论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1676-06

shRNA 抑制 p115 表达对胃癌体外血管形成的影响

文 雪,易永芬,邓 玮,屈玉玲,闫田静 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 初步探讨胃癌 BGC-823 细胞高尔基体囊泡转运蛋白(golgi- vesicular transport protein,p115)对胃癌血管形成的影响及其可能机制。**方法** 采用脂质体介导法将 p115 shRNA-1318 转染入胃癌 BGC-823 细胞株,经 G418 筛选出稳定转染的细胞株。利用 Western blot、RT-PCR 和细胞免疫荧光方法检测转染后的 p115 抑制效应及其对 MIF、p-Akt、VEGF-A 的调控情况;采用细胞活性检测实验、Transwell 体外侵袭实验和血管形成实验方法分别检测转染 p115 shRNA 的胃癌 BGC-823 细胞对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖,迁移和血管形成的影响。**结果** p115 shRNA-1318 转染后胃癌 BGC-823 细胞 p115、MIF、p-Akt 和 VEGF-A 的蛋白及 mRNA 表达明显抑制($P<0.01$);细胞免疫荧光:与对照组相比,p115 shRNA 组 p115、MIF 及 VEGF-A 的色泽暗红且抑制率分别为 63%、65%、68%;细胞活性检测:与对照组相比,p115 shRNA 组 HUVECs 增殖能力明显降低($P<0.05$);Transwell 侵袭实验:p115 shRNA 组 HUVECs 较空白对照组,阴性对照组(shNC)细胞侵袭能力明显降低,24 h 穿过 Transwell 的细胞数分别为:(39±5)、(174±4)、(179±4),与对照组相比差别具有统计学意义($P<0.05$);血管形成实验:p115 shRNA 组 HUVECs 不能在 Matrigel 胶上形成网状结构,空白对照组、shNC 组成管指数分别为:(1 289±37)、(1 329±33),p115 shRNA 组成管指数为:(422±41),与对照组相比差别具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** p115 基因沉默下调胃癌的 VEGF-A 表达及抑制血管生成;其分子机制可能与 MIF 通过 PI3K/Akt 信号通路途径调节胃癌血管形成有关。

[关键词] 高尔基体囊泡转运蛋白 p115;巨噬细胞移动抑制因子;人脐静脉血管内皮细胞;血管生成
[中图法分类号] R735.2;R394.2;R730.23 [文献标志码] A

Influence of shRNA-mediated p115 gene silencing on angiogenesis in gastric cancer cells *in vitro*

Wen Xue, Yi Yongfen, Deng Wei, Qu Yuling, Yan Tianjing (Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the influence of Golgi-vesicular transport protein (p115) in gastric cancer cell line BGC-823 on the angiogenesis of gastric cancer and its possible mechanism. **Methods** BGC-823 cells were divided into a blank control group, a negative control group, and a p115 shRNA-1318-transfected group. In the p115 shRNA-transfected group, p115 shRNA-1318 was transferred into BGC-823 cells by liposome-mediated transfection. The well-transfected BGC-823 cells were screened out using G418. Western blotting was employed to analyze the protein expression levels of p115, MIF, p-Akt, and VEGF-A in BGC-823 cells. RT-PCR was employed to analyze the mRNA expression levels of p115, MIF and VEGF-A in BGC-823 cells. Cell immunofluorescence assay was employed to analyze the distributions and inhibitory rates of p115, MIF and VEGF-A in BGC-823 cells. The effect of p115 shRNA-1318-transfected BGC-823 cells on the proliferation, migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were analyzed by cellular activity assay, Transwell *in vitro* invasion assay, and Matrigel assay, respectively. **Results** The protein expression levels of p115, MIF, p-Akt, and VEGF-A as well as the mRNA expression levels of p115, MIF, and VEGF-A were significantly inhibited in the p115 shRNA-transfected group ($P<0.01$). As proven by cell immunofluorescence assay, the expression levels of p115, MIF, and VEGF-A in the p115 shRNA-transfected group were significantly inhibited when compared with those in the control groups, with inhibitory rates of 63%, 65%, and 68%, respectively. The proliferation rate of HUVECs in the p115 shRNA-transfected group was significantly lower than those in the control groups ($P<0.05$). As compared with those in the control groups, the BGC-823 cells in the p115 shRNA-transfected group had significantly decreased invasion ability ($P<0.05$).

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30672431)
[通信作者] 易永芬,电话:(023)68485789,E-mail:yiyongfen1953@yahoo.com.cn

The numbers of the cells passing through Transwell chamber within 24 h in the p115 shRNA-transfected group, blank control group, and negative control group were 39 ± 5, 174 ± 4, and 179 ± 4, respectively. The capillary-like structures formed in the p115 shRNA-transfected group were significantly fewer than those formed in the blank control group and negative control group (422 ± 41 *vs* 1 289 ± 37 and 1 329 ± 33, $P < 0.05$). **Conclusion** Gene silencing of p115 can down-regulate the expression of MIF and VEGF-A in gastric cancer cells and suppress the angiogenesis of gastric cancer. The molecular mechanism is probably related to the fact that MIF adjusts the angiogenesis of gastric cancer through PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] p115; MIF; HUVECs; angiogenesis; gastric cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30672431). Corresponding author: Yi Yongfen, Tel:86-23-68485789, E-mail: yiyongfen1953@yahoo.com.cn

胃癌是世界上主要的高发恶性肿瘤之一,文献[1]报道抑制胃癌血管生成有助于抑制胃癌细胞生长,浸润和转移。高尔基体囊泡运输蛋白是p115(golgi-vesicular transport protein)是一个位于高尔基体顺面的蛋白,其主要功能是稳定高尔基体和运输细胞质内蛋白,其在前列腺癌,宫颈癌中高度表达[2-3]。最新研究表明在炎症因子的刺激下,p115能移位到细胞质中将细胞质的MIF转运到细胞膜受体上发挥其相应的功能[4]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)是一种独特的促进肿瘤发生的细胞因子,其能够通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/Akt途径促进肿瘤的血管生成[5-8]。

前期研究发现p115和MIF在不同分化胃癌细胞中都有表达,其中在低分化细胞株BGC-823中二者的含量最高[9]。后采用基因重组的技术,构建了4组p115 shRNA表达载体并将其转入胃癌BGC-823细胞中,筛选出p115 shRNA-1318能明显的抑制p115的表达并能抑制细胞增殖,证实p115基因与胃癌细胞增殖密切相关,但是p115在胃癌发生、发展中的作用究竟如何,还需进一步证实[10]。本实验选用沉默效果最好的p115的shRNA-1318转入胃癌BGC-823细胞,观察p115的沉默后胃癌BGC-823细胞株中MIF、p-Akt、血管内皮生长因子-A(VEGF-A)的表达情况,p115能否抑制MIF的表达和分泌及MIF是否能通过PI3K/Akt信号通路途径抑制胃癌微血管形成。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)、胃癌BGC-823细胞由重庆医科大学分子与肿瘤防治研究中心提供,p115 shRNA-1318为前期筛选出抑制效果最好的质粒表达载体,Lipofectamine™ 2000试剂为Promega公司产品,PCR引物由重庆升博公司合成,RT-PCR试剂盒购于TaKaRa公司。Cell Counting Kit8试剂购于重庆升博公司,p115兔抗人多克隆抗体购于Abcam公司,MIF兔抗人多克隆抗体购于Santa Cruz,VEGF-A兔抗人多克隆抗体,p-Akt兔抗人多克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。质粒小量抽提试剂盒由Omega公司产品提供。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验分为3组:p115 shRNA组、空白对照组和阴性对照组(shNC),每组设3个复孔。

1.2.2 脂质体介导转染法 转染BGC-823细胞按照Lipofectamine 2000说明书分别转入p115 shRNA、shNC。将细胞以每孔2×10^5ml/L的细胞密度接种于6孔板中37 ℃,5% CO_2的培养箱中培养24 h,在无菌EP管中准备以下2种溶液,A液:4 μg的DNA溶于无抗无血清培养基中共250 μl混合液,B液:10 μl脂质体溶于无抗无血清培养基中共250 μl混合液,将A液与B液混匀后,室温孵育25 min,无抗无血清培养基清洗细胞3次后加入上述溶液,同时加入2 ml无抗无血清培养基,混匀。培养6 h后更换有抗胎牛血清培养,继续培养24 h。荧光显微镜观察其转染情况。加入浓度为400 μg/ml的G418进行筛选,2周后挑选出单克隆细胞株进行扩大培养。取出上述细胞铺片,于荧光显微镜下观察并计算转染率。

转染率=(绿色荧光的细胞数/白光下总细胞数)×100%

1.2.3 Western blot检测p115及下游MIF、p-Akt、VEGF-A蛋白水平的表达 转染后48 h收集p115 shRNA组、空白对照组、阴性对照组(shNC)的细胞。用PBS洗2次,以每孔加入细胞裂解液100 μl,冰上放置25 min,12 000 r/min离心10 min,吸取上清液后加入1×loading buffer蛋白上样缓冲液煮沸5 min。BCA法测蛋白浓度,8% SDS-PAGE凝胶电泳,上层胶20 min,下层胶1 h,半干转膜30 min,5%牛奶封闭1 h,分别用抗p115、MIF、p-Akt、VEGF-A和β-actin的一抗孵育(抗体稀释浓度均为1∶500),4 ℃冰箱过夜;TBST洗膜3次,每次10 min后加二抗(1∶1 000)37 ℃孵育3 h,碧云天化学发光显色,用Bio-Rad凝胶成像仪摄取每张膜的凝胶图像,再用Quantity One检测其结果的面积及灰密度值。每个指标实验重复3次。

1.2.4 RT-PCR检测p115及下游MIF、VEGF-A mRNA水平的表达 用Trizol试剂分别提取p115 shRNA组、空白对照组、shNC组的BGC-823细胞总RNA,采用一步法行RT-PCR反应。电泳法检测mRNA的完整性,紫外分光光度计检测其纯度并对其定量。按照RT-PCR反应试剂盒说明书进行RT-PCR操作。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,由Bio-Rad凝胶成像仪摄取各组细胞PCR产物凝胶图像,并用Quantity One进行半定量分析,引物见表1。

1.2.5 细胞免疫荧光 将p115 shRNA组,空白对照组,阴性对照组(shNC)的BGC-823细胞用0.25%的胰酶消化,加含无抗无血清的1640培养液终止消化,轻轻吹打混匀后用血球计数板计数细胞,以10^6/ml细胞密度接种于24孔板中培养,一共9个孔。待细胞刚刚长满单层,用4%多聚甲醛固定10 min,

后用PBS漂洗3次,每次5 min,用20%吐温穿孔15 min;PBS漂洗3次,每次5 min;1% BSA封闭30 min;加入1% BSA稀释的p115,MIF,VEGF-A一抗孵育(抗体稀释浓度均为1∶50),于37℃杂交过夜;次日用PBS漂洗2次,每次5 min;加入1% BSA山羊抗兔二抗稀释液,于37 ℃杂交1 h;NIKON TE2000-U型荧光倒置显微镜200倍下观察其分布情况,阳性细胞呈鲜红色,利用Image Pro Plus软件计算阳性表达率=总荧光亮度/细胞总数×100%。

表1 RT-PCR实验中合成的引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
p115	上游:AACCTGGTGGCTGAACGGCAAG 下游:AGAAGCTTCACACCAGGCCAGC	459 bp
MIF	上游:CGGGTTCCTCTCCGAGCTCACC 下游:TGATGTAGACCCTGTCCGGGCTGA	242 bp
VEGF-A	上游:GCCATCCTGTGTGCCCCTGATGCGATGCGG 下游:CCTGTG-GGCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAGC	434 bp
β-actin	上游:GACCCAGATCATGTTTGAGACC 下游:GCCAGGATAGAGCCACCAAT	684 bp

1.2.6 细胞活性检测实验 将对数生长期的HUVECs细胞以每孔4×10^5接种于96孔板37 ℃,5% CO_2的培养箱中培养24 h,分别收集p115 shRNA组、空白对照组、shNC组的上清液以1∶1的比例加入RPMI1640培养液体积共300μl。每组设4个复孔,培养箱培养24 h,每孔加入CCK-8溶液继续培养4 h后用酶标仪测定在450 nm的吸光值。

1.2.7 Transwell体外侵袭实验 取24孔板,将孔径为8.0 μm的Transwell小室放入小孔中。用50 mg/L Matrigel和无抗无血清按1∶5比例配成的稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面,每孔加入60 μl混合液,紧贴小室底部加入并防止气泡的产生,后将24孔板放入37 ℃孵箱30 min。取对数生长期HUVECs,采用0.25%胰蛋白酶消化液进行消化,制备成单细胞悬液,以每孔100 μl细胞密度为1×10^5个/ml接种到Transwell双层共培养板的上室;取p115 shRNA组、空白对照组、shNC组的BGC-823细胞用0.25%胰蛋白酶消化液对细胞进行消化,并制备成单细胞悬液,以每孔500 μl细胞密度为1×10^5个/ml细胞接种到Transwell双层共培养板24孔板内,待2种细胞完全贴壁后将其共培养,放入培养箱24 h后,取出Transwell小室并用棉签擦去膜上靠近内室那一面的细胞,让其自然晾干后将Transwell小室放于0.1%结晶紫染色30 min,用清水洗3遍。显微镜下观察细胞,计算上、下、左、右、中5个高倍镜视野细胞数并取均值,利用Image-Pro Plus软件对数据结果进行分析。

1.2.8 血管生成实验 取一24孔板,用50 mg/L Matrigel和无抗无血清按1∶2比例配成的稀释液包被小孔底部,每孔加入300 μl混合液,紧贴小室底部加入并防止气泡的产生,后将24孔板放入37 ℃孵箱,30 min。取对数生长期HUVECs,采用0.25%胰蛋白酶消化液进行消化,制备成单细胞悬液,以每孔300 μl细胞密度为5×10^4个/ml接种24孔板中;取转染p115 shRNA组、空白对照组、shNC组的胃癌细胞BGC-823的上清液100 μl,按1∶2比例与RPMI1640培养液混合加入小孔中,放入培养箱24 h后,在显微镜下观察血管生成情况。结果判定:参照Chigurupali等[11]的方法计算HUVECs成管情况,获取图像(×100),以节点数×分支数/每个图像(×100)反映成管情况,每组图中获取5个图像,取其平均值。

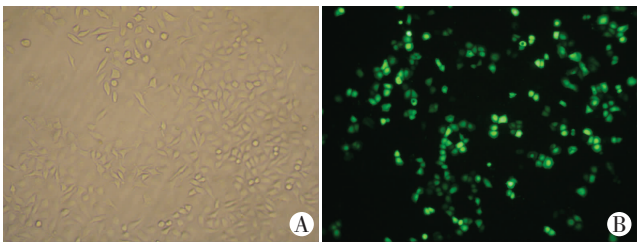
1.3 统计学处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0软件进行统计单因素方差分析;两两比较均采用SNK-q检验方法。

2 结果

2.1 转染效率的观察

在Lipofectamine2000介导下转染胃癌细胞株BGC-823,24 h后利用荧光显微镜观察转染情况:在蓝色荧光激发波长下转染细胞显示绿光,在转染48 h时荧光强度最强,转染率约为67%,见图1。但随着时间的推移,荧光强度呈逐渐递减性,最终消失。

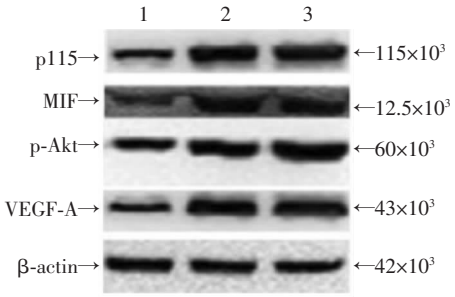


A:倒置显微镜;B:荧光显微镜

图1 重组质粒shp115转染胃癌BGC-823细胞48 h后转染情况(×100)

2.2 Western blot检测蛋白表达

p115、MIF、VEGF-A、p-Akt在p115 shRNA组细胞中蛋白的表达明显低于空白对照组和shNC组细胞($P<0.01$);空白对照组与shNC组细胞相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2、表2。



1:p115 shRNA组;2:空白对照组;3:shNC组

图2 Western blot检测各组胃癌细胞中p115、MIF、VEGF-A、p-Akt蛋白表达

表2 各组胃癌细胞中p115、MIF、VEGF-A和p-Akt蛋白的表达($n=3,\bar{x}\pm s$)

蛋白	p115 shRNA组	空白对照组	shNC组
P115	0.35±0.06	0.68±0.02[a]	0.68±0.04[a]
MIF	0.37±0.03	0.76±0.02[a]	0.75±0.01[a]
VEGF-A	0.39±0.01	0.78±0.02[a]	0.79±0.01[a]
p-Akt	0.34±0.03	0.77±0.02[a]	0.78±0.01[a]

a:$P<0.01$,与p115 shRNA组比较

2.3 RT-PCR检测mRNA的表达

p115、MIF、VEGF-A在p115 shRNA组细胞中mRNA的表达明显低于空白对照组和shNC组细胞($P<0.01$);空白对照

组与 shNC 组细胞相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3,表 3。

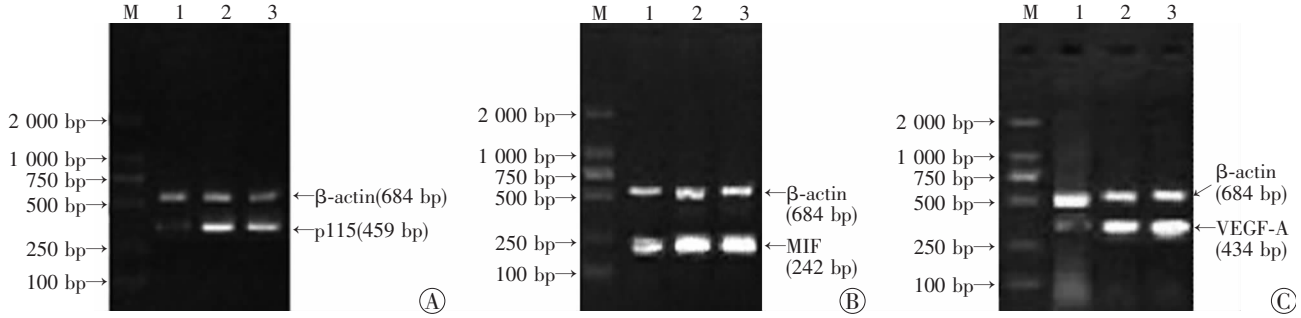
表 3 各组胃癌细胞中 p115、MIF 和 VEGF-A mRNA 的表达水平($n=3, \bar{x}\pm s$)

基因	p115 shRNA 组	空白对照组	shNC 组
P115	0.36±0.05	0.64±0.02[a]	0.63±0.03[a]
MIF	0.39±0.04	0.79±0.01[a]	0.78±0.01[a]
VEGF-A	0.39±0.01	0.78±0.01[a]	0.77±0.01[a]

a: $P<0.01$,与 p115 shRNA 组比较

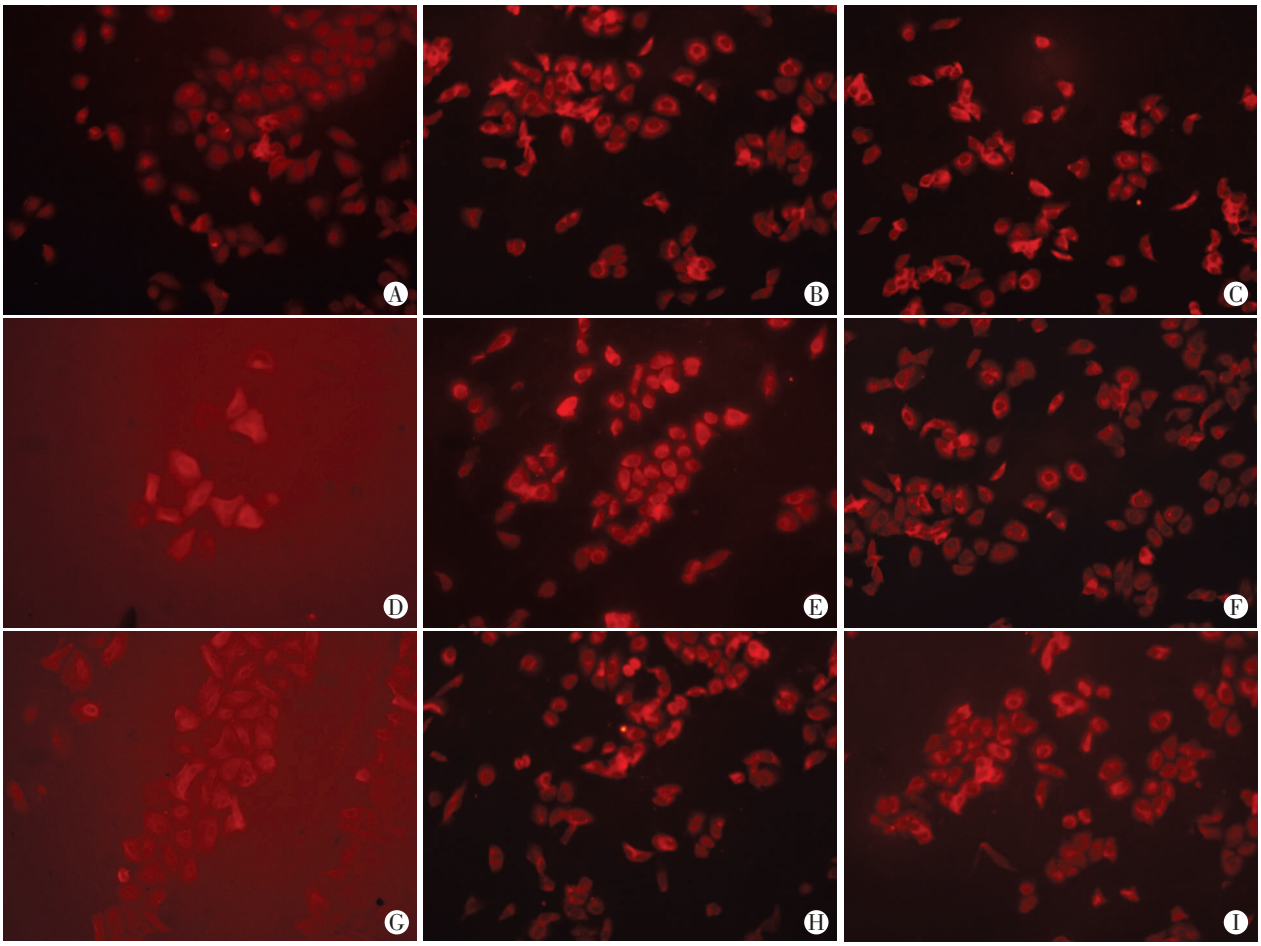
2.4 细胞免疫荧光

结果见图 4。在胃癌 BGC-823 细胞中,p115 主要位于高尔基体上,色泽为鲜红色,与空白对照组与 shNC 组相比,p115 shRNA 能明显抑制 p115 蛋白的表达,色泽暗红,抑制率为 63%;MIF 表达主要位于细胞质内,色泽鲜红,与空白对照、shNC 组相比,p115 shRNA 能明显抑制胃癌 BGC-823 细胞 MIF 的表达,抑制率为 65%;VEGF-A 表达主要在细胞质内弥散分布,色泽鲜红;与空白对照、shNC 组相比,p115 shRNA 能明显抑制胃癌 BGC-823 细胞 VEGF-A 的表达,抑制率为 68%。



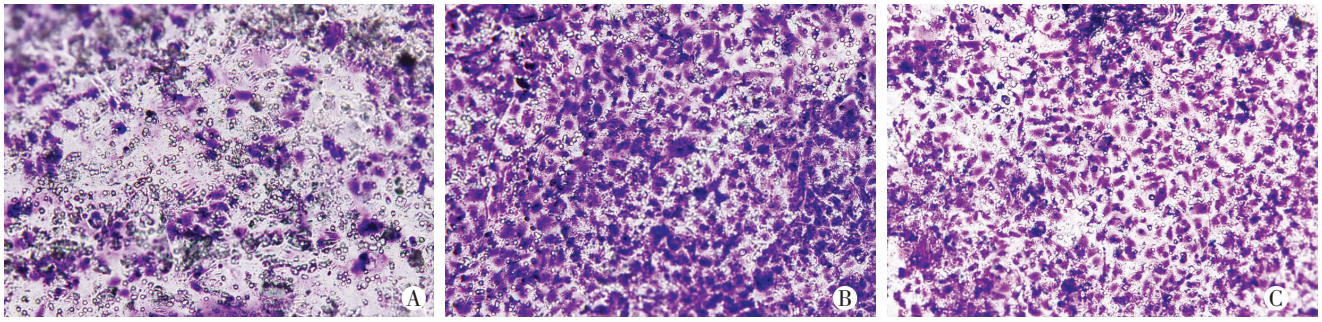
M: 标准(DL2000);1: p115 shRNA 组;2:空白对照组;3: shNC 组;A:p115 mRNA;B: MIF mRNA;C:VEGF-A mRNA

图 3 RT-PCR 检测各组胃癌细胞中 p115、MIF、VEGF-A mRNA 的表达



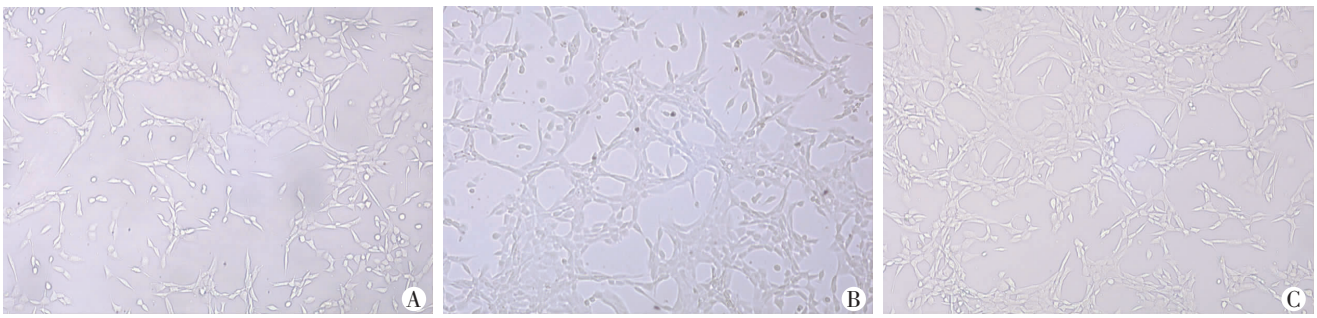
A~C:p115;D~F:MIF;G~I:VEGF-A;A、D、G:p115 shRNA 组;B、E、H:空白对照组;C、F、I: shNC 组

图 4 细胞免疫荧光检测 p115 抑制后 BGC-823 细胞的 p115、VEGF-A、MIF 的表达水平 (×200)



A：p115 shRNA 组；B：空白对照组；C：shNC 组

图5 显微镜下 p115 shRNA 干扰 BGC-823 细胞的上清液对 HUVECs 的侵袭运动能力的影响 （×100）



A：p115 shRNA 组；B：空白对照组；C：shNC 组

图6 倒置显微镜观察 p115 shRNA 组干扰 BGC-823 细胞的上清液对 HUVECs 微血管的生成 （×100）

2.5 细胞活性检测实验

p115 shRNA 组、空白对照组、shNC 组，在 $D(450)$ 分别为（0.38±0.02）、（0.75±0.04）、（0.77±0.03），说明转染组细胞培养上清液 24 h 后能显著抑制 HUVECs，而空白对照组、shNC 组上清液对 HUVECs 有明显的促进增殖的作用，差别具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.6 细胞侵袭实验

结果见图5，24 h 后穿过小室的 p115 shRNA 组，空白对照组，shNC 组每个低倍视野细胞数分别为（39±5）、（174±4）、（179±4），与空白对照组，shNC 组相比，p115 shRNA 组细胞侵袭能力明显降低，差别具有统计学意义（$P<0.05$）；空白对照组与 shNC 组相比，差别无统计学意义（$P>0.05$）。

2.7 血管生成

结果见图6，收集转染 24 h 后的细胞上清液放于 12 孔板中，24 h 后在倒置显微镜下观察。p115 shRNA 组、空白对照组、shNC 组各取 5 个高倍镜视野对血管样结构进行计数结果分别为：（422±41）、（1 289±37）、（1 329±33）。p115 shRNA 组与空白对照组、shNC 组相比，差别具有统计学意义（$P<0.05$）；空白对照组和 shNC 组相比，两者统计学无差异（$P>0.05$）。

3 讨论

高尔基体囊泡运输蛋白 p115 主要位于高尔基体顺面，少数位于细胞质中，Merk 等[4]研究发现其在前列腺癌，宫颈癌细胞中高表达。p115 有稳定高尔基体及细胞内蛋白转运功能：当它作为稳定高尔基体的蛋白时，随着肿瘤细胞恶性程度的增加，高尔基体形态越不稳定[12]，结合前期研究结果提示 p115 有可能和肿瘤恶性程度有关；同时 p115 作为转运蛋白对于调节细胞内蛋白的空间位置起着重要的作用：研究表明当血糖浓度升高时 p115 能与 IRAP 蛋白结合，使得葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）在细胞内的空间位置发生改变从而达到降低血糖的目的[13]。

Merk 等[4]研究结果显示：在炎症因子的刺激下，高尔基体的 p115 能移位到细胞质中，游离状态的 p115 能与细胞质内的 MIF 结合，此结合物可刺激 MIF 的分泌，使得上清液中 p115 和 MIF 的含量相应的增加，p115 这种调控细胞内蛋白空间位置的变化可促使细胞产生一系列的级联反应，进而启动下游的信号通路。研究表明前列腺癌中 p115 和 MIF 相关，这说明 p115 和 MIF 不仅在炎症反应中相关而且在肿瘤中也相关。这与前期研究结果 p115 和 MIF 在胃癌中正相关的相符[9]。MIF 作为一种独特肿瘤分泌因子，在胃癌组织中高表达，并且与胃癌血管生成相关[14]。Western blot 、细胞免疫荧光及 RT-PCR 检测结果发现 p115 基因沉默后胃癌 BGC-823 细胞中 p115、MIF、VEGF-A 蛋白及 mRNA 表达水平明显受到抑制（$P<$

0.05),推测 p115 基因沉默抑制胃癌血管生成。VEGF-A 在胃癌组织中表达量明显高于正常胃组织,而且被认为是促进胃癌血管生成最强的因子,在胃癌血管生成中发挥着极其重要的作用。

肿瘤血管生成是一个多因素,多环节共同的调节过程,新生血管的形成必须依赖于内皮细胞的增殖,迁移[15]。本实验采用 p115 shRNA 转染胃癌细胞分泌上清液作用于内皮细胞,细胞活性检测实验,Transwell 共培养细胞侵袭实验结果均显示内皮细胞的增殖和侵袭迁移能力明显受到抑制($P<0.05$),在新生血管后期增殖和迁移的内皮细胞能重新排列形成树枝状物,最终形成管腔。由于 Matrigel 中含有内皮细胞生长所需的生长因子和许多黏附因子,这正是内皮细胞形成管腔所需,本实验应用经典的二维培养模式观察 p115 基因抑制胃癌细胞后内皮细胞的管腔形成情况,结果发现抑制 p115 的表达可以有效地抑制 Matrigel 上管腔的形成,因此推测内皮细胞形成新生血管可能与 p115 基因抑制相关,其原因之一是当高尔基体囊泡运输蛋白 p115 减少时,MIF 表达随之降低,MIF 与靶细胞上的受体 CD74 受体结合量减少,胃癌细胞分泌的 VEGF-A 量降低,结合 Lang[16] 研究:胃癌细胞分泌的 VEGF-A 能通过与内皮细胞生长因子受体 EGFR 和 HER-2/neu 结合,从而介导内皮细胞的增殖,迁移而促使内皮细胞分化形成血管,这充分说明 p115 能抑制胃癌血管生成。Sun 等[8]研究发现胃癌细胞分泌的 MIF 可以与其靶细胞表面 CD74 受体结合并激活 PI3K/Akt 信号通路途径促进 VEGF-A 的表达。Western blot 检测发现 p-Akt 的蛋白表达量明显降低,这提示 p115 对胃癌血管生成的有可能通过 PI3K/Akt 途径,具体机制有待进一步研究。

综上所述,p115 shRNA 转染入胃癌细胞后能明显抑制胃癌体外血管生成。结合前期研究结果笔者认为 p115 是一个促癌基因,具有促进血管生成的作用,而且其有可能通过调节 MIF 的表达和分泌。MIF 有可能通过 PI3K/Akt 途径调节 VGEF-A 分泌从而调节内皮细管腔的形成,这为胃癌进一步研究提供了新思路、新靶点。

参考文献:

[1] Yasuhiko kitadai. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer [J]. J Oncol, 2010, 29(3): 468 – 725.

[2] Rabouille C, Jokitalo E. Golgi apparatus partitioning during cell division [J]. Mol Membr Biol, 2003, 20(2): 117 – 127.

[3] Mukherjee S, Chiu R, Leung S M, *et al*. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton [J]. Traffic, 2007, 8(4): 369 – 378.

[4] Merk M, Baugh J, Zierow S, *et al*. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor[J]. J Immunol, 2009, 182(11): 6896 – 6906.

[5] Amin M A, Volpert O V, Woods J M, *et al*. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen – activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase[J]. Circ Res, 2003, 93(4): 321 – 329.

[6] Beswick E J, Pinchuk I V, Suarez G, *et al*. Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events [J]. J Immunol, 2006, 176(11): 6794 – 6801.

[7] Eccles S A. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5/6): 583 – 598.

[8] Sun B, Nishihira J, Suzuki M, *et al*. Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: relevance to tumor growth and angiogenesis [J]. Int J Mol Med, 2003, 12(4): 633 – 641.

[9] 邓玮, 易永芬, 文雪, 等. 胃癌组织和细胞中 P115、MIF 的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 241 – 245.

[10] 邓玮,易永芬,文雪, 等. RNA 干扰 P115 基因对胃癌细胞巨噬细胞移动抑制因子表达的抑制作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(4): 404 – 409.

[11] Chigurupati S, Kulkarni L, Thomas S, *et al*. Calcitonin stimulates multiple stages of angiogenesis by directly acting on endothelial cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(18): 8519 – 8529.

[12] An Y, Chen C Y, Moyer B, *et al*. Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering[J]. J Mol Biol, 2009, 391(1): 26 – 41.

[13] Hosaka T, Brooks C C, Presman E, *et al*. p115 interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(6): 2882 – 2890.

[14] Shun C T, Lin J T, Huang S P, *et al*. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24): 3767 – 3771.

[15] Chen Z, Htay A, Dos-Santos W, *et al*. In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2009, 92(2): 121 – 128.

[16] Lang S A, Klein D, Moser C, *et al*. Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(3): 1123 – 1132.

(**收稿**:2011-01-13;**修回**:2011-03-15)

(编辑 汪勤俭)