

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.09.006

• 基础研究 •

缺氧微环境中Bcl-2干扰对食管癌Ec9706细胞血管生成拟态的影响

徐红艳, 李向柯, 王亚楠, 王峰, 杨子长, 孙燕, 樊青霞

Effects of Bcl-2 Interference on Esophageal Cancer Cell Ec9706 Vasculogenic Mimicry in Hypoxic Microenvironment

XU Hongyan, LI Xiangke, WANG Ya'nan, WANG Feng, YANG Zichang, SUN Yan, FAN Qingxia

Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate hypoxic microenvironment on esophageal cancer cells Ec9706 vasculogenic mimicry and its possible molecular mechanism. **Methods** Human esophageal cancer cells were induced by CoCl_2 chemical method to form hypoxia-microenvironment. While in hypoxic microenvironment, human esophageal squamous cell carcinoma cell lines Ec9706 was interfered by Bcl-2-siRNA, and human body environment was simulated by three-dimensional culture system and placed in the inverted fluorescence microscope to observe the number of pipeline structure formation and morphology. Flow cytometry was applied to detect cell proliferation. RT-PCR and Western blot were used to assay mRNA and protein expression of Bcl-2, VE-cad and MMP2. **Results** Hypoxia group formed more network-like tubular structure ($P < 0.000$) than normoxic control group, decreased apoptosis ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression of Bcl-2, VE-cad and MMP2 compared with normoxic significantly increased ($P < 0.05$) lower. After training in hypoxia carried out under Bcl-2-siRNA interference, the tubular network-like structure of experimental group significantly reduced than hypoxic hypoxia control group ($P < 0.000$), apoptosis increased ($P < 0.05$), whereas the mRNA and protein expression of Bcl-2, VE-cad and MMP2 was also significantly lower ($P < 0.05$). The network-like tubular structures between hypoxia and anoxia empty vector control was no significant difference ($P > 0.05$), apoptosis rate was no statistically significant ($P > 0.05$), the mRNA and protein of Bcl-2, VE-cad and MMP2 was not statistically significant between groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Hypoxia could induce the formation of esophageal cancer cells Ec9706 vasculogenic mimicry, and the important molecular mechanism may be related to Bcl-2-dependent VE-cad overexpression.

Key words: Esophageal cancer; Vascular mimicry; Hypoxia; RNA interference; Bcl-2; VE-cadherin

摘要: 目的 探讨缺氧微环境对食管癌Ec9706细胞血管生成拟态的影响及其可能的分子机制。**方法** 应用 CoCl_2 化学法诱导人食管癌细胞形成缺氧微环境,在缺氧微环境中以Bcl-2-siRNA干扰人食管鳞癌细胞系Ec9706,三维培养体系模拟人体内环境并置于荧光倒置显微镜下观察管道结构形成数量及形态。流式细胞术检测干扰前后细胞的增殖情况,采用RT-PCR法和Western blot法检测Bcl-2、VE-cadherin(VE-cad)及MMP2的mRNA及蛋白表达情况。**结果** 缺氧对照组比常氧对照组形成更多的网络样管状结构($P < 0.000$),凋亡减少($P < 0.05$),Bcl-2、VE-cad和MMP2的mRNA和蛋白表达较常氧下显著增多($P < 0.05$)。而在缺氧培养下进行Bcl-2-siRNA干扰后,缺氧实验组对比缺氧对照组网络样管状结构显著减少($P < 0.000$),凋亡增多($P < 0.05$),而Bcl-2、VE-cad及MMP2的mRNA和蛋白表达也较缺氧对照组的表达显著降低($P < 0.05$)。缺氧空载体组与缺氧对照组网络样管状结构未见明显差异($P > 0.05$),凋亡率差异未见统计学意义($P > 0.05$),Bcl-2、VE-cad和MMP2的mRNA和蛋白表达两组之间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 缺氧能够诱导食管癌Ec9706细胞血管生成拟态的形成,且Bcl-2依赖的VE-cad过表达可能是缺氧诱导血管生成拟态形成的重要分子机制。

关键词: 食管癌; 血管生成拟态; 缺氧; RNA干扰; Bcl-2; VE-cadherin

中图分类号: R735.1 文献标识码: A

收稿日期: 2013-08-28; 修回日期: 2014-03-24

基金项目: 河南省医学科技攻关计划资助项目(201203011)

作者单位: 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院肿瘤科

作者简介: 徐红艳(1988-),女,硕士在读,主要从事恶性肿瘤的基础与临床研究

0 引言

食管癌全球年新发病约为48万余例,年死亡40多万例,中国食管癌粗发病率和粗死亡率均居世界第1位,发病世标率第6位,死亡世标率位于第12位^[1]。Maniotis等^[2]首次在高侵袭性葡萄膜黑色

素瘤中发现血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM), 后相继在肝癌、乳腺癌^[3]、结直肠癌^[4]、肾透明细胞癌^[5]、食管癌^[6]等肿瘤中均发现存在VM现象, 并证实VM形成与肿瘤转移、侵袭、不良预后明显正相关。已有研究表明缺氧能促进食管癌VM形成, 但其确切机制尚不清楚, Bcl-2介导的VE-cad过表达可能促进黑色素瘤VM形成。本实验拟通过在常氧和缺氧微环境下常规培养食管癌细胞, 三维培养观察管道结构形成情况, 同时采用Bcl-2干扰技术, 探究其与VM形成相关因子VE-cad和MMP-2的联系, 探讨食管癌VM形成的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管鳞癌细胞株Ec9706为郑州大学肿瘤中心保存。二氯化钴购自Sigma公司, 胎牛血清和DMEM培养液购自Gibco公司; 基质胶购自Becton Dickinson公司; Bcl-2-siRNA由上海英俊生物技术有限公司构建; LipofectamineTM 2000(Invitrogen)、Trizol、反转录酶试剂盒、PCR试剂盒(全式金)、DNA Marker购自全式金; 鼠抗人血管内皮钙黏蛋白(VE-cad)抗体、鼠抗人抗凋亡蛋白(Bcl-2)抗体、鼠抗人基质金属蛋白酶2(MMP2)抗体、鼠抗人 β -actin抗体、兔抗鼠二抗购自Sigma公司; 彩色预染标准分子量蛋白购自Genview。凋亡试剂盒购自南京凯基; 标准蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Ec9706细胞用含10%胎牛血清的1640培养液, 于37℃、5%CO₂培养箱中培养。平均2~3 d传代1次, 以保持细胞呈对数生长。

1.2.2 缺氧处理 化学缺氧剂CoCl₂用于模拟肿瘤内缺氧微环境, 加入培养液的终浓度是75 μ mol/L。

1.2.3 实验分组 本实验分四组, 常规环境培养下的细胞设为常氧对照组, 缺氧环境中直接培养的细胞设为缺氧对照组, 缺氧环境中进行载体干扰的细胞设为缺氧实验组, 缺氧环境中进行空载体干扰的细胞设为缺氧空载体组。

1.2.4 Bcl-2-siRNA转染细胞 取对数生长期Ec9706细胞 4×10^5 个, 接种于培养皿中, 培养于不含抗生素的DMEM培养液中, 细胞生长至约80%聚合时开始转染, 具体步骤参照Lipofectamine 2000说明书。转染后24 h按1:12的比例传代, 48 h后用含3 μ g/ml Blastidicin (筛选浓度在转染前通过杀伤曲线确定) 的选择性培养液进行筛选, 约4周

后挑取克隆在选择性培养液中继续传代, 扩大培养。阴性对照质粒也按相同的办法进行转染。PCR和Western blot法鉴定并检测单克隆细胞株的转染效率。

1.2.5 三维培养观察管道结构形成情况 将冻存的Matrigel原液置于4℃过夜使之溶解, 24孔培养板每孔加入300 μ l Matrigel原液, 轻轻摇动使之分布均匀, 37℃培养箱内孵育30 min待其凝固。每孔接种单细胞悬液1ml, 浓度为 5×10^5 /ml, 分别置于常氧和缺氧条件下继续培养。24 h后终止培养, 观察各组细胞的管状结构排列情况及完整程度。随机于倒置显微镜下取上、下、左、右、中心5个视野摄像记录并计数管状结构数量, 取每个视野的均值。实验重复三次。

1.2.6 细胞凋亡检测 干扰前后的细胞以 5×10^5 /孔浓度接种于6孔板内, 待细胞长至单层铺满后, 用不含EDTA的胰酶消化后收集细胞, 加入染色液Annexin V-EGFP及Propidium Iodide, 作用15 min后, 于流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

1.2.7 RT-PCR检测血管生成拟态相关基因Bcl-2、VE-cad及MMP2的mRNA表达情况 将处理后的各组细胞用TRIzol一步法提取总RNA。引物由上海生工生物有限公司设计并合成, β -actin上游引物为CTGGGACGACATGGAGAAAA下游引物为AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC, 扩增片段为564 bp; Bcl-2上游引物TGGGAGAACAGGGTACGATAAC, 下游引物是GAACTCAAAGAAGGCCACAATC, 扩增片段为448 bp; VE-cad上游引物为AGGACATAACACCACGAAACG, 下游引物为CGGTCAAACCTGCCATACTT, 扩增片段为121 bp; MMP2的上游引物为TACTGGATCTACTCAGCCAGCA, 下游引物为CTTCAGGTAATAGGCACCCTTG, 扩增片段为300 bp。按照反转录试剂盒进行反转录合成cDNA, 并按扩增试剂盒说明书进行扩增, 扩增产物在1%琼脂糖凝胶电泳中以100 V稳压电泳1 h, 进行凝胶成像摄片并分析结果。

1.2.8 Western blot检测血管生成拟态相关基因VE-cad、Bcl-2蛋白表达 细胞长至铺满培养瓶时, 裂解细胞并收集上清液于EP管中。采用BCA法测蛋白浓度。余蛋白加热变性后于-20℃保存备用。制胶上样, 100 V稳压电泳2 h。100 V恒压1 h进行冰浴电转至PVDF膜上, 封闭液封闭1 h后TBST 10 min \times 3次。加入一抗 (bcl-2 1:1 000, VE-cad 1:1 000, MMP 21:1 000, β -actin 1:2 000), 4℃封闭孵育过

夜。次日TBST漂洗10 min×3次后，加入HRP标记的二抗（1:2 000）孵育2 h后TBST漂洗。ECL化学发光法显色，曝光，分析结果。

1.3 统计学方法

应用统计软件SPSS13.0进行数据处理，所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。Tanon Gis软件对感光胶片条带进行灰度值扫描，目的条带与内参条带的比值代表目的基因蛋白的表达水平。多组样本均数的比较采用单因素方差分析，两组样本均数的比较采用t检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

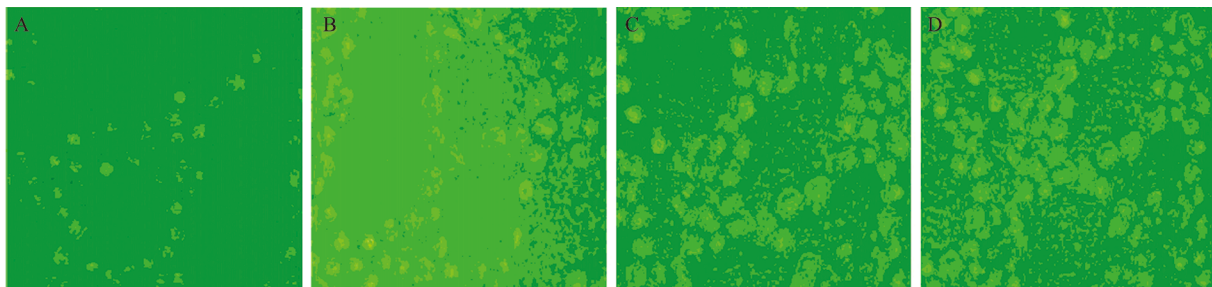
2 结果

2.1 三维培养体系观察各实验组结果

缺氧对照组(21.2±2.2)比常氧对照组(3.9±1.1)形成更多的网络样管状结构($P < 0.000$)；而在缺氧下进行Bcl-2-siRNA干扰的实验组(2.5±1.2)网络样管腔结构比缺氧对照组(21.2±2.2)和空载体组(19.9±2.1)显著减少($P < 0.000$)；而缺氧对照组和空载体组之间差异无统计学意义($P=0.051$)，见图1。

2.2 流式细胞术检测结果

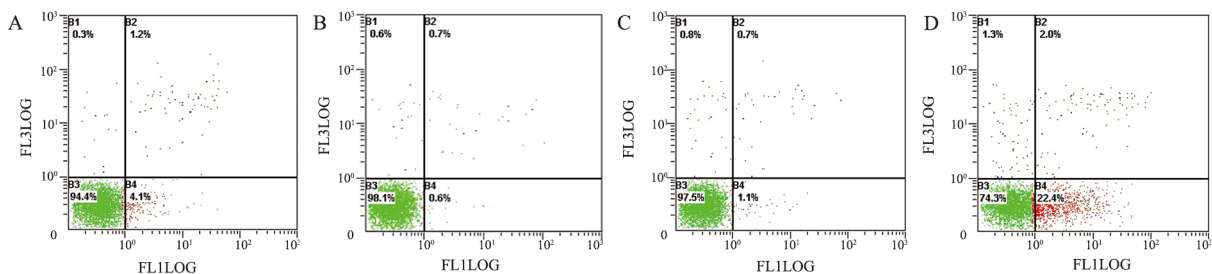
常氧对照组、缺氧对照组、缺氧空载体组和缺氧实验组细胞的凋亡率分别为(6.17±0.17)、(0.6±0.12)、(1.2±0.12)和(22.63±0.37)，缺氧对照组细胞凋亡率明显低于常氧对照组 ($P < 0.05$)，缺氧实验组细胞凋亡率显著强于缺氧对照组 ($P < 0.05$)，见图2。



A: normoxia control group; B: hypoxia control group; C: hypoxia empty vector group; D: hypoxia experimental group

图1 三维培养观察各组细胞管腔样结构形成能力（荧光倒置显微镜 ×200）

Figure1 Luminal-like structures forming ability of cells in each group in three-dimensional culture (Inverted fluorescence microscope ×200)



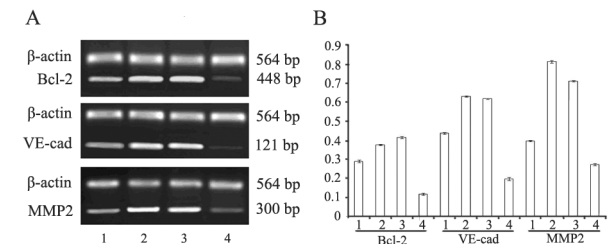
A: normoxia control group; B: hypoxia control group; C: hypoxia empty vector group; D: hypoxia experimental group

图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Figure2 Apoptosis rate in each group detected by flow cytometry

2.3 缺氧对照组Bcl-2, VE-cad的mRNA表达情况

缺氧对照组Bcl-2, VE-cad的mRNA表达情况均明显高于常氧对照组 ($P < 0.05$)，缺氧实验组Bcl-2, VE-cad, MMP2的表达明显降低 ($P < 0.05$)。缺氧对照组和缺氧空载体组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图3。



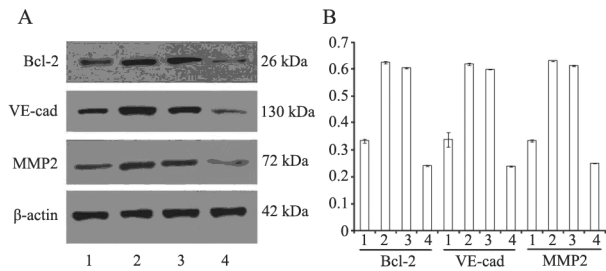
1: normoxia control group; 2: hypoxia control group; 3: hypoxia empty vector group; 4: hypoxia experimental group

图3 RT-PCR检测不同实验组细胞Bcl-2、VE-cad和MMP2的mRNA表达情况(A)和表达灰度值(B)

Figure3 mRNA expression of Bcl-2, VE-cad and MMP2(A) and gray value of Bcl-2, VE-cad, MMP2 mRNA expression(B) in different experimental groups detected by RT-PCR

2.4 缺氧对照组Bcl-2, VE-cad的蛋白表达情况

缺氧对照组Bcl-2, VE-cad的蛋白表达情况均明显高于常氧对照组 ($P < 0.05$)，缺氧实验组Bcl-2, VE-cad, MMP2的表达较缺氧对照组明显降低 ($P < 0.05$)，缺氧对照组和缺氧空载体组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图4。



1:normoxia control group;2:hypoxia control group;3:hypoxia empty vector group;4:hypoxia experimental group

图4 Western blot法检测各组细胞Bcl-2、VE-cad、MMP2的蛋白表达情况(A)及各蛋白表达灰度值(B)

Figure4 Protein expression of Bcl-2, VE-cad and MMP2(A) and grayscale scanning(B) detected by Western blot

3 讨论

食管癌的预后差与血液供应有极大的关系，以往的治疗主要集中在内皮性血管生成上。然而其血液供应不仅仅依赖于内皮性血管生成，血管生成拟态发挥着同样重要的作用。血管生成拟态的分子机制极其复杂，已有学者证明缺氧能诱导胶质瘤、恶性黑色素瘤及肝癌细胞的血管生成拟态，引起血管生成拟态相关分子的高表达^[7]。缺氧亦能诱导食管癌细胞血管生成拟态的形成，并诱导肿瘤组织对放疗、化疗的耐受性，导致肿瘤生长、侵袭和转移。Zhao等研究了乳腺癌中，在缺氧微环境下，Bcl-2高表达促进了VE-cad的高表达，并由此介导了更多管状结构的形成，以及VM相关蛋白的高表达^[8]。

VE-cad是广泛表达于内皮细胞的黏合蛋白，能促进细胞-细胞间的相互作用^[9]，是内皮细胞黏附的主要组分，施瑞华等证实VE-cad下调可以抑制血管生成拟态的形成，并抑制细胞增殖促进细胞凋亡^[10]。Bcl-2是抗凋亡蛋白家族的重要成员之一，可以和Bax相互作用控制细胞死亡，也可以作为载体促进转录因子迁移至细胞核内，引起相关分子的表达甚至高表达^[11]。但在我们的研究中，推测Bcl-2可充当促转录因子来调节VM相关分子VE-cad表达的上调^[12]，并由此介导食管癌细胞血管生成拟态的形成。在本研究中，我们采用RNA干扰技术沉默Bcl-2的表达，并检测干扰前后细胞的表达情况。数据表明，缺氧后Bcl-2表达的上调引起VE-cad表达的上调，同时形成更多的网络样管状结构，并诱导细胞增殖，降低凋亡率。同时数据也表明，在缺氧环境中，Bcl-2-siRNA下调Bcl-2的表达后，VE-cad的表达几乎消失，VM结构及形态也几近消失，凋亡也明显增多，VM的相关蛋白的表达也显著降低。

我们研究证实了在缺氧微环境中，Bcl-2可能激

活VE-cad的转录调节启动子，介导VE-cad的过表达，并促进更多VM结构的形成。这可能是缺氧诱导VM形成的分子机制^[13]。这一研究发为VM形成的分子机制提供新的视角，可用于寻找新的抗肿瘤血管生成的药物。

参考文献:

- [1] Zhang SW, Zhang M, Li GL, *et al.* An analysis of incidence and mortality of esophageal cancer in China, 2003-2007[J]. Zhongguo Zhong Liu, 2012, 21(4): 241-7. [张思维, 张敏, 李光琳, 等. 2003 ~ 2007年中国食管癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(4): 241-7.]
- [2] 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.
- [3] Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, *et al.* A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(12): 1776-81.
- [4] 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.
- [5] Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, *et al.* Histological, immunohistological and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer[J]. Vet Pathol, 2010, 47(2): 265-74.
- [6] Liu F, Niu J. Investigation of vacuole membrane proteins 1 and relations with carcinomas[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2013, 40(1): 102-4. [刘芬, 牛响. 空泡膜蛋白1及其与肿瘤关系的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(1): 102-4.]
- [7] Zhao J, Huang JS, Yang AJ, *et al.* Three-dimensional cell culture and histology of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma[J]. Ai Zheng, 2007, 26(2): 123-6. [赵静, 黄江生, 杨爱军, 等. 肝癌细胞中血管生成拟态的三维细胞培养及细胞学研究[J]. 癌症, 2007, 26(2): 123-6.]
- [8] Zhao N, Sun BC, Sun T, *et al.* Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2[J]. Med Oncol, 2012, 29(5): 3599-607.
- [9] Rezaei M, Friedrich K, Wielockx B, *et al.* Interplay between neural-cadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(6): R154.
- [10] Wang L, Shi RH, Wang P, *et al.* Effect of down-regulation of vascular endothelial-cadherin on vasculogenic mimicry, proliferation and apoptosis of esophageal squamous carcinoma cells[J]. Wei Chang Bing Xue, 2012, 17(5): 260-5. [王璐, 施瑞华, 王频, 等. 血管内皮钙黏附素下调对食管鳞癌细胞血管生成拟态、增殖和凋亡的影响[J]. 胃肠病学, 2012, 17(5): 260-5.]
- [11] Liu Y, Shen Y, Qin C, *et al.* Growth inhibition and apoptosis of human B-cell lymphoma in vitro and in vivo by Bcl-2 short hairpin RNA[J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 244-52.
- [12] Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, *et al.* Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms[J]. J Biol Chem, 2001, 276(22): 18702-9.
- [13] Fan YZ, Sun W. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in tumors and potential tumor-target therapy[J]. World J Gastrointest Surg, 2010, 2(4): 117-27.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]