

慢病毒介导的 *FLOT2* 基因沉默影响结肠癌细胞生物学功能的影响及机制

伍班名¹ 张涛² 张秀容¹ 钟寒迪³ 王桂林¹

(宜宾市第二人民医院 1. 急诊科; 2. 检验科; 3. 胃肠外科, 四川 宜宾 644000)

【摘要】目的 构建干扰 *FLOT2* 表达的慢病毒载体, 探讨抑制 *FLOT2* 表达对结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的影响及机制。**方法** 通过 qRT-PCR 检测结直肠癌组织及人结肠癌 LoVo、SW480 及 HT29 细胞 *FLOT2* 的表达水平, Western blot 检测结肠癌细胞 *FLOT2* 表达。将含 *FLOT2* siRNA 的慢病毒载体转染结肠癌 LoVo 细胞和 SW480 细胞。采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测转染后的细胞 *FLOT2* 表达。MTT 法、流式细胞术、Transwell 小室、Western blot 分别检测细胞增殖能力、凋亡率、侵袭迁移能力及 PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平。**结果** 结直肠癌组织 *FLOT2* mRNA 表达水平明显高于癌旁组织, 三个结肠癌细胞 *FLOT2* mRNA 及蛋白水平均明显高于在正常结肠上皮细胞 NCM460 ($P < 0.05$)。LoVo 细胞和 SW480 细胞转染 *FLOT2* siRNA 慢病毒载体后, *FLOT2* mRNA 及蛋白表达水平均明显降低, 且可明显降低细胞增殖、侵袭和迁移能力, 促进细胞凋亡, 下调 PCNA 和 Vimentin 表达, 上调 cleaved caspase3 和 E-cadherin ($P < 0.05$)。**结论** 抑制 *FLOT2* 表达可明显降低结肠癌细胞增殖、侵袭和迁移能力, 促进细胞凋亡, 其机制可能与调节 PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 表达有关。

【关键词】 结肠癌; *FLOT2* 基因; 增殖; 凋亡; 侵袭迁移

【中图分类号】 R329.2⁺5; R735.3⁺5 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.04.012

Lentivirus-mediated gene silencing of *FLOT2* affects the proliferation, apoptosis, migration and invasion of colon cancer cells

WU Banming¹, ZHANG Tao², ZHANG Xiurong¹, ZHONG Handi³, WANG Guilin¹

(1. Emergency Department, The Second People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan, China;

2. Laboratory Department, The Second People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan, China;

3. Gastrointestinal Surgery, The Second People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective To construct lentivirus vector that interferes with *FLOT2* expression, and explore the effect of inhibiting *FLOT2* expression on proliferation, apoptosis, invasion and migration of colon cancer cells. **Methods** The expression of *FLOT2* in colorectal cancer tissue and LoVo, SW480 and HT29 cells were detected by qRT-PCR, the expression of *FLOT2* protein was detected by Western blotting. The expression of *FLOT2* was detected by qRT-PCR and Western blotting after the lentivirus vector of *FLOT2* siRNA was transfected into LoVo cells and SW480 cells. MTT assay, flow cytometry, Transwell chamber and Western blotting were used to detect the cell proliferation, apoptosis rate, invasion and migration ability and the expression of PCNA, cleaved caspase 3, E-cadherin and vimentin. **Results** The expression of *FLOT2* mRNA and protein in three colon cancer cells was significantly higher than that in NCM460 cells ($P < 0.05$). After *FLOT2* siRNA lentiviral vector were transfected into LoVo cells and SW480 cells, the expression of *FLOT2* mRNA and protein were significantly reduced, and the ability of cell proliferation, invasion and migration were significantly reduced, apoptosis was promoted, the expression of PCNA and Vimentin was down regulated, and cleaved Caspase3 and E-cadherin were up regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of *FLOT2* expression can significantly reduce the proliferation, invasion and migration of colon cancer cells, and promote apoptosis. The mechanism may be re-

通信作者: 王桂林, 副主任医师, E-mail: 960269686@qq.com

引用本文: 伍班名, 张涛, 张秀容, 等. 慢病毒介导的 *FLOT2* 基因沉默影响结肠癌细胞生物学功能的影响及机制[J]. 西部医学, 2022, 34(4): 530-535. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.04.012

lated to the regulation of PCNA, cleaved caspase 3, E-cadherin and vimentin expression.

【Key words】 Colon cancer; FLOT2 gene; Proliferation; Apoptosis; Invasion and migration

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,近些年的发病率和死亡率升高,严重威胁人们健康及生命^[1]。基因治疗作为近年来一种新的肿瘤诊疗手段引起了广泛关注。基因治疗是通过向靶组织或细胞导入外源 DNA 或 RNA 片段,使致病基因表达水平降低或治疗基因表达增强,从而达到治疗的目的^[2]。因此,寻找影响结肠癌发生发展的有效基因并对其功能确认,对于肿瘤治疗具有重要意义。近些年,脂筏结构蛋白 2(Flo-tillin-2, FLOT2) 基因引起了广大学者的关注。人 FLOT2 基因定位于 17q11-12 上,多项研究^[3-5]发现, FLOT2 的高表达可影响乳腺癌、鼻咽癌、口腔鳞状细胞癌等肿瘤细胞生长,可能成为抗肿瘤治疗靶点。另有研究^[6]发现,结直肠癌组织及细胞 FLOT2 表达升高,其表达与浸润深度、淋巴结转移、远处转移等有关,但 FLOT2 对结肠癌细胞生物学特性及机制研究尚未明确。因此,本研究旨在通过将 FLOT2 siRNA 慢病毒载体转染结肠癌细胞,观察细胞增殖、侵袭迁移及凋亡率变化,并进一步研究其机制。

1 材料与方法

1.1 组织样本 选取 2018 年 10 月~2019 年 5 月在我院行住院手术治疗的结直肠癌患者肿瘤及癌旁组织(距癌变部位大于 5 cm)标本,共 40 对,其中男性 16 例,女性 24 例。所有组织切除后即刻送往实验室冲洗干净,然后放置在液氮罐中冷冻,在 -80℃ 冰箱保存。所有患者经过病理确诊,且相关病历及治疗完整;术前均未行放化疗及靶向药物治疗等干预措施;患者无其他组织或器官的恶性肿瘤。样本采集经过患者知情同意,签署知情同意书,并经过医院伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器 胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶均购自美国 Hyclone 公司, RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,反转录试剂盒购自日本 TAKARA 公司, FLOT2、PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 抗体均购自美国 Abcam, MTT、DMSO 均购自美国 Sigma 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司,细胞凋亡试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,紫外分光光度计购自美国 Perkin Elmer 公司,酶标仪购自美国 Thermo 公司,流式细胞仪购自美国 BD。

1.3 细胞及培养 人正常结肠上皮细胞 NCM460 及结肠癌 LoVo、SW480 及 HT29 细胞均购自美国 ATCC。细胞常规复苏后,置于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱,使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培

养。实验为生长至对数期的细胞。

1.4 qRT-PCR 检测 RNA 表达水平 根据 RNA 抽提试剂盒说明提取组织及细胞总 RNA,利用分光光度仪检测 RNA 的浓度及纯度,将总 RNA 逆转录为 cDNA。设计 FLOT2 引物: F: 5'-GGCTTGTGAGCAGTTTCTGG-3', R: 5'-TCGAAGGCTCGCTTAGAGTC-3'; 内参 GAPDH 引物: F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGT-3'。PCR 反应体系: SYBR Green 10 μL, 上下游引物: 各 0.5 μL, cDNA 1 μL, 加入 ddH₂O 至 20 μL。反应条件为 95℃ 5 min, 接着 35 个循环, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 FLOT2 mRNA 相对表达水平。设置 5 个复孔, 实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测蛋白水平 细胞中加入适量 RIPA 裂解液,裂解反应结束后,离心,上清即为提取蛋白。蛋白与上样缓冲液混匀后在 100℃ 变性 5 min,取等量变性蛋白上样,经 SDS-PAGE 分离,电泳结束后转 PVDF 膜。洗膜,5% 脱脂奶粉封闭膜,1 h 后加一抗工作液,4℃ 孵育过夜,洗膜,加入 HRP 标记的二抗,37℃ 孵育 1 h。洗膜, ECL 显色, Bio-Rad 扫描分析。以检测的目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 分组及慢病毒转染 以 2×10⁵/孔接种生长至对数期的 LoVo 细胞和 SW480 细胞于 24 孔板,于培养箱内常规培养。实验分为空白组(细胞未感染)、si-NC 组(空载体慢病毒感染)和 si-FLOT2 组(FLOT2 siRNA 慢病毒感染)。观察到细胞达 70% 生长密度时,将病毒稀释液(MOI=30)依照分组加入到相应的孔内,感染 5 d,细胞感染效率达到 80% 时,继续孵育 48 h。加入 4 μg/mL 嘌呤霉素以筛选 FLOT2 表达沉默的细胞株。采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测转染后的细胞 FLOT2 的感染效果。

1.7 MTT 实验检测细胞增殖能力 取转染后处于生长至对数期的 LoVo 细胞和 SW480 细胞,制备成单细胞悬液,细胞计数后将浓度调整为 1×10⁴ 个/mL,96 孔板每孔加 100 μL 细胞悬液,于培养箱内常规培养,每组 5 个复孔,设置 24、48 和 72 h 三个时间梯度加 MTT 液,每孔 20 μL,培养箱内常规培养 2 h,弃掉孔内上清,在每孔中加 100 μL DMSO,结晶溶解后,酶标仪测定 490 nm 波长光密度值(OD)。实验重复 3 次。

1.8 Transwell 实验检测侵袭、迁移能力 细胞侵袭检测:首先将 Transwell 小室底部膜上室面使用 Ma-

trigel 稀释液包被, 4℃ 风干。吸出残余在培养板中液体, 按照 50 μ L/孔加无血清培养液, 37℃, 30 min。将小室放入培养板中, 上室中加无血清培养基 300 μ L, 室温静置 30 min, 以使基质胶再水化。细胞悬液制备前可饥饿处理细胞 12~24 h, 以进一步除去血清的影响。胰酶消化细胞, 细胞计数后将密度调整为 1×10^5 个/mL, 小室上室中加 100 μ L 细胞悬液, 下室中含血清培养基 500 μ L, 于培养箱培养 24 h。使用棉签轻轻擦去上室内细胞及基质胶, 取出小室, 倒置风干后, 0.1% 结晶紫染色, 37℃ 30 min 取出。PBS 清洗, 显微镜下随机选择 5 个视野, 照相, 计数。实验重复 3 次。细胞迁移检测: 实验步骤同细胞侵袭实验, 差异在于 Transwell 小室底部膜上室面未铺 Matrigel。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡实验 收集慢病毒感染 48 h 的各组 LoVo 细胞和 SW480 细胞, 胰酶消化、计数细胞, 使 1 mL 细胞悬液中至少含 1×10^6 个细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞, 离心, 加入 300 μ L 结合缓冲液重悬细胞, 使其浓度大于 1×10^5 /mL, 避光环境分别加入 5 μ L 的 AnnexinV-FITC 和 PI 工作液, 混匀, 室温避光反应 15~20 min。上机检测前补加 500 μ L 结合缓冲液, 1 h 内通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.10 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS21.0 软件进行分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组差异比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织及细胞 FLOT2 的表达 通过 qRT-PCR 检测结肠癌组织及人正常结肠上皮细胞 NCM460 及结肠癌 LoVo、SW480 及 HT29 细胞 FLOT2 的表达水平, Western blot 检测结肠癌细胞 FLOT2 蛋白水平, 与癌旁组织 FLOT2 水平比较, 结肠癌组织 FLOT2 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 与 NCM460 细胞比较, FLOT2 在三个结肠癌细胞 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), 见图 1、表 1。

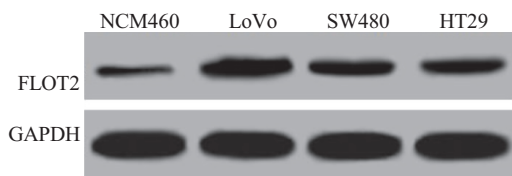


图 1 Western blot 检测结肠癌细胞 FLOT2 的表达

Figure 1 Western blot detection of FLOT2 expression in colon cancer cells

2.2 慢病毒感染后 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 表达 慢病毒感染 LoVo 细胞和 SW480 细胞

表 1 不同结肠癌细胞 FLOT2 mRNA 及蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The relative expression levels of FLOT2 mRNA and protein in different colon cancer cells

细胞	n	FLOT2 mRNA 表达水平	FLOT2 蛋白水平
NCM460	3	1.00 $\pm$ 0.00	0.054 $\pm$ 0.005
LoVo	3	5.456 $\pm$ 0.431 ^①	0.505 $\pm$ 0.056 ^①
SW480	3	4.118 $\pm$ 0.321 ^①	0.277 $\pm$ 0.034 ^①
HT29	3	3.997 $\pm$ 0.262 ^①	0.251 $\pm$ 0.028 ^①
F		118.881	80.203
P		<0.001	<0.001

注: 与 NCM460 细胞比较, ^① $P < 0.05$

胞后, 采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测各组细胞 FLOT2 表达水平, 结果显示, 两株细胞空白组和 si-NC 组 FLOT2 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 si-FLOT2 组 FLOT2 mRNA 及蛋白表达水平均明显低于空白组 (均 $P < 0.05$), 见图 2、表 2。

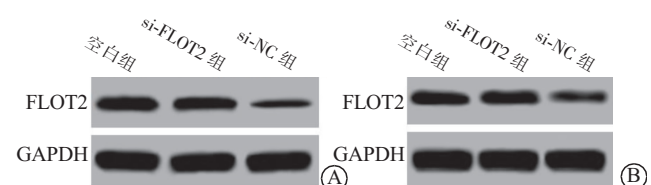


图 2 慢病毒感染后 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 表达水平

Figure 2 FLOT2 expression levels in LoVo cells and SW480 cells after lentivirus infection

注: A. LoVo 细胞; B. SW480 细胞

表 2 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 mRNA 及蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression levels of FLOT2 mRNA and protein in LoVo cells and SW480 cells

组别	n	LoVo 细胞	
		FLOT2 mRNA 表达水平	FLOT2 蛋白水平
空白组	3	1.00 $\pm$ 0.00	0.411 $\pm$ 0.036
si-NC 组	3	0.991 $\pm$ 0.114	0.403 $\pm$ 0.032
si-FLOT2 组	3	0.215 $\pm$ 0.023 ^①	0.101 $\pm$ 0.012 ^①
F		135.137	114.063
P		<0.001	<0.001

组别	n	SW480 细胞	
		FLOT2 mRNA 表达水平	FLOT2 蛋白水平
空白组	3	1.00 $\pm$ 0.00	0.388 $\pm$ 0.041
si-NC 组	3	1.005 $\pm$ 0.068	0.397 $\pm$ 0.038
si-FLOT2 组	3	0.267 $\pm$ 0.031 ^①	0.147 $\pm$ 0.018 ^①
F		290.589	52.477
P		<0.001	<0.001

注: 与空白组比较, ^① $P < 0.05$

2.3 抑制 FLOT2 表达对 LoVo 细胞和 SW480 细胞增殖活力的影响 MTT 法检测抑制 FLOT2 后的 LoVo

细胞和 SW480 细胞增殖能力,两株细胞 si-NC 组与空白组在三个时间点细胞增殖能力比较差异均无统计学意义($P>0.05$),而 si-FLOT2 组从 48 h 起细胞增殖能力明显低于空白组($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组 LoVo 细胞和 SW480 细胞 OD 值($\bar{x} \pm s$)

Table 3 OD values of LoVo cells and SW480 cells in each group

组别	n	LoVo 细胞		
		24 h	48 h	72 h
空白组	3	0.454±0.042	0.828±0.067	1.121±0.083
si-NC 组	3	0.446±0.040	0.815±0.064	1.111±0.079
si-FLOT2 组	3	0.439±0.041	0.522±0.048 ^①	0.716±0.056 ^①
F		0.100	24.748	29.523
P		0.906	0.001	0.001

组别	n	SW480 细胞		
		24 h	48 h	72 h
空白组	3	0.463±0.045	0.818±0.065	1.136±0.079
si-NC 组	3	0.471±0.048	0.824±0.063	1.123±0.083
si-FLOT2 组	3	0.459±0.039	0.581±0.052 ^①	0.754±0.062 ^①
F		0.087	15.864	24.943
P		0.918	0.004	0.001

注:与空白组比较,① $P<0.05$

2.4 抑制 FLOT2 表达对 LoVo 细胞和 SW480 细胞侵袭迁移能力的影响 Transwell 小室检测 FLOT2 siRNA 慢病毒感染 LoVo 细胞和 SW480 细胞 48 h 的细胞侵袭迁移能力,结果显示,抑制 LoVo 细胞 SW480 细胞 FLOT2 表达后,细胞侵袭和迁移均降低,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3 和表 4。

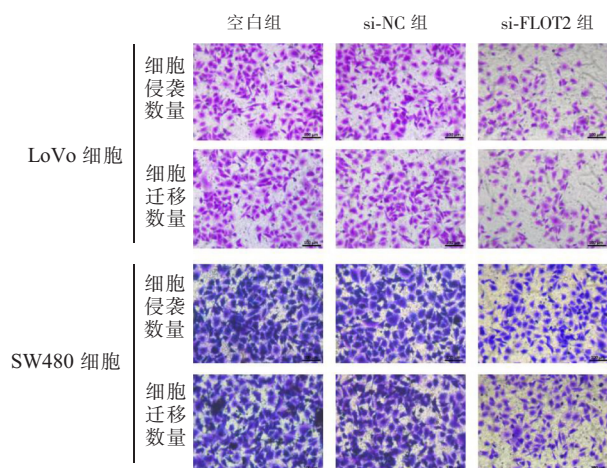


图 3 Transwell 检测细胞迁移和侵袭

Figure 3 Transwell detects cell migration and invasion

2.5 抑制 FLOT2 表达对 LoVo 细胞和 SW480 细胞凋亡的影响 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测各组 LoVo 细胞和 SW480 细胞凋亡率变化,结果显示,抑制 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 表达,细胞凋亡率升高,与空白组比较差异有统计学意义($P<$

0.05),见表 4 和图 4。

表 4 各组 LoVo 细胞和 SW480 细胞侵袭数、迁移数及凋亡率($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Invasion number, migration number and apoptosis rate of LoVo cells and SW480 cells in each group

组别	n	LoVo 细胞		
		细胞侵袭数	细胞迁移数	凋亡率($\times 10^{-2}$)
空白组	3	181.4±7.4	152.5±5.5	2.02±0.17
si-NC 组	3	179.3±6.5	150.2±5.1	2.13±0.18
si-FLOT2 组	3	122.3±4.1 ^①	102.3±4.3 ^①	21.44±2.02 ^①
F		88.906	96.717	271.637
P		<0.001	<0.001	<0.001

组别	n	SW480 细胞		
		细胞侵袭数	细胞迁移数	凋亡率($\times 10^{-2}$)
空白组	3	184.9±7.9	157.7±6.1	1.89±0.21
si-NC 组	3	182.7±7.4	155.5±6.3	1.93±0.18
si-FLOT2 组	3	137.7±4.5 ^①	123.5±3.8 ^①	18.73±1.88 ^①
F		46.474	36.104	234.966
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,① $P<0.05$

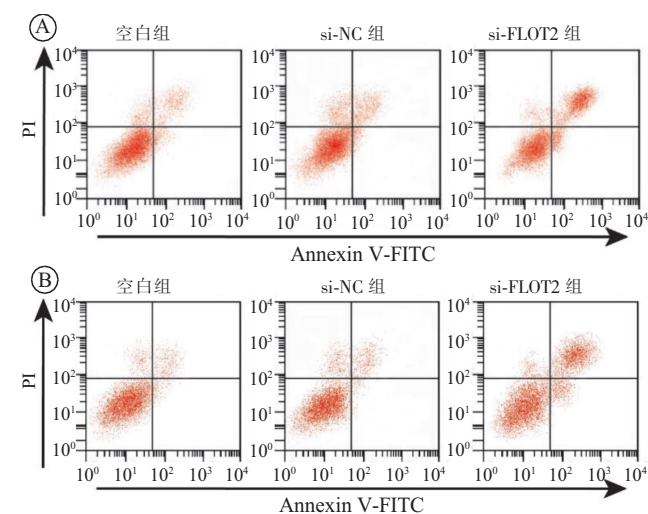


图 4 流式细胞术检测抑制 FLOT2 表达对 LoVo 细胞和 SW480 细胞凋亡的影响

Figure 4 Flow cytometry was used to detect the effect of FLOT2 inhibition on apoptosis of LoVo cells and SW480 cells

注:A. LoVo 细胞;B. SW480 细胞

2.6 抑制 FLOT2 表达对 LoVo 细胞和 SW480 细胞增殖、凋亡、侵袭迁移相关蛋白表达的影响 采用 Western blot 检测各组 LoVo 细胞和 SW480 细胞与增殖、凋亡及 EMT 相关的 PCNA、cleaved caspase3 及 E-cadherin 和 Vimentin 表达,结果显示,抑制 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 表达后,PCNA 和 Vimentin 表达降低,cleaved caspase3 和 E-cadherin 表达升高,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5,表 5、6。

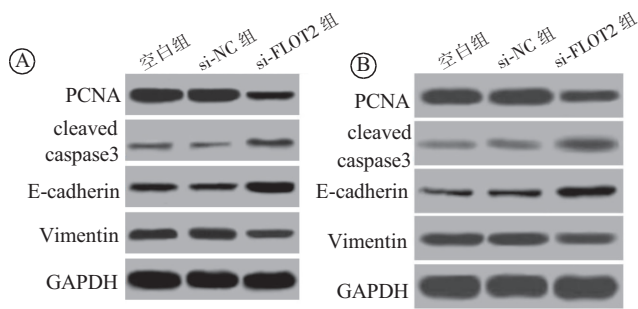


图 5 Western blotting 检测 LoVo 细胞(A)和 SW480 细胞(B)PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 表达

Figure 5 Expression of PCNA, Cleaved caspase3, E-cadherin and Vimentin in LoVo cells (A) and SW480 cells (B) were detected by Western blotting

注: A. LoVo 细胞; B. SW480 细胞

表 5 LoVo 细胞 PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Relative protein expression levels of PCNA, Cleaved caspase3, E-cadherin and Vimentin in LoVo cells

组别	n	PCNA	cleaved caspase3	E-cadherin	Vimentin
空白组	3	0.666±0.063	0.046±0.005	0.148±0.016	0.256±0.026
si-NC 组	3	0.651±0.061	0.038±0.004	0.132±0.013	0.271±0.028
si-FLOT2 组	3	0.155±0.015 ^①	0.075±0.008 ^①	0.341±0.034 ^①	0.106±0.011 ^①
F		96.152	32.486	77.027	47.391
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与空白组比较, ①P<0.05

表 6 SW480 细胞 PCNA、cleaved caspase3、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Relative expression levels of PCNA, Cleaved caspase3, E-cadherin and Vimentin in SW480 cells

组别	n	PCNA	cleaved caspase3	E-cadherin	Vimentin
空白组	3	0.557±0.052	0.032±0.006	0.115±0.014	0.305±0.028
si-NC 组	3	0.571±0.059	0.041±0.005	0.122±0.016	0.311±0.032
si-FLOT2 组	3	0.177±0.021 ^①	0.082±0.010 ^①	0.287±0.026 ^①	0.133±0.015 ^①
F		67.876	39.708	75.609	45.232
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与空白组比较, ①P<0.05

3 讨论

肿瘤发生、发展是一个多阶段、多基因改变、多因素协同作用的复杂过程, 其中抑癌基因失活、癌基因过度表达是肿瘤发生的分子基础, 对与肿瘤相关基因的分子生物学、调节机制及治疗方法研究具有重要意义^[7-8]。多项研究证实, 多种肿瘤中存在 FLOT2 的过表达, 其表达与肿瘤进展有关, 如 Cao 等^[9]研究显示, 胃癌中 FLOT2 表达升高, 下调其表达可抑制癌细胞增殖、侵袭和迁移能力; 李镇伽等^[10]研究显示, 胃癌中 FLOT2 表达升高, 其表达与肿瘤大小、淋巴结转移、浸润深度、远处转移及 AJCC 分期相关, 低表达 FLOT2 的胃癌患者 5 年总体生存率明显升高。miR-103a-3p、

miR-485-5p 通过靶向下调 FLOT2 表达抑制甲状腺癌细胞的增殖, 促进凋亡^[11-12]。既往研究^[6]表明, FLOT2 在结肠癌中高表达, 但其表达对结肠癌细胞生长及机制研究尚未明确。因此, 本研究检测不同结肠癌细胞 FLOT2 表达情况, 发现结肠癌 LoVo 细胞 FLOT2 表达最高, 因此选择作为研究对象。采用慢病毒 RNA 干扰技术沉默 LoVo 细胞和 SW480 细胞 FLOT2 表达, 探究其生物学特性改变, 结果显示, FLOT2 表达受到抑制后, LoVo 细胞和 SW480 细胞增殖及侵袭迁移均明显降低, 凋亡率升高。提示 FLOT2 可能与结肠癌进展有关。

PCNA 是 DNA 复制过程的必需因子, 肿瘤中 PCNA 表达升高, 已将其作为肿瘤是否增殖的标志物^[13-14]。有研究显示, 乳腺癌中 FLOT2 表达升高, 抑制 FLOT2 的表达可降低 PCNA 表达^[15]。caspase 家族成员是细胞凋亡过程最为重要的蛋白类, 而 caspase3 是 caspase 家族最为重要的一种, 是多种凋亡途径中共同的下游效应部分, 其活化后可使凋亡发生不可逆, 因此被称为“死亡执行蛋白酶”^[16]。肿瘤转移是一个包括基质降解、血管生成、运动增强、细胞黏性改变等的多步骤、多因子参与的复杂过程, 目前肿瘤转移是在全世界范围内导致肿瘤患者死亡的一个首要原因^[17-18]。近年来研究证实, 上皮-间充质转换 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 与肿瘤侵袭转移密切相关, 是决定侵袭转移程度的一个关键因素^[19]。E-cadherin 是 EMT 发生的重要标志, 其在包括结肠癌在内的肿瘤中表达减少可引起细胞活性增强及细胞间黏附力减弱^[20-21]。有研究显示, 食管癌中 FLOT2 高表达, 其表达可促进癌细胞生长和侵袭能力^[22]; miR-449a 可通过靶向 FLOT2 抑制 TGF- β 介导的 EMT 而抑制胃癌细胞侵袭^[23]; FLOT2 可通过调节细胞周期和诱导肝细胞癌 EMT 促进肿瘤生长和转移^[24]。本研究结果显示, LoVo 细胞 FLOT2 表达受到抑制后, PCNA 和 Vimentin 表达明显降低, cleaved caspase3 和 E-cadherin 表达明显升高, 提示 FLOT2 可能通过调节 PCNA、spase3、E-cadherin 和 Vimentin 表达影响结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移。核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激活通过促进细胞增殖、血管生成、侵袭和转移, 抑制细胞凋亡在结肠癌进展中起促进作用^[25]。有研究^[26]报道干扰 FLOT2 通过抑制 NF- κ B 信号通路可诱导胃癌细胞凋亡。但 FLOT2 是否通过调控 NF- κ B 信号通路调控结肠癌细胞生物学行为进一步研究。

4 结论

结肠癌细胞 FLOT2 表达升高, 抑制 FLOT2 表达可抑制结肠癌细胞增殖、侵袭和迁移, 促进细胞调

亡。FLOT2 可能是结肠癌的潜在诊断标记物和治疗靶点, FLOT2 在结肠癌中的具体作用机制需进一步研究。

【参考文献】

- [1] GURKAN A C, ARISAN E D, YERLIKAYA P O, *et al.* Inhibition of autophagy enhances DENSp^m-induced apoptosis in human colon cancer cells in a p53 independent manner[J]. *Cellular Oncology*, 2018, 41(3): 297-317.
- [2] KITANO H, ISHIKAWA T, TAMURA E, *et al.* Efficient cancer gene therapy with a Del1 fragment administered by hypodermic injection in a mouse explanted tumor model[J]. *Translational Cancer Research*, 2018, 7(3): 686-694.
- [3] CARBONNELLE D, LUU TH, CHAILLOU C, *et al.* LXR Activation Down-regulates Lipid Raft Markers FLOT2 and DHHC5 in MCF-7 Breast Cancer Cells[J]. *anticancer research*, 2017, 37(8): 4067-4073.
- [4] LIU W, LIU X, WANG L, *et al.* PLCD3, a flotillin2-interacting protein, is involved in proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(1): 45-52.
- [5] WEN Q, ALNEMAH M M, LUO J, *et al.* FLOT-2 is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma[J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(7): 8236-8243.
- [6] LI T, CAO C, XIONG Q, *et al.* FLOT2 overexpression is associated with the progression and prognosis of human colorectal cancer[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(3): 2802-2808.
- [7] SHIH Y L, HUANG Y H, LIN K H, *et al.* Identification of Functional Thyroid Stimulating Hormone Receptor and TSHR Gene Mutations in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Anticancer Research*, 2018, 38(5): 2793-2802.
- [8] JUNG Y Y, SUNG J Y, KIM J Y, *et al.* Down-regulation of B-Cell Translocation Gene 1 by Promoter Methylation in Colorectal Carcinoma[J]. *Anticancer Research*, 2018, 38(2): 691-697.
- [9] CAO K, XIE D, CAO P, *et al.* SiRNA-Mediated Flotillin-2 (Flot2) Downregulation Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Gastric Carcinoma Cells[J]. *Oncology Research Featuring Preclinical & Clinical Cancer Therapeutics*, 2014, 21(5): 271-279.
- [10] 李镇伽, 虞黎明, 徐苏鸣, 等. Flotillin-2 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(6): 629-633.
- [11] 刘兵雄, 李学刚. MiR-103a-3p 靶向 FLOT2 调控甲状腺癌细胞增殖, 凋亡的分子机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1668-1675.
- [12] 张磊, 李国良, 孟帮柱, 等. miR-485-5p 通过靶基因 FLOT2 调控甲状腺癌细胞增殖, 凋亡的分子机制[J]. *中国老年学杂志* 2020, 15(40): 3313-3319.
- [13] DAYAHINDARA VEITIA, LIUZZI J, VILA M, *et al.* Prevalence of HPV and EBV infection and their relationship with the p53 and PCNA expression in oral carcinoma patients[J]. *Journal of Oral Research*, 2017, 6(4): 86-91.
- [14] LI C, WU M, ZONG G, *et al.* Overexpression of Protein Phosphatase 1 γ (PP1 γ) Is Associated with Enhanced Cell Proliferation and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *digestive diseases & sciences*, 2017, 62(1): 1-10.
- [15] 赵海军, 王泽阳, 王娟. 脂筏结构蛋白 1 基因在乳腺癌细胞中的表达及靶向抑制其表达对癌细胞凋亡的诱导[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(6): 1428-1431.
- [16] HONG H, AN J C, CRUZ J F D L, *et al.* Cnidium officinale Makino extract induces apoptosis through activation of caspase-3 and p53 in human liver cancer HepG2 cells[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 14(4): 3191-3197.
- [17] CAO K, LI J, ZHAO Y, *et al.* miR-101 Inhibiting Cell Proliferation, Migration and Invasion in Hepatocellular Carcinoma through Downregulating Girdin[J]. *Molecular Cells*, 2016, 39(2): 96-102.
- [18] HUA S, LEI L, DENG L, *et al.* miR-139-5p inhibits aerobic glycolysis, cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via a reciprocal regulatory interaction with ETS1[J]. *Oncogene*, 2018, 37(12): 1060-1061.
- [19] MURAKAMI K, YUNYAN W U, IMAIZUMI T, *et al.* DEC1 promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomedical Research*, 2017, 38(4): 221-227.
- [20] ZHANG Z F, BU X L, CHEN H, *et al.* Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin[J]. *international journal of molecular medicine*, 2016, 38(4): 1199-1207.
- [21] WANG W, YUE Z, TIAN Z, *et al.* Expression of Yin Yang 1 in cervical cancer and its correlation with E-cadherin expression and HPV16 E6[J]. *Plos One*, 2018, 13(2): e0193340.
- [22] 李莉娜, 肖鹏, 王云峰, 等. Flot-2 高表达促进食管鳞状细胞癌的生长和侵袭[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2017, 26(2): 160-164.
- [23] LI Q, PENG J, LI X, *et al.* miR-449a targets Flot2 and inhibits gastric cancer invasion by inhibiting TGF- β -mediated EMT[J]. *Diagnostic Pathology*, 2015, 10(1): 202-209.
- [24] WANG C H, ZHU X D, MA D N, *et al.* Flot2 promotes tumor growth and metastasis through modulating cell cycle and inducing epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2017, 7(5): 1068-1083.
- [25] PATEL M, HORGAN P G, MCMILLAN D C, *et al.* NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer[J]. *Transl Res*, 2018, 197(1): 43-56.
- [26] 雷蕾, 张涛, 叶斌, 等. RNA 干扰 FLOT2 基因表达下调 NF- κ B 信号对胃癌细胞凋亡诱导作用研究[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(6): 620-624.

(收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2022-01-01; 编辑: 黎仕娟)