

网络出版时间:2024-12-05 14:00:01 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.011

肝癌细胞通过 eNAMPT-INSR 轴促进人脐静脉内皮细胞血管生成

吴俊杰¹,李世州²,高成明²,曹鹏博²,周钢桥^{1,2}⁽¹⁾ 安徽医科大学生命科学院,合肥 230032;⁽²⁾ 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院,北京 100850)

摘要 目的 探究肝癌细胞分泌的胞外烟酰胺磷酸核糖基转移酶(eNAMPT)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成的影响及潜在机制。方法 通过低氧刺激肝癌细胞分泌 eNAMPT,并通过血管生成实验探究 eNAMPT 对 HUVEC 血管形成的影响;利用 eNAMPT 刺激后的 HUVEC 转录组测序探究 eNAMPT-胰岛素受体(INSR)轴影响 HUVEC 血管生成的分子机制;通过 Western blot 检测 eNAMPT-INSR 轴影响 HUVEC 胞内相关节点分子的蛋白表达变化;通过 qRT-PCR 检测 eNAMPT-INSR 轴影响 HUVEC 胞内相关靶基因的表达变化。结果 ELISA 和 Western blot 结果显示低氧刺激后肝癌细胞培养上清中 eNAMPT 蛋白水平显著升高,体外血管生成实验结果显示 eNAMPT 显著增加 HUVEC 的血管生成结节数与总长度;HUVEC 的转录组测序结果显示 eNAMPT 能够作为胰岛素类似物参与调控 HUVEC 的细胞迁移、血管生成等生物学过程并可能通过激活类胰岛素相关信号通路促进血管生成;Western blot 结果显示 eNAMPT-INSR 轴影响 HUVEC 内 PI3K-AKT 和 MAPK-ERK1/2 信号通路中 p-AKT、p-ERK1/2 的蛋白水平变化;qRT-PCR 结果显示 eNAMPT-INSR 轴影响 HUVEC 内血管生成相关靶基因 *MMP2*、*MMP9*、*VEGF* 的表达变化。结论 肝癌细胞分泌的 eNAMPT 通过与 INSR 结合激活 PI3K-AKT 和 MAPK-ERK1/2 信号通路促进血管生成。

关键词 肝癌;烟酰胺磷酸核糖基转移酶;胰岛素受体;血管生成

中图分类号 Q 257

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2141-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.011

烟酰胺磷酸核糖基转移酶(nicotinamide phos-

phoribosyl transferase, NAMPT)是一种磷酸核糖基转移酶,分为细胞内 NAMPT(intracellular Nicotinamide phosphoribosyl transferase, iNAMPT)和细胞外 NAMPT(extracellular Nicotinamide phosphoribosyl transferase, eNAMPT)两种形式^[1-2]。iNAMPT 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucle-

2024-09-15 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82172707)

作者简介:吴俊杰,男,硕士研究生;

周钢桥,男,博士,研究员,通信作者, E-mail: zhougq114@126.com

domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome, microglia, and myelin in rats with post-traumatic stress disorder (PTSD). **Methods** A PTSD rat model was established using the single prolonged stress (SPS) paradigm. Anxiety and cognitive functions were evaluated through the open field test, elevated plus maze, and Morris water maze. Histopathological changes in hippocampal neurons were assessed using hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression levels of NLRP3 and iba-1 (a microglial marker) in the hippocampus were examined using immunofluorescence staining. Immunohistochemical staining and Luxol Fast Blue staining were performed to investigate alterations in hippocampal myelin. **Results** Hippocampal neurons in PTSD rats exhibited damage, with increased activation of the NLRP3 inflammasome and microglia, and elevated myelin content. **Conclusion** The pathogenesis of PTSD may be associated with hippocampal neuronal damage, inflammatory responses, and changes in myelin.

Key words post-traumatic stress disorder; hippocampus; NLRP3; myelin; neurons; microglia

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 32260208)

Corresponding author Zhang GuiQing, E-mail: firstli@126.com

otide, NAD)合成的限速酶,参与能量代谢、细胞存活以及死亡等重要生物学事件^[3]。除了以酶的形式在胞内发挥作用外,胞外形式的 eNAMPT 被发现与许多疾病进展有关。多项临床研究^[4-5]表明,在前列腺癌和乳腺癌患者血液中 eNAMPT 水平越高,肿瘤恶性程度越高。另外,体内实验^[6]表明, eNAMPT 在肺血管重塑中发挥重要作用。然而,关于 eNAMPT 促进血管生成的研究却很少被报道。

肝脏是 eNAMPT 的主要分泌器官,但 eNAMPT 在肝癌发生发展中的功能和作用机制知之甚少。因此该研究旨在探索肝癌细胞分泌来源的 eNAMPT 对血管生成的影响,并初步揭示其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人脐静脉内皮细胞 HUVEC,人肝癌细胞 HepG2、JHH-7、Huh-7、MHCC-LM3 和 SUN-475 均保存于课题组实验室细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(货号:M1805)、0.25% 胰蛋白酶(货号:VCM3012)、青-链霉素(货号:15140122)购自北京细工生物科技公司;胎牛血清(货号:SPC500V)购自澳洲 AusgeneX 公司;D-葡萄糖(货号:G8150)、L-谷氨酰胺(货号:G0200)购自北京索莱宝科技有限公司;NAMPT 抗体(1:1 000,货号:11776-1-AP)和 INSR 抗体(1:2 000,货号:20433-1-AP)抗体购自美国 Proteintech 公司;p-INSR(1:500,货号:3023S)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB 或 AKT)(1:1 000,货号:4691S)、磷酸化蛋白激酶 B (phospho-AKT, p-AKT)抗体(1:1 000,货号:4060S)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)抗体(1:1 000,货号:4696S)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (phospho-extracellular regulated protein kinases 1/2, p-ERK1/2)抗体(1:1 000,货号:5726S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体(1:1 000,货号:ABL1020)购自武汉亚科因生物技术有限公司;细胞/组织 RNA 抽提试剂盒(货号:CW0599S)、RIPA 细胞裂解液(货号:CW2333S)、兔源二抗(1:2 000,货号:CW0103)和鼠源二抗(1:2 000,货号:CW0102)均购自江苏康为世纪生物技术有限公司;外源性 eNAMPT 蛋白(货号:P43490)购自美国 RayBiotech 公司;anti-NAMPT 中和性抗体(货号:ab240589)购自英国 Abcam 公司;胰岛素受体(insulin receptor, INSR)抑制

剂(货号:BMS-754807)购自美国 Selleck 公司;siRNA 转染试剂盒(货号:R10035.7)购自广州锐博生物科技有限公司;基质胶(货号:354230)购自美国 Corning 公司;逆转录试剂盒(货号:00005103-140603)购自武汉莫纳生物科技有限公司;人内脂素/内脏脂肪素(Visfatin)酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号:CSB-E08940)购自武汉华美生物工程有限公司;KAPA SYBR FAST qPCR 试剂盒(货号:0000138674)购自美国 KAPA Biosystems 公司。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 恒温培养箱(型号:Forma™ 3111)、三气恒温培养箱(型号:Forma™ 3131)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:QuantStudio™ 3)购自美国 Applied Biosystems 公司;酶标仪(型号:Spark)购自瑞士 TECAN 公司;光学显微镜(型号:ECLIPSE Ti2)购自日本 Nikon 公司;全自动化学发光图像分析系统(型号:Tanon 5200)购自上海 Tanon 公司;SDS-PAGE 电泳仪(型号:1658004)、电转仪(型号:M1703930)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞 HUVEC,人肝癌细胞 HepG2、JHH-7、Huh-7、MHCC-LM3 和 SNU-475 使用 DMEM 培养基进行培养,培养基中含有 10% 胎牛血清及青-链霉素(100 μg/ml)双抗,所有细胞均置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,并保持一定的湿度。

1.2.2 低氧处理 将人肝癌细胞按照 10⁵ 个/孔接种于 24 孔板中并在含有 10% 血清、11 mmol/L 的 D-葡萄糖、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基中进行培养,置于 37 °C、3% O₂ 的气氛中培养 24 ~ 72 h,收集细胞培养上清液用于 Western blot 和 ELISA 检测上清中 eNAMPT 含量。

1.2.3 siRNA 转染 采用 siRNA 转染试剂盒进行 siRNA 转染。将 siRNA 和转染试剂共同孵育 15 min 后,滴加至目的细胞培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 的气氛中培养 48 h 后用于后续实验。靶向 INSR 的 siRNA 由锐博生物科技有限公司合成,siRNA 序列见表 1。

1.2.4 细胞分组及药物处理 将预转染 siINSR 以及对照组(siNC)的 HUVEC 细胞按照 10⁵ 个/孔接种于 24 孔板中并在含有 10% 血清的 DMEM 培养基中进行培养,待细胞完全贴壁后,更换为不含血清、双抗的培养基,对照组添加等体积药物的 PBS,实验

表1 siRNA 序列
Tab.1 siRNA sequence

| Gene name | siRNA sequence(5'-3') |
|-----------|-----------------------|
| siNC | TTCTCCGAACGTGTCACGT |
| siINSR | TGCTTCACAGAAGACCATGC |

组分别添加外源性 eNAMPT 蛋白 (100 ng/ml) 组、anti-NAMPT 中和性抗体 (10 μ mol/ml) 组、INSR 抑制剂 BMS-754807 (10 μ mol/ml) 组处理细胞,20 min 后收集细胞总蛋白用于 Western blot 检测相关蛋白的表达情况。

1.2.5 细胞总蛋白提取及 Western blot 实验 收集等量目的细胞并向沉淀中加入 RIPA 细胞裂解液,震荡混匀后置于冰上裂解 30 min,12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液并加入 2 \times 蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用;上清液中的蛋白是通过收集等量的细胞培养上清液并 3 000 r/min 离心 10 min,取离心后的上清液并加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,置于冰上孵育 15 min,煮沸 10 min,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。根据目的蛋白分子量配置合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶,依次进行上样、电泳、转膜、5% 脱脂乳封闭 1 h、一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育、二抗室温孵育 1 h,最后在凝胶成像仪中进行显影。

1.2.6 ELISA 实验 分别向人内脂素/内脏脂肪素酶联免疫吸附试剂盒提供的酶标板相应孔中加入待测样本及标准品各 100 μ l,每组设置 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;弃去液体,然后向每孔中加入生物素标记抗体 100 μ l,用封板膜封板后,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;小心揭开封板膜,弃废液,用洗涤液洗涤每孔 3 遍,每次浸泡 2 min;向每孔中加入试剂盒提供的辣根过氧化物酶标记 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。洗板 5 次后向每孔加显色剂 90 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15~30 min 后每孔加入终止液 50 μ l,5 min 内使用酶标仪在 450 nm 波长处测定结果并分析。

1.2.7 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 实验 收集各组细胞,按照说明书使用细胞 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,测定浓度并逆转录为 cDNA。根据 KAPA SYBR FAST qPCR 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 体系配置。将反应体系在 96 孔板中充分混匀,置于 qPCR 仪上进行反应,每组设置 3 个复孔,以 GAPDH 为内参进行定量分析。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 对 mRNA 的定量结果进行归一化处理。所有 qRT-PCR 实验均进行熔解曲线分析,以排除非特异性扩增。引物序列见表 2。

1.2.8 转录组测序及通路富集分析 提取 eNAM-

表2 qRT-PCR 的引物序列
Tab.2 Primer sequence of qRT-PCR

| Gene name | Primer sequence(5'-3') |
|-----------|--|
| NAMPT | F:GCAGAAGCCGAGTTC AACATC R: TGCTTGTGTTGGGTG GATATTG |
| MMP2 | F:CTTTCAGGGAATGAATACTGGA R: GACGGCATCCAGGTTATCCG |
| MMP9 | F:TCCGCTACCACCTCGAACTT R: GATGCCATTGACGTCGTCCT |
| VEGF | F:CGGCGAAGAGAAGAGACACA R: GGAGGAAGGTCAACCACTCA |
| GAPDH | F:CGGAGTCAACGGATTGTTGTCGT R: TCTCAGCCTTGACGGTGCCA |

PT 蛋白刺激及对照组的 HUVEC 中的总 RNA,由北京贝瑞和康生物技术有限公司在 Illumina HiSeq X Ten 平台上采用 150 bp 的双端配对策略进行转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq)。随后,采用 Fastp (v 0.23.4) 软件对测序数据进行质量评价,并去除低质量的数据和接头序列。以 *Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38/hg38)* 基因组序列为参考,采用 HISAT2 (v 2.2.1) 对通过质量评估的测序数据进行序列比对,使用 FeatureCounts (v 2.0.6) 对基因表达进行定量分析和计算基因数量值,并计算每百万次映射读取的外显子每千碱基的片段数 (fragments per kilobase of exon per million mapped reads, FPKM) 值。进一步利用 R 语言软件包中的 DESeq2 (v 1.38.3) 进行基因差异表达分析,采用 Benjamin-Hochberg (BH) 方法对其进行多重检验校正,将添加 eNAMPT 蛋白处理与否的 HUVEC 细胞中的 \log_2 (fold change) > 0.3 及 $P < 0.05$ 的基因定义为差异表达的基因。使用在线网站 Metascape (<https://metascape.org/>) 对差异表达基因进行功能富集分析。最后,基因组富集分析 (Gene set enrichment analysis, GSEA) 使用软件 GSEA (v 4.3.2) 以配对组 (eNAMPT 蛋白刺激组与对照组) 为基础,按信噪比对基因进行排序。然后通过加权 Kolmogorov-Smirnov 检验从 MsigDB 中确定显著富集的基因集。显著性错误发现率 (false discovery rate, FDR) 以基因集被置换 1 000 次进行计算。

1.2.9 体外血管生成实验 提前将基质胶在 4 $^{\circ}$ C 解冻,用预冷的枪头吸取 150 μ l 融解的基质胶铺于 48 孔板中,避免产生气泡,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,将 5×10^4 个 HUVEC 重悬于 200 μ l 不含酚红的培养基中并铺于基质胶上,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的条件下培养 8~10 h,用显微镜拍摄 HUVEC 在 3 个随机视野中的

血管网络,利用 ImageJ (v 1.8.0.112) 分析软件统计血管分支结节数和分支总长度。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析与绘图,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用独立样本 Student's *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 iNAMPT 和 eNAMPT 在多种肝癌细胞中均有表达 为探究 NAMPT 与肝癌进展间的关系,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 iNAMPT 在肝癌细胞中的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示,iNAMPT 在各肝癌细胞内(HepG2、JHH-7、Huh-7、MHCC-LM3 和 SUN-475) 均有表达,且各细胞间 iNAMPT 的 mRNA 水平($F = 27.87, P < 0.001$) (见图 1A) 和蛋白水平($F = 418.4, P < 0.001$) (见图 1B) 均存在差异。其中 iNAMPT 在 HepG2 细胞中表达量最低,在 SNU-475 细胞中表达量最高。

为进一步确定各肝癌细胞能否向胞外分泌 eNAMPT,以及 iNAMPT 表达水平与 eNAMPT 分泌水平间的相关性,收集低氧处理 48 h 后的各肝癌细胞培养上清液以及胞内蛋白并检测其中的 NAMPT 蛋白水平。结果显示,低氧处理 48 h 后,ELISA($F = 103.1, P < 0.001$) (图 2A) 和 Western blot($F_{iNAMPT} = 4787.0, F_{eNAMPT} = 217.7, 均 P < 0.001$) (图 2B) 均能检测到各肝癌细胞培养上清中 eNAMPT 和胞内 iNAMPT 的表达,并且胞外 eNAMPT 的分泌水平与胞内 iNAMPT 表达水平呈正相关($r = 0.985, P < 0.01$) (图 2D)。同时 Western blot 检测结果显示,随着低

氧处理时间的增加,培养上清中 eNAMPT 的水平也随之升高(图 2C)。

2.2 肝癌细胞来源的 eNAMPT 促进 HUVEC 的血管生成能力 血管生成在肿瘤的进展和转移中至关重要,体外血管生成实验结果显示,与对照组相比,外源性 eNAMPT 蛋白(100 ng/ml) 刺激后的 HUVEC 细胞的成管结节数($t = 10.69, P < 0.001$) 与管长度($t = 3.03, P < 0.05$) 均增多(见图 3A、3B)。为进一步验证肝癌细胞来源的 eNAMPT 对 HUVEC 细胞成管的影响,收集低氧处理 72 h 后的 HepG2 和 SUN-475 细胞培养上清液,与 HUVEC 细胞共培养进行血管生成实验。结果显示,与空白对照组(Mock) 相比,肝癌细胞培养上清液处理的 HUVEC 细胞成管结节数($t = 3.83、7.02, 均 P < 0.05$) 与管长度($t = 3.66、4.76, 均 P < 0.05$) 均增多(见图 3C、3D);对于分泌水平较低的 HepG2 细胞,eNAMPT 分泌水平较高的 SNU-475 细胞培养上清液促进 HUVEC 的管结节数($t = 4.51, P < 0.05$) 与管长度($t = 3.02, P < 0.05$) 形成能力更强。

2.3 eNAMPT 参与调控细胞迁移、血管生成等信号通路 差异表达基因的鉴定和功能富集分析结果显示,与对照组相比,eNAMPT 处理后 HUVEC 中有 63 个基因显著上调,72 个基因显著下调(图 4A)。对这些基因进行功能富集分析,结果显示上调的差异表达基因富集于细胞迁移、血管生成、生长调节等相关生物学过程和通路;下调的差异表达基因富集于有机磷生物合成等过程(图 4B)。除此之外,基于整个基因表达谱的 GSEA 分析结果也一致地显示,血管生成、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路和类胰岛素相关通路

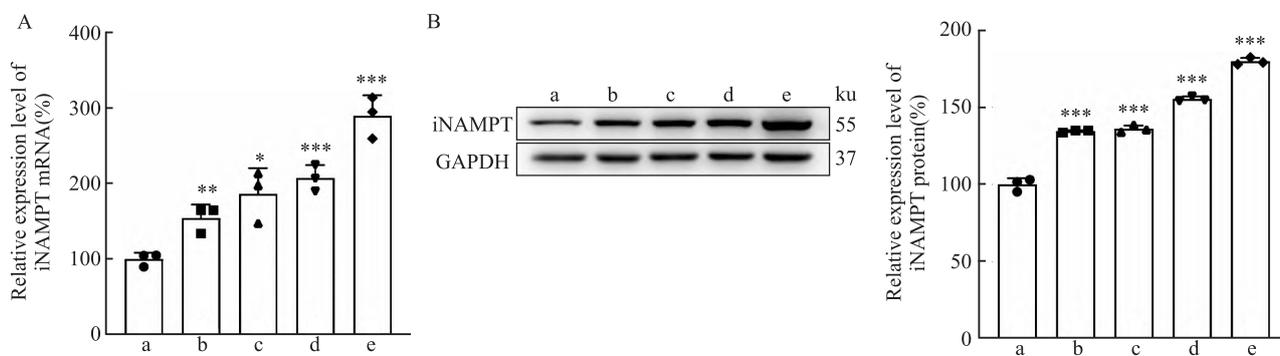


图 1 iNAMPT 在各肝癌细胞中的 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 mRNA and protein expression levels of iNAMPT in hepatocellular carcinoma cells

A: The mRNA level of iNAMPT in hepatocellular carcinoma cells detected by qRT-PCR; B: The protein expression level of iNAMPT in hepatocellular carcinoma cells detected by Western blot and the statistical histogram of gray value; a: HepG2; b: JHH-7; c: Huh-7; d: MHCC-LM3; e: SNU-475; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs HepG2.

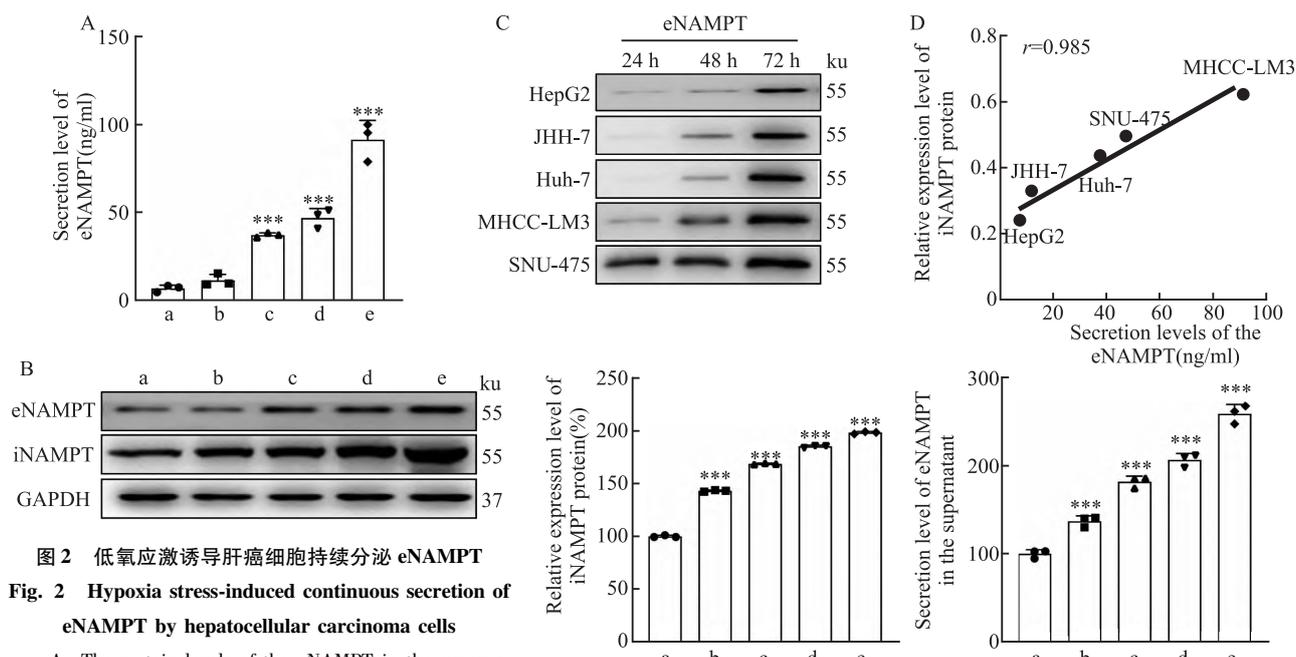


图2 低氧应激诱导肝癌细胞持续分泌 eNAMPT
Fig. 2 Hypoxia stress-induced continuous secretion of eNAMPT by hepatocellular carcinoma cells

A: The protein levels of the eNAMPT in the supernatant of hepatocellular carcinoma cells after 48 h hypoxia treatment detected by ELISA; B: The statistical histograms of protein levels and gray values of iNAMPT inside hepatocellular carcinoma cells and eNAMPT in the culture supernatant of hepatocellular carcinoma cells after 48 h of hypoxia treatment detected by Western blot; C: Western blot analysis result of the protein levels of eNAMPT in the supernatant of hepatocellular carcinoma cells cultured at different time points (24, 48, 72 h) after hypoxia treatment; D: Correlation analysis between the secretion level of eNAMPT in liver cancer cell culture supernatant and the relative expression level of intracellular iNAMPT protein gray level; a: HepG2; b: JHH-7; c: Huh-7; d: MHCC-LM3; e: SNU-475; *** $P < 0.001$ vs HepG2.

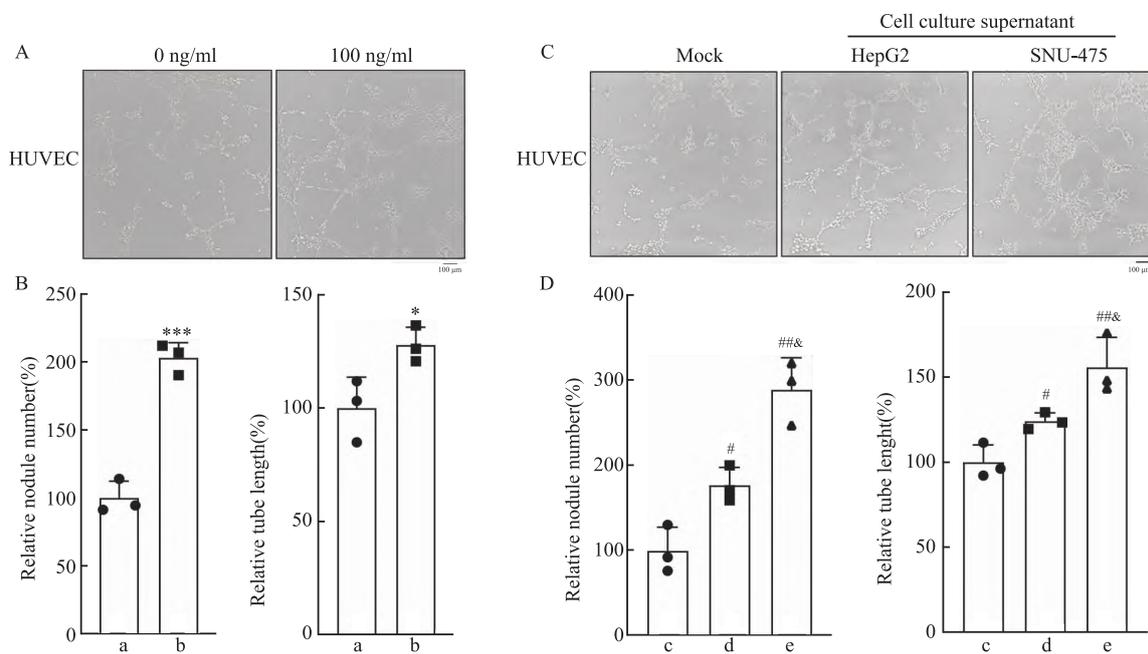


图3 肝癌细胞来源的 eNAMPT 促进 HUVEC 体外血管形成

Fig. 3 eNAMPT derived from liver cancer cells promoted *in vitro* vascularization of HUVEC

A: Representative visual showed the promotion of tube formation *in vitro* of HUVEC by eNAMPT protein (0 ng/ml, 100 ng/ml) $\times 100$; B: Statistical histogram of the number of nodules formed by HUVEC tubes and the total length of tubes; C: Representative visual diagram $\times 100$ showed the promotion of HUVEC angiogenesis *in vitro* by hepatocellular carcinoma cell culture supernatant (HepG2, SNU-475) after 72 h hypoxia treatment; D: Statistical histogram of the number of nodules formed by HUVEC tubes and the total length of vessels; a: 0 ng/ml; b: 100 ng/ml; c: Mock; d: HepG2 cell culture supernatant; e: SNU-475 cell culture supernatant; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 0 ng/ml; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Mock; & $P < 0.05$ vs HepG2 cell culture supernatant.

在 eNAMPT 处理的 HUVEC 中富集(见图 4C-4E)。这些结果提示 eNAMPT 促进血管生成可能通过激活类胰岛素相关信号通路。

2.4 eNAMPT 通过激活 INSR 信号通路促进 HUVEC 的血管形成 上述的表达谱数据分析显示, eNAMPT 可能通过类胰岛素相关通路参与调控 HUVEC 细胞的迁移和血管生成。为验证 eNAMPT 对 HUVEC 细胞 INSR 通路的影响,利用 Western blot 检测 INSR 及下游节点分子的表达及活性水平变化。结果显示,与对照组相比, HepG2 细胞来源的 eNAMPT 处理虽然不影响 HUVEC 细胞中 INSR、AKT 和 ERK1/2 的蛋白整体水平,但是促进 INSR、AKT 和 ERK1/2 的磷酸化水平(p-INSR、p-AKT 和 p-ERK1/2)(见图 5A,1~2 电泳道);而此种效应在中性和抗体 anti-NAMPT 处理后得到了消除(见图 5A,第 3 电泳道)。为进一步验证 eNAMPT 介导的 HUVEC 细胞中下游通路变化是否依赖于 INSR,采用 INSR 抑制剂 BMS-754807(见图 5A,第 4 泳道)或

靶向 INSR 的 siRNA(见图 5A,第 5 泳道)处理 HUVEC。结果显示,两种处理均可以抑制 INSR 的磷酸化水平,从而导致其下游 AKT 和 ERK1/2 的磷酸化水平下降。

体外血管生成实验显示,使用 anti-NAMPT 中性和抗体($t_{\text{结节数}} = 18.19, t_{\text{管长度}} = 10.81, \text{均 } P < 0.001$)能够减弱肝癌细胞来源的 eNAMPT 对 HUVEC 血管形成能力的促进作用;同样地, INSR 抑制剂($t_{\text{结节数}} = 30.75, t_{\text{管长度}} = 20.46, \text{均 } P < 0.001$)或敲低 INSR($t_{\text{结节数}} = 40.46, t_{\text{管长度}} = 32.18, \text{均 } P < 0.001$)均能消除肝癌细胞来源的 eNAMPT 对 HUVEC 血管形成能力的促进作用(图 5B,5C)

2.5 eNAMPT 促进 HUVEC 细胞中 MMP2、MMP9 和 VEGF 的表达 前期表达谱数据以及 Western blot 实验证明 eNAMPT 通过发挥类胰岛素的作用与 INSR 结合,激活下游 PI3K-AKT 和 MAPK-ERK1/2 的级联反应。因此,利用 qRT-PCR 进一步检测 eNAMPT 对下游相关靶基因表达水平的影响。结果

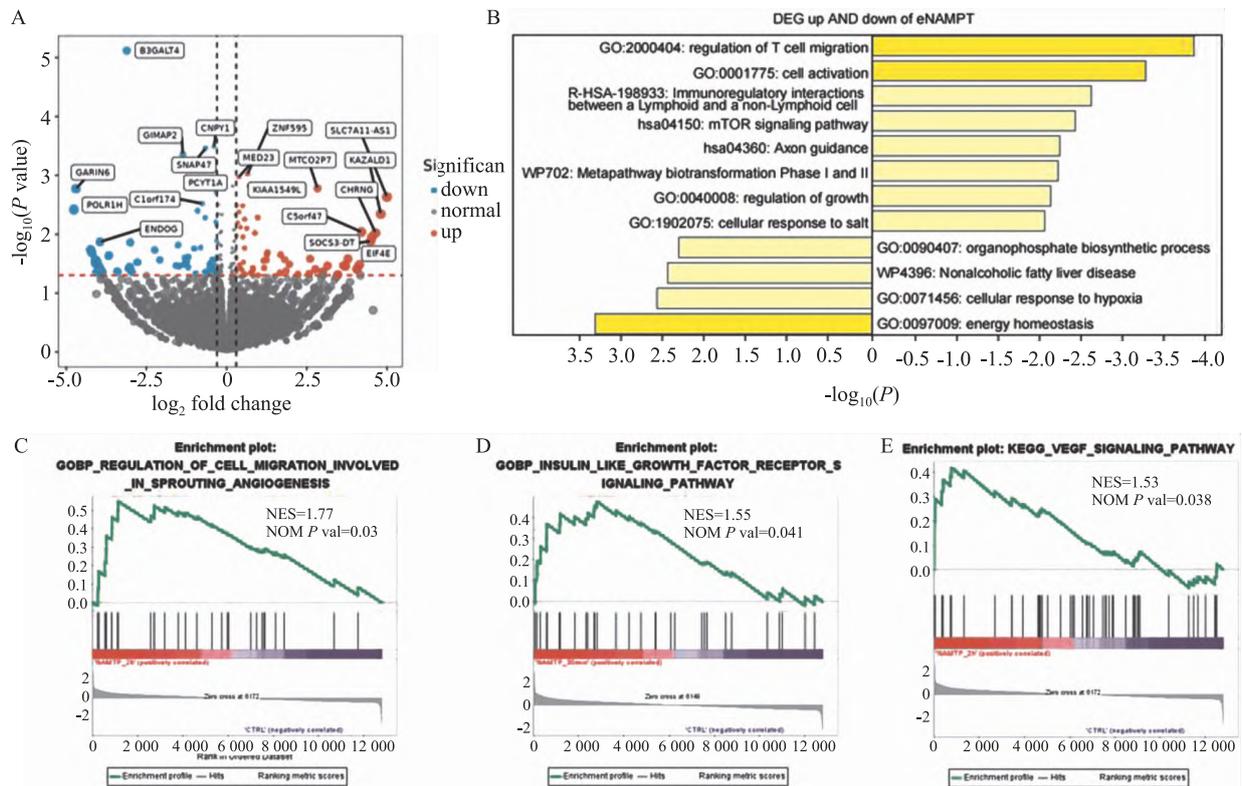


图 4 eNAMPT 蛋白刺激与对照组间相关基因差异表达分析

Fig. 4 Differential expression analysis of related genes between eNAMPT and control group

A: Volcano map of differentially expressed genes ($\log_2 \text{FC} > 0.3, P < 0.05$) stimulated by eNAMPT protein and control group; B: Functional enrichment analysis of differentially expressed genes between eNAMPT protein stimulation and control group showed significant differences in biological processes and signaling pathways; C - E: GSEA enrichment analysis between eNAMPT protein stimulation and control group.

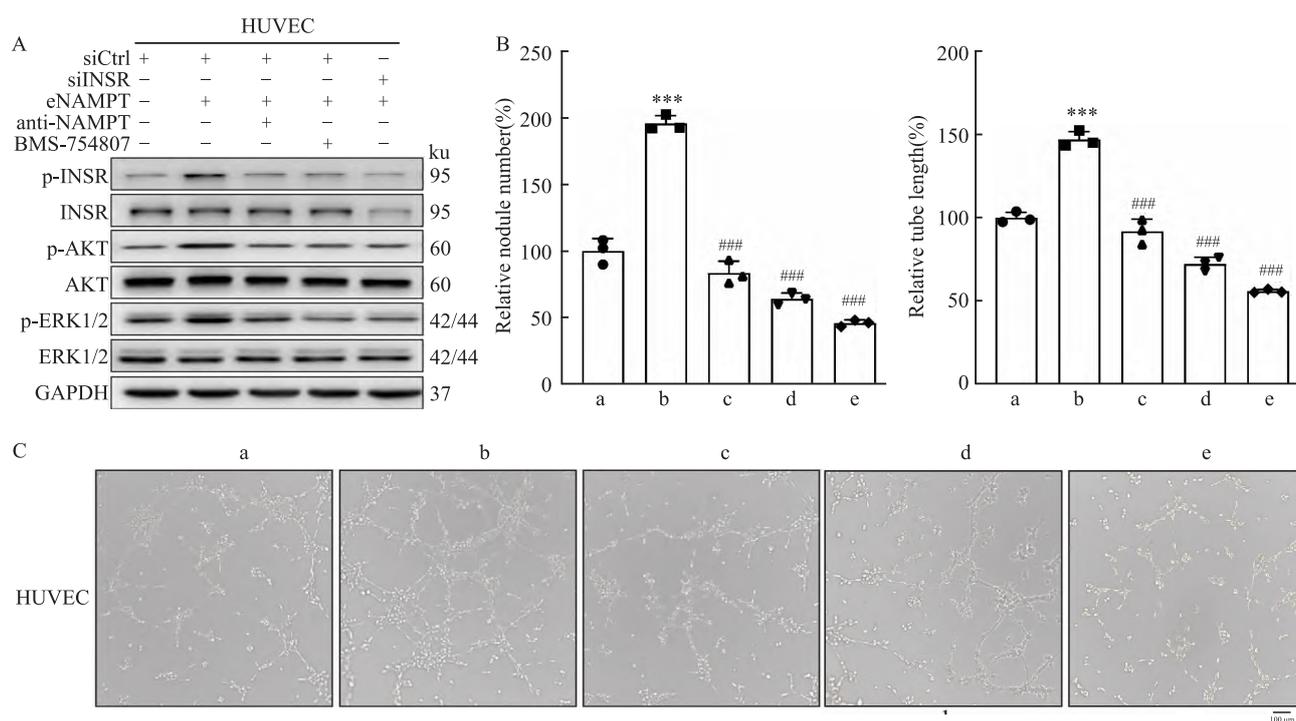


图5 eNAMPT通过INSR-PI3K-AKT/MAPK-ERK1/2轴调控HUVEC的血管形成能力

Fig. 5 eNAMPT regulated the angiogenic ability of HUVEC via the INSR-PI3K-AKT/MAPK-ERK1/2 axis

A: The levels of INSR, AKT, ERK1/2 and their phosphorylated proteins in HUVEC were detected by Western blot; B: Representative visual map of eNAMPT protein, anti-NAMPT neutralizing antibody, INSR inhibitor (BMS-754807) and siINSR influencing HUVEC angiogenesis $\times 100$; C: Statistical histogram of the number of nodules formed *in vitro* by HUVEC and the total length of blood vessels; a: siCtrl group; b: siCtrl + eNAMPT group; c: siCtrl + eNAMPT + anti-NAMPT group; d: siCtrl + eNAMPT + BMS-754807 group; e: siINSR + eNAMPT group; *** $P < 0.001$ vs siCtrl group; ### $P < 0.001$ vs eNAMPT group.

显示,与对照组相比,肝癌细胞来源的eNAMPT刺激后,HUVEC细胞中基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMP)2、MMP9和VEGF的mRNA水平上调($t = 4.07$ 、 4.21 、 12.58 ,均 $P < 0.05$);而anti-NAMPT中和性抗体、INSR抑制剂以及敲低INSR均能抑制MMP2($t = 25.38$ 、 6.24 、 13.39 ,均 $P < 0.01$)、MMP9($t = 5.07$ 、 6.22 、 7.85 ,均 $P < 0.01$)、VEGF($t = 11.47$ 、 14.53 、 17.93 ,均 $P < 0.001$)的表达(见图6A-6C)。综上提示肝癌细胞来源的eNAMPT通过发挥类胰岛素的作用结合INSR,促进INSR的磷酸化,激活下游PI3K-AKT、MAPK-ERK1/2的级联反应,促进转移和血管生成相关靶基因表达,进而促进血管生成。

3 讨论

NAMPT作为一种磷酸核糖基转移酶参与NAD合成的挽救途径,在细胞生物能学和代谢中起着重要作用,因此NAMPT被认为是一种具有生长因子、脂肪细胞因子和酶特性的多功能蛋白。iNAMPT在

多种恶性肿瘤中表达上调,包括与肥胖相关的疾病,并与较差的预后、晚期和分期相关^[7-8]。血清中eNAMPT也被报道是潜在的恶性肿瘤、恶性肿瘤分期进展和预后的良好生物标志物,并有助于监测某些恶性肿瘤^[9]。肝脏是eNAMPT主要分泌器官之一,在本研究中发现肝癌细胞在低氧条件下会促进eNAMPT向胞外分泌,而这与肿瘤微环境中的营养剥夺相类似。除此之外,缺氧及氧化应激也会增加eNAMPT的释放^[10],这些条件都与癌症高度相关。另有研究^[11]报道,eNAMPT能够促进血管生成,进一步加快癌症进展,严重降低癌症患者的生存期。

血管生成由多种促血管生成信号诱导,在癌症的进展和转移中至关重要。本研究通过qRT-PCR及Western blot检测发现iNAMPT在多种肝癌细胞中高表达,且低氧处理能够刺激肝癌细胞持续向胞外分泌eNAMPT;同时,肝癌细胞来源的eNAMPT能够促进HUVEC细胞的成管能力;对机制的探索发现,eNAMPT通过发挥类胰岛素的作用结合INSR,促进INSR的磷酸化,激活下游PI3K-AKT、MAPK-

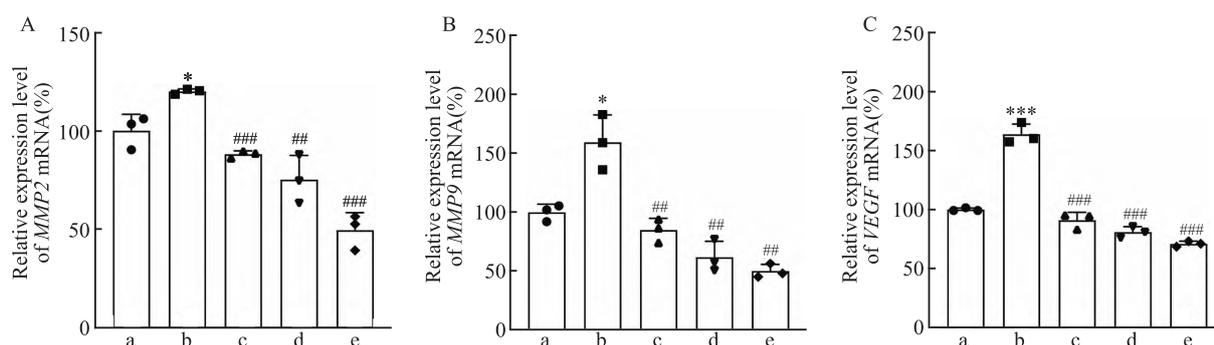


图6 eNAMPT促进HUVEC细胞中MMP2、MMP9、VEGF基因表达上调

Fig. 6 eNAMPT promoted the up-regulation of MMP2, MMP9 and VEGF genes in HUVEC cells

A - C: mRNA levels of MMP2, MMP9 and VEGF in HUVEC detected by qRT-PCR; a: siCtrl group; b: siCtrl + eNAMPT group; c: siCtrl + eNAMPT + anti-NAMPT group; d: siCtrl + eNAMPT + BMS-754807 group; e: siINSR + eNAMPT group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs siCtrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs siCtrl + eNAMPT group.

ERK1/2的级联反应,促进细胞迁移和血管生成相关靶基因MMP2、MMP9和VEGF的表达,进而促进血管生成。低氧是多种恶性肿瘤的共有特征,有研究^[12]表明,低氧条件下缺氧诱导因子1 α 的表达会发生上调,并通过VEGF轴促进瘤内的血管生成。本研究揭示了低氧诱导肝癌微环境血管生成的一个新机制,即低氧环境诱导肝癌细胞产生的eNAMPT可以通过INSR促进内皮细胞血管生成。

鉴于NAMPT在肿瘤进展中的重要作用,靶向NAMPT被认为是一种很有前景的治疗策略。由于NAMPT具有胞内、胞外两种形式,缺乏组织以及细胞特异性的靶向iNAMPT难免会对机体正常组织产生毒副作用^[13]。针对基因进行干扰同样会影响健康组织细胞内其作为酶的作用。因此靶向胞外形式的eNAMPT,即运用中和性抗体已成为一种新的靶向NAMPT的治疗策略。已有研究^[14]报道,在小鼠体内实验中,利用NAMPT中和性抗体能够有效降低eNAMPT调控的下丘脑NAD水平,进而维持下丘脑的相关功能稳态。运用中和性抗体策略也已经在其他背景下被报道,并取得了很有前景的应用结果^[15]。基于目前已有的发现,未来仍需更多研究来确定此种策略在eNAMPT升高相关肿瘤中的疗效。

总之,本研究首次在细胞水平初步证明了肝癌细胞来源的eNAMPT促进血管生成的功能,并探索了其促进血管生成的分子机制,即肝癌细胞能够分泌eNAMPT并结合HUVEC上的INSR进而激活其胞内的PI3K-AKT和MAPK-ERK1/2信号通路,上调血管生成相关的靶基因,增强其血管生成能力,该发现为肝癌肿瘤微环境重塑血管生成研究领域提供了

新的理论基础,靶向eNAMPT有望成为未来肝癌临床治疗中新的策略。

参考文献

- [1] Shackelford R E, Mayhall K, Maxwell N M, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review [J]. Genes Cancer, 2013, 4 (11 - 12): 447 - 56. doi: 10.1177/1947601913507576.
- [2] Garten A, Schuster S, Penke M, et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(9): 535 - 46. doi:10.1038/nrendo.2015.117.
- [3] Navas L E, Carnero A. NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6 (1): 2. doi: 10.1038/s41392-020-00354-w.
- [4] Sun B L, Sun X, Casanova N, et al. Role of secreted extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) in prostate cancer progression: novel biomarker and therapeutic target [J]. EBioMedicine, 2020, 61: 103059. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103059.
- [5] Travelli C, Colombo G, Aliotta M, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) neutralization counteracts T cell immune evasion in breast cancer [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11 (10): e007010. doi: 10.1136/jitc-2023-007010.
- [6] Chen J, Sysol J R, Singla S, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase promotes pulmonary vascular remodeling and is a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2017, 135(16): 1532 - 46. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024557.
- [7] Tang H, Wang L, Wang T, et al. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery [J]. Eur J Med Chem, 2023, 258: 115607. doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115607.

- [8] Recinella L, Orlando G, Ferrante C, et al. Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 578966. doi: 10.3389/fphys.2020.578966.
- [9] Semerena E, Nencioni A, Masternak K. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1268756. doi: 10.3389/fimmu.2023.1268756.
- [10] Lin Y C, Wu H C, Liao C C, et al. Secretion of one adipokine Nampt/Visfatin suppresses the inflammatory stress-induced NF- κ B activity and affects Nampt-dependent cell viability in Huh-7 cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 392471. doi: 10.1155/2015/392471.
- [11] Audrito V, Managò A, Zamporini F, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) is a novel marker for patients with BRAF-mutated metastatic melanoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27): 18997–9005. doi: 10.18632/oncotarget.24871.
- [12] Tirpe A A, Gulei D, Ciortea S M, et al. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6140. doi: 10.3390/ijms20246140.
- [13] Zabka T S, Singh J, Dhawan P, et al. Retinal toxicity, *in vivo* and *in vitro*, associated with inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(1): 163–72. doi: 10.1093/toxsci/kfu268.
- [14] Yoon M J, Yoshida M, Johnson S, et al. SIRT1-mediated eNAMPT secretion from adipose tissue regulates hypothalamic NAD⁺ and function in mice [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 706–17. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.002.
- [15] Bermudez T, Sammani S, Song J H, et al. eNAMPT neutralization reduces preclinical ARDS severity *via* rectified NF κ B and Akt/mTORC2 signaling [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 696. doi: 10.1038/s41598-021-04444-9.

Hepatocellular carcinoma cells promote angiogenesis of HUVEC *via* the eNAMPT-INSR axis

Wu Junjie¹, Li Shizhou², Gao Chengming², Cao Pengbo², Zhou Gangqiao^{1,2}

(¹*Dept of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)*

Abstract Objective To investigate the function and potential mechanism of hepatocellular carcinoma (HCC) cells-derived extracellular nicotinamide phosphoribosyl transferase (eNAMPT) in the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** The eNAMPT secretion of HCC cells were stimulated by hypoxia treatment and investigated the angiogenesis of HUVEC was investigated by tube formation assays. Transcriptomic RNA sequencing (RNA-seq) analyses of HUVEC under eNAMPT treatment were used to explore the mechanism of the effect of eNAMPT-insulin receptor (INSR) axis on angiogenesis. Western blot was used to detect the effects of eNAMPT-INSR axis on protein expression of HUVEC cells. qRT-PCR was used to detect the influence of eNAMPT-INSR axis on the expression of HUVEC intracellular related target genes. **Results** ELISA and Western blot results showed that the protein level of eNAMPT in the culture supernatant of HCC cells increased significantly after hypoxia stimulation. *In vitro* angiogenesis assay results showed that eNAMPT significantly increased the nodules number and total length of tubes in HUVEC. The transcriptome sequencing results of HUVEC showed that eNAMPT, as an insulin analogue, participated in the regulation of biological processes such as cell migration and angiogenesis in HUVEC, and might promote angiogenesis by activating insulin-like signaling pathways. Western blot results showed that the eNAMPT-INSR axis affected p-AKT and p-ERK1/2 protein levels in PI3K-AKT and MAPK-ERK1/2 signaling pathways in HUVEC. qRT-PCR results showed that the eNAMPT-INSR axis affected the expression of angiogenesis related target genes MMP2, MMP9 and VEGF in HUVEC. **Conclusion** eNAMPT secreted by HCC cells promotes angiogenesis by binding INSR to activate the PI3K-AKT and MAPK-ERK1/2 signaling pathways.

Key words hepatocellular carcinoma; nicotinamide phosphoribosyl transferase; insulin receptor; angiogenesis

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82172707)

Corresponding author Zhou Gangqiao, E-mail: zhougq114@126.com