

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.008

# 体外共培养体系中胆管癌细胞对人脐静脉内皮细胞 b-FGF 和 VEGF 表达的影响\*

李 薇, 杨 芸, 宋富强, 冯亚星, 李 昆<sup>△</sup>

(成都军区总医院临床实验医学研究与保障中心, 成都 610083)

**[摘要]** **目的** 探讨体外共培养体系中胆管癌细胞(QBC939)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 建立胆管癌 QBC939 细胞与 HUVEC 体外共培养体系,采用 CCK-8 法检测共培养不同时相 HUVEC 的增殖;ELISA 检测共培养上清液中 b-FGF 含量;qRT-PCR 和 Western blot 检测共培养不同时相 HUVEC 细胞 VEGF mRNA 和蛋白质的表达。**结果** 共培养后 12、24、48 h 和 72 h, HUVEC 增殖较对照组显著增高( $P < 0.01$ )。与 0 h 组比较,共培养 12、24、48 h 上清液中 b-FGF 含量显著增高( $P < 0.05$ )。共培养 12 h 时 VEGF mRNA 表达显著增加,并持续至 72 h( $P < 0.01$ ),VEGF 蛋白表达在共培养 12 h 后显著增高,24、48、72 h 时与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 人胆管癌 QBC939 细胞可促进血管内皮细胞增殖、增加 b-FGF 分泌和 VEGF 表达。b-FGF 和 VEGF 表达增加与肿瘤血管新生,以及肿瘤的生长和转移可能具有相关性。

**[关键词]** 胆管肿瘤;内皮细胞;脐静脉;血管内皮生长因子 A**[中图分类号]** R575.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1749-03

## Influence of cholangiocarcinoma cell lines on expression of b-FGF and VEGF in HUVEC in a co-culture system\*

Li Wei, Yang Yun, Song Fuqiang, Feng Yaxing, Li Kun<sup>△</sup>

(Center of Laboratory Medicine, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of cholangiocarcinoma cell lines on the expression of b-FGF and VEGF in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) in a co-culture system. **Methods** A co-culture system of cholangiocarcinoma cell lines QBC939 and HUVEC were established in vitro. QBC939 cells and HUVEC were co-cultured for 12, 24, 48 and 72 h respectively, the proliferation of HUVEC was detected by CCK-8 assay. The b-FGF level in cell culture supernatant was detected by ELISA assay. The mRNA and protein expression levels of VEGF were detected by qRT-PCR and Western blot analysis. **Results** The proliferation of HUVEC was significantly increased at 12, 24, 48 and 72 h after incubation in a co-culture system ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression level of VEGF in HUVEC was gradually increased after 12 h incubation with a time-dependent manner. It showed that the protein level of b-FGF and VEGF was also significantly increased at 12, 24, 48 h after incubation as compared to the control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Human cholangiocarcinoma cells can promote the proliferation of endothelial cells, increase the secretion of b-FGF and upregulate the expression of VEGF, suggesting that the expressions of b-FGF and VEGF may be correlated with the tumor angiogenesis.

**[Key words]** bile duct neoplasms; endothelial cells; umbilical veins; vascular endothelial growth factor A

胆管癌是来源于肝内或肝外胆管上皮的恶性肿瘤,早期临床症状不典型,易向周围组织、血管和神经浸润<sup>[1]</sup>。肿瘤内部血管生成对肿瘤生长、转移具有重要作用,肿瘤血管的生成涉及多种促血管生成因子,其中碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最强有力的血管生成因子。研究表明肿瘤细胞与正常内皮细胞共培养体系能够在体外有效诱导正常内皮细胞的瘤化发展及血管新生。本研究通过建立体外胆管癌细胞 QBC939 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)共培养体系,观察共培养时 HUVEC 细胞增殖,以及 b-FGF 分泌和 VEGF 表达的变化,探讨胆管癌细胞对正常内皮细胞功能的影响。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人胆管癌细胞株 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光教授惠赠;HUVEC 购于武汉大学典型物种保存中心。胎牛血清、DMEM 培养基、双抗(penicillin/streptomycin)、

0.25% 胰蛋白酶购于 HyClone 公司;TRIzol 试剂(R0016)、CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;人 VEGF 抗体(AB52916)购于 Abcam 公司,免疫印迹试剂盒(KC-5G5)购于康成生物公司;一步法实时定量 PCR 试剂盒(DRR086A)购自 TAKARA 公司;ELISA 试剂盒(DFB50)购于 R&D 公司。美国 Thermo 3111 二氧化碳孵箱、日本 Olympus CKX41-A32PH 倒置显微镜,美国 Thermo Multiskan GO 全自动酶标仪、美国 UVP BioSpectrum410 化学发光凝胶成像系统、美国 BIO-RAD CFX96 型实时定量 PCR 仪等。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞共培养** 取对数生长期的 QBC939 细胞置于 24 孔 Transwell 共培养系统下室, HUVEC 加入共培养系统上室, QBC939 细胞和 HUVEC 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基共培养,细胞初始浓度比为 2:1。同时另外单独培养 QBC939 和 HUVEC 细胞于共培养系统的下室和上室,上、下室为相同培养基。以共培养 0 h 为对照组,共培养 12、24、48

\* 基金项目:四川省卫生厅科学研究项目(100091)。 作者简介:李薇(1986-),硕士,主管技师,主要从事细胞生物学方面的研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: kunli2005@sina.com。

和 72 h 时,分别检测培养上清液 b-FGF 的分泌,各组 HUVEC 细胞增殖,以及 VEGF mRNA 和蛋白质的表达。

**1.2.2 CCK-8 比色法检测 HUVEC 增殖** 取 HUVEC 按  $1 \times 10^3$  加入 96 孔 Transwell 共培养系统的上室,QBC939 细胞接种于共培养系统的下室,QBC939 细胞和 HUVEC 共培养细胞浓度比例为 2:1,同时按相同浓度接种 HUVEC 单独培养于上室,每孔加入 DMEM 培养液  $100 \mu\text{L}$ ,CCK-8  $10 \mu\text{L}$ ,于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱中分别共培养 0 h 和 12、24、48、72 h,酶标仪上选定 450 nm 为测定波长,630 nm 为参考波长,检测每孔光密度值(OD 值),以共培养各时相 OD 值减去相应单独培养 HUVEC 的 OD 值,得出共培养 QBC939 对 HUVEC 增值的影响。

**1.2.3 ELISA 检测共培养上清液中 b-FGF** 取  $100 \mu\text{L}$  收集的上清液,检测步骤按试剂盒说明书进行,显色后酶标仪 450 nm 测 OD 值,共培养各时相 OD 值减去相应单独培养 QBC939 和 HUVEC 各组的 OD 值,根据绘制的标准曲线求出 b-FGF 含量。

**1.2.4 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 VEGF-mRNA** VEGF 扩增引物(540 bp):上游  $5'$ -GGA GTA CCC TGA TGA GAT CGA G- $3'$ ;下游  $5'$ -CAT TTG TTG TGC TGT AGG AAG C- $3'$ 。内参 GAPDH 扩增引物(715bp):上游  $5'$ -CAA ATT CCA TGG CAC CGT CA- $3'$ ;下游  $5'$ -GGA GTG GGT GTC GCT GTT GA- $3'$ 均由上海生物工程有限公司合成。Trizol 法提取 RNA,取 40 ng RNA 行 qRT-PCR 扩增,步骤按试剂盒说明书进行。共培养各时相 mRNA 的相对表达量减去相应单独培养 HUVEC 各组 mRNA 的相对表达量,得出共培养 QBC939 对 HUVEC VEGF-mRNA 表达的影响。

**1.2.5 Western blot 检测 VEGF 蛋白表达** 常规提取蛋白质,BCA 法定量,取  $50 \mu\text{g}$  样品加入  $5 \times \text{SDS-PAGE}$  样品缓冲液,沸水煮 5 min,行 SDS-PAGE 蛋白电泳,内参为 GAPDH。其后转移至 PVDF 膜,按免疫印迹试剂盒说明书操作,化学发光凝胶成像系统检测 VEGF 表达量。共培养各时相蛋白的相对表达量减去相应单独培养 HUVEC 各组蛋白相对表达量,得出共培养 QBC939 对 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白表达的影响。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

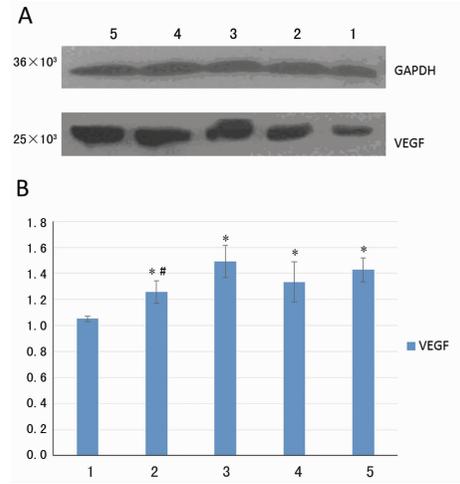
## 2 结果

**2.1 CCK-8 法检测 QBC939 和 HUVEC 共培养对 HUVEC 细胞增殖的影响** 共培养 12、24、48 h 和 72 h 时,HUVEC 增殖较对照组显著增加( $P < 0.01$ )。共培养 72 h HUVEC 细胞增殖能力较 12 h 显著增加( $P < 0.01$ ),和 24、48 h 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 共培养不同时间 b-FGF 的分泌变化** 共培养 0、12、24、48、72 h,b-FGF 分别为  $0.6653 \pm 0.0708$ 、 $0.8148 \pm 0.0617$ 、 $0.8066 \pm 0.0631$ 、 $0.8002 \pm 0.0343$ 、 $0.7004 \pm 0.0925$ 。与 0 h 组比较,共培养 12、24、48 h 时 HUVEC 细胞 b-FGF 显著增加( $P < 0.05$ );72 h 时 b-FGF 较 0 h 有所增加,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 共培养不同时间 HUVEC 的 VEGF mRNA 及蛋白表达变化** 共培养 0、12、24、48、72 h,VEGF mRNA 分别为  $1.0000 \pm 0.1776$ 、 $1.2586 \pm 0.0869$ 、 $1.4922 \pm 0.1247$ 、 $1.6112 \pm 0.0799$ 、 $1.7195 \pm 0.0993$ 。共培养 12 h 时 HUVEC 的 VEGF mRNA 表达升高,持续至 72 h( $P < 0.01$ );共培养 72 h 和 12、24 h 比较显著增高( $P < 0.01$ ),和 48 h 比较有所

增高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。VEGF 蛋白表达在共培养 12 h 时亦显著升高,持续至 72 h( $P < 0.01$ );共培养 72 h 较 12 h 时显著增高( $P < 0.01$ ),和 24、48 h 比较有所增高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 1)。



\*:  $P < 0.01$ ,与共培养 0 h 组比较;#:  $P < 0.01$ ,与共培养 72 h 组比较。1:共培养 0 h 组;2:共培养 12 h 组;3:共培养 24 h 组;4:共培养 48 h 组;5:共培养 72 h 组。

图 1 共培养不同时间 HUVEC 的 VEGF 蛋白表达

## 3 讨论

肿瘤微环境中各类细胞相互接触、相互依存、相互作用,共同维持着肿瘤的各种特性。血管新生是肿瘤生长和转移的重要病理基础和条件<sup>[2-3]</sup>。肿瘤细胞和周边宿主细胞分泌表达多种细胞因子,这些因子所形成的微环境有利于新生血管的生成,其中 b-FGF 和 VEGF 是最重要的血管生成因子,对内皮细胞具有高度特异性。研究显示<sup>[4-6]</sup>,肿瘤细胞的条件培养液可刺激血管内皮细胞的增殖,增加黏附力和侵袭力,促进血管形成。本研究采用共培养方式,观察胆管癌细胞株 QBC939 对 HUVEC 增殖及促血管生成因子分泌的影响,结果表明体外共培养胆管癌细胞和 HUVEC,可促进 HUVEC 的增殖及 b-FGF 分泌与 VEGF 的表达增加。

b-FGF 是 FGF 家族中的重要成员,诱导内皮细胞萌芽、增殖,增加血管通透性,促进血管新生<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup>证实,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是 b-FGF 和 VEGF 共同信号通路中的一个重要信号蛋白,通过激活 MAPK 可促使内皮细胞间的连接和增殖。早在 1998 年,Seghezzi 等<sup>[9]</sup>就提出 b-FGF 主要通过细胞的自分泌机制上调 VEGF 在内皮细胞中的表达。随后的研究发现,b-FGF 可通过刺激 VEGF 的表达及肿瘤血管内皮细胞的增殖作用激活血管新生<sup>[10]</sup>。bFGF 通过与靶细胞上的受体结合而发生作用,因此细胞内合成的 b-FGF 须分泌到细胞外才能发挥其生物学功能。本实验结果中,b-FGF 的分泌在共培养 12 h 即显著升高,24、48 h 亦显著高于对照组;VEGF mRNA 和蛋白的表达在共培养各时相点均较对照组显著升高。VEGF 能特异性促进血管内皮细胞分裂增殖,同时增加血管通透性,使血管内成分渗漏,为血管内皮的迁移及血管形成提供基质。本研究共培养 72 h 时,HUVEC 增殖虽显著高于对照组和 12 h 组,但较 24、48 h 时差异无统计学意义;共培养 72 h 时,b-FGF 分泌较对照组差异不显著,而 VEGF 的表达显著高于对照组,推测可能与共培养 72 h 时 HUVEC 增殖减缓及细胞分泌 b-FGF 能力降低有关。此外,VEGF 的表达还可能受到其他因子的调

控<sup>[11-12]</sup>。

本研究表明,胆管癌细胞能促进血管内皮细胞的增殖,以及 b-FGF 分泌和 VEGF 表达,增强内皮细胞血管生成的能力,为肿瘤发生、发展和转移提供条件和环境。实验结果可为胆管癌治疗中抗血管生成积累资料,在此基础上,有待进一步研究其机制。

#### 参考文献

- [1] 汪华霖. 肝门部胆管癌的诊治进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(9):1072-1074.
- [2] Ribatti D, Moschetta M, Vacca A, et al. Microenvironment and multiple myeloma spread [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2):102-106.
- [3] Wahl ML, Moser TL, Pizzo SV. Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease [J]. *Endo Soci*, 2004(59):73-104.
- [4] Cao Y, E G, Wang EF, et al. VEGF Exerts an Angiogenesis-Independent function in cancer cells to promote their malignant progression [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16):3912-3918.
- [5] Chaitanya GV, Cromer WE, Wells SR, et al. Gliovascular and cytokine interactions modulate brain endothelial barrier in vitro [J]. *J Neuro inflammation*, 2011, 8(1):162-178.
- [6] Gavalas NG, Liontos M, Trachana SP, et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8):15885-15909.

(上接第 1748 页)

无显著性差异,表明在该辐射条件(30、60、90 mW/cm<sup>2</sup>, 5 min)下,辐射大鼠垂体分泌 FSH 的能力并未受到明显影响。造成这一结果可能的原因为:(1)其功能虽有轻微改变,但在辐射后 24 h 内恢复正常;(2)由于辐射大鼠 INHB 下降,腺垂体分泌 FSH 功能部分受损,仍能代偿性分泌 FSH。INHB 浓度结果表明,当辐射剂量小于 60 mW/cm<sup>2</sup> 时,短期的全身微波辐射并未对血浆抑制素浓度产生明显影响,间接反映了睾丸支持细胞分泌 INHB 能力未受损。只有当辐射剂量增加到一定程度时(90 mW/cm<sup>2</sup>),睾丸支持细胞的分泌功能才收到明显抑制。

关于电磁辐射引起损伤的具体机制,至今仍未达成共识。细胞膜氧化酶体系的活化、DNA 损伤<sup>[12]</sup>、细胞凋亡增加等多种机制均曾被提及,但这些机制均不能完全解释同种细胞或组织的所有病理改变。故辐射对机体的损伤很可能是通过多种机制共同作用的。近年来,随着移动电话的普及及使用,通过手机辐射或模拟手机辐射对大鼠、细胞等进行辐射研究,以期找出微波辐射对机体损伤的具体机制。截至目前,氧化应激被认为是电磁辐射引起机体损伤的最重要机制,许多研究都正围绕这一内容开展,未来可能解开电磁辐射是怎样影响人体生理功能的这一谜题。

#### 参考文献

- [1] 闫蓓,袁伟,高尔生,等. 电磁辐射对男性生殖功能影响的研究现状[J]. *环境与职业医学*, 2007, 24(4):423-425.
- [2] 尉春华,杨瑛,李东红,等. 高功率微波辐射对大鼠睾丸生殖细胞凋亡的影响[J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(4):312-314.
- [3] 吴惠,王德水,王水明,等. 不同波段电磁辐射致大鼠睾丸

- [7] Fontijn D, Bosch LJ, Duyndam MC, et al. Basic fibroblast growth factor-mediated overexpression of vascular endothelial growth factor in 1F6 human melanoma cells is regulated by activation of PI-3K and p38MAPK[J]. *Cell Oncol*, 2009, 31(3):179-190.
- [8] Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, et al. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways[J]. *FEBS Lett*, 2003, 536(1):19-24.
- [9] Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries; an autocrine mechanism contributing to angiogenesis [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(7):1659-1673.
- [10] Eichholz A, Merchant S, Gaya AM. Anti-angiogenesis therapies; their potential in cancer management[J]. *Onco Targets Ther*, 2010, 3(3):69-82.
- [11] Eveno C, Pocard M. VEGF levels and the angiogenic potential of the microenvironment can affect surgical strategy for colorectal liver metastasis [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(6):569-573.
- [12] Andreas P, Michael M, Joachim D. Liver cancer; Targeted future options[J]. *World J Hepatol*, 2011, 3(2):38-44.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-01-13)

支持细胞的损伤效应[J]. *生物物理学报*, 2011, 27(1):38-46.

- [4] 季惠翔,宋波,张家华,等. 微波照射后小鼠睾丸损伤及凋亡的研究[J]. *重庆医学*, 2009, 38(21):2680-2682.
- [5] 曹毅,童建. 电磁辐射生物效应研究综述[J]. *环境与职业医学*, 2007, 24(2):222-226.
- [6] Foster KR, Morrissey JJ. Thermal aspects of exposure to radiofrequency energy: report of a workshop [J]. *Int. J. Hyperthermia*, 2011, 27(4):307-319.
- [7] 高晓芳,王水明,彭瑞云,等. 微波辐射对大鼠睾丸闭锁蛋白和连接黏附分子-1 表达的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16(1):10-13.
- [8] 王水明,彭瑞云,高亚兵,等. 高功率微波辐射所致大鼠睾丸损伤的病理学研究[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(6):486-489.
- [9] 杨昊,陈斌. 抑制素 B 在男科学中的研究进展及应用[J]. *中华男科学杂志*, 2011, 25(1):69-71.
- [10] 刘琼珊,李长祺,林敏,等. 血清抑制素 B 在男性不育症诊断中的应用研究[J]. *福建医药杂志*, 2011, 33(5):5-6.
- [11] 李天泉,周明连,何浩明. 男性不育症患者血清 TNF- $\alpha$ 、T、FSH、PRL 检测的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2011, 24(4):392-394.
- [12] Lai H, Singh NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat[J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(6):687-694.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-02-08)