

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.12.003

❖ 基础研究 ❖

基于 VEGF/VEGFR 信号通路探讨贝伐珠单抗对肠癌 SW480 细胞生物学行为的影响及其机制

樊叶, 李超, 汪志兵

(南京医科大学附属南京医院·南京市第一医院消化科, 江苏 南京 210006)

【摘要】目的: 基于血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体(VEGFR)信号通路探讨贝伐珠单抗对肠癌细胞生物学行为的影响及其机制。**方法:** 将人肠癌细胞系 SW480 细胞作为研究对象, 采用不同浓度(0、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的贝伐珠单抗处理 SW480 细胞。采用 CCK8 试剂盒检测细胞增殖水平; Transwell 迁移侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力; Annexin V-FITC 双染法检测细胞凋亡情况; Western Blot 法检测细胞内 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 蛋白表达水平。比较不同浓度贝伐珠单抗对肠癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及其对肠癌细胞内 VEGF/VEGFR 信号通路的影响。**结果:** 贝伐珠单抗浓度依赖性抑制肠癌细胞体外增殖、迁移和侵袭($P < 0.05$)。贝伐珠单抗浓度依赖性诱导了肠癌细胞的体外凋亡($P < 0.05$)。随着贝伐珠单抗浓度的增加, VEGF 的表达下调, VEGFR1 和 VEGFR2 的表达上调($P < 0.05$)。**结论:** 贝伐珠单抗能抑制肠癌细胞增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡, 其机制可能是通过调控 VEGF/VEGFR 信号通路。

【关键词】 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体; 贝伐珠单抗; 肠癌; 细胞生物学行为

【中图分类号】 R965.1

【文献标志码】 A

Exploration on effect and mechanism of bevacizumab on the biological behaviors of intestinal cancer SW480 cells based on the VEGF/VEGFR signal pathway

FAN Ye, LI Chao, WANG Zhi-bing

(Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective: To explore the effect and mechanism of bevacizumab on the biological behaviors of intestinal cancer cells based on vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling pathway. **Methods:** The human intestinal cancer cell line SW480 cells were selected as the subjects of this study. The SW480 cells were treated with bevacizumab at different concentrations (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and Cell Counting Kit-8 (CCK8) was used to detect the cell proliferation level, and Transwell migration and invasion test was applied to detect the cell migration and invasion abilities. Fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) double staining method was adopted to measure the cell apoptosis, and Western Blot was for the detection of protein expression levels of intracellular VEGF, VEGFR1 and VEGFR2. The effect of different concentrations of bevacizumab on proliferation, migration, invasion, apoptosis and VEGF/VEGFR signaling pathway in colorectal cancer cells was compared. **Results:** Bevacizumab inhibited the in vitro proliferation, migration and invasion of intestinal cancer cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Bevacizumab induced the in vitro apoptosis of intestinal cancer cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). As the concentration of bevacizumab increased, the expression of VEGF was down-regulated while the expressions of VEGFR1 and VEGFR2 were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bevacizumab can inhibit the proliferation, migration and invasion and induce the cell apoptosis of intestinal cancer cells in vitro by regulating the VEGF/VEGFR signaling pathway.

【Key words】 Vascular endothelial growth factor; Vascular endothelial growth factor receptor; Bevacizumab; Intestinal cancer; Cell biological behaviors

肠癌是常见的消化道恶性实体瘤之一, 2016 年全球癌症发病率和死亡率统计显示, 我国等发展中国家肠癌的发病率逐年上升, 成为仅次于胃癌和肺

癌的第三大癌症^[1]。早期肠癌症状不明显, 检出率较低, 有数据^[2]表明, 约 25% 的患者在确诊时已处于晚期, 错过了根治性手术切除的最佳治疗时机, 同

基金项目: 江苏省南京市卫生科技发展专项资金项目 (ZKX21042)

作者简介: 樊叶 (1987 -), 女, 住院医师。E-mail: wuwubaobei123@126.com

通讯作者: 汪志兵。E-mail: ahwangzhibing776@163.com

时因肠癌的转移率和复发率较高,放射疗法和化学疗法效果也不佳,且存在严重的毒副作用^[3],导致患者预后较差。贝伐珠单抗是近些年来新发现的对于肠癌有较好疗效的人源化单克隆抗体,通过靶向血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)并抑制其生物活性^[4],显著抑制肿瘤新生血管生成和肿瘤转移,在肠癌等实体瘤中发挥重要的抑制作用。VEGF 是调节血管新生和血管生成动态平衡的高度特异性分子^[5],与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)共同作用,参与调控肿瘤细胞增殖、分化和凋亡等过程^[6],影响肠癌等多种恶性肿瘤疾病进展。然而,目前尚不清楚贝伐珠单抗是否可以直接通过调控 VEGF/VEGFR 信号通路影响肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡等细胞周期。基于此,本研究拟通过 VEGF/VEGFR 途径探究贝伐珠单抗对肠癌细胞生物学的影响,并初步了解其作用机制。

1 方法

1.1 细胞培养

人肠癌细胞系 SW480 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,与含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的培养液混合,置于改良的无糖 RPMI-1640 培养基中,保持 37 °C 的温度和 5% 的 CO₂ 浓度进行常规培养,每隔 3 d 更换 1 次完全新鲜的培养基,待细胞融合至 80% 以 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2 药物处理

采用不同浓度(0、25、50、100、200 μg/mL)的贝伐珠单抗(上海罗氏制药有限公司)处理人肠癌细胞系 SW480 细胞,37 °C 的温度和 5% 的 CO₂ 浓度下培养 48 h,收集处理后的含药 SW480 细胞,检测其增殖、迁移、侵袭、凋亡水平。

1.3 细胞活力检测

采用 CCK8 计数试剂盒检测细胞活力,取经过上述不同浓度的贝伐珠单抗处理后的各组 SW480 细胞,按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,培养 48 h 后加入 CCK8 溶液,每孔各 10 μL,严格按照说明书要求操作。共同培养 2 h,采用酶标仪(山东竞道光电科技有限公司)分别检测不同时间(0、24、48、72 h)下波长为 450 nm 处各组细胞的吸光度值,实验重复 3 次。

1.4 细胞迁移和侵袭能力检测

采用 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力,取对数生长期的上述各组细胞,Transwell 上室用 Matrigel 基质胶进行包被或不进行任何操作,然后将细

胞按照 2×10^4 个/孔放入 Transwell 上室中,另加 600 μL 含有胎牛血清的培养液于 Transwell 下室中,37 °C 的温度和 5% 的 CO₂ 浓度下培养 12 h,移除上室细胞,采用 4% 的多聚甲醛固定 Transwell 下室中的细胞,再用 0.1% 的结晶紫染色,倒置荧光显微镜(南京贝登医疗股份有限公司)下观察由上室穿过 Transwell 滤膜进入下室的细胞数,分析细胞迁移和侵袭情况,实验重复 3 次。

1.5 细胞凋亡检测

取不同浓度的贝伐珠单抗处理后的各组 SW480 细胞,采用 Annexin V-FITC 双染法进行细胞凋亡检测。将各组细胞按照 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后采用磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 3 次,经洗涤过的细胞重悬于 150 μL Binding Buffer 结合缓冲液中,向缓冲区的细胞悬液中滴加 10 μL 的 Annexin V-FITC 试剂以及 5 μL 碘化丙啶染色液,轻摇离心管使其充分混合,2 ~ 8 °C 下避光孵育 15 min,采用 AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒(武汉普诺赛生命科技有限公司)说明书检测各组细胞凋亡水平,实验重复 3 次。

1.6 VEGF/VEGFR 信号通路检测

采用 Western blot 法检测细胞内 VEGF/VEGFR 信号通路的蛋白表达,取经不同浓度的贝伐珠单抗处理后的各组 SW480 细胞,移除培养基,PBS 洗细胞 1 次,采用 RIPA 裂解液裂解细胞后提取蛋白,BCA 法检测蛋白含量。将提取到的蛋白经聚丙烯酰胺恒温下 1 000 V 电泳 1 h 后转膜,室温封闭 2 h 后加入 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 和 β-actin 单克隆抗体(Abcam 公司,稀释比均为 1:2 000)室温下孵育过夜,常规洗膜后与二抗(Abcam 公司,稀释比均为 1:1 000)室温下孵育 1 h,再次洗涤后以 ECL 发光试剂(湖南一诺唯真科技有限公司)显影,Image J 软件扫描并测量感光条带,分析以 β-actin 作为内参时各组 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 蛋白的相对表达,实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞增殖的影响

贝伐珠单抗浓度依赖性地抑制肠癌细胞体外增殖($P < 0.05$)。见图 1。

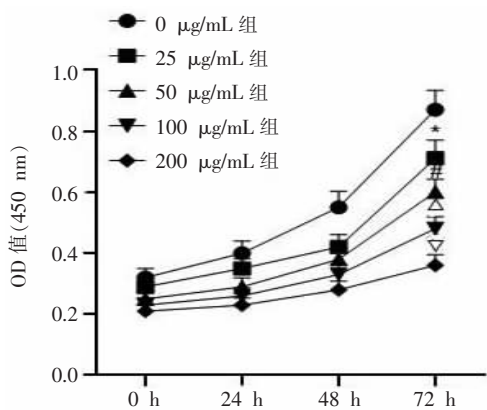


图 1 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞增殖的影响
* $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; # $P < 0.05$, 与 25 $\mu\text{g/mL}$ 组相比;
 $\Delta P < 0.05$, 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\nabla P < 0.05$, 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 组相比。

2.2 不同浓度贝伐珠单抗对肠癌细胞迁移的影响

Transwell 检测各组细胞迁移水平, 结果显示, 贝伐珠单抗浓度依赖性抑制肠癌细胞体外迁移 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 不同浓度贝伐珠单抗对肠癌细胞侵袭的影响

Transwell 检测各组细胞侵袭水平, 结果显示, 贝伐珠单抗浓度依赖性抑制肠癌细胞体外侵袭 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 不同浓度贝伐珠单抗对肠癌细胞凋亡的影响

AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡情况, 结果显示, 贝伐珠单抗显著诱导了肠癌细胞的体外凋亡, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。见图 4。

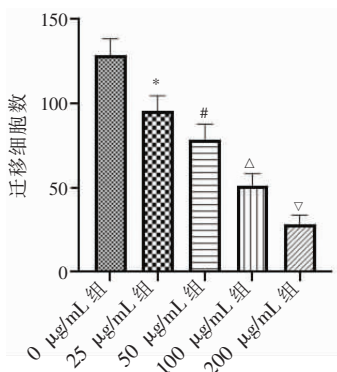
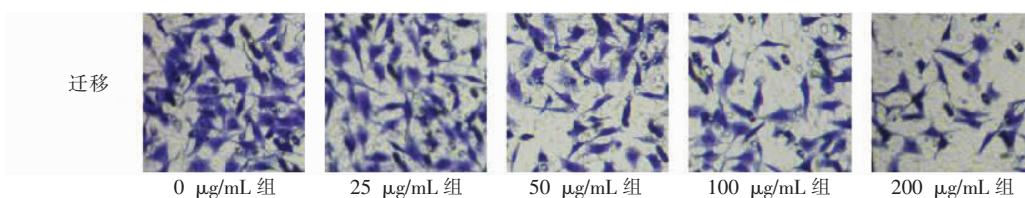


图 2 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞迁移的影响 (50 \times)

* $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; # $P < 0.05$, 与 25 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\nabla P < 0.05$, 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 组相比。

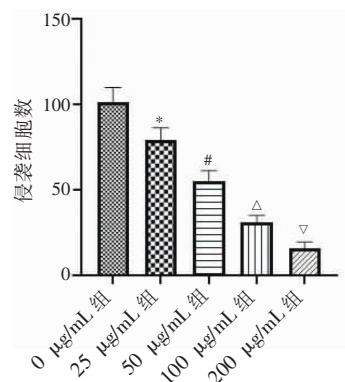
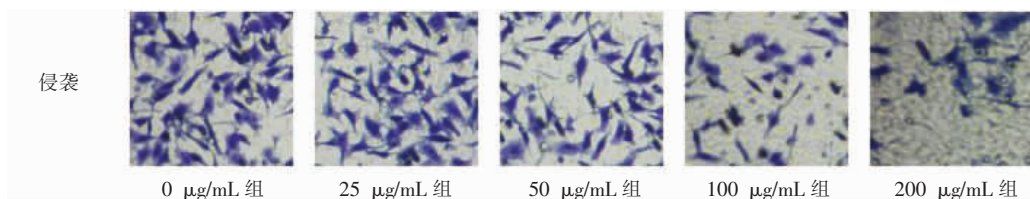


图 3 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞侵袭的影响 (50 \times)

* $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; # $P < 0.05$, 与 25 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\nabla P < 0.05$, 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 组相比。

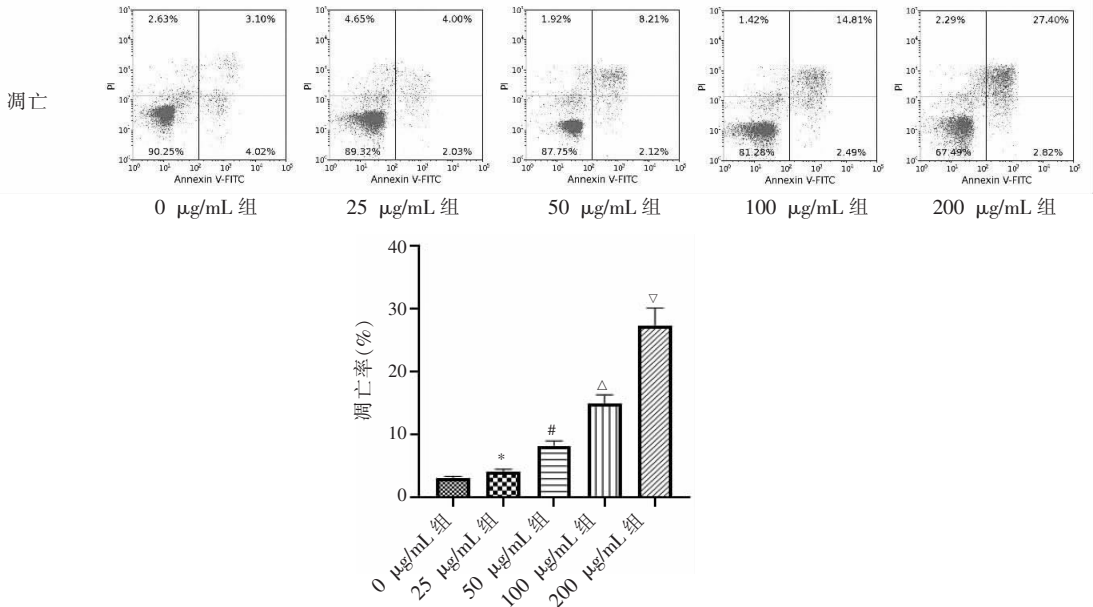


图 4 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞凋亡的影响

* $P < 0.05$, 与 0 µg/mL 组相比; # $P < 0.05$, 与 25 µg/mL 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 50 µg/mL 组相比; $\nabla P < 0.05$, 与 100 µg/mL 组相比。

2.5 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞内 VEGF/VEGFR 信号通路的影响

Western blot 检测经不同浓度的贝伐珠单抗处理后的各组肠癌细胞内 VEGF、VEGFR1、VEGFR2

蛋白表达,结果显示,随着贝伐珠单抗浓度的增加,VEGF 的表达显著下调,VEGFR1 和 VEGFR2 的表达显著上调 ($P < 0.05$)。见图 5。

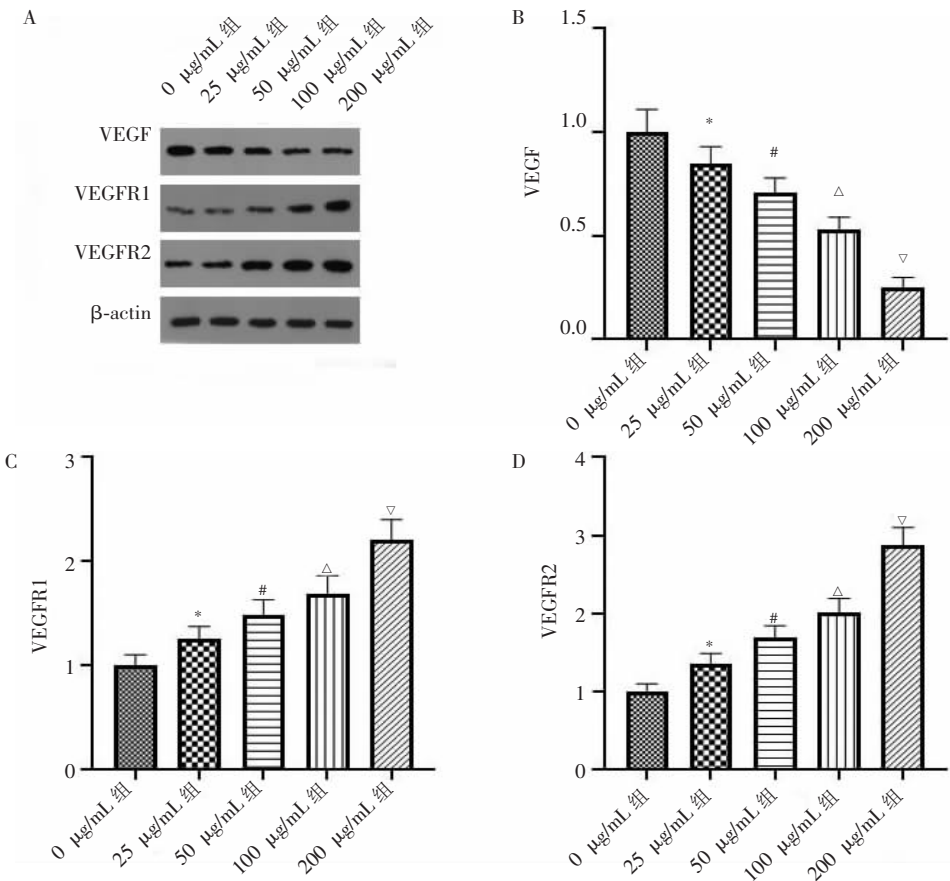


图 5 不同浓度的贝伐珠单抗对肠癌细胞内 VEGF/VEGFR 信号通路的影响

A. Western blot 检测 VEGF/VEGFR 信号通路条带图; B. 各组 VEGF 表达水平比较; C. 各组 VEGFR1 表达水平比较; D. 各组 VEGFR2 表达水平比较。* $P < 0.05$, 与 0 µg/mL 组相比; # $P < 0.05$, 与 25 µg/mL 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 50 µg/mL 组相比; $\nabla P < 0.05$, 与 100 µg/mL 组相比。

3 讨论

随着基因技术的发展和人们对肠癌研究的不断加深,有学者^[7-8]提出,肠癌细胞生物学行为为受到转化生长因子 $\beta 1$ 、VEGF 等多种细胞因子的影响。VEGFR1 和 VEGFR2 是 VEGFR 家族中的重要成员,其中 VEGFR1 在单核细胞等巨噬细胞系的细胞膜中高表达,参与细胞因子和趋化因子之间的信号转导,刺激不同组织的炎症反应和非炎症反应^[9],促进肿瘤血管、淋巴管生成和肿瘤转移。VEGFR2 具有较强的酪氨酸激酶活性,在血管内皮细胞中高表达,产生主要和直接的血管生成信号^[10]。有报道^[11-12]称,VEGF 在肺癌、卵巢癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中高表达,抑制 VEGF 的表达可阻断肿瘤新生血管生成,被认为是多种癌症的潜在免疫治疗靶点。本研究发现,VEGF/VEGFR 信号通路参与介导肠癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡,为肠癌的临床治疗提供了新的分子靶点和理论依据,这主要与 VEGF 与其受体家族中的 VEGFR1 和 VEGFR2 结合,可在恶性肿瘤疾病中参与细胞间的信号传递,调控细胞内的多种基因表达,进而影响疾病进展有关^[13]。

贝伐珠单抗是治疗胰腺炎、结肠癌等癌症的重要靶向药物,发挥显著抗肿瘤血管生成作用,抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制肠癌等癌症的病情进展^[14]。本研究结果显示,贝伐珠单抗可浓度依赖性地抑制人肠癌细胞系 SW480 细胞的体外增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,发挥显著的抑癌效应。进一步的机制实验也表明,贝伐珠单抗的抗肿瘤作用是通过抑制血管内皮生长因子 VEGF 的表达,上调血管内皮生长因子受体 VEGFR1/2 来实现的。这与贝伐珠单抗特有的生物活性有关,贝伐珠单抗可与 VEGFR 受体竞争性结合^[15],上调 VEGFR1、和 VEGFR2 的表达,阻断 VEGF 的活性,下调 VEGF 的表达,抑制肿瘤新生血管和淋巴管生成^[16],进而显著抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭,并诱导细胞凋亡,与 Itatani 等^[17]的研究结果相符。

综上,贝伐珠单抗通过下调 VEGF,上调 VEGFR1 和 VEGFR2 的表达,在体外显著抑制肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,且贝伐珠单抗的抗癌效应随着药物浓度的增加而增强。

参考文献

[1] Torre LA, Siegel RL, Ward EM, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update[J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2016, 25(1): 16–27.

[2] Argilés G, Taberno J, Labianca R, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Annals of Oncology*, 2020, 31(10): 1291–1305.

[3] Rosen AW, Degett TH, Gögenur I. Individualized treatment of colon cancer[J]. *Ugeskrift for Laeger*, 2016, 178(31): V11150916.

[4] Antoniotti C, Borelli B, Rossini D, et al. AtezoTRIBE: a randomised phase II study of FOLFOXIRI plus bevacizumab alone or in combination with atezolizumab as initial therapy for patients with unresectable metastatic colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 683.

[5] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248–1264.

[6] Li X, Li X, Lv X, et al. Smad4 inhibits VEGF-A and VEGF-C expressions via enhancing Smad3 phosphorylation in colon cancer[J]. *Anatomical Record*, 2017, 300(9): 1560–1569.

[7] Shang A, Gu C, Wang W, et al. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p-TGF- $\beta 1$ axis[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 117.

[8] Malki A, ElRuz RA, Gupta I, et al. Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: recent insights and advancements[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 130.

[9] Yu Q, Wang L, Ding J, et al. Evaluation of ¹¹¹In-DOTA-F56 peptide targeting VEGFR1 for potential non-invasive gastric cancer xenografted tumor mice Micro-SPECT imaging[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30(14): 127248.

[10] Shaik F, Cuthbert GA, Homer-Vanniasinkam S, et al. Structural basis for vascular endothelial growth factor receptor activation and implications for disease therapy[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1673.

[11] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie et Embryologie*, 2018, 59(2): 455–467.

[12] Li S, Liu M, Do MH, et al. Cancer immunotherapy via targeted TGF- β signalling blockade in TH cells[J]. *Nature*, 2020, 587(7832): 121–125.

[13] Shibuya M. VEGF-VEGFR system as a target for suppressing inflammation and other diseases[J]. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 2015, 15(2): 135–144.

[14] 王倩倩, 朱陵君. VEGF 信号通路及结直肠癌抗 VEGF/VEGFR 靶向治疗[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(21): 3491–3495.

[15] Glassman AR, Wells JA, Josic K, et al. Five-year outcomes after initial aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab treatment for diabetic macular edema (protocol T extension study)[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(9): 1201–1210.

[16] Zhong L, Wang R, Wang Y, et al. Dual inhibition of VEGF and PARP suppresses KRAS-mutant colorectal cancer[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(9): 365–375.

[17] Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, et al. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer—alterations to anti-VEGF pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1232.

(收稿日期: 2023-09-10

修回日期: 2023-10-08)