

## 同源形成素样蛋白 2 基因对口腔鳞状细胞癌侵袭、迁移及核因子- $\kappa$ B 信号的影响

李勇伟\* 邱勋定 顾明 邓璇 谢莉莉

(海南省人民医院口腔科 海南 海口 570311)

**[摘要]** 目的:探讨下调同源形成素样蛋白 2(formin-like 2, FMNL2)基因表达对口腔鳞状细胞癌侵袭、迁移及核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号的影响。方法:FMNL2 的特异性小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)(si-FMNL2 组)及阴性对照 siRNA(NC 组)转染人口腔鳞状细胞癌 CAL-27 细胞,二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)作为 NF- $\kappa$ B 信号抑制剂,处理 48 h, Western blot 检测 FMNL2、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达; Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力。结果:与 NC 组比较, si-FMNL2 组和 PDTC 组细胞侵袭和迁移能力均明显降低, E-cadherin 蛋白表达明显升高, Vimentin、NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。与 PDTC 组比较, PDTC+si-FMNL2 组细胞侵袭和迁移能力均明显降低, E-cadherin 蛋白表达明显升高, Vimentin 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。结论:下调 FMNL2 基因表达可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路逆转上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而抑制口腔鳞状细胞癌侵袭和迁移能力。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌 同源形成素样蛋白 2 基因 侵袭 迁移 上皮-间充质转化 核因子- $\kappa$ B 信号

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2019)02—0137—05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.02.009

**Effect of FMNL2 Gene on Invasion, Migration, and NF- $\kappa$ B Signal in Oral Squamous Cell Carcinoma.** LI Yong-wei\*, QIU Xun-ding, GU Ming, DENG Yi, XIE Li-li. Department of Stomatology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of down-regulation of FMNL2 gene expression on invasion, migration, and NF- $\kappa$ B signal in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** FMNL2 specific siRNA (si-FMNL2) and negative control siRNA (NC) were transfected into human oral squamous cell carcinoma cells CAL-27. PDTC was set as NF- $\kappa$ B signal inhibitor. After the cells were treated for 48h, western blotting was used to detect FMNL2, E-cadherin, Vimentin, NF- $\kappa$ Bp65, and I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression. **Results:** Compared with the blank group, the cell invasion and migration ability in si-FMNL2 group and PDTC group decreased obviously, the expression of E-cadherin protein increased obviously, and the expression of Vimentin, NF- $\kappa$ Bp65, and I $\kappa$ B $\alpha$  protein decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the PDTC group, the cell invasion and migration ability in PDTC+si-FMNL2 group decreased obviously, the expression of E-cadherin protein increased obviously, and the expression of Vimentin protein decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Downregulation of FMNL2 gene expression can reverse EMT by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus inhibiting the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma.

**[Key words]** Oral squamous cell carcinoma FMNL2 gene Invasion Migration EMT NF- $\kappa$ B signal

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是常见的口腔颌面部恶性肿瘤,近些年其发病率有上升趋势<sup>[1]</sup>。同源形成素样蛋白 2

(formin-like 2, FMNL2)是 Formins 家族的成员,有研究表明,长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)牛磺酸上调基因 1(taurine upregulated gene 1, TUG1)可通过上调 FMNL2 表达促进 OSCC 进展<sup>[2]</sup>。近年研究表明,上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)在肿瘤侵袭及转移过程中发挥重要作用,包括 OSCC 在内的多种肿瘤细胞中已证实 EMT 可直接促进细胞侵

**基金项目** 2018 年海南省卫生计生行业科研项目(编号:18A200009)

**作者简介** 李勇伟(1973~),男,广东吴川人,学士,主管技师,研究方向为口腔修复医学及技术。

\* 通讯作者 李勇伟, E-mail: 87751194@qq.com

袭转移<sup>[3]</sup>。有研究表明,核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号与肿瘤增殖、侵袭、迁移、分化等密切相关,抑制 NF- $\kappa$ B 信号可通过逆转 EMT 降低肿瘤细胞侵袭和迁移能力<sup>[4]</sup>。因此,本研究通过 RNA 干扰技术抑制 FMNL2 表达,旨在研究下调 FMNL2 表达对 OSCC 侵袭和迁移的影响,并进一步探讨其是否与 NF- $\kappa$ B 信号和 EMT 有关。

## 1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 人 OSCC 细胞 CAL-27 购自美国菌种保藏中心。DMEM 培养基和胎牛血清(fetal calf serum, FBS)(美国 Gibco 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);FMNL2、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(美国 Abcam 公司);二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC, 美国 Sigma 公司);凝胶成像分析系统(美国 Bio-rad 公司)。

1.2 细胞培养及转染 CAL-27 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,2 d 换液 1 次。取生长至对数期的 CAL-27 细胞,以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 6 孔细胞培养板,每孔 2 mL,常规培养,细胞铺满培养板 60%~70% 时开始转染小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。其中 FMNL2 特异性 siRNA (si-FMNL2 组)及阴性对照 siRNA (NC 组)设计合成均由上海吉玛公司完成。参照 Lipofectamine™ 2000 说明制备 Lipo-2000-siRNA 复合物,将复合物加入至相应组别的培养孔中,设置加等体积脂质体的空白组,轻轻混匀,培养 4~6 h,更换含血清及双抗的培养基,继续培养 48 h,进行后续实验。

1.3 Western blot RIPA 裂解液提取转染 48 h 后的细胞总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒检测蛋白浓度,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、转聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、封闭后,洗膜,加一抗(稀释比例 1:500),4 °C 平缓摇动孵育过夜,加辣根过氧化物酶(horse reddish peroxidase, HRP)标记的二抗(稀释比例 1:2000),室温孵育 1 h,洗膜,加增强型化学发光显色剂在暗室内压片曝光。Quantity One 软件计算蛋白条带灰度值。实验重复 3 次。

1.4 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 Transwell 小室预先铺 Matrigel 胶(每孔 100  $\mu$ L)。Transwell 小室上室接种 200  $\mu$ L 细胞悬液( $5 \times$

$10^5$ /mL),Transwell 小室下室中加入含 20% FBS 的培养基 600  $\mu$ L,培养 24 h 后取出小室,洗净上室,棉签轻轻拭去上室底膜表层细胞,甲醇固定,苏木精染色,中性树胶封片,显微镜下( $\times 200$ )随机选择 5 个视野,计数穿透滤膜的细胞数,取均值。实验重复 3 次。

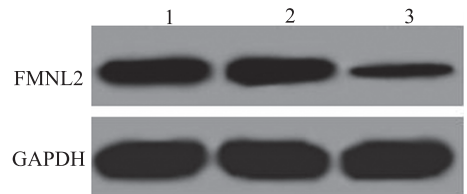
1.5 Transwell 小室检测细胞迁移能力 基本方法同细胞侵袭实验,区别在于未铺 Matrigel 胶。

1.6 抑制 NF- $\kappa$ B 信号对 CAL-27 细胞侵袭、迁移能力的影响 CAL-27 细胞分为空白组、PDTC 组(NF- $\kappa$ B 信号抑制剂,剂量 20  $\mu$ mol/L)和 PDTC+si-FMNL2 组,细胞处理 48 h,通过 Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力,Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达。方法同上。

1.7 统计学方法 数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 RNA 干扰效率 如图 1 所示,si-FMNL2 组 FMNL2 表达水平( $0.405 \pm 0.038$ )明显低于空白对照组( $0.105 \pm 0.010$ ,  $P < 0.05$ ),NC 组 FMNL2 表达水平( $0.417 \pm 0.042$ )与空白对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



1:空白对照组;2:NC组;3:si-FMNL2组

图 1 Western blot 检测 FMNL2 蛋白表达

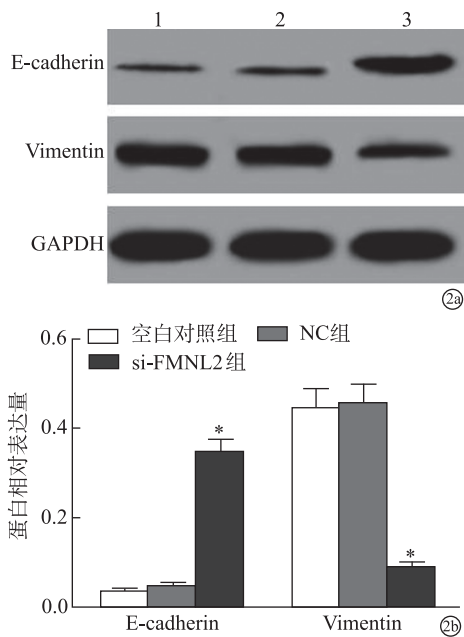
Fig. 1 Western blotting was used to detect the expression of FMNL2 protein.

2.2 si-FMNL2 可降低 CAL-27 细胞侵袭和迁移能力 si-FMNL2 组细胞侵袭( $92.3 \pm 5.1$ )及迁移( $122.3 \pm 8.5$ )能力均明显低于空白组( $178.9 \pm 10.7$ ,  $268.7 \pm 14.4$ ,  $P < 0.05$ )。

2.3 si-FMNL2 可抑制 CAL-27 细胞 EMT 如图 2 所示,与空白对照组比较,si-FMNL2 组 E-cadherin 表达水平明显升高,Vimentin 表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。

2.4 si-FMNL2 对 CAL-27 细胞 NF- $\kappa$ B 信号的影响 如图 3 所示,与空白对照组比较,si-FMNL2 组 NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平均明显降低( $P <$

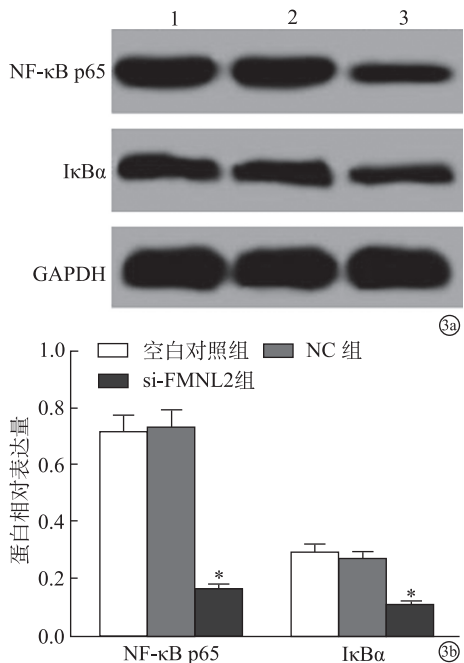
0.05)。



2a: Western blot 检测结果 1: 空白对照组; 2: NC 组; 3: si-FMNL2 组; 2b: E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$

图 2 si-FMNL2 对 CAL-27 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of si-FMNL2 on the expression of EMT associated protein in CAL-27 cells.



3a: Western blot 检测结果 1: 空白对照组; 2: NC 组; 3: si-FMNL2 组; 3b: NF-κB p65 和 IκBα 蛋白相对表达量 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$

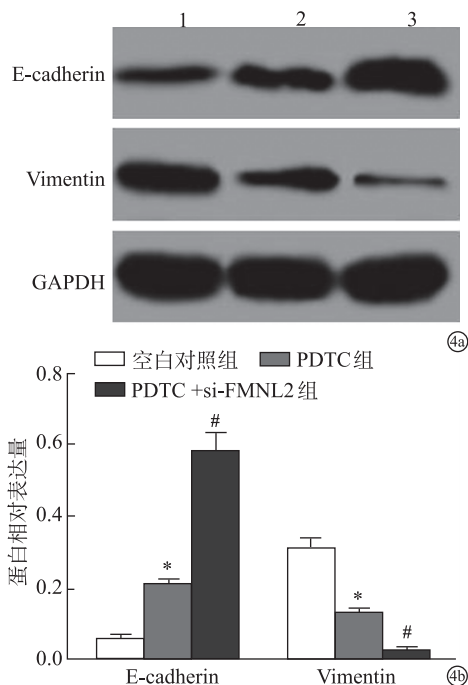
图 3 si-FMNL2 对 CAL-27 细胞 NF-κB 信号通路的影响

Fig. 3 Effect of si-FMNL2 on NF-κB signaling pathway in CAL-27 cells.

2.5 抑制 NF-κB 信号对 CAL-27 细胞侵袭和迁移

能力影响 PDTC 组细胞侵袭( $125.3 \pm 10.5$ )及迁移数( $140.5 \pm 10.2$ )均明显低于空白对照组( $175.6 \pm 12.7$ 、 $275.3 \pm 15.6$ ),而 PDTC + si-FMNL2 组细胞侵袭( $56.7 \pm 4.1$ )及迁移数( $76.9 \pm 6.7$ )均明显低于 PDTC 组( $P < 0.05$ )。

2.6 抑制 NF-κB 信号对 CAL-27 细胞 EMT 影响 如图 4 所示,与空白对照组比较,PDTC 组 E-cadherin 蛋白表达明显升高,Vimentin 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ );与 PDTC 组比较,PDTC + si-FMNL2 组 E-cadherin 蛋白表达明显升高,Vimentin 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。



4a: Western blot 检测结果 1: 空白对照组; 2: PDTC 组; 3: PDTC + si-FMNL2 组; 4b: E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 PDTC 组比较, #  $P < 0.05$

图 4 抑制 NF-κB 信号对 CAL-27 细胞 EMT 的影响

Fig. 4 Effect of NF-κB signal inhibition on EMT in CAL-27 cells.

3 讨论

FMNL2 是一个新近发现的基因,定位于染色体 2q23.3,目前在肿瘤中研究较少,有研究结果显示,FMNL2 异常表达与多种肿瘤侵袭转移及预后密切相关<sup>[5]</sup>。过表达 FMNL2 可通过促进 EMT 提高癌细胞的侵袭和迁移能力<sup>[6]</sup>。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发现和发展起来的一种能在转录水平阻断基因表达的技术,具有序列特异性、高效性、高稳定性及便利性等特点,在基因功能研究、抗肿瘤基因治疗、抗病毒治疗等方面有广泛应用<sup>[7]</sup>。有研究结果表明, RNAi 沉默 FMNL2 基因表达可降低结直肠癌细胞侵袭和迁移能力<sup>[8]</sup>。本研

究结果显示, RNAi 沉默 FMNL2 基因可降低 OSCC 细胞侵袭和迁移能力。

侵袭转移是癌细胞的一个重要特征,也是引起肿瘤患者死亡的重要原因。EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为有间质表型细胞的生物学过程,越来越多研究结果证实,EMT 可增强肿瘤细胞侵袭、迁移、多种耐药能力,减弱粘附能力,在上皮来源的肿瘤中扮演重要的角色<sup>[9]</sup>。EMT 的重要标志是 E-cadherin 等上皮细胞标志物表达减少, Vimentin 等间质细胞标志物表达升高<sup>[10]</sup>。E-cadherin 是钙粘蛋白家族成员之一,是 EMT 的标志分子,越来越多研究表明, E-cadherin 表达缺失或降低的肿瘤细胞更易失去细胞间粘附能力,从而增强肿瘤细胞侵袭和迁移能力<sup>[11]</sup>。有研究表明,抑制 OSCC 细胞 EMT 可降低癌细胞的侵袭和迁移能力<sup>[12]</sup>;抑制 FMNL2 基因表达可上调宫颈癌细胞 E-cadherin 表达和下调 Vimentin 表达<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,抑制 FMNL2 基因表达可上调 OSCC 细胞 E-cadherin 表达和下调 Vimentin 表达,这与前人研究结果一致。提示抑制 FMNL2 基因表达可通过逆转 EMT 降低 OSCC 细胞侵袭和迁移能力。

EMT 发生涉及多个信号途径,如磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸激酶(phosphoinositide 3-kinase/Serine threonine kinase, PI3K/AKT)、Wnt、NF- $\kappa$ B 信号等<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B 是重要的细胞核转录因子,在多种细胞中广泛存在,近年研究结果表明, NF- $\kappa$ B 信号与肿瘤发生、增殖、侵袭、转移、凋亡等密切相关,在多数肿瘤中处理持续激活状态,并可调节多种与肿瘤侵袭转移相关因子及基因表达促进肿瘤侵袭和迁移<sup>[15,16]</sup>。有研究结果显示,随着 OSCC 恶性程度增高, NF- $\kappa$ B 信号 NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  表达升高,抑制 OSCC 细胞 NF- $\kappa$ B 信号可降低癌细胞生长<sup>[17]</sup>。FMNL2 可通过影响 NF- $\kappa$ B 活化,进而促进结直肠癌细胞侵袭和迁移<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,抑制 FMNL2 基因表达可降低 OSCC 细胞 NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  表达,提示抑制 FMNL2 基因可能通过下调 NF- $\kappa$ B 信号逆转 EMT,从而抑制 OSCC 细胞侵袭和迁移。为了进一步证实是否通过下调 NF- $\kappa$ B 信号发挥作用,应用 NF- $\kappa$ B 信号抑制剂 PDTC 处理 OSCC 细胞,发现 PDTC 可增加下调 FMNL2 基因对 OSCC 细胞侵袭和迁移能力的影响,并可增加下调 FMNL2 基因对细胞 E-cadherin 表达上调和 Vimentin 表达下调的促进作用。因此,以上结果表明抑制 FMNL2 基因可通过下调 NF- $\kappa$ B 信号逆转

EMT,从而抑制 OSCC 细胞侵袭和迁移能力。

综上所述,下调 FMNL2 基因表达可抑制 OSCC 侵袭和迁移能力,其机制与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路逆转 EMT 有关。提示 FMNL2 基因可能是 OSCC 治疗的有效靶点之一,但还需更多研究作为理论支持。

## 参考文献

- [1] Yu XD, Yang J, Zhang WL, et al. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(3):2871-2877.
- [2] Yan G, Wang X, Yang M, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes progression of oral squamous cell carcinoma through upregulating FMNL2 by sponging miR-219 [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(9):1899-1912.
- [3] Ji C, Liu H, Yin Q, et al. miR-93 enhances hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by EMT via targeting PDCD4 [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(11):1621-1629.
- [4] Zhou W, Wang Q, Xu Y, et al. RMP promotes epithelial-mesenchymal transition through NF- $\kappa$ B/CSN2/Snail pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40373-40388.
- [5] 刘勇,阮思蓓,吕沐瀚,等.转移相关基因 FMNL2 参与胃癌侵袭转移的相关性分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(4):439-441.
- [6] Li Y, Zhu X, Zeng Y, et al. FMNL2 enhances invasion of colorectal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(12):1579-1590.
- [7] 潘斌,邓志海,吴友科,等.沉默 URG11 基因对前列腺癌 LNCaP 细胞增殖、迁移与侵袭的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(4):658-664.
- [8] 朱曦龄,黎功. FMNL2 基因对大肠癌细胞 SW620 增殖、侵袭及转移的影响[J]. *山东医药*, 2017, 57(24):34-37.
- [9] Wang L, Zhao Z, Feng W, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes colorectal cancer metastasis via EMT pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32):51713-51719.
- [10] Zong H, Yin B, Zhou H, et al. Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7):4507-4512.
- [11] Jing Z, Chen XY, Huang KJ, et al. Expression of FoxM1 and the EMT-associated protein E-cadherin in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4):2445-2450.
- [12] Hong KO, Lee JI, Hong SP, et al. Thymosin  $\beta$ 4 induces proliferation, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma [J]. *Amino Acids*, 2016, 48(1):117-127.
- [13] 陶明珠,张强,周铁军,等. FMNL2 基因小干扰 RNA 质粒转染人宫颈癌 HeLa、Siha 细胞株 Vimentin 及 E-cadherin 的表达观察[J]. *山东医药*, 2017, 57(19):5-8.
- [14] Song W, Wang L, Lei Z, et al. ZNF143 enhances metastasis

of gastric cancer by promoting the process of EMT through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Tumour Biol, 2016, 37(9):12813-12821.

[15] 杨芳,陈明月,胡英英,等. PPAR $\gamma$  在脂多糖刺激牙周膜细胞中调控 NF- $\kappa$ B 信号通路的作用研究[J]. 口腔医学研究, 2017,33(7):698-702.

[16] Liang F, Zhang S, Wang B, et al. Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) promotes glioma cell invasion and migration and down-regulates E-cadherin via the NF- $\kappa$ B pathway [J]. J Mol Histol, 2014, 45(2):141-151.

[17] Su X, Wang J, Chen W, et al. Overexpression of TRIM14 promotes tongue squamous cell carcinoma aggressiveness by activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(9):9939-9950.

[18] Yang SS, Li XM, Yang M, et al. FMNL2 destabilises COMMD10 to activate NF- $\kappa$ B pathway in invasion and metastasis of colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 117(8):1164-1175.

[收稿日期:2018-09-04]

(本文编辑 关隽)

### 《口腔医学研究》杂志审稿流程示意图

