

研究论文

LGR4通过调控上皮-间充质转化促进宫颈癌转移

陈吉豪 唐佳佳 陈晓钢 侯强*

(温州医科大学眼视光学院/附属眼视光医院, 温州 325003)

摘要 LGR4(leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4)在多种肿瘤发生中具有重要作用,但在宫颈癌(cervical cancer)中的作用及机制尚不清楚。该研究使用免疫组织化学技术检测宫颈癌组织中LGR4的表达情况,发现LGR4在癌组织中的蛋白水平高于癌旁组织。Kaplan-Meier生存分析发现,LGR4高表达患者的总生存时间明显短于LGR4低表达患者。体外研究表明,LGR4可以调控HeLa细胞的迁移和侵袭能力,但不影响其增殖。为了阐明LGR4影响细胞迁移和侵袭的机制,该研究检测了迁移和侵袭相关的EMT信号通路。Western blot实验及免疫荧光实验证实LGR4通过EMT信号通路调控HeLa细胞的迁移和侵袭。最后,动物实验证明LGR4可以在小鼠体内促进宫颈癌的转移。这些结果说明LGR4调控宫颈癌的EMT过程,进而促进宫颈癌的转移。

关键词 G蛋白偶联受体4; 宫颈癌; 上皮-间充质转化; 肿瘤转移

Cervical Cancer Metastasis is Potentiated by LGR4 through Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition

CHEN Jihao, TANG Jiajia, CHEN Xiaogang, HOU Qiang*

(School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325003, China)

Abstract LGR4 (leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 4) has long been associated with the development of various cancers. However, the causal role and mechanism of LGR4 in cervical cancer remain unclear. Immunohistochemical analysis confirmed that LGR4 was highly expressed in cervical cancer tissues. The Kaplan-Meier analysis showed that patients with high expression level of LGR4 had a significantly shorter overall survival time compared with patients with low LGR4 level. *In vitro* studies showed that knockdown or overexpression of LGR4 in HeLa cells influenced cell migration and invasion abilities without affecting cell proliferation. To elucidate the mechanisms, this paper tested migration and invasion correlated EMT signaling pathway. Western blot and immunofluorescence experiment confirmed that LGR4 regulated HeLa cell migration and invasion through EMT. Finally, LGR4's role in cervical cancer metastasis was assessed in an *in vivo* murine model. The results showed that LGR4 promoted the metastasis of cervical cancer *in vivo*.

Keywords LGR4; cervical cancer; EMT; tumor metastasis

宫颈癌严重危害全球妇女健康,其发病率位于女性肿瘤第4位,并且是发展中国家癌症导致相关死

亡的主要原因^[1]。根据美国NCCN指南推荐,早期宫颈癌的一线治疗方式是手术切除,而晚期宫颈癌的

收稿日期: 2021-12-02 接受日期: 2022-01-14

浙江省自然科学基金探索项目(批准号: LY21H120006、LY16H120009)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13676513563, E-mail: houqiang@wmu.edu.cn

Received: December 2, 2021 Accepted: January 14, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (Grant No. LY21H120006, LY16H120009)

*Corresponding author. Tel: +86-13676513563, E-mail: houqiang@wmu.edu.cn

治疗则主要采用放疗和化疗。宫颈癌的5年生存率约为67%，但在复发和/或转移情况下5年生存率仅为17%^[2]。因此，亟待探索新的治疗手段用于治疗复发及转移性宫颈癌。

肿瘤细胞获得侵袭和转移能力是宫颈上皮内瘤变发展为宫颈癌的关键。最引起广泛关注的机制是上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[3]。这种转化导致极化的、不活动的上皮细胞变为活动的间充质细胞，而间充质细胞是肿瘤细胞侵入正常组织的基础。随后肿瘤细胞的全身扩散可能需要通过间充质-上皮细胞转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)逆转这一过程^[4]。在微环境影响下，已经发生EMT转变的肿瘤细胞恢复上皮表型，肿瘤细胞的黏附和增殖能力增强，从而形成转移灶^[5]。

LGR4(leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4)是G蛋白偶联受体家族成员之一，其具有17个富含亮氨酸重复序列和7个跨膜结构。LGR4与不同的配体结合后，可以激活不同的下游信号通路，如与R-spondin或Norrin结合后，可激活Wnt信号通路^[6]；与核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)结合后，可激活G蛋白偶联受体通路^[7]。

LGR4被报道在多种癌症中表达失调并且与疾病(如结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌等)的预后差有关^[8-10]。在宫颈癌中，LGR4在癌组织和癌前病变组织中的表达水平明显升高，并且与宫颈癌的分化程度和临床分期存在相关性。另外，LGR4还与炎症及血管生成指标升高相关，提示LGR4可能参与宫颈癌患者的炎症反应以及肿瘤血管的生长^[11]。敲低LGR4可以抑制HeLa细胞的体外侵袭和体内转移能力^[12]，但相关机制还不清楚。

因此，本研究拟通过探索LGR4与宫颈癌之间的联系，为靶向LGR4抑制肿瘤细胞转移中的EMT进程提供新的研究思路和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织与细胞 收集2017年4月至2017年12月于温州医科大学附属第一医院就诊的8例宫颈癌患者的癌组织为临床样本。患者均为女性，平均年龄(43.2±7.8)岁。所有患者均经病理学检查确诊为鳞

状细胞癌，其中3人肿瘤分级为I级，3人为II级，其余均为III级，术前未进行化疗、放疗等治疗。宫颈肿瘤组织阵列包含12对宫颈肿瘤标本，购自Alenabio公司。组织阵列中所有临床病例均为女性，病理诊断均为鳞状细胞癌，平均年龄(45.3±10.1)岁。其中3人肿瘤分级为I级，3人为II级，其余均为III级。HeLa细胞从美国ATCC菌种保藏管理中心(ATCC, manassas, VA, USA)购得。该研究已通过温州医科大学伦理委员会审核批准(批准号: 2018-038)，并获得患者及家属知情同意。

1.1.2 试剂与耗材 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)培养基、胰蛋白酶、Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司；过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、Tween-20、Trion-X100、丽春红、1 mol/L Tris-HCl(pH8.8, pH6.8)、免疫染色固定液、抗荧光淬灭剂、Western blot一抗稀释液、十二烷基硫酸钠裂解液(sodium dodecyl sulfate, SDS)、特超敏ECL化学发光试剂盒、WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Bench Marker™预染彩虹蛋白Marker及所有荧光标记二抗购自Beyotime公司；Trizol、Geneticin(G418)、Pierce BCA Protein Assay Kit购自Thermo Fisher Scientific公司；LGR4(1:2 000, 羊抗兔, 货号ab137480)和Twist(1:1 000, 羊抗兔, 货号ab50887)的一抗购自Abcam公司。N-cadherin(1:1 000, 羊抗兔, 货号#13116)和Snail(1:1 000, 羊抗兔, 货号#3879)抗体购自Cell Signaling Technology公司。Transwell小室、基质胶购自Costar公司。Scramble shRNA质粒(货号sc-108060)及LGR4特异性shRNA质粒(货号sc-62557-sh)、E-cadherin(1:1 000, 羊抗鼠, 货号sc-8426)、Vimentin(1:1 000, 羊抗鼠, 货号sc-6260)、β-actin(1:2 000, 羊抗鼠, 货号sc-8432)一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学分析 临床标本用10%福尔马林固定，石蜡块包埋。切成5 μm的切片并安装在载玻片上。宫颈肿瘤组织阵列包含12对宫颈肿瘤标本。用5%山羊血清室温封闭1 h，然后一抗(1:2 000稀释)4 °C孵育过夜。PBS冲洗2次后，兔二抗(1:1 000稀释)室温孵育2 h。随后依次进行3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色、苏木素复染、

脱水以及封片。用不含一抗的山羊血清孵育的切片作阴性对照。

1.2.2 生存分析 在肿瘤学网站www.oncolnc.org下载TCGA(the cancer genome atlas program)数据库,对宫颈癌患者LGR4的表达及临床资料进行分析。我们将TCGA数据库中LGR4表达水平的前30%设置为高表达LGR4组,后30%设置为低表达LGR4组。采用Kaplan-Meier分析比较LGR4高表达组和低表达组的患者生存率。

1.2.3 细胞培养 HeLa细胞用含10% FBS的DMEM培养基培养,放置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中,每隔48 h换1次液。

1.2.4 转染和稳定克隆的选择 以人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE) cDNA为模板,PCR扩增LGR4 cDNA序列,并克隆到pcDNA 3.1(+)表达载体中。通过测序验证序列。使用Lipofectamine 2000进行质粒转染。转染后,用1 mg/mL的G418筛选稳定的高表达LGR4单克隆细胞。用Lipofectamine 2000转染Scramble shRNA质粒(sc-108060)或LGR4特异性shRNA质粒(sc-62557-sh),然后用1.5 μg/mL嘌呤霉素筛选,以建立稳定的LGR4敲低细胞。

1.2.5 实时定量聚合酶链反应(q-PCR)分析 用Trizol试剂提取细胞总RNA,在分光光度计(Nano-Drop ND-2000)上检测RNA浓度,1 μg RNA通过反转录系统转录成cDNA,然后进行PCR,PCR反应体系:2 μL反转录产物,10 μL SYBR Green Mix,上下游引物各0.5 μL,7 μL无菌水;循环条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,共40个循环;熔解曲线:95 °C 15 s,60 °C 15 s,95 °C 15 s。通过熔解曲线验证扩增产物的特异性,相对表达量用2^{-ΔΔCt}法计算。使用的引物为LGR4: 5'-ATT CCC TAG TCA TTC GGG G-3'和5'-GTG CCT TCC TTT ATT TGG T-3'; GAPDH: 5'-CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT-3'和5'-TGG TCA TGA GTC CTT CCA CG-3'。GAPDH作为校准的内参基因。

1.2.6 细胞增殖实验 在96孔板中按每孔2 000个细胞将对数生长期的HeLa细胞接种到100 μL含10% FBS的DMEM培养基中,分别培养24、48、72、96、120 h,之后每孔加入10 μL WST-1溶液孵育4 h,于酶标仪(Molecular Devices, SpectraMax190)测定波长为490 nm处的吸光度(D)值。

1.2.7 Transwell迁移和侵袭试验 将Transwell小室

置于24孔板,上室接种1×10⁵个细胞并用200 μL无血清培养基培养,下室加入600 μL含10% FBS的DMEM培养基。培养24 h后,取出小室用4%多聚甲醛室温下固定20 min,再用结晶紫室温下染色15 min。用棉签轻轻擦拭掉上室细胞,显微镜(Zeiss, axiovert a3)下随机选取5个视野拍照记录(200×),并用ImageJ(1.8.0)软件进行细胞计数。Transwell侵袭实验中小室上室需要提前包被基质胶,其他操作与迁移实验相同。

1.2.8 免疫荧光染色 按1.0×10⁵个/孔将处于对数生长期的细胞接种于底部放置爬片的24孔板中,待细胞贴壁后,吸去培养基,用PBS洗涤2次,加入4%的多聚甲醛室温固定15 min。加入含有0.1% Triton X-100的PBS进行破膜,静置20 min, PBS洗涤2次。加入1% BSA封闭30 min。吸去封闭液,加入1:100稀释的一抗,4 °C孵育过夜。吸弃一抗, PBS清洗3次,加入二抗(1:1 000)室温孵育2 h。使用DAPI进行核染色。采用荧光显微镜(Leica, DM4B)获得细胞图像。

1.2.9 Western blot 用SDS裂解液提取细胞总蛋白,BCA测定蛋白浓度,加入5×蛋白上样缓冲液煮沸使蛋白变性。10% SDS-PAGE凝胶电泳后湿法转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,洗膜,加入一抗(1:1 000)后4 °C孵育过夜,洗膜,加入二抗(1:2 000),室温下孵育2 h,洗膜,加入显色剂。用化学发光成像系统(Bio-Rad, ChemiDoc)观察蛋白质条带。

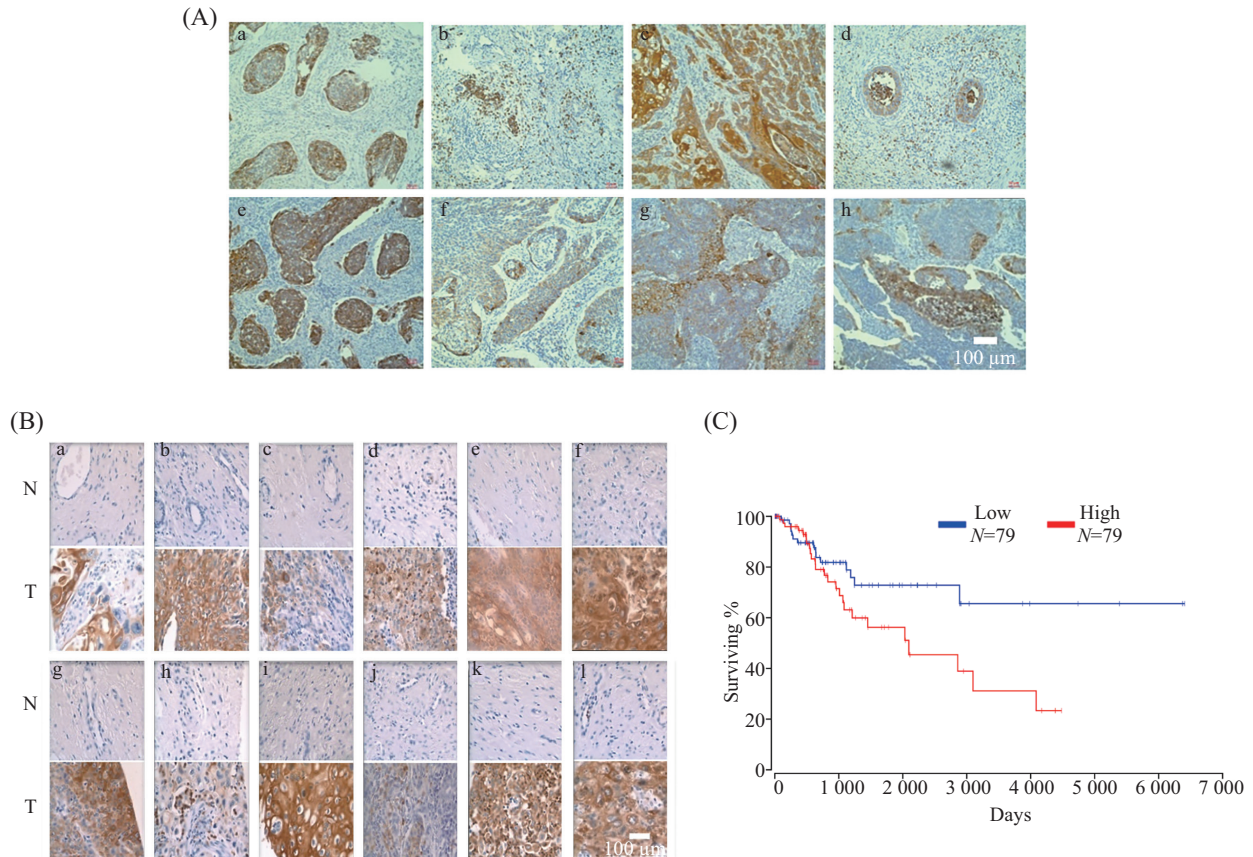
1.2.10 体内肿瘤转移实验 将6周龄雌性裸鼠分为5组,分别为未经处理组(Mock组)、敲低LGR4对照组(Ctrl组)、敲低LGR4组(shLGR4组)、过表达LGR4对照组(Vec组)及过表达LGR4组(LGR4组),每组5只,分别将1×10⁶个对应的HeLa细胞重悬于100 μL PBS溶液中,并将其通过尾静脉注射至裸鼠体内,注射后30天安乐死裸鼠,切除肺并固定,在显微镜下(Leica, F20)计数转移灶。动物实验经温州医科大学动物保护与使用委员会批准(批准号:2019-0377)。

1.2.11 统计分析 数据以平均值±标准差表示。采用Student's *t*检验进行统计学分析。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LGR4在宫颈癌组织中高表达,且与患者预后不良有关

临床标本的免疫组织化学分析结果表明,LGR4



A: 免疫组化检测宫颈癌标本中LGR4表达。a~h代表8名患者的组织样本。B: 免疫组化检测宫颈癌组织阵列(T)和癌旁正常组织(N)中LGR4的表达。a~l代表12对组织样本。C: Kaplan Meier生存分析。

A: LGR4 expression was detected by immunohistochemistry in cervical cancer sample. a-h represents tissue samples from eight patients. B: LGR4 expression was detected by immunohistochemistry in cervical cancer tissue array (T) and matched normal tissue chip (N). a-l represents 12 pairs of chip samples. C: survival analysis using Kaplan Meier method in TCGA cohort.

图1 LGR4在宫颈癌组织中高表达,且与患者预后不良有关

Fig.1 LGR4 was highly expressed in cervical cancer tissues and is associated with shortened survival

在宫颈癌组织中高表达(图1A)。为了进一步验证实验结果,我们购买了宫颈癌相关的组织阵列。我们通过免疫组化检测宫颈癌组织阵列(T)和癌旁正常组织(N)中LGR4的表达同样证实LGR4在宫颈癌组织中高表达(图1B)。为了评估LGR4的高表达与预后的关系,我们使用TCGA数据库分析了宫颈癌患者的生存情况。我们将TCGA数据库中LGR4表达水平的前30%设置为高表达LGR4组,后30%设置为低表达LGR4组。LGR4在低表达组的平均表达量为 248.80 ± 108.93 , LGR4在高表达组的平均表达量为 1729.22 ± 599.59 。结果显示, LGR4高表达患者的总生存时间明显短于LGR4低表达患者(log-rank $P=0.037 < 0.05$)(图1C)。

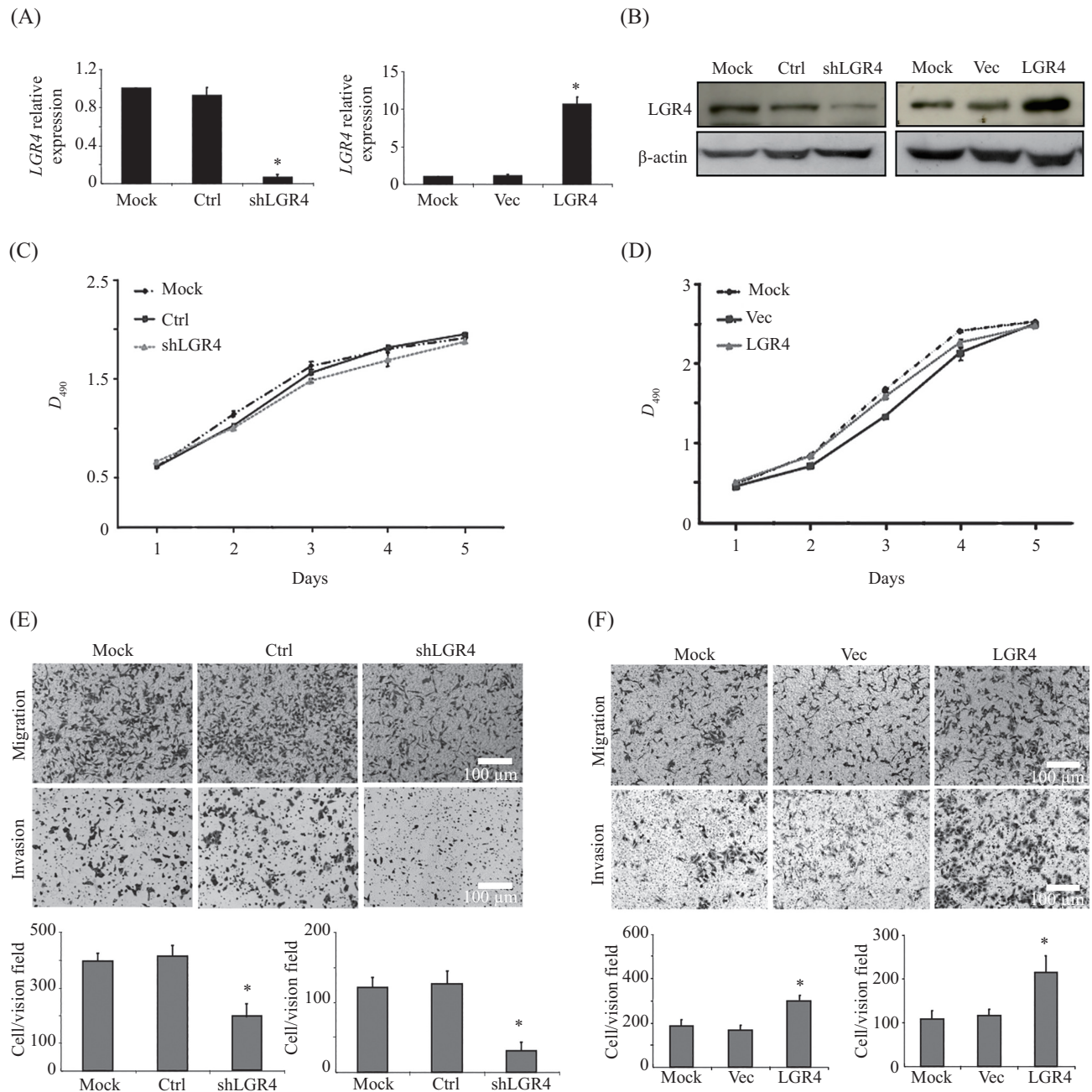
2.2 LGR4可以调控HeLa细胞的迁移和侵袭能力,但不影响HeLa细胞的增殖

为了深入了解LGR4在宫颈癌中的作用,我们

建立了稳定的LGR4敲低或过表达的HeLa细胞。LGR4 shRNA使HeLa细胞LGR4 mRNA水平降低了约93%(图2A),而高表达LGR4细胞的LGR4 mRNA水平增加了近10倍(图2A)。相应地,LGR4 shRNA使HeLa细胞LGR4蛋白水平明显下降,而高表达LGR4细胞中LGR4的蛋白水平显著升高(图2B)。我们通过WST-1实验研究LGR4对HeLa细胞增殖的影响。发现LGR4敲低(图2C)及过表达(图2D)的HeLa细胞的增殖没有显著变化。随后,我们通过Transwell实验检测LGR4敲低或过表达的HeLa细胞的迁移和侵袭能力。发现敲低LGR4抑制了HeLa细胞的迁移和侵袭能力(图2E);相反,过表达LGR4促进了HeLa细胞的迁移和侵袭能力(图2F)。综上所述,LGR4在HeLa细胞的迁移和侵袭中起着至关重要的作用。

2.3 LGR4通过EMT调控HeLa细胞的迁移和侵袭

为了阐明LGR4影响迁移和侵袭的机制,我们



A: q-PCR检测敲低和过表达LGR4的HeLa细胞*LGR4* mRNA水平。B: Western blot检测敲低和过表达LGR4的HeLa细胞蛋白水平。C、D: 敲低和过表达LGR4的HeLa细胞的增殖实验。E、F: 敲低和过表达LGR4的HeLa细胞的迁移和侵袭分析。 $\bar{x}\pm s$, $n=3$, * $P<0.05$, 与Mock组相比。

A: *LGR4* mRNA levels of knockdown and overexpression stable cell lines were detected by q-PCR. B: Western blot of knockdown and overexpression stable cell lines. C,D: proliferation assay of knockdown and overexpression cell lines. E,F: migration and invasion assay of knockdown and overexpression cell lines. $\bar{x}\pm s$, $n=3$, * $P<0.05$ compared with Mock group.

图2 LGR4在HeLa细胞中表达下调或过表达影响细胞迁移和侵袭能力,但不影响细胞增殖

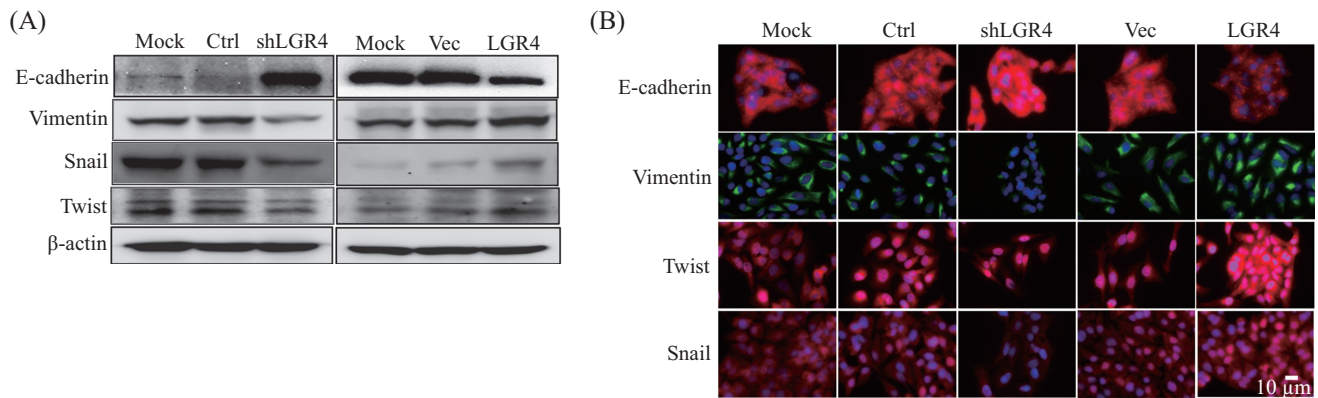
Fig.2 Knockdown or overexpression of LGR4 in HeLa cells influenced cell migration and invasion abilities without affecting cell proliferation

检测了迁移和侵袭相关的EMT信号通路。Western blot实验发现,在LGR4敲低的HeLa细胞中,诱导EMT的转录因子Twist、Snail和Vimentin的蛋白水平均降低,E-cadherin升高(图3A)。随后,我们在高表达LGR4的HeLa细胞中观察到了相反的结果(图3A)。

免疫荧光实验证实了Western blot实验结果。以上实验结果证实LGR4通过EMT信号通路调控HeLa细胞的迁移和侵袭。

2.4 LGR4在体内调控宫颈癌的肺转移

为了研究LGR4在宫颈癌转移中的作用,我们

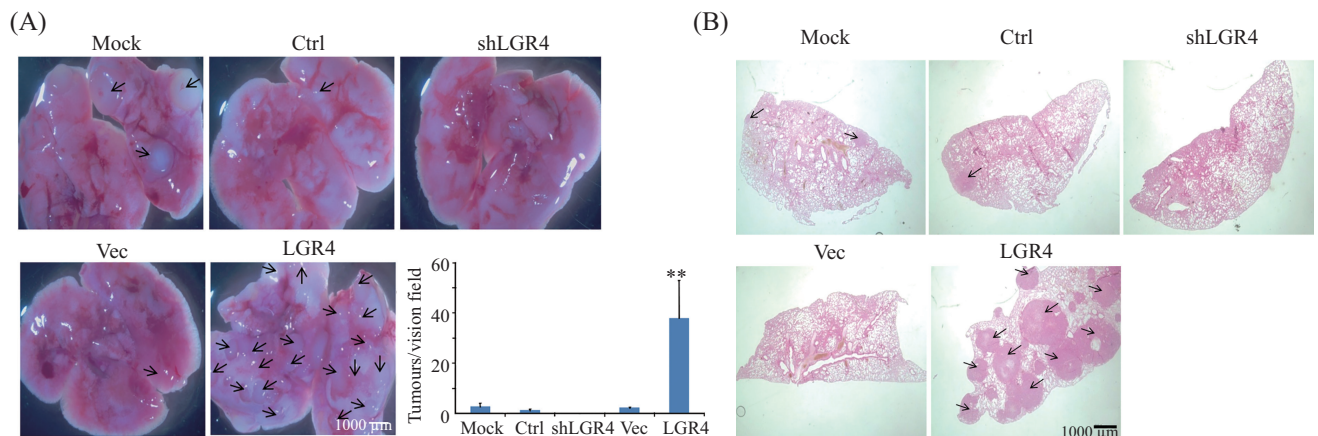


A: Western blot检测LGR4敲低(左)和过表达(右) HeLa细胞中EMT相关蛋白。B: 免疫荧光法检测LGR4敲低和过表达HeLa细胞中EMT相关蛋白。E-cadherin、Twist、Snail为红色荧光, Vimentin为绿色荧光, DAPI为蓝色荧光。

A: Western blot of EMT related proteins in LGR4 knockdown (left) and overexpression (right) stable cell lines. B: immunofluorescence assay of EMT related proteins in LGR4 knockdown and overexpression cells. The red fluorescence represents E-cadherin, Twist and Snail. The green fluorescence represents Vimentin. The blue fluorescence represents DAPI.

图3 LGR4通过EMT调控HeLa细胞的迁移和侵袭

Fig.3 LGR4 regulated HeLa cell migration and invasion through EMT



A: 箭头指示宫颈癌的肺转移灶(** $P < 0.01$, 与Vec组相比)。B: 肺转移灶H&E染色(箭头示宫颈癌的肺转移灶)。

A: the arrows indicate a tumor with lung metastasis (** $P < 0.01$ compared with Vec group). B: H&E staining of tumor foci in lungs (the arrows indicate a tumor with lung metastasis).

图4 裸鼠尾静脉注射HeLa细胞, 30天后检查宫颈癌肺转移灶

Fig.4 HeLa cells were injected into the tail vein of nude mice, and experimental lung metastasis was determined after 30 days

将敲低和过表达LGR4的HeLa细胞及其相应的对照组注射到裸鼠尾静脉。30天后,我们对裸鼠的肺进行检查来评估宫颈癌肺转移的进展。实验结果显示,与对照组相比,注射敲低LGR4的HeLa细胞的实验组(shLGR4组)未发现肺转移,而注射过表达LGR4的HeLa细胞的实验组(LGR4组)肺转移明显增加(图4A和4B)。这说明LGR4在体内可以促进宫颈癌的转移。

3 讨论

宫颈癌症发生率位居全球女性恶性肿瘤的第4位,全世界每年有30多万人因此死亡^[13]。人乳头

瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的高危亚型(如HPV16、HPV18)感染是导致宫颈癌发生的重要病因^[13]。在所有宫颈癌的组织学类型中,鳞状细胞癌和腺癌的总和超过90%^[14]。目前对晚期宫颈癌主要采取放疗和化疗的治疗手段。但在复发和/或转移情况下5年生存率仅为17%^[2]。侵袭和转移能力是恶性肿瘤的重要生物学特性,大多数宫颈癌患者由于局部复发及转移而最终死亡,这也是放化疗效果不佳的原因之一。

关于肿瘤细胞迁移和侵袭能力的研究成为目前研究的热点。EMT是宫颈癌发生转移和侵袭的重

要因素之一,且与宫颈癌的放疗抵抗和化疗耐药密切相关^[15]。EMT指上皮细胞通过特定的程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,是胚胎发育和器官形成的基础过程^[16]。EMT程序启动后,肿瘤细胞的上皮表型向间质表型转变,表现为上皮细胞失去细胞间黏附及细胞极性等分化表型,获得侵袭、迁移和抗凋亡等间质性特性,同时上皮细胞和间质细胞标志物表达发生改变,如Vimentin、Snail和Twist等间充质标记物的表达水平上升和E-cadherin等上皮标记物的表达受到抑制^[17]。

G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是参与膜启动信号转导过程的细胞表面受体的最大超家族之一。GPCRs具有多种结构特征,包括一个细胞外N-端结构域、七个与细胞外和细胞内相连的跨膜结构域,以及一个细胞内C-端结构域,它们在各种生理和病理过程中起着关键作用。在癌症中,GPCR参与了多种过程,例如增殖、迁移、细胞凋亡和肿瘤发生^[18]。

LGRs是G蛋白偶联受体家族中高度保守的一类蛋白,其特征为胞外N末端富含9~18个亮氨酸重复序列。LGRs能够与相应的配体结合并调节众多细胞过程。LGR4通常被R-spondins、Norrin、RANKL和circLGR4配体激活,其激活导致Wnt/ β -catenin和G蛋白相关通路的信号转导^[7,19-21]。证据表明,LGR4在癌组织中表达上调并调节肿瘤的发生发展。如LGR4在乳腺癌中过度表达,并且与预后不良有关^[9]。LGR4的高表达与前列腺癌患者的复发时间变短相关,敲低LGR4能抑制前列腺癌细胞的侵袭、迁移、EMT过程,并促进细胞凋亡^[22]。

LGR4与宫颈癌的相关研究较为匮乏。目前已有的研究显示:LGR4在宫颈癌及癌前病变组织中表达失调,与宫颈癌的分化程度和临床分期存在相关性,并且LGR4可能参与宫颈癌患者的炎症反应和肿瘤血管的生长^[11]。同时LGR4在动物实验中表现出促进HeLa细胞侵袭和转移的能力^[12],这意味着LGR4有可能成为干预宫颈癌的靶标。因此,本研究首先通过免疫组织化学分析证实了LGR4在宫颈癌中高表达。之后我们使用TCGA数据集回顾性分析LGR4低表达和高表达之间的生存期,发现高LGR4表达水平的宫颈癌的患者总体生存率较差,提示LGR4可以作为宫颈癌的预后标志物。

为了进一步确定LGR4在宫颈癌中的机制及作

用。我们通过体外研究发现敲低LGR4抑制了HeLa细胞的迁移和侵袭能力;相反,过表达LGR4促进了HeLa细胞的迁移和侵袭能力。LGR4的这一作用似乎普遍存在于多种肿瘤,如前列腺癌^[23]、肺腺癌^[24]、乳腺癌^[24]等。LGR4敲低的HeLa细胞中,诱导EMT的转录因子Twist、Snail和Vimentin的蛋白水平降低,E-cadherin升高,而过表达LGR4的HeLa细胞得到了相反的结果,提示LGR4可能通过EMT调控HeLa细胞的迁移和侵袭能力。有研究表明,LGR4可以通过与R-spondin2结合激活Wnt/ β -catenin信号调控细胞的迁移、侵袭、EMT等过程^[9,25-26]。在乳腺癌细胞中,LGR4缺失导致典型Wnt信号通路受损,进而导致E-cadherin表达水平增加,N-cadherin降低,提示LGR4可以调控EMT^[9]。在舌鳞状细胞癌中,R-spondin2-LGR4系统通过Wnt/ β -catenin信号通路调节舌鳞状细胞癌细胞的生长、迁移和侵袭和EMT^[25]。R-spondins是包含凝血酶敏感蛋白1型重复序列(thrombospondin type 1 repeat-containing proteins)的结构域家族,由四种分泌糖蛋白R-spondin1/2/3/4组成^[27]。R-Spondins促进Wnt/ β -catenin信号通路,主要是通过与其受体高亲和力结合介导的^[28]。Wnt/ β -catenin信号通路在人类胚胎发育、组织和器官稳定、干细胞自我更新等方面发挥作用^[19,29]。肿瘤细胞的增殖、侵袭及EMT过程通常伴随着Wnt/ β -catenin信号的异常激活,其成员及调节因子也是抗肿瘤治疗的潜在靶点^[30-32]。最后,动物实验证实低表达LGR4可以抑制宫颈癌的转移,而高表达LGR4可以促进宫颈癌的转移。这与WU等^[12]的结果一致。这提示LGR4有可能成为抑制宫颈癌转移的靶标。

综上所述,LGR4在宫颈癌中高表达并且与宫颈癌患者的预后相关,LGR4能够通过EMT调控HeLa细胞的迁移和侵袭能力,进而促进体内宫颈癌的转移。我们的研究表明,LGR4可能成为抑制宫颈癌转移及改善宫颈癌患者预后的新的分子靶点。

参考文献 (References)

- [1] DENNY L, DE SANJOSE S, MUTEPI M, et al. Interventions to close the divide for women with breast and cervical cancer between low-income and middle-income countries and high-income countries [J]. *Lancet*, 2017, 389(10071): 861-70.
- [2] MARRET G, BORCOMAN E, LE TOURNEAU C. Pembrolizumab for the treatment of cervical cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(9): 871-7.
- [3] NIETO M A, HUANG R Y, JACKSON R A, et al. EMT: 2016 [J].

- Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [4] CHO E S, KANG H E, KIM N H, et al. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(1): 14-24.
- [5] OWUSU-AKYAW A, KRISHNAMOORTHY K, GOLDSMITH L T, et al. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function [J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(1): 114-33.
- [6] HAO H X, XIE Y, ZHANG Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner [J]. Nature, 2012, 485(7397): 195-200.
- [7] LUO J, YANG Z, MA Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption [J]. Nat Med, 2016, 22(5): 539-46.
- [8] ZENG Z, JI N, YI J, et al. LGR4 overexpression is associated with clinical parameters and poor prognosis of serous ovarian cancer [J]. Cancer Biomark, 2020, 28(1): 65-72.
- [9] YUE Z, YUAN Z, ZENG L, et al. LGR4 modulates breast cancer initiation, metastasis, and cancer stem cells [J]. Faseb J, 2018, 32(5): 2422-37.
- [10] WU J, XIE N, XIE K, et al. GPR48, a poor prognostic factor, promotes tumor metastasis and activates β -catenin/TCF signaling in colorectal cancer [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(12): 2861-9.
- [11] 李付连, 索玉平, 王谋香, 等. G蛋白偶联受体4对人乳头瘤病毒感染宫颈癌组织新生血管建立的影响和诊断价值[J]. 中国综合临床 (LI F L, SUO Y P, WANG M X, et al. Effects and diagnostic value of G protein-coupled receptor 4 on the establishment of neovascularization of human papillomavirus infection in cervical cancer tissues [J]. Clinical Medicine of China), 2018, 34(3): 4.
- [12] GAO Y, SHAN Z Y, WANG H, et al. Inhibitory effect of shRNA targeting GPR48 on invasion and metastasis of human cervical carcinoma cell line HeLa [J]. Ai Zheng, 2009, 28(2): 104-7.
- [13] CROSBIE E J, EINSTEIN M H, FRANCESCHI S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. Lancet, 2013, 382(9895): 889-99.
- [14] SMALL W, Jr, BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: a global health crisis [J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404-12.
- [15] QURESHI R, ARORA H, RIZVI M A. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 321-31.
- [16] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84.
- [17] YANG J, ANTIN P, BEX G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(6): 341-52.
- [18] BAR-SHAVIT R, MAOZ M, KANCHARLA A, et al. G protein-coupled receptors in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(8): 1320.
- [19] CARMON K S, GONG X, LIN Q, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(28): 11452-7.
- [20] DENG C, REDDY P, CHENG Y, et al. Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor [J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 9): 2060-8.
- [21] ZHI X, ZHANG J, CHENG Z, et al. CircLgr4 drives colorectal tumorigenesis and invasion through Lgr4-targeting peptide [J]. Int J Cancer, 2019, doi: 10.1002/ijc.32549.
- [22] LUO W, TAN P, RODRIGUEZ M, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (Lgr4) is necessary for prostate cancer metastasis via epithelial-mesenchymal transition [J]. J Biol Chem, 2017, 292(37): 15525-37.
- [23] LIANG F, YUE J, WANG J, et al. GPCR48/LGR4 promotes tumorigenesis of prostate cancer via PI3K/Akt signaling pathway [J]. Med Oncol, 2015, 32(3): 49.
- [24] GONG X, YI J, CARMON K S, et al. Aberrant RSPO3-LGR4 signaling in Keap1-deficient lung adenocarcinomas promotes tumor aggressiveness [J]. Oncogene, 2015, 34(36): 4692-701.
- [25] ZHANG L, SONG Y, LING Z, et al. R-spondin 2-LGR4 system regulates growth, migration and invasion, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of tongue squamous cell carcinoma via Wnt/ β -catenin signaling [J]. EBioMedicine, 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.076.
- [26] SU X, ZHOU G, TIAN M, et al. Silencing of RSPO1 mitigates obesity-related renal fibrosis in mice by deactivating Wnt/ β -catenin pathway [J]. Exp Cell Res, 2021, 405(2): 112713.
- [27] KAZANSKAYA O, GLINKA A, DEL BARCO BARRANTES I, et al. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/ β -catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis [J]. Dev Cell, 2004, 7(4): 525-34.
- [28] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer [J]. Oncogene, 2017, 36(11): 1461-73.
- [29] CHEN Q, CAO H Z, ZHENG P S. LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2014, 5(19): 9092-105.
- [30] TANG Q, CHEN J, DI Z, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 232.
- [31] MOSA M H, MICHELS B E, MENCHE C, et al. A Wnt-induced phenotypic switch in cancer-associated fibroblasts inhibits EMT in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2020, 80(24): 5569-82.
- [32] WELLENSTEIN M D, COFFELT S B, DUIS D E M, et al. Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis [J]. Nature, 2019, 572(7770): 538-42.