

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.08.003  
文章编号: 1005-8982(2020)08-0013-07

## Galectin-1 与胃癌细胞阿帕替尼敏感性的 关系及调控机制研究

冷娇, 刘雪梅, 张匠, 毛英, 刘黎

(遂宁市中心医院 肿瘤科, 四川 遂宁 629000)

**摘要: 目的** 探讨半乳糖凝集素 1 (Galectin-1) 与胃癌细胞株 SGC-7901 对阿帕替尼敏感性的关系, 以及可能的调控机制。**方法** 转染 Gal1-siRNA 至 SGC-7901 细胞, 并采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 Western blotting 验证干扰效果。另外设置空白对照组和阴性 siRNA 组。采用 MTT 法检测细胞对阿帕替尼的敏感性; Annexin V/PI 双染法和 DAPI 法检测阿帕替尼对细胞凋亡活力的影响; Western blotting 检测各组细胞中上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin、Vimentin, 以及相关转录因子 Snail、Twist、ZEB 的表达。**结果** 不同浓度阿帕替尼作用 48 h, 或 25  $\mu\text{mol/L}$  阿帕替尼分别作用不同时间, Gal1-siRNA1 组细胞增殖抑制率均高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。25  $\mu\text{mol/L}$  阿帕替尼处理 48 h 后, Gal1-siRNA1 组细胞凋亡率高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。同时与空白对照组和阴性 siRNA 组比较, Gal1-siRNA1 组细胞 E-cadherin 蛋白表达升高, 而 Vimentin 和 Snail 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 通过 siRNA 干扰 SGC7901 细胞 Galectin-1 mRNA 和蛋白的表达后, 细胞对阿帕替尼的敏感性增强, 其作用机制可能与抑制上皮间质转化进程有关。

**关键词:** 胃癌 / 胃肿瘤; 阿帕替尼 / 抗肿瘤药; Galectin-1 / 半乳糖凝集素类; 敏感性

**中图分类号:** R735.2

**文献标识码:** A

## Relationship between Galectin-1 and sensitivity of gastric cancer cells to apatinib and its possible mechanism

Jiao Leng, Xue-mei Liu, Jiang Zhang, Ying Mao, Li Liu

(Department of Oncology, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000, China)

**Abstract: Objective** To discuss the relationship between Galectin-1 and sensitivity of gastric cancer cells SGC7901 to apatinib and its possible mechanism. **Methods** SGC-7901 cells were cultured in vitro. Chemically synthesized siRNA targeting Galectin-1 were transfected into SGC-7901 cells, which were verified by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. SGC-7901 cells with the non-transfected cells and cells transfected with negative siRNAs were made as blank group and negative siRNA group. The proliferation of SGC-7901 cells was detected by MTT assay. The apoptosis of SGC-7901 cells was detected by Annexin V/PI staining and DAPI staining. The levels of epithelial cadherin (E-cadherin), Vimentin, Twisit, Snail and zinc finger E-box binding homeobox (ZEB) proteins in SGC-7901 cells were detected by Western blotting. **Results** After apatinib with different concentrations treated for 48h or 25 $\mu\text{mol/L}$  apatinib treated for different time, the inhibition rates of SGC-7901 cells in Gal1-siRNA1 group were higher than that in blank group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of apatinib for 48h on SGC-7901 cells in Gal1-siRNA1 group were higher than that in blank group ( $P < 0.05$ ). Compared with blank group and negative siRNA group, E-cadherin protein of SGC-7901 cells in Gal1-siRNA1 group was higher,

收稿日期: 2019-11-17

[通信作者] 刘黎, E-mail: mmw9578@163.com; Tel: 18008258756

while Vimentin protein and Snail protein were lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Silencing Galectin-1 can enhance the sensitivity of SGC7901 cells to apatinib, which may be related to inhibiting EMT process via regulating E-cadherin, Vimentin and Snail.

**Keywords:** gastric neoplasms; Apatinib / antineoplastic agents; Galectin-1 / galectins; sensitivity

随着精准医学的发展,越来越多的生物学分子被发现并用于临床恶性肿瘤的诊断和治疗。甲磺酸阿帕替尼(Apatinib)是一种高度特异性靶向抑制血管的内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)酪氨酸激酶活性的小分子抗血管生成剂<sup>[1]</sup>。LIN等<sup>[2]</sup>学者证实,阿帕替尼可靶向抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/VEGFR-2信号通路,从而抑制胃癌细胞的增殖,并促使其凋亡。虽然阿帕替尼在临床上有理想的应用前景,但是目前仍然缺乏预测或筛选优势人群的生物标志物。半乳糖凝集素1(Galectin-1)是最早发现的Gal家族成员,在胃癌<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>、甲状腺癌<sup>[5]</sup>等肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)中呈异常高表达,并且可能与上皮间质转化有关。SANO等<sup>[6]</sup>学者也发现,Galectin-1可以通过识别 $\beta$ -半乳糖苷而与内皮细胞表面VEGFR-2结合,进而不依赖于VEGF的作用激活下游信号通路,影响抗VEGF/VEGFR-2药物治疗的敏感性。因此本研究拟通过制备Galectin-1低表达SGC7901胃癌细胞模型,分析其对上皮间质转化分子机制和阿帕替尼敏感性的影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 人胃癌细胞株SGC-7901购自上海复旦IBS细胞资源中心(FuDan IBS Cell Center, FDCC),37℃恒温水浴迅速融化,1000 r/min离心3 min,弃上清,加入1 ml RPMI 1640培养液重悬,转移至细胞培养瓶。使用含10%特级胎牛血清、100 u/ml青-链双抗的RPMI 1640完全培养基进行培养,设置条件:37℃、稳定5%二氧化碳,95%相对饱和湿度。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 甲磺酸阿帕替尼购自江苏恒瑞医药股份有限公司,使用前用生理盐水倍比稀释至实验浓度。RPMI 1640细胞培养基、特级胎牛血清、青-链双抗购自美国Gibco公司,甲基噻唑基四唑(MTT)、嘌呤霉素、Trizol试剂、聚凝胺(Polybrene)购自美国Sigma公司,SuperScript First-

Strand Synthesis System试剂盒购自美国Invitrogen公司;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒购自美国Applied Biosystems公司,鼠抗人上皮型E-cadherin抗体、鼠抗人Twist1抗体、兔抗人Vimentin抗体、兔抗人Snail抗体和兔抗人ZEB抗体购自美国Santa Cruz公司。委托上海吉玛公司设计2条干扰Galectin-1 siRNA序列,1号正向引物:5'-ATCGGGATCCGGGCCTTGGAACTGATGAA-3',反向引物:5'-GACTCTATCGGAATTCTTCATCAGGCC-3',长度435~452 bp;2号正向引物:5'-ATCGGGATCCGGCCATAATGGTTAAGGT-3',反向引物:5'-GACTCTATCGGAATTCACCTTTATATGGCTC-3',长度375~391 bp。阴性无序序列正向引物:5'-GGACTCTTCAGTTTGTAGTAGGGGCAAC-3',反向引物:5'-TGGGAGGTCTTCGAGTTCGGACTGCCCC-3',长度322~363 bp。IX73荧光倒置显微镜购自日本奥林巴斯光学公司,T100 PCR仪购自美国Bio-Rad公司,通用基础电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

### 1.2 细胞转染及分组

构建pSiren包裹的Galectin-1干扰pSiren-shRNA逆转录病毒载体。取对数期生长的SGC-7901细胞接种在6孔板中,分为空白对照组(正常培养,不做任何特殊处理)、阴性siRNA组(转染阴性无序序列)、Gal1-siRNA1组(转染Gal1-siRNA1序列)、Gal1-siRNA2组(转染Gal1-siRNA2序列),加入Polybrene转染试剂,同时加入适量pSiren-shRNA逆转录病毒载体悬液,继续培养24 h后,更换新鲜培养液,置于荧光倒置显微镜下观察荧光染色,以判断感染率。瞬时转染成功后用1  $\mu$ g/ml嘌呤霉素筛选2~3周,将耐嘌呤霉素的稳转细胞用于后续实验。采用qRT-PCR和Western blotting验证细胞转染效果。筛选有效干扰Galectin-1表达的siRNA序列进行后续研究。

### 1.3 MTT法

取SGC-7901细胞按 $1 \times 10^3$ 个/孔单层接种至96孔板中,每组设置8个平行孔,每孔加入100  $\mu$ l梯度浓度增加的阿帕替尼,浓度设置分别为5、25、125和625  $\mu$ mol/L,培养48 h后,检测吸光度(Absorbance,

A) 值。MTT 检测方法: 每孔加入  $20 \mu\text{l}$  MTT 试剂, 静置 4 h 后轻轻丢弃上清, 加入 200  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜溶解结晶紫, 用酶标仪检测吸收波长 490 nm 处的 A 值。计算细胞增殖抑制率: 增殖抑制率 (%) =  $1 - A_{\text{受试组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

#### 1.4 细胞增殖活力测定

细胞接种方法同 1.3, 加入  $20 \mu\text{mol/L}$  阿帕替尼, 继续培养 48 h, MTT 检测方法参照 1.3。

#### 1.5 Annexin V/PI 双染法

收集  $25 \mu\text{mol/L}$  阿帕替尼作用 48 h 后的细胞, 用 PBS 和无血清 RPMI 1640 培养液反复洗涤后, 加入  $1 \times$  Binding Buffer 重悬, 调整细胞浓度约  $1 \times 10^6$  个/ml, 加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和  $5 \mu\text{l}$  PI, 用 300 目筛网过滤, 上机检测细胞凋亡情况。

#### 1.6 DAPI 染色

取 SGC-7901 细胞按  $1 \times 10^5$  个/孔单层接种至 12 孔板中, 加入  $25 \mu\text{mol/L}$  阿帕替尼作用 48 h, 弃上清, 加入 4% 多聚甲醛固定, 每孔加入 5 ml DAPI 染色液, 避光孵育 5 min, 荧光显微镜下拍照计数。

#### 1.7 RNA 提取和 qRT-PCR

加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。采用 Nanodrop 2000 核酸测定仪检测 RNA 浓度和纯度, 用 SuperScript First-Strand Synthesis System 试剂盒逆转录生成 cDNA, 逆转录反应条件:  $42.0^\circ\text{C}$ 、60 min,  $70.0^\circ\text{C}$ 、5 min,  $40.0^\circ\text{C}$ 、2 min。取  $2 \mu\text{g}$  cDNA 模板、正反向引物各  $1 \mu\text{l}$ 、 $2 \times$  Taq Master Mix  $12.5 \mu\text{l}$ , 加入适量去离子水, 配制  $25 \mu\text{l}$  PCR 反应体系, 按照 SYBR DDPeen PCR master Mix 说明书进行 qRT-PCR。PCR 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 2 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $60^\circ\text{C}$  (Galectin-1 mRNA) 或  $54.5^\circ\text{C}$  (GAPDH mRNA) 退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 25 s, 共计 40 个循环,  $72^\circ\text{C}$  继续延伸 10 min。Galectin-1 mRNA 正向引物:  $5' - \text{GTATTGCGCACTGGATACGACC GACCG} - 3'$ , 反向引物:  $5' - \text{TGCTTTGCTCATGACATG TCTACAGCCCA} - 3'$ , 引物长度 100 bp; GAPDH 正向引物:  $5' - \text{CAGCAATTACCAACGAATGCCGA} - 3'$ ; 反向引物:  $5' - \text{GATCTGCGTACCCACACCATGGA} - 3'$ , 引物长度 182 bp。从软件中读取到达阈值的循环数 Ct 值。以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  表示目的基因 mRNA 相对表达量。

#### 1.8 Western blotting

加入 RIPA 和 PMSF 混合细胞裂解液, 提取总

蛋白, 采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白样品与上样 Marker 混合煮沸, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将蛋白条带湿转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 加入 E-cadherin 抗体 (1 : 100 稀释)、Twist1 抗体 (1 : 100 稀释)、Vimentin 抗体 (1 : 50 稀释)、Snail 抗体 (1 : 200 稀释) 和 ZEB 抗体 (1 : 200 稀释) 孵育, 二抗孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂显影, FluorChem FC3 分析系统对蛋白条带进行定量分析。

#### 1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞转染效果

经慢病毒转染后, SGC-7901 细胞出现 GFP 绿色荧光则表示转染成功。当病毒滴度为  $1 \times 10^8$  PFU/ml 时, 细胞转染效率为 77.34%。空白对照组、阴性 siRNA 组、Gal1-siRNA1 组、Gal1-siRNA2 组 SGC-7901 细胞 Galectin-1 mRNA 相对表达量分别为 ( $1.00 \pm 0.05$ )、( $0.97 \pm 0.10$ )、( $0.30 \pm 0.07$ ) 和 ( $0.85 \pm 0.10$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 110.281, P = 0.000$ )。空白对照组、阴性 siRNA 组、Gal1-siRNA1 组、Gal1-siRNA2 组 Cal-1 蛋白相对表达量分别为 ( $0.68 \pm 0.12$ )、( $0.63 \pm 0.10$ )、( $0.21 \pm 0.07$ ) 和 ( $0.56 \pm 0.08$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 44.744, P = 0.000$ )。Gal1-siRNA1 组和 Gal1-siRNA2 组 SGC-7901 细胞 Galectin-1 mRNA 和蛋白相对表达量低于空白对照组和阴性 siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), 其中 Gal1-siRNA1 组细胞相对表达量最低 ( $P < 0.05$ ), 用于后续实验。见图 1 ~ 5。

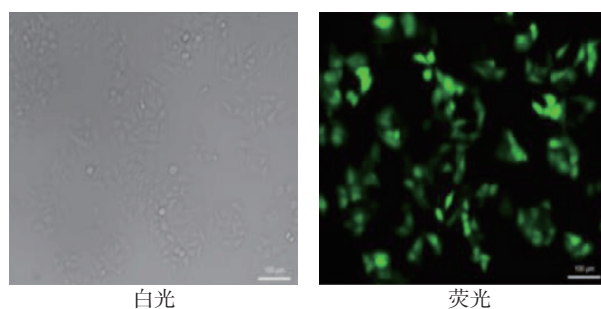


图 1 白光和荧光视野下 SGC-7901 细胞状态 ( $\times 100$ )

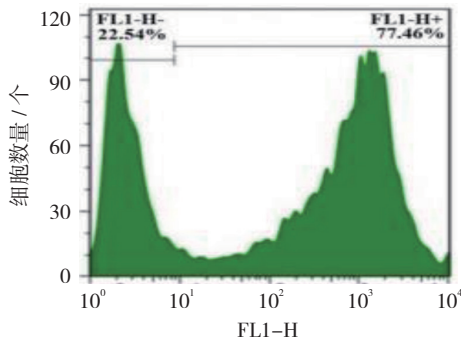
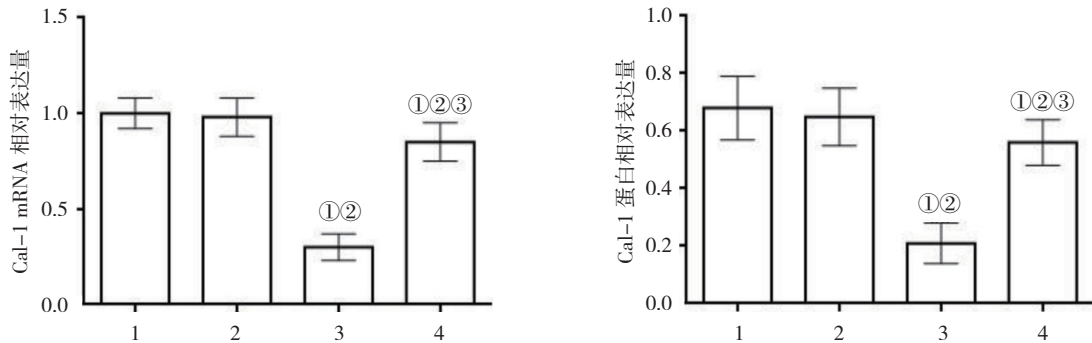


图 2 SGC-7901 细胞转染效率

## 2.2 药物敏感性

同一药物浓度前提下，空白对照组、阴性 siRNA 组和 Gal1-siRNA1 组细胞增殖抑制率比较，经方差分析，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，Gal1-siRNA1 组同一药物浓度下各细胞增殖抑制率均高于空白对照组和阴性 siRNA 组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

空白对照组、阴性 siRNA 组和 Gal1-siRNA1 组细胞经  $25 \mu\text{mol/L}$  阿帕替尼处理 24、48、72 和 96 h 的增殖活性比较，采用重复测量设计的方差分析，



1: 空白对照组; 2: 阴性 siRNA 组; 3: Gal1-siRNA1 组; 4: Gal1-siRNA2 组。①与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与阴性 siRNA 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与 Gal1-siRNA1 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 3 各组 SGC-7901 细胞 Galectin-1 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

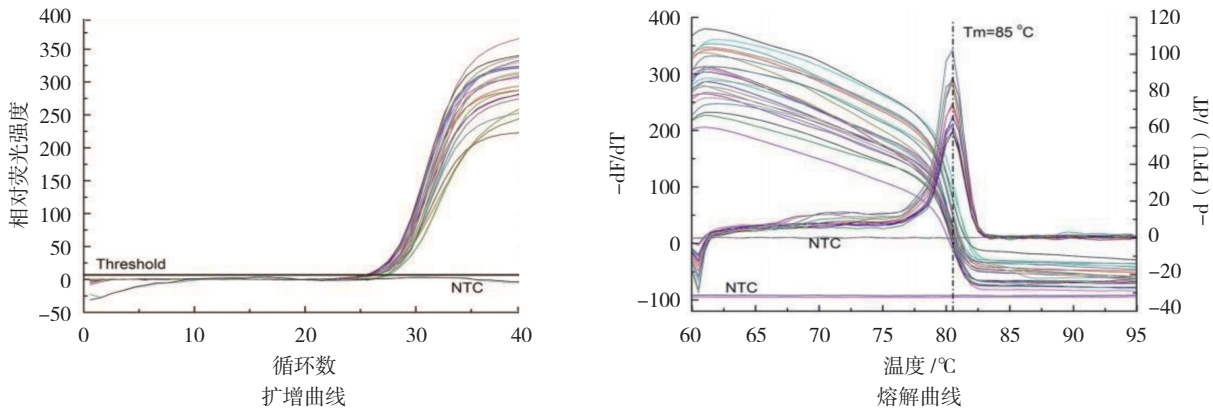


图 4 qRT-PCR 扩增曲线和溶解曲线

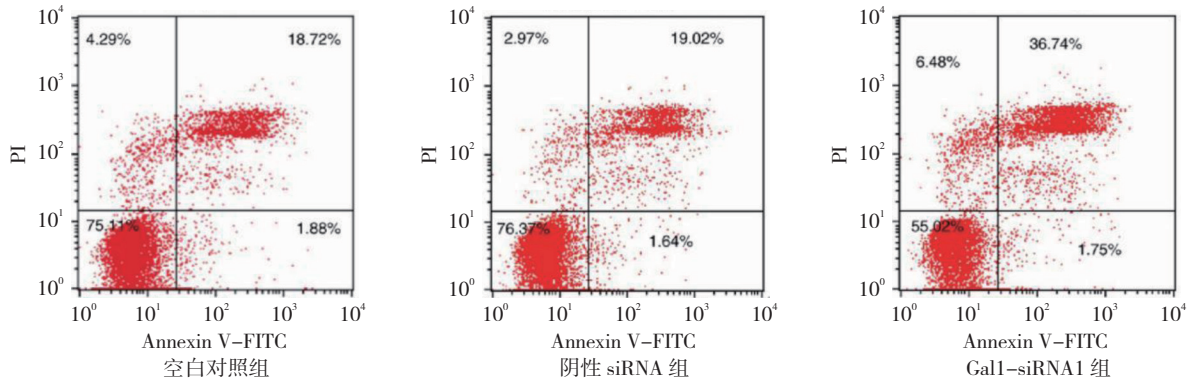


图 5 流式细胞图



表 1 各组不同药物浓度下细胞增殖抑制率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	5 $\mu$ mol/L	25 $\mu$ mol/L	125 $\mu$ mol/L	625 $\mu$ mol/L
空白对照组	10.48 $\pm$ 2.11 <sup>†</sup>	17.64 $\pm$ 3.28 <sup>†</sup>	48.32 $\pm$ 3.43 <sup>†</sup>	69.87 $\pm$ 3.81 <sup>†</sup>
阴性 siRNA 组	11.25 $\pm$ 2.23 <sup>†</sup>	18.10 $\pm$ 3.72 <sup>†</sup>	50.24 $\pm$ 3.29 <sup>†</sup>	70.58 $\pm$ 3.76 <sup>†</sup>
Gal1-siRNA1 组	14.77 $\pm$ 2.19	27.56 $\pm$ 3.25	73.84 $\pm$ 3.56	78.91 $\pm$ 4.10
F 值	8.828	21.398	137.472	13.338
P 值	0.002	0.000	0.000	0.000

注: † 与 Gal1-siRNA1 组比较,  $P < 0.05$ 。

结果: ①不同时间点  $A_{490nm}$  值有差别 ( $F = 181.746$ ,  $P = 0.000$ ); ②3 组细胞  $A_{490nm}$  值有差别 ( $F = 220.835$ ,  $P = 0.000$ ), 与空白对照组和阴性 siRNA 组相比, Gal1-siRNA1 组细胞  $A_{490nm}$  值较低, 增殖抑制活性较好; ③3 组细胞  $A_{490nm}$  值变化趋势有差别 ( $F = 7.158$ ,  $P = 0.000$ )。见表 2。

表 2 各组不同时间点细胞  $A_{490nm}$  值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>†</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>†</sup>	0.63 $\pm$ 0.07 <sup>†</sup>	0.87 $\pm$ 0.09 <sup>†</sup>
阴性 siRNA 组	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>†</sup>	0.42 $\pm$ 0.05 <sup>†</sup>	0.64 $\pm$ 0.08 <sup>†</sup>	0.89 $\pm$ 0.10 <sup>†</sup>
Gal1-siRNA1 组	0.20 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.07

注: † 与 Gal1-siRNA1 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.3 细胞凋亡活性

加入 25  $\mu$  mol/L 阿帕替尼处理 48 h 后, 经 Annexin V/PI 双染法, 空白对照组、阴性 siRNA 组、Gal1-siRNA1 组细胞凋亡率分别为 (18.97  $\pm$  2.96)%、(19.36  $\pm$  3.25)% 和 (36.48  $\pm$  3.10)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 82.926$ ,  $P = 0.000$ ), Gal1-siRNA1 组细胞

凋亡率高于其他组 ( $P < 0.05$ ) (见图 5)。经 DAPI 染色, 空白对照组、阴性 siRNA 组、Gal1-siRNA1 组细胞凋亡率分别为 (22.34  $\pm$  5.57)%、(23.85  $\pm$  6.46)% 和 (40.16  $\pm$  6.55)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 7.598$ ,  $P = 0.023$ ), Gal1-siRNA1 组细胞凋亡率高于空白对照组、阴性 siRNA 组 ( $P < 0.05$ ) (见图 6)。

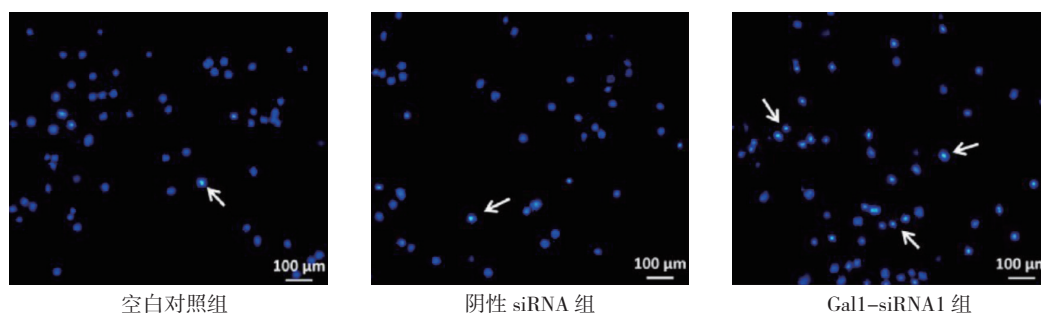


图 6 25  $\mu$  mol/L 阿帕替尼对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 (DAPI 染色  $\times 100$ )

### 2.4 沉默 Galectin-1 mRNA 表达对上皮间质转化通路相关蛋白的影响

空白对照组、阴性 siRNA 组和 Gal1-siRNA1 组细胞 E-cadherin、Snail、Vimentin 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与空白对照组和阴性 siRNA

组比较, Gal1-siRNA1 组细胞 E-cadherin 蛋白相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 而 Snail 和 Vimentin 蛋白相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。空白对照组、阴性 siRNA 组和 Gal1-siRNA1 组细胞 Twist 和 ZEB 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3 和图 7。

表 3 各组细胞 E-cadherin、Snail、Twist、Vimentin、ZEB 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	E-cadherin	Snail	Twist	Vimentin	ZEB
空白对照组	0.68 ± 0.10 <sup>†</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>†</sup>	0.43 ± 0.09	0.67 ± 0.08 <sup>†</sup>	0.52 ± 0.11
阴性 siRNA 组	0.69 ± 0.11 <sup>†</sup>	0.43 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.43 ± 0.10	0.66 ± 0.10 <sup>†</sup>	0.53 ± 0.12
Gal1-siRNA1 组	1.03 ± 0.15	0.29 ± 0.05	0.41 ± 0.08	0.43 ± 0.06	0.50 ± 0.12
F 值	21.361	13.308	0.131	22.123	0.137
P 值	0.000	0.000	0.878	0.000	0.873

注: † 与 Gal1-siRNA1 组比较,  $P < 0.05$ 。

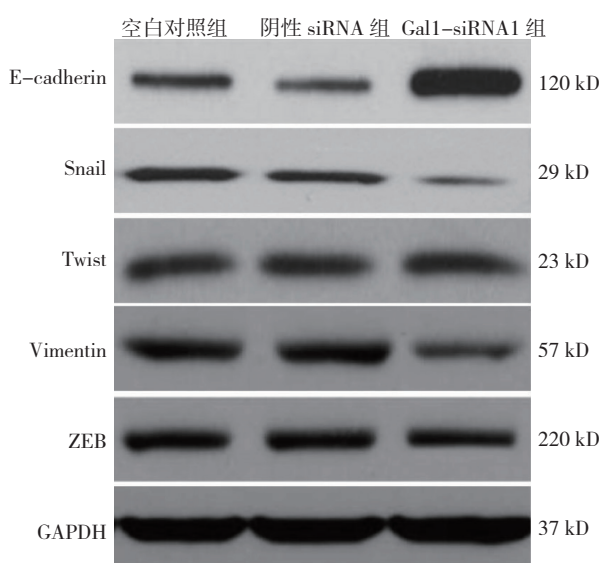


图 7 E-cadherin、Snail、Twist、Vimentin 和 ZEB 蛋白的表达

### 3 讨论

甲磺酸阿帕替尼是我国第 1 个自主研发的 1.1 类小分子抗肿瘤新药,也是第 1 个被证实用于晚期胃癌患者安全有效的抗血管生成靶向制剂<sup>[7]</sup>。通过与 VEGF 竞争并特异性结合 VEGFR-2,抑制 VEGFR-2 羧基末端和酪氨酸激酶区域发生自动磷酸化,进而抑制肿瘤血管生成及细胞的增殖、侵袭、迁移等恶性生物学行为。2016 年由李进教授<sup>[8]</sup>牵头一项多中心、随机、双盲 III 期临床试验 (NCT01512745) 证实甲磺酸阿帕替尼可用于二线治疗失败的晚期胃癌患者和胃食管结合部腺癌患者,不仅能够有效地控制病情进展和癌性腹水,而且常见的不良反应基本可控,从而大大提高患者的生活质量并延长生存时间。另外戴广海的研究团队<sup>[9]</sup>通过一项多中心 II 期临床研究 (NCT02596256) 也证实,在晚期胃癌患者的二线治疗中,阿帕替尼联合多西他赛较多西他赛单药治疗

可延长患者无进展生存时间,提高疾病控制率,但是 3 级以上毒性反应发生率高于多西他赛单药治疗组。近几年,多个研究机构陆续开展了阿帕替尼用于晚期胃癌一线治疗的 I 期临床研究,包括 NCT03255811、NCT02537171 等,但是研究结果尚未公布。

虽然阿帕替尼用于晚期胃癌的临床疗效已被普遍证实,但是其抗癌机制尚不明确。近几年,随着阿帕替尼在临床的使用时间延长,肿瘤细胞敏感性降低的问题逐渐引起相关专家的关注。HUANG 等<sup>[10]</sup>发现高表达 VEGFR-2 的胃癌细胞对阿帕替尼敏感性更高,并且证实其可能的作用机制与阻断肿瘤细胞中 VEGFR-2/PLC  $\gamma$  1/ERK1/2 信号通路的激活,以及减少 VEGF 自分泌,进而抑制胃癌细胞的复制和增殖活力有关。CHEN 等<sup>[11]</sup>还发现, Galectin-1 在胃癌组织中呈高表达,并且与 VEGF 的含量密切相关,因而笔者推测 Galectin-1 与 VEGF 在促肿瘤血管生成过程中具有协同作用。本研究委托上海吉玛公司设计了 2 条干扰 Galectin-1 表达的 siRNA 序列,并转染至 SGC-7901 细胞中,通过反复摸索,证实最佳转染条件为病毒滴度为  $1 \times 10^8$  PFU/ml 时,细胞转染率为 77.34%。而且分别经 qRT-PCR 和 Western blotting 验证, Gal1-siRNA1 的干扰效果最高, Galectin-1 mRNA 和蛋白表达降低最明显,继而建立了稳转细胞株以进行后续实验。

本实验进一步通过 MTT 法检测不同浓度阿帕替尼作用于空白对照组、阴性 siRNA 组、Gal1-siRNA1 组, Gal1-siRNA1 组细胞的增殖抑制率低于空白对照组和阴性 siRNA 组,说明下调 Galectin-1 表达与提高胃癌细胞对阿帕替尼的敏感性有关。然后采用同一药物浓度作用于各组细胞, Gal1-siRNA1 组细胞的增殖活性同样低于空白对照组和阴性 siRNA 组,说明阿帕替尼对 SGC-7901 细胞的抑制作用不仅具有剂量-效应关系,也具有时间-效应关系。在此基础上,本实

进一步采用流式细胞术 DAPI 染色法验证了阿帕替尼对各组细胞凋亡活力的影响。结果也证实阿帕替尼对 Gal1-siRNA1 组细胞凋亡活力的影响也大大增加, 说明下调 Galectin-1 表达可通过促进 SGC-7901 细胞的凋亡, 增加阿帕替尼的敏感性。

化疗药物敏感性降低往往是治疗失败的主要原因。越来越多的研究表明, 上皮间质转化是胃癌细胞对化疗药物产生耐药性的主要原因<sup>[12]</sup>。E-cadherin 是维持上皮细胞极性最主要的细胞黏附分子<sup>[13]</sup>, 而 Vimentin 是细胞间充质表型的重要标志<sup>[14]</sup>。Snail、Twist、ZEB 都是属于影响上皮间质转化进程的转录因子<sup>[15]</sup>。本研究中, 与空白对照组和阴性 siRNA 组比较, Gal1-siRNA1 组细胞 E-cadherin 蛋白相对表达量升高, 而 Vimentin 蛋白和 E-cadherin 的转录抑制因子 Snail 蛋白相对表达量降低, 说明下调 Galectin-1 表达后, SGC-7901 细胞上皮间质转化进程受到明显抑制, 因此笔者推测上皮间质转化可能是 Galectin-1 影响阿帕替尼敏感性的作用机制之一, 但是具体的作用机制和调控网络尚需进一步研究。

综上所述, 本实验通过 siRNA 干扰 SGC-7901 细胞中 Galectin-1 mRNA 和蛋白的表达后, 在一定程度上增加了细胞对阿帕替尼的敏感性, 其作用机制可能为通过上调 E-cadherin 黏附因子的表达, 抑制 Vimentin 蛋白和 Snail 转录因子的表达, 最终抑制上皮间质转化进程。

#### 参 考 文 献:

- [1] 王敏, 饶智国, 杨波. 甲磺酸阿帕替尼治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(2): 151-155.
- [2] LIN L, ZHAI E, LIAO B, et al. Autocrine VEGF signaling promotes cell proliferation through a PLC-dependent pathway and modulates Apatinib treatment efficacy in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 11990-12002.
- [3] CHONG Y, TANG D, GAO J, et al. Galectin-1 induces invasion and the epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cells via non-canonical activation of the hedgehog signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83611-83626.
- [4] NAM K S, SON S, OH S, et al. Binding of galectin-1 to integrin  $\beta 1$  potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 35804-35823.
- [5] ARCOLIA F, JOURNE F, WATTIER A, et al. Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(3): 760-770.
- [6] SANO M, HASHIBA K, NIO-KOBAYASHI J, et al. The luteotrophic function of galectin-1 by binding to the glycans on vascular endothelial growth factor receptor-2 in bovine luteal cells[J]. *J Reprod Dev*, 2015, 61(5): 439-448.
- [7] 张惠博, 宋启斌, 于金明. 阿帕替尼治疗晚期胃癌的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(6): 573-576.
- [8] LI J, QIN S, XU J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13): 1448-1454.
- [9] WANG Z, DAI G, ZHOU Y, et al. Apatinib combined with docetaxel in second-line treatment of advanced gastric cancer: a prospective randomized controlled clinical study[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): x660-x664.
- [10] HUANG M P, HUANG B, LI G W, et al. Apatinib affect VEGF-mediated cell proliferation, migration, invasion via blocking VEGFR2/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in cholangiocarcinoma cell[J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18: 169.
- [11] CHEN J, ZHOU S J, ZHANG Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(13): 2073-2079.
- [12] 孙卉, 钱亚云. 胰岛素样生长因子系统和 EMT 在胃癌中作用的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(7): 823-827.
- [13] DI BARTOLOMEO M, PIETRANTONIO F, PELLEGRINELLI A, et al. Osteopontin, E-cadherin, and  $\beta$ -catenin expression as prognostic biomarkers in patients with radically resected gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(2): 412-420.
- [14] LI Y W, ZHANG T T, QIN S K, et al. Effects of UPF1 expression on EMT process by targeting E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Twist in a hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2137-2143.
- [15] XIONG W Q, ZHANG L, LIU H W, et al. E2-mediated EMT by activation of  $\beta$ -catenin/Snail signalling during the development of ovarian endometriosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 8035-8045.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 冷娇, 刘雪梅, 张匠, 等. Galectin-1 与胃癌细胞阿帕替尼敏感性的关系及调控机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(8): 13-19.