

· 论著 ·

VE-statin/Egfl7-siRNA 抑制恶性胶质瘤
诱导内皮细胞血管生成能力的体外研究尹波^{1,2}, 黄纯海³, 王苟思义¹, 王非一凡¹, 叶宁荣¹, 李钊¹, 桑树山¹, 李学军¹

1. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008

2. 湖南常德澧县人民医院神经外科, 湖南 常德 415500

3. 吉首大学第一附属医院神经外科, 湖南 吉首 416000

摘要:目的 通过细胞培养及 RNA 干扰技术探讨类表皮生长因子域 7 (VE-statin/Egfl7) 在恶性胶质瘤血管生成中的作用和机制。方法 Transwell 培养技术建立 U251-HUVEC 共培养系统, 体外模拟恶性胶质瘤与内皮细胞的相互作用; 并通过构建靶向 VE-statin/Egfl7 基因的 siRNA 慢病毒载体抑制 U251 和 HUVEC 细胞中该基因的表达。通过内皮细胞增殖、粘附、迁移及成管实验检测该基因在体外恶性胶质瘤微环境中对血管生成的影响。结果 沉默 VE-statin/Egfl7 基因表达后, HUVEC 生长出现暂时性减缓, 但很快恢复正常增殖状态, 而且内皮细胞的迁移能力不受影响, 但是内皮细胞的粘附能力明显受到抑制; 成管实验发现, VE-statin/Egfl7 基因沉默后内皮细胞不能形成毛细血管样结构。结论 VE-statin/Egfl7 可通过调节内皮细胞的粘附性而在恶性胶质瘤血管生成过程的血管管腔形成过程中起着关键性调控作用。

关键词: 类表皮生长因子域 7; 恶性胶质瘤; 血管生成; RNA 干扰

Inhibitory effect of VE-statin/Egfl7-siRNA on angiogenesis of endothelial cells induced by malignant glioma in vitro

Yin Bo^{1,2}, Huang Chun-hai³, Wanggou Si-yi¹, Wangfei Yi-fan¹, Ye Ning-rong¹, Li Zhao¹, Sang Shu-shan¹, Li Xue-jun¹. 1. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Neurosurgery, Lixian People's Hospital, Changde 415500, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Jishou University, Jishou 416000, China.

Abstract: Objective To investigate the function and mechanism of epidermal growth factor-like domain 7 (VE-statin/Egfl7) in malignant glioma angiogenesis by cell culture and RNA interference. **Methods** Interaction between tumor cells and endothelial cells in malignant glioma was simulated by transwell-based co-culture of U251 and HUVEC cells. A lentivirus system carrying siRNA was used to inhibit the expression of VE-statin/Egfl7 in HUVEC cells and U251 cells. The effects of VE-statin/Egfl7 on angiogenesis in malignant glioma microenvironment were evaluated by endothelial cell proliferation, adhesion, migration, and tube formation assay. **Results**

After VE-statin/Egfl7 gene silencing, a temporary growth inhibition was observed in HUVEC cells, followed by immediate recovery of normal proliferation. The endothelial cell migration was not affected, while the adhesion of endothelial cells was significantly inhibited. VE-statin/Egfl7 gene silencing also significantly suppressed the formation of capillary-like structures by endothelial cells. **Conclusions** VE-statin/Egfl7 plays a key role in the formation of vascular tubular structure in malignant glioma angiogenesis via regulation of endothelial cell adhesion.

Key words: Epidermal growth factor-like domain 7; Malignant glioma; Angiogenesis; RNA interference

脑胶质瘤是由神经外胚叶衍化而来的胶质细胞发生的恶性肿瘤, 发病率占颅内肿瘤的第一位。

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目 (NO:11B100); 湖南省科技厅资助项目 (NO:14JJ2019); 国家自然科学基金资助项目 (NO:81272798)

收稿日期: 2014-04-07; 修回日期: 2014-06-28

作者简介: 尹波 (1979-), 男, 硕士, 主治医师, 湖南常德澧县人民医院神经外科, 主要从事胶质瘤临床与基础研究。

通讯作者: 李学军 (1972-), 男, 博士, 副教授, 湘雅医院神经外科, 主要从事神经肿瘤临床与基础研究 E-mail: lixuejun70s@126.com。

虽然近年医学技术取得了令人瞩目的进步,但是恶性胶质瘤患者的预后并没得到多大改观,其平均生存期仍然只有12~15个月。胶质瘤的生长及侵袭依赖于血管形成,持续的血管增殖被认为是胶质瘤一个重要的恶性特征^[1],肿瘤血管生成的机制复杂,寻找具有调控血管生成的关键性靶点具有重要的意义。类表皮生长因子域7(Epidermal growth factor-like domain 7, VE-statin/Egfl7)是新近发现的内皮细胞源性血管生成调控因子,在胚胎发育过程中高表达,在胚胎血管发育的管状形成过程中起着关键性调控作用。它在成人除肺、卵巢、子宫等富血管组织外的大部分组织中不表达或弱表达^[2]。继Wu等^[3]及本课题组^[4]分别发现VE-statin/Egfl7在肝癌和恶性胶质瘤中存在高水平表达后,越来越多的证据显示VE-statin/Egfl7基因在多种人类恶性肿瘤中被重新激活。本研究拟进一步采用小RNA干扰技术(Small interfering RNA, siRNA)体外研究VE-statin/Egfl7在胶质瘤血管生成中的作用,阐明VE-statin/Egfl7在胶质瘤中表达的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株HUVEC及人脑星型胶质细胞瘤细胞株U251(来源于多形性胶质母细胞瘤WHO IV级)均购自中南大学湘雅中心实验室细胞库。加入含12%胎牛血清的RMPI 1640培养基于37℃和5%二氧化碳的温箱中培养。

1.2 主要仪器和试剂

Trizol购自美国intravogen公司。RT-PCR相关试剂均购自TAKARA公司。胎牛血清、RMPI 1640培养基及Opti-MEM等为GIBCO产品。MTT、结晶紫为Sigma产。Plasmid大抽Kit为QIAGEN生产。引物由上海吉凯基因合成。荧光显微镜为奥林帕斯公司产。SDS-PAGE蛋白电泳仪及蛋白转膜仪为上海天能产。倒置相差显微镜为Nikon TMS-F。Transwell培养板购于美国Costar。多孔培养板购于美国Corning公司。

1.3 实验方法

1.3.1 U251-HUVEC共培养及实验分组 用Transwell培养技术建立U251-HUVEC共培养系统:将Transwell小室放入24孔培养板中,小室底层有一张通透性的聚碳酸酯膜。将HUVEC和U251细胞分别种在上下室内,由于聚碳酸酯膜有通透性,上下层培养液中的成分可以互相交换,从而可以研

究上下层细胞之间相互作用。聚碳酸酯膜的孔径若小于3.0 μm,细胞不能通过但细胞分泌的物质可以通过,常用0.4 μm。若膜的孔径大于3.0 μm则上室的细胞在下室细胞的趋化作用下会穿过此孔向下迁移。实验分组:①正常阴性对照(CC),即正常培养未加任何干预措施。②含普适性阴性对照序列(NC)的慢病毒感染U251和HUVEC细胞。③含VE-statin/Egfl7-siRNA有效靶点序列(KD)的慢病毒感染U251和HUVEC细胞。

1.3.2 VE-statin/Egfl7-siRNA慢病毒载体构建及感染U251及HUVEC 前期本课题组已成功筛选出VE-statin/Egfl7基因RNA干扰的有效靶点。VE-statin/Egfl7-siRNA慢病毒载体构建及感染细胞方法见参考文献^[5,6]。

1.3.3 HUVEC增殖能力检测(MTT法) 收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,细胞培养用24孔板,膜孔径0.4 μm。下室接种U251,每孔 1×10^5 个;上室接种HUVEC,每孔200 μl,含细胞数 6×10^3 个/孔;置37℃、5%CO₂温箱分开培养;待两种细胞均融合达30%以上时进行共培养,并按实验分组要求进行慢病毒感染,继续培养;培养后24 h、48 h、72 h、96 h、5 d行MTT检测;小心吸去上清,加入480 μl新鲜RPMI 1640培养液,再加入120 μl 0.5% MTT溶液,继续培养4 h;然后吸掉上清,将聚碳酸酯膜取下置入96孔板中,每孔加入150 μl二甲亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,弃聚碳酸酯膜;同时设置调零孔(二甲亚砜),每组设定5复孔;选择492 nm波长,在酶标仪上测定各孔光密度(optical density, OD)值。

1.3.4 HUVEC粘附及迁移能力检测(结晶紫法) 按1.3.3准备细胞及感染病毒。感染慢病毒72 h后,收集HUVEC接种于上室,膜孔径0.4 μm,膜的上面经鼠尾胶原包被用于粘附实验,每孔200 μl,含细胞数 2×10^4 个/孔;测定前,将各实验组上室置入新的24孔板中,每孔加0.6 ml 33%醋酸脱色,充分振荡,每组设定5复孔;同时设置调零孔(33%醋酸);每孔取脱色液150 μl加入96孔板中,在570 nm处测定OD值。细胞迁移实验用的膜孔径为8.0 μm,上室内HUVEC接种为每孔200 μl,含细胞数 1×10^5 个/孔,培养24 h后测定迁移细胞数;吸去培养液,用棉签轻轻擦除上室聚碳酸酯膜内侧面贴壁细胞,用0.01 MPBS漂洗两次,4%多聚甲醛固定10 min;后续结晶紫染色步骤同粘附实验。

1.3.5 HUVEC 体外成管能力检测 取 7 倍体积的鼠尾胶原,1 倍体积的 $10 \times \text{RMP 1640}$ 培养基,1 倍体积的 0.1 N 氢氧化钠和 1 倍体积的胎牛血清,在冰盒上无菌小瓶内迅速混匀,调 pH 值至 7.4 左右;收集对数期细胞用 24 孔板培养,膜孔径 $0.4 \mu\text{m}$ 。调整细胞悬液浓度,先在下室接种 HUVEC,每孔 4×10^4 个,上室接种 U251 细胞, 4×10^4 个/孔,进行共培养,如前所述进行慢病毒感染;置 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 温箱培养;待 HUVEC 细胞近 100% 融合汇集成单细胞层后吸除培养液;将配制好的胶原凝胶加入下室覆盖 HUVEC 层,每孔 $300 \mu\text{l}$;于 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 温箱继续培养,观察 HUVEC 的管状结构形成情况。

1.4 统计分析

用 SPSS 13.0 统计分析软件包处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。根据数据资料的特征,采用单因素方差分析,SNK-q 检验进行两两间显著性分析。图像分析采用 Image-Pro Plus

6.0 软件。

2 结果

2.1 慢病毒瞬转 U251 和 HUVEC 细胞株

含靶向 VE-statin/Egfl7 基因的 siRNA 序列的慢病毒表达载体感染 U251 及 HUVEC 细胞 48 小时后,在倒置相差荧光显微镜下可见感染细胞发出强烈的绿色荧光,感染率 $> 80\%$,而对照组因未感染慢病毒故不发出荧光。实时荧光定量 PCR 检测结果显示实验组与对照组相比,两种细胞的 VE-statin/Egfl7 表达抑制率均 $> 80\%$ 以上。

2.2 HUVEC 增殖活性的变化

加入 MTT 后活细胞生成紫蓝色的针状结晶。用二甲亚砜(DMSO)溶解后在酶标仪上测定各孔 OD 值。KD 组 HUVEC 在 48 h 后增殖能力明显低于两对照组,此状态一直持续至第 4 d ($P < 0.01$);第 5 d 时又恢复至对照组水平 ($P > 0.05$)。CC 组与 NC 组无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 a ~ c。

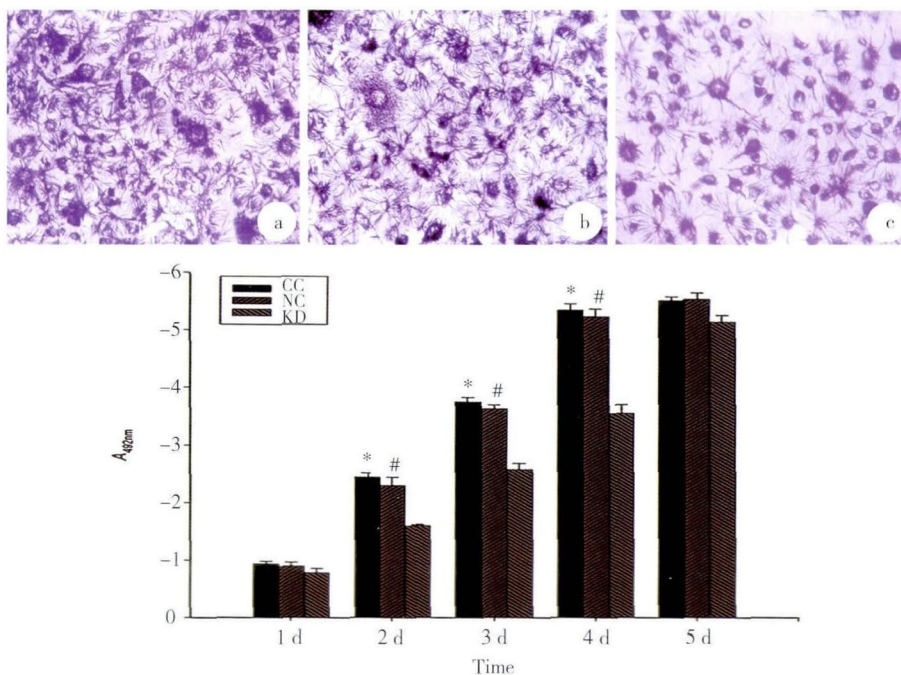


图 1 VE-statin/Egfl7-siRNA 对 HUVEC 细胞增殖能力的影响 a ~ c: KD 组 HUVEC 在 48 h 后增殖能力明显低于两对照组,此状态一直持续至第 4 d ($P < 0.01$);第 5 d 时又恢复至对照组水平 ($P > 0.05$) (*, # 对比 KD 组, $q = 20.023, 16.686; 29.009, 26.034; 30.549, 28.672, P < 0.01$) (a) 代表 HUVEC 细胞的正常阴性对照组, (b) 代表普适性阴性对照序列的慢病毒感染 HUVEC 细胞, (c) 代表含 VE-statin/Egfl7-siRNA 有效靶点序列的慢病毒感染 HUVEC 细胞

2.3 HUVEC 粘附、迁移能力的变化

在 CC 及 NC 两组中,接种 30 min 后其结晶紫

OD 值分别为 0.850 ± 0.033 和 0.823 ± 0.036 ,均明显高于 KD 组 (0.406 ± 0.027),表明 VE-statin/

Egfl7 siRNA 可明显抑制 HUVEC 的粘附性 ($q = 30.816, 28.942, P < 0.01$); 但 24 h 时检测三组细胞迁移无显著差异, 表明 VE-statin/Egfl7 siRNA 对 HUVEC 的迁移能力无明显影响 ($P > 0.05$)。

2.4 HUVEC 成管能力的变化

加入鼠尾胶原 6 h 后, CC 及 NC 组均可见 HUVEC 细胞出现变形, 大多呈长梭形, 伸出较长的伪足。与未加胶的普通 HUVEC 培养相比, 细胞伸展, 胞体变成细长形。随着培养时间的延长, 变形的细胞不断运动, 并逐渐出现纵轴一致的群集性现象。24 h 后已可见明显的单层 HUVEC 围成的毛细血管管腔样结构, 并逐渐增加。3 d 后管腔结构仍较明显。与两对照组相比, KD 组一直未见管状结构形成。采集 24 h 的图像经 Image-Pro Plus 6.0 量化分析后发现, CC 及 NC 组管状结构相对面积分别为 0.599 ± 0.052 和 0.587 ± 0.036 ; 管型数分别为 25.20 ± 2.51 和 23.8 ± 2.32 , KD 组均为 0。两组间相比无明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

如其它实体性肿瘤一样, 胶质瘤的生长高度依赖持续的血管生成。本课题组在前期研究中发现^[4] VE-statin/Egfl7 在人脑恶性胶质瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞中均存在高水平表达, 并且与肿瘤的恶性程度、增殖及血管新生有着密切的正相关性。用免疫组化及实时荧光定量 PCR 检测到人源多形性胶质母细胞株 U251 也存在该基因的高表达, 这表明 VE-statin/Egfl7 非内皮细胞特异性分泌, 胶质瘤细胞也可合成该蛋白, 但它的作用及分子机制尚不太清楚。本研究通过 transwell 技术建立了 U251 与 HUVEC 的共培养系统, 从而在体外构建胶质瘤细胞与内皮细胞相互作用与影响的微生态环境, 以单独分析特定因子 VE-statin/Egfl7 的作用及机制。前期本课题组采用小 RNA 干扰技术构建了靶向 VE-statin/Egfl7 基因的短发夹结构 RNA 慢病毒绿色荧光蛋白表达载体, 对 HUVEC 及 U251 细胞的 VE-statin/Egfl7 基因可产生显著特异性的沉默作用^[5,6]。在此基础上, 本研究旨在进一步在体外探索 VE-statin/Egfl7 在恶性胶质瘤诱导内皮细胞血管生成中的作用和机制, 结果发现沉默 VE-statin/Egfl7 基因表达后, HUVEC 生长亦出现暂时性减缓, 但很快恢复正常增殖状态, 而且内皮细胞的迁移能力亦不受影响, 但是内皮细胞的粘附能力明显受到抑制; 成管实验发现, VE-statin/Egfl7 基因沉

默后内皮细胞不能形成毛细血管样结构。结果提示 VE-statin/Egfl7 可通过调节内皮细胞的粘附性而在胶质瘤血管生成过程的血管管腔化中起着关键性调控作用。

VE-statin/Egfl7 是新一发现的血管活性因子, 在生理或病理性血管生成中 VE-statin/Egfl7 可重新被激活而参与血管生成^[7], 这也提示在某些血管依赖性的恶性肿瘤中它的表达可能被重新激活, 在肿瘤的抗血管生成治疗中是一极具潜在价值的靶点, 因而近三年 VE-statin/Egfl7 与肿瘤发生发展的相关性研究备受重视。除了在胶质瘤中, 研究表明 VE-statin/Egfl7 在人体多种恶性肿瘤中存在表达, 并促进肿瘤的侵袭和转移能力, 且与预后不良相关^[8-10]。自从 Folkman 提出了肿瘤生长血管依赖性理论, 指出肿瘤血管生成是肿瘤迅速成长、侵袭和转移的关键。血管新生是肿瘤侵袭和转移的前提和基础这一观点已取得共识且为大量研究所证实。本研究表明 VE-statin/Egfl7 可通过调节胶质瘤的血管生成能力, 在促进脑胶质瘤的恶性进展中发挥作用, 该研究进一步阐明了 VE-statin/Egfl7 在人脑恶性胶质瘤中高水平表达的意义和机制。VE-statin/Egfl7 在人脑胶质瘤恶性化特征中的分子机制尚未检索到相关报道。但有研究发现^[3] VE-statin/Egfl7 通过激活 EGFR 增加局部粘着斑激酶 (FAK) 的磷酸化水平, 而促进内皮细胞的迁移及肝癌的转移。在果蝇中 VE-statin/Egfl7 与整合素配体 Talin 形成复合体而调节整合素 α PS2 β PS 的活性^[11], 整合素与 Talin 的结合可以激活 FAK 信号通路。人体中该基因在细胞外基质与整合素 α v β 3 结合, 参与血管形成^[12]。在胚胎血管发育及血管损伤修复时, VE-statin/Egfl7 的功能主要是在脉管发育过程中管状结构的形成中起着关键作用。其主要作用机制可能与调节血管内皮细胞的群集性迁移和时空排列相关^[13]。在本研究中发现 VE-statin/Egfl7 基因沉默后, 恶性胶质瘤细胞株 U251 诱导的 HUVEC 血管生成能力明显受到抑制, 并影响 HUVEC 的粘附性, 表明 VE-statin/Egfl7 参与胶质瘤血管生成调控是其作用机制之一。

生理及病理性血管生成中, 内皮细胞迁移是重要的一个步骤, 但本研究并没发现如实验前所预期 VE-statin/Egfl7 影响内皮细胞的迁移能力, 而是在沉默 VE-statin/Egfl7 基因表达后发现单个 HUVEC 迁移能力并无明显的改变。分析其原因, VE-sta-

tin/Egfl7 在血管生成中主要是调节内皮细胞的群集性迁移即血管出芽,而并不是增加单个内皮细胞的迁移能力,在多细胞器官中,尽管各种细胞能够单独迁移,但是通常细胞都是呈群集性迁移的^[13]。Schmidt 等^[14]研究表明 VE-statin/Egfl7 对单个内皮细胞的迁移没有影响,它主要是通过给邻近的内皮细胞传递位置信息而影响内皮细胞的群集性迁移。当 VE-statin/Egfl7 表达缺失时,新形成的内皮细胞粘附于其它内皮细胞的基底侧出现局部异常的内皮细胞堆积,而不是与其邻近内皮细胞呈面对面沿血管出芽迁移路径呈线状排列,因而导致内皮细胞不能向前迁移。所以,VE-statin/Egfl7 的作用机制之一可能是在内皮细胞群集性迁移过程中,精确调节内皮细胞之间的正确空间排列从而保证内皮细胞按正确的路径迁移,确保最终毛细血管样结构形成。

内皮细胞与周围细胞外基质粘附、整合亦是血管形成的重要步骤之一,若不然内皮细胞则无法发挥其正常功能,最终发生凋亡。本研究发现 VE-statin/Egfl7 基因沉默可使 HUVEC 粘附能力下降。Park 等^[15]研究报道 VE-statin/Egfl7 可促进内皮细胞粘附,但是其作用能力较其它基质蛋白弱,故单独存在情况下,VE-statin/Egfl7 对内皮细胞具有促进粘附的能力。Schmidt 等^[14]发现 VE-statin/Egfl7 能够整合入新生血管周围的细胞外基质,并与 Fibronectin 等形成细胞外基质复合物,由于比这些胞外基质粘附能力低,因而 VE-statin/Egfl7 的粘附调节作用可能主要是确保内皮细胞在管状结构形成过程中精确的时空排列。

本研究表明 VE-statin/Egfl7-siRNA 抑制 U251 和 HUVEC 的 VE-statin/Egfl7 基因表达后,可明显抵抗恶性胶质瘤细胞 U251 诱导的 HUVEC 血管生成能力,其作用机制是通过调节内皮细胞粘附性影响其群集性迁移,最终在血管管腔化过程中起着关键性作用。以 VE-statin/Egfl7 为靶点的抗胶质瘤血管生成及基因治疗可能成为一新的有效的策略。

参 考 文 献

- [1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2):97-109.
- [2] Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, et al. Egfl7, a novel

epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev Dyn*, 2004, 230(2):316-324.

- [3] Wu F, Yang LY, Li YF, et al. Novel role for epidermal growth factor-like domain 7 in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 50(6):1839-1850.
- [4] 李学军, 黄纯海, 李萃, 等. EGFL7 在人脑胶质瘤中的表达及其意义. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(2):148-151.
- [5] 黄纯海, 李学军, 罗勇, 等. 人 EGFL7 基因短发夹结构 RNA 慢病毒载体的构建及鉴定. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2009, 8(6):513-516.
- [6] 周桂林, 黄纯海, 万一, 等. 靶向人 EGFL7 基因的短发夹结构 RNA 对胶质瘤细胞系 U251 增殖的影响. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(22):2702-2706.
- [7] Nichol D, Stuhlmann H. EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood*, 2012, 119(6):1345-1352.
- [8] Li JJ, Yang XM, Wang SH, et al. Prognostic role of epidermal growth factor-like domain 7 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*, 2011, 125(11):1152-1157.
- [9] Philippin-Lauridant G, Baranzelli MC, Samson C, et al. Expression of Egfl7 correlates with low-grade invasive lesions in human breast cancer. *Int J Oncol*, 2013, 42(4):1367-1375.
- [10] Delfortrie S, Pinte S, Mattot V, et al. Egfl7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation. *Cancer Res*, 2011, 71(23):7176-7186.
- [11] Gilsohn E, Volk T. Slowdown promotes muscle integrity by modulating integrin-mediated adhesion at the myotendinous junction. *Development*, 2010, 137(5):785-794.
- [12] Nikolic I, Stankovic ND, Bicker F, et al. EGFL7 ligates $\alpha\beta 3$ integrin to enhance vessel formation. *Blood*, 2013, 121(15):3041-3050.
- [13] De Mazière A, Parker L, Van Dijk S, et al. Egfl7 knock-down causes defects in the extension and junctional arrangements of endothelial cells during zebrafish vasculogenesis. *Dev Dyn*, 2008, 237(3):580-591.
- [14] Schmidt M, Paes K, De Mazière A, et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development*, 2007, 134(16):2913-2923.
- [15] Nichol D, Stuhlmann H. EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood*, 2012, 119(6):1345-1352.