

# ANGPTL4 调控人肺腺癌 PC9/GR 细胞迁移和侵袭机制的研究

方乐,李轩,程浩,郝吉庆

**摘要** 目的 探究人血管生成素样蛋白4(ANGPTL4)对肺腺癌吉非替尼耐药细胞(PC9/GR)侵袭、迁移能力的影响及其作用机制。方法 通过 siRNA 方法干扰 PC9/GR 细胞中的 ANGPTL4 表达,并以 Western blot、qRT-PCR 验证干扰效果;以 CCK-8 实验验证干扰 ANGPTL4 对 PC9/GR 细胞增殖的抑制作用;通过划痕实验、Transwell 实验等检测各组细胞的侵袭、转移能力;Western blot 实验测定各组细胞中上皮间质化(EMT)相关蛋白 Vimentin、E-cadherin 及 N-cadherin 的表达水平。结果 PC9/GR 细胞中 ANGPTL4 表达高于 PC9 细胞,CCK-8 实验显示 PC9/GR 细胞对吉非替尼的 IC<sub>50</sub> 高于 PC9 细胞,且干扰 PC9/GR 细胞中 ANGPTL4 表达后,IC<sub>50</sub> 降低;划痕实验、Transwell 迁移实验显示,干扰 PC9/GR 细胞中 ANGPTL4 表达后,细胞伤口愈合能力、迁移及侵袭能力减弱。Western blot 实验结果显示干扰 ANGPTL4 后 PC9/GR 细胞中 N-cadherin、Vimentin 表达降低而 E-cadherin 表达增加。结论 ANGPTL4 可能参与肺腺癌吉非替尼获得性耐药,并促进 PC9/GR 细胞的侵袭转移,干扰 ANGPTL4 可抑制 PC9/GR 细胞的 EMT 过程。

**关键词** 非小细胞肺癌;EGFR-TKI 耐药;人血管生成素样蛋白4;上皮间质化

**中图分类号** R 734.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0902-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.011

肺癌是世界上发病率第2的恶性肿瘤,每年全球的确诊患者中有1/3来自中国<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌中常见突变基因为EGFR,与患者预后密切相关<sup>[2]</sup>。吉非替尼是第1代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosinase inhibitor,EGFR-TKIs),被广泛用于晚期非小细胞肺癌(non small cell lung carcinoma,NSCLC)的治疗。但是大部分对EGFR-TKIs敏感的NSCLC患者在经过9~13个月的治疗后对吉非替尼获得性耐药<sup>[3]</sup>,严重影响了NSCLC患者的生存率,故其耐药机制的研

究成为了全球范围内研究的热点。人血管生成素样蛋白4(human angiopoietin-like protein 4,ANGPTL4)是一种多功能蛋白,其在人类的肿瘤发生中起重要作用<sup>[4]</sup>,研究<sup>[5-6]</sup>表明ANGPTL4与乳腺癌的远处转移及预后密切相关。而ANGPTL4是否在肺腺癌的获得性吉非替尼耐药过程中发挥作用尚未知。该研究旨在探究肺腺癌获得性耐药前后ANGPTL4的表达差异以及ANGPTL4表达影响PC9/GR细胞迁移侵袭的潜在机制,为吉非替尼耐药的肺腺癌患者寻找新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞培养** 人肺腺癌细胞株PC9购自中南大学细胞库、人肺腺癌耐吉非替尼细胞株PC9/GR由安徽医科大学病毒研究所赠予,培养基为添加了10%胎牛血清及1%双抗的高糖DMEM培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

**1.1.2 试剂与仪器** 胎牛血清、ECL发光试剂盒均购自上海赛默飞世尔科技公司;CCK-8试剂盒、qRT-PCR试剂盒均购自日本 taraka 生物科技公司;RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒、transwell小室、细胞培养6孔板均购自上海碧云天生物技术有限公司;ANGPTL4一抗、β-actin一抗均购自英国 Abcam 公司;IgG(H&L)-HRP(羊抗兔)购自美国 Bioword technology 公司;吉非替尼购自美国 MCE 公司,按说明书配置为10 mmol/L浓度的溶液后置于-20℃保存;ANGPTL4-siRNA、空白对照组 siRNA 均购自上海吉凯基因技术有限公司;ANGPTL4及GAPDH引物购自滁州通用生物技术有限公司,引物序列见表1。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA 干扰细胞 ANGPTL4 基因表达** 将融合度达80%的细胞消化离心,重悬后进行6孔板铺板(1×10<sup>5</sup>/孔),继续置于恒温培养箱中培养16~24 h。待细胞融合度达50%,进行慢病毒转染。冰上解冻 siRNA,取一洁净无酶1.5 ml EP管标记为A管,加入4 μl shRNA 和250 μl Optim-mem培养基,

2022-03-30 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020240)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:方乐,女,硕士研究生;

郝吉庆,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:haojiqing@ahmu.edu.cn

表1 ANGPTL4-shRNA 序列及 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
ANGPTL4-siRNA	F:GACCACAAGCACCTAGACCAT R:ATGGTCTAGGTGCTTGTGGTC
NC-siRNA	F:TTCTCCGAACCTGTCACGT R:ACGTGACACGTTCCGAGAA
ANGPTL4	F:CTGCACCGACCTCCCGTTA R:CCTCATGGTCTAGGTGCTTGT
GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

混匀后常温放置 3 min。另取一洁净无酶 1.5 ml EP 管标记为 B 管,加入 4  $\mu$ l lip2000 和 250  $\mu$ l Optimem 培养基,混匀后加入 A 管中。轻轻吹打混匀脂质复合物,室温放置 20 min 后加入已弃去原培养液并漂洗干净的细胞中,每孔细胞中另加入 Optimem 培养基 1.5 ml。将处理好的细胞放回恒温培养箱中,6 h 后弃去原培养基换入新鲜的完全培养基继续孵育 24 h。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力** 将消化重悬后的 PC9/GR、PC9/GR-siRNA、PC9/GR-siNC 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种至 96 孔板中,共设 6 个平行复孔。细胞生长 24 h 贴壁后,弃去原培养基,加入按 0、0.01、0.5、1、2、4、8、16、32、100  $\mu$ mol/L 梯度稀释的吉非替尼药物溶液并加入完全培养基至 200  $\mu$ l。培养 24 h 后,每孔加入 CCK-8 药物 10  $\mu$ l 并避光继续培养 2 h。在酶标仪 450 nm 波长条件下,测定各孔吸光度值。

**1.2.3 划痕实验检测细胞迁移能力** 将各组细胞以  $1 \times 10^5$  密度均匀接种于 6 孔板中,培养 24 h。待细胞融合度达 100% 时,以 200  $\mu$ l 枪头在孔中央做 1 条垂直线,以 PBS 轻轻洗去未贴壁细胞后仍放回培养箱培养,24 h 后于  $\times 100$  显微镜下拍照并计算痕迹宽度。每次实验重复 3 次,取平均值。

**1.2.4 Transwell 法检测细胞迁移及侵袭能力** 迁移实验:将 Transwell 小室放入 12 孔板中以构建小室模型,各组细胞消化重悬并稀释至  $6 \times 10^4$  密度后,向 Transwell 小室内加入含 200  $\mu$ l 的细胞混悬液,下室加入 400  $\mu$ l 完全培养基,后放入恒温培养箱继续培养。24 h 后将上室取出,轻轻除去上室膜上残余贴壁细胞,在室温下以 4% 的多聚甲醛溶液固定 30 min 后以 0.4% 结晶紫染液进行染色,约 5 min 后洗去浮色。在显微镜下观察细胞并计数,每孔随机选择 3 个视野进行计数,取平均值。侵袭实验:按试剂盒说明书配置基质胶,均匀加在上室滤膜上,室温放至融合。细胞以无血清培养基稀释至  $5$

$\times 10^4$  个/ml。向上室内加入 200  $\mu$ l 细胞悬液,下室加入 600  $\mu$ l 完全培养基,培养 24 h 后取出擦去上室残余细胞,进行固定、染色、观察计数。每孔随机选择 3 个视野进行计数,取平均值。

**1.2.5 Western blot 法检测细胞蛋白表达** 待 6 孔板中细胞生长至融合度达 70% ~ 80% 时,弃去原培养基以 PBS 漂洗细胞 2 次,每孔加入配置好的细胞裂解液 250  $\mu$ l 冰上孵育 3 min。于显微镜下观察细胞裂解完全后,将混合液吸出置于洁净 EP 管中。混合物冰上孵育 10 min 后 4  $^{\circ}$ C、27 690 r/min 离心 20 min,取上清液,加入 1/4 体积的  $\times 5$  上样缓冲液充分混匀,100  $^{\circ}$ C 沸水加热 10 min。配置合适浓度的 SDS-PAGE 胶,每泳道加入适量蛋白质样品后在 75 V、25 min、120 V、55 min 的条件下进行电泳。经过转膜、封闭后,将带有蛋白质条带的 PVDF 膜放入稀释好的一抗溶液(1:1 000)中 4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。次日,取出 PVDF 膜并用 TBST 溶液漂洗,每 10 min 1 次,共进行 4 次。40 min 后将 PVDF 膜置于二抗溶液中(羊抗兔或羊抗鼠,1:5 000),摇床孵育 2 h。2 h 后再次以 TBST 溶液漂洗,每 10 min 1 次,共进行 4 次。向膜上滴加适量 ECL 发光液,充分润湿膜后于紫外凝胶成像仪上进行拍照分析。

**1.2.6 qRT-PCR 法检测细胞 mRNA 表达** 按照 RNAeasy<sup>TM</sup> 动物 RNA 抽提试剂盒说明书提取细胞 mRNA,并测量浓度。用  $\times 5$  Master Mix 逆转录试剂盒将上述所得到的 RNA 样本进行反转录以得到对应的 cDNA,并测量浓度,获得的 cDNA 可置于 -20  $^{\circ}$ C 短期保存。按 qRT-PCR 试剂盒说明书配置反应体系,并设置反应条件,于全自动荧光定量 PCR 系统下进行 qRT-PCR。设置 GAPDH 为管家基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达强度。

**1.3 统计学处理** 该研究中所有实验均独立重复 3 次,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 6.0 进行数据分析。两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ANGPTL4 在 PC9、PC9/GR 细胞间的表达情况** Western blot、qRT-PCR 实验结果显示 ANGPTL4 在 PC9/GR 细胞中表达量高于 PC9 细胞株,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,  $F = 75.028$ ) (图 1)。

**2.2 siRNA 对细胞 ANGPTL4 基因表达的影响** 提取 PC9/GR 组、PC9/GR-siNC 组、PC9/GR-siANG-

PTL4 组共 3 组细胞的蛋白与 RNA, 分别进行 Western blot、qRT-PCR 实验以验证敲低效率。Western blot、qRT-PCR 实验结果显示, 与 PC9/GR 组、PC9/GR-siNC 组相比, PC9/GR-siANGPTL4 组中 ANGPTL4 蛋白表达含量下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05, F = 33.784$ ) (图 2)。

**2.3 CCK-8 测定细胞增殖能力** 将细胞培养至对数生长期, 分别对 PC9、PC9/GR、PC9/GR-siNC、PC9/GR-siRNA 共 4 组细胞进行 CCK-8 实验。实验结果显示, 4 组细胞的增殖能力均随着吉非替尼药物浓度的增高而下降, 表明吉非替尼可抑制各组细

胞的增殖。在相同浓度吉非替尼药物浓度作用下, PC9 细胞增殖能力低于 PC9/GR 细胞, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05, F = 803.608$ ); PC9/GR-siRNA 细胞增殖能力低于 PC9/GR 细胞, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05, F = 483.837$ ); 而 PC9/GR、PC9/GR-siNC 两组细胞间差异不明显, 差异无统计学意义 (图 3)。

**2.4 敲低 ANGPTL4 对细胞迁移的影响** 取生长对数期的 PC9/GR、PC9/GR-siRNA、PC9/GR-siNC 共 3 组细胞进行迁移实验。划痕实验结果表明 PC9/GR-siRNA 组伤口大于 PC9/GR 组, 迁移至伤口的细胞数目也少于 PC9/GR 组, 差异有统计学意

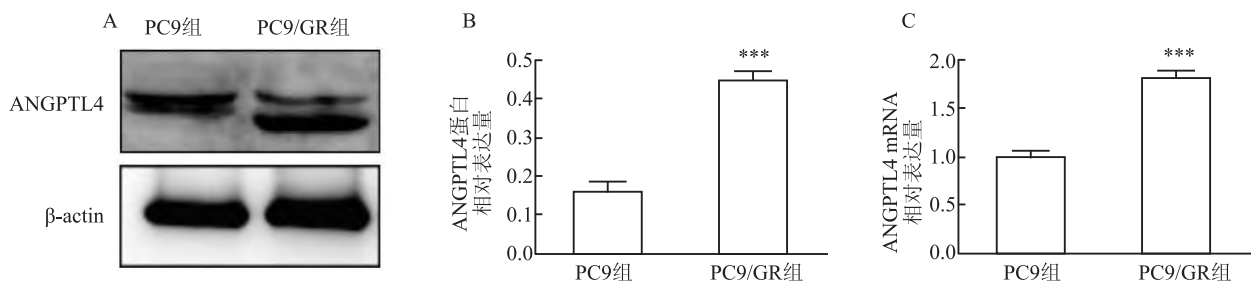


图 1 qRT-PCR 和 Western blot 检测 ANGPTL4 在 PC9、PC9/GR 细胞间的表达差异

A: PC9 与 PC9/GR 细胞中蛋白的相对表达; B: PC9 组与 PC9/GR 组细胞中蛋白相对表达量统计学分析; C: PC9 组与 PC9/GR 组细胞中 mRNA 的表达; 与 PC9 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

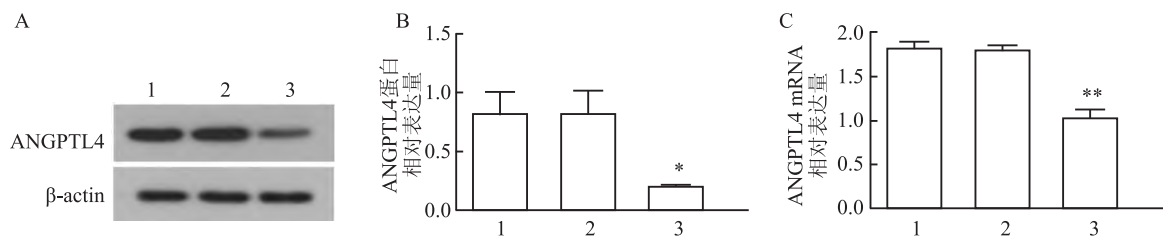


图 2 qRT-PCR 和 Western blot 检测干扰 PC9/GR 中 ANGPTL4 表达效率

A: 各组细胞中蛋白相对表达量; B: 各组细胞中蛋白相对表达量统计学分析; C: 各组细胞中 mRNA 的相对表达量; 1: PC9/GR 组; 2: PC9/GR-siNC 组; 3: PC9/GR-siANGPTL4 组; 与 PC9/GR 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

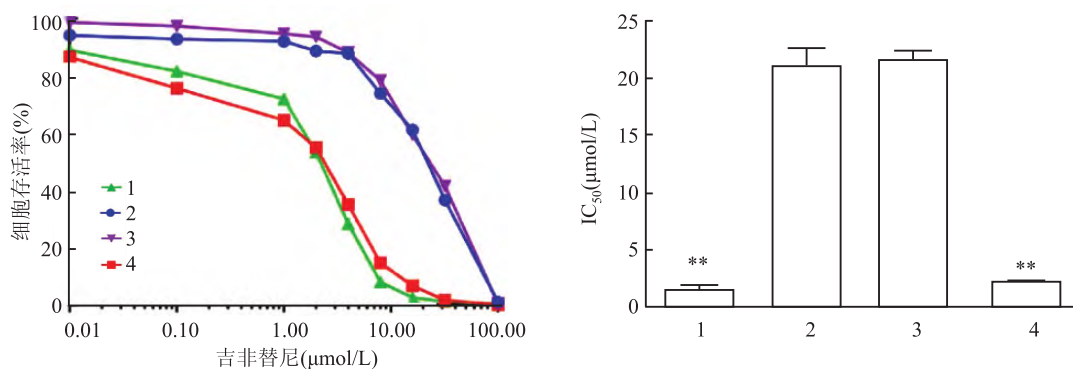


图 3 CCK-8 实验检测 4 组细胞的增殖活力

1: PC9 组; 2: PC9/GR 组; 3: PC9/GR-siNC 组; 4: PC9/GR-siRNA 组; 与 PC9/GR 组比较: \*\*  $P < 0.01$

义( $P < 0.01$ ,  $F = 63.67$ )。而 PC9/GR 组和 PC9/GR-siNC 组相比较,差异无统计学意义(图 4A、B)。Transwell 实验中,PC9/GR-siRNA 组迁移至小室底膜的细胞少于 PC9/GR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $F = 126.943$ );PC9/GR 组和 PC9/GR-siNC 组相比较,差异无统计学意义(图 4C、D)。

**2.5 敲低 ANGPTL4 对细胞侵袭能力的影响** 在构建小室模型并恒温培育 24 h 后,取出模型中上室在显微镜下观察细胞并计数。实验数据显示,PC9/GR-siANGPTL4 组小室底部细胞数目少于 PC9/GR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $F = 596.645$ ),而 PC9/GR 组与 PC9/GR-siNC 组相比,差异无统计学意义(图 5)。

**2.6 敲低 ANGPTL4 对细胞上皮间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程的影响** 通

过 Western blot 对 EMT 相关蛋白的表达进行检测提取 PC9/GR、PC9/GR-siNC、PC9/GR-siRNA 组细胞蛋白质进行 Western blot 实验。Western blot 实验结果显示,PC9/GR-siRNA 组细胞相较于 PC9/GR 与 PC9/GR-siNC 组细胞 N-cadherin、Vimentin 表达降低而 E-cadherin 表达增加,且 PC9/GR 与 PC9/GR-siNC 组细胞 N-cadherin、Vimentin 及 E-cadherin 表达差异均无统计学意义(图 6)。

### 3 讨论

NSCLC 约占肺癌总数的 85%,大部分患者确诊时已处于晚期,治疗难度较大,生存期短<sup>[7]</sup>。在过去的 10 年中,肺癌的治疗取得了巨大的突破<sup>[8]</sup>,靶向药物的出现提供了新的有效治疗手段。其中,由于 EGFR-TKIs 类药物具有显著的有效性和安全性

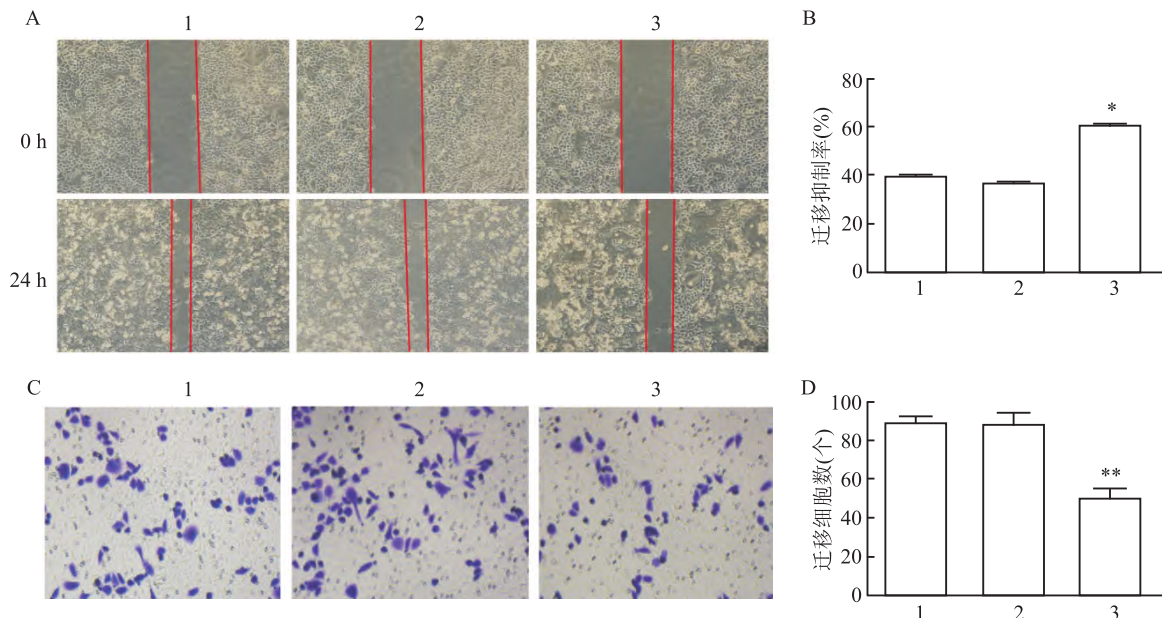


图 4 干扰 ANGPTL4 对耐吉非替尼肺腺癌细胞 PC9/GR 迁移能力的影响

A:细胞划痕实验检测各组细胞迁移愈合能力  $\times 200$ ;B:各组细胞迁移愈合率统计图;C:Transwell 迁移实验检测各组细胞迁移能力  $\times 400$ ;D:各组迁移细胞数目统计图;1:PC9/GR 组;2:PC9/GR-siNC 组;3:PC9/GR-siRNA 组;与 PC9/GR 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

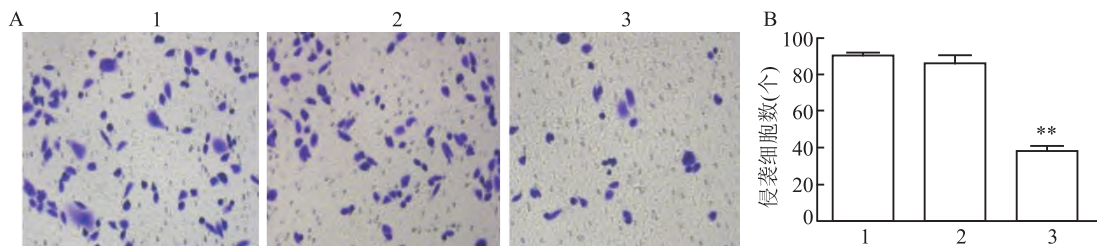


图 5 干扰 ANGPTL4 对耐吉非替尼肺腺癌细胞 PC9/GR 侵袭能力的影响

A:Transwell 迁移实验检测各组细胞侵袭能力  $\times 400$ ;B:各组迁移细胞数目统计图;1:PC9/GR 组;2:PC9/GR-siNC 组;3:PC9/GR-siRNA 组;与 PC9/GR 组比较: \*\*  $P < 0.01$

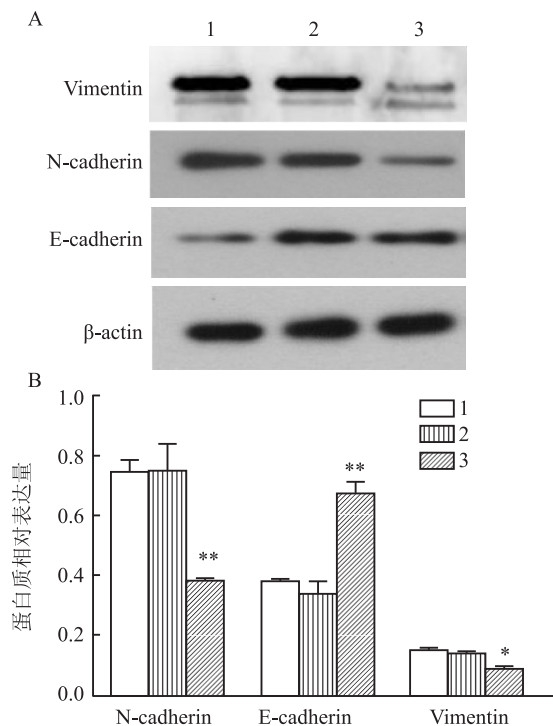


图6 干扰ANGPTL4表达对N-cadherin、Vimentin、E-cadherin表达的影响

A: Western blot 检测各组细胞中 N-cadherin、Vimentin、E-cadherin 蛋白质表达; B: 各组细胞蛋白相对表达量统计学分析; 1: PC9/GR 组; 2: PC9/GR-siNC 组; 3: PC9/GR-siRNA 组; 与 PC9/GR 组比较; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

而得到广泛运用。然而, EGFR-TKIs 继发耐药性的产生极大影响了治疗效果<sup>[9]</sup>。EGFR-TKIs 继发耐药性的产生机制有多种, 如 FGL1 高表达、PD1 高表达等, 而在更多的研究中, 学者认为 EGFR 突变以外的 EMT 是 EGFR-TKIs 获得性耐药的主要机制<sup>[10]</sup>, 而有关 EMT 如何促使 EGFR-TKIs 获得性耐药产生的机制目前仍无定论。

ANGPTL4 蛋白属于分泌蛋白超家族, 在结构上与调节血管生成的因子有关, 又被称为血管生成素<sup>[11]</sup>。起初, ANGPTL4 由于在肝脏和脂肪组织中的普遍表达而被认为是一种参与脂质代谢的因子, 最近的研究<sup>[12]</sup>表明 ANGPTL4 是一种多功能蛋白, 在癌症发生发展、失巢凋亡抵抗、新生血管形成中均发挥关键作用。该研究表明 PC9/GR 细胞 IC<sub>50</sub> 明显高于 PC9 细胞, 表明 PC9/GR 细胞较之 PC9 细胞对吉非替尼具有更高的耐药性。此外, Western blot、qRT-PCR 实验结果均显示 PC9/GR 细胞中 ANGPTL4 的表达量明显高于 PC9 细胞, 且提示 ANGPTL4 可能参与 PC9 细胞对吉非替尼耐药性的形成。CCK-8 实验结果显示, 在不同浓度的吉非替尼

处理下, PC9/GR 细胞的增殖活性远高于 PC9 细胞、PC9/GR-siANGPTL4 组细胞, 且 PC9 细胞与 PC9/GR-siANGPTL4 细胞之间增殖活性并无明显差异。实验结果显示沉默 ANGPTL4 表达可在一定程度上恢复 PC9/GR 细胞对吉非替尼的敏感性。

E-Cadherin 为一种钙依赖性蛋白的跨膜蛋白, 广泛分布于人体的各类上皮细胞中, 在细胞黏附和极性维持中起重要作用。E-Cadherin 表达的丧失导致接触抑制的丧失, 从而促进肿瘤细胞的迁移侵袭过程<sup>[13]</sup>。N-cadherin 为神经性钙依赖蛋白, 与 E-Cadherin 多在上皮组织中表达不同的是 N-cadherin 主要在神经组织、肌肉和成纤维细胞中表达且在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中表达水平增高<sup>[14]</sup>。E-Cadherin、N-cadherin 均与 EMT 密切相关。该研究采用 Western blot 法显示: 与 PC9/GR 细胞比较, PC9/GR-siANGPTL4 细胞中 E-Cadherin 表达上升而 N-cadherin 表达下调。在划痕实验与 Transwell 迁移实验中, PC9/GR-siANGPTL4 组细胞迁移能力明显低于 PC9/GR, 且在 Transwell 侵袭实验中得到了相同的结果。波形蛋白 (Vimentin) 作为另外一种重要的参与 EMT 的蛋白, 其具有特殊的动态性质以保证细胞的形态, 常在多种肿瘤组织中过度表达并与肿瘤生长转移密切相关<sup>[15]</sup>。该实验结果显示, PC9/GR-siANGPTL4 组细胞相较于 PC9/GR 细胞, Vimentin 的表达量明显下降, 而综合该研究中划痕实验、Transwell 迁移实验结果也表明沉默 ANGPTL4 表达可降低 PC9/GR 细胞中 EMT 的发生, 从而抑制细胞迁移。

综上所述, 在敲低 PC9/GR 细胞株中 ANGPTL4 表达后, Vimentin 与 N-cadherin 表达量明显下降, 而 E-Cadherin 表达上升, 与划痕实验、Transwell 迁移实验等结果一致, 结合细胞增殖实验提示 ANGPTL4 或可通过介导 EMT 过程调控肺腺癌细胞侵袭、转移, 并促进肺腺癌细胞对吉非替尼耐药性的产生。但有关 ANGPTL4 促进肺腺癌细胞吉非替尼获得性耐药性的具体机制还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Hong Q Y, Wu G M, Qian G S, et al. Prevention and management of lung cancer in China [J]. Cancer, 2015, 121 (17): 3080-8.
- [2] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma [J]. Nature, 2014, 511 (7511): 543-50.
- [3] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus stand-

- ard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet oncol*, 2012,13(3):239-46.
- [4] Hata S, Nomura T, Iwasaki K, et al. Hypoxia-induced angiopoietin-like protein 4 as a clinical biomarker and treatment target for human prostate cancer[J]. *Oncol rep*, 2017,38(1):120-8.
- [5] Cai Y C, Yang H, Wang K F, et al. ANGPTL4 overexpression inhibits tumor cell adhesion and migration and predicts favorable prognosis of triple-negative breast cancer[J]. *BMC cancer*, 2020, 20(1):878.
- [6] Zhao J, Liu J, Wu N, et al. ANGPTL4 overexpression is associated with progression and poor prognosis in breast cancer[J]. *Oncol lett*, 2020,20(3):2499-505.
- [7] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017,67(1):7-30.
- [8] Jones G S, Baldwin D R. Recent advances in the management of lung cancer[J]. *Clin Med (Lond)*, 2018,18(2):s41-6.
- [9] 高薇薇,孙翠兰,郝吉庆. 沉默 FGLI 对肺腺癌细胞吉非替尼药物敏感性的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020,55(6):854-9.
- [10] Weng C H, Chen L Y, Lin Y C, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI[J]. *Oncogene*, 2019,38(4):455-68.
- [11] Laura L P, Angela L, Stefano C, et al. Potential role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway[J]. *PPAR Research*, 2017,2017(5):1-15.
- [12] Tan M J, Teo Z, Sng M K, et al. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2012,10(6):677-88.
- [13] Mendonsa A M, Na T Y, Gumbiner B M. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(35):4769-80.
- [14] Cao Z Q, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019,118:109320.
- [15] Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011,68(18):3033-46.

## Mechanism of ANGPTL4 regulating the migration and invasion of human lung adenocarcinoma PC9/GR cells

Fang Yue, Li Xuan, Cheng Hao, Hao Jiqing

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of human angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) on the invasion and migration of gefitinib-resistant lung adenocarcinoma strains and its mechanism. **Methods** The expression of ANGPTL4 in PC9/GR cells was interfered by siRNA method, and the interference effect was verified by Western blot and qRT-PCR. The CCK-8 experiment was performed to verify the inhibitory effect of interfering with ANGPTL4 on the proliferation of PC9/GR cells. The scratch experiment and transwell experiment were performed to detect the invasion and metastasis ability of cells; the expression levels of Vimentin, E-cadherin and N-cadherin were detected by Western blot experiment. **Results** The expression of ANGPTL4 in PC9/GR cells was significantly higher than that in PC9 cells. The CCK-8 experiment proved that the  $IC_{50}$  of PC9/GR cells to gefitinib was higher than that of PC9 cells, and the  $IC_{50}$  was significantly reduced after interfering with the expression of ANGPTL4 in PC9/GR cells; scratch experiment and Transwell migration experiment showed that after interfering with the expression of ANGPTL4 in PC9/GR cells, the wound healing ability, migration and invasion ability of the cells were significantly reduced. The results of Western blot experiments showed that the expression of N-cadherin and Vimentin decreased and the expression of E-cadherin increased in PC9/GR cells after interference. **Conclusion** ANGPTL4 may participate in the acquired drug resistance of gefitinib in lung adenocarcinoma, and promote the invasion and metastasis of PC9/GR cells. Interference with ANGPTL4 can inhibit the EMT process of PC9/GR cells.

**Key words** non-small cell lung cancer; EGFR-TKI resistance; human angiopoietin-like protein 4; epithelial-mesenchymal transition