

· 基础研究 ·

VASH2 对脑胶质瘤血管新生的影响机制

李宇¹, 刘宇翔¹, 萨丽波^{2*}

(¹ 辽宁省金秋医院综合老年医学科, 沈阳 110016; ² 沈阳医学院生理教研室, 沈阳 110034)

【摘要】 目的 通过观察血管抑制素-2(VASH2)对脑胶质瘤微血管内皮细胞增殖、迁移和管形成的调控作用,探究其对脑胶质瘤血管新生的影响机制。**方法** 构建人脑胶质瘤微血管内皮细胞模型,通过稳定转染获得 VASH2 过表达和表达沉默的细胞系,在后续实验中分组,分别为空白对照组、VASH2 过表达阴性对照空质粒组[VASH2(+)NC 组]、VASH2 过表达组[VASH2(+)组]、VASH2 表达沉默阴性对照空质粒组[VASH2(-)NC 组]和 VASH2 表达沉默组[VASH2(-)组]。通过细胞生长抑制实验检测细胞增殖能力的变化;体外管形成实验检测细胞管形成能力的变化;细胞迁移实验检测细胞迁移能力的变化。应用 GraphPad Prism v5.01 统计软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Newman-Keuls 分析。**结果** 在人脑胶质瘤微血管内皮细胞中上调 VASH2 的表达,VASH2 过表达组与 VASH2 过表达阴性对照空质粒组相比较,细胞的增殖能力、迁移能力和管形成能力均明显增强($P<0.05$),表明 VASH2 过表达能够促进胶质瘤血管的新生。在人脑胶质瘤微血管内皮细胞中下调 VASH2 的表达,VASH2 表达沉默组与 VASH2 表达沉默阴性对照空质粒组相比较,细胞的增殖能力、迁移能力和管形成能力均明显减弱($P<0.05$),表明 VASH2 沉默能够抑制胶质瘤血管的新生。**结论** VASH2 在胶质瘤管形成的调控方面扮演了重要的角色,可能为胶质瘤的抗血管治疗提供新策略。

【关键词】 脑胶质瘤;血管抑制素 2;血管新生;机制

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.02.028

Role of VASH2 in regulation of angiogenesis in glioma

LI Yu¹, LIU Yu-Xiang¹, SA Li-Bo^{2*}

(¹Department of Geriatrics, Liaoning Provincial Jinqiu Hospital, Shenyang 110016, China; ²Department of Physiology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of vasohibin 2 (VASH2) on angiogenesis of glioma by regulating the proliferation, migration and tube formation of glioma microvascular endothelial cells. **Methods** After cell model of human glioma microvascular endothelial cells (GECs) was obtained, VASH2 overexpression and silencing cell lines were established by stable transfection. In the follow-up experiment, they were divided into control group, VASH2 overexpression negative control empty plasmid[VASH2(+)NC] group, VASH2 overexpression [VASH2(+)]group, VASH2 expression silencing negative control empty plasmid [VASH2(-)NC] group and VASH2 expression silencing [VASH2(-)] group. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect cell proliferation, tube formation assay was employed to observe the changes of cell tube formation, and transwell assay was adopted to measure cell migration ability. GraphPad Prism v5.01 statistical software was used for data analysis. One-way ANOVA was employed for comparison between multiple groups and Newman-Keuls analysis was used for pairwise comparison between groups. **Results** When the expression of VASH2 was up-regulated in GECs, there was significant difference between VASH2(+) group and VASH2(+)NC group ($P<0.05$). The cell proliferation ability, migration ability and tube formation ability were significantly enhanced. It showed that VASH2 overexpression can promote the angiogenesis of glioma. When the expression of VASH2 was down-regulated, there was significant difference between VASH2(-) group and VASH2(-)NC group ($P<0.05$). The proliferation ability, migration ability and tube formation ability of cells were significantly weakened, indicating that VASH2 silencing can inhibit the angiogenesis of glioma. **Conclusion** VASH2 plays an important role in the regulation of glioma angiogenesis. VASH2 may be considered as a potential target in the therapy for glioma in the future.

【Key words】 glioma; vasohibin 2; angiogenesis; mechanism

This work was supported by the Guiding Plan Project of Natural Science Foundation of Liaoning Province (20180551249), and the Project of Liaoning Provincial Natural Science Foundation (2020-MS-315).

Corresponding author: SA Li-Bo, E-mail: salibosmc@163.com

收稿日期: 2021-07-24; 接受日期: 2021-10-18

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划(20180551249);辽宁省自然基金资助计划(2020-MS-315)

通信作者: 萨丽波, E-mail: salibosmc@163.com

胶质瘤是一种最常见的高度异质性的原发性脑肿瘤^[1],迄今为止,现有的手术、放射、化学及靶向治疗方法未能对疾病进展和患者生存率产生强有力的影响^[2]。肿瘤组织的生长和代谢需要胶质瘤新生血管为其提供营养,进而促进肿瘤细胞的分裂和增殖,以及肿瘤细胞向远处的浸润和迁移^[3]。胶质瘤复发率和死亡率高,严重依赖于血管生成。因此,抗血管生成治疗是治疗恶性胶质瘤的一种重要治疗方法^[4],值得进行深入研究。

血管抑制素(vasohibin,VASH)是由血管抑制素-1(vasohibin1,VASH1)和血管抑制素-2(vasohibin2,VASH2)组成的对血管生成有调节作用的因子。VASH1对血管生成有抑制作用,而VASH2对血管生成有促进作用^[5]。VASH2已被证实是一些常见的人类癌症中发挥致癌作用,VASH2被多种癌细胞表达,促进肿瘤血管的生成和进展^[6]。据报道,食管鳞状细胞癌(esophageal cell squamous carcinoma,ESCC)患者肿瘤高表达VASH2,预后不良^[5],子宫内膜癌患者中VASH2通过旁分泌作用促进血管生成^[7]。最近发现在卵巢癌中敲除VASH2可降低微管蛋白羧肽酶(tubulin carboxypeptidase,TCP)活性,以VASH2为靶点的卵巢癌治疗策略可能实现对血管生成的抑制和微管活性的调节^[8]。增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy,PDR)以血管生成作为特征,可导致视力下降甚至失明,研究发现VASH2促进视网膜内皮细胞的增殖和迁移^[9]。本研究通过观察VASH2对脑胶质瘤微血管内皮细胞增殖、迁移和管形成的调控作用,探究其对脑胶质瘤血管新生的影响机制,希望能为胶质瘤的抗血管生成治疗提供一种新策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胶质瘤细胞系U87、人脑微血管内皮细胞系hCMEC/D3(上海富衡生物科技有限公司);DMEM高糖培养基(HyClone);ECM内皮细胞培养基(Scien Cell);胎牛血清(ABW公司);VASH2过表达和沉默转染质粒(苏州吉玛公司);脂质体LTX,含Plus试剂(Lipofectamine LTX and Plus,美国生命技术公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8,日本同仁公司);吉姆萨工作液、胰蛋白酶(北京索莱宝公司);基质胶(美国碧迪公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立人脑胶质瘤微血管内皮细胞模型

U87细胞长到近融合时弃去DMEM培养基(10%胎

牛血清),用无血清DMEM培养液冲洗2次后加入无血清ECM基础培养基,放入恒温培养箱(37℃、5%CO₂)中培养24h后收集培养液,培养液在4℃离心机中以离心力2000g离心10min,收集上清液,加入5%胎牛血清,1%内皮细胞生长因子,配成胶质瘤条件培养液。用胶质瘤条件培养液培养人脑微血管内皮细胞hCMEC/D3(ECs)72h后,人脑胶质瘤微血管内皮细胞(glioma microvascular endothelial cells,GECs)模型建立成功。

1.2.2 建立VASH2稳定转染细胞系 sh-VASH2质粒载体为pGPU6/GFP/Neo,序列5'-3'为GCCT-TCTTGCGAAAGCCTTCA,VASH2过表达质粒以pcDNA3.1(+)为载体,将GECs细胞在生长状态良好的情况下接种于24孔板中,相应质粒的空载体为阴性对照。将VASH2过表达和表达沉默的质粒及相应的阴性对照质粒用Lipofectamine LTX and Plus分别进行转染,经G418筛选培养大约4周后得到VASH2过表达和表达沉默的胶质瘤微血管内皮细胞系。在后续实验中分组:空白对照组、VASH2过表达阴性对照空质粒[VASH2(+)-NC]组、VASH2过表达[VASH2(+)]组、VASH2表达沉默阴性对照空质粒[VASH2(-)-NC]组和VASH2表达沉默[VASH2(-)]组。

1.2.3 CCK-8细胞生长抑制实验 96孔细胞培养板中接种转染后分组的GECs细胞,密度为2000个/孔,每孔加入胶质瘤条件培养液200μl,24h后换液,每孔加入胶质瘤条件培养液100μl后再每孔加入10μl CCK-8,孵育2h后,应用酶标仪检测A_{450nm}。细胞活力(%)=(实验组A_{450nm}-空白A_{450nm})/(对照组A_{450nm}-空白A_{450nm})×100%。

1.2.4 细胞迁移实验 24孔细胞培养板中放入穿透小室(transwell chamber),在其上室加入转染后分组的GECs细胞100μl,密度为5×10⁵/ml,培养液为无血清胶质瘤条件培养液,下室加入600μl含5%胎牛血清的胶质瘤条件培养液培养24h,然后取出transwell小室,用棉签轻轻拭去小室上表面的细胞,下表面细胞用4%多聚甲醛固定30min后,用0.5%结晶紫染色30min,PBS充分冲洗,随机在高倍镜视野中选取5个视野,计数细胞迁移的数目。

1.2.5 体外血管形成实验 在96孔板中,每孔加入基质胶100μl,37℃放置30min后每孔加入100μl转染后分组的GECs细胞,密度为4×10⁵/ml,由胶质瘤条件培养液培养24h后随机取3个高倍镜视野进行拍照,应用ImageJ软件对图片进行分析,计数微血管的长度及分支数。

1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism v5.01 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Newman-Keuls 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VASH2 对 GECs 增殖能力的影响

分别上调和下调 GECs 中 VASH2 的表达后, 检测 GECs 增殖能力的改变。与空白对照组比较, VASH2(+)NC 组和 VASH2(-)NC 组 GECs 增殖能力均无统计学意义的变化。VASH2(+)组与 VASH2(+)NC 组比较, 细胞的增殖能力明显增加 (P<0.05); VASH2(-)组与 VASH2(-)NC 组比较, VASH2(-)组细胞的增殖能力明显降低 (P<0.05)。VASH2 对 GECs 增殖能力的影响详见图 1。

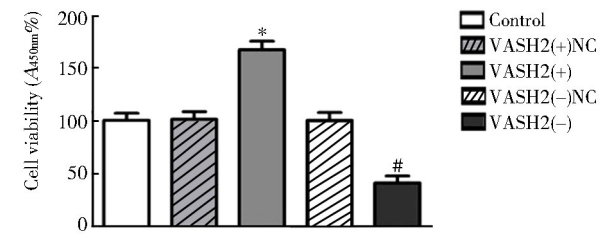


图 1 VASH2 对 GECs 增殖能力的影响
Figure 1 Effect of VASH2 on GECs proliferation ability (n=3)
VASH2: vasohibin2; GECs: glioma microvascular endothelial cells.
Compared with VASH2(+)NC group, * P<0.05;
compared with VASH2(-)NC group, #P<0.05.

2.2 VASH2 对 GECs 迁移能力的影响

分别上调和下调 GECs 中 VASH2 的表达后, 检

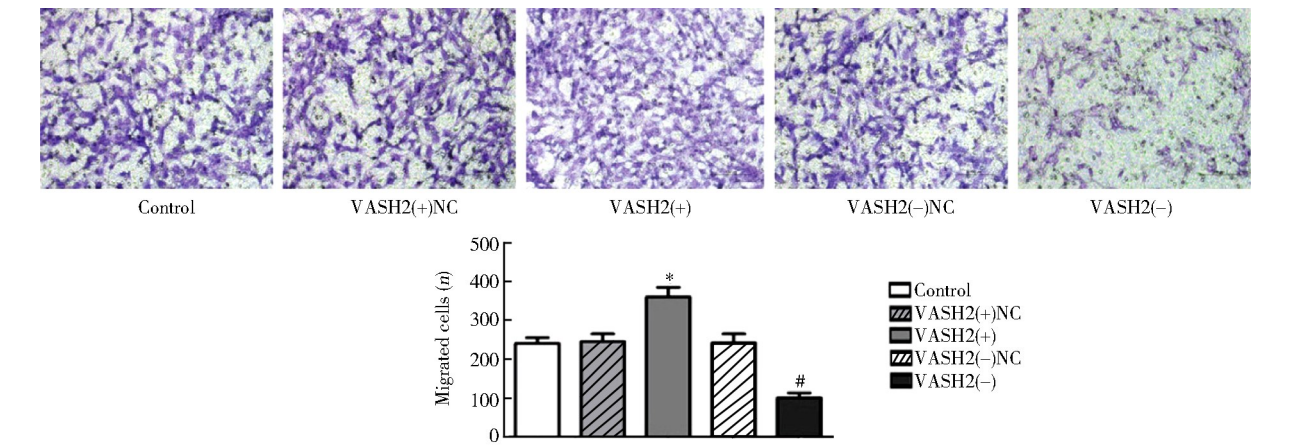


图 2 VASH2 对 GECs 迁移能力的影响
Figure 2 Effect of VASH2 on GECs migration ability (n=3; crystal violet staining×200)
VASH2: vasohibin2; GECs: glioma microvascular endothelial cells. Compared with VASH2(+)NC group,
* P<0.05; compared with VASH2(-)NC group, #P<0.05.

测 GECs 迁移能力的改变。与空白对照组比较, VASH2(+)NC 组和 VASH2(-)NC 组 GECs 迁移能力均无统计学意义的变化。VASH2(+)组与 VASH2(+)NC 组比较, 细胞的迁移能力明显增加 (P<0.05); VASH2(-)组与 VASH2(-)NC 组比较, VASH2(-)组细胞的迁移能力明显降低 (P<0.05)。VASH2 对 GECs 迁移能力的影响详见图 2。

2.3 VASH2 对 GECs 管形成能力的影响

分别上调和下调 GECs 中 VASH2 的表达后, 检测 GECs 管形成能力的改变。与空白对照组比较, VASH2(+)NC 组和 VASH2(-)NC 组 GECs 管形成能力均无统计学意义的变化; VASH2(+)组与 VASH2(+)NC 组比较, 细胞的管形成能力明显增加 (P<0.05); VASH2(-)组与 VASH2(-)NC 组比较, 细胞的管形成能力明显降低 (P<0.05)。VASH2 对 GECs 管形成能力的影响详见图 3。

3 讨论

本研究结果显示, 上调 GECs 中 VASH2 的表达后, GECs 增殖、迁移和管形成的能力均增强; 下调 GECs 中 VASH2 的表达后, GECs 的增殖、迁移和管形成的能力均减弱。证明了 VASH2 对脑胶质瘤血管新生具有一定的调控作用。胶质瘤的进展取决于肿瘤血管的生长, 胶质瘤细胞能分泌血管内皮生长因子等促血管生成因子促进血管内皮细胞的生长。此外, 胶质瘤血管内皮细胞还分泌多种促进肿瘤生长的因子, 这些分泌因子的相互作用可以促进胶质瘤生长^[4]。因此, 抗血管生成治疗被认为是治疗恶性胶质瘤的重要方法。

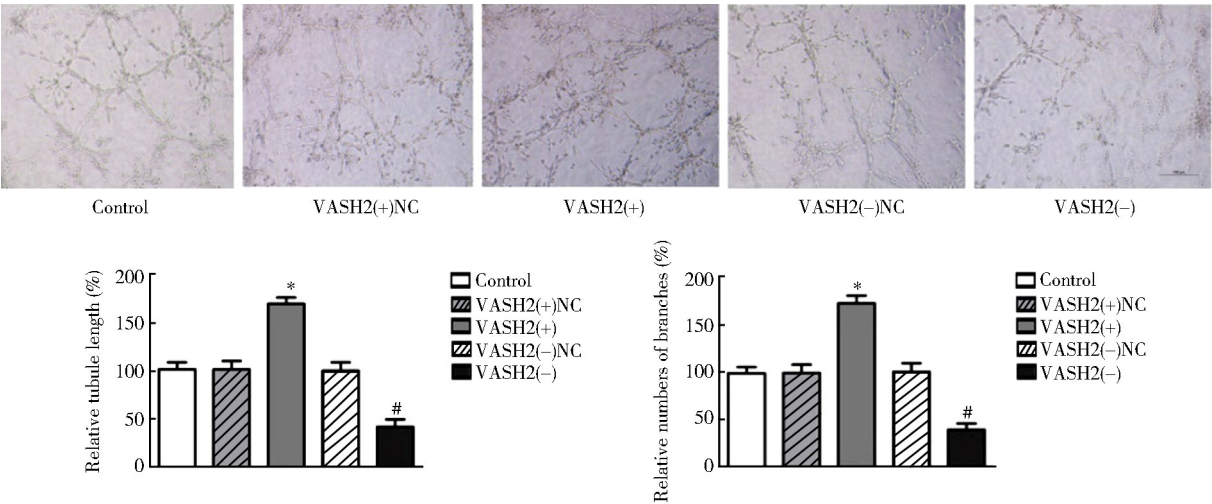


图3 VASH2对GECs管形成能力的影响

Figure 3 Effect of VASH2 on GECs tube formation ability ($n=3$; $\times 200$)
VASH2: vasohibin2; GECs: glioma microvascular endothelial cells. Compared with VASH2 (+) NC group, * $P<0.05$; comared with VASH2 (-) NC group, # $P<0.05$.

近年来已有研究发现在胶质瘤中 miR-383 通过血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 介导的黏附斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 和肉瘤癌基因/酪氨酸激酶 (sarcoma oncogene/tyrosine kinase, Src) 信号通路抑制 GECs 的增殖、迁移和管形成^[10]。还有学者研究发现 FUS/circ_002136/miR-138-5p/SOX13 反馈环在调控血管新生方面发挥重要作用,下调融合肉瘤基因 (fused in sarcoma, FUS) 或 环状 RNA circ_002136 通过反馈环的信号通路可以显著抑制 GECs 的增殖、迁移和管形成的能力。SRY 盒转录因子 13 (SRY-box transcription factor 13, SOX13) 能结合并激活脊椎蛋白 2 (spondin 2, SPON2) 启动子,从而在转录水平上调 SPON2 的表达。下调 SPON2 的表达能够抑制 GECs 的管生成,更重要的是 SOX13 还能激活 FUS 启动子并增加其活性,形成反馈循环^[11]。RNA 结合蛋白莫洛尼白血病病毒 10 (Moloney leukemia virus 10, MOV10) 通过与环状 RNA circ-DICER1 结合,通过 miR-103a-3p/miR-382-5p 通路改变小脑锌指结构 4 (zinc finger of the cerebellum 4, ZIC4) 在 GECs 中的表达, ZIC4 能够调控下游靶基因热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90 β) 通过 PI3K/Akt 信号通路调控 GECs 的增殖、迁移和血管形成的能力^[12]。在胶质瘤中 VASH2 对血管生成的影响与哪些因子调控有关还有待进一步深入研究。

近年来的研究报道发现,在胰腺癌、肝癌、卵巢癌和乳腺癌中肿瘤血管的生成也与 VASH2 的调控

密切相关。Iida-Norita 等^[13] 研究发现,胰腺癌患者高表达 VASH2 显示预后较差,并阐明了它在肿瘤微环境中的作用,当 VASH2 被敲除时,肿瘤血管生成在体内被显著抑制,这一现象与趋化因子、细胞因子及骨髓源性抑制细胞的募集有关^[13]。在胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 中 VASH2 的过度表达促进肿瘤血管生成和增殖,加速了肿瘤向更严重的恶性表型发展的步伐,并与较差的临床结果相关。VASH2 可能是术后 PDAC 治疗的一个重要新靶点^[14]。VASH2 能够通过调控肿瘤血管生成进而调节胃肠道肿瘤的发生^[15]。肝细胞癌的恶性生长和转移与血管的生成有密切关系。进一步研究表明, VASH2 介导的成纤维细胞生长因子-2、血管内皮生长因子和血管抑制素 1 的转录增加可能是这些作用的机制。由于组蛋白修饰, VASH2 在肝癌细胞中异常表达,并且 VASH2 通过小血管抑制蛋白结合蛋白 (small vasohibin binding protein, SVBP) 介导的旁分泌机制参与肝癌的血管生成。表明 VASH2 在肝癌血管生成和恶性转化中具有重要作用^[16]。在体内外实验中还发现 VASH2 可促进干细胞的侵袭,减少细胞凋亡,增加干细胞的比例。研究发现肝癌细胞中 VASH2 的表达能够通过诱导上皮间质转化进而促进肿瘤的恶性转化^[17]。

在浆液性卵巢癌中 VASH2 刺激内皮细胞迁移,其在癌细胞中的表达增加与 mir-200b 的减少有关。在浆液性卵巢癌细胞中表达的 VASH2 通过促进血管生成促进肿瘤生长和腹膜播散^[18]。通过研究 VASH2

在 200 例乳腺癌组织中的血管生成功能和作用机制,发现 VASH2 与血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,PECAM-1/CD31)阳性微血管密度呈正相关,在异种移植瘤中诱导血管生成,并促进人脐静脉内皮细胞管的形成。此外,VASH2 调节人乳腺癌细胞中成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2,FGF2)的表达,并且在体外通过 FGF2 中和阻断 VASH2 过度表达诱导的促血管生成作用。FGF2 启动子通过组蛋白修饰被 VASH2 转录激活。总之,VASH2 的表达与 FGF2 的表达呈正相关,并通过非旁分泌机制转录激活成纤维细胞生长因子 2,促进管腔乳腺癌的血管生成^[19]。

VASH2 对脑胶质瘤管形成的具体调控作用机制尚有待进一步深入研究,从而为脑胶质瘤的综合治疗提供新靶点和新策略。

【参考文献】

[1] Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 50–58. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.010.

[2] Poff A, Koutnik AP, Egan KM, *et al.* Targeting the Warburg effect for cancer treatment: ketogenic diets for management of glioma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 56: 135–148. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.12.011.

[3] Tu J, Fang Y, Han D, *et al.* Activation of nuclear factor-kappaB in the angiogenesis of glioma: insights into the associated molecular mechanisms and targeted therapies[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(2): e12929. DOI: 10.1111/cpr.12929.

[4] Zhu C, Kros JM, Cheng C, *et al.* The contribution of tumor-associated macrophages in glioma neo-angiogenesis and implications for anti-angiogenic strategies[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(11): 1435–1446. DOI: 10.1093/neuonc/now081.

[5] Yamamoto M, Ozawa S, Ninomiya Y, *et al.* Plasma vasohibin-1 and vasohibin-2 are useful biomarkers in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Esophagus*, 2020, 17(3): 289–297. DOI: 10.1007/s10388-020-00719-8.

[6] Tan X, Liao Z, Zou S, *et al.* VASH2 promotes cell proliferation and resistance to doxorubicin in non-small cell lung cancer *via* AKT signaling[J]. *Oncol Res*, 2020, 28(1): 3–11. DOI: 10.3727/096504019X15509383469698.

[7] Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, *et al.* Downregulation of vasohibin-2, a novel angiogenesis regulator, suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis in endometrial cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 1058–1062. DOI: 10.3892/ol.2013.1119.

[8] Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, *et al.* Knockout of vasohibin-2 reduces tubulin carboxypeptidase activity and increases paclitaxel

sensitivity in ovarian cancer[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(8): 2732–2739. DOI: 10.1002/cam4.3841.

[9] Ding Y, Hu Z, Luan J, *et al.* Protective effect of miR-200b/c by inhibiting vasohibin-2 in human retinal microvascular endothelial cells[J]. *Life Sci*, 2017, 191:245–252. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.09.001.

[10] Zhao LN, Wang P, Liu YH, *et al.* MiR-383 inhibits proliferation, migration and angiogenesis of glioma-exposed endothelial cells *in vitro via* VEGF-mediated FAK and Src signaling pathways[J]. *Cell Signal*, 2017, 30: 142–153. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.09.007.

[11] He Z, Ruan X, Liu X, *et al.* FUS/circ_002136/miR-138-5p/SOX13 feedback loop regulates angiogenesis in Glioma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 65. DOI: 10.1186/s13046-019-1065-7.

[12] He Q, Zhao L, Liu X, *et al.* MOV10 binding circ-DICER1 regulates the angiogenesis of glioma *via* miR-103a-3p/miR-382-5p mediated ZIC4 expression change[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 9. DOI: 10.1186/s13046-018-0990-1.

[13] Iida-Norita R, Kawamura M, Suzuki Y, *et al.* Vasohibin-2 plays an essential role in metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(7): 2296–2308. DOI: 10.1111/cas.14041.

[14] Kim JC, Kim KT, Park JT, *et al.* Expression of vasohibin-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma promotes tumor progression and is associated with a poor clinical outcome[J]. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62(138): 251–256. DOI: 10.5754/hge141015.

[15] Kitahara S, Suzuki Y, Morishima M, *et al.* Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 99. DOI: 10.1186/1476-4598-13-99.

[16] Xue X, Gao W, Sun B, *et al.* Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1724–1734. DOI: 10.1038/onc.2012.177.

[17] Xue X, Zhang Y, Zhi Q, *et al.* MiR200-upregulated Vasohibin 2 promotes the malignant transformation of tumors by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 62. DOI: 10.1186/s12964-014-0062-x.

[18] Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, *et al.* Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(9): 1135–1146. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0098-T.

[19] Tu M, Lu C, Lyu N, *et al.* Vasohibin 2 promotes human luminal breast cancer angiogenesis in a non-paracrine manner *via* transcriptional activation of fibroblast growth factor 2[J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2): 272–281. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.09.031.