

· 论 著 ·

Alphastatin 多肽对胶质瘤血管生成拟态的抑制作用及其相关机制*

郭世文¹, 张 熙¹, 尉春艳²

(西安交通大学医学院: 1. 第一附属医院神经外科, 西安 710061; 2. 第二附属医院妇产科, 西安 710004)

摘要:目的 探讨 24 肽 Alphastatin 对胶质瘤血管生成拟态的抑制作用及其相关机制。方法 应用 MTT、Transwell 法、细胞三维培养和 Western blot 等方法检测 Alphastatin 对 SHG44 细胞增殖、迁移和血管形成能力的抑制作用及血管内皮生长因子(VEGF)、上皮细胞激酶(EphA2)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)蛋白的表达。结果 对照组细胞迁移数为 178.71 ± 18.81 , 实验组(100 nmol/L, 1 000 nmol/L, 10 000 nmol/L)细胞数目分别为 142.57 ± 12.12 , 92.71 ± 17.68 和 30.00 ± 7.72 , 对照组细胞数显著高于实验组($P < 0.01$); 对照组拟态血管数目为 56.80 ± 12.21 , 也显著高于实验组(47.71 ± 10.58 , 18.86 ± 8.40 , 8.43 ± 5.62), $P < 0.01$ 。Alphastatin 虽然能作用于 VEGF 通路, 却不能直接抑制 VEGF 蛋白的表达, 但是可明显抑制 EphA2 蛋白的磷酸化和 MMP2 蛋白的活化, 减少血管生成拟态的形成。结论 Alphastatin 不但可抑制肿瘤血管内皮细胞依赖性血管, 还能抑制血管生成拟态, 可能是理想的肿瘤血管抑制肽。

关键词: 血管生成拟态; Alphastatin 多肽; 增殖; 迁移; 血管形成

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)21-2084-03

The effect and the mechanism of alphastatin suppressing the vasculogenic mimicry formation of glioma*

Guo Shiwen¹, Zhang Xi¹, Wei Chunyan²

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and the mechanism of alphastatin suppressing the vasculogenic mimicry formation of glioma. **Methods** MTT, transwell and three-dimensional culture were used to detect the proliferation, migration and tubule formation of SHG44. The expression of VEGF, EphA2 and MMP2 was detected by western blot. **Results** The number of cell migration in control group was 178.71 ± 18.81 , significantly higher than that in experimental group (142.57 ± 12.12 , 92.71 ± 17.68 , 30.00 ± 7.72) ($P < 0.01$). The number of vasculogenic mimicry was 56.80 ± 12.21 , also significantly higher than that in experimental group (47.71 ± 10.58 , 18.86 ± 8.40 , 8.43 ± 5.62) ($P < 0.01$). In experimental group the phosphorylation of EphA2 protein and activation of MMP2 protein were much suppressed by alphastatin and there was no change in VEGF protein. **Conclusion** Alphastatin can suppress not only endothelial cell dependent blood vessel but also vasculogenic mimicry. It may be a ideal vaso-inhibitory peptide.

Key words: vasculogenic mimicry; alphastatin; proliferation; migration; tubule formation

血管生成拟态是近年来新发现的恶性肿瘤的血液供应形式, 它的管腔表面没有血管内皮细胞, 而是由肿瘤细胞被覆, 血液可在管腔内流动。学者们认为, 血管生成拟态仅仅存在于某些高度恶性肿瘤当中, 与肿瘤的恶性程度呈正相关。血管生成拟态的发现是对传统肿瘤血管生成的重要补充。传统的肿瘤血管抑制治疗仅仅针对肿瘤血管内皮细胞依赖性血管, 而血管生成拟态的发现使人们认识到, 只有同时抑制内皮细胞依赖性血管和血管生成拟态, 才能达到良好的治疗效果。本课题的前期研究进一步发现, II ~ III 级恶性胶质瘤经二氯化钴(CoCl_2) 缺氧诱导后, 也能形成拟态血管。如果仅仅针对血管内皮细胞进行肿瘤的血管抑制治疗, 不但不能达到良好的治疗效果, 反而会使肿瘤处于缺氧状态, 血管生成拟态代偿性增多, 进而增加肿瘤的侵袭力及转移能力, 增加肿瘤的恶性程度。Alphastatin 是人纤维蛋白氨基末端 24 肽, 具有潜在的肿瘤血管抑制作用。它能作用于肿瘤内异常的血管内皮细胞进而抑制肿瘤的血管生成, 对于正常的血管内皮细胞并没有破坏作用。Alphastatin 是否能抑制血管生成拟态的形成, 至今尚无相关报道。本研究拟采用三维培养、Western blot 等方法探讨 Alphastatin 对血管生成拟态的抑制作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人源恶性胶质瘤细胞株 SHG44 由第四军医大学神经外科研究所提供, Alphastatin 多肽由上海吉尔生化有限公司合成, 序列为 ADS GEG DFL AEG GGV RGP RVV ERH, Transwell 小室购自 Costar 公司, Matrigel 基质胶购自 BD 公司, 血管内皮生长因子(VEGF) 抗体, EphA2 抗体, EphA2 磷酸化抗体, MMP2 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法 细胞培养 SHG44 由含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养, 2 d 传代 1 次, 实验应用对数期生长细胞。

1.2.1 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT) 取对数生长期的 SHG44 细胞接种于 96 孔板, 每孔 5×10^3 个, 设立对照组和实验组, 每组 8 个复孔。细胞贴壁后, 对照组每孔加入 CoCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$, 实验组加入 CoCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$ 和不同浓度 Alphastatin 多肽(100、1 000 和 10 000 nmol/L)。在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 小心吸除培养液, 加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO), 低速震荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上检测 490 nm 的吸光值(OD)。

1.2.2 细胞迁移 将 SHG44 细胞加入 Transwell 小室的上

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672126)。

室中,每孔加入 2×10^4 个,上室中加入 1% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液 200 μ L 和 CoCl_2 100 μ mol/L,对照组下室加入 10% FBS 的 DMEM 培养液 600 μ L,实验组下室加入 10% FBS 的 DMEM 培养液 600 μ L 和不同浓度的 alphastatin 多肽(100、1 000 和 10 000 nmol/L)。12 h 后观察实验组与对照组的细胞迁移至小室聚碳脂膜内的细胞数。

1.2.3 细胞三维培养 将 Matrigel 基质胶与胎牛血清 1 : 1 混合后立即加入到 24 孔板中,每孔加入混合物 20 μ L。将培养板室温下放置 20 min,待胶凝固后,每孔加入 SHG44 细胞 1×10^4 个。将培养板置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞贴壁后,将细胞分为对照组和实验组,对照组每孔加入 CoCl_2 100 μ mol/L,实验组加入 CoCl_2 100 μ mol/L 和不同浓度 alphastatin 多肽(100、1 000、10 000 nmol/L)。观察各组 SHG44 细胞血管生成拟态的形成情况。

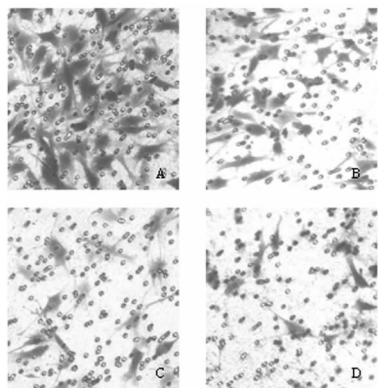
1.2.4 Western blot 检测 对照组和实验组设置同前,用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜。封闭 2 h 后分别与一抗孵育过夜,二抗孵育 1 h,化学发光显色,以 β -actin 为内参校正。

1.3 统计学处理 所得结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,多组均数比较采用方差分析,相关性比较采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Alphastatin 多肽不能抑制 SHG44 细胞的增殖 结果表明,对照组的 OD 值为 0.38 ± 0.03 ,实验组(100、1 000、10 000 nmol/L)OD 值分别为 0.34 ± 0.07 、 0.36 ± 0.07 、 0.37 ± 0.07 ,各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 Alphastatin 多肽能显著抑制 SHG44 细胞的迁移能力 Transwell 法显示对照组细胞数为 178.71 ± 18.81 ,实验组(100、1 000、10 000 nmol/L)细胞数目分别为 142.57 ± 12.12 、 92.71 ± 17.68 和 30.00 ± 7.72 ,对照组细胞数显著高于实验组,差异有统计学意义($P < 0.01$),细胞迁移数与 Alphastatin 剂量呈负相关($r = -0.965$, $P < 0.01$),见图 1。



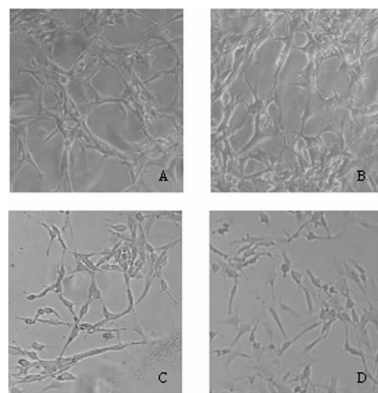
A: 对照组; B: 实验组(100 nmol/L); C: 实验组(1 000 nmol/L); D: 实验组(10 000 nmol/L)。

图 1 Alphastatin 对 SHG44 细胞迁移的抑制作用 ($\times 100$)

2.3 Alphastatin 能显著抑制 SHG44 细胞的管状形成数目 72 h 后发现,对照组中 SHG44 细胞互相融合,互相连接形成血管样结构,平均每视野管状数目为 56.80 ± 12.21 。实验组中血管样结构明显减少,并且随着 Alphastatin 浓度的升高拟态血管的数目逐渐降低,平均每视野管状数目分别为 47.71 ± 10.58 、 18.86 ± 8.40 和 8.43 ± 5.62 ($P < 0.01$)。管状数目与 Alphastatin 浓度呈负相关($r = -0.894$, $P < 0.01$),见图 2。

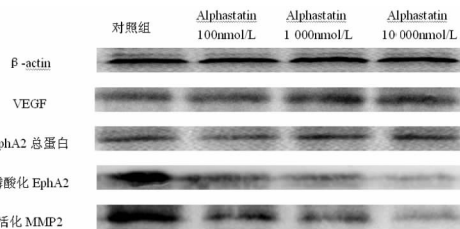
2.4 Western blot 检测结果 VEGF 蛋白和上皮细胞激酶(EphA2)总蛋白的表达并无明显变化,但是磷酸化 EphA2 蛋

白和基质金属蛋白酶 2(MMP2)活化蛋白的表达随着 Alphastatin 多肽浓度的增高而逐渐降低,见图 3。



A: 对照组; B: 实验组(100 nmol/L); C: 实验组(1 000 nmol/L); D: 实验组(10 000 nmol/L)。

图 2 Alphastatin 对 SHG44 拟态血管形成的抑制作用 ($\times 100$)



Alphastatin 并不能直接抑制 VEGF 蛋白的表达,但可明显抑制 EphA2 蛋白的磷酸化和 MMP2 蛋白的活化。

图 3 VEGF、EphA2、MMP2 蛋白的表达

3 讨 论

近年来,抑制血管生成治疗肿瘤是目前研究的热点^[1-2]。传统观念认为,肿瘤血管是血管内皮细胞依赖性的,因此,针对血管内皮细胞进行肿瘤血管抑制治疗是目前主要的治疗方法^[3]。理论上这种治疗方法对肿瘤血管抑制作用较强,几乎对所有实体瘤都有效,并且在治疗肿瘤的过程中不易产生耐药性。但是,在治疗过程中,肿瘤针对血管内皮细胞的治疗方法出现了不同程度的耐药性^[4-5]。如何提高肿瘤血管抑制治疗疗效,是目前研究的热点。

血管生成拟态是近年来新发现的存在于高度恶性肿瘤的一种微循环系统^[6-8]。它的管道内由一层肿瘤细胞而不是内皮细胞被覆,管腔内可见血细胞,有时可见一层 PAS 阳性的基质膜将肿瘤细胞和血细胞分开。血管生成拟态的发现使研究者认识到,肿瘤组织内部的血液供应系统并不仅仅是血管内皮细胞依赖性血管,还有其他形式的微循环结构。血管生成拟态的形成机制目前尚不清楚,主要认为与肿瘤细胞的可塑性相关。这种肿瘤细胞能够模仿内皮细胞的生物学行为,表达多种与内皮细胞相关的基因,如 VEGF、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、EphA2、MMPs 等^[9]。Wang 等^[10]认为 VEGF-EphA2-MMPs-VM 是卵巢癌血管生成拟态的关键通路。作者前期研究认为,缺氧能够诱导血管生成拟态的形成。针对血管内皮细胞的肿瘤血管抑制治疗使肿瘤细胞处于缺氧状态,肿瘤细胞可自行变形,连接形成拟态血管以满足肿瘤组织的营养。这可能是肿瘤对传统血管抑制治疗产生抗性的原因。只有同时抑制内皮细胞依赖性血管和拟态血管,才能彻底切断肿瘤的血液供应,达到治疗肿瘤的目的。

Alphastatin 是新发现的人纤维蛋白氨基末端 24 肽,具有

潜在的肿瘤血管抑制作用^[11]。研究表明,Alphastatin 能通过抑制 VEGF 通路和磷酸鞘氨醇(SIP-AKT)通路抑制肿瘤血管生成,对正常组织血管并没有抑制作用^[12-13]。Alphastatin 多肽能否抑制血管生成拟态,目前尚无相关研究。如果 Alphastatin 能同时抑制血管内皮依赖性血管和拟态血管,那它将是十分理想的血管抑制肽。

研究表明,Alphastatin 多肽虽然不能抑制 SHG44 细胞的增殖,但是可以抑制其细胞迁移能力和管道形成能力,并且抑制作用与浓度呈明显量-效关系,提示 Alphastatin 不但能抑制血管内皮细胞的迁移和血管腔的形成,还可能具有抑制血管生成拟态的功能,并且对正常血管无明显破坏作用。Western blot 检测表明 Alphastatin 不能直接作用于 VEGF 蛋白,但是可以抑制 EphA2 蛋白的磷酸化和 MMP2 蛋白的活化,减少层粘连蛋白 5 γ 2 切割片段 γ 2' 和 γ 2x 的形成,进而抑制血管生成拟态的形成。

综上所述,如果仅仅抑制血管内皮依赖性血管,拟态血管将发挥营养肿瘤的作用,不能达到治疗肿瘤的目的。Alphastatin 不但能抑制血管内皮细胞依赖性血管,还能抑制血管生成拟态,可能是良好的血管抑制治疗药物,但是 Alphastatin 对 SHG44 血管生成拟态的抑制作用还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] Folkman J. What is the evidence of that tumors are angiogenesis-dependent [J]. *Natl Cancer Int*, 1990, 82(1): 4-6.
- [3] Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas [J]. *Current Opinion in Oncology*, 2008, 20: 652-661.
- [4] Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas [J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7: 1152-1160.

(上接第 2083 页)

- regulation of immunoglobulin E class-switch recombination [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9): 721-732.
- [2] Plosker GL, Keam SJ. Omalizumab: a review of its use in the treatment of allergic asthma [J]. *Bio Drugs*, 2008, 22(3): 189-204.
- [3] Moisan J, Camateros P, Thuraisingam T, et al. TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5): 987-995.
- [4] Igartua M, Pedraz JL. Topical resiquimod: a promising adjuvant for vaccine development [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(1): 23-27.
- [5] Tomai MA, Miller RL, Lipson KE, et al. Resiquimod and other immune response modifiers as vaccine adjuvants [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(5): 835-847.
- [6] Shen E, Lu L, Wu C. TLR7/8 ligand, R-848, inhibits IgE synthesis by acting directly on B lymphocytes [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67(6): 560-568.
- [7] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size [J]. *BMJ*, 1989, 299(6710): 1259-1260.

- [5] Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 740-745.
- [6] Su M, Feng YJ, Yao LQ, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18: 476-486.
- [7] Sun B, Shuo MS, Zhang SW, et al. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Human Pathology*, 2008, 39: 444-451.
- [8] 赵静, 黄江生, 杨爱军, 等. 肝细胞癌中血管生成拟态的三维细胞培养及组织学研究 [J]. *癌症*, 2007, 26(2): 123-126.
- [9] Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 5(19): 233-246.
- [10] Wang JY, Sun T, Zhao XL, et al. Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2008, 7(5): 760-768.
- [11] Staton CA, Brown NJ, Rodgers GR, et al. Alphastatin, a 24-amino acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo [J]. *Blood*, 2004, 103(2): 601-606.
- [12] Staton CA, Stribbling SM, Echeverria CG, et al. Identification of key residues involved in mediating the in vivo anti-tumor/anti-endothelial activity of Alphastatin [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007, 5: 846-854.
- [13] 陈凇, 李涛, 李荣, 等. alphastatin 抑制体外内皮细胞血管生成及其作用机制的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 15(86): 1061-1064.

(收稿日期: 2011-01-21 修回日期: 2011-05-15)

- [8] Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(3): 256-262.
- [9] Ma R, Du JL, Huang J, et al. Additive effects of CpG ODN and R-848 as adjuvants on augmenting immune responses to HBsAg vaccination [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(2): 537-542.
- [10] Vasilakos JP, Smith RM, Gibson SJ, et al. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN [J]. *Cell Immunol*, 2000, 204(1): 64-74.
- [11] Sel S, Wegmann M, Sel S, et al. Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10 [J]. *J Immunol*, 2007, 178(12): 7805-7813.
- [12] Brugnolo F, Sampognaro S, Liotta F, et al. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4⁺ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2): 380-388.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-02-10)