

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.005
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190130.0959.010.html(2019-01-31)

过表达人 VEGF183 诱导小鼠乳腺癌血管成熟^{*}

王晓银,吕探宇,夏文姣,朱武凌,张会勇[△]
(新乡医学院生命科学技术学院,河南新乡 453003)

[摘要] **目的** 研究过表达人 VEGF183 对小鼠乳腺癌瘤周血管成熟度的影响并与过表达 VEGF189 和 VEGF165 进行比较。**方法** 实验分 4 组:EMT-6 组(BALB/C 小鼠接种转染空载体 pcDNA3.1 的 EMT-6 细胞)、EMT-6-183 组(BALB/C)小鼠接种过表达 VEGF183 的 EMT-6 细胞),EMT-6-189 组(BALB/C 小鼠接种过表达 VEGF189 的细胞),EMT-6-165XEG (BALB/C 小鼠接种转染过表达 VEGF-16 的 EMT-6 细胞),免疫组织化学技术检测各组组织切片中平滑肌肌动蛋白 α (α -SMA) 标记的周细胞数(PN),CD31 标记的微血管密度(MVD),并对二者的比值 PN/MVD 进行比较。**结果** 过表达 VEGF165 的小鼠乳腺癌瘤周 MVD 与 EMT-6 组比较差异有统计学意义($P<0.01$),过表达 VEGF183 与 VEGF189 的小鼠乳腺癌周 MVD 与 EMT-6 组相比较差异有统计学意义($P<0.01$),而过表达 VEGF 异构体各组间小鼠乳腺癌周 MVD 差异无统计学意义($P>0.05$);过表达 VEGF165 的小鼠乳腺癌周 PN 与 EMT-6 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),过表达 VEGF183 与 VEGF189 的瘤周 PN 与 EMT-6 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),而过表达 VEGF 异构体各组间瘤周 PN 差异无统计学意义($P>0.05$);过表达 VEGF183 诱导了 39.2% 的血管成熟度,而过表达 VEGF165 与 VEGF189 分别诱导了 46.0% 和 35.4% 的血管成熟度。**结论** 过表达 VEGF183 可促进肿瘤血管成熟,但其诱导的血管成熟度介于 VEGF165 与 VEGF189 之间。

[关键词] 血管内皮生长因子 A;血管成熟度;免疫组织化学;乳腺肿瘤
[中图法分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1280-04

Overexpression of human VEGF183 induced tumor vessel maturation in mouse breast cancer^{*}
WANG Xiaoyin,LYU Tanyu,XIA Wenjiao,ZHU Wuling,ZHANG Huiyong[△]
(College of Life Science and Technology,Xinxiang Medical University,Xinxiang, Henan 453003,China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of overexpression of human vascular endothelial growth factor 183(VEGF183)on peritumoral vascular maturity and compare it with overexpression of VEGF189 and VEGF 165. **Methods** The experiment was divided into four groups;the EMT-6 group (BALB/C mice was inoculated with EMT-6 cells transfected with empty vector pcDNA3.1),the EMT-6-183 group (BALB/C mice was in oculated with EMT-6 cells which overexpression of VEGF183),the EMT-6-189 group (BALB/C mice was inoculated EMT-6 cells which overexpression of VEGF189),EMT-6-165 group (BALB/C mice was inoculated with EMT-6 cells which overexpression of VEGF183). Immunohistochemical technique was used to detect the pericyte number (PN) labeled with smooth muscle actin α (α -SMA) and microvessel density (MVD) labeled with CD31 in tissue sections,and the ratio of PN to MVD was compared. **Results** There was a statistically significant difference in peritumoral MVD between the EMT-6-165 group,the EMT-6 group and the EMT-6 group ($P<0.01$). There was a statistically significant difference in peritumoral MVD between the EMT-6-183 group,the EMT-6-189 group and the EMT-6 group ($P<0.01$),but there was no significant difference in peritumoral MVD between the EMT-6-183,the EMT-6-165 and the EMT-6-189 group ($P>0.05$). There was a statistically significant difference in peritumoral PN between the EMT-6-165 group and EMT-6 group ($P<0.05$). There was a statistically significant difference in peritumoral PN between the EMT-6-183 group,the EMT-6-189 group and EMT-6 group,but there was no significant difference in peritumoral PN between the EMT-6-183, EMT-6-165 and the EMT-6-189 group ($P>0.05$). 39.2% of vascular maturity was induced in

^{*} 基金项目:河南省科技攻关项目(182102310337);河南省重大科技专项 (161100310900)。 作者简介:王晓银(1992—),硕士,主要从事肿瘤生物治疗的研究。 [△] 通信作者,E-mail:huiyongzhang115@163.com。

EMT-6-183 group, while 46.0% and 35.4% in EMT-6-165 group and the EMT-6-189 group, respectively.

Conclusion Overexpression of VEGF183 can also promote the vascular maturity, but it is between VEGF165 and VEGF189.

[Key words] vascular endothelial growth factor A; vascular maturity; immunohistochemistry; breast neoplasms

恶性肿瘤的生长和转移离不开营养供应^[1]。目前,研究最多的与肿瘤血管生成相关的因子是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。VEGF 被认为是一种最重要的促血管生成因子,其因 mRNA 的剪切形成 VEGF121、145、148、165、183、189 与 206 等 7 种主要亚型^[2-4]。VEGF 通过与其受体 VEGFR1、VEGFR2 和 Nrp1 结合,在肿瘤血管生成中发挥着重要的作用^[4]。有研究表明,VEGF 各亚型与 Nrp1 结合能力的不同导致在肿瘤中不同的招募^[5-6]。单核细胞表达 Nrp1(Nrp1-expressing monocytes, NEMs)以自分泌的方式在新生血管周围招募平滑肌细胞促进血管成熟^[7]。CD31 是内皮细胞表面标志物,表示血管密度(microvessel density, MVD)^[8]。 α -smooth muscle actin(α SMA)是周细胞表面标志物^[9],表示周细胞数(pericyte number, PN),而 α SMA 在 CD31 中所占的比例(PN/MVD)表示血管成熟度^[10]。已有研究表明,VEGF189 和 VEGF165 可以促进血管成熟度^[11]。笔者前期研究发现,过表达 VEGF183(与 VEGF189 相比,在外显子 6a 处少 6 个氨基酸),可使瘤内微血管扩张^[12],但关于其对血管成熟度的影响,并未见相关研究报道。

本文主要研究稳定过表达 VEGF183 的乳腺癌细胞株 EMT-6 在 BALB/C 小鼠皮内接种后,对肿瘤血管成熟度的影响,并与过表达 VEGF165 和 VEGF189 做比较。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 小鼠乳腺癌细胞株 EMT-6 购于美国 ATCC 公司,由本实验通过脂质体稳定转染获得转染 pcDNA3.1 空载体的 EMT-6 细胞株,EMT-6-pcDNA3.1(EMT-6 细胞组,作对照),过表达 VEGF189 的 EMT-6 细胞株 EMT-6-pcDNA3.1-VEGF189(EMT-6-189 细胞组),过表达 VEGF183 的 EMT-6 细胞株 EMT-6-pcDNA3.1-VEGF183(EMT-6-183 细胞组)和过表达 VEGF165 的 EMT-6 细胞株 EMT-6-pcDNA3.1-VEGF165(EMT-6-165 细胞组)细胞株(上述 3 种细胞株 VEGF 表达量接近),保存于新乡医学院合成生物学工程实验室(具体构建方法参考文献[12])。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖液体培养基购于美国 HyClone 公司,血清购于美国 BI 公司,0.25% 的胰蛋白酶购于吉林省吉诺生物医药技术有限公司。一

抗:CD31 兔抗小鼠(批号 50408-T16)购于北京义翘神州生物技术有限公司,工作液浓度 1:2 000 稀释; α -SMA 兔单抗小鼠(批号 ab32575)购于英国 Abcam 公司,工作液浓度 1:300 稀释;免疫组织化学 SP 试剂盒(兔链霉卵白素-生物素法检测系统,批号 SP-9001)、即用型 DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司,其余化学试剂均为分析纯级。

1.1.3 实验动物 雌性的 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠(批次号 11400700216964)购于北京维通利华实验动物有限公司。本实验中的实验动物饲养与操作经新乡医学院动物伦理学委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 稳定表达各 VEGF 亚型及载体的 EMT-6 细胞株于 10% 的胎牛血清与 1% 的双抗的 DMEM 高糖培养基中,置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 样本制备 12 只 BALB/C 小鼠分为 4 组(EMT-6, EMT-6-189, EMT-6-183 和 EMT-6-165 组),每组 3 只。小鼠先腹部右侧腋下脱毛,皮内接种 2.5×10^5 个对应组细胞,待肿瘤长至直径约为 4~5 mm 时,颈椎脱臼法处死小鼠,取出肿瘤。肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定至少 24 h,常规方法脱水透明浸蜡,石蜡包埋,石蜡切片机切片,厚度 5 μ m。

1.2.3 免疫组织化学 石蜡切片经脱蜡水化;抗原修复,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 3 min;3% 的内源性过氧化氢阻断剂阻断,PBS 洗 3 次,每次 3 min;正常山羊血清封闭,吸去血清,一抗孵育,4℃ 过夜,PBS 洗 3 次,每次 3 min;滴加即用型生物素标记的山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min;DAB 显色;苏木素复染;自来水返蓝;脱水至透明;中性树脂封片。

1.2.4 检测指标的定性与定量 DAB 染色后,分别于低倍镜下和高倍镜下观察,阳性反应呈棕黄色,CD31 为内皮细胞膜阳性, α -SMA 为周细胞胞质阳性。MVD 计数:首先在 100 倍视野下选择计数的部位,然后在 400 倍视野下计数 CD31 阳性的血管数,每张片子选择 5 个不同的视野计数,计算平均值即为 MVD;PN 计数:与 CD31 计数原则一样,先在 100 倍视野下选择计数部位,再在 400 倍视野下计数 α -SMA 阳性周细胞数,随机选择 5 个不同的视野计数,计算平均值即为 PN。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对实验结果进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析(Analysis of Variance,ANOVA),检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组间 MVD 的比较 免疫组织化学结果显示,CD31 阳性主要表达在瘤周,EMT-6-183、EMT-6-165、EMT-6-189 组与 EMT-6 组比较,CD31 的阳性血管数呈现递增的趋势;与 EMT-6 组比较,EMT-6-189、EMT-6-183 组的血管形态不同,相较于对照组与 VEGF165 组,VEGF183 与 VEGF189 诱导出现了较大比例扩张的肿瘤微血管,见图 1A~D。而定量分析瘤周 MVD 表明:EMT-6-183 组 MVD 为 4.6 ± 1.1 ,EMT-6-165 组的为 4.8 ± 0.8 ,EMT-6-189 组为 6.8 ± 1.3 ,EMT-6 组为 22.8 ± 4.8 ,EMT-6-165、EMT-6-183、EMT-6-189 组瘤周 MVD 与 EMT-6 组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),而 EMT-6-165、EMT-6-183、EMT-6-189 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),图 1E。

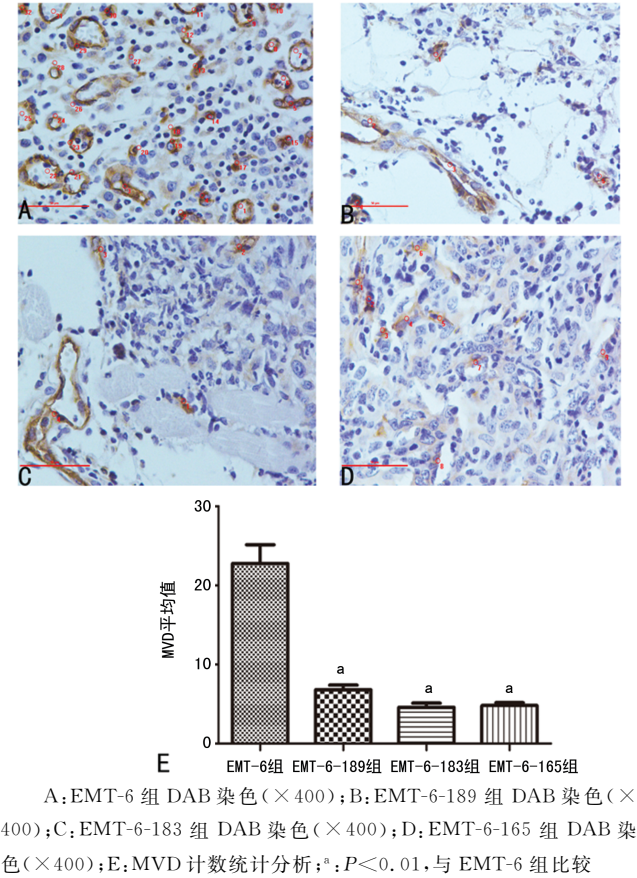


图 1 各组间的 MVD 表达情况及分析

2.2 各组间 PN 的比较 α -SMA 阳性细胞定位在血管外周,且主要分布在瘤周,符合周细胞的组织学分布, α -SMA 阳性细胞形成管腔样微血管,见图 2A~D。而 PN 的定量分析结果显示,EMT-6 组 PN 为 6.6 ± 2.9 ,EMT-6-189 组为 2.4 ± 0.5 ,EMT-6-165 组为 2.2 ± 0.4 ,EMT-6-183 组为 1.8 ± 0.4 ,EMT-6-

165、EMT-6-183、EMT-6-189 组与 EMT-6 组比较均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),而 EMT-6-165、EMT-6-189、EMT-6-183 组各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2E。

2.3 各组间 PN/MVD 的比较 EMT-6-183 组诱导了 39.2%的血管成熟度,而 EMT-6-165、EMT-6-189 组分别诱导了 46.0%和 35.38%的成熟度。EMT-6 组的血管成熟度只有 31.8%。

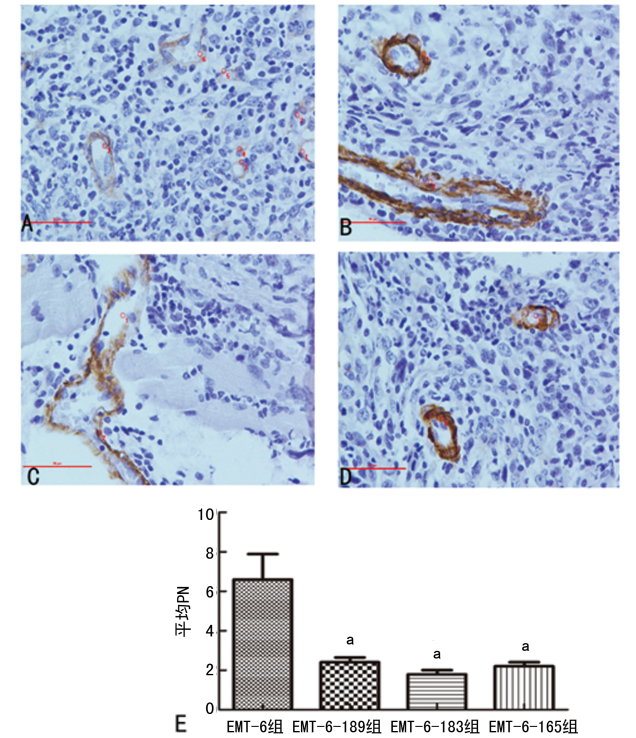


图 2 各组间的 PN 表达情况分析

3 讨 论

从已存在的血管中生出新血管的过程被称为血管新生^[13]。这一过程发生在缺血性疾病、炎症性疾病和恶性肿瘤中,被称为病理性血管生成^[14]。通过对肿瘤血管生成的认识,帮助我们了解肿瘤的生物学特征,从而促进开展个性化治疗。血管计数是评估血管生成的“金标准”^[15],但在某些恶性肿瘤中,血管的数目不能准确地反应肿瘤的恶性程度及生长速度。研究证实,肿瘤内血管成熟对于肿瘤的供血发挥着重要的作用^[16]。周细胞和内皮细胞是血管的重要组成部分,参与诱导血管新生,同时周细胞又通过和内皮细胞相互作用共同调节血管的形成、稳定和重塑。

VEGF 是已知的研究最多的促血管生长因子,本研究在 EMT-6 细胞株中分别稳定转入 pcDNA3.1-VEGF189、pcDNA3.1-VEGF183、pcDNA3.1-VEGF165,皮内接种于 BALB/c 小鼠。结果表明,周细胞和内皮细胞在各组中均有表达,而在 EMT-6 组内,

因有内源性的 VEGF120 及 VEGF164 (对应于人 VEGF121 与 VEGF165) 表达, 内皮细胞数表达量较多, 形成管腔状较小的血管且主要集中在瘤周, 所以其瘤周 MVD 相对较高。但因周细胞主要表达于血管外周, 表达量较少, 因此 PN/MVD 值较低。而过表达 VEGF165, 尤其是过表达 VEGF183 与 VEGF189 导致血管管腔扩大, 而致使瘤周血管数目减少, 即瘤周 MVD 相对 EMT-6 组少。过表达 VEGF189、VEGF183 和 VEGF165 的小鼠, PN 和 MVD 值组内差距较小, 但是 PN/MVD 值均高于 EMT-6 组, 且过表达 VEGF183 的小鼠 PN/MVD 值介于过表达 VEGF189 和过表达 VEGF165 之间。已有研究表明 VEGF189 和 VEGF165 能够促进血管成熟^[11], 而 VEGF183 与 VEGF189 相比, 结构上少了 6 个氨基酸, 可能一定程度上影响其空间结构, 使其与 VEGFR1、VEGFR2 和 Nrp1 的结合能力不同, 导致对成熟度的影响不同。

本研究结果表明 VEGF183 与其他 VEGF 亚型均可促进血管成熟。肿瘤血管的成熟度直接影响化疗及免疫药物的运输^[17-18], 从而影响肿瘤治疗效果。本研究可为未来依据 VEGF 表达的类型及血管成熟度进行肿瘤个体化治疗提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] WEIDNER N. Chapter 14 measuring intratumoral microvessel density[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 444: 305-323.
- [2] KHAKI M, SALMANIAN A H, ABTAHI H, et al. Mesenchymal stem cells differentiate to endothelial cells using recombinant vascular endothelial growth factor-A[J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2018, 4(6): 144-150.
- [3] CHESONKOV M S, KHESINA P A, SHAVOCHKINA D A, et al. Shift in VEGFA isoform balance towards more angiogenic variants is associated with tumor stage and differentiation of human hepatocellular carcinoma[J]. *Perrj*, 2018, 6(6): 4915-4932.
- [4] KHAKI M, SALMANIAN A H, MOSAYEBI G, et al. Heterologous expression of a truncated form of human recombinant vascular endothelial growth factor-A and its biological activity in wound healing[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 5(20): 791-797.
- [5] OTT P A, HODI F S, BUCHBINDER I, et al. Inhibition of immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: an overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data[J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 202-209.
- [6] ABOU FAYCAL C, BRAMBILLA E, AGORRETA J, et al. The sVEGFR1-i13 splice variant regulates a β 1 integrin/VEGFR autocrine loop involved in the progression and the response to anti-angiogenic therapies of squamous cell lung carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 118(12): 1596-1608.
- [7] CARRER A, MOIMAS S, ZACCHIGNA S, et al. Neupilin-1 identifies a subset of bone marrow Gr1- monocytes that can induce tumor vessel normalization and inhibit tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6371-6381.
- [8] CHAWLA N, KATARIA S P, AGGARWAL K, et al. Significance of vascular endothelial growth factor and CD31 and morphometric analysis of microvessel density by CD31 receptor expression as an adjuvant tool in diagnosis of psoriatic lesions of skin[J]. *Indian journal of pathology and microbiology*, 2017, 6: 189-195.
- [9] KAZEMI K, CARRER A, MOIMAS S, et al. VEGF121 and VEGF165 differentially promote vessel maturation and tumor growth in mice and humans[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2016, 23(5): 125-132.
- [10] ROLNY C, MAZZONE M, TUGUES S, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF[J]. *Cancer cell*, 2011, 19(1): 31-44.
- [11] VINTONENKO N, PELAEZ-GARAVITO I, BUTEAU-LOZANO H, et al. Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions[J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(4): 332-343.
- [12] ZHANG H, CHEN Y, FAN B, et al. Overexpression of VEGF183 promotes murine breast cancer cell proliferation in vitro and induces dilated intratumoral microvessels[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3871-3880.
- [13] ABU EL-ASRAR A M, MOHAMMAD G, ALLEGAERT E, et al. Matrix metalloproteinase-14 is a biomarker of angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy[J]. *Mol Vis*, 2018, 5(24): 394-406.
- [14] CHU L H, GANTA V C, CHOI M H, et al. A multiscale computational model predicts distribution of anti-angiogenic isoform VEGF165b in peripheral arterial disease in human and mouse[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 1038-1049.
- [15] GIACCA M, ZACCHIGNA S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(6): 622-629.
- [16] LU T, WU B, YU Y, et al. Blockade of ONECUT2 expression in ovarian cancer inhibited tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(7): 2221-2234.
- [17] WEISS A, BONVIN D, BERNDSEN R H, et al. Angiostatic treatment prior to chemo- or photodynamic therapy improves anti-tumor efficacy[J]. *Scientific Rep*, 2015, 5: 8990-8998.
- [18] WICK W, PLATTEN M, WICK A, et al. Current status and future directions of anti-angiogenic therapy for gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(3): 315-328.