

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.010

RNAi 沉默 SDF-1 基因对人胃癌裸鼠原位移植瘤生物学行为的影响及机制*

刘小慧¹ 贺曼曼² 郭明海¹ 冯运章¹ 张伟¹ 赵国杰¹

(1 邯郸市中心医院普外二科 河北 邯郸 056001; 2 邯郸市中心医院麻醉科 河北 邯郸 056001)

摘要 目的:探讨 RNAi 技术沉默基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)对人胃癌裸鼠原位移植瘤生物学行为的影响及可能机制。**方法:**利用 RNAi-SDF-1 细胞及对照组细胞建立人胃癌裸鼠皮下移植瘤, Western Blot 检测裸鼠皮下移植瘤 SDF-1 蛋白表达情况。利用裸鼠皮下移植瘤建立其原位移植瘤模型, 8 周后处死裸鼠解剖尸体, 检测原位移植瘤生长、凋亡及远处脏器转移情况。Western Blot 检测 SDF-1 沉默对通路蛋白 Akt、p-Akt、NF- κ B、p-NF- κ B 以及侵袭转移相关基因 E-cadherin、MMP-7 表达的影响。**结果:**成功建立 RNAi-SDF-1 裸鼠原位移植瘤模型。与空白及阴性对照组比较, RNAi-SDF-1 组裸鼠原位移植瘤生长缓慢, 体积与质量均明显降低, 差异有统计学意义($P<0.01$)。流式细胞术结果显示, RNAi-SDF-1 组肿瘤细胞凋亡率明显高于空白及阴性对照组($P<0.01$)。尸体解剖结果显示, RNAi-SDF-1 组肿瘤腹腔淋巴结及肝脏转移率明显低于空白及阴性对照组($P<0.05$)。Western Blot 结果显示, 与空白及阴性对照组比较, RNAi-SDF-1 组肿瘤组织中 Akt、p-Akt、NF- κ B、p-NF- κ B、MMP-7 表达水平明显降低, E-cadherin 表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论:**RNAi-SDF-1 能够有效抑制人胃癌 SGC7901 细胞裸鼠原位移植瘤的生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制其腹腔淋巴结、肝脏转移, 其机制可能与抑制 PI3K-Akt、NF- κ B 信号通路及 MMP-7 的表达并上调 E-cadherin 的表达相关。

关键词:基质细胞衍生因子-1; RNA 干扰; 胃癌; SGC7901 细胞; 裸鼠; 生物学行为

中图分类号:R-33; R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)17-3250-07

Effect of RNAi Silencing SDF-1 Gene on Biological Behavior of Orthotopic Transplanted human Gastric in Nude Mice and its Mechanism*

LIU Xiao-hui¹, HE Man-man², GUO Ming-hai¹, FENG Yun-zhang¹, ZHANG Wei¹, ZHAO Guo-jie¹

(1 Department II of General surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei, 056001, China;

2 Department of Anesthesiology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei, 056001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of RNAi silencing stromal cell derived factor-1 (SDF-1) on the biological behavior of orthotopic transplanted human gastric cancer in nude mice and its possible mechanism. **Methods:** The subcutaneous transplanted tumor models of human gastric cancer in nude mice were constructed by using RNAi-SDF-1 cells and control cells, and the protein expression of SDF-1 in subcutaneous transplanted tumor of nude mice was detected by Western Blot. The orthotopic transplanted tumor model was established by using subcutaneous transplanted tumor in nude mice, and eight weeks later, the nude mice were dissected to detect the growth, apoptosis and distant organ metastasis of orthotopic transplanted tumor. The effects of SDF-1 silencing on the expression of pathway proteins Akt, p-Akt, NF- κ B, p-NF- κ B and invasion and metastasis related genes E-cadherin and MMP-7 were detected by Western Blot. **Results:** The orthotopic transplanted tumor model of RNAi-SDF-1 nude mice was successfully established. Compared with the blank and negative control group, the growth of orthotopic transplanted tumor in RNAi-SDF-1 group was slower, and the volume and mass of orthotopic transplanted tumor were significantly lower than those in blank and negative control group ($P<0.01$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of tumor cells in RNAi-SDF-1 group was significantly higher than that in blank and negative control groups ($P<0.01$). The results of autopsy showed that the metastasis rate of abdominal lymph nodes and liver in RNAi-SDF-1 group was significantly lower than that in blank and negative control groups ($P<0.05$). The results of Western Blot showed that the expression levels of Akt, p-Akt, NF- κ B, p-NF- κ B and MMP-7 in RNAi-SDF-1 group were significantly lower than those in blank and negative control groups, while the expression levels of E-cadherin were significantly higher than those in blank and negative control groups ($P<0.01$). **Conclusions:** RNAi-SDF-1 can effectively inhibit the growth of orthotopic transplanted tumor of human gastric cancer SGC7901 cells in nude mice, induce apoptosis of tumor cells, and inhibit the metastasis of abdominal lymph nodes and liver. The mechanism may be related to the inhibition of PI3K-Akt, NF- κ B signaling pathway and MMP-7 expression and up-regulation of E-cadherin expression.

Key words: SDF-1; RNA interference; Gastric cancer; SGC7901 cell; Nude mice; Biological behavior

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)17-3250-07

* 基金项目:河北省重点研发计划自筹项目(172777201)

作者简介:刘小慧(1985-),医学硕士,主治医师,研究方向:消化系统肿瘤,电话:18630004402, E-mail: liuhui-10@163.com

(收稿日期:2019-03-03 接受日期:2019-03-27)

前言

据统计 1996~2013 年我国胃癌患者例均费用为 7 387~28 743 元,整体呈上升趋势,年均增长率 1.7%^[1],而每年约有 67.9 万胃癌新发病例^[2],胃癌已成为威胁我国人群健康的严峻社会经济问题。因此对胃癌分子机制的深入研究具有重要的社会经济价值。基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 是一种炎性趋化因子,与其受体 CXCR4 结合后通过激活下游 PI3K/Akt、MAPK/ERK、NF- κ B 等信号通路调控细胞的生长/增殖、凋亡、趋化、运动、黏附、耐药等诸多生物学行为^[3-5]。研究报道^[4,6]SDF-1 在胃癌组织中高表达,且 SDF-1/CXCR4 轴能够促进胃癌细胞增殖、抑制其凋亡,并促进胃癌细胞的侵袭和转移。但对 SDF-1 的研究多限于体外实验,体内实验研究颇少。因此本研究从体内实验方面探讨 RNAi 技术沉默 SDF-1 基因表达对人胃癌 SGC7901 细胞裸鼠原位移植瘤生物学行为的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌细胞株 SGC7901 购自中国科学院上海细胞研究所,使用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)培养,置于 5% CO₂, 37℃ 恒温箱培养,常规换液传代。5 周龄 BALB/c-nu/nu 裸鼠,雌雄均有,平均质量 18~22 g,购自上海实验动物中心,SPF 条件饲养。重组质粒 RNAi-SDF-1、阴性对照质粒均由上海吉玛制药有限公司合成。兔抗人 SDF-1、MMP-7 抗体、鼠抗人 E-cadherin 抗体购自 Abcam 公司。兔抗人 Akt1、p-Akt1 抗体购自美国 Epitomics 公司,兔抗人 NF- κ B、p-NF- κ B 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 SDF-1-RNAi 的合成、转染及实验分组 SDF-1-RNAi 序列(5'-GTGCATTGACCCGAAGCTAAATCAAGAGTTTAGCTTCGGGTCAAT-GCACTTTTT-3')^[7] 及非特异性序列均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。细胞接种于 6 孔板,融合度 80% 左右时通过 Lipofectamine 2000 进行转染。实验分三组:空白对照组(细胞不经任何处理)、阴性对照组(转染非特异性序列质粒)、SDF-1-RNAi 组(转染 SDF-1-RNAi 质粒)。

1.2.2 建立裸鼠皮下移植瘤模型 取对数期三组细胞制备细胞悬液,细胞浓度调整为 1×10^6 /mL。每组 3 只裸鼠,采用 0.6% 戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,按无菌手术常规消毒铺单,取 SGC7901 细胞悬液 0.1 mL 注射于裸鼠前肢腋窝处皮下,注射后轻按,待裸鼠苏醒后放回饲养笼,连续观察 2 周。1 周后三组裸鼠种植部位均可触及大小不等质硬结节,说明皮下移植瘤建模成功。2 周后脱颈处死裸鼠,解剖出皮下移植瘤,去除坏死组织及周围结缔组织,取直径约 0.5 cm 肿瘤组织进行 Western Blot 检测 SDF-1 蛋白表达印证转染效果。余新鲜肿瘤组织修剪为约 1 mm³ 大小,种植于另一只裸鼠相同部位进行鼠间传代,每组每代选用两只裸鼠实验,避免裸鼠死亡或肿瘤失败导致断代。

1.2.3 RT-PCR 检测裸鼠皮下移植瘤 SDF-1 mRNA 表达 按 Trizol 法提取肿瘤组织总 RNA,按试剂盒说明书逆转录为 cDNA,配置 25 μ L 反应体系扩增目的基因。RT-PCR 反应条

件:预变性 94℃ 5 min $\rightarrow$ 94℃ 变性 30 s $\rightarrow$ (SDF-1, 55℃; GAPDH, 58℃) 退火 60 s $\rightarrow$ 72℃ 延伸 1 min,扩增 30 个循环。电泳后以 GAPDH 作为内参计算 SDF-1 蛋白相对表达强度。

1.2.4 Western Blot 检测裸鼠皮下移植瘤 SDF-1 蛋白表达 收集各组肿瘤组织加入蛋白裂解液 RIPA,冰上作用 30 min,提取组织总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,每个样品上样量 50 μ g,经 SDS-PAGE 电泳分离,转 PVDF 膜。20 mL 封闭液室温摇床孵育 1.5 h,弃封闭液,一抗孵育,4℃ 孵育过夜后洗膜,按 1:3000 稀释倍数加入二抗,室温摇床孵育 1.5 h。洗膜后用红外荧光扫描成像系统扫描,以 GAPDH 作为内参计算 SDF-1 蛋白相对表达强度。

1.2.5 建立裸鼠原位移植瘤模型 按 1.2.2 操作先期进行建立裸鼠皮下移植瘤模型,建模成功后取皮下移植瘤进行鼠间传代,共传代 5 次以获取生长旺盛的皮下移植瘤,将 45 只裸鼠随机分三组(每组 15 只)分别进行各组皮下移植瘤原位移植手术。简要步骤:准备实验裸鼠禁食 8 小时,同期获取第五代裸鼠皮下移植瘤,置入 1640 培养液(含青霉素 100 U/mL)。戊巴比妥钠(浓度 0.6%, 50 mg/kg)腹腔注射麻醉实验裸鼠,常规去毛消毒铺单,取剑突下正中中小切口逐层剪开各层入腹,探查并显露胃壁,于胃大弯远侧端无血管区挑开浆膜,切口约 2-3 mm,向内按压分离浆膜下层造成人为凹陷槽,将新鲜皮下移植瘤组织约 1 mm³ 置入凹槽,OB 胶封闭切口并粘连少许大网膜组织覆盖切口。细丝线关腹。麻醉清醒后回笼,每日观察裸鼠一般状态,8 周后统一处死裸鼠,解剖尸体,统计测量原位移植瘤体积、质量,观察远处转移部位、数目。原发灶肿瘤组织测量长轴(a)、短轴(b)及质量后置入液氮罐保存以待后续实验。按公式 $V=0.5ab^2$ (mm³) 计算肿瘤体积。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 取手术同期新鲜裸鼠胃癌组织制备单细胞悬液,按 1×10^6 /mL 密度取 0.1 mL 单细胞悬液,采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率,按照说明书操作,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 混合均匀,上机检测。

1.2.7 Western Blot 检测裸鼠原位移植瘤 Akt、p-Akt、NF- κ B、p-NF- κ B、E-cadherin、MMP-7 表达情况 按照 1.2.4 步骤测定上述各蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

应用 SPSS23.0 统计软件分析,计数资料用 % 表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验及单因素方差分析(ANOVA),多组中两两比较采用 LSD-t 检验;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠胃癌模型建立一般情况

实验分三组,裸鼠按每组 3 只进行皮下移植瘤建模,动态观察,空白及阴性对照组裸鼠术后第 5 天可触及皮下质硬小结节, RNAi-SDF-1 组裸鼠第 7~8 天触及皮下质硬小结节,裸鼠饮食、饮水、活动等一般生活习性未见著变,2 周后测量瘤体约 0.5~0.8 cm 大小,9 只裸鼠均成功造模,成瘤率 100%。将皮下移植瘤鼠间传代五次后进行手术,将第五代裸鼠新鲜皮下移植瘤原位移植到裸鼠胃浆膜下,与 RNAi-SDF-1 组比较,空白及

阴性对照组裸鼠较早出现明显的进食饮水减少,活动减少,并逐渐出现消瘦、恶病质表现,8周内裸鼠均无死亡,8周后处死

所有裸鼠进行尸体解剖,结果显示45只裸鼠原位移植瘤均成功造模,成瘤率100%。

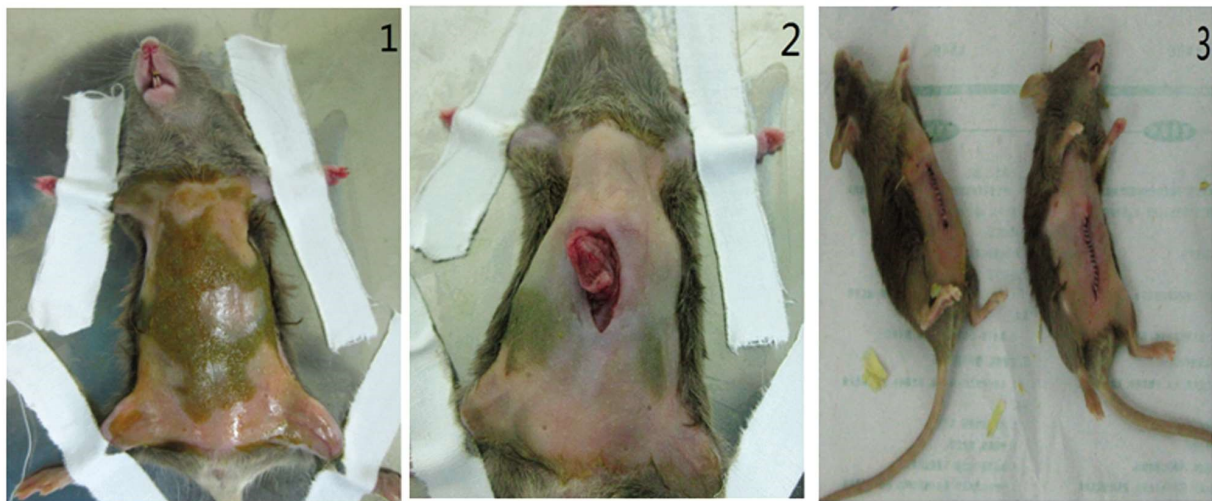


图1 裸鼠原位移植简要手术过程

Fig.1 Brief surgical procedure of orthotopic transplantation in nude mice

注:1:裸鼠麻醉后消毒;2:分离提出裸鼠胃壁;3:关腹,严密缝合切口。

Note: 1: disinfection of nude mice after anesthesia; 2: separation and presentation of gastric wall in nude mice; 3: closure of abdomen and strict suture of incision.

2.2 RT-PCR 及 Western Blot 检测皮下移植瘤 SDF-1 表达情况

每组随机选取三只裸鼠进行皮下移植瘤实验,2周后处死裸鼠,剥取皮下移植瘤,去除表面坏死组织及纤维结缔组织,RT-PCR 及 Western Blot 分别验证 SDF-1 mRNA 及蛋白表达水平。RT-PCR 结果显示 RNAi-SDF-1 组肿瘤组织中 SDF-1 mRNA 相对表达量显著低于空白对照组及阴性对照组($P<0.01$);空白及阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。Western Blot 结果显示 RNAi-SDF-1 组肿瘤组织中 SDF-1 蛋白相对表达量显著低于空白对照组及阴性对照组($P<0.01$);空白及阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)(图2,表1)。以上结果表明 RNAi-SDF-1 转染成功,皮下移植瘤可以进行后续实验。

2.3 RNAi-SDF-1 对裸鼠原位移植瘤生长的影响

对所有裸鼠进行尸体解剖,剥离其胃部肿瘤,统计原位移植瘤体积与质量,结果表明 RNAi-SDF-1 组裸鼠胃癌肿瘤体积显著低于空白对照组及阴性对照组($F=92.363, P<0.01$);空白及阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。RNAi-SDF-1 组裸鼠胃癌肿瘤质量也显著低于空白及阴性对照组($F=92.393,$

$P<0.01$);空白及阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明沉默 SDF-1 基因表达能够显著抑制裸鼠胃癌原位移植瘤生长,其抑瘤率达 44.31%(图3,表2)。

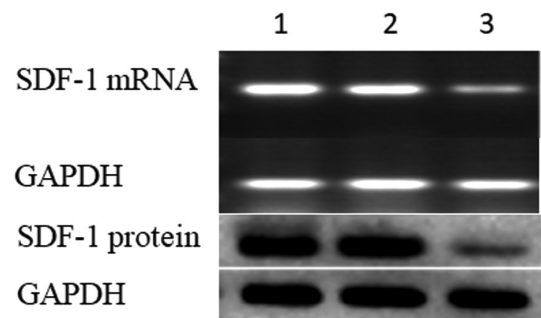


图2 各组皮下移植瘤组织中 SDF-1 mRNA 与蛋白表达情况

Fig.2 Expression of SDF-1 mRNA and protein in subcutaneous transplanted tumor tissue of each group

注:1:空白对照组;2:阴性对照组;3:RNAi-SDF-1 组。

Note: 1: blank control group; 2: negative control group; 3: RNAi-SDF-1 group.

表1 三组皮下移植瘤中 SDF-1 mRNA 及蛋白表达比较

Table 1 Comparison of SDF-1 mRNA and protein expression in three groups of subcutaneous transplanted tumors

Groups	SDF-1 mRNA	SDF-1 protein
Blank control group	1.318± 0.158	1.251± 0.116
Negative control group	1.304± 0.119	1.242± 0.113
RNAi-SDF-1 group	0.241± 0.017*	0.181± 0.016*
F	87.417	F=128.366
P	P=0.000	P=0.000

Note: * $P<0.01$, compared with blank and negative control group.

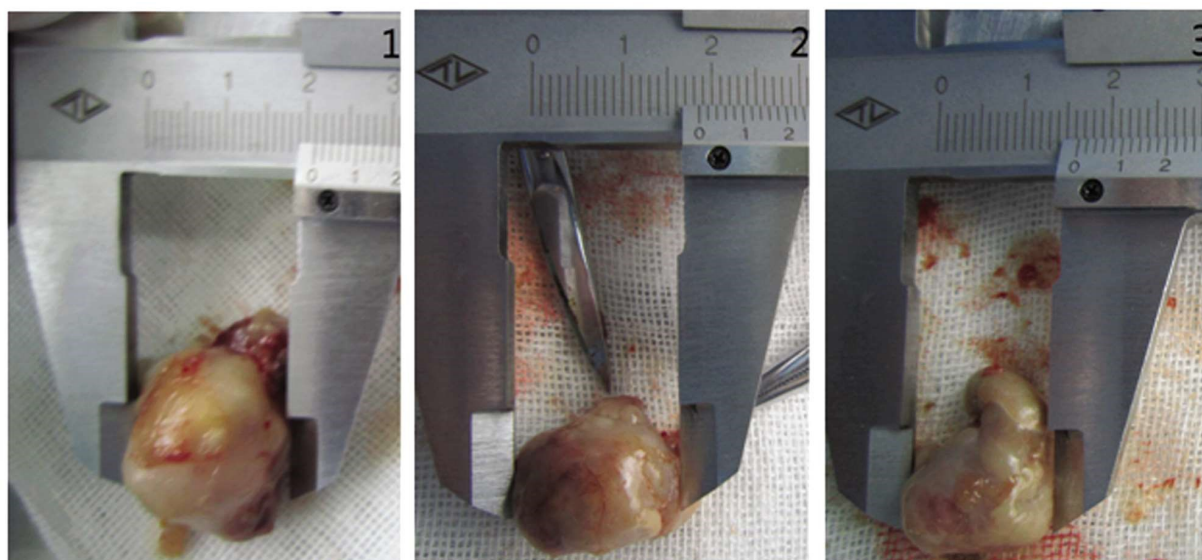


图3 三组裸鼠胃癌原位移植瘤比较

Fig.3 Comparison of orthotopic gastric cancer xenografts in nude mice

注:1:空白对照组;2:阴性对照组;3:RNAi-SDF-1 组。

Note: 1: blank control group; 2: negative control group; 3: RNAi-SDF-1 group.

表2 三组裸鼠胃癌原位移植瘤体积和质量比较

Table 2 Comparison of volume and mass of orthotopic gastric cancer xenografts in three groups of nude mice

Groups	Samples	Volume[($\bar{x} \pm s$)mm ³]	Mass[($\bar{x} \pm s$)g]	Tumor inhibitory rate(%)
Blank control group	15	2992.288 $\pm$ 360.737	3.43 $\pm$ 0.41	-
Negative control group	15	2882.443 $\pm$ 319.328	3.30 $\pm$ 0.37	3.79 %
RNAi-SDF-1 group	15	1652.611 $\pm$ 193.469*	1.91 $\pm$ 0.21*	44.31 %
F		92.363	92.393	
P		0.000	0.000	

Note: * $P < 0.01$, compared with blank and negative control group.

2.4 RNAi-SDF-1 对裸鼠原位移植瘤凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, RNAi-SDF-1 组胃癌细胞凋亡率[(32.40 $\pm$ 2.39) %]显著高于空白对照组[(13.60 $\pm$ 1.07) %]及阴性

对照组[(14.2 $\pm$ 1.12) %]($F=128.366$, $P=0.000$);空白及阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)(图4,图5)。

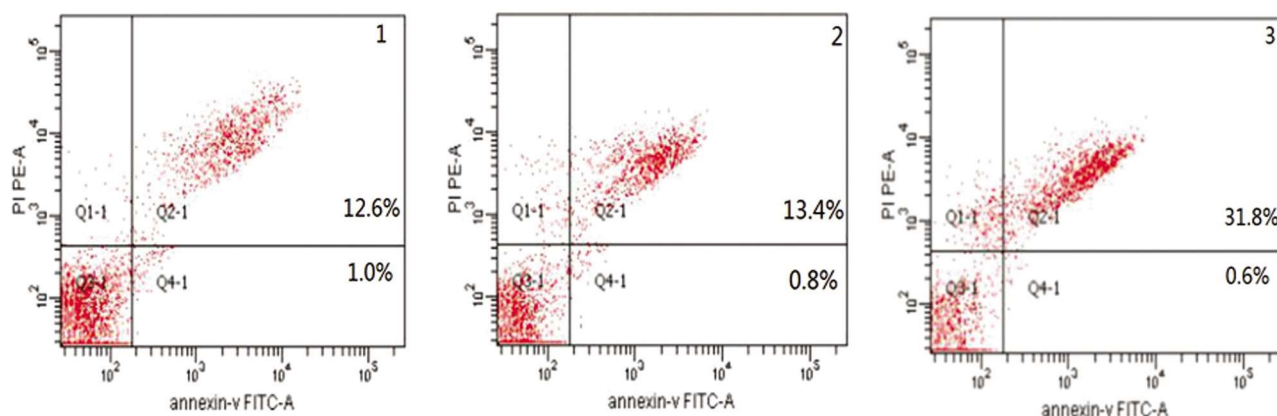


图4 三组细胞凋亡率比较

Fig.4 Comparison of apoptotic rate in three groups

注:1:空白对照组;2:阴性对照组;3:RNAi-SDF-1 组。

Note: 1: blank control group; 2: negative control group; 3: RNAi-SDF-1 group.

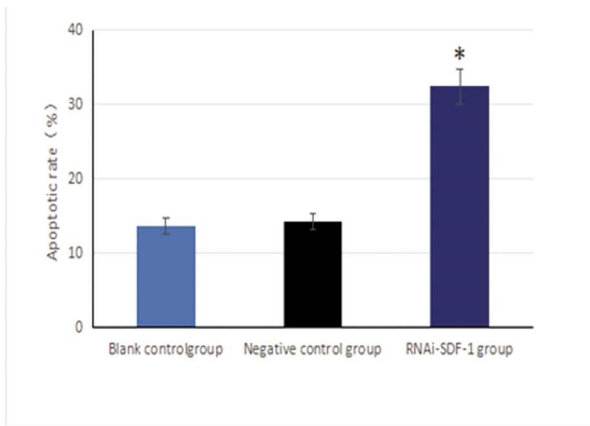


图5 三组细胞凋亡率比较

Fig.5 Comparison of apoptotic rate in three groups

注: * $P<0.01$, 与空白及阴性对照组比较。

Note: * $P<0.01$, compared with blank and negative control group.

2.5 RNAi-SDF-1 对裸鼠原位移植瘤远处转移的影响

45 只裸鼠 8 周后脱颈处死进行尸体解剖, 主要观察肝脏、脾脏、腹腔淋巴结、肠系膜、腹膜五个部位有无肉眼可分辨的明显转移瘤, 结果显示 RNAi-SDF-1 组裸鼠腹腔淋巴结转移率 [(3/15)] 明显低于空白对照组 [(10/15)] 及阴性对照组 [(9/15)] ($\chi^2=6.651$, $P=0.010$; $\chi^2=5.000$, $P=0.025$)。RNAi-SDF-1 组裸鼠肝脏转移率 [(2/15)] 明显低于空白对照组 [(9/15)] 及阴性对照组 [(8/15)] ($\chi^2=7.033$, $P=0.008$; $\chi^2=5.400$, $P=0.020$)。此外也观察到肠系膜、脾脏、腹膜转移情况, 但因例数较少, 无法进行统计学分析(图 6)。

2.6 RNAi-SDF-1 对裸鼠原位移植瘤 Akt、NF- κ B、p-Akt、p-NF- κ B、E-cadherin、MMP-7 蛋白表达的影响

Western Blot 检测三组裸鼠胃癌原位移植瘤组织中 Akt、NF- κ B、p-Akt、p-NF- κ B、E-cadherin、MMP-7 蛋白的表达水平, 结果表明 RNAi-SDF-1 组肿瘤组织中 Akt、NF- κ B、p-Akt、p-NF- κ B、MMP-7 蛋白表达水平明显低于空白及阴性对照组 ($P<0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平明显高于空白及阴性对照组 ($P<0.01$)。空白及阴性对照组上述各蛋白表达差异均无统计学意义(均 $P>0.05$) (图 7, 表 3)。

3 讨论

裸鼠由于缺乏免疫系统是研究各类肿瘤体内生物学行为的重要模型。对裸鼠皮下移植瘤和原位移植瘤的观察检测是目前研究某一基因或者分子、通路对肿瘤有无影响的两种主要方法。裸鼠皮下移植瘤模型建立具有操作便捷, 成本低廉等优点, 但是肿瘤被皮下结缔组织包裹, 难以观察肿瘤侵袭转移特征。裸鼠原位移植瘤模型建立虽然操作较复杂、成本较高, 但模拟人体肿瘤微环境中肿瘤生物学行为, 这种研究更具有说服力。本实验 45 只裸鼠原位移植瘤模型全部成功建立, 总结前期准备及实验过程, 成功造模需注意以下几个细节问题: ① 严格限制麻醉剂量, 避免麻醉过量致死; ② 严格控制术程出血, 本研究前期预实验发现出血量沾湿 3 根医用棉签即可导致裸鼠死亡; ③ 严格遵循无菌原则, 多次鼠间传代能够获取生长旺盛且无菌的肿瘤组织; ④ 关腹时要打结牢靠并尽量留短线结, 防止裸鼠苏醒后撕咬线结导致切口裂开或感染。

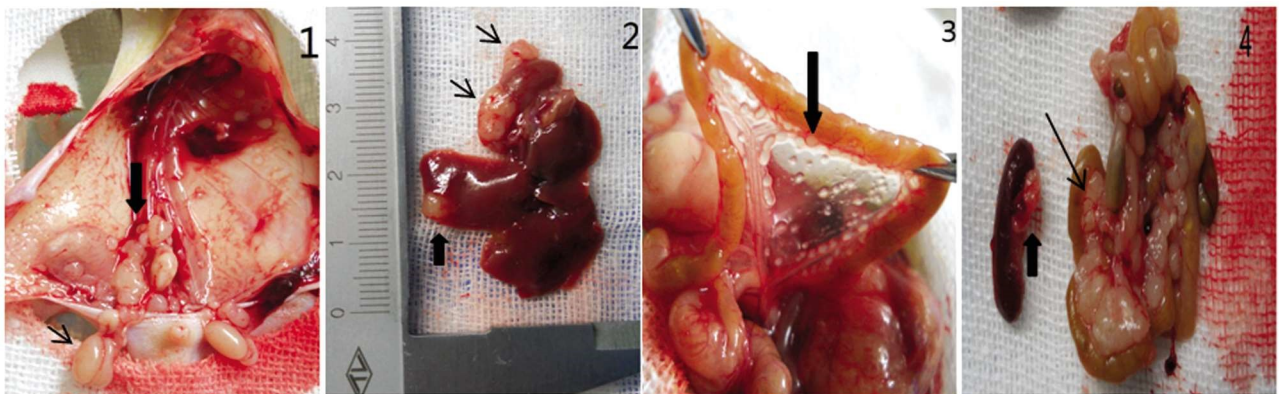


图6 裸鼠不同部位远处转移情况

Fig.6 Distant metastasis in different parts of nude mice

注: 1: 腹腔淋巴结转移, 粗黑箭头所指为转移淋巴结融合成团; 2: 肝脏转移, 箭头所指为多发转移灶; 3: 肠系膜转移, 箭头所指为肠系膜多发粟粒样转移结节; 4: 脾脏及腹膜转移, 粗黑箭头所指为脾脏转移灶, 细黑箭头所指为腹膜转移灶。

Note: 1: abdominal lymph node metastasis, thick black arrow refers to metastatic lymph node fusion cluster; 2: liver metastasis, arrow refers to multiple metastases; 3: mesenteric metastasis, arrow refers to mesenteric multiple miliary metastatic nodules; 4: metastasis of spleen and peritoneum, the thick black arrow refers to the splenic metastasis and the fine black arrow refers to the peritoneal metastasis.

SDF-1, 又称 CXCL12, 与其跨膜 G 蛋白偶联受体 CXCR4 和 CXCR7 广泛表达于多种组织和细胞中, 在免疫、循环及中枢神经系统发育中发挥重要生理作用, 同时也是肿瘤细胞与其微环境相互作用的关键因素, 与肿瘤细胞的生长、侵袭、转移等病理过程密切相关^[89]。研究报道 SDF-1 高表达能增强舌癌细胞株 Tca8113^[10]、人绒毛膜癌细胞株 JAR^[11]、宫颈癌细胞^[12]、胃癌

细胞株 MGC-803^[6]增殖、侵袭及迁移能力。SDF-1 过表达可以导致胃上皮细胞过度增殖, 诱导胃黏膜上皮细胞异型增生和肿瘤形成^[13], 而抑制其表达能够诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡^[14]。然而上述研究均局限于体外, 关于 SDF-1 对肿瘤影响的体内实验研究颇少。因此本实验建立沉默 SDF-1 基因表达的人胃癌 SGC7901 裸鼠模型, 以观察其对裸鼠胃癌原位移植瘤生物学行

为的影响。实验结果表明沉默 SDF-1 基因表达能够显著抑制裸鼠原位移植瘤生长增殖,诱导其凋亡,抑制其肝脏、腹腔淋巴结转移。这与体外实验结果具有一致性,表明 SDF-1 具有癌基因特征,其高表达能够促进肿瘤生长增殖、侵袭转移并抑制其凋亡。

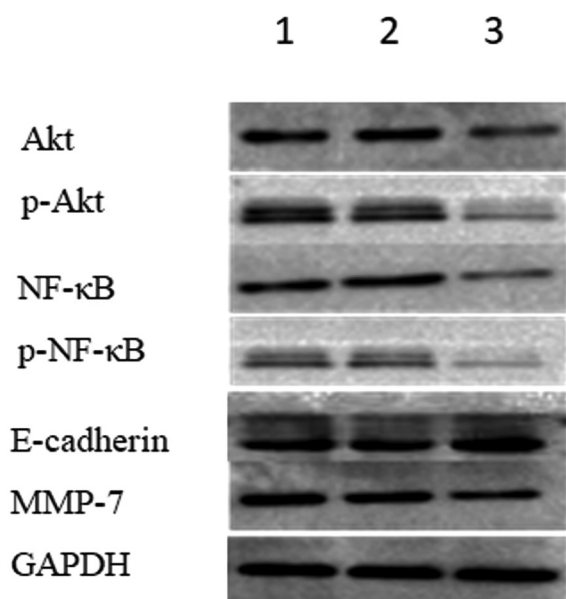


图 7 各组裸鼠肿瘤组织中 Akt、p-Akt、NF-κB、p-NF-κB、E-cadherin、MMP-7 蛋白的表达

Fig.7 The protein expression of Akt, p-Akt, NF-κB, p-NF-κB, E-cadherin, MMP-7 in tumor tissues of nude mice in each group

注:1:空白对照组;2:阴性对照组;3:RNAi-SDF-1 组。

Note: 1: blank control group; 2: negative control group; 3: RNAi-SDF-1 group.

表 3 各组裸鼠肿瘤组织中 Akt、p-Akt、NF-κB、p-NF-κB、E-cadherin、MMP-7 蛋白表达水平比较

Table 3 Comparison of Akt, p-Akt, NF-κB, p-NF-κB, E-cadherin, MMP-7 protein expression in tumor tissues of nude mice in each group

Groups	Akt	p-Akt	NF-κB	p-NF-κB	E-cadherin	MMP-7
Blank control group	0.380 ± 0.031	0.194 ± 0.016	0.352 ± 0.033	0.171 ± 0.014	0.480 ± 0.042	0.686 ± 0.092
Negative control group	0.377 ± 0.033	0.185 ± 0.017	0.356 ± 0.034	0.164 ± 0.017	0.475 ± 0.041	0.699 ± 0.082
RNAi-SDF-1 group	0.223 ± 0.015*	0.121 ± 0.009*	0.215 ± 0.016*	0.102 ± 0.008*	0.657 ± 0.038*	0.454 ± 0.033*
F	52.380	38.360	37.735	39.771	32.623	17.346
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note:* $P < 0.01$, compared with blank and negative control group.

明 SDF-1 与 E-cadherin 之间可能存在某种负反馈调节。基质金属蛋白酶(MMPs)能够分解一种或多种细胞外基质成分,在肿瘤激活、生长、侵袭过程中发挥关键作用^[27]。MMP-7 是MMP 家族成员之一,既能降解细胞外基质组分,又能处理细胞表面分子,如前 - 防御素、As 配体、E-cadherin 等^[27]。研究报道SDF-1 能够促进 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达增强舌癌侵袭转移能力^[10]。这说明 SDF-1 与 MMP7 之间可能存在某种正反馈调节。为验证上述推论,本实验检测了上述两种蛋白的表达情况,结果表明 SDF-1 沉默能够显著上调裸鼠原位移植瘤 E-cadherin 的表达并下调 MMP7 的表达,从而抑制肿瘤的侵袭和转移。

综上所述,本实验成功建立人胃癌 SGC7901 裸鼠原位移

PI3K/Akt 信号通路是参与细胞多重生命活动的关键细胞信号通路,在肿瘤发展进程中发挥重要作用^[15]。PI3K-Akt 信号通路激活能够促进胃癌细胞迁移和侵袭^[16],受抑能够促进胃癌细胞凋亡^[15]。研究报道 SDF-1/CXCR4 通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进恶性颅咽管瘤的增殖、迁移和侵袭^[17]。SDF-1 能够诱导间质细胞产生 TNF-α,促进肿瘤生长^[18],也能够通过激活 PI3K/Akt 通路诱导 VEGF 生成^[19],促进胃癌细胞增殖、侵袭并增强其抗凋亡能力^[4]。NF-κB 信号通路是调控细胞增殖和凋亡的信号级联放大反应通路^[20],与 PI3K/Akt 信号通路存在密切关联。Akt 能够直接或间接调节 IKK 活性,促使 IκB 磷酸化和泛素化,导致 NF-κB 核转位,增加其转录活性^[16]。研究报道 SDF-1/CXCR4 通过激活 NF-κB 信号通路能够促进人甲状腺乳头状癌 B-CPAP 细胞迁移、侵袭和上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)^[21],而 NF-κB 激活又能够通过增加 SDF-1 的表达促进胰腺癌细胞生长,使胰腺癌细胞逃避细胞毒性 T 细胞的浸润和杀伤^[22]。本实验检测了 PI3K/Akt 和 NF-κB 两种通路关键蛋白的表达,结果显示 RNAi-SDF-1 组肿瘤组织中 Akt、NF-κB、p-Akt、p-NF-κB 蛋白表达水平均明显低于空白及阴性对照组,表明 SDF-1 沉默能够通过抑制 PI3K/Akt 和 NF-κB 双通路进而实现对裸鼠原位移植瘤生物学行为的调控。

侵袭和转移是导致胃癌患者临床致死的主要原因。肿瘤细胞实现远处侵袭和转移,首先要从原发肿瘤中分离出来,并具备降解细胞外基质、侵袭和迁移的运动能力^[23,24]。E-cadherin 是介导细胞间相互连接的跨膜黏连糖蛋白,其表达缺失导致细胞粘附功能和细胞间连接均丧失,并且促进 EMT 进程,从而使肿瘤细胞易于从原发肿瘤中分离出来,并获得更强的侵袭和转移能力^[23,25]。研究表明 SDF-1 对 EMT 具有正向促进作用^[21,26]。这说

植瘤模型,并发现沉默 SDF-1 基因表达能够有效抑制裸鼠原位移植瘤的生长,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制其腹腔淋巴结、肝脏转移,其机制可能与抑制 PI3K-Akt、NF-κB 信号通路及 MMP-7 的表达并上调 E-cadherin 的表达相关。但本实验研究结果可能只是 SDF-1 发挥作用的部分机制,另有报道 SDF-1 能够激活 MEK/ERK 信号通路调控胶质母细胞瘤 U-251 细胞周期进程^[26]。由此可见 SDF-1 可能通过对多种信号通路的共同调控在体内发挥生物学效应,以 SDF-1 为靶点的抗癌药物可能具有多靶点广谱抗癌活性。最后,本实验由于客观原因裸鼠样本量较少,未观察其对脾脏、腹膜等器官转移的影响,盼望后来者以此为切入点继续研究。

参考文献(References)

- [1] 姚芳, 石春雷, 刘成成, 等. 中国 1996-2015 年胃癌经济负担研究的系统评价[J]. 中华预防医学杂志, 2017, 51(8): 756-762
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [3] 仇志富, 吴晓光. SDF-1/CXCR4 生物学自噬轴与脑缺血损伤研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(9): 2295-2298
- [4] 吕晓业, 王健, 李山虎, 等. SDF-1/CXCR4 轴在胃癌中的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(2): 159-161, 195
- [5] 杨娜, 朱澜, 邢立娟, 等. 急性白血病患者血清 SDF-1、GM-CSF、 α -HBDH 的表达水平及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(8): 1416-1418
- [6] 黎曙明, 华永龙, 叶志祥, 等. CXCR7、SDF-1 在胃癌组织中的表达及对胃癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 河北医药, 2018, 40(18): 2725-2729
- [7] 杨文博, 孔佩艳, 常城, 等. 特异性 RNA 干扰抑制骨髓基质细胞 SDF-1 表达对 Jurkat 细胞黏附及药物敏感性的影响[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(8): 458-460
- [8] Zhou Y, Cao HB, Li WJ, et al. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: Oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy [J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(11): 801-810
- [9] 欧阳卓, 孙晋萍, 田秀兰, 等. 基质细胞衍生因子-1 和趋化因子受体-4 在子宫内膜异位症患者病灶中的表达及意义[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(23): 1854-1858
- [10] 孙小英, 李敬芳. SDF-1/CXCR4 在舌癌组织中的表达及对舌癌细胞系 Tca8113 增殖、迁移和侵袭的影响研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(6): 788-792, 796
- [11] 张展, 李爱萍, 王媛媛, 等. SDF-1/CXCR4 轴对人绒毛膜癌细胞侵袭、迁移能力的影响及意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(6): 418-423
- [12] Yadav SS, Prasad SB, Prasad CB, et al. CXCL12 is a key regulator in tumor microenvironment of cervical cancer: an in vitro study [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33(5): 431-439
- [13] Shibata W, Ariyama H, Westphalen CB, et al. Stromal cell-derived factor-1 overexpression induces gastric dysplasia through expansion of stromal myofibroblasts and epithelial progenitors[J]. Gut, 2013, 62(2): 192-200
- [14] Fu Z, Zhang P, Luo H, et al. CXCL12 modulates the radiosensitivity of cervical cancer by regulating CD44[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6): 5101-5108
- [15] 陈龙云, 柳叶. 抑制 PI3K/AKT 信号通路能够诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 1976-1980
- [16] 宋静静, 单保恩, 王浩, 等. 外源性 IL-17 对胃癌细胞生物学特性的影响及其机制研究[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(11): 867-873
- [17] Yin X, Liu Z, Zhu P, et al. CXCL12/CXCR4 promotes proliferation, migration, and invasion of adamantinomatous craniopharyngiomas via a PI3K/AKT signal pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 23
- [18] Gu HQ, Zhang ZB, Zhang JW, et al. The role of the SDF-1/CXCR7 axis on the growth and invasion ability of endometrial cancer cells[J]. Archives of gynecology and obstetrics, 2017, 295(4): 987-995
- [19] 陈玉琴, 林丽, 张子阳, 等. SDF-1/CXCR4 在糖尿病肾组织中的表达及其与微血管异常的关系 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(12): 1870-1873
- [20] Duan H, Chen L, Qu L, et al. Mycoplasma hyorhinis infection promotes NF- κ B-dependent migration of gastric cancer cells [J]. Cancer Res, 2014, 74(20): 5782-5794
- [21] Lin Y, Ma Q, Li L, et al. The CXCL12-CXCR4 axis promotes migration, invasiveness, and EMT in human papillary thyroid carcinoma B-CPAP cells via NF- κ B signaling [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(5): 619-626
- [22] Garg B, Giri B, Modi S, et al. NF- κ B in Pancreatic Stellate Cells Reduces Infiltration of Tumors by Cytotoxic T Cells and Killing of Cancer Cells, via Up-regulation of CXCL12 [J]. Gastroenterology, 2018, 155(3): 880-891. e8
- [23] Alisha M, Mendonsa, Tae-Young Na, et al. E-cadherin in contact inhibition and cancer. Oncogene, 2018, 37(35): 4769-4780
- [24] 单雄威, 于小明, 王广发, 等. 二磷酸腺苷核糖基化因子 6 与肿瘤侵袭和迁移关系的研究进展 [J]. 广东医学, 2016, 37(13): 2036-2038
- [25] Borcherdig N, Cole K, Kluz P, et al. Re-Evaluating E-Cadherin and β -Catenin: A Pan-Cancer Proteomic Approach with an Emphasis on Breast Cancer[J]. Am J Pathol, 2018, 188(8): 1910-1920
- [26] Liao AY, Shi RR, Jiang YL, et al. SDF-1/CXCR4 Axis Regulates Cell Cycle Progression and Epithelial-Mesenchymal Transition via Up-regulation of Survivin in Glioblastoma[J]. Molecular neurobiology, 2016, 53(1): 210-215
- [27] 吴伟东, 罗磊, 丁锋. 肺癌相关基质金属蛋白酶研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(13): 93-96
- [28] Italian societies [J]. Journal of Endocrinological Investigation, 2018, 41(3): 1-28
- [29] Nasef H O, Nixon I J, Wreesmann V B. Optimization of the risk-benefit ratio of differentiated thyroid cancer treatment[J]. Eur J Surg Oncol, 2018: 276-285
- [30] Sager S, Hatipoglu E, Gunes B, et al. Comparison of day 3 and day 5 thyroglobulin results after thyrogen injection in differentiated thyroid cancer patients [J]. Therapeutic Advances in Endocrinology & Metabolism, 2018, 9(6): 177

(上接第 3342 页)

- [26] Probst S, Abikhzer G, Chaussé G, et al. I-131 Radiation n-Induced Myelosuppression in Differentiated Thyroid Cancer Therapy [J]. Molecular Imaging & Radionuclide Therapy, 2018, 27(2): 84
- [27] Liu C L, Yang P S, Chien M N, et al. Expression of serine peptidase inhibitor Kunitz type 1 in differentiated thyroid cancer[J]. Histochemistry & Cell Biology, 2018, 149(6): 1-10
- [28] Pacini F, Basolo F, Bellantone R, et al. Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six