

重组 ANGPT2 及抗体对白血病荷瘤小鼠 ANGPT1/2 表达的影响

杨红¹⁾, 王伟雅²⁾, 周泽平¹⁾, 刘琳¹⁾, 张铀¹⁾, 高春林²⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院血液内科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学第三附属医院, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 应用重组的 ANGPT2 及 ANGPT2 单克隆抗体注射急性髓系白血病荷瘤小鼠, 了解荷瘤小鼠肿瘤组织中 ANGPT1/2 表达的变化. **方法** 应用 HL-60 细胞构建急性髓系白血病模型, 同时给予小鼠注射重组的 ANGPT2 和 Anti-ANGPT2, 应用 Western blot 检测急性髓系白血病小鼠肿瘤组织中的 ANGPT1/2 蛋白的表达. **结果** 应用重组的 ANGPT2, 对照组与实验组中的 ANGPT1 和 ANGPT2 蛋白的表达差异无统计学意义; 应用 Anti-ANGPT2, 对照组与实验组中的 ANGPT2 蛋白的表达差异无统计学意义, ANGPT1 蛋白的表达明显低于对照组. **结论** 进行 ANGPT2 单克隆抗体实验时, 需要阻断 VEGF 以达到理想的结果.

[关键词] ANGPT2; 急性髓系白血病; NOD/SCID 小鼠

[中图分类号] R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0078-04

A Study of the Expression of ANGPT1, ANGPT2 in Mouse Model of Acute Myeloid Leukemia by Using Recombinant ANGPT2 and Monoclonal Antibody against ANGPT2

YANG Hong¹⁾, WANG Wei-ya²⁾, ZHOU Ze-ping¹⁾, LIU Lin¹⁾, ZHANG You¹⁾, GAO Chun-lin²⁾

(1) Dept. of Hematology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Colorectal Cancer, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of ANGPT1/2 proteins in the tumor tissue of mouse model of acute myeloid leukemia by using recombinant ANGPT2 and monoclonal antibody against ANGPT2. **Methods** HL-60 cells were transplanted with NOD/SCID mouse through abdominal injection into construct mouse model of acute myeloid leukemia. Then the mice were injected with recombinant ANGPT2 and monoclonal antibody against ANGPT2. The expressions of ANGPT1 and ANGPT2 proteins in the tumor tissues of mouse model were detected by Western Blot. **Results** In recombinant ANGPT2, there were no significant differences in the expressions of ANGPT1/2 between the control group and experimental group. In anti-ANGPT2 group, there was no significant difference in the expression of ANGPT2 between the control group and experimental group, while the expression of ANGPT1 was significantly lower than the control group. **Conclusion** In the future, VEGF should be blocked if we want achieve the good results using the ANGPT2 monoclonal antibody.

[Key words] ANGPT2; Acute myeloid leukemia; NOD/SCID mouse

血管生成素 (Angiopoietins, ANGPT) 是一分泌型细胞因子家族, 主要表达在血管内皮细胞表面, 其中 ANGPT1、ANGPT2 在血管生成中起主要作用. 该家族细胞因子及其受体在胚胎血管发育、血管重塑、创伤修复、肿瘤血管形成等方面起着

重要的作用, 尤其在多种实体瘤中表达明显增高, 共同参与了肿瘤的血管新生, 影响肿瘤生长和转移. 目前研究发现 ANGPT2 在急性髓系白血病中高表达, 并且与预后有关. 笔者的研究通过应用重组的 ANGPT2 及 ANGPT2 单克隆抗体注射急性髓

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB198)

[作者简介] 杨红 (1977~), 女, 湖北武汉市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事血液系统疾病的临床研究工作.

[通讯作者] 高春林. E-mail:kmmcyang@126.com

系白血病荷瘤小鼠, 了解荷瘤小鼠肿瘤组织中 ANGPT1/2 表达的变化, 为下一步研究 ANGPT2 单克隆抗体治疗急性髓系白血病的动物实验奠定基础.

1 材料与方法

1.1 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), 体重约 5 g 左右, HL-60 细胞全称为 HL-60 人原髓细胞白血病细胞, 购自中国科学院上海细胞库. 主要实验试剂为 IMDM 培养基和胎牛血清, 重组人 ANGPT2 (购自 Peprotech 公司), ANGPT2 Polyclonal Antibody (购自 Epitomics 公司), Angiopoietin 1 Polyclonal Antibody (购自 Abcam 公司), Anti-ANGPTL2 抗体 (购自上海安妍试剂公司) 静脉注射用人免疫球蛋白 (购自上海莱士血液制品股份有限公司)

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将购买的 NOD/SCID 小鼠, 随机分为 2 组, 重组 ANGPT2 实验组和 Anti-ANGPT2 实验组各 8 只重组 ANGPT2 实验组再随机分成两组, 实验组和对照组各 4 只 Anti-ANGPT2 实验组再随机分成两组, 实验组和对照组各 4 只

1.2.2 HL-60 细胞的培养 用 10% 小牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素 RPMI-1640 培养液; 细胞起始浓度为 $2.0 \times 10^5/\text{mL} \sim 4.0 \times 10^5/\text{mL}$, 置 25 cm^2 塑料培养瓶内, 每瓶培养基的体积为 8 mL; 培养条件 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 饱和湿度, 5% CO_2 , 取对数生长期 HL-60 细胞进行实验.

1.2.3 急性髓细胞白血病小鼠模型的构建及重组人血管生成素接种荷瘤小鼠 重组 ANGPT2 组对照组: 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. 14 d 在已局部消毒的 NOD/SCID 小鼠的左下腹腹腔再次给予注射生理盐水 0.1 mL.

实验组: 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 个细胞及 $15 \text{ }\mu\text{g}$ 重组 ANGPT2 在已局部消毒的 NOD/SCID 小鼠的左下腹进行腹腔接种. 14 天在已局部消毒的 NOD/SCID 小鼠的左下腹腹腔再次接种 $15 \text{ }\mu\text{g}$ 重组 ANGPT2, 对照组给予注射生理盐水 0.1 mL. Anti-ANGPT2 组对照组: 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, 之后每周 3 次在小鼠左下腹注射重组人免疫球蛋白 $20 \text{ }\mu\text{g}$, 共 4 周.

实验组: 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, 之后每周 3 次在小鼠左下腹注射 Anti-ANGPT2 蛋白 $20 \text{ }\mu\text{g}$, 共 4 周.

1.2.4 急性髓系白血病小鼠模型鉴定 病理学检查: 取濒死小鼠及死亡小鼠的实体瘤, 中性福尔马林固定后, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察形态学改变.

1.2.5 Western Blot 检测 ANGPT1、ANGPT2 蛋白的表达 取小鼠肿瘤组织样品通过 RIPA 裂解获得上清, 每个样品分别上样 $80 \text{ }\mu\text{g}$. 上样完毕后, 聚丙烯酰胺凝胶先 90 V 跑完积层胶, 再将电压升至 200 V 直到电泳结束. 电泳结束后, 取下凝胶进行转膜, 恒压 100 V 转膜, 约为 1.5 h . 电转结束后, 取下膜后先用 PBS 洗涤 4 次, 每次 5 min . 然后置于 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 h . 用封闭液稀释一抗, 膜在一抗稀释液中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h . 洗膜 4 次, 每次 5 min ; 用含 5% 牛奶的封闭液稀释二抗. 膜在二抗中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h . 洗膜 ECL 显影, 照相. 应用 KODAK1D 软件对条带进行灰度分析处理, 用目的条带与 GAPDH 条带的灰度比值作为 ANGPT1 和 ANGPT2 蛋白的相对表达水平.

1.3 统计学分析

所得数据采用 SSPS 统计软件进行分析, Western blot 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验进行分析, 检验标准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 应用病理检查鉴定急性髓系白血病小鼠模型

取濒死小鼠及死亡小鼠的实体瘤, 中性福尔马林固定后, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察形态学改变, 符合急性髓系白血病的病理学特点 (图 1).

2.2 Western bolt 免疫印迹法检测小鼠肿瘤组织中 ANGPT1 和 ANGPT2 蛋白的结果

2.2.1 重组 ANGPT2 组小鼠肿瘤组织中 ANGPT1 和 ANGPT2 在实验组和对照组中的表达 Western blot 显示 ANGPT1 和 ANGPT2 在实验组和对照组中均有表达 (图 2), 用目的条带与 GAPDH 条带灰度的比值作为 ANGPT1 和 ANGPT2 蛋白的

相对表达水平. ANGPT1 在对照组和实验组中的表达, 通过统计学分析, $P=0.8760$, $t=0.1629$, 2 组差异无统计学意义; ANGPT1 在对照组和实验组中的表达, 通过统计学分析, $P=0.2890$, $t=1.163$, 2 组差异无统计学意义.

2.2.2 Anti-ANGPT2 组小鼠肿瘤组织中 ANGPT1 和 ANGPT2 在实验组和对照组中的表达 Western blot 显示 ANGPT1 和 ANGPT2 在实验组和

对照组中均有表达 (图 3), 通过灰度分析处理, 用目的条带与 GAPDH 条带的灰度值比值作为 ANGPT1 和 ANGPT2 蛋白的相对表达水平. ANGPT1 在对照组和实验组中的表达, 通过统计学分析, $P=0.0121$, $t=3.547$, 2 组差异有统计学意义; ANGPT2 在对照组和实验组中的表达, 通过统计学分析, $P=0.8446$, $t=0.2046$, 2 组差异无统计学意义.

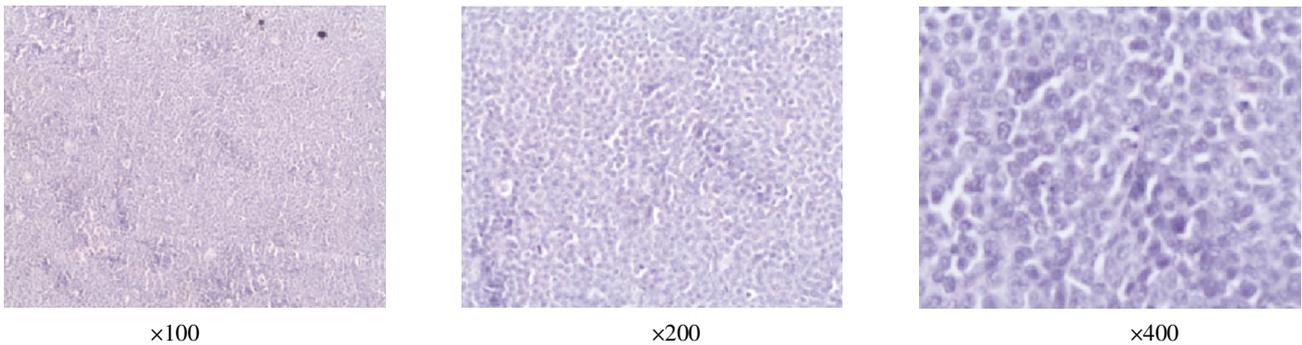


图 1 实体瘤可见大量的白血病细胞 (HE 染色)
Fig. 1 HL-60 cells in solid tumor (HE staining)

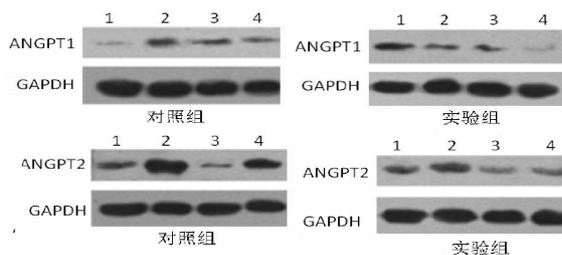


图 2 重组的 ANGPT2 组 Western blot 免疫印迹法检测 ANGPT1 和 ANGPT2 的表达
Fig. 2 The expressions of ANGPT1 and ANGPT2 proteins in recombinant ANGPT2 group detected by Western Blot

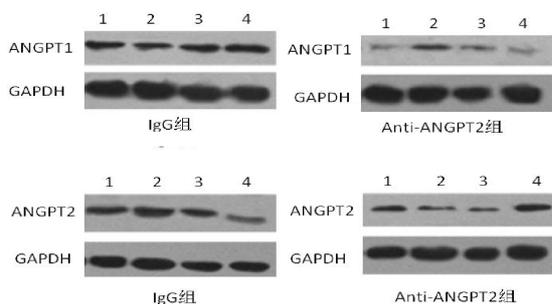


图 3 Anti-ANGPT2 组 Western blot 免疫印迹法检测 ANGPT1 和 ANGPT2 的表达
Fig. 3 The expressions of ANGPT1 and ANGPT2 proteins in anti-ANGPT2 group detected by Western Blot

3 讨论

1971 年 Folkman 实验室首次发文指出“肿瘤

的生长和转移依赖于血管生长”^[2], 自此肿瘤血管生成、生长在肿瘤治疗中的作用得到广泛重视. 随着对肿瘤本质认识的逐步深入, 分子靶向治疗在治疗肿瘤方面发挥的作用愈加重要, 其中以肿瘤血管为靶点的研究也成为基础和临床研究的热点领域^[3]. 急性髓细胞白血病 (Acute myeloid leukaemia, AML) 是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一. 研究显示, 新确诊的急性髓细胞白血病患者的微血管的密度 (MVD) 较正常人明显增高. 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^[4]. 学者们认为, 生长因子和骨髓内皮细胞及白血病细胞来源的血管生成因子的相互作用在 AML 的发病机制中发挥重要作用. AML 中虽然有许多血管源的细胞因子通过自分泌或旁分泌的方式对造血系统发挥调控作用, 但其中最重要的是血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血管生成素 (angiopoietin, ANGPT)-TIE 受体家族^[5]. 目前针对 VEGF 的研究很多, 并且 VEGF 相关抗体已广泛应用于肿瘤治疗, 主要是通过降低肿瘤血管新生, 减慢肿瘤生长. 随着应用的增多, 目前 VEGF 相关抗体在肿瘤治疗中存在较多耐药情况^[6]. 鉴于 ANGPT 家族与 VEGF 在血管增生中具有协同作用, 我们设想通过抑制 ANGPT, 是否可以达到更好的肿瘤治疗效果.

ANGPT 家族与 VEGF 的协同作用能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^[7]。ANGPT-TIE家族主要包括2种分泌的配体(ANGPT1, ANGPT2)。ANGPT1诱导的TIE2活化能激活内皮细胞的生存信号,维持内皮细胞屏障和静止的血管系统。与之相反,ANGPT2通常作为ANGPT1的拮抗剂,它能增加血管的通透性,并改变血管系统的稳定性,使之有利于血管增生。ANGPT1主要表达于壁细胞、成纤维细胞、非血管正常细胞和肿瘤细胞;ANGPT2则主要由内皮细胞分泌。研究发现,细胞因子,包括VEGFA、胰岛素样生长因子(IGF1)、血小板源生长因子(PDGFB)都能诱导ANGPT2的分泌。肿瘤产生的VEGF能促进肿瘤内皮细胞分泌ANGPT2^[8]。

目前研究发现,在乳腺癌、黑色素瘤和肺癌中高水平的ANGPT2与增强的肿瘤转移和侵袭能力密切相关^[9-11]。Huang等报道,应用B16/F10黑色素瘤异种移植模型,给予合成的ANGPT2, MMP3和MMP10后小鼠肺部的血管的完整性明显被破坏,同时血管的通透性明显增加,循环的肿瘤细胞“外溢”也增加^[12]。同时大量的研究证实ANGPT2在急性髓系白血病中高表达并与预后相关^[13-16],但是研究多仅限于骨髓和外周血,目前还没有用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。

本研究中笔者应用重组的ANGPT2及Anti-ANGPT2注射急性髓系白血病荷瘤小鼠,研究ANGPT1/2蛋白表达的变化,笔者的研究结果显示ANGPT2在2组的实验组与对照组中均无统计学差异。笔者分析了出现该研究结果的原因:对于应用重组的ANGPT2组,笔者分析原因可能为注射的重组的ANGPT2为一种蛋白质,存在一定的半衰期,进入肿瘤组织的量较少,由此导致对照组与实验组ANGPT1/2表达无明显差异;对于Anti-ANGPT2组,对照组与实验组中的ANGPT2蛋白的表达无统计学差异,ANGPT1蛋白的表达明显低于对照组,笔者分析原因可能是急性髓系白血病肿瘤血管新生与多种因子有关,如VEGFA、胰岛素样生长因子(IGF1)、血小板源生长因子(PDGFB)都能诱导ANGPT2的分泌,同时肿瘤产生的VEGF能促进肿瘤内皮细胞分泌ANGPT2。当笔者应用Anti-ANGPT2阻断了ANGPT2的表达后,可能存在肿瘤组织中的VEGF反馈引起大量的ANGPT2的分泌,而ANGPT2是ANGPT1的拮抗剂,而出现我们的实验组与对照组中的ANGPT2蛋白表达无统计学差异,ANGPT1蛋白的表达明显低于对照组。

下一步笔者可以通过进行肿瘤血管密度的检测以明确重组ANGPT2及Anti-ANGPT2对急性髓系白

血病小鼠肿瘤血管增生的影响;同时该实验给予我们一个提示,笔者下一步研究单克隆ANGPT2对急性髓系白血病的治疗中,可能需要预先阻断VEGF。

[参考文献]

- [1] REIKVAM H, HATFIELD KJ, P LASSALLE P et al. Targeting the angiopoietin (Ang)/Tie-2 pathway in the crosstalk between acute myeloid leukaemia and endothelial cells: studies of Tie-2 blocking antibodies, exogenous Ang-2 inhibition of constitutive agonistic Ang-1 release. *Expert Opin. Investig[J]. Drugs*, 2010, 19(2):169-183.
- [2] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182-1186.
- [3] FERRARA N, KERBEL R S. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. *Nature*, 2005, 438(7070):967-974.
- [4] FIEDLER W, GSCHUCH, LOGES S. Prognostic implication of expression of Angiopoietin-2 in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2008, 32(6):843-844.
- [5] HOUA H A, CHOUA W C, LIN L I, et al. Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2008, 32(6):904-912.
- [6] HIROYA H, BEVERLY L, FALLCON, et al. Complementary action of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(6):2213-2223.
- [7] SHIM W S, HO I A, WONG P E. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(7):655.
- [8] HU B, CHENG S Y. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy [J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11(2):111-116.
- [9] IMANISHI Y. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4254-4263.
- [10] HELFRICH I. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma [J]. *Clin. Cancer Res*, 2009, 15(4):1384-1392.
- [11] PARK J H. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer [J]. *Chest*, 2007, 132(1):200-206.
- [12] HUANG Y. Pulmonary vascular destabilization in the pre-metastatic phase facilitates lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69:7529-7537.
- [13] SCHLIEMANN C, BIEKER R, THOENNISEN N, et al. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2007, 21(9):1901-1906.
- [14] AREF S, EI MENSRAWY N. Soluble angiopoietin-2/sTie2 receptor ratio is an independent prognostic marker in adult acute myeloid leukemia [J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2009, 25(1):17-22.
- [15] HOU H A, CHOU W C, LIN L I, et al. Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2008, 32(6):904-912.
- [16] LOGES S, HEIL G, BRUWELERT M, et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(6):1109-1117.

(2014-09-09 收稿)