

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 24. 005

转化生长因子-β1 对肿瘤血管形成的影响*

马 锐, 万巧凤, 于 佳
(宁夏医科大学基础医学院, 银川 750004)

摘 要:**目的** 探讨转化生长因子-β1(TGF-β1)对大鼠主动脉血管生长的作用,研究 TGF-β1 对肿瘤血管形成的影响。**方法** 无菌分离出大鼠的胸主动脉,显微镜下小心地将大鼠的胸主动脉分离,并将剔好的动脉剪成小段,每段长度 1~2 mm;将主动脉放入盛有青霉素、链霉素的冰磷酸盐缓冲液中,拿出预先用 Matrigel 胶包被的 48 孔板,将动脉环小心接种到 48 孔板的 Matrigel 胶上;再取出液态 Matrigel 胶,加在环上,形成夹心状;37 ℃培养箱中再放置 30 min,使其凝固。人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 培养基中给予 3. 125、6. 250、12. 500 ng/mL TGF-β1 分别加至 Matrigel 胶上层;培养箱中常规培养并进行拍照、统计。**结果** 显微镜下观察比较发现,随着 TGF-β1 水平增加,大鼠主动脉环的血管生成速度、密度、直径及血管分支长度均增加。**结论** TGF-β1 能刺激乳腺癌细胞血管内皮细胞的血管形成。

关键词:转化生长因子-β1; 血管形成; 乳腺肿瘤
中图法分类号:R737. 9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)24-3660-03

Influence of TGF-β1 on the angiogenesis of tumor* MA Rui, WAN Qiaofeng, YU Jia

(School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)
Abstract: Objective To investigate the effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) on aortic vascular growth in rats and the effect of TGF-β1 on angiogenesis of tumor. **Methods** The thoracic aorta of rats was isolated aseptically. The thoracic aorta of rats was carefully separated under the microscope and cut into small segments, each of which was about 1—2 mm in length. The aorta was put into ice phosphate buffer containing penicillin and streptomycin. The 48-well plate pre-coated with Matrigel glue was taken out and the artery ring was carefully inoculated onto the Matrigel glue of the 48-well plate. Then the liquid Matrigel glue was taken out and added to the ring to form a sandwich shape. It was placed in the incubator at 37 ℃ for 30 minutes for solidification. In Human breast cancer cells MDA-MB-231 medium, 3. 125, 6. 250 and 12. 500 ng/mL TGF-β1 were added to the upper layer of Matrigel glue respectively. The cells were cultured regularly in incubator and photographed and counted. **Results** Microscopic observation showed that with the increase of level of TGF-β1, the velocity, density, diameter of angiogenesis and the length of vascular branches increased. **Conclusion** TGF-β1 can stimulate the angiogenesis of vascular endothelial cells in breast cancer cells.
Key words: transforming growth factor-beta 1; angiogenesis; tumor of breast

正常机体在生理状态下血管新生是暂时的,并且机体严密监视、控制这一过程。但在病理条件下,血管内皮细胞促进血管生长的能力将使增生组织或细胞异常增殖。同时,血管形成受多种信号调控,这些信号能够调控血管生成的状态,包括基因突变、免疫细胞在局部浸润、代谢应激(如缺氧、酸中毒、碱中毒、低血糖)、增殖压力改变等。转化生长因子-β(TGF-β)有许多生物学作用,如参与胚胎发育、调节细胞的生长、增殖和分化,甚至诱导程序性死亡;另外, TGF-β 还参与细胞外基质形成、抑制细胞因子产生,促进黏附分子表达,进而抑制免疫应答,修复受损组织等。TGF-β 家族中研究最多的是 TGF-β1,它是一种多功

能生长因子,分布于多种组织细胞内,激活其下游的胞内信号蛋白,介导 TGF-β1 的信号传递,进而发挥重要生物学效应。有研究显示,在成纤维促血管生成中, TGF-β1 信号通路可以诱导成纤维细胞表型发生改变,促进肌动蛋白 α(α-SMA)和血管内皮生长因子(VEGF)A 表达,使成纤维细胞形成小管样结构^[1]。有研究表明, TGF-β 基因敲除的小鼠表现有血管发育缺陷,致胚胎死亡^[2]。目前 TGF-β 对血管内皮细胞的作用及转导通路研究还比较少, GATA 6 能够与 TGF-β 基因的启动子结合,参与调控血管内皮细胞功能。而 GATA 6 分子在血管内皮细胞内广泛表达,维持血管内皮细胞的生存和调节周围血管^[3],这些理论知识为利用

* 基金项目:宁夏回族自治区卫生和计划生育委员会重点课题资助项目(2015-NW-042)。
作者简介:马锐,女,讲师,主要从事病原生物学方面的研究。

TGF- β 1 刺激大鼠内皮细胞提供了有利条件。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 健康雄性大鼠, 6~8 周, 体质量 160~200 g, 购于宁夏医科大学实验动物中心。人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 (上海美轩生物科技有限公司), TGF- β 1 (Invitrogen 公司), Matrigel 胶 (BD 公司), ECM 培养基 (Invitrogen 公司), 全自动数码凝胶成像分析仪 (Bio-Rad 公司), 超净工作台 (苏州苏洁医疗), CO₂ 恒温培养箱 (博科公司), 生物安全柜 (Thermo 公司), 普通倒置显微镜 (OLYMPUS 公司)。

1.2 方法

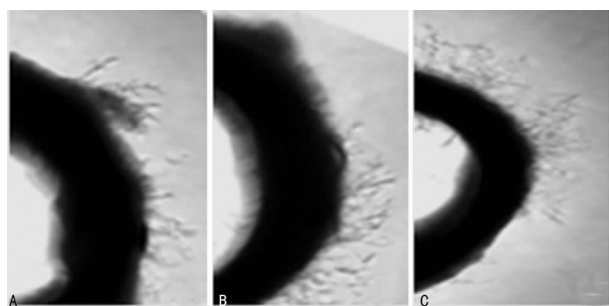
1.2.1 大鼠主动脉环形成试验 SD 大鼠戊巴比妥钠腹腔麻醉后打开腹腔, 迅速分离出大鼠的胸主动脉, 若有出血, 用纱布拭去, 保持视野清晰 (过程中注意无菌操作); Matrigel 胶提前从 -20℃ 移至 4℃ 冰箱过夜, 将 Matrigel 胶加入 48 孔板中, 并在 37℃ 培养箱中放置 30 min, 使其凝固。小心将大鼠的胸主动脉结缔组织和脂肪剔除掉, 注意不能剪破血管; 放入盛有 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的冰磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 再将动脉剪成小段, 每段长度 1~2 mm; 用 PBS 清洗主动脉环, 取出 37℃ 培养箱中的 48 孔板, 将动脉环小心接种到 48 孔板的 Matrigel 胶上; 再将液态 Matrigel 胶覆盖于环上, 形成夹心状; 37℃ 培养箱中放置 30 min, 使其凝固; 凝固后, 在每孔 Matrigel 胶上层给予 3.125、6.250、12.500 ng/mL TGF- β 1 (ECM 培养基配制) 的 MDA-MB-231 细胞培养基上清液, 比较各种 TGF- β 1 水平对大鼠主动脉环形成的影响。同一水平设 3 个复孔置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每两天换 1 次, 每日拍照。

1.2.2 新生血管分支长度比较 倒置显微镜观察大鼠主动脉形成的血管分支, 对不同组别进行测量并统计。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉环血管形成试验 见图 1。



注: A 为 3.125 ng/mL TGF- β 1 组; B 为 6.250 ng/mL TGF- β 1 组; C 为 12.500 ng/mL TGF- β 1 组

图 1 各种 TGF- β 1 水平对大鼠主动脉环形成的影响 ($\times 120$)

2.2 不同水平 TGF- β 1 刺激试验大鼠新生血管分支

长度比较 诱导 48 h 后, 3.125、6.250、12.500 ng/mL TGF- β 1 刺激试验大鼠主动脉环外周血管分支长度分别为 (0.600 $\pm$ 0.041)、(0.900 $\pm$ 0.309)、(1.200 $\pm$ 0.238) mm, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明 MDA-MB-231 人类乳腺癌细胞经 TGF- β 1 诱导后, 血管分支长度增加。

3 讨论

目前, 乳腺癌仍是导致女性死亡的重要疾病, 虽然现代诊断和治疗技术不断提高, 乳腺肿瘤患者病死率逐年下降, 但其病死率仍高达 35%。因此, 筛选出具有早期诊断价值的靶标分子, 对于改善预后意义重大。TGF- β 1 及其下游信号通路研究目前已成为肿瘤研究的热点^[3-4]。作为 DPC4 基因的传递蛋白, TGF- β 1 已被证明 DPC4 突变或缺失与多种肿瘤相关。在肿瘤细胞分泌的众多因子中, 何种因子介导内皮细胞从原有血管出芽形成新的肿瘤血管, 并发挥的关键作用还不十分清楚。血管生成后, 血管大量增殖, 形成类似毛细血管网的细胞环状结构, 这是肿瘤新血管生长的重要步骤。

目前已有许多药物针对血管生成靶向性方向治疗乳腺肿瘤, 如索拉非尼^[5]。在健康人体内, 血管生成是被严格控制的, 但在肿瘤组织中, 血管生成迅速, 一方面供给肿瘤组织营养, 另一方面实现肿瘤细胞远端转移。因此, 如何行之有效地切断肿瘤组织血管生成途径, 已被研究人员公认为是治疗肿瘤的有效途径。尤其是某些促血管生成因子, 可以在原有管腔内大量释放, 这些因子似“诱饵”激活血管内皮细胞表面的相应受体, 如 VEGF-VEGFR 结合、活化内皮细胞、释放水解酶及蛋白酶, 发挥纤维溶解作用, 溶解血管基底膜^[6-7]。探明以上机制, 对于肿瘤细胞如何最终形成管腔, 以致成熟血管形成, 具有重大现实意义。

本研究旨在研究 TGF- β 1 对于乳腺肿瘤细胞血管生成的影响; 为肿瘤细胞侵袭、远端转移等提供理论佐证, 进而对 TGF- β 1 及其受体、信号通路研究提供了前期基础^[8-9]。在前期多次预试验的基础上, 本研究分离出大鼠胸主动脉, 并制作体外主动脉环试验模型, 借助 Matrigel 胶模拟的细胞内基质环境, 进行血管形成试验观察。48 h 后经倒置显微镜比较发现, 人类乳腺癌细胞 MDA-MB-231 经 TGF- β 1 诱导后, 血管出芽数量、密度增加, 而且血管分支长度也增长。TGF- β 1 使 MDA-MB-231 人类乳腺癌细胞迁移和血管生成的能力增强, 在后续研究中, 作者将对其调控的分子机制进行进一步探究。

参考文献

- [1] BOLDBAATAR A, LEE S, HAN S, et al. Erratum; Eupatolide inhibits the TGF- β 1-induced migration of breast cancer cells via downregulation of SMAD3 phosphorylation and transcriptional repression of ALK5[J]. Oncology Lett, 2018, 15(6): 8885-8889. (下转第 3666 页)

根据学者提出的有关菌株同源性的判断标准及
同源性≥85%的菌株可被认为是来源同一克隆株的
理论,该起事件检出的 21 株 Vp 中,相同血清型的不同
PFGE 带型之间存在 1~3 个条带差异,具有高度
同源性,为同一聚类,可能来自同一污染源。

药敏试验结果显示,21 株 Vp 的抗生素耐药情况
基本一致,与文献[12-13]报道基本一致,对氨苄西林
和头孢唑啉的耐药率最高,达 100.00%,对头孢他啶、
四环素、阿莫西林/克拉维酸等均敏感。近年来,滥用
抗生素及细菌之间耐药基因传递等原因使细菌耐药
情况愈发严重,进而受到广大医务人员的重视^[13-14]。
因此,需密切关注 Vp 的耐药情况及变化,以期有效指
导临床合理使用抗生素。

综上所述,此次聚集性腹泻事件是由 O3:K6 和
O4:K8 两种血清型为主的 5 种不同克隆株 Vp 混合
感染引起的。而分离自餐厅从业人员的菌株为非产
毒株,与分离自患者的 Vp,可视为无相关性。因此,
引起此次事件的病原菌来源尚未确定,不排除由于此
次送检的可疑样品不全,未采集到致病菌污染样品。
建议相关部门在处理此类事件时,应扩大可疑食物或
相关环节样品的采样范围。此次事件可怀疑为该宾
馆食堂用具被多种血清型 Vp 污染,或是食品在烹煮
过程中存在尚未熟透的现象,或是食堂厨房存在用具
生熟未严格分开、食品储存保管不当等,均是造成 Vp
迅速繁殖、多重污染并引起聚集性腹泻事件的可能
原因。

参考文献

[1] 陈洪友,盛跃颖. 上海地区副溶血性弧菌大流行菌株血清
型及分子特征研究[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(1):
5-9.

[2] SHIMOHATA T,TAKAHASHI A. Diarrhea induced by

infection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Med Invest,
2010,57(3/4):179-182.

[3] 唐晓阳. 水产品中副溶血性弧菌风险评估基础研究[D].
上海:上海海洋大学,2013.

[4] 陈洪友,屠丽红. 贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究
[J]. 疾病监测,2014,29(7):522-526.

[5] 韩海红,李宁,郭云昌. 副溶血性弧菌分子标志基因研究
概况[J]. 微生物学报,2015,55(1):12-15.

[6] 商晓春,周晓红,帅慧群,等. 一起多血清型副溶血性弧菌
引起的食物中毒脉冲场凝胶电泳分析[J]. 疾病监测,
2013,28(7):598-602.

[7] 陈洪友,盛跃颖. 2012 年上海地区副溶血性弧菌血清分型
和毒力基因携带状况研究[J]. 微生物与感染,2014,9
(1):37-42.

[8] 刘弘,陆屹. 2008 年上海市食源性疾病监测[J]. 中国食品
卫生杂志,2011,23(2):126-131.

[9] 陈茂义,胡婕,陈婷,等. 副溶血性弧菌毒力基因研究进展
[J]. 公共卫生与预防医学,2013,24(3):65-67.

[10] MATSUMOTO C,OKUDA J,ISHIBASHI M,et al. Pan-
demic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyti-*
cus and emergence of related strains evidenced by arbi-
trarily primed PCR and toxRS sequence analyses[J]. J
Clin Microbiol,2000,38(2):578-585.

[11] 张红芝,顾其芳,刘诚,等. 2009—2012 年上海市副溶血
性弧菌血清分型研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25
(4):363-366.

[12] 赵思宇. 副溶血弧菌分离株的耐药特征和基因分型研究
[D]. 武汉:武汉轻工大学,2015.

[13] 娄阳. 上海市不同来源副溶血性弧菌耐药性研究及潜在
风险分析[D]. 上海:上海海洋大学,2016.

[14] 姚琳,李凤铃. 副溶血性弧菌的耐药状况及耐药机制研究
进展[J]. 中国渔业质量与标准,2013,3(4):96-102.

(收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-08-26)

(上接第 3661 页)

[2] XU X,GE S,JIA R,et al. Hypoxia-induced miR-181b en-
hances angiogenesis of retinoblastoma cells by targeting
PDCD10 and GATA6[J]. Oncology Reports, 2015, 33
(6):2789-2796.

[3] 周雨晴,金敏,祖旭宇. 乳腺癌 TGF-β 信号通路相关转录
因子研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(15):
1041-1048.

[4] NEUZILLET C,DE G A,TIJERAS-RABALLAND A,et
al. Perspectives of TGF-β inhibition in pancreatic and hep-
atocellular carcinomas[J]. Oncotarget,2013,5(1):78-94.

[5] ZANOTTO-FILHO A,RAJAMANICKAM S,LORANC
E,et al. Sorafenib improves alkylating therapy by bloc-
king induced inflammation, invasion and angiogenesis in
breast cancer cells. [J]. Cancer Letters, 2018, 425 (1):
101-115.

[6] WANG F,WANG L,LI Y,et al. PAC-1 and its derivative

WF-210 Inhibit Angiogenesis by inhibiting VEGF/VEG-
FR pathway[J]. Europ J Pharmacol,2018,821(1):29-38.

[7] KIM J H,KIM M S,LEE B H,et al. Marmesin-mediated
suppression of VEGF/VEGFR and integrinβ1 expression:
Its implication in non-small cell lung cancer cell responses
and tumor angiogenesis[J]. Oncol Rep,2016, 37(1):91-
96.

[8] WANG Z,PEREZ M,LEE E S,et al. The functional rela-
tionship between transglutaminase 2 and transforming
growth factor β1 in the regulation of angiogenesis and en-
dothelial-mesenchymal transition [J]. Cell Death Dis,
2017,8(9):e3032.

[9] 张书勤,魏柏,马薇,等. Smad4、TGF-β1、TGF-βR1 在乳腺
癌细胞中的表达和意义[J]. 中国妇幼保健,2017,32
(14):3146-3149.

(收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-08-28)