

· 临床研究 ·

血管内皮生长因子及其受体在急性白血病儿童骨髓和血浆中的表达

李莉¹, 谢晓恬¹, 梁爱斌¹, 廖雪莲¹, 石苇¹, 李本尚¹, 霍莉莉²

(1. 同济大学附属同济医院小儿血液专科, 上海 200065; 2. 上海市中医医院儿科, 上海 200071)

[摘要] 目的 血管内皮生长因子(VEGF)与实体瘤的发生、发展和预后相关,但其与儿童急性白血病的关系尚不明确。本实验通过检测 VEGF 及其受体 *fms* 样酪氨酸激酶受体(Flt-1)及含激酶插入区受体(KDR)在儿童急性白血病的表达情况,分析它们与儿童急性白血病的发生与预后的关系,为进一步研究抗白血病治疗新靶点提供思路。方法 采用 RT-PCR 法检测 21 例初发和复发、20 例缓解后白血病患者和 5 例健康儿童骨髓单个核细胞 VEGF、Flt-1、KDR mRNA 的表达。使用酶联免疫吸附法检测上述患儿及 20 例正常儿童外周血 VEGF 蛋白浓度。结果 健康儿童骨髓单个核细胞均未检测到 VEGF 及其受体 Flt-1、KDR 的表达。90% (19/21)初发/复发白血病患者骨髓单个核细胞表达 VEGF, 86% (18/21)表达 Flt-1, 30% (6/20)缓解后白血病患者骨髓单个核细胞表达 VEGF, 15% (3/20)表达 Flt-1, 两组差异有显著性(均 $P < 0.001$)。初发/复发组 VEGF 和 Flt-1 阳性率与正常组 [0% (0/5); 0% (0/5)] 比较差异有显著性(均 $P < 0.001$),而缓解组与正常组比较差异无显著性。两组白血病患者未检测到 KDR 表达。初发/复发组血浆 VEGF 浓度为 405 ± 270 pg/mL, 高于缓解组 (136 ± 98 pg/mL, $P < 0.01$) 和正常组 (91 ± 41 pg/mL, $P < 0.01$)。缓解组与正常组比较差异无显著性。结论 白血病患者表达 VEGF 及其受体,化疗后病情缓解,其水平随之下降,说明 VEGF 及其受体(Flt-1)在白血病的发生、发展中可能起重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(1): 31-33]

[关键词] 血管内皮生长因子;受体,血管内皮生长因子;白血病;儿童

[中图分类号] R725.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)01-0031-03

Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bone marrow and plasma of children with acute leukemia

Li LI, Xiao-Tian XIE, Ai-Bin LIANG, Xue-Lian LIAO, Wei-SHI, Ben-Shang LI, et al. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China (Email: xtxie@163.com)

Abstract: Objective The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with the pathogenesis and prognosis of solid tumors, however its relationship to childhood acute leukemia has not yet been identified. This study determined the expression of VEGF and its receptors in children with acute leukemia in order to study their relationships to the activity of childhood acute leukemia. **Methods** The mRNA of VEGF, and its receptors Flt-1 and KDR were detected in bone marrow mononuclear cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction and the plasma VEGF levels were measured using immunoassay in 21 children with initial or recurrent untreated acute leukemia and 20 leukemia children in complete remission. The bone marrow samples from 5 healthy volunteer children and plasma samples from 20 healthy children were used as the controls. **Results** VEGF and its receptors were not expressed in the samples from healthy children. KDR mRNA expression was not detected in either healthy or leukemia children. The VEGF mRNA was expressed in 90% of patients with initial/recurrent acute leukemia, which was higher than in patients in complete remission (30%; $P < 0.001$) and healthy children ($P < 0.001$). The patients with acute leukemia also had a significantly higher Flt-1 mRNA expression level (86%) than patients in complete remission (15%; $P < 0.001$) and healthy children ($P < 0.001$). There was no difference in the expression levels of VEGF and Flt-1 between patients in complete remission and healthy children. The plasma VEGF concentration of initial/recurrent patients (405 ± 270 pg/mL) was much higher than that of patients in complete remission (136 ± 98 pg/mL; $P < 0.05$) and normal controls (91 ± 41 pg/mL; $P < 0.01$). There was no difference in the plasma VEGF concentrations between the patients in complete remission and healthy children. **Conclusions** The expression of VEGF and the receptor (Flt-1) may play an important role in the development

[收稿日期] 2004-02-26; [修回日期] 2004-07-01

[作者简介] 李莉(1969-),女,硕士,主治医师,研究方向:儿童血液肿瘤。

[通讯作者] 谢晓恬,上海市新村路389号同济大学附属同济医院小儿血液专科,邮编:200065。

of childhood leukemia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(1):30-33]

Key words: Vascular endothelial growth factor; Receptor, vascular endothelial growth factor; Leukemia; Child

血管内皮生长因子(VEGF)作为潜在的血管通透性诱导剂及特异性内皮细胞促分裂原,在血管的生成中起重要作用。研究发现 VEGF 与实体瘤发生、发展、分期及预后相关,但其在血液系统恶性肿瘤中作用尚不明确,近期国内外学者已经逐步在此领域开展研究工作。VEGF 有两个特异性受体:fms 样酪氨酸激酶受体(fms-like tyrosine, Flt-1)和含有激酶插入区域的受体(kinase insert domain containing receptor, KDR)。本研究检测儿童急性白血病初发/复发患儿,完全缓解患儿和健康儿童骨髓单个核细胞 VEGF 及其受体 FLT-1、KDR mRNA 的表达及血浆 VEGF 蛋白表达,探讨 VEGF 及其受体与儿童白血病发生和预后的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

白血病患者为 2002 年 9 月至 2003 年 9 月收治于上海同济医院小儿血液专科的病例。所有患儿均依据临床表现、外周血涂片、骨髓细胞形态学、免疫学分型和细胞遗传学诊断标准确诊。21 例初发及复发未治急性白血病患者包括急性淋巴细胞白血病(ALL)16 例;急性非淋巴细胞白血病(ANLL)5 例;其中男 17 例,女 4 例,平均年龄 6.4 岁。完全缓解急性白血病患者 20 例,ALL 15 例,ANLL 5 例;男 12 例,女 8 例,平均年龄 6.3 岁。对照组 5 例健康献髓者,男 3 例,女 2 例,平均年龄 6.7 岁。20 份健康儿童外周血标本来自我院门诊健康体检者,男 9 例,女 11 例,平均年龄 7.3 岁。所有患儿及志愿者监护人均被告知实验目的和过程。

1.2 标本留取、细胞分离

骨髓标本:分别抽取初发/复发患儿、缓解患儿及健康献髓者骨髓 2~4 mL,肝素抗凝。用 RPMI-1640 液 2:1 稀释备用。加入 4 mL Ficoll 分离液于 15 mL 塑料离心管中,将稀释后的标本液缓慢滴至 Ficoll 分离液液面之上,4℃ 3 000 r/min 离心 30 min 吸取单个核细胞备用。

外周血标本:留取清晨空腹外周静脉血 2~4 mL,肝素抗凝,6 h 内室温下离心,2 000 r/min,离心 10 min,吸取血浆,分装后储存于 -70℃ 备用。

1.3 ELISA 法检测血浆 VEGF 浓度

使用固相酶联免疫吸附试验试剂盒(晶美公司),按厂家提供检测方法检测,每个样本重复两次。

1.4 RT-PCR 检测 VEGF 及其受体

Trizol(GIBCOBRL 公司)法抽提骨髓单个核细胞总 RNA。分光光度计测 A260/280 比值鉴定 RNA 质量和数量,比值为 1.8~2.0。合成 cDNA。引物序列^[1]见表 1。扩增条件:50 μL PCR 反应液加入 4 μL dNTP(各 2.5 mM),0.25 μL Taq(大连宝生物工程有限公,5 U/μL),2 μL cDNA,20 μM 引物各 1 μL。94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,退火 45 s,温度分别为 VEGF 64℃,Flt-1 62℃,KDR 54℃,β-actin 56℃,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环。10 μL PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶或 PAGE 上电泳,鉴定及拍照。

1.5 统计学分析

统计分析采用 SAS 统计软件,率的比较使用 χ^2 检验及四格表精确概率法统计。血浆 VEGF 浓度用($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异用方差分析,两两比较用 SNK-q 检验。

表 1 引物序列
Table 1 PCR primers

	引物	产物长度
VEGF	上游:5'-TCG GGC CTC CGA AAC CAT GA-3'	408 bp, 541 bp
	下游:5'-CCT GGT GAG AGA TCT GGT TC-3'	
Flt-1	上游:5'-CAA GTG GCC AGA GGC ATG GAG TT-3'	1089 bp
	下游:5'-GAT GTA GTC TTT ACC ATC CTG TTG-3'	
KDR	上游:5'-CAA CAA AGT CGG GAG AGG AG-3'	877 bp
	下游:5'-ATG ACG ATG GAC AAG TAG CC-3'	
β-actin	上游:5'-TGA TCA CCA TTG GGA ATG AG-3'	154 bp
	下游:5'-CAG TGT GTT GGC GTA GAG GT-3'	

2 结果

2.1 各组骨髓单个核细胞 VEGF 及其受体表达情况

健康儿童均未检测到 VEGF 及其受体 Flt-1, KDR 的表达。90% (19/21) 初发/复发白血病患者骨髓单个核细胞表达 VEGF, 86% (18/21) 表达 Flt-1, 30% (6/20) 缓解后白血病患者表达 VEGF, 15% (3/20) 表达 Flt-1, 两组差异有显著性 ($\chi^2 = 15.77, P < 0.001$; $\chi^2 = 20.48, P < 0.001$)。初发/复发组 VEGF 和 Flt-1 阳性率与正常组比较差异有显著性 (均 $P < 0.001$), 而缓解组与正常组比较差异无显著性。两组白血病患者未检测到 KDR 表达。

2.2 各组血浆 VEGF 水平

初发/复发组血浆 VEGF 浓度为 405 ± 270 pg/mL, 高于缓解组 (136 ± 98 pg/mL, $P < 0.01$) 和正常组 (91 ± 41 pg/mL, $P < 0.01$)。缓解组与正常组比较差异无显著性。

3 讨论

血管内皮生长因子是特异性最强, 作用最强的促血管生成因子。近年来发现, 血管内皮生长因子及其受体在许多实体瘤: 包括乳腺癌、直肠癌和卵巢癌等都有强烈表达^[2,3], 明显高于正常对照, 其表达强度与肿瘤性质、早期转移、治疗效果及预后密切相关。研究还发现缺氧时实体肿瘤和血液肿瘤中 VEGF 基因表达上调^[4,5]。大部分肿瘤虽然血管丰富, 但仍不能满足肿瘤相对无限生长的需要, 导致肿瘤相对缺氧, VEGF 表达上升。在肿瘤发生过程中, VEGF 促进新生血管生成及增加血管通透性, 为肿瘤血行转移创造条件^[6]。

近年来, 国外研究报道 VEGF 及其受体在白血病中也有表达^[7], 其水平与骨髓血管密度正相关^[8]。复发患者 VEGF 水平明显高于初发患者, VEGF 水平高低与复发和存活时间成反比^[9], 而完全缓解患者骨髓组织 VEGF 和 KDR 表达水平接近正常^[8]。说明白血病细胞可能自分泌 VEGF, 通过自身细胞膜上受体, 促进肿瘤细胞生长和转移。

本实验研究了临床急性白血病患者 VEGF 及其受体 Flt-1, KDR 表达情况, 初发/复发和完全缓解的白血病患者骨髓单个核细胞均表达 VEGF 和 Flt-1, 不表达 KDR。但初发/复发组 VEGF 及 Flt-1 的阳性表达率高于缓解组。正常志愿者骨髓单个核细胞均

未检测到 VEGF 及其受体的表达。随着疾病缓解 VEGF 及其受体 Flt-1 的表达明显降低, 说明 VEGF 与 Flt-1 与儿童白血病病情可能关系较密切。本实验未检测到 KDR 表达, 这与在成人慢性 B 淋巴细胞性白血病中的研究发现不同^[10], 可能 KDR 与儿童急性白血病发病关系较小。初发/复发患儿血浆 VEGF 浓度高于缓解后患儿和正常儿童。说明随着白血病的缓解, 血浆 VEGF 水平也显著下降。国内盖志敏等^[11]也有类似报道。本实验结果提示: VEGF 及其受体 Flt-1 与急性儿童白血病发生密切相关, 动态监测血浆 VEGF 可能有助于判断白血病的发生和预后。

VEGF 及其受体的中和抗体已经在实体肿瘤模型中证实有抑制肿瘤侵袭、转移的作用, 部分制剂已经用于一期临床试验。针对 VEGF, Flt-1 的靶向治疗将有可能改善儿童急性白血病的预后。进一步研究 VEGF 及其受体详细的作用机制—特别是信号传导机制, 将可能开辟白血病新的治疗途径。目前已经有关于 VEGF 对细胞增殖、细胞凋亡及趋化性方面方面的研究, 结果显示 VEGF 通过其受体可以上调凋亡抑制因子的表达^[12-14]。进一步从基因水平阐明 VEGF 作用机制, 将会对基因治疗肿瘤, 提高临床疗效提供理论基础, 为进一步研究肿瘤靶点提供思路。

[参 考 文 献]

- [1] Hayashibara T, Yamada Y, Miyanishi T, Mori H, Joh T, Maeda T, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Cellular Chemotaxis: a possible autocrine pathway in adult T-cell leukemia cell invasion [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2719-2726.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [3] Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis [J]. Cell Struct Funct, 2001, 26(1): 25-35.
- [4] Gupta M, Mungai PT, Goldwasser E. A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene [J]. Blood, 2000, 15, 96(2): 491-497.
- [5] Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, von Stackelberg A, Lottaz C, et al. Activation of the HIF pathway in childhood ALL: prognostic implications of VEGF [J]. Leukemia, 2004, 18(5): 926-933.
- [6] Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaru J, Nakamura S, et al. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma [J]. Eur J Haematol, 2002, 68(2): 91-100.
- [7] Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in hematopoietic malignancies [J]. Cancer Research, 1999, 59(3): 728-733.

(下转第 38 页)

【参 考 文 献】

- [1] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4): 201-202.
- [2] 韩晓华, 袁壮, 赵淑琴, 刘春峰, 张智洁, 刘勇. 小儿院内获得性肺炎病原学及临床分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(6): 545-547, 549.
- [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement [S]. NCCLS documents M100-S9. Pennsylvania: NCCLS, 1999, 17-99.
- [4] Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum-lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactamases agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns [J]. Rev Infect Dis, 1988, 10(4): 867-878.
- [5] 孙继梅, 周秀珍, 张智洁, 刘勇. 3种方法检测超广谱 β -内酰胺酶的临床评价 [J]. 中国医科大学学报, 2003, 31(3): 235-236.
- [6] Jacoby GA. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases [J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(1): 81-83.
- [7] Lucet JC, Decre D, Fichelle A, Joly-Guillou ML, Pernet M, Deblangy C, et al. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital [J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(6): 1411-1418.
- [8] Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(1): 53-58.
- [9] 李家斌, 徐元宏, 俞云松. 合肥市产 ESBLs 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌流行状况及耐药性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(5): 358-361.
- [10] 陈亚岗, 俞云松, 周伟琳, 丁永祥, 马亦林. 浙江省产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌流行情况及耐药性 [J]. 中华传染病杂志, 2000, 18(4): 236-238.
- [11] 林庆安, 罗文炯, 修清玉, 李惠萍. 上海部分地区肠杆菌科细菌产超广谱 β -内酰胺酶情况及耐药监测 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(7): 241-242.
- [12] Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics [J]. Clin Infect Dis, 1997, 24 (Suppl 1): S19-S45.
- [13] 张兵, 钟礼立, 蔡瑞云, 李云, 曾赛珍, 黄寒, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶细菌感染的危险因素研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(2): 130-132.
- [14] Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli [J]. Clin Microbiol, 1996, 34(4): 908-911.
- [15] Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes [J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(8): 1162-1171.
- [16] Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of Klebsiella infection resistant to late-generation cephalosporins [J]. Ann Intern Med, 1993, 119(5): 353-358.
- (本文编辑: 吉耕中)
- (上接第33页)
- [8] Padro T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Burger H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2002, 16(7): 1302-1310.
- [9] Koomagi R, Zintl F, Sauerbrey A, Volm M. Vascular endothelial growth factor in newly diagnosed and recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia as measured by real-time quantitative polymerase chain reaction [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(11): 3381-3384.
- [10] Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabinzadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells [J]. Leuk Res, 2004, 28(3): 243-248.
- [11] 盖志敏, 张素桂, 马晓红. 急性白血病血管内皮生长因子的含量及临床意义 [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 351-352.
- [12] Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cell by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition [J]. Blood, 2002, 99(7): 2532-2540.
- [13] Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cell after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL-1 acting as an antiapoptotic factor [J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5565-5569.
- [14] Koistinen P, Siitonen T, Mantymaa P, Saily M, Kinnula V, Savolainen ER, et al. Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric Oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system [J]. Leukemia, 2001, 15(9): 1433-1441.
- (本文编辑: 钟乐)