

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01060

• 论 著 •

抗肿瘤血管生成药 bevacizumab 对 VEGF 促人肝癌细胞株 HepG2 增殖的阻断作用

万 骋^{1,2}, 崔 斐¹, 陈 斌¹, 罗荣城^{1*}

1. 南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广州 510515
2. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008

[摘要] 目的: 观察 bevacizumab 对肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: 应用免疫细胞化学法和 RT-PCR 分别从蛋白和基因水平检测肝癌细胞株 HepG2 中血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 Flt-1、KDR 的表达; ELISA 检测 HepG2 培养上清液中 VEGF 蛋白的浓度; 人重组 VEGF(rhVEGF) 和 bevacizumab 分别处理 HepG2 细胞后, MTT 法检测细胞增殖活性, 应用 RT-PCR 和 Western 印迹分别从基因和蛋白水平检测 VEGF 表达量的变化。结果: HepG2 细胞中 VEGF、Flt-1 和 KDR 蛋白均呈阳性表达。rhVEGF 可促进 HepG2 细胞的增殖, 在 0~100 ng/ml 区间其促进增殖的作用呈剂量依赖性; 而 bevacizumab 可抑制 HepG2 细胞的增殖, 浓度为 0.1、1、10、20 μ g/ml 时细胞增殖抑制率分别为 (8.76% $\pm$ 1.15)%、(26.83 $\pm$ 1.20)%、(31.87 $\pm$ 1.30)%、(28.20 $\pm$ 1.28)%。rhVEGF 可促进 HepG2 细胞中 VEGF 的表达, 而 bevacizumab 能抑制 VEGF 的表达。结论: Bevacizumab 可能通过阻断 VEGF 的促增殖作用而抑制 HepG2 细胞增殖。

[关键词] 肝细胞癌; HepG2 细胞株; bevacizumab; 血管内皮生长因子类

[中图分类号] R 375.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1060-05

Antiangiogenesis agent bevacizumab blocks the promoting effect of vascular endothelial growth factor on proliferation of human hepatoma cell line HepG2

WAN Cheng^{1,2}, CUI Fei¹, CHEN Bin¹, LUO Rong-cheng^{1*}

1. Tumor Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
2. Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of bevacizumab on the proliferation of human hepatoma cell line HepG2. **Methods:** The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFRs) in HepG2 cells were examined by immunocytochemical staining and RT-PCR; ELISA was used to determine the level of VEGF in culture supernatants of HepG2 cells. The proliferation of HepG2 cells was analyzed by MTT assay after treatment with rhVEGF and bevacizumab separately; the expression of VEGF was examined by RT-PCR and Western blotting. **Results:** VEGF and VEGFRs (Flt-1 and KDR) were expressed in human HepG2 cells. rhVEGF increased the proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner within a concentration range of 0-100 ng/ml; bevacizumab inhibited the proliferation of HepG2 cells; the inhibition rates were (8.76% $\pm$ 1.15)%, (26.83 $\pm$ 1.20)%, (31.87 $\pm$ 1.30)% and (28.20 $\pm$ 1.28)%, when the concentrations of bevacizumab were 0.1, 1, 10, and 20 μ g/ml, respectively. Expression of VEGF in the HepG2 cells was increased by rhVEGF and inhibited by bevacizumab. **Conclusion:** Bevacizumab might inhibit the proliferation of HepG2 cells through blocking the effect of VEGF.

[KEY WORDS] hepatocellular carcinoma; HepG2 cell line; bevacizumab; vascular endothelial growth factors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1060-1064]

肝细胞癌(HCC)是预后最差的恶性肿瘤之一, 它是血管富集性的肿瘤, 其血管生成和转移密切相关^[1]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在肿瘤血管生成中起重要作用,

它是通过与血管内皮细胞上的特异性受体 VEGFR-1(Flt-1) 和 VEGFR-2(KDR) 结合, 刺激血管内皮细胞增殖, 从而促进血管生成^[2-3]。抗肿瘤血管生成药物 bevacizumab 是针对 VEGF 人工合成的

[收稿日期] 2008-03-25 [接受日期] 2008-05-29
[作者简介] 万 骋, 硕士. E-mail: wancheng126@yahoo. com. cn
* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 020-62787732, E-mail: lrc@nfhoc. com

一种重组人源化单克隆抗体,其主要通过抑制内皮细胞增殖发挥抑制肿瘤作用^[4-6]。而抗 VEGF 治疗对肿瘤细胞本身的作用却不很清楚。本研究通过观察 bevacizumab 对 HepG2 细胞增殖的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养基和小牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;mRNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;PV 二步法免疫细胞化学试剂盒购自北京中杉金桥公司;人 VEGF 检测试剂盒购自深圳晶美生物公司;兔抗人 VEGF、Flt-1、KDR 多抗及二抗 IgG-HRP 均购自美国 Santa Cruz 公司;一抗 β -actin 兔抗人单抗购自武汉博士德公司;MTT 为美国 Sigma 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。人重组 VEGF(rhVEGF)为美国 Peprotech 公司产品;bevacizumab(商品名:Avas-tin)购自美国 Roche 公司。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2、内皮细胞系 ECV304 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱培养,培养液加 1% 双抗(青霉素、链霉素),48~72 h 传代,传代前用 0.25% 胰蛋白酶消化。

1.3 免疫细胞化学分析 VEGF 及其受体表达 培养细胞爬片,待细胞生长至单层后冷丙酮固定。免疫细胞化学染色按 PV 二步法免疫组化试剂盒说明书进行。兔抗人 VEGF 多抗用 PBS 按 1:100 稀释,兔抗人 Flt-1、KDR 多抗均用 PBS 按 1:50 稀释,同时设 PBS 代替一抗为对照。阳性标准为细胞内出现棕黄色颗粒。

1.4 ELISA 法检测培养上清 VEGF 浓度 取对数生长期 HepG2 细胞接种于培养瓶,培养 24 h 细胞贴壁后改换无血清 RPMI 1640 培养基。继续培养细胞 48 h 后收集 5×10^6 个细胞培养液,4℃ 2 500×g 离心 30 min,取上清,-80℃ 冻存待用。上清液中 VEGF 蛋白浓度测定按照 VEGF 检测试剂盒进行,酶标仪 490 nm 处测光密度(D)值,根据标准品的 D 值求出标准曲线方程,并计算出细胞上清中 VEGF 浓度。实验重复 3 次。

1.5 MTT 法测定细胞增殖情况 为检测 rhVEGF 对 HepG2 细胞增殖的影响,取对数生长期的 HepG2 接种于 96 孔培养板中, 10^4 个/孔,培养 24 h 待细胞贴壁后改换无血清 RPMI 1640 培养基继续

培养 24 h,后加入 rhVEGF 使其终浓度分别为 12.5、25、50、100 ng/ml,每个浓度设 8 个复孔。继续孵育 72 h,MTT 检测细胞生长情况,于分光光度仪上读取 D 值(波长为 570 nm)。以浓度为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制效应曲线。

为检测 bevacizumab 对 HepG2 细胞增殖的影响,将 5×10^3 个/孔 HepG2 接种于 96 孔培养板中培养 24 h 后加入含 bevacizumab 的无血清培养基,使其终浓度分别为 0.1、1、10、20 μ g/ml,每个浓度设 8 个复孔,继续孵育 48 h 后行 MTT 检测。计算抑制率:抑制率 = (1 - 用药组 D 值/对照组 D 值) × 100%。以浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制效应曲线。以上实验均重复 3 次。

1.6 RT-PCR 测定 VEGF 及其受体基因的表达 将 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中, 5×10^5 个/孔。收集一部分对数生长期细胞行总 RNA 的提取以检测细胞中 VEGF、Flt-1、KDR mRNA 表达情况,以内皮细胞系 ECV304 为阳性对照。另以 100 ng/ml rhVEGF 和 10 μ g/ml bevacizumab 分别处理细胞,方法同前,二者均设 3 个复孔,以检测 rhVEGF 和 bevacizumab 对 VEGF mRNA 表达情况的影响,无血清 RPMI 1640 培养基作为空白对照。收集细胞,按照 RT-PCR 试剂盒操作步骤进行总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增。循环参数为:95℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 1 min,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,30 个循环之后,72℃ 再延伸 8 min。VEGF 的引物为:正链引物 5'-GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC-3',负链引物 5'-CGA TCG TTC TGT ATC AGT CTT TCC-3';Flt-1:正链引物 5'-CAA GTG GCC AGA GGC ATG GAG TT-3',负链引物 5'-GAT GTA GTC TTT ACC ATC CTG TTG-3';KDR:正链引物 5'-GAG GGC CAC TCA TGG TGA TTG T-3',负链引物 5'-TGC CAG CAG TCC AGC ATG GTC TG-3'。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离,紫外分析仪观察后摄片。Lab Works 软件进行图像分析,测定阳性电泳条带的平均灰度值,计算各样本 VEGF 与 β -actin 电泳条带的平均灰度值比率,作为其相对表达量。

1.7 Western 印迹检测 VEGF 蛋白的表达 将 HepG2 细胞接种于小培瓶中, 1×10^6 个/瓶,以 100 ng/ml rhVEGF 和 10 μ g/ml bevacizumab 分别处理细胞,方法同前,以检测 rhVEGF 和 bevacizumab 对 VEGF 蛋白表达量的影响,无血清 RPMI 1640 培养

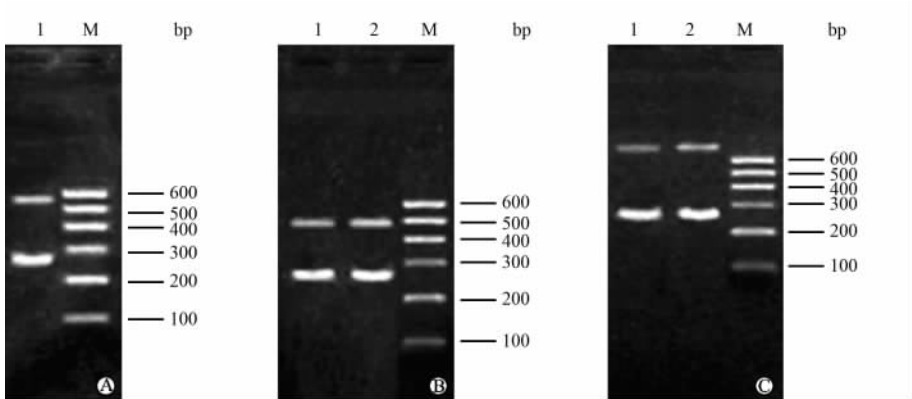
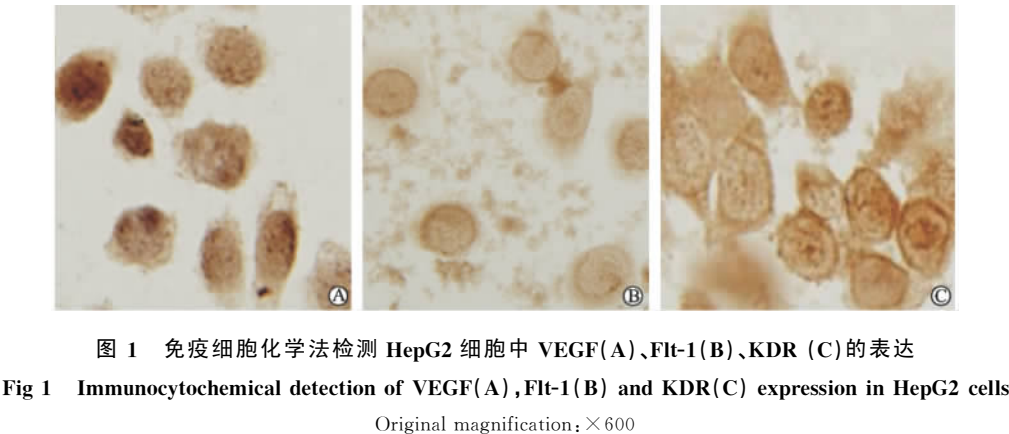
基作为空白对照。收集细胞,冷 PBS 洗 3 次后加入 400 μ l 裂解液,冰上裂解细胞 30 min,4 $^{\circ}$ C 4 500 $\times$ g 离心 10 min,提取上清测定蛋白质浓度后进行 SDS-PAGE,转膜,含 5%BSA 的 TBST 室温封闭 1 h,加入 VEGF 与 β -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,加入 IgG-HRP 二抗(1 : 1 000)杂交,洗膜后显色。

1.8 统计学处理 统计软件采用 SPSS 11.5。采用单因素方差分析(LSD)法分析 rhVEGF、bevacizumab 对 HepG2 细胞增殖及 VEGF mRNA 相对表

达量的影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HepG2 细胞中 VEGF、Flt-1、KDR 蛋白及基因的表达 免疫细胞化学检测结果表明,HepG2 细胞中可见 VEGF、Flt-1 及 KDR 的表达,其中 VEGF 在胞质中表达,而 Flt-1 及 KDR 在胞质和胞膜中均表达(图 1)。RT-PCR 检测结果也表明,HepG2 中均有 VEGF、Flt-1、KDR mRNA 的表达(图 2)。



2.2 HepG2 细胞培养上清 VEGF 水平 HepG2 培养上清液中存在 VEGF 蛋白,其浓度为 (564.2 ± 18.3) pg/ml,证实了 HepG2 细胞可分泌 VEGF 蛋白。

2.3 rhVEGF 对 HepG2 细胞增殖的影响 不同浓度 rhVEGF 对肝癌细胞株 HepG2 均有促进增殖的作用,12.5、25、50、100 ng/ml 组 D 值分别 0.14、0.15、0.23、0.40,与对照组(0 ng/ml rhVEGF, D 值为 0.11)相比差异均有统计学意义(P 值分别为 0.023,0.002,0.000,0.000)。在 25~100 ng/ml 范围内其促进作用随 rhVEGF 浓度的增高而增强,呈剂量依赖性(图 3)。

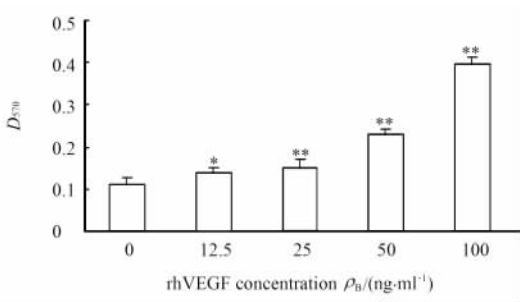


图 3 rhVEGF 对 HepG2 细胞的促进增殖作用

Fig3 Promoting effect of rhVEGF on HepG2 cells growth

* $P<0.05$, * * $P<0.01$ vs control group(without rhVEGF)

2.4 Bevacizumab 对 HepG2 细胞增殖的影响 不同浓度 bevacizumab 对肝癌细胞株 HepG2 的增殖有抑制作用,0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞增殖抑制率分别为 $(8.76 \pm 1.15)\%$ 、 $(26.83 \pm 1.20)\%$ 、 $(31.87 \pm 1.30)\%$ 、 $(28.20 \pm 1.28)\%$,其中 1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 组与对照组相比差异均有统计学意义(P 值分别为 0.001、0.000、0.001,图 4)。

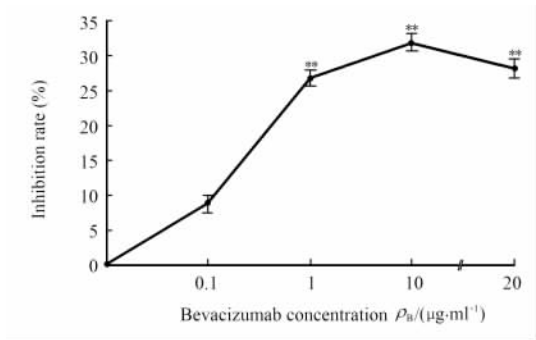


图 4 Bevacizumab 抑制 HepG2 细胞增殖情况
Fig 4 Inhibitory effect of bevacizumab on HepG2 cell growth
** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ bevacizumab group

2.5 RT-PCR 检测 HepG2 细胞 VEGF mRNA 表达的变化 rhVEGF 作用于 HepG2 细胞后,其 VEGF mRNA 表达量增加($P=0.000$);而 bevacizumab 作用后的 VEGF mRNA 表达量减少($P=0.000$)。因此,rhVEGF 可促进 VEGF mRNA 的表达,而 bevacizumab 则抑制 VEGF mRNA 的表达(图 5)。

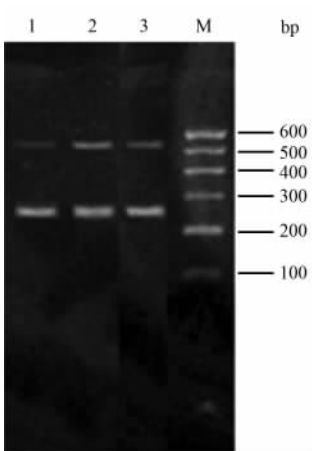


图 5 Bevacizumab、rhVEGF 对 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 表达的影响
Fig 5 Influence of bevacizumab and rhVEGF on expression of VEGF mRNA in HepG2 cells
1:Bevacizumab; 2:rhVEGF;3:Control group;M:Marker

2.6 Western 印迹检测 HepG2 细胞中 VEGF 蛋白表达的变化 rhVEGF 作用于 HepG2 细胞后,其

VEGF 蛋白表达量增加;而 bevacizumab 作用后的 VEGF 蛋白表达量减少。其结果同 RT-PCR 一致,进一步证实了 rhVEGF 可促进 VEGF 的表达,而 bevacizumab 则抑制 VEGF 的表达(图 6)。

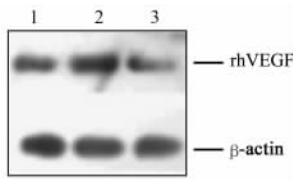


图 6 bevacizumab、rhVEGF 对 HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达的影响
Fig 6 Influence of bevacizumab and rhVEGF on expression of VEGF protein in HepG2 cells
1:Control group; 2:rhVEGF; 3:Bevacizumab

3 讨论

Bevacizumab 是针对 VEGF 人工合成的一种重组人源化单克隆抗体。2004 年被美国 FDA 批准用于晚期结直肠癌的一线治疗,治疗肾癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等也取得良好的疗效^[7]。bevacizumab 对肝癌的临床疗效的 I 期、II 期临床试验的结果表明,bevacizumab 单药以及联合其他化疗药物或 erlotinib 都有一定的抗肿瘤作用^[8]。Calvani 等^[9]研究发现,VEGF/KDR/hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) 自分泌途径不同程度地介导了缺氧的结肠癌细胞的生存,bevacizumab 可通过此自分泌途径抑制结肠癌细胞的增殖,并且结肠癌细胞本身就有对抗 VEGF 治疗敏感或耐药之分,这也决定了 bevacizumab 的治疗疗效。

VEGF 主要来源于肿瘤细胞,胃癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、黑素瘤、胶质瘤及肝癌等 VEGF 均呈高表达^[10]。过去认为 VEGF 主要作用于间质的血管内皮细胞而发挥促血管生成的作用。然而近年研究发现,多种肿瘤细胞自身也存在 VEGF 受体的表达,外源性 VEGF 可通过肿瘤细胞上的 VEGF 受体作用于肿瘤细胞^[2]。已证实白血病、黑素瘤、非小细胞肺癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌上均可见 VEGF 受体表达,并在这些肿瘤细胞上存在 VEGF 的自分泌机制^[11-13]。国内王腾等^[14]也证明了肝癌细胞株中可见 VEGF 受体表达,且可能存在自分泌作用方式。本研究发现,肝细胞癌 HepG2 细胞系中也同时存在 Flt-1 和 KDR 的表达;ELISA 检测证实 HepG2 肝癌细胞可分泌 VEGF 蛋白;且外源性 rh-VEGF 可促进 HepG2 细胞的增殖,并呈现剂量依赖性效应,提示肝癌细胞也可能存在 VEGF 的自分泌

作用。RT-PCR 和 Western 印迹结果均显示, rh-VEGF 可促进 HepG2 细胞 VEGF 的表达,提示随着肝癌细胞的增殖,其分泌的 VEGF 也增多,从而进一步加强 VEGF 的促进增殖作用。由此我们推测,肝癌细胞中很可能存在 VEGF 的自分泌机制。

本研究将 bevacizumab 在体外直接作用于 HepG2 细胞,结果发现, bevacizumab 可抑制 HepG2 细胞的增殖,而且 bevacizumab 作用于肝癌细胞后,其 VEGF 表达减少。由此推断, bevacizumab 可能通过阻断 VEGF 的自分泌途径而抑制细胞增殖,且随着增殖抑制,其 VEGF 的表达也减少。目前也已有很多研究表明,对于 VEGF 受体表达阳性的肿瘤细胞,外源性 VEGF 可上调 VEGF 受体的表达并使其磷酸化,从而刺激其增殖,而通过多种途径阻断外源性 VEGF 或 VEGF 受体后即可抑制其增殖。Vieira 等^[15]研究证实 VEGF 自分泌机制在甲状腺癌细胞生存中有重要作用,通过 VEGF 或 VEGFR 的中和抗体的阻断作用均可明显抑制肿瘤细胞的增殖。

综上所述,本研究证实肝癌细胞中存在 VEGF 和 VEGFRs 的共表达,并可能存在 VEGF 的自分泌作用,从而促进肿瘤细胞自身的增殖。而 bevacizumab 可以通过阻断 VEGF 的促增殖作用而抑制肿瘤细胞的增殖,这为抗肿瘤血管生成药物 bevacizumab 的抗肿瘤作用提供了新的理论依据,也更为其在肝细胞癌治疗的应用中奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] Yao D F, Wu X H, Zhu Y, Shi G S, Dong Z Z, Yao D B, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4: 220-226.

[2] Hicklin D J, Ellis L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 1011-1027.

[3] Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective[J]. Clin Cancer

Res, 2006, 12: 5018-5022.

[4] Zhang J, Lu A, Beech D, Jiang B, Lu Y. Suppression of breast cancer metastasis through the inhibition of VEGF-mediated tumor angiogenesis[J]. Cancer Ther, 2007, 5: 273-286.

[5] Semenza G L. A new weapon for attacking tumor blood vessels [J]. N Engl J Med, 2008, 358: 2066-2067.

[6] Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro* [J]. Angiogenesis, 2004, 7: 335-345.

[7] 罗荣城, 韩焕兴. 肿瘤生物治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 276-279.

[8] Zhu A X. Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2008, 112: 250-259.

[9] Calvani M, Trisciuglio D, Bergamaschi C, Shoemaker R H, Melillo G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68: 285-291.

[10] Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36: 127-137.

[11] Fragoso R, Elias A P, Dias S. Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48: 481-488.

[12] von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Burde R, Plath T, Schirner M, et al. *De novo* expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop[J]. Gastroenterology, 2000, 119: 1358-1372.

[13] Jackson M W, Roberts J S, Heckford S E, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62: 854-859.

[14] 王 腾, 殷咏梅, 陆彬彬, 王朝霞, 德 伟, 束永前. 人肝癌细胞株 VEGF/VEGFR 的检测及意义探讨[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 26: 334-336.

[15] Vieira J M, Santos S C, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop[J]. Eur J Endocrinol, 2005, 153: 701-709.

[本文编辑] 贾泽军