

田苗苗,田祖宏,张慧霞,等. Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 1-6.
Tian MM, Tian ZH, Zhang HX, et al. Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 1-6.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.11.001

Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响

田苗苗,田祖宏,张慧霞,张莹,宁思明,聂勇战,胡思隽*

(第四军医大学西京消化病医院/空军军医大学第一附属医院 肿瘤生物学国家重点实验室,西安 710032)

【摘要】 目的 初步探讨 Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响。方法 通过胃癌手术病理染色分析 Axl 与胃癌间的关系;通过转染慢病毒构建高表达 Axl 的胃癌细胞;通过对皮下注射胃癌细胞建立裸鼠胃癌细胞皮下成瘤模型;通过小动物活体成像在体评估皮下肿瘤大小。结果 胃癌手术病人切除组织免疫组化结果显示, Axl 在胃癌组织中表达量显著升高;所构建 Axl 高表达胃癌细胞中 Axl 表达量升高 2.4 倍。利用 Axl 高表达胃癌细胞建立裸鼠皮下成瘤模型,小动物活体成像显示皮下注射细胞 2 周后,高表达 Axl 细胞所形成的皮下瘤明显大于对照组,4 周后,差异更加显著($P < 0.01$)。最后,高表达 Axl 胃癌细胞所形成的皮下瘤的体积和重量均显著大于对照组。结论 胃癌组织高表达 Axl, Axl 高表达能够增强胃癌细胞 SGC-7901 的皮下成瘤能力。

【关键词】 Axl;胃癌;小动物活体成像;皮下成瘤;裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0001-06

Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice

TIAN Miaomiao, TIAN Zuhong, ZHANG Huixia, ZHANG Ying, NING Siming, NIE Yongzhan, HU Sijun*
(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University/the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice. **Methods** The relationship between Axl and gastric cancer was analyzed by immunohistochemical staining. Axl-overexpressing gastric cancer cells were constructed through lentivirus transfection. The nude mouse model was established by subcutaneous injection of gastric cancer cells, and tumor sizes were evaluated by imaging of live animals. **Results** Immunohistochemical result revealed significantly higher Axl expression in gastric cancer tissues compared with adjacent tissues. Axl expression in the Axl-overexpression gastric cancer cell line was increased by 2.4-fold. Live imaging of model mice revealed that after subcutaneous injection of cell lines for 2 weeks, tumors constructed with the Axl-overexpression cell line were significantly larger than that of the control group, and this difference was more significant after 4 weeks ($P < 0.01$). Finally, the volume and weight of subcutaneous tumors formed by gastric cancer cells with high Axl expression were significantly increased compared with the control group. **Conclusions** Axl overexpression can enhance the subcutaneous tumorigenicity of SGC-7901 cells.

【Keywords】 Axl; gastric carcinoma; living imaging of small animals; subcutaneous tumorigenesis; nude mouse

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81672702);空军军医大学西京医院学科助推项目(XJZT18MJ84)。

【作者简介】田苗苗(1987—),女,助理研究员,硕士研究生,研究方向:蛋白质组学,肿瘤多药耐药。E-mail: 393511506@qq.com

【通信作者】胡思隽(1982—),女,副研究员,博士研究生,研究方向:蛋白质组学,肿瘤。E-mail: husijun211@aliyun.com

胃癌是世界第四大肿瘤,全球胃癌致死率位居所有肿瘤第二位,是我国死亡人数最多的恶性肿瘤之一,对人类健康具有很大的威胁^[1]。尽管针对胃癌的发生发展已经取得了诸多进展,但是由于胃癌患者的早诊率低和多重耐药等限制,预后仍然较差^[2]。胃癌主要治疗措施包括手术治疗及化疗。胃癌化疗治疗方案中,一类重要的靶点是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)。

RTKs 是一个跨膜激酶蛋白家族,可以通过和配体结合及磷酸化等模式激活下游信号通路进而激活一系列生化反应,参与多种生命活动,包括组织修复和凋亡清除、免疫调控等^[3-4]。Axl (Anexlekt) 是 RTKs 的一种,其在不同类型癌症中均有较高表达,参与调控肿瘤细胞的增殖侵袭和转移,并且与癌症的不良预后相关^[5-9]。Axl 可介导肺癌、乳腺癌、头颈和食管鳞状上皮细胞癌等肿瘤的增殖、迁移、转移及耐药等^[10-12]。Axl 信号通路在胃癌组织和细胞系中高表达,可能通过 Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖,然而具体调控机制仍不明确^[13]。为了进一步探讨 Axl 与胃癌发生发展之间的关系,本研究着眼于 Axl 表达量与胃癌之间的关系及 Axl 高表达对裸鼠胃癌系皮下成瘤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠(5~6 周龄,约 20 g)购自北京维通利华有限公司[SCXK(京)2016-0011];饲养于空军军医大学实验动物中心[SYXK(陕)2014-001],12 h 昼夜交替,温度保持在 23℃~25℃,相对湿度恒定在 40%~60%,自由饮食。实验分为两组,每组 8 只。实验动物设计符合福利伦理要求,实验动物福利伦理审批号:20190214,本实验符合动物实验的 3R 原则。

1.1.2 组织样本

收集第四军医大学西京消化病医院(空军军医大学第一附属医院)2008 年至 2010 年间经病理检查的胃癌和癌旁组织 101 例,交由上海芯超生物科技有限公司制备为胃癌和癌旁芯片。实验所用组织均经病人本人和家属同意,并签署知情同意书,且经过医学伦理委员会审批,伦理委员会批件号:KY20192088-F-1。

1.1.3 细胞系

人胃癌细胞 SGC-7901 细胞购自上海吉凯生物公司。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自四季青公司;1640 培养基和胰酶购自美国 Gibco 公司;过表达慢病毒购自上海吉凯生物公司;抗 Axl 抗体购自美国 CST 公司;免疫组化用山羊抗兔 IgG 和 DAB 显色试剂盒均购自中杉金桥公司;总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。激光共聚焦扫描显微镜(FLUOVIEW FV10I)购自美国 Olympus 公司;小动物活体成像仪(Lumina2)购自美国 PE 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 高表达 Axl 细胞的构建

SGC-7901 细胞以 2×10^6 个/孔密度铺于六孔板中,过夜贴壁后加入适量具有绿色荧光蛋白(GFP)编码基因的慢病毒(过表达慢病毒 Let-Axl 或对照慢病毒 Let-Null),共培养 24 h 后更换培养基。72 h 后加入嘌呤霉素筛选已转染细胞,荧光显微镜观察同时进行 Western blot 和定量 PCR 检测确定转染效率。转染成功可进行细胞传代和后续研究。

1.3.2 裸鼠皮下成瘤及小动物活体成像

BALB/c 裸鼠(6 周)16 只用于成瘤实验,将胃癌细胞 SGC-7901/Let-Axl 和 SGC-7901/Let-Null 消化后,PBS 清洗两次,去除残留培养基,将 1×10^6 个细胞接种于裸鼠的右侧背部皮下,每周观察裸鼠的状态、肿瘤的生长状况^[14]。于第二和四周时,对裸鼠进行麻醉后,利用小动物活体成像仪进行荷瘤裸鼠活体成像并拍照(生物发光,激发波长 488 nm,发射波长 507 nm)^[15]。

1.3.3 定量 PCR

采用总 RNA 提取试剂盒对细胞总 RNA 进行提取,逆转录试剂盒进行逆转录,定量 PCR 试剂盒进行定量。内参为 GAPDH,引物序列 GAPDH-F(5'→3'): GCACCGTCAAGGCTGAGAAC; GAPDH-R(5'→3'): TGGTGAA-GACGCCAGTGGA; Axl 引物序列为 Axl-F(5'→3'): CCGGTTTCATCAACATCAA; Axl-R(5'→3'): CTGACATTCTCGAGATCGA。

1.3.4 Western blot 检测

用 RIPA 裂解液将细胞裂解并用细胞刮收集,测定总蛋白浓度后,每孔上样 40 μg 蛋白,150 V 恒压电泳 40 min,100 V 恒压转 PVDF 膜 1 h。5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,相应二抗室温孵育 2 h,通过 ECL 试剂盒发光检测。

1.3.5 免疫组化

组织切片于 60℃ 烤箱烘烤 2 h。常规脱蜡(依次为):二甲苯、二甲苯、无水乙醇、无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇,其中二甲苯浸泡 10 min,

乙醇浸泡 5 min。抗原修复:在清水中漂洗两次,再加入柠檬酸缓冲液,放入微波炉中煮沸 3 min(中火),待高压锅中煮沸后将组织片置于其中高压修复 2 min,冷却至室温。灭活内源性过氧化氢酶:在清水中冲洗一段时间,加入 3% H_2O_2 浸泡 10 min。血清封闭:将载玻片置于 PBS 中 5 min,清洗 2 次,山羊血清封室温下封闭 30 min。加一抗:加入 Axl 抗体(稀释浓度 1:300),以 PBS 作为阴性对照组,4℃ 孵育过夜。加二抗:PBS 中洗 3 次,每次 5 min,加二抗,然后置于 37℃ 温箱中 30 min。显色:PBS 中洗 3 次,每次 5 min,擦干组织周围的 PBS 后加 DAB 显色剂。镜下观察组织染色情况至合适深浅。将显色后的片子用清水冲洗 15 min 后,浸泡于苏木精中染色 1 min。脱水:水中冲洗 5 min 后,依次将载玻片放入 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇、二甲苯、二甲苯。每个试剂中放置 2 min,最后浸泡在二甲苯中,通风柜中用中性树脂封片晾干。

1.3.6 表达分级判断标准

免疫组化表达分级通过两方面打分评判:(1)阴性为 0;阳性占 0%~33%的记作 1;34%~66%的记作 2;67%~100%的记作 3。(2)染色强度:分别将未显色、浅黄、棕黄和棕色记为 0、1、2、3 四个等级。将两个评分相乘并分为 0、1、2 和 3 四个表达强度等级。

1.3.7 细胞免疫荧光染色

多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次后山羊血清封闭 1 h。一抗 4℃ 孵育过夜后,用相应荧光二抗室温孵育 2 h, DAPI 室温染色 10 min, 加入抗淬灭剂封

片保存。

1.4 统计学方法

实验数据,采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验进行组间差异性检验,表达分级采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

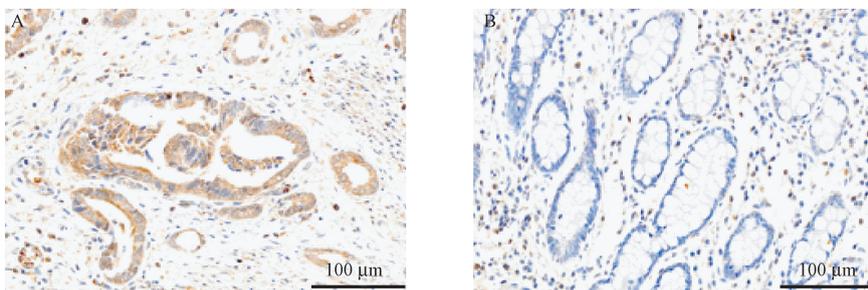
2 结果

2.1 胃癌组织中 Axl 高表达

为了观察胃癌组织中 Axl 的表达情况,我们收集了本院消化外科胃癌手术病人手术切除组织并制作胃癌组织芯片。经过免疫组化染色, Axl 在胃癌组织中的表达量显著高于癌旁组织(图 1)。101 例免疫组化统计结果见表 1。胃癌组织中,强度为中阳性(++)和强阳性(+++)分别有 34 例和 7 例,而在癌旁组织中,强度为中阳性(++)和强阳性(+++)分别只有 5 例和 0 例。胃癌组织中 Axl 表达量显著高于癌旁组织($P < 0.001$)。

2.2 Axl 高表达细胞构建

为了深入研究 Axl 高表达与胃癌发生发展之间的关系,我们首先构建了高表达 Axl 的 SGC-7901 细胞。经过慢病毒 Let-Axl 的转染,通过定量 PCR 技术检测表明, SGC-7901/Let-Axl 中 Axl mRNA 的含量显著高于 SGC-7901/Let-Null 组($P < 0.001$, 图 2A)。进一步检测发现, SGC-7901/Let-Axl 中 Axl 蛋白含量显著高于 SGC-7901/Let-Null(图 2B)。免疫荧光染色也表明 SGC-7901/Let-Axl 细胞中 Axl 含量明显升高(图 2C)。



注:A:胃癌组织;B:癌旁组织。

图 1 免疫组化检测组织中 Axl 表达

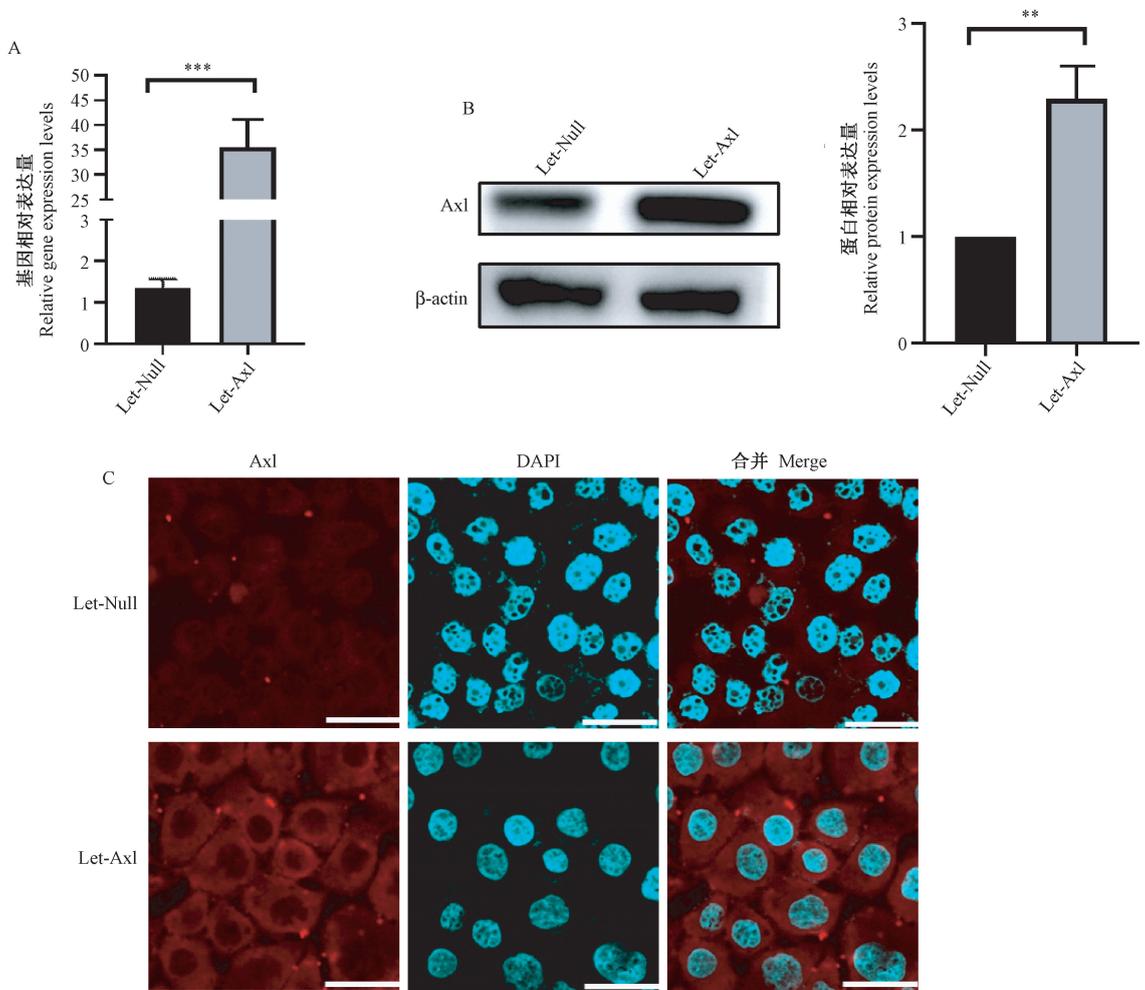
Note. A, Gastric cancer tissue. B, Paracancer tissue.

Figure 1 Axl expression in tissues. Immunohistochemistry stain

表 1 胃癌组织与癌旁组织 Axl 蛋白表达水平

Table 1 Axl expression levels in gastric cancer tissues and adjacent tissues

组别 Groups	表达分级 Rank				n	P
	-	+	++	+++		
胃癌组织 Gastric cancer tissues	30	30	34	7	100	<0.001
癌旁组织 Adjacent tissues	69	27	5	0	101	



注:A:定量 PCR 结果;B:Western blot 检测 Axl 表达量;C:免疫组化结果。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。比例尺为 20 μm 。

图 2 Axl 高表达细胞鉴定

Note. A, Results of quantitative PCR. B, Quantification of Axl by Western blot. C, Results of immunofluorescence. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scales indicate 20 μm .

Figure 2 Identification of Axl-overexpression cells

2.3 小动物活体成像检测 Axl 对胃癌肿瘤的影响

为了进一步研究 Axl 高表达对胃癌的影响,我们进行了裸鼠皮下胃癌细胞成瘤实验。在分别注射 Axl 高表达细胞 SGC-7901/Let-Axl 及其对照细胞 SGC-7901/Let-Null 两周后,通过小动物活体成像可以看出,高表达 Axl 的 SGC-7901 细胞所成皮下瘤荧光强度大于对照组,在注射肿瘤细胞 4 周后,再次进行小动物活体成像,结果显示,SGC-7901/Let-Axl 所成皮下瘤荧光强度显著大于对照组(图 3A)。荧光强度分析结果显示,注射 SGC-7901/Let-Axl 所形成肿瘤在小动物活体成像下荧光强度显著高于 SGC-7901/Let-Null($P < 0.01$,图 3B)。以上结果显示,SGC-7901/Let-Axl 成瘤能力显著高于 SGC-7901/Let-Null,Axl 高表达可以增强胃癌细胞 SGC-7901 的

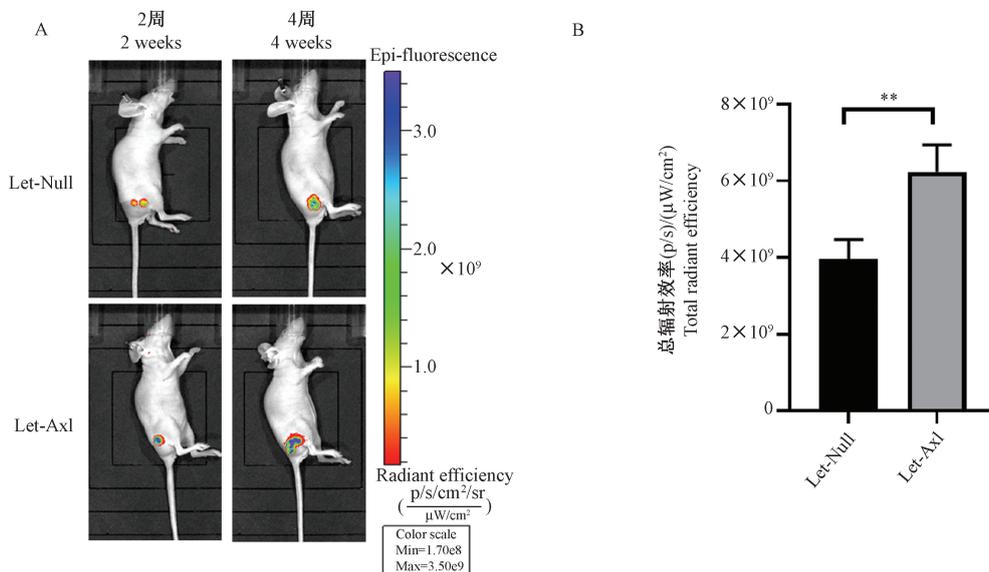
皮下成瘤能力。

2.4 高表达 Axl 增强胃癌细胞皮下成瘤能力

裸鼠皮下接种胃癌细胞 4 周后,SGC-7901/Let-Axl 所形成的肿瘤明显大于 SGC-7901/Let-Null 组(图 4A、4B)。处死裸鼠后,取出皮下瘤,对其体积和重量进行测量。相对于对照组 SGC-7901/Let-Null,高表达 Axl 细胞 SGC-7901/Let-Axl 所形成的皮下瘤的体积显著增大($P < 0.01$,图 4C),质量也显著增大($P < 0.01$,图 4D)。这些结果表明,Axl 高表达能够增强胃癌细胞皮下成瘤能力。

3 讨论

胃癌是我国第二大恶性肿瘤,致死率亦位居第二^[1]。尽管胃癌的诊断和治疗技术有了很大改进,



注:A:小动物活体成像结果;B:小动物活体成像荧光强度统计(皮下注射肿瘤细胞4周后)** $P < 0.01$ 。

图3 小动物活体成像检测皮下瘤大小

Note. A, Live animal imaging. B, Total radiant efficiency of live animal imaging (4 weeks after subcutaneous injection of cancer cells). ** $P < 0.01$.

Figure 3 Size of subcutaneous tumors detected by live animal imaging

但胃癌患者的5年总生存率仍然不能令人满意^[2]。癌症化疗治疗方案中,RTKs是一类极其重要的靶点。进一步深入研究RTKs与胃癌的关系,具有重要的临床意义。

Axl是RTKs家族中重要的一员,在多种肿瘤中有过表达或异位表达,可以激活相关通路参与肿瘤的增殖、迁移、转移、凋亡抑制和耐药性^[16]。研究表明,急性白血病细胞可以诱导骨髓间质细胞分泌Gas6,从而介导表达Axl的急性白血病细胞进行增殖、存活和耐药性。在食管鳞状细胞癌中,Axl高表达且与生存期呈负相关^[17]。在胰腺癌中,Axl与淋巴结转移呈现正相关,与生存期呈现负相关^[18]。在肝癌中,Axl可以促进原发性肝癌的细胞增殖和侵袭能力^[19]。

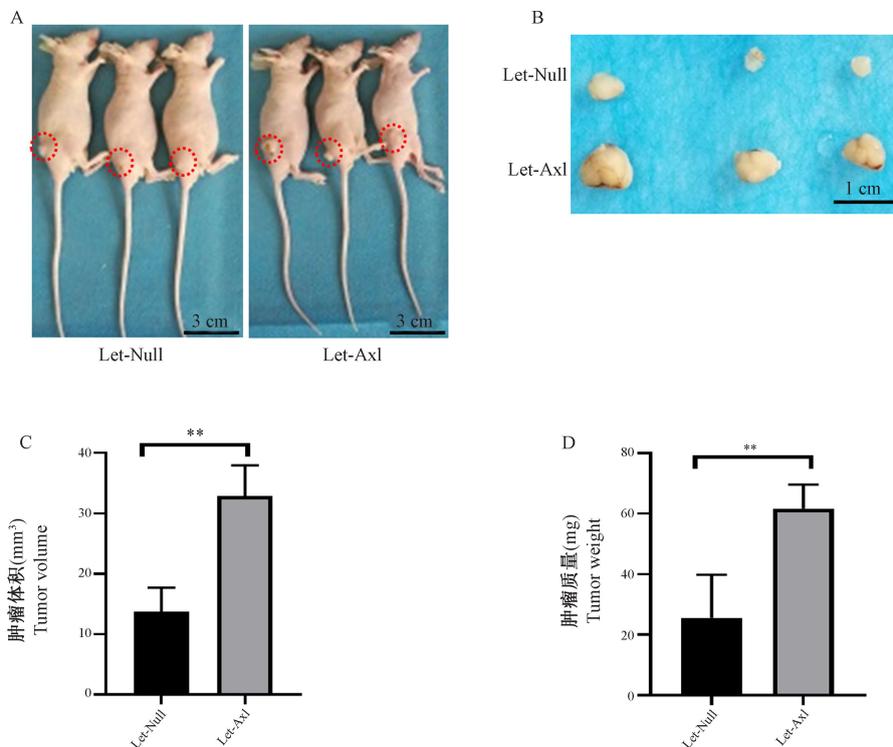
在本研究中,我们检测了进行胃癌外科手术患者的胃癌及癌旁组织中的Axl的表达量,结果显示,胃癌组织相比与癌旁组织,Axl表达量显著升高,这提示Axl与胃癌的发生发展可能具有密切的关系。为了确定Axl参与胃癌发生发展,我们构建Axl高表达胃癌细胞,在裸鼠体内进行皮下成瘤,通过小动物活体成像检测证实,Axl高表达能够显著提高胃癌细胞的皮下成瘤能力,处死动物后,取瘤组织测量体积和重量,确认了与活体成像结果的一致性。本研究一系列结果提示,Axl与胃癌的发生和

发展可能具有密切的关系。

Axl已成为多种肿瘤的治疗靶点和潜在的生物标志物,多种针对Axl的小分子抑制剂也已面市。我们通过本研究证实,Axl与胃癌的发生和发展可能具有密切的关系,可能可以作为胃癌预防、早诊及治疗的关键分子。基于本研究结果,经过后续深入研究探索,有望开发出以Axl为靶点治疗胃癌的新型有效的抗肿瘤药物和以Axl为胃癌标志物的诊断试剂盒。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Zhang D, Fan D. New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives [J]. Future Oncol, 2010, 6(4): 527-537.
- [3] Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases [J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62: 453-481.
- [4] Yu J, Rupasinghe C, Wilson JL, et al. Targeting receptor tyrosine kinases and their downstream signaling with cell-penetrating peptides in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells [J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 85(5): 586-597.
- [5] Dunne PD, McArt DG, Blayney JK, et al. AXL is a key regulator of inherent and chemotherapy-induced invasion and predicts a poor clinical outcome in early-stage colon cancer [J].



注:A:裸鼠皮下瘤生长情况;B:Axl 高表达及对对照组所形成的皮下瘤;C:皮下瘤体积;D:皮下瘤质量。** $P < 0.01$ 。红色圆圈所示为裸鼠皮下瘤。

图 4 Axl 高表达对皮下瘤形成的影响

Note. A, Subcutaneous tumor growth in nude mice. B, Subcutaneous tumor formed by Axl overexpression and control groups. C, Tumor volume. D, Tumor weight. ** $P < 0.01$. Red circles show the subcutaneous tumors in nude mice.

Figure 4 Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumor formation

Clin Cancer Res, 2014, 20(1): 164-175.

- [6] Avilla E, Guarino V, Visciano C, et al. Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1792-1804.
- [7] Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(7): 618-626.
- [8] Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, et al. Gas6/Axl pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(4): 769-775.
- [9] Sayan AE, Stanford R, Vickery R, et al. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL [J]. Oncogene, 2012, 31(12): 1493-1503.
- [10] Wu Z, Bai F, Fan L, et al. Coexpression of receptor tyrosine kinase AXL and EGFR in human primary lung adenocarcinomas [J]. Hum Pathol, 2015, 46(12): 1935-1944.
- [11] Boichuk S, Galembikova A, Dunaev P, et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance [J]. Molecules, 2017, 22(12): E2152.
- [12] Vouri M, Hafizi S. TAM receptor tyrosine kinases in cancer drug

resistance [J]. Cancer Res, 2017, 77(11): 2775-2778.

- [13] Sawabu T, Seno H, Kawashima T, et al. Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway [J]. Mol Carcinog, 2007, 46(2): 155-164.
- [14] 田树红, 王日超, 肖敏, 等. 裸小鼠胃癌原位移植模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 21-24.
- [15] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 7-12.
- [16] Reichl P, Dengler M, van Zijl F, et al. Axl activates autocrine transforming growth factor-beta signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2015, 61(3): 930-941.
- [17] Paccetz JD, Duncan K, Vava A, et al. Inactivation of GSK3 β and activation of NF- κ B pathway via Axl represents an important mediator of tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(5): 821-831.
- [18] Hector A, Montgomery EA, Karikari C, et al. The Axl receptor tyrosine kinase is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(10): 1009-1018.
- [19] He L, Zhang J, Jiang L, et al. Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(10): 882-891.

[收稿日期] 2019-09-18