

KIRREL 在胃癌中的表达及其对胃癌血管生成的影响

陈 硕 张明军 王 涛

摘要 目的 探讨类 IRRE 蛋白 1 系属(KIRREL)在胃癌组织中的表达及其对胃癌血管生成的影响。方法 采用蛋白质免疫印迹(Western blot)和免疫组化(IHC)检测 KIRREL 在胃癌组织和癌旁组织中的表达。选用人胃癌细胞系 SNU-5、AGS 通过慢病毒感染胃癌细胞,构建 KIRREL 干扰和过表达稳转细胞株。使用 Western blot 检测对照组、空载组、干扰和过表达组细胞内缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达量,并通过体外血管形成实验观察 KIRREL 对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)成管能力的影响。结果 KIRREL 在胃癌组织中的表达高于癌旁组织($P < 0.05$)。干扰 KIRREL 后,HIF-1 α 、VEGF 的蛋白表达显著降低,HUVEC 的管长度和节点明显减少;KIRREL 过表达则与之相反($P < 0.05$)。结论 KIRREL 在胃癌组织中过表达,并可能促进胃癌的血管生成。

关键词 KIRREL; 胃癌; 血管生成; 血管内皮生长因子; 缺氧诱导因子-1 α

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0248-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.013

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,发病率居世界第 5 位,死亡率居第 4 位^[1]。其 5 年生存率仅有 18% 左右^[2]。目前胃癌主要的治疗手段包括手术、化疗、放疗、免疫治疗与靶向治疗。其中在靶向治疗领域中,与其他恶性肿瘤相比,针对胃癌的靶向治疗药物相对较少,如雷莫芦单抗(靶点为 VEGFR-2)和曲妥珠单抗(针对 HER-2 阳性患者)。因此,有必要进一步探索新的基因来作为胃癌治疗的新靶点。

类 IRRE 蛋白 1 系属(Kin of IRRE-like protein 1, KIRREL)是免疫球蛋白超家族的一员,在肾足细胞的过滤缝隙中表达,在结构和序列上与肾病蛋白

(nephrin)相似。该蛋白的 C 端结构域能与足突蛋白(Podocin, NPHS2)相互作用^[3]。近年来,研究发现 KIRREL 在多种恶性肿瘤中高表达。然而, KIRREL 与胃癌相关的研究较少,其在胃癌中的作用机制尚不明确。为了明确 KIRREL 在胃癌中的作用,该研究拟检测 KIRREL 在胃癌中的表达,并初步探讨 KIRREL 沉默或过表达对胃癌血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本 选取胃癌组织及癌旁组织各 10 例,均来自安徽医科大学第二附属医院,其中男性 7 例,女性 3 例,年龄 40~70 岁。纳入标准:①术前通过胃镜和病理检查明确诊断为胃癌的患者;②拟行胃癌根治手术者;③心、肺等重要的脏器功能良好,能够承受胃癌手术打击;④已签署知情同意书。排除标准:①有其他恶性肿瘤病史;②既往有放化疗病史。本研究经安徽医科大学第二附属医院伦理评审委员会批准,伦理批号 YX2022075(F1)。

1.2 实验细胞 人胃癌细胞系 AGS、SNU-5,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购于北纳创联生物科技有限公司。

1.3 实验仪器 CO₂ 培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);全自动酶标仪(北京六一生物技术有限公司);DYY-7B 型稳压稳流电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);垂直电泳槽、转移电泳槽(美国伯乐公司);转膜仪(美国 Hoefer 公司);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)等。

1.4 主要试剂 完全 RPMI-1640 培养基、完全 F12 培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司);MCE 完全培养基(美国 SCIENCELL 公司);RIPA 细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司);HIF-1 α 一抗、VEGF 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司);KIRREL 一抗(美国 Bioss 公司);GAPDH 一抗、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒、中性树脂(北京康为世纪生物技术有限公司);苏木精染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)等。

2023-01-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085MH262);2019 年度医学物理与技术安徽省重点实验室开放基金(编号:LMPT201907)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院肿瘤科,合肥 230601

作者简介:陈 硕,女,硕士研究生;

张明军,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: mjzhang2006@hotmail.com

1.5 构建稳转细胞系 将 AGS、SNU-5 细胞复苏、传代培养,加入转染试剂与 Opti-MEM,分别转染 KIRREL 过表达和干扰质粒,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 8 h,更换培养基继续培养。转染后 24 h 判定转染效率,确定转染成功后,再次更换培养基培养 24 h。KIRREL 引物序列 F: 5'-CGCAAATGGGCGG-TAGGCCGTG-3', R: 5'-AGTCCCCTCCTAAAATGTC-3'; shRNA 引物序列见表 1。

表 1 shRNA 的引物序列

| shRNA | 序列(5'-3') |
|---------|---|
| shRNA-1 | F: GCTCAACTACTCTGGAATTGT R: ACAATTCAGAGTAGTTGAGC |
| shRNA-2 | F: GCACCAATGTCAGCACTTTAG R: CTAAAGTGTGACATTGGTGC |
| shRNA-3 | F: GCTGTCTACGAGAACTATGA R: TCATAGTTCCTAGGACAGC |

1.6 Western blot 用移液枪吸弃培养皿中的细胞培养液,每孔加入 100 μl 细胞裂解液,置于冰上 20 min。12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,3% 脱脂牛奶孵育 1 h。分别在 KIRREL(1:1 000 稀释)、HIF-1α(1:2 000 稀释)、VEGF(1:1 000 稀释)、GAPDH(1:2 000 稀释)一抗溶液中孵育 4 °C 过夜;洗膜后,将加入目的一抗的膜在 1:2 000 稀释的根酶标记山羊抗兔二抗溶液中室温孵育 2 h,加入内参一抗的膜在 1:2 000 稀释的辣根酶标记山羊抗鼠二抗溶液中室温孵育 2 h。再次洗膜,在膜上滴加 ECL 发光液,在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各条带灰度值。

1.7 免疫组化 将胃癌组织和癌旁组织进行石蜡包埋后,组织切片进行免疫组化检测。在 1:200 稀释的 KIRREL 一抗溶液中孵育 4 °C 过夜;复温后加入 1:100 稀释的辣根酶标记山羊抗兔二抗,孵育 30 min。DAB 显色 5 min。苏木精染 5 min,接着分化、返蓝、脱水、透明、封片、镜检。目的蛋白为棕色,细胞核为蓝紫色。根据阳性细胞所占比例和染色程度进行分析。

1.8 血管形成实验 收集 AGS 细胞、SNU-5 细胞的各组上清液,重悬 HUVEC 进行成管实验。将在 4 °C 中融化的基质胶铺在提前预冷的 24 孔板中,每孔 250 μl 注意不要出现气泡,放置在培养箱中凝固 30 min;接着将各组细胞消化计数,设置 3 个复孔,每孔

8 × 10⁴ 个细胞,6 h 后拍照观察细胞成管情况,图像从 5 个连续的视野中获得,放大倍数 × 100。选取管长度和节点进行定量分析。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。所有实验重复 3 次,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间定量数值比较采用独立样本 *t* 检验,多组之间定量数值比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIRREL 在胃癌组织中的表达分析 为了检测 KIRREL 在胃癌中的表达水平,将临床收集的 10 对胃癌组织和癌旁组织分别提取目的蛋白。首先通过免疫组化法检测发现:KIRREL 在胃癌组织中呈高表达,而在癌旁组织中呈低表达(见图 1A、1B)。其次,Western blot 结果表明在大约 70% (7/10) 的胃癌组织中,KIRREL 的蛋白表达高于癌旁组织。其中,在胃癌组织、癌旁组织中的表达量分别为 1.05 ± 0.22 及 0.63 ± 0.14,差异有统计学意义(*t* = 2.257, *P* < 0.05),见图 1C。

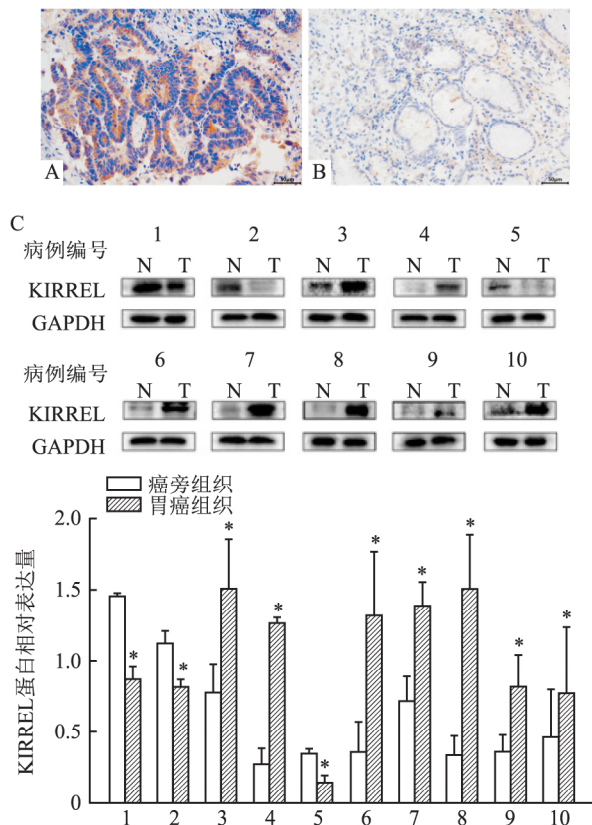


图 1 KIRREL 在胃癌组织中的表达分析

A: 免疫组化法检测 KIRREL 在胃癌组织中表达水平 × 400; B: 免疫组化法检测 KIRREL 在癌旁组织中表达水平 × 400; C: KIRREL 在成对的人胃癌组织和癌旁组织中的相对表达量; N: 癌旁组织; T: 胃癌组织; 与癌旁组织比较: * *P* < 0.05

2.2 构建 KIRREL 干扰和过表达胃癌细胞株 根据前期预实验结果,选择高表达 KIRREL 的胃癌细胞株 SNU-5 和低表达 KIRREL 的胃癌细胞株 AGS 作为研究对象。在 SNU-5 细胞中诱导转染了稳定的 KIRREL 基因慢病毒干扰载体(LV-shKIRREL),在 AGS 细胞中诱导转染了稳定的 KIRREL 基因慢病毒过表达载体(LV-KIRREL),同时分别设置了一组转染空载质粒的细胞株(LV-shNC, LV-NC)。以 GAPDH 作为内参,使用 Western blot 检测各组细胞中 KIRREL 的蛋白表达量,验证转染效果。结果如图 2A 与 LV-NC 组比较, LV-KIRREL 组的 KIRREL 蛋白表达量显著上调($t = 3.748, P < 0.05$),验证结果过表达有效,见图 2A; KIRREL 慢病毒 LV-shKIRREL1 组和 KIRREL 慢病毒 LV-shKIRREL3 组的 KIRREL 蛋白表达量显著下调($t = 8.249、8.648, P < 0.05$),见图 2B。本研究选择了 KIRREL 慢病毒 LV-shKIRREL1 组进行后续实验。

2.3 KIRREL 对胃癌血管生成的影响 为了验证 KIRREL 对胃癌血管生成的影响,Western blot 法检测发现,在 AGS 细胞中,与 LV-NC 组相比, LV-KIRREL 组 HIF-1 α 、VEGF 的蛋白表达量增多;而在 SNU-5 细胞中, LV-shKIRREL 组与 LV-shNC 组相比, HIF-1 α 、VEGF 的蛋白表达量明显减少,见图 3A。另外,体外血管形成实验结果显示,在 AGS 细胞中,与 LV-NC 组相比, LV-KIRREL 组 HUVEC 的管长度和节点明显增加($t = 7.603、5.041, P < 0.01$),而在 SNU-5 细胞中,与 LV-shNC 组相比, LV-shKIRREL 组的管长度和节点明显减少($t = 2.851、4.930, P < 0.05$),见图 3B。

3 讨论

KIRREL 主要位于足细胞膜,能根据分子量、电荷和形状限制大分子的通过,参与维持裂隙隔膜结构和功能的完整性。有研究^[4]表明, KIRREL 是一种信号分子,可以激活典型的蛋白激酶级联反应。虽然 KIRREL 在胃癌中的作用机制尚未见报道,但 KIRREL 已经被证实多种恶性肿瘤中高表达,且与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。例如, Hu et al^[5]综合分析了 3 个胰腺癌相关的微阵列数据集,发现 KIRREL 在胰腺癌中过表达,可作为胰腺癌的治疗新靶点。Chen et al^[6]对 302 例乳腺癌组织和 50 例正常乳腺组织进行分析,结果提示 KIRREL 在乳腺癌中过表达,可作为乳腺癌患者预后不良的独立预测指标。还有研究^[7]显示 KIRREL 基因甲基化

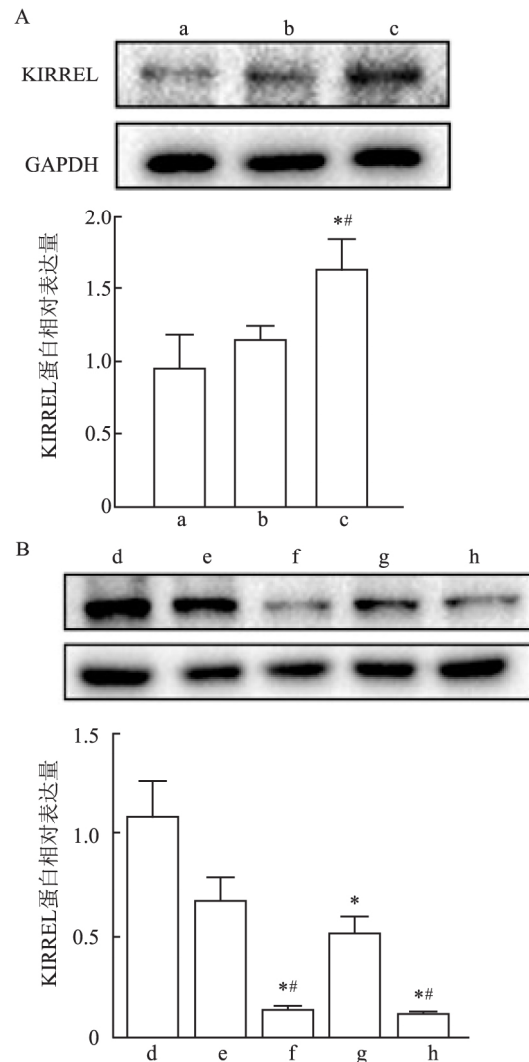


图2 构建 KIRREL 干扰和过表达胃癌细胞株

A: AGS 细胞 KIRREL 过表达验证; a: AGS; b: LV-NC; c: LV-KIRREL; B: SNU-5 细胞 KIRREL 慢病毒干扰验证; d: SNU-5; e: LV-shNC; f: LV-shKIRREL1; g: LV-shKIRREL2; h: LV-shKIRREL3; 与对照组(AGS 或 SNU-5)比较: * $P < 0.05$; 与空载组(LV-NC 或 LV-shNC)比较: # $P < 0.05$

可能通过促进细胞增殖和转移,从而在骨肉瘤的发病机制中起重要作用。

本课题组前期研究^[8]显示 KIRREL 基因在胃癌中呈高表达,表达水平的高低与肿瘤大小、T 分期、年龄等因素相关,且高表达的 KIRREL mRNA 与总生存时间相关。在此次研究中,Western blot、免疫组化检测结果均显示,与癌旁组织相比, KIRREL 在胃癌组织中表达上调,符合前期的研究结果。此外,该研究还通过实验验证了 KIRREL 可能促进胃癌的血管生成。

在肿瘤进展中,血管生成持续异常,这为增殖的肿瘤细胞提供了充足的营养和氧气,从而促进肿瘤

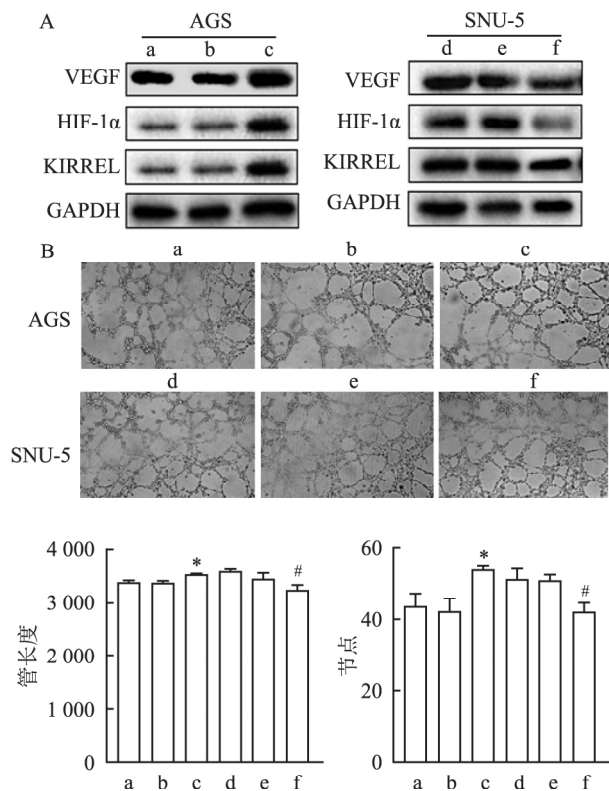


图3 KIRREL对胃癌血管生成的影响

A: Western blot 实验检测各组细胞中 HIF-1 α 、VEGF 的蛋白表达量; B: 体外血管形成实验评估 KIRREL 对 HUVEC 成管能力的影响 $\times 100$; a: AGS 组; b: LV-NC 组; c: LV-KIRREL 组; d: SNU-5 组; e: LV-shNC 组; f: LV-shKIRREL 组; 与 LV-NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 LV-shNC 组比较: # $P < 0.05$

细胞的生长、浸润和转移^[9-10]。研究^[11]表明,胃癌是一种高度血管生成的癌症。在低氧条件下,HIF-1 α 被激活,并通过识别启动子区域的共同缺氧反应元件促进血管生成因子的转录,这是肿瘤血管生成的前提条件^[12]。且在这一过程中,VEGF是促进肿瘤血管生成的关键细胞因子,刺激肿瘤细胞的增殖和迁移,抑制凋亡并调节其通透性^[13]。因此,为了进一步探讨 KIRREL 与胃癌血管生成的关系,本研究通过 Western blot 实验发现 KIRREL 过表达上调了 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,而 KIRREL 沉默则抑制了 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,这证实了 KIRREL 可能对胃癌血管生成具有促进作用。此外,体外血管形成实验的结果显示 KIRREL 促进了 HUVEC 的血管形成能力,这进一步证实了 KIRREL 促进胃癌血管生成这一观点。

综上所述,KIRREL 在胃癌组织中过表达,并促

进胃癌的血管生成。这一结论为治疗和预防胃癌提供了重要的理论依据。本研究的不足之处在于收集的临床标本数量较少,实验数据可能存在偏倚,信服力偏低,要更好地了解 KIRREL 在胃癌中的潜在功能,还需要进一步扩大样本量。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-49.
- [2] Suzuki S, Takahashi A, Ishikawa T, et al. Surgically treated gastric cancer in Japan: 2011 annual report of the national clinical database gastric cancer registry [J]. Gastric Cancer, 2021, 24 (3): 545-66.
- [3] Sellin L, Huber T B, Gerke P, et al. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins [J]. FASEB J, 2003, 17(1): 115-7.
- [4] Huber T B, Kottgen M, Schilling B, et al. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (45): 41543-6.
- [5] Hu B, Shi C, Jiang H X, et al. Identification of novel therapeutic target genes and pathway in pancreatic cancer by integrative analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(42): e8261.
- [6] Chen K, Zhao R, Yao G, et al. Overexpression of kin of IRRE-Like protein 1 (KIRREL) as a prognostic biomarker for breast cancer [J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(7): 153000.
- [7] Wang Q. CpG methylation patterns are associated with gene expression variation in osteosarcoma [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (1): 901-7.
- [8] Zhang M J, Hong Y Y, Li N. Overexpression of Kin of IRRE-Like protein 1 (KIRREL) in gastric cancer and its clinical prognostic significance [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2711-9.
- [9] Parmar D, Apte M. Angiopoietin inhibitors: A review on targeting tumor angiogenesis [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 899: 174021.
- [10] 邢江浩, 郝吉庆. 骨肉瘤外泌体中 miRNA 促侵袭及血管化机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1396-400.
- [11] Capuano A, Andreuzzi E, Pivetta E, et al. The probe based confocal laser endomicroscopy (pCLE) in Locally Advanced Gastric Cancer: A powerful technique for real-time analysis of vasculature [J]. Front Oncol, 2019, 9: 513.
- [12] Rashid M, Zadeh L R, Baradaran B, et al. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression [J]. Gene, 2021, 798: 145796.
- [13] Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, et al. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis [J]. Trends Mol Med, 2011, 17(7): 347-62.

人参皂苷 Rb1 改善局灶性 CIRI 小鼠模型神经损伤的调控机制研究

周璐 陈珊 赵雪 龙婷婷 朱俊德

摘要 目的 探究人参皂苷 Rb1 对局灶性脑缺血再灌注损伤(CIRI)的调控机制。方法 60 只 C57/BL 小鼠随机分为 6 组($n = 10$):假手术组、CIRI 模型组、人参皂苷 Rb1 低、中、高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组。手术方法构建局灶性 CIRI 小鼠模型。行神经功能评分、行为学测试,尼氏染色检测海马体中尼氏体数量。qPCR、Western blot 和免疫组化检测人参皂苷 Rb1 对海马体中 Wnt 信号通路分子表达的影响,通过分子对接和共沉淀实验研究人参皂苷 Rb1 的调控机制。结果 与 CIRI 模型组相比,添加人参皂苷 Rb1 后能够降低小鼠神经功能评分($P < 0.05$),降低通过平衡木时间($P < 0.05$),提高小鼠进入正确臂时间($P < 0.05$),增加小鼠摇摆时间和攀爬时间($P < 0.05$),证明了人参皂苷 Rb1 能够

有效恢复小鼠神经系统功能,提高模型小鼠行为学能力。人参皂苷 Rb1 治疗后海马体中轴抑制蛋白 2(Axin2)和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)降低,Wnt3a、Wnt1 和 β -连锁蛋白(β -catenin)表达量增加。结论 人参皂苷 Rb1 能够改善 CIRI 小鼠模型的神经功能并提高海马体中尼氏体数量,与激活 Wnt 信号通路有关,可能在卒中治疗期间对局灶性 CIRI 具有神经保护作用。

关键词 人参皂苷 Rb1; 局灶性 CIRI; Wnt 信号通路; β -catenin; 分子对接

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0252-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.014

2022-12-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660243);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]一般415);贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(编号:20NSP006)

作者单位:贵州医科大学基础医学院人体解剖教研室,贵阳 550025

作者简介:周璐,女,硕士研究生;

朱俊德,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 893543000@qq.com

根据 2020 年中国卒中报告,2019 年我国新发卒中 394 万例,其中缺血性卒中 287 万例,约占卒中患者的 72.84%^[1]。它是一种高致残、高死亡率的疾病,严重危害人类的健康。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)是脑组织缺血后,恢复血液供应时诱发的功能障碍加重的现

The expression of KIRREL in gastric cancer and its effect on angiogenesis

Chen Shuo, Zhang Mingjun, Wang Tao

(Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression of Kin of IRRE-like protein 1 (KIRREL) in gastric cancer tissues and further explore its effect on angiogenesis. **Methods** Western blot and IHC were used to detect the expression of KIRREL in gastric cancer tissues and adjacent tissues. Human gastric cancer cell lines SNU-5 and AGS were selected to construct KIRREL-interfering and overexpressing stable cell lines by lentiviral infection of gastric cancer cells. The expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the control, null, interfering and overexpression groups were measured by Western blot, and the effect of KIRREL on the tube-forming ability of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was observed by angiogenesis assay. **Results** The expression of KIRREL in gastric cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). After silencing KIRREL, the protein expression of HIF-1 α and VEGF was significantly reduced, and the tube length and nodes of HUVECs were also significantly reduced; the overexpression of KIRREL was the opposite ($P < 0.05$). **Conclusion** KIRREL is overexpressed in gastric cancer tissues and may promote angiogenesis in gastric cancer.

Key words KIRREL; gastric cancer; angiogenesis; VEGF; HIF-1 α