

# HIF-1 $\alpha$ 基因转染人胃腺癌 SGC7901 细胞对裸鼠移植瘤的影响及机制

汪晓庆<sup>1</sup>, 曹威<sup>2</sup>, 宋先兵<sup>1</sup>, 潘献柱<sup>1</sup>, 吴义春<sup>1</sup>, 陈晓宇<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 探讨低氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$  基因转染人胃腺癌 SGC7901 对裸鼠移植瘤血管生成及 EphA2 表达的影响及其可能机制。**方法** 采用 HIF-1 $\alpha$  基因重组质粒 pGCsi-shHIF-1 $\alpha$ , 转染胃腺癌 SGC7901 细胞并接种裸鼠(SGC7901/shRNA, 实验组), 建立裸鼠皮下人胃腺癌移植瘤模型, 动态观测裸鼠肿瘤体积和质量; 设 SGC7901(未转染组)、转染空质粒的 SGC7901(SGC7901/Neo, 空载体组) 为对照。观察移植瘤生长情况, 8 周后, 获取移植瘤模型瘤组织, 称取湿重, 免疫组化 SP 法检测移植瘤组织的微血管密度, Western blot 检测上皮细胞激酶 A2(EphA2) 表达。**结果** 与未转染组比较, 空载体组瘤体积、质量改变不明显, HIF-1 $\alpha$  转染的实验组的瘤体积、质量明显降低; HIF-1 $\alpha$  转染的实验组诱导血管增生、形成血管生成拟态和 EphA2 蛋白表达较未转染组、空载体组明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** HIF-1 $\alpha$  基因转染可明显抑制裸鼠人胃腺癌移植瘤的生长, 该作用可能与其抑制肿瘤血管新生、形成血管拟态及 EphA2 蛋白表达有关。

**关键词** 胃腺癌; 裸鼠; 低氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 基因转染; 血管

2017-03-30 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2015A359); 国家自然科学基金资助项目(编号: 81373421)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医学高等专科学校病理学教研室, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学组胚教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪晓庆, 女, 硕士;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cxyayd@163.com

生成

中图分类号 R 977.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)08-1128-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.007

恶性肿瘤的失控性增生常引起肿瘤组织的微环境低氧, 刺激低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$  的表达增加, 进而激活血管内皮生长因子, 促进血管新生和形成血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM), 从而引起肿瘤早期发生转移<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-5]</sup>证实 HIF-1 $\alpha$  参与恶性肿瘤发生发展过程。上皮细胞激酶 A2(epithelial cell kinase, EphA2) 在恶性肿瘤中呈高表达, 抑制 EphA2 的表达能够抑制肿瘤血管生成, 并阻止 VM 管道的形成<sup>[5]</sup>。胃腺癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 目前有关胃腺癌中血管新生及 VM 的形成机制尚不明确, 该实验拟将胃腺癌细胞 SGC7901 株通过稳定转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1 $\alpha$ , 接种裸鼠, 观测裸鼠皮下移植瘤生长情况, 探讨 HIF-1 $\alpha$  表达沉默对肿瘤血管新生及 EphA2 表达的影响, 进一步筛选出 HIF-1 $\alpha$  作用于血管新生及 VM 形成的可能靶基因。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人胃腺癌 SGC7901 细胞系由安徽医科大学免疫学应松成博士提供, 本研究室传代保存。

was tested by the cell cloning assay. Cell migration and invasion were measured by non-Matrigel transwell assay and Matrigel transwell assay *in vitro*. **Results** Using qRT-PCR analysis, we found ATB expression levels in U87 cell line was significantly increased compared with HEB( $P < 0.01$ ). The expression of ATB was remarkable reduced after U87 transfected with shRNA-ATB plasmid(the experimental group) compared with U87 cells transfected with shRNA control(the control group). Cloning formation experiment indicated that colony-formation ability was decreased than that of control group( $P < 0.01$ ). MTT assay indicated that the number of viable cell was lower than that of control group( $P < 0.01$ ). In addition, Transwell assay further verified that knockdown of ATB significantly inhibited the migration and invasion ability of U87 cells( $P < 0.01$ ). **Conclusion** ATB knockdown inhibit glioma cell proliferation, migration and invasion, which indicates that ATB may represent a potential therapeutic target for the treatment of human glioma.

**Key words** glioma; long non-coding RNA; ATB; cell proliferation; cell migration; cell invasion

RPMI 1640、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 转染空质粒的胃腺癌细胞 SGC7901 (SGC7901/Neo)、稳定转染 shRNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  胃腺癌细胞 SGC7901/shRNA 由上海吉凯公司构建和鉴定; 蛋白酶 K、DAB Kit 和兔抗 SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥试剂公司; 羊抗人 EphA2、CD34 购自美国 Sigma 公司; 6 周龄 BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司, 置安徽省动物实验中心 SPF 条件饲养。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与转染** 胃腺癌细胞 SGC7901 于 50 ml 培养瓶中加入 5 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中常规静置培养, 2 d 换液 1 次, 长至培养瓶底面 80% 时用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。取对数生长期的 SGC7901 细胞, 按  $2.0 \times 10^5$  个接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液的培养皿中, 待细胞长至约 80% 聚合时开始转染。取上述质粒 2  $\mu$ g 稀释于 125  $\mu$ l 的 RPMI 1640 培养液中, 加 10  $\mu$ l 脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000, 室温孵育 20 min, 培养于 37 °C 培养箱, CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。6 h 后更换新鲜的含 10% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液。阴性对照转染空质粒 SGC7901/Neo。含 G418 (400  $\mu$ g/ml) 的选择性培养液进行筛选、扩大培养鉴定。将转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1 $\alpha$  和阴性对照质粒的细胞命名为 SGC7901/shRNA 和 SGC7901/Neo。

**1.2.2 人胃腺癌 SGC7901 细胞裸鼠皮下移植瘤实验** 6 周龄 SPF 级 BALB/c 裸鼠 30 只, 雌性, 分 3 组, 每组 10 只。培养 3 组细胞, SGC7901 细胞为未转染组, 转染空质粒的 SGC7901 细胞 (SGC7901/Neo) 为空载体组, 干扰胃腺癌 HIF-1 $\alpha$  基因的 SGC7901 细胞 (SGC7901/shRNA) 为实验组, 3 组处对数生长期细胞  $1.5 \times 10^6$  r/min 离心 5 min, 收集, RPMI 1640 培养液 (无血清) 洗涤 2 次, RPMI 1640 重悬并调整细胞浓度, 按组皮下接种于 BALB/c-nu/nu 裸鼠背部皮下, 每只 0.1 ml, 细胞数约  $5 \times 10^6$  个, 构建裸鼠移植瘤模型, 常规饲养, 每隔 5 d, 肿瘤大小采用游标卡尺测量, 肿瘤体积 ( $V/\text{mm}^3$ ) = (长径  $\times$  短径<sup>2</sup>) / 2。动态连续观察 8 周, 每周记录 1 次各组裸鼠的生存情况和瘤体生长情况, 2 个月后引颈法处死裸鼠。瘤体冰 PBS 冲洗, 滤纸吸干, 电子称称取裸鼠瘤体质量重, 计算抑瘤率 (%) = (1 - 实验组瘤重 / 对照组瘤重)  $\times$  100%, 绘制肿瘤生长曲线。取

部分肿瘤组织置 10% 甲醛溶液固定, 另部分移植瘤组织液氮中速冻后, 保存于 -80 °C 低温冰箱。

**1.2.3 肿瘤微血管密度的检测** 采用免疫组织化学 SP 法, 步骤如下: 人胃腺癌 SGC7901 细胞部分移植瘤组织用 10% 甲醛溶液常规固定, 石蜡包埋、切片、脱蜡, pH 6.0 的柠檬酸缓冲液微波抗原修复, 3% 过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶, 滴加一抗 (羊抗人 CD34, PBS 稀释 1 : 150) 4 °C 过夜。次日, 滴加兔抗羊二抗; DAB 避光显色, 镜下观察, 苏木精复染, 自来水冲洗返蓝, 中性树脂封固。以 PBS 代替一抗做阴性对照。随机应用  $\times 20$  倍物镜观察并进行微血管计数, 每个肿瘤组织随机记录 5 个区域视野下的微血管数, 采用南京大学捷达 801 病理图象分析系统, 随机选取  $\times 20$  倍物镜下 6 个视野, 观察 3 组胃腺癌移植瘤中 CD34 阳性染色平均光密度值。

**1.2.4 Western blot 检测组织 EphA2 蛋白表达** -80 °C 低温冰箱冻存管中少量肿瘤组织, 加入蛋白裂解液, 研磨至粉状, 置离心管内室温溶解。300 ~ 400 W 破碎功率下冷水中超声细胞破反复碎仪破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 转移至 1.5 ml 离心管; 采用 BCA 标准蛋白测定各待测样品的蛋白浓度。取总蛋白 40  $\mu$ g 上样, SDS-PAGE 电泳, 加入羊抗人 EphA2 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 次日加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光法曝光、显影。应用 TanonGis 软件对感光胶片条带进行灰度值分析, 以目的条带与内参照条带  $\beta$ -actin 的比值代表目的蛋白的相对表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 采用独立样本 *t* 检验观察组间差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 稳定转染 shRNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  胃腺癌细胞裸鼠移植瘤生长情况** 皮下注射 SGC7901 (未转染组)、转染空质粒的 SGC7901 (SGC7901/Neo, 空载体组)、转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1 $\alpha$  干扰 SGC7901 细胞 (SGC7901/shRNA, 实验组), 3 周后, 显示未转染组、空载体组裸鼠均造模成功, 实验组未见明显成瘤; 随着时间推移, 未转染组、空载体组裸鼠瘤体增加明显, 实验组于 4 周后始见瘤体, 且瘤体明显小于未转染组、空载体组, 差异有统计学意义 ( $F = 11.37, P < 0.05, P < 0.01$ ), 未转染组与空载体空载

体组间瘤体大小差异无统计学意义,提示 pGCsi-shHIF-1α 抑制了 SGC7901 细胞肿瘤的生长。整个实验的 8 周内裸鼠均无死亡病例。见图 1、2 和表 1。

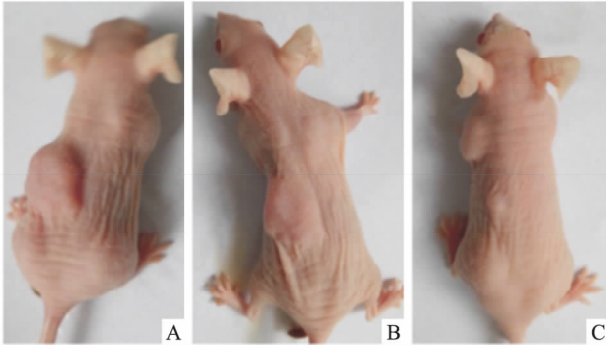


图 1 shRNA 干扰 HIF-1α 在 7 周时对裸鼠模型裸鼠移植胃腺癌生长的作用 A: 未转染组; B: 空载体组; C: 实验组

表 1 shRNA 干扰 HIF-1α 基因转染对裸鼠胃腺癌肿瘤生长的影响 (n = 10, x ± s)

项目	未转染组	空载体组	实验组
裸鼠质量(g)	27.38 ± 1.84	27.19 ± 1.76	25.61 ± 1.68*
肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )	3 101.26 ± 216.34	3 012.35 ± 203.82	2 316.27 ± 182.63**

与未转染组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2.2 肿瘤微血管密度的检测 采用免疫组化 SP 法染色检测 3 组胃腺癌细胞裸鼠移植瘤中微血管密度,结果表明,接种胃腺癌细胞 8 周后,未转染组和

空载体组均存在程度不等的血管增生现象。应用图像分析系统显示,与未转染组和空载体组比较,转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1α 干扰 SGC7901 细胞的实验组差异有统计学意义(F = 2.635, P < 0.05),见图 3。

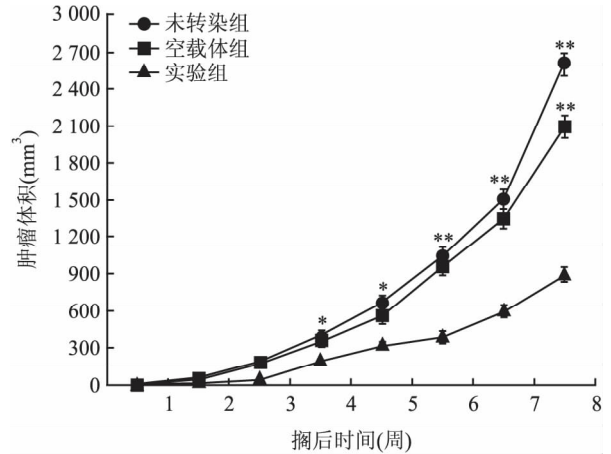


图 2 3 组裸鼠移植瘤在 8 周内的生长曲线与实验组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2.3 Western blot 检测组织 EphA2 蛋白表达情况

Western blot 实验结果显示,3 组胃腺癌移植瘤组织中均有 EphA2 蛋白表达,相较于胃腺癌 SGC7901 移植瘤未转染组和转染空质粒的空载体组,干扰胃腺癌 HIF-1α 基因的表达减弱,见图 4A。由图像分析可知,实验组 EphA2 蛋白表达显著弱于未转染

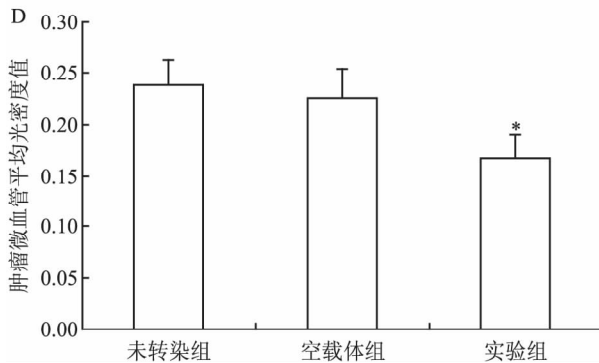
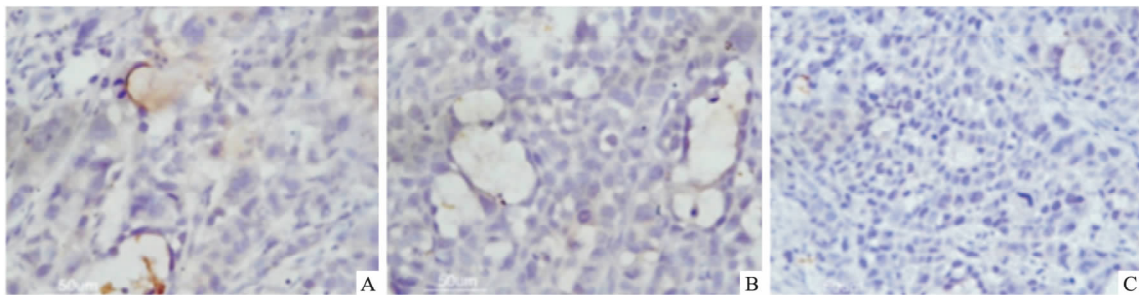


图 3 转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1α 对胃腺癌移植瘤微血管密度的影响 CD34 免疫组化染色 × 400 A: 未转染组; B: 空载体组; C: 实验组; D: 3 组肿瘤微血管密度平均光密度值; 与未转染组比较: \* P < 0.05

组、空载体组,差异有统计学意义( $F = 5.826, P < 0.01$ ),见图4B。

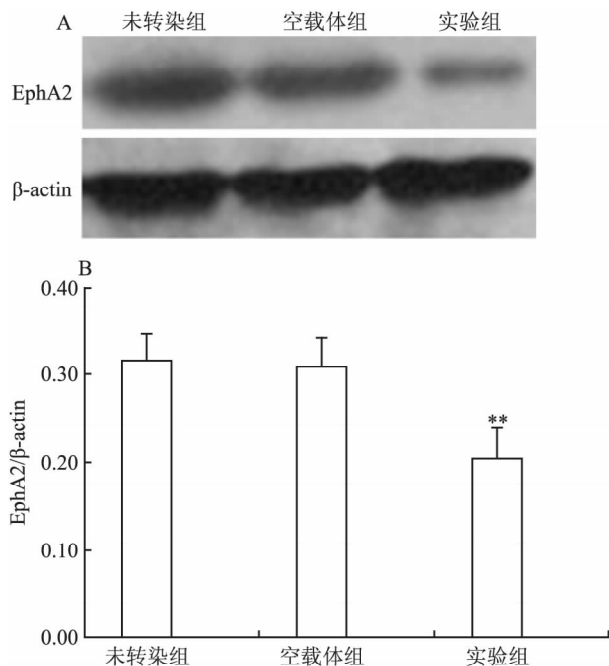


图4 Western blot 法检测 EphA2 蛋白在移植瘤组织中的表达

A: Western blot 检测结果; B: 蛋白表达的半定量统计图; 与未转染组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

在肿瘤发生过程中,由于其生长迅速而易造成局部低氧,肿瘤细胞适应低氧环境所采取的策略之一是形成多血管体系,模拟正常血管结构及血管通道,即形成 VM,从而保证肿瘤的血氧供应<sup>[2-3]</sup>。卵巢癌细胞在低氧培养条件下,肿瘤细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达显著升高,且形态学上有呈血管内皮样转变趋势;而 HIF-1 $\alpha$  的抑制剂可抑制卵巢癌血管新生和阻止卵巢癌细胞形成 VM,过表达 HIF-1 $\alpha$  会促进内皮祖细胞的增生<sup>[3]</sup>。另有研究<sup>[4]</sup>证实,HIF-1 $\alpha$  可特异性与低氧基因启动子或者增强子结合,参与调控靶基因转录,促进肿瘤血管生成和形成 VM。本课题组前期在临床病理工作中显示,中、低分化的胃腺癌组织中存在由肿瘤细胞围成的 VM,与常见的肿瘤中心区域坏死灶不同<sup>[5]</sup>。EphA2 是一种受体蛋白酪氨酸激酶,能够调节细胞的增生、凋亡、迁移及血管生成,高表达于恶性肿瘤中,抑制其表达可阻止 VM 管道的形成<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明,迅速增长的肿瘤局部血供缺乏,导致微环境供氧不足,微环境低氧刺激 HIF-1 表达,HIF-1 有 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两种

形式,其中 HIF-1 $\alpha$  因子是目前较为成熟的细胞因子,通过影响基因的转录和调控等过程使恶性肿瘤细胞及组织适应低氧状态,目前已有学者证实,在直肠癌<sup>[8]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>、黑色素瘤<sup>[10]</sup>等恶性肿瘤中,HIF-1 $\alpha$  亦存在过量表达。但目前 HIF-1 $\alpha$  与胃腺癌肿瘤生长情况及血管生成和 VM 形成研究尚较少。为进一步研究 HIF-1 $\alpha$  与胃腺癌肿瘤的生长情况及血管生成和 VM 形成的相关机制,本实验将胃腺癌 SGC7901 细胞株分为未转染组、空载体组和实验组,接种裸鼠,观测裸鼠皮下移植瘤生长情况,结果表明,实验组干扰 SGC7901 细胞出瘤时间延迟,生长速度减慢,移植瘤体积及质量明显降低;未转染组和空载体组均存在程度不等的血管增生现象,而实验组干扰 SGC7901 细胞的血管增生现象显著降低,表明 HIF-1 $\alpha$  可能通过参与胃腺癌肿瘤血管生成及 VM 的形成促进肿瘤生长,HIF-1 $\alpha$  表达沉默可抑制裸鼠胃腺癌细胞移植瘤在体内的生长,以及血管生成和 VM 形成。

Eph 系列蛋白是最大的酪氨酸蛋白激酶受体亚族,参与胚胎发育、细胞生长和信号传递等重要的生理过程,EphA2 是重要的该家族成员,可调节细胞增殖、诱导组织血管生成和基质黏附等作用,其在肿瘤生长和增殖过程中发挥重要作用,EphA2 在许多人类肿瘤中有高表达和高活性,如在食管癌、恶性黑色素瘤等恶性肿瘤中呈高表达<sup>[6]</sup>。也有研究<sup>[11]</sup>显示 EphA2 是肿瘤血管生成和 VM 形成的重要蛋白。Western blot 法检测 3 组肿瘤组织中 EphA2 的蛋白表达,本研究显示胃腺癌 SGC7901 移植瘤未转染组和空载体组 EphA2 都有较高水平的表达,而干扰胃腺癌 HIF-1 $\alpha$  基因的 EphA2 表达显著下调,推测 EphA2 可能是 HIF-1 $\alpha$  参与血管生成和 VM 调控机制中重要的下游靶点。目前关于 HIF-1 $\alpha$  影响 VM 形成的分子机制目前尚不清楚,VE-cadherin /EphA2 /PI3K/MMP 信号通路是 VM 网络状结构形成的关键通路,靶向 HIF-1 $\alpha$  能成为治疗胃腺癌一个重要手段,值得深入研究。

综上所述,本研究在构建 HIF-1 $\alpha$  的真核基因表达重组质粒基础上,并建立稳定表达转染细胞株。在此基础上,通过皮下注射建立胃腺癌细胞 SGC7901 裸鼠移植瘤模型,HIF-1 $\alpha$  沉默后,胃腺癌裸鼠移植瘤生长显著受抑,血管形成降低,EphA2 表达也下降,EphA2 基因在胃腺癌移植瘤的裸鼠中高表达,肿瘤血管生成明显增加,推测 EphA2 可能是参与 HIF-1 $\alpha$  的 VM 调控机制中的下游靶点。

## 参考文献

- [1] Spinella F, Caprara V, Di Castro V, et al. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(3): 395-405.
- [2] Zhu P, Ning Y, Yao L, et al. The proliferation, apoptosis, invasion of endothelial-like epithelial ovarian cancer cells induced by hypoxia [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 124.
- [3] Kütscher C, Lampert F M, Kunze M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha improves vasculogenesis-related functions of endothelial progenitor cells [J]. *Microvasc Res*, 2016, 105: 85-92.
- [4] Zhou T J, Huang X H, Gong L, et al. Vasculogenic mimicry and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): 15017396.
- [5] 汪晓庆, 张诗武, 王 弦, 等. 胃腺癌血管生成拟态的初步研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(5): 709-11.
- [6] Hess A R, Seftor E A, Gruman L M, et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(2): 228-33.
- [7] Chang E, Paterno J, Duscher D, et al. Exercise induces stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -mediated release of endothelial progenitor cells with increased vasculogenic function [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135(2): 340e-50e.
- [8] Nagaraju G P, Park W, Wen J, et al. Antiangiogenic effects of ganetespib in colorectal cancer mediated through inhibition of HIF-1 $\alpha$  and STAT-3 [J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(4): 903-17.
- [9] Ma X, Jia Y, Zu S, et al.  $\alpha$ 5 Nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in non-small cell lung cancer [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 278(2): 172-9.
- [10] Sun B, Zhang D, Zhang S, et al. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma [J]. *Cancer Lett*, 2007, 249(2): 188-97.
- [11] Subbarayal P, Karunakaran K, Winkler A C, et al. Ephrin A2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for *Chlamydia trachomatis* [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(4): e1004846.

## Effect and possible mechanism of HIF-1 $\alpha$ gene transfection of human gastric adenoma SGC7901 xenografts in nude mice

Wang Xiaoqing<sup>1</sup>, Cao Wei<sup>2</sup>, Song Xianbing<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathology, Anhui Medical College, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the effect of hypoxia inducing factor1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) gene transfection of human gastric adenocarcinoma on nude mice transplantation tumor and its possible mechanism. **Methods** Set SGC7901 (untransfected group), empty plasmid transfection SGC7901 (SGC7901/Neo, blank load transfection group) for comparison, gene recombinant plasmid pGCsi-shHIF-1 $\alpha$ , transfection gastric carcinoma SGC7901 cells (SGC7901/shRNA, experimental group) inoculated nude mice, to establish nude mice subcutaneous transplantation tumor of gastric adenocarcinoma model, dynamic observation of nude mice tumor volume and body quality. After eight weeks, to get tumor tissue transplantation tumor model, weigh wet weight, microvascular density of transplanted tumor tissue was detected by immunohistochemical SP method, epithelial cell kinase A2 (EphA2) expression was detected by Western blot. **Results** Compared with untransfected and blank load transfection group, HIF-1 $\alpha$  gene transfection in experimental group tumors had significantly lower in tumor volume, quality and vascular proliferation, EphA2 protein expression significantly lower than that in untransfected and blank load transfection group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  gene transfection can inhibit the growth of nude mouse transplantation tumor of gastric adenocarcinoma significantly, which may relate its inhibiting tumor angiogenesis and EphA2 protein expression.

**Key words** gastric adenoma; nude mice; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; gene transfection; angiogenesis