

## 研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.01.010

## 过表达 FOXB2 对肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

梁俊辉 陈泽锐 彭树明 陈善嘉 舒柏荣

**【摘要】** 目的 探讨叉头框蛋白 B2 (FOXB2) 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。方法 采用定量 PCR 检测正常肝细胞 LO2 细胞和肝癌细胞系 Hep3B、Huh7 细胞 FOXB2 mRNA 的表达, 构建过表达 FOXB2 的细胞模型, 逆转录实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测过表达效率, 细胞计数试剂盒 -8 (CCK-8) 法检测 FOXB2 对 Huh7 细胞增殖能力的影响; 平板克隆实验检测 FOXB2 对 Huh7 细胞克隆形成能力的影响; Transwell 实验检测 FOXB2 对 Huh7 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果 FOXB2 在肝癌细胞系 Huh7 和 Hep3B 细胞中的表达水平低于正常肝细胞 LO2 ( $P < 0.001$ ); 过表达 FOXB2 抑制了 Huh7 细胞的增殖 ( $P = 0.005$ ) 和克隆形成 ( $P < 0.001$ ); FOXB2 过表达肝癌细胞的迁移 ( $P < 0.001$ ) 和侵袭 ( $P = 0.002$ ) 能力低于 Vector 对照细胞。结论 FOXB2 在肝癌细胞中低表达, FOXB2 过表达抑制了肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

**【关键词】** 肝细胞癌; 叉头框蛋白 B2; 增殖; 侵袭; 迁移

**Effect of overexpression of forkhead box B2 on proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells** Liang Junhui<sup>△</sup>, Chen Zerui, Peng Shuming, Chen Shanjia, Shu Bairong. <sup>△</sup>Department of General Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital Nanhai Hospital, Foshan 528200, China

Corresponding author, Shu Bairong, E-mail: shubrmd@163.com

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the effect of forkhead box protein B2 (FOXB2) on the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The expression levels of FOXB2 mRNA in normal liver cells LO2, hepatocellular carcinoma cells Hep3B and Huh7 were detected by quantitative PCR. The cell model overexpressing FOXB2 was constructed. The overexpression efficiency was assessed by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. The effect of FOXB2 on Huh7 cell proliferation was evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8). The effect of FOXB2 on the clone formation of Huh7 cells was determined by plate cloning assay. The effect of FOXB2 on the invasion and migration of Huh7 cells was detected by Transwell chamber test. **Results** The expression levels of FOXB2 in hepatocellular carcinoma cells Huh7 and Hep3B were significantly lower than that in normal liver cells LO2 (both  $P < 0.001$ ). Overexpression of FOXB2 significantly inhibited the proliferation ( $P = 0.005$ ) and clone formation ( $P < 0.001$ ) of Huh7 cells. In the Huh7-FOXB2 overexpression group, the invasion ( $P = 0.002$ ) and migration capabilities ( $P < 0.001$ ) of hepatocellular carcinoma cells were significantly lower than that in the Vector control cells. **Conclusions** FOXB2 is lowly expressed in hepatocellular carcinoma cells. Overexpression of FOXB2 suppresses the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells.

**【Key words】** Hepatocellular carcinoma; Forkhead box protein B2; Proliferation; Invasion; Migration

目前肝细胞癌(肝癌)是病死率较高的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。尽管近年肝癌的基础和临床研究取得较大进展,但肝癌患者的5年生存率仍然很低<sup>[2]</sup>。现有的多种疗法依然具有明显不良反应<sup>[3]</sup>。寻找早期诊断的生物标志物和潜在的治疗靶点,对改善肝癌患者的预后是十分必要的。果蝇胚胎中转录调控因子叉头框蛋白(FOX)在控制细胞周期、上

皮分化和代谢以及调节免疫系统许多生物学过程中有重要的作用,且具有肿瘤抑制和潜在致癌的双重作用。FOXB2是FOX蛋白家族的重要成员之一,研究显示FOXB2抑制了胰腺癌细胞Panc-1的恶性表型<sup>[4]</sup>。FOXB2在肝癌中的作用笔者尚未见有相关报道,为此进行本研究,旨在阐明FOXB2在肝癌中的作用。

作者单位: 528200 佛山, 广东省人民医院南海医院普外科(梁俊辉, 陈泽锐, 彭树明, 舒柏荣); 510280 广州, 南方医科大学珠江医院(陈善嘉)

通信作者, 舒柏荣, E-mail: shubrmd@163.com

## 材料与方法

### 一、试剂与耗材

胎牛血清 (FBS)、双抗抗生素、高糖 DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 3000 转染试剂购自赛默飞; 细胞培养板 (6、24、96 孔板)、Transwell 小室 (8  $\mu\text{m}$ ) 购自 Corning 公司; 细胞计数试剂盒 -8 (CCK-8)、RIPA 裂解液、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、增强型电学发光 (ECL) 试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; RNAiso Plus 试剂、TB Green<sup>®</sup> 逆转录快速荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂购自宝生物工程技术有限公司; FOXB2 抗体购自 Immunoway 公司; GAPDH 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购自北京锐抗生物科技有限公司; 0.22  $\mu\text{m}$  的聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜购自 Millipore 公司; 结晶紫购自 Sigma-Aldrich 公司。

### 二、方法

#### 1. 细胞培养

正常肝细胞 LO2 细胞和肝癌细胞系 Hep3B、Huh7 细胞购自中国科学院细胞库, 采用含 10%FBS 的 DMEM 培养细胞, 添加 10 000 kU/L 的链霉素和 10 000 kU/L 青霉素于培养基中。于细胞培养箱进行细胞培养, 待细胞融合至 90% 时进行传代, 隔日进行细胞换液。

#### 2. qRT-PCR 检测细胞 mRNA 表达水平

按照说明书应用 RNAiso Plus 试剂从细胞中获取总 RNA, NanoDrop 测定 RNA 浓度。RT 体系为 10  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 产物常规稀释 10 倍; 采用 TB Green<sup>®</sup> Fast qPCR Mix 试剂进行 qRT-PCR 检测 mRNA 的表达水平。引物由华大基因合成。引物序列: GAPDH 上游 5'-CTACACTGAGCACCAGGTG GTC-3', 下游 5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAAAG -3', 产物长度 115 bp; FOXB2 上游 5'-GCTGAGCG ACATCTACAAGTTC-3', 下游 5'-GAATCTTGATG AAGCAGTCGTTG-3', 产物长度 119 bp。2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算目的 mRNA 相对表达量, 实验重复 3 次。

#### 3. 构建过表达 FOXB2 细胞系

转染空载体质粒的 Huh7 细胞为 Vector 组, 转染 FOXB2 重组质粒的 Huh7 细胞为 FOXB2 组; 细胞转染的前一日, 消化收集细胞, 计数后铺于 24 孔板; 细胞转染当日, 取 Opti-MEM 稀

释液; 加入 Lipofectamine 3000, 培养 20 min; 取 Lipofectamine 3000 在 Opti-MEM 中稀释; 将混合液加入对应各孔中后摇匀; 继续培养 48 h 后检测 FOXB2 mRNA 和蛋白的表达水平。

#### 4. 蛋白免疫印迹法检测细胞蛋白表达水平

预冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞 15 min。BCA 法测定蛋白浓度。95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 10% 的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白质, 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗体 (FOXB2 1:1000; GAPDH 1:1000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min, 抗体室温孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min, 使用增强 ECL 底物在 BIO-RAD Chemidoc XRS 凝胶成像系统曝光; 使用 Image J 进行图像分析。

#### 5. CCK-8 法检测细胞增殖能力

96 孔板每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液 (含有  $5 \times 10^3$  个细胞), 每组 3 个复孔, 不含细胞的培养基作为空白对照 (Vector); 然后分别于预先制定好的检测时间点 (24、48、72 h), 向检测孔中加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 试剂, 继续在培养箱中培养 2 h, 于酶标仪上在 450 nm 处测定吸光度 ( $D_{450}$ )。实验重复 3 次。

#### 6. 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

取 Vector 对照组和 FOXB2 过表达组的细胞以  $1 \times 10^3$  / 孔的密度铺板 6 孔板, 继续培养 1 周, 4% 多聚甲醛固定细胞后用 0.2% 结晶紫染色, 相机拍照并计数克隆个数。实验重复 3 次。

#### 7. Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力

按试剂盒说明书将  $5 \times 10^4$  细胞接种在 24 孔板中。预定时间收集细胞并将其悬浮在无血清培养基中。迁移能力时将细胞置于未涂 Matrigel 胶的上腔室中。侵袭实验测定时将上室的膜按 1:8 稀释并涂 Matrigel 胶。所有下腔室均充满 500  $\mu\text{L}$  含 25%FBS 的培养基。将细胞置于上室培养 24 h 后, 在 200 倍物镜下使用显微镜在 3 个视野中对迁移或侵袭的细胞数量进行计数。

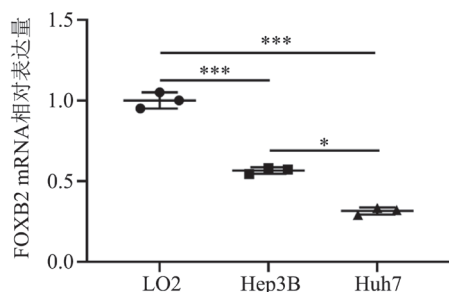
### 三、统计学处理

使用 GraphPad Prism 7 处理数据。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组比较采用  $t$  检验, 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、LO2、Hep3B、Huh7 细胞中 FOXB2 mRNA 相对表达量比较

人肝癌细胞系 Hep3B、Huh7 细胞的 FOXB2 mRNA 表达水平低于人正常肝细胞 LO2 细胞 ( $F = 321.6$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 1。

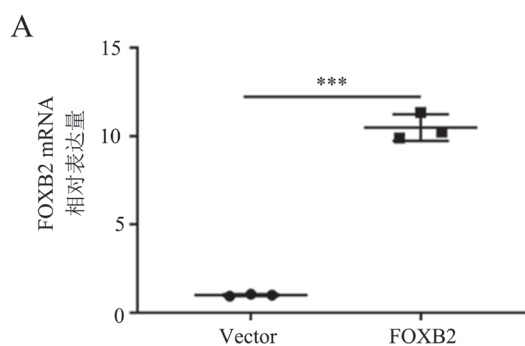


注: 组间比较, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ 。

图 1 LO2、Hep3B、Huh7 细胞中 FOXB2 mRNA 相对表达量比较

### 二、FOXB2 过表达对 Huh7 细胞增殖的影响

转染后的 qRT-PCR 检测结果显示, 与 Vector 组细胞相比, FOXB2 组细胞的 FOXB2 mRNA ( $t$



= 21.85,  $P < 0.001$ ) 和蛋白 ( $t = 7.19$ ,  $P = 0.002$ ) 相对表达量均明显上调, 见图 2A~C。CCK-8 实验显示, 过表达 FOXB2 在 72 h 明显抑制了 Huh7 细胞的增殖能力 ( $t = 5.61$ ,  $P = 0.005$ ), 见图 2D。

### 三、FOXB2 过表达对 Huh7 细胞克隆形成的影响

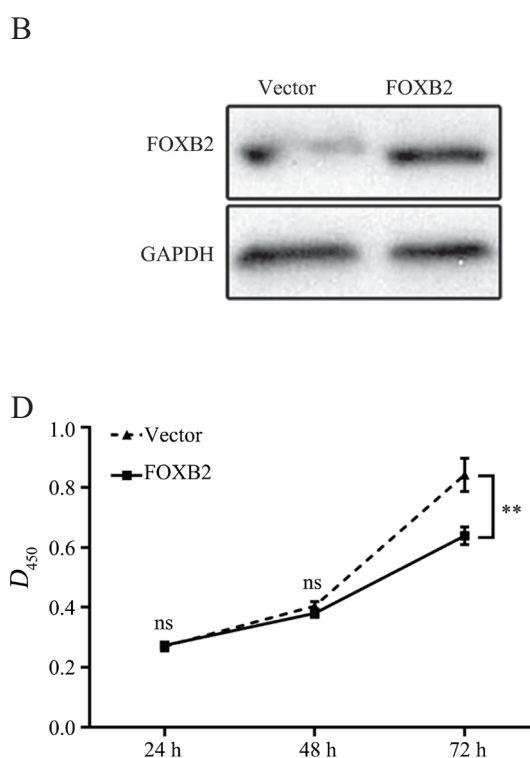
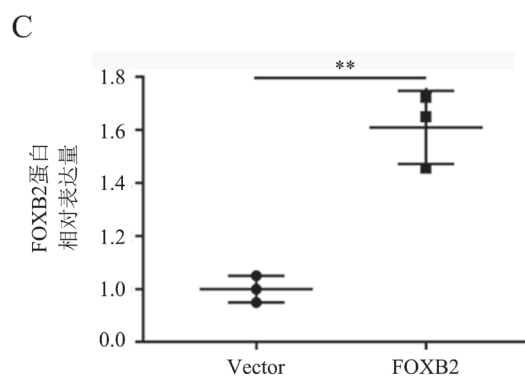
平板克隆形成实验结果显示, 过表达 FOXB2 明显抑制了 Huh7 细胞的克隆形成能力 ( $t = 19.41$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 3。

### 四、FOXB2 过表达对 Huh7 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 迁移实验结果显示, 过表达 FOXB2 明显抑制了肝癌细胞 Huh7 的迁移 ( $t = 7.32$ ,  $P = 0.002$ ) 和侵袭 ( $t = 10.58$ ,  $P < 0.001$ ) 能力, 见图 4。

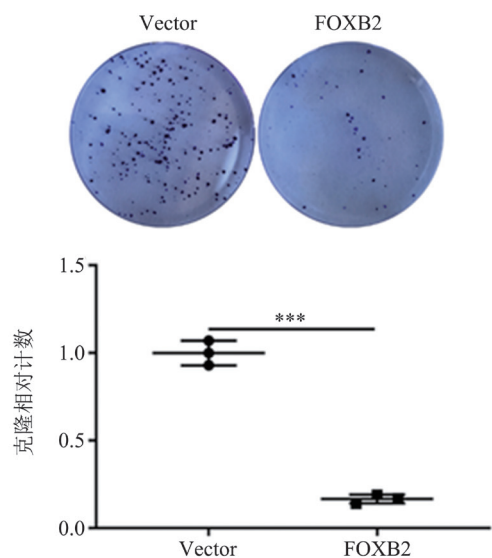
## 讨 论

肝癌仍然是危害人类健康的公共卫生难题之一, 在全球范围内仍然有增加的趋势<sup>[1]</sup>。尽管近



注: A 为 qRT-PCR 验证 FOXB2 过表达效率; B、C 为蛋白免疫印迹验证 FOXB2 过表达效率; D 为 FOXB2 过表达对 Huh7 细胞增殖的影响; 组间比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns $P > 0.05$ 。

图 2 FOXB2 过表达效率验证及其对 Huh7 细胞增殖的影响



注：组间比较，\*\*\* $P < 0.001$ 。

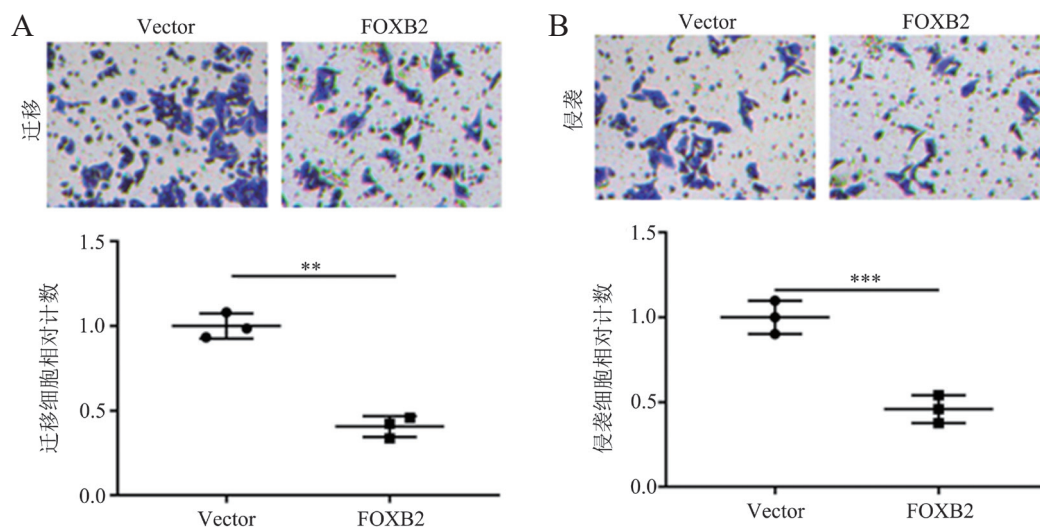
图3 FOXB2过表达对Huh7细胞克隆形成的影响

年肝癌的诊断和治疗研究方面均取得了长足的进展，但其5年生存率仍然较低，主要原因为肝癌早期临床表现缺乏特异性，大部分肝癌患者在确诊时已处于中晚期，肿瘤细胞已经发生转移，而转移及相关并发症是造成肝癌患者死亡的主要原因<sup>[5]</sup>。肝癌患者根治性切除术后5年累积复发率约为70%，有大约90%的患者因发生转移而死亡<sup>[6]</sup>。因此，深入研究肝癌的具体分子机制仍然是该领域的重点。

FOX蛋白家族由一组进化上保守的转录因子组成，其特征是一个共同的DNA结合域，称为叉

头盒结构域。该家族包括19个亚族，具有翼状螺旋DNA结合结构域或称叉头结构域，这种结构域具有转录激活和抑制作用，使FOX具有肿瘤抑制和潜在致癌的双重作用。FOX蛋白家族参与细胞生长、分化和其他生物过程。FOX蛋白家族转录因子的解除调控对肿瘤的发生和发展具有重要意义。在人类中，根据序列相似性，FOX基因被分为19个亚组。在癌细胞中，许多FOX基因被认为是抑癌基因或促癌基因。例如，FOXO和FOXM1转录因子的平衡通过竞争性调节靶基因胰岛素样生长因子，整合了腺苷5'-磷酸腺苷，活化蛋白激酶介导的代谢和细胞周期调节。FOXK1和FOXK2在调节线粒体功能、代谢和凋亡中起重要作用<sup>[7]</sup>。作为FOX家族蛋白的一员，BRAF突变阳性的结直肠癌中FOXB2的5'区CpG岛存在异常甲基化。Fukuchi等<sup>[4]</sup>研究显示，FOXB2在胰腺癌细胞系Panc-1细胞中低表达，其5'端的CpG岛高度甲基化，表明FOXB2可能受到抑制，进一步研究发现FOXB2抑制了Panc-1细胞的恶性特征。

本研究显示，与正常肝细胞相比，FOXB2在肝癌细胞中低表达；过表达FOXB2抑制了肝癌细胞的增殖和克隆形成能力，同时降低了肝癌细胞的迁移和侵袭能力。本研究初步探讨了FOXB2在肝癌中的作用，为后续的研究奠定了一定的基础，但FOXB2在肝癌中的具体作用机制依然不明确，日后将进一步研究FOXB2在肝癌中的具体分子机制。为改善肝癌患者的预后，发现新的肝癌药物干预靶点提供理论依据。



注：A为迁移能力，B为侵袭能力；组间比较，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。

图4 FOXB2过表达对Huh7细胞迁移能力和侵袭能力的影响（结晶紫染色， $\times 200$ ）

## 参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 ( 6 ): 394-424.
- [2] Erstad D J, Tanabe K K. Prognostic and therapeutic implications of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26 ( 5 ): 1474-1493.
- [3] Lee D H, Lee J M, Kim P N, et al. Whole tumor ablation of locally recurred hepatocellular carcinoma including retained iodized oil after transarterial chemoembolization improves progression-free survival. *Eur Radiol*, 2019, 29 ( 9 ): 5052-5062.
- [4] Fukuchi H, Hayashida Y, Inoue K, et al. Forkhead box B2 inhibits the malignant characteristics of the pancreatic cancer cell line Panc-1 in vitro. *Genes Cells*, 2019, 24 ( 10 ): 674-681.
- [5] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2019, 380 ( 15 ): 1450-1462.
- [6] Rankin E B, Giaccia A J. Hypoxic control of metastasis. *Science*, 2016, 352 ( 6282 ): 175-180.
- [7] Sakaguchi M, Cai W, Wang C H, et al. FoxK1 and FoxK2 in insulin regulation of cellular and mitochondrial metabolism. *Nat Commun*, 2019, 10 ( 1 ): 1582.

(收稿日期: 2021-05-18)

(本文编辑: 林燕薇)

