

# 血循环中 Tie2 mRNA 含量对脓毒症患者全身病情变化评价作用的研究

杨京 黄健 杨文琼 周建 蒋东坡 张耀宗 陈林

**【摘要】** 目的 探讨血循环中 Tie2 mRNA 含量是否与脓毒症全身病情变化存在相关关系。方法 选取重症监护病房(ICU)创伤患者,按是否为脓毒症分为脓毒症组(13例)和非脓毒症组(19例)。患者进入ICU当日进行急性生理学与慢性健康状况评分系统 I (APACHE I)评分;1、3、7 d 采集肘静脉血检测白细胞总数(WBC)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)含量;采用实时定量聚合酶链反应(PCR)检测血中 Tie2 mRNA 含量;用酶联免疫吸附法检测血浆血管性血友病因子(vWF)含量。结果 脓毒症组与非脓毒症组间 ALT、AST、vWF 含量比较差异均无统计学意义[ALT(U/L):53.30(199.58)比 80.65(202.62),AST(U/L):316.53(49.90)比 66.10(285.03),vWF:(272.47±114.61)%比(246.66±128.77)%,均  $P>0.05$ ]。脓毒症组 WBC、BUN、Cr 及血中 Tie2 mRNA 水平均显著高于非脓毒症组[WBC( $\times 10^9/L$ ):18.26(21.82)比 10.11(4.72),BUN(mmol/L):20.70(11.20)比 7.70(5.45),Cr( $\mu\text{mol/L}$ ):252.00(364.55)比 68.00(23.20),Tie2 mRNA:1.86±0.67 比 0.91±0.42,均  $P<0.01$ ]。所有患者 APACHE I 评分与血 Tie2 mRNA 水平呈显著正相关( $r=0.532, P<0.01$ ),其线形拟合方程为  $Y=12.66+4.922X$  ( $R^2=0.283$ );vWF 与 Tie2 mRNA 水平呈正相关( $r=0.334, P<0.05$ ),其线形拟合方程为  $Y=180.932+57.93X$  ( $R^2=0.112$ )。结论 脓毒症患者血循环中 Tie2 mRNA 水平能及时反映内皮细胞损伤程度和病情轻重,可作为一个相对敏感的病情预测候选指标。

**【关键词】** Tie2; 基因表达; 实时定量聚合酶链反应; 脓毒症

**Study on Tie2 mRNA level in peripheral blood associated with the severity of sepsis** YANG Jing\*, HUANG Jian, YANG Wen-qiong, ZHOU Jian, JIANG Dong-po, ZHANG Yao-zong, CHEN Lin. \* State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Corresponding author: CHEN Lin, Email: linchen70@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the possibility that the level of Tie2 mRNA in peripheral blood could reflect the severity of sepsis. **Methods** Trauma patients in intensive care unit (ICU) were recruited, and they were divided into sepsis group ( $n=13$ ) and non-sepsis group ( $n=19$ ). The severity of disease was evaluated with acute physiology and chronic health evaluation I (APACHE I) score on the day of ICU admission. Blood of patients was sampled on day 1, 3, 7 after ICU admission to determination of the white blood cell (WBC) count, contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr), mRNA levels of Tie2 in blood measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR), and the contents of plasma von Willebrand factor (vWF) with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** No significant difference in contents of ALT, AST and plasma vWF was found between sepsis group and non-sepsis group [ALT (U/L): 53.30 (199.58) vs. 80.65 (202.62), AST (U/L): 316.53 (49.90) vs. 66.10 (285.03), vWF: (272.47±114.61)% vs. (246.66±128.77)%, all  $P>0.05$ ]. The number of WBC ( $\times 10^9/L$ , 18.26 (21.82) vs. 10.11 (4.72)], the contents of BUN [mmol/L, 20.70 (11.20) vs. 7.70 (5.45)] and Cr [ $\mu\text{mol/L}$ : 252.00 (364.55) vs. 68.00 (23.20)], and the circulating mRNA levels of Tie2 (1.86±0.67 vs. 0.91±0.42) in sepsis group were higher than those in the non-sepsis group (all  $P<0.01$ ). The Tie2 mRNA level in peripheral blood of each patient was positively correlated with APACHE I score ( $r=0.532, P<0.01$ ). The linear regression equation was  $Y=12.66+4.922X$  ( $R^2=0.283$ ). Besides, there was a significant correlation between the amount of Tie2 mRNA and plasma levels of vWF ( $r=0.334, P<0.05$ ). The linear regression equation was  $Y=180.932+57.93X$  ( $R^2=0.112$ ). **Conclusion** The level of Tie2 mRNA in peripheral blood could reflect the damage of endothelial cell and severity of sepsis.

**【Key words】** Tie2; Gene expression; Quantitative real-time polymerase chain reaction; Sepsis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.06.012

基金项目:全军医药卫生科研基金项目(06G081)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院创伤实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(杨京、张耀宗、陈林), ICU(黄健、杨文琼、周建、蒋东坡) 通信作者:陈林,Email:linchen70@163.com

本课题组在前期的动物实验中利用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制了大鼠脓毒症模型,发现利用实时定量聚合酶链反应(PCR)检测的外周循环血 Tie2 mRNA含量可反映内皮细胞损伤标志物循环内皮细胞(CEC)的数量与全身炎症水平的高低<sup>[1]</sup>。尽管动物实验中使用 CLP 致脓毒症模型与临床脓毒症存在极高的相似性<sup>[2]</sup>,但动物实验与人体仍存在一定差异,如许多在动物模型中证明有效的抗炎药物并未在临床脓毒症患者的治疗中得到满意的效果,甚至完全没有作用<sup>[3-4]</sup>。故本研究中拟比较脓毒症患者与非脓毒症患者间 Tie2 mRNA 含量与全身病情、器官功能及其他内皮细胞损伤指标间的关系,以在临床患者中验证前期结果,也为找到新的能在临床中实际应用的反映脓毒症病情的指标奠定基础。

1 资料与方法

1.1 临床入选与排除标准:选择 2005 年 3 月至 12 月收入重症监护病房(ICU)的创伤患者,排除肿瘤、妊娠以及使用了免疫抑制剂或骨髓动员药物的患者。将入选患者按是否为脓毒症分为两组。脓毒症诊断符合文献<sup>[5]</sup>标准。所有病例在收入 ICU 的当日进行急性生理学与慢性健康状况评分系统 I (APACHE I)评分。本研究经医院伦理委员会批准,获得患者知情同意。

1.2 检测指标及方法:所有患者在收入 ICU 1、3、7 d清晨空腹采集静脉血,常规方法检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)含量及白细胞总数(WBC)。血浆血管性血友病因子(vWF)蛋白含量检测采用酶联免疫吸附法(ELISA),操作参照试剂盒(美国 Corgenix 公司)说明书进行。

1.3 外周血 Tie2 mRNA 检测:提取全血 RNA,进行逆转录反应,cDNA 保存于-70℃备用。Tie2、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列由上海生物工程公司合成。GAPDH:上游引物 5'-GAAGG TGAAGGTCGAGATC-3',下游引物 5'-GAAGAT GGTGATGGGATTTTC-3';Tie2:上游引物 5'-GTT CCAGGCAACTTGACTTCG-3',下游引物 5'-TG ACTCTAGCTCGGACCACGT-3'。PCR 反应体系

20 μl,含 2×PCR 缓冲液 10 μl、20 μmol/L 上游及下游引物各 0.5 μl、50×Rox 0.4 μl、cDNA 1 μl、ddH<sub>2</sub>O 7.8 μl。扩增条件参照试剂盒(大连宝生物工程公司)说明书设置,由定量 PCR 仪(Mx3000P,美国 Stratgene 公司)自动给出 c(t)值和 Tie2 mRNA 的相对含量值。

1.4 统计学分析:使用 SPSS 10.0 统计软件。计量指标以中位数(四分位间距)[M(Q<sub>R</sub>)]或均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用独立样本 t 检验,相关性用 Pearson 相关分析法,线性回归法拟合两变量间的回归方程。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料:32 例患者中男 28 例,女 4 例;年龄 21~64 岁。非脓毒症组 19 例,脓毒症组 13 例。脓毒症组原发创伤:坠落伤 1 例,刀刺伤 2 例,挤压伤 2 例,车祸伤 8 例;死亡 5 例患者,其中死于多器官功能衰竭 2 例,肺动脉栓塞 2 例,呼吸衰竭 1 例。

2.2 肝、肾功能及 WBC(表 1):脓毒症组 BUN、Cr 及 WBC 均显著高于非脓毒症组(均 P<0.01);两组 ALT、AST 比较差异无统计学意义(均 P>0.05)。

2.3 vWF(表 1):脓毒症组与非脓毒症组血浆 vWF 含量比较差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 Tie2 mRNA:脓毒症组血中 Tie2 mRNA 水平显著高于非脓毒症组(1.86±0.67 比 0.91±0.42, P<0.01)。

2.5 相关性分析(图 1):Pearson 相关分析显示,所有 32 例患者的血浆 vWF 水平与 Tie2 mRNA 含量呈显著正相关(r=0.334, P<0.05);其线形拟合方程为 Y=180.932+57.93X(R<sup>2</sup>=0.112)。32 例患者的 APACHE I 评分与 Tie2 mRNA 含量呈显著正相关(r=0.532, P<0.01);其线形拟合方程为 Y=12.66+4.922X(R<sup>2</sup>=0.283)。

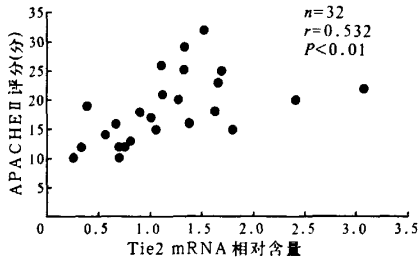
3 讨论

由于本院 ICU 的病源主要是严重创伤患者,故本组选择的病例均为创伤患者。将所有病例分为脓毒症组和非脓毒症组。结果显示,脓毒症组 BUN、Cr 显著高于非脓毒症组,但 AST、ALT 无显著差异。这可能由于非脓毒症组中有部分患者有原发的外伤

表 1 脓毒症与非脓毒症创伤患者肝、肾功能指标、WBC 及 vWF 含量比较

| 组别    | 例数 | ALT                      | AST                      | BUN                         | Cr                          | WBC[M(Q <sub>R</sub> ), | vWF                     |
|-------|----|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
|       |    | [M(Q <sub>R</sub> ),U/L] | [M(Q <sub>R</sub> ),U/L] | [M(Q <sub>R</sub> ),mmol/L] | [M(Q <sub>R</sub> ),μmol/L] | ×10 <sup>9</sup> /L]    | ( $\bar{x} \pm s, \%$ ) |
| 脓毒症组  | 13 | 53.30(199.58)            | 316.53(49.90)            | 20.70(11.20)*               | 252.00(364.55)*             | 18.26(21.82)*           | 272.47±114.61           |
| 非脓毒症组 | 19 | 80.65(202.62)            | 66.10(285.03)            | 7.70(5.45)                  | 68.00(23.20)                | 10.11(4.72)             | 246.66±128.77           |

注:WBC:白细胞总数,vWF:血管性血友病因子,ALT:丙氨酸转氨酶,AST:天冬氨酸转氨酶,BUN:尿素氮,Cr:肌酐;与非脓毒症组比较,\*P<0.01



注: APACHE I 评分: 急性生理学及慢性健康状况评分系统 I 评分

图 1 32 例创伤患者外周血 Tie2 mRNA 含量与 APACHE I 评分的相关性

性肝损伤,影响了肝功能指标组间差异的比较。

本研究发现脓毒症患者血中 Tie2 mRNA 含量显著高于非脓毒症组;而我们在前期的动物实验中发现,大鼠脓毒症模型中外周血 Tie2 mRNA 含量与 CEC 的数量相关,这与 Rafat 等<sup>[6]</sup>得到脓毒症患者 CEC 数量高于非脓毒症患者的结果类似,进一步提示 Tie2 mRNA 亦能反映 CEC 数量的变化。由于内皮细胞是炎症反应中的主要靶器官<sup>[7-8]</sup>,血管内皮功能在脓毒性休克中发生改变;也有大量体外实验表明,用脂多糖或促炎细胞因子处理内皮细胞会启动一系列的分子机制,导致细胞功能障碍和损伤。虽然有研究表明创伤评分 >20 分的严重多发伤患者 CEC 数量与评分呈正相关<sup>[9]</sup>;但本研究发现部分脓毒症组患者的原发伤并不严重,而其 Tie2 mRNA 含量仍然较高。这可能是由于机械应力对血管内皮的损伤是一过性和短暂的,病程后期的炎症反应才是主要的致伤因素。

本研究中还检测了血浆中内皮细胞特异性蛋白 vWF 的含量。vWF 主要在内皮细胞合成、表达,血小板也可少量合成。内皮细胞损伤后 vWF 可释放入血,是内皮细胞损伤/功能障碍的常用血浆标志蛋白。有人在动脉粥样硬化<sup>[10]</sup>和急性心力衰竭<sup>[11]</sup>患者中比较了免疫磁珠法测量得到的 CEC 数量和血浆 vWF 水平,发现二者间存在明显的相关关系。本研究中也发现 Tie2 mRNA 水平与 vWF 含量存在明显的相关性,进一步提示了血循环中 Tie2 mRNA 含量与 CEC 数量的高度一致性。

由于有研究提示 CEC 数量与脓毒症的严重程度呈正相关<sup>[6]</sup>,本研究中采用了 APACHE I 评分系统来评价患者的病情轻重,并将其与循环 Tie2 mRNA 水平进行相关分析。结果发现二者存在显著的正相关关系,这进一步提示血中 Tie2 mRNA 含量可作为一个新的病情评估指标。APACHE I 评分

系统是由美国华盛顿大学医学中心 Knaus 经数年时间对数千份病例研究后推出的,在评价病情和预后方面得到了临床的广泛使用、推广,但是需要的参数较为繁琐<sup>[12]</sup>。实时定量 PCR 检测 Tie2 mRNA 含量比起评分系统具有快捷、简便的优点。并且可以使用冻存血样进行,便于大量样本间比较的标准化。但是后者也有一些不足之处,如在一些不以血管内皮作为损伤靶器官的疾病中会限制其应用。

综上所述,本研究结果显示,通过使用实时定量 PCR 检测血中内皮细胞标记基因 Tie2 mRNA 含量是一种简便的、能够反映血管内皮细胞损伤程度的方法。与 APACHE I 评分系统相比,Tie2 mRNA 能更快捷、简便地反映全身病情变化。在临床常规监测指标、评分系统的基础上检测血循环 Tie2 mRNA 含量可能有助于判断脓毒症患者的病情变化。

#### 参考文献

- [1] Yang J, Huang J, Zhang YZ, et al. Tie2 mRNA in peripheral blood: a new marker to assess damage of endothelial cells in a rat model of sepsis. Chin J Traumatol, In press 2010.
- [2] Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. J Leukoc Biol, 2007, 81: 137-143.
- [3] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat Med, 2003, 9: 517-524.
- [4] Hoesel LM, Ward PA. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. Drug Discovery Today, 2004, 1: 345-350.
- [5] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 321-324.
- [6] Rafat N, Hanusch C, Brinkkoetter PT, et al. Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival. Crit Care Med, 2007, 35: 1677-1684.
- [7] Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. Crit Care Med, 2002, 30: 207-213.
- [8] Volk T, Kox WJ. Endothelium function in sepsis. Inflamm Res, 2000, 49: 185-198.
- [9] 周健, 林水金, 杨映波, 等. 严重多发伤后循环内皮细胞体外培养及其影响因素. 第三军医大学学报, 1998, 20: 21-23.
- [10] Makin AJ, Blann AD, Chung NA, et al. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells, relationship with von Willebrand factor and tissue factor. Eur Heart J, 2004, 25: 371-376.
- [11] Chong AY, Lip GY, Freestone B, et al. Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin. Eur J Heart Fail, 2006, 8: 167-172.
- [12] 肖军, 钟荣, 叶桂山. APACHE I, SAPS I 及 LODS 3 种评分系统在单一重症监护室的应用比较. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 743-747.

(收稿日期: 2010-01-08)

(本文编辑: 李银平)

## 的研究

作者: 杨京, 黄健, 杨文琼, 周建, 蒋东坡, 张耀宗, 陈林, YANG Jing, HUANG Jian, YANG Wen-qiong, ZHOU Jian, JIANG Dong-po, ZHANG Yao-zong, CHEN Lin

作者单位: 杨京, 张耀宗, 陈林, YANG Jing, ZHANG Yao-zong, CHEN Lin (400042重庆, 第三军医大学大坪医院创伤实验室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室), 黄健, 杨文琼, 周建, 蒋东坡, HUANG Jian, YANG Wen-qiong, ZHOU Jian, JIANG Dong-po (第三军医大学大坪医院创伤实验室ICU, 重庆, 400042)

刊名: 中国危重病急救医学 **ISTIC PKU**

英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE

年, 卷(期): 2010, 22(6)

被引用次数: 0次

## 参考文献(12条)

1. 姚咏明; 盛志勇; 林洪远 脓毒症定义及诊断的新认识[期刊论文]-中国危重病急救医学 2004(6)
2. Hoesel LM; Ward PA Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis 2004
3. Riedemann NC; Guo RF; Ward PA Novel strategies for the treatment of sepsis 2003
4. Rittirsch D; Hoesel LM; Ward PA The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis 2007
5. Yang J; Huang J; Zhang YZ Tie2 mRNA in peripheral blood: a new marker to assess damage of endothelial cells in a rat model of sepsis 2010
6. Makin AJ; Blann AD; Chung NA Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells, relationship with von Willebrand factor and tissue factor 2004
7. 周健; 林水金; 杨映波 严重多发伤后循环内皮细胞体外培养及其影响因素 1998
8. Volk T; Kox WJ Endothelium function in sepsis 2000
9. Henneke P; Golenbock DT Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells 2002
10. Rafat N; Hanusch C; Brinkoetter PT Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival 2007
11. 肖军; 钟荣; 叶桂山 APACHE II、SAPS II及LODS 3种评分系统在单一重症监护室的应用比较[期刊论文]-中国危重病急救医学 2006(12)
12. Chong AY; Lip GY; Freestone B Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin 2006

## 相似文献(10条)

1. 期刊论文 孙青芳, 卞留贯, 濮春华, 赵卫国, 沈建康, 丁美修, 张天锡 脑血管畸形中受体酪氨酸激酶TIE2基因的研究 -中国临床神经科学2003, 11(1)  
目的: 观察受体酪氨酸激酶TIE2基因在脑血管畸形中的表达及突变. 方法: 57例脑血管病(46例脑AVMs)、36例正常人抽取外周静脉血6 mL提取基因组DNA; 其中14例AVMs显微外科手术切除AVM及AVM周围脑组织和8例正常脑血管标本, 分别提取总RNA和4%PFA-PBS固定石蜡包埋. 采用原位杂交、PCR-SSCP分析TIE2受体在脑血管畸形中的变化. 结果: 部分AVMs和AVMs周围脑组织有受体酪氨酸激酶TIE2 mRNA表达, 在“动脉”和“静脉”之间没有明显差别; SSCP电泳结果显示2例AVMs电泳迁移率与正常对照有差别, 与受体酪氨酸激酶TIE2阳性质粒DNA一致. 结论: 脑AVMs中有受体酪氨酸激酶TIE2 mRNA表达, 受体酪氨酸激酶TIE2可能参与脑AVMs的发生.
2. 期刊论文 杨春光, 李霞辉, YANG Chunguang, LI Xiahui TIE2受体基因在野百合碱诱导的肺动脉高压中的表达 -中国医药导报2010, 07(30)  
目的: 探讨TIE2受体蛋白在野百合碱诱导的肺动脉高压中的作用. 方法: 应用野百合碱诱导的慢性肺动脉高压大鼠模型, 免疫组化观察肺动脉构型重建及细胞凋亡, 应用RT-PCR技术检测大鼠肺动脉TIE2 mRNA表达. 结果: 野百合碱大鼠肺动脉压明显升高, 免疫组化观察到肺血管重构及内皮细胞层Caspase-3蛋白表达, 野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠肺血管TIE2 mRNA表达明显减少. 结论: 在野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠模型中, 肺血管重构, 内皮细胞损伤凋亡可能与肺血管TIE2受体表达降低有关.

### 3. 学位论文 [董春娟 Notch和Ang/Tie2信号系统在急性髓系白血病患者血管新生中相关关系研究](#) 2009

研究背景:

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是严重危害人类健康的血液系统恶性疾病。血管新生是指在已有血管床基础上新毛细血管高度有序形成的复杂过程, 不仅在实体瘤的生长、播散和转移中起重要作用, 而且对AML疾病进展及不良预后具有重要意义。近年来研究显示, Notch和Ang/Tie2信号通路是影响肿瘤血管新生的两条重要通路。目前研究显示Notch和Ang/Tie2信号通路在血管内皮细胞中的表达存在一定联系, 但在肿瘤细胞中二者是否存在相互作用及其具体机制尚无报道。白血病患者骨髓微环境中存在Notch和Ang/Tie2信号通路的异常激活, 已有学者报道Ang及其受体在AML异常血管新生中的表达情况, 然而不同的研究小组所得的结论不尽相同。Notch和Ang/Tie2信号通路在调节AML血管新生中的作用及其相互关系尚不清楚, 有待于进一步研究。

目的:

检测AML患者外周血单个核细胞中Notch1、Ang-1、Ang-2和Tie2基因的表达, 探讨Notch和Ang/Tie2信号通路相关基因在调节AML骨髓微环境血管新生的作用及其相互关系, 明确Notch和Ang/Tie2信号通路在AML血管新生中的相互关系及可能机制, 为研究AML骨髓血管新生的具体机制提供实验室基础。

方法:

1. 研究对象的选择: 选取40例初诊AML患者, 以40例健康志愿者作为对照。
2. 收集研究对象外周血单个核细胞, 提取RNA, 逆转录成cDNA后应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (realtime Q-RT-PCR) 方法检测外周血单个核细胞Notch1、Ang-1、Ang-2和Tie2基因的表达情况, 同时以GAPDH为内参照。
3. 采用Wilcoxon秩和检验及Spearman秩相关分析对数据分别进行差异性及相关性分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果:

1. 初诊AML患者外周血单个核细胞Notch1和Ang-2表达高于对照组, Ang-1和Tie2的表达与对照组比较差异无统计学意义。
2. 初诊AML患者Notch1和Ang-2呈正相关, 而对照组Notch1和Ang-2无相关性。

结论:

1. 初诊AML患者中存在Notch信号通路的异常激活, 表现为Notch1的表达上调;
2. 初诊AML患者中存在Ang/Tie2信号通路的异常激活, 表现为Ang-2的上调;
3. 初诊AML患者中Notch和Ang/Tie2通路协同表达增强, 二者之间存在相互关联并共同参与调节AML骨髓微环境血管新生。

### 4. 外文期刊 [Hata K, Udagawa J, Fujiwaki R, Nakayama K, Otani H, Miyazaki K Expression of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, and Tie2 Genes in Normal Ovary with Corpus luteum and in Ovarian Cancer.](#)

Objective: The recent discovery of angiopoietin-1 (Ang1) and angiopoietin-2 (Ang2) has provided novel and important insights into the molecular mechanisms of blood vessel formation. Ang1 and Ang2 bind with similar affinity to the endothelial cell tyrosine kinase receptor Tie2. Our purpose was to assess the potential role of the Ang/Tie2 system in physiological and pathological angiogenesis in the ovary. Methods: Ang1, Ang2, and Tie2 gene expression in 14 normal ovaries with corpus luteum (CL) and in 19 cases of ovarian cancer were analyzed by polymerase chain reaction of RNA after reverse transcription. The level of each gene expression was presented by the relative yield of each gene to the beta(2)-microglobulin gene, respectively. Furthermore, cellular distribution of Ang1 and Ang2 mRNA was examined by in situ hybridization, and localization of Tie2 was studied by immunohistochemistry. Results: The Ang1, Ang2, and Tie2 gene expression in normal ovary with CL ranged from 0.18 to 1.06 (median 0.54), 0.31-2.64 (median 1.01), and 0.10-0.47 (median 0.20), respectively. The expression of these same genes in ovarian cancer ranged from 0.06 to 0.75 (median 0.14), 0.69-1.59 (median 1.12), and 0.04-0.35 (median 0.15), respectively. Ang1 gene expression in normal ovary with CL was significantly higher than that in ovarian cancer ( $p = 0.0004$ ). The gene expression levels of Ang2 and Tie2 were statistically the same in both groups. There was a significant correlation between Ang1 gene expression and Tie2 gene expression in normal ovary with CL ( $r = 0.619, p = 0.018$ ). No such significant correlation was found in ovarian cancer. Moreover, Ang2 gene expression showed no significant correlation with the Tie2 gene expression either in normal ovary with CL or in ovarian cancer. Transcripts for Ang1 were observed in CL cells and endothelial cells around CL, and in tumor cells and endothelial cells at the periphery of tumor invasion. Ang2 transcripts were expressed in the same patterns. Tie

### 5. 外文期刊 [Hata K, Nakayama K, Fujiwaki R, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K Expression of the angopoietin-1, angopoietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer.](#)

Objective. Angiopoietin/Tie2 system with vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to be important for the initiation of angiogenesis in tumors. The aim was to evaluate whether angiopoietin/Tie2 system with VEGF affects prognosis in patients of epithelial ovarian cancer. Methods. Angiopoietin-1 (Ang-1), Angiopoietin-2 (Ang-2), Tie2, and VEGF gene expression were analyzed by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 85 epithelial ovarian cancer surgical specimens. These gene expressions were correlated with clinical-pathological parameters, microvessel density (MVD), and patients' survival. Results. Ang-1/Ang-2 gene expression ratio, VEGF, and Tie2 gene expression significantly associated with MVD, respectively ( $P < 0.0001, P = 0.024, P = 0.005$ ). The patients with low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and high VEGF gene expression were found to have a significantly higher MVD when compared to others ( $P = 0.0003$ ). Moreover, there was a significant difference between the values of MVD in patients with low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and high VEGF and high Tie2 gene expression and those in others ( $P = 0.0025$ ). FIGO stage ( $P = 0.014$ ), residual disease ( $P = 0.042$ ), histological grade ( $P = 0.028$ ), Ang-1/Ang-2 gene expression ratio ( $P = 0.010$ ), and combination of Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and VEGF gene expression ( $P = 0.019$ ), were found to be significantly associated with a poor prognosis in univariate Cox regression analysis. Multivariate Cox regression analysis revealed that FIGO stage is an independent prognostic factor ( $P = 0.035$ ). Low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio had a tendency to be an independent prognostic factor ( $P = 0.061$ ). Conclusion. Angiogenesis occurred by angiopoietin/Tie2 system in concert with VEGF in epithelial ovarian cancer did not affect patients' survival. However, gene expression of Ang-1 and Ang-2 might present a pertinent diagnostic tool to select a high-risk group of patients i

### 6. 期刊论文 [赵明光, 陈游力, 高永中, 浦佩玉, 魏学忠, ZHAO Ming-guang, CHEN You-li, GAO Yong-zhong, PU Pei-yu,](#)

[WEI Xue-zhong 缺氧时脑动静脉畸形血管内皮细胞中酪氨酸激酶受体Tie2的表达](#) - [中国神经精神疾病杂志](#)

2005, 31 (6)

目的探讨缺氧条件下体外培养的人脑动静脉畸形(cAVM)血管内皮细胞中酪氨酸激酶受体Tie2基因表达。方法采用组织块贴壁法对cAVM血管内皮细胞进行培养和形态学观察。免疫组化方法检测细胞中第8因子相关抗原(FVIII-RA)表达。选用RT-PCR技术观察静态和缺氧状态下(体积分数95%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>; 2 h, 4 h, 8 h)血管内皮细胞Tie2 mRNA表达, 同时以免疫组化方法分析每组细胞Tie2蛋白相对含量。结果培养的活细胞具有单层“卵石样”排列的典型特征, 95%以上的细胞为FVIII-RA阳性染色。血管内皮细胞Tie2 mRNA和蛋白表达在缺氧2h开始升高( $P < 0.05$ ), 并持续至缺氧8 h ( $P < 0.05$ )。结论缺氧在基因转录水平诱导体外培养的cAVM血管内皮细胞中Tie2表达, 提示缺氧可能与cAVM血管内皮细胞的增殖活性有关系。

## 7. 学位论文 [吴世卿 RNA干扰酪氨酸激酶受体2对人脐静脉内皮细胞增殖的影响](#) 2009

早在1971年, Folkman就提出了肿瘤生长具有血管生成依赖性这一概念, 以后陆续有实验研究表明, 肿瘤连续性生长必需有血管形成, 当实体瘤生长到直径为2mm时, 如继续生长, 就需要血管供应的保障, 瘤细胞可能产生一种肿瘤血管生长因子促进血管内皮细胞的分裂, 出现新的毛细血管, 进而沟通血流, 进入肿瘤组织内, 保证瘤组织的氧和营养, 同时, 新生血管为肿瘤代谢产物的排除提供了途径, 因此, 血管生成是肿瘤侵袭性生长、转移的基础。抗肿瘤的血管形成治疗, 尤其是抗肿瘤的血管形成基因疗法、寻找最佳抗肿瘤血管形成的靶位成了当今肿瘤治疗研究的一个热点。

血管内皮细胞在肿瘤血管生成中起着极为重要的作用。机体的血管形成有两种方式: 血管发生和血管生成。血管发生是胚胎发育过程中成血管细胞发展、形成原始血管的过程, 包括内皮细胞分化、增殖、迁移、连接并形成原始血管丛等。血管生成是原始血管丛或已存在的血管经发芽或其他方式形成新血管的过程, 包括内皮细胞降解细胞外基质, 并通过趋化移动、增殖, 形成新血管等过程。因此, 以血管内皮细胞为靶点的抗血管新生治疗已成为肿瘤治疗的研究热点。针对肿瘤血管内皮细胞抗肿瘤血管生成有以下优势: ①血管内皮细胞基因组较为稳定, 针对血管内皮细胞治疗不易获得耐药; ②正常成熟组织毛细血管内皮细胞处于静止状态, 而肿瘤血管内皮细胞增殖活跃, 出现许多相对特异标记分子, 如整合素 $\alpha$ V $\beta$ 3、E-选择素、VEGF受体及Tie<sub>2</sub>, 它们的表达较正常静止内皮细胞高50倍以上, 是抗肿瘤血管生成的分子。③从理论上推算一个内皮细胞要饲养50-100个肿瘤细胞, 针对血管内皮细胞比直接针对肿瘤细胞治疗更为有效。④肿瘤生成血管依赖性是所有肿瘤共有的, 理论上适合各种肿瘤。

人脐静脉内皮细胞具有分化潜能和新生血管内皮细胞的特性, 且它对包括炎症因子在内的多种体内因子均有很好的反应性, 与动物血管内皮细胞相比, 可使实验条件和所获得结果更符合人体情况。因而, 人脐静脉内皮细胞是研究肿瘤血管内皮细胞理想细胞模型。

Tie<sub>2</sub>是近年来新发现的除血管内皮细胞生长因子(VEGF)之外的另一参与血管生成调控的主要基因, 其几乎完全由血管内皮细胞表达的酪氨酸激酶受体, 对血管内皮细胞的增殖、水解基底膜、迁移和血管构建的调控作用较强且特异性高。有研究报道缺乏Tie<sub>2</sub>基因的小鼠往往死于胚胎期的血管发育障碍, 提示Tie<sub>2</sub>在血管生成中起重要的调节作用。研究表明, 部分对阻断VEGF途径无生物反应的肿瘤常表达Tie<sub>2</sub>, 而单独阻断Tie<sub>2</sub>途径可抑制这一部分的肿瘤生长, 提示Tie<sub>2</sub>和VEGF信号通路是调控肿瘤生长的两条独立的途径。

RNA干扰是特异性基因表达沉默的强有力手段之一, 其广泛存在于真核生物中, 是生物体在进化上的一种保守的基因组水平的免疫监控机制。具有高度特异性、高效率、放大效应并可遗传的特点。作为一种新的反向遗传学研究基因功能的方法克服了正向遗传学中预测性基因功能分析的存在假阳性结论的缺点, 这种高通量的基因沉默技术能够抑制生物体基因组内每一条基因的表达, 从整体系统地研究基因的功能及不同基因间的关系。

为了进一步探讨Tie<sub>2</sub>基因对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响, 为后期进行体内抑制肿瘤血管生成的动物实验研究奠定基础, 为肿瘤的基因治疗提供实验依据, 本实验采用RNA干扰技术, 通过阳离子脂质体LIPOFECTAMINE2000介导, 将含有针对Tie<sub>2</sub>的特异性shRNA转染人脐静脉内皮细胞HUEVCs中。采用实时定量RT-PCR、免疫细胞化学染色及Western blot检测各组HUEVCs中Tie<sub>2</sub>的mRNA及蛋白表达的改变情况, MTT法检测HUEVCs的生长曲线变化, 并在显微镜下观察细胞凋亡情况。

研究内容共分为四章: 第一章人脐静脉内皮细胞的分离纯化及鉴定; 第二章Tie<sub>2</sub>在HUEVCs中的表达及意义; 第三章pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒的构建及鉴定; 第四章pGenesil1.1-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒干扰HUEVCs中Tie<sub>2</sub>表达及其对HUEVCs增殖的影响。

### 第一章人脐静脉内皮细胞的分离纯化及鉴定。

#### 1. 目的:

体外分离培养HUEVCs, 并鉴定所培养的细胞为血管内皮细胞。

#### 2. 方法:

从中南医科大学第一附属医院妇产科获取健康新鲜足月剖宫产胎儿脐带, 以酶消化法获得HUEVCs并进行培养, 制备细胞爬片, 同时设置阴性对照, 经免疫细胞荧光技术鉴定, 根据参考相关文献制定判定标准, 证明所培养细胞为血管内皮细胞。

#### 3. 结果:

以酶消化法可获得以HUEVCs为主的混合细胞悬液, 经反复贴壁法分离纯化内皮细胞, VIII因子免疫荧光化学法显示分离纯化所获得的HUEVCs95%以上的细胞胞浆内有荧光表达, 证实了所纯化的细胞为血管内皮细胞。

### 第二章 Tie<sub>2</sub>在HUEVCs中的表达及意义。

#### 1. 目的:

检测HUEVCs中Tie<sub>2</sub> mRNA水平及蛋白表达水平。旨在探讨Tie<sub>2</sub>在体外血管生成中的作用。

#### 2. 方法:

收集生长良好的细胞, 计数, 按Trizol试剂盒说明抽提总RNA, Tie<sub>2</sub>mRNA的表达按照RT-PCR试剂盒说明书进行。免疫细胞化学染色检测HUEVCs中Tie<sub>2</sub>蛋白的表达水平; 以Tie<sub>2</sub>兔抗人多克隆抗体为一抗, 按SABC免疫组化试剂盒说明进行, DAB显色。每批次均以PBS代替一抗作阴性对照片一张, 以已知Tie<sub>2</sub>高表达的人脐静脉内皮细胞株ECV304和博士德公司提供的Tie<sub>2</sub>阳性片作阳性对照。结果按照Birner等报道的方法进行判定。

#### 3. 结果:

Tie<sub>2</sub>基因在体外培养的HUEVCs中呈高水平表达。

### 第三章 pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒的构建及鉴定。

#### 1. 目的:

构建pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒。

#### 2. 方法:

在NCBI数据库中查找Tie<sub>2</sub>的mRNA全序列, 根据shRNA设计原则, 设计能编码Tie<sub>2</sub>-shRNA的寡核苷酸链, 交武汉晶泰公司合成。根据pGenesil1.1-U6-shRNA质粒的结构图, 将pGenesil1.1用Eco31 I酶切使其线性化; 将稀释退火片段与线性化pGenesil1.1质粒表达载体的连接构建pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒; 重组质粒经酶切鉴定并测序证实与设计一致。

#### 3. 结果:

成功构建pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒, 经酶切及测序鉴定证实所构建的质粒与设计完全相符。

### 第四章 pGenesil1.1-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒干扰HUEVCs中Tie<sub>2</sub>表达及其对HUEVCs增殖的影响

#### 1. 目的:

探讨应用RNA干扰(RNAi)技术沉默Tie<sub>2</sub>基因, 观察其对脐静脉内皮细胞HUEVCs增殖活性的影响, 为将来进一步进行抑制肿瘤血管生成的动物实验研究奠定基础, 为肿瘤的基因治疗提供实验依据。

#### 2. 方法:

pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒通过LIPOFECTAMINE2000脂质体介导转染HUEVCs, 同时设计阴性对照和空白对照。采用实时定量RT-PCR、免疫细胞化学染色及Western blot检测各组HUEVCs中Tie<sub>2</sub>mRNA及蛋白表达的改变情况, MTT法(噻唑蓝比色分析法)检测HUEVCs的生长曲线变化, 显微镜下观察细胞凋亡情况并计算凋亡细胞数。

#### 3. 结果:

pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒转染HUEVCs后, 实验组细胞中Tie<sub>2</sub>mRNA表达低于两对照组, 而且实验组转染后48h的Tie<sub>2</sub>mRNA表达量较24h降低; Tie<sub>2</sub>蛋白表达明显低于阴性对照和空白对照组(P<0.05), 且实验组转染后48h的Tie<sub>2</sub>蛋白表达量显著低于实验组转染后24h(P<0.05); 而凋亡率显著高于两对照组(P<0.05); 生长曲线显示实验组细胞增殖活性较两对照组受到明显抑制(P<0.05)。

#### 全文结论:

(1) 胰蛋白酶消化法可获得大量高纯度的人脐静脉内皮细胞。第VIII因子相关抗原检测证实了所分离获得的细胞为血管内皮细胞。

(2) Tie<sub>2</sub>在HUEVCs中呈高水平表达。

(3) 成功构建pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒。

(4) pGenesil1.1-U6-Tie<sub>2</sub>-shRNA重组质粒在体外能够抑制HUEVCs的Tie<sub>2</sub>的mRNA和蛋白表达, 转染后的HUEVCs凋亡率明显比对照组高, 其增殖活性受到明显抑制。本研究为靶向肿瘤血管内皮细胞Tie<sub>2</sub>基因抑制肿瘤血管生长奠定了实验基础。

## 8. 期刊论文 [郭洁, 陈靖, 张敏敏, 钟建泳, 郝传明, 顾勇, GUO Jie, CHEN Jing, ZHANG Min-min, ZHONG Jian-yong, HAO](#)

[Chuan-ming, GU Yong](#) 血管新生调控因子及其受体随增龄在小鼠肾脏组织内的表达 -中华肾脏病杂志2009, 25(9)

目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)、血管生成素(Ang-1、Ang-2)及其受体(Tie2)在增龄小鼠肾脏中的表达,以及它们在肾脏衰老中的作用。方法 选取4月龄、9月龄、12月龄及20月龄C57小鼠各6只,留取尿液及血液标本,应用常规生化法测定各组小鼠肾功能。用PAS染色对各组小鼠进行肾脏病理染色及分析;荧光染料肾脏灌注对肾小球毛细血管密度进行分析。应用免疫组化、免疫荧光、Western印迹及实时定量PCR方法分析肾脏转化生长因子(TGF- $\beta$  1)及VEGF、VEGFR2(血管内皮生长因子受体2,Flk-1)、Ang-1、Ang-2、Tie2的蛋白及基因表达的变化。结果 随着增龄,小鼠肾小球硬化指数(GSI)增加,其中20月龄约为4月龄的5倍( $P<0.05$ )。荧光染料肾脏灌注后见肾小球毛细血管内荧光强度呈减少趋势,20月龄显著低于4月龄( $P<0.05$ )。免疫组化结果显示,TGF- $\beta$  1在肾小球及肾小管间质中的表达呈增多趋势,且以肾小球内增多较显著,各组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫荧光结果显示,Ang-1在肾小球内的表达呈减少趋势,20月龄较4月龄显著减少( $P<0.05$ )。实时定量PCR结果显示,不同月龄小鼠肾脏组织内VEGF、Flk-1、Ang-1、Ang-2、Tie2的mRNA表达水平均呈下降趋势,20月龄与4月龄间VEGF、Flk-1及Ang-2差异无统计学意义,而Ang-1和Tie2差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )。Western印迹结果显示,4组小鼠肾脏VEGF、Flk-1、Ang-1、Ang-2、Tie2的蛋白表达水平也呈下降趋势,且20月龄与4月龄差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );TGF- $\beta$  1的表达量呈增多趋势,其中20月龄较4月龄增多约40%( $P<0.05$ )。相关分析结果显示,肾小球毛细血管密度、Ang-1、Ang-2、Tie2、VEGF、Flk-1的mRNA及蛋白水平均与Scr呈负相关。结论 随衰老程度加重,小鼠肾脏组织内血管内皮生长因子及其受体、血管生成素及其受体的表达减少,且与增龄肾脏的形态学改变及肾功能改变相关。

## 9. 外文期刊 [Dube. A. Akbarali. Y. Sato. TN. Libermann. TA. Oettgen. P Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene \(see comments\)](#)

The Tie2 gene encodes a vascular endothelium-specific receptor tyrosine kinase that is required for normal vascular development and is also upregulated during angiogenesis. The regulatory regions of the Tie2 gene that are required for endothelium-specific gene expression in vivo have been identified. However, the transcription factors required for Tie2 gene expression remain largely unknown. We have identified highly conserved binding sites for Ets transcription factors in the Tie2 promoter. Mutations in 2 particular binding sites lead to a 50% reduction in the endothelium-specific activity of the promoter. We have compared the ability of several members of the Ets family to transactivate the Tie2 promoter. Our results demonstrate that 1 of 3 distinct isoforms of the novel Ets transcription factor NERF, NERF2, is expressed in endothelial cells and can strongly transactivate the regulatory regions of the Tie2 gene in comparison to other Ets factors, which have little or no effect. NERF2 can bind to the Tie2 promoter Ets sites in electrophoretic mobility shift assays. These studies support a role for Ets factors in the regulation of vascular-specific gene expression and suggest that the novel Ets factor NERF2 may be a critical transcription factor in specifying the expression of the Tie2 gene in vascular endothelial cells.

## 10. 外文期刊 [Ema. M. Yokomizo. T. Wakamatsu. A. Terunuma. T. Yamamoto. M. Takahashi. S Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo.](#)

Vascular endothelial (VE) cadherin, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31), Tie2, CD34, and endoglin are established markers for adult and embryonic endothelial cells (ECs). Here, we report that the expression of these EC markers is initiated in the extraembryonic region at the late-streak stage (nominal stage E6.75). Immunohistochemical analysis shows that EC marker-positive cells arise in a subset of Flk1 (VEGF-R2) mesodermal cells. In contrast, GATA1, a marker for primitive erythropoietic progenitors, is expressed in a more restricted subset of Flk1-positive cells. Using flow cytometry, we observed that the GATA1-positive cell population existed as a subset of the EC marker-positive cell. Consistent with this notion, we showed with the primitive hematopoietic colony assay that primitive erythropoietic progenitors are enriched in PECAM-1- and Tie2-positive cells. These results suggest that primitive hematopoietic cells arise from EC marker-positive cells. Thus, VE-cadherin, PECAM-1, CD34, endoglin, and Tie2 are expressed not only in adult and embryonic ECs but in extraembryonic Flk1-positive cells during gastrulation. The latter cell population includes progenitors that give rise to primitive hematopoietic cells, suggesting that primitive and definitive hematopoietic cells in the mouse embryo arise from EC marker-positive cells.

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwzbjyx201006012.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyx201006012.aspx)

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 3bd44eab-6c1f-44c9-bb5d-9ede016bd016

下载时间: 2011年5月9日