

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.004

· 基础研究 ·

过表达血管生成抑制蛋白 1 对人结直肠癌细胞恶性生物学行为的影响

高卫峰¹, 张春泽^{1,2}, 张庆怀¹, 孙静³, 苏延军⁴, 张伟华¹ (1. 天津市人民医院 肛肠外科, 天津 300121; 2. 南开大学 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071; 3. 天津市人民医院 检验科, 天津 300121; 4. 天津医科大学 肿瘤医院 肺部肿瘤科, 天津 300060)

[摘要] **目的:** 探讨过表达血管生成抑制蛋白 1(vasohibin-1, VASH1)对人结直肠癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法:** 包装慢病毒并感染人结直肠癌 SW680、SW620 细胞以构建过表达 VASH1 的细胞系, 以未经感染的细胞为对照; qPCR 实验和 WB 实验检测 VASH1 的过表达效果, 小管形成实验、CCK-8 实验、软琼脂克隆形成实验、Transwell 实验和划痕愈合实验检测过表达 VASH1 在体外对细胞的微血管形成、增殖、克隆形成以及迁移能力的影响, NOD-SCID 小鼠皮下成瘤实验检测过表达 VASH1 对 SW620 细胞移植瘤的体内生长和肺转移的影响。**结果:** 成功构建过表达 VASH1 的 SW480 和 SW620 细胞。体外实验表明, 与对照组相比, 过表达 VASH1 的结直肠癌细胞的微血管形成能力、增殖能力、克隆形成能力以及迁移能力均显著降低(均 $P < 0.05$)。体内实验表明, 与对照组相比, 过表达 VASH1 的 SW620 细胞 NOD-SCID 小鼠皮下移植瘤的生长速度以及肺转移能力也明显降低(均 $P < 0.05$)。**结论:** 过表达 VASH1 能够抑制人结直肠癌细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 结直肠癌; 血管生成抑制因子 1; 微血管形成; 增殖; 转移

[中图分类号] R735.3; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)02-0121-07

Effect of over-expression of vasohibin-1 on malignant biological behavior of human colorectal cancer cells

GAO Weifeng¹, ZHANG Chunze^{1,2}, ZHANG Qinghuai¹, SUN Jing³, SU Yanjun⁴, ZHANG Weihua¹ (1. Department of Colorectal Surgery, Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China; 2. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Department of Laboratory, Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China; 4. Department of Lung Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of over-expressing VASH1 on the malignant biological behaviors of human colorectal cancer cells. **Methods:** Lentivirus was packaged and transfected into human colorectal cancer cells SW680 and SW620 to construct an over-expressed VASH1 cell line, the untransfected cells were used as control. qPCR experiment and WB experiment were used to detect the over-expression effect of VASH1. The effects of VASH1 over-expressed on microangiogenesis, proliferation, colony formation and migration of colorectal cancer cells were detected respectively by tubule formation, CCK-8 assay, soft agar assay, Transwell assay and Wound healing assay *in vitro*. In addition, tumor growth and lung metastasis were detected in NOD-SCID mice subcutaneously injected with VASH1-overexpressing SW620 cells. **Results:** Successfully constructed SW480 and SW620 cells over-expressing VASH1. Compared with the control group, the abilities of microangiogenesis, proliferation, colony forming and migration were significantly reduced in colorectal cancer cells over-expressing VASH1 ($P < 0.05$) *in vitro*. The abilities of subcutaneous tumor growth and lung metastasis of colorectal cancer cells over-expressing VASH1 were also significantly reduced ($P < 0.05$) *in vivo*. **Conclusion:** Over-expression of VASH1 can suppress the malignant biological behaviors of human colorectal cancer cells.

[Key words] colorectal cancer; vasohibin-1 (VASH1); microangiogenesis; proliferation; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(2): 121-127. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.004]

[基金项目] 天津市卫生健康委员会项目资助(No. 2014KZ053, No. 2017057); 天津市科技支撑重点研发计划项目资助(No. 19YFZCSY00420); 南开大学国家重点实验室开放课题资助项目(No. 2018094); 天津市重大疾病防治科技重大专项资助项目(No. 18ZXDBSY00040); 天津市人民医院院级课题资助项目(No. 2016YJ035)。Project supported by the Tianjin Health and Family Planning Commission Grant (No. 2014KZ053, No. 2017057), the Key Projects of Tianjin Science and Technology Support Plan (No. 19YFZCSY00420), the Open Research Foundation of State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology (No. 2018094), the Major Special Projects of Science and Technology for Prevention and Control of Major Diseases in Tianjin (No. 18ZXDBSY00040), and the Tianjin Union Medical Center Grant (No. 2016YJ035)

[作者简介] 高卫峰(1981-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事大肠癌的临床诊疗和发病机制研究, E-mail: gwf_7@163.com

[通信作者] 张伟华(ZHANG Weihua, corresponding author), 硕士, 主任医师, 主要从事大肠癌的治疗与发病机制研究,

E-mail: zhangweihuatj@163.com

结直肠癌是世界第三大癌症,其发病率正在逐年升高,平均每年世界上约有100万新发病例和55万病死病例^[1]。尽管近年来分子靶向药物联合化疗的治疗方案取得了一定进展,但已经发生转移的结直肠癌患者预后仍不理想^[2-3]。另外,结直肠癌转移过程的机制尚未完全明了,因此急需寻找与转移过程密切相关的分子标志物来监测结直肠癌的转移进程,以便及时采取合理的方法进行干预。血管新生是肿瘤发展过程中的一个关键步骤,该过程由肿瘤细胞及其间质中一系列的血管再生刺激因子和抑制因子共同调控^[4-9]。了解这些刺激因子和抑制因子的生物功能及其调节机制对于通过抗血管生成治疗来控制结直肠癌等癌症的发生发展具有重要意义。在哺乳动物体内已经发现了多种血管生成抑制因子,其中血管生成抑制蛋白1(vasohibin-1, VASH1)是一种由血管内皮细胞合成的、具有广谱抗血管生成活性的抑制因子^[10-13],其广泛表达于多种癌症的内皮细胞,如乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌等,影响癌症的临床进程。本研究通过体内、体外实验观察过表达VASH1对人结直肠癌SW680、SW620细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮HUVEC细胞、人结直肠癌SW480和SW620细胞、人胚肾HEK293T细胞、载体质粒、慢病毒包装系统质粒均为本实验室保存。DMEM培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司,感受态大肠杆菌*E. coli* DH5 α 购自北京原平皓生物技术有限公司,PBS购自北京天根生化科技有限公司,Matrigel基质胶购自美国BD公司,Nuclease-Free Water购自德国QIAGEN公司,Polybrene病毒感染增强剂购自美国Sigma公司,逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司,SybrGreen qPCR Mastermix试剂购自美国Bio-Rad公司,胰蛋白酶购自英国Oxoid公司,抗 β -actin抗体、抗VASH1抗体、HRP-羊抗鼠二抗均购自美国Proteintech公司,CD31抗体和VEGFA抗体购自英国Abcam公司。普通显微镜、倒置荧光显微镜均购自日本Olympus公司,电泳系统、转膜仪、PCR仪均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养

SW480、SW620和HEK293T细胞均采用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,HUVEC细胞采用EGM2培养基,均置于37℃、5%CO₂孵箱内恒温培养。

1.3 慢病毒的制备

取对数生长期的HEK293T细胞接种于10 cm

培养皿,于37℃孵箱恒温培养24 h使细胞生长至约70%汇合,加入包装质粒和pCCL转移质粒的混合溶液,培养3.5~4 h后吸弃上清液,加入含10%FBS的DMEM培养基继续培养,在更换培养基之后的24、48和72 h分别收取培养皿中的上清,过滤后获得的慢病毒克隆置于-80℃保存备用。

1.4 实验分组与转染

实验分为对照组(转染pCCL空载体)和VASH1组(转染pCCL-VASH1载体)。取对数生长期的SW480和SW620细胞分别接种于6孔板,待细胞生长至约70%汇合时用Polybrene介导转染。转染条件:吸去培养皿中的上清液后,每孔加入3 ml病毒液,MOI值均为30,培养7~8 h后弃去上清更换为完全培养基,培养过夜。

1.5 qPCR实验检测转染pCCL-VASH1对结直肠癌细胞中VASH1 mRNA表达的影响

用TRIzol法提取各组细胞总RNA,逆转录得到cDNA。用SybrGreen qPCR Mastermix试剂盒配制20 μ l体系qPCR反应混合液,进行上机扩增。反应条件:95℃10 min,随后95℃15 s、55℃30 s、72℃30 s,共进行40个循环。每个样品设3个复孔,以管家基因GAPDH作为内参,通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。

1.6 WB实验检测转染pCCL-VASH1对结直肠癌细胞中VASH1蛋白表达的影响

培养稳定转染的上述各组细胞,用RIPA裂解液裂解细胞提取其总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。蛋白样品置于100℃金属浴中变性10 min,然后进行SDS-PAGE,再将蛋白转到PVDF膜上,用TBST(0.1%)清洗膜后加入封闭液,室温封闭1 h,加入VASH1(1:5 000)或者 β -actin(1:10 000)一抗稀释液,置于4℃摇床孵育过夜,回收未结合的一抗,洗膜后加入HRP-羊抗鼠二抗稀释液,室温孵育1 h。回收未结合的二抗,用TBST(0.1%)洗膜后滴加ECL发光液显影。

1.7 小管形成实验观察VASH1过表达的结直肠癌细胞培养上清液对HUVEC微血管形成的影响

用EGM2培养液培养HUVEC,胰酶消化后接种于预铺Matrigel基质胶的24孔板内,每孔 5×10^4 个细胞,VASH1组和对照组细胞培养48 h后取上清液,分别用其培养HUVEC,37℃孵育箱培养3~5 h。吸弃上清,用PBS缓冲液轻轻洗一次,每孔加250 μ l培养液,在1 h之内拍照,用ImageJ软件分析照片,计算血管生成数。

1.8 CCK-8法检测VASH1过表达对结直肠癌细胞增殖的影响

用CCK-8试剂盒进行细胞增殖实验,将各组细

胞分别接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 每孔 1×10^3 个细胞。细胞置于 37°C 培养箱 24 h 后取出, 按照试剂盒操作步骤进行实验, 最后用酶标仪检测样品在 450 nm 波长处的光密度 (D) 值, 计算增殖率。增殖率 = $(D_{\text{VASH1}} - D_{\text{Cont}}) / D_{\text{Cont}} \times 100\%$ 。

1.9 软琼脂克隆形成实验检测 VASH1 过表达对结直肠癌细胞克隆形成的影响

分别配制 $2 \times \text{DMEM}$ 培养基、Argrose 上层胶和下层胶。将下层胶和 $2 \times \text{DMEM}$ 等体积混合后迅速加入 6 孔板, 室温放置至凝固。将上层胶和 $2 \times \text{DMEM}$ 等体积混合, 将培养好的各组细胞与上层胶混合, 每孔加入 1×10^4 个细胞。待上层胶凝固后置于孵育箱中培养 2~3 周。培养结束后, 用结晶紫染色, PBS 洗涤后拍照、计数, 观察各组细胞的克隆形成能力。

1.10 Transwell 实验检测 VASH1 过表达对结直肠癌细胞迁移能力的影响

将含有 10% FBS 的完全培养基加入到 24 孔板中 ($500 \mu\text{l}/\text{孔}$), 再将 Transwell 小室 ($8 \mu\text{m}$ 孔径) 置于孔内, 分别将 VASH1 组和对照组的 1×10^5 个 SW620 细胞悬浮在 $200 \mu\text{l}$ 含有 1% FBS 的培养基中, 接种于小室中, 将小室置于 37°C 、5% CO_2 的恒温孵育箱中, 常规培养 36 h, 用棉签将细胞从上室移出并用 PBS 缓冲液清洗小室。穿过并附着在膜底部的细胞用 4% 甲醛固定 10 min, 然后用 0.5% 的结晶紫染液室温染色 3 h, 之后用 PBS 清洗小室, 室温晾干后在倒置显微镜下拍照。用 Photoshop 软件的计数工具对穿过小室的细胞进行计数。

1.11 划痕愈合实验检测 VASH1 过表达对结直肠癌细胞迁移能力的影响

将 2×10^5 个分别过表达 VASH1 和空载体的 SW620 细胞接种在 24 孔板中, 之后置于 37°C 、5% CO_2 的恒温孵育箱中, 常规培养。当细胞长满后, 用 $10 \mu\text{l}$ 移液器 Tip 头在培养板中间画一条线, 制作一个“伤口”, 并更换为含 1% FBS 培养基。在划痕后的第 0 和第 24 小时, 在倒置显微镜下拍照记录伤口情况, 用 Image J 软件的测量工具测量伤口长度。伤口愈合率 = $\text{伤口缩短长度} / \text{原始伤口长度} \times 100\%$ 。

1.12 NOD-SCID 小鼠皮下移植瘤实验检测过表达 VASH1 在体内对移植瘤生长以及肺转移的影响

将 6~8 周龄的雄性 NOD/SCID 小鼠随机分为两组 (每组 $n=4$)。将 3×10^6 个过表达 VASH1 或空载体的 SW620 细胞接种到每只小鼠的腋下皮下位置。在接种细胞后的第 12 天开始, 每隔一天测量一次小鼠移植瘤的体积 [$V=(\text{长}) \times (\text{宽})^2 \times 0.5$]。在第 32 天处死所有小鼠, 将小鼠的肺组织和肿瘤组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 之后进行梯度脱水并

进行石蜡包埋和切片。随后进行 H-E 染色分析小鼠的肺转移情况, 即分析小鼠肺部转移灶的数量和肺部转移灶占小鼠肺组织总面积的百分比, 具体方法为利用显微镜拍摄经 H-E 染色的小鼠完整的五叶肺组织照片, 然后利用 Photoshop 软件中的测量工具测算每只小鼠五叶肺组织中转移灶的总面积以及五叶肺组织的总面积, 最后根据以下公式计算转移灶面积占小鼠肺组织总面积百分比, 即每只小鼠的肺转移灶面积百分比 = $\text{转移灶总面积} / \text{五叶总面积} \times 100\%$ 。

1.13 免疫组化 (IHC) 染色法分析移植瘤中 CD31 和 VEGFA 的表达水平

将石蜡切片置于烤片机上烘烤 2~3 h 后进行梯度脱蜡, 然后置于抗原修复液利用微波炉加热进行抗原修复, 冷却后利用 3% 的 H_2O_2 溶液去除内源性过氧化物酶。将切片置于湿盒内, 滴加抗原封闭液, 室温封闭 1 h, 然后加入 CD31 或者 VEGFA 的抗体稀释液, 置于 4°C 摇床孵育过夜。回收一抗, 用 PBST (0.1%) 清洗切片后加入生物素标记的二抗稀释液, 室温孵育 2 h。用 PBST (0.1%) 清洗后加入 HRP-生物素液, 室温孵育 1 h, 用 PBST (0.1%) 清洗切片后滴加 DAB 显色液进行染色 1~3 min, 苏木精染色 30 s, 自来水终止染色。最后经梯度脱水后, 中性树胶封片。

1.14 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析处理, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建过表达 VASH1 的 SW480 和 SW620 细胞

qPCR 和 WB 检测细胞中 VASH1 的过表达效果, 结果 (图 1) 显示, VASH1 组 SW480 和 SW620 细胞中 VASH1 的 mRNA ($P < 0.01$) 和蛋白表达水平均有所提高。

2.2 过表达 VASH1 人结直肠癌细胞的培养上清抑制 HUVEC 微血管形成

小管形成实验结果 (图 2) 显示, VASH1 组细胞的血管形成数均低于对照组 ($P < 0.05$), 说明在 SW480 和 SW620 细胞中过表达 VASH1 后, 其上清液能抑制 HUVEC 的血管形成能力。

2.3 过表达 VASH1 抑制结直肠癌细胞的增殖

CCK-8 实验结果 (图 3) 显示, VASH1 组 SW480 和 SW620 细胞的增殖率均显著低于对照组 (均 $P < 0.05$), 说明过表达 VASH1 能够显著抑制 SW480 和 SW620 细胞的增殖。

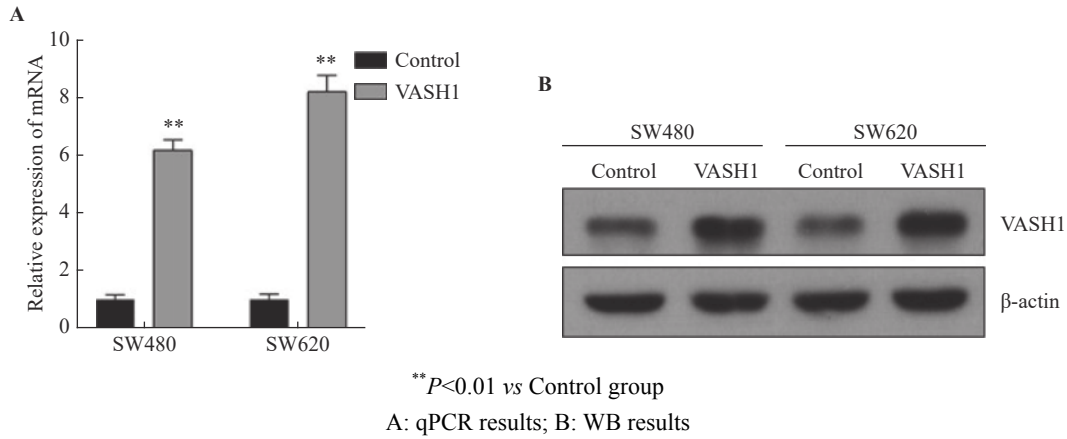


图 1 结直肠癌细胞中过表达 VASH1 的效果检测

Fig.1 Detection of VASH1 over-expression in colorectal cancer cells

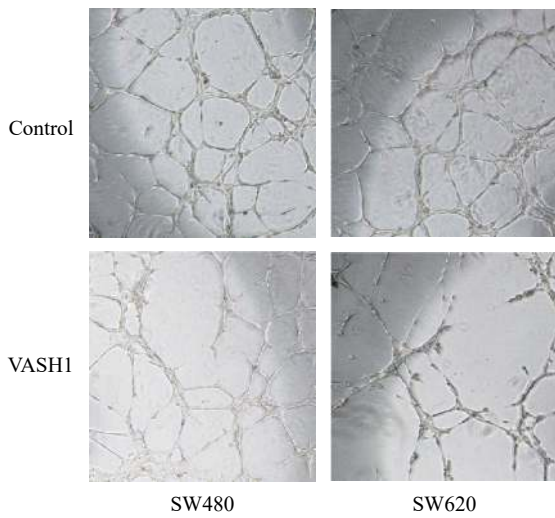


图 2 过表达 VASH1 人结直肠癌细胞的培养上清抑制 HUVEC 细胞微血管形成

Fig.2 The microvascular formation of HUVEC cells was inhibited by the culture supernatant of human colorectal cancer cells over-expressing VASH1

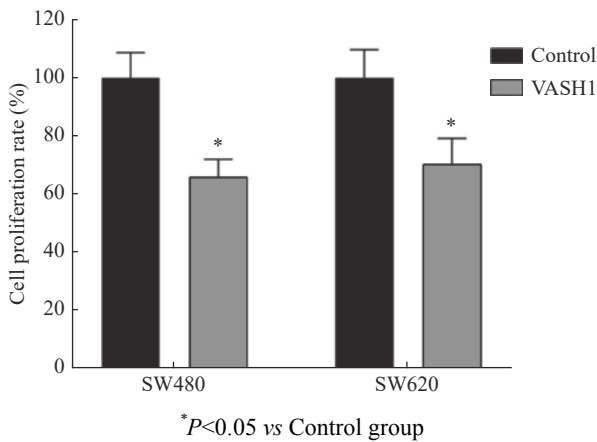


图 3 过表达 VASH1 抑制结直肠癌细胞的增殖

Fig.3 Over-expression of VASH1 inhibited the proliferation of colorectal cancer cells

2.4 过表达 VASH1 抑制结直肠癌细胞的克隆形成能力

软琼脂克隆形成实验结果 (图 4) 显示, 在

SW480 和 SW620 细胞中, VASH1 组细胞的克隆形成数均显著低于对照组 (*P*<0.05), 说明过表达 VASH1 能够抑制 SW480 和 SW620 细胞的克隆形成能力。

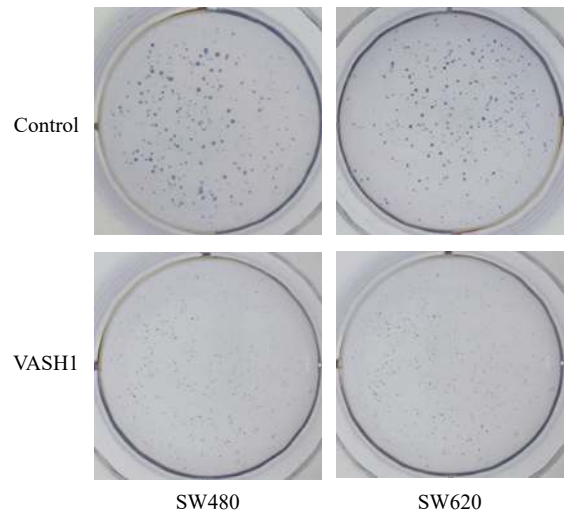


图 4 过表达 VASH1 对人结直肠癌细胞克隆形成能力的影响

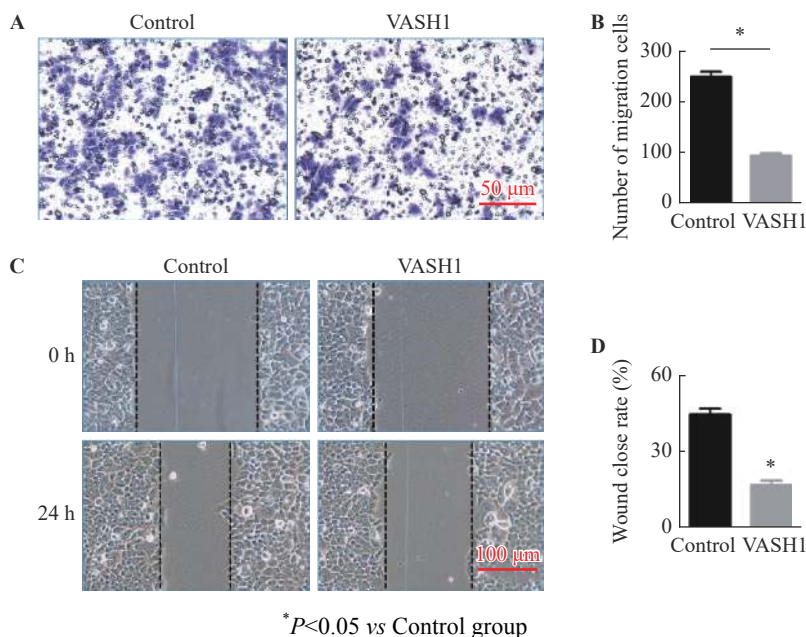
Fig.4 Over-expression of VASH1 inhibited the colony formation ability of colorectal cancer cells

2.5 过表达 VASH1 抑制 SW620 细胞的迁移

Transwell 实验和划痕愈合实验结果 (图 5) 显示, VASH1 组 SW620 细胞迁移数和划痕愈合率均显著低于对照组 (均 *P*<0.05), 说明过表达 VASH1 能够显著抑制 SW620 细胞的迁移能力。

2.6 过表达 VASH1 抑制 SW620 移植瘤的生长和肺转移

VASH1 组移植瘤的生长速度显著低于对照组 (*P*<0.05, 图 6A、B), 且 H-E 染色结果 (图 6C、D) 显示, VASH1 组的肺组织转移灶的数量和面积均显著低于对照组细胞 (均 *P*<0.05)。



A, B: Migration ability of VASH1 over-expressed colorectal cancer cells was detected by Transwell assay; C, D: Migration ability of VASH1 over-expressed colorectal cancer cells was detected by Wound healing assay

图 5 过表达 VASH1 抑制 SW620 细胞的迁移

Fig.5 Over-expression of VASH1 inhibited migration of SW620 cells

IHC 染色结果 (图 6E、F) 显示, 与对照组相比, VASH1 组移植瘤中血管内皮细胞标志物 CD31 阳性的细胞数明显降低, 微血管数量显著减少, 而且表达和分泌 VEGFA 的细胞也明显减少 (均 $P < 0.05$)。

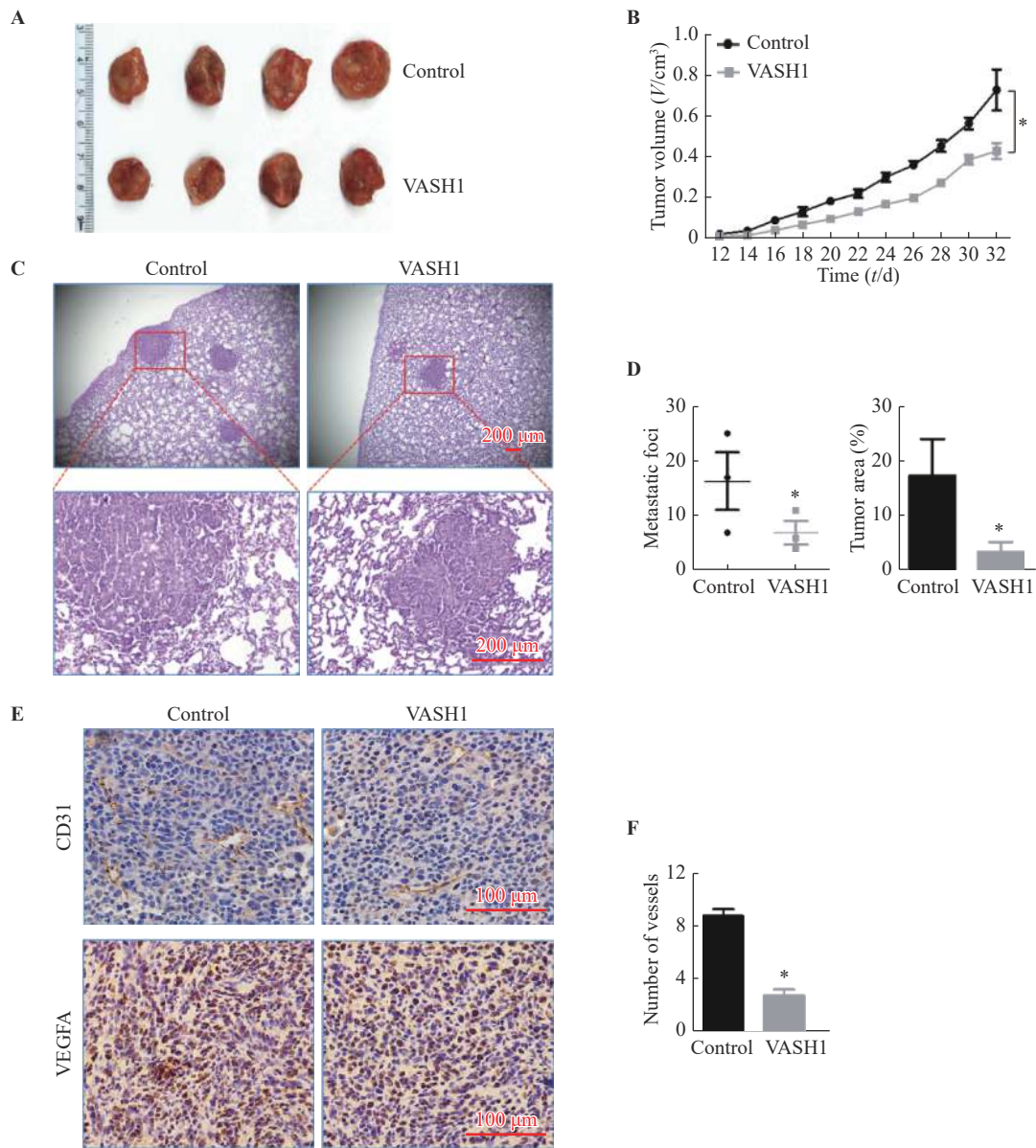
3 讨论

肿瘤的新生血管为肿瘤细胞提供生长所需的养分, 并可作为肿瘤的一条重要转移路径^[14-15]。微血管密度评估是量化瘤内血管新生最常用的方法, 微血管密度与多种肿瘤的恶性潜能有关^[16-19]。但是在某些肿瘤中并非如此, 如肾透明细胞癌, MIKAMI 等^[20]提出, 肾透明细胞癌中微血管密度与预后的关系是不同的, 微血管密度并不能完全反映血管新生的活性, 因为血管内皮细胞的标志物如 CD31、CD34 等是由静态和活跃的内皮细胞共同表达的, 而静态内皮细胞可能并没有血管新生活性; YILDIZ 等^[21]则认为, 尽管肾透明细胞癌通常是富血供的, 但在高级的肾透明细胞癌中血管密度是降低的, 原因在于肿瘤细胞的过度增殖。因此, 需要寻找一种更能反映肿瘤恶性潜能的分子标志物。

VASH1 近年来被鉴定为一种新型的由 VEGF 诱导的内皮来源的血管生成抑制剂^[10,13]。其在病理性血管新生中发挥重要作用, 比如视网膜疾病^[12]和糖尿病肾病^[22]。VASH1 主要表达于血管内皮细胞, 主要由 VEGF 和 FGF-2 等血管生成刺激因子诱导表达^[10,23]。近年来发现, VASH1 在口腔鳞状细胞癌、

子宫颈鳞状细胞癌、食管鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌等恶性肿瘤中均表达, 并参与肿瘤的发生、发展以及预后过程。例如, 在非小细胞肺癌的研究中发现, 在小鼠 Lewis 肺癌细胞中过表达 VASH1 显著抑制了小鼠体内肿瘤的生长和肿瘤血管的生成^[13]; 卵巢癌研究中发现, VASH1 在体外对细胞的生长无影响, 但在小鼠的卵巢癌移植瘤组织中高表达 VASH1 会对体内移植瘤生长和血管生成发挥明显的抑制作用, 且对肿瘤细胞向腹水的播散有抑制作用^[24]; 在肾透明细胞癌研究中, 有报道^[20]指出, VASH1 的表达与其病理分期和远处转移呈正相关, VASH1 的表达也是肾透明细胞癌患者无进展生存期和总生存期的独立预后指标。而且, 有几项研究^[25-27]证实, VASH1 在内皮细胞中的表达比微血管密度更能预示癌症患者的预后。

WATANABE 等^[13]和 HEISHI 等^[28]均发现, VASH1 可在一定程度上抑制 VEGF 和其他因子 (如 PDGF 和 FGF) 的血管生成功能。在肿瘤微环境的缺氧条件下 HIF-1 α 可上调 VEGF 的表达, 而 VASH1 能够增强脯氨酸羟化酶的表达从而促进 HIF-1 α 的脯氨酸羟基化, 并导致泛素介导的蛋白酶体途径降解 HIF-1 α 来抑制内皮细胞的增殖, 抑制肿瘤血管生成, 但是肿瘤细胞可通过蛋白水解作用降解由内皮细胞合成和分泌的 VASH1 蛋白, 从而促进肿瘤的生长和血管生成^[11,29]。



*P<0.05 vs Control group

A, B: Effect of VASH1 over-expression in SW620 cells on the growth of subcutaneously transplanted tumors in NOD-SCID mice; C, D: Effect of VASH1 over-expression in SW620 cells on lung metastasis in NOD-SCID mice; E-F: Effect of VASH1 over-expression in SW620 cells on angiogenesis of subcutaneously transplanted tumor in NOD-SCID mice

图 6 过表达 VASH1 对人结直肠癌 SW620 细胞皮下移植瘤生长和肺转移的影响

Fig.6 Effect of VASH1 over-expression on tumor growth and lung metastasis of Colorectal cancer SW620 cell subcutaneous transplantation tumor

本研究成功构建了 VASH1 慢病毒载体, 并且其用其高效转染在 SW480 和 SW620 细胞发现, 过表达 VASH1 后, 细胞的小管形成、增殖、克隆形成和迁移能力均显著降低, 反映了其微血管形成、恶性增殖能力和迁移能力的降低以及群体依赖性的升高, 这体现了肿瘤细胞的恶性潜能有所下降。此外, 过表达 VASH1 也显著降低了 SW620 细胞 NOS-SCID 小鼠皮下移植瘤的生长速度以及肺转移能力。LIU 等^[30] 在结肠癌研究中也发现, 结肠癌患者肿瘤组织中的 VASH1 水平与肿瘤体积、临床分期和远处转移呈负相关, 结肠癌细胞中过表达

VASH1 可诱导细胞衰老、凋亡, 以及抑制细胞生长和克隆形成。

总之, 本研究结果表明, VASH1 能够抑制人结肠癌细胞的微血管形成、恶性增殖以及迁移过程, 提示其有潜力成为结肠癌治疗的新靶点, 为结肠癌的治疗方案提供了新思路。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193. DOI: 10.3322/caac.21395.
- [3] DZUNIC M, PETKOVIC I, CVETANOVIC A, et al. Current and future targets and therapies in metastatic colorectal cancer[J]. *J BUON*, 2019, 24(5): 1785-1792.
- [4] DE PALMA M, BIZIATO D, PETROVA T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 457-474. DOI: 10.1038/nrc.2017.51.
- [5] GORADEL N H, MOHAMMADI N, HAGHI-AMINJAN H, et al. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1099-1110. DOI: 10.1002/jcp.27051.
- [6] LATA CZ E, CASPANI E, BARNHILL R, et al. Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(1): 43-54. DOI: 10.1007/s10456-019-09690-0.
- [7] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9): 1745-1770. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- [8] VAN BEIJNUM J R, PIETERS W, NOWAK-SLIWINSKA P, et al. Insulin-like growth factor axis targeting in cancer and tumour angiogenesis - the missing link[J]. *Biol Rev*, 2017, 92(3): 1755-1768. DOI: 10.1111/brv.12306.
- [9] VIALLARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.
- [10] SATO Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 5-11. DOI: 10.1093/jb/mvs128.
- [11] DU H, ZHAO J, HAI L, et al. The roles of vasohibin and its family members: Beyond angiogenesis modulators[J]. *Cancer Biol. Ther.*, 2017, 18(11): 827-832. DOI: 10.1080/15384047.2017.1373217.
- [12] HU X N. A review on vasohibin and ocular neovascularization[J]. *Int J Ophthalmol*, 2020, 13(6): 1004-1008. DOI: 10.18240/ijo.2020.06.22.
- [13] WATANABE K, HASEGAWA Y, YAMASHITA H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7): 898-907. DOI: 10.1172/jci21152.
- [14] SAJIB S, ZAHRA F T, LIONAKIS M S, et al. Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(1): 1-14. DOI: 10.1007/s10456-017-9583-4.
- [15] LA PORTA S, ROTH L, SINGHAL M, et al. Endothelial Tie1-mediated angiogenesis and vascular abnormalization promote tumor progression and metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(2): 834-845. DOI: 10.1172/jci94674.
- [16] HASAN J, BYERS R, JAYSON G C. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(10): 1566-1577. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600315.
- [17] MIYATA Y, SAKAI H. Reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: Usefulness and limitations of microvessel density measurement[J]. *Int J Urol*, 2015, 22(9): 806-815. DOI: 10.1111/iju.12840.
- [18] HU X L, LIU H L, YE M M, et al. Prognostic value of microvessel density in cervical cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 152. DOI: 10.1186/s12935-018-0647-3.
- [19] DEN UIL S H, VAN DEN BROEK E, COUPÉ V M H, et al. Prognostic value of microvessel density in stage II and III colon cancer patients: a retrospective cohort study[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1): 146. DOI: 10.1186/s12876-019-1063-4.
- [20] MIKAMI S, OYA M, KOSAKA T, et al. Increased vasohibin-1 expression is associated with metastasis and poor prognosis of renal cell carcinoma patients[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(7): 854. DOI: 10.1038/labinvest.2017.26.
- [21] YILDIZ E, AYAN S, GOZE F, et al. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*, 2008, 101(6): 758-764. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2007.07318.x.
- [22] NASU T, MAESHIMA Y, KINOMURA M, et al. Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2009, 58(10): 2365-2375. DOI: 10.2337/db08-1790.
- [23] SHIMIZU K, DE WATANABE K, YAMASHITA H, et al. Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(3): 700-706. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.073.
- [24] TAKAHASHI Y, SAGA Y, KOYANAGI T, et al. The angiogenesis regulator vasohibin-1 inhibits ovarian cancer growth and peritoneal dissemination and prolongs host survival[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(6): 2057-2063. DOI: 10.3892/ijo.2015.3193.
- [25] YOSHINAGA K, ITO K, MORIYA T, et al. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2): 446-451. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01812.x.
- [26] KANOMATA N, SATO Y, MIYAJI Y, et al. Vasohibin-1 is a new predictor of disease-free survival in operated patients with renal cell carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(7): 613-619. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201444.
- [27] KOSAKA T, MIYAZAKI Y, MIYAJIMA A, et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(10): 2123-2129. DOI: 10.1038/bjc.2013.169.
- [28] HEISHI T, HOSAKA T, SUZUKI Y, et al. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1950-1958. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090829.
- [29] SAITO M, SUZUKI Y, YANO S, et al. Proteolytic inactivation of anti-angiogenic vasohibin-1 by cancer cells[J]. *J Biochem*, 2016, 160(4): 227-232. DOI: 10.1093/jb/mvw030.
- [30] LIU S, HAN B, ZHANG Q, et al. Vasohibin-1 suppresses colon cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7880-7898. DOI: 10.18632/oncotarget.3493.

[收稿日期] 2020-02-02

[修回日期] 2021-03-02

[本文编辑] 黄静怡