

slfn5 基因在卵巢癌上皮-间质转化中的作用及机制

徐巧萍 邓魁 林青青 张珍

【摘要】 目的 探讨 slfn5 基因在卵巢癌组织中的表达及其对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化(EMT)的影响。方法 收集杭州市第一人民医院确诊的卵巢癌患者手术切除标本,采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测卵巢癌组织中 slfn5 mRNA 的相对表达量。采用 Western blot 法检测并比较卵巢癌细胞系 A2780、SKOV3、OVCAR3、HO8910 中 SLFN5 蛋白的相对表达量;选取表达高的 SKOV3、OVCAR3 细胞株转染沉默 slfn5 基因,分为 si-NC 组、si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组。Transwell 和细胞划痕实验比较各组细胞侵袭、迁移能力。Western blot 法考察各组细胞 SLFN5 及 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形纤维蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 Snail 等 EMT 相关蛋白和 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路关键蛋白 β -catenin 的相对表达量。结果 相比正常组织,卵巢癌组织 slfn5 mRNA 相对表达量明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。相比人卵巢表面上皮细胞 IOSE80, SKOV3、OVCAR3 和 HD8910 细胞系 slfn5 mRNA 均显著高表达,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);其中 SKOV3、OVCAR3 表达量最高。Transwell 迁移实验结果显示,相比 si-NC 组,si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组穿过基底膜的细胞数量比均减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。Transwell 侵袭实验结果显示,相比 si-NC 组,si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组穿过基底膜的细胞数量比均减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组 EMT 相关蛋白 Vimentin、Snail、N-cadherin 相对表达量下降,E-cadherin 上升,相比 si-NC 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组 β -catenin 相对表达量降低,相比 si-NC 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。结论 slfn5 基因在人卵巢癌细胞系中高表达,沉默 slfn5 基因降低了卵巢癌细胞系 EMT 相关蛋白的表达,并抑制细胞迁移和侵袭,其机制可能与调控 β -catenin 的表达有关。

【关键词】 卵巢癌 slfn5 上皮-间质转化 迁移 侵袭

Human Schlafen 5 promotes reversible epithelial and mesenchymal transformation in ovarian cancer

XU Qiaoping, DENG Kui, LIN Qingqing, ZHANG Zhen

First-author's address: Department of Pharmacy, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China

Corresponding author: ZHANG Zhen, E-mail: zlnszhang@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of slfn5 on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of ovarian cancer cells and its mechanisms. Methods The expression of slfn5 in resected samples from patients with ovarian cancer in Hangzhou First People's Hospital was detected by fluorescence quantitative PCR. The expression of SLFN5 protein in ovarian cancer cell lines A2780, SKOV3, OVCAR3 and HO8910 was detected by Western blot. The cell lines with high expression were selected and transfected with slfn5 silencing gene. Transwell and cell scratch assays were performed to exam the migration and invasion ability of cells in each group after silencing slfn5. The relative expression levels of SLFN5, EMT-related proteins E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, Snail, and Wnt/ β -catenin signaling pathway protein β -catenin were detected by Western blot. Results The relative expression of slfn5 in ovarian cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P<0.05$). The expression of slfn5 in SKOV3, OVCAR3 and HD8910 cells was

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.19.2022-1305

基金项目:浙江省中医药科学研究基金资助项目(2022ZA139);浙江省医药卫生科技计划项目(2021RC100)

作者单位:310006 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院药学部(徐巧萍),妇产科(林青青);西湖大学生命科学院(邓魁);浙江大学医学院附属杭州市肿瘤医院肿瘤内科(张珍)

通信作者:张珍,E-mail:zlnszhang@sina.com

significantly higher than that in IOSE80 cells ($P < 0.01$). The expression of slfn5 in ovarian cancer cell lines SKOV3 and OVCAR3 were high, which was selected for transfection. Transwell migration assay showed that the number of cells crossing the basement membrane in si-slfn5^{#1} group and si-slfn5^{#2} group was reduced after transfection of slfn5 silenced gene, compared to si-NC group ($P < 0.01$). The expression of EMT-related proteins Vimentin, Snail and N-cadherin in si-slfn5^{#1} and si-slfn5^{#2} groups was decreased, while E-cadherin increased, compared with si-NC group ($P < 0.01$). The relative expression of β -catenin in si-slfn5^{#1} and si-slfn5^{#2} groups was significantly lower than that in si-NC group ($P < 0.01$).

Conclusion The slfn5 is highly expressed in human ovarian cancer cells. Silencing slfn5 reduces the expression of EMT-related proteins and inhibits cell migration and invasion in ovarian cancer cells, which may be related to the regulation of β -catenin expression in Wnt/ β -catenin signaling pathway.

【Key words】 Ovarian cancer slfn5 Epithelial-mesenchymal transition Migration Invasion

卵巢癌是女性生殖道最常见恶性肿瘤之一,其发病率和病死率逐年升高。据统计,2015 年中国约有 52 100 例新发卵巢癌病例,病死率高达 50%^[1-2]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)指上皮到间质细胞的转化,它赋予细胞转移和入侵的能力,在促进癌症获得转移能力的过程中起重要作用。EMT 的分子机制相当复杂,转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β /母体抗生物皮肤生长因子同源蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein, SMAD)、非受体酪氨酸激酶(Janus kinase, JAK)2/信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)3、Notch、Ras-促分裂素原活化蛋白激酶(Ras-mitogen-activated protein kinase, Ras-MAPK)、NF- κ B 和 p38 等多条分子信号通路均被报道参与调控卵巢癌的 EMT 过程^[3-4]。因此,寻找阻断 EMT 的信号通路对抑制卵巢癌的侵袭、转移具有重要意义。人类 slfn (Schlafen) 基因家族有 6 个成员,其中 slfn5 基因在肺癌、大肠癌、乳腺癌、胰腺癌等多种肿瘤组织中表达升高,通过激活蛋白激酶(protein kinase, PK)B/糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK)-3 β / β -连环蛋白(β -catenin)通路、抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)14 表达来抑制细胞迁移和侵袭^[5-9]。Fischietti 等^[7]推断人类胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)患者的预后较差与 slfn5 基因高表达有关,这暗示 slfn5 基因还参与了 PDAC 的病理生理,并导致预后不良。对人肺癌细胞系 A549 的研究发现,slfn5 基因过表达导致 EMT 相关转录因子 Snail 的水平升高,伴随 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达降低, β -catenin 从膜向细胞质或细胞核易位^[8],可见 slfn5 基因是 EMT 过程中的关键调控分子。深入剖析 slfn5 基因上下游调控信号通路,探究癌细胞转移机制,可为抑制转移提供新的潜在治疗靶

点。本研究以人卵巢癌细胞系为材料,通过沉默 slfn5 基因,研究 slfn5 基因在卵巢癌 EMT 中的作用及其对肿瘤侵袭、迁移能力的影响,探讨 EMT 标记蛋白和典型转录因子在卵巢癌发生、发展中的作用及机制,以期对卵巢癌治疗提供新线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织材料 收集 2019 年 8 月至 2022 年 4 月在杭州市第一人民医院行手术治疗的 21 例卵巢癌患者的癌组织标本作为卵巢癌组。纳入标准:手术病理检查确诊为卵巢癌且为首次确诊;术前未进行放疗、靶向治疗。排除标准:合并其他恶性肿瘤;合并子宫肌瘤、子宫内膜异位症、子宫腺肌病、盆腔炎症性疾病;合并重要脏器功能障碍;合并凝血功能障碍、传染性疾病和感染性疾病。另收集同期行良性卵巢囊肿切除的 14 例患者的正常卵巢组织(距肿瘤组织边缘 > 5 cm,经病理检查确认)作为正常组。临床样本正常组年龄 38~76 (53.22 ± 10.11) 岁,卵巢癌组年龄 39~75 (52.73 ± 12.04) 岁。两组年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经杭州市第一人民医院医学伦理委员会审核批准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.1.2 细胞培养与分组 人卵巢表面上皮细胞 IOSE80 和卵巢癌细胞系 A2780、SKOV3、OVCAR3、HO8910 均购于浙江美森细胞科技有限公司。所有细胞均使用专用培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中培养,隔天换液,待培养瓶底部铺满细胞时传代,取生长状态良好的对数生长期细胞进行后续实验。

1.1.3 主要试剂 Real-time 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,Trizol 试剂、Real-time PCR 检测试剂盒购自美国 Promega 公司;DEPC 水购自北京索莱宝公司;细胞裂解液试剂盒购自美国 Thermo 公司;十二烷

基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;抗SLFN5抗体(批号:6789P)和N-钙黏蛋白(N-cadherin,批号:14215S)、E-cadherin(批号:3195P)、波形纤维蛋白(Vimentin,批号:9585P)、Snail(批号:3879S)、微管蛋白(Tubulin,批号:sc-47778)抗体均购自美国CST公司, β -catenin抗人多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的抗羊IgG、抗兔IgG购自美国CST公司。Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自上海赛默飞世尔科技有限公司;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、二甲基亚砷(DMSO)和磺酰罗丹明B购自美国Sigma公司。

1.2 两组样本组织中 slfn5 mRNA 表达的检测 将卵巢癌组织和癌旁组织经液氮速冻后剪碎研磨成粉末,采用Trizol法抽提总RNA,采用荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测mRNA扩增情况。按照逆转录试剂说明书配置逆转录体系,其中RNA模板1 μ l,逆转录试剂14 μ l,用DEPC水补齐20 μ l。反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性15 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,40个循环。每个样品设置3个平行反应孔,实验重复3次,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定slfn5 mRNA的相对表达量。slfn5引物:正向5'-CATCCGACGCATCACCGATCTG-3',反向5'-CATCCGACGCATCACCGATCTG-3';GAPDH引物:正向5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3',反向5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 细胞实验及指标测定

1.3.1 5种细胞中SLFN5蛋白表达的检测 采用Western blot法。将5组细胞分别加入细胞裂解液,冰上裂解30 min,离心收集上清液。采用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白水平。样品加入上样缓冲液,根据SDS-PAGE试剂盒方法分离样品,将条带转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,加入5%脱脂奶粉封闭1 h,洗膜后加入抗SLFN5一抗孵育过夜。再次洗膜后加入HRP二抗,孵育1 h。洗膜后加入化学发光增强剂,自显影。采用图像分析处理系统(Image J软件)对蛋白条带扫描分析,用测得的蛋白光密度值与Tubulin光密度值的比值表示5组细胞中SLFN5蛋白的相对表达量。

1.3.2 细胞分组、转染及slfn5 mRNA表达的检测 取

上述SLFN5蛋白相对表达水平高的2个细胞系用于后续实验。由上海吉凯公司设计并合成特异性沉默slfn5的RNA(si-slfn5^{#1}、si-slfn5^{#2})及阴性对照(siRNA-NC),采用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒方法依次转染,即为si-slfn5^{#1}组、si-slfn5^{#2}组和si-NC组,继续培养24 h;si-slfn5^{#1}组、si-slfn5^{#2}组引物序列见表1。取出细胞,采用qRT-PCR法检测各组细胞slfn5 mRNA的相对表达量。

表1 slfn5引物的siRNA序列

分组	引物名称	引物序列(5'-3')
si-slfn5 ^{#1}	siRNA-1	F: GUGGUAUAUACUCCAGAGATT
		R: UUUCUGGAGUAUAUACCACTT
si-slfn5 ^{#2}	siRNA-2	F: CACUCAGACUCCAACGAAUTT
		R: AUUCGUUGGAGUCUGAGUCTT

注:siRNA为沉默RNA

1.3.3 细胞迁移能力和侵袭能力的测定 取转染后的细胞作为材料。(1)细胞迁移实验:Transwell小室的下室中加入500 μ l含10% FBS的完全细胞培养基,上室接种300 μ l不含FBS的细胞悬液(细胞密度约 2×10^4 /L)。培养24 h后,甲醇固定Transwell小室的下层细胞,结晶紫染色、清水冲洗,用棉签轻轻拭去上层细胞,10倍显微镜下随机选择5个视野,观察穿过小室滤膜的细胞并计数,细胞相对数量比越大表示细胞迁移能力越强。(2)细胞侵袭实验:在Transwell小室的上室中预先均匀铺上100 μ l稀释好的基底胶,37 $^{\circ}$ C静置约2 h,待其凝结成胶后,参照细胞迁移实验进行,观察穿过小室滤膜的细胞并计数,细胞相对数量比越大表示细胞侵袭能力越强。

1.3.4 转染细胞迁移率的检测 采用细胞划痕实验。取转染后的各组细胞制备细胞悬液(约 2×10^4 /L),接种于6孔板。当细胞铺满6孔板底部时,用灭菌的移液枪枪头垂直于板底均匀划痕,无菌PBS洗去脱落细胞,于显微镜下观察划痕并拍照记录;继续培养24 h后再次取样拍照。用Image J图像处理软件并测定0 h(T_{0h})及24 h(T_{24h})划痕面积,计算细胞迁移率。细胞迁移率= $(T_{0h}-T_{24h})/T_{0h} \times 100\%$ 。

1.3.5 转染细胞中EMT相关蛋白表达的检测 采用Western blot法。取各组转染细胞加入细胞裂解液,采用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白水平。样品加入上样缓冲液,根据SDS-PAGE试剂盒方法分离样品,将条带转移到PVDF膜上,加入5%脱脂奶粉封闭1 h,洗膜后分别加入SLFN5、Vimentin、Snail、N-cadherin和E-

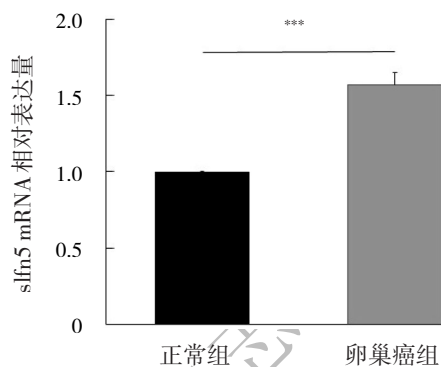
cadherin 等一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 加入二抗后室温孵育 45 min, 显影并用 Image J 软件进行灰度分析, 以 Tubulin 为内参, 计算细胞中 Vimentin、Snail、N-cadherin 和 E-cadherin 等 EMT 相关蛋白的相对表达量。

1.3.6 转染细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的检测 采用 Western blot 法。取各组转染细胞加入细胞裂解液, 参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒方法测定蛋白浓度; SDS-PAGE 分离条带并转膜, 加入 5% 牛奶室温封闭 1 h, 洗膜后加入 β -catenin 一抗, 4 ℃ 摇床孵育过夜, 加入二抗室温孵育 45 min, 显影并用 Image J 软件进行灰度分析, 以 Tubulin 为内参, 计算 β -catenin 蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组样本组织中 slfn5 mRNA 表达的比较 相比正常组, 卵巢癌组 slfn5 mRNA 相对表达量明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。



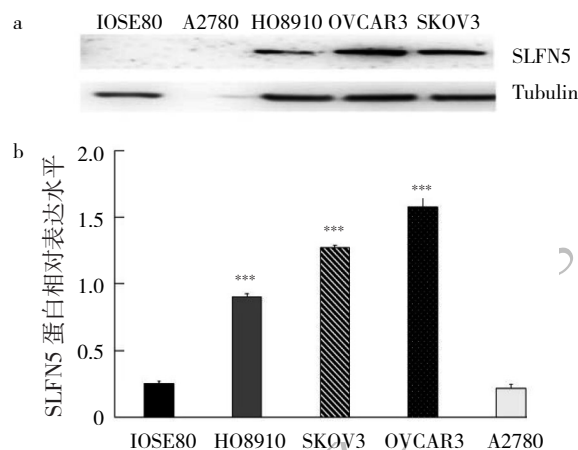
注: *** $P < 0.001$

图1 两组样本组织中 slfn5 mRNA 表达的比较

2.2 5 组细胞中 SLFN5 蛋白表达的比较 与 IOSE80 相比, HO8910、SKOV3、OVCAR3 细胞系 SLFN5 蛋白均显著高表达, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 其中 SKOV3、OVCAR3 相对表达水平更高, 见图 2。故选取 SKOV3、OVCAR3 细胞系进行后续实验。

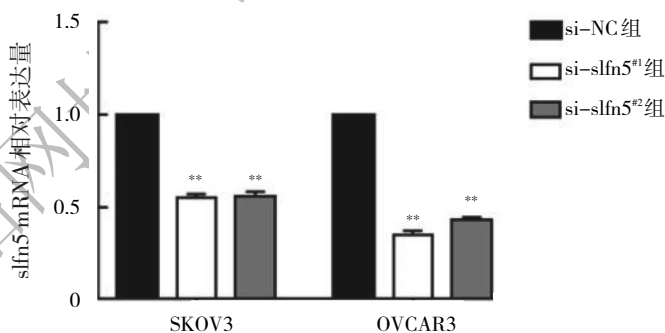
2.3 转染细胞中 slfn5 mRNA 表达的比较 与 si-NC 组相比, si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组细胞中 slfn5 mRNA 相对表达量均明显降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 提示稳定沉默 slfn5 基因的 SKOV3、OVCAR3 细胞株构

建成功, 见图 3。



注: Tubulin 为微管蛋白; 与 IOSE80 比较, *** $P < 0.001$

图2 5 种细胞中 SLFN5 蛋白表达的比较 (a: 蛋白电泳图; b: 5 组细胞 SLFN5 蛋白相对表达量)



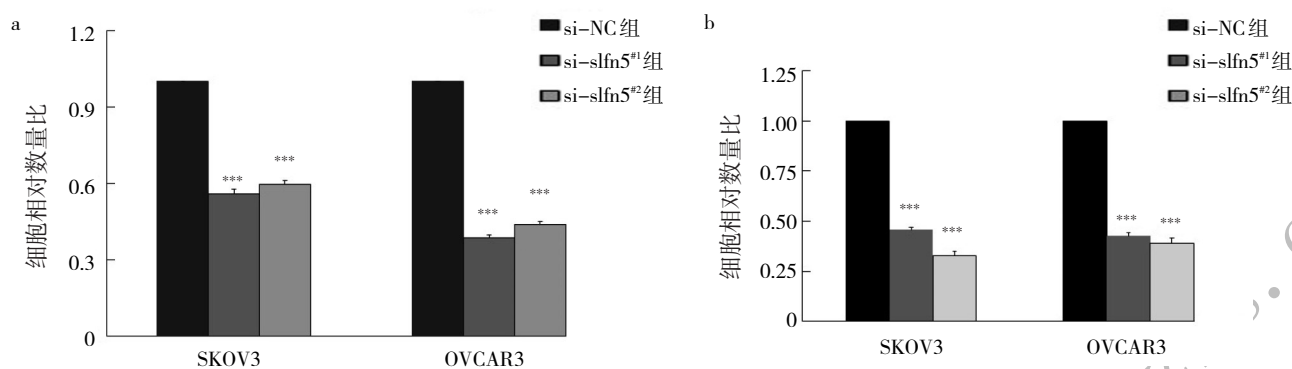
注: 与 si-NC 组比较, ** $P < 0.01$

图3 转染细胞中 slfn5 mRNA 表达的比较

2.4 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞迁移和侵袭能力的影响 Transwell 迁移实验结果显示, 相比 si-NC 组, si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组穿过基底膜的细胞相对数量均减小, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 提示沉默 slfn5 基因抑制了 SKOV3、OVCAR3 细胞的迁移。Transwell 侵袭实验结果显示, 相比 si-NC 组, si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组穿过基底膜的细胞相对数量均减小, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 提示沉默 slfn5 基因抑制了 SKOV3、OVCAR3 细胞的侵袭, 见图 4。

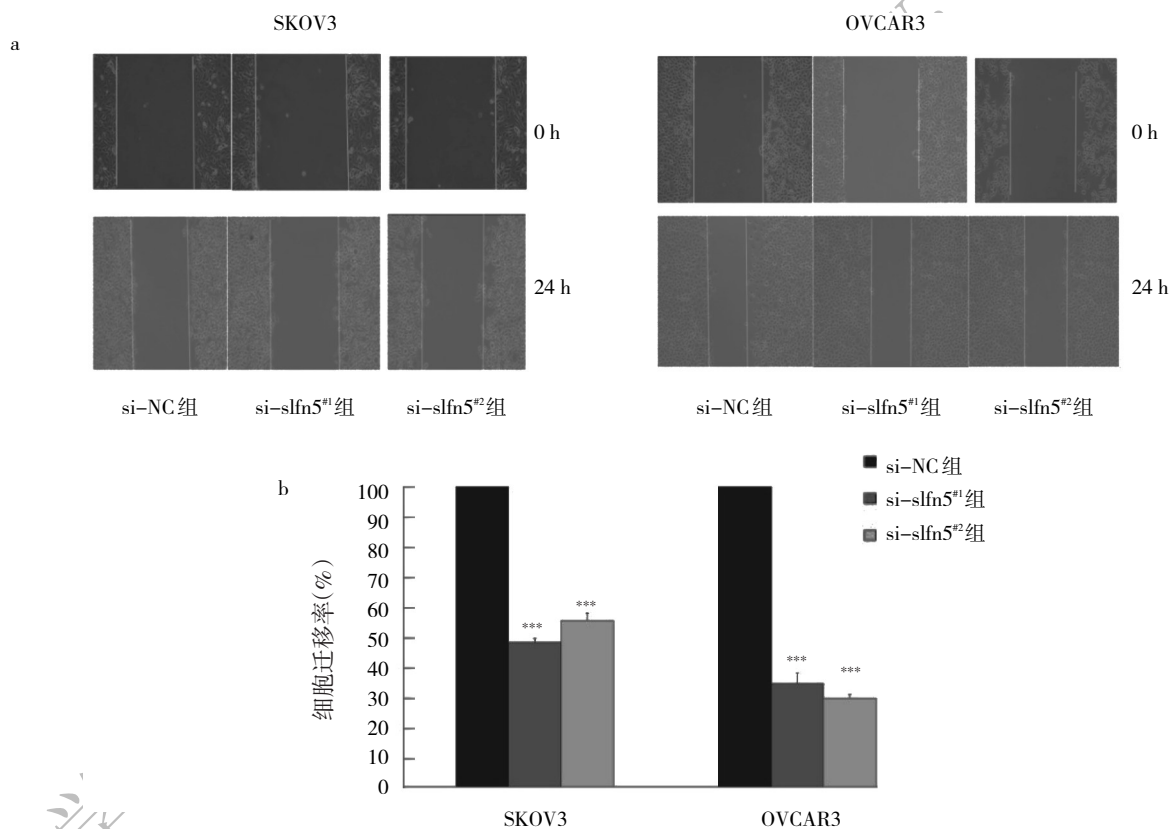
2.5 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞迁移率的影响 与 si-NC 组相比, si-slfn5^{#1} 组、si-slfn5^{#2} 组的细胞迁移率均显著低于 si-NC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 验证了沉默 slfn5 基因能够降低 SKOV3、OVCAR3 细胞的迁移能力, 见图 5。

2.6 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 Western blot 检测显示, 与 si-NC 组



注:与 si-NC 组比较,*** $P<0.001$

图 4 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞迁移和侵袭能力的影响(a:迁移实验的 3 组细胞相对数量比;b:侵袭实验的 3 组细胞相对数量比)



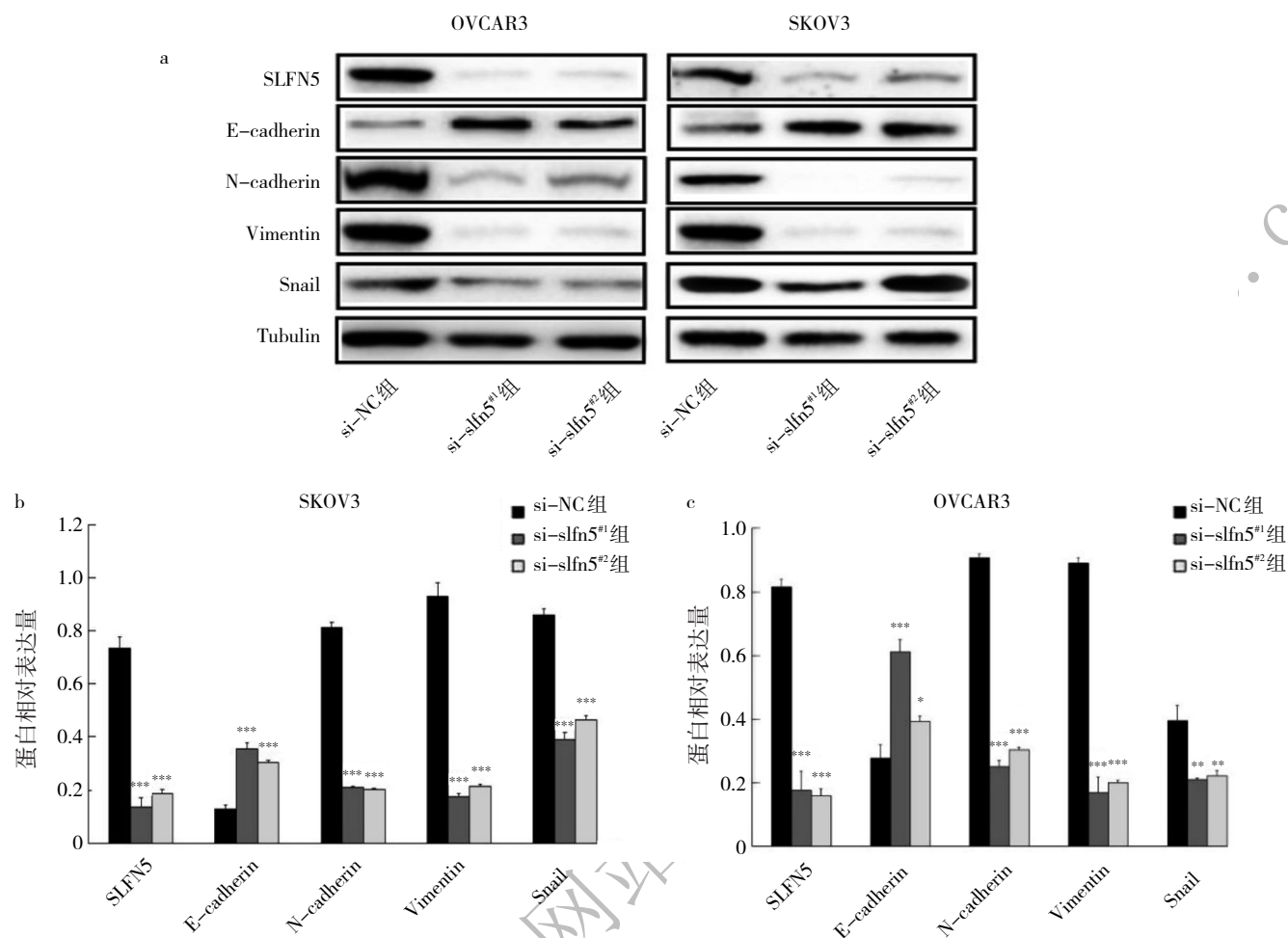
注:与 si-NC 组比较,*** $P<0.01$

图 5 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞迁移率的影响(a:SKOV3、OVCAR3 细胞迁移图;b:沉默 slfn5 基因后,SKOV3、OVCAR3 细胞的迁移率)

相比,si-slnf5^{#1}组、si-slnf5^{#2}组 Vimentin、Snail、N-cadherin 等的相对表达量显著降低,E-cadherin 相对表达量显著增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。E-cadherin 的增加和 Vimentin、Snail、N-cadherin 的减少与卵巢癌细胞迁移和侵袭能力下降直接相关,提示沉默

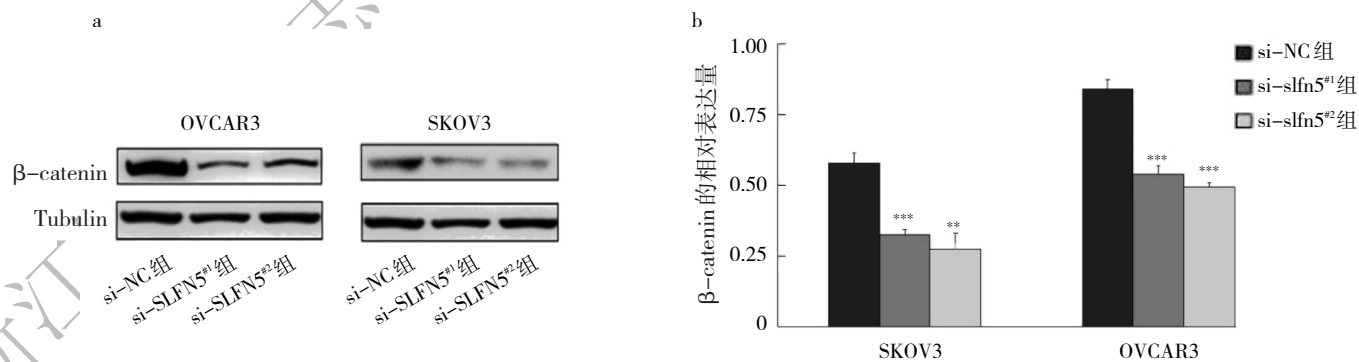
slfn5 基因能抑制卵巢癌细胞发生 EMT,见图 6。

2.7 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞 β -catenin 表达的影响 与 si-NC 组相比,si-slnf5^{#1}组、si-slnf5^{#2}组 β -catenin 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),见图 7。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信



注: E-cadherin 为 E-钙黏蛋白; N-cadherin 为 N-钙黏蛋白; Vimentin 为波形纤维蛋白; Tubulin 为微管蛋白; EMT 为上皮-间质转化与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 6 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响(a: 蛋白电泳图; b-c: 沉默 slfn5 基因的 SKOV3、OVCAR3 细胞 EMT 相关蛋白相对表达量)



注: β-catenin 为 β-链环蛋白; Tubulin 为微管蛋白; 与 si-NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 7 沉默 slfn5 基因对 SKOV3、OVCAR3 细胞 β-catenin 表达的影响(a: 蛋白电泳图; b: 沉默 slfn5 基因的 SKOV3、OVCAR3 细胞 β-catenin 蛋白相对表达量)

号通路关键调控因子,其相对表达量下降提示 Wnt/ β -catenin 信号通路活性降低。

3 讨论

人类 slfn (也有称 SLFN) 家族基因于 1998 年首次被报道,在免疫系统和恶性肿瘤中起重要作用^[1],并被确认在哺乳动物系统和器官中广泛表达^[9-10]。slfn5 基因被认为与几种恶性肿瘤的细胞侵袭和转移密切相关,如 Mavrommatis 等^[11]发现 slfn5 基因高表达可抑制恶性黑色素瘤的锚定非依赖性生长,而敲除 slfn5 基因则可以增强恶性黑色素瘤细胞侵袭三维胶原的能力。Sassano 等^[5]研究发现,slfn5 通过负调控 MMP-1 和 MMP-13 抑制肾癌细胞的迁移和侵袭。slfn5 还被认为是一种乳腺癌抑制因子,可通过直接调节乳腺癌转录因子——锌指 E 盒结合同源框 (zinc-finger E-box binding homeobox, ZEB) 蛋白 1 的表达来实现抗癌作用^[12]。但 slfn5 基因对卵巢癌发生、发展的作用还未见报道。本研究检测了 23 例患者的卵巢癌组织和癌旁组织中 slfn5 mRNA 的表达水平,结果发现相对于癌旁组织,卵巢癌组织中 slfn5 mRNA 表达量显著上调。相比卵巢表面上皮细胞,卵巢癌 HO8910、SKOV3、OVCAR3 细胞系均表现出 SLFN5 蛋白的高表达,证实了卵巢癌细胞和癌组织中存在 slfn5 基因表达上调。

肿瘤迁移和侵袭是两个密切相关的病理过程,与肿瘤转移息息相关。卵巢癌转移是影响卵巢癌治疗、预后以及复发的重要因素,因此,对卵巢癌细胞迁移和侵袭的机制研究是卵巢癌研究的重中之重。slfn5 基因被证实在控制肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 细胞的运动性和侵袭性方面发挥关键作用^[11]。slfn5 基因表达促进脑胶质瘤细胞的运动性和侵袭性^[13]。本研究表明,沉默 slfn5 基因可以显著抑制卵巢癌的迁移和侵袭能力。对转染沉默 slfn5 基因的卵巢癌细胞的划痕实验、Transwell 实验结果证实下调 slfn5 基因抑制了卵巢癌细胞的迁移能力和侵袭能力。沉默 slfn5 基因后,SKOV3、OVCAR3 细胞的迁移、侵袭能力被有效抑制,细胞迁移率显著低于对照组,提示 slfn5 基因可能通过促进人卵巢癌细胞系的 EMT 实现细胞迁移和侵袭。

EMT 最早是在胚胎发育中发现的一个现象,成体的表皮细胞受到损伤后,也会出现相应的 EMT。肿瘤细胞在发生、发展中,常常通过 EMT 丢失部分上皮细胞的特性来获得一些间质细胞的特性,从而获得更强的侵袭能力^[14]。EMT 的主要特征包括 E-cadherin 等上

皮标志物表达下降甚至缺失,而间质标志物如 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的增加^[15]。本研究中,沉默 slfn5 基因后,卵巢细胞系 E-cadherin 蛋白水平上调, Vimentin、Snail 和 N-cadherin 下调,提示 slfn5 基因在卵巢癌细胞 EMT 中起抑制作用。E-cadherin 下调导致肿瘤细胞间的黏附性减弱,从而促进了肿瘤细胞的脱落,后者随血液和淋巴转移^[3],被认为是上皮-间质细胞转型的重要特征。N-cadherin 是一种神经性钙粘附蛋白,是细胞间动态黏附的重要结构成分,在恶性肿瘤细胞中的表达比正常上皮表型细胞高^[16-17]。本研究发现,EMT 相关蛋白的表达水平与 slfn5 基因和 SLFN5 蛋白的表达水平有关,slfn5 基因是 EMT 过程中的关键调控因子,这为抑制卵巢癌转移提供了新的潜在治疗靶点。

β -catenin 是一种多功能蛋白,通过与细胞骨架的相互作用,协助细胞对细胞外的信号和影响作出响应,其典型作用是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路激活核内靶基因的表达^[18]。EMT 过程中, β -catenin 介导 E-cadherin 受体与细胞骨架的附着,该细胞骨架与膜上的 E-cadherin 结合,完成从膜到核的易位^[19]。 β -catenin 定位于正常上皮细胞和非侵袭性肿瘤细胞的细胞膜中,与 E-cadherin 分离后在细胞质中积累并在 EMT 期间转移至细胞核,以激活 EMT 相关基因的转录,特别是促进 Snail 和 ZEB1 等转录因子的表达^[20]。本研究构建了沉默 slfn5 基因的卵巢癌细胞系,Western blot 检测发现,相比对照组,转染组细胞中 Snail、N-cadherin、Vimentin 和 β -catenin 显著下调, E-cadherin 显著上调。Snail 是 E-cadherin 的公认抑制剂,可直接抑制 E-cadherin 的转录并诱导 EMT, Snail 还可以通过诱导 E-cadherin 阻遏物 (如 ZEB1) 的表达并上调间质标记 Vimentin,从而导致上皮细胞黏附力的丧失,诱导 EMT 并促进细胞迁移,侵袭并最终转移到远处器官^[21]。本研究中转染细胞 E-cadherin 显著高表达, Snail 及其他 EMT 蛋白表达趋势与 β -catenin 一致,与 SLFN5 表达趋势一致,提示 slfn5 可能通过 β -catenin-Snail-E-cadherin 信号转导来促进肿瘤转移,即 slfn5 基因可能通过 β -catenin 介导的 Snail/E-cadherin 信号通路在 EMT 和卵巢癌细胞转移中起作用^[6]。

作为肿瘤细胞转移的关键步骤,EMT 在肿瘤的诊断、分期和治疗中起着重要的作用。利用 EMT 过程中涉及的分子发现新的肿瘤治疗靶标以及开发新的诊断和治疗药物可能成为癌症早期诊断和治疗的新策略^[21]。本研究通过沉默 slfn5 基因调控 EMT 相关蛋白

的表达,并抑制细胞迁移和侵袭,其机制可能是抑制 β -catenin 表达,调节了 β -catenin 介导的 Snail/E-cadherin 信号通路,从而降低 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。

4 参考文献

- [1] Morand S, Devanaboyina M, Staats H, et al. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12):6532. DOI:10.3390/ijms22126532.
- [2] Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4):284–296. DOI:10.3322/caac.21456.
- [3] Bai Y, Li LD, Li J, et al. A FXD5/TGF β /SMAD positive feedback loop drives epithelial-to-mesenchymal transition and promotes tumor growth and metastasis in ovarian cancer[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1):301–314. DOI:10.3892/ijo.2019.4911.
- [4] van Jaarsveld MT, van Kuijk PF, Boersma AW, et al. miR-634 restores drug sensitivity in resistant ovarian cancer cells by targeting the Ras-MAPK pathway[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:196. DOI:10.1186/s12943-015-0464-4.
- [5] Sassano A, Mavrommatis E, Arslan AD, et al. Human Schlafen 5 (SLFN5) is a regulator of motility and invasiveness of renal cell carcinoma cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(15):2684–2698. DOI:10.1128/MCB.00019-15.
- [6] Wan G, Liu Y, Zhu J, et al. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β /catenin pathway[J]. *Cell Signal*, 2019, 59:1–12. DOI:10.1016/j.cellsig.2019.03.004.
- [7] Fischietti M, Eckerdt F, Blyth GT, et al. Schlafen 5 as a novel therapeutic target in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2021, 40(18):3273–3286. DOI:10.1038/s41388-021-01761-1.
- [8] Guo L, Liu Z, Tang X. Overexpression of SLFN5 induced the epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cell line A549 through β -catenin/Snail/E-cadherin pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 5(862):172630. DOI:10.1016/j.ejphar.2019.172630.
- [9] Schwarz DA, Katayama CD, Hedrick SM. Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development [J]. *Immunity*, 1998, 9(5):657–668. DOI:10.1016/s1074-7613(00)80663-9.
- [10] Al-Marsoumi S, Vomhof-DeKrey EE, Basson MD. Schlafens: emerging proteins in cancer cell biology[J]. *Cells*, 2021, 10(9):2238. DOI:10.3390/cells10092238.
- [11] Mavrommatis E, Arslan AD, Sassano A, et al. Expression and regulatory effects of murine Schlafen (Slfn) genes in malignant melanoma and renal cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(46):33006–33015. DOI:10.1074/jbc.M113.460741.
- [12] Wan G, Zhu J, Gu X, et al. Human Schlafen 5 regulates reversible epithelial and mesenchymal transitions in breast cancer by suppression of ZEB1 transcription[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(4):633–643. DOI:10.1038/s41416-020-0873-z.
- [13] Arslan AD, Sassano A, Saleiro D, et al. Human SLFN5 is a transcriptional co-repressor of STAT1-mediated interferon responses and promotes the malignant phenotype in glioblastoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(43):6006–6019. DOI:10.1038/onc.2017.205.
- [14] Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. *Front Med*, 2018, 12(4):361–373. DOI:10.1007/s11684-018-0656-6.
- [15] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2):69–84. DOI:10.1038/s41580-018-0080-4.
- [16] Goossens S, Vandamme N, van Vlierberghe P, et al. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: beyond EMT and MET[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(2):584–591. DOI:10.1016/j.bbcan.2017.06.006.
- [17] Wang X, Zhao S, Wang Z, et al. Platelets involved tumor cell EMT during circulation: communications and interventions[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1):82. DOI:10.1186/s12964-022-00887-3.
- [18] Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(1):25–39. DOI:10.1038/s41577-019-0218-4.
- [19] Yuan K, Xie K, Lan T, et al. TXNDC12 promotes EMT and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via activation of β -catenin[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(4):1355–1368. DOI:10.1038/s41418-019-0421-7.
- [20] Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, et al. Wnt/ β -catenin pathway: modulating anticancer immune response[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):101. DOI:10.1186/s13045-017-0471-6.
- [21] Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, et al. Ovarian cancer, the revised FIGO staging system, and the role of imaging[J]. *Am J Roentgenol*, 2016, 206(6):1351–1360. DOI:10.2214/AJR.15.15199.

(收稿日期:2022-05-06)

(责任编辑:沈亚芳)