTG TTG TAT TAC TGT CCA A-3',片段大小 197 bp; ANGPT2 基因,上游引物:5'-CCT CGA CTA CGA CGA CTC AGT-3',下游引物:5'-TCT GCA CCA CAT TCT GTT GGA-3',片段大小 146 bp; VEGF 基因,上游引物:5'-GCA CAT AGA GAG AAT GAG CTT CC-3',下游引物:5'-CTC CGC TCT GAA CAA GGC T-3',片段大小 105 bp; β -actin 基因,上游引物:5'-TGC CAT CCT AAA AGC CAC-3',下游引物:5'-TCA ACT GGT CTC AAG TCA GTG-3',片段大小 289 bp。RQ-PCR 反应按 QIAGEN 公司 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒说明书进行。总反应体系为 20.0 μ L。2 \times SYBR Primix Ex Taq™ 10.0 μ L,上游及下游引物各 1.0 μ L,cDNA 2.0 μ L,H₂O 6.0 μ L。反应条件如下:94 °C 预变性 3 min;95 °C 15 s,55 °C 20 s,72 °C 30 s,44 个循环。扩增产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,确定产物特异性。根据目的基因对比标准品的 RQ 值作为 ANGPT1、ANGPT2、VEGF mRNA 相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用秩和检验(Wilcoxon test),相关性分析采用 Spearman 相关分析法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

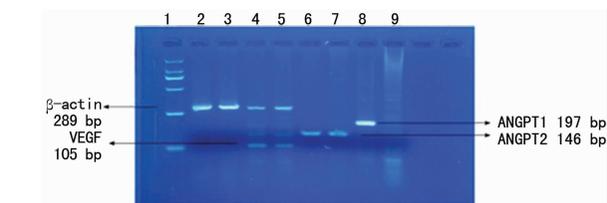
2 结 果

2.1 成功构建 AML 小鼠模型 腹腔接种 HL-60 细胞后约 20~33 d 左右 10 只小鼠均有不同程度发病,小鼠出现精神状态差、活动减少、嗜睡、步态不稳、行动迟缓、进食减少、体质量不增或下降。通过病理学检查发现小鼠的肝、脾、肺、脑、肾等全身重要脏器均有肿瘤细胞的广泛浸润,其小血管内亦可见大量的肿瘤细胞浸润。流式细胞仪检测,结果显示 CD33 在小鼠骨髓中高表达,表达率为 30.0%~97.4%,见图 1。



A,C:CD45/SSC 射门;B,D:CD33 表达量。

图 1 流式细胞术检测小鼠骨髓 CD33 表达



1:DNA 分子标记物(DL2000);2:正常组织内参 β -actin 基因;3:肿瘤组织内参 β -actin;4:正常组织 VEGF 基因;5:肿瘤组织 VEGF 基因;6:正常组织 ANGPT2 基因;7:肿瘤组织 ANGPT2 基因;8:正常组织 ANGPT1 基因;9:肿瘤组织 ANGPT1 基因。

图 2 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 ANGPT1、ANGPT2、VEGF mRNA 表达水平 取 10 例

经鉴定成功建模的小鼠的肿瘤组织为模型组,10 例未经任何处理的小鼠为对照组,RQ-PCR 法检测 ANGPT1、ANGPT2 及 VEGF mRNA 表达水平。ANGPT2、VEGF 和 β -actin 基因扩增产物溶解曲线分析显示,溶解浓度均一,可排除非特异性扩增。目的和内参基因 PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳可见,ANGPT1 靠近 197 bp 处,ANGPT2 靠近 146 bp 处,VEGF 靠近 105 bp 处,且条带致密、明亮,无引物二聚体和非特异性扩增,说明扩增产物正确,引物特异性好,见图 2。

2.3 ANGPT1、ANGPT2、VEGF mRNA 在模型组和对照组中的表达 ANGPT1 去掉一个异常值 13.642,进行统计学分析。结果显示模型组与正常组比较,ANGPT1 mRNA 表达差异无统计学意义,而两组间 ANGPT2 及 VEGF mRNA 的差异

均有统计学差异,模型组明显高于正常组($P < 0.05$),结果见图 3。

2.4 ANGPT2 mRNA 表达量与小鼠生存期的相关性分析
研究结果显示小鼠生存期为(38.6 ± 4.1)d,而 ANGPT2 的

mRNA 表达量为 46.963 ± 25.742 3。为了进一步明确二者之间是否存在关系,采用 Spearman 相关分析,结果显示 ANGPT2 基因 mRNA 表达量与小鼠生存期呈负相关关系($P < 0.01, r = -0.997$),见图 4。

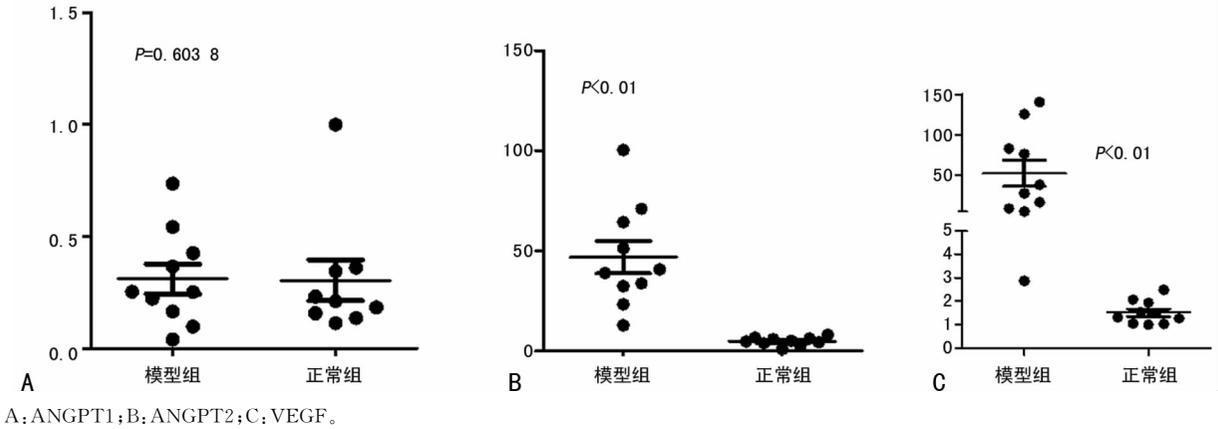


图 3 ANGPT1、ANGPT2、VEGF mRNA 在两组中的相对表达量

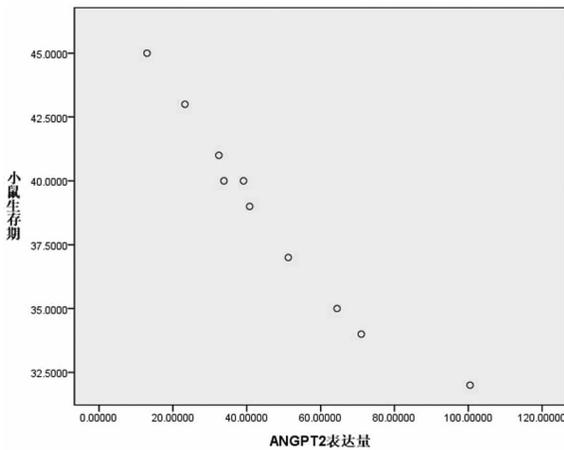


图 4 ANGPT2 mRNA 表达量与小鼠生存期的相关分析图

3 讨论

ANGPT 是血管生成的一类因子,是一个家族体系。ANGPT 家族与 VEGF 在血管的增生、稳定以及退化中具有协同作用,促进肿瘤性新生血管的形成,并在肿瘤的生长、侵袭、转移中发挥重要作用^[1]。近年研究逐渐发现血管新生的程度可以成为预测肿瘤预后的一项重要指标。血管新生指的是在原有血管的基础上形成新的毛细血管网,即内皮细胞增殖、迁移和毛细血管形成的过程。Padro 等^[2]研究发现新确诊的 AML 患者的微血管密度(microvessel density, MVD)是正常对照组的 2 倍,经过化疗达完全缓解且骨髓处于抑制期时骨髓微血管密度下降了 60%,而未达到完全缓解者仅下降了 17%。对于完全缓解的骨髓与正常对照组 MVD 无显著差异。表明血管新生在 AML 的发病机制中可能起着重要的作用,而 MVD 的增高通常伴随来源于白血病细胞的血管生长因子的分泌,其中最重要的是 ANGPTs 及 VEGF^[3]。Muller 等^[4]、Tarai 等^[5]发现与正常对照组比较,新确诊的和复发的 AML 患者中 ANGPT1、ANGPT2 有较高的阳性表达率,并且与幼稚细胞的数量呈正相关。Schliemann 等^[6]用免疫组织化学法分析了 AML 患者骨髓活检标本的 ANGPT1、ANGPT2、TIE2 的表达情况,

证实了 ANGPT2 在 AML 患者的骨髓中高表达,而 ANGPT1 与正常对照组无显著差异,进一步证明了 ANGPT2 与 AML 的预后呈负相关。Schliemann 等^[7]用 ELISA 检测 68 例新确诊 AML 患者血浆中 ANGPT2 水平,发现高水平 ANGPT2 者预后不良。

目前临床实验中大多仅限于用 AML 患者的骨髓和外周血等进行相关检测,大量的研究只是证实了 ANGPT2 在 AML 的骨髓、外周血及血浆中高表达且与 AML 患者的预后呈负相关,但是还没有用 ANGPT2 的特异性单克隆抗体进行临床治疗的报道,并且其相关的实验动物模型研究也很少。

本研究采用 NOD/SCID 小鼠成功构建 AML 模型,并利用 RQ-PCR 检测建模成功的 AML 小鼠的肿瘤组织,研究发现 ANGPT2、VEGF mRNA 的表达水平较对照组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 ANGPT1 mRNA 的表达水平与对照组无显著差异($P > 0.05$),这与文献^[4-6]临床研究的结果一致,提示 ANGPT2 mRNA 高表达在 AML 的发病中有重要意义。在研究中同时还发现,高表达 ANGPT2 的小鼠其生存期比 ANGPT2 表达低的小鼠短,采用 Spearman 相关分析显示 ANGPT2 基因 mRNA 表达量与小鼠生存期有高度的相关关系,且为负相关,由此可推论出高表达的 ANGPT2 与 AML 的预后呈负相关,高表达 ANGPT2 的 AML 预后不良。

针对 ANGPT2 的研究在实体瘤中也有大量的报道,研究发现 ANGPT2 高表达与大肠癌^[8]、鼻咽癌^[9]、胃癌^[10]等多种实体瘤侵袭转移及预后相关。但目前研究的热点是靶向治疗且已取得了初步结果。Hashizume 等^[11]应用 ANGPT2 选择性地抑制性 L₁~L₇ 融合蛋白治疗人结肠癌异体移植的小鼠模型,发现该方法能有效抑制肿瘤生长和血管增生,当与抗 VEGF 合用时其作用更为明显。有学者^[12-13]应用 3.19.3 单克隆 ANGPT2 抗体,有效地抑制了侵袭性的 MMTV-PyMT 乳腺癌和胰腺腺癌瘤的血管增生和疾病进展,局部性地降低了巨噬细胞(TIE-2-expressing macrophages, TEMs)的 TIE2 的表达,也有效降低了肿瘤的血管增生。

本研究成功建立了 AML NOD/SCID 小鼠模型,并在 mRNA 水平利用特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确的 RQ-PCR 进行了 ANGPT2、VEGF 及 ANGPT1 基因的相关检测,

发现 ANGPT2、VEGF mRNA 的表达水平较正常组显著增高,而 ANGPT1 mRNA 的表达水平与正常组无显著差异,且高表达 ANGPT2 的小鼠其生存期比 ANGPT2 表达低的小鼠短,说明了高表达的 ANGPT2 与 AML 的预后呈负相关。作为 ANGPT2 靶向治疗的前期试验,这对于下一步的分子靶向治疗研究奠定了良好的实验及理论基础。接下来需要在 AML 小鼠模型的基础上进一步深入研究用特异性的 ANGPT2 单克隆抗体治疗 AML 小鼠,观察小鼠的生存期及肿瘤生长情况,同时还需进一步探讨 VEGF 抗体与 ANGPT2 抗体在 AML 中的协同治疗效果,为临床靶向 ANGPT2 治疗 AML 奠定坚实的理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(7):655-665.
- [2] Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2000, 95(8):2637-2644.
- [3] Fiedler W, Schuch G, Loges S, et al. Prognostic implication of expression of angiopoietin-2 in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(6):843-844.
- [4] Muller A, Lange K, Gaiser T, et al. Expression of angiopoietin-1 and its receptor TEK in hematopoietic cells from patients with myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2002, 26(2):163-168.
- [5] Tarai M, Miwa H, Shikami M, et al. Expression of endothelial cell associated molecules in AML cells[J]. *Leukemia*, 2002, 16(1):112-119.
- [6] Schliemann C, Bieker R, padro T, et al. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2006, 91(9):1203-1211.
- [7] Schliemann C, Bieker R, Thoennissen N, et al. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2007, 21(9):1901-1906.
- [8] 刘新兰, 李亦功, 魏健敏, 等. Ang-2, Tie-2 和 VEGFR-2 表达在大肠癌血管生成和预后中的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(11):1658-1662.
- [9] 赵萍萍, 皱容, 屈元娇, 等. Ang-1 和 Ang-2 及其受体 Tie-2 在鼻咽癌患者血循环中的表达及临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(13):1289-1292.
- [10] 刘少平, 董卫国, 胡钦勇, 等. 外周血管生成素-2 表达与胃癌淋巴结微转移及预后的关系[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2013, 34(2):285-292.
- [11] Hashizume H, Falcón BL, Kuroda T, et al. Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6):2213-2223.
- [12] Mazzieri R, Pucci F, Moi D, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells[J]. *Cancer cell*, 2011, 19(4):512-526.
- [13] Lewis CE, Ferrara N. Multiple effects of angiopoietin-2 blockade on tumors[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4):431-433.
- [14] 王超, 杨智勇, 路华, 等. Toll 样受体 4 信号通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的机制研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(1):25-28.
- [15] Yu JM, Mo YC, Liang DD, et al. Effects of nimodipine on rabbits with symptomatic cerebral vasospasm[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, 91(5):345-349.
- [16] Titova E, Ostrowski RP, Zhang JH, et al. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(6):568-581.
- [17] 易帅, 霍晓川, 甄为, 等. Toll 样受体 4 拮抗剂防治兔蛛网膜下腔出血后迟发型血管痉挛[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(2):157-160.
- [18] Frazão JB, Errante PR, Condino-Neto A. Toll-Like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans[J]. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)*, 2013, 61(6):427-443.
- [19] Shao Z, Li J, Zhao Z, et al. Effects of tetramethylpyrazine on nitric oxide/cGMP signaling after cerebral vasospasm in rabbits[J]. *Brain Res*, 2010, 1361:67-75.
- [20] Shibuya M, Asano T, Sasaki Y. Effect of Fasudil HCl, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2001, 77:201-204.
- [21] Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase(ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection[J]. *Stroke*, 2005, 36(10):2251-2257.
- [22] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2002, 80(10):629-638.
- [23] Carr KR, Zuckerman SL, Mocco J. Inflammation, cerebral vasospasm, and evolving theories of delayed cerebral ischemia[J]. *Neurol Res Int*, 2013, 2013:506584.
- [24] Chen Q, Gupta S, Pernis AB. Regulation of TLR4-mediated signaling by IBP/Def6, a novel activator of Rho GTPases[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(3):539-543.
- [25] Aminmansour B, Ghorbani A, Sharifi D, et al. Cerebral vasospasm following traumatic subarachnoid hemorrhage[J]. *J Res Med Sci*, 2009, 14(6):343-348.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2014-12-10)

(收稿日期:2014-10-18 修回日期:2014-12-10)

(上接第 585 页)