

Slit2/Robo1 信号在胃肠道血管畸形发病机制中的作用以及沙利度胺对其表达的影响

李一男, 戈之铮*, 高云杰, 冯倩, 陈慧敏, 房静远, 萧树东(上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001)

摘要: 目的 探讨 Slit2/Robo1 信号在胃肠道血管畸形发病机制中的作用以及沙利度胺对其表达的影响。方法 收集 7 例胃肠道血管畸形患者血管病变组织与正常黏膜组织, 分别检测 Slit2, Robo1, VEGF 基因和蛋白水平的表达。体外培养原代人脐静脉内皮细胞至对数生长期, 同步化后用不同浓度的沙利度胺(50, 100, 200 mg·L⁻¹)作用 24 和 48 h 后, 实时定量 PCR 法测定处理组与溶剂对照组的 Slit2, Robo1, VEGF mRNA 表达水平, 免疫印迹法测定 Slit2, Robo1, VEGF 蛋白表达水平。结果 胃肠道血管畸形患者血管病变组织中 Slit2, Robo1, VEGF 基因及蛋白表达水平显著高于正常黏膜组织。沙利度胺能够明显抑制 Slit2, Robo1, VEGF 基因与蛋白的表达。结论 Slit2, Robo1 可能与胃肠道血管畸形的发病相关, 而沙利度胺可抑制其表达, 这一作用可能是沙利度胺抑制血管生成, 治疗胃肠道血管畸形的机制之一。

关键词: 胃肠道; 血管畸形; 沙利度胺; Slit2; Robo1

中图分类号: R969.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)04-0357-04

Role of Slit2/Robo1 in the Pathogenesis of Gastrointestinal Vascular Malformation and the Effect of Thalidomide on Their Expression

LI Yi'nan, GE Zhizheng*, GAO Yunjie, FENG Qian, CHEN Huimin, FANG Jingyuan, XIAO Shudong
(Department of Gastroenterology and Hepatology, Shanghai Jiao-Tong University School of Medicine Renji Hospital, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the role of Slit2/Robo1 in the pathogenesis of gastrointestinal vascular malformation (GIVM) and the effect of thalidomide on their expression. **METHODS** We collected the biopsy specimens of 7 patients with GIVM including the vascular malformation region and normal mucosa region. The expression levels of vascular endothelial growth factor(VEGF), Slit2, Robo1 in patients tissues was measured by Western blot to find out the difference in the mucosa. Then cultured human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) and intervened HUVEC with thalidomide of different concentration(50, 100, 200 mg·L⁻¹) for 24 hours or 48 hours to observe the expression of VEGF, Slit2, Robo1 by real-time PCR and Western blot. **RESULTS** VEGF, Slit2, Robo1 was strongly expressed in all patients tissues with angiodysplasia lesions, as compared to expression in tissues without angiodysplasia lesions of the same patient. Thalidomide decreased VEGF, Slit2, Robo1 expression, both at the protein and mRNA levels in a dose-dependent manner. **CONCLUSION** Slit2/Robo1 may play an important role in the pathogenesis of angiodysplasia. Thalidomide can suppress VEGF, Slit2/Robo1 expression. This may be the mechanism of the therapeutic effect of thalidomide on GIVM.

KEY WORDS: gastrointestinal; vascular malformation; thalidomide; Slit2; Robo1

胃肠道血管畸形(gastrointestinal vascular malformation, GIVM)是一种隐匿的高复发性出血性疾病, 组织学表现为黏膜层或黏膜下多量管腔扩张、增粗或迂曲的变形血管, 是引起急慢性下消化道出血的原因之一^[1]。病变常多发, 易复发, 给根治带来困难。近年来, 有较大样本的随机对照试验证实了沙利度胺治疗 GIVM 所致消化道出血具有长期疗效^[2]。

血管畸形的发生被认为与血管异常生成有关^[3]。

目前发现神经轴突诱导因子 Slit2 与其配体 Robo1 在血管生成过程中具有重要的生物学功能^[4]。本研究将通过研究 Slit2/Robo1 通路对血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响, 探讨 Slit2/Robo1 通路在 GIVM 发病机制中所起的作用, 以及沙利度胺治疗 GIVM 的可能机制。

1 资料与方法

1.1 组织标本

收集我院 2010 年 10 月至 2012 年 10 月间消

基金项目: 上海市卫生局科研课题项目(20114002)

作者简介: 李一男, 男, 硕士生 Tel: 13671551897
Tel: (021)58752345 E-mail: zhizhengge@yahoo.com.cn

E-mail: liyinan@sjtu.edu.cn

*通信作者: 戈之铮, 男, 博士, 主任医师, 教授

化内镜检查 GIVM 患者活检组织 7 例, 活检部位选取血管畸形病灶处以及周围正常黏膜处。患者平均年龄 60.1 岁, 男性 2 例, 女性 5 例。标本收集经院伦理委员会同意, 患者均知情同意。

1.2 细胞培养

原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 经Ⅷ因子鉴定, 采用第 2~6 代。培养采用原代细胞培养液。培养条件为 37℃, 5% CO₂, 100%湿度。取对数生长期细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2.5×10⁵ 个细胞。贴壁后无血清 DMEM 培养基同步化 24 h。

1.3 分组

沙利度胺溶解于二甲基亚砜(DMSO)并加入细胞培养孔, 终浓度为 50, 100, 200 mg·L⁻¹, 溶剂对照组加入 0.1% DMSO。24 和 48 h 后分别检测 Slit2, Robo1, VEGF 基因和蛋白水平的表达。

1.4 RNA 与蛋白提取

药物干预 24 h 后, 使用 Trizol 试剂提取总 RNA, 溶于 20 μL DEPC 水中, 用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。所有 RNA OD260: OD280 为 1.9~2.0。

药物干预 48 h 后, 采用 Rapa 裂解蛋白, 裂解液中加入蛋白及磷酸酶抑制剂。总蛋白采用 BCA 法进行定量。

1.5 实时定量 PCR

逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 操作根据说明书。

采用 SYBR Green I 嵌合荧光法检测 Slit2, Robo1, VEGF mRNA。每组基因设 3 个复孔, 按 2^{-ΔΔCt} 计算相对表达量, 所有实验重复 3 次。引物合成见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物设计

Tab 1 Real-time qPCR primer design

基因	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
β-actin	上游: CTTAGTTGCGTTACACCTT	144
	下游: CCTTACCGTTCCAGTTT	
Slit2	上游: CACCTCGTACAGCCGCACTT	104
	下游: TGTGGACCGCTGAGGAGCAA	
Robo1	上游: GGAAGAAGACGAAGCCGACAT	107
	下游: TCTCCAGGTCCCAACACTG	
VEGF	上游: AGTTCCACCACCAACATGC	110
	下游: TGAAGGGACACAACGACACA	

1.6 蛋白免疫印迹

等量的蛋白质(50 μL)进行 10%的十二烷基硫

酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。Robo1 抗体购自 Abcam 公司, Slit2 抗体购自 Epitomics 公司, ECL 法显色, 根据 GAPDH 计算相对光密度, 所有试验重复 3 次。

1.7 酶联免疫吸附试验

药物干预 48 h 后, 提取细胞上清液, 12 000 r·min⁻¹, 4℃, 5 min 离心, VEGF ELISA 试剂盒购自生工公司, 操作按说明书, 根据标准曲线确定相应浓度, 所有实验重复 3 次。

1.8 统计方法

采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均通过正态性检验。统计检验采用 one-way ANOVA 方法, 组间比较采用 LSD-t 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活检标本中 Slit2, Robo1, VEGF 蛋白水平的表达

免疫印迹结果显示, GIVM 患者血管畸形组织中的 Slit2, Robo1, VEGF 蛋白表达水平较正常组织明显升高(P<0.01), 结果见图 1。

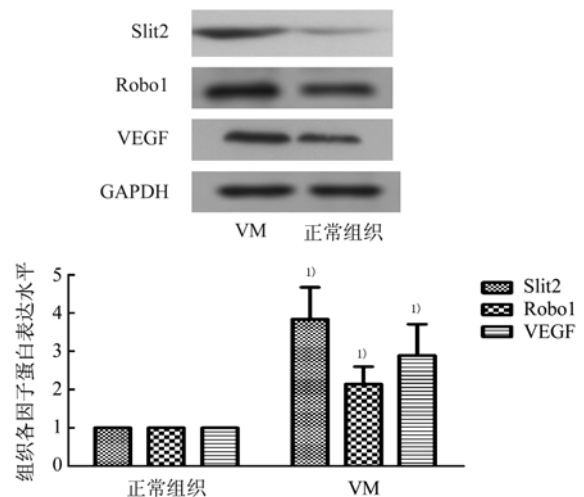


图 1 活检标本中 Slit2, Robo1, VEGF 蛋白水平的表达 VM-血管畸形病灶区域; 与正常组织区域比较, ¹⁾P<0.01

Fig 1 Expression levels of Slit2, Robo1 and VEGF protein in biopsy specimen

VM-region of vascular malformation; compared with normal tissues, ¹⁾P<0.01

2.2 沙利度胺干预后 HUVEC 中 Slit2, Robo1, VEGF mRNA 与蛋白的表达

沙利度胺干预 24 h 后各组与溶剂对照组相比可以显著抑制 HUVEC 中 Slit2, Robo1, VEGF mRNA 的表达。与溶剂对照组相比, 沙利度胺干预 48 h 可显著抑制 HUVEC 中 Slit2, Robo1, VEGF 蛋白的表达。结果见图 2。

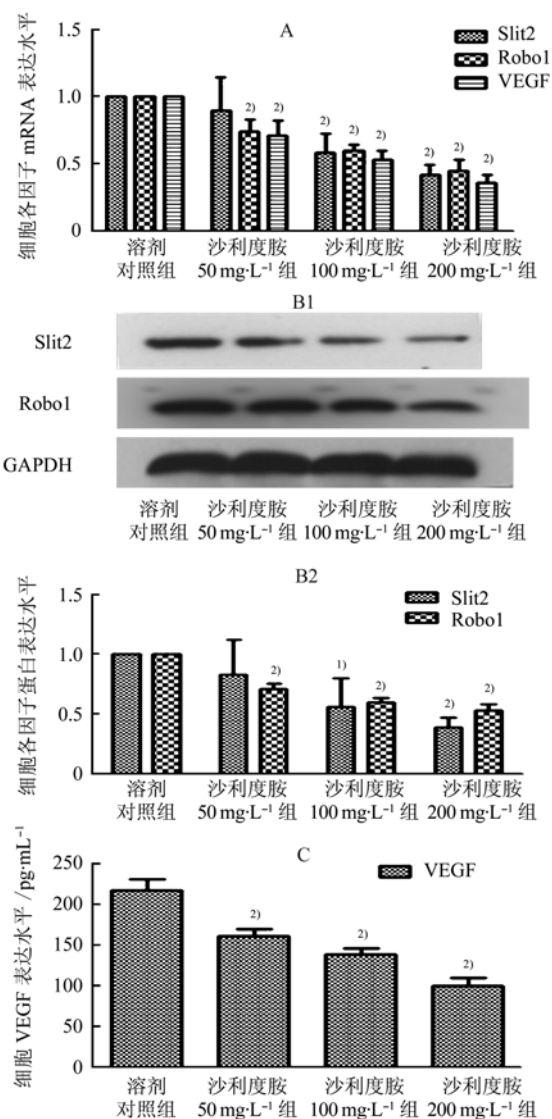


图2 不同浓度沙利度胺对 HUVEC 中 Slit2, Robo1, VEGF mRNA 与蛋白表达水平的影响。

A—mRNA 表达水平; B1—Robo1 免疫印迹图片; B2—蛋白表达水平; C—VEGF 蛋白表达水平
与溶剂对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Fig 2 Effects of thalidomide on Slit2, Robo1 and VEGF mRNA and protein expression

A—expression levels of mRNA in HUVEC; B1—photograph of the immunoblot analysis for Robo1 expression in HUVEC; B2—expression levels of protein in HUVEC; C—expression levels of VEGF protein in HUVEC

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

GIVM 是一种隐匿的高复发性出血性疾病,其发生发展被认为与血管异常生成有关。VEGF 是目前公认的血管生成的标志性分子^[5]。本研究显示, GIVM 患者中病灶区域的 Slit2, Robo1, VEGF 的表达量显著高于正常黏膜,且沙利度胺可以抑制 HUVEC 中 Slit2, Robo1, VEGF mRNA 以及蛋白

的表达。

沙利度胺曾因其严重不良反应而于 1961 年被召回。然而在 1994 年发现沙利度胺可抑制 VEGF 以及成纤维细胞生长因子介导的血管生成^[6]。此外,据报道沙利度胺可通过抑制血管内皮细胞中血管生成素-2 以及低氧诱导因子-1 α 的合成进而抑制血管生成^[7-8]。除了对血管内皮细胞的作用外,有报道指出,沙利度胺可以通过调节血小板聚集生长因子与转化生长因子水平促进血管平滑肌细胞的募集及活化,起到促进新生血管成熟以及维持血管壁稳定的作用,从而起到抑制血管生成的作用^[9],提示沙利度胺的多靶点作用机制。一项较大样本的随机对照研究显示,沙利度胺治疗后 GIVM 患者有效率与完全止血率显著高于对照组 (71.4% vs 3.7% $P = 0.001$; 46.4% vs 0%, $P = 0.000$)。其他次要指标均显示沙利度胺组的疗效优于对照组,治疗过程中未出现严重不良反应^[2]。

Slit-Rob 信号通路包括分泌蛋白(Slit1, 2, 3) 和其相应受体(Robo1, 2, 3, 4)。Slit2/Robo1 信号通路最初发现可以引导神经轴突生长,而后发现其可以诱导血管生成与分支^[10]。Slit2 被广泛地证实存在于各种癌组织中, Slit2/Robo1 信号通路被认为可以调节肿瘤血管生成。有研究指出,血管内皮细胞可以从低 Slit2 浓度的肿瘤块边缘区域向内部 Slit2 高浓度区域迁移,以形成肿瘤内的新生血管,促进肿瘤的生长^[4]。此外,Slit2 也可调节肿瘤淋巴管形成^[11]。另有研究表明,Slit2/Robo1 信号通路在糖尿病视网膜血管病变以及角膜新生血管的发生发展中也起到重要作用^[12-13]。Slit2/Robo1 信号通路在血管周细胞迁移中也发挥了重要作用^[14]。

有研究指出,Slit2 浓度升高可以促进视网膜色素上皮细胞表达 VEGF^[12]。本研究首次发现 GIVM 患者病灶区域中相较于正常黏膜区域存在局部 Slit2, Robo1 与 VEGF 浓度升高的现象,提示 Slit2/Robo1 信号通路可能与 GIVM 的发生发展存在关联,这种关联可能通过影响 VEGF 的表达水平而发挥作用。在体外试验中显示,沙利度胺可以抑制 HUVEC 中 VEGF 的表达水平,与先前接受沙利度胺治疗后 GIVM 患者血清 VEGF 水平下降相一致^[15]。此外,本研究显示沙利度胺可以抑制 HUVEC 中 Slit2, Robo1 的表达水平,且具有剂量依赖性。因此沙利度胺可能通过影响 Slit2/Robo1 通路来抑制 VEGF 的表达。

研究表明, GIVM 患者出现病灶局部 Slit2, Robo1, VEGF 表达增高现象, 可能与 GIVM 发病相关。而沙利度胺可以抑制其表达, 这可能是沙利度胺抑制血管生成, 治疗 GIVM 的机制之一。

REFERENCES

- [1] BARNERT J, MESSMANN H. Diagnosis and management of lower gastrointestinal bleeding [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6(11): 637-646.
- [2] GE Z Z, CHEN H M, XIAO S D, et al. Long-term effects of thalidomide for recurrent gastrointestinal bleeding due to vascular malformation: an open-label, randomized, parallel controlled study [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1629-1637.
- [3] JUNQUERA F, SAPERAS E, DE TORRES I, et al. Increase expression of angiogenic factors in human colonic angiodysplasia [J]. *Am J Gastroenterol*, 1994, 94(12): 1070-1076.
- [4] WANG B, RAO Y, GENG J G, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(1): 19-29.
- [5] FERRARA N, GERBER H P, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med* 2003, 9(7): 669-676.
- [6] D'AMATO R J, LOUGHNAN M S, FLYNN E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 26(9): 4082-4085.
- [7] CHEN H M, GE Z Z, LIU W Z. The mechanisms of thalidomide in treatment of angiodysplasia due to hypoxia [J]. *Chin J Int Med(中华内科杂志)*, 2009, 48(4): 295-298.
- [8] TAN H H, CHEN H M, GE Z Z, et al. Role of vascular endothelial growth factor in angiodysplasia: an interventional study with thalidomide [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(6): 1094-1101.
- [9] LEBRIN F, SRUN S, RAYMOND K, et al. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 420-428.
- [10] KRAMER S G, KIDD T, SIMPSON J H, et al. Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration [J]. *Science*, 2001, 292(17): 737-740.
- [11] YANG X M, HAN H X, GENG J G, et al. Slit-Robo signaling mediates lymphangiogenesis and promotes tumor lymphatic metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 571-577.
- [12] ZHOU W Y, YU W Z, XIE W K, et al. The role of Slit-Robo signaling in proliferative diabetic retinopathy and retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2011, 17(1): 1526-1536.
- [13] HAN X, ZHANG M C. Potential anti-angiogenic role of Slit2 in corneal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(6): 742-749.
- [14] GUIJARRO-MUÑOZ I, CUESTA A M, ALVAREZ-CIENFUEGOS A, et al. The axonal repellent Slit2 inhibits pericyte migration: potential implications in angiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 15(4): 371-378.
- [15] BAUDITZ J, LOCHS H, VODERHOLZER W. Macroscopic appearance of intestinal angiodysplasias under antiangiogenic treatment with thalidomide [J]. *Endoscopy*, 2006, 38(10): 1036-1039.

收稿日期: 2012-08-30

姜黄素逆转非小细胞肺癌吉非替尼耐药的研究

盛琦¹, 陈建^{2*}, 李茵²(1.浙江省血液中心, 杭州 310006; 2.浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

摘要: 目的 研究姜黄素对吉非替尼耐药非小细胞肺癌细胞株 PC9/G2 耐药性的影响及作用机制。方法 MTT 法测定姜黄素对 PC9/G2 的无毒剂量及对 PC9/G2 对吉非替尼耐药的逆转效应, 实时荧光定量法测定姜黄素对 EGFR 下游通路中 PI3K 表达水平的影响, 分光光度法测定姜黄素对凋亡蛋白 Caspase-3 活性的影响。结果 姜黄素对 PC9/G2 的无毒剂量为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 姜黄素联合吉非替尼组细胞存活率比单用吉非替尼组降低 13%~22%, 姜黄素使 PI3K 的表达水平明显下降, Caspase-3 凋亡蛋白活性显著提高。结论 姜黄素对 PC9/G2 具有耐药逆转作用, 作用机制可能是通过下调 PI3K 的表达水平, 诱导更多的凋亡蛋白 Caspase-3 而实现。

关键词: 姜黄素; 吉非替尼耐药; 逆转; 机制

中图分类号: R961

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)04-0360-05

Experimental Study of Curcumin on the Reversal of Gefitinib Resistance in Non-small Lung Cancer Cell Line

SHENG Qi¹, CHEN Jian^{2*}, LI Jun²(1.Zhejiang Blood Centre, Hangzhou 310006, China; 2.The First Affiliate Hospital,

基金项目: 浙江省中医药科学研究基金计划(2011ZB065; 2010ZA051)

作者简介: 盛琦, 女, 主管技师 Tel: 13606628212 E-mail: shengqi0986@163.com *通信作者: 陈建, 男, 硕士, 主管药师 Tel: 13588084969 E-mail: cj21_0503@163.com