

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.007

叉头框蛋白 D3 在胃贲门腺癌组织中的表达及其对 SGC-7901 细胞生物学行为的影响

杨阳, 王欣晨, 牛云峰, 郭炜, 梁佳, 郭艳丽, 董稚明 (河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所 病理研究室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨叉头框蛋白 D3 (forkhead box protein D3, FOXD3) 在胃贲门腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma, GCA) 中的表达及其对 SGC-7901 细胞生物学行为的影响。**方法:** 从河北医科大学第四医院生物标本库中选取 2014 年 6 月至 2016 年 12 月手术切除的 49 例 GCA 组织及相应癌旁组织标本, qRT-PCR 检测 FOXD3 在 GCA 组织、癌旁组织以及在 5 种胃癌细胞系中 (BGC-823、SGC-7901、HGC-27、MGC-803 及 NCI-N87) 的表达。向 SGC-7901 细胞转染 pc-DNA3.1-FOXD3 或 pc-DNA3.1, 采用细胞增殖实验、克隆形成实验、划痕愈合实验和 Transwell 小室侵袭实验分别检测 FOXD3 过表达对 SGC-7901 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭的影响, qRT-PCR 及 WB 法检测细胞转染前后上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关分子 mRNA 及蛋白的表达情况, 流式细胞术检测转染前后细胞周期改变。**结果:** GCA 组织中 FOXD3 mRNA 的表达量明显降低, 其表达水平与患者临床分期和淋巴结转移密切相关; FOXD3 在胃癌细胞系中的表达均低于正常细胞 (均 $P < 0.01$)。FOXD3 过表达能明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$), 提高 SGC-7901 细胞中 E-cadherin 的表达水平, 减少 N-cadherin、 β -catenin 和 vimentin 的表达水平 (均 $P < 0.01$), 使细胞周期阻滞在 G0/G1 期 ($P < 0.01$)。**结论:** FOXD3 在 GCA 组织中的表达明显下调, 其过表达可以抑制胃癌细胞的生物学行为, FOXD3 可作为抑癌基因为肿瘤治疗提供新思路。

[关键词] 胃贲门腺癌; 叉头框蛋白 D3; SGC-7901 细胞; 上皮-间质转化; 增殖; 迁移; 侵袭; 细胞周期

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)08-0810-08

Expression of forkhead box protein D3 in gastric cardia adenocarcinoma tissues and its effect on biological behaviors of SGC-7901 cells

YANG Yang, WANG Xinchun, NIU Yunfeng, GUO Wei, LIANG Jia, GUO Yanli, DONG Zhiming (Pathology Laboratory of Hebei Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of forkhead box protein D3 (FOXD3) in gastric cardia adenocarcinoma (GCA) and its effect on the biological behaviors of SGC-7901 cells. **Methods:** A total of 49 pairs of GCA tissues and corresponding para-cancerous tissues that surgically resected from June 2014 to December 2016 were selected from the Biological Specimen Library of the Fourth Hospital of Hebei Medical University. qRT-PCR was used to detect the expression of FOXD3 in GCA tissues and corresponding para-cancerous tissues, as well as in gastric cancer cell lines (BGC-823, SGC-7901, HGC-27, MGC-803, and NCI-N87). pc-DNA3.1-FOXD3 or pc-DNA3.1 was transfected into SGC-7901 cells. Cell proliferation assay, clone formation assay, scratch healing assay, and Transwell chamber invasion assay were used to detect the effect of FOXD3 overexpression on the proliferation, clone formation, migration, and invasion of SGC-7901 cells. The mRNA and protein expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecules before and after the transfection were detected by qRT-PCR and WB. Cell cycle changes before and after transfection were detected by Flow cytometry. **Results:** The expression of FOXD3 mRNA in GCA tissues was significantly downregulated, and its expression was closely correlated with clinical stage and lymph node metastasis of GCA patients. The expression of FOXD3 in gastric cancer cell lines was lower than that in normal cell lines (all $P < 0.01$). FOXD3 overexpression significantly inhibited the proliferation, clone formation, migration and invasion of SGC-7901 cells *in vitro* (all $P < 0.01$). FOXD3 overexpression could up-regulate the expression of E-cadherin and down-regulate the expressions of N-cadherin, β -catenin and vimentin in SGC-7901 cells (all $P < 0.01$).

[基金项目] 河北省自然科学基金面上项目资助 (No. H2019206664)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2019206664)

[作者简介] 杨阳 (1995—), 女, 硕士生, 主要从事上消化道肿瘤发病机制的研究, E-mail: 359550704@qq.com

[通信作者] 董稚明 (DONG Zhiming, corresponding author), 教授, 博士生导师, 主要从事消化道恶性肿瘤发病分子机制的研究, E-mail: dongzhiming2000@163.com

Overexpression of FOXD3 could arrest the cell cycle in the G0/G1 phase ($P<0.01$). **Conclusion:** The expression of FOXD3 in GCA tissues is significantly downregulated, and its overexpression can inhibit the biological behaviors of gastric cancer cells. FOXD3 can be used as a tumor suppressor gene to provide new ideas for tumor therapy.

[Key words] gastric cardia adenocarcinoma (GCA); forkhead box protein D3 (FOXD3); SGC-7901 cell; epithelial-mesenchymal transformation (EMT); proliferation; migration; invasion; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(8): 810-817. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.007]

胃贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)属于上消化道常见的恶性肿瘤之一,和胃其他部位的肿瘤不同,其具有独特的组织学特性、临床表现、诊治方法以及较差的预后,属于胃癌的特殊类型^[1]。GGA早期症状不明显,大部分患者发现时已处于进展期或晚期,且容易转移和复发,5年生存率低^[2]。因此,明确GGA发病机制,寻找一种更为有效且安全无创的诊断和预后评估方法是目前急需解决的问题,也是GCA研究的热点。目前尚未见到叉头框蛋白D3(forkhead box protein D3, FOXD3)表达与GCA相关性的报道。本研究将检测FOXD3在GCA组织中的表达水平,观察过表达FOXD3对胃癌细胞体外增殖、迁移、侵袭能力以及对EMT相关标志物mRNA和蛋白水平的影响,旨在进一步明确GCA的发病机制,为其诊断治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 主要试剂和仪器

反转录试剂盒、转染试剂Lipofectamine™2000和MTS试剂均购自美国Promega公司,DNA纯化试剂盒购自德国Qiagen公司,胎牛血清购自美国BI公司,胰蛋白酶、TRIzol、RIPA裂解液、10×电转液、SDS-PAGE相关试剂和5×蛋白上样缓冲液试剂均购自北京索莱宝公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time PCR, qRT-PCR)仪购自美国ABI公司,兔抗人上皮钙黏素(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、神经钙黏素(N-cadherin)、β联蛋白(β-catenin)及β肌动蛋白(β-actin)的单克隆抗体均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)购自美国KPL公司。

1.2 细胞系和组织标本制备及其病理资料收集

胃癌细胞系BGC-823、SGC-7901、HGC-27、MGC-803及NCI-N87由河北医科大学第四医院肿瘤研究所病理研究室留存并传代。实验所用的样本均来自河北医科大学第四医院生物标本库,取自2014年6月至2016年12月收治的49例GCA患者手术标本(患者均未接受放化疗、未检测幽门螺杆菌),男性44例、女性5例,中位年龄63岁(49~83岁),手术切除癌组织原发灶以及相应癌旁组织(距原发灶边缘3~5 cm)。一部分标本保存于液氮中用于提取RNA,另一部分标本经H-E染色后经病理医师组织

病理学诊断均为GCA组织。病理学分级依照WHO标准进行,收集患者的临床病理资料。本研究经河北医科大学第四医院伦理委员会批准同意(伦理审查编号:2020k-1147)。

1.3 qRT-PCR法检测GCA组织及细胞中FOXD3基因的表达

取49例GCA患者癌及癌旁组织,加入TRIzol裂解液后用匀浆器充分研磨;细胞用PBS冲洗,加入TRIzol充分悬浮后移入EP管。依据TRIzol试剂说明书提取组织及5株细胞(BGC-823、SGC-7901、HGC-27、MGC-803及NCI-N87)中的总RNA。按照逆转录试剂盒操作流程,将总RNA反转录成cDNA后进行qRT-PCR扩增。以β-actin作为组织表达的内参照,随机选取10例癌旁正常组织cDNA混合后作为细胞表达的对照组(Pools)。qRT-PCR引物序列:FOXD3上游引物为5'-GACGACGGGCTGGAAGAGAA-3',下游引物为5'-GGGCAGCCTCCTTATGTCA-3';β-actin上游引物为5'-ACCGAGCGCGGCTACAG-3',下游引物为5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。qRT-PCR扩增条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s、54℃退火30 s、72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸7 min后4℃保存扩增产物。反应达到阈值的循环数记为该组织中FOXD3和β-actin的Ct值。结果采用相对定量法: $\Delta Ct = Ct_{\text{FOXD3}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{癌组织}} - \Delta Ct_{\text{配对癌旁组织}}$,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因的相对表达量。

1.4 过表达载体质粒pcDNA3.1-FOXD3转染SGC-7901细胞

根据上述实验选取FOXD3表达量最低的SGC-7901细胞进行后续实验。用细胞胰蛋白酶消化计数后均匀接种于6孔板中,参照Lipofectamine™2000说明书进行转染。分两组进行实验:SGC-7901细胞中转入pc-DNA3.1-FOXD3(实验组)或空载体pc-DNA3.1(对照组)。

1.5 MTS实验和克隆形成实验检测FOXD3对SGC-7901细胞增殖能力的影响

MTS实验:转染后的SGC-7901细胞继续常规培养24 h,胰酶消化计数后接种于96孔板(1×10^3 个/孔),每组6个复孔;待细胞贴壁后分别于0、24、48、72和96 h在每个孔加入MTS试剂(500 μg/ml),继续培养

2 h,最后用酶标仪检测每个孔在波长 450 nm 处的光密度(D)值,以 D 值代表细胞增殖水平。

克隆形成实验:转染后的SGC-7901细胞继续常规培养24 h,胰酶消化计数后将 5×10^3 个细胞均匀接种于6孔板,37℃恒温培养箱中孵育1周后取出,4%多聚甲醛溶液固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min,光学显微镜下计数克隆形成数(>50个细胞计为1个克隆),并计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 细胞划痕愈合实验和Transwell侵袭实验检测FOXD3对SGC-7901细胞迁移、侵袭能力的影响

细胞划痕愈合实验:转染后的SGC-7901细胞继续常规培养24 h,胰酶消化计数后将 5×10^5 个细胞均匀接种于6孔板,孵育24 h后,用200 μ l移液器吸头垂直刮擦每个孔底形成划痕,换成不含血清的1640培养液继续培养,在划痕后0、12和24 h测量划痕宽

度并计算细胞迁移率。细胞迁移率=(起始划痕宽度-12或24 h划痕宽度)/起始划痕宽度 $\times 100\%$ 。

Transwell侵袭实验:转染后的SGC-7901细胞继续常规培养24 h,胰酶消化计数后用不含血清的1640培养液重悬细胞。在Transwell的上室中预铺50 μ l matrigel胶,37℃过夜。将 1×10^5 个细胞接种至其上室,其下室加入含FBS培养基,37℃恒温孵育箱继续培养24 h,取出小室。将上室内侧细胞擦洗除去,将膜下侧细胞固定后染色20 min,计数穿膜细胞,比较组间差异。

1.7 qRT-PCR法检测过表达FOXD3对SGC-7901细胞中EMT标志物mRNA水平的影响

qRT-PCR法检测转染FOXD3过表达质粒后,SGC-7901细胞中E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin及vimentin基因mRNA的表达情况。实验流程同1.3节,引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列、退火温度及产物长度

Tab.1 qRT-PCR primer sequences, annealing temperature and product length

Gene	Primer sequence	Annealing temperature ($t/^\circ\text{C}$)	Product length (bp)
E-cadherin	F: 5'-CGAGAGCTACACGTTACACGG-3'	59	162
	R: 5'-GGCCTTTTGACTGTAATCACACC-3'		
N-cadherin	F: 5'-CAACTTGCCAGAAACTCCAGG-3'	59	205
	R: 5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'		
Vimentin	F: 5'-CGCCTGCAGGATGAGATTTCAG-3'	58	175
	R: 5'-TCAGGGAGGAAAAGTTTGGA-3'		
β -catenin	F: 5'-ATGGCTTGGAATGAGAC-3'	50	189
	R: 5'-AACTGGATAGTCAGCACC-3'		

1.8 WB法检测过表达FOXD3对SGC-7901细胞中EMT标志分子蛋白表达的影响

按照蛋白提取试剂盒操作流程,使用含有蛋白酶抑制剂以及磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液对细胞进行裂解,提取细胞总蛋白。通过BCA蛋白定量试剂盒操作流程,定量总蛋白的浓度。分别取50 μ g蛋白样本,通过SDS-PAGE分离蛋白质,以80 V为起始电压进行电泳,30 min后以120 V电泳1 h;应用转膜技术将分离后的蛋白转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,加一抗(兔抗人E-cadherin、N-cadherin、vimentin、 β -catenin及 β -actin的单克隆抗体),4℃摇床过夜,次日TBST缓冲液冲洗3次,每次10 min;加二抗后室温孵育1 h,TBST缓冲液漂洗3次,每次10 min。电化学发光液显色后拍照,凝胶成像分析仪采集和分析图片。

1.9 流式细胞术检测过表达FOXD3对SGC-7901细胞周期的影响

细胞培养48 h后,用不含EDTA的胰酶消化计数,

调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。70%乙醇4℃固定过夜,4℃下离心5 min后收集细胞,预冷的PBS洗涤细胞3次,加入碘化丙啶染液后于4℃避光孵育30 min,流式细胞仪检测处于G0/G1、S~G2/M期的细胞所占比例。

1.10 统计学处理

本研究所有实验均独立重复3次,所有数据均采用SPSS21.0软件进行分析。FOXD3在组织中表达情况以及与临床病理资料间的关系均使用中位数(四分位数间距)即M(25q,75q)表示,采用秩和检验进行组间分析。符合正态分布的计量数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GCA组织中FOXD3 mRNA的表达与临床病理特征的关系

qRT-PCR实验结果(图1)显示,GCA组织中

FOXD3 mRNA 的表达水平显著低于其相应的癌旁组织 ($P<0.01$)。FOXD3 mRNA 表达水平与 GCA 患者临床病理特征的关系见表 2。III+IV 期 GCA 患者组织中 FOXD3 mRNA 的表达明显低于 I + II 期的患者组织 ($P<0.01$)；发生淋巴结转移的 GCA 患者组织中, FOXD3 mRNA 表达水平明显低于无淋巴结转移患者 ($P<0.01$)；FOXD3 mRNA 的表达水平与 GCA 患者的年龄、性别及分化程度均未发现关联 (均 $P>0.05$)。

2.2 胃癌细胞系中 FOXD3 呈低表达并构建过表达 FOXD3 的 SGC-7901 细胞

qRT-PCR 法检测结果(图 2A)显示,在胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MGC-803、HGC-27 以及 NCI-N87 中 FOXD3 mRNA 的表达水平均显著低于对照组(均 $P<0.01$)，SGC-7901 细胞中的 FOXD3 mRNA 表达水平最低,故选用 SGC-7901 细胞进行后续研究。

将重组质粒载体 pc-DNA3.1-FOXD3 转染 SGC-7901 细胞后用 qRT-PCR 检测转染效率,结果(图 2B)显

示,pc-DNA3.1-FOXD3 转染组 FOXD3 mRNA 的表达水平与对照组相比明显上调,且差异有统计学意义 ($P<0.01$)，这一结果意味着通过构建质粒载体可以获得 FOXD3 过表达的 SGC-7901 细胞。

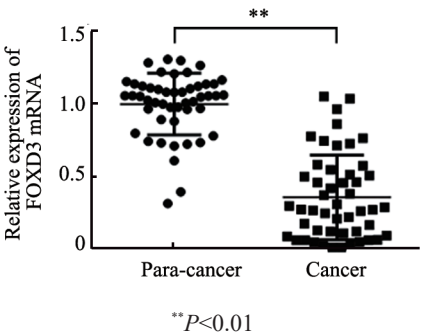


图 1 qRT-PCR 法检测 FOXD3 mRNA 在 GCA 及其癌旁组织中的表达

Fig.1 Expression of FOXD3 mRNA in GCA tissues and para-cancerous tissues was detected by qRT-PCR

表 2 GCA 组织中 FOXD3 表达水平与 49 例患者临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship between FOXD3 expression level in GCA tissues and clinicopathological features of 49 patients

Index	Case (n)	Expression level of FOXD3 mRNA				
		M	25q	75q	Z	P
Age (t/a)						
≤63	25	0.275	0.792	0.515	-0.720	0.472
>63	24	0.303	0.129	0.572		
Gender						
Male	44	0.274	0.093	0.543	-0.694	0.488
Female	5	0.313	0.202	0.624		
Lymph node metastasis						
Yes	38	0.239	0.068	0.435	-3.187	0.001
No	11	0.518	0.461	0.866		
Pathological differentiation						
Well	6	0.509	0.239	0.734	-1.128	0.259
Moderate-poor	43	0.272	0.098	0.513		
TNM stage						
I + II	13	0.551	0.276	0.741	-2.853	0.004
III + IV	36	0.203	0.067	0.455		

M: Median; 25q,75q: Interquartile range

2.3 FOXD3 过表达抑制 SGC-7901 细胞的增殖能力

MTS 实验结果(图 3A)显示,转染 FOXD3 过表达质粒 72 h 后,SGC-7901 细胞的增殖水平显著低于转染空质粒的对照组细胞[(0.7±0.1) vs (1.1±0.1), $P<0.01$];克隆形成实验结果(图 3B)显示,转染 FOXD3 过表达质粒的 SGC-7901 细胞,其克隆形成率显著低于转染空质粒的对照组细胞[(2.9±0.1)% vs (6.8±0.4)%, $P<0.01$],说明 FOXD3 过表达可以减弱

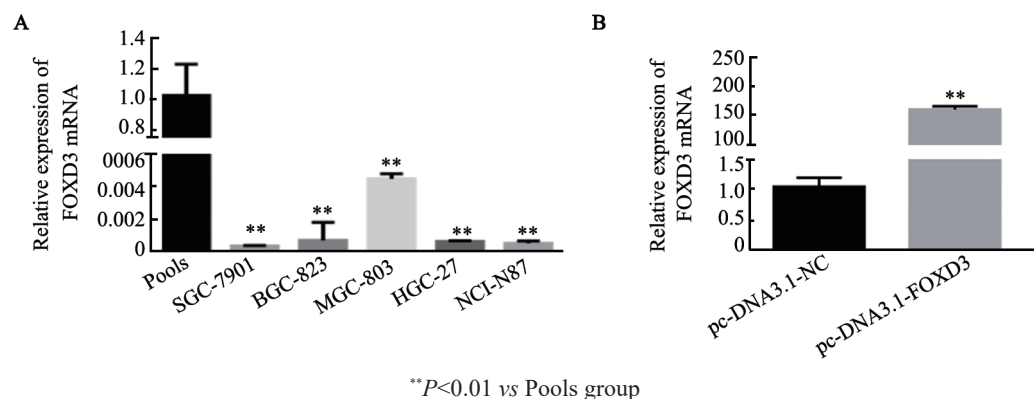
SGC-7901 细胞的增殖能力。

2.4 FOXD3 过表达抑制 SGC-7901 细胞的迁移及侵袭能力

细胞划痕愈合实验(图 4A)显示,转染 FOXD3 过表达质粒载体的 SGC-7901 细胞,其细胞划痕愈合率明显低于对照组[12 h: (4.6±0.5)% vs (9.6±0.9)%, $P<0.01$; 24 h: (6.5±1.4)% vs (18.6±2.0)%, $P<0.01$],说明 FOXD3 过表达可以减弱 SGC-7901 细胞的迁移

能力。Transwell 侵袭实验(图 4B)显示,转染 FOXD3 过表达质粒载体的 SGC-7901 细胞,其穿膜细胞数明显少于对照组[(391.2±21.8) vs (416.0±11.7) 个, $P <$

0.01],说明 FOXD3 过表达可以减弱 SGC-7901 细胞的侵袭能力。



A: The expression level of FOXD3 mRNA in gastric cancer cells;

B: The expression level of FOXD3 mRNA in SGC-7901 cells after transfection

图2 qRT-PCR法检测 FOXD3 mRNA 的表达水平

Fig.2 The expression level of FOXD3 mRNA was detected by qRT-PCR

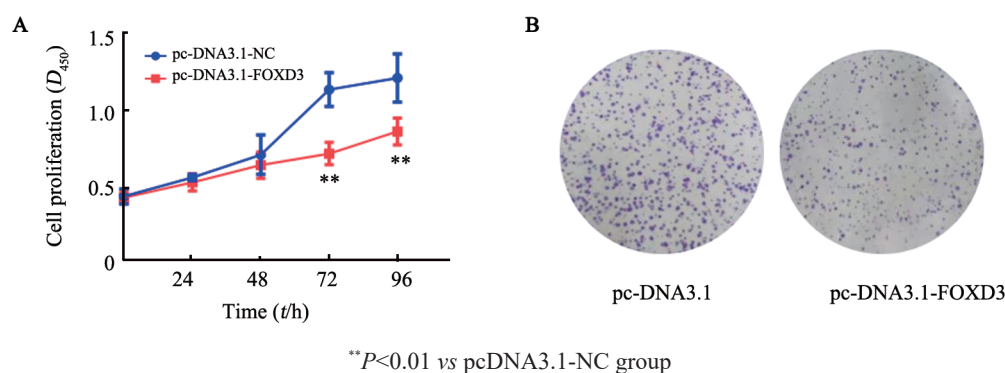


图3 MTS法(A)和克隆形成实验(B)检测 FOXD3 mRNA 过表达对 SGC-7901 细胞的增殖能力的影响

Fig.3 MTS assay (A) and clone formation assay (B) were used to detect the effect of FOXD3 mRNA overexpression on the proliferation of SGC-7901 cells

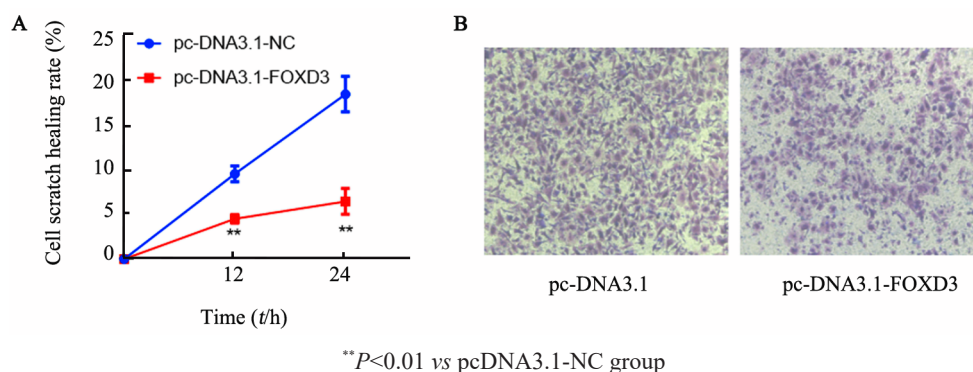


图4 细胞划痕愈合实验(A)和Transwell侵袭实验(B)检测 FOXD3 过表达对 SGC-7901 细胞的迁移和侵袭能力的影响(×100)

Fig.4 Scratch healing assay (A) and Transwell invasion assay (B) were used to detect the effect of FOXD3 overexpression on the migration and invasion ability of SGC-7901 cells (×100)

2.5 FOXD3 过表达对 SGC-7901 细胞中 EMT 相关标志分子 mRNA 及蛋白表达水平的影响

qRT-PCR 实验结果(图 5A)显示,与对照组相比,

转染 FOXD3 过表达质粒载体的 SGC-7901 细胞中 E-cadherin mRNA 的表达水平显著升高[(5.2±0.4) vs (1.0±0.1), $P < 0.01$],而细胞中 N-cadherin、β-catenin 和

vimentin mRNA 的表达明显降低(均 $P<0.01$)。WB 法检测 EMT 相关标志分子蛋白表达水平, 结果(图

5B)显示, 各分子的蛋白表达水平与 qRT-PCR 实验结果一致。

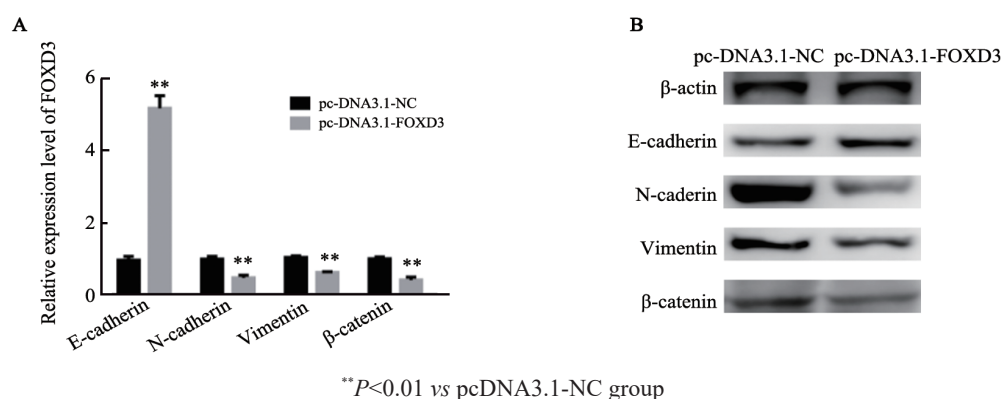


图5 qRT-PCR法(A)和WB法(B)检测FOXD3过表达对SGC-7901细胞中EMT标志物E-cadherin、N-cadherin、β-catenin和vimentin mRNA和蛋白表达水平的影响

Fig.5 qRT-PCR(A) and WB (B) were used to detect the effect of FOXD3 overexpression on mRNA and protein expression levels of EMT markers E-cadherin, N-cadherin, β-catenin and vimentin mRNA in SGC-7901 cells

2.6 FOXD3 过表达对 SGC-7901 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(图6)显示, pc-DNA3.1-FOXD3 转染组细胞 S~G2/M 期细胞所占比例显著低于对照组 [(45.0±1.4)% vs (55.7±1.7)%, $P<0.01$]; pc-DNA3.1-FOXD3 转染组细胞 G0/G1 期细胞所占比例显著高于对照组 [(54.9±1.4)% vs (44.3±1.7)%, $P<0.01$], 说明过表达 FOXD3 基因可使 SGC-7901 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。

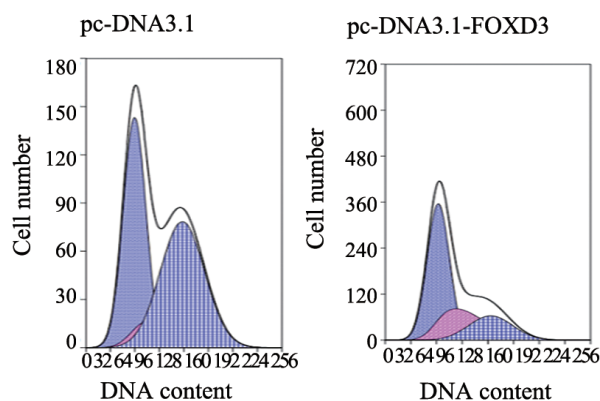


图6 流式细胞术检测FOX D3过表达对SGC-7901细胞周期的影响

Fig.6 The effect of FOXD3 overexpression on SGC-7901 cell cycle was detected by Flow cytometry

3 讨论

中国是胃癌高发国家, 近年来GCA的发病率呈上升趋势, 尤其是在中国河北、河南两省的交界地区。贲门结构的特殊性导致对于贲门腺癌来源及发生机制仍存在争议, 但越来越多的研究都在指向其

可能是一种干细胞疾病^[3]。FOX 蛋白可以直接调控肿瘤细胞的形成过程, 还可以通过控制其他基因的表达从而参与肿瘤细胞凋亡、增殖及侵袭过程^[4]。FOXD3 是 FOX 蛋白家族成员之一, 属于 FOX 转录因子家族, 定位在人类染色体 1p31, 属于干细胞多功能因子, 能够维持胚胎发育^[5], 保持胚胎干细胞的多能性^[6], 还能影响神经嵴的形成、迁移及分化等^[7]。研究表明, FOXD3 在大肠癌^[8]、卵巢癌^[9]、肺癌^[10]中的均呈现明显低表达。FOXD3 可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移等生物学功能, 关于其作用于肿瘤细胞的具体机制还有待探索。CHENG 等^[11]研究表明, 在胃癌中 FOXD3 可以直接结合编码细胞死亡调节因子 CYFIP2 和 RARB 基因的启动子并激活其转录, 感染幽门螺杆菌会导致 FOXD3 发生高甲基化进而表达减少, 这可能会扰乱细胞死亡和生存之间的平衡。LIU 等^[12]研究发现, FOXD3 可以直接与 miR-137 启动子区结合并激活其转录, 通过靶向调控 AKT2 通路抑制肝癌细胞的发生发展。HE 等^[13]研究表明, FOXD3/miR-214/MED19 轴对于调控结直肠癌的生长、侵袭和转移具有重要意义。XU 等^[8]研究表明, FOXD3 低表达与结直肠癌患者的组织病理分型差、淋巴结转移以及较差的预后显著相关, FOXD3 不但可以通过内质网应激下发生的未折叠蛋白质反应增加线粒体凋亡, 还可以通过直接结合到 p53 启动子区增强其表达, 甲基化的 FOXD3 在结直肠癌中充当肿瘤抑制因子。在非小细胞肺癌患者血清中 FOXD3 表达下降, 且与患者的 TNM 分期、淋巴结转移和分化程度密切相关, 被认为是诊断非小细胞肺癌的潜在分子标志物^[14]。

本课题组对FOXD3在GCA中的表达以及生物学行为展开研究,希望发现GCA治疗的新靶点。研究发现,FOXD3 mRNA在GCA组织和胃癌细胞系中呈现明显的低表达,并且FOXD3的表达水平与GCA患者的淋巴结转移和TNM分期相关。进一步构建pc-DNA3.1-FOXD3质粒载体转染SGC-7901细胞系,通过MTS法、克隆形成实验、Transwell小室侵袭实验及划痕实验验证FOXD3 mRNA对SGC-7901细胞生物学行为的影响,结果发现FOXD3过表达会抑制SGC-7901细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

EMT是指在特定条件下,上皮细胞向间充质细胞表型转变,从而获得侵袭和迁移能力的过程,在此过程中,上皮标志物E-cadherin表达量降低,而间质标志物vimentin、N-cadherin表达升高^[15]。EMT进程可增强肿瘤细胞的转移能力、提高化学耐药性和肿瘤干性^[16],而FOX基因可以通过调控EMT参与肿瘤细胞的发展进程^[17],FOXD3则能够通过调节EMT相关蛋白的表达水平影响EMT进程,从而改变肿瘤细胞的迁移能力^[18]。YIN等^[19]发现,间变性甲状腺癌细胞系SW1736和K18中FOXD3的表达水平下调,从而加快EMT进程。HE等^[20]研究发现,启动子区甲基化过高会导致FOXD3表达下调,加快EMT进程,从而促进肝细胞癌的发生、发展。有关FOXD3是否影响GCA的EMT进程尚少有研究。本研究检测了过表达FOXD3对EMT相关分子表达水平的影响,结果显示上皮标志物E-cadherin的表达明显升高,而间质标志物N-cadherin、 β -catenin及vimentin的表达明显降低,意味着FOXD3可以通过EMT进程调节胃癌细胞的迁移能力。

综上所述,FOXD3 mRNA在GCA组织中呈现低表达,过表达FOXD3可以抑制细胞体外增殖、迁移和侵袭能力。但FOXD3在GCA中的作用机制尚不清楚,本课题组将继续进行后续实验,以期更深层次探究FOXD3在GCA中低表达的机制,为临床治疗提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] HU N, WANG Z, SONG X, et al. Genome-wide association study of gastric adenocarcinoma in Asia: a comparison of associations between cardia and non-cardia tumours[J]. Gut, 2016, 65(10): 1611-1618. DOI:10.1136/gutjnl-2015-309340.
- [2] GUO W, LV P, LIU S, et al. Aberrant methylation-mediated downregulation of long noncoding RNA C5orf66-AS1 promotes the development of gastric cardia adenocarcinoma[J]. Mol Carcinog, 2018, 57(7): 854-865. DOI:10.1002/mc.22806.
- [3] MOKROWIECKA A, VEITS L, FALKEIS C, et al. Expression profiles of cancer stem cell markers: CD133, CD44, Musashi-1 and EpCAM in the cardiac mucosa-Barrett's esophagus-early esophageal adenocarcinoma-advanced esophageal adenocarcinoma sequence[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(3): 205-209. DOI: 10.1016/j. prp. 2016.12.018.
- [4] HERMAN L, TODESCHINI A L, VEITIA R A. Forkhead transcription factors in health and disease[J]. Trends Genet, 2021, 37(5): 460-475. DOI:10.1016/j.tig.2020.11.003.
- [5] ZENG C W, SHEU J C, TSAI H J. A new member of the forkhead box protein family in zebrafish: Domain composition, phylogenetic implication and embryonic expression pattern[J/OL]. Gene Expr Patterns, 2020, 35: 119093 [2021-02-05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567133X19301553? via% 3Dihub>. DOI: 10.1016/j.gep.2019.119093.
- [6] KRISHNAKUMAR R, CHEN A F, PANTOVICH M G, et al. FOXD3 regulates pluripotent stem cell potential by simultaneously initiating and repressing enhancer activity[J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(2): 306-307. DOI:10.1016/j.stem.2018.07.015.
- [7] COSTA R, MUCCIOLI S, BRILLO V, et al. Mitochondrial dysfunction interferes with neural crest specification through the FoxD3 transcription factor[J/OL]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105385 [2021-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33348025/>. DOI:10.1016/j.phrs.2020.105385.
- [8] XU M, ZHU J, LIU S, et al. FOXD3, frequently methylated in colorectal cancer, acts as a tumor suppressor and induces tumor cell apoptosis under ER stress via p53[J]. Carcinogenesis, 2020, 41(9): 1253-1262. DOI:10.1093/carcin/bgz198.
- [9] LUO G F, CHEN C Y, WANG J, et al. FOXD3 may be a new cellular target biomarker as a hypermethylation gene in human ovarian cancer[J/OL]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 44 [2021-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30858761/>. DOI: 10.1186/s12935-019-0755-8.
- [10] XU W, LI J, LI L, et al. FOXD3 suppresses tumor-initiating features in lung cancer via transcriptional repression of WDR5[J]. Stem Cells, 2019, 37(5): 582-592. DOI:10.1002/stem.2984.
- [11] CHENG A S L, LI M S, KANG W, et al. Helicobacter pylori causes epigenetic dysregulation of FOXD3 to promote gastric carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2013, 144(1): 122-133. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.10.002.
- [12] LIU L L, LU S X, LI M, et al. FoxD3-regulated microRNA-137 suppresses tumour growth and metastasis in human hepatocellular carcinoma by targeting AKT2[J]. Oncotarget, 2014, 5(13): 5113-5124. DOI:10.18632/oncotarget.2089.
- [13] HE G Y, HU J L, ZHOU L, et al. The FOXD3/miR-214/MED19 axis suppresses tumour growth and metastasis in human colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2016, 115(11): 1367-1378. DOI: 10.1038/bjc.2016.362.
- [14] XU B N, ZHANG L, ZHANG D D, et al. Serum fork-head box D3 (FOXD3) expression is down-regulated in and associated with diagnosis of patients with non-small cell lung cancer[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 9504-9508. DOI:10.12659/msm.896748.
- [15] MA B Q, MA J X, YANG Y L, et al. Effects of miR-330-3p on invasion, migration and EMT of gastric cancer cells by targeting PRRX1-mediated wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncotargets Ther, 2020, 13: 3411-3423. DOI:10.2147/OTT.S238665.
- [16] LOH C Y, CHAI J, TANG T, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic

- implications, and challenges[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118[2021-02-05]. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1118>. DOI: 10.3390/cells8101118.
- [17] ASADOLLAHI S, MAZAHARI M N, KARIMI-ZARCHI M, et al. The relationship of FOXR2 gene expression profile with epithelial-mesenchymal transition related markers in epithelial ovarian cancer[J]. *Klin Onkol*, 2020, 33(3): 201-207. DOI:10.14735/amko2020201.
- [18] WANG L. ELFI-activated FOXD3-AS1 promotes the migration, invasion and EMT of osteosarcoma cells via sponging miR-296-5p to upregulate ZCCHC3[J/OL]. *J Bone Oncol*, 2021, 26: 100335 [2021-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33204608/>. DOI: 10.1016/j.jbo.2020.100335.
- [19] YIN H, MENG T, ZHOU L, et al. FOXD3 regulates anaplastic thyroid cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33644-33651. DOI:10.18632/oncotarget.16853.
- [20] HE G, HU S, ZHANG D, et al. Hypermethylation of FOXD3 suppresses cell proliferation, invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(2): 374-382. DOI:10.1016/j.yexmp.2015.06.017.
- [收稿日期] 2021-03-04 [修回日期] 2021-07-23
[本文编辑] 黄静怡