

临床细胞生物学

FHL2对人鼻咽癌5-8F细胞恶性生物学行为影响及相关机制

王雪¹ 王晓琼¹ 孟易禹¹ 金巧智² 陈武兵² 蔡志毅^{1,2*}¹温州医科大学第一临床医学院, 温州 325000; ²台州市市立医院耳鼻咽喉头颈外科, 台州 318000

摘要 采用定量Real-time PCR(qRT-PCR)、Western blot法检测NP-69和5-8F细胞中FHL2表达情况及转染后5-8F各组细胞中FHL2、c-myc、 β -catenin的mRNA与蛋白质水平; 利用CCK-8法、细胞平板克隆形成实验、划痕实验及Transwell实验分别检测转染后5-8F各组细胞增殖、迁移及侵袭能力。实验结果显示, 鼻咽癌细胞株5-8F的FHL2蛋白质水平高于NP-69, 转染siRNA的5-8F细胞中FHL2表达水平显著低于无关序列组和空白对照组($P < 0.01$)。下调FHL2基因表达后5-8F细胞增殖、侵袭、迁移能力均受到抑制($P < 0.05$), 且转染组5-8F细胞中c-myc、 β -catenin的mRNA及相应蛋白质水平均有下降($P < 0.01$)。综上所述, 在5-8F细胞中FHL2高表达。FHL2基因敲低后可以抑制5-8F细胞增殖、侵袭、迁移能力, 并可能通过Wnt信号通路影响鼻咽癌5-8F细胞的恶性生物学行为。

关键词 FHL2; Wnt通路; 鼻咽肿瘤; 细胞增殖

The Effect of FHL2 on the Malignant Biological Behaviors of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line 5-8F and Its Related Mechanism

Wang Xue¹, Wang Xiaoqiong¹, Meng Yiyu¹, Jin Qiaozhi², Cheng Wubing², Cai Zhiyi^{1,2*}¹The First Clinical Medical Institute, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;²Department of Otolaryngology, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, China)

Abstract The transient transfection method was employed to down-regulate the *FHL2* gene expression in human nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells. qRT-PCR was used to detect the levels of *FHL2*, *c-myc* and β -*catenin* mRNA in each group of Transfected NP-69 and 5-8F cells. Meanwhile, the levels of FHL2, c-myc and β -catenin protein were detected by Western blot. The cell proliferation ability, cloning ability and migration ability in transfected cells were detected by CCK-8 method, cell clone formation experiment, wound healing test and Transwell assay, respectively. Western blot results showed that the level of FHL2 in nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F was obviously higher than that in non cancerous immortalized human nasopharyngeal epithelial cells NP-69. After down-regulation of *FHL2* gene expression, the abilities of proliferation, migration and invasion of 5-8F cells were significantly inhibited ($P < 0.05$). The results from qRT-PCR and Western blot showed that the levels of *FHL2* mRNA and protein in transfected siRNA cells were significantly lower than that of unrelated sequence group and blank control group ($P < 0.01$). Moreover, the levels of c-myc, β -catenin mRNA and protein in the transfected 5-8F cells were significantly decreased compared with NC group and control group ($P < 0.01$). Together,

收稿日期: 2017-10-17 接受日期: 2018-03-02

*通讯作者。Tel: 0576-88858000, E-mail: caizy008@tom.com.cn

Received: October 17, 2017 Accepted: March 2, 2018

*Corresponding author. Tel: +86-576-88858000, E-mail: caizy008@tom.com.cn

网络出版时间: 2018-05-15 18:12:25 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1812.018.html

the expression of *FHL2* gene, a potential oncogene was up-regulated in nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells. *FHL2* gene might regulate the germination and development of nasopharyngeal carcinoma through Wnt signaling pathway, and the abilities of cell proliferation, migration and invasion were significantly suppressed if *FHL2* gene was knockdown in the 5-8F cells.

Keywords FHL2; Wnt pathway; nasopharyngeal carcinoma; cell proliferation

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是常见的头颈部恶性肿瘤之一,近20年来发病率不断上升,我国广东、广西、福建和浙江等地为世界鼻咽癌高发区。目前,鼻咽癌的发病机制尚不十分清楚,且经过以根治性放疗为主的传统的治疗后,鼻咽癌患者的十年生存率依然在60%左右^[1-2]。又因鼻咽癌解剖位置隐蔽,早期症状不典型,放疗后易复发和远处转移等因素,鼻咽癌的早期诊断与预后不甚理想。因此,探索新的分子诊断标志物和治疗靶点,对于鼻咽癌的早期诊断、治疗及判断预后具有重要意义。

FHL(four and half LIM domains)由4个半LIM结构域组成,目前发现的FHL家族成员有FHL1、FHL2、FHL3、FHL4和FHL5(ACT),其中,FHL2(four and a half LIM domain 2)是FHL蛋白质家族中研究最深入的成员。早期研究表明,FHL2在细胞的增殖、分化、凋亡等生物学过程中发挥了举足轻重的作用^[3-4]。近年来研究发现,FHL2还对肿瘤的发生发展及预后具有重要影响^[5-6]。更为有趣的是,FHL2在肿瘤的发生发展过程中具有两面性,即可促进肿瘤发展,亦可抑制肿瘤发展。随着研究的不断深入,FHL2作为新的基因靶点,为诸多肿瘤的基因治疗提供了新的途径。但FHL2是否能成为鼻咽癌分子诊断的新靶标尚不明确。

本研究通过体外研究,利用qRT-PCR及Western blot等技术观察在鼻咽癌细胞株5-8F中*FHL2*基因表达及下调FHL2蛋白质水平后5-8F细胞生物学行为的变化,探索FHL2蛋白在鼻咽癌发生发展中可能发挥的作用,分析其与鼻咽癌的相关性及作用机制。该文旨在为进一步探讨*FHL2*基因与肿瘤的关系提供新的实验数据,并为鼻咽癌的早期诊断提供新的标志物。

1 材料与方 法

1.1 材料

人低分化、成瘤、高转移5-8F鼻咽癌细胞株及永生化NP-69鼻咽上皮细胞株由中国科学院上海

细胞库提供。DMEM培养基、PBS缓冲液、Opti-MEM1无血清培养基、胎牛血清和胰蛋白酶-EDTA消化液均购自Gibco公司。CCK-8试剂盒购自Bryotime公司。Trizol reagent、cDNA第一链合成试剂盒和RealMaster Mix(SYBR Green)荧光定量PCR试剂盒购自天根生物科技有限公司。兔来源单克隆抗体FHL2、c-myc、 β -catenin购自Abcam公司。兔抗人 β -actin抗体购自杭州贤至生物科技有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗购自北京索来宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有10%胎牛血清DMEM培养基,在37 °C、5% CO₂恒温恒湿条件下贴壁培养5-8F及NP-69细胞。1~2天换液,细胞处于对数生长期时按1:3传代培养。

1.2.2 5-8F细胞转染及转染效率的检测 细胞转染及转染效率检测采用孟易禹等^[7]的方法,稍作修改。将对数生长期的5-8F细胞株制成细胞悬液并检测浓度,以 2×10^5 /孔接种6孔板,待细胞汇合至70%~90%时转染,转染前30~40 min换液,加入无血清培养基1.5 mL/孔。按Lipofectamine 2000(Lipo 2000)说明书操作,以250 μ L的Opti-MEM1无血清培养基分别稀释FHL2-siRNA、FAM-NC和Lipo 2000,混匀后室温静置5 min。将上述溶液与Lipo 2000稀释液均匀混合后静置15~20 min,加入6孔板中继续培养。将转染siRNA-FHL2+Lipo 2000组(si-FHL2组)作为实验组,转染FAM-NC+Lipo 2000组(NC组)作为阴性对照组,只加入Lipo 2000稀释液组为空白对照组(Control组)。6 h后,PBS冲洗细胞2~3次,去除背景荧光染料后于荧光显微镜下观察并拍照。荧光染料组需全程避光操作、培养。

1.2.3 qRT-PCR检测*FHL2*的干扰效率及各相关mRNA水平变化 利用Trizol法提取转染48 h后5-8F各组细胞总RNA。取少量RNA在紫外分光光度计下检测 D_{260} 、 D_{280} 的 D 值,计算 D_{260}/D_{280} 比(比值应处于1.8~2.1之间)。按天根生物科技有限公司

cDNA合成说明书及荧光定量PCR(qRT-PCR)说明书合成cDNA后配制20 μL 反应体系,每个样本设3个复孔。qRT-PCR反应步骤为95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共40个循环。反应以 β -actin为内参照。FHL2的上游引物序列为:5'-GCC TGG GTG AGA AAG AAA ACA TAA-3',下游引物序列为:5'-GAG GAA CGG CAG TGG CAT AAC-3'。 β -actin的上游引物序列为:5'-CTA CCT CAT GAA GAT CCT CAC CGA-3',下游引物序列为:5'-TTC TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT-3'。 β -catenin的上游引物序列为:5'-CCG AAG GAC AGT ACG CAC AAG-3',下游引物序列为:5'-CAG GAA GGG ATG GAA GGT CTC-3'。*c-myc*的上游引物序列为:5'-CAT TTT CGG TTG TTG CTG ATC-3',下游引物序列为:5'-TCC CTC CAC TCG GAA GGA CTA-3'。所得各孔Ct值以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。独立实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测FHL2的干扰效率及相关蛋白质水平 按孟易禹等^[7]的方法提取5-8F细胞、NP-69细胞及各组转染后细胞总蛋白。采用BCA法检测并调节蛋白质浓度。取等量蛋白质顺序加样,待目的蛋白质泳动至分离胶2/3时停止电泳,采用湿转法转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h。TBST充分洗膜后加特异性一抗,一抗稀释比例为 β -actin(1:1 000)、FHL2(1:1 000)、 β -catenin(1:10 000)、*c-myc*(1:10 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,二抗(1:10 000)室温孵育1 h。采用ECL发光液显影,ImageQuant LAS 4000 Mini凝胶成像仪自动曝光,利用Quantiy One软件计算各组与内参照 β -actin灰度的相对比值。每个样本重复3次实验。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力 取96孔板按 8×10^3 /孔接种处于对数生长期的5-8F细胞,参照上述方法转染各组细胞。每组取6孔,另设只含完全培养基的6孔为标准空白孔,培养48 h后PBS洗涤并于每孔中加入10 μL CCK-8试剂,混匀后继续培养1~2 h,酶标仪检测450 nm波长下每孔的D值。

1.2.6 平板集落形成实验 将转染后细胞按 8×10^2 /孔接种于6孔板中,连续培养10天。洗涤后90%甲醇固定15 min,再次洗涤后0.1%结晶紫染色15 min,洗净拍照。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力 取6孔板,背面均匀画平行横线后每孔接种约 3×10^5 个5-8F细胞。贴壁培养24 h后,按上述方法转染各组细胞。6 h后用100 μL 的Tip头垂直于横线划痕,PBS冲洗1~2次,加入

无血清培养液继续培养。分别于0 h、24 h和48 h在显微镜下拍照,用ImageJ 1.46软件计算迁移率。迁移率=(初始划痕的宽度值-相应点的划痕宽度值)/初始划痕的宽度值 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.8 Transwell实验检测细胞侵袭能力 向Transwell小室的上室中每孔加入50 μL 用无血清的DMEM培养基稀释的Matrigel,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。使用前1 h每孔加入100 μL 含1%胎牛血清的DMEM培养液,使用前吸除。制备终浓度为 1×10^5 /mL的各组细胞悬液。于Transwell上室中每孔加入200 μL 细胞悬液,下室中每孔加入500 μL 含有10%胎牛血清的DMEM培养基。继续培养12 h。取出Transwell小室,轻擦去上室内的细胞。洗涤后4%多聚甲醛固定15 min,再次洗涤后0.1%结晶紫染色15 min,清水冲洗后显微镜下观察并随机选择3个视野拍照并计数,实验重复3次。

1.3 统计学处理

统计学分析采用SPSS 19.0软件。计量资料以均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示,两组不同细胞间FHL2蛋白表达量的比较采用 χ^2 检验,多样本均数之间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两样本间均数的差异性分析采用*t*检验,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

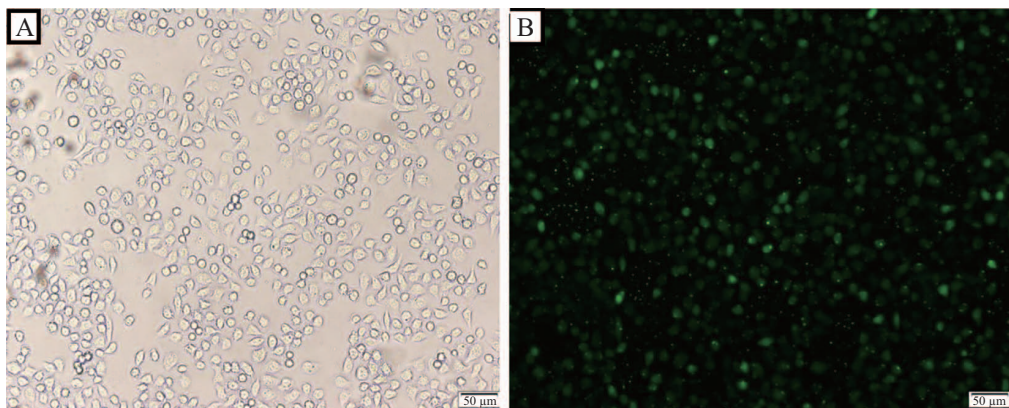
2 结果

2.1 细胞转染效率

将带有FAM荧光蛋白的无关序列(FAM-NC)转入5-8F细胞株6 h后,于倒置荧光显微镜下检测到绿色荧光。计算荧光下细胞数、白光下细胞数比值。结果显示,转染效率约80%(图1)。

2.2 qRT-PCR检测FHL2、c-myc、 β -catenin的mRNA水平变化

采用qRT-PCR检测FHL2、*c-myc*、 β -catenin相对表达水平,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算出相对表达水平。结果显示,以内参 β -actin的mRNA表达水平为对照,FHL2在siRNA-FHL2组、NC组及空白对照组的mRNA相对水平分别为 0.18 ± 0.02 、 0.99 ± 0.02 和 1.02 ± 0.01 , β -catenin在siRNA-FHL2组、NC组及空白对照组的mRNA相对水平分别为 0.57 ± 0.02 、 1.05 ± 0.02 和 1.04 ± 0.01 ,*c-myc*在siRNA-FHL2组、NC组及空白对照组的mRNA相对水平分别为 0.65 ± 0.04 、 1.15 ± 0.02 和 1.19 ± 0.01 。应用单因素方差分析对计算结果进行

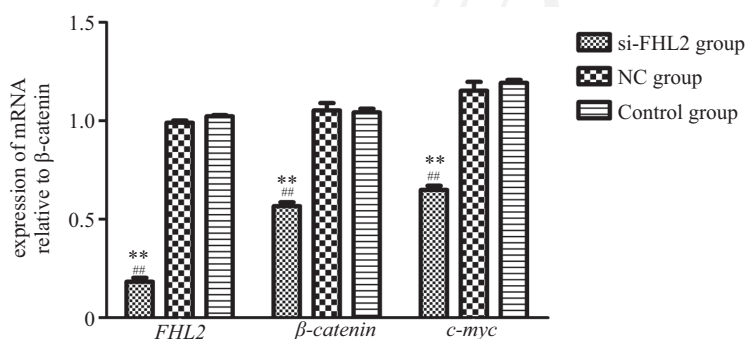


A: 转染6 h后白光下5-8F细胞; B: 转染6 h后荧光下5-8F细胞。

A: the 5-8F cells under the white light after transfctrd for 6 h; B: 5-8F cells under the fluorescence light after transfctrd for 6 h.

图1 转染6 h后5-8F细胞荧光表达情况

Fig.1 The expression of FAM fluoescin in the human nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells after tansfected for 6 h



** $P < 0.01$, 与对照组比较; ### $P < 0.01$, 与NC组比较。

** $P < 0.01$ vs control group, ### $P < 0.01$ vs NC group.

图2 转染48 h后5-8F细胞中FHL2、β-catenin、c-myc的mRNA相对水平

Fig.2 The relative level of FHL2, β-catenin, c-myc mRNA in human nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells after tansfected for 48 h

统计分析, 结果显示, 转染后siRNA-FHL2组的FHL2、c-myc、β-catenin的相对表达量明显低于NC组及空白对照组($P < 0.01$), NC组和空白对照组之间的差异无统计学显著性($P > 0.05$)(图2)。

2.3 Western blot检测FHL2、c-myc、β-catenin蛋白质水平

根据Western blot实验结果, 计算各组蛋白质与内参β-actin条带灰度值的平均比值, 得出在NP-69细胞和5-8F细胞中FHL2相对表达量分别为 1.03 ± 0.1 和 0.72 ± 0.05 , 差异有统计学意义($P < 0.01$)。人鼻咽癌5-8F细胞经转染siRNA-FHL2或NC处理48 h后, FHL2、c-myc和β-catenin蛋白质水平在si-FHL2组分别为 1.16 ± 0.02 、 0.65 ± 0.03 和 1.12 ± 0.02 , 在NC组分别为 1.49 ± 0.02 、 1.02 ± 0.03 和 1.60 ± 0.02 , 而在空白对照组则分别为 1.45 ± 0.02 、 0.96 ± 0.03 和 1.69 ± 0.03 。结果显示, si-FHL2组相对NC组及空白对照组明显下调,

具有统计学意义($P < 0.01$), NC组和空白对照组之间无显著差异($P > 0.05$)(图3和图4)。

2.4 FHL2对5-8F细胞增殖能力的影响

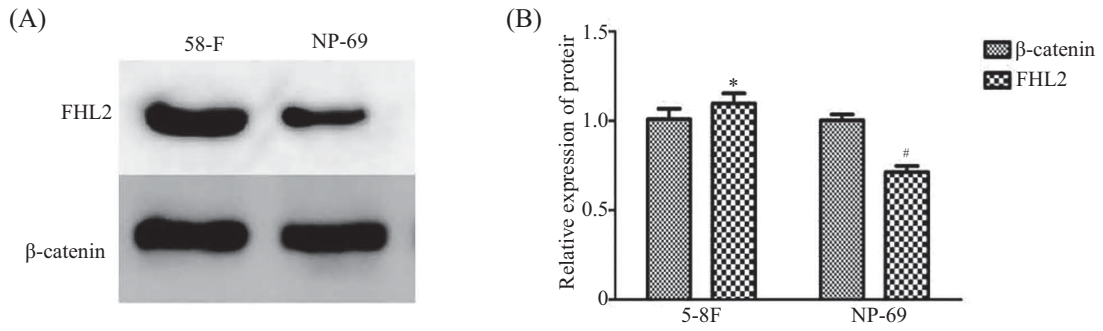
采用CCK-8实验检测FHL2对5-8F细胞增殖能力的影响。结果表明, si-FHL2组、NC组及空白对照组的D值分别为 0.55 ± 0.02 、 0.99 ± 0.03 和 1.01 ± 0.02 。统计分析显示, 敲低FHL2基因后, 5-8F细胞增殖能力明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 然而NC组和空白对照组相比无明显差异($P > 0.05$)(图5)。

2.5 FHL2对细胞平板克隆形成的影响

集落形成实验结果显示, si-FHL2组的菌落形成数与NC组和空白对照组的相比明显降低, 而NC组和空白对照组相比无显著差异。结果提示, 下调FHL2表达后可以削弱5-8F细胞的集落形成能力(图6)。

2.6 FHL2表达对5-8F细胞迁移能力的影响

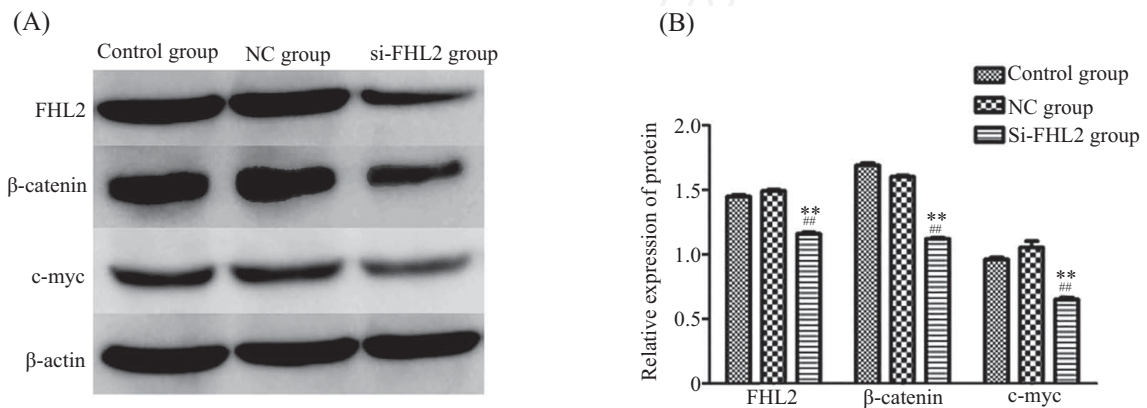
划痕实验结果显示, si-FHL2组、NC组和空白



A: Western blot法检测FHL2蛋白质水平; B: 蛋白灰度相对分析, * $P < 0.01$, 与β-actin灰度值相比, # $P < 0.01$, 与β-actin灰度值相比。
A: determination of FHL2 protein levels detected by Western blot; B: relative protein levels of FHL2 analysed by densitometry, * $P < 0.01$ vs relative protein levels of β-actin; # $P < 0.01$ vs relative protein levels of β-actin.

图3 NP-69和58-F细胞中FHL2蛋白质水平

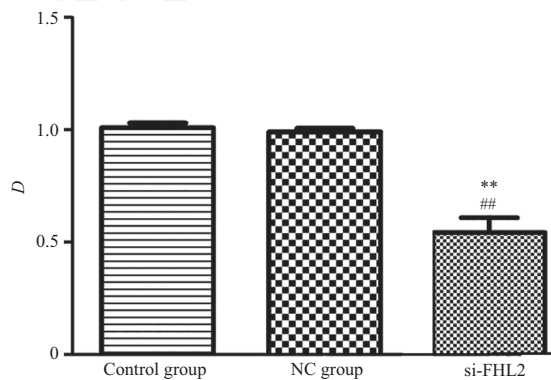
Fig.3 Protein level of FHL2 in 58-F cells and NP-69 cells



A: Western blot法检测转染后FHL2、β-catenin、c-myc蛋白质水平; B: 蛋白灰度相对分析, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; ## $P < 0.01$, 与NC组比较。
A: determination of FHL2, β-catenin, c-myc proteins levels detected by Western blot; B: the relative levels of FHL2, β-catenin, c-myc proteins analysed by densitometry, ** $P < 0.01$ vs control group, ## $P < 0.01$ vs NC group.

图4 转染48 h后5-8F细胞中FHL2、β-catenin、c-myc的蛋白质水平变化

Fig.4 The change of FHL2, β-catenin, c-myc protein levels in 5-8F cells after transfected for 48 h



** $P < 0.01$, 与对照组比较; ## $P < 0.01$, 与NC组比较。
** $P < 0.01$ vs control group, ## $P < 0.01$ vs NC group.

图5 CCK-8法检测转染24 h后各组5-8F细胞的增殖情况

Fig.5 The proliferations of diferent group 5-8F cells transfected for 24 h detected by CCK-8 assay

对照组的细胞迁移率分别为 0.33 ± 0.03 、 0.71 ± 0.01 和 0.73 ± 0.02 , 与NC组和空白对照组相比, si-FHL2组的5-8F细胞迁移速度明显下降, 差异有统计学意义

($P < 0.01$)(图7)。

2.7 FHL2表达对5-8F细胞侵袭能力的影响

细胞体外侵袭实验结果显示, si-FHL2组的穿膜

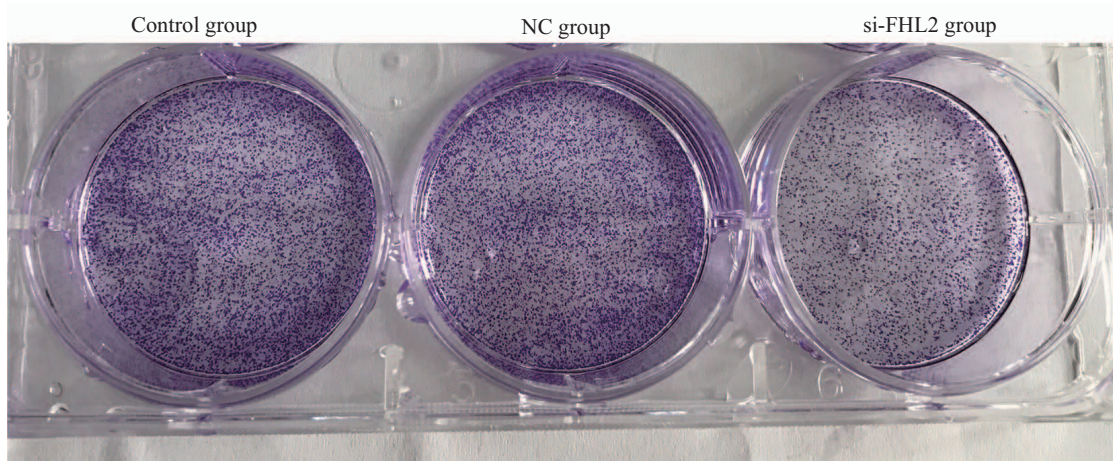
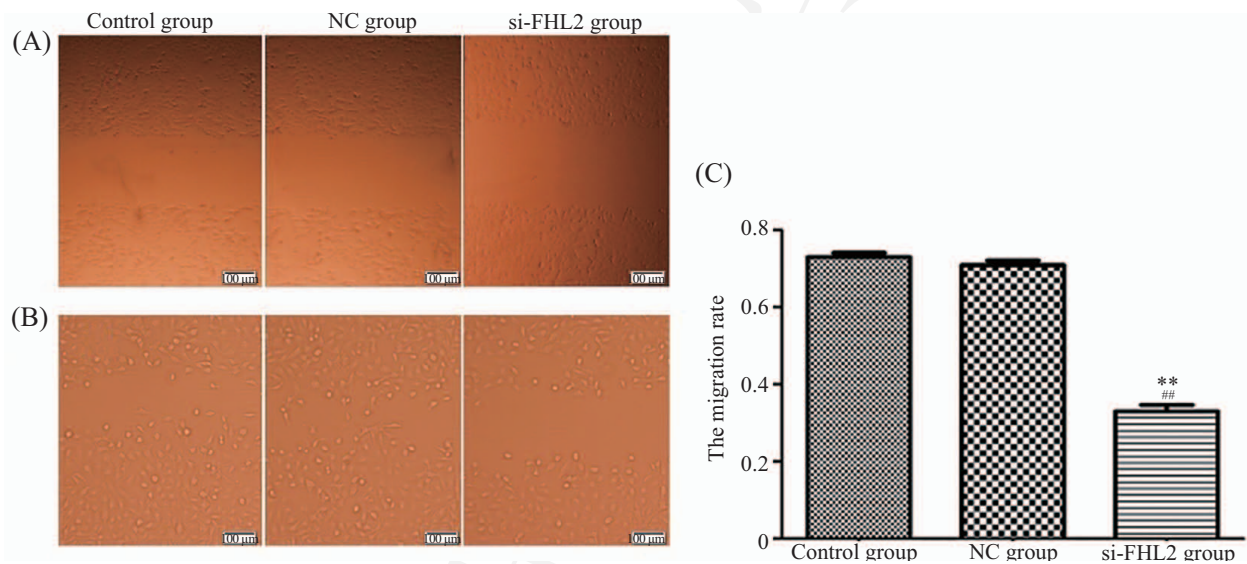


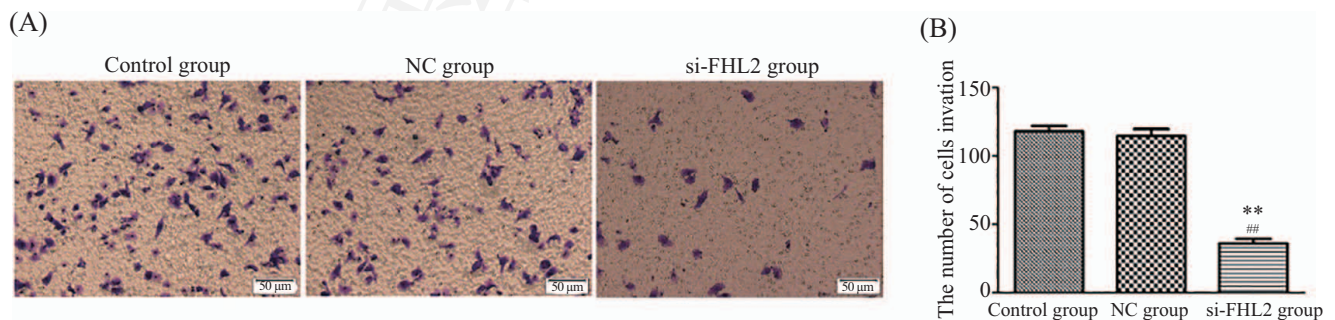
图6 转染siRNA-FHL2 10天后5-8F细胞株集落形成能力
Fig.6 Cell colony formation after transfected with siRNA-FHL2 for 10 days



A: 培养0h的5-8F细胞; B: 培养48h的5-8F细胞; C: 统计学分析。 ** $P < 0.01$, 与对照组比较; # $P < 0.01$, 与NC组比较。
A: the 5-8F cells were cultivated for 0 h; B: the 5-8F cells were cultivated for 48 h. C: statistical analysis. ** $P < 0.01$ vs control group, ** $P < 0.01$ vs NC group.

图7 干扰FHL2后对5-8F细胞迁移能力的影响

Fig.7 The effect of knock-down FHL2 expression on the migration ability of 5-8F cells



A: Transwell实验; B:统计学分析穿膜细胞数, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; # $P < 0.01$, 与NC组比较。
A: Transwell experiment; B: statistical analysis, ** $P < 0.01$ vs control group, ** $P < 0.01$ vs NC group.

图8 干扰FHL2后对5-8F细胞侵袭能力的影响

Fig.8 The effect of knock-down FHL2 expression on the invasion ability of 5-8F cells

细胞数为 36 ± 6 /视野, NC组的穿膜细胞数为 114 ± 8 /视野, 空白对照组的穿膜细胞数为 118 ± 7 /视野。与NC组和空白对照组相比, si-FHL2组的5-8F细胞穿膜细胞数明显减少, 差异有统计学意义($P<0.01$)(图8)。

3 讨论

FHL2作为LIM家族的成员之一, 在肿瘤的发生发展过程中发挥双重性作用, 在一些肿瘤如卵巢癌、舌鳞状细胞癌、前列腺癌及胃癌中表达上调, 促进肿瘤的发生发展^[8-12], 而在另一些组织如侵袭性乳腺癌中表达下调, 抑制肿瘤的发生发展^[13]。但FHL2在鼻咽癌中的相关报道较少。本研究通过qRT-PCR、Western blot方法比较研究了在鼻咽癌5-8F细胞和NP69细胞中FHL2 mRNA和蛋白质水平, 结果显示, 5-8F细胞中FHL2的mRNA相对水平及蛋白质水平均显著高于NP69细胞。这提示, FHL2在鼻咽癌的发生发展过程中可能扮演着重要的角色。

为了进一步探索FHL2对鼻咽癌细胞株5-8F恶性生物学行为的影响, 我们采用了Lipo 2000瞬时转染法特异性下调FHL2在5-8F细胞中的表达, 荧光显微镜观察结果显示转染效率约80%, 并通过qRT-PCR和Western blot验证FHL2水平较转染前明显降低。这提示, 我们已成功下调FHL2在5-8F细胞中的表达。CCK-8实验结果证明, si-FHL2组的D值较NC组及对照组明显降低; 平板克隆实验证明, si-FHL2组的菌落数较NC组及对照组明显减少。这些结果表明, 干扰FHL2可以抑制5-8F细胞的增殖。Transwell及细胞划痕实验结果同时验证了下调FHL2的表达可显著抑制鼻咽癌5-8F细胞迁移和侵袭能力。这些结果都提示, FHL2基因在5-8F细胞的增殖及转移中发挥了重要作用, 并可能充当了癌基因的角色, 促进了鼻咽癌的发生发展。

Guo等^[14]发现, 在HEK293、SW480、A375、UDC-Mel-N和293T细胞及T细胞因子/淋巴增强因子家族(TCF/LEF)相关靶基因 β -catenin介导的转录中, FHL2起着激活的作用。在128、CHO和C2C12肌母细胞中观察到FHL2是起抑制作用的^[14-15]。 β -catenin作为Wnt信号转导通路成分之一, 其突变也可导致Wnt信号转导通路不恰当的激活^[16], 一旦经典Wnt信号转导通路被激活, 将会使靶基因过度表达, 从而影响细胞的增殖、分化, 促进肿瘤的发生^[17]。在其他肿瘤的研究中(如舌鳞状细胞癌)发现, FHL2充当了

癌基因的角色, 且过表达的FHL2使舌鳞状细胞癌中NF- κ B、 β -catenin的表达上调, 提示在舌鳞状细胞癌中FHL2可能通过Wnt/ β -catenin及NF- κ B信号通路调控鳞状细胞癌的发生发展^[18]。而FHL2是否通过Wnt信号通路调控鼻咽癌细胞增殖和转移尚不明确。本研究利用qRT-PCR、Western blot方法检测了Wnt通路相关成员c-myc、 β -catenin的mRNA及蛋白质水平, 结果显示, 转染si-FHL2组细胞中Wnt通路相关成员c-myc、 β -catenin的mRNA及蛋白质水平显著下降, 这与FHL2蛋白质在舌鳞状细胞癌中的发现一致。以上结果提示, FHL2极有可能通过Wnt信号通路途径调控鼻咽癌的发生发展。

综上所述, FHL2在5-8F细胞中高表达, 敲低FHL2基因表达能抑制5-8F细胞的增殖, 并显著降低其侵袭能力, 说明FHL2在鼻咽癌中扮演着癌基因的角色。敲低FHL2能影响5-8F细胞中c-myc、 β -catenin的表达, 表明其极可能通过调控c-myc、 β -catenin表达参与鼻咽癌的增殖与转移过程。然而, FHL2蛋白质是否通过Wnt信号通路抑制鼻咽癌细胞的增殖、侵袭能力尚不十分明确, 同时需要体内实验进一步验证FHL2蛋白质在鼻咽癌发生发展中的作用, 这也是本课题组后续的研究方向。本研究为FHL2蛋白与鼻咽癌之间的密切关系提供了新的实验依据, 更有助于FHL2基因作为早期鼻咽癌分子诊断标志物应用于临床。

参考文献 (References)

- 1 Lv JW, Huang XD, Chen YP, Zhou GD, Tang LL, Mao YP, et al. A national study of survival trends and conditional survival in nasopharyngeal carcinoma: analysis of the national population-based surveillance epidemiology and end results registry. *Cancer Res Treat* 2017; 50(2): 324-34.
- 2 高黎, 易俊林, 黄晓东, 李素艳, 罗京伟, 徐国镇. 鼻咽癌根治性放疗10年经验总结. *中华放射肿瘤学杂志*(Gao Li, Yi Junlin, Huang Xiaodong, Li Suyan, Luo Jingwei, Xu Guozhen. Ten-year experience of radical radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: analysis of 905 patients, *Chinese Journal Of Radiation Oncology*) 2006; 15(4): 249-57.
- 3 Retaux S, Bachy I. A short history of LIM domains(1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol Neurobiol* 2002; 26(2/3): 269-81.
- 4 Yu H, Ma Q, Lin J, Sun YF, Zheng F. Expression and purification of GST-FHL2 fusion protein. *Genet Mol Res* 2013; 12(4): 6372-8.
- 5 Friedrich FW, Reischmann S, Schwalm A, Unger A, Ramanujam D, Münch J, et al. FHL2 expression and variants in hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(6): 451.

- 6 Kurakula K, Sommer D, Sokolovic M, Moerland PD, Scheij S, van Loenen PB, *et al.* LIM-only protein FHL2 is a positive regulator of liver X receptors in smooth muscle cells involved in lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 2015; 35(1): 52-62.
- 7 孟易禹, 王雪, 黄栋栋, 金巧智, 陈武兵, 蔡志毅. 沉默Trim27基因对鼻咽癌5-8F细胞增殖、侵袭与迁移的影响. *中国病理生理杂志* (Meng Yiyu, Wang Xue, Huang Dongdong, Jin Qiaozhi, Chen Wubing, Cai Zhiyi. Knockdown of TRIM27 expression regulates cell proliferation, invasion and migration in human nasopharyngeal 5-8F carcinoma cells. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2017; 33(1): 53-9.
- 8 Westphal P, Mauch C, Florin A, Czerwitzki J, Olligschläger N, Wodtke C, *et al.* Enhanced FHL2 and TGF- β 1 expression is associated with invasive growth and poor survival in malignant melanomas. *Am J Clin Pathol* 2015; 143(2): 248-56.
- 9 Nair SS, Guo Z, Mueller JM, Koochekpour S, Qiu Y, Tekmal RR, *et al.* Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1/modulator of nongenomic activity of estrogen receptor enhances androgen receptor functions through LIM-only coactivator, four-and-a-half LIM-only protein 2. *Mol Endocrinol* 2007; 21(3): 613-24.
- 10 Wang J, Yang Y, Xia HH, Gu Q, Lin MC, Jiang B, *et al.* Suppression of FHL2 expression induces cell differentiation and inhibits gastric and colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(3): 1066-76.
- 11 Labalette C, Nouët Y, Levillayer, Armengol C, Renard CA, Soubigou G, *et al.* The LIM-only protein FHL2 mediates ras-induced transformation through Cyclin D1 and p53 pathways. *PLoS One* 2008; 3(11): e3761.
- 12 Guo Z, Zhang W, Xia G, Niu L, Zhang Y, Wang X, *et al.* Sp1 upregulates the four and half lim 2(FHL2) expression in gastrointestinal cancers through trans-cription regulation. *Mol Carcinog* 2010; 49(9): 826-36.
- 13 Chen YH, Wu ZQ, Zhao YL, Si YL, Guo MZ, Han WD. FHL2 inhibits the Id3-promoted proliferation and invasive growth of human MCF-7 breast cancer cells. *Chin Med J* 2012; 125(13): 2329-33.
- 14 Guo Z, Zhang W, Xia G, Niu L, Zhang Y, Wang X, *et al.* Sp1 upregulates the four and half lim 2(FHL2) expression in gastrointestinal cancers through transcription regulation. *Mol Carcinog* 2010; 49(9): 826-36.
- 15 王小元. FHL2蛋白生物学功能的探讨. *医学综述* (Wang Xiaoyuan. Research advances of FHL2 protein biological function. *Medical Recapitulate*) 2013; 19(5): 776-8.
- 16 Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6): 1192-205.
- 17 Zou Y, Salinas P. Introduction: Wnt signaling mechanisms in development and disease. *Dev Neurobiol* 2010; 74(8): 757-8.
- 18 Wang Q, Wang X, Tian X, Tang R, Xu X. Four and a half LIM domains 2 contributes to the development of human tongue squamous cell carcinoma. *J Mol Histol* 2016; 47(2): 105-16.