

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI: 10.11699/cyxh20130508

干扰 Krüppel 样因子 8 表达对肝癌 SMMC7721 细胞中血管生成相关因子的调控作用

李 旭¹, 徐亚丽², 李 英¹, 戴晓波¹, 张幸平¹, 张 涛¹, 李甲初¹, 陈晓品¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016; 2. 重庆市第三人民医院老年病科, 重庆 400014)

【摘要】目的:构建 Krüppel 样因子 8(Krüppel-like factor 8, KLF8)的真核表达质粒及干扰质粒,考查 KLF8 对人肝癌 SMMC7721 细胞中血管生成相关因子的调控作用。**方法:**构建 KLF8 的真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF8,测序确认。构建靶向不同 KLF8 干扰位点的干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8,筛选出干扰效率最高的 pGPU6/GFP/Neo-KLF8。将 pcDNA3.1-KLF8、相应的对照质粒 pcDNA3.1、pGPU6/GFP/Neo-KLF8、相应的对照质粒 pGPU6/GFP/Neo-ShNC 分别转染人肝癌 SMMC7721 细胞,共 4 组。实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 KLF8 的表达,qPCR 检测各组细胞中低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)1- α 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素(angiotensin, Ang)1、Ang2、血管生成素受体 Tie2 及基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMP)2 的 mRNA 表达。**结果:**pcDNA3.1-KLF8 显著上调 KLF8 表达(相对表达量为 68.8 ± 6.5), pGPU6/GFP/Neo-KLF8 下调 KLF8 的表达(相对表达量 0.31 ± 0.01)。转染 pcDNA3.1-KLF8 组与其对照组相比,VEGF、Ang2、HIF1- α 及 MMP2 mRNA 表达增加($P < 0.05$),血管生成素受体 Tie2、Ang1 的 mRNA 表达无差异($P > 0.05$);转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 组与其对照组相比,Ang2 和 HIF1- α 表达降低($P < 0.05$),VEGF、血管生成素受体 Tie2、Ang1 及 MMP2 的表达无差异($P > 0.05$)。**结论:**在肝癌中,KLF8 可能通过调控 VEGF、Ang2、HIF1- α 及 MMP2 来调控血管生成。

【关键词】肝细胞癌; Krüppel 样因子 8; 血管生成相关因子**【中国图书分类法分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-12-13

Regulation of altered Krüppel-like factor 8 expressions on angiogenesis related factors of hepatocellular carcinoma SMMC7721

LI Xu¹, XU Yali², LI Ying¹, DAI Xiaobo¹, ZHANG Xingping¹, ZHANG Tao¹, LI Jiachu¹, CHEN Xiaopin¹

(1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Gerontology, the Third People's Hospital in Chongqing)

【Abstract】Objective: To construct Krüppel-like factor 8(KLF8) expression plasmid pcDNA3.1-KLF8 and KLF8 interference plasmid pGPU6/GFP/Neo-KLF8 and to investigate role of KLF8 in regulating angiogenesis related factors in SMMC7721. **Methods:** KLF8 expression plasmid pcDNA3.1-KLF8 and KLF8 interference plasmid pGPU6/GFP/Neo-KLF8 targeting four interference sites were constructed and then were screened for the most effective one. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to confirm the effects on regulating KLF8 levels. pcDNA3.1-KLF8, pcDNA3.1, pGPU6/GFP/Neo-KLF8 and pGPU6/GFP/Neo-ShNC plasmid were transfected into human SMMC7721 cells separately. mRNA levels of hypoxia-inducible factor(HIF)1- α , vascular endothelial growth factor(VEGF), angiotensin 1(Ang1), angiotensin 2(Ang2), angiotensin receptor Tie2, matrix metallo-proteinase(MMP)2 were investigated by qPCR. **Results:** Sequencing showed that KLF8 eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-KLF8 was successfully constructed and pcDNA3.1-KLF8 significantly up-regulated KLF8 expressions(relative expression: 68.8 ± 6.5). The most efficient KLF8 interference plasmids pGPU6/GFP/Neo-KLF8 was obtained and pGPU6/GFP/Neo-KLF8 down-regulated KLF8 expressions(relative expression: 0.31 ± 0.01). Compared with those in control group, mRNA levels of VEGF, Ang2, HIF1- α and MMP2 were increased($P < 0.05$) while angiotensin receptor Tie2 and Ang1 had no significant changes($P > 0.05$) in experiment group(transfected with pcDNA3.1-KLF8). Meanwhile, compared with those in control group(transfected with pGPU6/GFP/Neo-ShNC), mRNA levels of Ang2 and HIF1- α were decreased($P < 0.05$) while VEGF, angiotensin receptor Tie2, MMP2 and Ang1 displayed no significant changes($P > 0.05$) in experiment group(transfected with pGPU6/GFP/Neo-KLF8). **Conclusion:** KLF8 may regulate angiogenesis in SMMC7721

作者介绍: 李 旭, Email: 513661614@qq.com,

研究方向: 肿瘤血管发生机制。

通信作者: 李甲初, Email: jcleel127@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81001096/H1617); 重庆

市自然科学基金资助项目(编号: CSTC, 2010BB5395)。

by regulating several angiogenesis related factors such as VEGF, Ang2, HIF1- α and MMP2.**【Key words】** hepatocellular carcinoma; Krüppel-like factor 8; angiogenesis related factor

肝癌是常见的并且危害严重的恶性肿瘤之一,在我国肝癌是位列第 2 的癌症死因^[1]。肝癌也是最富血管化的肿瘤之一,血管发生在肝癌的早期阶段、生长及转移中发挥着重要作用^[2],目前调控肝癌血管生成的机制尚不清楚。

Krüppel 样因子 8(Krüppel-like factor 8,KLF8)是调节基因转录的核蛋白家族的一个成员,包含了一个特征性的羧基末端 DNA 结合结构域,其由 3 个 Krüppel 样锌指结构组成。KLF8 的锌指结构识别 DNA 序列里的 CACCC 元件,抑制 CACCC 依赖性启动^[3]。有研究^[4-6]显示,KLF8 在肝癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌等多种富血管化实体肿瘤中表达增加,促进肿瘤的侵袭及转移。作为转录因子的 KLF8 是否在肝癌中调控血管生成目前国际上尚无相关报道。

本研究通过构建 KLF8 真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF8 及干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8,经测序确认,并验证其有效上调或下调 KLF8 表达后分别转染肝癌 SMMC7721 细胞,以转染相应的空白质粒的细胞为对照,实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)检测多种血管生成相关因子:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、血管生成素(angiotensinogen,Ang)2、低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)、基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase,MMP)2、血管生成素受体 Tie2、Ang1 的变化,以探讨 KLF8 在肝癌血管生成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株及质粒 SMMC7721 细胞由广州中山大学肿瘤研究所馈赠,HCCLM3 由复旦大学附属中山医院肝癌研究所惠赠,感受态细胞 DH5 α 购自北京鼎国生物技术有限公司,pcDNA3.1 载体及 pcDNA3.1-control(阴性对照质粒)均购自 Invitrogen 公司,引物由宝生物(大连)生物技术公司合成。根据不同的干扰靶位点,上海吉玛制药技术有限公司设计并合成干扰质粒如下:pGPU6/GFP/Neo-KLF8-974,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1041,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1163,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 及 pGPU6/GFP/Neo-ShNC(阴性对照质粒)。

1.1.2 试剂 Purelink HQ Plasmid Pure Kit 质粒提取试剂盒、Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒、Agarose、RPMI1640 培养液、胎牛血清购自 Invitrogen 公司,胶回收试剂盒购自鼎国生物技术有限公司,限制性内切酶、T4DNA 连接酶、逆转录试剂盒(DRR047A)、RT-qPCR 试剂盒(DRR820A)购自宝

生物工程(大连)有限公司,鼠抗人 KLF8 单克隆抗体(M12)购自 abnova 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、小鼠抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物技术有限公司。其他为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF8 的构建及鉴定

1.2.1.1 真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF8 的构建 在高表达 KLF8 的肝癌细胞 HCCLM3 中提取总 mRNA,RT-PCR 克隆 KLF8 编码区序列,并在引物的两端分别加上 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。克隆的 KLF8 编码区序列经测序确认。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶分别对 pcDNA3.1 及 KLF8 序列进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶将线性化 pcDNA3.1 与 KLF8 序列连接,筛选出形成重组的真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF8 的菌落。挑出单克隆菌落,进行氨苄青霉素的筛选,提取 pcDNA3.1-KLF8 质粒。将 pcDNA3.1-KLF8 质粒送至重庆医科大学感染病实验室测序确认。

1.2.1.2 pcDNA3.1-KLF8 上调 KLF8 表达的鉴定 pcDNA3.1-KLF8 瞬时转染 SMMC7721,以 pcDNA3.1 瞬时转染 SMMC7721 为对照组,24 h 后在荧光显微镜下观察转染后的 SMMC7721 细胞荧光,以检测转染效率。RT-qPCR 及 Western blot 检测 KLF8 的表达。

1.2.1.2.1 RT-qPCR 转染 48 h 后收集细胞,TRIzol 法提取总 RNA,RT-qPCR 检测各组细胞中的 KLF8、GAPDH 的表达,引物序列 KLF8:F:5'-GCTCACCAGCAGAATCCATACA-3'; R:5'-GTGCACCGAAAAGGCTTGAT-3'; GAPDH:F:5'-TGG-TATCGTGAAGGACTCA-3'; R:5'-CCAGTAGAGGCAGGG-ATGAT-3'。PCR 反应采用 20 μ l 体系,上下游引物(10 μ mol)各 0.8 μ l、模板 2 μ l、ROX Reference Dye II (50 $\times$)0.4 μ l、SYBR Premix Ex Taq™ II (2 $\times$)10 μ l。在 ABI 7500 Real-time PCR 反应体系中反应,循环条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,共 40 个循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。

1.2.1.2.2 Western blot 细胞转染 48 h 后,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,用 Western blot 裂解液:cocktail:PMSF 为 100:1:1 的体积比例混合液裂解细胞,然后 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白量调整一致后,加入 SDS 缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性 10 min。配制 12% SDS-PAGE 胶,蛋白样品经电泳分离后,电转移至聚偏二氟乙烯膜上。将膜置于含 5%脱脂奶粉的 PBST 中封闭 1 h,随后加入鼠抗人 KLF8 单克隆抗体稀释液和小鼠抗 GAPDH 抗体稀释液 4 $^{\circ}$ C 过夜;用 PBST 洗膜,10 min/次,洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 稀释液在室温下反应 1 h,洗膜,方法同上,洗 3 次。最后 ECL 显影。

1.2.2 干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 的筛选

1.2.2.1 靶向 4 个不同干扰位点的 KLF8 干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-974,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1041,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1163,pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 及对照质粒 pGPU6/GFP/Neo-ShNC 由上海吉玛公司合成。将质粒转化

入感受态细胞 DH5 α , 挑出单克隆菌落, 进行卡那霉素的筛选, 分别提取质粒。用脂质体转染试剂盒分别将其转染人 SMMC7721 肝癌细胞, 24 h 后在荧光显微镜下观察转染后的 SMMC7721 细胞荧光, 以检测转染效率。转染 48 h 后收集细胞, TRIzol 法提取总 RNA, RT-qPCR 检测各组细胞中 KLF8、GAPDH 的 mRNA 水平, 引物及反应体系、反应条件如 1.2.1.2。筛选出干扰效率最高的质粒为 pGPU6/GFP/Neo-KLF8。

1.2.2.2 Western blot 检测干扰效率最高组 KLF8 蛋白的表达方法同 1.2.1.2。

1.2.3 SMMC7721 中上调或下调 KLF8 后血管生成相关因子的表达情况

1.2.3.1 人肝癌 SMMC7721 细胞的培养及质粒的瞬时转染

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 、含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI1640 培养液的条件下进行培养。在细胞对数生长期, 将同一批细胞接种在 6 个 6 孔板中, 每孔接种 4×10^5 个细胞, 待细胞生长到 70%, 用脂质体转染试剂盒将 pcDNA3.1-KLF8, pcDNA3.1 质粒转染人肝癌 SMMC7721 细胞, 每组 3 个复孔($n=3$), 称为 KLF8 上调实验组、KLF8 上调对照组; KLF8 的下调实验分组同上, 分别转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8、PG-PU6/GFP/Neo-ShNC 质粒, 每组 3 个复孔($n=3$), 称为 KLF8 下调实验组和 KLF8 下调对照组, 24 h 后在荧光显微镜下观察质粒的转染效率。

1.2.3.2 RT-qPCR 检测各组细胞中 KLF8、VEGF、Ang2、HIF1- α 、MMP2、血管生成素受体 Tie2、Ang1 的表达 TRIzol 法提取总 RNA, RT-qPCR 检测各组细胞中的 KLF8、VEGF、Ang2、HIF1- α 、MMP2、血管生成素受体 Tie2、Ang1 的 mRNA 水平。KLF8 与 GAPDH 用上述引物, 其他血管生成相关因子的引物序列如下: VEGF:F:5'-ACTTTCTGCTGTCTT-GGGTG-3', R:5'-CTGCATGCTGATGTTGGACT-3'; Ang1:F:5'-AGAGC-AGCCTGATCTTACACGGT-3', R:5'-CCACAAGCATCAAAC-CACCATC-3'; Ang2:F:5'-GGATTTGGTAACCCCTTCA-3', R:5'-ATTCCTTCCAGTCTTT-3'; 血管生成素受体 Tie2:F:5'-TGCTTGGACCTTACTGACATTC-3', R:5'-TGCCTTG-AACCTTGTAAACGGA-3'; HIF1- α :F:5'-ATTACCCACCGC-TGAAACGC-3', R:5'-TGAACCTTGTCTAGTGCTTCCATCG-3'; MMP2:F:5'-ACATCAAGGGCATTACAGGAGC-3', R:5'-CACAGTCCGCCAAATGAACC-3'。PCR 反应体系为 20 μl , 反应条件同上。计算 Ct 值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行分析。各血管生成相关因子实验组相对于其对照组的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算, ΔCt 值=各种血管生成因子 Ct 值-GAPDH 基因 Ct 值, $-\Delta\Delta\text{Ct}$ 值=对照组 ΔCt 值-实验组 ΔCt 值。相对表达量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, KLF8 上调实验组相对于其对照组和 KLF8 下调实验组相对于其对照组间比较用配对 t 检验进行统计。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-KLF8 真核表达质粒的测序及功能鉴定

将构建好的 pcDNA3.1-KLF8 质粒送至重庆医科大学感染病实验室测序确认, 结果经与 KLF8 编码区域序列比对, 序列无变异。与对照组比较, 转染 pcDNA3.1-KLF8 的细胞中 KLF8 mRNA 的相对表达量为 68.8 ± 6.5 , $P < 0.05$, 差异具有统计学意义(图 1)。Western blot 结果显示转染 pcDNA3.1-KLF8 组较对照组 KLF8 蛋白水平明显上调(图 2)。提示成功构建 KLF8 真核表达载体 pcDNA3.1-KLF8, 其能有效上调 KLF8 mRNA 水平和蛋白水平的表达。

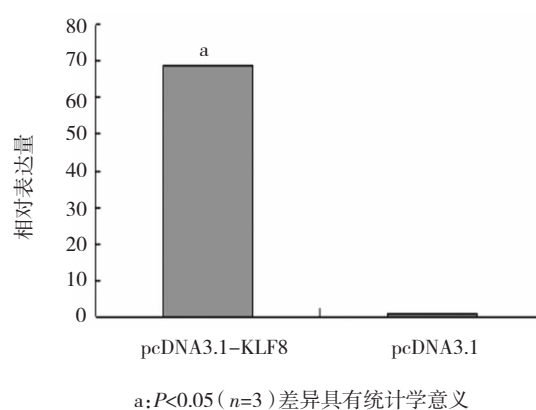


图 1 RT-qPCR 检测转染 pcDNA3.1-KLF8 和 pcDNA3.1 的 SMMC7721 细胞中 KLF8 mRNA 的表达
Fig.1 Expressions of KLF8 mRNA in pcDNA3.1-KLF8 and pcDNA3.1 transfected SMMC7721 detected by RT-qPCR

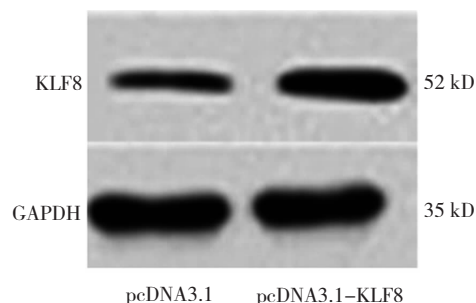


图 2 Western blot 检测转染 pcDNA3.1-KLF8 和 pcDNA3.1 的 SMMC7721 细胞中 KLF8 蛋白的表达
Fig.2 Expressions of KLF8 protein in pcDNA3.1-KLF8 and pcDNA3.1 transfected SMMC7721 detected by Western blot

2.2 真核干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 的筛选

使用荧光显微镜观察干扰质粒转染细胞 24 h 后荧光表达情况, 未转染质粒的人 SMMC7721 肝癌细胞组无荧光表达, 计数表达荧光的细胞比例, 转染效率高于 60%(图 3)。RT-qPCR 检测各组细胞中的 KLF8 mRNA 表达情况, 以 GAPDH 为内参。与 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-ShNC 对照组相

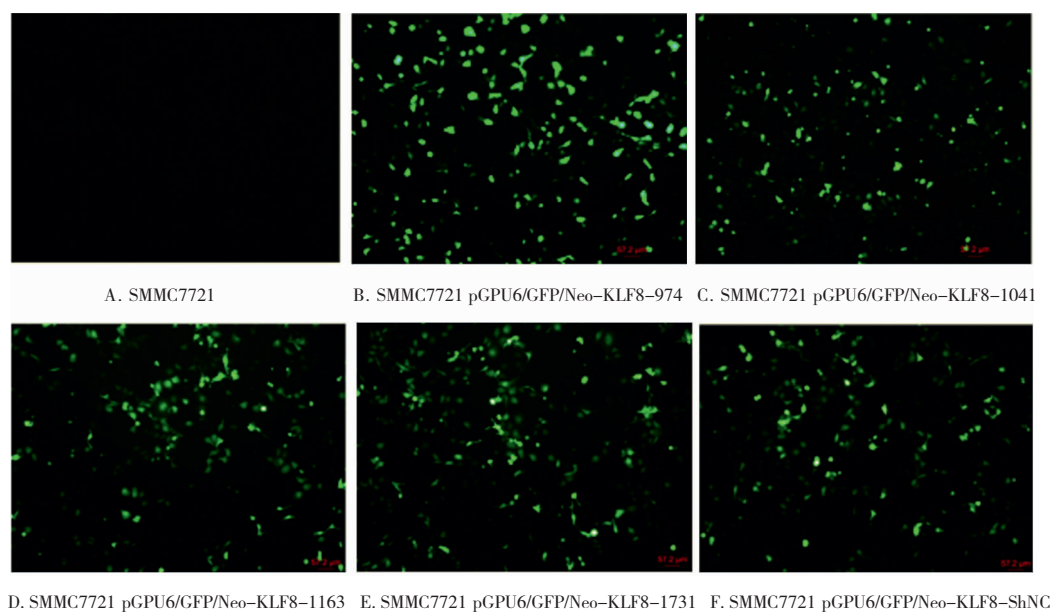
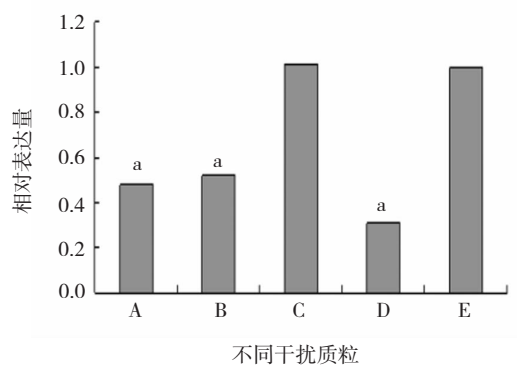


图 3 转染 24 h 后荧光表达情况 (200 ×)

Fig.3 Fluorescence expressions at 24 h after the transfection (200 ×)

比, KLF8 mRNA 在各转染组的相对表达量如下(图 4)转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-974 组: 0.48 ± 0.04 ($P < 0.05$); 转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1041 组: 0.56 ± 0.05 ($P < 0.05$); 转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1163 组: 1.09 ± 0.12 ($P > 0.05$); 转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 组: 0.31 ± 0.01 ($P < 0.05$)。其中 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 质粒的干扰效果最佳, 选用该质粒行下述研究。Western blot 显示 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 有效

a: $P < 0.05$, $n = 3$, 差异具有统计学意义

- A. SMMC7721-PGPU6/GFP/Neo-KLF8-974
- B. SMMC7721-PGPU6/GFP/Neo-KLF8-1041
- C. SMMC7721-PGPU6/GFP/Neo-KLF8-1163
- D. SMMC7721-PGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731
- E. SMMC7721-PGPU6/GFP/Neo-ShNC

图 4 不同干扰质粒转染 SMMC7721 细胞后, RT-qPCR 检测 KLF8 mRNA 在各组细胞中的表达

Fig.4 Expressions of KLF8 mRNA in SMMC7721 transfected with different interference plasmids detected by RT-qPCR

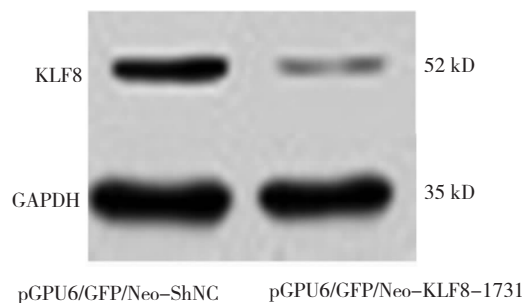


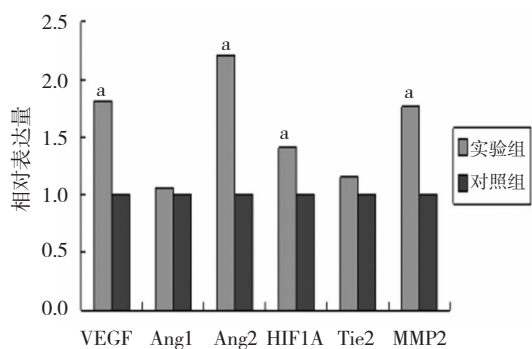
图 5 Western blot 检测转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 和对照质粒 pGPU6/GFP/Neo-ShNC 的 SMMC7721 中 KLF8 的表达

Fig.5 Expressions of KLF8 in pGPU6/GFP/Neo-KLF8-1731 and pGPU6/GFP/Neo-ShNC transfected SMMC7721 detected by Western blot

2.3 pcDNA3.1-KLF8 上调 KLF8 的 SMMC7721 及 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 下调 KLF8 的 SMMC7721 中血管生成相关因子 VEGF、Ang1、Ang2、血管生成素受体 Tie2、HIF1- α 、MMP2 的表达情况

荧光显微镜观察 pGPU6/GFP/Neo-KLF8、pGPU6/GFP/Neo-ShNC 质粒转染细胞 24 h 后荧光表达情况, 转染效率高于 60%, 未转染质粒的 SMMC7721 人肝癌细胞无荧光表达。与对照组比较, 转染 pcDNA3.1-KLF8 质粒的细胞组中 VEGF (相对表达量: 1.87 ± 0.16 , $P < 0.05$)、Ang2 (2.21 ± 0.34 , $P < 0.05$)、HIF1- α (1.41 ± 0.14 , $P < 0.05$) 及 MMP2 (1.77 ± 0.25 , $P < 0.05$) 表达增加, 差异有统计学意义, 血管生成素受体 Tie2 (1.16 ± 0.13 , $P > 0.05$)、Ang1 (1.06 ± 0.08 , $P > 0.05$) 的表达差异无统计学意义(图 6)。与对照组相比转染 pGPU6/GFP/Neo-KLF8 质粒的细胞组中 Ang2 (相对表达量: 0.40 ± 0.08 , $P < 0.05$) 和 HIF1- α (0.69 ± 0.08 , $P < 0.05$) 表达降低, 差异有统计学意义, VEGF (1.02 ± 0.28 , $P > 0.05$)、血管生成素受体 Tie2 (0.68 ± 0.19 , $P >$

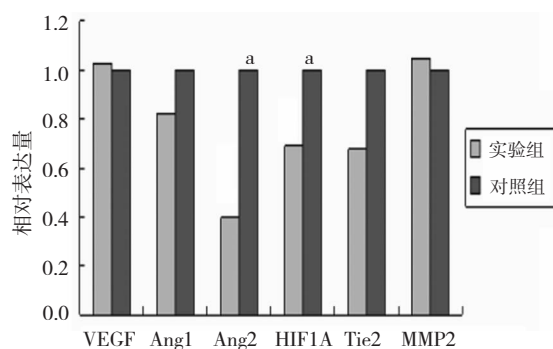
0.05)、Ang1 ($0.82 \pm 0.10, P > 0.05$) 及 MMP2 ($0.82 \pm 0.10, P > 0.05$) 无明显变化, 差异无统计学意义(图 7)。



a: $P < 0.05, n = 3$, 差异具有统计学意义

图 6 qPCR 检测上调 KLF8 后的 SMMC7721 中血管生成相关因子的相对表达量

Fig.6 Relative expressions of angiogenesis related factors after up-regulating KLF8 in SMMC7721 detected by qPCR



a: $P < 0.05, n = 3$, 差异具有统计学意义

图 7 RT-qPCR 检测下调 KLF8 后的 SMMC7721 中血管生成相关因子相对表达量的改变并与对照组比较

Fig.7 Changes in relative expressions of angiogenesis related factors after down-regulating KLF8 in SMMC7721 detected by RT-qPCR and its comparison with control group

3 讨论

肝癌[主要是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)]是最富血管化的肿瘤之一, 具有高血管侵袭的特征, 其血管生成活性与血管侵袭的危险度^[7]和转移相关^[8]。研究肝癌中调节血管生成的分子机制有助于发现肝癌抗血管生成治疗的靶点。

VEGF 是目前为止肝癌中最重要的血管生成因子^[9]。其作用经内皮细胞由其受体 VEGFR1 和 VEGFR2 介导^[10]。HCC 肿瘤细胞中的 VEGF 过表达和肿瘤血管生成有直接的联系^[11]。HIF-1 表达于乏氧的肿瘤细胞中, 可激活促血管生成因子如 VEGF/血小板源性生长因子, 增加增殖和肿瘤血管的再生^[12]。HCC 低氧区域 VEGF 的表达可通过 HIF1- α 途径

上调^[13]。本研究中发现上调 KLF8 的 SMMC7721 中 VEGF、HIF1- α 表达增加, 而下调 KLF8 的 SMMC7721 中 HIF1- α 表达降低, VEGF 的表达未见明显下降, 提示 KLF8 在肝癌中可能调控 HIF1- α 的表达, 其调控机制是通过直接与 HIF1- α 启动子区域结合进行转录调控还是通过其他间接的机制尚待进一步的研究; KLF8 上调 VEGF 的表达作用极有可能是通过上调 HIF1- α 表达间接实现的, KLF8 与 VEGF 之间是否有直接的关联, 目前尚不清楚。

Ang 在血管发生中也发挥着重要作用, 其作用主要由血管生成素受体 Tie2 介导。Ang1 是内皮细胞的一个生存信号, 促进周细胞和平滑肌细胞的募集反应来形成成熟的血管。Ang2 在 HCC 的瘤组织中高表达, 与肿瘤血管生成和肿瘤侵袭的病理特征如门静脉侵袭相关; HCC 中 VEGF 和 Ang2 的表达具有很强的正相关性^[14]。本研究上调或下调 KLF8 后, SMMC7721 中的 Ang1 及血管生成素受体 Tie2 mRNA 水平无明显改变, 而 Ang2 的 mRNA 水平随 KLF8 的上调或下调, 其表达相应的增加或降低。提示 KLF8 在肝癌中调控 Ang2 的表达, 需要进一步研究以明确作为转录因子的 KLF8 是否通过与 Ang2 的启动子区域结合来调控其表达。上调 KLF8 后 Ang2 和 VEGF 表达均增高, 与既往 HCC 中 VEGF 和 Ang2 的表达具有很强的正相关性的发现一致。

MMPs 通过增强癌细胞生长、移动及侵袭、转移、血管生成来促进肿瘤进展。MMP2 和 MMP9 可诱导 VEGF 的释放^[15]。本研究结果显示上调 KLF8 的 SMMC7721 中 MMP2 也有上调, 但下调 KLF8 后 MMP2 无相应的下调, 提示肝癌中 KLF8 与 MMP2 之间存在相互关联。KLF8、HIF1- α 、VEGF、MMP2 之间可能存在一个相互调控的网络, 共同参与肝癌中血管生成的调节。

综上所述, 本研究成功构建了 pcDNA3.1-KLF8 表达质粒, 并筛选出干扰效果最强 KLF8 干扰质粒 pGPU6/GFP/Neo-KLF8, 为进一步研究 KLF8 的功能奠定了基础, 在肝癌中 KLF8 可能通过调控 VEGF、Ang2、HIF1- α 及 MMP2 的表达来调控血管生成。

参 考 文 献

- [1] Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(1): 97-104.
- [2] Park Y N, Kim Y B, Yang K M, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of

¹²⁵I 放射性粒子植入联合 CIK 细胞对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

吴 念¹, 龚建平¹, 冯虎翼², 幸定培¹, 吴 伟¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010; 2. 重庆市第五人民医院普外科, 重庆 400062)

【摘要】目的:观察¹²⁵I 放射性粒子组织间植入联合细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制效应。**方法:**取健康人外周血单个核细胞, 加入不同的细胞因子促进 CIK 细胞成熟, 流式细胞仪检测 CIK 细胞表型, CD3⁺CD56⁺双阳性细胞达 20% 以上为达标; 用人肝癌细胞株 SMMC-7721 建立裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为¹²⁵I 放射性粒子组(A 组)、CIK 细胞组(B 组)、¹²⁵I 粒子+CIK 细胞组(C 组)、空白对照组(D 组), 分别加处理因素, 每 4 d 测量各组移植瘤体积, 观察它们对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。HE 染色检测各组移植瘤病理变化, 免疫组织化学技术检测各组 Ki-67 蛋白表达, TUNEL 试剂盒检测各组移植瘤原位凋亡。**结果:**¹²⁵I 粒子放射性粒子植入联合 CIK 细胞静脉输入可明显抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长, C 组瘤体积为(0.42 ± 0.17) cm³, 显著小于 A 组(1.23 ± 0.83) cm³、B 组(3.77 ± 1.42) cm³ 和 D 组(6.62 ± 0.53) cm³, 各组瘤体积有显著性差异($F=155.706, P<0.001$); C 组抑瘤率为 93.71%, 显著高于 A 组(81.33%) 和 B 组(43.06%)。免疫组化染色发现各组移植瘤 Ki-67 蛋白表达的平均吸光度值分别为: C 组(0.481 ± 0.063)、A 组(0.592 ± 0.104)、B 组(0.669 ± 0.120)、D 组(0.797 ± 0.113), 差异有统计学意义($F=24.334, P<0.001$)。TUNEL 法发现: C 组凋亡的平均光吸光度值(0.859 ± 0.067), 显著高于 A 组(0.756 ± 0.055) 和 B 组(0.517 ± 0.051), 差异有显著统计学意义($F=318.373, P<0.001$), 联合治疗明显抑制细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡。**结论:**¹²⁵I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞免疫治疗在体内可显著抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长, 抑制癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 其疗效优于单一治疗方式, 局部内放疗联合细胞免疫治疗可能有协同增效作用, 有可能成为肝癌综合治疗的方法之一。

【关键词】肝癌; ¹²⁵I 放射性粒子; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 裸鼠移植瘤

【中国图书分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-19

作者介绍: 吴 念, Email: cqwn2010@126.com,

研究方向: 肝癌的微创治疗研究。

通信作者: 龚建平, Email: gongjianping11@126.com。

multistep hepatocarcinogenesis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7): 1061-1065.

[3] Van Vliet J, Turner J, Crossley M. Human Krüppel-like Factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(9): 1955-1962.

[4] Wang X, Zhao J. KLF8 transcription factor participates in oncogenic transformation[J]. Oncogene, 2007, 26(3): 456-461.

[5] Li J C, Yang X R, Sun H X, et al. Up-regulation of Krüppel-Like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6): 2146-2157.

[6] Fu W J, Li J C, Wu X Y, et al. Small interference RNA targeting Krüppel-like factor 8 inhibits the renal carcinoma 786-0 cells growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(8): 1255-1265.

[7] Poon R T, Ng I O, Lau C, et al. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. Ann Surg, 2001, 233(2): 227-235.

[8] Yao D F, Wu X H, Zhu Y, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(2): 220-226.

[9] Mise M, Arai S, Higashitani H, et al. Clinical significance of vascu-

lar endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 455-464.

[10] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 203-212.

[11] Moon W S, Rhyu K H, Kang M J, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma[J]. Mod Pathol, 2003, 16(6): 552-557.

[12] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

[13] Yasuda S, Arai S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance[J]. Hepatol, 2004, 40(1): 117-123.

[14] Pang R, Poon R T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2006, 242(2): 151-167.

[15] Belotti D, Paganoni P, Manenti L, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation[J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5224-5229.

(责任编辑: 关蕴良)