

FZD10 对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

吴小凤^{1,2},程大钊^{1,3},詹日明^{1,2},陈黎^{1,3},王天雨^{1,3},余华^{1,3},张桂洪^{1,3},唐旭东^{1,3*} (1. 广东医科大学抗肿瘤活性物质研发协同创新中心, 广东湛江 524023; 2. 广东医科大学附属检验医学中心, 广东湛江 524001; 3. 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要: 目的 研究FZD10 对非小细胞肺癌(NSCLC) 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 采用Western blot 检测NSCLC 细胞(H1299、A549、H460、H1703、PC-9、95C、95D) 中FZD10 表达; 利用RNA 干扰技术敲低95D NSCLC 细胞中FZD10 表达, 分别采用CCK8、Transwell、Western blot 检测细胞增殖、迁移、侵袭及MMP-2、MMP-9 表达。结果 NSCLC(H1299、95D、95C、H1703、PC-9) 细胞中FZD10 表达明显高于正常人支气管上皮细胞BEAS-2B, 其中95D 细胞中表达最高。FZD10-siRNA 明显减少95D 细胞增殖、迁移、侵袭及MMP-2、MMP-9 表达($P<0.05$ 或 0.01)。结论 FZD10 可增强NSCLC 细胞增殖、迁移及侵袭能力。

关键词: FZD10; 增殖; 迁移; 侵袭; 非小细胞肺癌

中图分类号: R 734.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 06-0621-05

Effect of FZD10 on proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells

WU Xiao-feng^{1,2}, CHENG Da-zhao^{1,3}, ZHAN Ri-ming^{1,2}, CHEN Li^{1,3}, WANG Tian-yu^{1,3}, YU Hua^{1,3}, ZHANG Gui-hong^{1,3}, TANG Xu-dong^{1,3*} (1. Collaborative Innovation Center for Antitumor Active Substance Research and Development, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Center for Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of FZD10 on the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Methods FZD10 expression of NSCLC cells (H1299, A549, H460, H1703, PC-9, 95C and 95D) was determined by Western blot. After FZD10 of 95D cells was knocked down by RNA interference, proliferation, migration, invasion, and expression of MMP-2 and MMP-9 were detected by CCK8, Transwell and Western blot, respectively. Results FZD10 expression was increased in H1299, 95D, 95C, H1703 and PC-9 NSCLC cells compared with normal human bronchial epithelial cells (BEAS-2B), especially in 95D cells. The proliferation, migration, invasion, and expression of MMP-2 and MMP-9 of FZD10-siRNA transfected 95D cells were remarkably decreased ($P<0.01$ or 0.05). Conclusion FZD10 can enhance proliferation, migration and invasion of NSCLC cells.

Key words: FZD10; proliferation; migration; invasion; NSCLC

肺癌是最常见的癌症^[1],死亡率居恶性肿瘤之首^[2-3]。肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(NSCLC),其中NSCLC 约占85%,侵袭、转移是NSCLC 致死的重要因素之一。FZD10 是Frizzles(FZD)家族中的一员,为类G 蛋白偶联受体。目前已有文献报道FZD10 在骨肉瘤^[4]、胃癌^[5]、滑膜肉瘤^[6] 等癌组织中高表达,而且还发

现FZD10 与神经细胞、肿瘤细胞的增殖^[7-8] 及肿瘤的侵袭、转移有关^[8-9]。Gugger 等^[10] 也证实FZD10 在肺鳞癌中高表达,但FZD10 在NSCLC 细胞增殖、侵袭、转移中的作用仍不清楚。因此,本文拟对此进行分析,以期进一步了解NSCLC 侵袭、转移的分子机制,为寻找NSCLC 防治的潜在靶点提供参考依据。

收稿日期: 2022-07-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372511),广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515011081),广东省“扬帆计划”培养高层次人才项目(201635011),广东省普通高校特色创新类项目(自然科学)(2022KTSCX048)

作者简介: 吴小凤(1991-),女,硕士,技师, E-mail: 977830984@qq.com

通信作者: 唐旭东(1968-),女,博士,教授,硕士生导师, E-mail: txd@gdmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 细胞株

正常人支气管上皮细胞(BEAS-2B)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司(iCell Bioscience Inc); NSCLC 细胞株 A549 和 H1299 来自美国菌种保藏中心(ATCC); NSCLC 细胞株 95C、95D、H460 购自中国科学院细胞库, H1703 和 PC-9 由本实验室保存。

1.2 主要试剂

兔抗人 FZD10 抗体和兔抗人 MMP-2 抗体为英国 Abcam 公司产品; 兔抗人 MMP-9 抗体为北京 Bioss 产品; 结晶紫、CCK8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白检测试剂盒均购自碧云天生物科技公司; Matrigel 基质胶为美国 BD 公司产品; RT-qPCR 相关试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自宝生物工程(大连)有限公司(大连 TaKaRa 公司); FZD10-siRNA 及转染试剂 DharmaFECT™ Transfection Reagents-SiRNA 均购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 NSCLC 细胞(H1299、A549、H460、H1703、PC-9、95C、95D) 和 BEAS-2B 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 条件下传代培养。

1.3.2 细胞转染 参照美国 Thermo 公司转染试剂 DharmaFECT™ Transfection Reagents-SiRNA 说明书进行操作, 在 95D 细胞中转染 FZD10-siRNA, 并将细胞分成 3 组: (1) 模拟转染组(Mock): 仅加转染试剂; (2) 非特异 siRNA 转染组(Si-CTR): 转染非特异 siRNA; (3) FZD10-siRNA 转染组(Si-FZD10): 转染特异性 FZD10-siRNA。在所有转染实验中 FZD10-siRNA 的终浓度均为 25 nmol/L, 在 96 孔板中加入 FZD10-siRNA 2.5 pmol, 在 6 孔板中加入 FZD10-siRNA 50 pmol。

1.3.3 CCK8 细胞增殖实验 将 100 μL 95D 细胞悬液接种于 96 孔板(细胞数为 2 500 个/孔)培养 12 h 后转染, 分别在 24、48、72 h 时更换培养基为含有 CCK8 试剂的完全培养基 100 μL, 培养 1~2 h, 在波长为 450 nm 条件下检测吸光度值。

1.3.4 迁移、侵袭实验 将 95D 细胞接种到 6 孔板中, 瞬时转染 FZD10-siRNA 24 h 后, 将已转染细胞用

胰酶消化、离心、去上清, 再用含 10% FBS 的基础培养基重悬细胞沉淀并制成细胞悬液; 在 Transwell 板的下室缓慢加入 700 μL 完全培养基(避免出现气泡), 上室(侵袭实验应提前包被 Matrigel 基质胶)加入细胞悬液(细胞数为 30 000 个/孔), 每孔细胞悬液体积不超过 200 μL。培养 24 h 后, 用棉签擦拭上室, 于 4% 多聚甲醛中固定 25~30 min, 再用结晶紫在室温下染色 10 min, 清洗、晾干后在倒置显微镜下观察并拍照。结果使用 Image J 软件进行分析。

1.3.5 Western blot 使用强 RIPA 裂解液分别裂解 3 组转染细胞, 提取总蛋白, 使用 BCA 法检测蛋白原液浓度, 再进行 SDS-PAGE 电泳(100 V 电泳约 2 h), 转膜、电转(100 V 电转 1.5 h)、封闭; 分别加兔抗人 FZD10、MMP-2、MMP-9 抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜后, 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次; 用 HRP 标记的第二抗体(1:2 000) 常温孵育 1~2 h, 再用 PBST 缓冲液洗涤 3 次; 用 ECL 化学发光检测信号, Image J 软件进行灰度值分析, 将 GAPDH 用作内参对照。

1.3.6 RT-qPCR 使用 Trizol 分别裂解 3 组转染细胞, 提取总 RNA, 选择 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0 的样品, RT-qPCR 操作参照文献^[11-12]。FZD10 的扩增引物序列为 F: 5'-AGCAGGTCTCTACCCCATC-3' 和 R: 5'-TAATCGGGGAGCACTTGAGC-3' (GenBank No. NM_007197.4), GAPDH 的扩增引物序列为 F: 5'-ATGAATGGGCAGC CGTTAGG-3' 和 R: 5'-CCCAATACGACCAAATCAGA-GAT-3' (GenBank No. NM_001256799.2), 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增条件为 42 °C 5 min, 95 °C 10 s, 再 40 个循环(95 °C 5 s, 60 °C 31 s)。结果以 2^{-ΔΔCt} 对扩增产物进行相对定量分析, GAPDH 为内参对照。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析, 所有实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FZD10 在 NSCLC 细胞中的表达

Western blot 结果(图 1) 显示: 与 BEAS-2B 细胞相比, 除 A549 和 H460 细胞外, 在其他 NSCLC 细胞 H1299、95D、95C、H1703、PC-9 中的 FZD10 蛋白水平明显升高, 特别是在 95D 细胞中表达最高, 因此我们选择该细胞进行后续实验。

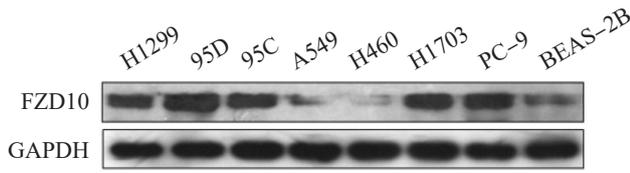


图1 NSCLC 细胞和正常肺上皮细胞的FZD10 表达

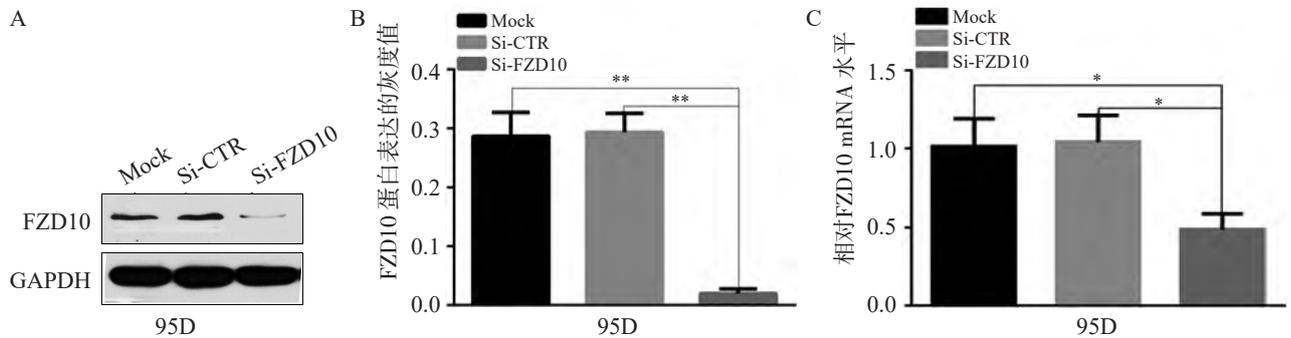
2.2 FZD10 敲低对 95D 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

从图2可见,在95D NSCLC 细胞中敲低FZD10,与Mock 组和 Si-CTR 组比较, Si-FZD10 组细胞的FZD10 蛋白和 mRNA 的表达都明显受抑 ($P < 0.05$ 或 0.01),说明FZD10 在 95D 细胞中被成功敲低。CCK8 检测结果(图3)显示: Si-FZD10 组细胞的增殖被抑

制,且在转染 72 h 时抑制显著 ($P < 0.05$); Transwell 小室实验结果(图4、5)显示: Si-FZD10 组细胞的迁移和侵袭能力明显降低 ($P < 0.01$),而Mock 组和 Si-CTR 组细胞的迁移、侵袭能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明FZD10 的敲低可抑制 95D 细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.3 FZD10 敲低对 95D 细胞MMP-2 和MMP-9 蛋白表达的影响

图6可见,与Mock 组、Si-CTR 组比较, Si-FZD10 组细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。



A. Western blot 检测结果; B. A 的灰度分析结果 ($n=3$, $**P < 0.01$); C. RT-qPCR 分析结果 ($n=3$, $*P < 0.05$)

图2 FZD10 的敲低效果分析

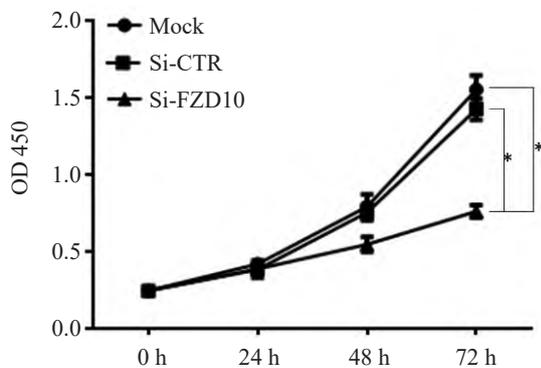
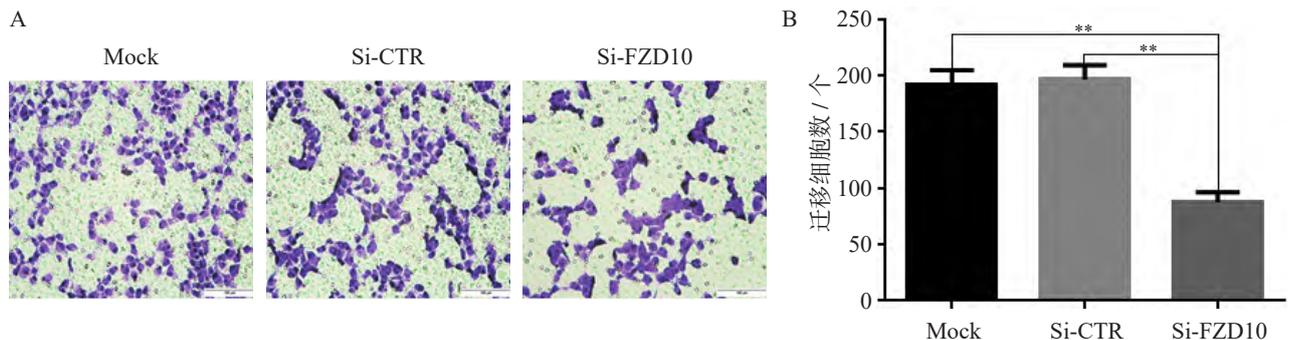


图3 敲低FZD10 对 95D 细胞增殖能力的影响 ($n=3$, $*P < 0.05$)

3 讨论

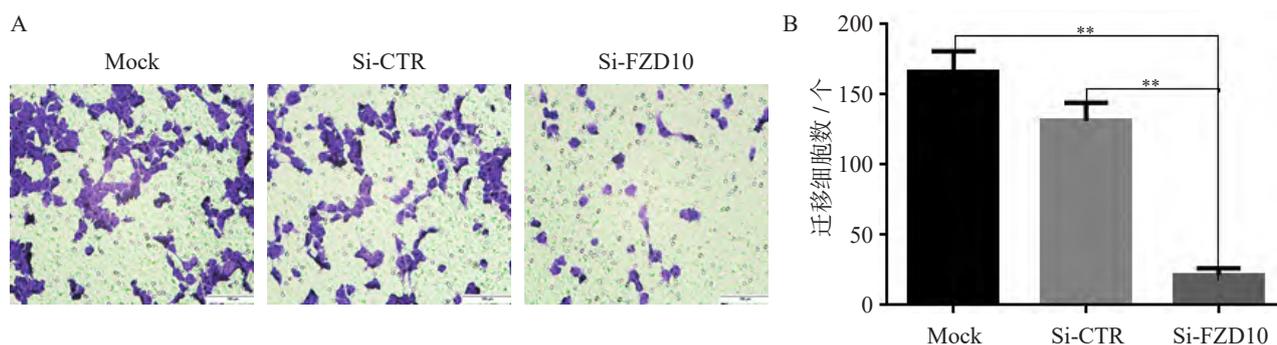
NSCLC 是临床上常见的恶性肿瘤,尽管近年来由于靶向药物和免疫治疗的临床应用使NSCLC 的疗效显著提高^[13-14],但NSCLC 发病机制复杂,涉及的信号分子繁多,治疗后的NSCLC 还是面临较大的复发和转移的风险,而目前有关肺癌转移的分子机制还不完全清楚。

FZD10 是Frizzles 家族中的一种蛋白受体。研究发现其在肺鳞癌等多种肿瘤组织中表达上调^[4-6, 10]。但最近 Zhang 等^[15] 却报道在 45 岁以下的 NSCLC 患者组



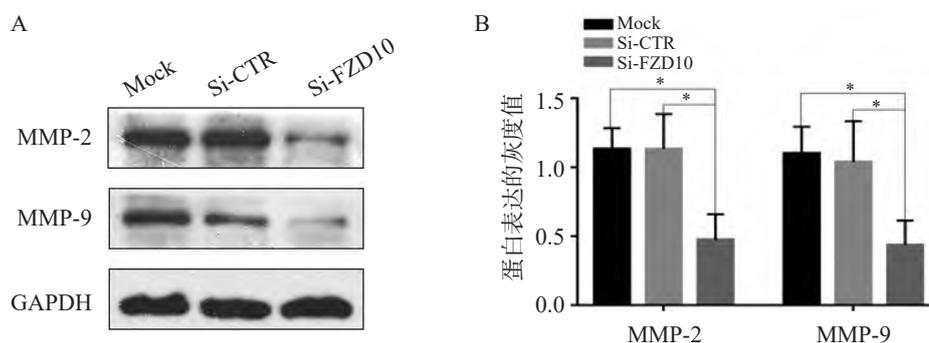
A. 显微镜观察 95D 细胞迁移能力的结果 ($\times 200$); B. 迁移细胞数统计分析结果 ($n=3$, $**P < 0.01$)

图4 敲低FZD10 对 95D 细胞迁移能力的影响



A. 显微镜观察 95D 细胞侵袭能力的结果 ($\times 200$); B. 侵袭细胞数统计分析结果 ($n=3$, $**P<0.01$)

图 5 敲低FZD10对95D细胞侵袭能力的影响



A. Western blot 检测结果; B. A 的灰度分析结果 ($n=3$, $*P<0.05$)

图 6 敲低FZD10对95D细胞MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响

织中FZD10 mRNA 的表达下调,这与Gugger等^[10]所报道的FZD10在肺鳞癌中过度表达不一致。这些报道结果的差异说明FZD10在NSCLC中的表达还存在争议。为进一步证实FZD10在NSCLC中的表达情况,本文采用Western blot技术分析了NSCLC细胞株中FZD10蛋白的表达,结果发现FZD10蛋白在NSCLC细胞株H1299、95C、95D、H1703、PC-9中都呈现高表达(图1)。

有研究显示,FZD10的表达与Survivin的表达相关,且两者的高表达可作为骨肉瘤诊断、恶性程度判断的重要指标^[4];而且,通过综合分析TCGA与GEO甲基化数据发现FZD10可能为胆管癌预后的相关基因^[16];特别是FZD10的表达还被报道可影响胃癌细胞的增殖和侵袭能力^[5],并且可能成为滑膜肉瘤^[6]、结肠癌^[17]治疗的靶点。这些报道说明,FZD10在肿瘤的发生、发展中具有重要作用。本文发现FZD10蛋白在具有高转移潜能的NSCLC细胞95D中表达最高(图1),初步说明FZD10表达可能与NSCLC转移有关。

为进一步探讨FZD10在NSCLC转移中的作用,本文通过RNA干扰技术敲低95D细胞中FZD10的表达,分析FZD10对NSCLC细胞增殖、迁移、侵袭的影响。结果发现,用特异性FZD10-siRNA敲低FZD10后,

可以明显抑制95D细胞的增殖($P<0.05$,图3)、迁移($P<0.01$,图4)和侵袭能力($P<0.01$,图5),提示FZD10可能在NSCLC转移中起重要作用。

基质金属蛋白酶属锌依赖性内肽酶家族,其中MMP-2、MMP-9与基底膜降解、血管生成相关,参与调控肿瘤的侵袭转移过程^[18]。为研究FZD10增强NSCLC细胞95D增殖、迁移、侵袭能力的机制,本文进一步分析了FZD10对NSCLC细胞MMP-2和MMP-9表达的影响,结果表明敲低FZD10后95D细胞中MMP-2和MMP-9蛋白的表达均显著降低($P<0.05$,图6)。本文结果初步说明,FZD10可能通过上调MMP-2和MMP-9的表达增强NSCLC细胞的增殖、迁移和侵袭能力,从而促进NSCLC转移,提示FZD10可能是NSCLC防治的潜在靶点。

参考文献:

- [1]PILLERON S, SOTO-PEREZ-DE-CELIS E, VIGNAT J, et al. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050[J]. Int J Cancer, 2021, 148(3): 601-608.
- [2]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

- [3]PATIL N S, NABET B Y, MÜLLER S, et al. Intratumoral plasma cells predict outcomes to PD-L1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(3): 289-300.
- [4]刘浩茹, 王洁, 王晨亮. Survivin FZD10 在骨肉瘤中的表达及临床意义[J]. *实用医技杂志*, 2016, 23(8): 822-823.
- [5]陈昌望, 王璋, 周玲, 等. FZD10 在胃癌中的表达以及对胃癌细胞的影响[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(11): 853-857.
- [6]SUDO H, TSUJI A B, SUGYO A, et al. FZD10-targeted α -radioimmunotherapy with ^{225}Ac -labeled OTSA101 achieves complete remission in a synovial sarcoma model[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(2): 721-732.
- [7]ALREFAEI A F, MÜNSTERBERG A E, WHEELER G N. FZD10 regulates cell proliferation and mediates Wnt1 induced neurogenesis in the developing spinal cord[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0219721.
- [8]SCAVO M P, DEPALO N, RIZZI F, et al. FZD10 carried by exosomes sustains cancer cell proliferation[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 777-794.
- [9]SCAVO M P, RIZZI F, DEPALO N, et al. A possible role of FZD10 delivering exosomes derived from colon cancers cell lines in inducing activation of epithelial-mesenchymal transition in normal colon epithelial cell line[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6705-6719.
- [10]GUGGER M, WHITE R, SONG S, et al. GPR87 is an overexpressed G-protein coupled receptor in squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Dis Markers*, 2008, 24(1): 41-50.
- [11]XIU Z, LIU J, WU X, et al. Cytochalasin H isolated from mangrove-derived endophytic fungus inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness via YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer cells[J]. *J Cancer*, 2021, 12(4): 1169-1178.
- [12]MA Y, XIU Z, ZHOU Z, et al. Cytochalasin H inhibits angiogenesis via the suppression of HIF-1 α protein accumulation and VEGF expression through PI3K/AKT/P70S6K and ERK1/2 signaling pathways in non-small cell lung cancer cells[J]. *J Cancer*, 2019, 10(9): 1997-2005.
- [13]ZHAO Y, GUO S, DENG J, et al. VEGF/VEGFR-targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: Targeting the tumor microenvironment[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(9): 3845-3858.
- [14]ZHU Y, ZHANG Y, HU X, et al. PD-1 inhibitors plus chemotherapy in EGFR/ALK-positive NSCLC patients with brain metastases and disease progression after EGFR/ALK-TKIs therapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(12): 3557-3566.
- [15]ZHANG Y, LU N, PU S, et al. Significance of screening sensitive methylation sites using whole-genome sequencing in early diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 67(5): 218-226.
- [16]范宁, 代增强, 王守光, 等. 综合分析TCGA 与GEO 甲基化数据鉴定胆管癌预后相关基因SOX9 和FZD10[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2021, 33(1): 25-31.
- [17]SCAVO M P, FUCCI L, CALDAROLA L, et al. Frizzled-10 and cancer progression: Is it a new prognostic marker?[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 824-830.
- [18]ILHAN S, DILEKCI G, GUNER A, et al. Newly synthesized benzimidazoles inhibit vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in prostate cancer cells[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(11): 2109-2115.

版权声明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据-数字化期刊群、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣),作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部