

bFGF 抗体对人结直肠癌相关内皮细胞增殖、迁移、血管新生的影响和机制研究

余杰 宋泽凯 蔡谢潇 曹高健

[摘要] 目的 探究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)抗体对人结直肠癌相关内皮细胞增殖、迁移、血管新生及转录激活因子3(STAT3)通路的影响。方法 以结直肠癌 LOVO 细胞培养上清诱导人脐静脉内皮(HUVECs)细胞形成的结直肠癌相关内皮细胞为研究对象。采用CCK-8法和成管实验测定bFGF抗体对bFGF刺激内皮细胞增殖、迁移、成管功能的影响。采用Western blotting法测定STAT3通路蛋白表达。结果 与抗体组比较,不同浓度联合组的内皮细胞增殖抑制率均明显升高(t 分别=13.65、25.95、55.07、32.43, P 均 <0.05);与对照组比较,不同浓度抗体组内皮细胞迁移距离明显缩短(t 分别=3.69、7.19、7.29、14.34, P 均 <0.05),且各组抑制率升高和迁移距离缩短均呈剂量依赖性(t 分别=19.57、18.00、5.59;3.51、3.46、4.77, P 均 <0.05)。与对照组比较,抗体组、雷抗组、联合组内皮细胞管腔形成数目均明显减少(t 分别=2.58、13.85、17.16, P 均 <0.05),雷抗组和联合组数量明显少于抗体组,联合组明显少于雷抗组(t 分别=3.14、6.15、6.67, P 均 <0.05)。与bFGF组比较,不同浓度抗体组细胞中pSTAT3蛋白相对表达量均明显下降(t 分别=2.21、6.14、10.60、14.16, P 均 <0.05),且下降随着抗体浓度升高而降低(t 分别=3.59、3.41、6.23, P 均 <0.05)。结论 bFGF抗体对bFGF刺激的细胞增殖、迁移及血管新生等功效具有明显抑制作用,抑制作用存在剂量效应,且可能与抑制STAT3磷酸化有关。

[关键词] 结直肠癌; 内皮细胞; 增殖; 迁移; 血管新生; 碱性成纤维细胞生长因子抗体

Effect and mechanism of bFGF antibody on proliferation, migration and angiogenesis of human colorectal cancer associated endothelial cells YU Jie, SONG Zekai, CAI Xiexiao, et al. Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325200, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) antibody on the proliferation, migration, angiogenesis and transcriptional activator 3 (STAT3) pathway of human colorectal cancer (CRC) related endothelial cells. **Methods** The formation of human umbilical vein endothelial (HUVECs) cells induced by LOVO cell culture of colorectal cancer was studied. The effects of bFGF antibody on proliferation, migration and tube formation of endothelial cells stimulated by bFGF were determined by CCK-8 method, and tube formation test. The expression of STAT3 pathway protein was determined by Western blotting. **Results** Compared with antibody group, the proliferation inhibition rate of endothelial cells in combined group with different concentration of bFGF antibody was significantly increased ($t=13.65, 25.95, 55.07, 32.43, P<0.05$). Compared with the control group, the migration distance of endothelial cells in different antibody concentration groups was significantly shortened ($t=3.69, 7.19, 7.29, 14.34, P<0.05$), and the increase of inhibition rate and the reduction of migration distance in each group were dose-dependent ($t=19.57, 18.00, 5.59, 3.51, 3.46, 4.77, P<0.05$). Compared with the control group, the number of endothelial cell lumen formation in antibody group, thunder reactant group and combined group was significantly reduced ($t=2.58, 13.85, 17.16, P<0.05$), the number of thunder reactant group and combined group was significantly less than that in antibody group, and the number of combined group was significantly less than that in combined group ($t=3.14, 6.15, 6.67, P<0.05$). Compared with bFGF group, the expression level of pSTAT3 in all antibody groups was significantly decreased ($t=2.21, 6.14, 10.60, 14.16, P<0.05$), and the decrease was significant with the increase of antibody concentration ($t=3.59, 3.41, 6.23, P<0.05$). **Conclusion** bF-

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.008.005

基金项目:温州科技局(Y20210916)

作者单位:325200 浙江温州,温州医科大学附属第三医院胃肠外科(余杰、蔡谢潇、曹高健),病理科(宋泽凯)

GF antibody can significantly inhibit cell proliferation, migration, and angiogenesis stimulated by bFGF. The inhibition has a dose-effect and may be related to the inhibition of STAT3 phosphorylation.

[Key words] colorectal cancer; endothelial cells; proliferation; migration; angiogenesis; basic fibroblast growth factor antibody

结直肠癌是临床常见的新生血管丰富的实体肿瘤,国内每年有约55.5万新发病例和28.6万死亡病例^[1]。以往对于结直肠癌的研究证实血管新生对于结直肠癌肿瘤的发生、发展,尤其在肿瘤细胞浸润、转移和复发等过程中起着至关重要的作用^[2]。贝伐珠单抗和雷珠单抗等抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)代表性药物已广泛应用于转移性肿瘤的一、二线方案治疗中,但其使用会引发耐药性、药毒性,从而限制了其临床应用^[3]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种典型的血管新生诱导剂,控制参与肿瘤标志的信号通路,提示其可成为抗癌治疗的又一靶点^[4,5]。本次研究旨在探究bFGF抗体对细胞增殖、迁移、血管新生的影响作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验对象 温州医科大学附属第三医院胃肠外科于2023年3月至2023年12月开展本次研究。经典血管模型-人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由武汉普诺赛生命科技有限公司培育, CL-0675、人结直肠癌细胞株 LOVO 细胞(A01X823)由上海抚生实业有限公司培育。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 ①结直肠癌条件培养液制备:用内含10%胎牛血清的DMEM培养液培养LOVO细胞至细胞融合度达到80%左右,更换不含胎牛血清的新鲜培养液继续培养48 h;胰酶消化后离心,收集上清液并过滤后保存待用。②HUVECs细胞制备:HUVECs细胞的冷冻管恒温解冻60 s后接种至DMEM培养基中复苏,待贴壁生长后更换培养基细胞传代和消化,收集3代后对数期细胞待用。③结直肠癌相关血管内皮细胞制备:将对数生长期HUVECs细胞接种于结直肠癌条件培养液与EMEM培养液(1:1)混合而成的培养液中,培养至细胞融合度达80%左右。

1.2.2 CCK-8法测定细胞增殖能力 取对数生长期内皮细胞制备单细胞悬液(1×10^5 /mL),接种于96

孔细胞培养板中(每孔100 μ L),置于CO₂培养箱培养24 h;将细胞随机分为九份,弃去多余培养液,对照组加入内含20 ng/mL bFGF的培养液100 μ L,抗体组仅加入内含不同浓度bFGF抗体(0.25、1、4、16 μ mol/L)的培养液100 μ L,联合组分别加入内含20 ng/mL bFGF和不同浓度bFGF抗体的培养液100 μ L,CO₂培养箱培养24 h;每孔加入内含10 μ L CCK-8溶液的新鲜培养液继续孵育2 h。酶标仪于450 nm处测定吸光值,计算抑制率(%)=(1-抗体组或联合组OD值/对照组OD值) \times 100%。

1.2.3 划痕实验测定细胞迁移能力 结直肠癌相关血管内皮细胞用内含0.2%胎牛血清白蛋白的无血清培养液进行细胞重悬浮(1×10^6 /mL)。在6孔培养板背面划出横线和竖线。将制备的单细胞悬液接种于6孔细胞培养板中待生长融合度达到70%~80%时,用200 μ L无菌枪头沿垂直孔板平面制造细胞划痕线。将细胞随机分为五份,分别加入内含20 ng/mL bFGF(对照组)和不同浓度bFGF抗体组(0.25、1、4、16 μ mol/L)的条件培养基,培养24 h。分别于培养前和培养24 h结束时拍照记录。选用Image J软件对内皮细胞迁移距离进行处理分析。

1.2.4 成管实验测定血管新生 按照50 μ L/孔的量,将预冷处理的Matrigel的胶铺在96孔细胞培养板中,操作全程在冰上完成;CO₂培养箱中静置处理60 min待其凝固,将细胞随机分为四份,内含20 ng/mL bFGF(对照组)、20 ng/mL bFGF+16 μ mol/L bFGF抗体(抗体组)、20 ng/mL bFGF+16 μ mol/L雷珠单抗(雷抗组)、20 ng/mL bFGF+8 μ mol/L bFGF抗体+8 μ mol/L雷珠单抗(联合组),分别将传代培养内皮细胞悬液接种于96孔细胞板中,37 $^{\circ}$ C条件下继续培养6 h。利用Matrigel体外三维成型法检测各组结直肠癌相关血管内皮细胞管腔形成数量。

1.2.5 Western blotting法测定STAT3通路蛋白表达 将内皮细胞悬液接种于6孔细胞培养板中(5×10^5 个细胞/孔),并将细胞随机分为六组,对照组培养基中不含bFGF及抗体,bFGF组内含20 ng/mL bFGF,各抗体组分别内含0.25、1、4、16 μ mol/L bFGF抗体和20 ng/mL bFGF,培养24 h后裂解细

胞。BCA法测定细胞蛋白浓度,取40 μg提取总细胞蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;然后滴加入pSTAT3和GAPDH抗体,4℃条件下孵育过夜,冲洗3次后加羊抗兔抗体,继续孵育2h,最后显影曝光,凝胶成像系统扫描并分析STAT3通路蛋白表达结果。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间计量资料比较采用 t 检验;重复测量资料比较用重复测量资料方差分析,两两比较采用LSD- t 法;计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组内皮细胞增殖抑制率比较见表1

表1 各组内皮细胞增殖抑制率的比较/%

组别	0.25 μmol/L	1 μmol/L	4 μmol/L	16 μmol/L
抗体组	6.71±0.93	7.54±1.20	6.46±1.28	7.11±1.19
联合组	15.24±1.50 [▲]	41.84±3.54 ^{*▲}	71.81±3.10 ^{#▲}	86.64±6.83 ^{△▲}

注: *: 与同组0.25 μmol/L bFGF抗体比较, $P<0.05$; #: 与1 μmol/L bFGF抗体比较, $P<0.05$; △: 与4 μmol/L bFGF抗体比较, $P<0.05$; ▲: 与同浓度抗体组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,不同浓度抗体组内皮细胞的增殖抑制率比较,差异无统计学意义($F=1.33, P>0.05$)。不同浓度联合组内皮细胞的增殖抑制率比较,差异有统计学意义($F=454.85, P<0.05$),联合组两两比较,随着抗体浓度升高,内皮细胞增殖抑制率逐渐升高(t 分别=19.57、18.00、5.59, P 均 <0.05)。与同浓度抗体组比较,联合组内皮细胞增殖抑制率均明显升高,差异均有统计学意义(t 分别=13.65、25.95、55.07、32.43, P 均 <0.05)。

2.2 各组内皮细胞迁移距离比较 对照组内皮细胞迁移距离(258.25 ± 20.79) μm, 0.25、1、4、16 μmol/L bFGF抗体浓度的抗体组内皮细胞迁移距离分别为(221.38 ± 19.15) μm、(189.13 ± 17.54) μm、(163.13 ± 11.99) μm、(132.75 ± 13.44) μm, 各组内皮细胞迁移距离间比较,差异有统计学意义($F=67.10, P<0.05$)。与对照组比较,抗体组内皮细胞迁移距离均明显缩短(t 分别=3.69、7.19、7.29、14.34, P 均 <0.05);并且随着抗体浓度升高,内皮细胞迁移距离明显缩短,差异均有统计学意义(t 分别=3.51、3.46、4.77, P 均 <0.05)。

2.3 各组内皮细胞管腔形成数目比较 对照组、抗体组、雷抗组、联合组内皮细胞管腔形成数目分别

为(128.63 ± 3.38)个、(108.44 ± 14.41)个、(91.35 ± 6.86)个、(71.16 ± 7.79)个,差异有统计学意义($F=48.26, P<0.05$)。与对照组比较,抗体组、雷抗组、联合组管腔形成数目均减少(t 分别=2.58、13.85、17.16, P 均 <0.05),雷抗组和联合组明显少于抗体组,联合组明显少于雷抗组,差异均有统计学意义(t 分别=3.14、6.15、6.67, P 均 <0.05)。

2.4 各组内皮细胞中pSTAT3和STAT3蛋白表达比较见表2

表2 各组内皮细胞中pSTAT3和STAT3蛋白表达比较

组别	pSTAT3蛋白 相对表达量	STAT3蛋白 相对表达量
对照组	0.17±0.04	0.56±0.12
bFGF组	0.61±0.10*	0.66±0.10
0.25 μmol/L抗体组	0.49±0.11#	0.60±0.10
1 μmol/L抗体组	0.31±0.09 ^{#△}	0.64±0.08
4 μmol/L抗体组	0.19±0.04 ^{#△▲}	0.56±0.11
16 μmol/L抗体组	0.07±0.02 ^{#△▲▽}	0.50±0.12

注: *: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与bFGF组比较, $P<0.05$; △: 与0.25 μmol/L抗体组比较, $P<0.05$; ▲: 与1 μmol/L抗体组比较, $P<0.05$; ▽: 与4 μmol/L抗体组比较, $P<0.05$ 。

由表2可见,各组的STAT3蛋白相对表达量比较,差异无统计意义($F=1.54, P>0.05$);各组的pSTAT3蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($F=57.44, P<0.05$)。与对照组比较, bFGF组pSTAT3蛋白表达量增大($t=11.19, P<0.05$),与bFGF组比较,不同浓度抗体组细胞中pSTAT3蛋白相对表达量均明显下降(t 分别=2.21、6.14、10.60、14.16, P 均 <0.05);且pSTAT3蛋白相对表达量随着抗体浓度升高而降低,差异均有统计学意义(t 分别=3.59、3.41、6.23, P 均 <0.05)。

3 讨论

bFGF又名FGF-2,是FGF家族成员之一,也是第一个被鉴定出来的血管新生刺激因子,高表达于大多数实体肿瘤组织中,通过与受体结合,参与肿瘤细胞增殖、迁移、血管形成和肿瘤复发等活动^[6],但尚缺少其在结直肠癌病情进展中的研究报道。

血管内皮细胞是衬在心血管及淋巴管内表皮的单层上皮细胞,负责血管功能调节,确保血管正常代谢和更新。血管内皮细胞增殖是血管新生的基础,不仅为血管新生提供所需营养物质和能量,同时也是血管的必备细胞单元。血管新生是恶性肿瘤病灶转移的必备条件。吕经纬等^[7]研究发现,

与VEGF功能相似,一定浓度的bFGF对猪血管内皮细胞增殖和迁移具有促进作用。以往研究显示,bFGF抗体可通过与bFGF蛋白结合,降低bFGF蛋白表达,缓解bFGF促血管新生作用^[5,8]。本次研究结果显示,联合组对内皮细胞增殖抑制率均明显高于抗体组,内皮细胞迁移距离均明显小于抗体组,且随着抗体浓度增大,其对内皮细胞增殖抑制率逐渐增大,内皮细胞迁移距离明显缩短(P 均 <0.05),结果表明单独加入bFGF抗体对内皮细胞增殖和细胞迁移具有一定抑制作用,与周娟等^[9]报道的bFGF抗体组卵巢癌抑制瘤抑制率观察结果相似,可能原因在于bFGF抗体可与细胞内原有代谢形成bFGF结合,从而阻断了bFGF与相应受体结合所形成的促细胞增殖效应。张宇等^[9]在乳腺癌研究中发现,bFGF源化单抗E12有助于增强化疗对肿瘤细胞增殖的抑制作用,且其抑制作用与剂量相关,本次研究在内皮细胞增殖中观察到相似结果。同时本次研究结果还显示,bFGF抗体组内皮细胞管腔形成数目少于对照组,且其与雷珠单抗联用组效果更明显(P 均 <0.05),提示bFGF抗体对bFGF刺激的血管新生具有明显抑制作用,且其与雷珠单抗联用能获得增效作用,可能原因在于消除了VEGF在血管生成方面的补偿作用。

STAT3是非受体酪氨酸激酶(janus tyrosine kinase, JAK)/STAT信号通路中的重要信号分子,其被激活后形成的pSTAT3可与启动子结合,从而启动下游诸如细胞周期调控基因表达^[10]。bFGF、VEGF等促血管生成因子是STAT3信号途径的下游效应分子,pSTAT3可促进内皮细胞、炎症细胞和肿瘤细胞等分泌VEGF、bFGF等促血管生成因子,然后以旁分泌或自分泌形式驱动内皮增殖,促进肿瘤血管新生^[11]。Cui等^[12]发现,STAT3的持续激活与VEGF、bFGF等表达呈正相关;抑制STAT3可下调HUVECs中一氧化氮合酶、bFGF等与肿瘤血管生成和毛细血管发芽相关的促血管生成因子表达^[13]。本次研究结果显示,抗体组pSTAT3表达水平与bFGF组相比明显下降(P 均 <0.05),且变化趋势与在内皮细胞增殖和血管生成中的影响一致,提示bFGF抗体可通过抑制STAT3激活,阻断结肠癌相关内皮细胞增殖、迁移和血管生成。

综上所述,bFGF抗体对bFGF刺激的细胞增殖、迁移及血管新生等功效具有明显抑制作用,该抑制作用存在剂量效应,且可能与抑制STAT3磷酸化有关。

参考文献

- 1 李哲轩,张阳,周彤,等.2020全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-13.
- 2 Wang R, Ma Y, Zhan S, et al. B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF- κ B pathway to induce VEGFA expression[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1):55-69.
- 3 Mukwaya A, Jensen L, Lagali N. Relapse of pathological angiogenesis: Functional role of the basement membrane and potential treatment strategies[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(2):189-201.
- 4 Wang Z, Xu H, Zhang J, et al. Basic fibroblast growth factor blockade enhances lung cancer cell invasion by activating the AKT/MMP-2/VEGF pathway[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2020, 126(1):43-50.
- 5 周娟,朱君花,王春佟. bFGF抗体抑制人卵巢癌裸鼠移植瘤细胞转移及血管新生的实验研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(3):229-232.
- 6 Li C, Kuang K, Du J, et al. Far beyond anti-angiogenesis: Benefits for anti-basicFGF therapy in cancer[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022, 1869(7):119253-119264.
- 7 吕经纬,谭谦. VEGF、bFGF浓度梯度对猪血管内皮细胞、成纤维细胞增殖移行的影响[J]. 医学临床研究, 2016, 33(2):279-282.
- 8 卢锐斌,赵辉,谢秋玲,等.抗FGF-2纳米抗体抑制碱烧伤诱导大鼠角膜血管新生[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(6):609-615.
- 9 张宇,黄建芳,徐萌,等. FGF2人源化单抗E12及其联合顺铂/紫杉醇体外抑制乳腺癌细胞增殖作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(8):1187-1194.
- 10 El-Tanani M, Al Khatib AO, Aladwan SM, et al. Importance of STAT3 signalling in cancer, metastasis and therapeutic interventions[J]. Cell Signal, 2022, 92: 110275-110282.
- 11 Zhou W, Yang L, Nie L, et al. Unraveling the molecular mechanisms between inflammation and tumor angiogenesis[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(2):301-317.
- 12 Cui LM, Zhang K, Ma DJ, et al. Protein expression under sustained activation of signal transducer and activator of transcription-3 in diethylnitrosamine-induced rat liver carcinogenesis[J]. Oncol Lett, 2014, 8(2):608-614.
- 13 Wysoczynski M, Pathan A, Moore JB, et al. Pro-angiogenic actions of CMC-derived extracellular vesicles rely on selective packaging of angiopoietin 1 and 2, but not FGF-2 and VEGF[J]. Stem Cell Rev Rep, 2019, 15(4):530-542.

(收稿日期 2024-04-08)

(本文编辑 高金莲)