

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.11.008

shASPP2 H22 稳转肝癌细胞系的构建及 ASPP2 敲低对 H22 移植瘤小鼠血管生成的影响*

高明慧[#] 霍云飞[#] 寇卜心 柴梦音 李全维 豆双双 庞丽君 刘晓霓[△]

(北京肝病研究所 首都医科大学附属北京佑安医院 北京 100069)

摘要 目的:构建小鼠 shASPP2 H22 稳转肝癌细胞系,观察 ASPP2 敲低对血管生成的影响。**方法:**针对小鼠 ASPP2 基因设计了 3 个不同的 shRNA 干扰序列(Y18421, Y18422, Y18423)及 1 个对照序列(GL427NC2),采用双酶切(Age I 和 EcoR I)及质粒连接构建重组质粒,使用菌落 PCR 和测序比对进行鉴定;使用 293T 细胞将各重组质粒包装慢病毒并测定滴度;将 shASPP2 和对照慢病毒质粒转染 H22 细胞,采用流式细胞术测定转染效率;采用 qRT-PCR、Western Blot 法观察 shASPP2 慢病毒对 H22 细胞 ASPP2 的干扰效果;采用 CCK8 法观察 ASPP2 敲低对 H22 细胞增殖的影响;采用 Western Blot 法观察 ASPP2 敲低对 H22 细胞及上清 VEGF 表达和分泌的影响;采用细胞注射法建立小鼠 ASPP2 敲低 H22 细胞皮下移植瘤模型,游标卡尺法观察肿瘤体积大小,采用活体激光共聚焦观察肿瘤血管生成情况,采用 Western Blot 法观察肿瘤组织 VEGF 的表达。**结果:**双酶切、菌落 PCR 和测序鉴定结果显示各重组质粒构建成功;各重组质粒经慢病毒包装后,测定显示 Y18421、Y18422、Y18423 和 GL427NC2 慢病毒质粒的滴度分别为 3.40×10^8 TU/mL、 4.08×10^8 TU/mL、 5.49×10^8 TU/mL 和 1.7×10^9 TU/mL;Y18421、Y18422、Y18423 及 GL427NC2 慢病毒质粒转染效率分别为:86.2%、69.6%、60.8%和 76.9%。与 GL427NC2 H22 细胞相比,Y18421 H22 细胞的 ASPP2 mRNA 及蛋白的表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);Y18421 细胞在培养 24, 48, 72 h 后增殖速率显著增加($P < 0.0001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$);Y18421 细胞及上清的 VEGF 表达显著升高($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 GL427NC2 细胞移植瘤相比,Y18421 细胞移植瘤体积明显增大($P < 0.05$),总血管长度显著增加($P < 0.05$),VEGF 蛋白的表达明显上调($P < 0.05$)。**结论:**小鼠 shASPP2 H22 稳转肝癌细胞系构建成功,ASPP2 敲低可能通过上调 VEGF 的表达促进小鼠 H22 细胞移植瘤血管生成。

关键词:H22 细胞;肿瘤蛋白 p53 结合蛋白 2;血管内皮生长因子;血管生成

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)11-2043-09

Construction of shASPP2 H22 Stable Hepatoma Cell Line and the Effect of ASPP2 Knockdown on Angiogenesis in H22 Xenograft Mice*

GAO Ming-hui[#], HUO Yun-fei[#], KOU Bu-xin, CHAI Meng-yin, LI Quan-wei, DOU Shuang-shuang, PANG Li-jun, LIU Xiao-ni[△]

(Beijing Institute of Hepatology, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To construct mouse shASPP2 H22 stable hepatocarcinoma cell line and observe the effect of ASPP2 knockdown on angiogenesis. **Methods:** Three shRNA sequences (Y18421, Y18422, Y18423) and one control sequence (GL427NC2) were designed for mouse ASPP2 gene. Recombinant plasmid was constructed by double enzyme digestion (Age I and EcoR I) and plasmid ligation, colony PCR and sequencing alignment were used to identify it. 293T cells were used to package the lentivirus with each recombinant plasmid and determined the titers. H22 cells were transfected with shASPP2 and control lentivirus plasmids, the transfection efficiency was determined by flow cytometry. qRT-PCR, Western Blot were used to observe the interference effect of shASPP2 lentivirus on ASPP2 expression in H22 cells. CCK8 assay was used to observe the effect of ASPP2 knockdown on the proliferation of H22 cells. Western Blot was used to observe the effect of ASPP2 knockdown on the expression and secretion of VEGF in H22 cells and supernatant. The mouse subcutaneous xenograft model of ASPP2 knockdown H22 cells was established by cell injection. The tumor volume was observed by vernier caliper method, the tumor angiogenesis was observed by in vivo laser confocal microscopy, and the expression of VEGF in tumor tissue was detected by Western Blot. **Results:** The results of double enzyme digestion and colony PCR and sequencing alignment showed that the recombinant plasmids were successfully constructed. The titers of Y18421, Y18422, Y18423 and GL427NC2 were 3.40×10^8 TU/mL, 4.08×10^8 TU/mL, 5.49×10^8 TU/mL and 1.7×10^9 TU/mL, respectively. Flow cytometry

* 基金项目:北京自然科学基金项目(7192084);北京市公共医学研究所发展改革试点项目(京医研 2021-10);

首都卫生发展科研专项(2020-2-1152);国家自然科学基金项目(82003200)

为共同第一作者

作者简介:高明慧(2000-),女,硕士研究生,主要研究方向:肝癌发生发展分子机制,E-mail: minghui512484@163.com;

霍云飞(1999-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝癌发生发展分子机制,E-mail: yunfeihuo@mail.ccmu.edu.cn

△ 通讯作者:刘晓霓(1972-),女,硕士生导师,主要研究方向:肝癌机制研究及治疗靶点的发现;人源化动物模型构建及应用,

E-mail: liuxiaoni888@ccmu.edu.cn

(收稿日期:2023-12-23 接受日期:2024-01-18)

showed that the transfection efficiency of lentiviral plasmid Y18421, Y18422, Y18423 and GL427NC2 were 86.2%, 69.6%, 60.8 % and 76.9 %, respectively. The expression of ASPP2 mRNA and protein in Y18421 cells was significantly lower than that in GL427NC2 cells ($P<0.01$, $P<0.05$); CCK8 results showed that the proliferation rate of Y18421 cells was significantly increased after cultured 24, 48 and 72 h ($P<0.0001$, $P<0.001$, $P<0.01$); The expression of VEGF in Y18421 cell and its supernatant were significantly increased ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$); Compared with GL427NC2 cells, Y18421 cells transplanted tumor volume was significantly increased ($P<0.05$), Total vessel length increased significantly ($P<0.05$), and the expression of VEGF protein was significantly up-regulated in Y18421 cells ($P<0.05$).

Conclusion: The mouse shASPP2 H22 stable hepatoma cell line was successfully constructed. ASPP2 knockdown can promote the angiogenesis of mouse H22 cell transplantation tumor by promoting the expression of VEGF.

Key words: H22 cells; Tumor protein p53-binding protein 2; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)11-2043-09

前言

p53 凋亡刺激蛋白 (apoptosis stimulating protein of p53, ASPP)家族包括两个抑癌基因(ASPP1 和 ASPP2)及 1 个癌基因(抑制性 ASPP[iASPP])^[1,2]。ASPP2 由 TP53BP2 编码,在细胞损伤后通过多种转录或翻译后机制表达上调, 促进细胞凋亡^[3,4]。研究表明 ASPP2 的表达下调与多种肿瘤的发生发展和临床预后不良密切相关^[5-9]。ASPP2 表达下调可通过激活 NF- κ B、甲羟戊酸酯、TGF- β 1、PI3K/AKT、aPKC-1 /GLI1 等途径促进肿瘤生长和转移^[10]。肿瘤血管生成是肿瘤侵袭、浸润和转移的重要事件^[11]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是诱导肿瘤血管生成的主要血管生长因子^[12-15]。肿瘤细胞可以通过自分泌和旁分泌的方式合成和分泌 VEGF, 在肿瘤周围及内部形成丰富血管网^[16-18], VEGF 也可通过阻碍 T 细胞等免疫细胞的肿瘤浸润, 促进调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg)、髓系抑制细胞 (Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、M2 型肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated Macrophages, TAMs) 向肿瘤间质的迁移, 并促进 CXCL1 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1)、CXCL8 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 8) 等趋化因子的分泌^[19,27], 从而促进肿瘤的生长和进展。但 ASPP2 是否影响肿瘤细胞的 VEGF 的表达尚未见报道。本研究通过 RNA 干扰技术 ASPP2 敲低稳转肝癌 H22 细胞系, 观察 ASPP2 敲低对小鼠 H22 肝癌细胞移植瘤血管生成及 VEGF 表达的影响, 为进一步探讨 ASPP2 在肝癌发生发展中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝癌 H22 细胞和人胚肾 293T 细胞由北京肝病研究所保存, 其亲代均来自中国医学科学院基础医学研究所细胞

资源中心。Age I 和 EcoR I 限制性内切酶购自 NEB 公司; DH5 α pSLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-F2A-Puro-WPRE 载体购自上海和元生物科技有限公司; T4 DNA ligase、慢病毒包装试剂盒、EpFect Transfection Reagent、EvaGreen 2 \times Master Mix 购自 Syngen 公司; FastPure Cell/tissue Total RNA Isolation Kit V2 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PrimeScriptTM II 1ST Strand cDNA Synthesis Kit、TB Green Premix Ex TaqTM 购自 Takara 公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自 Aidlab 公司; 彩虹 180 广谱蛋白 Marker、Evans Blue 购自北京索莱宝科技有限公司; RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清和 Puromycin 均购自 Gibco 公司; GAPDH、 β -actin、辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司; ASPP2、VEGF 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H22 细胞和 293T 细胞复苏后分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基和 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 经 2-3 次传代以后, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 小鼠 ASPP2 shRNA 靶点设计及重组质粒的构建 根据美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 提供的核酸序列, 由上海和元生物合成 3 条针对小鼠 ASPP2 基因 (GENBANK: NM_173378.2) 的干扰序列和 1 条对照序列, 序列见表 1。

将合成好的 oligo 用 oligo annealing buffer 溶解成 20 μ M, 互补单链各取 30 μ L 混合。然后将 oligo 混合物在水浴锅中 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 自然冷却至室温, 形成双链 oligo 片段; 使用 Age I 和 EcoR I 限制性内切酶双酶切干扰载体 pSLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-F2A-Puro-WPRE (loop 茎环结构为 CTCGAG, 载体图谱见图 1), 获得线性化载体质粒, 酶切产物

表 1 小鼠 ASPP2 基因干扰序列

Table 1 Interference sequence of mouse ASPP2 gene

Sequence name		Interference sequence
ASPP2	Y18421	5' GCAGTACCAATCTGCAGAATA3'
	Y18422	5' -CTAGGACTATACCCAAGAAT-3'
	Y18423	5' GCAACAACAGAGGGAGTGT3'
Control	GL427NC2	5' -CCTAAGTGAAGTCGCCCTCG3'

进行琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,将目的载体条带从胶中切割进行胶回收,与干扰序列双链 DNA 进行 16℃ 过夜连接,连接体系见表 2,完成重组质粒的构建;次日取 2 μL 连接产物,使用热激法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含氨苄西

林的 LB 固体培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜培养,挑取单克隆菌落并培养,用菌落 PCR 法鉴定重组质粒,引物序列信息见表 3,将阳性重组质粒送专业公司进行 DNA 测序,测序结果用 Vector NTI 软件进行比对和分析。

表 2 重组质粒连接反应体系

Table 2 Recombinant plasmid linking reaction system

Reagent	Positive control(μL)	Self-linking control(μL)	Link group(μL)
Annealed double strand oligo(10 mM)	1	-	1
Linearized interference carrier (40 ng/μL)	3	3	3
10×T4 DNA ligase Buffer	2	2	2
T4 DNA ligase	1	1	1
dd H ₂ O	13	14	13

Note: The annealed double-strand oligo added to the positive control is the previously annealed fragment for verification, and the length of the annealed double-strand oligo added to the link group is the same, but it has nothing to do with the target sequence.

表 3 引物序列信息

Table 3 Primer sequence information

Primer name	Sequence information(5' to 3')	Product length(bp)
Y18421	F:CCGGGCAGTACCAATCTGCAGAATACTC GAGTATTCTGCAGATTGGTACTGCTTTTTTG R:AATTCAAAAAAGCAGTACCAATCTGCAG AATACTCGAGTATTCTGCAGATTGGTACTGC	
Y18422	F:CCGGGCTAGGACTATAACCAAGAATCTCG AGATTCTGGGTATAGTCCTAGCTTTTTTG R:AATTCAAAAAAGCTAGGACTATAACCAAG AATCTCGAGATTCTGGGTATAGTCCTAGC	
Y18423	F:CCGGGCAACAACAGAGGGAGTGTTCCTCG AGAAACTCCCTCTGTTGTTGCTTTTTTG R:AATTCAAAAAAGCAACAACAGAGGGAG TGTTTCTCGAGAAACTCCCTCTGTTGTTGC	474
GL427NC2	F:CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCG AGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTTG R:AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCC TCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG	

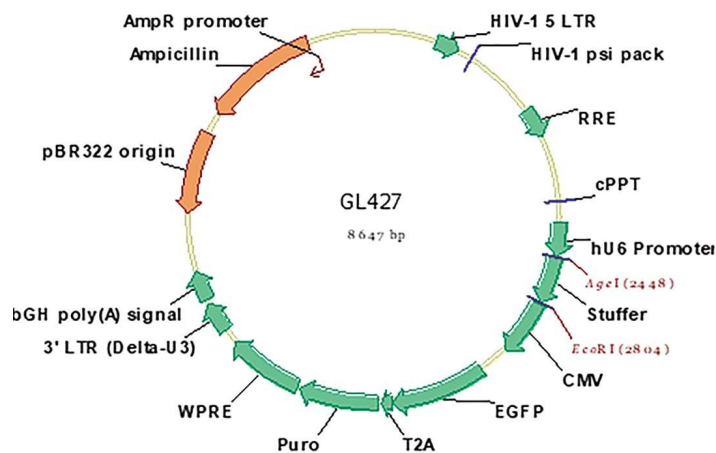


图 3 小鼠 ASPP2 慢病毒质粒测序结果 A: Y18421 测序结果; B Y18422 测序结果; C: Y18423 测序结果; D: GL427NC2 测序结果。

Fig. 3 Sequencing results of mouse ASPP2 lentivirus plasmid A: Y18421; Sequencing results of BY18422;

C: Y18423 sequencing results; D: GL427NC2 sequencing results.

表 4 引物序列

Table 4 Primer sequence

Primer name	Sequence information(5' to 3')
GAPDH	F:TGTTTCCTCGTCCCGTAGA
	R:ATCTCCACTTTGCCACTGC
ASPP2	F:GTACCCAGAGTGCTGGAAC
	R:AGGCTTGCCATACACACTTGA
VEGF	F:ATTGGAGCCTTGCCCTTG
	R:CTCGATTGGATGGCAGTAG

1.2.3 重组质粒慢病毒包装 10 cm 细胞培养皿培养 293T 细胞,当细胞生长到汇合率为 70 %-80 %时,按照慢病毒包装试剂盒进行慢病毒包装转染。在转染 48 h 后,收集含有慢病毒的细胞上清液,更换新鲜培养基继续培养 24 h,再次收集细胞上清。将收集到的细胞上清和浓缩试剂按照 5:1 的比例混合。混匀后 4 °C 静置,每隔 30 min 混匀一次,共进行 3 次混匀,4 °C 过夜孵育。于 4 °C,4000×g 离心 30 min,小心去除上清,收集沉淀。PBS 重悬沉淀,即得到病毒浓缩液,-80 °C 冰箱保存待用。

1.2.4 慢病毒质粒滴度测定 将生长状态良好的 293T 细胞消化计数,每孔取 1×10^5 个细胞加入 6 孔板。放入 37 °C,5 % CO₂ 培养箱中过夜培养。将每种病毒分别按 0.1 μL、1 μL 和 10 μL 体积接种。培养 48 h 后荧光显微镜观察 293T 细胞荧光表达情况并拍照,提取基因组 DNA,进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 实验的扩增/检测对象为慢病毒载体上的 WPRE 序列(WPRE 序列可以随目的基因整合入细胞基因组)。根据公式 $TU_{mL-1} = (C \times N \times D \times 1000) / V$,计算出慢病毒滴度。其中,C 为平均每基因组整合的病毒拷贝数;N 为感染时细胞的数目;D 为病毒载体的稀释倍数,V 为加入的稀释病毒的体积数(μL)。

1.2.5 小鼠 shASPP2 H22 稳转肝癌细胞系的构建 将 H22 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板,过夜培养后,在孔中加入慢病毒质粒转染,转染 24 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h,分别用终浓度为 6 μg/mL 和 2 μg/mL 的嘌呤霉素进行筛选和维持培养。采用流式细胞术观察慢病毒质粒的转染效率。

1.2.6 ASPP2 及 VEGF mRNA 的表达 采用 qRT-PCR 法。收集细胞,提取总 RNA,反转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:上、下游引物各 0.4 μL,cDNA 1 μL,SYBR 10 μL,ROX 0.4 μL,RNase H₂O 7.8 μL,共 20 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s;60 °C 退火并延伸 1 min,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法分析 ASPP2 及 VEGF mRNA 水平变化。引物序列见表 4。

1.2.7 ASPP2 和 VEGF 蛋白的表达 采用 Western Blot 法。用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液将细胞冰上裂解 30 min,提取总蛋白。将蛋白印迹用 5 % 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,室温 TBST 洗膜 3 次。加入 IgG 二抗室温孵育 1 h,室温 TBST 洗膜 3 次,使用凝胶成像系统拍摄,Image J 进行灰度值分析。

1.2.8 H22 细胞增殖能力的检测 采用 CCK8 法。以每孔 4000 细胞接种于 96 孔板培养,于 0、24、48 h 和 72 h 分别加入 CCK8 溶液,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm

的吸光度值,通过公式:细胞增殖速率=(各时间点 OD₄₅₀ 吸收值 - 培养基空白对照 OD₄₅₀ 吸收值的平均值) / [(0 h OD₄₅₀ 吸收值 - 培养基空白对照 OD₄₅₀ 吸收值的平均值)平均值]来计算细胞增殖速率。

1.2.9 细胞上清中 VEGF 蛋白的表达 采用离心法及 Western Blot 法。大量收集细胞培养上清,将上清 2000×g 离心 10 min 以去除死细胞,将离心上清 10000×g 离心以去除细胞碎片,将离心上清 11,000×g 离心 70 min 收集沉淀。Western Blot 法检测细胞上清沉淀中 VEGF 蛋白的表达。

1.2.10 小鼠皮下移植瘤模型的构建 采用细胞注射法。分别将 5×10^6 个 GL427NC2 和 Y18421 细胞接种到 4 周龄雄性 Balb/c 小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)腋部皮下,每组 4 只。待最大肿瘤直径达到 1.5 cm 时,小鼠戊巴比妥钠深度麻醉处死,取肿瘤组织 -80 °C 冻存备用。

1.2.11 小鼠移植瘤的血管观察 采用探头式活体激光共聚焦 (cellvizio,法国)观察。上述荷瘤小鼠每组取 2 只,用戊巴比妥钠 (50 mg/kg)腹腔注射对小鼠进行麻醉,将 1% Evans Blue 对小鼠进行尾静脉注射,注射 2~3 min 后,沿小鼠瘤周小心剪开外皮使肿瘤露出,用活体激光共聚焦成像系统的扫描探头在 660 nm 波长下对肿瘤血管进行观察,采用系统软件对肿瘤血管进行定量分析。

1.3 统计学分析

数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各数据资料采用 Graph Pad Prism 8.3 软件进行统计学分析,组间的数据比较采用 Student's *t* 检验,检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 干扰载体酶切及重组质粒菌落 PCR 电泳鉴定

双酶切琼脂糖凝胶电泳结果显示目的载体片段大小在 8000-10000 bp 之间,与预期的 8291 bp 一致,见图 2 A。菌落 PCR 结果显示目的条带大小在 500 bp 附近,与预期的 474 bp 一致,为阳性菌落,见图 2 B。

2.2 重组质粒测序鉴定

将菌落 PCR 鉴定的阳性单克隆菌落进行测序。将测序结果与原始序列信息进行比对。结果显示重组质粒 DNA 序列与目标序列一致,表明各 ASPP2 shRNA 靶点重组质粒构建成功。见图 3。

2.3 重组慢病毒质粒滴度检测

分别用不同量的各慢病毒质粒浓缩液转染 293T 细胞

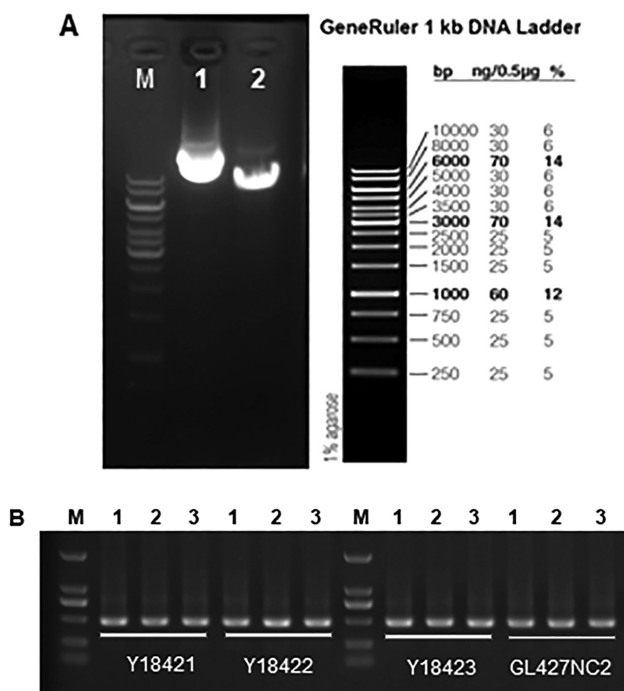


图2 干扰载体酶切及菌落 PCR 电泳鉴定 A:载体酶切电泳结果 (M:1kb DNA ladder Marker;1:GL427 载体条带; 2:GL427 载体酶切后片段条带); B:菌落 PCR 电泳鉴定结果

(M:DL2,000 DNA Marker:2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp; 1-3:每个平板各挑取3个单克隆菌落的 PCR 条带)。

Fig. 2 Interference with carrier enzyme digestion and colony PCR electrophoretic identification A: Results of carrier enzyme digestion electrophoresis (M: 1kb DNA ladder Marker; 1: GL427 carrier band; 2: GL427 carrier enzyme digested fragment strip); B: Colony PCR electrophoretic identification results (M: DL2,000 DNA Marker: 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 1-3: PCR bands of 3 monoclonal colonies were selected from each plate).

48 h, 荧光显微镜观察到所有细胞均具有 GFP 绿色荧光, 见图 4。qRT-PCR 检测 293T 细胞慢病毒质粒载体的 WERE 序列, 根据公式计算 Y18421、Y18422、Y18423 和 GL427NC2 的慢病毒滴度分别为 3.40×10^8 TU/mL、 4.08×10^8 TU/mL、 5.49×10^8 TU/mL 和 1.70×10^9 TU/mL, 见表 5。

2.4 重组慢病毒质粒转染 H22 细胞的效率

流式细胞术检测各慢病毒转染 H22 细胞的效率, 结果显示: Y18421、Y18422、Y18423 和 GL427NC2 慢病毒转染 H22 细胞效率分别为: 86.2%、69.6%、60.8% 和 76.9%, 见图 5。其中, shASPP2 慢病毒中 Y18421 转染效率最高。

2.5 小鼠 shASPP2 稳转 H22 肝癌细胞系的 ASPP2 表达鉴定及增殖速率检测

qRT-PCR 结果显示, 与 GL427NC2 细胞相比, Y18421、Y18422、Y18423 细胞的 ASPP2 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.01$), 见图 6 A; Western Blot 结果显示, 与 GL427NC2 细胞相比, Y18421 细胞的 ASPP2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); CCK8 结果表明, Y18421 细胞在各个时间点增殖速率最快 ($P < 0.0001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)。因此后续选择 Y18421 细胞做为

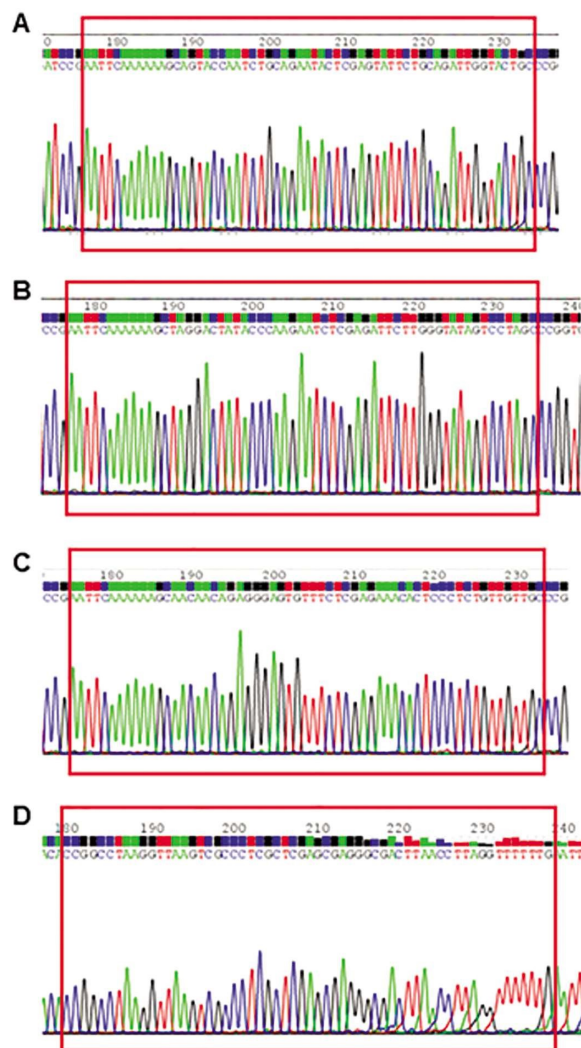


图3 小鼠 ASPP2 慢病毒质粒测序结果 A:Y18421 测序结果;B Y18422 测序结果;C:Y18423 测序结果;D:GL427NC2 测序结果。

Fig. 3 Sequencing results of mouse ASPP2 lentivirus plasmid A: Y18421; Sequencing results of BY18422; C: Y18423 sequencing results; D: GL427NC2 sequencing results.

敲低 ASPP2 的 H22 细胞进行实验。

2.6 ASPP2 敲低对小鼠 H22 细胞 VEGF 表达及分泌的影响

qRT-PCR 结果显示: 与 GL427NC2 细胞相比, Y18421 细胞的 VEGF mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.001$), 见图 7 A。Western Blot 结果显示: 与 GL427NC2 细胞相比, Y18421 细胞及细胞上清的 VEGF 蛋白表达水平也显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.7 ASPP2 敲低对 H22 细胞皮下移植瘤血管生成的影响

荷瘤实验结果显示, 与 GL427NC2 细胞移植瘤相比, Y18421 细胞移植瘤的肿瘤体积明显增大 ($P < 0.05$), 见图 8 A-B; 血管总长度明显增加 ($P < 0.05$), 见图 8 C-D; VEGF 的表达明显上调 ($P < 0.05$), 见图 8 E-F。

3 讨论

已有研究报道, ASPP2 具有促进细胞凋亡, 抑制细胞增殖、抑制细胞迁移等抑癌基因活性^[20], ASPP2 在包括肝癌在内的多种肿瘤中低表达^[5,6,10]。我们既往研究表明 ASPP2 敲除可以通过

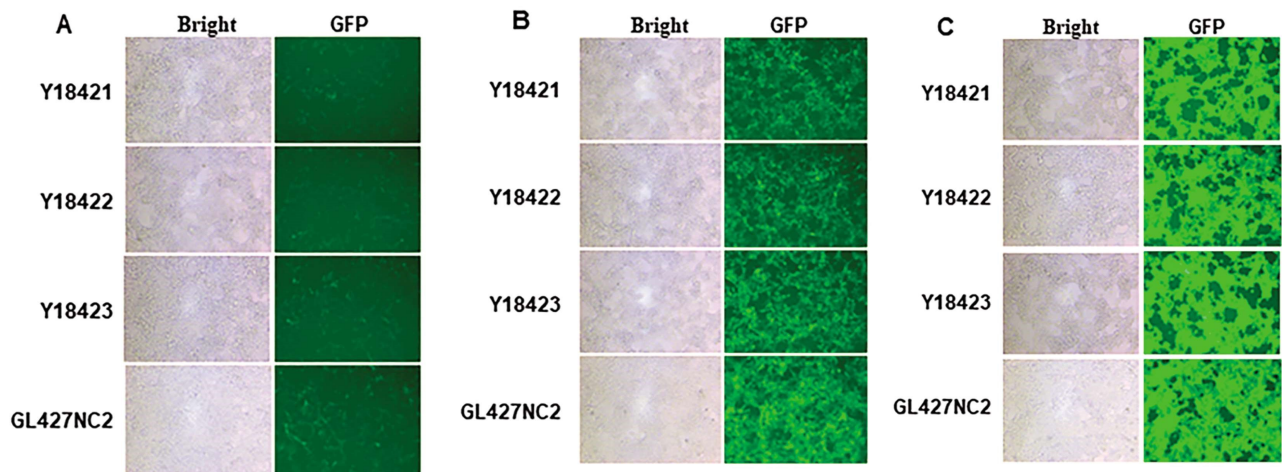


图 4 各重组慢病毒质粒转染 293T 细胞 48 h 后绿色荧光蛋白表达的结果(100×)

A: 0.1 μL 慢病毒转染 293T 细胞荧光表达情况; B: 1 μL 慢病毒转染 293T 细胞荧光表达情况; C: 10 μL 慢病毒转染 293T 细胞荧光表达情况。

Fig.4 The expression of green fluorescent protein in 293T cells transfected with each recombinant lentivirus plasmid for 48 h (100×)

A: 0.1 μL lentivirus. B: The fluorescence expression of 293T cells transfected with 1 μL lentivirus;

C: Fluorescence expression of 293T cells transfected with 10 μL lentivirus.

表 5 小鼠 shASPP2 慢病毒质粒滴度测定

Table 5 Determination of mouse shASPP2 lentivirus plasmid titer

Virus name	Sample number	V value(μL)	C value	N value	D value	Titer(TU/mL)	Mean titer (TU/mL)
Y18421	1	10	18.04	2×10 ⁵	1	3.61×10 ⁸	3.40×10 ⁸
	2	1	1.68	2×10 ⁵	1	3.35×10 ⁸	
	3	0.1	0.16	2×10 ⁵	1	3.24×10 ⁸	
Y18422	1	10	20.61	2×10 ⁵	1	4.12×10 ⁸	4.08×10 ⁸
	2	1	1.78	2×10 ⁵	1	3.57×10 ⁸	
	3	0.1	0.23	2×10 ⁵	1	4.56×10 ⁸	
Y18423	1	10	27.61	2×10 ⁵	1	5.52×10 ⁸	5.49×10 ⁸
	2	1	2.73	2×10 ⁵	1	5.46×10 ⁸	
	3	0.1	1.42	2×10 ⁵	1	5.49×10 ⁸	
GL427NC2	1	10	69.29	2×10 ⁵	1	1.39×10 ⁸	1.7×10 ⁸
	2	1	8.47	2×10 ⁵	1	1.69×10 ⁸	
	3	0.1	1.02	2×10 ⁵	1	2.03×10 ⁸	

激活 NF-κB 通路促进二乙基亚硝胺(DEN)诱导的小鼠肝癌的发生。因此,ASPP2 是肝癌发生发展中重要的抑制因子^[21,23]。为了进一步研究 ASPP2 在肝癌发生发展过程中的生物学作用,本研究利用 RNA 干扰技术构建小鼠 shASPP2 稳转肝癌细胞系,并进行 ASPP2 敲低后细胞的 ASPP2 表型验证以及生物学功能研究。Y18421 重组质粒构建稳转 H22 细胞 ASPP2 表达明显低于对照 H22 细胞,增殖功能实验也显示 Y18421 重组质粒构建稳转 H22 细胞增殖速率显著增加,与以往研究一致^[21,22],说明小鼠 shASPP2 稳转肝癌细胞系构建成功。血管生成是肿瘤发生发展的重要病理特征,在肿瘤微环境中,肿瘤细胞、成纤维细胞、中性粒细胞等细胞可以分泌血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、VEGF 等促血管生成因子,其中 VEGF 在肿瘤血管形成中起着关键作用^[11,32]。VEGF 是

血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子^[24],既能特异性诱导间质产生,促进内皮细胞的分化;还可使血管舒张、增加血管的通透性,促进血浆蛋白在细胞基质中沉积,为成纤维细胞和血管内皮细胞长入提供基质^[25-27]。因此,VEGF 常常作为肿瘤血管形成的重要标志物^[28-31]。VEGF 也通过多种途径削弱细胞毒性 T 细胞等免疫细胞的抗肿瘤作用,促进肿瘤侵袭和转移^[32]。本研究发现体外实验发现 ASPP2 敲低促进了 H22 细胞 VEGF 的表达和分泌,提示 ASPP2 可能影响肿瘤血管生成。进一步移植瘤实验证实,ASPP2 敲低促进小鼠 H22 肝癌移植瘤的血管生成,上调肿瘤组织 VEGF 的表达。因此,ASPP2 可能通过上调肿瘤细胞 VEGF 的生成进而促进肿瘤血管生成。

参考文献(References)

[1] Patel KD, Barasiya YV, Patel JB, et al. Apoptosis stimulating protein

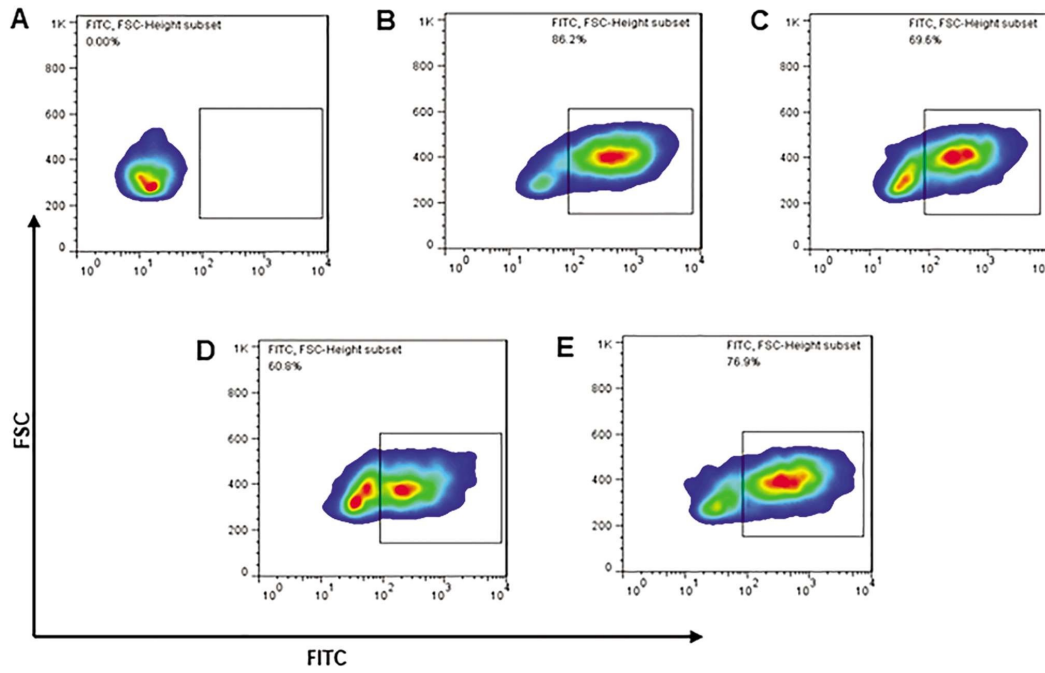


图 5 流式细胞仪检测重组慢病毒质粒转染 H22 细胞的效率 A: 未转染慢病毒的 H22 细胞; B: Y18421 病毒的转染效率; C: Y18422 病毒的转染效率; D: Y18423 病毒的转染效率; E: GL427NC2 病毒的转染效率。

Fig.5 Efficiency of transfection of H22 cells with recombinant lentivirus plasmid by flow cytometry A: H22 cells without lentivirus transfection; B: Transfection efficiency of Y18421 virus; C: Transfection efficiency of Y18422 virus; D: Transfection efficiency of Y18423 virus; E: Transfection efficiency of GL427NC2 virus.

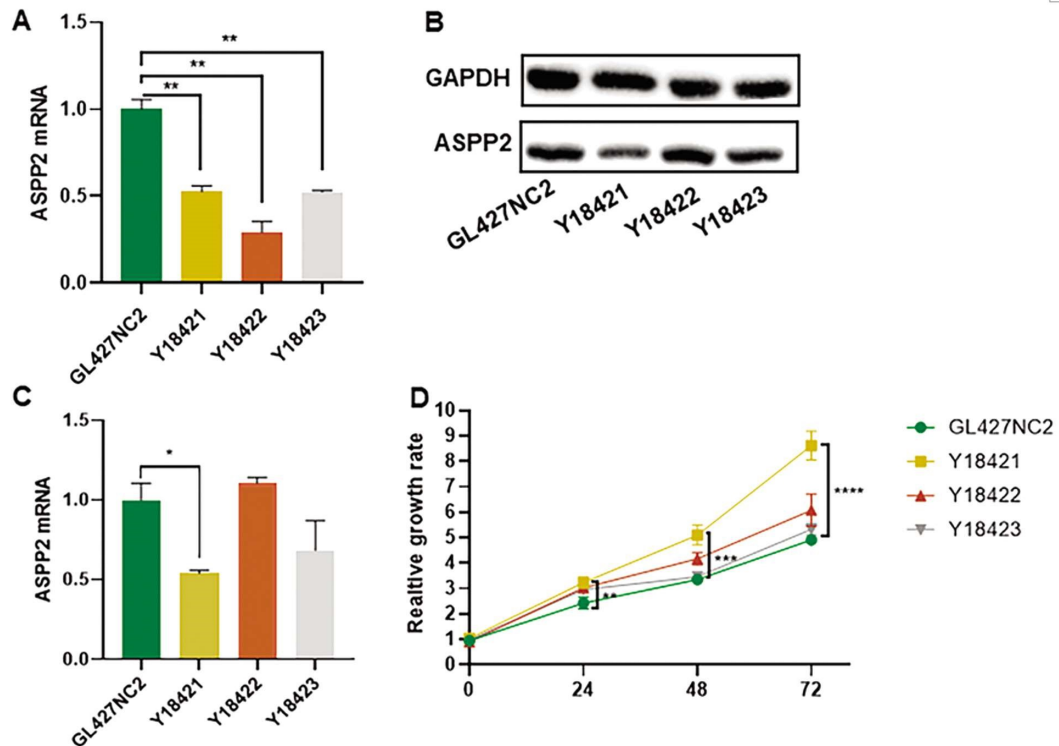


图 6 小鼠 shASPP2 H22 细胞 ASPP2 mRNA 及蛋白表达 A: qRT-PCR 检测各 ASPP2 敲低组及对照组的 ASPP2 mRNA 表达情况; B-C: Western blot 检测各 ASPP2 敲低组及对照组的 ASPP2 蛋白表达情况; D: CCK8 检测各 ASPP2 敲低组及对照组细胞的增殖速率。

**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Fig. 6 Expression of ASPP2 mRNA and protein in mouse shASPP2 H22 cells A: The expression of ASPP2 mRNA ASPP2 knockdown and in the control group was detected by qRT-PCR. B-C: Western blot analysis of ASPP2 protein expression in ASPP2 knockdown and in control group; D: The proliferation rate of ASPP2 knockdown and in control group was detected by CCK8.

**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

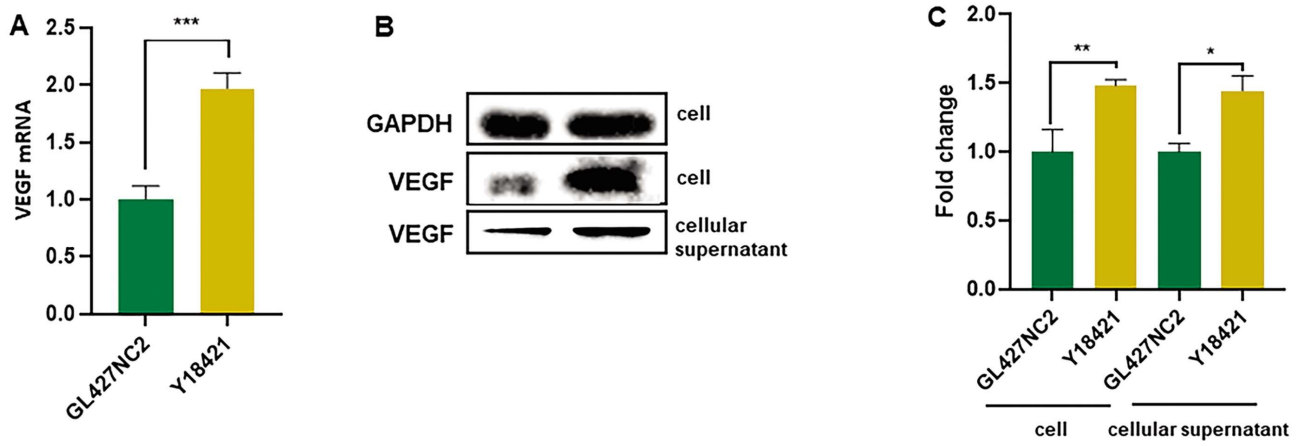


图7 ASPP2 敲低对小鼠 H22 细胞 VEGF 表达及增殖的影响 A: qRT-PCR 检测 Y18421 及 GL427NC2 细胞的 VEGF mRNA 表达情况; B-C: Western blot 检测 Y18421 及 GL427NC2 细胞及细胞上清中 VEGF 蛋白表达情况;*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Fig.7 Effects of ASPP2 knockdown on VEGF expression and proliferation in mouse H22 cells A: qRT-PCR was used to detect VEGF mRNA expression in Y18421 and GL427NC2 cells. B-C: Western blot was used to detect the expression of VEGF protein in Y18421 and GL427NC2 cells and cellular supernatant. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

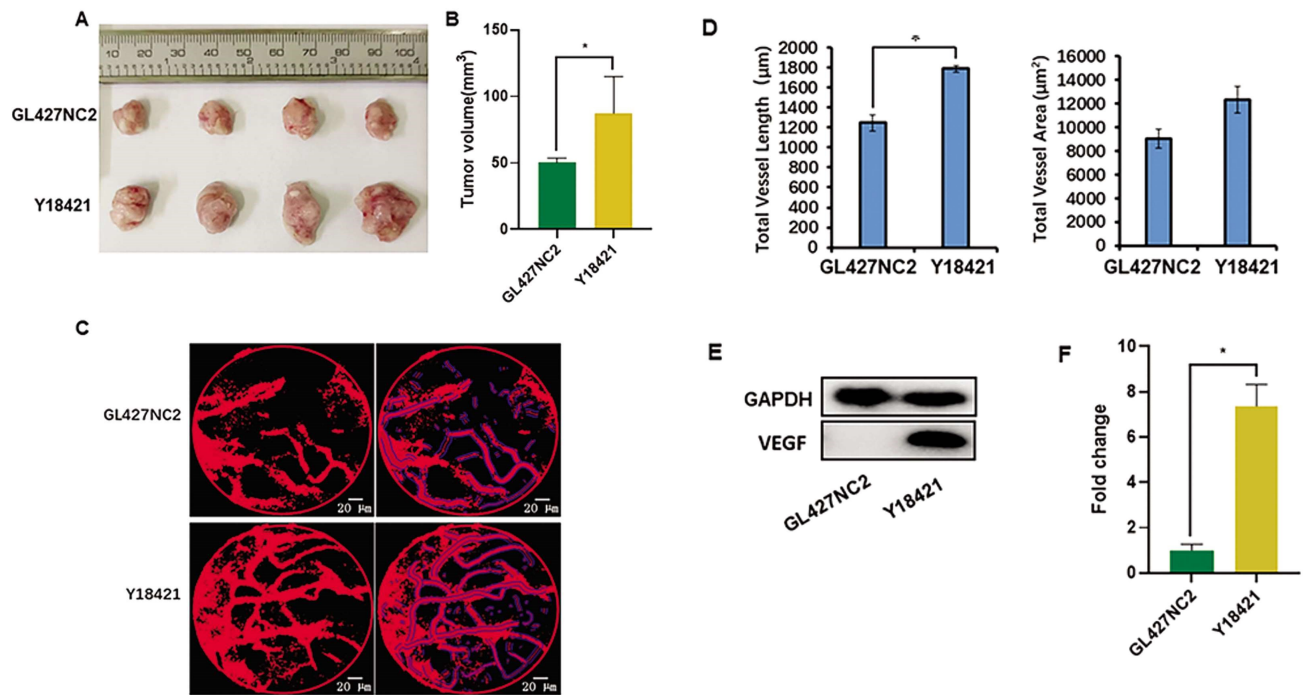


图8 ASPP2 敲低对 H22 移植瘤生长及血管生成的影响 A-B:ASPP2 敲低对 H22 移植瘤体积的影响;C-D: 活体激光共聚焦观察 ASPP2 敲低对 H22 移植瘤血管生成的影响;E-F:ASPP2 敲低对 H22 移植瘤 VEGF 表达的影响, * $P < 0.05$

Fig.8 Effect of ASPP2 knockdown on H22 transplanted tumor growth and angiogenesis in mice A- B: effect of ASPP2 knockdown on H22 transplanted tumor volume; C-D: in vivo laser confocal observation of the effect of ASPP2 knockdown on H22 transplanted tumor angiogenesis; E-F: effect of ASPP2 knockdown on VEGF expression in H22 transplanted tumors, * $P < 0.05$.

- of p53 (ASPP) 1 and ASPP2 m-RNA expression in oral cancer[J]. Arch Oral Biol, 2020, 119: 104920.
- [2] Li S, Shi G, Yuan H, et al. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP[J]. Oncol Rep, 2012, 28 (1): 133-40.
 - [3] Kampa KM, Acoba JD, Chen D, et al. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(11): 4390-5.
 - [4] Zhou L, Yang X, Shu S, et al. Sufentanil Protects the Liver from Ischemia/Reperfusion-Induced Inflammation and Apoptosis by Inhibiting ATF4-Induced TP53BP2 Expression [J]. Inflammation, 2021, 44(3): 1160-1174.
 - [5] Wu T, Song H, Xie D, et al. Silencing of ASPP2 promotes the proliferation, migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via the PI3K/AKT pathway [J]. Int J Oncol, 2018, 52 (6): 2001-2010.
 - [6] Tian L, Deng Z, Xu L, et al. Downregulation of ASPP2 promotes gallbladder cancer metastasis and macrophage recruitment via

- aPKC- α /GLI1 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1115.
- [7] Yang T, Zhu C, Shi Y, et al. RDIVpSGP motif of ASPP2 binds to 14-3-3 and enhances ASPP2/k18/14-3-3 ternary complex formation to promote BRAF/MEK/ERK signal inhibited cell proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(11): 1616-1627.
- [8] Schittenhelm MM, Walter B, Tsintari V, et al. Alternative splicing of the tumor suppressor ASPP2 results in a stress-inducible, oncogenic isoform prevalent in acute leukemia [J]. *EBioMedicine*, 2019, 42: 340-351.
- [9] Tang Q, Liang B, Zhang L, et al. Enhanced CHOLESTEROL biosynthesis promotes breast cancer metastasis via modulating CCDC25 expression and neutrophil extracellular traps formation[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 17350.
- [10] Huo Y, Cao K, Kou B, et al. TP53BP2: Roles in suppressing tumorigenesis and therapeutic opportunities [J]. *Genes Dis*, 2022, 10(5): 1982-1993.
- [11] Jiang X, Wang J, Deng X, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 204.
- [12] Nagano H, Tomida C, Yamagishi N, et al. VEGFR-1 Regulates EGF-R to Promote Proliferation in Colon Cancer Cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5608.
- [13] Morse MA, Sun W, Kim R, et al. The Role of Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(3): 912-920.
- [14] Amini A, Masoumi Moghaddam S, Morris DL, et al. The critical role of vascular endothelial growth factor in tumor angiogenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(1): 23-43.
- [15] Zhang Y, Brekken RA. Direct and indirect regulation of the tumor immune microenvironment by VEGF[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 111(6): 1269-1286.
- [16] Lacial PM, Graziani G. Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 97-107.
- [17] Korbecki J, Barczak K, Gutowska I, et al. CXCL1: Gene, Promoter, Regulation of Expression, mRNA Stability, Regulation of Activity in the Intercellular Space[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 792.
- [18] Okikawa S, Morine Y, Saito Y, et al. Inhibition of the VEGF signaling pathway attenuates tumor associated macrophage activity in liver cancer[J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(4): 71.
- [19] Bourhis M, Palle J, Galy-Fauroux I, et al. Direct and Indirect Modulation of T Cells by VEGF-A Counteracted by Anti-Angiogenic Treatment[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 616837.
- [20] Li H, Wang X, Zhang C, et al. HDAC1-induced epigenetic silencing of ASPP2 promotes cell motility, tumour growth and drug resistance in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2018, 432: 121-131.
- [21] Xu L, Tong X, Zhang S, et al. ASPP2 suppresses stem cell-like characteristics and chemoresistance by inhibiting the Src/FAK/Snail axis in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 13669-13677.
- [22] 刘晓霓, 寇卜心, 柴梦音, 等. p53 凋亡刺激蛋白 2 基因敲除小鼠的构建及其对二乙基亚硝酸胺诱导肝癌的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(9): 784-789.
- [23] Wang S, Kou B, Chai M, et al. Knockout of ASPP2 promotes DEN-induced hepatocarcinogenesis via the NF- κ B pathway in mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(2): 202-214.
- [24] Zhao W, McCallum SA, Xiao Z, et al. Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides[J]. *Biosci Rep*, 2012, 32(1): 71-81.
- [25] Berthod F, Germain L, Tremblay N, et al. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(2): 491-498.
- [26] Lawler J. Counter regulation of tumor angiogenesis by vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 2): 126-135.
- [27] Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, et al. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175586.
- [28] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(2): a006544.
- [29] Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal-A Historical Perspective with a Focus on the Fundamental Roles of Increased Vascular Permeability and Clotting[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2019, 45(6): 576-592.
- [30] Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15585.
- [31] Viillard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [32] Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 198.