

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.005

成纤维细胞生长因子 13 通过 ROS/Caspase-3 通路调控非小细胞肺癌 A549 细胞的凋亡

刘天宇, 唐铖铖, 冯光, 雷静静, 孙晨皓, 王令, 路宏朝 (陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

[摘要] **目的:** 探讨成纤维细胞生长因子 13 (fibroblast growth factor 13, FGF13) 对非小细胞肺癌 A549 细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成和凋亡的影响及其调控机制。**方法:** WB 法检测 FGF13 在人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和肺癌 A549、H460 细胞中的本底表达量。采用 FGF13 过表达载体转染 BEAS-2B 和 A549 细胞; 设计两组靶向 FGF13 的 shRNA 序列, 构建慢病毒干扰载体, 包装病毒后侵染 A549 细胞, 采用 qPCR 和 WB 法检测干扰效果, DCFH-DA 探针结合荧光酶标仪分析敲减 FGF13 对 A549 细胞内 ROS 水平的影响, MitoSOX 与 WB 法检测对线粒体 ROS 水平及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4) 蛋白表达量的影响, Annexin V-FITC-PI 双染法检测对细胞凋亡和 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响。**结果:** 与 BEAS-2B 细胞相比, FGF13 蛋白在两种肺癌细胞中均高表达 (均 $P < 0.05$)。成功构建 FGF13 过表达、低表达的 A549 细胞系。过表达 FGF13 后, BEAS-2B 和 A549 细胞内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$); 敲减 FGF13 表达后, A549 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$); 然而过表达及干扰 FGF13 对 A549 细胞内线粒体 ROS 水平无显著影响, 但 NOX4 蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$) 及显著上调 ($P < 0.05$)。FGF13 干扰后 A549 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量显著上调 ($P < 0.05$)。**结论:** FGF13 可能通过 NOX 家族途径调控 ROS 的生成, 并通过 ROS/Caspase-3 通路调控 A549 细胞凋亡。

[关键词] 成纤维细胞生长因子 13; A549 细胞; 活性氧; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4; Caspase-3; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0451-09

Fibroblast growth factor 13 regulates apoptosis of A549 cells through the ROS/Caspase-3 pathway

LIU Tianyu, TANG Chengcheng, FENG Guang, LEI Jingjing, SUN Chenhao, WANG Ling, LU Hongzhao (School of Biologic Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of fibroblast growth factor 13 (FGF13) on the generation of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells and its regulatory mechanism. **Methods:** WB was used to detect the background expression of FGF13 in human normal lung epithelial BEAS-2B cells and lung cancer A549 and H460 cells. BEAS-2B and A549 cells were transfected with FGF13 over-expression vector. Two groups of shRNA sequences targeting FGF13 were designed to construct lentivirus interference vector. The packaged lentivirus were used to infect A549 cells. qPCR and WB were used to detect the interference efficiency. DCFH-DA probe combined with fluorescence microplate reader was used to analyze the effect of FGF13 knock-down on the level of ROS in A549 cells. MitoSOX and WB were used to detect mitochondrial ROS levels and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) protein expression levels. Annexin V-FITC-PI double staining method was used to detect the cell apoptosis and expressions of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 protein. **Results:** FGF13 protein was highly expressed in lung cancer cells compared with BEAS-2B cell (both $P < 0.05$). A549 cell line with over-expression and low-expression of FGF13 were successfully constructed. Over-expression of FGF13 significantly reduced the level of ROS in A549 and BEAS-2B cells ($P < 0.05$), while knockdown of FGF13 significantly increased the level of ROS in A549 cells ($P < 0.05$). Though over-expression and interference of FGF13 had no significant effect on mitochondrial ROS levels in A549 cells, NOX4 protein expression was significantly down-regulated ($P < 0.05$) after FGF13 over-expression and significantly upregulated after FGF13 knockdown ($P < 0.05$), respectively. The interference of FGF13 significantly increased the apoptosis rate ($P < 0.01$) of A549 cells and significantly upregulated the protein expression levels of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion:** FGF13 regulates ROS production possibly through the NOX family pathway

[基金项目] 陕西省教育厅科技计划资助项目 (No. 20JK0570)。Project supported by the Science and Technology Plan Foundation from Department of Education of Shaanxi Province (No. 20JK0570)

[作者简介] 刘天宇 (1994-), 男, 硕士, 研究方向为细胞工程, E-mail: 1206141742@qq.com

[通信作者] 路宏朝 (LU Hongzhao, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为细胞工程, E-mail: zl780823@126.com

and regulates apoptosis of A549 cells by the ROS/Caspase-3 pathway.

[Key words] fibroblast growth factor 13 (FGF13); A549 cell; reactive oxygen species (ROS); nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4); caspase-3; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 451-459. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.005]

成纤维细胞生长因子 13 (fibroblast growth factor 13, FGF13) 属于成纤维细胞生长因子家族成员, 其相对分子质量为 28 000^[1]。FGF13 基因存在不同亚型^[2], 如“1S” (FGF13 1A)、“1U” (FGF13 1B)、“1V”、“1Y”和“1V+1Y”等, 这些亚型在个体组织中差异性表达并分别定位于不同的细胞区域^[3], 推测它们可能具有不同的生物学特性和功能。FGF13 在卵巢癌、前列腺癌和乳腺癌等多种癌症组织中呈高水平表达^[4-5], 与肿瘤的增殖、侵袭、迁移及耐药性的产生有关^[6-8]。研究^[9]显示, FGF13 在非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 细胞中表达水平较高, 通过减少核糖体和蛋白质的合成、降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成维持细胞内环境稳态。与机体正常细胞相比, 恶性肿瘤细胞内 ROS 水平显著升高^[10-11]。适量的 ROS 能够促进肿瘤细胞增殖和分化^[12], 过多则又会导致细胞内氧化应激增强, 而造成脂质、蛋白质和 DNA 的氧化损伤, 最终导致肿瘤细胞的凋亡或坏死^[11]。因此, ROS 是维持肿瘤细胞内环境稳态的重要成分。然而, NSCLC 细胞中 FGF13 如何调控 ROS 的生成目前尚不明确。鉴于此, 本研究通过过表达或干扰 A549 细胞中 FGF13 基因的表达, 探究 FGF13 对 ROS 生成和 A549 细胞凋亡的影响以及相关的调控机制, 为进一步研究 FGF13 在 NSCLC 内环境稳态中的作用和机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒及主要试剂

pcDNA3.1-FGF13 及 Empty vector 质粒为本实验室保存, 人 NSCLC 细胞株 A549、人大细胞肺癌细胞株 H460、HEK-293T 细胞购自上海赛百慷公

司, 人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 购自上海艾睿生物科技有限公司。慢病毒包装辅助载体 psPAX2、pMD2.G 和慢病毒载体 pLKO.1-TRC 购自武汉淼灵生物科技有限公司, 限制性核酸内切酶 *Age* I、*Eco*R I、嘌呤霉素、质粒提取试剂盒均购自博日公司, LipofectamineTM 2000、T4 DNA 连接酶、DNase (RNase-free) 均购自美国 Invitrogen 公司, 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量检测试剂盒购自美国 AG 公司, ROS 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 线粒体超氧化物红色荧光探针 (MitoSOX) 购自 Life Technologies 公司, Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 鼠抗人 FGF13 单克隆抗体、山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 抗体购自英国 Abcam 公司, 兔抗人 NOX4 多克隆抗体、HRP-抗 GAPDH 鼠单克隆抗体购自 proteintech 公司, 兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, shRNA 引物由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成。

1.2 细胞转染与分组

调整 A549 细胞密度至 1×10^6 个/ml, 取 2 ml 接种于 6 孔板, 培养过夜, 将细胞分为 pcDNA3.1-FGF13 组及 Empty vector 组 (对照组), 采用 LipofectamineTM 2000 将浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 FGF13 过表达质粒和阴性对照分别转染至该组细胞。

1.3 shRNA 引物设计与合成

从 NCBI 中检索人 FGF13 基因序列 (NM_001139502.2), 采用美国 Sigma 公司 (<http://www.sigmaldrich.com>) 在线设计软件, 设计两组针对人 FGF13 基因的 shRNA 和对照组 NC-shRNA 序列 (表 1) 并委托公司合成。

表 1 shRNA 序列

Tab.1 Sequence of shRNA

shRNA	shRNA sequence (5'-3')
FGF13-shRNA-1-F	CCGGAACAAGCCTGCAGCTCATTCTCGAGAAATGAGCTGCAGGCTTGTCTTTTTG
FGF13-shRNA-1-R	AATTCAAAAAGAACAAGCCTGCAGCTCATTCTCGAGAAATGAGCTGCAGGCTTGTTC
FGF13-shRNA-2-F	CCGCAAGCTGTACTTGGCAATGAACTCGAGTTCATTGCCAAGTACAGCTTGTTTTTG
FGF13-shRNA-2-R	AATTCAAAAACAAGCTGTACTTGGCAATGAACTCGAGTTCATTGCCAAGTACAGCTTG
NC-shRNA-F	CCGGTACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGATTTTTG
NC-shRNA-R	AATTCAAAAATACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTA

1.4 重组质粒的构建与鉴定

pLKO.1-TRC 载体经 *Age* I、*Eco*R I 酶切后, FGF13-shRNA-1、FGF13-shRNA-2 经 T4 DNA 连接酶连接入载体, 然后将连接产物转入 DH5 α 感受态菌进行转化, 均匀涂布在 Amp 抗性的 LB 固体培养基上, 倒置平皿, 37 °C 恒温培养箱培养过夜。次日进行菌落 PCR 鉴定, 选取阳性克隆测序。

1.5 慢病毒的包装与收集

将 6 μ g 重组质粒 pLKO.1-FGF13-shRNA 及 4 μ g 的包装质粒 pMD2.G 和 psPAX2 用 Opti-MEM 混匀, 常温静置 20 min。混合物经 LipofectamineTM 2000 介导共转染 293T 细胞, 培养 16 h 后弃去含转染混合物的培养上清, PBS 洗涤, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 分别培养 40、64 h 后收集培养液, 503.1 \times g 离心 5 min, 收集上清于 -80 °C 保存。

1.6 A549-FGF13-shRNA 稳转细胞株的建立

接种处于对数生长期的 A549 细胞, 加入病毒上清液进行感染, 以 FGF13-shRNA 慢病毒感染 A549 细胞作为实验组 (shRNA-1、shRNA-2), 空载体病毒感染的细胞作为阴性对照组 (NC), 不感染病毒的细胞作为空白对照。感染 12 h 后更换新鲜培养基继续培养。72 h 后采用嘌呤霉素筛选。嘌呤霉素筛选后的阳性细胞经扩大培养后用于后续研究。

1.7 qPCR 检测 FGF13 mRNA 表达

利用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 按照 Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean 试剂盒说明书将其逆转录为 cDNA。设计 PCR 引物, FGF13 基因上游引物: 5'-GGTCTGCGAGTGGTGGCTAT-3', 下游引物: 5'-CCTGACTGCTGCTGACGGTAT-3'; GAPDH 基因上游引物: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物: 5'-TGGTGAAGACGCAGTGGA-3'。反应体系配制及条件按 SYBR Green Premix \times Pro Taq HS qPCR Kit 试剂盒说明书进行, 每个样本重复 3 次, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的表达量。

1.8 WB 法检测蛋白质表达

RIPA 裂解液裂解细胞, 制备蛋白质样品。用 BCA 法测定蛋白质浓度。制备的蛋白质样品进行 SDS-PAGE, 电转法将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭, 一抗孵育过夜, 使用的抗体包括抗 FGF13 (1:2 000)、抗 NOX4 (1:1 000)、抗 Caspase-3 (1:1 000) 和抗 GAPDH (1:5 000)。次日去除一抗, TBST 洗涤, 加入二抗室温孵育 2 h, 使用的抗体包括山羊抗兔 IgG (1:5 000)、山羊抗鼠 IgG (1:2 000), ECL 化

学发光检测, 采用 Image J 软件进行灰度分析并计算目的蛋白的相对表达量。

1.9 细胞内总 ROS 及线粒体 ROS 水平检测

1.9.1 细胞内总 ROS 水平检测 将细胞接种于 96 孔板, 12 h 后移去培养液, 用 PBS 以 1:1 000 稀释 ROS 探针, 使终浓度为 10 μ mol/L。加入探针后于 37 °C 细胞培养箱内避光孵育 20 min。PBS 洗涤。荧光酶标仪 (488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长) 检测荧光强度, 取 3 次检测结果计算平均值。

1.9.2 细胞内线粒体 ROS 水平检测 将细胞接种于 96 孔板, 12 h 后移去培养液, 将 MitoSOX 探针用培养基稀释至浓度为 5 μ mol/L。37 °C 细胞培养箱内避光孵育 30 min, PBS 洗涤, 荧光酶标仪 (510 nm 激发波长, 580 nm 发射波长) 检测荧光强度, 取 3 次检测结果计算平均值。

1.10 荧光显微镜检测 A549 细胞凋亡

接种处于对数生长期的 A549 细胞, PBS 清洗一次。均匀地将细胞与 5 μ l Annexin V-FITC、10 μ l 碘化丙啶 (PI) 染色液以及 195 μ l 1 \times 结合缓冲液混合, 室温避光孵育 20 min。荧光显微镜下观察, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

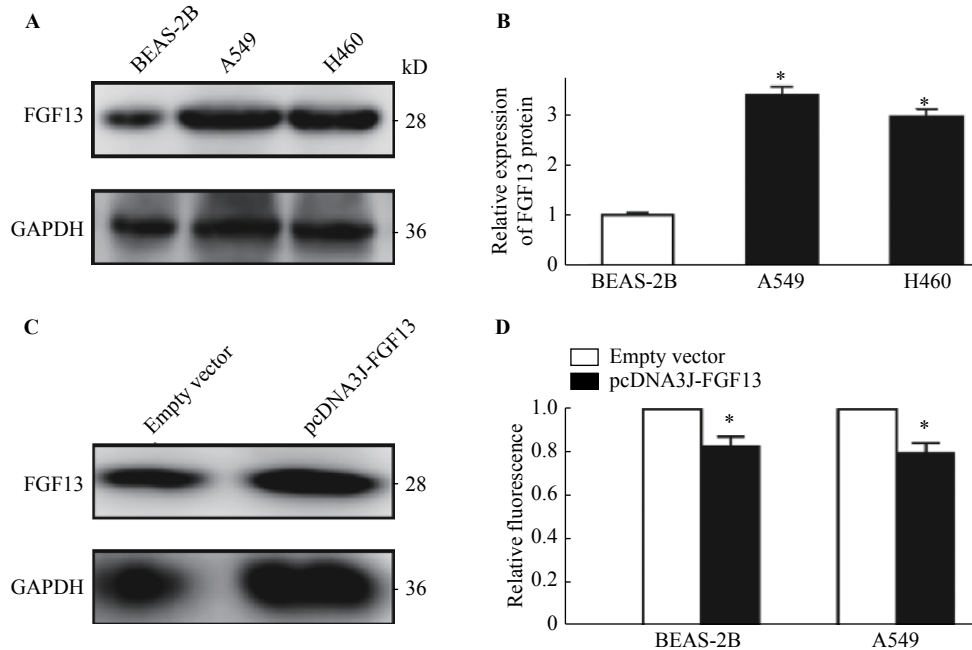
1.11 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, Origin 2017 软件绘图。所有实验独立重复 3 次, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析对多组间均数进行比较, 以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 FGF13 抑制 A549 细胞内 ROS 的生成

首先检测了 FGF13 基因在人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 与两种肺癌细胞 A549 和 H460 中本底表达情况。WB 检测结果 (图 1A、B) 显示, 与 BEAS-2B 相比, FGF13 蛋白在两种肺癌细胞中表达较高, 约为 BEAS-2B 细胞的 3.2 倍和 2.9 倍 (均 $P<0.05$)。鉴于 FGF13 在 A549 细胞中表达最高, 因此将该种细胞用于后续研究。在 A549 细胞中转染 FGF13 的过表达质粒, WB 检测其在蛋白水平上的过表达效率。结果 (图 1C) 发现, FGF13 蛋白表达量较对照组明显上调, 可用于后续研究。进一步在 BEAS-2B 和 A549 细胞中过表达 FGF13 后, 检测两种细胞中 ROS 水平变化。结果 (图 1D) 显示, 过表达 FGF13 后, BEAS-2B 与 A549 细胞内 ROS 水平分别较对照组降低了约 20% 和 21% ($P<0.05$), 表明 FGF13 抑制两种细胞中 ROS 的生成。



* $P < 0.05$ vs BEAS-2B cells group

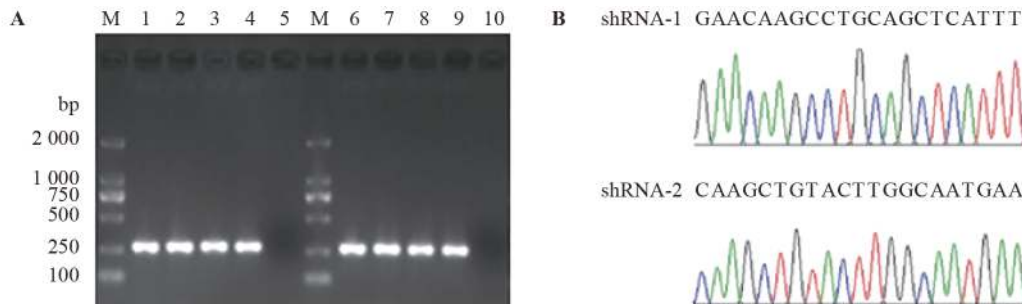
A, B: Protein expression level of FGF13 in BEAS-2B, A549 and H460 cells; C: mRNA expression level of FGF13 in A549 cells transfected with empty vector or pcDNA3.1-FGF13; D, E: Protein expression level of FGF13 in A549 cells transfected with empty vector or pcDNA3.1-FGF13; F: ROS levels in BEAS-2B and A549 cells transfected with empty vector or pcDNA3.1-FGF13

图1 FGF13 表达水平及 ROS 水平检测

Fig.1 Determination of expression level of FGF13 and ROS

2.2 pLKO.1-FGF13-shRNA 慢病毒干扰载体的构建
为进一步验证 FGF13 对 ROS 生成的影响, 构建了 FGF13 慢病毒干扰载体。重组质粒 pLKO.1-FGF13-shRNA 的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 264 bp 的特异条带 (图 2A), 大小与预期

一致。测序结果 (图 2B) 显示, 其发夹结构中的干扰序列均与之前设计的目的片段完全一致, 说明合成的两组 FGF13-shRNA 核苷酸序列插入正确, pLKO.1-FGF13-shRNA 慢病毒干扰载体构建成功。



A: Electrophoretic profile of colony PCR product; M: Marker; 1-4: pLKO.1-FGF13-shRNA1 positive clones (264bp), 5: Negative Control, 6-9: pLKO.1-FGF13-shRNA2 positive clones(264bp), 10: Negative control. B: Sequencing results of recombinant plasmid; shRNA-1:pLKO.1-FGF13-shRNA-1; shRNA-2:pLKO.1-FGF13-shRNA-2

图2 重组质粒的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid

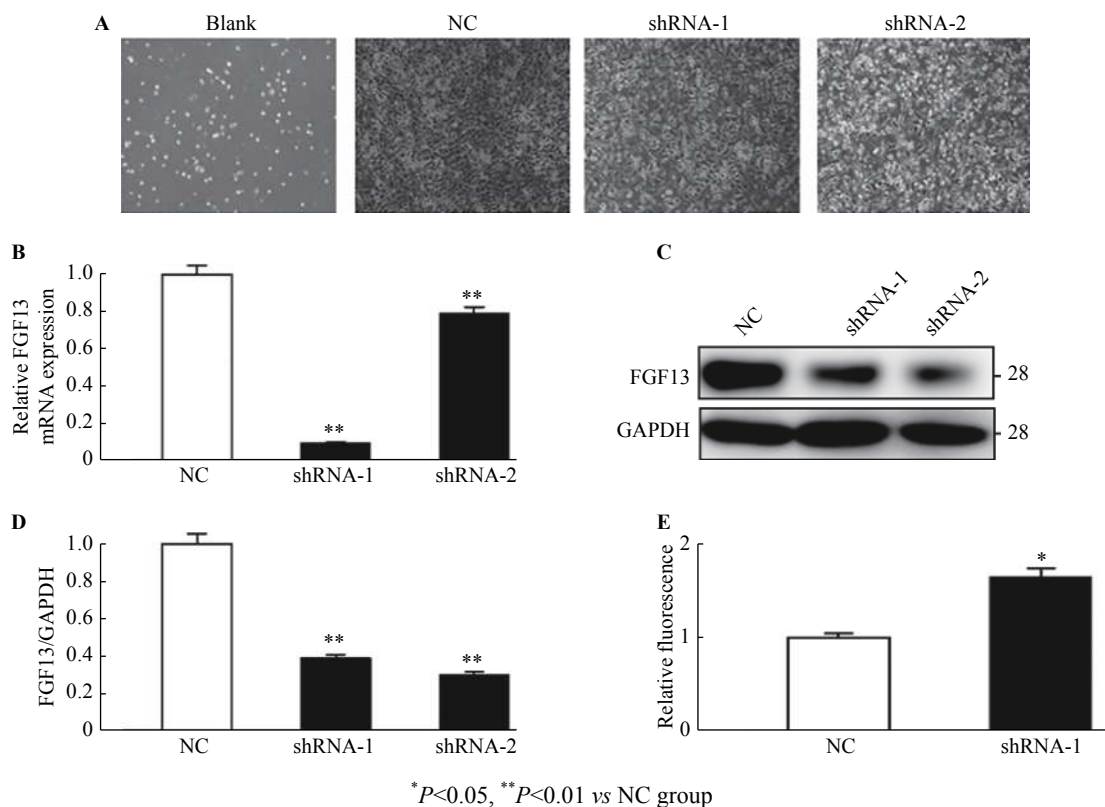
2.3 A549-FGF13-shRNA 稳转细胞株的建立及对 ROS 的影响

慢病毒感染 A549 细胞, 嘌呤霉素筛选 NC (对照组) 和 FGF13-shRNA-1、FGF13-shRNA-2 (实验组) 阳性细胞株。结果 (图 3A) 显示, 空白组 (Blank) 细胞全部死亡, 而对照组和实验组细胞正常

生长, 为阳性细胞株, 用于后续研究。利用 qPCR 和 WB 检测慢病毒干扰效率, qPCR 结果 (图 3B) 显示, 与 NC (对照组) 相比, FGF13-shRNA-1 组细胞中 FGF13 mRNA 表达水平下降约 90% ($P < 0.01$), FGF13-shRNA-2 组细胞中 FGF13 mRNA 表达水平下降约 22% ($P < 0.05$)。WB 结果 (图 3C、D) 显示,

与 NC (对照组) 相比, FGF13-shRNA-1 组细胞中 FGF13 蛋白表达水平降低约 62% ($P<0.01$), FGF13-shRNA-2 组细胞中 FGF13 蛋白表达水平降低约 68% ($P<0.01$)。因此, FGF13-shRNA-1 组干扰效果最明显, 用于后续实验。为分析干扰 FGF13 对 A549 细胞内 ROS 生成的影响, 检测了 FGF13-

shRNA-1 组细胞内 ROS 水平。结果 (图 3E) 表明, 与 NC (对照组) 相比, FGF13-shRNA-1 组细胞内 ROS 水平显著升高, 约为 NC 组的 1.6 倍 ($P<0.05$), 说明干扰 FGF13 促进 A549 细胞内 ROS 的生成。进一步确定了 FGF13 调控 A549 细胞内 ROS 的生成。



A: Pictures of positive cells after 48 h of purinomycin screening ($\times 100$), Blank: A549 cells; NC: Negative control; shRNA-1:pLKO.1-FGF13-shRNA-1; shRNA-2:pLKO.1-FGF13-shRNA-2; B: qPCR for FGF13 mRNA expression in shRNA-transfected A549 cells; C, D: Protein expression level of FGF13 in shRNA-transfected A549 cells; E: ROS levels in A549-FGF13-shRNA stably transfected cell line

图 3 A549-FGF13-shRNA 稳转细胞株的建立及对 ROS 的影响

Fig.3 Establishment of A549-FGF13-shRNA stably transfected cell line and its effect on ROS

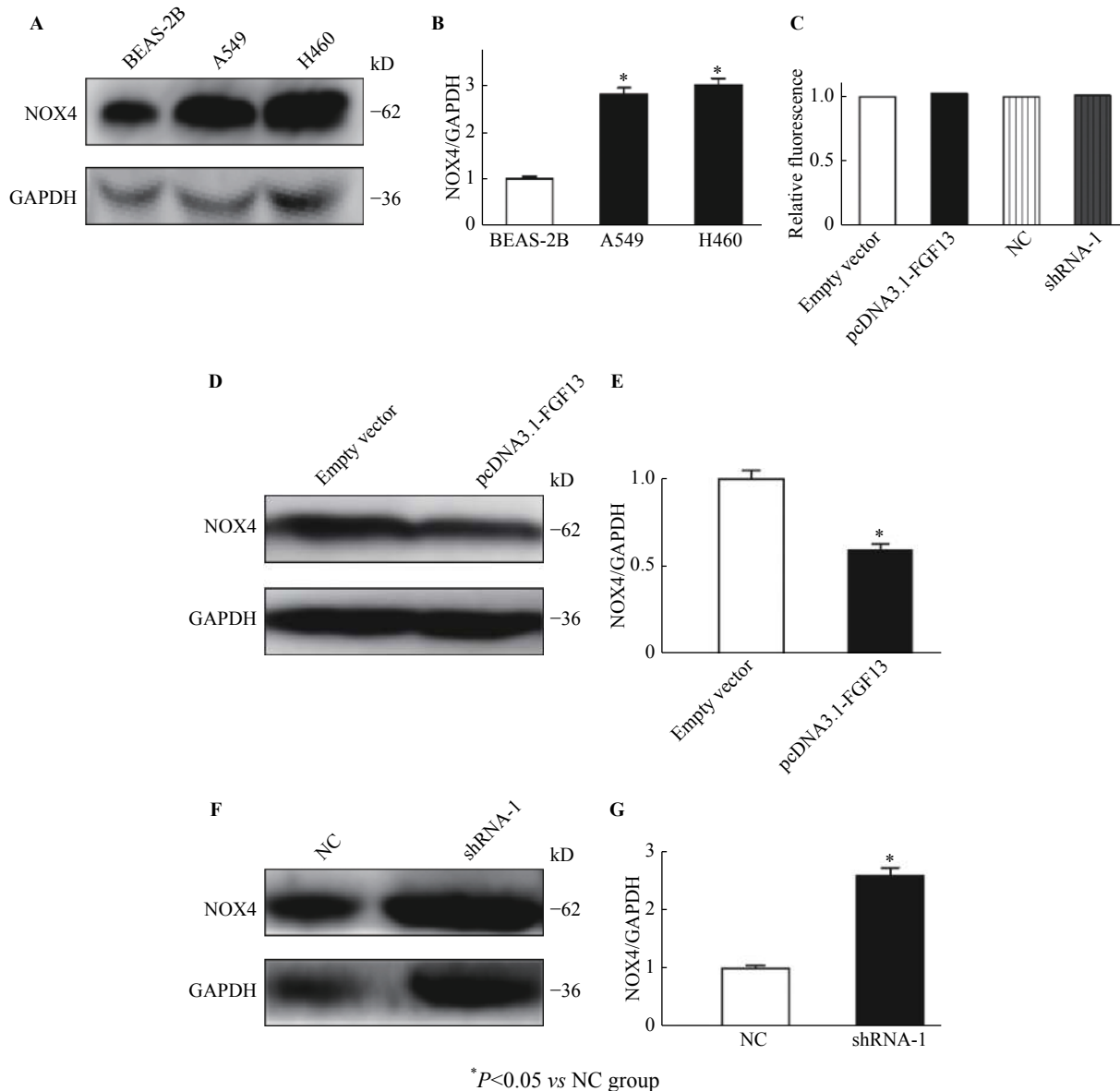
2.4 FGF13 下调 NOX4 蛋白表达调控 A549 细胞内 ROS 的生成

为探究 FGF13 通过哪条途径抑制 A549 细胞内 ROS 的生成, 我们首先检测了 NOX4 蛋白在 BEAS-2B、A549 和 H460 细胞中的本底表达水平。结果 (图 4A、B) 表明, 与 BEAS-2B 相比, NOX4 蛋白在两种肺癌细胞中均高表达, 约为 BEAS-2B 细胞的 2.8 倍和 3 倍 (均 $P<0.05$)。其次, 在 A549 细胞中分别过表达和干扰 FGF13, 检测线粒体 ROS 水平与 NOX4 蛋白表达的情况。结果 (图 4C) 显示, 与对照组相比, 过表达或干扰 FGF13 后, A549 细胞内线粒体 ROS 水平均无明显变化; 然而, NOX4 蛋白表达量发生明显变化。过表达 FGF13 后 NOX4 蛋白相对表达量降低了约 48% ($P<0.05$) (图 4D、E), 而干扰 FGF13 后, NOX4 蛋白相对表达量升高至 NC 组

的 2.6 倍 ($P<0.05$) (图 4F、G), 表明 FGF13 通过影响 NOX4 蛋白途径调控细胞内 ROS 的生成。

2.5 干扰 FGF13 引起的 ROS 升高促进 A549 细胞凋亡

研究发现肿瘤细胞内 ROS 的水平直接影响细胞的凋亡, 本试验结合荧光显微镜, 采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测干扰 FGF13 后 A549 细胞的凋亡率。结果 (图 5A、B) 显示, 与对照组细胞 (1.12 ± 0.06)% 相比, FGF13-shRNA-1 组细胞凋亡率达到 (92 ± 4.6)% ($P<0.01$); WB 检测 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量, 结果 (图 5C-E) 显示, 干扰 FGF13 后 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量分别升高至对照组的 1.5 倍和 1.9 倍 ($P<0.05$), 以上结果表明干扰 FGF13 引起细胞内 ROS 升高诱导了 A549 细胞的凋亡。



A, B: Protein expression level of NOX4 in BEAS-2B, A549 and H460 cells; C: MitROS levels in A549 cells transfected with empty vector or pcDNA3.1-FGF13, NC or shRNA-1; D, E: Protein expression level of NOX4 in A549 transfected with empty vector or pcDNA3.1-FGF13; F, G: Protein expression level of NOX4 in shRNA-transfected A549 cells; shRNA-1: pLKO.1-FGF13-shRNA-1; NC: Negative control

图 4 FGF13 对 A549 细胞内线粒体 ROS 水平及 NOX4 蛋白表达的影响
Fig.4 Effects of FGF13 on ROS levels and NOX4 protein expression in A549 cells

3 讨论

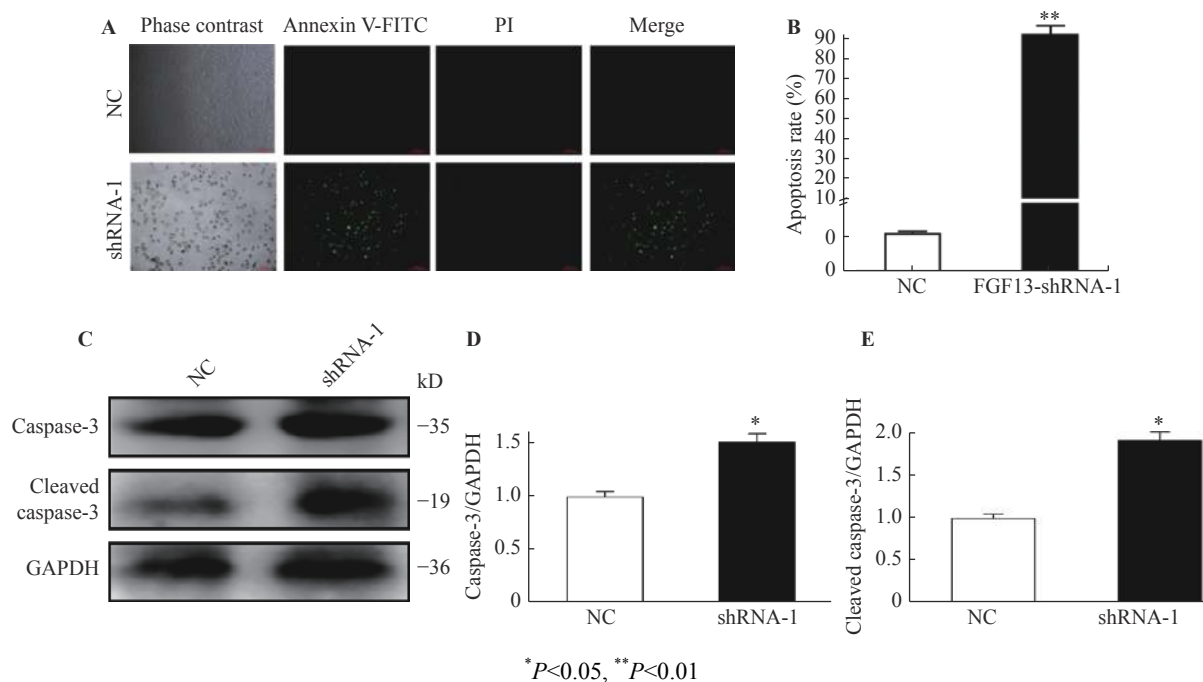
肺癌是重大公共卫生问题, 目前我国位居肿瘤发病率和死亡率的首位^[13], 其中 NSCLC 是最普遍的肺癌类型^[14]。近年来随着研究的深入, 对肿瘤发生、发展机制的认识已经取得相当大的进展, 已开发出一些新型抗肿瘤药物, 例如程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 免疫药物、靶向药物和抗肿瘤血管生成药物等, 这些药物在某些 NSCLC 患者治疗中展现出较好的抗肿瘤效果^[15-16]。然而, 由于肿瘤异质性以及复杂的肿瘤微环境, 导致大部分患者在治疗后产生复发和转移^[17]。因此, 寻找新的靶点和治疗方法是当前

NSCLC 的研究主题。

与 FGF 家族的其他成员不同, FGF13 是一种胞内蛋白^[18]。研究^[7, 19-20]表明, FGF13 在多种类型的肿瘤中过表达, 参与肿瘤的侵袭和迁移, 并通过维持肿瘤细胞内环境稳态促进肿瘤细胞的存活。肿瘤细胞内环境是细胞代谢的主要场所, 各种复杂的生命活动都依赖于细胞内环境稳态的维持^[9], 其中细胞内膜系统, 如线粒体、内质网、核膜等以及细胞内氧化还原水平 (包括 ROS 和抗氧化体系) 的稳定是肿瘤细胞内环境稳态尤为重要的两大部分^[21]。ROS 是一类在细胞正常代谢过程中产生的具有强氧化性的小分子化学物质^[22], 在肿瘤的发生、生长、增殖、

凋亡和迁移中发挥重要作用^[23]。研究^[9]显示, 在 NSCLC 细胞中 FGF13 可降低 ROS 的水平, 但 ROS 的具体生成途径尚不清楚。本研究首先检测了 FGF13 基因在人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 与两种肺癌细胞 A549 和 H460 中本底表达情况, 结果发现 FGF13 在两种肺癌细胞中均高表达。其次, 检测了过表达 FGF13 后 BEAS-2B 与 A549 细胞内 ROS

水平变化, 发现过表达 FGF13 后 ROS 水平显著降低; 再利用慢病毒干扰技术, 成功构建两组稳定干扰 FGF13 基因的 A549 细胞株, ROS 检测结果表明, 干扰 FGF13 基因后 ROS 水平显著升高, 进一步验证了 FGF13 调控 A549 细胞内 ROS 的生成, 与 BUBLIK 等^[9]报道结果一致。



A, B: A549 cell apoptosis was determined by Annexin V-FITC-PI staining followed by fluorescence microscope ($\times 100$); Phase Contrast: survival cells; Annexin V-FITC: apoptosis cell in the early; PI: apoptosis cell in the late; Merge: dead cell.

C-E: Protein expression level of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 in shRNA-transfected A549 cells;

NC: Negative control; shRNA-1: pLKO.1-FGF13-shRNA-1

图 5 干扰 FGF13 对 A549 细胞凋亡的影响

Fig.5 Interfering with the effect of FGF13 on A549 cell apoptosis

据报道^[24], 肿瘤细胞内 ROS 的生成主要来源于线粒体氧化呼吸链途径和 NADPH 氧化酶 NOX 家族。其中, 线粒体是细胞内重要的一种细胞器, 可通过氧化磷酸化途径产生 ROS^[24], 而 NOX 家族则被认为是细胞内产生 ROS 的最主要的来源^[25]。NOX 家族由 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5 以及二元氧化酶 1 (DUOX1)、二元氧化酶 2 (DUOX2) 7 个亚型组成^[26]。在肺组织中, 包含了 40 多种细胞, 主要表达 NOX1、NOX2、NOX4 与 Duox1/2; 在 NSCLC 中 Duox1/2 发生甲基化, 表达水平极低, NOX2 主要与吞噬细胞介导的免疫反应有关^[27]。与 NOX1 相比, NOX4 高度表达, 不仅能够生成大量的 ROS, 促进 NSCLC 增殖并抑制凋亡, 而且可通过正反馈 PI3K/Akt 信号通路促进其转移^[12]。因此, 本研究首先检测了 NOX4 蛋白在 BEAS-2B、A549 和 H460 细胞中的本底表达水平。结果表明, 与 BEAS-

2B 相比, NOX4 蛋白在两种肺癌细胞中均高表达, 这与吴启鹏等^[12]的研究结果相一致。其次, 检测了过表达或干扰 FGF13 后 A549 细胞内线粒体 ROS 的水平, 结果发现无论过表达或干扰 FGF13, ROS 的生成量都无变化。说明在 A549 细胞中, FGF13 调控的 ROS 并非来源于线粒体氧化呼吸链途径。进一步检测 NOX 家族中的 NOX4 蛋白表达量, 发现过表达 FGF13 后, NOX4 蛋白显著下调, 相反干扰 FGF13 后其蛋白表达量显著上调。说明在 A549 细胞中, FGF13 可能是通过影响 NOX 家族而调控细胞内 ROS 的生成。

ROS 生成过多会引起细胞脂质、蛋白质和 DNA 氧化损伤, 最终导致肿瘤细胞凋亡^[28], 许多化疗药物都是通过引起 ROS 生成增多并促进肿瘤细胞凋亡, 以发挥治疗癌症, 提高患者生存率的作用^[29]。例如 5-氟尿嘧啶通过 p53 依赖途径产生大量

ROS, 诱导结直肠癌细胞凋亡^[30]; 利妥昔单抗抑制 Bcl-2 和 p38/MAPK 途径并促进 ROS 生成, 诱导淋巴瘤细胞凋亡等^[31]。细胞凋亡是一个重要的生理过程, 内源性凋亡途径始于 Caspase-9 的激活, 然后激活 Caspase-3、6 和 7, 通过下游半胱天冬酶切割特定底物蛋白质, 促使细胞凋亡^[32-33], 其中 Caspase-3 是凋亡级联反应途径的核心蛋白, 它的激活是细胞凋亡的重要条件^[34]。因此, 为探究 FGF13 是否通过调控 ROS 的生成进而影响 A549 细胞凋亡, 本研究检测了干扰 FGF13 后 A549 细胞凋亡率和 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达情况。结果发现干扰 FGF13 后 A549 细胞凋亡率显著升高, Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量显著升高, 表明干扰 FGF13 后引起的 ROS 升高促进细胞凋亡, 说明 FGF13 可能通过 ROS/Caspase-3 通路调控 A549 细胞凋亡。

综上所述, 本研究分别通过过表达 FGF13 和构建稳定干扰 FGF13 的 A549 细胞株, 研究结果表明 FGF13 可能是通过 NOX 家族途径调控 A549 细胞内 ROS 的生成进而通过 ROS/Caspase-3 通路调控细胞凋亡, 而具体 FGF13 通过何种作用机制调控 NOX4 的表达还需进一步研究。该研究结果为深入研究 FGF13 在 NSCLC 内环境稳态中的作用和机制提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] SMALLWOOD P M, MUNOZ-SANJUAN I, TONG P, et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9850-9857[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38518/>. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9850.
- [2] GECZ J, BAKER E, DONNELLY A, et al. Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient[J]. *Hum Genet*, 1999, 104(1): 56-63. DOI: 10.1007/s004390050910.
- [3] MUNOZ-SANJUAN I, SMALLWOOD P M, NATHANS J. Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2589-2597. DOI: 10.1074/jbc.275.4.2589.
- [4] HOEK K, RIMM D L, WILLIAMS K R, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5270-5282. DOI: 10.1158/0008-5472.can-04-0731.
- [5] MISSIAGLIA E, DALAI I, BARBI S, et al. Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(2): 245-255[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288616/>. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.5988.
- [6] HOLLERN D P, SWIATNICKI M R, RENNACK J P, et al. E2F1 drives breast cancer metastasis by regulating the target gene FGF13 and altering cell migration[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1-13. DOI: 10.1038/s41598-019-47218-0.
- [7] JOHNSTONE C N, PATTISON A D, HARRISON P F, et al. FGF13 promotes metastasis of triple-negative breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(1): 230-243. DOI: 10.1002/ijc.32874.
- [8] REDMER T, WALZ I, KLINGER B, et al. The role of the cancer stem cell marker CD271 in DNA damage response and drug resistance of melanoma cells[J/OL]. *Oncogenesis*, 2017, 6(1): e291[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294251/>. DOI: 10.1038/oncis.2016.88.
- [9] BUBLIK D R, BURSAC S, SHEFFER M, et al. Regulatory module involving FGF13, miR-504, and p53 regulates ribosomal biogenesis and supports cancer cell survival[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(4): E496-E505[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5278483/>. DOI: 10.1073/pnas.1614876114.
- [10] 兰景彬, 杨铃, 潘克俭. 阿托伐醌通过ROS介导的自噬抑制结直肠癌细胞增殖的研究[J]. *成都医学院学报*, 2019, 14(2): 158-162, 192. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2019.02.005.
- [11] 姚贝. Nrf2介导NOX4过表达的NSCLC细胞氧化还原适应的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [12] 吴启鹏. NOX4通过ROS/PI3K/Akt/c-Myc通路促进NSCLC谷氨酰胺代谢及增殖[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [13] 王森, 王郁, 吕微, 等. miR-142-5p通过影响上皮间质转化抑制肺癌H1650细胞的侵袭与迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2): 142-148. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.02.007.
- [14] 姜战胜. 晚期非小细胞肺癌一线靶向治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(10): 1129-1133. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.10.015.
- [15] PARK H, SHOLL L M, HATABU H, et al. Imaging of precision therapy for lung cancer: current state of the art[J/OL]. *Radiology*, 2019, 293(1): 15-29[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6776234/>. DOI: 10.1148/radiol.2019190173.
- [16] 李彦明, 郝雁冰, 杨继雷, 等. miR-125a-5p通过靶向APAF1增强非小细胞肺癌细胞吉非替尼耐药性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(6): 622-628. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.005.
- [17] 黄崇标, 徐杰, 李增勋. 肿瘤相关成纤维细胞在肺癌中的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(4): 267-273. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.16.
- [18] OLSEN S K, GARBI M, ZAMPIERI N, et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34226-34236. DOI: 10.1074/jbc.m303183200.
- [19] GAN Y B, WIENTJES M G, AU J L. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(6): 1324-1331. DOI: 10.1007/s11095-006-0136-6.
- [20] OTANI Y, ICHIKAWA T, KUROSUMI K, et al. Fibroblast growth factor 13 regulates glioma cell invasion and is important for bevacizumab-induced glioma invasion[J]. *Oncogene*, 2018, 37(6):

- 777-786. DOI: 10.1038/onc.2017.373.
- [21] 汪建成. 中间丝蛋白Nestin调节细胞内环境稳态的作用机理研究[D]. 广州: 中山大学, 2016.
- [22] ZHOU D H, SHAO L J, SPITZ D R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells[M]//Advances in Cancer Research. Amsterdam: Elsevier, 2014: 1-67. DOI: 10.1016/b978-0-12-420117-0.00001-3.
- [23] 徐小艳. NADPH氧化酶4对A549细胞迁移的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [24] JIA D, LU M, JUNG K H, et al. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways[J]. *PNAS*, 2019, 116(9): 3909-3918. DOI: 10.1073/pnas.1816391116.
- [25] LEE I T, YANG C M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(5): 581-590. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.05.005.
- [26] 张家敏, 吴炜景, 曾奕明. NADPH氧化酶家族在肺部疾病中的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(23): 1820-1824. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2018.23.013.
- [27] BEDARD K, KRAUSE K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313. DOI: 10.1152/physrev.00044.2005.
- [28] 庞林荣, 陈俊, 陆静尔, 等. 褪黑素联合顺铂促进大鼠胰腺癌AR42J细胞凋亡[J]. *中华胰腺病杂志*, 2019, 19(6): 430-434. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2019.06.008.
- [29] PERILLO B, DI DONATO M, PEZONE A, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon[J/OL]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(2): 192-203[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7062874/>. DOI: 10.1038/s12276-020-0384-2.
- [30] HWANG P M, BUNZ F, YU J, et al. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells[J/OL]. *Nat Med*, 2001, 7(10): 1111-1117[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4086305/>. DOI: 10.1038/nm1001-1111.
- [31] ALAS S, NG C P, BONAVIDA B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 836-845.
- [32] LAN H, YUAN H Y, LIN C Y. Sulforaphane induces p53-deficient SW480 cell apoptosis via the ROS-MAPK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7796-7804. DOI: 10.3892/mmr.2017.7558.
- [33] BRETNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA R L, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J/OL]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14: 32[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710246/>. DOI: 10.1186/1471-2121-14-32.
- [34] LI L, MAO X G, QIN X M, et al. Aspirin inhibits growth of ovarian cancer by upregulating caspase-3 and downregulating bcl-2[J/OL]. *Oncol Lett*, 2019, 17(5): 4742[2020-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444002/>. DOI: 10.3892/ol.2019.10108.
- [收稿日期] 2020-08-21 [修回日期] 2021-03-26
[本文编辑] 黄静怡