

引文格式:高文,陈陆霞,何彦津,梁凤鸣.姜黄素对人脉络膜黑色素瘤细胞株血管形成拟态抑制作用及其相关机制的研究[J].眼科新进展,2017,37(11):1018-1021. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0258

【实验研究】

姜黄素对人脉络膜黑色素瘤细胞株血管形成拟态抑制作用及其相关机制的研究

高文 陈陆霞 何彦津 梁凤鸣

作者简介:高文,女,1983年12月出生,河北沧州人,硕士,主治医师。研究方向:眼肿瘤。E-mail: gao-wenxiuwen@163.com; ORCID:0000-0003-2499-6757

About GAO Wen: Female, born in December, 1983. Master degree. Attending doctor. E-mail: gaowenxiuwen@163.com; ORCID: 0000-0003-2499-6757

收稿日期:2017-07-18
修回日期:2017-08-09

本文编辑:方红玲
作者单位:300193 天津市,天津市中医药大学第一附属医院眼科(高文,梁凤鸣);300000 天津市,天津市眼科医院(陈陆霞);300000 天津市,天津医科大学眼科医院(何彦津)

通讯作者:陈陆霞, E-mail: chen2006317@126.com; ORCID: 0000-0001-8588-2820; 何彦津, E-mail: yanjinhe88@gmail.com; ORCID: 0000-0003-1513-1970

Received date: Jul 18, 2017

Accepted date: Aug 9, 2017

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (GAO Wen, LIANG Feng-Ming), Tianjin 300193, China; Tianjin Eye Hospital (CHEN Lu-Xia), Tianjin 300000, China; Eye Hospital of Tianjin Medical University (HE Yan-Jin), Tianjin 300000, China

Responsible author: CHEN Lu-Xia, E-mail: chen2006317@126.com; ORCID: 0000-0001-8588-2820; HE Yan-Jin, E-mail: yanjinhe88@126.com; ORCID: 0000-0003-1513-1970

Inhibitory effects of curcumin on vasculogenic mimicry in choroid melanoma cell line OCM-1 and its mechanisms

GAO Wen, CHEN Lu-Xia, HE Yan-Jin, LIANG Feng-Ming

【Key words】 Choroid melanoma; curcumin; vasculogenic mimicry; PI3K

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of curcumin (Cur) on vasculogenic mimicry (VM) and PI3K pathway in choroid melanoma cell line OCM-1 *in vitro* 3-dimensional culture. **Methods** Three-dimensional culture of OCM-1 cells was performed for the observation of VM formation and the influence of concentration gradient ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Cur on VM, and immunohistochemistry staining was used to detect the expression of PI3K and EphA2 in OCM-1 cell line. **Results** Cur could markedly inhibit the formation of VM in choroid melanoma cell line OCM-1 *in vitro* 3-dimensional culture with a dose-dependent manner. Cur suppressed EphA2 and PI3K expression in a concentration-dependent manner, and the difference between groups with $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cur group was significant statistically (all $P=0.000$), but there was no significant difference between $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group (EphA2, $P=0.300$; PI3K, $P=0.188$). **Conclusion** Cur can significantly inhibit VM formation in choroid melanoma cell line OCM-1, of which the mechanism may be related to the downregulation expression of EphA2 and PI3K, thus inhibiting PI3K signaling pathway.

【中图分类号】 R773

【关键词】 脉络膜黑色素瘤;姜黄素;血管形成拟态;PI3K

【摘要】 **目的** 研究姜黄素对人脉络膜黑色素瘤细胞株 OCM-1 血管形成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 及其 PI3K 信号通路的影响。 **方法** 三维培养人脉络膜黑色素瘤细胞株 OCM-1, 观察其形成 VM 的能力。观察梯度浓度 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的姜黄素对 OCM-1 细胞株 VM 形成的影响, 采用免疫细胞化学检测参与 VM 形成的 PI3K 与 EPHA2 的表达。 **结果** 姜黄素在体外可以抑制 OCM-1 细胞株 VM 的形成, 呈浓度依赖性。姜黄素对 OCM-1 细胞 EphA2 和 PI3K 蛋白表达的影响: EphA2 和 PI3K 蛋白表达随姜黄素 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度的升高呈浓度依赖性降低。各组分别与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组比较, 差异均有统计学意义 (均为 $P=0.000$), 其中 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.300$, $P=0.188$)。 **结论** 姜黄素能明显抑制 OCM-1 细胞株 VM 的形成, 其机制可能与下调 EPHA2、PI3K 蛋白的表达, 从而抑制 PI3K 信号通路有关。

脉络膜黑色素瘤 (choroidal melanoma, CM) 是成人眼内最常见的原发性恶性肿瘤, 是一种严重危害人类健康的疾病^[1]。肿瘤的生长和转移被认为是一个依赖于血管形成的过程。Maniotis 等^[2]在研究高侵袭性人眼葡萄膜黑色素瘤微循环时发现并提出了一种全新的肿瘤血管形成模式, 即血管形成拟态 (vasculogenic mimicry, VM), 肿瘤细胞通过自身塑形构成的一种功能性微循环管道, 可以为肿瘤组织输送血液和营养物质, 并有利于肿瘤的侵袭和转移^[3]。

由于 VM 存在, 单纯针对内皮细胞的抗血管形成治疗效果往往不理想^[4]。这提示在抗肿瘤血管形成治疗中需要兼顾 VM 才有可能获得良好的疗效。本课题组在前期实验中发现人 CM 株 OCM-1 在体外三维培养中能形成 VM^[5]。VM 形成的分子机制尚不清楚, 研究证明^[4], 在 VM 形成过程中存在一条信号传导通路: 激活 PI3K 途径, 可以促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和周围基质的重塑, 从而最终导致 VM 形成。

姜黄素 (curcumin; $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$) 是一种酚性化合

物,具有天然抗肿瘤作用。但其作用机制尚不清楚,一方面姜黄素通过肿瘤的化学预防及抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡,达到抗肿瘤作用;另一方面,姜黄素还具有抑制肿瘤血管形成及转移作用^[6-7],主要通过 NF- κ B、PI3K/AKT 抑制肿瘤血管形成^[8];还可以通过下调 PI3K/mTOR/ETS2 途径,抑制致癌基因 MDM2 的激活达到抑制肿瘤生长的作用^[9]。以上研究可以看出,无论是肿瘤血管形成还是 VM 的形成,都存在 PI3K 途径,姜黄素可以通过 PI3K/AKT 抑制肿瘤血管形成已经得到证实。姜黄素浓度达到 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 OCM-1 细胞株 VM 的形成具有明显的抑制作用^[5]。那么有必要探索其作用与 PI3K 途径的关系。本实验体外三维培养人 CM 细胞株 OCM-1,并初步探讨姜黄素抑制 VM 形成的机制,为姜黄素抗肿瘤 VM 的临床应用及其作用机制的深入研究提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人 CM 细胞株 OCM-1 (瑞典卡洛琳斯卡医学院惠赠);姜黄素[规格每支 1 g,溶于二甲亚砜(DMSO)中配置成姜黄素溶液(DMSO 浓度控制在 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内)];小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);高糖-DMEM 培养液(天津斯凯迪商贸发展有限公司);鼠尾胶原蛋白 I 型(Rat tail tendon collagen Type I)(生友生物技术有限公司);PI3K 多克隆抗体,EphA2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);PV-9000 二步法免疫组织化学检测试剂(北京中杉金桥公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 OCM-1 三维培养模型的建立 参照杭州生友生物技术有限公司鼠尾胶原蛋白 I 型的使用说明制备三维胶原,取对数生长期 OCM-1 细胞 40×10^3 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 24 孔培养板内,每孔 20×10^3 个细胞。分为 5 组:姜黄素浓度为 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,每组 4 个平行孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,每隔 48 h 换液,观察 VM 形成情况。

1.3 细胞免疫组织化学法检测 PI3K、EphA2 蛋白的表达 三维培养的 OCM-1 细胞经处理固定后加入体积分数 3% H_2O_2 处理 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗涤,封闭血清孵育,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜,二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,DAB 显色,蒸馏水冲洗,苏木精对比复染。光学显微镜下观察 PI3K、EphA2 蛋白的表达情况。结果判定采用综合评分法,根据细胞着色深度及阳性细胞数分别记为 0~3 分。着色深度以多数细胞呈色程度为准,凡细胞浆着浅棕色者 1 分,棕色 2 分,深棕色 3 分,不着色 0 分;阳性细胞占有所有细胞中的比例 <30% 为 1 分,30%~70% 为 2 分,>70% 为 3 分,无细胞着色为 0 分。根据上述两项指标积分数分为 4 级,0 分阴性,2~3 分弱阳性,4 分阳性,5~6 分强阳性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单向方差分析,方差齐性检验应用 SNK 法,多重比较采用 LSD 法和 SNK 法,两两比较采用 Dunnett 法双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 OCM-1 细胞 EphA2 蛋白表达的影响

0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组,EphA2 免疫组织化学综合评分分别为 (3.800 \pm 1.142) 分、(2.172 \pm 0.718) 分、(1.305 \pm 0.488) 分、(0.570 \pm 0.387) 分、(0.192 \pm 0.093) 分,呈浓度依赖性降低,其他各组分别与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组比较,差异有统计学意义 ($P = 0.000$),其中 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较,差异无统计学意义 ($P = 0.300$)。EphA2 蛋白表达显示(图 1):0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 EphA2 染色且围成网格状,棕黄色强阳性;10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 EphA2 染色阳性部位为细胞浆,棕黄色,阳性;20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 EphA2 染色阳性部位为细胞浆,浅棕色,弱阳性;30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 EphA2 染色阴性;40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 EphA2 染色阴性。

2.2 姜黄素对 OCM-1 细胞 PI3K 蛋白表达的影响

0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组,EphA2 免疫组织化学综合评分分别为 (5.580 \pm 1.298) 分、(2.757 \pm 0.985) 分、(1.410 \pm 0.789) 分、(0.263 \pm 0.165) 分、(0.197 \pm 0.082) 分,呈浓度依赖性降低,其他各组分别与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组比较,差异有统计学意义 ($P = 0.000$),其中 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.188$)。PI3K 蛋白表达显示(图 2):0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 PI3K 染色棕黄色且围成网格状,强阳性;10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 PI3K 染色阳性部位为细胞浆,棕黄色,阳性;20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 PI3K 染色阳性部位为细胞浆,浅棕色,弱阳性;30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 PI3K 染色阴性;40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组 PI3K 染色阴性。

3 讨论

CM 是成人常见的原发性眼内恶性肿瘤,占全身原发性恶性黑色素瘤 5%~6%^[10],肿瘤细胞主要来源于 CM 细胞,其特点是肿瘤恶性程度高,易于转移。一旦确诊肿瘤转移,预后极差^[1]。目前临床主要以手术治疗为主,辅以放疗及化疗,但疗效各异,迄今为止还没有一种理想的治疗方法。肿瘤的发生、发展及转移均依赖于血管提供必要的营养和氧气,肿瘤血管新生不仅能为肿瘤组织提供足够的营养和氧气,运走代谢废物,以利于肿瘤持续快速生长,而且为瘤细胞进入循环系统向远处转移提供了

途径^[11]。因此,如果能阻断或抑制肿瘤血管的新生,切断它的营养通路,肿瘤细胞最终将会停止增殖而死亡,达到治疗肿瘤的目的,这就是备受关注的抗肿瘤血管形成疗法^[12]。传统意义上的肿瘤血管形成是在宿主已有微血管床上由内皮细胞芽生而产生微血管的过程,但是研究结果发现,单纯以内皮依赖型细胞为靶点的抗肿瘤血管新生疗法对于一些高度恶性的肿瘤疗效欠佳。VM的发现为恶性肿瘤的防治提供了新的思路,为肿瘤治疗开辟了新的靶点。

抗VM肿瘤的研究目前较为明确的主要信号通路是EphA2与E-钙黏蛋白分子途径。研究表明,E-phA2与E-钙黏蛋白是调节VM形成的上游分子,二

者共同表达于细胞与细胞间的黏附点,这两种分子之间存在交互作用;而PI3K是EphA2信号转导的中枢分子,激活后可发挥调节多种细胞的功能,如召集多种细胞信号分子,诱导细胞的迁移、存活及管道形成等^[13]。PI3K是重要的VM调节因子,活化的PI3K催化二磷酸肌醇磷酸化从而发挥激活细胞信号转导的作用。PI3K通路可激活MMP-14和MMP-2,从而促进LN-5r2水解片段,促进VM的形成^[14]。因此,推测PI3K可以作为VM形成通路中信号转导的中枢分子。

姜黄素抗肿瘤作用机制广泛,其抗肿瘤血管形成的分子机制已得到证实,包括^[15-17]:(1)抑制血管

内皮细胞增殖并促进其凋亡;(2)抑制血管形成促进因子的表达,包括 VEGF、血管形成素-1 (Ang-1)、血管形成素-2 (Ang-2) 等,以及促进血管形成抑制因子——血小板抑制素的表达;(3)降低基质金属蛋白酶的活性;(4)通过磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 信号途径抑制肿瘤血管形成。同时,从本实验结果来看,在体外三维培养 OCM-1 细胞过程中,姜黄素呈浓度依赖性($10 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)抑制肿瘤 VM 形成,下调 PI3K、EphA2 蛋白的表达,姜黄素浓度至 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,几乎全部抑制。因此,从以上研究可以推断,姜黄素可以通过抑制 PI3K 信号通路同时抑制内皮依赖性血管和 VM 的形成,以达到抗肿瘤的作用。

总之,恶性肿瘤是造成人类死亡的主要疾病之一,寻找高效低毒的选择性抗癌药物是恶性肿瘤治疗的必然趋势。临床前试验证明,肿瘤是血管形成依赖性的,所以从抑制肿瘤的血管形成、切断肿瘤细胞的营养供应和转移途径等方面开展的抗肿瘤药物的研究和开发是近年来肿瘤治疗的新手段,也是目前国际上关注的热点。综上所述,CM 细胞株 OCM-1 三维培养研究均已证明,姜黄素可以起到癌化学预防作用和抗癌作用,有可能成为一种极有临床应用价值的肿瘤抑制剂,其机制可能是通过抑制 PI3K 信号通路同时抑制内皮依赖性血管和 VM 的形成发挥作用的。

参考文献

[1] BURR JM, MITRY E, RACHET B, COLEMAN MP. Survival from uveal melanoma in England and Wales 1986 to 2001 [J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2007, 14 (1) : 3-8.

[2] MANIOTIS AJ, FOLBERG R, HESS A, SEFTOR EA, GARDNER LM, PEER J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155 (5) : 739-752.

[3] SUN B, ZHANG S, ZHAO X, ZHANG W, HAO X. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25 (6) : 1609-1614.

[4] VASUDEV N, REYNOLDS A. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17 (3) : 471-494.

[5] 高文, 何彦津. 姜黄素对人脉络膜黑色素瘤细胞株 OCM-1 血管形成拟态形态学和病理改变的影响 [J]. 眼科新进展, 2017, 37

(1) : 27-29, 34.

GAO W, HE YJ. Effects of curcumin on pathological and morphological changes of vasculogenic mimicry in choroid melanoma cell line OCM-1 [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37 (1) : 27-29, 34.

[6] ZHOU X, WANG W, ZHENG Z, ZAHNG Y, YOU T. Curcumin enhances the effects of 5-Fluorouracil and oxaliplatin in inducing gastric cancer cell apoptosis both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Res*, 2016, 23 (1) : 29-34.

[7] 李妍, 杨维泓, 徐玉芬, 姚庆华. 姜黄素对 Lewis 肺癌小鼠 TGF- β 1 信号转导通路的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (1) : 138-140.

LI Y, YANG WH, XU YF, YAO QH. Effect of curcumin on the tgf- β 1 signaling pathway in mice with lewis lung carcinoma [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2013, 31 (1) : 138-140.

[8] PANABI Y, DARVISHI B, GHANEI M, JOWZI N, BEIRAQHDAR F, VARNAMKHAISTI BS. Molecular mechanisms of curcumins suppressing effects on tumorigenesis, angiogenesis and metastasis, focusing on NF- κ B pathway [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 28 (1) : 21-29.

[9] LI M, ZHANG Z, HILL DL. Curcumin, a dietary component, has anti-cancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (9) : 1988-1996.

[10] BEDIKIAN AY. Metastatic uveal melanoma therapy: current options [J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2006, 46 (1) : 151-166.

[11] MITTAL K, EBOS J, RINI B. Angiogenesis and tumor micro-environment: vascular endothelial growth factor and beyond [J]. *Semin Oncol*, 2014, 41 (2) : 235-251.

[12] FAKHREJAHANI E, TOI M. Antiangiogenesis therapy for breast cancer: an update and perspectives from clinical trials [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44 (3) : 197-207.

[13] PAULIS YW, SOETEKOUW PM, VERHEUL HM, TIAN-HEI-JNEN VC, GRIFFIOEN AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806 : 18-28.

[14] KIRSCHMANN DA, SEFTOR EA, HARDY KM, SEFTOR RE, HENDRIX MJ. Molecular pathways vasculogenic mimicry in tumor cells diagnostic and therapeutic implications [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (10) : 2726-2732.

[15] SYLVESTER J, LIACINI A, LI WQ, ZAFARULLAH M. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase 3-13 and agglicanase-1 genes in articular chondrocytes [J]. *Cell Signal*, 2004, 16 (4) : 469-476.

[16] GURURAJ AE, BELAKAVADI M, VENKATESH DA, MARME D, SALIMATH BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297 (4) : 934.

[17] 钱海云, 黄江平, 崔平和, 黄杰. β -catenin 对非小细胞肺癌细胞 A549 顺铂耐药作用及机制的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19 (21) : 1620-1624.

QIAN HY, HUANG JP, CUI FH, HUANG J. Role and mechanism of β -catenin-mediated resistance to cisplatin in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Chin J Cancer Prevent Treatment*, 2012, 19 (21) : 1620-1624.