

干扰组织蛋白酶 F 表达对胃癌裸鼠肿瘤体内增殖能力的影响

季策¹, 戴经纬², 陈鑫莹¹, 王强¹

1. 中国医科大学附属盛京医院胃肠营养减肥外科, 辽宁 沈阳 110004;

2. 中国医科大学附属盛京医院第二神经外科, 辽宁 沈阳 110004

摘要: **目的** 探讨干扰组织蛋白酶 F (CTSF) 的表达对胃癌 HGC-27 荷瘤裸鼠肿瘤体内增殖能力的影响。**方法** 30 只 Balb/c 裸鼠采用皮下注射胃癌 HGC-27 细胞建立成瘤模型, 然后随机分为对照组、顺铂组与联合组, 每组 10 只。顺铂组给予顺铂注射治疗; 联合组在与顺铂组治疗的基础上采用慢病毒感染载体 CTSF-短发夹 RNA (CTSF-shRNA) 注射给予干扰 CTSF 表达治疗; 对照组给予相同剂量相同注射方法的生理盐水治疗, 三组均治疗观察 4 周。记录三组裸鼠的肿瘤体积、血管内皮生长因子 (VEGF) 与细胞凋亡变化情况。**结果** 荷瘤裸鼠治疗第 2、4 周的肿瘤体积、CTSF 与 VEGF mRNA 及蛋白相对表达水平均依对照组、顺铂组、联合组之序递降, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。治疗第 2、4 周的肿瘤组织细胞凋亡指数依对照组、顺铂组、联合组之序递升, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论** 干扰 CTSF 的表达联合顺铂治疗较单纯顺铂治疗对抑制胃癌 HGC-27 荷瘤裸鼠肿瘤体内增殖能力、促进肿瘤组织细胞凋亡、抑制 VEGF 表达的作用更明显, 从而具有很好的抑瘤效果。

关键词: 组织蛋白酶 F; 胃癌; 荷瘤裸鼠; 细胞凋亡; 血管内皮生长因子; 肿瘤增殖

中图分类号: R-33 R 735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2020)07-0992-04

Effect of interfering CTSF expression on proliferation of tumor-bearing nude mice with gastric carcinoma

Ji Ce*, Dai Jing-wei, Chen Xin-ying, Wang Qiang

* Department of Gastrointestinal Nutrition and Bariatric Surgery, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China

Corresponding author: WANG Qiang, E-mail: wangqiang10271@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of interfering cathepsin F (CTSF) expression on the proliferation of gastric carcinoma HGC-27 cells in tumor-bearing nude mice. **Methods** Thirty Balb/c nude mice were injected subcutaneously with HGC-27 cells to establish tumor-forming models, which were randomly divided into control group, cisplatin group and combination group ($n = 10$, each). Cisplatin injection was given in cisplatin group; CTSF short hairpin RNA (CTSF-shRNA) lentivirus vector was used to interfere with CTSF expression in combination group based on the same cisplatin treatment; the same dose of normal saline was given in control group. Treatment regime was continued for 4 weeks in three groups. The tumor volume, vascular endothelial growth factor (VEGF) and apoptosis were observed and recorded in three groups. **Results** At 2nd and 4th week after treatment, there were significant differences in tumor volume, relative expression levels of CTSF, VEGF mRNA and protein by pairwise comparison, which statistically decreased in the order of control group, cisplatin group and combination group ($P < 0.01, P < 0.05$), and the apoptosis index in tumor tissues increased statistically in the order of control group, cisplatin group and combination group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion** Compared with cisplatin alone, interfering CTSF expression combined with cisplatin have more advantages in inhibiting the proliferation of HGC-27 cells and VEGF expression and promoting apoptosis of tumor cell in tumor bearing nude mice with better anti-tumor effect.

Key words: Cathepsin F; Gastric carcinoma; Tumor-bearing nude mice; Apoptosis; Vascular endothelial growth

factor; Tumor proliferation

Fund program: Shenyang Science and Technology Plan Project (18-01144-22)

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,病死率与发病率位居各种癌症的前列^[1]。胃癌的生长和转移都需要新生血管的支持,新生血管生成在胃癌的发生、发展中扮演关键角色。多种信号分子共同参与并调控肿瘤新生血管生成^[2-3]。顺铂是目前胃癌化疗的主要药物之一,具有抗癌作用强、抗癌谱广等优点,但是也有一定的毒副作用,可使患者被迫停药或中止治疗^[4-5]。在胃癌治疗过程中利用靶向药物与化疗药物进行联合治疗,可增强肿瘤细胞的药物敏感性,显著减轻化疗药物的毒副作用^[6-7]。组织蛋白酶 F (cathepsin F, CTSF) 作为主要存在于溶酶体中的裂解肽键的蛋白水解酶,在各种低等生物群和高等生物群中均有发现,在组织中也分布广泛,包括羧肽酶、肽链内切酶、肽链端解酶等^[8-9]。CTSF 能作为疾病的调节因子在肿瘤的发生中发挥着重要作用,在多数肿瘤中呈现高表达状况^[10]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知活性最强的血管生成因子,可促进肿瘤血管生成,与肿瘤患者预后密切相关^[11]。本研究具体探讨采用慢病毒感染载体 CTSF-短发夹 RNA (CTSF-shRNA) 干扰 CTSF 的表达对裸鼠肿瘤体内增殖能力的影响,以明确 CTSF 的作用效果与机制。现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 研究时间为 2019 年 3 月至 9 月,胃癌 HGC-27 细胞由本实验室保存,胎牛血清、DMEM 培养基、RPMI1640 培养基粉末购自美国 Gibco 公司,CTSF 抗 VEGF 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,沉默 CTSF 的慢病毒及感染增强剂均购自上海吉凯基因公司,山羊抗兔/小鼠 IgG/HRP 抗体购自中杉金桥公司。Balb/c 裸鼠[雄性,体质量为 (18 ± 2)g,30 只]由本单位所在实验动物中心提供(购自上海斯莱克实验动物有限责任公司),动物许可号:SYXK2019-0002,所有裸鼠于实验前在恒温、恒湿、SPF 级条件下适应性饲养 1 周。

1.2 动物建模与分组 清洁饮用水及饲料供裸鼠自由摄入,在饲养过程中每隔 2 d 定期更换垫料。使用注射器抽取处理好的胃癌 HGC-27 细胞悬液 0.2 ml,浓度为 1×10^7 /ml。取出裸鼠暴露左右肋腹部皮肤,消毒后用注射器穿入 0.5 cm 左右,开始缓慢注射,注射完毕后放回鼠笼继续培养。

每天观察肿瘤形成和生长情况并记录肿瘤长、

短直径大小,待移植瘤最大直径 ≥ 4 mm 时开始随机分为对照组、顺铂组与联合组,每组 10 只。

1.3 治疗措施 (1)顺铂组:给予顺铂治疗,顺铂 2 mg/kg,0.2 ml/次,每天皮下注射 1 次,连续 4 次后停用 10 d;然后再每天皮下注射 1 次,连续 4 d。(2)联合组:在与顺铂组给予同样剂量、方法顺铂的基础上,给予干扰 CTSF 表达的治疗,在皮下注射顺铂的同时采用慢病毒感染载体 CTSF-shRNA 注射感染裸鼠,注射方法同顺铂组。(3)对照组:给予同剂量的生理盐水进行注射治疗,注射方法同顺铂组。三组均治疗观察 4 周。

1.4 观察指标 (1)肉眼可见形成肿瘤后,用游标卡尺每天测量移植瘤体,分别测量短径(W)、长径(L),按公式 $V(\text{mm}^3) = L \times W^2/2$ 计算肿瘤的体积。(2)在治疗第 2、4 周每组各处死 5 只裸鼠(脱颈处死),取完裸鼠肿瘤组织后,观察肿瘤组织和肺组织的病理形态学变化。同时将部分肿瘤组织制作成冰冻切片,采用 TUNEL 原位凋亡检测肿瘤组织局部细胞凋亡指数。(3)将部分肿瘤组织在去 RNA 酶的研钵中研碎,提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,VEGF 上游引物:5'-GAT AAC CTG GAT GCC GTC GTG-3',下游引物:5'-CAG CCT AGC CAG TCG GAT TTG-3';CTSF 上游引物:5'-GGC CGA AGA TAA CGC GCA TAC-3',下游引物为:5'-GGC ATA TAC GTG CAA ATT CAC CAG-3'。采用荧光定量 PCR 检测 VEGF 与 CTSF 表达水平,目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算, $\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT$ 目的基因 - ΔCT 对照基因。Western blot:将部分肿瘤组织研磨后制备蛋白样品,跑 SDS-PAGE 电泳,转膜后加入 5% 牛奶封闭液,放摇床上 200 rpm 室温封闭 2 h;加入一抗(稀释比例 1:1 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,然后加入二抗(稀释比例 1:10 000),室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,然后进行 ECL 曝光,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学方法 选择 GraphPad Prism 6.0 软件与 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间对比采用方差分析及两两比较的 SNK-q 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 肿瘤体积对比 所有裸鼠都建模成功,建模后表现为精神差、毛发脱落、活动度减少、皮毛缺少光

泽, 饲料消耗量减少。治疗第 2、4 周的肿瘤体积依对照组、顺铂组、联合组之序递降, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 1。

2.2 肿瘤细胞凋亡指数对比 顺铂组与联合组治疗第 2、4 周的肿瘤组织细胞凋亡指数依对照组、顺铂组、联合组之序递升, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

2.3 CTSF 与 VEGF mRNA 表达水平对比 顺铂组与联合组治疗第 2、4 周的 CTSF 与 VEGF mRNA 相对表达水平依对照组、顺铂组、联合组之序递降, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 3。

2.4 CTSF 与 VEGF 蛋白表达水平对比 顺铂组与

水平依对照组、顺铂组、联合组之序递降, 组间两两比较均有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

当前由于各种因素的影响, 我国胃癌发病人数逐年增加, 特别是病死率在全部恶性肿瘤中上升幅度非常高。顺铂是临床常用的一线化疗药物, 可用于胃癌的治疗^[12]。不过顺铂具有多种毒副作用, 目前临床普遍采用顺铂联合其他措施进行综合治疗, 以改善患者的预后^[13]。组织蛋白酶的概念首次被提出是上个世纪 90 年代, 人体中的组织蛋白酶相互之间在氨基酸序列上存在同源性。其中人体 CTSF 基因 mRNA 全长 1 929 bp, 在一段高度保守的蛋白区域发现一个沉默突变^[14]。CTSF 是组织和细胞内蛋白的降解和周转的重要基因家族, 在胃癌患者癌组织中表达水平高于癌旁组织^[15-16]。

在生物体内, CTSF 作为溶酶体蛋白酶可参与多种重要的生理活动, 例如胚胎发育、抗原呈现、蛋白质水解、细胞凋亡等^[17]; 参与抗原呈现, 能够优先水解重组人源穿孔蛋白, 并去除其 C 端肽段, 从而参与机体多种生理活动的调控^[18]。本研究显示, 顺铂组与联合组治疗第 2、4 周的肿瘤体积都显著低于对照组, 且联合组低于顺铂组, 表明干扰 CTSF 的表达能更好的发挥抑瘤作用。有研究显示, 抑制 CTSF 表达可抑制肿瘤细胞在脏器毛细血管的滞留, 阻断 P-选择素和 L-选择素与肿瘤细胞表面的黏蛋白配体的结合, 影响内皮细胞释放的组织因子途径抑制剂和肿瘤细胞宿主相互作用, 从而减少肿瘤转移^[19-20]。

CTSF 在细胞内首先是以无活性的前体酶原形式存在的, 包括成熟肽、信号肽、前体肽等 3 个组成部分^[21]。CTSF 可参与 II 型组织相容性复合物抗原的呈递作用, 从而参与机体的自身免疫反应。CTSF 在各型胰腺癌患者癌组织中的表达水平普遍较高, 在弥漫型和管型胃癌中表达水平较低, 而在黏液型和印戒细胞型胃癌中表达水平较高^[22]。本研究结果显示, 顺铂组与联合组治疗第 2、4 周的肿瘤组织细胞凋亡指数均显著高于对照组, 且联合组高于顺铂组, 表明干扰 CTSF 表达能促进肿瘤组织细胞凋亡。

影响胃癌患者的预后因素较多, 其中一个重要因素为肿瘤转移。胃癌肿瘤转移也是由多种因素参与的复杂过程, 涉及到肿瘤新生血管的形成与细胞外基质的降解等^[23]。血管生成的主要机制是通过 VEGF 的过度表达来实现, 新血管的形成是肿瘤转移、浸润的重要条件。作为肿瘤基质和毛细血管网形成的基

表 1 三组不同时间肿瘤体积对比 ($\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	治疗第 2 周	治疗第 4 周
对照组	5	278.94 ± 12.59	435.02 ± 25.97
顺铂组	5	167.09 ± 14.92 ^a	175.02 ± 14.60 ^a
联合组	5	89.88 ± 12.75 ^{ab}	90.82 ± 13.00 ^{ab}
F 值		249.300	457.039
P 值		<0.01	<0.01

注: 与对照组对比, ^a $P < 0.05$; 与顺铂组对比, ^b $P < 0.05$ 。

表 2 三组不同时间肿瘤组织凋亡指数对比 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	治疗第 2 周	治疗第 4 周
对照组	5	1.78 ± 0.21	2.47 ± 0.23
顺铂组	5	23.87 ± 2.41 ^a	25.09 ± 3.11 ^a
联合组	5	43.76 ± 3.33 ^{ab}	44.09 ± 3.77 ^{ab}
F 值		390.456	272.047
P 值		<0.01	<0.01

注: 与对照组对比, ^a $P < 0.05$; 与顺铂组对比, ^b $P < 0.05$ 。

表 3 三组不同时间肿瘤组织 CTSF 与 VEGF mRNA 相对表达水平对比 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	CTSF mRNA		VEGF mRNA	
	治疗第 2 周	治疗第 4 周	治疗第 2 周	治疗第 4 周
对照组	4.63 ± 0.12	5.76 ± 0.21	5.89 ± 0.13	6.87 ± 0.22
顺铂组	2.45 ± 0.08 ^a	2.87 ± 0.14 ^a	2.76 ± 0.09 ^a	3.66 ± 0.10 ^a
联合组	0.98 ± 0.10 ^{ab}	1.00 ± 0.09 ^{ab}	1.62 ± 0.10 ^{ab}	1.77 ± 0.14 ^{ab}
F 值	1692.516	1201.483	2094.957	1278.404
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与对照组对比, ^a $P < 0.05$; 与顺铂组对比, ^b $P < 0.05$ 。

表 4 三组不同时间肿瘤组织 CTSF 与 VEGF 蛋白相对表达水平对比 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	CTSF 蛋白		VEGF 蛋白	
	治疗第 2 周	治疗第 4 周	治疗第 2 周	治疗第 4 周
对照组	4.22 ± 0.21	5.10 ± 0.32	5.28 ± 0.31	6.09 ± 0.21
顺铂组	2.48 ± 0.11 ^a	3.09 ± 0.24 ^a	2.33 ± 0.09 ^a	2.56 ± 0.10 ^a
联合组	0.89 ± 0.09 ^{ab}	1.00 ± 0.10 ^{ab}	0.90 ± 0.10 ^{ab}	1.01 ± 0.11 ^{ab}
F 值	647.146	370.856	655.250	1535.869
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与对照组对比, ^a $P < 0.05$; 与顺铂组对比, ^b $P < 0.05$ 。

础, VEGF 是特异性最高的血管生成调控因子, 在胃癌组织中有较高的表达^[24]。本研究结果显示, 顺铂组与联合组治疗第 2、4 周的 CTSF 与 VEGF 蛋白和 mRNA 相对表达水平均显著低于对照组, 且联合组低于顺铂组, 表明干扰 CTSF 表达能抑制 VEGF 的表达。Malla 等^[25] 研究结果表明, 组织蛋白酶 B 的敲低可通过破坏 VEGF 的 JAK/STAT 途径依赖性表达来抑制肿瘤诱导的血管生成。本研究与其结论一致。

总之, 干扰 CTSF 的表达能抑制裸鼠肿瘤体内增殖能力, 促进肿瘤组织细胞凋亡, 并抑制 VEGF 的表达, 从而具有很好的抑瘤效果。本研究尚存在一些不足, 裸鼠皮下微环境与胃癌部位差距较大, 并且不能很好模拟胃癌发生发展的过程, 且观察时间点比较少, 笔者将在后续研究中深入分析。

参考文献

[1] 孟菲菲, 司君利, 刘璐, 等. 长链非编码 RNA MEG3 在胃癌中的表达及其与预后的关系 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43 (15) : 659 - 662.

[2] 师鲁静, 孙勇军, 刘世君, 等. 黏附分子 CD24 与突变型 p53 在胃癌组织的表达 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33 (8) : 1969.

[3] 潘云云, 柏志成, 潘栋辉, 等. 抗人表皮生长因子受体 2 亲和体 ZHER2:342 的 18F 标记及靶向胃癌的示踪研究 [J]. 中华普外科手术学杂志 (电子版), 2016, 10 (3) : 218 - 221.

[4] 王勇, 李国苗, 李志斌, 钟世寿. 多西他赛联合氟尿嘧啶、顺铂方案与多西他赛联合氟尿嘧啶、洛铂方案治疗胃癌的疗效比较 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28 (10) : 1712 - 1714.

[5] 吴越菲, 徐礼鹏, 孙燃, 韦永明. MiR-520a 对胃癌 SGC7901 细胞增殖、侵袭、迁移以及顺铂药物敏感性的影响 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40 (1) : 1 - 7.

[6] 陈振瑾. 用于老年性胃癌靶向药物治疗进展 [J]. 重庆医学, 2020, 49 (7) : 1184 - 1188.

[7] 周东辉, 吴璇, 钭赉振, 周勇. 晚期胃癌分子靶向治疗和免疫治疗的研究进展 [J]. 浙江医学, 2020, 42 (3) : 203 - 208.

[8] Ji C, Zhao Y, Kou YW, et al. Cathepsin F knockdown induces proliferation and inhibits apoptosis in gastric cancer cells [J]. Oncol Res, 2018, 26 (1) : 83 - 93.

[9] Luziga C. Potential role of cytotoxic T-lymphocyte antigen 2 alpha in secretory activity of endocrine cells in mouse adenohypophysis [J]. Open Vet J, 2019, 9 (2) : 114 - 119.

[10] Yang L, Wang J, Li J, et al. Identification of serum biomarkers for gastric cancer diagnosis using a human proteome microarray [J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15 (2) : 614 - 623.

[11] 赵璐, 杜小明. 血管内皮生长因子和性别决定区 Y 框蛋白 2 在

[12] 陈晓东, 段琼玉, 孙宇楠, 等. 多西他赛单药与培美曲塞联合顺铂二线治疗老年晚期胃癌的疗效及对患者生活质量的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20 (2) : 277 - 280.

[13] 李晶, 王艳艳, 王丹红. 安维汀联合 5-氟尿嘧啶与顺铂灌注治疗胃癌恶性腹水的疗效 [J]. 临床医学, 2020, 40 (1) : 104 - 106.

[14] Daseke MJ 2nd, Valerio FM, Kalusche WJ, et al. Neutrophil proteome shifts over the myocardial infarction time continuum [J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114 (5) : 37.

[15] Gao C, Fu Q, Su B, et al. The involvement of cathepsin F gene (CTS F) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) mucosal immunity [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 7 (66) : 270 - 279.

[16] Li X, Qin LM, Li YF, et al. Presynaptic endosomal cathepsin D regulates the biogenesis of GABAergic synaptic vesicles [J]. Cell Rep, 2019, 28 (4) : 1015 - 1028. e5.

[17] Lopez T, Mustafa Z, Chen C, et al. Functional selection of protease inhibitory antibodies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116 (33) : 16314 - 16319.

[18] Wang Y, Xie J, Ai Z, et al. Nobiletin-loaded micelles reduce ovariectomy-induced bone loss by suppressing osteoclastogenesis [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14 (1) : 7839 - 7849.

[19] Kang TH, Yun DH, Lee EH, et al. A cathepsin F of adult *Clonorchis sinensis* and its phylogenetic conservation in trematodes [J]. Parasitology, 2004, 128 (2) : 195 - 207.

[20] Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, et al. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer [J]. BMC Cancer, 2005, 30 (5) : 68.

[21] Bruen R, Curley S, Kajani S, et al. Liraglutide attenuates preestablished atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via regulation of immune cell phenotypes and proinflammatory mediators [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370 (3) : 447 - 458.

[22] Husmann K, Muff R, Bolander ME, et al. Cathepsins and osteosarcoma: expression analysis identifies cathepsin K as an indicator of metastasis [J]. Mol Carcinog, 2008, 47 (1) : 66 - 73.

[23] 王媛媛, 于景翠. 人类胃癌小鼠模型的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41 (6) : 536 - 541.

[24] 刘俊骥, 刘兰, 颜赞芳, 等. 细胞粘附蛋白、HER-2、ZO-1 和 VEGF 与弥漫型胃癌侵袭转移的相关性研究 [J]. 实用癌症杂志, 2019, 34 (5) : 714 - 717.

[25] Malla RR, Gopinath S, Gondi CS, et al. Cathepsin B and uPAR knockdown inhibits tumor-induced angiogenesis by modulating VEGF expression in glioma [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18 (6) : 419 - 434.

收稿日期: 2019 - 10 - 15 修回日期: 2019 - 12 - 05 编辑: 王海琴