

## 卵巢癌诊治

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002688

SP1 介导 CD147 通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路影响  
卵巢癌的血管形成孙丽莎<sup>1</sup>, 邓红玉<sup>2</sup>, 沈浩明<sup>2</sup>, 单冬勇<sup>3</sup>, 杨勇文<sup>4</sup>, 屈斌<sup>2</sup>

(湖南省肿瘤医院 1. 输血科; 2. 检验科, 长沙 410009; 3. 中南大学湘雅三医院肿瘤科放疗中心, 长沙 410013;

4. 中南大学湘雅一医院检验科, 长沙 410000)

**【摘要】目的:**探讨特异性蛋白(specific protein, SP1)介导 CD147, 即细胞外基质金属蛋白诱导因子(extracellular matrix metallo-protein inducer, EMMPRIN)的表达激活缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路对卵巢癌血管形成的影响。**方法:**血管生长是肿瘤发生的关键步骤, 多数恶性肿瘤的血管生成密集且生长迅速。这是由于肿瘤细胞自身可分泌多种生长因子, 诱导血管生成。因此, 血管生成在肿瘤的发展转移过程中起到重要作用, 抑制这一过程将能明显阻止肿瘤组织的发展和扩散转移。体外的血管生成试验能很好地模拟肿瘤的血管发生过程, 实验分为过表达组(OE 组)、沉默组(SI 组)、控制组(CONTROL 组)、阴性对照质粒组(NC 组), 通过沉默或过表达卵巢癌细胞株 SKOV3 中 SP1 或 CD147, 并使用 HIF-1 $\alpha$  蛋白翻译抑制剂 KC7F2 阻断 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路, 然后用培养上清液作用于人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC-12, 进行体外血管形成实验来模拟肿瘤血管生成改变, 并使用荧光实时定量 PCR 技术检测 CD147 和 VEGF 在细胞中的表达分布。**结果:**阴性对照组血管分支数(206.33  $\pm$  16.03)高于 SI-CD147 组血管分支数(137.00  $\pm$  15.09); OE-SP1 组的 CD147 mRNA 水平(2.38  $\pm$  0.26)高于 SI-SP1 组中 CD147 mRNA 水平(0.55  $\pm$  0.12); SI-SP1+OE-CD147 组血管分支数(200.00  $\pm$  19.52)高于 SI-SP1 组血管分支数(130.00  $\pm$  12.01); OE-CD147 组血管分支数(373.67  $\pm$  29.02)高于 OE-CD147+KC7F2 组血管分支数(187.00  $\pm$  19.52), OE-CD147 组 VEGF 分子水平(4.05  $\pm$  0.09)高于 OE-CD147+KC7F2 组 VEGF 分子水平(1.02  $\pm$  0.11)。**结论:**卵巢癌中 CD147 表达升高, 上游转录因子 SP1 可以上调 CD147 表达, 从而激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路, 促进卵巢癌血管形成过程, 最终参与卵巢癌发病。

**【关键词】**卵巢癌; CD147; SP1; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ /血管内皮生长因子信号通路; 血管形成

**【中图分类号】**R711

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2020-05-25

SP1 mediates CD147 to influence the angiogenesis of ovarian cancer  
through HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathwaySun Lisha<sup>1</sup>, Deng Hongyu<sup>2</sup>, Shen Haoming<sup>2</sup>, Shan Dongyong<sup>3</sup>, Yang Yongwen<sup>4</sup>, Qu Bin<sup>2</sup>

(1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Clinical Laboratory, Hunan Cancer Hospital;

3. Oncology Radiotherapy Center, The Third Xiangya Hospital of Central South University;

4. Department of Clinical Laboratory, The First Xiangya Hospital of Central South University)

**【Abstract】Objective:** To discuss the expression of CD147 [extracellular matrix metalloprotein inducer(EMMPRIN)] mediated by specific protein(SP1), the activation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ), and the effect of vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling pathway on angiogenesis in ovarian cancer. **Methods:** The angiogenesis is the critical step in tumorigenesis. Most malignant tumors have dense angiogenesis and grow fast, which is due to the tumor cells can secrete many kinds of growth factors themselves to induce angiogenesis. Therefore, angiogenesis plays an important role in the development and metastasis of tumors and inhibition of it

**作者介绍:** 孙丽莎, Email: 44028204@qq.com,

研究方向: 输血免疫诊断。

**通信作者:** 屈斌, Email: 120778562@qq.com。

**基金项目:** 湖南省自然科学基金青年资助项目(编号: 2018JJ3791);

湖南省卫计委科研资助项目(编号: 20200557, 20201513);

湖南省肿瘤医院启航基金资助项目(QH201904); 长沙市

重点研发、平台和人才科技计划资助项目(编号: kq1907127)。

**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20201104.1715.018.html>

(2020-11-06)

will significantly prevent the development and metastasis of tumor tissues. *In vitro* angiogenesis assay could simulate the procession of tumor angiogenesis well. In this study, the experiment was divided into overexpression group(OE group), silencing group(SI group), CONTROL group(CONTROL group), and negative CONTROL group(NC group). By silencing or over-expressing of SP1 or CD147 in ovarian cancer cell line SKOV3, blocking HIF-1 $\alpha$ /VEGF signal pathway with HIF-1 $\alpha$  protein translation inhibitor KC7F2, and then using culture supernatants

to act on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC-12), *in vitro* angiogenesis assay was carried out to simulate tumor angiogenesis changes. Meanwhile, fluorescence real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to examine the expressions of CD147 and VEGF in the cells. **Results:** The amount of vascular arborizations in NC group ( $206.33 \pm 16.03$ ) was more than that in SI-CD147 group ( $137.00 \pm 15.09$ ). The mRNA level of CD147 in OE-SP1 group ( $2.38 \pm 0.26$ ) was higher than that in SI-SP1 group ( $0.55 \pm 0.12$ ). The amount of vascular arborizations in SI-SP1+OE-CD147 group ( $200.00 \pm 19.52$ ) was more than that in SI-SP1 group ( $130.00 \pm 12.01$ ). The amount of vascular arborizations in OE-CD147 group ( $373.67 \pm 29.02$ ) was more than that in OE-CD147+KC7F2 group ( $187.00 \pm 19.52$ ). The molecular level of VEGF in OE-CD147 group ( $4.05 \pm 0.09$ ) was higher than that in OE-CD147+KC7F2 group ( $1.02 \pm 0.11$ ). **Conclusion:** The expression of CD147 increases in ovarian cancer, and the upstream transcription factor SP1 is able to upregulate the expression of CD147, thereby activating HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway to promote the angiogenesis of ovarian cancer, and ultimately leading to the pathogenesis of ovarian cancer.

**[Key words]** ovarian cancer; CD147; SP1; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor signaling pathway; angiogenesis

卵巢癌是临床上较常见的女性生殖系统恶性肿瘤,其全球发病率仅位于宫颈癌、子宫体癌之后,死亡率在女性生殖系统恶性肿瘤中居首位<sup>[1]</sup>。在中国,卵巢癌的发病率和死亡率相当高,并且逐年增加<sup>[2]</sup>。尽管近年来卵巢癌的诊断发展迅速,已经开发了一些检测方法对卵巢癌进行筛查,但主要依赖影像检查、病理学检测、血清学 CA125 检测等<sup>[3]</sup>。这些方法存在一定局限性,如影像检验受限于场地与费用、病理学检查存在有创性与肿瘤的异质性、血清学 CA125 特异性不高,容易造成漏诊和误诊,使得大多数患者诊断时已属晚期,并且预后较差,患者 5 年总生存率仅 45%<sup>[4-5]</sup>。可见,临床上缺乏可靠的检测手段来协助卵巢的早期诊断与疗效监测。因此探究卵巢癌的发生发展机制,寻找新的卵巢癌肿瘤标志物和潜在治疗靶标,是目前待解决的重大课题。

CD147 又称细胞外基质金属蛋白诱导因子 (extracellular matrix metalloprotein inducer, EMM-PRIN), 是一种跨膜蛋白, 编码基因位于 19p13.3 上, 编码 269 个氨基酸, 属于免疫超家族 (immunoglobulin super family, IgSF) 成员<sup>[6]</sup>。目前发现, CD147 在卵巢癌的发生发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。既往研究发现, CD147 在卵巢癌患者血清中高表达, 且与患者的预后相关<sup>[8]</sup>。在此研究基础上, 本研究应用体外的血管生成试验来模拟肿瘤的血管发生过程, 探讨 CD147 在卵巢癌细胞中的作用及相关分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

卵巢癌细胞株 SKOV3 购于美国 ATCC, MALAT1-shRNA Lentivector (转染级, 1 g/L) 购于优诚生物, 人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC-12 购于中国医学科学院细胞资源中心, 质粒 PC-DNA3.1 购于上海沪震。

### 1.2 试剂和仪器

胰酶、抗生素均购自 Invitrogen 公司; DMEM 培养基, 胎牛血清均购自美国 GIBCO 公司; Trizol RNA 分离试剂购自 Taqman 公司; HIF-1 $\alpha$  蛋白翻译抑制剂 KC7F2 购自 MCE 公司; SYBR Green real-time PCR mixture 购自 Qiagen 公司; 限制性内切酶、dNTP、Taq 酶及快速连接试剂盒均购自 Takara 公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自 Thermo 公司; 光学倒置显微镜购自奥林巴斯; 实时荧光定量 PCR 仪购自赛默飞, 引物合成及测序由湖南优诚生物公司完成。

### 1.3 总 RNA 的提取

取待裂解的细胞, 离心去上清。每 1 mL 的 Trizol 试剂裂解的样品中加入 0.2 mL 氯仿, 盖紧管盖。手动剧烈振荡管体 15 s 后, 15~30 °C 孵育 2~3 min。4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min。离心后混合液体将分为下层的红色酚相、中间层及无色水相上层。RNA 全部分配于水相中。水相上层的体积大约是匀浆时加入 Trizol 试剂的 60%。将水相上层转移到干净无 RNA 酶的离心管中。加等体积异丙醇混合以沉淀其中的 RNA, 混匀后 15~30 °C 孵育 10 min, 于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min。此时离心前不可见的 RNA 沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块。移去上清液, 每 1 mL Trizol 试剂裂解的样品中加入至少 1 mL 75% 乙醇 (75% 乙醇用 DEPC 处理), 清洗 RNA 沉淀。混匀后, 4 °C 下 7 000 r/min 离心 5 min。小心吸去大部分乙醇溶液, 使 RNA 沉淀在室温空气中干燥 5~10 min。溶解 RNA 沉淀溶解 RNA 时, 先加入无 RNA 酶的水 40  $\mu$ L, 用枪反复吹打几次, 使其完全溶解, 获得的 RNA 溶液保存于 -80 °C 待用。

### 1.4 sh-MALAT1 和对照 NC 的序列

根据 MALAT1 基因在 GeneBank 中序列 (NR\_002819.4) 设计相应的 shRNA。人 MALAT1 的靶序列 (GTACGTC-GAAGGCCTTGTA) 设计特异性 shRNA 序列, 同时随机排列碱基序列 (GTTCTCCGAACGTGTCACGT) 设计阴性对照 NC, 与人 MALAT1 基因外显子无同源性, 序列见表 1。

### 1.5 CD147 过表达的区域以及序列

根据 CD147 在 GeneBank 中的 cDNA 序列 (NM\_001728, CDS 区 1 158 bp) 设计上下游引物, 并由上海生工生物合成, 提取 SKOV3 细胞中总 RNA, 逆转录获取 cDNA, 以其为模板,

进行 PCR 扩增和胶回收,按照 PC-DNA3.1 操作手册构建重组载体,酶切鉴定并测序,序列见表 2。

#### 1.6 实时荧光定量 PCR

取 1  $\mu\text{g}$  RNA 反转录成 cDNA,用 SYBRGREEN mixture 做染料,用实时荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 检测 CD147、VEGF 的表达效率,用 GAPDH 做内参,所用引物序列及测序由优诚生物完成,使用 GraphPad Prism 4.0 总结数据,所用引物序列见表 3。

#### 1.7 细胞处理及分组

1.7.1 细胞培养 卵巢癌细胞株 SKOV3 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37  $^{\circ}\text{C}$  饱和湿度、含 5% $\text{CO}_2$  的  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。

1.7.2 SKOV3 细胞转染 取处于对数生长期、生长状态良好的 SKOV3 细胞,用 0.25%胰酶消化后,通过细胞计数计算,按照密度为  $3 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中,铺细胞 18~24 h (尽量不要超过 24 h,否则影响转染效率),细胞长至 60%~80% (细胞密度过稀或过密均会影响转染效率)转染 sh-NC、sh-MALAT1 (筛靶后的质粒),转染 48 h 后收集细胞上清。

1.7.3 HUVEC-12 细胞铺板 取处于对数生长期、生长状态

良好的 HUVEC-12 细胞用 0.25%胰酶消化后,通过细胞计数计算,按照密度为  $3 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中,铺细胞 18~24 h,待细胞长至 60%~80%时对细胞进行处理(这一步在 SKOV3 转染 24 h 时进行操作)。

#### 1.8 成管实验

1.8.1 Matrigel 的存储 收货时首先确认还有干冰,且 Matrigel 成固态液面水平;整个 Matrigel 只能分装 1 次,分装前先放在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱一段时间待之融化,分装用的枪头、EP 管等都要提前-20  $^{\circ}\text{C}$  预冷(因为基质胶在 10  $^{\circ}\text{C}$  以上即会发生成胶凝固导致基质胶报废),整个分装过程要在冰上进行,分装好的基质胶存储于冰箱-20  $^{\circ}\text{C}$ ,以后每次实验时拿出本次用量的已经分装好的基质胶用,并做好标记;实验人员的手心不要接触 EP 管管壁,防止体温使基质胶成胶凝固。

1.8.2 Matrigel 准备 前 1 d 将基质胶从冰箱-20  $^{\circ}\text{C}$  放入 4  $^{\circ}\text{C}$ ,使胶能过夜缓慢融化,同时准备一些吸取基质胶所需的枪头置于冰箱-20  $^{\circ}\text{C}$  预冷。

1.8.3 铺胶 从冰箱取出融化的基质胶及预冷的枪头置于冰盒中,用预冷的枪头吸取 50  $\mu\text{L}$  基质胶加入 96 孔板中(注意枪头要垂直于内孔的正上方加入基质胶,防止有基质胶流

表 1 sh-MALAT1 和对照 NC 的序列

| 靶序列编号               | 靶序列                                                              |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| sh-MALAT1 sense     | CACCGGCCCCGAGACTTCTGTAAAGGATTCAAGAGATCCTTTACAGAAGTCTCGGGCTTTTTTG |
| sh-MALAT1 antisense | GATCCAAAAAGCCCGAGACTTCTGTAAAGGATCTCTTGAATCCTTTACAGAAGTCTCGGGCC   |
| si-NC sense         | CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAACTTTTTG     |
| si-NC antisense     | GATCCAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAAGACGTGACACGTTCCGGAGAACC     |

表 2 CD147 基因 CDS 区序列

| CD147 基因 CDS 区序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATGGCGGCTGCGCTGTTCTGCTGCTGGGATTGCGCTGCTGGGCACCCACGGAGCCTCCGGGGCTGCCGGCTTCGTCCAGGCGCCGCTGTCCACAGAGCTGGGTGGGGGGGCACTGTGAGCTGCACTGCGAGGCCGTGGGCAGCCCGGTGCCCGAGATCCAGTGGTGGTTGAAGGGCAGGGTCCCAA<br>CGACACCTGCTCCAGCTCTGGGACGGCGCCCGGCTGGACCGCTCCACATCCACGCCACCTACCACCAGCAGCGGGCCAGCACCATCTCCATCGA<br>CACCCTGCTGGAGGAGGACACGGGCACCTACGAGTGCCGGGCCAGCAACGACCCGGATCGCAACCACCTGACCCGGCGCCAGGGTCAAGTGG<br>GTCCGCGCCAGGCAGTCTGCTAGTCTGGAACCCGGCACAGTCTTACTACCGTAGAAGACCTTGCTCCAAAGATACTCTCTACCTGCTCCTTGA<br>ATGACAGCGCCACAGAGCTCACAGGCCACCGCTGGCTGAAGGGGGCGCTGCTGCTGAAGGAGGACCGCTGCCCGGCCAGAAAACGGAGTTCAA<br>GGTGGACTCCGACGACCACTGGGGAGACTACTCTGCGTCTTCTCCCGAGCCCATGGGCACGGCCAAACATCCAGCTCCACGGGCTCCAGAGT<br>GAAGGCTGTGAAGTCTCAGAACACATCAACGAGGGGAGACGGCCATGCTGGTCTGCAAGTCAAGTCCGTCACCTGTCACTGACTGGGCCT<br>GGTACAAGATCACTGACTCTGAGGACAAGGCCCTCATGAACGGCTCCGAGAGCAGGTTCTTCGTGAGTTCTCTCGAGGGCCGGTCAGAGCTACAC<br>ATTGAGAACCTGAACATGGAGGCCACCCCGGCCAGTACCGGTGCAACGGCACCACTCCAAGGGCTCCGACGAGCCATCATCAGCTCCGCGT<br>GCCGAGCCACCTGGCCGCCCTCTGGCCCTTCTGGGCATCTGGCTGAGGTGCTGGTGTGCTGCTCACCATCATCTTCATCTACGAGAAGCGCCGAA<br>GCCCCAGGACGTCTGGATGATGACGACGCGCGCTCTGCACCCCTGAAGAGCAGCGGGCAGCACCAGAATG<br>ACAAAGGCAAGAAGCTCCGCCAGAGGAACCTTCTCTGA |

表 3 所用引物序列

| 引物名称      | 引物序列                                          |
|-----------|-----------------------------------------------|
| CD147 正义链 | 5'-GCCGAATTCATATGGATATGGCTGGCTGCCGGCACAGTC-3' |
| CD147 反义链 | 5'-CAATACTCGAGTTAATGAGTGCACGCGGAGCGAGGTC-3'   |
| VEGF 正义链  | 5'-ACGTCTGCGGATCTTGGACAC-3'                   |
| VEGF 反义链  | 5'-GGGCTGCTGCAATGATGAAGC-3'                   |
| GAPDH 正义链 | 5'-GACTCAACGGATTTGGTCTCT-3'                   |
| GAPDH 反义链 | 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'                    |

经上孔而留下残留胶,由于基质胶流动性不强,为避免产生气泡,铺胶过程中一定要轻缓),将铺好胶的 96 孔板置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置 30 min,待胶凝固 30 min。

**1.8.4 铺细胞** 待胶凝固的同时准备细胞悬液,细胞计数(由于加入细胞的量直接影响实验结果,所以在正式实验开始之前要对不同类型的细胞和使用数量进行预实验,获得最佳比例的细胞密度,本实验中以 HUVEC-12 细胞为例),准备密度为  $2 \times 10^4$  个/150  $\mu$ L 的细胞悬液,充分混匀后加入铺好胶的孔板(铺细胞前,确认基质胶完全凝固,铺细胞时注意保持枪头垂直在上孔的上方,不要接触下孔的凝胶),然后置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4~6 h。

**1.8.5 图片采集** 将孔板置于 10 × 10 倍 CKX53 光学倒置显微镜观察并拍照,要求图片亮度、清晰度较好,拍摄的每张图片间无重复区域。

## 1.9 血清标本采集

标本采自 2017 年 1 月至 2018 年 1 月在湖南省肿瘤医院初诊的卵巢疾病患者,研究已获得湖南省肿瘤医院伦理协会批准。本研究共收集卵巢癌组患者 110 人,年龄分布为  $(50.21 \pm 10.11)$  岁,纳入标准:①所有患者术前均未接受任何放化疗治疗,均采用卵巢癌分期手术治疗,且均经病理、细胞学检查证实为卵巢癌。②全部患者接受肿瘤减灭术,术后 2 周开始接受以铂类为基础的联合化疗[紫杉醇+卡铂(TP),顺铂+环磷酰胺(PC),顺铂+表柔比星(其他名称:表阿霉素)+环磷酰胺(PAC)方案],30 d 为 1 个疗程,接受 6 个疗程化疗结束后,在化疗结束 30 d 后抽血进行 CD147 检测;通过临床表现、身体检查、血清 CA125 水平测定、超声或 CT 检查定期随访;当血清 CA125 水平重新升高和(或)出现影像学证据,诊断为复发。排除标准:伴有认知障碍或阅读、听写障碍者;伴有严重的肝肾功能障碍者;伴有急性血液系统疾病或急性感染者。

收集卵巢良性疾病组患者(包括畸胎瘤、囊腺瘤、巧克力囊肿、卵巢囊肿等)60 人,年龄分布  $(48.57 \pm 11.70)$  岁。收集体检正常的健康对照组妇女 50 人,年龄分布  $(49.10 \pm 10.53)$  岁。经统计学分析,3 组年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 1.10 统计学处理

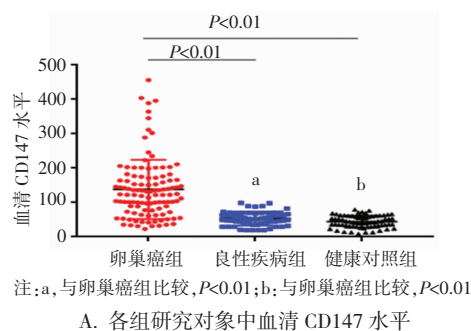
采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,各组数据采用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )数表示,两两组间比较采用  $t$  检验,所有实验均重复 3 次。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

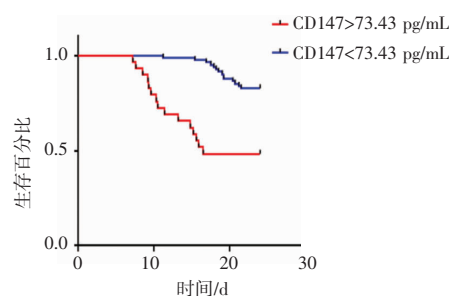
### 2.1 CD147 在卵巢癌中高表达且与患者较差的预后正相关

既往研究中,使用 ELISA 技术检测患者血清 CD147 的水平,其中 110 例卵巢癌组患者血清 CD147 水平为  $(147.61 \pm 86.06)$  pg/mL,60 例良性疾病组患者血清 CD147 水平为  $(53.17 \pm 20.16)$  pg/mL,50 例健康对照组血清 CD147 水平为  $(49.42 \pm 17.33)$  pg/mL。卵巢癌组血清 CD147 水平明显高于良性疾病组和健康对照组,且差异具有统计学意义( $t=8.766$ ,  $t=8.884$ ,  $P<0.05$ )(图 1A)。术后 CD147 高表达的卵巢癌患者预后较差,无进展生存时间较短,其低表达的卵巢癌患者预

后较好,无进展生存时间较长( $\chi^2=22.275$ ,  $\log\text{-rank}=20.400$ ,  $P<0.01$ )(图 1B)。



A. 各组研究对象中血清 CD147 水平



B. 术后不同血清 CD14 水平的卵巢癌患 PFS

图 1 各组研究对象中血清 CD147 水平与术后不同血清 CD14 水平的卵巢癌患 PFS

### 2.2 沉默 CD147 可以抑制卵巢癌细胞血管形成

SI-CD147 组血管分支数为  $137.00 \pm 15.09$ , SI-NC 组血管分支数为  $212.33 \pm 18.50$ , CONTROL 组血管分支数  $206.33 \pm 16.04$ , SI-CD147 组血管分支数低于 SI-NC 组血管分支数,且差异具有统计学意义( $t=-5.464$ ,  $P<0.01$ )(图 2)。

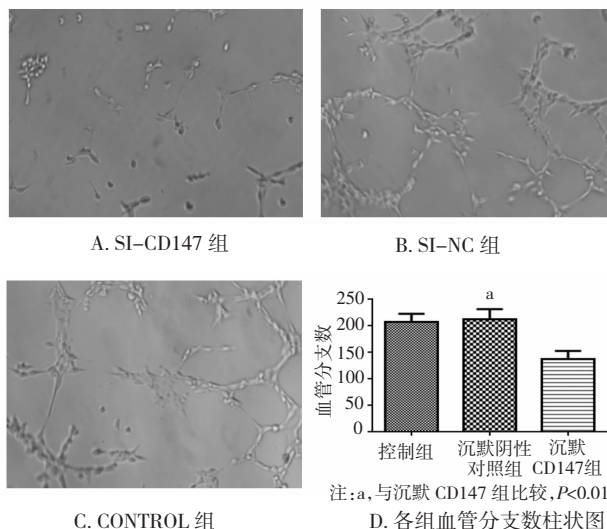


图 2 沉默 CD147 及对照组血管分支图

### 2.3 SP1 转录因子上调 CD147 的 mRNA 水平

使用实时荧光定量 PCR 技术检测各组中 CD147 的 mRNA 水平, OE-SP1 组中 CD147 的 mRNA 水平为  $2.38 \pm 0.26$ , OE-NC 组中 CD147 的 mRNA 水平为  $1.03 \pm 0.14$ , SI-SP1 组中 CD147 的 mRNA 水平为  $0.55 \pm 0.12$ , SI-NC 组中中

CD147 的 mRNA 水平为  $1.04 \pm 0.11$ 。OE-SP1 组中 CD147 的 mRNA 水平高于 SI-SP1 组中 CD147 的 mRNA 水平,且差异具有统计学意义( $t=10.847, P<0.01$ )(图 3)。

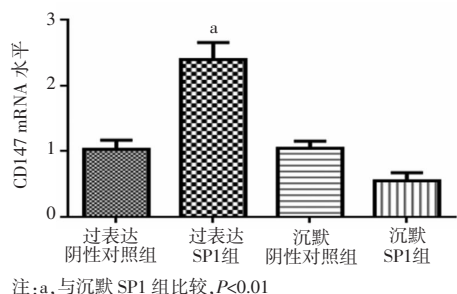


图 3 各组中 CD147 mRNA 水平

#### 2.4 沉默 SP1 通过靶向 CD147 抑制卵巢癌的血管形成

SI-SP1 组血管分支数为  $130.66 \pm 12.01$ , SI-NC 组血管分支数为  $200.66 \pm 21.73$ , SI-SP1+OE-NC 组血管分支数为  $135.33 \pm 15.04$ , SI-SP1+OE-CD147 组血管分支数为  $200.00 \pm 19.52$ , CONTROL 组血管分支数为  $198.33 \pm 21.59$ 。SI-SP1+OE-CD147 组血管分支数高于 SI-SP1 组血管分支数,且差异具有统计学意义( $t=5.239, P<0.01$ )(图 4)。

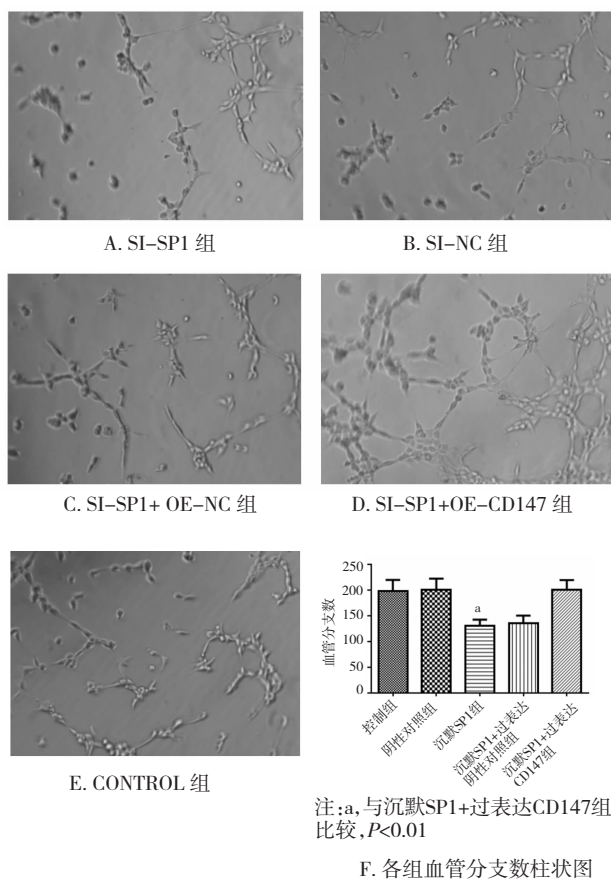


图 4 沉默 SP1 过表达 CD147 及对照组血管分支图

#### 2.5 过表达 CD147 抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路抑制卵巢癌细胞血管形成

CONTROL 组血管生成数为  $183.00 \pm 21.59$ , OE-NC 组血

管生成数  $189.00 \pm 21.28$ , OE-CD147 组  $373.67 \pm 29.02$ , OE-CD147+DMSO 组血管分支数为  $404.66 \pm 31.34$ , OE-CD147+KC7F2 组血管分支数为  $187.00 \pm 19.52$ 。OE-CD147 组血管生成数要高于 OE-CD147+KC7F2 组血管分支数,且差异具有统计学意义( $t=9.244, P<0.01$ )。使用 QPCR 技术检测各组中血管生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的分子水平, OE-CD147 组中 VEGF 的分子水平( $4.05 \pm 0.09$ )高于 OE-CD147+KC7F2 组中 VEGF 的分子水平( $1.02 \pm 0.11$ ),且差异具有统计学意义( $t=37.401, P<0.01$ )(图 5)。

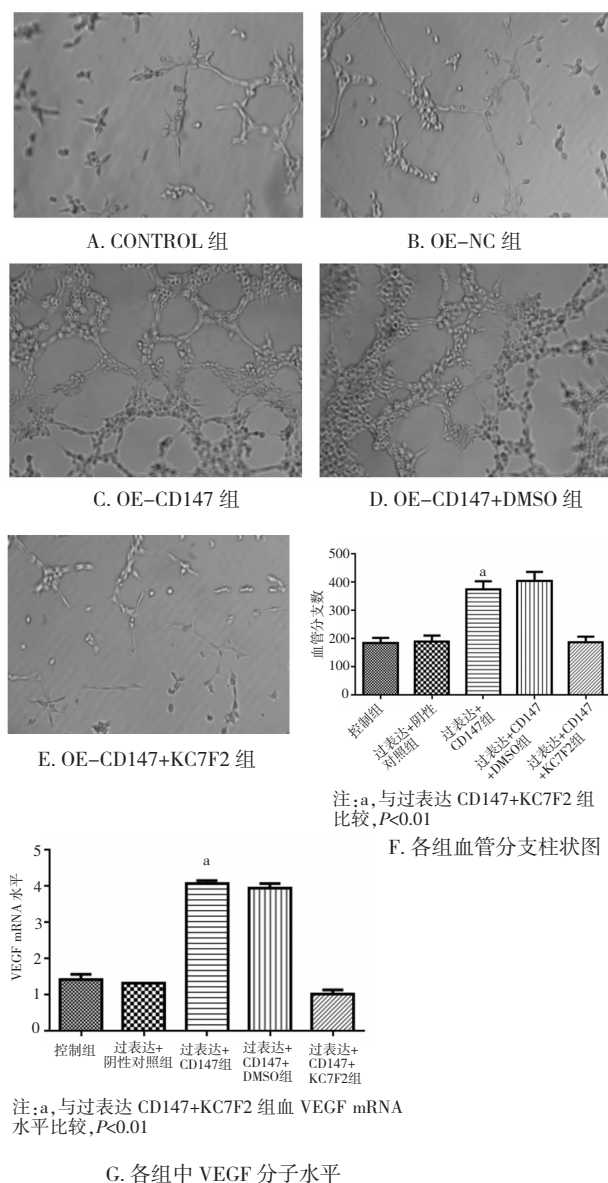


图 5 抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路及对照组血管分支图

### 3 讨论

肿瘤是一种细胞异常分化、增殖的疾病,其侵袭性的生长方式及转移要依赖新生血管网的形成,

因此探索肿瘤血管形成的机制对抑制肿瘤生长和转移具有十分重要的意义<sup>[9]</sup>。

CD147 是一种多功能诱导因子,诱导邻近成纤维细胞、内皮细胞旁分泌产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),从而降解由胶原、弹性蛋白、黏着蛋白、蛋白聚糖等构成的细胞外基质,为肿瘤细胞的转移运动提供条件,促进其浸润与扩散<sup>[10]</sup>。因此,CD147 在肿瘤的侵袭与转移过程中起重要作用,在肿瘤细胞中高度表达与肿瘤分化程度、浸润及转移密切相关<sup>[11]</sup>。有研究证实,CD147 可作为卵巢癌不良预后的重要指标,通过 MMP 和 VEGF 的产生,调节肿瘤生长、刺激血管形成、增加卵巢癌的恶性进展<sup>[12]</sup>。通过模拟体外血管生成实验发现过表达 CD147 可以促进细胞的血管生成,而沉默 CD147 可以有效抑制细胞的血管生成,进一步证明 CD147 可以调控卵巢癌细胞的增殖、转移、侵袭、血管形成。

为了探讨 CD147 在卵巢癌中高表达的原因,发现 SP1 在 CD147 的启动子区域有结合位点,SP1 可以上调下游靶基因 CD147 表达,从而促进卵巢癌的发生发展<sup>[13]</sup>。Zhao J 等<sup>[14]</sup>的研究显示,SP1-CD147 正反馈环路可以促进卵巢癌的侵袭。实时荧光 PCR 技术结果证实 OE-SP1 组中 CD147mRNA 水平高表达,SI-SP1 组中 CD147mRNA 水平低表达,然后通过体外细胞血管生成实验发现沉默 SP1 后可以抑制细胞血管生成,沉默 SP1 后再过表达 CD147 可以促进细胞血管生成。综合上述结果,提示 SP1 可以介导 CD147 表达,从而影响细胞血管生成。

文献表明,干扰 CD147 的表达可以下调 VEGF 的表达从而抑制乳腺癌的转移和侵袭<sup>[11]</sup>。另有文献表明缺氧诱导因子-1 $\alpha$ /血管内皮生长因子(hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor, HIF-1 $\alpha$ /VEGF)信号通路可以调控黑色素瘤的迁移、侵袭和血管形成<sup>[15]</sup>。由此说明 CD147 可以调控 VEGF 表达,HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路可以调控细胞的血管形成,但是 CD147 介导 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路影响卵巢癌细胞的血管形成机制尚不清楚。本次研究的最后一组细胞实验中,通过对比 OE-CD147 组和 OE-CD147+HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂组血管生成,发现过表达 CD147 后使用 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂会明显抑制细胞血管的生成并且 VEGF 的表达水平下降,而未使用 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂的过表达 CD147 组中血管的生成不受影响,VEGF 的表达水平不变。结果提示 CD147 可以激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路,促进 VEGF 的生成,从而刺激细胞血管的生成。

综上所述,卵巢癌中 CD147 表达升高,上游转录因子 SP1 可以正反馈 CD147 表达,从而激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路,调节肿瘤生长,刺激血管形成,增加卵巢癌的恶性进展,最终参与卵巢癌的发病。本次试验是使用生理状态下的 HUVEC 细胞代替肿瘤血管模型,但是肿瘤血管和生理状态下的血管形态、生长都有一定差异,还需要构建动物移植瘤模型进一步研究其作用机制。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [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] Marchetti C, De Felice F, Perniola G, et al. Screening program in ovarian cancer; a logical step in clinical management? A Meta-analysis[J]. Curr Probl Cancer, 2018, 42(2): 235-240.
- [4] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [5] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [6] Agrawal SM, Yong VW. The many faces of EMMPRIN: roles in neuroinflammation[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(2): 213-219.
- [7] Liu J, Liu Q, Wang Y, et al. Coexpression of Lewis y antigen and CD147 in epithelial ovarian cancer is correlated with malignant progression and poor prognosis[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(4): 1687-1698.
- [8] 孙丽莎, 邓红玉, 黄宏君, 等. 血清 CD147 水平在卵巢癌中的诊断价值及对预后复发的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(1): 73-78.
- [9] Lu T, Wu B, Yu Y, et al. Blockade of ONECUT2 expression in ovarian cancer inhibited tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis[J]. Cancer Sci, 2018, 109(7): 2221-2234.
- [10] Xiong L, Edwards CK 3rd, Zhou L. The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases; a review of the current scientific literature[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(10): 17411-17441.
- [11] Li F, Zhang JP, Guo J, et al. RNA interference targeting CD147 inhibits metastasis and invasion of human breast cancer MCF-7 cells by downregulating MMP-9/VEGF expression[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2018, 50(7): 676-684.
- [12] Yang H, Chen B. CD147 in ovarian and other cancers[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(1): 2-8.
- [13] Kong LM, Liao CG, Fei F, et al. Transcription factor SP1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(6): 1463-1470.
- [14] Zhao J, Ye W, Wu J, et al. SP1-CD147 positive feedback loop promotes the invasion ability of ovarian cancer[J]. Oncology Reports, 2015, 34(1): 67-76.
- [15] Zheng Y, Chen H, Zhao Y, et al. Knockdown of FBXO22 inhibits melanoma cell migration, invasion and angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(1): 20-28.

(责任编辑:唐秋姗)