

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.027

• 综 述 •

上皮间质转化在血管生成拟态中的研究进展

孔祥琳综述, 程先硕, 杨之斌, 李云峰审校

Contribution of Epithelial-mesenchymal Transition to Vasculogenic Mimicry

KONG Xianglin, CHENG Xianshuo, YANG Zhibin, LI Yunfeng

The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University Colorectal Cancer Clinical Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, China

Corresponding Author: LI Yunfeng, E-mail: liyunfeng@medmail.com.cn



Abstract: As a new model of the microcirculation, tumor cell vasculogenic mimicry (VM) is an unfavorable prognostic factor for tumor patients. Recent studies have showed that epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in VM formation. In this review, we present evidences for the participation of nuclear factors which regulate EMT, stem cell characteristics of EMT cells and microenvironment changes induced by EMT in VM. In addition, the relationship among VM, EMT, CSCs and microenvironment is also discussed briefly. With the significant part that EMT plays in the formation of VM, a further development of drug for anti-VM formation and a deep-going study of the molecular mechanism of EMT are expected to lay a solid theoretical foundation for the strategies that treatment of tumor distant metastasis by targeting EMT for inhibiting VM formation.

Key words: Vasculogenic mimicry (VM); Epithelial-mesenchymal transition (EMT); Cancer stem cells (CSCs)

摘要: 肿瘤的侵袭转移受到多种因素调节, 其中血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 作为已被发现的一种微循环的新模式, 是患者预后不良的一个关键因素。近年研究表明上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在VM形成中发挥重要作用。本文就最新研究, 综述EMT相关核转录因子, EMT细胞表达的干细胞特性, EMT细胞导致肿瘤微环境成分的改变在VM形成中的作用, 并简要探讨VM、EMT、肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 以及微环境之间的关系。鉴于EMT在VM的形成中的重要作用, 深入开发抗VM形成的药物以及研究EMT形成机制有望为靶向EMT抑制VM形成治疗肿瘤远处转移的新策略提供扎实的理论基础。

关键词: 血管生成拟态; 上皮间质转化; 肿瘤干细胞

中图分类号: R73-37 **文献标识码:** A

0 引言

血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 是指由具有可塑性、侵袭性的肿瘤细胞围成的血管网络。1999年, 由Maniotis等^[1]在研究侵袭性人眼葡萄膜黑色素瘤和转移性皮肤黑色素瘤时首次提出该概念, 2004年, Folberg等^[2]将VM分为管型和图案样基质型两种类型。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^[3]、黑色素瘤^[4]、肝癌^[5]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。上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transitions, EMT) 是一个由上皮细胞向间质细胞转变从而形成间充质细胞 (如成肌纤维细胞) 的暂时性和可逆性过程。这个过程被广泛定义为从上皮形态向间质形态转变时, 不同标志物表达的改变以及细胞获得迁移或者侵袭力增强的功能性改变^[5], 被视为参与肿瘤发生和转移的一个重要步骤。现有研究提示, EMT在VM形成过程中发挥重要作用。本文从EMT相关核转录因子, EMT细胞表达的干细胞特性, EMT细胞导致肿瘤微环境成分的改变及临床意义等方面综述EMT在VM形成中的作用。

1 调控EMT的核转录因子促进VM形成

最新的研究表明, 调控EMT的重要核转录因子如Twist、ZEB-1等的上调在VM形成中发挥关键作用, Sun等^[6]发现, 低表达Twist的肝癌细胞HepG2形成VM能力较弱, 而转染Twist表达基因

收稿日期: 2013-01-31; 修回日期: 2013-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960455);

云南省科技厅计划基金资助项目 (2008ZC142M)

作者单位: 650118 昆明, 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

通信作者: 李云峰, E-mail: liyunfeng@medmail.com.cn

作者简介: 孔祥琳 (1986-), 女, 硕士在读, 主要从事结直肠癌抗血管生成基础及临床研究

的HepG2细胞获得较强的VM形成能力,相反,高表达Twist的肝癌细胞Bel7402能形成VM,而敲除Twist后,其VM形成显著减少,此结果通过临床检测肝癌组织中Twist表达以及VM数目得以验证。缺氧诱发VM形成的机制研究已经较为成熟和全面^[7], Twist作为主要介导因子参与了缺氧诱发的肝细胞癌细胞形成VM,敲除该基因后能逆转这一过程^[8]。进一步研究发现^[9],缺氧条件下,肝细胞癌细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2和核转录因子Twist表达增高,并且Bcl-2与Twist1结合形成Bcl-2/Twist1复合物,进而诱导Twist以及其他一系列的核转录因子表达,促进EMT的发生以及VM形成。Liu等^[10]研究发现,诱发EMT的另一个核转录因子ZEB-1在VM形成过程中同样发挥重要作用。他们通过检测不同肠癌细胞形成VM的能力和其中ZEB-1的表达发现,高表达ZEB-1的肠癌细胞HCT116形成VM能力显著强于低表达ZEB-1的SW480和HT29细胞,当敲除ZEB-1后,HCT116形成VM的能力受到显著抑制,通过EMT形态及标志物检测发现细胞EMT现象也受到抑制。因此,ZEB-1可能是通过促进EMT的发生进一步促使VM形成。

2 EMT细胞表现肿瘤干细胞特性促进VM形成

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是一类具有自我更新、多向分化潜能、高致瘤性及高侵袭性等特性的细胞。体内外研究证明,发生EMT的肿瘤细胞高表达干性基因:如Oct4、CD133等^[11-12],表现出多向分化潜能和自我更新等肿瘤干细胞特性,使细胞同时获得更强的VM形成能力。Chiao等^[13]发现,在CD133阳性的神经母细胞瘤干细胞(glioblastoma stem-like cells, GSCs)形成的移植瘤组织中,形成的VM数量显著多于CD133阴性细胞的成瘤组织。Valyi-Nagy等^[14]通过体外3D模型发现,CD271阳性的黑色素瘤干细胞的VM形成能力同样强于CD271阴性细胞。侵袭性黑色素瘤细胞形成的VM,其表达有多种与干细胞相关的基因或细胞形态,例如,上皮细胞、血管内皮细胞、肌细胞、神经元细胞或其他细胞形态^[15],因此,肿瘤干细胞呈现出多向分化潜能是形成VM的重要因素。并且最新证据表明,肿瘤干细胞的自我更新能力也是形成VM的关键。Liu等^[16]通过克隆形成实验发现,完全克隆形态较部分克隆和旁克隆形态的三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231具有更强的自我更新能力,进一步的研究发现其干细胞标志蛋白CD133显著增高,以及VE-

cadherin和MMP2及MMP9表达上调,促进VM形成,加快三阴性乳腺癌疾病的恶化和进展。因此高表达的Twist1能显著促进肝癌细胞侵袭、转移以及VM形成。作为肿瘤干细胞自我更新的一个重要因子Bmi1,可以直接接受Twist1调控,高表达Twist1与Bmi1的肿瘤细胞可以获得EMT标志物的改变和肿瘤干细胞改变,促进肿瘤的发生与发展^[17]。类似的结果在乳腺癌研究中也得到证实^[18], Twist调控乳腺癌细胞发生EMT,伴随有CD44高表达和CD24低表达,促进乳腺癌干细胞形成,使细胞获得更强自我更新能力。因此,EMT可能通过CSCs的形成来促进VM形成。

3 EMT伴随微环境成分的改变促进VM形成

肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存和发生转移的条件,其中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是诱导VM形成的重要因素。研究发现,EMT发生的同时会伴随上述成分改变。在胰腺癌中,缺氧能促进胰腺癌细胞发生EMT,维持胰腺癌细胞的干性,同时上调微环境成分VEGF等表达^[19]。作为血管生长因子中重要成分之一,VEGF是诱导VM形成的重要因素。黑色素瘤中高表达的VEGF通过与VEGFR1,而不是VEGFR2受体结合,激活PI3K/PKC α 促进VM形成^[20]。敲除VEGFR1后,ABC5+黑色素瘤细胞层黏连蛋白表达和VM形成均受到抑制,其裸鼠移植瘤生长抑制程度大于90%^[21]。乳腺癌中高表达的VEGF是通过VEGFR2和VEGFR3受体促进MMP9表达增高,诱导MCF-7细胞形成VM^[22]。研究发现,在100 μ M辣椒素诱导肠癌细胞SW480发生EMT的同时,激活AKT/mTOR和STAT3途径,诱导肿瘤微环境中的MMP2和MMP9表达增高^[23]。早在2001年,Sood等^[24]提出MMP1、MMP2、MMP9以及MT1-MMP等与肿瘤VM形成密切相关。活化的MMP2与MMP14可以将层黏连蛋白5 γ 2-链降解成为 γ 2'和 γ 2x片段进而促进黑色素瘤细胞迁移、侵袭及VM形成^[25]。而姜黄素则可以通过阻断EphA2/PI3K/MMP途径抑制黑色素瘤小鼠移植瘤的增殖及VM形成^[26]。

4 靶向EMT抑制VM形成的治疗肿瘤新策略

肿瘤的生长、侵袭和转移依赖于肿瘤血管生成,因此,抗血管生成成为治疗肿瘤的一个非常重要的手段。尽管目前大量抗血管生成药物

已经用于临床,然而疗效依然不能令人满意。在胶质母细胞瘤体内外研究表明^[27],抗VEGF(AG28262)治疗并不能抑制小鼠胶质母细胞瘤细胞VM形成。也有报道称^[28],经典的血管生成抑制剂内皮抑素和TNP-470不能抑制VM的形成。使用贝伐单抗(bevacizumab, BV)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EMT的发生和干细胞的形成^[29],而这些改变都是促使VM形成的重要因素。因此,VM形成可能是导致这类药物临床疗效较差的基础,而明确EMT,甚至CSCs在VM中的作用将会为靶向VM治疗肿瘤提供更加充足的证据。

研究表明^[30],短期使用BV治疗卵巢癌可以促进VM形成,加速肿瘤转移。BV并不能抑制干细胞样亚群细胞向内皮样祖细胞转变,但是 γ 分泌酶抑制剂DAPT(N-3,5-difluorophenylacetyl-L-alanyl-2-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester,商品名DAPT)可以抑制该现象^[31],并且与BV单药治疗相比,当两者联合使用时能有效阻断Notch信号通路,抑制肿瘤生长,阻断Notch信号通路抑制VM形成可能是其主要作用机制^[32]。临床研究发现,染料木黄酮或姜黄素能够有效抑制黑色素瘤VM形成^[33-34],同时,FDA批准的抗血管药物,例如沙利度胺和雷帕霉素,也可以抑制VM形成^[35-36]。这些研究结果令人兴奋,它让人们看到靶向VM形成治疗肿瘤的前景,然而,VM的形成机制十分复杂,靶向VM治疗肿瘤转移仍然是一大挑战。研究发现,Wnt/ β -catenin、Notch1、MMPs等多种信号途径在诱发EMT,促进肿瘤侵袭转移中发挥关键作用,因此,广大学者对靶向这些信号途径的药物进行了深入研究,例如,舒林酸可以阻断 β -catenin转入细胞核而抑制Wnt/ β -catenin信号途径^[37]; γ 分泌酶抑制剂MK-0752能显著抑制Notch1通路^[38]; MMPs抑制剂能有效降解MMPs^[39]等。如上所述,EMT在VM形成中发挥至关重要的作用,因此,深入开展针对这类药物在靶向VM中作用的研究将为靶向EMT抑制VM形成治疗肿瘤提供良好的思路。

5 展望

总之,VM、EMT与CSCs三者 in 肿瘤侵袭、复发及转移中发挥重要的作用,EMT是肿瘤发生侵袭转移的起始步骤,VM为肿瘤细胞发生远处转移提供了除经典血管途径以外的另一种可能,而CSCs则为肿瘤复发埋下了种子,微环境改变是上述三种肿瘤生物学过程的基础,它们彼此之间存

在着紧密的联系。深入探讨它们之间的关系,为明确EMT在VM形成中的作用,以及为靶向EMT抑制VM形成治疗肿瘤新策略提供夯实的理论基础及可行的依据,将更好的服务于临床肿瘤治疗,受益于广大患者。

参考文献:

- [1] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*,1999, 155(3):739-52.
- [2] Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry[J]. *APMIS*,2004,112(7-8):508-25.
- [3] Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, *et al.* Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2009, 52(12):2028-35.
- [4] Mihic-Probst D, Ikenberg K, Tinguely M, *et al.* Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33571.
- [5] 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):770-7.
- [6] Sun T, Zhao N, Zhao XL, *et al.* Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry[J]. *Hepatology*,2010, 51(2):545-56.
- [7] Comito G, Calvani M, Giannoni E, *et al.* HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(4):893-904.
- [8] Che N, Zhao XL, Sun T, *et al.* The role of Twist1 in hepatocellular carcinoma angiogenesis: a clinical study[J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(6):840-7.
- [9] Sun T, Sun BC, Zhao XL, *et al.* Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2011, 54(5):1690-706.
- [10] 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*,2012,103(4):813-20.
- [11] Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, *et al.* Cancer stem cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(12):2144-51.
- [12] Lirdpramongkol K, Chiablaem K, Sila-Asna M, *et al.* Exploring stemness gene expression and vasculogenic mimicry capacity in well- and poorly-differentiated hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012, 422(3):429-35.
- [13] Chiao MT, Yang YC, Cheng WY, *et al.* CD133+ glioblastoma stem-like cells induce vascular mimicry in vivo[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2011,8(3):210-9.

- [14] Valyi-Nagy K, Kormos B, Ali M, *et al.* Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures[J]. *Mol Vis*, 2012,18:588-92.
- [15] Yao XH, Ping YF, Bian XW. Contribution of cancer stem cells to tumor vasculogenic mimicry[J]. *Protein Cell*, 2011, 2(4):266-72.
- [16] Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, *et al.* CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer[J]. *Oncogene*,2013, 32(5):544-53.
- [17] Yang MH,Hsu DS,Wang HW,*et al.* Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(10):982-92.
- [18] Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4):704-15.
- [19] Bao B, Ali S, Ahmad A, *et al.* Hypoxia-induced aggressiveness of pancreatic cancer cells is due to increased expression of VEGF, IL-6 and miR-21, which can be attenuated by CDF treatment[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e50165.
- [20] Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, *et al.* VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner[J]. *Melanoma Res*, 2011, 21(2):91-8.
- [21] Frank NY, Schatton T, Kim S, *et al.* VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4):1474-85.
- [22] Karroum A,Mirshahi P,Faussat AM,*et al.* Tubular network formation by adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cells is closely linked to MMP-9 and VEGFR-2/VEGFR-3 over-expressions[J]. *Eur J Pharmacol*,2012,685(1-3):1-7.
- [23] Yang J, Li TZ, Xu GH, *et al.* Low-concentration capsaicin promotes colorectal cancer metastasis by triggering ROS production and modulating Akt/mTOR and STAT-3 pathways[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(4):364-72.
- [24] Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, *et al.* Molecular determinants of ovarian cancer plasticity[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(4):1279-88.
- [25] Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(16):4757-62.
- [26] Chen LX, He YJ, Zhao SZ, *et al.* Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2):229-35.
- [27] Cong R, Sun Q, Yang L, *et al.* Effect of Genistein on vasculogenic mimicry formation by human uveal melanoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28:124.
- [28] 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):1473-7.
- [29] 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):2784-9.
- [30] 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, 31:16.
- [31] Li JL, Sainson RC, Oon CE, *et al.* DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(18):6073-83.
- [32] Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium[J]. *Nature*, 2010, 468(7325):829-33.
- [33] Chen LX, He YJ, Zhao SZ, *et al.* Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2):229-35.
- [34] Zhang S, Li M, Gu Y, *et al.* Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27:60.
- [35] Su M, Feng YJ, Yao LQ, *et al.* Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(3):476-86.
- [36] Soda Y,Marumoto T,Friedmann-Morvinski D,*et al.* Trans-differentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11):4274-80.
- [37] Xing Y, Zhang X, Zhao K, *et al.* Beneficial effects of sulindac in focal cerebral ischemia: a positive role in Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Brain Res*, 2012, 1482:71-80.
- [38] Krop I, Demuth T, Guthrie T, *et al.* Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(19):2307-13.
- [39] Cheng XS, Yang ZB, Yin ZF. Matrix metalloproteinases and epithelial-mesenchymal transition in tumor: an advance[J]. *Zhongguo Zhong Liu Sheng Wu Zhi Liao Za Zhi*, 2011,18(4):437-40. [程先硕,杨之斌,殷正丰. 基质金属蛋白酶与肿瘤上皮间质转化的研究进展[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011,18(4):437-40.]