

网络出版时间: 2019-9-19 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.019.html>

FAT4 的表达对人卵巢癌细胞增殖和侵袭的影响

陈颖, 周家德, 颜士杰, 肖兰

摘要 目的 研究 FAT4 在上皮性卵巢癌组织中表达及其对上皮性卵巢癌细胞增殖和侵袭的影响。方法 采用免疫组化方法检测上皮性卵巢癌及正常卵巢上皮组织 FAT4 蛋白表达。FAT4-siRNA 转染人上皮性卵巢癌细胞 A2780, qRT-PCR 和 Western blot 方法检测 FAT4 基因沉默效果, CCK-8 及 Transwell 实验分析 FAT4 基因敲除后细胞增殖及侵袭能力的改变。结果 上皮性卵巢癌组织中 FAT4 为胞质和核分布, 明显高于正常卵巢上皮组织 ($P < 0.01$), FAT4 表达与患者年龄、月经情况和病理类型无明显相关性 ($P > 0.05$), 而与上皮性卵巢癌肿瘤大小 ($P = 0.020$)、FIGO 分期 ($P = 0.002$) 以及病理分级 ($P = 0.029$) 有明显相关性 ($P < 0.05$); FAT4 干扰可显著抑制人卵巢癌细胞 A2780 增殖及侵袭能力 ($P < 0.01$)。结论 FAT4 高表达与肿瘤临床分期及分化程度相关, 体外实验证实 FAT4 与卵巢癌细胞增殖及侵袭相关, 为上皮性卵巢癌治疗提供了新的靶点。

关键词 FAT4; 增殖; 侵袭; 上皮性卵巢癌

中图分类号 R 73-37; R 73-35; R 349.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1755-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.019

卵巢上皮性肿瘤是女性生殖系统最常见的卵巢肿瘤, 一经确诊超过 70% 已是中晚期, 从而导致了

易复发、预后差以及病死率高等特点, 因此, 找寻与卵巢癌发生、发展相关的诊断指标对深入了解卵巢癌的发病机制具有重要的意义。

人类的 FAT4 亦称之 FAT-J, 于 2004 年首次报道^[1], FAT4 是一种单跨膜蛋白受体, 与调控哺乳动物的细胞分化、组织发育相关。研究表明, FAT4 蛋白在食管癌^[2]、肝癌^[3]中表达均显著降低; 在胃癌中, FAT4 低表达可导致胃癌细胞增殖^[4]; 另有报导, 乳腺癌中 FAT4 表达缺失与 FAT4 启动子甲基化有关^[5]; Bossuyt et al^[6]报道, FAT4 作为一个细胞黏附蛋白可影响细胞的迁移运动。国内外对 FAT 家族的研究主要集中于 FAT1, 而对 FAT4 研究较少, 目前对于 FAT4 与卵巢恶性肿瘤的研究几乎未见报道。本实验应用免疫组化法比较正常卵巢组织及上皮性卵巢癌组织中 FAT4 表达, 及其与临床病理特征间的联系; FAT4 体外干预对上皮性卵巢癌细胞增殖和侵袭力的影响, 以探讨上皮性卵巢癌发生发展与 FAT4 表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料及试剂 选取 2016 年 1 月 ~ 2018 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院病理确诊上皮性卵巢癌的蜡块标本 60 例 (患者术前均未行放疗或生物治疗), 分为实验组及对照组。实验组: 年龄 48 ~ 55 (52.21 ± 2.82) 岁, 其中 I ~ II 期 18 例, III ~ IV 期 42 例。卵巢肿瘤按照 WHO 组织学分级标准分为: 浆液性腺癌 25 例, 黏液性腺癌 27 例,

tect the activation of intracellular signaling pathway and the expression of early growth response protein 1 (EGR1). The EGR1 siRNA was transfected to inhibit the expression and observed the effect of IGF-1 on the migration and invasion of HCC cells. **Results** IGF-1 could promote the migration and invasion of HCC cell lines in a dose-dependent manner. IGF-1 increased the phosphorylation levels of IGF1R, AKT and ERK in HCC cells without significant changes in total expression, and the protein and mRNA expression of EGR1 also increased with the increase of IGF-1 concentration. After the expression of EGR1 decreased by siRNA, IGF-1 significantly reduced the migration and invasion ability of cells. **Conclusion** The migration and invasion of IGF-1 induced HCC cell line is mediated by EGR1.

Key words hepatocellular carcinoma; insulin-like growth factor-1; early growth response protein 1; cell migration and invasion

2019-07-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81603138); 安徽省中央引导地方科技发展专项项目 (编号: 2017070802D149)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

作者简介: 陈颖, 女, 硕士, 主治医师;

肖兰, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: emma_02000@163.com

其他类型 8 例; 对照组: 年龄 47 ~ 53 (50.07 ± 3.74) 岁, 同期因非卵巢疾病手术患者的正常卵巢组织 30 例。所有入组患者均为初诊且临床病例资料完整, 均知情并签订知情同意书。A2780 购自上海慧颖生物有限公司; RPMI-1640 细胞培养基购自美国 HyClone 公司; FAT4 兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天公司; TRIzol (总 RNA 抽提试剂) 购自美国 Gibco 公司; 脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; FAT4-siRNA 购自美国 Santa Cruz 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 免疫组织化学方法检测 FAT4 蛋白 将患者的临床病理资料, 如年龄、月经情况、病理类型、肿块大小、临床分期、肿瘤分级与 FAT4 表达进行比较。免疫组织化学方法进行 FAT4 检测, 所有石蜡块标本均连续切片, 切片厚度 4 μm , 切片先行抗原修复, 再经脱蜡、脱二甲苯、3% H_2O_2 封闭和枸橼酸修复液微波修复, FAT4 一抗浓度以 1:150 稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日常规复温, 抗兔二抗以 1:2000 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次, 滴加 5% DAB 显色。再经苏木精复染、乙醇化、脱水以及中性树胶封片固定, 室温风干后光镜下观察。细胞质、细胞核中为棕褐色细颗粒状为阳性。结果判定 FAT4 蛋白阳性表达为细胞质或核呈棕黄色颗粒, 每例样本随机观察 10 个高倍视野 ($\times 200$), 镜下无阳性细胞为阴性 (-), 阳性细胞数 $< 5\%$ 为弱阳性 (1+), 阳性细胞数 5% ~ 25% 为阳性 (2+), 阳性细胞数 $> 25\%$ 为强阳性 (3+)。

1.3 细胞培养和转染 A2780 细胞于含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养, 待细胞汇合度达到 70% 左右时行转染, 实验分 3 组: 未转染组 (空白对照组)、FAT4-NC 组、FAT4-siRNA 组, 具体转染步骤按 Lipofectamine 2000 试剂说明书上操作, 转染 4 h 后更换为 1640 完全培养液, 继续培养 48 h, 分别提取 RNA 及蛋白用于 Q-PCR 及 Western blot 检测 FAT4 抑制情况。

1.4 FAT4 基因在 mRNA 水平检测 TRIzol 提取细胞总 RNA, 定量后取 2 μg 反转录获得 cDNA。SYBR GREEN 荧光实时定量 q-PCR 方法进行检测 FAT4 基因表达情况。FAT4 上游引物序列: 5'-ATT-TAGGACCAGAAGCGAGAA-3', 下游: 5'-CTCTC-CACCTTCCCCAGCAA-3'; β -actin 上游引物序列: 5'-GTGGCCGAGGACTTTGATTG-3'; 下游 5'-CCTGTA-ACAACGCATCTCATATT-3'。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预

变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 40 个循环。设 3 个复孔, 所有反应进行 3 次 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析 A2780 细胞中 FAT4 基因表达情况及 siRNA 对 FAT4 基因的敲除效果。

1.5 Western blot 检测细胞 FAT4 蛋白表达 30 μg 蛋白质样品行 SDS-PAGE 电泳, 湿转至硝酸纤维素膜上; 5% BSA 室温封闭 2 h, 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液 (TBST) 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入 FAT4 一抗 (1:500), GAPDH 一抗 (1:5000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 1 $\times$ TBST 漂洗 3 遍, 相应辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床温育 2 h, ECL 显色曝光, 采集照片。

1.6 CCK-8 法检测各组细胞的增殖情况 PBS 洗涤细胞, 0.25% 胰酶消化细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{ml}$, 100 μl /孔接种于 96 孔板, 设 5 个复孔。接种后继续培养 48 h, 每孔更换新鲜培养基, 各加入 10 μl 的 CCK-8, 继续培养 4 h 后, 酶标仪检测 450 nm 波长处各孔吸光度 OD 值。重复 3 次, 取平均值。

1.7 体外侵袭实验 常规洗涤消化细胞制备单细胞悬液, 无血清培养基重悬细胞, 上室加入细胞浓度为 $8 \times 10^3/\text{ml}$ 的细胞悬液 200 μl , 下室加入含 100 ml/L 小牛血清的培养基 500 μl 。放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48 h, 取出小室, 乙醇固定, 结晶紫染色, 风干镜检, 混匀后计数下室细胞数。

1.8 统计学处理 所有数据采用 SPSS 15.0 统计软件分析。计数资料用率 (%) 表示, 使用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法; 定量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 相关样本行配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 上皮性卵巢癌组织过表达 FAT4 免疫组化显示 FAT4 主要表达于上皮性卵巢癌细胞质及胞核, 表现为棕黄色颗粒, 着色明显, 正常卵巢上皮细胞几乎不着色。相比较正常卵巢上皮组织, 上皮性卵巢癌组织中显著高表达 FAT4, FAT4 蛋白阳性表达率相比 (71.7% vs 16.7%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1、表 1。

2.2 FAT4 表达与上皮性卵巢癌临床病理的关系 FAT4 表达与上皮性卵巢癌患者的年龄、月经情况、病理类型无明显相关性 ($P > 0.05$), 而与上皮性卵巢癌肿瘤大小 ($P = 0.020$)、FIGO 分期 ($P = 0.002$) 以及病理分级 ($P = 0.029$) 有明显相关性 (P

<0.05) ,见表 2。

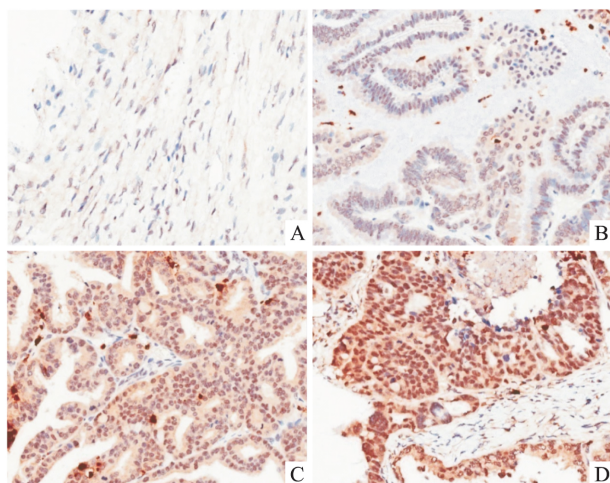


图 1 FAT4 蛋白表达 $\times 200$

A: FAT4 在正常卵巢上皮细胞中表达为(-); B: 弱阳性(1+); C: 阳性(2+); D: 强阳性(3+)

表 1 正常卵巢上皮及上皮性卵巢癌组织中 FAT4 阳性表达率比较(n)

组别	FAT4 蛋白表达			
	0	1+	2+	3+
正常卵巢组织($n=30$)	25	5		
卵巢癌组织($n=60$)	17	7	20	16

表 2 FAT4 表达与上皮性卵巢癌临床病理参数的关系

影响因素	n	FAT4 表达		χ^2 值	P 值
		阳性 ($n=43$)	阴性 ($n=17$)		
年龄(岁)					
>50	33	22	11	0.903	0.342
≤ 50	27	21	6		
月经情况					
未绝经	29	25	4	5.844	0.160
绝经	31	18	13		
FIGO 分期					
I ~ II 期	18	8	10	9.384	0.002
III ~ IV 期	42	35	7		
肿瘤直径(cm)					
>10	32	27	5	5.454	0.020
≤ 10	28	16	12		
病理类型					
浆液性	25	18	7	0.409	0.815
黏液性	27	20	7		
其他	8	5	3		
分化程度					
G1	10	4	6	7.094	0.029
G2	24	17	7		
G3	26	22	4		

2.3 siRNA 对 A2780 细胞 FAT4 mRNA 及蛋白表

达的影响 A2780 细胞转染 48 h 后 ,Western blot 结果显示: 细胞转染后 48 h ,FAT4-siRNA 组较对照组及 FAT4-NC 组 FAT4 蛋白表达明显下调($P < 0.05$) ,见图 2; 实时荧光定量 PCR 检测发现 FAT4-siRNA 组 FAT4 mRNA 水平相比较 FAT4-NC 及对照组亦明显下调($P < 0.05$) ,见图 3。

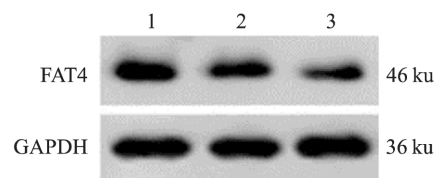


图 2 细胞中 FAT4 蛋白表达比较

1: 对照组; 2: FAT4-NC 组; 3: FAT4-siRNA 组

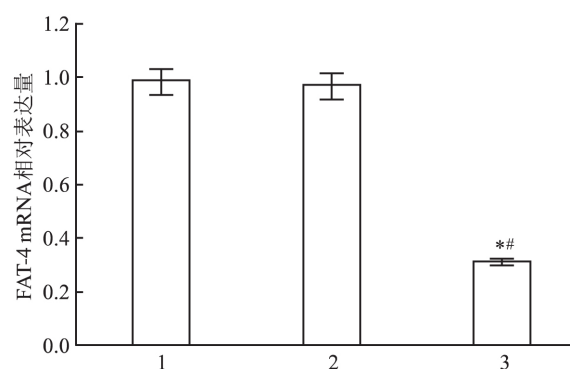


图 3 细胞中 FAT4 mRNA 相对表达量比较

1: 对照组; 2: FAT4-NC 组; 3: FAT4-siRNA 组; 与对照组比较:

* $P < 0.05$; 与 FAT4-NC 组比较: # $P < 0.05$

2.4 FAT4-siRNA 对 A2780 细胞增殖的影响 转染 48 h 后 ,FAT4-siRNA 组 A2780 细胞增殖较对照组及 FAT4-NC 组细胞增殖明显受到抑制($P < 0.01$)。见图 4。

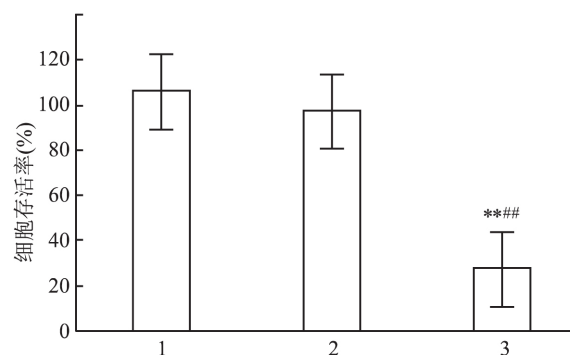


图 4 CCK-8 法检测 A2780 细胞增殖情况

1: 对照组; 2: FAT4-NC 组; 3: FAT4-siRNA 组; 与对照组比较:

** $P < 0.01$; 与 FAT4-NC 组比较: ### $P < 0.01$

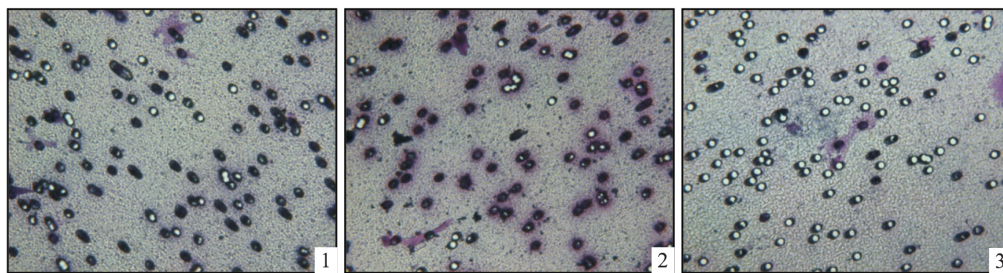


图5 各组细胞的侵袭能力 结晶紫染色×400

1: 对照组; 2: FAT4-NC 组; 3: FAT4-siRNA 组

2.5 FAT4-siRNA 对 A2780 细胞侵袭的影响 镜下检测结果显示 FAT4-siRNA 组穿过微孔膜的细胞数目明显少于对照组及 FAT4-NC 组, 见图5; 经统计学分析, FAT4-siRNA 组同其他两组间存在显著差异 ($P < 0.01$), 见图6。说明 FAT4 基因促进了人卵巢癌细胞 A2780 的体外侵袭能力。

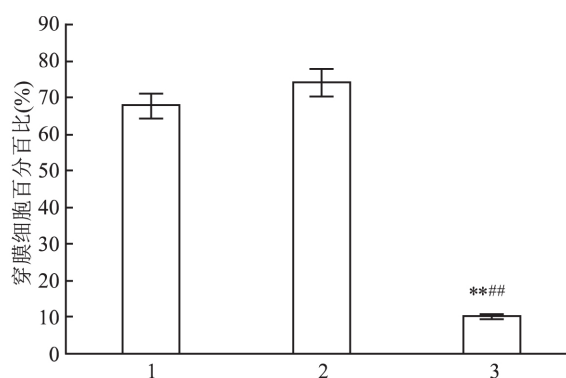


图6 穿过微孔膜 A2780 细胞百分比比较

1: 对照组; 2: FAT4-NC 组; 3: FAT4-siRNA 组; 与对照组比较:

** $P < 0.01$; 与 FAT4-NC 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

人类 FAT 基因是果蝇 *ft* 基因的同源基因。*ft* 基因通过参与调控 Hippo 通路和影响平面细胞极性在果蝇的整个发育过程发挥重要调节作用。近年来, 关于 FAT 基因家族的研究才广泛开展起来。从蛋白组织观点看, FAT 蛋白的分子量是钙黏超家族中最大的一类, 作为一种单次跨膜受体蛋白, 由 32~34 次重复钙黏蛋白组成。

FAT 家族主要包括 FAT1、FAT2、FAT3、FAT4 蛋白 4 个重要成员。已经证实 FAT1 和 FAT4 与肿瘤发生发展有关。FAT4 在胃癌、乳腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤的表达率显著低于正常组织, 表现为抑癌基因作用; Cai et al^[7] 研究提示 FAT4 蛋白在胃癌组织中表达下调, FAT4 mRNA 表达也显著低于癌旁组

组织, 且 FAT4 阴性表达与胃癌淋巴结转移、短生存期密切相关; 细胞水平也证实低表达 FAT4 可促进胃癌细胞发生侵袭转移, 提示 FAT4 是一个抑癌基因; Sun et al^[8] 报道外周血中异常 FAT4 甲基化与胃癌高风险有关。而 FAT4 是否具有癌基因功能目前尚未见报道。

人们已发现在 FAT 四个亚型中, FAT1 亚型既有抑癌作用又有致癌作用。在直肠癌、神经胶质瘤和头颈部肿瘤中 FAT1 表达下调, 但在乳腺癌、白血病和黑色素瘤中 FAT1 表达却为上调^[9-10]。那么 FAT4 基因是否也具有这种双重特性呢? 笔者发现与正常卵巢上皮组织比较, 上皮性卵巢癌中 FAT4 高表达, 提示 FAT4 高表达与上皮性卵巢癌发生有关; FAT4 表达与上皮性卵巢癌患者年龄、病理类型无明显相关, 而与肿瘤大小、FIGO 分期以及病理分级明显相关。随着上皮性卵巢癌 FIGO 分期提高, FAT4 阳性表达率明显升高, 且上皮性卵巢癌分期越晚, FAT4 阳性表达率越高, 提示 FAT4 过表达与上皮性卵巢癌的发生发展呈正相关, FAT4 过表达可能促进肿瘤增殖, 导致肿瘤体积增长较快, 推测 FAT4 可能是卵巢肿瘤癌基因的候选者之一。

相关机制研究^[11] 发现 FAT4 表达缺失可使 Hippo 通路中断, 进而导致乳腺肿瘤形成, 当小鼠 FAT4 表达恢复后其致瘤性明显下降, 提示 FAT4 通过 Hippo 信号通路在乳腺癌中起到抑癌基因作用。Bossuyt et al^[6] 发现 FAT4 敲除并未使小鼠肝脏形成肿瘤, FAT4 未起到肿瘤抑制作用。该研究推测在不同组织中 FAT4 与 Hippo 通路互作不同。在结肠癌中 FAT4 通过调节 PI3K-AKT 信号传导通路^[12], 抑制上皮间质转化, 从而进一步抑制结肠癌细胞的增殖和侵袭能力。与 FAT4 敲除小鼠相比, FAT4 过表达小鼠的结肠肿瘤明显缩小。本实验结果显示 FAT4 基因在上皮性卵巢癌 A2780 细胞中高表达, FAT4-siRNA 转染 A2780 细胞沉默 FAT4 基因后,

A2780 细胞的增殖和侵袭能力明显受到抑制,而其作用机制尚需更多深入的研究进一步验证。

卵巢癌的发生发展是多因素共同参与的过程,通过各种信号调节通路相互协调制约。本研究结果发现 FAT4 与卵巢癌细胞增殖及侵袭相关,下一步将深入研究 FAT4 通过激活哪些信号促进肿瘤生长和肿瘤转移及其具体分子机制,为寻找有效的治疗卵巢癌的分子靶点提供前期研究及理论基础。

参考文献

- [1] Hoeng J C, Ivanov N V, Hodor P, et al. Identification of new human cadherin genes using a combination of protein motifsearch and gene finding methods[J]. *J Mol Biol*, 2004, 337 (2): 307 - 17.
- [2] Gao Y B, Chen Z L, Li J G, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10): 1097 - 102.
- [3] Li M, Zhao H, Zhang X, et al. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(9): 828 - 9.
- [4] Ma L, Cui J, Xi H, et al. Fat4 suppression induces Yap translocation accounting for the promoted proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(1): 36 - 47.
- [5] Jin W, Li Q Z, Zuo Y C, et al. Relationship between DNA methylation in key region and the differential expressions of genes in human breast tumor tissue[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38 (1): 49 - 62.
- [6] Bossuyt W, Chen C L, Chen Q, et al. An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies[J]. *Oncogene*, 2014, 33(10): 1218 - 28.
- [7] Cai J, Feng D, Hu L, et al. FAT4 functions as a tumour suppressor in gastric cancer by modulation Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(12): 1720.
- [8] Sun H, Zhou H, Zhang Y, et al. Aberrant methylation of FAT4 and SOX11 in peripheral blood leukocytes and their association with gastric cancer risk[J]. *Cancer*, 2018, 9(13): 2275 - 83.
- [9] De Bock C E, Ardjmand A, Molloy T J, et al. The Fat1 cadherin is overexpressed and an independent prognostic factor for survival in paired diagnosis-relapse samples of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2012, 26(5): 918 - 26.
- [10] Sadeqzadeh E, de Bock C E, Thorne R F. Sleeping giants: emerging roles for the fat cadherins in health and disease[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1): 190 - 221.
- [11] Li S Y, Wang H, Mai H F, et al. Down-regulated long non-coding RNA RNAZFHX4-AS1 suppresses invasion and migration of breast cancer cells via FAT4-dependent Hippo signaling pathway[J]. *Cancer Gene Ther* 2018, 10(14): 1038.
- [12] Wei R, Xiao Y, Song Y, et al. FAT4 regulates the EMT and autophagy in colorectal cancer cells in part via the PI3K-AKT signaling axis[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 112.

Expression of FAT4 and their effects on cell proliferation and invasion of human ovarian cancer cells

Chen Ying, Zhou Jiade, Yan Shijie, et al

(*Dept of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To study the expression of FAT4 and the effects of FAT4 on cell proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. **Methods** FAT4 expression levels in epithelial ovarian carcinoma (EOC) tissues were examined by immunohistochemistry. qRT-PCR and Western blot were used to detect the relative expression of FAT4 in A2780 cells after FAT4 gene silenced. The effects of siRNA mediated knockdown of FAT4 on the cell proliferation and invasion of ovarian cancer were investigated by CCK-8 and Transwell assay. **Results** The cytoplasmic and nuclear distribution of FAT4 in epithelial ovarian cancer tissues was significantly higher than that in normal ovarian epithelial tissues ($P < 0.01$). There was no significant correlation between FAT4 expression and age, menstrual status and pathological type ($P > 0.05$), but FAT4 expression was significantly correlated with tumor size ($P = 0.020$), FIGO stage ($P = 0.002$), and pathological grade ($P = 0.029$). The cell proliferation and invasion of FAT4 siRNA group decreased significantly compared with the control and FAT4-negative control group ($P < 0.01$). **Conclusion** FAT4 high expression level is closely related to clinical stage and tumor grade. The present study demonstrated that FAT4 plays important roles in cell proliferation and invasion of EOC, indicating that FAT4 might be used as a potential therapeutic marker in patients with EOC.

Key words FAT4; proliferation; invasion; epithelial ovarian carcinoma