

EphrinB2 在胃癌动物模型中对细胞凋亡中的作用及机制研究

岳文静¹ 徐宁¹ 李乾坤¹ 李明¹ 牟韶娇¹ 王艺¹ 贺业群² 李源³

(1.滨州医学院烟台附属医院 消化内科 山东烟台 264000; 2.烟台市莱阳中心医院; 3.海阳市人民医院)

【摘要】目的: 研究EphrinB2在胃癌动物模型中对细胞凋亡的作用及机制。方法: 利用前期验证的质粒转染HGC27胃癌细胞, 饲养裸鼠, 向裸鼠腹腔内注射HGC27细胞, 实验共分为四个组: 空白对照组、阴性对照组、EphrinB2抑制组和EphrinB2过表达组。收集瘤体, 测量瘤体的大小, 保存瘤体和血清备用。用RT-qPCR及western blot法检测血清及瘤体中EphrinB2、Caspase-3、p53的变化。结果: 过表达组瘤体的体积最大, 抑制组瘤体的体积最小。RT-qPCR及western Blot检测结果均显示, 抑制组中EphrinB2表达量下降, Caspase-3、p53表达量明显升高, 过表达组中EphrinB2的表达升高, Caspase-3、p53表达量均下降。结论: 在动物体内, 抑制EphrinB2表达, 可促进凋亡蛋白Caspase-3、p53的表达, 促进胃癌细胞凋亡。

【关键词】胃癌; EphrinB2; 凋亡蛋白; 动物体内

The Role and Mechanism of EphrinB2 in Apoptosis in a Gastric Cancer Animal Model

Yue Wenjing¹ Xu Ning¹ Li Qiankun¹ Li Ming¹ Mou Shaojiao¹ Wang Yi¹ He Yequn² Li Yuan³

(1. Author's Affiliation: Department of Gastroenterology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai, Shandong, 264000, China; 2. Laiyang Central Hospital, Yantai City.; 3. Haiyang People's Hospital)

[Abstract] Objective: To investigate the role and mechanism of EphrinB2 in apoptosis in gastric cancer animal models. Methods: HGC27 gastric cancer cells were transfected with a previously validated plasmid, and nude mice were inoculated with HGC27 cells via intraperitoneal injection. The experiment was divided into four groups: blank control group, negative control group, EphrinB2 inhibition group, and EphrinB2 overexpression group. Tumor masses were collected, their sizes measured, and stored along with serum for further analysis. Changes in EphrinB2, Caspase-3, and p53 levels in serum and tumor tissues were assessed using RT-qPCR and Western blot. Results: The overexpression group exhibited the largest tumor volume, while the inhibition group showed the smallest. RT-qPCR and Western blot results demonstrated reduced EphrinB2 expression in the inhibition group, along with significantly elevated levels of Caspase-3 and p53. Conversely, the overexpression group showed increased EphrinB2 expression, accompanied by decreased levels of Caspase-3 and p53. Conclusion: In vivo, inhibiting EphrinB2 expression promotes the expression of apoptotic proteins Caspase-3 and p53, thereby inducing apoptosis in gastric cancer cells.

[Key words] gastric cancer; EphrinB2; apoptotic proteins; animal models

引言

《全球癌症统计数据 2022》^[1]显示胃癌全球新发病例数 97 万, 居恶性肿瘤发病第 6 位, 胃癌导致的死亡人数为 66 万, 居恶性肿瘤死亡第 5 位。研究胃癌的发生发展仍然至关重要。我们课题组前期在胃癌组织中研究发现^[2], EphrinB2 高表达, 并且与肿瘤大小、远处转移、TNM 分期显著相关。进一步进行了体外研究, 在 HGC27 细胞中使用 siRNA 抑制 EphrinB2 的表达, 结果显示, 抑制 EphrinB2 表达, 凋亡蛋白 Caspase-3、p53 的表达量明显升高, 凋亡率升高^[3]。这提示, 抑制 EphrinB2 表达, 诱导了细胞凋亡, 但在体内的凋亡调控机制尚待探讨。因此, 我们将在胃癌裸鼠中探讨

EphrinB2 的表达及与凋亡蛋白的相关性。

一、实验材料与实验方法

1. 细胞培养与质粒转染

HGC27 胃癌细胞株购自中科院上海细胞库, 在 RPMI 1640 培养基中培养。取前期鉴定的不同质粒转染细胞^[3], 培养并收集细胞进行实验。

2. 裸鼠饲养

裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 在 SPF 动物房饲养, 分为 4 组, 每组 6 只, 分别为空白对照组、阴性对照组、EphrinB2 抑制组和 EphrinB2 过表达组。将转染

对应质粒的 HGC27 细胞注入裸鼠腹腔内，观察瘤体生长情况。实验第 5 周时，处死裸鼠收集瘤体和血清备用。应用公式 $V(\text{mm}^3) = (A \times B^2) / 2$ ，A 是最大直径，B 是垂直直径，计算瘤体体积。

3. 荧光定量 PCR (RT-qPCR)

用 Trizol 法提取血清中 RNA，反转录合成 cDNA，设计合成引物（上海生工生物工程公司合成）。加入试剂进行扩增反应（整个过程在冰上进行）。反应条件如下：95℃ 3 min；95℃ 10 s，60℃ 30 s，共 39 个循环扩增。每个样品做 3 个平行管，用循环阈值 (Ct) 来评估基因表达的相对量， $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的表达量。

4. Western blot

研磨瘤体组织，提取蛋白质。按照 Bradford 法测定蛋白浓度。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。蛋白样品上样及电泳、变性，转移至 PVDF 膜上，加稀释后的一抗，4℃ 摇床过夜；次日洗膜后滴加对应的 HRP 标记的二抗（1: 6000）。配制 ECL 发光液，混匀避光并加在膜上，用凝胶成像分析仪测定条带分析灰度值。

5. 统计学分析方法

用 GraphPad Prism 10 软件进行统计学分析。均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

二、实验结果

1. 裸鼠瘤体中 EphrinB2 的变化

RT-qPCR 检测结果显示，与空白及阴性对照组比较，EphrinB2 在抑制组表达量下降 ($P < 0.05$)，在过表达组中的表达升高 ($P < 0.05$)，空白组与阴性对照组比较无统计差异 ($P > 0.05$)，见图 1A；western blot 检测结果显示，EphrinB2 在抑制组中表达量明显下降 ($P < 0.05$)，EphrinB2 在过表达组中的表达量明显升高 ($P < 0.05$)，空白组与阴性对照组比较无差异 ($P > 0.05$)。图 1B，*代表 $P < 0.05$ 。

2. 瘤体的体积大小分析

统计数据分析显示，空白对照组与阴性对照组比较，瘤体的体积大小无统计学意义 ($P > 0.05$)，过表达组瘤体的体积最大，抑制组瘤体的体积最小，与其他三组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。见图 2，*代表 $P < 0.05$ 。

3. EphrinB2 对瘤体中凋亡蛋白的影响

抑制 EphrinB2 表达后，RT-qPCR 和 western blot 实验数据均显示，Caspase-3、p53 的表达量明显升高 ($P < 0.05$)；过表达 EphrinB2，Caspase-3、p53 的表达量均下降 ($P < 0.05$)。见图 3，*代表 $P < 0.05$ 。

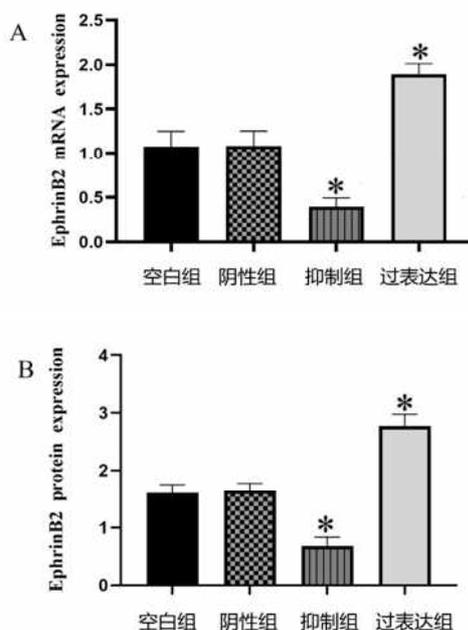


图 1 A. EphrinB2 在瘤体中的 mRNA 水平表达 B. EphrinB2 在瘤体中的蛋白水平表达

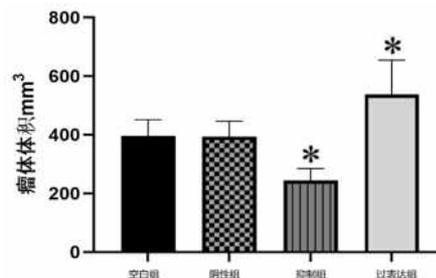


图 2 瘤体的体积大小

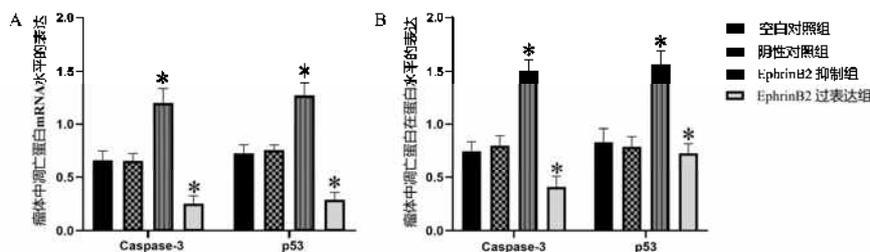


图 3 A. 凋亡蛋白在瘤体中的 mRNA 水平表达 B. 凋亡蛋白在瘤体中的蛋白水平表达

三、讨论

促红细胞生成素肝细胞受体 (erythropoietin producing hepatocyte receptor, Eph 受体) 是酪氨酸激酶受体家族中最大的一个亚族。Eph/Ephrin 家族在人体多个组织器官中存在, EphrinB2 在头颈部鳞状细胞癌^[4]、尿路上皮癌^[5]等肿瘤组织中均呈现高表达, 并与肿瘤的增殖、侵袭等行为有关。但 EphrinB2 在胃癌中的研究较少, 我们将探讨 EphrinB2 在胃癌裸鼠体内的表达及与凋亡蛋白的相关性。

本实验结果显示, EphrinB2 过表达组中, EphrinB2 在 mRNA 和蛋白的表达水平均最高, 裸鼠瘤体的体积最大; EphrinB2 抑制组中, EphrinB2 在 mRNA 和蛋白表达水平均最低, 裸鼠瘤体的体积最小; 空白对照组及阴性对照组在瘤体的体积大小及 EphrinB2 表达水平方面无统计学差异, 此结果提示在动物体内抑制 EphrinB2 表达, 可抑制胃癌的肿瘤生长。为探讨 EphrinB2 与细胞凋亡的相关性, 检测了瘤体内 Caspase-3、p53 的表达。抑制 EphrinB2 表达后,

RT-qPCR 和 western blot 实验数据显示, 与空白及阴性对照组比较, Caspase-3、p53 的表达量均明显升高; 过表达 EphrinB2 后, 与空白及阴性对照组比较, Caspase-3、p53 表达量均明显下降 ($P < 0.05$), 本实验结果提示抑制 EphrinB2 表达, 可促进 Caspase-3、p53 的表达, 促进细胞的凋亡。有学者研究了 EphrinB2 在结肠癌中的作用, 敲掉 EphrinB2 基因后可抑制结肠癌细胞 SW480 的增殖、侵袭, 促进结肠癌细胞的凋亡^[6]; 消瘤汤能抑制裸鼠结直肠癌组织中 EphrinB2 的表达, 抑制肿瘤的生长^[7]。这些研究均提示抑制 EphrinB2 表达, 可抑制肿瘤生长, 促进肿瘤细胞的凋亡, 但具体调控通路尚不明确。

此项动物体内研究结果提示 EphrinB2 可促进胃癌肿瘤的生长, 抑制 EphrinB2 表达后, 可启动 p53 凋亡通路, 促进细胞凋亡、抑制肿瘤的生长。实验结果为促进胃癌的凋亡研究提供了新的靶点。但凋亡通路比较复杂, 本实验研究的通路较少, 后续将进行深入研究。

参考文献:

- [1]Bray F, Laversanne M, Sung H, et al.Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA, 2024, 74 (3): 229-263.
 - [2]WEN-JING YUE, YI-PIN LIU, MING LI, et al.High serum Ephrin-B2 levels predict poor prognosis for patients with gastric cancer. ONCOLOGY LETTERS.2018, 16 (4): 4455-4461.
 - [3]岳文静.EphrinB2 在胃癌中的表达及其调控凋亡机制的研究[D].济南: 山东大学, 2019.
 - [4]Abdelazeem KNM, Nguyen D, Corbo S, et al.Manipulating the EphB4-ephrinB2 axis to reduce metastasis in HNSCC.Oncogene. 2025, 44 (3): 130-146.
 - [5]Sarmad Sadeghi1, David Quinn1, Tanya Dorff, et al.EphrinB2 Inhibition and Pembrolizumab in Metastatic Urothelial Carcinoma.J Clin Oncol, 2023, 41 (3): 640-650.
 - [6]张梦娇, 张旭, 梁雪梅等.沉默 Ephrin B2 基因表达对结直肠癌细胞侵袭和迁移的影响及其机制.山东医药, 2018, 58 (08): 6-9.
 - [7]徐宏智, 曾家耀, 赫军等.消瘤汤对裸鼠结直肠癌移植瘤组织中促红细胞生成素肝细胞激酶 B4 及其配体 EphrinB2 表达的影响.广西医学, 2019, 41 (23): 3013-3016.
- 作者简介: 岳文静 (1986-), 女, 山东烟台, 博士, 副主任医师。研究方向: 胃肠道肿瘤的基础研究和临床研究。邮箱 sdytywj@163.com。
- 基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (编号 202003031068)。