

Titolo: La melatonina limita la vitalità e l'angiogenesi delle cellule endoteliali vascolari sopprimendo HIF-1 α / ROS / VEGF - Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF

Codice: MLT006

Autore Cheng et al.

Data: 2019

Rivista: International Journal of Molecular Medicine 43: 945-955

Argomento: melatonina

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4021>

URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.4021>

Parole chiave: angiogenesi, melatonina, ROS, VEGF, HIF-1 α , ipossia

Tumore: n/a

Traduzione: tradotte solo le sezioni "riassunto", "introduzione" e "discussione", con minime semplificazioni

Punti di interesse: In questo lavoro, sono stati studiati gli effetti della MLT sull'angiogenesi in vitro su cellule endoteliali della vena ombelicale umana, abbreviate con la sigla HUVEC/S. In particolare è stato studiato l'effetto della MLT sulla vitalità delle cellule HUVEC stesse, la loro capacità di formare il vaso capillare, la produzione del fattore di crescita endotelio vascolare (VEGF). Inoltre è stato studiato come la melatonina regola la produzione di specie reattive dell'ossigeno, generalmente prodotte sia in normali processi fisiologici ma anche in condizione patologiche di ipossia. E' stato evidenziato che in una situazione di ipossia (bassi livelli di ossigeno) era aumentata sia la produzione di specie reattive dell'ossigeno, sia la produzione di VEGF. Entrambe queste variabili erano diminuite dalla MLT che di fatto contrasta gli effetti dovuti dall'ipossia. La MLT ha inoltre diminuito la vitalità delle cellule endoteliali studiate e la loro capacità di formare il vaso capillare. In condizioni di ipossia era inoltre anche aumentata la produzione del fattore di trascrizione HIF 1 α , importante per la trascrizione del DNA di geni che codificano per molecole pro angiogeniche tra cui il VEGF. La MLT ha bloccato anche l'attività di HIF1, inibendo quindi la trascrizione di importanti fattori per la promozione dell'angiogenesi. I risultati di questo studio dimostrano che l'ipossia aumenta il livello di specie reattive dell'ossigeno e il VEGF in modo diretto e maniera dipendente da fattori di trascrizione come HIF-1 α . La produzione di ROS comporta un aumento della vitalità e dell'angiogenesi di HUVECS. Inoltre, il VEGF aumenta la produzione di ROS tramite un feedback positivo, amplificando l'effetto stimolante di ipossia e ROS sulla vitalità e l'angiogenesi delle HUVEC. La MLT ha un duplice ruolo nell'inibizione dell'angiogenesi, in quanto agisce direttamente come inibitore della crescita cellulare, e indirettamente come antiossidante e agente spazzino dei radicali liberi (ROS). In sintesi, la MLT sopprime la vitalità e l'angiogenesi di HUVECS attraverso la sottoregolazione degli effetti indotti da ipossia tramite percorsi di segnalazione che coinvolgono HIF-1 α / ROS / VEGS (fattore di trascrizione / radicali liberi / fattori di crescita endoteliale) in vitro.

Riassumendo in modo schematico: l'ipossia aumenta i radicali liberi (specie reattive dell'ossigeno) che portano all'attivazione di fattori di trascrizione del DNA e alla produzione di molecole pro-angiogeniche come il VEGF che stimola le cellule endoteliali a crescere e a formare nuovi vasi sanguigni. La melatonina, oltre a ridurre la vitalità delle cellule endoteliali e a ridurre la loro capacità di formare in vaso capillare, blocca l'effetto dei ROS, la l'attivazione dei fattori di trascrizione e la produzione di VEGF.

Riassunto

L'angiogenesi è un processo essenziale coinvolto in vari processi sia fisiologici, come la placentazione che patologici, come il cancro e l'endometriosi. La melatonina (MLT), un noto ormone naturale secreto principalmente nella ghiandola pineale, è coinvolto nella regolazione della neoangiogenesi e nell'inibizione dello sviluppo di diverse varietà di cancro, incluso il cancro del polmone e del seno. Tuttavia, il meccanismo specifico della sua attività anti-angiogenica non è stato sistematicamente chiarito. Nel presente studio, l'effetto di MLT sulla vitalità e l'angiogenesi delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECS), e la produzione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sotto la normossia o l'ipossia sono state analizzate usando la Cell Counting KIT 8, formazione del vaso capillare, citometria a flusso, ELISA e Western blot essay. È stato determinato che la secrezione di VEGF delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECS) era significativamente aumentata sotto ipossia, mentre MLT ha diminuito selettivamente il rilascio della VEGF e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in condizioni di ipossia. Inoltre, MLT ha inibito la vitalità delle HUVEC in modo dose-dipendente e invertito l'aumento della vitalità della cellula e della formazione del vaso che era stata indotta dall'ipossia / VEGF / H₂O₂. Inoltre, il trattamento con un inibitore del fattore inducibile da ipossia (HIF) -1 α (KC7F2) e MLT ha ridotto sinergicamente il rilascio di ROS e VEGF, e inibito la vitalità cellulare e la formazione del vaso da parte delle cellule HUVEC. Queste osservazioni dimostrano che MLT può avere due ruoli nell'inibizione dell'angiogenesi, come antiossidante e un agente spazzino dei radicali liberi. MLT sopprime la vitalità e l'angiogenesi di HUVECS attraverso la sotto-regolazione di HIF-1 α / ROS / VEGF. In sintesi, i dati attuali indicano che MLT può essere un potenziale agente antitumorale in tumori solidi con abbondanti vasi sanguigni, particolarmente combinati con KC7F2.

Introduzione

L'angiogenesi è un processo essenziale in cui si formano nuovi vasi sanguigni che non solo ha un ruolo cruciale in processi fisiologici, compreso lo sviluppo embrionale e la riparazione delle ferite, ma anche in condizioni patologiche, tra cui infiammazione cronica, cancro, malattie cardiache etc (1, 2). Esercita un effetto importante nel promuovere l'aggressività di un tumore, promuovendo la crescita tumorale, la formazione delle metastasi e l'invasione dei tessuti (3). La progressione del tumore del cancro è caratterizzata dalla stimolazione dei fattori pro-angiogeni, tra cui ipossia, fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), citochine come interleuchina-6 e metalloproteinasi, nelle cellule endoteliali (4). VEGF è stato dimostrato di essere uno dei più importanti fattori di crescita angiogenici che induce la permeabilità, la proliferazione, la migrazione e la formazione del vaso sanguigno (5). Numerosi stimoli, tra cui ipossia, citochine e stress ossidativo, possono aumentare l'espressione della VEGF (2,6). L'inibizione della neo-angiogenesi è considerata un'importante strategia per agenti antitumorali efficaci che impediscono la proliferazione del cancro e la metastasi (7,8).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), compresi i radicali H₂O₂ e il superossido di radicali anionici, sono una famiglia di molecole reattive che servono un ruolo fondamentale in numerosi processi cellulari, compresi il metabolismo, la differenziazione, la proliferazione e la morte cellulare, regolando percorsi di segnalazione critici (9). I ROS sono generati in varie condizioni fisiologiche e patologiche, compresa l'infiammazione (10) e l'ischemia (11). I livelli eccessivi di ROS risultano in uno squilibrio nel metabolismo di questi intermedi reattivi a causa dello stress

ossidativo ed è associato a varie malattie, compreso il cancro e le malattie cardiovascolari e neurodegenerative (12). La produzione di fattore inducibile da ipossia (HIF) -1 α è associata alla produzione indotta da ipossia di ROS (13). L'accumulo di prove indica che VEGF e ROS esercitano un ruolo critico nella patofisiologia vascolare (14,15). Tuttavia, l'interazione tra VEGF e ROS rimane controversa. Alcuni studi hanno dimostrato che la VEGF potrebbe usufruire di ROS come intermedi per stimolare la proliferazione cellulare e la formazione del vaso (16,17). Altri studi hanno indicato che le specie ROS attivano l'induzione della VEGF, ma l'interazione sottostante rimane ambigua (18-20).

KC7F2 è un composto esogeno che agisce come inibitore di traduzione della sub unità alfa del fattore inducibile da ipossia (HIF-1 α) (inibisce la sintesi della proteina ma non la trascrizione del gene che codifica per la proteina), è coinvolto nell'angiogenesi associata al cancro e può essere valutato in termini di azioni antoproliferative ed effetti sul metabolismo delle cellule tumorali (21). Inoltre, KC7F2 può anche essere usato come inibitore HIF-1 α (22).

La melatonina (MLT), un noto ormone naturale secreto principalmente nella ghiandola pineale, ha attirato l'attenzione a causa dei suoi vari effetti in numerosi processi fisiologici come il sonno, il ritmo circadiano e la protezione delle cellule antiossidanti contro i radicali liberi e processi patologici, compresa la progressione tumorale (23). L'accumulo di prove indica che MLT è in grado di eliminare direttamente i radicali liberi e i le specie reattive associate ai radicali, nonché gli di stimolare indirettamente enzimi anti-ossidativi (24,25). È stato riferito che MLT può inibire lo sviluppo di molteplici tipi di cancro (26), compreso il cancro al fegato (27-29), al polmone (30,31), al seno (32-34), il cancro del pancreas e del cervello (35). Tuttavia, il meccanismo di fondo di MLT varia in diversi tipi di cancro (36).

Inoltre, gli studi indicano che la melatonina riduce l'espressione del fattore inducibile da ipossia, che è un fattore di trascrizione del DNA (HIF-1 α) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) in varie linee cellulari (37-39). L'accumulo di prove indica che l'effetto antitumorale della MLT è associato all'inibizione dell'angiogenesi (24,40,41). È stato riportato che i ROS prodotti in condizioni ipossiche inattivano l'enzima PHD2 e quindi i ROS stabilizzano HIF-1 α , permettendogli di agire come fattore di trascrizione. Tuttavia, il meccanismo specifico dell'attività anti-angiogenica della MLT non è stato sistematicamente chiarito. Pertanto, lo scopo del presente studio era di indagare l'effetto di MLT sugli HUVEC e sul meccanismo sottostante associato.

Discussione

Numerosi studi negli ultimi anni hanno indicato che MLT inibisce marcatamente la proliferazione e la metastasi delle cellule tumorali (26,27,30,32,36), e quindi potrebbe sopprimere la progressione e lo sviluppo del cancro, ridurre il rischio di mortalità e eventi avversi e migliorare anche la prognosi e la qualità della vita. La crescita del tumore, lo sviluppo e la metastasi sono associati all'angiogenesi, in particolare per i tipi di tumori solidi (2,6,88.45.46). Le cellule endoteliali nel microambiente tumorale hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione del cancro attraverso l'angiogenesi (8,45). Gli studi precedenti hanno dimostrato che le concentrazioni farmacologiche di MLT hanno un effetto anti-angiogenico diretto attraverso la soppressione della proliferazione nelle cellule endoteliali vascolari, nonché un effetto indiretto tramite l'inibizione delle citochine pro-angiogenesi, tra cui la VEGF, il fattore di crescita epidermico e il fattore di crescita insulino simile (IGF1) (37,41,47). La VEGF è una delle più potenti citochine pro-angiogeniche, che innescano specificamente la proliferazione delle cellule endoteliali e aumenta la permeabilità (48). Tuttavia, i meccanismi sottostanti di questo fenomeno rimangono scarsamente chiariti. Gli studi precedenti sono stati preliminari ma l'effetto di MLT sull'espressione VEGF e i meccanismi sottostanti rimangono ambigui (37,41,47).

Nel presente studio, la MLT ha notevolmente limitato la vitalità cellulare (agendo direttamente e in modo negativo sulla crescita cellulare) e ha interrotto la formazione di vasi negli HUVEC e questo effetto dipendeva dal VEGF. E' stato infatti osservato che la MLT diminuiva l'espressione di VEGF a livello di sintesi della proteina (mRNA).

L'angiogenesi tumorale è un processo chiave per la consegna di ossigeno e sostanze nutritive ai tumori in crescita, e quindi è considerato una caratteristica essenziale del microambiente nei tumori solidi (49). La produzione di alcune citochine angiogeniche e fattori di crescita sono regolati dall'ipossia. L'angiogenesi tumorale e la successiva crescita rapida del tumore accelerano ulteriormente l'ipossia tumorale (37,38,48). Nel presente studio, è stato determinato che MLT può inibire l'espressione del fattore inducibile da ipossia nelle cellule HUVEC a livello di mRNA e livello di proteine (a livello post-trascrizionale del DNA). Il fattore inducibile da ipossia è un fattore di trascrizione del DNA e quindi necessario per la produzione delle molecole angiogeniche necessarie per contrastare l'ipossia, come il VEGF.

Inoltre, è stato osservato che l'ipossia ha stimolato la produzione di VEGF. L'inibitore KC7F2 del fattore di trascrizione inducibile da ipossia (HIF1 alfa), ha sottoregolato l'espressione VEGF. È stato dimostrato così che l'ipossia stimola la produzione di VEGF attraverso la stimolazione del fattore di trascrizione HIF1.

L'ipossia cronica è la causa principale della formazione di ROS ad alta concentrazione all'interno delle cellule tumorali (50). I ROS, che sono prodotti da numerose attività ossidative fisiologiche e reazioni di stress nel corpo, sono anche associate a numerose elementi fisiologici, incluse autofagia cellulare e immunoregolazione e a processi patologici, compresa la progressione tumorale (51-54). A livelli bassi, ROS esibiscono effetti benefici, servono come molecole di segnalazione regolando segnali intracellulari e mantenendo l'omeostasi, anche nei processi di proliferazione, differenziazione, adesione, migrazione, invasione e apoptosi; Tuttavia, ad alti livelli, i ROS sono deleterie per le cellule, con conseguenti danni a proteine, lipidi e DNA, e infine con conseguente autofagia e morte cellulare (55,56). Un aumento del livello di ROS è stato dimostrato di promuovere la proliferazione cellulare, la migrazione cellulare, la sopravvivenza cellulare e la transizione epiteliale-mesenchimale (57,58), che ha infine causato uno stress ossidativo, che avvia la carcinogenesi (59). Le prove precedenti indicano che i ROS possono agire come secondi messaggeri in risposta all'ipossia, e avere un ruolo importante nella stabilizzazione e attivazione dei fattori di trascrizione HIF-1 e indurre la produzione di fattori angiogenici. Inoltre, gli antiossidanti chimici sopprimono l'accumulo di HIF-1 α e inibiscono la trascrizione della VEGF attraverso un meccanismo che coinvolge ROS (55).

Nel presente studio, è stato determinato che l'ipossia aumenta il rilascio di ROS e l'espressione VEGF. Inoltre, vi è un meccanismo di feedback positivo tra ROS e VEGF, che contribuisce all'elevata vitalità e angiogenesi di HUVEC. La melatonina può sopprimere efficacemente questi effetti, in particolare in combinazione con KC7F2 (un nuovo inibitore di traduzione HIF-1 α). Collettivamente, questi risultati indicano che MLT inibisce la vitalità e l'angiogenesi di HUVECS utilizzando l'asse HIF-1 α / VEGF / ROS.

In conclusione le osservazioni attuali dimostrano che l'ipossia aumenta il livello di ROS e VEGF in modo diretto e maniera dipendente da HIF-1 α . La produzione di ROS comporta un aumento della vitalità e dell'angiogenesi di HUVECS. Come importante fattore di crescita angiogenesi, VEGF può promuovere direttamente l'angiogenesi delle HUVEC. Inoltre, la VEGF aumenta la produzione di ROS e amplifica l'effetto stimolante dei ROS sulla vitalità e l'angiogenesi delle HUVEC. La MLT ha un duplice ruolo nell'inibizione dell'angiogenesi, agendo direttamente come inibitore della crescita cellulare, e indirettamente come agente spazzino antiossidante dei radicali liberi. MLT sopprime la vitalità e l'angiogenesi di HUVECS attraverso la sottoregolazione degli effetti indotti da ipossia tramite segnalazioni che coinvolgono Hif-1 α / Ros / VEGS in vitro.

Come inibitore del fattore di trascrizione HIF-1 α , il composto KC7F2 può esercitare un effetto anti-angiogenico sinergicamente con MLT in vitro. In sintesi, i dati attuali indicano che MLT può essere un potenziale agente antitumorale in tumori solidi con abbondanti vasi sanguigni, in particolare in combinazione con KC7F2. Tuttavia, sono richiesti ulteriori studi e prove in vivo.