

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.003

## sTie2 通过阻抑血管生成拟态抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移和侵袭

孔祥琳,程先硕,李富荣,肖尤川,杨之斌,黄尤光,夏翠锋,余昆,李云峰(昆明医科大学第三附属医院云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心,云南昆明650118)

**[摘要]** **目的:**探讨可溶性 Tie2(soluble Tie 2, sTie2)对结肠癌 HCT116 细胞血管生成拟态(vascular mimicry, VM)形成、增殖、迁移及侵袭能力的影响。**方法:**将重组质粒 pBLAST49-hsTie2 及对照质粒 pBLAST49 通过脂质体转染至 HCT116 细胞,分别形成 hsTie2-HCT116 细胞和 Ctrl-HCT116 细胞。通过 3D 模型培养、SRB 法、细胞划痕实验及 Transwell 法分别检测 HCT116 细胞的 VM 形成、增殖、迁移及侵袭能力,采用 Western blotting 法检测 HCT116 细胞中 VE-cadherin 蛋白的表达。**结果:**pBLAST49-hsTie2 重组质粒成功转染至结肠癌 HCT116 细胞。与 Ctrl-HCT116 细胞相比,hsTie2-HCT116 细胞中 VM 的形成  $[(0.75 \pm 0.45) \text{ vs } (7.50 \pm 0.52)]$  个/视野,  $P < 0.01$  及 VE-cadherin 蛋白的表达  $[(1.23 \pm 0.08) \text{ vs } (1.73 \pm 0.02)]$ ,  $P < 0.05$  显著降低;细胞增殖率也显著降低  $[(32.57 \pm 4.57)\% \text{ vs } (88.24 \pm 21.94)\%]$ ,  $P < 0.01$ ;细胞迁移能力  $[(0.37 \pm 0.07) \text{ vs } (0.80 \pm 0.03)]$  mm,  $P < 0.01$  及侵袭能力  $[(57.25 \pm 3.17) \text{ vs } (127.25 \pm 6.25)]$  个/视野,  $P < 0.01$  均显著减弱。**结论:**sTie2 通过阻抑 VM 形成抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,有望成为既抗血管生成又抗 VM 形成的双靶向治疗结肠癌的药物。

**[关键词]** 血管生成拟态;sTie2;结肠癌;HCT116 细胞;增殖;迁移;侵袭

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>5;R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)05-0522-07

## Soluble Tie2 inhibits proliferation, migration and invasion of colonic cancer HCT116 cells through suppression of vascular mimicry formation

Kong Xianglin, Cheng Xianshuo, Li Furong, Xiao Youchuan, Yang Zhibin, Huang Youguang, Xia Cuifeng, Yu Kun, Li Yunfeng (Clinical Research Center of Colorectal Cancer, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Tumor Hospital of Yun Nan Province, Kunming 650118, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of soluble Tie 2 (sTie2) on the vascular mimicry (VM) formation, proliferation, migration and invasion of colonic cancer HCT116 cells. **Methods:** The recombinant plasmid pBLAST49-hsTie2 or control plasmid pBLAST49 was transfected into HCT116 cells by liposome to form hsTie2-HCT116 or Ctrl-HCT116 cells. 3D model culture, SRB, scratch and Transwell assay were conducted respectively to detect the VM formation, proliferation, migration and invasion of HCT116 cells. Western blotting was used to detect the expression of VE-cadherin protein. **Results:** The recombinant plasmid pBLAST49-hsTie2 was transfected into colorectal cancer HCT116 cells successfully. Compared with that in the Ctrl-HCT116 cells, the formation of VM  $[(0.75 \pm 0.45) \text{ vs } [7.50 \pm 0.52]]$ ,  $P < 0.01$  and the expression of VE-cadherin protein  $[(1.23 \pm 0.08) \text{ vs } [1.73 \pm 0.02]]$ ,  $P < 0.01$  in hsTie2-HCT116 cells was significantly decreased, and the survival rate was also significantly decreased  $[(32.57 \pm 4.57)\% \text{ vs } [88.24 \pm 21.94]\%]$ ,  $P < 0.01$ . The migration  $[(0.37 \pm 0.07) \text{ vs } [0.80 \pm 0.03]]$  mm,  $P < 0.01$  and invasion capacity  $[(57.25 \pm 3.17) \text{ vs } [127.25 \pm 6.25]]$ ,  $P < 0.01$  of HCT116 cells were inhibited significantly. **Conclusion:** sTie2 inhibits the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells through suppression of the VM formation, which provides a good basis for the development of new drugs for the treatment of colorectal cancer by targeting both angiogenesis and VM formation.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30960455);云南省科技厅计划项目资助(No. 2008ZC142M)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30960455), and the Science and Technology Bureau Foundation of Yunnan Province (No. 2008ZC142M)

**[作者简介]** 孔祥琳(1986-),女,山东省泰安市人,硕士研究生,主要从事结直肠肿瘤基础及临床研究。E-mail: luce001@163.com

**[通信作者]** 李云峰(Li Yunfeng, corresponding author), E-mail: liyunfeng@medmail.com.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1600.006.html>

[ **Key words** ] vascular mimicry ( VM ), soluble Tie2 ( sTie2 ), colorectal cancer, HCT116 cell, proliferation, migration, invasion

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20( 5 ): 522-528 ]

肿瘤血管是肿瘤生长、增殖、迁移及侵袭的关键,抗血管生成已经成为治疗肿瘤的一大策略。目前,尽管抗血管生成药物得到飞速发展,但是临床疗效依然不够满意,其原因之一是在肿瘤组织中肿瘤血管主要存在两种形式:一种是由血管内皮细胞围成的血管结构;另一种是由肿瘤细胞围成的管腔结构,被称为血管生成拟态( vasculogenic mimicry, VM)<sup>[1]</sup>。目前抗血管生成的代表药物贝伐珠单抗( bevacizumab, BV)对肿瘤 VM 的形成非但没有抑制作用,反而具有促进作用,进而促进肿瘤远处转移<sup>[2]</sup>。因此,寻找针对血管及 VM 的双靶向药物用于肿瘤治疗已经迫在眉睫。

Ang/Tie2 信号途径在血管生成中发挥关键作用。有学者提出,外源性合成受体 Tie2 的胞外段,即可溶性 Tie2( soluble Tie2, sTie2 ),可以竞争性结合 Ang,从而抑制 Ang/Tie2 信号达到治疗肿瘤的目的。Lin 等<sup>[3]</sup>构建了带有 sTie2 基因的腺病毒载体和小鼠大肠癌模型,通过尾静脉推注 Ad sTie2,小鼠血浆中持续高表达的 sTie2 使小鼠大肠癌生长及血管形成抑制了 75%,使肿瘤血管长度、密度较对照组减少 40%。类似的结果在犬大肠癌及犬恶性胶质瘤中同样得到了验证。然而,sTie2 在血管生成拟态形成中的作用未见报道。本研究选择具有较高 VM 形成能力的结肠癌细胞 HCT116 细胞<sup>[4]</sup>,初步探讨 sTie2 在 VM 形成中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人结肠腺癌细胞系 HCT116 以及人脐静脉内皮细胞( human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)均用含青霉素、链霉素及 10% FBS 的 RPMI 1640 培养于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱。细胞系 HCT116 以 HUVEC 均引自中国科学院昆明动物研究所细胞库。RPMI 1640 培养基、FBS 和胰蛋白酶均购自 Gibco 公司,逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司,小鼠抗人 Tie2 抗体,小鼠抗人 VE-cadherin 抗体均购自 Abcam 公司,GAPDH 抗体购自康成生物,pBLAST49-hsTie2 重组质粒和 pBLAST49 质粒购自 InvivoGen 公司,Matrigel 胶购自 BD 公司。

### 1.2 pBLAST49-hsTie2 重组质粒瞬时转染 HCT116

### 细胞

转染前一天,用无抗生素的培养基将 HCT116 细胞接种于 6 孔板中,细胞汇合度 80% ~ 90%。每次转染前,取 4 μg pBLAST49-hsTie2 重组质粒或 pBLAST49 质粒分别用 250 μl 无血清、无双抗的培养基轻轻混匀;取 5 μl 脂质体用 250 μl 无血清、无双抗的培养基稀释并混匀,分别于室温孵育 5 min,随后将上述两种混合液轻轻混匀,室温孵育 20 min。将最终混合液加入细胞并补足 2 ml 培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h 后换成含血清、抗生素的培养基培养,将转染后的细胞分别命名为 hsTie2-HCT116 细胞和 Ctrl-HCT116 细胞,并进行后续实验。

### 1.3 RT-PCR 检测 pBLAST49-hsTie2 转染后 HCT116 细胞胞外 Tie2 mRNA 的表达

提取各组细胞总 RNA,参照 TAKARA 说明书进行逆转录合成 cDNA。参照 Invitrogen 公司说明书进行 PCR 实验检测各组细胞中 Tie2 胞外片段及内参 GAPDH 的表达,其反应体系:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s,共 36 个循环;72 °C 延伸 10 min。Tie2 胞外段:上游引物 5'-ATTTCTGTGAAGGGCGAGTT-3',下游引物 5'-GCCGAGGTGAAGAGGTTT-3';GAPDH:上游引物 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGG-3';下游引物 5'-TTTCTTACTCCTTGAGGCC-3'。上述引物均由 Invitrogen 公司合成,图像采用 Quantity One 软件进行灰度分析。每组实验均重复 3 次。

### 1.4 3D 培养检测 pBLAST49-hsTie2 转染对 HCT116 细胞 VM 形成能力的影响

实验共分为 HUVEC 细胞组(阳性对照组)、未转染组、Ctrl-HCT116 组、hsTie2-HCT116 组、Tie2 中和抗体处理( Tie2 Ab-HCT116 )组 5 组。Matrigel 胶以 100 μl/孔将 24 孔板包被,将 HUVEC 细胞、HCT116 细胞、Ctrl-HCT116 细胞、hsTie2-HCT116 细胞, Tie2 Ab-HCT116 细胞消化制成 1.5 × 10<sup>5</sup>/ml 的细胞悬液,分别在包被好 Matrigel 胶的 24 孔板中加入 1 ml 细胞悬液(其中 Tie2 Ab-HCT116 组加入 1 ng/ml Tie2 中和抗体),在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48、72 h,在高倍显微镜下随机取 5 个视野,分别计数细胞所形成的管腔数目。每组实验均重复 3 次。

### 1.5 Western blotting 检测 hsTie2-HCT116 细胞中

## sTie2 和 VE-cadherin 蛋白的表达

提取各组细胞总蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度后,使用 8% 的 SDS-PAGE 胶分离蛋白,转膜至 PVDF 膜;孵育小鼠抗人 Tie2 抗体(1:2 000 稀释)、VE-cadherin 抗体(1:2 000 稀释)和 GAPDH 抗体(1:5 000 稀释)4 ℃ 过夜,次日室温孵育 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:5 000 稀释)1 h,经 ECL 显色、曝光,采集图片,图片采用 Quantity One 软件进行灰度分析。每组实验均重复 3 次。

## 1.6 SRB 法检测 pBLAST49-hsTie2 转染对 HCT116 细胞的增殖的影响

取各组对数生长期的细胞消化为单细胞,对活细胞进行计数, $5 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔板中。置入孵箱,待细胞贴壁后,再培养 48 h,取出培养板,每孔加入 50% 的三氯乙酸 50  $\mu$ l 固定细胞,4 ℃ 放置 1 h。每孔加入 SRB 100  $\mu$ l 室温染色 30 min,1% 醋酸洗涤;最后加入 150  $\mu$ l/孔的 Tris 溶液,在平板振荡器上振荡 5 min;使用酶联免疫检测仪检测 515 nm 处光密度( $D$ )值。每组实验均重复 3 次。细胞增殖率计算公式为:细胞增殖率(%)=(未处理细胞  $D$  值 - 处理组细胞  $D$  值)/处理组细胞  $D$  值  $\times$  100%。

## 1.7 划痕试验检测 pBLAST49-hsTie2 转染对 HCT116 细胞迁移的影响

取各组细胞,按  $8 \times 10^6$ /孔的密度接种于 6 孔板中。次日,待细胞汇合度为 80% 时,用白色枪头沿着无菌直尺划痕,PBS 洗 3 次除去划下的细胞,置入孵箱培养,且按 0、12、24、48、72 h 取出拍照。图片采用 Image J 软件分析处理,迁移能力以迁移的距离表示。每组实验均重复 3 次。

## 1.8 Transwell 法检测 pBLAST49-hsTie2 转染对 HCT116 细胞侵袭的影响

用 Matrigel 包被 Transwell 小室底部膜的上室面基底膜,将各组细胞消化制成  $50 \times 10^5$ /ml 的细胞悬液,以 200  $\mu$ l/孔的量加入 Transwell 小室的上室,下室加入 500  $\mu$ l 条件培养基,48 h 后取出小室,结晶紫染色。于显微镜下随机取 5 个视野,计数穿过基底膜细胞数目,细胞侵袭能力以每个视野穿膜细胞数表示。每组实验均重复 3 次。

## 1.9 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pBLAST49-hsTie2 转染增强 HCT116 细胞中

### sTie2 mRNA 的表达

采用 Tie2 胞外段引物,通过 RT-PCR 检测各组细胞中 sTie2 mRNA 的表达,间接反映 hsTie2-HCT116 细胞中 Tie2 mRNA 的表达。结果(图 1)显示,HUVEC 细胞、HCT116 细胞、Ctrl-HCT116 细胞,hsTie2-HCT116 细胞均表达胞外段 Tie2,但 hsTie2-HCT116 细胞表达 sTie2 mRNA 显著高于 Ctrl-HCT116 细胞[(0.308  $\pm$  0.003) vs (0.179  $\pm$  0.022), $P < 0.01$ ],而 HCT116 细胞和 Ctrl-HCT116 细胞之间差异无统计学意义[(0.183  $\pm$  0.021)、(0.179  $\pm$  0.022), $P > 0.05$ ]。

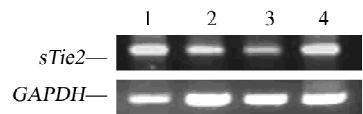


图 1 pBLAST49-hsTie2 转染后 HCT116 细胞 sTie2 mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of sTie2 mRNA in HCT116 cells after pBLAST49-hsTie2 transfection

1: HUVEC; 2: HCT116; 3: Ctrl-HCT116; 4: hsTie2-HCT116

### 2.2 pBLAST49-hsTie2 转染后 HCT116 细胞中 sTie2 蛋白的表达

Western blotting 结果(图 2)显示,HUVEC 细胞、HCT116 细胞、Ctrl-HCT116 细胞均表达相对分子质量为 140 000 的 Tie2 蛋白,hsTie2-HCT116 细胞在表达 Tie2 蛋白的同时还表达相对分子质量为 58 000 的小片段 sTie2 蛋白,然而其他各组细胞均无 sTie2 蛋白的表达。结果提示,结肠癌细胞 HCT116 表达 Tie2 蛋白,并且 hsTie2-HCT116 细胞成功表达 sTie2。

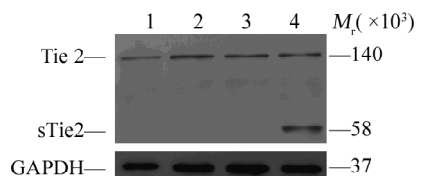


图 2 pBLAST49-hsTie2 转染 HCT116 细胞后 sTie2 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of sTie2 protein in HCT116 cells after pBLAST49-hsTie2 transfection

1: HUVEC; 2: HCT116; 3: Ctrl-HCT116; 4: hsTie2-HCT116

### 2.3 pBLAST49-hsTie2 转染抑制 VM 的形成

通过构建 3D 培养模型发现,细胞培养 24 h 后,HUVEC 很快形成数个典型 VM 管腔结构,HCT116

细胞类似 HUVEC 细胞也形成管腔结构(图 3 A、B),Ctrl-HCT116 细胞也能形成类似的管腔结构(图 3C);但是,hsTie2-HCT116 细胞或 Tie2 Ab-HCT116 细胞形成类似管腔结构较 Ctrl-HCT116 细胞或 HCT116 细胞显著减少(图 3 D、E)。VM 管腔计数结果(图 4)显示,hsTie2-HCT116 细胞和 Tie2 Ab-

HCT116 细胞形成管腔数分别为(  $0.75 \pm 0.45$  )和(  $1.25 \pm 0.45$  )个,较 Ctrl-HCT116 细胞的(  $7.50 \pm 0.52$  )个显著减少(  $P < 0.01$  ),而 Ctrl-HCT116 细胞与 HCT116 细胞 VM 管腔数差异则无统计学意义[ (  $7.50 \pm 0.52$  )vs (  $7.75 \pm 0.89$  )个,  $P = 0.390$  ]。

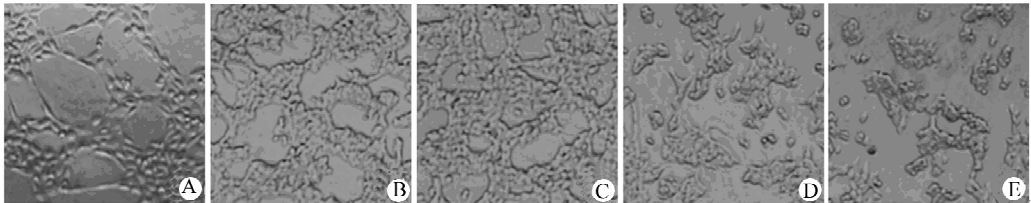


图 3 pBLAST49-hsTie2 转染对 HCT116 细胞 VM 形成能力的影响(  $\times 300$  )

Fig. 3 Effect of pBLAST49-hsTie2 transfection on formation of VM in HCT116 cells(  $\times 300$  )

A: HUVEC; B: HCT116; C: Ctrl-HCT116; D: hsTie2-HCT116; E: Tie2 Ab-HCT116

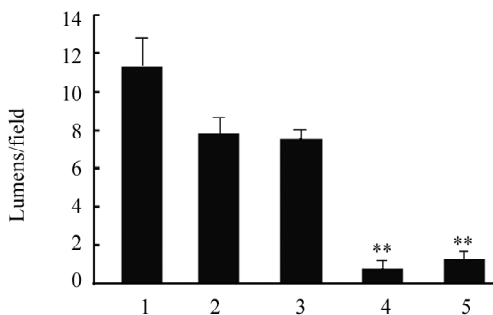


图 4 pBLAST49-hsTie2 转染后对 HCT116 细胞 VM 管腔数的影响

Fig. 4 Effect of pBLAST49-hsTie2 transfection on number of VM lumens in HCT116 cells

1: HUVEC; 2: HCT116; 3: Ctrl-HCT116;  
4: hsTie2-HCT116; 5: Tie2 Ab-HCT116

\*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl-HCT116 cell

#### 2.4 pBLAST49-hsTie2 转染后抑制 VM 标志蛋白 VE-cadherin 的表达

Western blotting 检测 VM 标志蛋白 VE-cadherin 的表达,结果(图 5)提示,hsTie2-HCT116 细胞及 Tie2 Ab-HCT116 细胞中 VE-cadherin 蛋白的表达显著低于 Ctrl-HCT116 细胞[ (  $1.23 \pm 0.08$  )、(  $1.61 \pm 0.01$  ) vs (  $1.73 \pm 0.02$  ),  $P < 0.05$  ]。而 Ctrl-HCT116 细胞与 HCT116 细胞间差异无统计学意义。结果提示,sTie2 或 Tie2 中和抗体可以显著抑制 VE-cadherin 蛋白的表达。

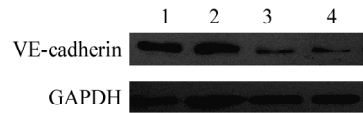


图 5 pBLAST49-hsTie2 转染 HCT116 细胞后 VM 标志蛋白 VE-cadherin 的表达

Fig. 5 Vascular mimicry marker: VE-cadherin expression in HCT116 cells after transfected with pBLAST49-hsTie2

1: HCT116; 2: Ctrl-HCT116;

3: hsTie2-HCT116; 4: Tie2 Ab-HCT116

#### 2.5 pBLAST49-hsTie2 转染抑制 HCT116 细胞的增殖

SRB 检测结果(图 6)显示,与 Ctrl-HCT116 组相比,Tie2 Ab-HCT116 细胞存活率明显降低[ (  $54.28 \pm 9.97$  )% vs (  $88.24 \pm 21.94$  )% ,  $P < 0.05$  ];hsTie2-HCT116 细胞存活率更低,仅为(  $32.57 \pm 4.57$  )% (  $P < 0.01$  )。而 Ctrl-HCT116 细胞与 HCT116 细胞相比,差异则无统计学意义(  $P = 0.116$  )。结果提示,sTie2 或 Tie2 中和抗体能显著抑制人结肠腺癌 HCT116 细胞的增殖。

#### 2.6 pBLAST49-hsTie2 转染抑制 HCT116 细胞迁移能力

划痕实验检测结果如图 7 所示,HCT116 细胞及 Ctrl-HCT116 细胞划痕 72 h 后几乎完全愈合,而 Tie2 Ab-HCT116 细胞和 hsTie2-HCT116 细胞划痕 72 h 后未见完全愈合(图 7)。经 Image J 软件分析,Tie2 Ab-HCT116 细胞和 hsTie2-HCT116 细胞划痕愈

合能力显著弱于 Ctrl-HCT116 细胞[ ( 0.36 ± 0.05 )、( 0.37 ± 0.07 ) vs ( 0.80 ± 0.03 ) mm,  $P < 0.01$  ], 而 Ctrl-HCT116 细胞与 HCT116 细胞相比, 其迁移能力的差异无统计学意义(  $P = 0.520$  )。结果提示, sTie2 或 Tie2 中和抗体可以显著抑制 HCT116 细胞迁移能力。

2.7 pBLAST49-hsTie2 转染抑制 HCT116 细胞的侵袭能力

Transwell 细胞侵袭实验结果( 图 8 )显示, 转染 sTie2 和经 Tie2 抗体处理 48h 后的 HCT116 细胞穿膜数显著少于 Ctrl-HCT116 细胞[ ( 57.25 ± 3.17 )、( 63.50 ± 3.31 ) vs ( 127.25 ± 6.25 ) 个,  $P < 0.01$  ], 而 Ctrl-HCT116 细胞与 HCT116 细胞的差异则无统计学意义(  $P = 0.148$  )。可见, sTie2 或 Tie2 中和抗体显著抑制了 HCT116 细胞的侵袭能力。

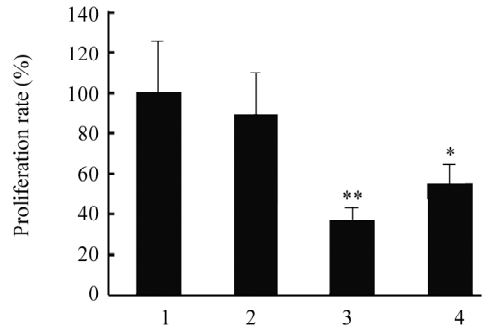


图 6 pBLAST49-hsTie2 对 HCT116 细胞增殖能力的影响

Fig 6 Effect of pBLAST49-hsTie2 on proliferation of HCT116 cells

1: HCT116; 2: Ctrl-HCT116; 3: hsTie2-HCT116; 4: Tie2 Ab-HCT116

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl-HCT116 cell

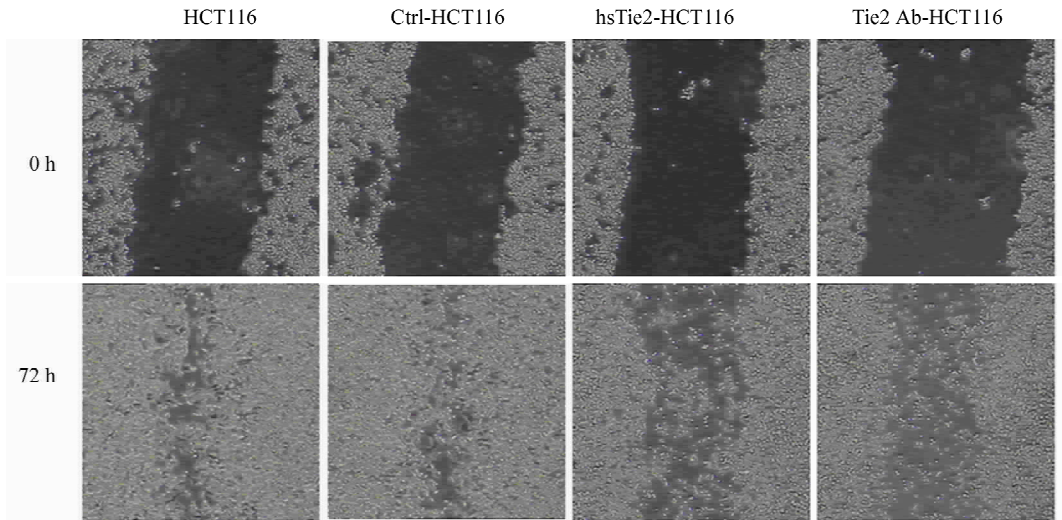


图 7 pBLAST49-hsTie2 转染后对 HCT116 细胞迁移能力的影响( × 100 )

Fig 7 Effect of pBLAST49-hsTie2 on migration of HCT116 cells after transfection( × 100 )

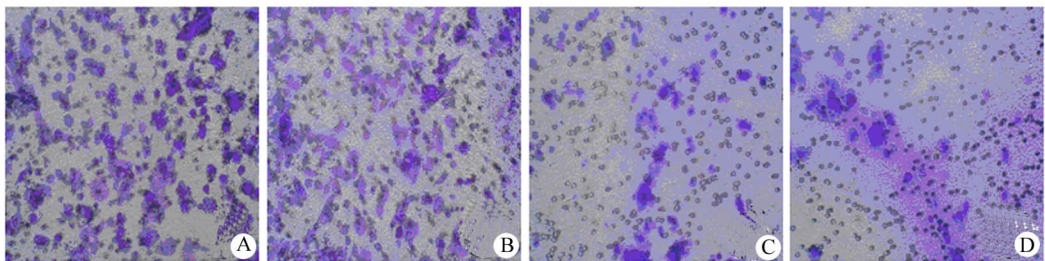


图 8 pBLAST49-hsTie2 转染后对 HCT116 细胞侵袭能力的影响( × 200 )

Fig 8 Effect of pBLAST49-hsTie2 on invasion of HCT116 cells after transfection( × 200 )

A: HCT116; B: Ctrl-HCT116; C: hsTie2-HCT116; D: Tie2 Ab-HCT116

### 3 讨论

VM 是指由具有可塑性、侵袭性的肿瘤细胞围成的血管状管腔网络。自 Maniotis 等<sup>[5]</sup>研究侵袭性人眼葡萄膜黑素瘤和转移性皮肤黑素瘤时首次提出该概念至今,短短 13 年间进行广泛而深入的研究显示,这种有别于经典肿瘤血管结构的 VM 形态广泛存在于结直肠癌<sup>[6]</sup>、黑素瘤<sup>[7]</sup>、肝癌<sup>[8]</sup>、骨肉瘤<sup>[9]</sup>等多种肿瘤组织中,是微循环的一种新模式,在肿瘤侵袭、转移中发挥重要作用,是患者预后不良的一个关键因素。靶向 VM 即成为治疗肿瘤新的策略<sup>[10]</sup>。目前抗血管生成的主流用药不仅对 VM 的形成无影响,甚至反而促进其生长,如 Xu 等<sup>[2]</sup>在卵巢癌小鼠模型中发现,短期使用贝伐珠单抗治疗卵巢癌可以显著促使 VM 的形成,顺铂亦不能抑制 VM 形成,两药联合作用后,依然促进 VM 形成,加速肿瘤转移。成胶质细胞瘤体内外研究<sup>[11]</sup>表明,抗 VEGF 治疗并不能抑制小鼠成胶质细胞瘤细胞 VM 的形成。也有报道<sup>[12]</sup>认为,经典的血管生成抑制剂内皮抑素不能抑制 VM 的形成;使用贝伐珠单抗或舒尼替尼治疗乳腺癌时会导致瘤内缺氧并且增加乳腺癌干细胞的形成<sup>[13]</sup>,而这些改变都是促使 VM 形成的重要因素。因此,寻找一种既能抑制血管生成,又能抑制 VM 形成的新途径用于治疗肿瘤已经势在必行。

血管的生成受多种复杂信号途径的调控,除经典 VEGF/VEGFR 轴以外,Ang/Tie2 轴是新近发现与血管生成及重塑密切相关的信号途径<sup>[14]</sup>。Tie2 属于酪氨酸激酶受体,其广泛表达于肿瘤组织及其周边血管内皮细胞中,具有信号转导所必需的酪氨酸激酶活性,在肿瘤新生血管形成中起着重要作用,参与肿瘤新生血管的发育、成熟、塑型和重建<sup>[15]</sup>。Tie2 在正常大肠和缺乏血管的良性肿瘤中低表达,而在大肠癌及其周边新生血管、肿瘤和炎性细胞浸润处的表达显著增高<sup>[16]</sup>。Tie2 促使肿瘤血管发芽并促进血管延长,促使肿瘤血管与供体血管间形成联系,而阻断 Tie2 效应则明显抑制肿瘤的增长、肿瘤血管形成及肿瘤细胞介导血管生成<sup>[3]</sup>。部分对阻断 VEGF 途径无生物反应的肿瘤常异常表达 Tie2,表明 Tie2 是部分肿瘤血管化的主要信息途径之一。研究<sup>[17]</sup>提示,Ang/Tie2 信号途径能够通过活化 MSK1 上调 survivin 和 Ref1 的表达,增强肝癌细胞 HepG2 对多柔比星的耐药性。鉴于 Ang/Tie2 在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的调节作用,许多学者开始尝试以 Tie2 作为肿瘤治疗的新靶点。

已有研究<sup>[18]</sup>显示,合成 sTie2 竞争性结合 Ang,

通过抑制 Ang/Tie2 信号通路有效抑制小鼠结肠癌细胞的生长及血管的生成。采用 sTie2 全身治疗可以有效抑制乳腺癌、肺癌细胞等转移至肺部及淋巴结。本研究通过转染 pBLAST49-hsTie2,使 HCT116 细胞高表达 sTie2,通过 3D 培养构建 VM 模型发现,转染 pBLAST49-hsTie2 的 HCT116 细胞 VM 管腔数目显著少于转染空质粒的 HCT116 细胞,并且该细胞中 VM 标志蛋白 VE-cadherin 表达明显受抑制。通过使用 Tie2 中和抗体处理细胞后得到类似的结果。pBLAST49-hsTie2 及 Tie2 中和抗体均能够显著抑制 HCT116 细胞增殖,pBLAST49-hsTie2 及 Tie2 中和抗体能显著抑制 HCT116 细胞迁移和侵袭。上述结果提示,sTie2 能够通过抑制 VM 形成抑制 HCT116 细胞增殖,迁移及侵袭,有望 sTie2 用于结肠癌的治疗,但其分子机制有待进一步的研究。

目前对 VM 形成机制的研究<sup>[19]</sup>结果提示,缺氧条件、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、miRNA、肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)以及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[20]</sup>等在其中发挥重要作用,而 Ang/Tie2 信号途径与其中的 MMP,尤其是 MMP2 或 MMP9 关系最为密切<sup>[21]</sup>。因此,sTie2 是否是通过抑制 MMP2 或 MMP9 表达,进而抑制 VM 形成?这个问题将在后续研究中深入探讨。

综上,sTie2 不仅能抑制肿瘤血管生成及肿瘤细胞生长,又能抑制肿瘤形成 VM,进而抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭。这些结果将为开发既能抗血管生成又能抗 VM 形成的双靶向药物提供较好的研究思路。

### [参考文献]

- [1] Szala S, Jarosz M. Tumor blood vessels [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2011, 65: 437-446.
- [2] Xu Y, Li Q, Li XY et al. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31(1): 16.
- [3] Lin P, Polverini P, Dewhirst M, et al. Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth [J]. J Clin Invest, 1997, 100(8): 2072-2078.
- [4] Liu Z, Sun B, Qi L, et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Cancer Sci, 2011, 103(4): 813-820.
- [5] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel forma-

- tion by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: Vasculogenic mimicry [ J ]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739-752.
- [ 6 ] Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, et al. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer [ J ]. *Dis Colon Rectum*, 2009, 52(12): 2028-2035.
- [ 7 ] Mihic-Probst D, Ikenberg K, Tinguely M, et al. Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33571.
- [ 8 ] Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation [ J ]. *Thorax*, 2009, 64(9): 770-777.
- [ 9 ] 王子凡, 陈舰, 梅炯. 仿血管通道结构在大鼠和裸鼠骨肉瘤组织微血管形成中的作用 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(6): 588-593.
- [ 10 ] SefTOR RE, Hess AR, SefTOR EA, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: From controversy to therapeutic promise [ J ]. *Am J Pathol*, 2012, 181(4): 1115-1125.
- [ 11 ] Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11): 4274-4280.
- [ 12 ] van der Schaft DW, SefTOR RE, SefTOR EA, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells [ J ]. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(19): 1473-1477.
- [ 13 ] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(8): 2784-2789.
- [ 14 ] Moss A. The angiopoietin/Tie 2 interaction: A potential target for future therapies in human vascular disease [ J ]. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013. [ Epub ahead of print ]
- [ 15 ] Fukuhara S, Sako K, Noda K, et al. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis [ J ]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(3): 387-396.
- [ 16 ] Goede V, Coutelle O, Shimabukuro-Vornhagen A, et al. Analysis of Tie2-expressing monocytes (TEM) in patients with colorectal cancer [ J ]. *Cancer Invest*, 2012, 30(3): 225-230.
- [ 17 ] Li T, Liu Z, Jiang K, Ruan Q. Angiopoietin2 enhances doxorubicin resistance in HepG2 cells by upregulating survivin and Ref-1 via MSK1 activation [ J ]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2): 267-284.
- [ 18 ] Holopainen T, Huang H, Chen C, et al. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4656-4664.
- [ 19 ] Kirschmann DA, SefTOR EA, Hardy KM, et al. Molecular pathways: Vasculogenic mimicry in tumor cells: Diagnostic and therapeutic implications [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(10): 2726-2732.
- [ 20 ] Ping YF, Bian XW. Concise review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization [ J ]. *Stem Cells*, 2011, 29(6): 888-894.
- [ 21 ] Saber T, Veale DJ, Balogh E, et al. Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis [ J ]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23540.
- [ 收稿日期 ] 2013-06-12 [ 修回日期 ] 2013-08-18
- [ 本文编辑 ] 韩丹, 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》“转化医学”栏目征稿启事

转化医学(translational medicine)是近年国际医学领域出现的新热潮,是实验研究与临床研究双向转化(bench to bedside and bedside to bench)的研究体系,转化医学为基础研究和临床医疗之间架起了桥梁,从而把基础医学研究的最新成果快速、有效地转化为临床疾病诊治的药物、技术和手段,有力地推动医学科学的发展。

为了顺应转化医学的发展热潮,为我国广大肿瘤防治工作者提供有关“转化医学”信息传播和学术交流的平台,促进转化医学在肿瘤学领域的发展,本刊特开辟“转化医学”新栏目,并向广大肿瘤防治工作者征集“转化医学”相关稿件。

本刊“转化医学”栏目文稿内容包括以下几个方面:

- (1)宣传“转化医学”的观念、理论、研究体系、研究模式和方法、发展趋势等;
- (2)讨论我国肿瘤学领域深入开展“转化医学”研究的策略和措施;
- (3)介绍国外肿瘤学领域“转化医学”发展的新闻、成功案例和发展动向;
- (4)我国作者肿瘤学领域“转化医学”的研究成果和经验体会;
- (5)与“转化医学”有关的在肿瘤学领域有发表价值的其他文稿。

“转化医学”文稿的写作格式要求,如果是(4)类中的原创性研究成果文稿,格式同本刊论著(基础研究和临床研究);如果是(1)、(2)、(3)和(5)类的文稿,格式类似于本刊的综述,篇幅在5000字以内,附中文摘要(报道式、非结构式),文内图表用中文表达,参考文献应精选最主要的20篇左右。文稿的文字力求简洁明了、通顺流畅、层次清楚、重点突出。如文稿有新颖性,可进入本刊快速发表通道,在3个月左右发表。

(本刊编辑部)