

论著·基础研究

FMNL3 基因转染对结直肠癌 SW480 细胞 EMT 和体外侵袭能力的影响*

曾元凤¹, 肖移生², 罗小江³, 胡国柱⁴, 路名芝¹, 吴晓牧^{5△}, 辛洪波^{6▲}

(1. 江西省人民医院病理科, 江西南昌 330006; 2. 江西中医药大学基础医学院形态学教研室, 江西南昌, 330004; 3. 江西省人民医院普外科, 江西南昌 330006; 4. 江西省人民医院干细胞重点实验室, 江西南昌 330006; 5. 江西省人民医院神经内科, 江西南昌 330006; 6. 南昌大学转化医学研究院, 江西南昌, 330031)

摘要:目的 探讨成蛋白样 3 型蛋白(FMNL3)基因转染对结直肠癌 SW480 细胞上皮-间质转化(EMT)和体外侵袭能力的影响。**方法** 将带绿色荧光蛋白的重组 FMNL3 表达质粒 pEGFP-N1/FMNL3 转染至 SW480 细胞中(以未转染质粒的 SW480 细胞作正常对照, 转染空载质粒的 SW480 细胞为阴性对照), 荧光定量 PCR(RT-qPCR)和 Western blot 法检测重组质粒转染前、后细胞 FMNL3 mRNA 和蛋白的表达变化; 在荧光显微镜下观察 FMNL3 转染前、后 SW480 细胞的形态变化; 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测转染前、后 SW480 细胞 EMT 上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 Vimentin 的表达变化; 用 Transwell 小室实验检测 FMNL3 基因转染对 SW480 细胞的体外侵袭能力的影响。**结果** FMNL3 转染 48 h 后 SW480 细胞中 FMNL3 mRNA 和蛋白表达水平明显提高($P<0.01$); FMNL3 蛋白表达于细胞质中, 转染 FMNL3 基因后 SW480 细胞的形态发生了明显的改变, 由典型的圆形、多边形变成梭形并伸出多个细长突起的间充质样, 呈现典型的 EMT 形态学改变; 转染 FMNL3 基因后, SW480 细胞中 EMT 上皮标志物 E-cadherin 表达下调, 间质标志物 Vimentin 表达上调; 转染 FMNL3 基因后 SW480 细胞的体外侵袭能力显著增强。**结论** FMNL3 基因可能通过促进结直肠癌细胞 EMT 而促进其侵袭。

关键词: 结直肠肿瘤; 成蛋白样 3 型蛋白; 上皮-间质转化; 侵袭
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.018 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2014)12-1460-03

Influence of FMNL3 gene transfection on epithelial-mesenchymal transition and in vitro invasion potential of colorectal carcinoma SW480 cells*

Zeng Yuanfeng¹, Xiao Yisheng², Luo Xiaojiao³, Hu Guozhu⁴, Lu Mingzhi¹, Wu Xiaomu^{5△}, Xin Hongbo^{6▲}

(1. Department of Pathology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Teaching and Researching Section of Morphology, College of Basic Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China; 3. Department of General Surgery, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 4. Key Laboratory of Stem Cells, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 5. Department of Neurology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 6. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China)

Abstract: **Objective** To investigate the impact of FMNL3 gene transfection on the epithelial-mesenchymal transition(EMT) and the in vitro invasive potential of colorectal carcinoma SW480 cells. **Methods** The recombination FMNL3 expression plasmid with EGFP was transfected into SW480 cells(SW480 cells without transfected plasmid as the normal control group and SW480 cells with empty vector as the negative control group). The changes of FMNL3 mRNA and protein expression were detected by real-time PCR and Western blot after transfection of 48h with recombination FMNL3 expression plasmid. The changes of SW480 cell morphology were detected by the fluorescence microscope after FMNL3 transfection. The changes of EMT epithelial and mesenchymal markers in SW480 cells were detected by real-time PCR and Western blot after FMNL3 transfection. The Transwell chamber invasion assay in vitro was used to investigate the effects of FMNL3 gene trasfection on the invasive potential of SW480 cells. **Results** The levels of FMNL3 mRNA and the protein expression were significantly increased at 48h after transfection with recombination FMNL3 expression plasmid($P<0.01$); the FMNL3 protein was expressed within cytoplasm, the morphology of SW480 cells after FMNL3 transfection showed significant changes from round and polygon to spindle and stretched out the multiple long and thin prominences as mesenchyma, which appeared the typical EMT change; after FMNL3 gene transfection, the expression of EMT epithelial marker E-cadherin was down-regulated and the expression of mesenchymal marker Vimentin was up-regulated in SW480 cells; the in vitro invasive potential of SW480 cells was remarkably enhanced after FMNL3 transfection. **Conclusion** FMNL3 gene may promote its invasion by promoting EMT of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal cancer; FMNL3; epithelial-mesenchymal transition; invasion

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201972, 81260327)。 作者简介: 曾元凤(1974—), 主治医师, 博士后在站工作人员, 主要从事结直肠癌转移的分子机制研究。 △ 通讯作者, Tel: (0791) 8895633; E-mail: wuxm@163.com。 ▲ 通讯作者, Tel: (0791) 83827168; E-mail: hongboxin@yahoo.com。

转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因。已有研究发现上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤细胞侵袭和转移中起重要作用^[1]。因此,对结直肠癌 EMT 发生机制的研究,将有助于揭示结直肠癌侵袭、转移的调控机制,并可能为结直肠癌治疗靶点的寻找提供坚实的理论依据。新近发现的成蛋白样 3 型蛋白(formin-like, FMNL3)属 Diaphanous 相关成蛋白(Diaphanous-related formins, DRFs)家族成员,该家族蛋白是目前发现的一类最有效的细胞骨架装配和组建的关键调控分子,其在肿瘤转移中的作用已引起人们的广泛重视^[2]。目前有关 FMNL3 的表达和功能学研究文献甚少,其是否与结直肠癌 EMT 和侵袭、转移相关尚少见文献报道。因此,本课题将初步探讨 FMNL3 基因转染对结直肠癌 SW480 细胞 EMT 及体外侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞株和质粒:结直肠癌细胞株 SW480 及 pEGFP-N1 质粒为江西省人民医院中心实验室自存;自行构建 FMNL3 重组表达质粒 pEGFP-N1/FMNL3; Transwell 小室(8 μm 孔径)购自 Corning 公司。(2)主要试剂:Lipofectamine™ 2000、各种引物购自 Invitrogen 公司;荧光定量 PCR(RT-qPCR)试剂盒购自 TOYOBO 公司;蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司;BCA 蛋白定量试剂盒和化学发光液购自碧云天公司;鼠抗人 FMNL3 一抗购自 Abnova 公司,兔抗人 E-cadherin 和 Vimentin 一抗购自 CST 公司,羊抗兔二抗购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 基因转染实验 自行构建 FMNL3 重组表达质粒 pEGFP-N1/FMNL3,经鉴定正确后将其转染 SW480 细胞。转染前 24 h 将细胞接种于 24 孔板中,待细胞生长至 90%~95% 汇合时进行基因转染实验:用 50 μL 的 Opti-MEM 稀释 1 μg 重组质粒并混匀;取 2 μL 的 Lipofectamine™ 2000 用 50 μL 的 Opti-MEM 稀释并混匀;室温孵育 5 min 后将两液混匀;室温孵育 20 min 后均匀加入 SW480 细胞培养孔中,培养 6 h 后换完全培养液。实验组转染 FMNL3 重组质粒(SW480/FMNL3 组),阴性对照组转染空载质粒(SW480/mock 组),正常对照组未进行质粒转染(SW480/NC 组)。

1.2.2 RT-qPCR 及 Western blot 法检测重组质粒转染细胞后 FMNL3 的表达 转染后 48 h 收集细胞,用 TRIzol 试剂按说明书提取细胞总 RNA,然后进行 RT-qPCR 反应。采用 Prime 5.0 自行设计并由 Invitrogen 公司合成,FMNL3 的 RT-qPCR 检测引物如下,上游引物:5'-TCC GAT TCA TTC GTT CTT AC-3',下游引物:5'-CCG CCT CAA CTC TGC TAT T-3',产物长度 173 bp;GAPDH 内参引物如下,上游引物:5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G-3',下游引物:5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3',产物长度 138 bp。应用 IBM7500 定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 实验,反应条件为 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 5 s、55~60℃ 退火 30 s、45 个循环。定量的方法参照文献^[3],用 $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组与对照组的基因表达的倍比关系,公式如下 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})_{对照组}$ 。实验重复 3 次,计算平均值。用南京凯基公司的蛋白提取试剂盒抽提各组细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白。取细胞总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,FMNL3-抗(1:500)4℃ 孵育过夜,二抗(1:

500)室温 1 h,用化学发光液在暗室内显影、曝光成像。

1.2.3 FMNL3 基因转染前、后 SW480 细胞形态检测 因重组质粒含有编码绿色荧光蛋白 EGFP 的基因,转染细胞后能发出绿色荧光,转染 48 h 后可在倒置荧光显微镜下观察 SW480 细胞的形态学变化。

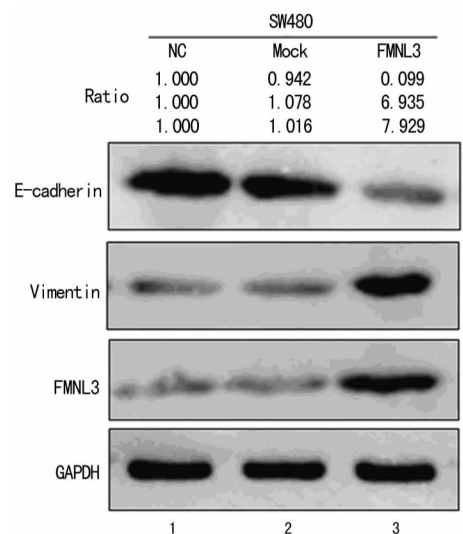
1.2.4 FMNL3 基因转染前、后 SW480 细胞的体外侵袭能力变化 实验前将 Transwell 小室滤膜按每孔 50 μL 包被 Matrigel 胶并在培养箱中聚合 2 h,消化细胞并用无血清的 RPMI-1640 培养液重悬,调整细胞浓度至 1×10^5 /mL 后,将细胞接种于上室,下室用常规培养基作趋化因子,培养 24 h 后取出滤膜,4%多聚甲醛固定、Gimsa 染色,光镜下随机挑取 5 个视野计数穿膜细胞数,取其均值代表浸润力量值。

1.2.5 RT-qPCR 及 Western blot 法检测细胞中 EMT 上皮及间质标志物的表达 方法步骤同 1.2.2,其中 Anti-E-Cadherin 和 Anti-Vimentin 均 1:1 000。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,RT-qPCR、Western blot 及体外侵袭实验结果均采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pEGFP-N1/FMNL3 转染 SW480 细胞后 FMNL3 表达水平 FMNL3 重组表达质粒 pEGFP-N1/FMNL3 经双酶切及测序鉴定证实序列完全正确,说明 FMNL3 表达载体构建成功。转染 SW480 细胞 48 h 后 FMNL3 mRNA 表达水平提高约 53.47 倍($P < 0.01$),蛋白表达约 8 倍(图 1),说明 FMNL3 已经成功转染入 SW480 细胞中。

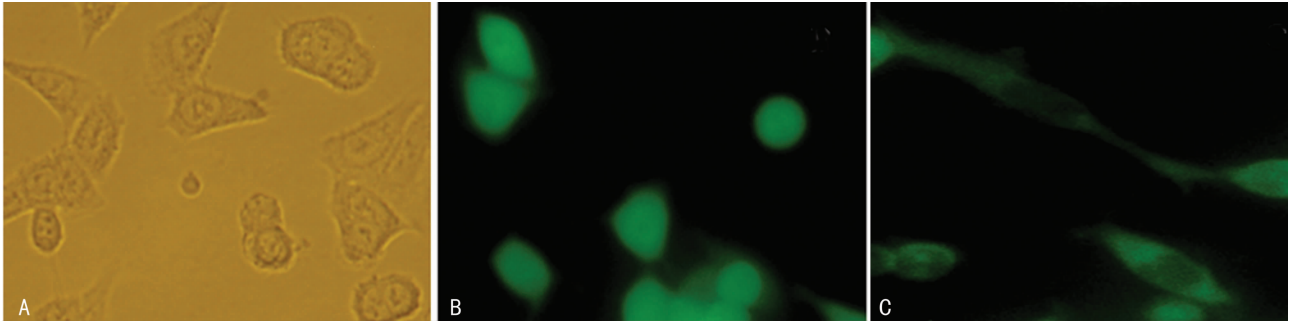


1:SW480/NC 组;2:SW480/mock 组;3:SW480/FMNL3 组。

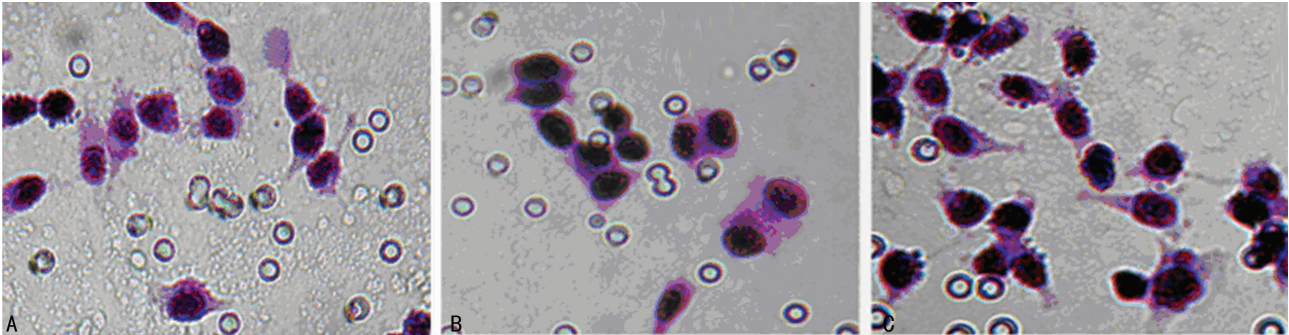
图 1 3 组 SW480 细胞中 E-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平比较

2.2 FMNL3 基因转染前、后 SW480 细胞形态观察 倒置荧光显微镜下观察 FMNL3 转染前、后 SW480 细胞的形态,结果显示,FMNL3 蛋白表达于细胞质;FMNL3 转染后 SW480 细胞形态变化显著,由典型的圆形、多边形变成梭形并伸出多个突起的间充质细胞样(图 2),呈现出典型的 EMT 形态学改变。

2.3 EMT 上皮及间质标志物的表达变化 RT-qPCR 及 Western blot 法检测结果显示,与 SW480/NC 组比较,SW480/FMNL3 组细胞 E-cadherin mRNA 表达水平下调 55%,而 Vimentin 的 mRNA 表达上调 15.47 倍,其蛋白表达变化趋势与 mRNA 水平的表达变化一致。

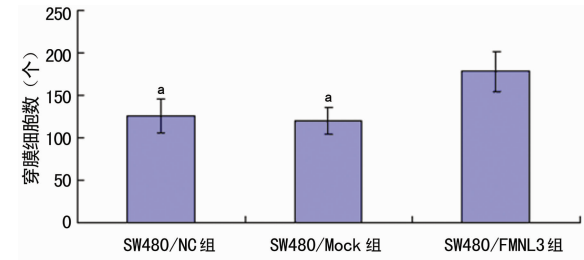


A:SW480/NC 组;B:SW480/mock 组;C:SW480/FMNL3 组。
图 2 倒置荧光显微镜下观察 3 组 SW480 细胞的形态学改变(×200)



A:SW480/NC 组;B:SW480/mock 组;C:SW480/FMNL3 组。
图 3 显微镜下观察 3 组 SW480 细胞的体外侵袭能力(×200)

2.4 FMNL3 基因转染前、后 SW480 细胞的体外侵袭能力变化 Transwell 体外侵袭实验观察到,48 h 后各组细胞均已穿出微孔滤膜(图 3、4),SW480/NC 组、SW480/mock 组、SW480/FMNL3 组显微镜下计数穿膜细胞数分别为(125.78±20.12)个、(125.46±16.59)个、(164.78±23.37)个,FMNL3 转染后 SW480 细胞的体外侵袭能力显著增强($P<0.05$)。



^a, $P<0.05$,与 SW480/FMNL3 组比较。
图 4 3 组 SW480 细胞的体外侵袭能力变化统计图形

3 讨 论

FMNL3 基因编码产物属 DRFs 家族成员,该家族是一类细胞中普遍存在、高度保守的多功能蛋白家族,通过其保守的 FH2 结构域促进肌动蛋白单体聚合并加快肌动蛋白纤维延伸,是目前发现的细胞中最有效的肌动蛋白成核因子之一^[4];作为细胞骨架组建和装配的关键调控分子,其参与了众多以肌动蛋白为基础的生命过程,包括细胞质分裂、细胞极性和运动、伪足形成等^[5-6]。目前研究已经发现,该家族与 Rho 细胞运动信号通路相关,通过调控细胞骨架如丝状伪足、板层伪足等的形成而影响肿瘤细胞的运动、侵袭和转移能力^[2]。

FMNL3 是新近发现的基因^[7],位于染色体 12q13。目前有关其表达和功能学研究文献甚少,生物信息学分析显示其在脾脏、卵巢纤维瘤、横纹肌肉瘤、胃癌中表达^[7];有研究发现在

体内高运动能力的黑色素细胞亚群中存在 FMNL3 的高表达^[8];FMNL3 调控肌动蛋白的成核和延伸^[9],与血管形成过程中内皮细胞的细胞骨架重组有关^[10],并能促进细胞骨架丝状伪足的形成^[11],FMNL3 依赖 RhoC 诱导前列腺癌细胞迁移^[12-13];但 FMNL3 是否与结直肠癌 EMT 相关目前还少见文献报道。本课题前期研究中用免疫组织化学和 RT-qPCR 法检测结直肠癌组织和多个细胞系中 FMNL3、EMT 上皮和间质标志物的表达发现,FMNL3 在结直肠癌原发灶组织中的表达高于对应癌旁正常组织,在淋巴结转移灶组织中的表达高于其原发灶组织^[14];同时发现 FMNL3 的表达与 EMT 上皮标志物的表达呈负相关,而与间质标志物呈正相关;FMNL3 及间质标记物 Vimentin 在高转移潜能细胞系(SW620 和 LOVO)中的表达高于其在低转移潜能细胞系(SW480 和 HT29)中的表达,而上皮标记物的表达趋势正好相反^[15];这提示 FMNL3 可能与结直肠癌 EMT 相关。在本研究中也发现,转染 FMNL3 基因后 SW480 细胞的形态发生明显变化,由圆形或多边形变为梭形并伸出多个细长突起的间质样,呈现典型的 EMT 形态学改变;并且不论 mRNA 水平还是蛋白水平,与 SW480/Mock 组细胞相比,SW480/FMNL3 组细胞中上皮标志物 E-cadherin 表达均降低,间质标志物 Vimentin 表达均升高,这进一步说明 FMNL3 可能促进结直肠癌细胞 EMT,与本课题的前期研究结果相吻合;同时还发现,转染 FMNL3 基因后 SW480 细胞的体外侵袭能力显著增强,说明在体外 FMNL3 能够促进结直肠癌细胞侵袭。综合以上研究结果,本研究认为 FMNL3 可能通过促进结直肠癌细胞 EMT 而促进结直肠癌侵袭,但具体的分子机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Blick T,Widodo E,Hugo H,et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer (下转第 1467 页)

本系统评价实验周期短,动物数量少,同样可用于市场的抽检和监控产品质量的稳定性,配合成分分析方法等应用,可有效提高市场合格保健品种质量功效的控制水平。通过对评价方法进行标准化、规范化要求及提升市场准入标准,可提高保健食品的内在质量,从而显著提升保健食品的功效及安全水平;低水平重复开发现象、鱼龙混杂等相关系列问题也可被有效避免或解决。通过本研究对 2 个中药保健食品胶囊的对比评价,可以清晰地看到该评价体系对规范保健食品市场及新产品开发等方面强大的实用价值。本研究及评价系统为政府部门有效监管保健食品市场提供实验依据和科学的评价方法,使保健食品的功效及安全性都会得到充分保障。未来对中国公共健康水平的提升,减少疾病风险及相关的医药投入,有效改善国人的生存质量、延长人口寿命将会产生深远的影响。

参考文献:

- [1] 钱蔚. 中国保健食品行业发展及规管问题探讨[J]. 中外医疗,2009(29):172-174.
- [2] 徐华锋. 中国保健食品行业的现状和发展趋势[J]. 亚太传统医药,2007(3):14-18.
- [3] 吕仁宝. 浅谈保健食品市场现状及对策[J]. 中国药事,2011,25(6):560-563.
- [4] 叶永茂. 中国食品保健品及其安全问题[J]. 上海医药情报研究,2005(1):43-49.
- [5] 毛正银,王华东. 21 世纪中国保健食品行业发展中的问题与对策[J]. 首都医药,2009(13):48-49.
- [6] 陆欣,王庆伟. 2009 年北京市保健食品国家抽检分析及启示[J]. 首都医药,2010(10):10-11.

- [7] 任艺. 京城百姓对保健食品认知情况调查-近七成百姓不相信保健食品有效[J]. 首都医药,2009(1):8-10.
- [8] 2010 年加快保健食品、化妆品标准体系建设[J]. 日用化学品科学,2010,33(2):47.
- [9] 徐海滨,严卫星. 保健食品原料安全评价技术与标准的研究简介[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(6):481-484.
- [10] 白佳利,沈秀,王浩,等. 用损益指数综合评价大豆营养保健功效及安全性[J]. 食品科学,2012,33(17):263-268.
- [11] 孟媛,于涛,韩景献. 精与三焦关系浅析[J]. 江苏中医,2010,42(5):6-8.
- [12] 黄秋丹. 浅议“治未病”之意义[J]. 河南中医学院学报,2009,24(4):18-19.
- [13] Hennig B,Ettinger AS,Jandacek RJ,et al. Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases[J]. Environ Health Perspect,2007,115(4):493-495.
- [14] Decaria JE,Sharp C,Petrella RJ. Scoping review report: obesity in older adults[J]. Int J Obes (Lond),2012,36(9):1141-1150.
- [15] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [16] 吴丽,潘苏华. 中药保健食品的优势及发展方向[J]. 时珍国医国药,2009,20(7):1838-1840.

(收稿日期:2013-10-28 修回日期:2013-12-19)

(上接第 1462 页)

- cell lines[J]. Clip Exp Metastasis,2008,25(6):629-642.
- [2] Kitzing TM,Sahadevan AS,Brandt DT,et al. Positive feedback between Dial,LARG,and RhoA regulates cell morphology and invasion[J]. Genes Dev,2007,21(12):1478-1483.
- [3] Livak KJ,Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.
- [4] Pruyne D,Evangalista M,Yang C,et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbedendassociation[J]. Science,2002,297(5581):612-615.
- [5] Faix J,Grosse R. Staying in shape with formins[J]. Dev Cell,2006,10(6):693-706.
- [6] Goode BL,Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly[J]. Annu Rev Biochem,2007(76):593-627.
- [7] Katoh M,Katoh M. Identification and characterization of human FMNL1,FMNL2 and FMNL3 genes in silico[J]. Int J Oncol,2003,22(5):1161-1168.
- [8] Pinner S,Jordan P,Sharrock K,et al. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination[J]. Cancer Res,2009,69(20):7969-7977.
- [9] Thompson ME,Heimsath EG,Gauvin TJ,et al. FMNL3

- FMNL3-actin structure gives insight into formin-mediated actin nucleation and elongation[J]. Nat Struct Mol Biol,2013,20(1):111-118.
- [10] Hetheridge C,Scott AN,Swain RK,et al. The formin FMNL3 is a cytoskeletal regulator of angiogenesis[J]. J Cell Sci,2012,125(Pt 6):1420-1428.
- [11] Harris ES,Gauvin TJ,Hemsath EG,et al. Assembly of filopodia by the forming FRL2(FMNL3)[J]. Cytoskeleton(Hoboken),2010,67(12):755-772.
- [12] Bai SW,Herrera-Abreu MT,Rohn JL,et al. Identification and charecterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization,cell morphology and migration[J]. BMC Biol,2011,9(1):54.
- [13] Vega FM,Fruhwrth G,Ng T,et al. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets[J]. J Cell Biol,2011,193(4):655-665.
- [14] 肖移生,龚利平,路名芝,等. FMNL3 在结直肠癌组织中的表达和临床意义[J]. 实用医学杂志,2013,29(9):1422-1425.
- [15] 曾元凤,肖移生,时军,等. FMNL3 基因与结直肠癌上皮-间质转化关系的初步研究[J]. 2013,29(19):3119-3121.

(收稿日期:2013-10-20 修回日期:2013-12-05)