

. 实验研究 .

VEGF 单抗对低氧环境下 C6 胶质瘤细胞侵袭性的影响

戴黎明 徐成仕 王泽芬 曹长军 李志强

【摘要】目的 探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)单克隆抗体对低氧环境下 C6 胶质瘤细胞迁移和侵袭能力的影响。**方法** 采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(对照组)培养 C6 胶质瘤细胞,加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴模拟缺氧环境(缺氧组),然后加入终浓度为 0.1(VEGF-1 组)、1(VEGF-2 组)、10 $\mu\text{g/ml}$ (VEGF-3 组) VEGF 抗体处理。MTT 法测定细胞活性,Transwell 技术检测细胞侵袭和迁移能力,免疫印迹法检测粘着斑激酶(FAK)及富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2(Pyk2)蛋白及其磷酸化水平。**结果** 对照组、缺氧组、VEGF-1 组和 VEGF-2 组 C6 胶质瘤细胞增殖活性无显著差异($P>0.05$),但 VEGF-3 组细胞活性显著降低($P<0.05$)。缺氧组和 VEGF-1 组 C6 胶质瘤细胞侵袭能力无显著差异($P>0.05$),但 VEGF-2 组 C6 胶质瘤细胞侵袭能力显著增强($P<0.05$)。缺氧组、VEGF-1 和 VEGF-2 组 C6 胶质瘤细胞 FAK 蛋白表达及其磷酸化水平无显著差异($P>0.05$)。缺氧组、VEGF-1 和 VEGF-2 组 C6 胶质瘤细胞 Pyk2 蛋白表达亦无显著差异($P>0.05$),但 VEGF-2 组 Pyk2 磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 缺氧条件下,VEGF 单抗显著增强 C6 胶质瘤细胞的侵袭能力,可能与 Pyk2 磷酸化水平增高有关。

【关键词】 胶质瘤; C6 胶质瘤细胞; 侵袭; 缺氧; 血管内皮生长因子单克隆抗体

【文章编号】 1009-153X(2016)04-0219-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 73-73

Effect of nonoclonal antibody of VEGF on C6 glioma cells invasiveness under hypoxia and the role of FAK/Pyk2

DAI Li-ming, XU Cheng-shi, WANG Ze-fen, CAO Chang-jun, LI Zhi-qiang. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan university, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the monoclonal antibody of vascular endothelial growth factor (VEGF) on glioma cell invasiveness under hypoxia and its mechanism. **Method** C6 glioma cells were treated by VEGF antibodies in vitro under the hypoxia mimicked by CoCl₂. C6 glioma cells invasiveness and migration ability were determined respectively by MTT assay, wound healing, and transwell assay. The total and phosphorylated protein levels of focal adhesion kinase (FAK) and proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) were detected by Western blotting. **Results** The migration ability and invasiveness of C6 glioma cells exposed to VEGF monoantibodies increased in a concentration-dependent manner under the hypoxia. Treatment with VEGF antibodies significantly enhanced the level of Pyk2 phosphorylated at Tyr⁴⁰², but had no effect on the level of FAK phosphorylated at Tyr³⁹⁷ in vitro. **Conclusion** The present results suggest that C6 glioma cell migration ability and invasiveness may be promoted anti-VEGF treatment under the hypoxia via the increase in the level of phosphorylated Pyk2 at Pyk⁴⁰².

【Key words】 C6 glioma cells; Invasiveness; Migration; Hypoxia; VEGF; Proline-rich tyrosine kinase

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,预后极差,恶性程度最高的多形性胶质瘤母细胞瘤平均生存期仅为 14 个月^[1]。随着对胶质瘤分子生物学研究的深入,靶向治疗正在由基础研究向临床应用转化。以人源化的血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗

体贝伐单抗为代表的抗血管生成治疗已经被批准用于原发或复发恶性胶质瘤的治疗,且在影像学和临床疗效方面都显示出一定的疗效^[2]。令人遗憾的是,既往研究表明贝伐单抗可能会增强胶质瘤的迁移及侵袭能力,但具体机制尚不清楚^[3,4]。本研究探讨低氧环境下 VEGF 单抗对胶质瘤细胞迁移、侵袭能力的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 大鼠 C6 胶质瘤细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。细胞生长至 70%~80% 时,弃去原培养基,加入无血清培养基培养 8 h 后再加入含 VEGF 单抗的培养基,VEGF 抗体终浓度

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.04.009

基金项目:武汉市科技晨光计划(2014070404010223);湖北省自然科学基金(2010CDB05507);武汉大学中央高校自主科研项目(41010180)

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院神经外科(戴黎明(硕士研究生,现在武汉市长航总医院工作)、徐成仕、曹长军、李志强);430071 武汉,武汉大学基础医学院生理学系(王泽芬)

通讯作者:李志强, E-mail: lizhiqiang@whu.edu.cn

分别为0.1 μg/ml(低浓度)、1 μg/ml(中浓度)、10 μg/ml(高浓度),以未加VEGF抗体作为对照。缺氧培养采用培养基内终浓度为100 μmol/L氯化钴的化学模拟法。

1.2 MTT法测定细胞活性 取对数生长期C6细胞,以每孔8×10³个细胞接种于96孔板,每孔100 μl,每组设置5个复孔。氯化钴及不同浓度VEGF抗体处理24 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,37 ℃孵育4 h,弃去孔内培养基,每孔加入200 μl二甲基亚砷作用10 min。以空白孔调零,酶联免疫检测仪检测490 nm波长处吸光度,重复3次,计算各组均值。以对照组细胞活性为100%,处理组吸光度值与对照组比值×100%即为各组细胞活性。

1.3 Transwell 实验检测 C6 细胞迁移和侵袭能力 取对数生长期的C6细胞,以每孔1×10⁵个细胞接种于6孔板,常规培养。氯化钴及不同浓度VEGF抗体处理72 h后,调整并取密度为5×10⁵/ml的细胞悬液200 μl加入Transwell小室的上室,再向下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养基600 μl。培养8 h后,取出上室,弃去培养液,温PBS洗涤1次;4%多聚甲醛固定30 min,风干后0.1%结晶紫染色30 min。用手术刀片小心取下小室底部的聚碳酸酯膜,中性树脂胶封片,在倒置显微镜下观察,200×视野下任取5个不重复视野照相,并计数迁移细胞数量。细胞迁移抑制率=VEGF处理组迁移细胞数/对照组迁移细胞数×100%。每组重复2次。Transwell侵袭实验步骤同上,但使用的上室预先包被Matrigel基质胶。

1.4 Western blot 检测 C6 细胞蛋白及其磷酸化水平 将细胞悬液离心弃上清并用冷PBS洗涤细胞,加入100 μl细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl pH=8.0; 150 mmol/L NaCl; 0.1% SDS; 1% NP-40; 0.5% DOC; 0.02% NaN₃; 100 μg/ml PMSF; 1 μg/ml Aprotinin; PMSF和Aprotinin临用时加入)冰上裂解30 min,充分吹打混匀后进行超声破碎(10 s×3次),12 000 g离心10 min,取少量上清进行蛋白质含量测定,另一部分加入1/4体积5×上样缓冲液,100 ℃水浴中煮沸10 min。BCA法检测蛋白浓度,上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白上样总量为20 μg,蛋白质转移至PVDF膜后,用TBST配制的5%脱脂奶粉作为封闭液,37 ℃摇床孵育1 h;加入封闭液稀释的一抗,4 ℃孵育过夜;TBST洗脱一抗3次,每次15 min;加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),37 ℃摇床上孵育1 h;TBST洗脱3次,每次15 min后在PVDF膜上滴加ECL工作液,荧光成像仪上显影、

照相;photoshop CC软件处理分析图片。

1.5 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析或t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧条件下 VEGF 单抗对 C6 细胞活性的影响 MTT法检测结果显示,氯化钴模拟的C6细胞缺氧组与常氧对照组相比,细胞活性无明显差异(图1A;P>0.05)。在氯化钴模拟的缺氧条件下,低浓度和中浓度VEGF单抗不影响C6细胞活性(P>0.05),但高浓度VEGF单抗显著抑制C6细胞活性(图1B;P<0.05)。为避免细胞活性抑制对其迁移和侵袭能力的影响,本研究选取低浓度和中浓度VEGF抗体进行后续实验。

2.2 缺氧条件下 VEGF 单抗对 C6 细胞迁移和侵袭的影响 Transwell检测结果表明,在缺氧情况下,中浓度VEGF单抗可促进C6胶质瘤细胞迁移和侵袭(P<0.05),低浓度VEGF单抗对胶质瘤细胞的迁移及侵袭无显著影响(P>0.05)。见图2。

2.3 缺氧条件下 VEGF 单抗对 C6 细胞粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2(proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2)磷酸化的影响 Western blot检测结果显示,在缺氧环境下,低浓度和中浓度VEGF单抗对C6细胞FAK蛋白及其磷酸化水平以及Pyk2蛋白及其磷酸化水都无显著影响(P>0.05);中浓度VEGF单抗对C6细胞Pyk2蛋白表达无显著影响(P>0.05),而显著增加其磷酸化水(P<0.05);中浓度VEGF单抗对C6细胞FAK蛋白及其磷酸化水平无显著影响(P>0.05)。见图3。

3 讨论

侵袭性生长是胶质瘤恶性特征的重要表现,主要与肿瘤细胞的迁移和侵袭行为相关^[5,6]。缺氧既是肿瘤发生发展过程,也是肿瘤治疗过程中常见的病理生理现象。因此,探讨缺氧条件下药物对肿瘤细胞迁移、侵袭能力的影响及机制具有重要意义。

高级别胶质瘤有十分发达的血管系统,而且其血管密度与胶质瘤的恶性程度成正比^[7]。在胶质瘤血管生成过程中,内皮细胞的增殖、活化和运动是重要的病理过程。VEGF及其信号通路是调控胶质瘤血管生成的重要因素之一,可以调节血管内皮细胞的生长、增殖、渗透性及运动^[8]。抗血管生成治疗在胶质瘤综合治疗中起关键性作用。然而,在临床使

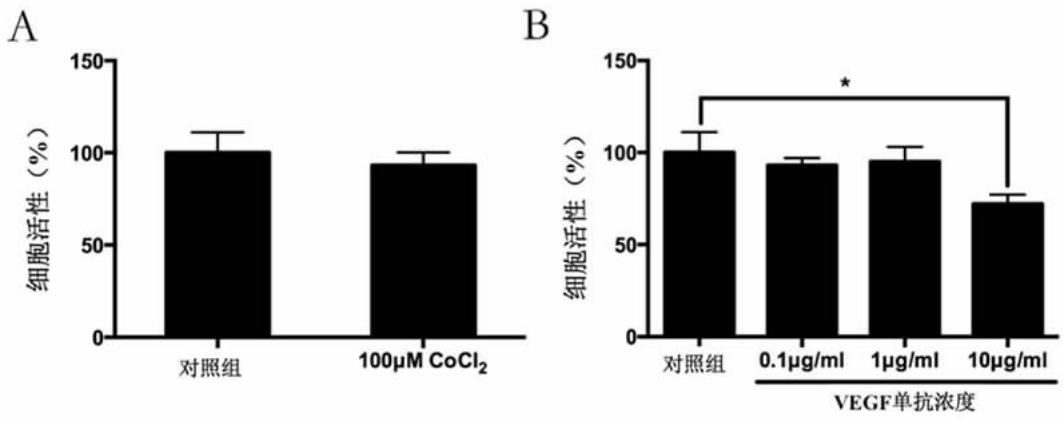


图1 氯化钴及不同浓度VEGF单抗对C6细胞活性的影响

A. 与常氧条件下培养(培养基中不加氯化钴)相比,氯化钴不影响C6胶质瘤细胞活性;B. 在氯化钴模拟缺氧培养条件下,0.1 µg/ml和1 µg/ml VEGF单抗不影响C6细胞的活性,10 µg/ml VEGF单抗显著抑制胶质瘤细胞的活性,* $P < 0.05$; VEGF: 血管内皮细胞生长因子

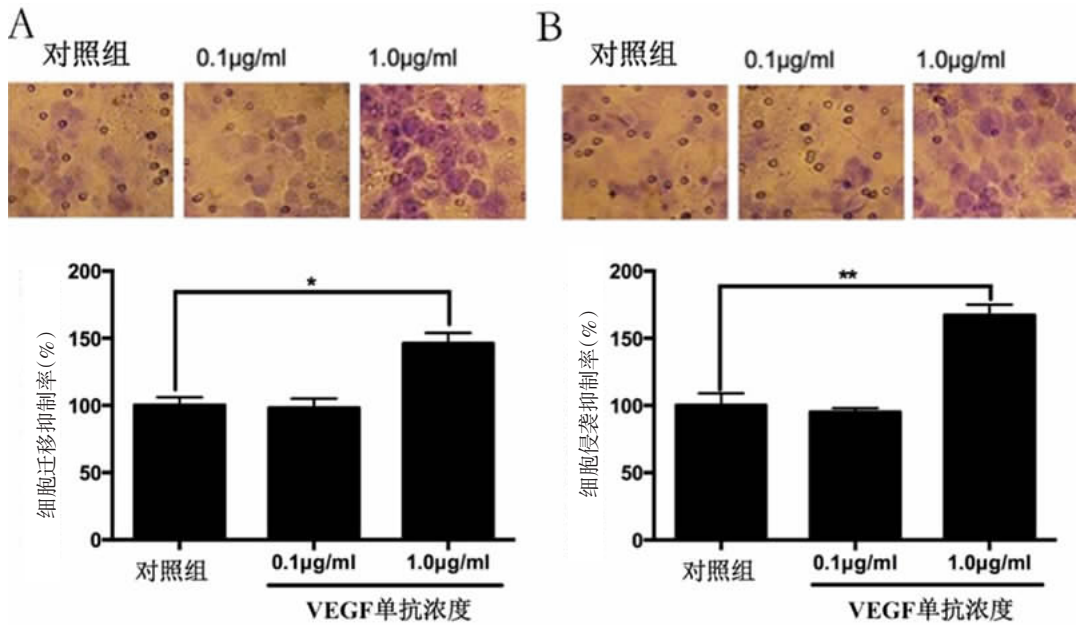


图2 缺氧条件下VEGF单抗对C6细胞迁移和侵袭的影响

A. 在氯化钴模拟缺氧培养条件下,1 µg/ml VEGF单抗可促进C6胶质瘤细胞迁移,而0.1 µg/ml VEGF单抗则无显著作用,* $P < 0.05$; B. 在氯化钴模拟缺氧培养条件下,1 µg/ml VEGF单抗可促进C6胶质瘤细胞侵袭,而0.1 µg/ml VEGF单抗则无显著作用,** $P < 0.05$; VEGF: 血管内皮细胞生长因子

用抗血管生成药物的过程中,人源化VEGF单克隆抗体贝伐单抗促进胶质瘤迁移及侵袭的现象越来越受到关注。de Groot等^[3]贝伐单抗治疗虽然在短期内使得复发胶质瘤明显缩小,但是后期却出现更为广泛的浸润扩散,这些扩散的区域同样也表现出侵袭相关蛋白的高表达。Keunena等^[9]发现贝伐单抗治疗能够降低胶质瘤动物模型的血管密度,降低肿瘤细胞的异质性,但也使肿瘤灶更加具备侵袭迁移能力。本研究表明缺氧条件下VEGF抗体干预可以引起C6细胞的侵袭迁移能力增强。这与我们在常氧

条件下的实验结论一致^[10]。这表明,抗VEGF治疗可促进胶质瘤侵袭的作用。

FAK/Pyk2是细胞质中的非受体酪氨酸蛋白激酶成员之一。研究表明FAK/Pyk2与胶质瘤的迁移、侵袭行为密切相关^[10-13]。我们之前的研究表明在常氧条件下,FAK/Pyk2的磷酸化介导VEGF单抗促进胶质瘤细胞的迁移及侵袭^[10]。本研究发现,缺氧条件下1 µg/ml VEGF单抗对C6细胞FAK蛋白表达及其磷酸化水平均无显著影响,对Pyk2蛋白表达也无显著影响,但可显著提高Pyk2磷酸化水平。这种

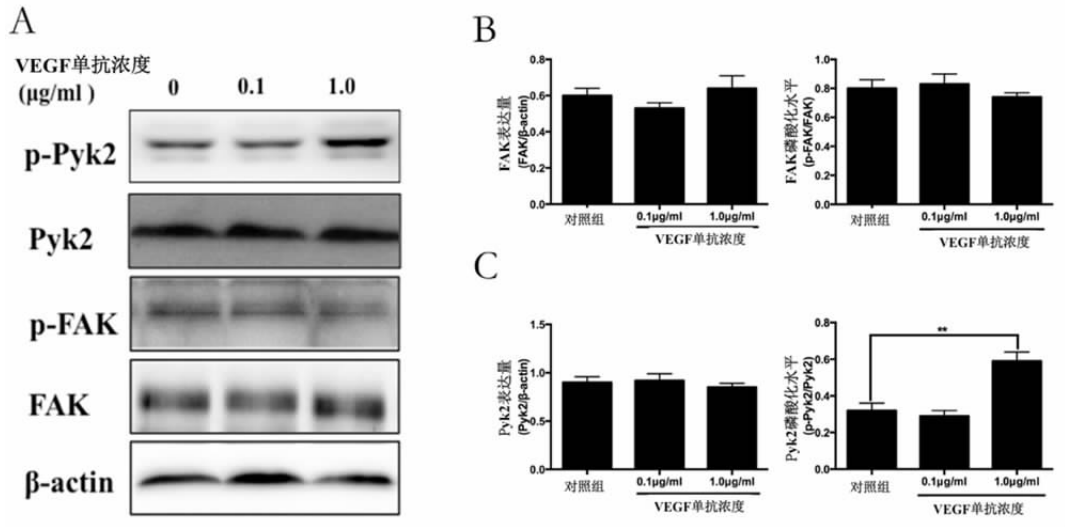


图3 缺氧条件下 VEGF 单抗对 C6 细胞 FAK、Pyk2 蛋白及其磷酸化的影响

A. 蛋白电泳图; B. FAK 蛋白及其磷酸化水平变化, 0.1、1 µg/ml VEGF 单抗对 FAK 蛋白及磷酸化水平无显著影响; C. Pyk2 蛋白及磷酸化水平变化, 0.1、1.0 µg/ml VEGF 单抗对 Pyk2 蛋白及磷酸化水平无显著影响, 但 1 µg/ml VEGF 单抗显著增加 Pyk2 磷酸化水平, ** P<0.05; VEGF: 血管内皮细胞生长因子; FAK: 粘着斑激酶; Pyk2: 富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2

差异提示 FAK 和 Pyk2 在胶质瘤细胞中的作用可能不同, 在缺氧条件下 VEGF 抗体主要通过 Pyk2 的磷酸化, 进而影响胶质瘤细胞的迁移侵袭。

【参考文献】

[1] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(3): 166-193.

[2] Zhang W, Fulci G, Bührman JS, *et al.* Bevacizumab with angiostatin-armed oHSV increases antiangiogenesis and decreases bevacizumab-induced invasion in U87 glioma [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 37-45.

[3] de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, *et al.* Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(3): 233-242.

[4] Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14): 4589-4599.

[5] Salhia B, Tran NL, Symons M, *et al.* Molecular pathways triggering glioma cell invasion [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6(4): 613-626.

[6] Navis AC, van den Eijnden M, Schepens JT, *et al.* Protein

tyrosine phosphatases in glioma biology [J]. *Acta Neuro-pathol*, 2010, 119(2): 157-175.

[7] Corsini E, Ciusani E, Gaviani P, *et al.* Decrease in circulating endothelial progenitor cells in treated glioma patients [J]. *J Neurooncol*, 2012, 108(1): 123-129.

[8] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.

[9] Keunen O, Johansson M, Oudin A, *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9): 3749-3754.

[10] Xu CS, Wang ZF, Dai LM, *et al.* Induction of proline-rich tyrosine kinase 2 activation-mediated C6 glioma cell invasion after anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 148.

[11] Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 7): 1007-1013.

[12] Lipinski CA, Tran NL, Viso C, *et al.* Extended survival of Pyk2 or FAK deficient orthotopic glioma xenografts [J]. *J Neurooncol*, 2008, 90(2): 181-189.

[13] Lipinski CA, Tran NL, Menashi E, *et al.* The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells [J]. *Neoplasia*, 2005, 7(5): 435-445.

(2015-01-08 收稿, 2015-04-22 修回)