

神经纤毛蛋白 2 促进胰腺神经内分泌肿瘤血管生成作用的研究

谢 雄, 吴 双, 杨卫文, 张 月, 欧娟娟, 梁后杰, 庞学利[△]

(第三军医大学西南医院肿瘤科, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨神经纤毛蛋白 2(NRP2)调控胰腺神经内分泌肿瘤(PNETs)血管生成的作用及意义。**方法** 干扰胰腺神经内分泌肿瘤 BON-1 细胞系 NRP2 表达,分别用对照组和干扰组的 BON-1 细胞培养上清液处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC),CCK-8 检测其细胞增殖,Transwell 检测迁移,小管形成实验检测其促血管生成。**结果** CCK-8 检测显示对照组和干扰组培养上清液处理的 HUVEC 细胞间增殖差异无统计学意义($P>0.05$);对照组吸光度为 0.35 ± 0.04 ,干扰组为 0.32 ± 0.04 。Transwell 实验显示干扰组细胞培养上清液处理的 HUVEC 细胞侵袭能力较对照组减弱,对照组(203 ± 13)个/孔,干扰组(100 ± 10)个/孔($P<0.01$);小管形成实验显示干扰组细胞培养上清液处理的 HUVEC 细胞小管形成减少,对照组为 40 ± 5 ,干扰组为 24 ± 3 ($P<0.01$)。**结论** 干扰 BON-1 细胞 NRP2 表达可抑制与其共培养的 HUVEC 细胞的成管能力,提示 NRP2 可能具有促进 PNETs 相关血管生成的作用,是 PNETs 新的潜在治疗靶点。

[关键词] 胰腺神经内分泌肿瘤;神经纤毛蛋白 2;血管生成

[中图分类号] R736.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)12-1599-03

Study of pro-angiogenesis effect of neuropilin-2 on pancreatic neuroendocrine tumors

Xie Xiong, Wu Shuang, Yang Weiwu, Zhang Yue, Ou Juanjuan, Liang Houjie, Pang Xueli[△]

(Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and significance of neuropilin-2(NRP2) for regulating the angiogenesis of pancreatic neuroendocrine tumors(PNETs). **Methods** The NRP2 expression in pancreatic neuroendocrine tumor BON-1 cell line was intervented. The BON-1 cells cultural supernatants in the control group and interference group were used to treat human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). CCK-8 was used to detect the cell proliferation, Transwell was used to detect the cell migration and the tubule formation test was used to detect the pro-angiogenesis. **Results** The CCK-8 detection showed that there was no statistically significant difference in the supernatant treated HUVEC proliferations between the interference group and control group medium($P>0.05$); the absorbancy in the control group was 0.35 ± 0.04 , while which in the interference group was 0.32 ± 0.04 . The Transwell test showed that the invasion ability of HUVEC treated with cultural supernatants in the interference group was weakened compared with the control group, the control group was (203 ± 13)/hole, while the interference group was (100 ± 10)/hole ($P<0.01$); the tubule formation test showed that HUVEC tubular formation treated by cultural supernatant in the interference group was decreased, the control group was 40 ± 5 , while the interference group was 24 ± 3 ($P<0.01$). **Conclusion** Interfering NRP2 expression of BON-1 cells can inhibit the vessel formation ability of co-cultured HUVEC, suggesting that NRP2 may have the pro-angiogenesis effect of PNETs, and may be a potential new target for the treatment of PNETs.

[Key words] pancreatic neuroendocrine tumors; neuropilin-2; angiogenesis

胰腺神经内分泌肿瘤(pancreatic neuroendocrine tumors, PNETs)发生率较低,进展缓慢,生存期相对较长^[1],但其迁延病变同样对患者生命健康造成重要危害,是我国最为常见的神经内分泌肿瘤类型^[2],其组织血管丰富,抗血管生成是主要的治疗策略之一。分子靶向药物舒尼替尼已被批准用于 PNETs 的治疗^[3]。但临床观察显示,舒尼替尼治疗 PNETs,在短暂获益后,肿瘤侵袭能力显著增强,更易发生转移^[4]。提示寻找新的抗血管生成靶点,可能为 PNETs 治疗提供新的思路。神经纤毛蛋白 2(neuropilin2, NRP2)表达于黑色素瘤、神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤等肿瘤细胞^[5]。目前有研究表明, NRP2 可与血管内皮生长因子(VEGF)145 及 VEGF-C 结合^[6],发挥促血管生成作用。本课题组前期实验发现,在 PNETs 细胞中也有 NRP2 的表达,其对血管生成的作用及意义尚不清楚,国内外少见相关报道。本实验拟通过干扰 PNETs 细胞系 BON-1 中 NRP2 表达,探讨 NRP2 对 PNETs 血管生成的影响以及潜在的临床意义。

1 材料与方

1.1 细胞株 人胰腺神经内分泌肿瘤细胞株 BON-1 由意大

利 Verona 大学 Scarpa 实验室惠赠,由本实验室传代并保种。HUVEC、293T 细胞为本实验室常规培养。

1.2 材料与试剂 胎牛血清、Optim-MEM、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;谷氨酰胺粉末购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂购自日本同仁公司;shRNA NRP2 KD 质粒及对照空质粒由赛业公司提供,质粒提取试剂盒 D6904-01(Omega), Lipofectamine2000 (Invitrogen), Neuropilin-2 Rabbit mAb(CST)、Matrigel 购于美国 BD 公司,Transwell 小室购于美国 Corning 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞传代和培养 人 PNETs 细胞系 BON-1 以含 10%胎牛血清和 20 mmol/L Gln(Sigma, 美国)的 DMEM/F12 培养基培养;HUVEC 以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,置于 37℃、5% CO₂ 的无菌恒温培养箱中,常规培养传代。

1.3.2 NRP2 KD 的 BON-1 细胞系构建 步骤依次为质粒抽提、包装病毒、慢病毒感染。干扰组使用 shRNA NRP2 KD 质粒,对照组使用 Scramble shRNA 质粒。

1.3.2.1 质粒抽提 将 shRNA NRP2 KD 质粒及 Scramble

shRNA 质粒按照说明书进行质粒抽提,测浓度后保存(Scramble shRNA 质粒用于对照)。

1.3.2.2 包装病毒 取对数生长期的 293T 细胞计数,将 2.5×10^6 细胞接种于直径 10 cm 细胞培养板中,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的无菌恒温培养箱中过夜;待细胞密度达 30% 时进行慢病毒包装;取无菌 1.5 mL 离心管 2 个,记为 A、B 管,A 管中加入 $500 \mu\text{L}$ Optim-MEM 培养基,再分别加入 $5 \mu\text{g}$ 目的质粒和 $6 \mu\text{g}$ 包装质粒,室温静置 5 min;B 管中加入 $500 \mu\text{L}$ Optim-MEM 培养基和 $10 \mu\text{L}$ Lipofectamine2000,将 A、B 管混匀,室温静置 15 min;293T 细胞培养板用无菌 PBS 洗 3 次,加入无血清无双抗的 DMEM 培养基,再分别加入已配好的质粒载体混合溶液,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的无菌恒温培养箱中;6 h 后换液,用无双抗、含 20% 小牛血清的 DMEM 溶液培养;48 h 后收取上清, $3\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min,使用 $0.44 \mu\text{m}$ 的滤器进行过滤,测定病毒滴度,分装后于 -80°C 保存。

1.3.2.3 慢病毒感染 取对数生长期的 BON-1 细胞,将 4×10^4 细胞接种于 24 孔板中;待细胞密度达到 70%~80% 时换液,加入 Polybrene 至终浓度为 $6 \mu\text{g/mL}$,加入适量病毒悬液;继续培养 16 h 后换成新鲜培养基;感染 72 h 后,进行细胞传代培养,并加入 puromycin 进行筛选,持续 15 d 后利用蛋白免疫印迹法(Western blot)进行验证。

1.3.3 Western blot 检测 待细胞密度长至 70%~80% 时收获各组细胞,PBS 漂洗 3 次(需吸出残余 PBS),加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解 5 min,用细胞刮刮下板壁上的细胞后移入离心管中,置于冰上继续裂解 30 min, $12\ 000 \text{ r/min}$ 4°C 离心 30 min,取上清液, -80°C 保存备用;利用 BCA 工作液进行蛋白定量,根据定量结果配置上样样本(每孔 $25 \mu\text{g}$),加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 $4 \mu\text{L}$;配置 6% SDS-PAGE 凝胶;上样、电泳、转膜;5% BSA 封闭 2 h;用一抗稀释液按照 1:1 000 配置一抗溶液, 4°C 摇床孵育 12 h;回收一抗置于 -20°C 保存;PBST 洗膜 5 min,重复 4 次;使用二抗稀释液按照 1:5 000 配置山羊抗兔二抗溶液,室温摇床孵育 2 h;PBST 洗膜 5 min,重复 4 次;显影,采集图片;用一抗二抗去除液洗膜 10 min,去除已孵育一抗;5% BSA 封闭 2 h,选用 β -Tubulin 内参作为一抗,按照前述孵育一抗、二抗及显影步骤进行实验并采集图片。

1.3.4 条件上清液的收集 将对照组、干扰组细胞按照细胞传代步骤进行消化、离心、混悬,用细胞计数板计数后按照每瓶 100×10^4 进行传代,24 h 后进行换液, 5 mL DMEM/F12 完全培养基/瓶;换液 48 h 后将培养瓶中培养基分别收集之离心管中, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 6 min,取上清液置于 -80°C 中保存备用。

1.3.5 细胞增殖实验 取对数生长期 HUVEC 按照细胞传代步骤进行消化、离心、混悬,用细胞计数板计数,用 DMEM 完全培养基调整细胞浓度至 $2 \times 10^4/\text{mL}$,混悬后按照每孔 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中(对照组和干扰组分别设 6、12、24、48 h 4 个时间点,每个时间点分别设有 5 个复孔,另设空白对照孔),放入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的无菌恒温培养箱中培养;6 h 细胞贴壁后,向空白对照孔中加入 $100 \mu\text{L}$ DMEM/F12 完全培养基和 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液;其余孔分别加入对照组、干扰组上清每孔 $200 \mu\text{L}$;放回 37°C 、含 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中反应 2 h 后置酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度(A)值;剩余孔在设置的时间点按上述方法检测。

1.3.6 细胞迁移实验 取对数生长期 HUVEC 按照细胞传代步骤进行消化、离心、混悬,用细胞计数板计数,用 DMEM 完全培养基调整细胞浓度至 $5 \times 10^4/\text{mL}$,混悬后按照每孔 180

μL 加入 Transwell 小室中;按照分组分别向 Transwell 小室下层孔板中加入对照组、干扰组上清液每孔 $600 \mu\text{L}$ (各设 3 个复孔);放入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的无菌恒温培养箱中培养;24 h 后取出需染色的 Transwell 小室至新的 24 孔板中,PBS 洗 3 遍,每孔 $500 \mu\text{L}$ 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍, $500 \mu\text{L}/\text{孔}$ 结晶紫染色 10 min,PBS 洗 3 遍;用棉签轻轻擦去 Transwell 小室内部的细胞,显微镜下观察小室底部外部迁移出来的 HUVEC,图片采集。

1.3.7 小管形成实验 将 4°C 中预解冻的 Matrigel 按照每孔 $50 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中,置于 37°C 细胞培养箱中 30 min 凝固;取对数生长期 HUVEC 按照细胞传代步骤进行消化、离心、混悬(用无血清培养基混悬),用细胞计数板计数,分别用对照组、干扰组上清调整细胞浓度至 $5 \times 10^4/\text{mL}$,混悬后按照每孔 $200 \mu\text{L}$ 加入已经铺上 Matrigel 的 Transwell 小室中;放入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的无菌恒温培养箱中培养;每小时观察 1 次,小管形成良好时采集图片。

2 结果

2.1 慢病毒载体质粒转染 BON-1 细胞效率 用慢病毒载体转染 BON-1 细胞 72 h 后明视野及荧光视野图片(图 1)。

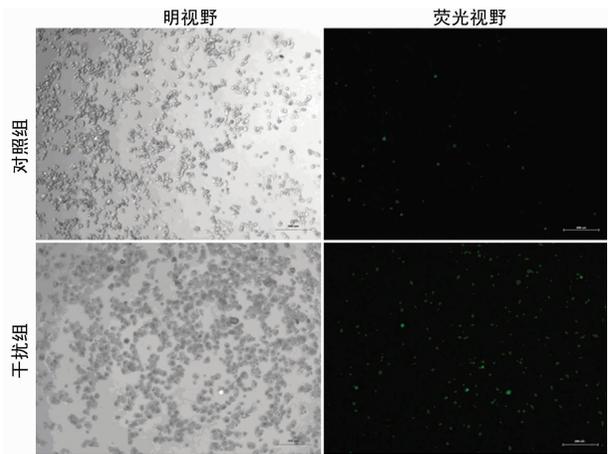


图 1 PNETs 细胞系 BON-1 经慢病毒转染后荧光图

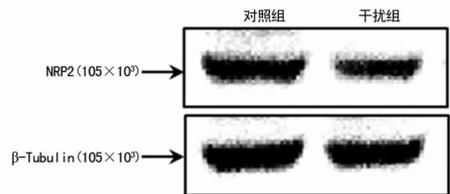


图 2 PNETs 细胞系 BON-1 经慢病毒转染后 Western blot 检测 NRP2 的表达

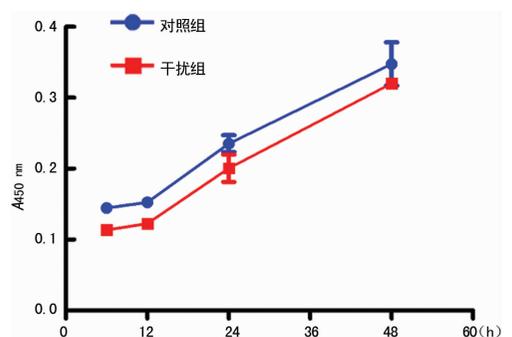


图 3 对照组、干扰组细胞的条件下清液对 HUVEC 增殖的影响

2.2 慢病毒载体质粒转染后 BON-1 细胞中 NRP2 的表达

NRP-2 表达量, 对照组为 0.95 ± 0.02 , 干扰组为 0.27 ± 0.03 , 干扰组 NRP2 表达量低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 PNETs 细胞中 NRP2 表达量对肿瘤血管生成的影响

2.3.1 NRP2 对 HUVEC 增殖的影响

48 h 后对照组 $A_{450\text{nm}}$ 为 0.35 ± 0.04 , 干扰组为 0.32 ± 0.04 , 两组上清对 HUVEC 增殖影响的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.3.2 NRP2 对 HUVEC 的趋化作用

迁移实验结果见图 4, 分别使用对照组、干扰组细胞的条件下清液处理 HUVEC 12 h 后, 平均细胞迁移数分别为对照组 203 ± 13 , 干扰组 100 ± 10 。干扰组 HUVEC 透过微孔的细胞数目明显减少 ($P < 0.01$)。

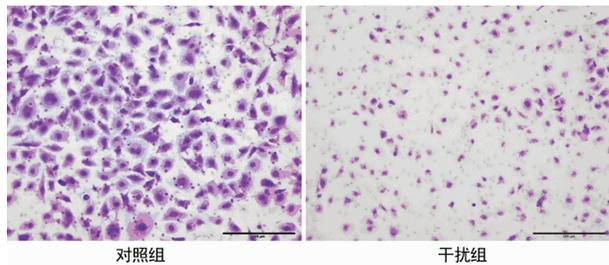


图 4 对照组、干扰组细胞的条件下清液对 HUVEC 迁移能力的影响

2.3.3 NRP2 对 HUVEC 成管能力的影响

对照组成管数为 40 ± 5 , 干扰组的成管数为 24 ± 3 。经干扰组细胞条件下清液处理的 HUVEC 成管能力弱于对照组细胞 ($P < 0.01$), 见图 5。

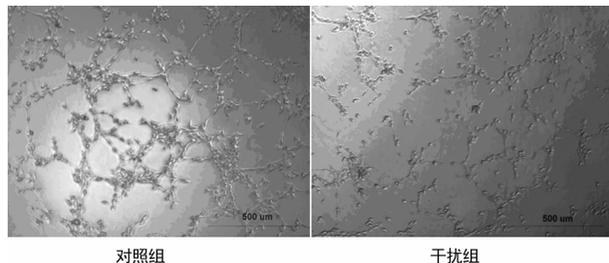


图 5 对照组、干扰组细胞的条件下清液对 HUVEC 小管形成能力的影响

3 讨论

目前, PNETs 的治疗根据分期的不同, 可选择包括手术、放疗、化疗、生长抑素治疗以及分子靶向药物依维莫司和舒尼替尼等, 抗血管生成是最重要的策略之一^[7]。VEGFR 是舒尼替尼抗血管生成的主要靶点, PNETs 患者可从该药物治疗中明显获益: 中位无进展生存期达到 11.4 个月^[8]。遗憾的是, 使用舒尼替尼后不久, 肿瘤产生抵抗, 血管在短期内再生, 疾病进展。但舒尼替尼继发耐药机制尚未完全阐明, 研究表明其可能是因为肿瘤由其他通路代偿从而促进血管生成所致。由此想到, 在舒尼替尼阻断 VEGFR 后, 可能有新的受体与 VEGF 结合, 继续发挥促进血管生成的功能。本研究希望探寻新的靶点, 进而抑制 VEGFR 被阻断后肿瘤血管生成的代偿路径, 发挥协同抗肿瘤作用。本课题组关注到 NRP2 可结合 VEGF145 和 VEGF-C, 并在前期实验中证实 PNETs 细胞上 NRP2 的表达上调。

NRP2 定位于 2 号染色体, 转录后形成多种剪接体, 编码 130-140 kDa 的跨膜蛋白^[9]。其被作为轴突导向调节分子而被发现, 此后研究发现其与血管发育, 肿瘤血管生成及肿瘤恶性

进展相关^[10]。NRP2 除可作为 VEGF 的共受体而参与肿瘤血管生成外, 还可与 VEGFC 及 VEGFC 介导的 VEGFR3 结合而共同促进淋巴管形成^[11], NRP2 抗体可以抑制肿瘤淋巴管形成以及肿瘤的转移^[12], 推测其对于 PNETs 可能也具有抗血管生成的作用。但是目前关于 PNETs 的研究中, 尚未见关于 NRP2 表达及作用的报道。本研究通过干扰 NRP2 表达的 BON-1 细胞与血管内皮细胞共培养, 检测内皮细胞的增殖、迁移及成管能力, 发现 NRP2 对血管内皮细胞增殖的影响无显著性差异, 但可以明显促进其迁移及成管能力, 首次初步证实了 NRP2 具有促进 PNETs 相关血管生成的作用, 其对 PNETs 的进展可能具有重要作用。NRP2 对血管生成及淋巴管形成的双重作用, 使其有望成为 PNETs 等血管丰富肿瘤的新靶点, 为 PNETs 治疗提供新思路, 具有潜在的重要临床价值。

参考文献

- [1] Yao JC, Hassan M, Phan A, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(18):3063-3072.
- [2] 郭林杰, 唐承薇. 中国胃肠胰神经内分泌肿瘤临床研究现状分析[J]. *胃肠病学*, 2012, 17(5):276-278.
- [3] Capurso GA, Fave GD. Molecular pathogenesis and targeted therapy of sporadic pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2015, 22(8):594-601.
- [4] Asudev S, Reynolds R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(3):471-494.
- [5] Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, et al. Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5):584-593.
- [6] Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 515(1):33-48.
- [7] Merola E, Rinzivillo M, Cicchese N, et al. Digestive neuroendocrine neoplasms: A 2016 overview[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(8):829-835.
- [8] Moriyama M, Matsumoto Y, Zhou QL, et al. A case of pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Int Cancer Conf J* 2016, 5(1):1-4.
- [9] Eichmann AM, Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(9):1013-1021.
- [10] Geretti ES, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(1):31-39.
- [11] Snezana D, Driscoll C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor[J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(9/10):447-455.
- [12] Caunt M, Mak J, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4):331-342.