

УДК 577.218

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ VEGF-A И VEGF-C И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В ЛИМФОЦИТАХ И МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ^{*,**}

© 2007 г. О.И. Степанова, А.В. Крылов,
В.И. Людино, Е.П. Киселева^{***}

ГУ Институт экспериментальной медицины РАМН,
197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;
факс: (812)234-9489, электронная почта: ekissele@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.05.07
После доработки 21.06.07

Отмечено, что факторы роста эндотелия сосудов VEGF-A и VEGF-C являются основными ангиогенными факторами, регулирующими рост новых кровеносных и лимфатических сосудов в организме, и обладают иммунорегуляторными свойствами. Проведено комплексное исследование экспрессии мРНК VEGF-A и VEGF-C, а также всех известных рецепторов семейства VEGF в лимфоцитах и макрофагах интактных мышей. С помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией показано, что резидентные перитонеальные макрофаги, тимоциты и клетки лимфоузлов мышей способны конститутивно синтезировать мРНК VEGF-A и VEGF-C. Установлено, что макрофаги также экспрессируют мРНК рецепторов VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 и NRP-2, в то время как тимоциты и клетки лимфоузлов – мРНК тех же рецепторов, за исключением VEGFR-1. Полученные данные существенно дополняют представления о распределении экспрессии генов рецепторов VEGF в разных клетках организма, и в частности в клетках иммунной системы. Можно предположить, что факторы семейства VEGF помимо своих основных ангиогенных функций выполняют еще и важные медиаторные функции внутри иммунной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: VEGF-A, VEGF-C, рецепторы VEGF, ангиогенез, NRP-1, NRP-2.

Рост новых сосудов во взрослом организме – сложный и скоординированный процесс, в регуляции которого участвуют разнообразные молекулы. Одним из основных ангиогенных факторов считается фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF). Семейство VEGF представлено пятью основными факторами: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарным фактором роста. Наибольшее значение для роста кровеносных сосудов имеет VEGF-A, а для роста лимфатических – VEGF-C. Биологическое воздействие факторов семейства VEGF на клетки эндотелия реализуется через специфические тирозинкиназные рецепторы: VEGF-A взаимодействует с VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1), а VEGF-C – с VEGFR-2 и VEGFR-3. Кроме того, имеются два нетирозинкиназных рецептора, усиливающих активационный сигнал, но не обладающих способностью проводить его в клетку.

Это нейропептиды 1 и 2 (NRP-1, NRP-2), причем NRP-1 является корецептором VEGFR-2, а NRP-2 – корецептором VEGFR-3 [1].

Помимо своего основного ангиогенного действия VEGF выполняет иммунорегуляторные функции [2, 3], влияет на гемопоэз, дифференцировку и созревание дендритных клеток [4], а также лимфоцитов Т и В [5]. В связи с этим актуально изучение наличия рецепторов VEGF на клетках иммунной системы, а также способности лимфоцитов и макрофагов к синтезу самих факторов и их аутокринной регуляции. Проведено комплексное исследование экспрессии мРНК всех известных рецепторов семейства VEGF на лимфоцитах и макрофагах интактных мышей, а также мРНК VEGF-A и VEGF-C.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на самцах мышей линии СЗНА массой 18–20 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Клетки перитонеального экссудата получали путем промывания брюшной полости. Для получения обогащенной

* Ускоренная публикация.

** Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 07-138, 14.10.2007.

*** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

фракции макрофагов клетки культивировали 24 ч при 37° в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), после чего удаляли фракцию не прилипающих к стеклу лимфоцитов. Паховые лимфатические узлы и тимус раздавливали и пропускали через нейлоновый фильтр, отделяя строму органа от лимфоцитов. Строма представляла собой часть ткани органа, оставшуюся на фильтре после раздавливания клеток. В дальнейшем исследовали изолированные тимоциты, лимфоциты лимфоузлов и строму тимуса, а также кусочки ткани цельного тимуса и края легкого. Кроме того, изучали линию клеток перевиваемой гепатомы 22А из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, любезно предоставленную О.Н. Погодиной. Клетки гепатомы культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки до получения монослоя.

Анализ экспрессии мРНК проводили с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами. Для исследования брали $5 \cdot 10^6$ клеток на пробу или 50 мг ткани легкого или тимуса. Тотальную мРНК выделяли одноступенчатым методом с использованием TRI-Reagent («Sigma», США) согласно инструкции производителя. Для проведения обратной транскрипции к 2 мкг РНК добавляли 200 ед. обратной транскриптазы М-MLV («Promega», США), смесь дезоксирибонуклеотидилтрифосфатов (dNTP) в концентрации 1,25 ммоль каждого и смесь специфических обратных праймеров в концентрации 25 пкмоль каждого (табл. 1) в общем объеме 50 мкл. Праймеры подбирались с помощью программы Primer-Master-1 таким образом, чтобы длина продукта при прохождении реакции на кДНК и ядерной ДНК была разной. В качестве внутреннего стан-

Таблица 1. Специфические праймеры для ОТ-ПЦР

Ген	Праймер	Последовательность	Температура отжига, °С	Длина продукта, п.о.*
VEGF-A	прямой обратный	5'-gaccctggctttactgctgta-3' 5'-gtgaggtttgatccgcatgat-3'	58	303
VEGF-C	прямой обратный	5'-aacgtgtccaagaatcagcc-3' 5'-agtcctctcccgcagtaatcc-3'	61	388
VEGFR-1	прямой обратный	5'-gaagcggttcacctggactgagacc-3' 5'-ggctttgctgggggatttctctaa-3'	65	432
VEGFR-2	прямой обратный	5'-acagacagtgggatggctcttgcacat-3' 5'-aaacaggaggtgagctgcagtgtgg-3'	66	272
VEGFR-3	прямой обратный	5'-cagacagacagcgggatgggtgc-3' 5'-aggctgtagtgggggtgggaca-3'	66	411
NRP-1	прямой обратный	5'-tggtctggatgggtgtgggc-3' 5'-aagagaggaaaaagggggct-3'	64	865
NRP-2	прямой обратный	5'-ttcgatcctgttccagcga-3' 5'-ggcatggtcgtacaccaac-3'	64	300
β-Актин	прямой обратный	5'-atggatgacgatatcgct-3' 5'-atgaggtagtctgctcaggt-3'	56	568

* п.о. – Пара оснований.

дарту прохождения обратной транскрипции использовали β -актин. Для проведения ПЦР к 2 мкл кДНК добавляли 5 ед. Таq-полимеразы («Медиген», Россия), прямой и обратный праймеры в концентрации 10 пкмоль каждого, смесь dNTP (0,8 ммоль каждого) и 2–6 ммоль $MgCl_2$ (в зависимости от пары праймеров) в конечном объеме составила 25 мкл. Начальную денатурацию проводили при 94° в течение 5 мин. Каждый цикл ПЦР состоял из денатурации (94° – 30 с), гибридизации (56–66° – 30 с; температура подбиралась индивидуально для каждой пары праймеров (табл. 1)) и элонгации (72° – 30 с). Для β -актина проводили амплификацию в течение 25, а для остальных факторов – 35 циклов в термоамплификаторе («Techne», Великобритания). Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Гели фотографировали цифровым фотоаппаратом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении синтеза мРНК VEGF-A и VEGF-C показано, что все исследованные нами клетки и ткани (резидентные перитонеальные макрофаги, лимфоциты лимфоузлов и тимоциты, а также ткани тимуса и легкого интактных мышей) экспрессируются генами обоих факторов (рисунок). Синтез VEGF-A и VEGF-C макрофагами – факт известный [6, 7]. Что же касается их синтеза лимфоцитами, то это не так очевидно. Была показана экспрессия мРНК VEGF-A Т-лимфоцитами селезенки мышей [8], стимулированных антигеном Т-лимфоцитов из лимфоузлов крыс [3], а также активированными Т-лимфоцитами периферической крови человека [9]. Кроме того, экспрессия мРНК VEGF-A и VEGF-C была выявлена в цельном тимусе [3, 10], однако синтез мРНК этих факторов изолированными тимоцитами, а также синтез мРНК VEGF-C лимфоцитами показан нами впервые.

При изучении экспрессии мРНК рецепторов VEGF ткань легкого, богатую сосудами, использовали в качестве положительного контроля, клетки гепатомы – как пример клеток неэндотелиального происхождения. В легком нами была выявлена экспрессия мРНК всех исследованных рецепторов (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 и NRP-2) (рисунок). Кроме того, экспрессия мРНК этих же рецепторов была показана в цельном тимусе и строме тимуса, что также может объясняться наличием сосудов в этой ткани. Аналогичный результат дало исследование клеток перитонеального экссудата и макрофагов.

Полученные нами данные согласуются с информацией об экспрессии мРНК VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 в перитонеальных макрофагах мышей и человека, а также макрофагоподобных клеточных линиях [11–13]. Данные по экспрессии мРНК NRP-1 и NRP-2 в макрофагах получены нами впервые.

На рисунке показано, что в пределах чувствительности использованного метода в клетках лимфоузлов и тимоцитах были экспрессированы мРНК всех исследованных нами рецепторов, кроме VEGFR-1. Авторами [3] было продемонстрировано наличие мРНК VEGFR-2 и отсутствие мРНК VEGFR-1 в Т-лимфоцитах лимфоузлов крыс, что согласуется с полученными нами результатами. Вместе с тем существуют сведения о наличии синтеза мРНК обоих рецепторов в Т-лимфоцитах селезенки мышей [8]. Возможно, это отражает различия популяционного состава Т-лимфоцитов периферических лимфоузлов и селезенки. Экспрессия мРНК VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 и -2 в тимоцитах, а также мРНК VEGFR-3, NRP-1 и -2 в клетках лимфоузлов обнаружена нами впервые.

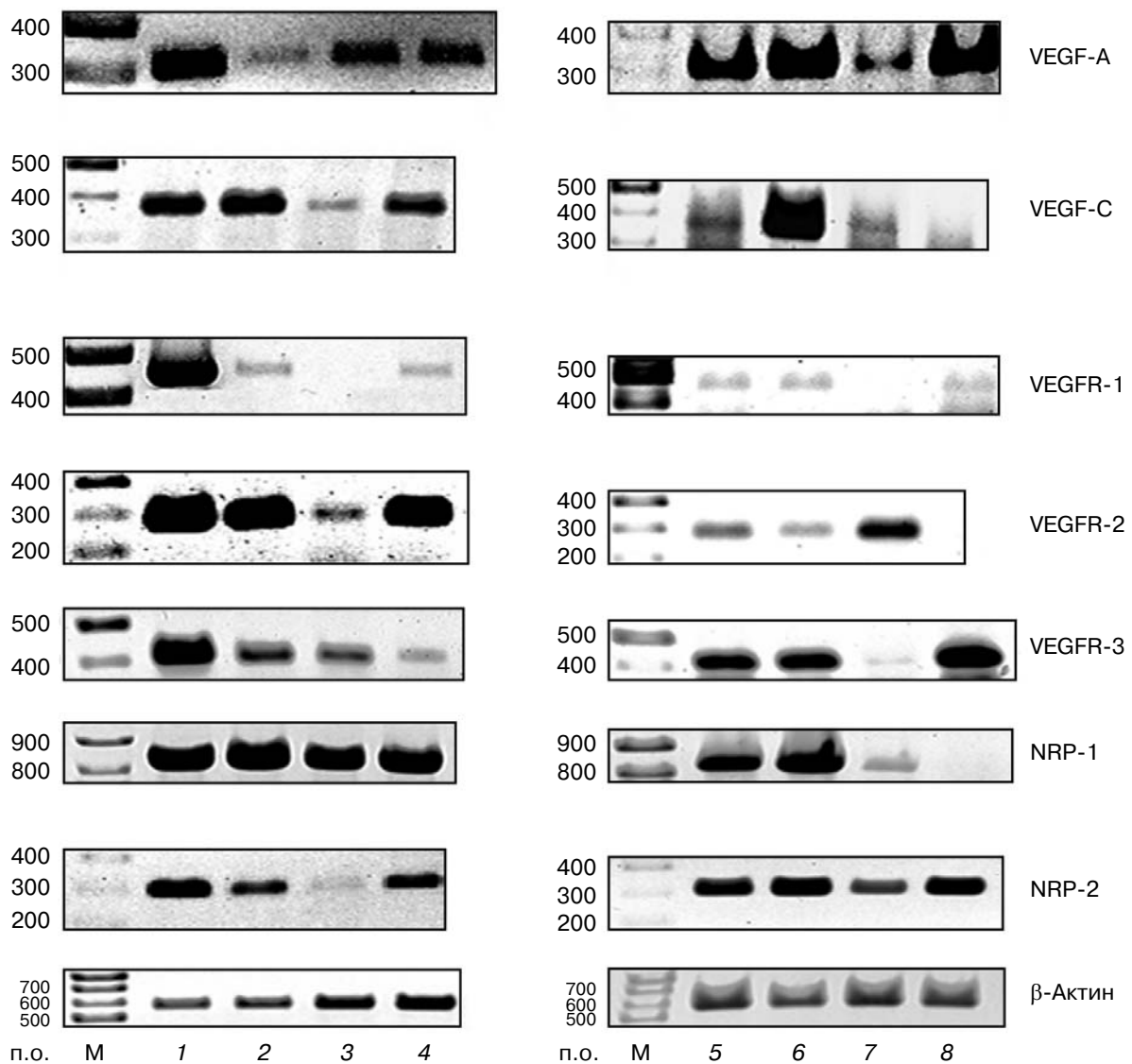
Таким образом, нами проведен комплексный анализ конститутивного синтеза мРНК рецепторов VEGF в клетках иммунной системы интактных мышей (табл. 2). Полученные данные существенно образом дополняют представления о распределении экспрессии генов рецепторов VEGF в разных клетках организма, и в частности в клетках иммунной системы. Однако роль факторов семейства VEGF в функционировании этих клеток изучена недостаточно.

Известно, что VEGF-A и VEGF-C являются хемоаттрактантами для моноцитов/макрофагов. VEGF-A привлекает моноциты крови в очаг воспаления и роста сосудов через взаимодействие с VEGFR-1 [2], в то время как на тканевых макрофагах оба рецептора (VEGFR-1 и VEGFR-2) опосредуют хемотаксическую активность [11, 13]. VEGF-C влияет на миграцию макрофагов через VEGFR-3 [14]. Известны лишь единичные исследования влияния VEGF-A на лимфоциты и тимоциты [3, 5], а влияние VEGF-C на эти клетки не изучалось.

Вместе с тем появляется все больше работ, в которых отмечена важная роль факторов роста сосудов в регуляции миграции клеток различного происхождения. Например, показано, что наличие рецепторов к факторам семейства VEGF на опухолевых клетках способствует их выживанию, усиливает способность к миграции и метастазированию [15]. При этом наличие рецепторов VEGF может опосредовать и противоположные эффекты. Показано, что повышенная экспрессия NRP-1 на клетках аденокарциномы

Таблица 2. Экспрессия мРНК VEGF-A, VEGF-C и их рецепторов в исследуемых клетках

Тип клеток	VEGF-A	VEGF-C	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NRP-1	NRP-2
Макрофаги	+	+	+	+	+	+	+
Клетки лимфоузлов	+	+	-	+	+	+	+
Тимоциты	+	+	-	+	+	+	+
Гепатома 22а	+	+	+	-	+	-	+



Экспрессия мРНК VEGF-A, VEGF-C и их рецепторов. М – маркер молекулярной массы, 1 – легкое, 2 – тимус цельный, 3 – изолированные тимоциты, 4 – строма тимуса, 5 – клетки перитонеального экссудата, 6 – перитонеальные макрофаги, культивированные 24 ч, 7 – изолированные лимфоциты лимфатических узлов, 8 – клетки гепатомы 22А

поджелудочной железы человека тормозит миграцию и пролиферацию опухолевых клеток, а подавление экспрессии этого корцептора, напротив, усиливает опухолевый рост [16]. Имеются также данные о том, что наличие рецепторов VEGF на клетках рака молочной железы является важной клинической характеристикой опухолевого роста и имеет прогностическое значение [17, 18].

В данной работе исследовали экспрессию генов VEGF-A и VEGF-C, а также их рецепторов на линии мышинных опухолевых клеток гепатомы 22a. Были обнаружены экспрессия мРНК как самих факторов, так и рецепторов VEGFR-1, VEGFR-3, NRP-2 и отсутствие мРНК VEGFR-2 и NRP-1 (рисунок). При сопоставлении клеток

гепатомы с лимфоцитами по их способности к синтезу мРНК рецепторов VEGF выявлены значительные различия в наборе экспрессированных генов рецепторов.

Таким образом, впервые показано, что тимоциты и клетки лимфоузлов интактных мышей конститутивно синтезируют мРНК ангиогенных факторов VEGF-A и VEGF-C, а также их основных рецепторов. Можно предположить, что факторы семейства VEGF помимо своих основных ангиогенных функций выполняют еще и важные медиаторные функции внутри иммунной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-48250).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003) *Nature Medicine*, **6**, 669–676.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marme, D. (1996) *Blood*, **87**, 3336–3343.
- Mor, F., Quintana, F.J., and Cohen, I.R. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 4618–4623.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998) *Blood*, **92**, 4150–4166.
- Huang, Y., Chen, X., Dikov, M.M., Novitskiy, S.V., Mosse, A., Yang, L., and Carbone, D.P. (2007) *Blood*, **110**, 624–631.
- Crowther, M., Brown, N.J., Bishop, E.T., and Lewis, C.E. (2001) *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 478–490.
- Maruyama, K., Masaaki, I., Cursiefen, C., Jackson, D.G., Keino, H., Torrita, M., van Rooijen, N., Takeriaka, H., D'Amore, P.A., Stein-Streilein, J., Losordo, D.W., and Streilein, J.W. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 2363–2372.
- Owen, L., Iragavarapu-Charyulu, V., Gunja-Smith, Z., Herbert, L.M., Grosso, J.F., and Lopez, D.M. (2003) *J. Immunol.*, **171**, 4340–4351.
- Ijima, K., Yoshikawa, N., Nakamura, H. (1996) *J. Immun. Meth.*, **196**, 199–209.
- Partanen, T.A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S.A., Achen, M.G., and Alitalo, K. (2000) *FASEB J.*, **14**, 2087–2096.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuta, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9349–9354.
- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D.S., Millican, S.A., Muller, K.H., Sharkey, A.M., and Smith, S.K. (1996) *J. Clin. Invest.*, **98**, 482–489.
- Yang, Z.F., Poon, R.T., Luo, Y., Cheung, C.K., Ho, D.W., Lo, C.M., and Fan, S.T. (2004) *J. Immunol.*, **173**, 2507–2515.
- Skobe, M., Hamberg, L.M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G.L., Alitalo, K., and Detmar, M. (2001) *Am. J. Pathol.*, **159**, 893–903.
- Wey, J.S., Fan, F., Gray, M.J., Bauer, T.W., McCarty, M.F., Somcio, R., Lui, W., Evans, D.B., Wu, Y., Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2005) *Cancer*, **104**, 427–438.
- Gray, M.J., Wey, J.S., Belcheva, A., McCarty, M.F., Trevino, J.G., Evans, D.B., Ellis, L.M., and Gallick, G.E. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 3664–3670.
- Жукова Л.Г., Жуков Н.В., Личиницер М.Р. (2003) *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **135**, 562–565.
- Щербачев А.М., Герштейн Е.С., Анурова О.А., Кушлинский Н.Е. (2005) *Вопр. онкологии*, **51**, 317–321.

**GENE EXPRESSION OF VEGF-A, VEGF-C,
AND THEIR RECEPTORS IN MURINE
LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES****O. I. Stepanova, A. V. Krylov, V. I. Liudyno, E. P. Kisseleva**

*Institute of Experimental Medicine, Russian
Academy of Medical Sciences, ul. Pavlova 12, St. Petersburg 197376,
Russia; fax: (812)234-9489, E-mail: ekissele@yandex.ru*

Received May 10, 2007

Revision received June 21, 2007

Vascular endothelial growth factors VEGF-A and VEGF-C are important angiogenic factors responsible for the growth of blood and lymphatic vessels in the organism. They also possess immunoregulatory properties. In this study VEGF-A, VEGF-C, and their receptor mRNA expression in lymphocytes and macrophages of intact mice were investigated. Using reverse transcription PCR assay, it was shown that resident peritoneal macrophages, thymocytes, and lymph node lymphocytes of intact mice can constitutively synthesize VEGF-A and VEGF-C. The expression of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, and NRP-2 mRNA was shown in macrophages, while in thymocytes and lymphocytes – all other receptor mRNAs except VEGFR-1. These data extend our knowledge on VEGF receptor distribution in different cells of the organism, particularly in the cells of the immune system. One can suppose that VEGF family members, in addition to their main angiogenic functions, also reveal important mediatory functions in the immune system.

Key words: VEGF-A, VEGF-C, VEGF receptors, angiogenesis, NRP-1, NRP-2