

沉默 *FOXQ1* 基因抑制肝细胞癌 SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力

王城^{a,b,c}, 吴斌^d, 严舒^d, 邓大炜^d, 曾丽娟^e, 李建水^{a,d} (川北医学院附属医院 a. 肝胆胰肠研究所; b. 普外科; c. 儿外科; d. 肝胆外科; e. 信息科, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:** 探讨沉默叉头框蛋白 Q1 (forkhead box Q1, *FOXQ1*) 基因后对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力的影响及其机制。 **方法:** 制备 *FOXQ1*-shRNA、NC-shRNA 重组慢病毒, 将其感染到 SMMC-7721 细胞中; 实验设干扰组、阴性对照组和空白组, 用 Transwell 小室法检测细胞迁移、侵袭能力; 利用 qRT-PCR 和 Western blotting 法检测 SMMC-7721 细胞中 *FOXQ1*、*MMP-2* 和 *MMP-9* mRNA 和蛋白的表达。 **结果:** 随着肝癌 SMMC-7721 细胞的迁移侵袭能力的增强, *FOXQ1* 的表达逐渐增加; 干扰组较阴性对照组与空白组 *FOXQ1* 表达水平降低 [(0.34 ± 0.03) vs (0.89 ± 0.07) 和 (0.84 ± 0.05)], $P < 0.05$]; 沉默 *FOXQ1* 基因后, SMMC-7721 细胞的迁移侵袭能力显著下降 [(9.67 ± 1.15) vs (25.67 ± 2.08) 和 (27.33 ± 2.52)], $P < 0.05$], *MMP-2* 与 *MMP-9* 表达水平下降 [*MMP-2*: (0.35 ± 0.04) vs (0.61 ± 0.05) 和 (0.65 ± 0.08); *MMP-9*: (0.40 ± 0.05) vs (0.73 ± 0.07) 和 (0.77 ± 0.06)], 均 $P < 0.05$]。 **结论:** 沉默 *FOXQ1* 基因的表达能够抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的迁移、侵袭能力, 其机制可能与 *MMP-2* 与 *MMP-9* 的表达下调有关。

[关键词] 肝细胞癌; 叉头框蛋白 Q1 基因; 转录因子; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)01-0048-05

Inhibitory effect of *FOXQ1* gene silencing on migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

WANG Cheng^{a,b,c}, WU Bin^d, YAN Shu^d, DENG Dawei^d, ZENG Lijuan^e, LI Jianshui^{a,d} (a. Institute of Hepato-Biliary-Pancreas and Intestinal Disease; b. Department of General Surgery; c. Pediatric Surgery; d. Department of Hepatobiliary Surgery; e. Information Centre, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Forkhead box Q1 (*FOXQ1*) gene silencing on migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **Methods:** *FOXQ1*-shRNA and NC-shRNA recombinant lentiviral vectors were constructed and transduced into SMMC-7721 cells. There were interfered group, negative group and blank group. Transwell chamber assay was used to detect the abilities of cell migration and invasion. qRT-PCR and Western blotting were used to examine the mRNA and protein expressions of *FOXQ1*, *MMP-2* and *MMP-9* in SMMC-7721 cells. **Results:** *FOXQ1* expression level was positively correlated to the migration and invasion abilities of SMMC-7721 cells; Compared with the negative group and blank group, the expression level of *FOXQ1* was decreased in interfered group [(0.34 ± 0.03) vs [0.89 ± 0.07] and [0.84 ± 0.05]], $P < 0.05$]; After *FOXQ1* gene silencing, the cell migration and invasion abilities of SMMC-7721 cells were significantly decreased ([9.67 ± 1.15] vs [25.67 ± 2.08] and [27.33 ± 2.52]], $P < 0.05$], in the meanwhile, the expressions of *MMP-2* and *MMP-9* were down-regulated significantly [*MMP-2*: [0.35 ± 0.04] vs [0.61 ± 0.05] and [0.65 ± 0.08]]; *MMP-9*: [0.40 ± 0.05] vs [0.73 ± 0.07] and [0.77 ± 0.06]], all $P < 0.05$). **Conclusion:** *FOXQ1* gene silencing could suppress migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. Its mechanism might be related to the down-regulation of *MMP-2* and *MMP-9*.

[Key words] hepatocellular carcinoma; Forkhead box Q1 (*FOXQ1*) gene; transcription factor; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 48-52. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.010]

[基金项目] 四川省教育厅科研资助项目 (No. 12ZB218)。Project supported by the Scientific Research Foundation of the Education Bureau of Sichuan Province (No. 12ZB218)

[作者简介] 王城 (1974 -), 男, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事小儿外科基础与临床研究, E-mail: 16398765@qq.com

[通信作者] 李建水 (LI Jianshui, corresponding author), 博士, 副教授, 主要从事肝胆胰肠疾病的诊治研究, E-mail: ljs2005doctor@126.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,全球每年有 750 万新发病例,约 60 万人死于 HCC^[1]。肿瘤的侵袭转移是 HCC 患者病死率较高的主要原因,相当一部分 HCC 患者确诊时已发生临床转移或微转移^[2]。然而,目前对于 HCC 的侵袭转移的潜在机制仍不太清楚。叉头框(Forkhead box)蛋白是一类广泛存在的转录因子,FOXQ 属于 I 类 FOX 家族成员,叉头框蛋白 Q1(Forkhead box Q1, *FOXQ1*)基因属于 FOXQ 亚族,是叉头框基因家族新发现的重要成员之一,作为转录因子调控人类重要的生理、病理进程^[3]。近年研究^[4-7]表明, *FOXQ1* 在多种肿瘤中异常高表达,作为原癌基因的角色被人们认识,可与多条信号通路或 miRNAs 交互作用调控肿瘤的发生发展、分化、血管生成、肿瘤复发、肿瘤微环境及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。 *FOXQ1* 已经迅速成为肿瘤研究领域中的热点之一,但对其在 HCC 中的研究报道较少。本研究利用 RNAi 技术,观察沉默 *FOXQ1* 基因对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭能力的影响,并探讨其相关作用机制,旨在为 HCC 的分子靶向治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人肝癌细胞 SMMC-7721、肝癌细胞 HepG2、正常肝细胞 L02 细胞均由川北医学院肝胆胰肠研究所提供,人肝癌细胞 Huh7 从重庆医科大学生命科学院实验室获得。RNA 提取试剂盒、PCR 逆转录与扩增试剂盒、SYBYGreen 荧光染料、qRT-PCR 引物购自 TaKaRa 公司,Western blotting 相关试剂盒均购自上海碧云天公司, *FOXQ1* 一抗购自 Santa Cruz 生物技术有限公司,兔抗人 *MMP-2*、*MMP-9* 和 *GAPDH* 多克隆一抗体均购自武汉三鹰公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自上海生工公司,Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自 BD 公司。

1.2 细胞培养与分组

细胞用 RPMI 1640 或 DMEM(高糖)加 10% 胎牛血清、37 °C、5% CO₂ 常规湿度培养。实验分为干扰组(感染 *FOXQ1*-shRNA 的 SMMC-7721 细胞)、阴性对照组(感染 negative control 的 SMMC-7721 细胞)、对照组(未经处理的 SMMC-7721 细胞)。

1.3 qRT-PCR 与 Western blotting 法检测慢病毒感染效果

用于感染携带 *FOXQ1*-shRNA 重组慢病毒与阴性对照慢病毒(pLKD. CMV. GFP. U6)为纽恩生物科技公司产品。*FOXQ1*-shRNA 干扰序列:CGCGGAC-UUUGCACUUUGA;阴性对照慢病毒序列(negative control, NC)-shRNA:TTCTCCGAACGTGTCACGT,每孔以 MOI 30、终质量浓度为 5 μg/ml/孔的 polybrene,24 h 后换液,72 h 后荧光显微镜下观察荧光强度。qRT-PCR 与 Western blotting 检测干扰效果。

1.4 qRT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞的 mRNA 的表达

RNA 提取、逆转录、扩增方法与步骤按照试剂盒说明书操作,逆转录条件为:37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存。扩增条件为:95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 50 °C ~ 60 °C 不等退火 30 s, 共 40 个循环,根据各目的基因 2^{-ΔΔCt} 值计算表达量,所有实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测 SMMC-7721 细胞的蛋白表达

总蛋白质提取与浓度测定按照说明书操作,蛋白热变性后 -20 °C 冰箱保存,行 SDS-PEAG 凝胶电泳,每孔道蛋白上样量为 40 μg,电泳时间约为 2 h。根据各目的蛋白质预测分子量切胶,4 °C 环境下用 250 mA 恒流湿法转膜至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入稀释的一抗,4 °C 孵育过夜,次晨复温 2 h, TBST 漂洗后加入稀释的二抗,37 °C 孵育 1 h, *GAPDH* 为内参, ECL 化学发光,用 Quantity One 灰度分析软件分析,实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室法检测 SMMC-7721 细胞的迁移、侵袭能力

1.6.1 细胞迁移实验 取对数期生长各组细胞悬液(5 × 10⁴ 个/400 μl)加入上室,下室加入 600 μl 全培养基,常规培 24 h,擦净上室细胞, PBS 清洗 2 次,结晶紫或苏木素染色, PBS 清洗后常规制片,显微镜下随机选取 10 个视野进行摄像,然后统计结果。实验重复 3 次。

1.6.2 细胞侵袭试验 将融化基质胶与 4 °C 预冷的无血清培养基体积比 1:3 进行稀释,取稀释液 40 μl 铺于 Transwell(孔径大小 0.8 μm)上室面。紫外灯下过夜,使用前用无血清培养基水化。其余步骤同迁移实验。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的均数比较采用一维方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌 SMMC-7721 细胞的迁移、侵袭能力强

体外侵袭实验结果显示,肝癌 SMMC-7721 细胞的侵袭能力显著强于 HepG2 细胞、Huh7 细胞和正常肝 L02 细胞 [(106.33 ± 4.16) vs (55.00 ± 4.36), (50.33 ± 5.51) 和 (5.33 ± 1.53), $P < 0.05$]。

2.2 肝癌 SMMC-7721 细胞中 FOXQ1 蛋白高表达

Western blotting 检测结果(图1)显示,SMMC-7721 细胞中 FOXQ1 蛋白的表达水平最高,HepG2、Huh7 细胞中表达无明显差异,L02 中几乎不表达;4 株细胞间表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

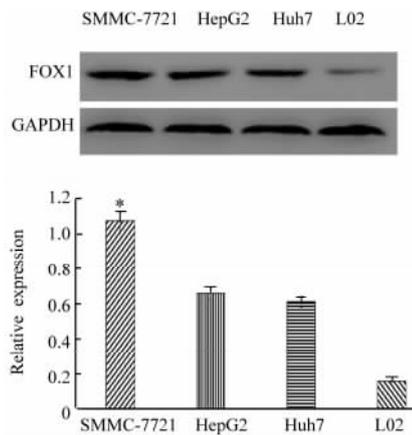
2.3 FOXQ1-shRNA 重组慢病毒感染的 SMMC-7721 细胞绿色荧光蛋白表达

FOXQ1-shRNA 重组慢病毒感染 72 h 后,倒置荧光显微镜下通过白光(图2A)、荧光(图2B)及重叠图像(图2C)观察,可见感染慢病毒的 SMMC-7721 细胞有绿色荧光蛋白表达,感染率约为 90% 左右。

2.4 沉默 FOXQ1 降低 SMMC-7721 细胞 FOXQ1 mRNA 和蛋白的表达

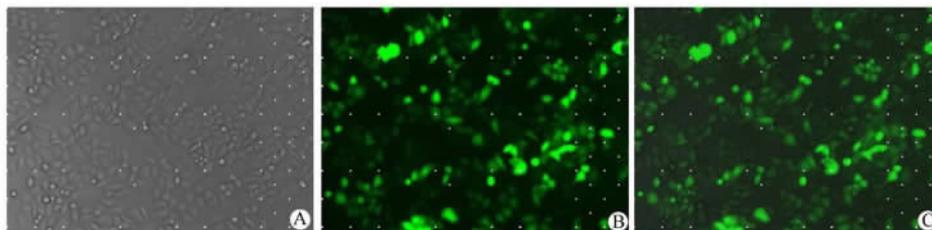
Western blotting 和 qRT-PCR 法检测结果(图3)

显示,干扰组中 SMMC-7721 细胞 FOXQ1 mRNA 与蛋白的表达明显低于空白组与阴性对照组($P < 0.05$)。



A: Expression of FOXQ1 protein; B: Relative expression of FOXQ1 protein
* $P < 0.05$ vs HepG2, Huh7 and L02 cells respectively

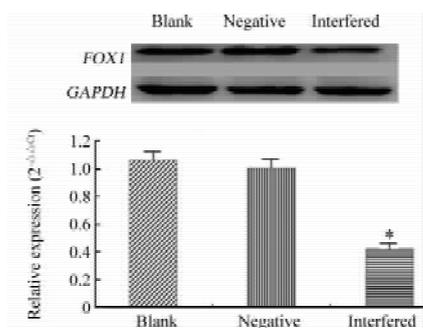
图1 肝癌细胞系和正常肝细胞中 FOXQ1 的表达
Fig.1 Expression of FOXQ1 protein in four hepatocellular carcinoma cell lines



A: White light microscope; B: Fluorescence microscope; C: Overlapped images

图2 感染 72 h 后 SMMC-7721 细胞内绿色荧光蛋白的表达(× 200)

Fig.2 Green fluorescent protein was observed under fluorescence microscope 72 h after SMMC-7721 cells were transduced with lentivirus (× 200)



A: Expression of FOXQ1 protein; B: Expression of FOXQ1 mRNA
* $P < 0.05$ vs negative or blank group

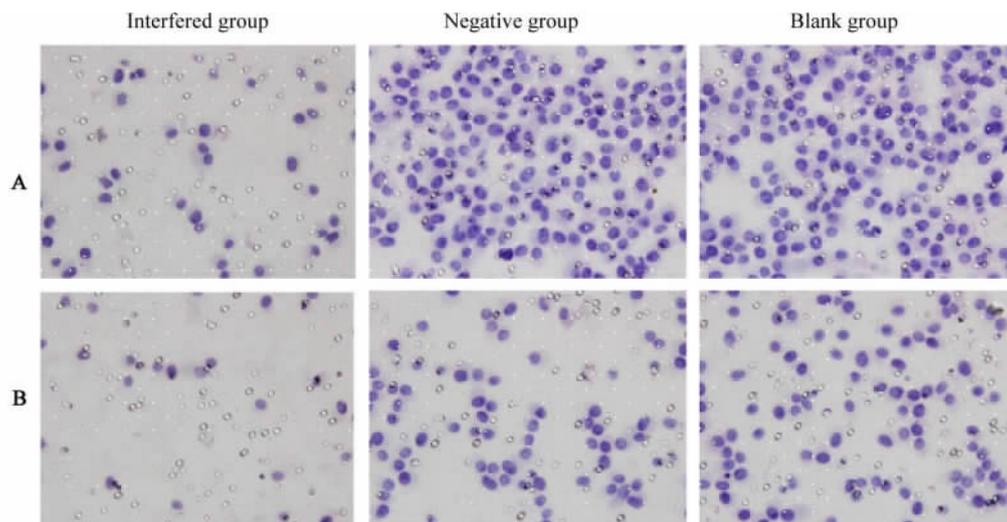
图3 不同处理组 SMMC-7721 细胞 FOXQ1 表达变化
Fig.3 Expression of FOXQ1 in SMMC-7721 cells in various treatment groups

2.5 沉默 FOXQ1 降低 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭的能力

体外细胞迁移侵袭实验结果(图4)显示,干扰组 SMMC-7721 细胞穿过小室膜的细胞数也明显少于阴性对照组及空白组 [(9.67 ± 1.15) vs (25.67 ± 2.08) 和 (27.33 ± 2.52), $P < 0.05$]。

2.6 沉默 FOXQ1 降低 SMMC-7721 细胞 MMP-2、MMP-9 的表达

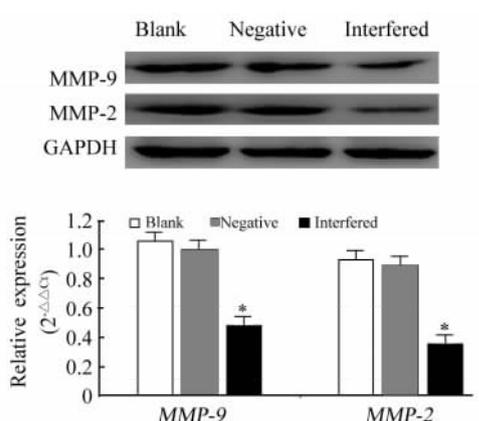
Western blotting 和 qRT-PCR 法检测结果(图5)显示,干扰组 SMMC-7721 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达量明显低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$)。



A: Invasion assay; B: Migration assay

图 4 不同处理组 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力的变化(×200)

Fig. 4 Migration and invasion abilities of SMMC-7721 cells in various treatment groups(×200)



A: Expression of MMP-2, MMP-9 protein;

B: Expression of *MMP-2*, *MMP-9* mRNA

* $P < 0.05$ vs negative or blank groups

图 5 不同处理组 SMMC-7721 细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达

Fig. 5 Expressions of MMP-2, MMP-9 in SMMC-7721 cells in various treatment groups

3 讨论

FOXQ1 基因位于人体 6 号常染色体短臂 25.3 区(6p25.3), 编码的蛋白质有 403 个氨基酸^[8]。*FOXQ1* 作为转录因子调控上皮细胞及平滑肌细胞分化、T 细胞激活与自身免疫等^[9-10]。*FOXQ1* 在多种肿瘤中异常高表达, 参与肿瘤的发生发展与恶性生物学行为的调控。有研究^[11-12]发现, 在乳腺癌、

胰腺癌中 *FOXQ1* 的表达与肿瘤干细胞的增殖和侵袭能力有关。miRNAs 可通过调控 *FOXQ1* 与 *FOXQ1* 的表达调控结直肠癌细胞的增殖、侵袭和转移^[13-14]。在消化道肿瘤中, *FOXQ1* 调控 Snail 信号通路中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)与波形蛋白(vimentin)的表达调控 EMT, 是消化道肿瘤的一个影响预后独立因素^[15-17]。目前有研究^[18-20]认为, 体内发生侵袭转移的肿瘤细胞都具有从肿瘤母体脱落水解细胞基质、主动进出脉管的能力。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是能够降解细胞外基质和基底膜的蛋白水解酶, 与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关。

为了探讨 *FOXQ1* 对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭能力的影响及其机制, 本研究检测 3 株肝癌细胞与正常肝细胞的迁移、侵袭能力与 *FOXQ1* 的表达, 结果显示, 随着肝癌细胞的迁移、侵袭能力的增强, *FOXQ1* 表达水平增加。提示细胞迁移、侵袭能力可能与 *FOXQ1* 的表达相关。随后, 利用 RNAi 技术, 沉默 SMMC-7721 细胞中 *FOXQ1* 基因后的体外迁移侵袭实验结果显示, 干扰组 SMMC-7721 细胞的迁移、侵袭能力显著低于对照组与空白组($P < 0.05$)。为了进一步揭示沉默 *FOXQ1* 导致 SMMC-7721 细胞的迁移、侵袭能力变化的机制, 又检测了 MMPs 家族中 MMP-2、MMP-9 的表达, 结果发现, 干扰组 SMMC-7721 细胞 *MMP-2*、*MMP-9* mRNA 和蛋白质表达水平显著降低($P < 0.05$)。基底膜是阻止肿瘤细胞侵袭、转移的机械屏障, 沉默 *FOXQ1* 基因

后下调 MMP-2、MMP-9 的表达,使细胞降解基底膜及细胞外基质的能力减弱,癌细胞穿透能力下降,致使癌细胞的“阿米巴样”运动能力减弱,导致肿瘤细胞的迁移、侵袭能力减弱。

综上,FOXQ1 可能是 HCC 细胞侵袭、转移过程中的一个重要的因子,该研究结果为临床 HCC 的基因靶向治疗提供了实验与理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] PORTOLANI N, CONIGLIO A, GHIDONI S, et al. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications[J]. Ann Surg, 2006, 243(2):229-235. DOI:10.1097/01.sla.0000197706.21803.a1.
- [3] FEUERBORN A, SRIVASTAVA P K, KUFFER S, et al. The Forkhead factor FOXQ1 influences epithelial differentiation[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(3):710-719. DOI: 10.1002/jcp.22385.
- [4] PENG X, LUO Z, KANG Q, et al. FOXQ1 mediates the crosstalk between TGF- β and Wnt signaling pathways in the progression of colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7):1099-1109. DOI:10.1080/15384047.2015.1047568.
- [5] MENG F, SPEYER C L, ZHANG B, et al. PDGFR α and β play critical roles in mediating FOXQ1-driven breast cancer stemness and chemoresistance[J]. Cancer Res, 2015, 75(3):584-593. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-3029.
- [6] CHRISTENSEN J, BENTZ S, SENGSTAG T, et al. FOXQ1, a novel target of the Wnt pathway and a new marker for activation of Wnt signaling in solid tumors[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(3): e60051[2016-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608605/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0060051.
- [7] ZHANG Z, MA J, LUAN G, et al. MiR-506 suppresses tumor proliferation and invasion by targeting FOXQ1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2015, 10(4):991-1001. DOI: 10.1371/journal.pone.0122851.
- [8] KATO H, IGARASHI M, FUKUDA H, et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes[J]. Cancer Lett, 2013, 328(2):198-206. DOI:org/10.1016/j.canlet.2012.09.017.
- [9] LI Y, ZHANG Y, YAO Z, et al. Forkhead box Q1: a key player in the pathogenesis of tumors (review)[J]. International J Oncol, 2016, 49(1): 51-58. DOI:10.3892/ijo.2016.3517.
- [10] VERZI M P, KHAN A H, ITO S, et al. Transcription factor FOXQ1 controls mucin gene expression and granule content in mouse stomach surface mucous cells[J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 591-600. DOI:org/10.1053/j.gastro.2008.04.019.
- [11] KIM S H, KASCHULA C H, PRIEDIGKEIT N, et al. Forkhead box Q1 is a novel target of breast cancer stem cell inhibition by diallyl trisulfide[J]. J Biol Chem, 2016, 291(26):13495-13508. DOI: 10.1074/jbc.M116.715219.
- [12] BAO B, AZMI A S, ABOUKAMEEL A, et al. Pancreatic cancer stem-like cells display aggressive behavior mediated via activation of FOXQ1[J]. J Biol Chem, 2014, 289(21):14520-14533. DOI:10.1074/jbc.M113.532887.
- [13] WENG W, OKUGAWA Y, TODEN S, et al. FOXM1 and FOXQ1 are promising prognostic biomarkers and novel targets of tumor suppressive miR-342 in human colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(19):4947-4957. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-0360.
- [14] VISHNUBALAJI R, HAMAM R, YUE S, et al. MicroRNA-320 suppresses colorectal cancer by targeting SOX4, FOXM1, and FOXQ1[J]. Oncotarget, 2016, 7(24):35789-35802. DOI:10.18632/oncotarget.8937.
- [15] KANEDA H, ARAO T, TANAKA K, et al. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth[J]. Cancer Res, 2010, 70(5): 2053-2063. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2161.
- [16] XIANG X J, DENG J, LIU Y W, et al. MiR-1271 inhibits cell proliferation, invasion and EMT in gastric cancer by targeting FOXQ1[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(4):1382-1394. DOI: 10.1159/000430304.
- [17] ABBA M, PATIL N, RASHEED K, et al. Unraveling the role of FOXQ1 in colorectal cancer metastasis[J]. Mol Cancer Res, 2013, 1(9): 1017-1028. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0024.
- [18] NAKAYAMA T, HIRAKAWA H, SHIBATA K, et al. Expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in human colorectal cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion and distant metastasis[J]. Oncol Rep, 2011, 25(4): 929-935. DOI: 10.3892/or.2011.1176.
- [19] PENG X, LUO Z, KANG Q, et al. FOXQ1 mediates the crosstalk between TGF- β and Wnt signaling pathways in the progression of colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7):1099-1109. DOI:10.1080/15384047.2015.1047568.
- [20] 孔祥盼. 转录因子 FOXC1 和长链非编码 RNA FOXCUT 在口腔鳞癌组织中的表达及功能研究[D]. 中国人民解放军医学院, 2014.

[收稿日期] 2016 - 08 - 02

[修回日期] 2016 - 11 - 15

[本文编辑] 党瑞山