

· 论 著 ·

# FHL2 在胃癌上皮细胞间质转化中的表达

孔凤娟<sup>1</sup>, 师雷锋<sup>1,2</sup>

1. 新乡医学院, 河南 新乡 453000; 2. 中国人民解放军第 150 医院肿瘤科, 河南 洛阳 471000

**摘要:** **目的** 通过 SGC-823 胃癌细胞上皮细胞间质转化(EMT)模型,研究四个半结构域蛋白 2(FHL2)的改变和相关分子生物学特性的改变。**方法** (1)体外培养人胃癌细胞株 SCCT-823 细胞(对照组),采用奥沙利铂持续刺激法诱导 SGC-823 细胞成为耐奥沙利铂胃癌细胞,制作 EMT 模型(实验组);(2)采用倒置相差显微镜观察实验组和对照组形态学差异;(3)采用 Transwell 侵袭实验检测两组细胞侵袭能力;(4)采用 Western blot 实验检测两组细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白和 FHL2 蛋白表达。**结果** (1)与对照组相比,实验组表型由上皮样细胞向间质样细胞表型转变;(2)对照组穿过膜的细胞数为  $65.7 \pm 11.65$ ,实验组穿过膜的细胞数为  $123.4 \pm 28.13$ ,实验组细胞的侵袭能力增强,差异具有统计学意义( $t = 12.434, P < 0.01$ );(3)与对照组相比,实验组胃癌细胞 E-钙黏蛋白表达水平下调( $1.47 \pm 0.13$  vs  $0.76 \pm 0.1$ ),波形蛋白( $0.65 \pm 0.21$  vs  $1.01 \pm 0.25$ )和 FHL2 蛋白( $0.34 \pm 0.09$  vs  $0.71 \pm 0.11$ )表达水平上调( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 经奥沙利铂刺激后,SGC-823 胃癌细胞发生 EMT,细胞表型由上皮样细胞向间质细胞表型变化,且将具有更强的侵袭能力,E-钙黏蛋白表达水平下调,波形蛋白和 FHL2 蛋白表达水平上调。

**关键词:** 胃癌; 奥沙利铂; 上皮间质转化; 波形蛋白; E-钙黏附分子; 四个半 LIM 结构域蛋白 2

**中图分类号:** R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)03-0365-04

## Expression of FHL2 in epithelial- mesenchymal transition of gastric carcinoma cells in vitro

KONG Feng-juan\*, SHI Lei-feng

\* Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453000, China

Corresponding author: SHI Lei-feng, E-mail: m15237303235\_9@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the changes of four and a half LIM domains protein 2 (FHL2) level and the changes of related molecular biologic characteristics in epithelial-mesenchymal transition (EMT) by establishing EMT model of SGC-823 gastric carcinoma cells. **Methods** The human SGC-823 gastric carcinoma cells were cultured in vitro (control group) and were induced into the cells of resistance to oxaliplatin (L-OHP) by L-OHP constant stimulation method to establish EMT model (experiment group). The inverted phase contrast microscope was used to observe the cellular morphology. Transwell invasion experiment was used to detect cell invasion ability. Western blot experiment was used to detect the expressions of E-cadherin, vimentin and FHL2. **Results** Compared with control group, the cell phenotype in experimental group was converted to phenotype of interstitial like cells; the number of cells passing through the membrane was higher ( $65.7 \pm 11.65$  vs  $123.4 \pm 28.13, t = 12.434, P < 0.01$ ); E-cadherin expression level was down-regulated ( $1.47 \pm 0.13$  vs  $0.76 \pm 0.1$ ); vimentin ( $0.65 \pm 0.21$  vs  $1.01 \pm 0.25$ ) and FHL2 ( $0.34 \pm 0.09$  vs  $0.71 \pm 0.11$ ) expression levels were up-regulated in experiment group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** After stimulation of L-OHP, EMT occurs in SGC-823 gastric carcinoma cells, namely, the phenotype of SGC-823 cells is changed from epithelial like cells to interstitial cells which will has stronger invasion ability, at the same time, down-regulation of E-cadherin expression and up-regulation of vimentin and FHL2 expressions are accompanied.

**Key words:** Gastric cancer; Oxaliplatin; Epithelial-mesenchymal transition; Vimentin; E-cadherin; Four and a half LIM domains protein 2

目前,胃癌是临床上最为常见的消化系统恶性肿瘤之一。尽管随着医学技术的不断发展,胃癌的发病

率呈现一个下降的趋势,但其发病率和病死率仍然排在恶性肿瘤的前列<sup>[1]</sup>,临床上常选择手术 + 化疗 +

放疗等综合方案对胃癌进行治疗,在很大程度上可以缓解患者的病情,并且化疗在其中扮演着至关重要的角色<sup>[2-3]</sup>。但随着化疗后患者出现多药耐药(multi-drug resistance, MDR)的现象,胃癌患者的预后及 5 年生存率均不太理想<sup>[4]</sup>。已有研究表明,上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)与恶性肿瘤的转移侵袭、发生 MDR 以及复发存在着密切的关系。目前认为 FHL2 是仅有四个半 LIM 结构域蛋白(four and a half LIM domains protein 2, FHL2)家族成员,能够作为癌蛋白及抑癌蛋白通过不同机制广泛影响乳腺癌、胃肠道肿瘤、肝癌、前列腺癌等肿瘤的发生发展,并且在不同肿瘤中的表达具有组织特异性<sup>[5]</sup>。基于上述研究基础,本课题组探究胃癌 EMT 过程中 FHL2 蛋白的变化,为进一步研究其中所涉及的机制提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 试剂:(1)奥沙利铂(L-OHP)购于江苏恒瑞制药厂;(2)RPMI1640 培养基、胰酶、PBS 溶液购于美国 Hyclone 公司;(3)胎牛血清购于杭州四季清公司;(4)人胃癌 SGC-823 细胞株购于南京凯基生物科技发展有限公司;(5)波形蛋白抗体、E-钙黏附分子和 FHL2 抗体一抗购于 Abcam 公司;(6)山羊抗兔 IgG 二抗购于 Biosharp 公司;(7)Matrigel 胶、Transwell 小室、培养瓶、离心管购于美国 CORNING 公司。仪器:(1)倒置显微镜:日本奥林巴斯株式会社;(2)Milli-Q Biocel 超纯水仪:美国 Millipore 公司;(3)凝胶成像系统、电泳电源装置(EPS-300)和垂直电泳槽(VE-180):上海天能科技有限公司;(4)移液器枪头:美国科进(Kirgen)集团。

## 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及诱导 体外培养人胃癌 SGC-823 细胞(对照组),采用奥沙利铂持续刺激法诱导其成为耐奥沙利铂细胞(实验组)。根据提前检测 SGC-823 细胞对奥沙利铂的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>),设定奥沙利铂浓度为 10 μg/ml。具体为向细胞培养瓶加入含奥沙利铂的 PBS,计算并调整使培养瓶中奥沙利铂终浓度为 10 μg/ml。每隔 48 h 进行一次换液操作,每次加入 5 ml 含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗的 1640 培养液。待细胞能够在含奥沙利铂的培养基中恢复正常对数生长能力时,即获得所需要的细胞模型。

1.2.2 形态学观察 弃去培养瓶的培养液,并向其加入 1~2 ml PBS 溶液,充分洗涤细胞 2 次,但动作一定要轻柔,以避免贴壁的细胞脱落。洗涤结束后,

用移液器小心吸除残留的 PBS 溶液,并加入 5 ml 10% 含胎牛血清的培养液。用倒置相差显微镜观察对照组和实验组,先从 100 倍镜下观察且选取较为典型的两种细胞,随后继续用高倍镜观察并拍照。

1.2.3 Transwell 实验 提前将分装好的小管 Matrigel 基质胶在 4 °C 冰箱中过夜冷藏 24 h;在冰浴条件下将 1640 培养基和 Matrigel 基质胶(按 1:8 的比例)混合;Transwell 小室的上室中加入混合溶液 60 μl,确保每个小孔底部均匀的铺上混合液且无气泡,置于 37 °C 下 2 h;取处于对数生长期的对照组和实验组细胞,加入 2 ml 0.25% 含 EDTA 胰酶细胞消化液进行消化后用 2 ml 的 10% 含胎牛血清培养基中和胰酶,在 4 °C,1 000 rpm 条件下离心 5 min,去上清液,加入无血清的 1640 培养液,用细胞直接计数法计算细胞悬液中的细胞浓度,并用无血清培养基将上述细胞悬液浓度调整为 2.5 × 10<sup>5</sup> 个/ml;向每个准备好的上室中加入细胞悬液 200 μl,并向下室中加入 10% 含胎牛血清的培养液 500 μl,然后一起置于 37 °C、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中连续培养 24 h;待培养结束后,小心吸除上下小室中的液体(保证移液枪头未碰到上室底部),并用棉签小心拭去上室中未穿过膜的细胞;向下室中加入 500 μl 提前配置的多聚甲醛,室温,15 min,进行固定;去除多聚甲醛,晾干小室后,下室中加入提前配置的 0.1% 结晶紫染色液 500 μl,室温,20 min,染色。随后快速用 PBS 洗涤,切勿将细胞洗去;待风干后,用倒置相差显微镜从低倍镜开始观察各组细胞,调整到高倍镜下时每个小室随机选取 5 个视野进行计数并记录。

1.2.4 Western bolt 实验 根据波形蛋白、E-钙黏附分子和 FHL2 的分子量选择不同浓度的分离胶和浓缩胶;向泳道中加入样品,并保证每个泳道上样量为 40 μg,但总体积不超过 15 μl,在恒压 90 V 条件下进行电泳,待溴酚蓝跑至浓缩胶和分离胶分界线时,调整电压为 120 V 继续电泳,待溴酚蓝跑至接近分离胶底部时电泳结束;随后进行转膜;转膜结束后将聚二氟乙烯(PVDF)膜用即用型丽春红染色 1 min,观察是否有蛋白条带,随后用蒸馏水摇床清洗三遍,最终放置于封闭液中,在摇床上室温封闭 2 h;将膜放入配制好的一抗溶液中,4 °C 过夜;用 Tris 缓冲液(TBS)-Tween(TBST)低速摇床洗膜 2 次,5 min/次,用 TBS 洗膜 1 次,5 min/次;将膜放入配制好的二抗溶液中,37 °C,2 h,蛋白面朝上;用 TBST 低速摇床洗膜 2 次,5 min/次,用 TBS 洗膜 1 次,5 min/次,蛋白面朝上;将提前配制的 TCL 底物显色剂均匀滴于 PVDF 膜的蛋白面,避光放置 1 min 后,置于凝胶成像系统中进

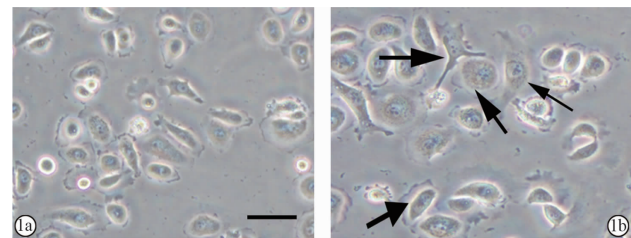
行曝光,获取蛋白条带,并用配置软件进行灰度值检测,记录实验结果。所有实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 统计学软件进行统计学分析。用  $\bar{x} \pm s$  表示符合正态分布的计量资料,采用两组间对比的独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

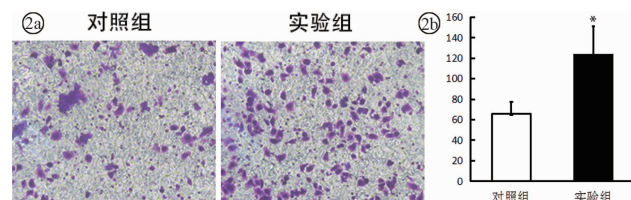
2.1 两组胃癌细胞形态学 实验组细胞表型由上皮样细胞表型向间质样细胞表型发生转变,具体表现为细胞大小不一,有明显的伪足出现;对照组细胞表型以上皮样细胞表型为主,主要表现为类圆形,细胞间缝隙较小,大小形状较为规则。见图 1。

2.2 两组胃癌细胞侵袭能力检测 Transwell 侵袭实验结果显示,对照组穿过膜的细胞数为  $65.70 \pm 11.65$ ,实验组穿过膜的细胞数为  $123.40 \pm 28.13$ ,实验组细胞的侵袭能力更强,差异具有统计学意义( $t = 12.434, P < 0.01$ )。见图 2。



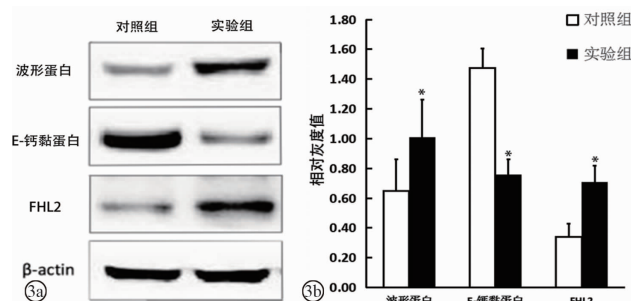
注:1a:对照组细胞;1b:实验组细胞,箭头所示为典型的发生间质样表型改变的胃癌细胞;比例尺 20  $\mu\text{m}$ 。

图 1 两组倒置相差显微镜下胃癌细胞形态学 ( $\times 200$ )



注:2a:镜下观察对照组结晶紫染色的穿过小室的细胞 ( $\times 200$ ); 2b:镜下观察实验组结晶紫染色的穿过小室的细胞 ( $\times 200$ ); 2c:为两组胃癌细胞穿过小室细胞数的统计图,与对照组比较,  $* P < 0.01$ 。

图 2 两组胃癌细胞 Transwell 侵袭实验结果



注:3a:三种蛋白免疫印迹结果;3b:三种蛋白与内参灰度比值值的统计图,与对照组比较,  $* P < 0.05$ 。

图 3 波形蛋白、E-钙黏蛋白和 FHL2 在两组胃癌细胞中的表达

表 2 两组胃癌细胞中波形蛋白、E-钙黏蛋白和 FHL2 蛋白的相对灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

检测蛋白	对照组	实验组	$t$ 值	$P$ 值
波形蛋白	$0.65 \pm 0.21$	$1.01 \pm 0.25$	6.23	$< 0.05$
E-钙黏蛋白	$1.47 \pm 0.13$	$0.76 \pm 0.10$	7.82	$< 0.05$
FHL2 蛋白	$0.34 \pm 0.09$	$0.71 \pm 0.11$	5.43	$< 0.05$

2.3 波形蛋白、E-钙黏蛋白和 FHL2 蛋白在两组胃癌细胞中的表达 Western bolt 结果显示,与对照组比较,实验组波形蛋白和 FHL2 蛋白表达明显上调( $P$  均  $< 0.05$ ),而 E-钙黏蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ ),差异具有统计学意义。见表 2 和图 3。

## 3 讨论

EMT 最早是由 Greenburg 等<sup>[6]</sup>在 1982 年于晶状体细胞中发现的,并提出 EMT 过程是在特定的内环境改变或者病理因素的作用下,上皮细胞表型发生改变,向更具运动能力的间质细胞转化的过程。还有学者通过实验发现 EMT 的过程是可逆的,这是因为上皮细胞在一定的环境刺激作用后发生暂时的细胞转化,且在多种生物学行为中存在,如胚胎发育、组织修复以及肿瘤的发生发展<sup>[6]</sup>。正常上皮细胞稳定性的维持是依靠细胞之间通过粘附连接、细胞间桥等特殊作用,并在基底膜上进行单层或多层有序排列而形成细胞极性。当细胞所处的内环境发生改变或在病理因素的作用下,发生 EMT 的细胞往往会有共同的表现:(1)细胞间桥断裂,连接蛋白表达下调或者被重新分布而导致细胞稳定性和细胞极性的改变<sup>[6]</sup>; (2)细胞的表型由上皮样向间质样表型转变,具体表现为细胞多型性,伪足增多,细胞骨架以波形蛋白为主,细胞的收缩能力及肌动蛋白纤维也相应增加<sup>[7]</sup>; (3)细胞将获得更强的转移侵袭能力以及抗凋亡能力<sup>[8]</sup>。已有大量的研究证实胃癌细胞产生耐药能力和细胞发生 EMT 过程有着紧密的联系。胃癌细胞在获得耐药性的同时往往会产生 EMT 的趋势,以获得更强的转移侵袭能力以及产生间质样细胞的表型来对抗化疗药物的药理作用<sup>[9]</sup>。本研究采用奥沙利铂持续刺激法诱导人胃癌 SGC-823 细胞,使其成为耐药细胞,并通过形态学和蛋白标志物检测证明在该过程中存在 EMT,即细胞表型由上皮样表型向间质表型变化,上皮标志蛋白(E-钙黏蛋白)下调和间质标志蛋白(波形蛋白)上调。

FHL2 是重要的衔接蛋白和支架蛋白,通过与不同蛋白分子结合实现生物学功能。FHL2 在肿瘤中存在异常表达,在不同肿瘤中既可以作为癌蛋白促进

肿瘤发生发展,也可以作为抑癌蛋白抑制肿瘤的生长<sup>[5,10]</sup>。本实验发现,在胃癌细胞发生 EMT 的过程中 FHL2 表达也会发生改变,具体表现为明显表达上调。

综上所述,目前针对 FHL2 的靶向治疗仍处于起步状态,也仅限于体外实验,但已有的数据显示利用 SiRNA 或质粒靶向针对 FHL2,下调或上调肿瘤细胞内 FHL2 的表达能抑制细胞的增殖,降低细胞存活率<sup>[11-12]</sup>。在胃癌细胞发生 EMT 的过程中,通过干预 FHL2 的表达可能会为逆转该过程提供新的思路。所以本课题组接下来将进一步研究其中所涉及的相关信号通路或传导因子,为可能的新的靶向治疗靶点提供证据。

### 参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.

[2] 胡祥. 日本《胃癌治疗指南》(第 3 版)解读[J]. 中国实用外科杂志, 2010, 30(1): 25-30.

[3] 王舒宝. 进展期(Ⅱ、Ⅲa)胃癌的治疗[J]. 中国实用外科杂志, 2001, 21(7): 385.

[4] 张伟, 吴瑾. 肿瘤多药耐药机制的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2015, 29(4): 364-367.

[5] 蔡婷, 何伟春, 骆静, 等. FHL2 蛋白在肿瘤中的转录调控及其分

子生物学机制[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(10): 1958-1961.

[6] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. J Cell Biol, 1982, 95(1): 333-339.

[7] Medici D, Muñoz-Cánoves P, Yang PC, et al. Mesenchymal transitions in development and disease [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 5107517.

[8] Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 19): 4417-4422.

[9] Brinkmann BF, Tuncay H, Ebnet K. Homotypic cell-cell interactions and apical-basal polarity in epithelial cells and endothelial cells [M]//Ebnet KT, eds. Cell polarity 1: Biological role and basic mechanisms, Heidelberg: Springer International Publishing AG, 2015: 277-302.

[10] 卢文婷, 王敏. FHL2 基因及其相关疾病的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(4): 645-649.

[11] Zienert E, Eke I, Aust D, et al. LIM-only protein FHL2 critically determines survival and radioresistance of pancreatic cancer cells [J]. Cancer Lett, 2015, 364(1): 17-24.

[12] Xu J, Zhou J, Li MS, et al. Transcriptional regulation of the tumor suppressor FHL2 by p53 in human kidney and liver cells [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e99359.

收稿日期: 2017-10-12 编辑: 王国品

(上接第 364 页)

[8] Choi Y, Lim DH. Prognostic significance of Ki-67 labeling index in WHO Grade II meningioma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2015, 93(3): E115.

[9] Telugu RB, Chowhan AK, Rukmangadha N, et al. Histopathological and immunohistochemical evaluation of meningiomas with reference to proliferative markers p53 and Ki-67 [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(1): EC15-9.

[10] 沈金花, 董光, 方龙江, 等. 脑膜瘤中 ADC 值、rADC 值与 Ki-67 增殖指数的相关性分析 [J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(1): 11-14.

[11] Swiderska-Chadaj Z, Markiewicz T, Grala B, et al. Content-based analysis of Ki-67 stained meningioma specimens for automatic hotspot selection [J]. Diagn Pathol, 2016, 11(1): 93.

[12] 陈倩倩, 杜君, 林瑞, 等. Ki-67 在 T<sub>1</sub> 期非肌层浸润性膀胱癌中的表达及意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(7): 316-320.

[13] 蒋依娜, 王鸿雁, 杨喆. 孤立性纤维性肿瘤/脑膜血管周细胞瘤 14 例临床病理观察 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(6): 672-674.

[14] Fakhrou A, Meshkini A, Shadravan S. Status of Ki-67, estrogen and progesterone receptors in various subtypes of intracranial meningiomas [J]. Pak J Biol Sci, 2012, 15(11): 530-535.

[15] 蒋春秀, 朱建彬, 邹天宇, 等. 颅内孤立性纤维瘤/血管外皮瘤与脑膜瘤的临床和 MRI 对比分析 [J]. 中国医学影像技术, 2017, 33(6): 848-852.

收稿日期: 2017-10-09 修回日期: 2017-10-27 编辑: 周永彬