

Vav3对人胃癌细胞株BGC823血管生成基因的调节作用及意义

檀碧波 李勇 范立侨 赵群 王冬 刘羽

河北医科大学第四医院外三科, 河北 石家庄 050011

[摘要] 背景与目的: 研究发现 *Vav3* 基因在多种恶性肿瘤中表达异常, 但 *Vav3* 与胃癌血管生成的关系尚不明确。本研究通过抑制内源性 *Vav3*, 观察其对胃癌细胞血管生成基因表达的影响, 并探讨其机制和意义。方法: 荧光定量RT-PCR及蛋白质印迹法(Western blot)检测人胃癌细胞株BGC823、胃上皮细胞株GES-1中 *Vav3* 的表达; 合成针对 *Vav3* 的小干扰RNA(small interference RNA, siRNA), 并转染胃癌细胞株BGC823; MTT法检测转染前后胃癌细胞的活性; 检测转染前后BGC823血管生成相关基因血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, *VEGF-A*)、*VEGF-C*、*VEGF-D*、血管生成素-2(angiotensin-2, *Ang-2*)、血管生成抑制蛋白-1(*vasohibin-1*)表达的变化。结果: *Vav3* 在胃癌BGC823细胞中的表达明显高于胃上皮细胞株GES-1($P < 0.01$); *Vav3*-siRNA转染BGC823细胞后, *Vav3* 表达明显受到抑制($P < 0.01$); MTT结果显示 *Vav3*-siRNA转染后, BGC823活性明显降低($P < 0.05$); 转染后BGC823中 *VEGF-C* 和 *Ang-2* 表达均较转染前降低($P < 0.05$), 而 *vasohibin-1* 表达则升高($P < 0.05$)。结论: *Vav3* 对部分胃癌细胞血管生成相关基因有调控作用, 并可能通过这种作用促进肿瘤血管生成。

[关键词] 胃癌; *Vav3* 基因; 血管生成; RNA干扰

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.12.004

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)12-0901-05

Effect and significance of *Vav3* to angiogenesis of gastric cancer cell line BGC823 TAN Bi-bo, LI Yong, FAN Li-qiao, ZHAO Qun, WANG Dong, LIU Yu (The Third Department of Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050011, China)

Correspondence to: LI Yong E-mail: li_yong_hbth@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** It was reported that *Vav3* gene was expressed aberrantly in many cancers. But the relationship between *Vav3* and angiogenesis genes of gastric cancer is still not clear. The purpose of this research was to investigate the effect and significance of *Vav3* to angiogenesis of human gastric cancer cell line BGC823. **Methods:** The expressions of *Vav3* in human gastric cancer cell line BGC823, gastric epithelial cell line GES-1 were tested by fluorescence quantitative RT-PCR and Western blot. Then *Vav3*-siRNA was synthesized and transfected into BGC823. Activity of BGC823 was measured with fluorescence quantitative RT-PCR and MTT assay. The expressions of angiogenesis related genes *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, angiotensin-1 (*Ang-2*), *vasohibin-1* were determined by qPCR and Western blot. **Results:** Expressions of *Vav3* were detected higher in gastric cancer BGC823 cells than in GES-1 ($P < 0.01$). Expression of *Vav3* was inhibited by *Vav3*-siRNA ($P < 0.05$). Activity of BGC823 was obviously inhibited after *Vav3*-siRNA transfected with MTT assay ($P < 0.05$). The expressions of *VEGF-C*, *Ang-2* were lower in cells after transfected by *Vav3*-siRNA(both $P < 0.05$); expression of *Vasohibin-1* increased after *Vav3*-siRNA transfected into BGC823 ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Vav3* gene can regulate some angiogenesis related genes, and *Vav3* may promote angiogenesis of gastric cancer cells with this function.

[Key words] Gastric cancer; *Vav3* gene; Angiogenesis; RNA interference

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072033、81372580); 河北省自然科学基金资助项目(C2010000619); 河北省普通高校强势特色学科资助项目(冀教高[2005]52); 河北省科技支撑项目(14277779D); 河北省卫生厅重大医学科研课题资助项目(zd2013040)。

通信作者: 李勇 E-mail: li_yong_hbth@126.com

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤, 进展快, 预后差, 其重要原因在于胃癌具有较强的促进新生血管生成的能力^[1-2]。但胃癌新生血管生成过程复杂, 具体机制还不十分明确。*Vav3*作为原癌基因*Vav*家族成员之一, 在肿瘤的发展、转移等过程中扮演重要角色, 且与肿瘤细胞的血管生成有关^[3-4]。但*Vav3*调节胃癌血管生成的功能及具体机制还不明确。因此, 本研究通过RNA干扰技术抑制人胃癌细胞株BGC823中*Vav3*表达, 探讨其调节肿瘤细胞血管生成的分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

人低分化胃腺癌细胞株BGC823由本实验室保种, 正常胃上皮细胞株GES-1购自中国科学院上海细胞研究所。MTT购自美国Sigma公司; RPMI-1640培养液、胰蛋白酶购自美国Gibco公司; 荧光定量RT-PCR试剂盒购自美国Promega公司; Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司; 兔抗人*Vav3*、血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, *VEGF-A*)、*VEGF-C*、*VEGF-D*、血管生成素-2(angiotenin-2, *Ang-2*)、血管生成抑制蛋白-1(*vasohibin-1*)及β-actin多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司; 相关PCR引物、小干扰RNA由上海生工生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

细胞置于含10%新生牛血清的RPMI-1640培养液中培养, 2~3 d传代1次。实验时将处于对数生长期的细胞经消化分散后计数, 制成细胞悬浮液备用。

1.3 *Vav3*-siRNA合成及转染

*Vav3*特异性小干扰RNA(*Vav3*-siRNA)序列参考文献[5]设计, 序列为: 5'-CCCAGUUUCUCUGUUUGAAGAACAU-3', 无关对照siRNA(non-specific control siRNA, NS-siRNA)序列为5'-CCCUUCUCUGUUUGUAAAGAGACAU-3'。采用脂质体介导法, 使用Lipofectamine™

2000, 按照说明书将*Vav3*-siRNA或对照NS-siRNA转染BGC823细胞株。

1.4 MTT法检测细胞活性

BGC823细胞以 5×10^4 个/mL密度接种于96孔板, 生长至60%~70%时转染*Vav3*-siRNA或对照siRNA。每组设6个复孔。各实验组于实验结束前4 h加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT。培养4 h, 弃培养液, 各孔加入150 μL DMSO, 室温振荡15 min, 用酶标仪于波长490 nm处测吸光度(A)值。以上实验重复3次。生长抑制率(%)=(1-A_{实验组}/A_{对照组})×100%。

1.5 荧光定量RT-PCR检测目的基因mRNA表达

采用TRIzol一步法提取总RNA, 取2 μg反转录合成cDNA。取2 μL反转录产物进行PCR反应以检测靶分子的mRNA表达, GAPDH为内参。按试剂盒说明建立终体积为20 μL的PCR反应体系, 2 μL反转录产物、10 μL SYBR Green Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL。PCR热循环参数为: 95 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共45个循环。应用Primer 5.0设计引物并经过Blast比对检测特异性后用于实验。各基因引物序列: *Vav3*(81 bp)引物: 正义链5'-CAAATTCACCGAGATCCTGT-3', 反义链5'-TGCTGGAGTGCTGTACGAAA-3'; *VEGF-A*(81 bp)引物: 正义链5'-GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC-3', 反义链5'-GATGATTCTGCCCTCCTCCTT-3'; *VEGF-C*引物(191 bp): 正义链5'-ACGAGCTACCTCAGCAAGA-3', 反义链5'-TTGTTGCTGCCTGACACT-3'; *VEGF-D*引物(152 bp): 正义链5'-TCTCGCTCAGCATCCCATC-3', 反义链5'-CACCTCCACGCACGTTTCT-3'; *Ang-2*引物(329 bp): 正义链5'-CAAGACGGAACAACGAAC-3', 反义链5'-CACCGCTAACCAACCAAAA-3'; *Vasohibin-1*引物(128 bp): 正义链5'-CTGCCAATCAAATGCCTGGA-3', 反义链5'-AGCACGATGTGGCGGAAGTA-3';

*GAPDH*引物(138 bp): 正义链5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3', 反义链5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'。RT-PCR检测结果经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, RT-PCR检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。*GAPDH*作为内参照基因。

1.6 蛋白质印迹法(Western blot)检测各目的基因蛋白表达

提取样本总蛋白, 进行蛋白定量后, 各取60 μg蛋白样本上样, 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至PVDF膜, TBST配制的5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 分别用稀释后的目标分子一抗或内参照β-actin一抗4℃温育过夜, 经TBST漂洗3次后加相应辣根过氧化酶标记的二抗室温温育1 h, 化学发光法显色, 对条带进行积分吸光度扫描。

1.7 统计学处理

实验数据用SPSS 13.0统计分析软件处理, 并以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间强度比较使用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Vav3*在人胃癌细胞株BGC823中的表达

qPCR和Western blot结果均显示人胃癌细胞株BGC823中*Vav3*表达明显高于胃上皮细胞株GSE-1($P < 0.05$, 图1)。

2.2 *Vav3*-siRNA转染胃癌BGC823细胞对*Vav3*表达的影响

Vav3-siRNA转染BGC823细胞后, 细胞中*Vav3*表达受到明显抑制, 本实验中*Vav3*-siRNA在80 nmol/L、作用24 h时对*Vav3*抑制率达到90%左右。qPCR及Western blot验证结果一致($P < 0.01$, 图2)。

2.3 *Vav3*-siRNA对BGC823细胞活性的影响

MTT结果显示, *Vav3*-siRNA转染后, BGC823细胞的存活率明显下降, 且存活率与浓度、时间呈依赖性($P < 0.05$); 转染对照siRNA的对照组与阴性组相比, 增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$, 图3)。

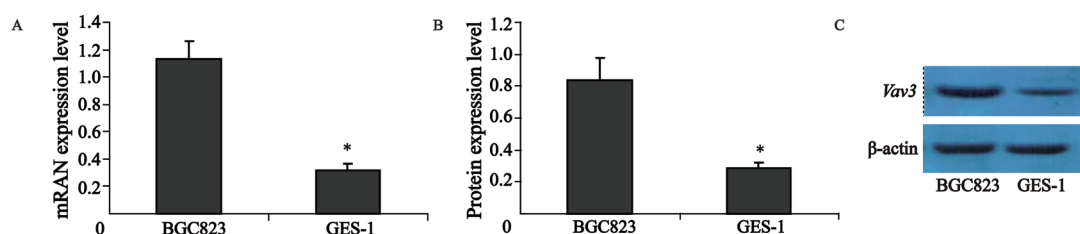


图1 *Vav3*在BGC823细胞及GES-1细胞中的表达情况

Fig. 1 Expression of *Vav3* in gastric cancer cell line and gastric epithelial cell line

A: Result of fluorescence quantitative PCR of *Vav3* mRNA expression in gastric cancer cell line and gastric epithelial cell line; B: Result of Western blot of *Vav3* protein expression in gastric cancer cell line and gastric epithelial cell line; C: Gel electrophoresis of Western blot. *: Compared with BGC823, $P < 0.05$.

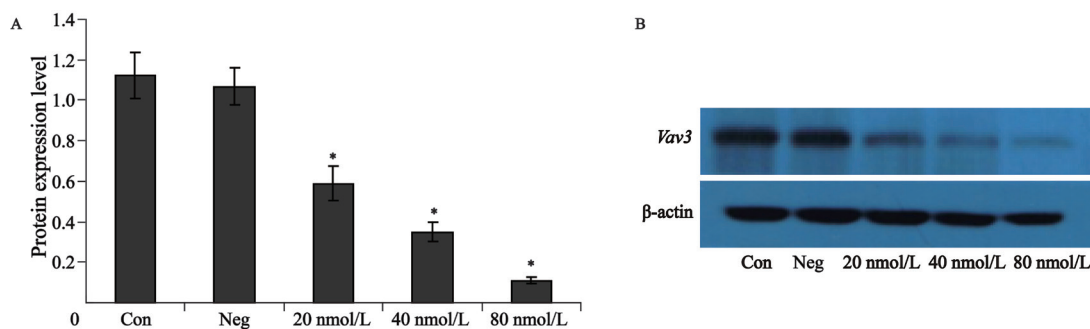


图2 siRNA转染对BGC823细胞*Vav3*表达的影响

Fig. 2 Expression of *Vav3* in BGC823 after *Vav3*-siRNA was transfected

A: Result of *Vav3* protein expression in BGC823 cells (histogram); B: Result of *Vav3* protein expression in BGC823 cells (gel electrophoresis). Con: Blank control group; Neg: Negative control group. *: Compared with negative control group, $P < 0.01$.

2.4 *Vav3*-siRNA对BGC823细胞血管生成相关基因表达的影响

选取80 nmol/L的*Vav3*-siRNA、control-siRNA分别转染BGC823细胞24 h后检测血管生成相关基因*VEGF-A*、*VEGF-C*、*VEGF-D*、*Ang-2*和*vasohibin-1*的表达情况。结果显示, 转染后BGC823中*VEGF-C*、*Ang-2*表达均较转染前降低(P 均 <0.05), 而*Vasohibin-1*表达则升高(P 均 <0.05), *VEGF-A*、*VEGF-D*在转染前后表达变化不明显(P 均 >0.05 , 图4)。

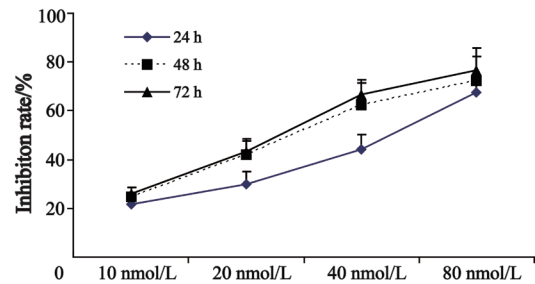


图3 *Vav3*-siRNA对BGC823细胞活性的影响

Fig. 3 Effect of *Vav3*-siRNA to activity of BGC823 (MTT assay)

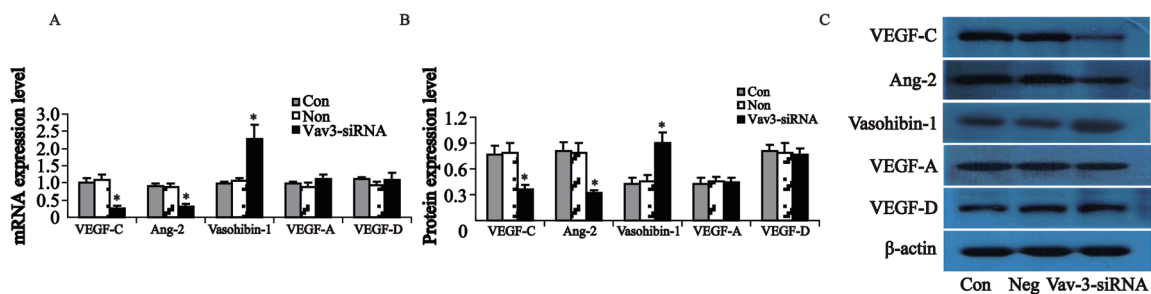


图4 *Vav3*-siRNA对BGC823细胞血管生成相关基因的影响

Fig. 4 Effect of *Vav3*-siRNA to angiogenesis related genes in BGC823 cells

A: Effect of *Vav3*-siRNA to angiogenesis related genes of BGC823 cells (fluorescence quantitative PCR); B: Effect of *Vav3*-siRNA to angiogenesis related proteins of BGC823 cells (Western blot); C: Gel electrophoresis of Western blot. Con: Blank control group; Neg: Negative control group. *: Compared with negative control group, $P < 0.01$.

3 讨论

新生血管形成是促进实体肿瘤侵袭进展的重要原因, 采取措施抑制新生血管生成已成为肿瘤治疗的热点^[6]。胃癌具有新生血管生成迅速的特点, 这是胃癌进展快、预后差的主要原因之一^[7-8]。故阐明胃癌血管生成机制有重要意义。虽然在此方面取得了许多成果, 但具体机制仍不明确。报道显示*Vav3*基因在胃癌中表达上调, 与胃癌多种恶性生物学行为有关^[9], 故本研究对胃癌细胞中*Vav3*的表达进行了探讨, 发现*Vav3*在胃癌细胞株表达较胃上皮细胞株高, 说明*Vav3*可能参与了胃癌的发生及进展。siRNA抑制内源性*Vav3*在胃癌BGC823细胞的表达后, 细胞的增殖能力明显下降, 证实了*Vav3*对胃癌细胞活性有促进作用, 可能作为今后治疗的靶基因, 值得进一步深入研究。

*Vav3*基因能通过调节Rho家族的不同成员活

性参与对多条信号通路的调节作用^[10-11], *Vav3*通过这种功能可影响肿瘤细胞血管生成^[4]。故本研究进一步从分子水平对*Vav3*受抑制后血管生成相关基因*VEGF-A*、*VEGF-C*、*VEGF-D*、*Ang-2*和*vasohibin-1*的变化进行了检测。*VEGF*家族成员可以促进新生血管生成, 与肿瘤进展关系密切^[12-14]。*Ang-2*是血管生成素家族成员之一, 可导致肿瘤新生血管形成^[15]。而*vasohibin-1*则有抑制内皮细胞生长和迁移的作用, 对肿瘤新生血管的生成有抑制作用^[16]。本结果发现*Vav3*受抑制时促进细胞血管生成的*VEGF-C*、*Ang-2*的表达下调, 而具有抑制肿瘤细胞血管生成作用的*vasohibin-1*基因表达则明显升高。研究表明, MAPK信号转导通路对VEGF家族成员有重要的调节作用^[17], 而*Vav3*基因调控的下游主要信号转导通路之一, 即为MAPK信号转导通路^[18], 因此我们推测*Vav3*基因有可能通过调节MAPK信号转导通路的活性而影响了

VEGF-C的表达。同时本研究结果也发现,抑制内源性Vav3基因表达后VEGF-A、VEGF-D变化并不明显,说明Vav3基因影响的仅是VEGF家族中的部分成员,具体的机制还有待深入研究。关于Vav3基因影响血管生成抑制基因vasohibin-1表达的机制目前尚未发现相关报道,我们推测Vav3基因可能也是通过对一些信号转导通路调节而产生了这一效果。以上结果说明Vav3通过调节胃癌细胞血管生成网络中部分成员表达而导致胃癌细胞血管生成能力的增强,但直接的分子间作用机制还有待深入。

总之,本研究发现,BGC 823细胞中Vav3表达上调,降低Vav3表达可调控部分血管生成相关基因表达。这些结果提示Vav3可能作为原癌基因在胃癌细胞血管生成过程中发挥了重要作用,有可能作为胃癌治疗的新靶向基因。但本研究仅从分子水平进行了体外实验,Vav3对胃癌血管生成的确切效果还有待进一步体内研究予以证实。

[参 考 文 献]

- [1] CHOI K S, SONG H, KIM E H, et al. Inhibition of hydrogen sulfide-induced angiogenesis and inflammation in vascular endothelial cells: potential mechanisms of gastric cancer prevention by Korean Red Ginseng [J] . J Ginseng Res, 2012, 36(2): 135-145.
- [2] WANG X, CHEN X, FANG J, et al. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth [J] . J Surg Oncol, 2011, 103(2): 184-192.
- [3] FERNANDEZ-SALGUERO P M. A remarkable new target gene for the dioxin receptor: The Vav3 proto-oncogene links AhR to adhesion and migration [J] . Cell Adh Migr, 2010, 4(2): 172-175.
- [4] BRANTLEY-SIEDERS D M, ZHUANG G, VAUGHT D, et al. Host deficiency in Vav2/3 guanine nucleotide exchange factors impairs tumor growth, survival, and angiogenesis *in vivo* [J] . Mol Cancer Res, 2009, 7(5): 615-623.
- [5] CARVAJAL-GONZALEZ J M, MULERO-NAVARRO S, ROMAN A C, et al. The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion [J] . Mol Biol Cell, 2009, 20(6): 1715-1727.
- [6] ZHANG Y, HE J. The development of targeted therapy in small cell lung cancer [J] . J Thorac Dis, 2013, 5(4): 538-548.
- [7] WANG S, WU X, ZHANG J, et al. CHIP functions as a novel suppressor of tumour angiogenesis with prognostic significance in human gastric cancer [J] . Gut, 2013, 62(4): 496-508.
- [8] SCARTOZZI M, GIAMPIERI R, LORETELLI C, et al. Tumor angiogenesis genotyping and efficacy of first-line chemotherapy in metastatic gastric cancer patients [J] . Pharmacogenomics, 2013, 14(16): 1991-1998.
- [9] LIN K Y, WANG L H, HSEU Y C, et al. Clinical significance of increased guanine nucleotide exchange factor Vav3 expression in human gastric cancer [J] . Mol Cancer Res, 2012, 10(6): 750-759.
- [10] NOMURA T, YAMASAKI M, HIRAI K, et al. Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia [J] . Mol Cancer, 2013, 12: 27.
- [11] DONG Z, LIU Y, LEVIN L, et al. Vav3 oncogene is involved in regulation of secretory phospholipase A2- II a expression in prostate cancer [J] . Oncol Rep, 2011, 25(6): 1511-1516.
- [12] GOEL H L, MERCURIO A M. VEGF targets the tumour cell [J] . Nat Rev Cancer, 2013, 13(12): 871-882.
- [13] 刘宣,王炎,殷佩浩,等. Wnt/ β -catenin信号通路对人肠癌细胞VEGF表达的调控作用 [J] . 中国癌症杂志, 2012, 22(12): 881-885.
- [14] 张家丽,任秀宝. 小细胞肺癌组织微环境中VEGF与DC成熟及Treg关系的探讨 [J] . 中国癌症杂志, 2012, 22(7): 517-521.
- [15] GERALD D, CHINTHARLAPALLI S, AUGUSTIN H G, et al. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy [J] . Cancer Res, 2013, 73(6): 1649-1657.
- [16] SATO Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation [J] . J Biochem, 2013, 153(1): 5-11.
- [17] DUAN P, NI C. t-PA stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/p38 signaling pathways [J] . Pharmazie, 2014, 69(1): 70-75.
- [18] LYONS L S, RAO S, BALKAN W, et al. Ligand-independent activation of androgen receptors by Rho GTPase signaling in prostate cancer [J] . Mol Endocrinol, 2008, 22(3): 597-608.

(收稿日期: 2014-06-24 修回日期: 2014-08-07)