

EGFL8 基因表达下调抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭

侯鉴基¹, 魏文滨¹, 黄舒华¹, 吴斌华¹, 孙冰纯^{2*} (广东医科大学 1. 海洋医药研究; 2. 附属医院妇产科, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 明确表皮生长因子样结构域 8 (EGFL8) 基因在卵巢癌中异常表达及其对肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的调控。**方法** 对 36 份临床卵巢癌肿瘤组织标本和 8 份正常卵巢组织标本进行免疫组织化学染色, 检测 EGFL8 的表达。通过 RT-PCR 实验分析 EGFL8 在卵巢癌细胞株中的表达。合成 EGFL8 的 siRNA (siEGFL8) 并转染卵巢癌细胞, 分析其沉默 EGFL8 表达的能力。采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法、细胞划痕实验以及 Transwell 实验分别研究 siEGFL8 对卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响。**结果** 与正常卵巢组织比较, 卵巢癌组织 EGFL8 呈高表达 ($P<0.01$)。EGFL8 基因在 GEO 数据库中的 GSE14407 数据集以及卵巢癌 Caov3、A2780、SKOV3 细胞株中的表达均显著上调 ($P<0.05$ 或 0.01)。成功设计的 siEGFL8 抑制 EGFL8 基因的表达, 抑制卵巢癌细胞增殖呈时间依赖性 ($P<0.01$ 或 0.05)。细胞划痕和 transwell 侵袭实验结果表明, EGFL8 基因表达受抑后其迁移和侵袭能力显著下降 ($P<0.01$)。**结论** EGFL8 基因调控卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: 表皮生长因子样结构域 8; 卵巢癌; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

中图分类号: R 735.7

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 04-0367-06

Inhibition of the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells by downregulating the expression of EGFL8 gene

HOU Jian-ji¹, WEI Wen-bin¹, HUANG Shu-hua¹, WU Bin-hua¹, SUN Bing-chun^{2*} (1. Institute of Marine Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the aberrant expression of EGFL8 gene in ovarian cancer and its regulation over proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells. **Methods** The EGFL8 in 36 clinical ovarian cancer tissues and 8 normal ovarian tissues were identified with immunohistochemical staining. The expression of EGFL8 in ovarian cancer cell lines was determined by using Real time-PCR (RT-PCR). The EGFL8 siRNA was designed and manufactured before transfected into ovarian cancer cells to test its capacity to silence EGFL8. The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method, cell scratch assay, and transwell experiment were used to investigate the effect of siEGFL8 on the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells. **Results** The expression of EGFL8 in ovarian cancer tissues was significantly higher than that in healthy ovarian tissues ($P<0.01$). The expression of EGFL8 gene was significantly upregulated in the GEO database's GSE14407 dataset and in the ovarian cancer cell lines Caov3, A2780, and SKOV3 ($P<0.05$ or 0.01). The successfully designed siEGFL8 inhibited the expression of EGFL8 gene, inhibiting the proliferation of ovarian cancer cells in a time-dependent manner ($P<0.05$ or 0.01). Cell scratch and transwell invasion experiments revealed that the migration and invasion ability of EGFL8 gene decreased significantly after its expression was inhibited ($P<0.01$). **Conclusion** EGFL8 gene regulates the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells.

Key words: EGFL8; ovarian cancer; cell proliferation; cell migration; cell invasion

收稿日期: 2022-12-08

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)资助项目(ZJW-2019-007), 湛江市科技攻关项目(2020B01027), 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2021A05050), 广东省医学科研基金项目(A2023207)

作者简介: 侯鉴基(1994-), 男, 在读硕士研究生, E-mail: 1045662579@qq.com

通信作者: 孙冰纯, 副主任医师, E-mail: blovespace@163.com

卵巢癌是全球第三常见的妇科恶性肿瘤,在妇科恶性肿瘤中死亡率最高^[1],全球每年约有14万名妇女死于卵巢癌^[2]。大多数卵巢癌在III期(51%)和IV期(29%)时才被诊断出,全世界的卵巢癌患者5年生存率为30%~40%,近20年未见增加生存率^[3]。此外,70%的晚期上皮性卵巢癌患者会出现癌症复发,生存期极低^[4],因此寻找新的治疗方法非常重要。表皮生长因子样结构域7(EGFL7)是公认的肿瘤治疗靶点^[5-9],EGFL6在多种肿瘤中高表达^[10-12],EGFL8同样作为癌症的治疗靶点^[13],但卵巢癌相关报道尚少。本文旨在研究EGFL8基因在卵巢癌中的表达及功能,并探讨其作为治疗靶点的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验仪器和材料

选取2013年9月-2018年8月广东医科大学附属医院妇产科卵巢癌患者肿瘤组织标本36份,患者年龄(58.08±10.24)岁,病理类型均为卵巢高级别浆液性癌,根据FIGO(2014)分期指南:I期2份(均为I C期),II期6份(均为II B期),III期25份(III A期1份、III B期3份、III C期21份),IV期3份(均为IV B期)。正常卵巢组织标本8份,供者年龄为(54.50±4.78)岁。胎牛血清和高糖DMEM培养基购自Gibico公司,siEGFL8由上海吉玛公司合成,脂质体Viafect购自PROMEGA公司。EGFL8抗体(ab58650)、beta-Tubulin抗体(ab6046)以及通用型辣根过氧化物酶标记的人抗小鼠抗体或人抗兔抗体二抗均购自Abcam公司。PCR引物由上海生工公司合成,AG RNAexPro RNA提取试剂(A3A0031)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit由赛默飞世尔科技(中国)有限公司提供(K1622)。Epoch酶标仪由美国博腾仪器有限公司提供,荧光定量基因扩增仪购自德国ANALYTIKJENA,型号为qTOWER384G。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 卵巢癌细胞株SKOV3由本实验室保种。培养细胞前配制双抗10%胎牛血清培养基,置于细胞孵育箱进行培养,条件为37℃,5%CO₂。

1.2.2 细胞转染 以脂质体Viafect将siEGFL8转染入卵巢癌细胞,具体操作按说明书进行。将SKOV3细胞转种于6孔板,在汇合度达70%时转染。具体操作步骤为:6μg siEGFL8和500μL无血清DMEM培养基加入1.5mL EP管,另取一支1.5mL的EP管,加入6μL脂质体Viafect和500μL无血清DMEM培养基,

两管混合后在室温下静置20min,随后滴入6孔板。6h后换用完全培养基,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中继续培养。

1.2.3 靶向EGFL8基因的siRNA序列的设计 设计一条靶向EGFL8的siRNA,位点为其mRNA的513-531碱基,序列为5'-GTCATGTGGACGTGGATGA-3'。该siRNA设计后交由上海吉玛公司合成。将其转染入SKOV3细胞24h后,收集卵巢癌细胞提取总RNA,检测EGFL8基因的转录水平。

1.2.4 CCK-8法检测细胞生长抑制情况 取SKOV3细胞,按每孔1×10⁴个细胞接种于96孔板中,待细胞汇合度在60%左右时转染,6h后换液继续培养。12、24、36、48h后检测细胞增殖情况。具体操作为每孔加入10μL CCK-8溶液,继续在培养箱中培养4h,测定在450nm处的吸光度。以加入相同培养基和CCK-8试剂但无细胞的孔作为空白对照,设置以NC-siRNA作为阴性对照组,每组4个复孔。细胞增殖抑制率计算公式:细胞生长抑制率(%)=[(对照组A值-实验组A值)/(对照组A值-空白组A值)]×100%。

1.2.5 RT-PCR检测EGFL8 mRNA转录水平 各组细胞以2×10⁵/孔起始浓度接种于6孔板,按方法1.2.2的转染方法进行siEGFL8转染。24h后收集细胞,AG RNAexPro RNA提取试剂抽提总RNA,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit将RNA逆转录成cDNA,以荧光定量PCR(Real time-PCR, RT-PCR)方法测定EGFL8mRNA转录水平,GAPDH为内参照。EGFL8引物序列^[14]如下:上游引物5'-CCCCTC CACTACAACGAGT-3',下游引物5'-AACGCGGTACATGGTCCTGT-3';GAPDH:上游引物为5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3',反应程序为95℃预变性2min;95℃变性10s,55℃退火30s,63℃延伸30s,循环40次,72℃2min。

1.2.6 蛋白质印迹法(western blot, WB)检测EGFL8蛋白表达 将siEGFL8转染SKOV3细胞,48h后收集细胞检测EGFL8蛋白表达情况。测定蛋白质浓度,4℃14000g离心20min后,将蛋白样品与5×上样缓冲液按4:1体积混合,100℃煮沸10min,经12%的SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,转至PVDF膜上,在含5%脱脂奶粉的1×TBST中室温孵育2h,1×TBST漂洗1次,加入1:1500兔抗人EGFL8多克隆抗体,4℃下过夜,1×TBST洗3次,每次15min,与1:5000辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG作用

1 h, 1×TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 最后使用凝胶成像系统免疫印迹化学发光试剂显影。

1.2.7 细胞划痕实验 用marker 笔在 6 孔板背后画横线, 每孔至少穿过 5 条线, 每条线均匀且平行。在孔内接种约 6×10^5 个细胞, 原则为过夜后细胞能够长满。第 2 天用 20 μ L 枪头垂直孔板背后的黑线划痕, 使划痕与标记线相交。使用无菌 PBS 洗细胞 2~3 次, 去除划下的细胞, 使留下的间隙肉眼即清晰可见, 然后更换新鲜无血清或低血清(血清含量为 2%)的培养基。24 h 后, 在显微镜下观察并拍照保存。

1.2.8 Transwell 细胞侵袭实验 将 Matrigel 胶按 1:8 稀释, 包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 置 37 $^{\circ}$ C 细胞孵箱 2 h 使 Matrigel 胶聚合成凝胶, 备细胞悬液前可先让细胞在无血清培养基中饥饿培养 12 h, 细胞悬液 200 μ L 加入 Transwell 小室, 24 孔板下室则加入 600 μ L 含 10% FBS 的培养基, 培养 24 h, 取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 以多聚甲醛固定 30 min 后, 用 0.1% 结晶紫染色 30~60 min, 用 PBS 洗 3 遍。用棉签轻轻擦掉上室水分。400 倍显微镜下随机 3 个视野观察细胞, 计数。

1.3 统计学处理

采用 graphpad prism 9.0 进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFL8 在卵巢癌中的表达情况

免疫组织化学结果显示, 与正常卵巢组织(图

1A) 比较, 卵巢癌组织中 EGFL8 (图 1B、C、D) 呈高表达 ($P < 0.01$), 见图 1E。RT-PCR 检测结果显示, 与正常卵巢组织中的 EGFL8 表达水平相比, 卵巢癌组的 EGFL8 的表达水平显著增高 (4.57 ± 0.79) 倍 ($P < 0.01$), 如图 1F。

随后, 将卵巢癌 Caov3、A2780、SKOV3 3 个细胞株以及正常卵巢上皮细胞株 IOSE-80 分别种于 6 孔板中, 汇合度为 90% 时, 提取上述 4 个细胞株的 RNA, 进行 RT-PCR 检测 EGFL8 基因的转录水平。结果显示, EGFL8 在各卵巢癌细胞株中的转录水平均显著上调 ($P < 0.01$), 见图 2。

GEO 数据库中 GSE14407 数据集里 EGFL8 中的表达, 发现该基因表达也显著增高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.2 沉默 EGFL8 的表达

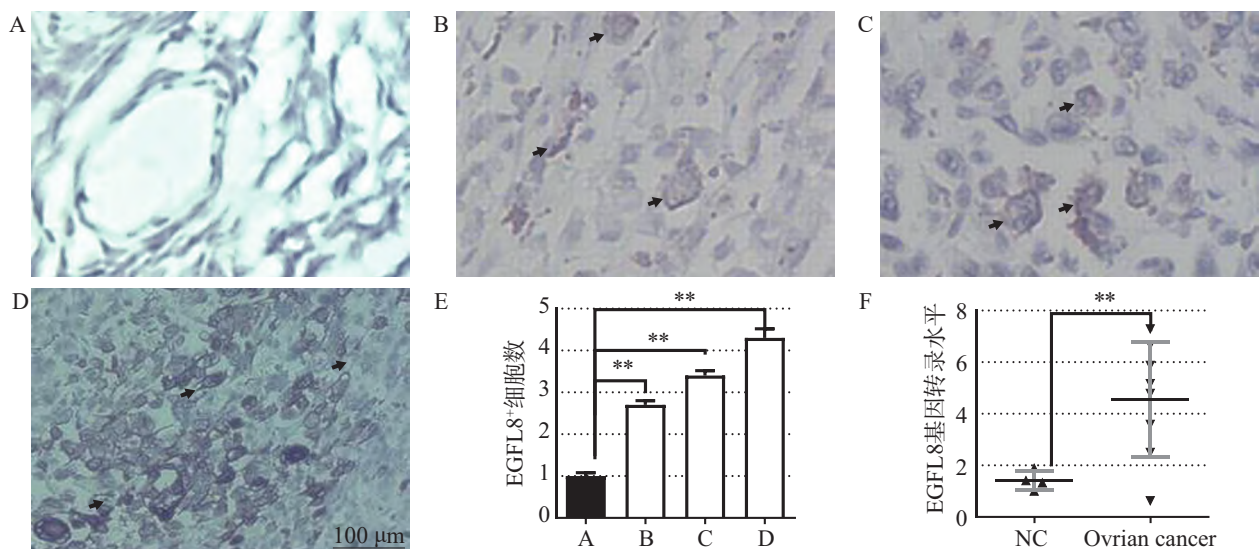
进一步对 EGFL8 功能进行验证, 本文设计一个靶向 EGFL8 的 siRNA (siEGFL8), 图 4A 为 RT-PCR 结果显示, EGFL8 转录水平受到显著抑制 ($P < 0.01$), mRNA 下调 81.29%。图 4B western blot 实验结果显示, EGFL8 蛋白的表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 与 RT-PCR 结果一致。

2.3 siEGFL8 抑制卵巢癌细胞增殖

siEGFL8 转染 SKOV3 细胞后, 抑制肿瘤细胞增殖呈时间依赖性, 同一时间内 siEGFL8 组的增殖抑制率显著高于 NC 组 ($P < 0.05$ 或 0.01), 见图 5。

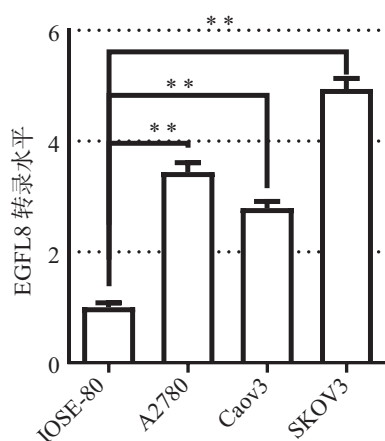
2.4 siEGFL8 抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭

细胞划痕实验研究结果表明, 转染 siEGFL8 后, 与 NC 组相比, SKOV3 细胞的迁移距离显著缩短, 抑制率达到 78% ($P < 0.01$), 见图 6A。transwell 细胞侵袭实



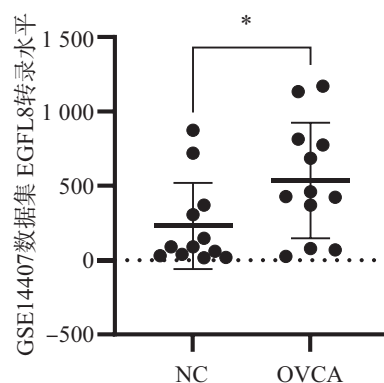
A. 正常卵巢组织; B~D. 不同个体卵巢癌组织, 黑色箭头指向 EGFL8 阳性区域; E. 免疫组化统计结果; F. RT-PCR 实验。与正常卵巢组织或 NC 组比较: ** $P < 0.01$

图 1 EGFL8 在卵巢癌组织中的表达情况



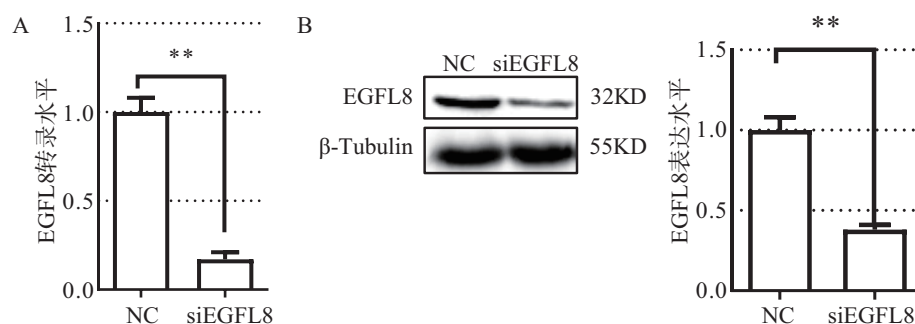
与正常卵巢上皮细胞株IOSE-80组比较: ** $P < 0.01$

图2 卵巢癌细胞株中EGFL8 mRNA水平



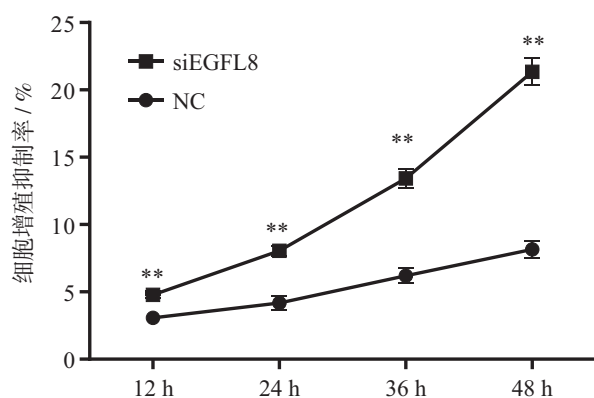
与NC组比较: * $P < 0.05$

图3 GEO数据库中GSE14407数据集结果



A. RT-PCR 实验; B. western blot 实验。与NC组比较: ** $P < 0.01$

图4 siEGFL8对SKOV3细胞中EGFL8表达的影响



CCK8 实验, 同时时间与NC组比较: ** $P < 0.01$

图5 siEGFL8抑制SKOV3细胞增殖

验结果显示, 与NC组相比, siEGFL8组的侵袭细胞数量显著减少, 抑制率达65% ($P < 0.01$), 见图6B。

3 讨论

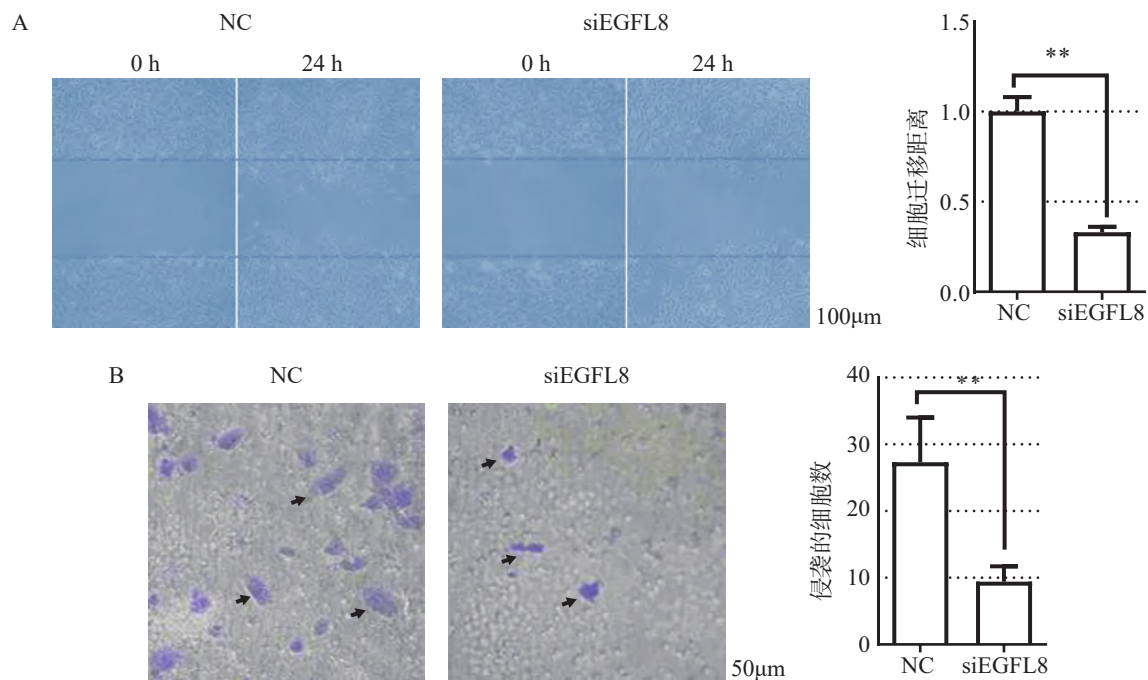
EGFL8基因属于表皮生长因子样结构域基因家族, 因其成员的蛋白质结构包含单个或多个EGFL结构域而得名^[13]。EGFL8是EGFL家族中新发现的成员, EGFL8参与胸腺上皮细胞和胸腺T细胞的发育调

控^[14-15]。EGFL8在正常组织中的表达存在差异性, 在肿瘤组织中可能存在同样的差异。Fagerberg等^[16]报道, EGFL8基因在卵巢、皮肤、子宫内膜等组织中高表达, 其中在卵巢中的水平最高, 但该基因在消化系统中的表达出现显著下降, 在胃、肠、肝等组织中的表达显著低于女性生殖系统。然而EGFL8在肿瘤, 特别是在卵巢癌组织中的表达及功能尚未清晰。

本实验结果发现该基因在卵巢癌细胞中高表达。此外, 卵巢癌组织中EGFL8蛋白表达的阳性细胞数也显著高于正常卵巢组织。此实验数据与GEO数据库中的GSE14407数据集的结果一致。

Lim等^[17]对小鼠皮质胸腺上皮细胞基因功能表征分析发现, EGFL8参与的生物过程中细胞增殖、迁移、生长。因此, 深入分析它在肿瘤环境中对卵巢癌细胞的增殖、迁移以及侵袭的调控情况。本文设计了靶向EGFL8基因的siRNA片段 (siEGFL8), 转染入卵巢癌SKOV3细胞后, CCK-8实验结果显示实验组数据显著下调, 提示EGFL8基因表达下调后卵巢癌细胞的增殖能力显著受抑。

细胞划痕和transwell细胞侵袭实验分析siEGFL8



A. 细胞划痕实验; B. transwell 实验, 黑色箭头为结晶紫染色的细胞。与NC 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图6 siEGFL8 抑制SKOV3 细胞迁移与细胞侵袭

对卵巢癌细胞迁移和侵袭能力的影响。转染siEGFL8的细胞迁移数显著少于阴性对照组。而transwell细胞侵袭实验结果表明,转染siEGFL8卵巢癌细胞穿过Matrigel胶和transwell小孔的数量显著低于阴性对照组,说明EGFL8基因表达下调后卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力显著受抑。总之,本次研究的结果初步表明EGFL8可望成为卵巢癌新的基因治疗靶点,从而为卵巢癌治疗提供新的思路。

然而,本研究结果与某肿瘤研究出现一些差异。与该基因在正常消化系统中的表达相似,但EGFL8在消化系统肿瘤组织中的表达显著下调。肝癌细胞较正常组织中的表达下调,并且通过激活Notch信号通路促进肝细胞癌的迁移、侵袭和凋亡^[18]。在胃癌细胞和直肠癌组织中也发现EGFL8的表达下调^[19-20]。根据这些研究报告,结合本研究结果,可以认为EGFL8在消化系统肿瘤中具有抑癌作用,在女性生殖系统肿瘤中有致癌作用。本次研究仅初步分析EGFL8对卵巢癌细胞表型的调控,其具体作用机制有待深入探讨。此外,本次研究仅进行体外实验,仍需建立卵巢癌动物模型,进一步分析敲除EGFL8基因后在体内对卵巢癌的具体影响,后续研究将重点阐明EGFL8高表达致癌的具体作用机制。

参考文献:

[1] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial

ovarian cancer [J]. BMJ, 2020, 371: m3773.

[2] PENNY S M. Ovarian cancer: An overview [J]. Radiologic technology, 2020, 91(6): 561-575.

[3] NEBGEN D R, LU K H, BAST R C, J R. Novel approaches to ovarian cancer screening [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(8): 75.

[4] ALLEMANI C, WEIR H K, CARREIRA H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25, 676, 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. Lancet, 2015, 385(9972): 977-1010.

[5] CHENG Z, DAI Y, PANG Y, et al. High EGFL7 expression may predict poor prognosis in acute myeloid leukemia patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(10): 1314-1318.

[6] FITCH M J, CAMPAGNOLO L, KUHNERT F, et al. Egfl7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells [J]. Dev Dyn, 2004, 230(2): 316-324.

[7] JUAN Z, DAI C, TANAKA K, et al. EGFL7 as a novel therapeutic candidate regulates cell invasion and anoikis in colorectal cancer through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Int J Clin Oncol, 2021, 26(6): 1099-1108.

[8] SALAMA Y, HEIDA A H, YOKOYAMA K, et al. The EGFL7-ITGB3-KLF2 axis enhances survival of multiple myeloma in preclinical models [J]. Blood advances, 2020, 4(6): 1021-1037.

[9] BILL M, PATHMANATHAN A, KARUNASIRI M, et al. EGFL7 antagonizes NOTCH signaling and represents a novel therapeutic target in acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(3): 669-678.

- [10]WU B, ZHANG L, YU Y, et al. MiR-6086 inhibits ovarian cancer angiogenesis by downregulating the OC2/VEGFA/EGFL6 axis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 345.
- [11]HUO F C, ZHU W T, LIU X, et al. Epidermal growth factor-like domain multiple 6 (EGFL6) promotes the migration and invasion of gastric cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. Invest New Drugs, 2021, 39(2): 304-316.
- [12]AN J, DU Y, FAN X, et al. EGFL6 promotes breast cancer by simultaneously enhancing cancer cell metastasis and stimulating tumor angiogenesis [J]. Oncogene, 2019, 38(12): 2123-2134.
- [13]SHI S, MA T, XI Y. A pan-cancer study of epidermal growth factor-like domains 6/7/8 as therapeutic targets in cancer [J]. Front Genet, 2020, 11: 598743.
- [14]SUBHAN F, YOON T D, CHOI H J, et al. Epidermal growth factor-like domain 8 inhibits the survival and proliferation of mouse thymocytes [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4): 952-958.
- [15]CHOI H J, YOON T D, MUHAMMAD I, et al. Regulatory role of mouse epidermal growth factor-like protein 8 in thymic epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(2): 250-255.
- [16]FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, OKSVOLD P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(2): 397-406.
- [17]LIM Y S, LEE D Y, KIM H Y, et al. Descriptive and functional characterization of epidermal growth factor-like domain 8 in mouse cortical thymic epithelial cells by integrated analysis of gene expression signatures and networks [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 4.
- [18]WU F, ZHANG F Y, TAN G Q, et al. Down-regulation of EGFL8 regulates migration, invasion and apoptosis of hepatocellular carcinoma through activating Notch signaling pathway [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 704.
- [19]WU F, SHIRAHATA A, SAKURABA K, et al. Down-regulation of EGFL8: A novel biomarker for advanced gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2011, 31(10): 3377-3380.
- [20]WU F, SHIRAHATA A, SAKURABA K, et al. Down-regulation of EGFL8: A novel prognostic biomarker for patients with colorectal cancer [J]. Anticancer Res, 2011, 31(6): 2249-2254.

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