

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.003

· 基础研究 ·

低氧环境下甲酰肽受体 1 拮抗剂 Boc2 对人肺腺癌细胞恶性生物学行为的影响

黄波^a, 丁洁^b, 郭红荣^a [武汉大学附属同仁医院(武汉市第三医院) a. 呼吸科; b. 消化内科, 湖北 武汉 430070]

[摘要] **目的:** 探讨低氧环境下甲酰肽受体 1 (formyl peptide receptor 1, FPR1) 的拮抗剂 Boc2 对人肺腺癌细胞迁移、侵袭、增殖及成瘤能力的影响。**方法:** 采用 Western blotting 检测低氧诱导下人肺腺癌细胞 A549 中低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 和 FPR1 蛋白的表达情况。以 FPR1 拮抗剂 Boc2 体外处理低氧诱导的 A549 细胞, 按照随机数字表法分为 3 组: 对照组(常氧条件下培养)、低氧组和低氧+Boc2 处理组。细胞划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验及 MTT 法分别用于检测各组细胞的迁移、侵袭和增殖能力。接种 A549 细胞制备裸鼠移植瘤模型, 同上分 3 组, 4 周后处死裸鼠, 分析各组间裸鼠移植瘤体积、质量、成瘤率以及迁移相关蛋白 E-钙黏素 (E-cadherin, E-cad) 和侵袭相关蛋白 MMP-9 表达量的差异性。**结果:** 低氧诱导能促进 A549 细胞 FPR1 蛋白的表达, 且呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 低氧组细胞的迁移、侵袭及增殖能力均显著增强 ($P < 0.01$), 而相对低氧组, Boc2 处理能显著抑制 A549 细胞的迁移、侵袭和增殖能力 ($P < 0.05$)。低氧组裸鼠成瘤率为 100.0% (15/15), 对照组为 60.0% (9/15), 低氧+Boc2 处理组裸鼠成瘤率为 73.3% (11/15); 低氧组裸鼠移植瘤体积、质量均显著高于对照组 (均 $P < 0.01$); 而相对低氧组, 低氧+Boc2 处理组裸鼠肿瘤体积、质量均有显著降低 (均 $P < 0.01$)。低氧组 E-cad 及 MMP-9 蛋白表达量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而与低氧组相比 Boc2 处理能显著降低 E-cad 及 MMP-9 蛋白表达量 ($P < 0.05$)。**结论:** FPR1 拮抗剂 Boc2 能显著抑制低氧诱导的人肺腺癌细胞 A549 的迁移、侵袭、增殖及成瘤能力, 表明 FPR1 在人肺腺癌的发生发展过程中扮演着重要角色, 并有可能成为人肺腺癌治疗的潜在靶点。

[关键词] 肺腺癌; A549 细胞; 低氧; 甲酰肽受体 1; 迁移; 侵袭; 增殖; 成瘤

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)02-0125-07

Effects of formyl peptide receptor 1 antagonist Boc2 on malignant biological behaviors of human lung adenocarcinoma cells under hypoxia conditions

HUANG Bo^a, DING Jie^b, GUO Hongrong^a [a. Department of Respiration, b. Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University (Wuhan Third Hospital), Wuhan 430070, Hubei, China]

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of FPR1 (formyl peptide receptor 1) antagonist Boc2 on migration, invasion, proliferation and tumorigenicity of human lung adenocarcinoma cells under hypoxia conditions. **Methods:** The protein expressions of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and FPR1 in human lung adenocarcinoma A549 cells induced by hypoxia was detected by Western blotting. FPR1 antagonist Boc2 was used to treat the hypoxia-induced A549 cells *in vitro*. The cells were divided into three groups: control group (cultured under normoxic condition), hypoxia group and hypoxia+Boc2 treatment group. Cell scratch test, transwell matrigel invasion assay and MTT method were used to detect the migration, invasion and proliferation of each group of cells, respectively. The A549 cells of each group were inoculated into nude mice to prepare xenograft model. After 4 weeks, the nude mice were sacrificed, and the differences in average tumor volume and mass, tumor formation rate, the expression of migration-related protein-E-cadherin (E-cad) and invasion-related protein-matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were analyzed. **Results:** Hypoxia induction can promote the expression of FPR1 protein in A549 cells in a time-dependent manner ($P < 0.05$). The results of cell experiments showed that the ability of migration, invasion and proliferation of cells in hypoxia group were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$); while compared with hypoxia group, Boc2 treatment significantly inhibited the migration, invasion and proliferation of A549 cells ($P < 0.05$). The

[基金项目] 武汉市卫生计生委科研基金(No. WX16D11)。Project supported by the Science Foundation of Health and Family Planning Commission of Wuhan Municipality (No. WX16D11)

[作者简介] 黄波(1982-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌的基础与临床研究, E-mail: 3493482001@qq.com

[通信作者] 郭红荣(GUO Hongrong, corresponding author) 硕士, 教授, 主任医师, 主要从事支气管哮喘与肺部肿瘤的基础与临床研究, E-mail: hyg68@tom.com,

results of nude mice experiments showed that the average volume and mass of nude mice in hypoxia group were significantly higher than those in the control group (all $P < 0.01$). But the mean volume and mass of nude mice in hypoxia+Boc2 treatment group were significantly lower than those in the hypoxia group (all $P < 0.01$). The rate of tumor formation in nude mice of hypoxia group was 100.0% (15/15), which was significantly higher than 60.0% (9/15) in the control group ($\chi^2=7.500$, $P=0.006$) and 73.3% (11/15) in the hypoxia + Boc2 treatment group ($\chi^2=4.615$, $P=0.032$). The expression of E-cad and MMP-9 protein in hypoxia group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), while Boc2 treatment significantly decreased the expression of E-cad and MMP-9 protein in hypoxia group ($P < 0.05$). **Conclusions:** FPR1 antagonist Boc2 can significantly inhibit the migration, invasion, proliferation and tumorigenicity of hypoxia-induced human lung adenocarcinoma A549 cells, indicating that FPR1 plays an important role in the development and progression of human lung adenocarcinoma and may become a potential target of human lung adenocarcinoma treatment.

[Key words] lung adenocarcinoma; A549 cell; hypoxia; formyl peptide receptor 1 (FPR1); migration; invasion; proliferation; tumorigenicity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2): 125-131. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.02.003]

肺癌是全球癌症致死人群中最为常见的肿瘤之一,全球每年大约有100万人死于肺癌,而肺腺癌是肺癌最为常见的一种组织学类型^[1]。最近研究^[2]显示,分子靶向治疗对那些肿瘤中存在被激活致癌基因的患者疗效显著,如表皮生长因子受体1(epidermal growth factor receptor 1, *EGFR-1*)基因。然而在肺腺癌中却缺少能够被识别的致癌基因,因此只能采用常规的化疗方法进行治疗,无法缓解患者的痛苦。为了开发更有效的肺腺癌治疗途径,对肿瘤细胞迁移、侵袭、增殖的特征研究便显得十分重要。随着对肿瘤研究的不断深入,缺氧被认为是肿瘤生物学行为的重要决定因素^[3]。体内外研究^[4-5]表明,肿瘤缺氧与局部复发、远处转移的可能性增加以及抗放射治疗和某些类型的化疗紧密相关。甲酰肽受体1(formyl peptide receptor 1, FPR1)是最初在吞噬白细胞中鉴定得到的G蛋白偶联受体^[6],并参与各种肿瘤细胞广泛的生理病理过程,如胶质瘤细胞的迁移、侵袭和致瘤性均被证明与FPR1的作用密不可分^[7];而FPR1在肿瘤发生中的作用离不开特异性的环境,其高表达与胃癌的晚期和低存活率有关^[8]。目前对于FPR1在肺腺癌中作用的研究还比较少见,因此,本研究构建了肺腺癌A549细胞的体内体外缺氧模型,检测在缺氧条件下FPR1的表达以及FPR1拮抗剂对肺腺癌细胞的迁移、侵袭以及成瘤能力的影响,旨在寻求人肺腺癌分子治疗的新靶标,为肺腺癌的临床治疗提供科学可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与动物

人肺腺癌细胞株A549购自昆明动物研究所,复苏、培养至一定条件下进行实验。BALB/c裸鼠45只,体质量21~23 g,购自重庆医科大学,动物证号:SCXK(渝)2016-0039。自由暂养1周后开始动物实验。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI 1640细胞培养基、胎牛血清及青霉素-链霉素(Invitrogen公司美国),FPR1特异性拮抗剂Boc2(上海楚肽生物科技有限公司),全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒、高灵敏ECL化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),Transwell小室(Chemicon公司日本),Matrigel基质胶(美国B&D公司),兔抗人一抗FPR1(货号ab113531;稀释比1:1 000)、兔抗人一抗E-cadherin(货号ab15148;稀释比1:500)、兔抗人一抗MMP-9(货号ab137867;稀释比1:1 000)、兔抗人一抗 β -actin(货号ab8227;稀释比1:400)以及山羊抗兔二抗IgG(货号ab6734;稀释比1:5 000)均购自美国Abcam公司;其他试剂均由上海国药试剂分析纯配制。3111型CO₂培养箱(Thermo公司,美国),酶标仪(Bio-Tek,美国),培养裸鼠用孵化器(Grumbach公司,德国),倒置显微镜(尼康公司,日本),Tanon-5200全自动化学发光分析仪(天能公司,上海),凝胶处理分析系统(ABI公司,美国),低温冷冻离心机(Eppendorf公司,德国)。

1.3 细胞株的培养

将购买的人肺腺癌细胞株A549依次进行复苏、传代和分化后,再进行接种、同步化培养,培养条件为:含10%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养液;培养环境为:37 °C、5% CO₂的培养箱中培养24 h,具体操作按细胞生长状态作相应调整,随后进行蛋白提取及相关实验检测。

1.4 Western blotting检测人肺腺癌细胞A549中HIF-1 α 和FPR1蛋白的表达水平

取生长状态良好的细胞,再次置于37 °C、5% CO₂、5%~7% O₂的潮湿培养箱分别培养0、12、24和48 h。在各个培养时间段结束后,收集细胞分别进行蛋白提取;后用BCA蛋白浓度检测试剂盒对所提蛋白进行浓度检测;取20 μ g蛋白和4 μ l 2 \times SDS上样缓冲液混合均匀,100 °C变性10 min;上样,12% SDS-PAGE分离后转至PVDF膜上;用5%脱脂牛奶封闭1 h;PBS洗膜;PBS洗膜后分别加入一抗(HIF-1 α ,

1:1 000;FPR1, 1:1 000; β -actin, 1:400)在4 °C下, 孵育过夜;PBS洗膜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔IgG(1:5 000)孵育0.5 h;PBS洗膜;用ECL化学发光进行显色。以 β -actin为内参蛋白, 后采用Image J图像分析软件进行分析。

1.5 细胞划痕实验检测人肺腺癌细胞株A549的迁移能力

取生长状态良好的细胞, 分为3组, 均在CO₂培养箱中进行培养观察, 其中对照组(正常培养基)通入正常空气(约含21% O₂), 使细胞在常氧条件下培养, 而低氧组(正常培养基)和低氧+Boc2处理组(含1 μ mol/L Boc2的培养基)通入含5%~7%O₂的湿化空气, 使细胞在低氧条件下培养。采用细胞划痕实验来检测细胞的迁移能力, 具体操作如下:细胞消化后接种于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基的6孔板中, 数量以贴壁后铺满板底为宜;细胞铺满板底后, 用1 ml枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 尽量保证各个划痕宽度一致;吸去细胞培养液, 用PBS冲洗3次, 洗去划痕产生的细胞碎片;加入无血清培养基, 各组细胞按不同培养条件继续培养24 h后, 拍照记录;通过愈合情况, 分析各组细胞的迁移能力变化。

1.6 Transwell实验检测人肺腺癌细胞株A549细胞的侵袭能力

取生长状态良好的细胞, 离心除去培养基, 用1 \times PBS重悬制成细胞悬液;取100 μ l细胞悬液置于铺有Matrigel基质胶的Transwell小室的上室, 再取500 μ l的含10%的胎牛血清的RPMI 1640培养基加入下室;将Transwell的6孔板转入不同培养条件下进行培养(对照组:常氧条件下培养;低氧组和低氧+Boc2处理组:含5%~7%的O₂、37°C、5% CO₂的培养箱中培养), 24 h后取出6孔Transwell板;将Transwell上室的细胞用棉签小心地擦除, 用1 \times PBS冲洗反复3次, 每次5 min, 洗净上室内部的细胞;将Transwell下室迁移的细胞用4%多聚甲醛固定30 min, 0.2%的Triton X-100通透15 min, 固定穿出小室的细胞, 用1 \times PBS冲洗反复3次, 每次5 min;将Transwell小室浸泡在0.1%结晶紫溶液中5 min, 用1 \times PBS冲洗反复3次, 每次2 min, 将小室翻转后置于倒置显微镜下进行细胞计数;实验重复3次, 均数作为这个小室的侵袭细胞数。

1.7 MTT法检测人肺腺癌细胞株A549的增殖能力

将生长状态良好的各组细胞转入不同培养条件下进行培养, 每隔24 h在每孔(含3组细胞)加入5 mg/ml的MTT溶液20 μ l, 继续孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 后每孔加150 μ l的DMSO, 置摇床低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。于酶标仪上测量490 nm波长下的光密度(D)值, 绘制细胞

增殖曲线。

1.8 观察各组裸鼠肺腺癌细胞株A549成瘤能力

成瘤方法:取适应性饲养一周后的裸鼠45只, 按照数字表法将裸鼠随机分为对照组、低氧组和低氧+Boc2处理组, 每组15只。肺腺癌A549细胞 1.0×10^5 /ml悬液皮下注射裸鼠, 500 μ l/只, 构建A549细胞裸鼠皮下成瘤模型。对照组裸鼠在通有含约20% O₂的湿化空气的孵化器内(保持温度在25 °C)培养, 低氧组和低氧+Boc2处理组裸鼠每天给予1次为期2 h的低氧处理(通有含5%~7% O₂的湿化空气, 空气流量保持在3~6 L/min, 保持温度在25 °C);在此同时, 低氧+Boc2处理组裸鼠每日进行Boc2(50 μ g/kg)滴注, 而对照组和低氧组裸鼠每日进行等量的生理盐水处理, 直至实验结束。从细胞注射开始, 每天观察裸鼠的生长状态及成瘤情况, 至4周后处死各组裸鼠, 取肿瘤测量体积、体质量, 并记录实验过程中各组成瘤裸鼠数, 计算、比较各组裸鼠成瘤率, 采用Western blotting检测各组裸鼠肿瘤组织中迁移相关蛋白E-cad和侵袭相关蛋白MMP-9的表达水平(具体操作参照1.4)。

1.9 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件, 计数资料以百分率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧诱导能提高A549细胞中HIF-1 α 、FPR1蛋白的表达水平

Western blotting检测结果(图1)显示, HIF-1 α 和FPR1蛋白的表达水平随着低氧培养时间的延长而提高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明低氧诱导能促进A549细胞FPR1蛋白的表达, 且呈一定程度时间依赖性。

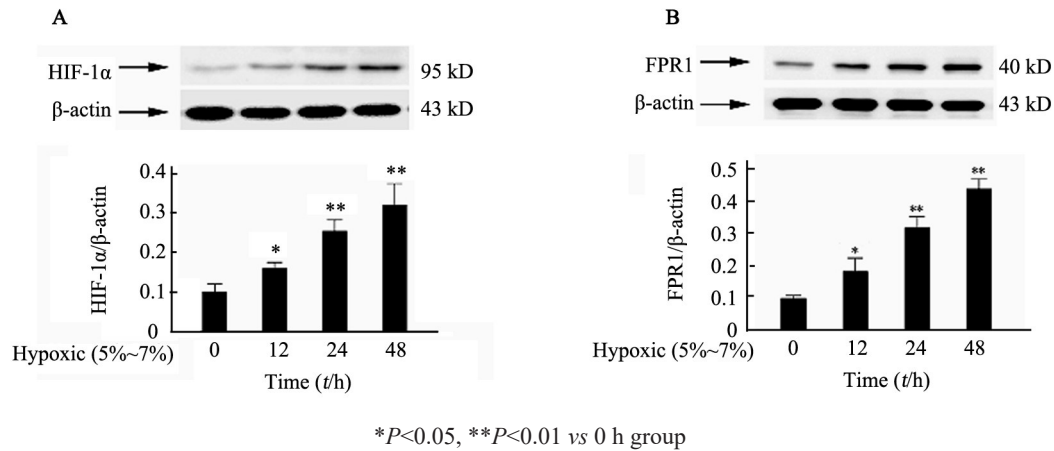
2.2 低氧环境下Boc2处理能抑制A549细胞的迁移能力

细胞划痕实验结果(图2)显示, 与对照组相比, 低氧组划痕出现明显愈合, 说明该组细胞迁移能力较强;而Boc2处理的低氧组划痕愈合受到一定的抑制, 明显慢于低氧组, 表明Boc2处理能抑制细胞的迁移能力。

2.3 低氧环境下Boc2处理能显著抑制A549细胞的侵袭能力

Transwell侵袭实验结果(图3)显示, 与对照组相比, 低氧组细胞数目显著增多($P<0.01$);而相对低氧组, Boc2处理能显著抑制A549细胞的侵袭能力, 细

胞数目显著减少($P<0.01$)。



A: Expression of HIF-1α protein; B: Expression of FPR1 protein

图1 低氧条件下不同培养时间段 HIF-1α 和 FPR1 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of HIF-1α and FPR1 protein in A549 cells induced by hypoxia for different time period

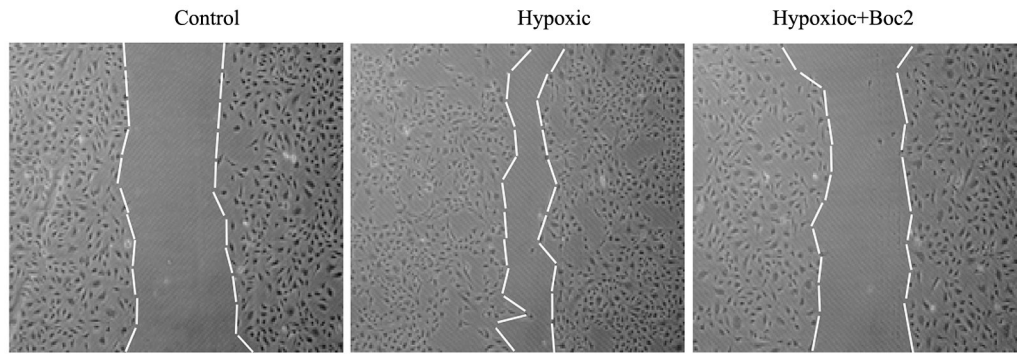


图2 细胞划痕实验检测细胞迁移能力(×10)

Fig. 2 The detection of cell migration ability by cell scratch test (×10)

2.4 低氧环境下 Boc2 处理能显著抑制 A549 细胞的增殖能力

MTT 检测结果(图4)显示,培养 48 h 后,与对照组相比,低氧组细胞增殖较快, D 值明显增大($P<0.05$),而低氧+Boc2 处理组与低氧组相比,细胞增殖较缓慢, D 值明显减小($P<0.05$);培养 72 h 后,与对照组相比,低氧组细胞 D 值增大更加显著($P<0.01$),而低氧+Boc2 处理组与低氧组相比,细胞 D 值减小更加明显($P<0.01$)。

2.5 低氧环境下 Boc2 处理能显著降低裸鼠移植瘤体积和质量

实验过程中未出现裸鼠死亡状况。低氧组裸鼠成瘤率为 100.0%(15/15),对照组为 60.0%(9/15),而低氧+Boc2 处理组裸鼠成瘤率为 73.3%(11/15)。裸鼠成瘤实验结果(图5)显示,低氧组裸鼠肿瘤平均体积、平均质量均显著高于对照组(均 $P<0.01$),而相对低氧组,低氧+Boc2 处理组裸鼠肿瘤平均体积、平均质量均出现了显著降低(均 $P<0.01$)。

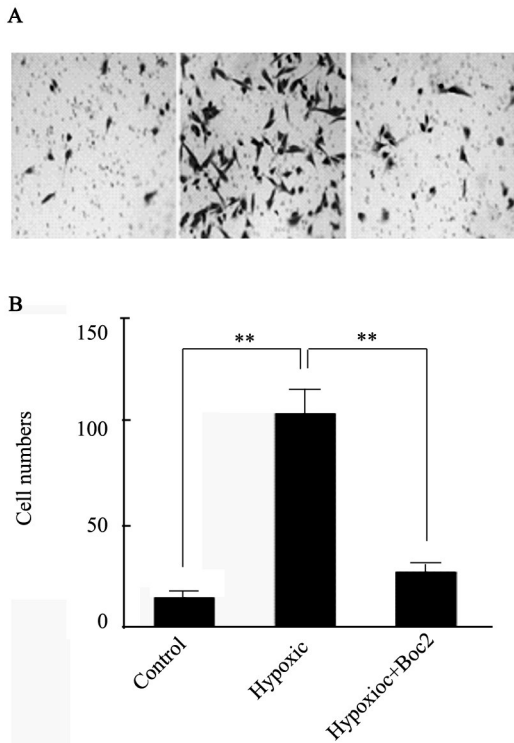
2.6 低氧环境下 Boc2 处理能显著降低 E-cad 及 MMP-9 蛋白表达水平

Western blotting 检测结果(图6)显示,低氧组迁移相关蛋白 E-cad 及侵袭相关蛋白 MMP-9 蛋白的表达量均显著高于对照组($P<0.01$);而与低氧组相比, Boc2 处理能显著降低 E-cad 及 MMP-9 蛋白表达量($P<0.05$)。

3 讨论

随着对肿瘤研究的不断深入,越来越多的证据^[9-11]表明,肿瘤细胞迁移和侵袭能力受到众多微环境因素的影响,如细胞外基质的组成、缺乏营养物质和氧气可用性的变化等。尤其是低氧压或者缺氧,不仅与肿瘤患者的预后差相关,而且可以刺激肿瘤血管的生成与侵袭力的增强,从而促进肿瘤的转移^[12-13]。然而缺氧影响肿瘤转移的分子机制尚不太清楚。已有报道^[14]显示, FPR1 参与各种肿瘤细胞迁移,侵袭和致瘤性的过程,如 N-甲酰基甲硫氨酸-亮氨

酰-苯丙氨酸(N-formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine, fMLP)作为FPR1的特异性激动剂,可以以剂量



** $P < 0.01$ vs Control group or Hypoxia+Boc2 group

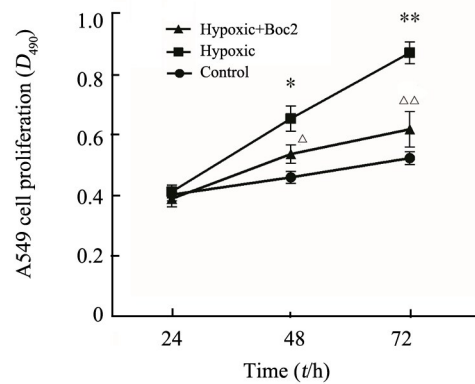
A: Result of transwell invasive experiment ($\times 100$);

B: Cell invasion ability histogram of 3 groups

图3 Transwell实验检测A549细胞的侵袭能力

Fig. 3 The invasion ability of A549 cells detected by Transwell assay

FPR1拮抗剂Boc2可以抑制fMLP的变化。在卵巢癌的研究^[12]中发现,FPR1通过与亮氨酸-37的相互作用增强了卵巢癌的侵袭能力。除此之外,FPR1还可以介导人类肝癌细胞和成神经细胞瘤细胞的致瘤性,在成神经细胞瘤细胞及其肿瘤组织中采用RT-PCR、免疫印迹、免疫组化及免疫荧光均证明了FPR1的高表达,且FPR1 shRNA抑制了成神经细胞瘤细胞的成瘤能力,其具体作用机制可能与FPR1对MAPK/Erk、PI3K/Akt和P38-MAPK信号通路的调节密切相关^[15-17],暗示对FPR1活性进行调节可能影响肿瘤细胞的转移和由缺氧介导的肿瘤生长促进。

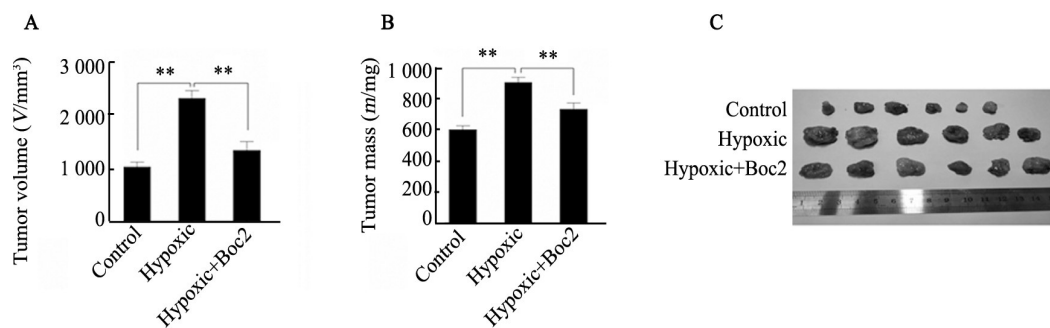


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Hypoxia group

图4 MTT检测A549细胞的增殖能力

Fig. 4 Detection of proliferation ability of A549 cells by MTT

依赖的方式增强小鼠胶质瘤细胞BV-2的迁移,而



** $P < 0.01$ vs Control group or Hypoxia+Boc2 group

A: Comparison of tumor volume; B: Comparison of average tumor mass; C: Solid tumor resected from nude mice

图5 各组裸鼠肿瘤的平均体积和平均质量比较

Fig. 5 The comparison of average volume and mass of tumors in nude mice of each group

HIF-1 α 被认为是低氧转录反应的主要调节剂,在人类癌症肿瘤组织中其经常处于过表达状态,并且调控几种与肿瘤发生和发展相关基因的表达^[18]。因此在本研究中,笔者首先检查了缺氧处理后A549细胞中HIF-1 α 、FPR1的表达,结果表明,HIF-1 α 、

FPR1在蛋白质水平的表达呈时间依赖性增加,表明A549细胞的缺氧模型成功构建。随后,进一步研究了缺氧处理后A549细胞的迁移和侵袭能力,结果表明,缺氧促进A549细胞的迁移、侵袭和转移,而FPR1活性抑制剂Boc2抑制了A549细胞的迁移、侵袭和迁

移。最后,通过用 A549 细胞植入建立了裸鼠肺腺癌缺氧模型,研究了 A549 细胞的致瘤性,结果表明,低氧处理下裸鼠的肿瘤体积和重量显著高于常氧处理的裸鼠,而 FPR1 活性抑制剂显著抑制了低氧对小鼠肿瘤的影响,且有效降低了裸鼠的成瘤率。此外, FPR1 活性抑制剂能显著降低低氧诱导的迁移和侵袭相关蛋白(E-cad 和 MMP-9)的表达。而近些年随着对各种癌症的研究^[19]深入, FPR1 亦可作为某些癌症的抑制子,如在 FPR1 基因敲除老鼠的肝脏组织中发

现上皮细胞的内稳态被破坏,炎症反应明显加强,肝损伤更加严重。在胃癌^[20-21]相关研究中也发现, FPR1 通过利用炎症反应的解决途径来抑制肿瘤新生血管的发生与生长,而 shFPR1 又能显著增加血管密度以及促进细胞增殖。因此, FPR1 在各种癌症中呈多态性表达趋势,而具体到某一种癌症, FPR1 的表达及作用机制仍需被透彻了解才能进一步被应用于临床研究。

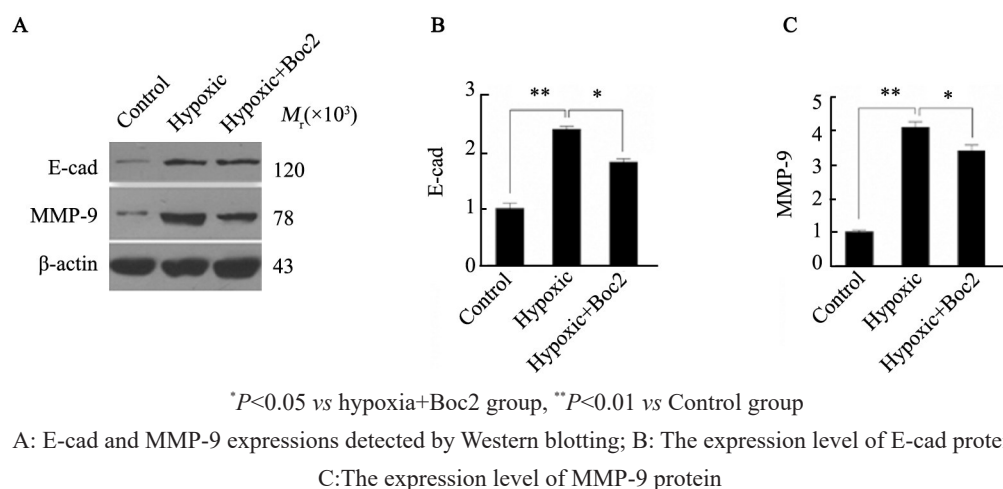


图6 各组裸鼠肿瘤组织中 E-cad 和 MMP-9 蛋白表达量比较

Fig. 6 The comparison of protein expressions of E-cad and MMP-9 in tumor tissues of nude mice of each group

综上所述,缺氧诱导促进了 FPR1 的表达,增强了肺腺癌细胞的迁移、侵袭和增殖能力,促进肿瘤的生长。FPR1 的抑制剂 Boc2 导致瘤细胞体外迁移、侵袭、增殖能力及体内肿瘤生长的抑制。因此, FPR1 的抑制对治疗肺腺癌具有极大潜力,增强 FPR1 的抑制强度可以为临床治疗肺腺癌提供可靠的依据,但其具体机制仍需进一步的实验验证。

[参考文献]

[1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma [J]. Nature, 2014, 511(7511): 543-550. DOI: 10.1038/nature13385.

[2] JACOBSEN K, BERTRAN-ALAMILLO J, MOLINA M A, et al. Convergent Akt activation drives acquired EGFR inhibitor resistance in lung cancer[J/OL]. Nature Commun, 2017, 8(1): 410[2017-09-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583255/>. DOI: 10.1038/s41467-017-00450-6.

[3] PAOLICCHI E, GEMIGNANI F, KRSTIC-DEMONACOS M, et al. Targeting hypoxic response for cancer therapy[J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 13464-13478. DOI: 10.18632/oncotarget.7229.

[4] MANOOCHEHRI KHOSHINANI H, AFSHAR S, NAJAFI R. Hypoxia: a double-edged sword in cancer therapy [J]. Cancer Invest, 2016, 34(10): 536-545. DOI: 10.1080/07357907.2016.1245317.

[5] VACCHELLI E, MA Y, BARACCO E E, et al. Chemotherapy-induced

antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1[J]. Science, 2015, 350(6263): 972-978. DOI:10.1126/science.aad0779.

[6] UNITT J, FAGURA M, PHILLIPS T, et al. Discovery of small molecule human FPR1 receptor antagonists [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(10): 2991-2997. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.03.049.

[7] BOER J C, VAN MARION D M, JOSEPH J V, et al. Microenvironment involved in FPR1 expression by human glioblastomas[J]. J Neuro-oncol, 2015, 123(1): 53-63. DOI: 10.1007/s11060-015-1777-2.

[8] CHENG T Y, WU M S, LIN J T, et al. Formyl peptide receptor 1 expression is associated with tumor progression and survival in gastric cancer[J]. Anticancer res, 2014, 34(5): 2223-2229.

[9] WU J S, SHENG S R, LIANG X H, et al. The role of tumor microenvironment in collective tumor cell invasion[J]. Future Oncol, 2017, 13(11): 991-1002. DOI: 10.2217/fon-2016-0501.

[10] 赵家义, 吴宏宇, 韩一平. CRISPR/Cas 基因编辑技术应用于表皮生长因子受体突变型肺腺癌的治疗[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 675-679. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.018.

[11] 于瑞莲, 罗树春, 陈琳, 等. DNAJ 热激蛋白家族 B8 基因对肺腺癌侵袭转移的作用及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(8): 845-850. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.005.

[12] VAUPEL P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis[J]. Oncologist, 2008, 13(3): 21-26. DOI: 10.1634/theoncologist.13-S3-21.

[13] 曾宝真, 葛春蕾, 付桥粉, 等. 稳定过表达人 MGST1 基因抑制肺腺癌细胞 SPCA1 的凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 608-614. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.006.

- [14] HUANG J, CHEN K, CHEN J, et al. The G-protein-coupled formyl-peptide receptor FPR confers a more invasive phenotype on human glioblastoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(6): 1052-1060. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605591.
- [15] COFFELT S B, TOMCHUCK S L, ZWEZDARYK K J, et al. Leucine leucine-37 uses formyl peptide receptor-like 1 to activate signal transduction pathways, stimulate oncogenic gene expression, and enhance the invasiveness of ovarian cancer cells[J]. *Mol Cancer Res MCR*, 2009, 7(6): 907-915. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0326.
- [16] ZHANG L, WANG H, YANG T, et al. Formylpeptide receptor 1 mediates the tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(2): e1078055[2017-09-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801470/>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1078055.
- [17] SNAPKOV I, OQVIST CO, FIGENSCHAU Y, et al. The role of formyl peptide receptor 1 (FPR1) in neuroblastoma tumorigenesis[J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 490 [2017-09-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4950242/>. DOI: 10.1186/s12885-016-2545-1.
- [18] REZVANI H R, ALI N, NISSEN L J, et al. HIF-1 α in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(9): 1793-1805. DOI: 10.1038/jid.2011.141.
- [19] GIEBELER A, STREETZ K L, SOEHNLEIN O, et al. Deficiency of formyl peptide receptor 1 and 2 is associated with increased inflammation and enhanced liver injury after LPS-stimulation[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100522 [2017-09-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0100522.
- [20] PREVETE N, LIOTTI F, ILLIANO A, et al. Formyl peptide receptor 1 suppresses gastric cancer angiogenesis and growth by exploiting inflammation resolution pathways[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(4): e1293213[2017-09-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0100522. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1293213.
- [21] PREVETE N, LIOTTI F, VISCIANO C, et al. The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(29): 3826-3833. DOI: 10.1038/onc.2014.309.

[收稿日期] 2017-09-17

[修回日期] 2017-12-09

[本文编辑] 王映红

· 科技动态 ·

代谢产物右旋羟戊二酸抑制FTO/m6A/Myc/CEBPA通路的抗肿瘤作用

贝克曼研究所陈建军教授、芝加哥大学生化研究所何川教授、浙江大学附属第一医院血液科金洁教授及其研究团队合作发现:异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变造成的代谢产物右旋羟戊二酸(R-2-hydroxyglutarate, R-2HG)通过抑制FTO/m6A/Myc/CEBPA信号发挥抗白血病的作用。2011年,何川教授实验室证实肥胖相关蛋白(obesity-associated protein, FTO)是m6A去甲基转移酶。m6A是一种广泛存在的RNA修饰,参与RNA的剪接、转位、衰减、翻译等过程,参与维持机体稳态,并与疾病的发生发展密切相关,如肿瘤、炎症相关疾病等。FTO调节肿瘤的具体机制需要进一步被揭示。

陈建军、何川、金洁教授及其研究团队发现,27株不具备IDH突变的白血病细胞株在IDH突变代谢产物R-2HG的刺激下,增殖的反应性存在差异。研究人员将27株细胞分为了R-2HG敏感型细胞以及R-2HG耐受型细胞两大类。R-2HG敏感型细胞在R-2HG的刺激下细胞增殖能力显著降低,而耐受型细胞的增殖未发生明显变化。体内荷瘤实验也得到了同样的结论。RNA-seq研究发现,R-2HG敏感型细胞的转录本中的FTO的表达量以及Myc信号通路相关基因的表达量显著高于耐受型细胞株。在R-2HG的刺激下,敏感型细胞中的FTO表达量及Myc信号通路相关基因表达量显著降低。提示细胞对R-2HG的敏感性很可能跟FTO以Myc信号有关。通过m6A blot以及检测蛋白相互作用的方法发现R-2HG能与FTO直接结合,抑制FTO的去甲基转移酶功能,提升细胞中的整体m6A水平。对Myc进行单独检测,发现R-2HG刺激以及干扰FTO都能增加Myc的m6A水平。报告基因实验证实Myc受FTO直接调控,受R-2HG间接调控。干扰FTO以及干扰Myc都能显著抑制R-2HG的抗肿瘤增殖作用,从而确定R-2HG通过FTO/m6A/Myc发挥抗肿瘤作用。

深入研究发现,R-2HG是先抑制FTO的去甲基转移酶活性,再抑制FTO的表达量。通过分析TCGA等数据库中的转录因子表达情况,发现CEBPA是既与FTO表达量呈明显正相关,且在R-2HG刺激下m6A水平显著增加的转录因子。报告基因实验证明干扰CEBPA能降低FTO的转录水平,降低FTO的表达量。干扰CEBPA也能抑制R-2HG诱导的抗肿瘤增殖的效应,从而研究人员得出结论,R-2HG通过抑制FTO/m6A/Myc信号降低了CEBPA的表达水平,进一步正反馈降低FTO水平,放大R-2HG的抗肿瘤效果。

除了揭示R-2HG抗肿瘤的机制之外,研究团队还通过体内动物模型发现R-2HG与化疗药物地西他滨或者道诺霉素联合用药能显著延长荷瘤小鼠的生存期。进一步体外实验证实,R-2HG只有对FTO及Myc的表达量均适中的敏感型细胞有效,对Myc高表达及FTO低表达的耐受型细胞无效。这些实验结果为临床治疗白血病的用药提供了新的靶点。

[朱哈 摘译,刘娟 审阅. Su R, Dong L, Li C, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA signaling[J]. *Cell*, 2018, 172(1/2):90-105. DOI:10.1016/j.cell.2017.11.031]