

# 沉默 *B7-H3* 基因抑制人恶性血液病裸鼠移植瘤的体内成瘤和转移

闫新星, 张 巍, 王 晶, 克晓燕<sup>△</sup>

(北京大学第三医院血液科, 北京 100191)

**[摘 要]** **目的:**探讨靶向 *B7-H3* 基因沉默对人恶性血液病细胞株在裸鼠体内成瘤和转移的影响及机制。**方法:**应用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 和流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测 13 株恶性血液病细胞中 *B7-H3* 分子的表达水平, 筛选高表达的 U937、Maver 和 Z138 细胞。分别利用慢病毒转染技术靶向敲减 *B7-H3*, 建立稳定低表达细胞株, 应用 qPCR 和 FCM 验证基因沉默效果。将 U937、Maver 和 Z138 各自分为空白对照组 (non-infected control group, CON)、靶向 *B7-H3* 敲减组 (*B7-H3* knockdown group, KD) 和阴性无关序列对照组 (negative nontargeted control infected group, NC), 将以上 9 组分别构建裸鼠皮下移植瘤模型, 比较肿瘤生长和转移情况, 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色检测 Ki-67 表达, 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 水平。**结果:** 筛选 *B7-H3* 分子高表达的 U937、Maver 和 Z138 细胞进行靶向敲减 *B7-H3*, 成功建立稳定低表达细胞株。U937、Maver 和 Z138 细胞各自的 KD 组与 NC 组比较, 观察终点的平均肿瘤生长抑制率分别为 61.83% ( $F = 43.78, P < 0.05$ )、59.12% ( $F = 36.51, P < 0.05$ ) 和 67.37% ( $F = 40.29, P < 0.05$ ), 而各自 NC 组与 CON 组相比, 肿瘤体积增长趋势差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在所有移植瘤裸鼠模型中肝转移最常见, KD 组裸鼠的远处转移较相应 NC 组明显降低。3 种细胞各自 KD 组的 Ki-67 指数均较相应 NC 组显著下降 (U937 移植瘤:  $40.3\% \pm 5.2\%$  vs.  $79.1\% \pm 6.3\%$ ,  $q = 30.31, P < 0.05$ ; Maver 移植瘤:  $35.2\% \pm 6.4\%$  vs.  $69.6\% \pm 5.1\%$ ,  $q = 24.82, P < 0.05$ ; Z138 移植瘤:  $38.4\% \pm 7.1\%$  vs.  $75.7\% \pm 4.8\%$ ,  $q = 28.07, P < 0.05$ ), 而 NC 组与 CON 组 Ki-67 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。3 种细胞各自 KD 组肿瘤组织的 MMP-2 蛋白表达显著降低 (U937 移植瘤:  $q = 14.59, P < 0.05$ ; Maver 移植瘤:  $q = 9.25, P < 0.05$ ; Z138 移植瘤:  $q = 11.04, P < 0.05$ ), NC 组与 CON 组 MMP-2 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论:** 靶向 *B7-H3* 基因沉默能够抑制人恶性血液病细胞在裸鼠体内的成瘤和转移能力, 其机制可能与 Ki-67 和 MMP-2 的表达下调有关。

**[关键词]** 恶性血液病; *B7-H3*; 基因沉默; 裸鼠

**[中图分类号]** R552 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2017)02-0286-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2017.02.019

## *B7-H3* silencing inhibits human hematological malignancy xenograft tumor tumorigenesis and metastasis in nude mice

YAN Xin-xing, ZHANG Wei, WANG Jing, KE Xiao-yan<sup>△</sup>

(Department of Hematology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect and mechanism of targeted *B7-H3* gene silencing on the tumorigenesis and metastasis of human hematological malignancy xenograft tumor in nude mice. **Methods:** Real-time fluorogenic quantitative PCR (qPCR) and flow cytometry (FCM) were used to detect the expression of *B7-H3* in 13 strains of malignant hematologic cells. Then, U937, Maver and Z138 cells which expressed high level of *B7-H3* were screened out. Targeted *B7-H3* knockdown in U937, Maver and Z138 was performed by lentivirus transduction and the effect of *B7-H3* silencing in stable cell lines was tested by qPCR and FCM. Injecting the nine groups subcutaneously into the nude mice to establish xenograft models after dividing the U937, Maver and Z138 into non-infected control group (CON), *B7-H3* knockdown group (KD) and negative non-targeted control infected group (NC), respectively, for detecting the tumorigenicity and metastasis *in vivo*. Furthermore, the expression of Ki-67 in xenograft tumors was detected by immunohistochemistry (IHC). The expression of metalloproteinase 2 (MMP-2) was detected by western blot. **Results:** The stable *B7-H3* silencing cell lines of U937, Maver and Z138 were successfully established. Compared with the NC group, the KD groups of U937, Maver and Z138 had an obviously slower tumor growth. The average tumor inhibition rates at the end of observation period

were 61.83% ( $F=43.78$ ,  $P<0.05$ ), 59.12% ( $F=36.51$ ,  $P<0.05$ ) and 67.37% ( $F=40.29$ ,  $P<0.05$ ); there was no significant difference in tumor volume growth between the NC group and the CON group ( $P>0.05$ ). The liver distant metastasis of all the xenograft tumor models in nude mice was the most common and the rates of distant metastasis in KD groups were significantly lower than that of the corresponding NC groups. The Ki-67 indexes of the KD groups were significantly lower than those of the relative NC groups in three cell lines (U937:  $40.3\% \pm 5.2\%$  vs.  $79.1\% \pm 6.3\%$ ,  $q=30.31$ ,  $P<0.05$ ; Maver:  $35.2\% \pm 6.4\%$  vs.  $69.6\% \pm 5.1\%$ ,  $q=24.82$ ,  $P<0.05$ ; Z138:  $38.4\% \pm 7.1\%$  vs.  $75.7\% \pm 4.8\%$ ,  $q=28.07$ ,  $P<0.05$ ); there was no significant difference in the expression of Ki-67 between the NC group and the CON group ( $P>0.05$ ). The expressions of MMP-2 were also significantly lower in the KD groups than in the NC groups (U937:  $q=14.59$ ,  $P<0.05$ ; Maver:  $q=9.25$ ,  $P<0.05$ ; Z138:  $q=11.04$ ,  $P<0.05$ ); there was no significant difference in the expression of MMP-2 between the NC group and the CON group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Targeted *B7-H3* gene silencing could inhibit the tumorigenesis and metastasis of human hematological malignancy xenograft tumor in nude mice. The mechanism may be related to the down-regulation of Ki-67 and MMP-2.

**KEY WORDS** Hematological malignancies; *B7-H3*; Gene silencing; Nude mice

恶性血液病主要包括各类白血病、多发性骨髓瘤以及恶性淋巴瘤,其总发病率居于恶性肿瘤的前十位,并呈现城市高于农村、患者年轻化且逐年增长的趋势<sup>[1]</sup>。目前,恶性血液病的治疗包括化学药物治疗(简称化疗)、放射治疗(简称放疗)、造血干细胞移植和免疫治疗等,以化疗为主的综合疗法应用虽延长了部分患者的生存,但由于疾病进展快、原发耐药和缓解后复发情况多见,患者的长期生存仍不理想。近年来,肿瘤免疫疗法取得了重大进展,以程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)和程序性死亡受体-配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)单抗为代表的一批靶向 B7 家族分子的新药在黑色素瘤、肾癌、肺癌和淋巴瘤的治疗方面显示出卓越的疗效<sup>[2]</sup>,成为研究的热点。

机体的抗肿瘤免疫主要由 T 细胞介导,其中 B7 家族分子参与的第二信号(即协同刺激信号)起了关键作用。目前已发现了 B7 家族的 10 个分子<sup>[3]</sup>,而 B7-H3 作为 2001 年发现的新成员,具有免疫调节和非免疫调节的双重作用,既调节机体免疫细胞的正常功能,又影响肿瘤细胞自身的增殖、凋亡、侵袭、耐药等生物学特性<sup>[4-5]</sup>,越来越多的研究发现在包括恶性血液病在内的多种人类肿瘤组织中存在 B7-H3 的异常高表达,并提示与肿瘤转移和不良临床预后密切相关<sup>[6-7]</sup>,被认为是新的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。然而, B7-H3 分子参与恶性血液病的肿瘤形成和转移及相关机制尚未明确,相关体内研究甚少。

本研究通过检测 13 株恶性血液病细胞中 B7-H3 的表达,筛选出高表达的急性单核细胞白血病 U937 细胞和套细胞淋巴瘤 Maver、Z138 细胞;利用慢病毒转染技术进行靶向 *B7-H3* 敲减,将稳定低表达细胞株注入裸鼠皮下构建移植瘤模型,观察 3 种血液肿瘤细胞在裸鼠体内成瘤和转移能力的变化,

探讨 B7-H3 分子在恶性血液病肿瘤形成和转移中的作用及初步机制,为恶性血液病的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

洛斯维·帕克纪念研究所-1640 培养基(Roswell Park memorial institute-1640, RPMI-1640)、Iscove 氏改良的 Dulbecco 氏培养基(Iscove's modified Dulbecco medium, IMDM)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 HyClone 公司。含靶向 B7-H3 shRNA 质粒由本课题组前期实验构建并留存<sup>[8]</sup>。脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。RNA 提取剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司,引物均由美国 Invitrogen 公司负责合成, SuperReal 荧光定量预混试剂增强版购自北京天根生化科技有限公司。别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的 B7-H3 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司, APC 标记同型对照抗体购自美国 BD 公司。兔抗人 Ki-67 多克隆抗体、山羊抗兔二抗、免疫组织化学染色试剂盒二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂购自丹麦 Dako 公司。放射性免疫沉淀分析(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司,兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体和兔抗人基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)单克隆抗购自英国 Abcam 公司, IRDye 800CW 共轭山

羊抗兔二抗购自美国 LI-COR 公司。

## 1.2 细胞株及细胞培养

人 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 和 CA46、人套细胞淋巴瘤细胞株 Maver 和 Z138、人 T 淋巴母细胞白血病/淋巴瘤细胞株 Jurkat、Jurkat E6-1 和 Molt-4、人皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞株 Hut-78、人 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株 YTS、人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、人急性早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60、人急性单核细胞白血病细胞株 U937 均购于美国 ATCC 公司。人多发性骨髓瘤细胞株 CZ1 由上海长征医院惠赠。

Raji、Z138、Jurkat、Jurkat E6-1、Molt-4、K562、HL-60、U937 和 CZ1 细胞采用含 10% (体积分数) 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (同时含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), CA46、Hut-78 和 YTS 细胞采用含 20% (体积分数) 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (同时含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), Maver 细胞采用含 10% (体积分数) 胎牛血清的 IMDM 培养基 (同时含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 均在 37 °C、5% (体积分数) CO<sub>2</sub>、饱和湿度孵箱中培养, 每 3 天换液并传代, 取对数生长期细胞进行实验。

## 1.3 实验动物

雌性 5~6 周龄 BALB/c 裸鼠 54 只, 体重 16~18 g, 无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于北京大学医学部实验动物科学部 SPF 级动物房, 每日给予食物、自由饮水、12 h 光照。每 3 天更换垫料, 遵守无菌操作原则。本实验所有的实验动物关怀、实验设计及操作、实验动物的处理均通过了北京大学实验动物伦理委员会的批准。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测细胞株中 B7-H3 mRNA 表达

用 TRIzol 试剂分别提取 13 株恶性血液病细胞株总 RNA, 按照 Thermo 逆转录试剂盒说明书将其反转录为 cDNA。引物序列参考文献 [9] 设计, B7-H3: 上游 5'-CTCTGCCTTCTCACCTCTTTG-3', 下游 5'-CCTTGAGGGAGGAACTTTATC-3', 扩增片段长度为 134 bp;  $\beta$ -actin 引物序列: 上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 扩增片段长度为 205 bp。采用 20  $\mu$ L qPCR 反应体系, 循环条件为: 95 °C 15 min; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。每株细胞设置 4 个复

孔, 实验重复 3 次。应用 iQ5 软件分析数据, 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算 B7-H3 mRNA 的相对表达。

### 1.4.2 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测细胞株中 B7-H3 膜蛋白表达

分别收获 13 株恶性血液病的对数期细胞, 经 0.22  $\mu$ m 滤网过滤后用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度为 1  $\times$  10<sup>6</sup>/mL, 各取 100  $\mu$ L 单细胞悬液分别加入 5  $\mu$ L B7-H3 单克隆抗体和相应同型对照抗体, 室温避光孵育 30 min。鞘液洗涤 2 次后上机检测, 应用 CellQuest Pro 软件分析数据。相同条件下实验重复 3 次。

### 1.4.3 靶向 B7-H3 沉默建立稳定低表达细胞株及基因沉默效果检测

靶向人 B7-H3 (基因编号: 80381) 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列设计为: 5'-TCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAA-CAGAGC-3', 无关阴性序列设计为 5'-GCACTAC-CAGAGCTAACTCAGATAGTACT-3'<sup>[9]</sup>。用本实验室留存的滴度为 5  $\times$  10<sup>9</sup> TU/mL 的病毒液<sup>[8]</sup> 感染对数生长期高表达 B7-H3 分子的 U937、Maver 和 Z138 细胞, 48 h 后分别在含 250 mg/L (U937) 和 200 mg/L (Maver, Z138) 嘌呤霉素的培养基中用有限稀释法筛选出稳定转染株, 分别用 qPCR 和 FCM 检测 B7-H3 基因沉默的效果。按照是否转染及转染的病毒不同将 3 株细胞各分成 3 组: 未转染的肿瘤细胞对照组 (non-infected control group, CON), 转染阴性无关序列对照组 (negative nontargeted control infected group, NC), 转染靶向 B7-H3 shRNA 的基因敲减组 (B7-H3 knockdown group, KD), 共 9 组。

### 1.4.4 裸鼠成瘤及转移情况

将 54 只 BALB/c 裸鼠随机分为 9 组, 分别为 U937、Maver 和 Z138 细胞的 CON 组、NC 组和 KD 组, 每组 6 只。取对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 在无菌条件下用 1 mL 注射器分别在对应组裸鼠的右侧腋窝皮下注射 U937 (1  $\times$  10<sup>7</sup> 个细胞/只, 200  $\mu$ L)、Maver (2  $\times$  10<sup>7</sup> 个细胞/只, 200  $\mu$ L) 和 Z138 (2  $\times$  10<sup>7</sup> 个细胞/只, 200  $\mu$ L) 细胞, 建立裸鼠移植瘤模型。隔日观察肿瘤生长情况, 使用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径。计算肿瘤体积  $V(\text{mm}^3) = \text{长} \times \text{宽}^2 \times 0.5$ , 并绘制肿瘤生长曲线。在观察终点 (U937 接种后第 19 天, Maver 和 Z138 接种后第 20 天) 拍照后断颈法处死裸鼠, 低温条件下完整取出移植瘤并称重。计算肿瘤生长抑制率 = (1 - 处理组平均瘤重  $\div$  对照组平均瘤重)  $\times$  100%。解剖裸鼠, 观察肿瘤转移情况, 取出肿瘤转移部位并拍照记录。切取部分新鲜肿瘤及脏器组织置于 4% (质量分数) 多聚甲醛固定, 用于苏

木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色,另留部分肿瘤组织于液氮中保存,以备 Western blot 实验使用。

**1.4.5 HE 染色和 Ki-67 IHC 染色** 用 4% (质量分数) 多聚甲醛固定液氮保存组织 24 h 后,行常规脱水、石蜡包埋、切片,将制备的切片经脱蜡、水化后行 HE 染色。将肿瘤组织切片行 IHC 染色:脱蜡、水化后于 3% (质量分数)  $H_2O_2$  中室温避光孵育 25 min;用 1 mmol/L EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 行抗原热修复;以山羊抗体封闭 10 min 后滴加兔抗人 Ki-67 多克隆抗体 (1 : 500 体积比稀释),4 °C 孵育过夜,加入二抗室温孵育 50 min 后用 DBA 显色。随机选取 5 个高倍镜视野 (400 ×),计算阳性染色肿瘤细胞数占肿瘤细胞总数百分比的平均值,即 Ki-67 指数。

**1.4.6 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 MMP-2 表达** 用 RIPA 裂解液提取肿瘤组织总蛋白,BCA 法定量后取 35 μg 蛋白质上样,10% (体积分数) SDS-PAGE 电泳,转至聚偏二氟乙烯膜后,于 5% (质量分数) 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入兔

抗人 MMP-2 一抗 (1 : 500,74 000) 和兔抗人 GAPDH 一抗 (1 : 5 000,36 000),4 °C 孵育过夜;加入山羊抗兔 800CW 二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h,应用美国 LI-COR 公司 Odyssey 双色红外激光成像系统采集图像,ImageJ 软件分析条带灰度,计算目的条带与 GAPDH 灰度值之比。

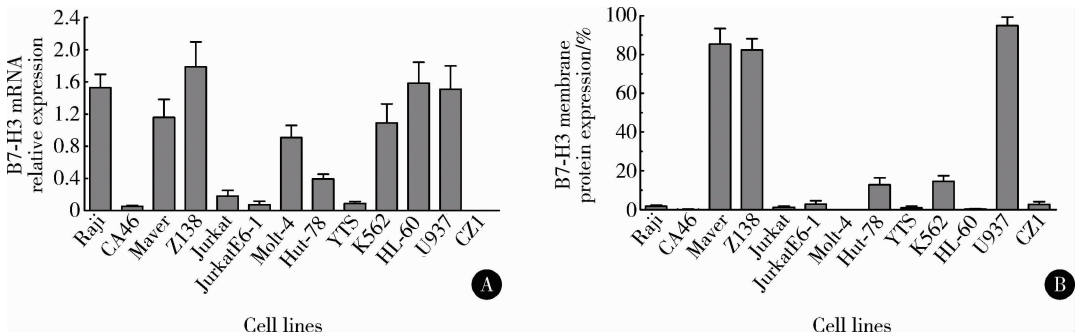
**1.5 统计学分析**

实验数据用均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 20.0 软件,3 组间总的比较采用方差分析,两组间相互比较采用 SNK 检验 (*q* 检验),分类变量采用卡方检验,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 13 株人恶性血液病细胞 B7-H3 表达情况**

分别应用 qPCR 和 FCM 检测 13 株恶性血液病细胞株中 B7-H3 mRNA 和膜蛋白的表达,可见 B7-H3 mRNA 在除 CZ1 外的 12 株人恶性血液病细胞中广泛表达,而蛋白质仅在人恶性血液病 U937、Maver 和 Z138 细胞表面高表达 (图 1)。选取 U937、Maver 和 Z138 用于后续基因敲减和体内实验。



A, the mRNA expression of B7-H3 was analyzed by quantitative polymerase chain reaction calculating with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method; B, the membrane protein expression of B7-H3 was determined by flow cytometry.

图 1 B7-H3 在 13 株恶性血液病细胞中的表达水平

Figure 1 Expression of B7-H3 in 13 human hematologic malignancy cell lines

**2.2 B7-H3 稳定低表达细胞株的建立**

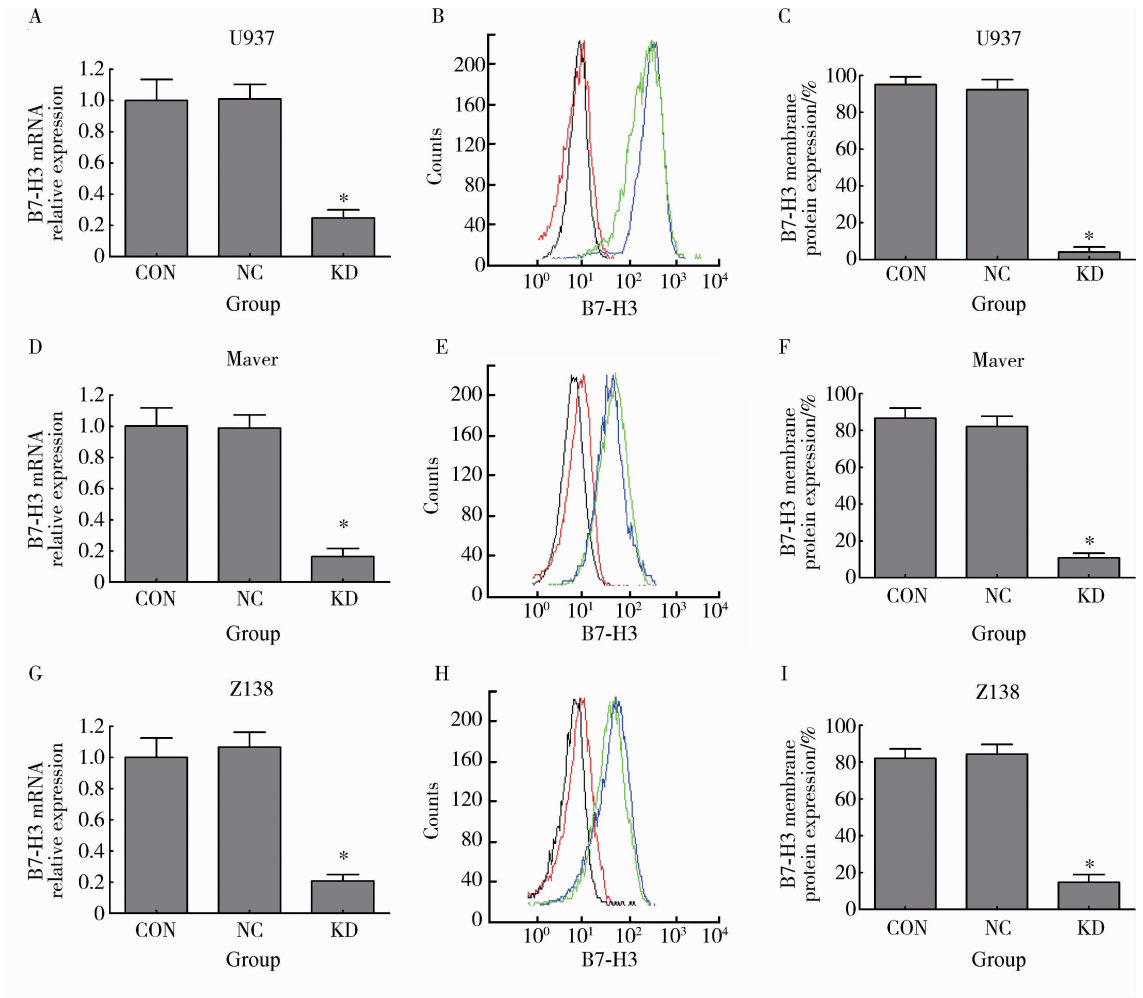
分别应用 qPCR 和 FCM 验证基因沉默效果 (图 2),qPCR 结果显示:U937、Maver 和 Z138 细胞的 KD 组与相应 NC 组比较 B7-H3 mRNA 的表达明显降低 (U937: *F* = 76.24, *P* < 0.05; Maver: *F* = 90.31, *P* < 0.05; Z138: *F* = 85.37, *P* < 0.05),而 NC 组与 CON 组相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

FCM 结果显示:3 种细胞的 KD 组与相应 NC 组相比,B7-H3 蛋白表达分别降低了 95.50% (U937: *F* = 134.66, *P* < 0.05),86.85% (Maver: *F* = 97.63, *P* < 0.05) 和 61.83% (Z138: *F* = 78.96, *P* < 0.05),

差异有统计学意义。而 NC 组与 CON 组相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

**2.3 裸鼠肿瘤生长和转移情况**

成瘤实验显示:U937、Maver 和 Z138 移植瘤 KD 组与相应 NC 组相比,肿瘤体积增长明显减慢 (*P* < 0.05),而 NC 组与 CON 组相比,肿瘤体积增长趋势差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。在各组移植瘤模型的观察终点:U937 组平均肿瘤生长抑制率为 61.83% (*F* = 43.78, *P* < 0.05),Maver 和 Z138 平均肿瘤生长抑制率分别为 59.12% (*F* = 36.51, *P* < 0.05) 和 67.37% (*F* = 40.29, *P* < 0.05,图 3)。



A, *B7-H3* knockdown of U937 cells at mRNA level was shown by quantitative polymerase chain reaction (qPCR); B, *B7-H3* membrane protein expression of U937 cells was determined by flow cytometry (FCM); C, FCM results of U937 express into a numerical value; D, *B7-H3* knockdown of Maver cells at mRNA level was shown by qPCR; E, *B7-H3* membrane protein expression of Maver was determined by FCM; F, FCM results of Maver express into a numerical value; G, *B7-H3* knockdown of Z138 cells at mRNA level was shown by qPCR; H, *B7-H3* membrane protein expression of Z138 was determined by FCM; I, FCM results of Z138 express into a numerical value. The green line represents the non-infected control group (CON), the blue line is the negative nontargeted control infected group (NC), the red line is the *B7-H3* knockdown group (KD), and the black line is the isotype control. \*  $P < 0.05$ , KD group *vs.* NC group.

图 2 *B7-H3* 在 U937、Maver、Z138 细胞中的沉默效果

Figure 2 Effect of *B7-H3* silencing in U937, Maver and Z138 cells

解剖证实,所有移植瘤模型中,除 KD 组外,均发现远处转移,其中以肝转移最为常见,U937 裸鼠模型的 NC 组和 CON 组的转移均为 2/6;Maver 和 Z138 组模型的 NC 组和 CON 组亦发现肝转移(表 1)。此外,U937 模型的 NC 组有 1 只脾转移,Maver 模型的 CON 组有 1 只眼眶转移,而脑、肺、肾等部位未见肿瘤转移灶(图 4)。

### 2.4 IHC 检测 Ki-67 表达

肿瘤组织 Ki-67 IHC 染色结果显示:KD 组肿瘤组织 Ki-67 的表达水平较各自的 NC 组均明显降低(图 5)。U937 移植瘤 3 组间 Ki-67 表达差异有统计学意义( $F = 78.49, P < 0.05$ ),KD 组 Ki-67 指数为  $40.3\% \pm 5.2\%$ (与 NC 组的  $79.1\% \pm 6.3\%$  相比,  $q = 30.31, P < 0.05$ );Maver 移植瘤 3 组间 Ki-67 表

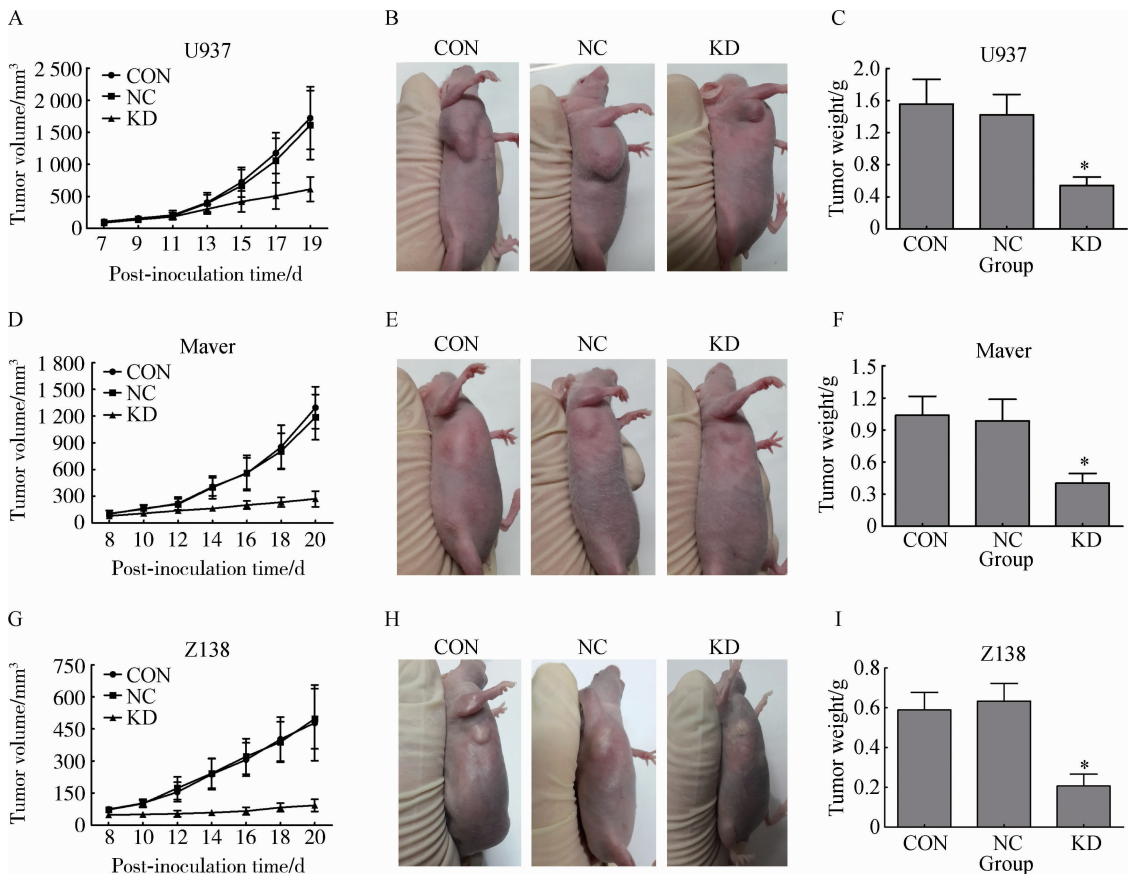
达差异有统计学意义( $F = 66.21, P < 0.05$ ),KD 组 Ki-67 指数为  $35.2\% \pm 6.4\%$ (与 NC 组的  $69.6\% \pm 5.1\%$  相比,  $q = 24.82, P < 0.05$ );Z138 移植瘤 3 组间 Ki-67 表达差异有统计学意义( $F = 70.37, P < 0.05$ ),KD 组 Ki-67 指为  $38.4\% \pm 7.1\%$ (与 NC 组的  $75.7\% \pm 4.8\%$  相比,  $q = 28.07, P < 0.05$ )。

表 1 裸鼠移植瘤的肝转移情况

Table 1 Liver metastasis of xenograft tumors in nude mice

Group	U937	Maver	Z138
Non-infected control group	2/6	1/6	1/6
Negative nontargeted control infected group	2/6	2/6	1/6
<i>B7-H3</i> knockdown group	0/6	0/6	0/6
$\chi^2$	2.57	2.19	1.36
$P$	0.47	0.73	1.00

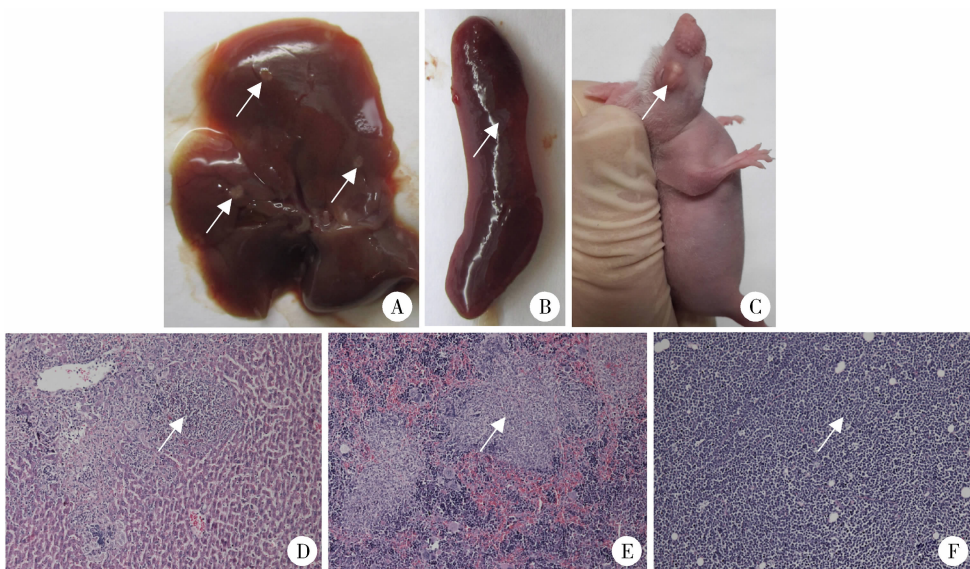




A, *B7-H3* knockdown inhibited the growth of U937 xenografts; B, U937 xenograft tumors on day 19; C, tumor weight of U937 xenografts; D, *B7-H3* knockdown inhibited the growth of Maver xenografts; E, Maver xenograft tumors on day 19; F, tumor weight of Maver xenografts; G, *B7-H3* knockdown inhibited the growth of Z138 xenografts; H, Z138 xenograft tumors on day 19; I, tumor weight of Z138 xenografts. CON, non-infected control group; NC, negative nontargeted control infected group; KD, *B7-H3* knockdown group. \*  $P < 0.05$ , KD group vs. NC group.

图3 沉默 *B7-H3* 抑制体内成瘤

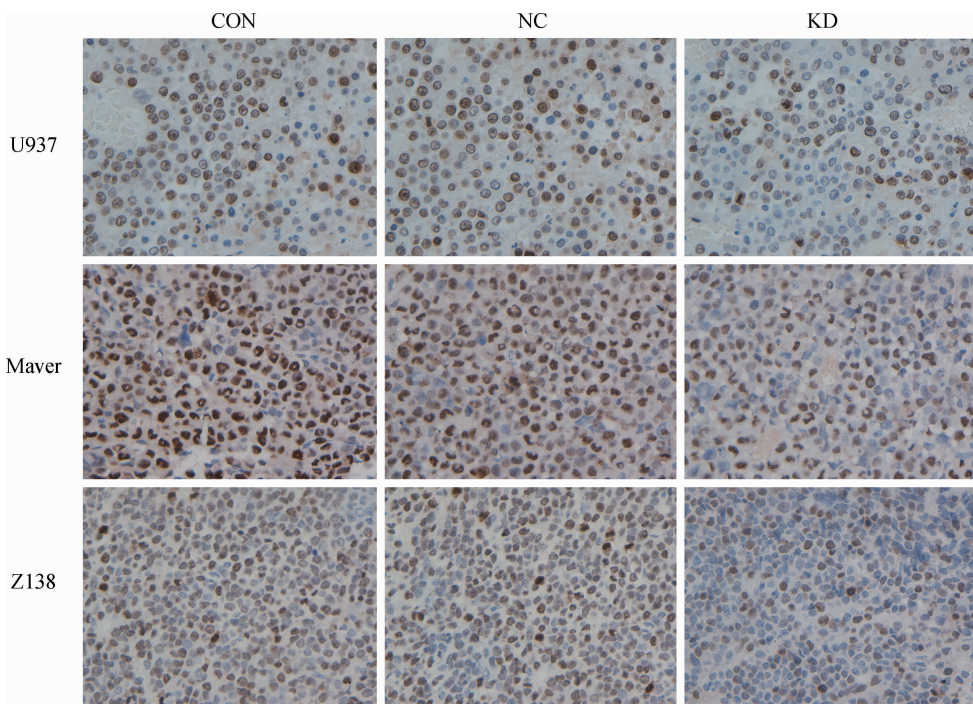
Figure 3 *B7-H3* silencing inhibits tumor proliferation in vivo



A, metastatic tumors in liver; B, metastatic tumors in spleen; C, metastatic tumors in orbital tissue; D, HE staining of tumor in liver ( $\times 100$ ); E, HE staining of tumor in spleen ( $\times 100$ ); F, HE staining of tumor in orbital tissue ( $\times 100$ ). Arrows indicate the tumor tissues.

图4 裸鼠移植瘤的转移情况

Figure 4 Metastasis of xenograft tumors in nude mice



CON, non-infected control group; NC, negative nontargeted control infected group; KD, *B7-H3* knockdown group.

图 5 U937、Maver 和 Z138 细胞移植瘤瘤块 Ki-67 免疫组织化学染色 (×400)

Figure 5 Immunohistochemical staining of Ki-67 in U937, Maver and Z138 xenograft tumors (×400)

### 2.5 Western blot 检测 MMP-2 蛋白表达

应用 Western blot 检测肿瘤组织 MMP-2 蛋白表达改变,结果显示:U937 移植瘤 3 组间 MMP-2 差异有统计学意义 ( $F = 55.86, P < 0.05$ ),KD 组与相应 NC 组比较 MMP-2 蛋白表达水平显著降低 ( $q = 14.59, P < 0.05$ ),而 NC 组与 CON 组 MMP-2 表达差异无统计学意义 ( $q = 1.13, P > 0.05$ )。Maver 移植瘤 3 组间 MMP-2 差异有统计学意义 ( $F = 31.71, P < 0.05$ ),KD 组与相应 NC 组比较 MMP-2 蛋白表达水平显著降低 ( $q = 9.25, P < 0.05$ ),而 NC 组与 CON 组 MMP-2 表达差异无统计学意义 ( $q = 0.21, P > 0.05$ )。Z138 移植瘤 3 组间 MMP-2 表达差异有统计学意义 ( $F = 47.27, P < 0.05$ ),KD 组与相应 NC 组比较 MMP-2 蛋白表达水平显著降低 ( $q = 11.04, P < 0.05$ ),而 NC 组与 CON 组 MMP-2 表达差异无统计学意义 ( $q = 0.31, P > 0.05$ ,图 6)。

### 3 讨论

B7-H3 分子是一种 I 型跨膜蛋白,表达在活化的淋巴细胞,树突状细胞,肝、肺和前列腺等组织以及包括恶性血液病在内的多种肿瘤组织中<sup>[10]</sup>。Hu 等<sup>[11]</sup>用 FCM 检测 33 例急性淋巴细胞白血病患者肿瘤细胞,B7-H3 的阳性率为 48.5%。近期研究发现 B7-H3 与多种肿瘤的临床预后密切相关<sup>[12-15]</sup>。靶向 B7-H3 分子的多种单克隆抗体 8H9、MJ18 和

MGA271 等在临床试验中显示了良好的安全和有效性<sup>[16-18]</sup>。近年来,B7-H3 分子在肿瘤发生发展中的作用及机制探讨已经成为临床研究的热点<sup>[19]</sup>。

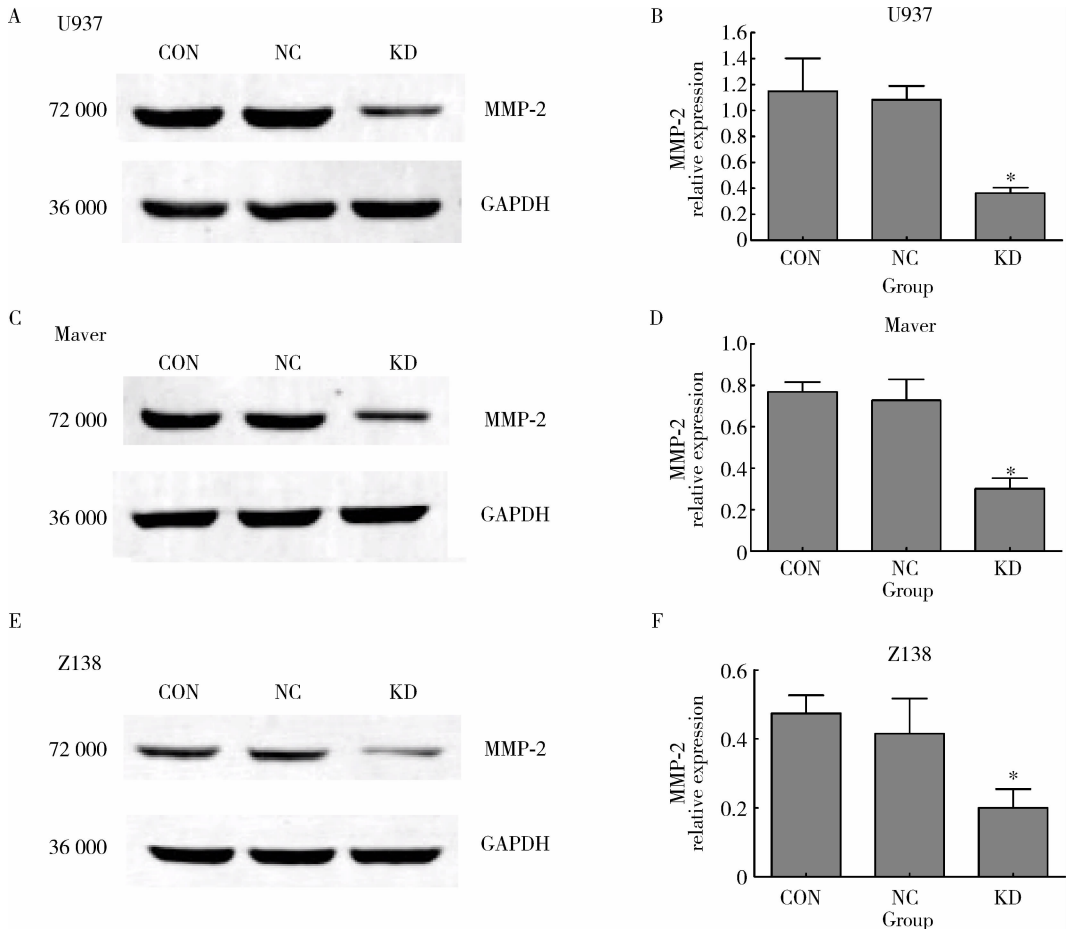
本实验检测了 13 株人恶性血液病细胞中 B7-H3 分子的表达,发现 B7-H3 mRNA 与其膜蛋白在不同细胞表达水平不平行,这可能与 MicroRNA-29 和 MicroRNA-187 等参与的转录后调控机制有关<sup>[20-21]</sup>,提示通过基因沉默抑制 *B7-H3* 表达可能是治疗恶性血液病的潜在方法。我们选取 B7-H3 高表达株,设计并合成了特异性沉默 B7-H3 基因的 shRNA,转入肿瘤细胞,通过 shRNA 对同源 mRNA 的降解,实现了靶向 *B7-H3* 基因沉默,并成功构建了稳定低表达细胞株。

既往的 B7-H3 对恶性血液病的研究多集中在体外细胞水平,而鲜有对体内研究的报道。本实验以 BALB/c 裸鼠为研究对象,成功建立恶性血液病移植瘤裸鼠模型以研究 *B7-H3* 靶向沉默对恶性血液病细胞体内成瘤和转移能力的改变,结果显示,*B7-H3* 基因沉默后移植瘤生长明显减慢,提示 *B7-H3* 基因能够促进血液肿瘤的体内成瘤能力。Liu 等<sup>[22]</sup>用人乳腺癌细胞 *B7-H3* 基因敲减株和对照株分别构建移植瘤裸鼠模型,发现 *B7-H3* 基因敲减组肿瘤生长速率明显降低,结果与本实验相近。Tekle 等<sup>[5]</sup>和 Zhao 等<sup>[9]</sup>分别将黑色素瘤和胰腺癌细胞的 B7-H3 基因敲减,细胞的增殖能力明显减弱,且



荷瘤裸鼠的生存时间显著延长,这些研究均提示 *B7-H3* 分子可能在体内发挥促瘤作用。*Ki-67* 抗原是一种与细胞增殖相关的核蛋白,其表达水平反映了细胞的增殖活性,与恶性肿瘤的发展和预

后高度相关<sup>[23]</sup>。本实验发现敲减 *B7-H3* 基因后 *Ki-67* 表达水平明显降低,提示 *B7-H3* 分子可能通过增强 *Ki-67* 的表达,进而促进恶性血液病肿瘤细胞增殖。



A, B, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) protein expression in U937 xenograft tumors; C, D, MMP-2 protein expression in Maver xenograft tumors; E, F, MMP-2 protein expression in Z138 xenograft tumors. Non-infected control group (CON), negative nontargeted control infected group (NC), *B7-H3* knockdown group (KD). \*  $P < 0.05$ , KD group vs. NC group.

图6 蛋白免疫印迹法检测移植瘤 MMP-2 表达水平

Figure 6 MMP-2 protein expression of xenograft tumors determined by Western blot

急性单核细胞白血病和套细胞淋巴瘤在临床上具有高度侵袭性,成为疾病预后较差的重要原因。近期研究发现,在黑色素瘤、骨肉瘤和非小细胞肺癌等多种实体瘤中,*B7-H3* 分子的高表达能促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[24-26]</sup>。本课题组前期通过体外微孔滤膜培养小室及双室联合培养系统(Transwell 试验)发现,靶向 *B7-H3* 基因沉默后 Maver 和 Z138 细胞穿过基质胶的侵袭能力明显受到抑制,提示 *B7-H3* 分子参与了套细胞淋巴瘤肿瘤细胞体外侵袭<sup>[8]</sup>。我们发现 *B7-H3* 基因敲减后肿瘤的转移能力有降低趋势,但统计检验尚不能认为组间存在转移差异,造成统计结果与实际观察情况不一致的原因可能是样本量不足造成的,拟后续开展大样本量

动物实验完善研究。Dai 等<sup>[27]</sup>发现敲减胃腺癌细胞 *B7-H3* 基因可以显著抑制肿瘤在裸鼠体内的肝和腹腔转移,结果与本实验相近。MMPs 是一类  $Zn^{2+}$  依赖的胞外蛋白水解酶,被认为是评价肿瘤侵袭力的重要指标<sup>[28]</sup>。MMP-2 是 MMPs 家族的一员,可降解 IV 型胶原蛋白,与肿瘤的转移密切相关。本课题组前期体外实验发现 *B7-H3* 基因沉默后的 Maver 和 Z138 细胞 MMP-2 mRNA 表达水平显著降低<sup>[8]</sup>。在此基础上,本实验敲减组肿瘤组织中 MMP-2 的蛋白表达明显降低,提示 *B7-H3* 可能通过促进基质金属蛋白酶 MMP-2 表达增强了恶性血液病肿瘤细胞的体内侵袭能力。

综上所述,本实验选取 *B7-H3* 表达水平较高的



U937、Maver 和 Z138 细胞,建立稳定低表达 B7-H3 的细胞株。通过分别构建裸鼠皮下移植瘤模型,证明了靶向 B7-H3 基因沉默能够通过下调 Ki-67、MMP-2 的表达水平从而抑制恶性血液病细胞的体内成瘤和转移能力,为 B7-H3 分子在恶性血液病的靶向治疗提供了新的证据。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 郑荣寿,张思维,吴良友,等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 1(21): 1-12.
- [ 2 ] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer[J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2455-2465.
- [ 3 ] Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy[J]. Blood, 2013, 121(5): 734-744.
- [ 4 ] Sun M, Richards S, Prasad D V, et al. Characterization of mouse and human B7-H3 genes [J]. J Immunol, 2002, 168(12): 6294-6297.
- [ 5 ] Tekle C, Nygren MK, Chen YW, et al. B7-H3 contributes to the metastatic capacity of melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes[J]. Int J Cancer, 2012, 130(10): 2282-2290.
- [ 6 ] Chen C, Shen Y, Qu QX, et al. Induced expression of B7-H3 on the lung cancer cells and macrophages suppresses T-cell mediating anti-tumor immune response[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(1): 96-102.
- [ 7 ] Wilcox RA, Ansell SM, Lim MS, et al. The B7 homologues and their receptors in hematologic malignancies [J]. Eur J Haematol, 2012, 88(6): 465-475.
- [ 8 ] Zhang W, Wang Y, Wang J, et al. B7-H3 silencing inhibits tumor progression of mantle cell lymphoma and enhances chemosensitivity[J]. Int J Oncol, 2015, 46(6): 2562-2572.
- [ 9 ] Zhao X, Zhang GB, Gan WJ, et al. Silencing of B7-H3 increases gemcitabine sensitivity by promoting apoptosis in pancreatic carcinoma[J]. Oncol Lett, 2013, 5(3): 805-812.
- [ 10 ] Zhou YH, Chen YJ, Ma ZY, et al. 4IgB7-H3 is the major isoform expressed on immunocytes as well as malignant cells[J]. Tissue Antigens, 2007, 70(2): 96-104.
- [ 11 ] Hu Y, Lv X, Wu Y, et al. Expression of costimulatory molecule B7-H3 and its prognostic implications in human acute leukemia [J]. Hematology, 2015, 20(4): 187-195.
- [ 12 ] Ingebrigtsen VA, Boye K, Tekle C, et al. B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 131(11): 2528-2536.
- [ 13 ] Lu P, Liu R, Ma EM, et al. Functional analysis of B7-H3 in colonic carcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3899-3903.
- [ 14 ] Sun TW, Gao Q, Qiu SJ, et al. B7-H3 is expressed in human hepatocellular carcinoma and is associated with tumor aggressiveness and postoperative recurrence[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(11): 2171-2182.
- [ 15 ] Wu CP, Jiang JT, Tan M, et al. Relationship between costimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3): 457-459.
- [ 16 ] Zhou Z, Luther N, Ibrahim GM, et al. B7-H3, a potential therapeutic target, is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma[J]. J Neurooncol, 2013, 111(3): 257-264.
- [ 17 ] Loo D, Alderson RF, Chen FZ, et al. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(14): 3834-3845.
- [ 18 ] Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10277-10278.
- [ 19 ] Maj T, Wei S, Welling T, et al. T cells and costimulation in cancer[J]. Cancer J, 2013, 19(6): 473-482.
- [ 20 ] Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors [J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6275-6281.
- [ 21 ] Zhao J, Lei T, Xu C, et al. MicroRNA-187, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, inhibits cell growth and migration through targeting B7-H3 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438(2): 439-444.
- [ 22 ] Liu H, Tekle C, Chen YW, et al. B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(6): 960-971.
- [ 23 ] Ma YL, Peng JY, Zhang P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2010, 27(2): 304-309.
- [ 24 ] Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era[J]. Blood, 2011, 117(1): 26-38.
- [ 25 ] Wang J, Chong KK, Nakamura Y, et al. B7-H3 associated with tumor progression and epigenetic regulatory activity in cutaneous melanoma[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(8): 2050-2058.
- [ 26 ] Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2006, 53(2): 143-151.
- [ 27 ] Dai W, Shen G, Qiu J, et al. Aberrant expression of B7-H3 in gastric adenocarcinoma promotes cancer cell metastasis[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2086-2092.
- [ 28 ] Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, et al. Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas [J]. Int J Cancer, 1996, 69(1): 9-16.

(2015-07-04 收稿)

( 本 文 编 辑 : 刘 淑 萍 )