

· 论 著 ·

羊栖菜多糖抑制人肺癌细胞 H1299 血管生成拟态的作用

陈慧玲, 龙香娥, 张玲, 万勇, 况炜

【摘要】目的 探讨羊栖菜多糖(SFPS)抑制人肺癌细胞 H1299 血管生成拟态(VM)的作用。**方法** 采用 CCK-8 方法检测不同浓度 SFPS(0、10、30、100、300 及 1 000 mg/L)作用的 H1299 细胞活性,应用三维细胞培养技术分析不同浓度 SFPS 对 H1299 细胞 VM 的影响,并通过实时荧光定量 PCR 法测定 H1299 细胞中血管内皮生长因子-A(VEGF-A)及胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)的 mRNA 表达水平。**结果** 与对照组(SFPS 浓度 0 mg/L)相比, SFPS 作用 48 h 后, H1299 细胞存活率下降最为明显, 30、100、300 及 1 000 mg/L 浓度组与对照组差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。随着 SFPS 处理浓度的增加, 30、100 及 300 mg/L 浓度组 VM 管道结构数量较对照组均明显减少(均 $P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。RT-PCR 结果显示, 不同浓度 SFPS 能够抑制 H1299 细胞中 VEGF-A 及 PI3K 的 mRNA 表达(均 $P < 0.05$)。**结论** SFPS 可降低人肺癌细胞 H1299 存活率, 并抑制 VM 形成, 这可能与下调 VEGF-A 与 PI3K 的表达有关。

【关键词】 羊栖菜多糖; 肺肿瘤; 癌; 血管生成拟态; 血管内皮生长因子; 胞内磷脂酰肌醇激酶

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.04.004

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)04-0346-04

The inhibitory effect of Sargassum fusiforme polysaccharides on vasculogenic mimicry in human lung cancer cell H1299

CHEN Huiling, LONG Xiang, ZHANG Ling, WAN Yong, KUANG Wei (Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315104, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of Sargassum fusiforme polysaccharides (SFPS) on vasculogenic mimicry (VM) in human lung cancer cell line H1299. **Methods** The cell line H1299 was treated with different concentrations of SFPS (0, 10, 30, 100, 300, 1 000 mg/L), and the cell viability was detected by cell count kit-8 (CCK-8). The effect of different concentrations of SFPS on VM in H1299 cells was analyzed by three dimensional cell culture technology. The mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in each group were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). **Results** Compared with the control group (SFPS 0 mg/L), the survival rate of H1299 cells decreased significantly after SFPS treatment (30, 100, 300, 1000 mg/L) for forty-eight hours (all $P < 0.05$), while the number of VM pipeline structures decreased significantly (all $P < 0.05$). The RT-PCR showed that different concentrations of SFPS could inhibit the mRNA expressions of VEGF-A and PI3K in H1299 lung cancer cells (all $P < 0.05$). **Conclusions** SFPS can reduce the survival rate of H1299 lung cancer cells and inhibit VM formation by downregulation of VEGF-A and PI3K expression.

【Key words】 Sargassum fusiforme polysaccharides; Lung neoplasm; Carcinoma; Vasculogenic mimicry; Vascular endothelial growth factor; Phosphatidylinositol 3-kinase

[Modern Practical Medicine, 2025, 37(4):346-349]

肿瘤的生长和转移需要足够的血液供应, 以往一直认为血管生成是肿瘤血供的唯一方式, 抗血管生成可阻断肿瘤的血供而抑制肿瘤生长, 也可切断肿瘤的血道转移途径。然而研究显示, 抗血管疗法并未使癌症患者存活率显著提高, 甚至可能促进血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的发展^[1]。VM 最

基金项目: 宁波市科技计划项目(2021S147); 浙江省教育厅一般科研项目(Y202250865)

作者单位: 315104 宁波, 宁波卫生职业技术学院

通信作者: 况炜, Email: kwei93@126.com

早发现于黑色素瘤细胞中^[2],与经典的血管生成不同,其不需要依赖血管内皮细胞,直接由高侵袭性肿瘤细胞通过自身变形而形成类似于血管的管道结构。VM 在乳腺癌、卵巢癌、肝癌、前列腺癌和胶质瘤等多种肿瘤中均有发现,在肺癌中也存在。具有较高 VM 的肿瘤患者通常预后较差,VM 在肿瘤进展中可刺激肿瘤细胞的侵袭、生长和转移^[3]。研究表明,提取自褐藻羊栖菜的多糖成分羊栖菜多糖(sargassum fusiforme polysaccharides, SFPS)对胃癌、直肠癌、乳腺癌及肺癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用^[4-6]。本研究以具有高侵袭性的人肺癌细胞株 H1299 为研究对象,来探讨 SFPS 对 H1299 细胞 VM 的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验材料 (1)细胞。人肺癌细胞株 H1299 购自镜像绮点(上海)细胞技术有限公司。(2)主要试剂。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购自上海达希尔生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购于新赛美生物科技有限公司;Matrigel matrix 基质胶购于厦门模基生物科技有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司。(3)药物。SFPS 由上海源叶生物科技有限公司提供,多糖含量 98.1%,SFPS 用 PBS 充分溶解配制成 20 mg/ml 的母液,过滤除菌,4℃保存。在实验前用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基将母液稀释至所需浓度。(4)主要仪器。CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司,酶联免疫检测仪购自美国 Bio-Rad 公司,显微镜购于日本 Olympus 公司,荧光定量 PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 RPMI 1640 培养基加入 10%胎牛血清,配置成完全培养基,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养人肺癌 H1299 细胞株,每 2~3 天传代,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8 方法检测细胞活性 将 H1299 细胞悬液浓度调整为 4×10⁴个/ml,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μl。待细胞贴壁后,加入不同浓度 SFPS (终浓度分别为 0、10、30、100、300 及 1 000 mg/L),每组 6 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下分别培养 24、48 及 72 h。以 1:10 的比例混合

CCK-8 试剂和无血清 RPMI 1640 培养基,弃去细胞培养板的原培养基,加入配好的 CCK-8 溶液,100 μl/每孔,在培养箱内继续孵育 1 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。计算细胞存活率,细胞存活率(%)=(加药组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.2.3 成管实验检测 VM 形成情况 将 Matrigel matrix 基质胶和无血清 RPMI 1640 培养基以 2:1 的比例稀释,取 96 孔细胞培养板加入稀释的基质胶,每孔 50 μl,置 37℃培养箱内烘干 1 h,形成凝胶。取对数生长期的 H1299 细胞,制备 5×10⁶个/ml 细胞悬液,以 50 μl/孔接种至 96 孔板内,实验组分别加入 0、30、100 及 300 mg/L 浓度的 SFPS,每组 3 个复孔,继续置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。48 h 后在倒置显微镜下观察 VM 形成情况,并拍照记录,计数管状结构数量。

1.2.4 RT-PCR 法检测血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)和胞内磷脂酰肌醇激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)表达 用 Trizol 试剂提取 0、30、100 及 300 mg/L 各浓度组 H1299 细胞的总 RNA,按照逆转录试剂盒说明合成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 检测,每个样本重复 3 次。反应条件为:94℃预变性 30s,94℃变性 5s,55℃退火 15s,72℃延伸 10s,共 45 个循环。mRNA 表达水平以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 2^{-ΔΔCt}法计算 VEGF-A、PI3K 的相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

1.3 统计方法 数据采用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料以均数±标准差表示,多组间比较采用 F 检验,多重比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 SFPS 组 H1299 细胞存活率比较 与

表 1 PCR 引物序列	
引物名称	序列(5'→3')
VEGF-A	F:TGCAGATTATGCGGATCAAACC
	R:TGCATTACATTGTGTGTGCTGTAG
PI3K	F:CGTTTCTGCTTTGGGACAAC
	R:CCTGATGATGGTCGTGGAG
GAPDH	F:AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC
	R:GGGGTCATTGATGGCAACAATA

注:VEGF-A 为血管内皮生长因子-A,PI3K 为胞内磷脂酰肌醇激酶,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

对照组(SFPS 浓度为 0 mg/L)相比,SFPS 作用 48 h 后,H1299 细胞存活率下降最为明显,30、100、300 及 1 000 mg/L 浓度组与对照组差异均有统计学意义($t \geq 3.00$,均 $P < 0.05$),呈浓度依赖性下降.SFPS 作用 24 h 时,各浓度组与对照组 H1299 细胞存活率差异无统计学意义($F=1.06$, $P > 0.05$);SFPS 作用 72 h 后,仅 1 000 mg/L 浓度组 H1299 细胞存活率低于对照组($t=5.71$, $P < 0.05$),见封三图 1。

2.2 不同浓度 SFPS 对 H1299 细胞管道结构数目的影响 对照组中 H1299 细胞之间相互连接形成类血管网状结构,而 30、100 及 300 mg/L 浓度组 SFPS 处理后,H1299 细胞形成的管道结构较对照组明显减少($t \geq 2.15$,均 $P < 0.05$),并呈剂量依赖性,见表 2 及封三图 2。

2.3 VEGF-A 和 PI3K 的 mRNA 表达 与对照组比较,不同浓度 SFPS 组作用 48 h 后,VEGF-A 和 PI3K 在 H1299 细胞中的 mRNA 表达水平均有明显下降($t \geq 5.97$,均 $P < 0.05$),其中 300 mg/L 浓度 SFPS 组最为显著,见图 1。

3 讨论

肺癌的治疗除常规的手术、放化疗之外,应用分子靶向药物抑制肿瘤血液供应的治疗方法逐渐成为研究热点^[7]。然而传统的抗肿瘤血管生成疗法是针对血管内皮细胞依赖的血管生成,而 VM 则是由肿瘤细胞直接形成的管道结构,VM 形成可能是导致抗血管生成疗法未能达到预期疗效的关键因素^[8]。研究表明,VM 促进肿瘤生长,其与宿主血管的直接沟通可导致肿瘤细胞的转移并通过血液扩散到其他器官,最终导致预后不良^[9-10]。因此,寻找一种既能抑制血管生成又能抑制 VM 的药物,成为抑制肿瘤血供的新策略。

羊栖菜在我国沿海分布广泛,尤其盛产于浙江沿海^[11],在浙南地区已实现大面积养殖。羊栖菜水提物中的有效成分主要是 SFPS,其抗癌效应得到了

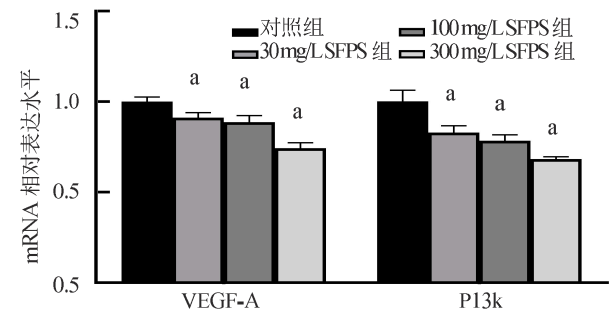
表 2 不同浓度 SFPS 组 H1299 细胞管道结构数目($n=6$)

组别	管道结构数目(个)
对照组	31.2±4.17
30 mg/L SFPS 组	24.6±3.44
100 mg/L SFPS 组	20.2±2.48
300 mg/L SFPS 组	15.2±2.71
F 值	18.85
P 值	< 0.05

普遍关注。体内外实验结果表明,SFPS 不仅能抑制 A549 肺癌细胞移植瘤小鼠的肿瘤生长,而且对人胃癌细胞 SGC-7901、直肠癌细胞 CoLo-205、乳腺癌细胞 MCF-7 及肺癌细胞 A549 等的增殖活性均具有抑制作用^[4-6]。本课题组前期的研究结果显示,SFPS 对人肺癌细胞 SPC-A-1 的增殖及其移植瘤小鼠的肿瘤生长具有抑制作用^[12]。本实验以高侵袭性肺癌细胞 H1299 为对象,发现 30、100、300 及 1 000 mg/L 的 SFPS 处理 48 h 后作用最为显著,肺癌细胞增殖受到抑制,提示 SFPS 可抑制 H1299 细胞生长,与前述实验结论相一致。由此确定 48 h 作为后续给药时间,同时由于 1 000 mg/L 浓度过高。

本研究结果显示,H1299 确实能在基质胶中形成类血管的管道结构,与 Xia 等^[13]的研究结论相一致。与对照组相比,30、100 及 300 mg/L SFPS 处理后的 H1299 肺癌细胞管道结构形成的数量明显减少,并呈剂量依赖性。由此说明,SFPS 可降低肺癌细胞 H1299 的体外 VM 管道形成能力。与内皮细胞依赖的肿瘤血管新生不同,VM 是高侵袭性肿瘤细胞通过自身变形、相互连接而形成的类血管样管道,以满足肿瘤快速生长的需要。此外,VM 直接由肿瘤细胞构成,肿瘤细胞与血流之间缺乏血管内皮屏障,故而肿瘤细胞更容易进入血液,有利于肿瘤的侵袭和转移。临床研究证实,具有 VM 的肺癌组织分化程度低、更易发生转移,患者的预后较差^[14]。本研究结果提示,SFPS 可能通过抑制 H1299 细胞 VM 形成的恶性行为而改善患者生存。

VEGF 不仅是肿瘤血管生成的主要调控因子,也是 VM 形成的关键因子,在管状结构形成中起重要作用。VEGF 家族主要包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及胎盘生长因子等亚型,其中



注:与对照组比较,a $P < 0.05$;VEGF-A 为血管内皮生长因子-A,PI3K 为胞内磷脂酰肌醇激酶

图 1 不同浓度 SFPS 组 H1299 细胞中 VEGF-A 和 PI3K 的 mRNA 表达水平

VEGF-A 在管道形成中发挥重要作用。据报道, VEGF-A 以二聚体形式分泌, 通过与其受体 VEGFR-1 的结合, 诱导 VM 形成^[15]。体外细胞实验表明, 通过三维培养可出现 VM 的人肺腺癌细胞株 A549 中, VEGF 表达较不出现 VM 结构的细胞株高^[16]。非小细胞肺癌的临床研究显示, 随着肺癌组织中 VEGF 表达率升高, VM 阳性率相应升高, 两者呈正相关^[14]。笔者前期研究发现, SFPS 可下调人肺癌细胞 SPC-A-1 中的 VEGF-A 表达。本次实验对 H1299 肺癌细胞的 VEGF-A 的 mRNA 表达进行测定, 也证实了 SFPS 可抑制肺癌细胞 VEGF-A 表达, 说明 SFPS 的抗肿瘤 VM 作用可能与下调 VEGF-A 表达密切相关。

PI3K 是一类脂质激酶, 由催化亚基 P110 和调节亚基 P85 组成, 是肿瘤 VM 形成中不可或缺的枢纽信号分子。已有研究证明, VEGF 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路诱导肿瘤 VM 形成^[17]。VEGF 通过与 VEGFR 的结合, 可刺激 PI3K 活化, 进而激活下游的效应分子 Akt, 引起 MMP-2、MMP-9 合成、细胞外基质重塑, 从而促进 VM 管道的形成。采用特异性抑制剂抑制 PI3K/Akt 通路活化后, 肺癌 A549 细胞的侵袭性以及 MMP-2 和 MMP-9 表达则随之减少, 同时肺癌细胞 VM 形成受到抑制^[18]。本实验结果表明, SFPS 作用后, PI3K 在 H1299 肺癌细胞中的 mRNA 表达水平明显下降, 此作用与 VEGF-A 的下调相一致。可见, SFPS 抑制 VM 的作用与 VEGF 与 PI3K 的表达抑制存在一定关系, 笔者后续将对 SFPS 在相关信号通路的作用靶点进行深入研究和分析。

综上所述, SFPS 可抑制人肺癌细胞 H1299 的增殖及 VM 形成, 此作用与下调 VEGF-A、PI3K 基因表达密切相关。笔者前期研究表明, SFPS 可以通过 VEGF 信号途径抑制肺癌细胞诱导的肿瘤血管生成^[12], 由此可见, SFPS 可能在肺癌血管生成及 VM 形成方面均有抑制作用, 这为海藻多糖的药用价值开发提供了一定的实验依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈慧玲、龙香娥、张玲、万勇: 实验操作、论文撰写; 陈慧玲: 数据整理、统计学分析; 况炜: 研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] MCLEMORE M R. The role of the data safety monitoring board: Why was the Avastin phase III clinical trial stopped[J]. Clin J Oncol Nurs, 2006, 10(2): 153-154.
- [2] MANIOTIS A J, FOLBERG R, HESS A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry[J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 739-752.
- [3] WECHMAN S L, EMDAD L, SARKAR D, et al. Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models[J]. Adv Cancer Res, 2020, 148: 27-67.
- [4] 季宇彬, 高世勇. 羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制的研究[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1111-1114.
- [5] 王建光, 杨新宇. 羊栖菜多糖诱导 MCF-7 细胞凋亡机制的研究[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(5): 567-569.
- [6] CHEN X M, NIE W J, YU G Q, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(3/4): 695-700.
- [7] GE W, CAO D D, WANG H M, et al. Endostar combined with chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced NSCLCs: A meta-analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(10): 2705-2711.
- [8] LI W J, WU J T, JIA Q H, et al. PD-L1 knockdown suppresses vasculogenic mimicry of non-small cell lung cancer by modulating ZEB1-triggered EMT[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 633.
- [9] KIRSCHMANN D A, SEFTOR E A, HARDY K M, et al. Molecular pathways: Vasculogenic mimicry in tumor cells: Diagnostic and therapeutic implications[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10): 2726-2732.
- [10] 王羽飞, 马莉, 李楠, 等. 血管生成拟态、Crip1 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(9): 1434-1438.
- [11] 张建琳, 包炎琳, 孙彬, 等. 下三横山岛潮间带大型海藻群落构成及季节变化[J]. 应用海洋学学报, 2023, 42(2): 225-234.
- [12] CHEN H L, ZHANG L, LONG X G, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharides inhibit VEGF-A-related angiogenesis and proliferation of lung cancer in vitro and in vivo[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 22-27.
- [13] XIA Y, CAI X Y, FAN J Q, et al. The role of sema4D in vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms[J]. Int J Cancer, 2019, 144(9): 2227-2238.
- [14] 承泽农, 武世伍, 俞岚, 等. 非小细胞肺癌中血管生成拟态和 VEGF 的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20(4): 343-348.
- [15] FRANK N Y, SCHATTON T, KIM S, et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1474-1485.
- [16] 朱芳, 李振宇, 任精华, 等. VEGF 与肿瘤血管生成拟态关系的研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(1): 20-24.
- [17] XU X Y, ZONG Y, GAO Y X, et al. VEGF induce vasculogenic mimicry of choroidal melanoma through the PI3k signal pathway[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3909102.
- [18] 李荣宾, 黄延延, 林贤宾, 等. IGF1R/PI3K/Akt 通路及其调控对非小细胞肺癌血管生成拟态形成影响的研究[J]. 福建医药杂志, 2023, 45(3): 112-115.

收稿日期: 2024-11-18

(本文编辑: 钟美春)

[1] MCLEMORE M R. The role of the data safety monitoring board: Why was the Avastin phase III clinical trial stopped[J]. Clin J Oncol