

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.011

FPR2 介导内外源性配体 HP(2-20)/ANXA1 促进胃癌细胞侵袭和转移 *

刘 崑 侯曦露 历海清 郭世存 余森源 高 倩 严和中 刘 卫 唐 郡^Δ

(解放军第 105 医院消化内科 安徽 合肥 230031)

摘要 目的:分析 FPR2 在内外源性配体对胃癌细胞侵袭和转移影响中的作用。**方法:**采用构建成功的 XN0422/SGC7901-mock 细胞和 XN0422/SGC7901-shFPR2 低表达细胞,通过划痕实验、transwell 实验观察和比较 FPR2 的内外源性配体—HP(2-20)/ANXA1 对 XN0422/SGC7901 迁移和增殖的影响。**结果:**HP (2-20)/ANXA1 处理的 XN0422/SGC7901-mock 和 XN0422/SGC7901-shFPR2 细胞侵袭和转移能力均相较于 DMSO 处理的 XN0422/SGC7901-mock 和 XN0422/SGC7901-shFPR2 细胞明显增强 ($P<0.05$),且 XN0422/SGC7901-mock 组细胞的侵袭转移能力明显优于 XN0422/SGC7901-shFPR2 组细胞($P<0.05$)。**结论:**HP2-20 和 Ac2-26 可以促进胃癌细胞的侵袭和迁移,而这一作用与 FPR2 有关。

关键词:FPR2;配体;胃癌;侵袭转移

中图分类号:R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)06-1055-05

Endogenous and Exogenous Ligands Promote the Invasion and Metastasis of Gastric Cancer Cells by FPR2*

LIU Wei, HOU Xi-lu, LI Hai-qing, GUO Shi-cun, YU Sen-yuan, GAO Qian, YAN He-zhong, LIU Wei, TANG Jun^Δ

(Department of Gastroenterology, The 105th Hospital of People's Liberation Army, Hefei, Anhui, 230031, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the effect of FPR2 on the invasion and metastasis of gastric cancer cells under the influence of endogenous and exogenous ligands. **Methods:** XN0422/SGC7901-mock cells and XN0422/SGC7901-shFPR2 cells previously constructed were used for the experiment. By using wound-healing assay and transwell assay, the effect of endogenous and exogenous ligands of FPR2-HP (2-20)/ANXA1 on the invasion and metastasis of XN0422/SGC7901 cells were compared. **Results:** The ability of invasion and metastasis in the XN0422/SGC7901-mock and XN0422/SGC7901-shFPR2 groups that were with the HP(2-20)/ANXA1 were significantly increased than that of the XN0422/SGC7901-mock and XN0422/SGC7901-shFPR2 group that treated with DMSO ($P<0.05$). Moreover, the ability of invasion and metastasis of XN0422/SGC7901-mock group was significantly increased than that of XN0422/SGC7901-shFPR2 group($P<0.05$). **Conclusion:** FPR2 may mediate HP(2-20) and ANXA1-promoted invasion and metastasis of GC cell.

Key words: FPR2; Ligands; Gastric cancer; Invasion and metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1055-05

前言

胃癌(gastric cancer)是世界上第二大导致肿瘤相关性死亡的恶性肿瘤,也是消化道最常见的恶性肿瘤之一^[1,2]。侵袭和转移是影响胃癌快速发展以及患者预后和生存的重要因素^[3,4]。我们以往的研究显示 FPR2 可以促进体外胃癌细胞侵袭和转移,而 FPR2 的活性依靠其配体的激活。胃癌组织中存在 FPR2 的内源性配体 - 膜联蛋白 1(Annexin1, ANXA1)和外源性配体 -HP(2-20)。因此,本研究主要探讨了内外源性配体是通过作用 FPR2 从而影响胃癌细胞的侵袭和转移。

1 实验方法

1.1 细胞培养

胃癌细胞 SGC7901、XN0422(均来源于第三军医大学西南医院病理科) 培养于含 10%胎牛血清的双抗 RPMI1640 培养基,置湿度 95%,5%CO₂,37℃恒温培养箱中培养。

1.2 划痕实验

将细胞接种在 24 孔板中,每组细胞设三个副孔。10 μL 小枪头在孔板底部划“十”字,PBS 轻轻将悬浮的细胞洗掉。上室加入 200 μL 无血清培养基,下室加入 500 μL 完全培养基和激动剂(100 μM Ac2-26/HP2-20 或等量 DMSO),显微镜拍照后孵育 24 h,再次在显微镜下拍照。

1.3 Transwell 实验

将 15 μL 稀释后的基质胶均匀涂在小室底部,待胶凝固后,在上室中加入 200 μL 无血清培养基。吸取含有 4×10^4 个细胞数的重悬液加入上室中。下室中加入 500 μL 完全培养基

* 基金项目:解放军南京军区医学科技创新经费资助项目(15MS046)

作者简介:刘崑(1970-),本科,副主任医师,主要研究方向:分子生物学,电话:18909696344, E-mail: 175830255@qq.com

Δ 通讯作者:唐郡(1974-),副主任医师,副教授,主要研究方向:分子生物学,电话:18909699751, E-mail: angjun1974@163.com

(收稿日期:2017-10-18 接受日期:2017-11-26)

和激动剂(100 μ M Ac2-26/HP2-20 或等量 DMSO),放入细胞培养箱中培养 24 h。PBS 洗后,4%多聚甲醛室温固定 15 min。结晶紫室温染色 5 min,清水洗后用棉签擦拭上室。随机选取 10 个 400 倍视野,拍照、计数细胞并进行统计学分析。

1.4 统计学分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示,采用 SPSS16.0 软件分析数据,两组数据比较用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 内外源性激动剂 HP2-20 和 Ac2-26 通过 FPR2 进而促进胃

癌细胞的迁移

为了证实 FPR2 可以特异性地介导胃癌细胞的侵袭和迁移功能,我们选择 FPR2 的内源性配体 Ac2-26 和外源性配体 HP2-20 进行研究。分别用 Ac2-26 和 HP2-20 配体处理 XN042 2-mock、XN0422-shFPR2、SGC7901-mock、SGC7901-shFPR2 细胞。通过划痕实验检测胃癌细胞的迁移能力。结果显示:在两种胃癌细胞的 mock 组及 sh-FPR2 组,两种配体处理后,细胞的迁移能力均明显提高 ($P<0.05$, 如图 1 所示)。再将 mock 组与 sh-FPR2 组相比较,发现经过等量的 Ac2-26 的刺激后,mock 组迁移能力增加的幅度明显高于 sh-FPR2 组,且差异具有统计学意义。同时 HP2-20 激动剂也存在上述现象(如图 2 所示)。

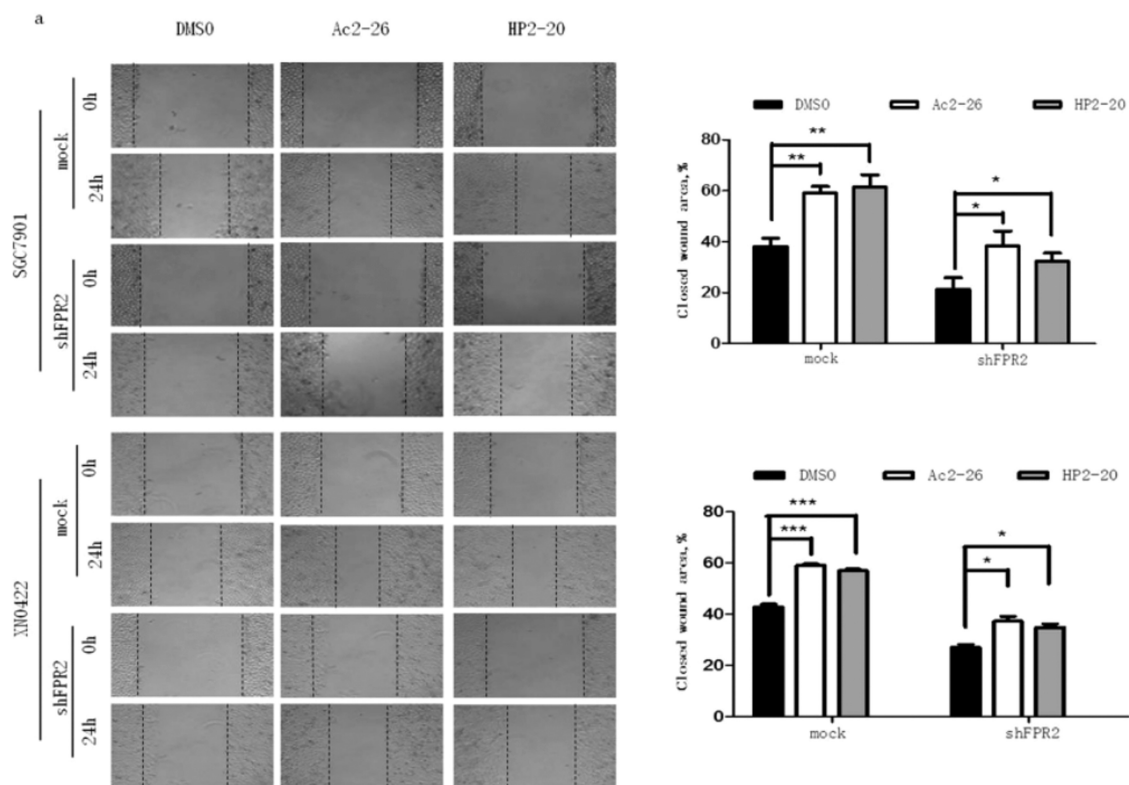


图 1 加 FPR2 激动剂的划痕实验:0h 和 24h 划痕愈合的代表性图像(左)和定量划痕愈合率统计图(右), $P<0.05$

Fig.1 Wound healing assay by using the agonist of FPR2: representative images of wound healing at 0 and 24 hours (left) and quantification of wound healing rates (right), $P<0.05$

2.2 内外源性激动剂 HP2-20 和 Ac2-26 通过 FPR2 进而促进胃癌细胞的侵袭

采用 transwell 实验检测胃癌细胞的侵袭能力,结果显示两个配体均能提高胃癌细胞的侵袭能力(如图 3 所示),且 mock 组细胞侵袭能力提高的幅度相对比 sh-FPR2 组更明显(如图 4 所示),以上结果表明 HP2-20 和 Ac2-26 可以促进胃癌细胞的侵袭和迁移能力,而 FPR2 的表达对两个配体提高胃癌侵袭和迁移能力存在一定的影响。

3 讨论

胃癌细胞的侵袭和转移一直是影响胃癌患者总体生存时间和术后复发的主要因素^[5,6]。在既往的研究中,我们筛选出 FPR2 高表达的两种胃癌细胞 SGC7901 和 XN0422,通过慢病

毒转染技术干扰 FPR2 的表达,发现 FPR2 在促进胃癌细胞侵袭和转移方面发挥着重要的作用。而 FPR2 促进胃癌细胞侵袭和转移方面的机制目前仍不明确。

众所周知,FPR2 在细胞中所发挥的作用很大程度上来源于各种各样形式配体的激活,包括与 FPR2 结构并不相关的一些脂质类激动剂和肽/蛋白质受体激动剂^[7-9]。通过不同受体激动剂可以激活 FPR2 结构中不同的受体结构域,进而产生不同的细胞内配体特异性的反应和生物学效应,如引起短暂的钙离子内流、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的磷酸化和调节细胞的趋化作用^[10,11]。

FPR2 的内源性激动剂 ANXA1 是一种糖皮质激素相关的磷脂结合蛋白,主要存在于中性粒细胞中,但其他种类的细胞也会表达这种蛋白,包括胃癌细胞^[7,12,13]。ANXA1 主要参与炎症

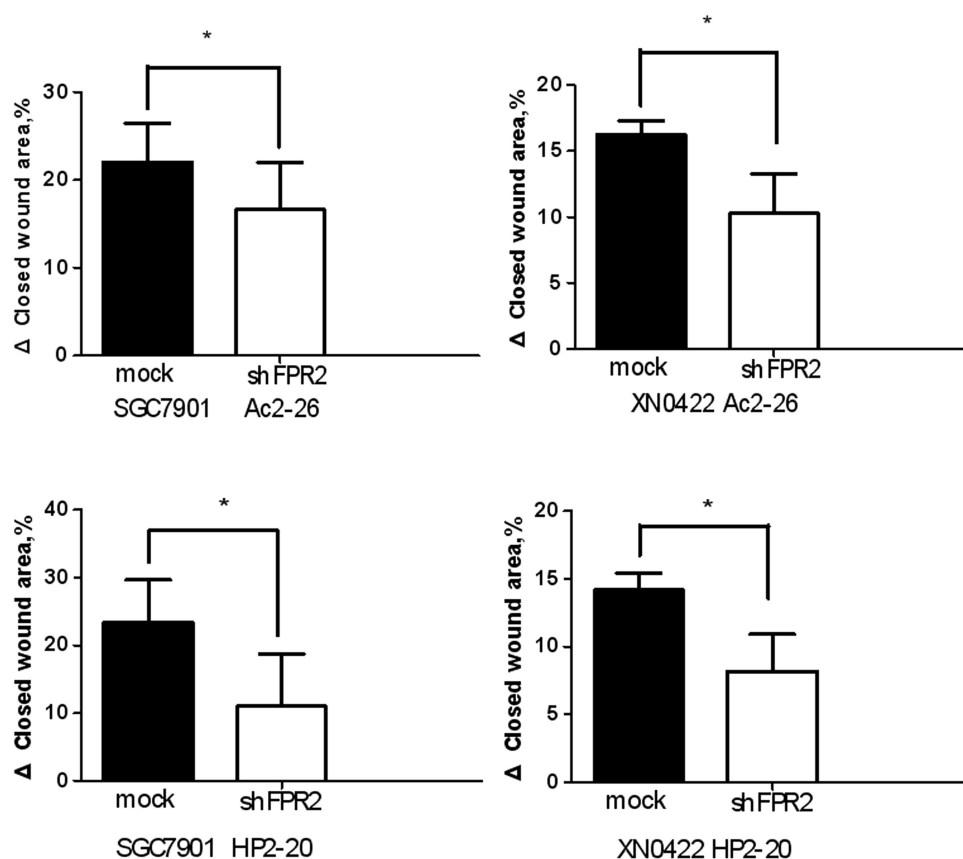


图 2 经过 Ac2-26/HP2-20 刺激后 mock 组和 shFPR2 组愈合率的增加幅度, $P < 0.05$

Fig.2 The increasing range of wound healing rates in the mock group and the shFPR2 group by the stimulation of Ac2-26/HP2-20, $P < 0.05$

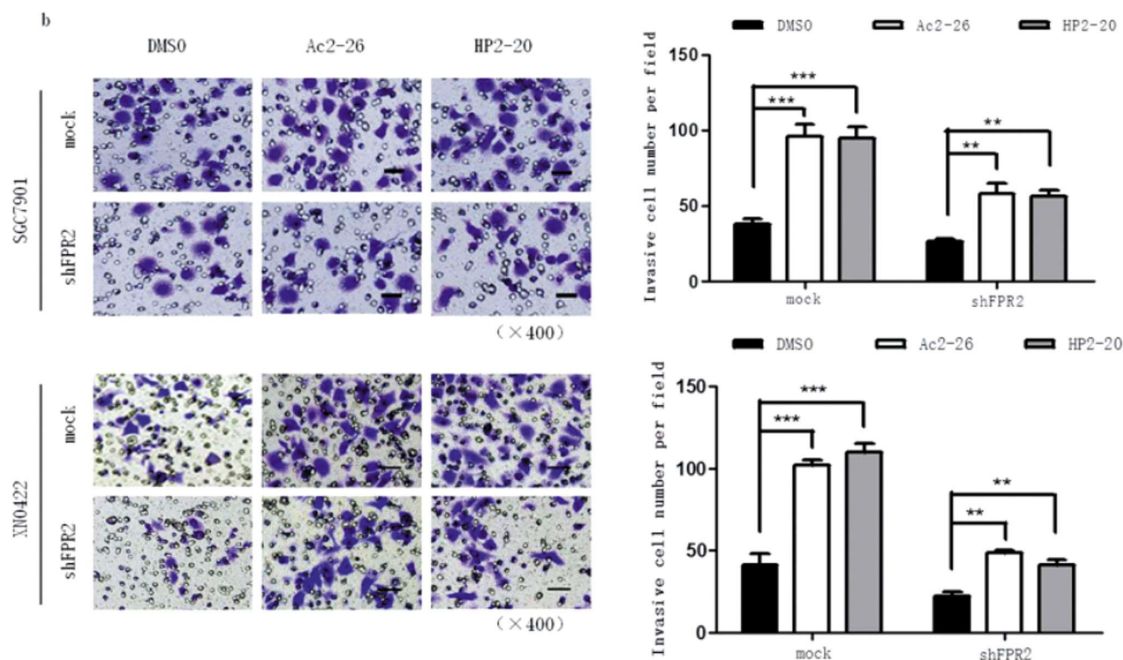


图 3 加 FPR2 激动剂的侵袭实验:24h 后侵袭细胞的代表图像(左)和侵袭细胞的定量统计图(右), $P < 0.05$

Fig.3 Invasion assay by using the agonist of FPR2: representative images of invasion at 24 hours (left) and quantification of invasive cell number (right), $P < 0.05$

反应^[14]。具有生物活性的 N-末端域在抑制白细胞黏附和趋化迁移有非常重要的作用,从而限制炎症反应的强度和持续时间以及促进上皮细胞的增殖和侵袭^[15]。其他研究表明 ANXA1 可以通过 FPR2 发挥自身的抗炎作用和激活 ERKs 磷酸化^[16]。近

年研究显示 ANXA1 可以通过激活 ERK 的磷酸化,从而刺激乳腺癌细胞系的增殖和调节 TNF- α 介导的肺成纤维细胞的增殖和炎症反应,而这些反应均依赖于 FPR2 的激活^[17,18]。

FPR2 的外源性激动剂 HP(2-20)是一种幽门螺旋杆菌来源

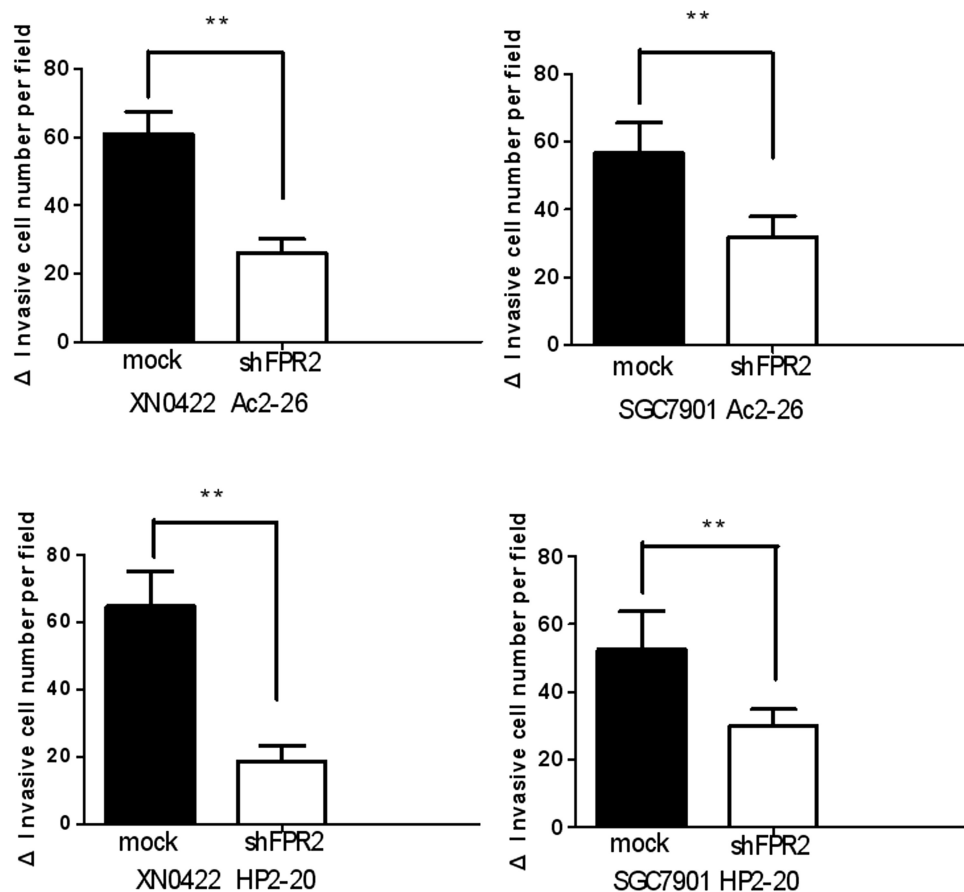


图4 经过 Ac2-26/HP2-20 刺激后 mock 组和 shFPR2 组细胞侵袭数量的增加幅度, $P < 0.05$

Fig.4 The increasing range of invasive cell number in the mock group and the shFPR2 group by the stimulation of Ac2-26/HP2-20, $P < 0.05$

的抗菌肽^[19-21]。众所周知,幽门螺旋杆菌(*H. pylori*, HP)是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公认的胃癌危险因素之一。HP 可以模仿单核细胞浸润的方式侵入胃黏膜组织并产生 HP(2-20),进而抑制 NK 细胞介导的抗肿瘤细胞毒作用和 T 细胞诱导作用,下调细胞因子,调节 NK 细胞和 T 细胞的凋亡^[7]。HP(2-20)还可以刺激 MKN-28 和 AGS 胃癌细胞的趋化、迁移和增殖,通过激活 FPR2 进而影响单核细胞的趋化和刺激烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶依赖的超氧阴离子作用^[19]。这些作用通过 FPR2 相关的下游信号通路介导,继而在 p44/p42 MAPK 活化、Akt 信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)磷酸化的情况下导致血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达和分泌^[7,22]。

当 FPR2 的配体与之结合后, FPR2 介导其下游信号转导通路的激活进而发挥功能。外源性配体 HP2-20 和内源性配体 ANXA1 可以刺激 FPR2 的信号传导。HP2-20 可以通过与 FPR2 和 FPR3 作用促进上皮细胞的迁移,增殖和血管形成从而调节胃上皮黏膜的愈合^[23]。作为胃癌的一个危险因素,HP 感染者患胃癌的风险会增加^[24]。ANXA1 可通过介导 FPRs 调节结肠癌细胞的迁移和 / 或侵袭^[25,26]。Cheng 等研究表明 FPR2 参与 ANXA1 的信号调节通路,进而影响胃癌细胞的侵袭和下游分子的表达^[27]。

本研究中,我们通过合成 HP2-20 和 ANXA1 的肽段 Ac2-26,使其刺激 FPR2 发挥其侵袭和转移的功能。我们发现

两个配体均能提高胃癌细胞的侵袭和转移能力,且 mock 组细胞的侵袭和转移能力提高的幅度更明显。研究结果表明 HP2-20 和 Ac2-26 可以促进胃癌细胞的侵袭和迁移,而这一作用与 FPR2 有关。

参考文献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [3] Ma M, Chen S, Zhu BY, et al. The clinical significance and risk factors of solitary lymph node metastasis in gastric cancer [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0114939
- [4] Liu X, Long Z, Cai H, et al. Analysis of lymph node metastasis correlation with prognosis in patients with T2 gastric cancer[J]. PLoS One, 2014, 9: e105112
- [5] Lin J, Chen Z, Huang Z, et al. Upregulation of T-cadherin suppresses cell proliferation, migration and invasion of gastric cancer in vitro[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4194-4200
- [6] Chen L, Zhang Y, Zuo Y, et al. Lumican expression in gastric cancer and its association with biological behavior and prognosis[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5235-5240
- [7] Cattaneo F, Parisi M, Ammendola R, et al. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 7193-7230
- [8] Dai H, Li LX, He H, et al. BML-111 inhibits LPS-stimulated Hela cell

- proliferation by downregulating OPN [J]. The Journal Of Practical Medicine, 2015, 31(3): 344-347
- [9] Winther M, Holdfeldt A, Sundqvist M, et al. Formyl peptide derived lipopeptides disclose differences between the receptors in mouse and men and call the pepducin concept in question[J]. PloS One, 2017, 12(9): e0185132
- [10] Rabiet MJ, Huet E, Boulay F, et al. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(8): 2486-2495
- [11] Seki T, Fukamizu A, Kiso Y, et al. Mitocryptide-2, a neutrophil-activating cryptide, is a specific endogenous agonist for formyl-peptide receptor-like 1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(1): 482-487
- [12] Chen L, Yuan Y, Kar S. PPAR γ Ligand-induced Annexin A1 Expression Determines Chemotherapy Response via Deubiquitination of Death Domain therapeutic strategy in human inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(9): 879-896
- [13] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1- binding protein 1 pathway [J]. Cancer, 2012, 118(23): 5757-5767
- [14] Perucci LO, Sugimoto MA, Gomes KB, et al. Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases [J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(9): 879-896
- [15] Mei YF, Dai SM, Jia HN, et al. Expression of annexin A1 in peripheral blood cells of Narve rheumatoid arthritis patients and its influencing factors [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2017, 97(25): 1937-1941
- [16] Kamal AM, Hayhoe RP, Paramasivam A, et al. Antiflammin-2 activates the human formyl-peptide receptor like 1 [J]. Scientific World Journal, 2006, 6: 1375-1384
- [17] Khau T, Langenbach SY, Schuliga M, et al. Annexin-1 signals mitogen- stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2 [J]. FASEB J. 2011, 25(2): 483-496
- [18] Jia Y, Morand EF, Song W, et al. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1[J]. J Cell Physiol. 2013, 228(2): 476-484
- [19] Betten A, Bylund J, Christophe T, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis[J]. J Clin Invest, 2001, 108(8): 1221-1228
- [20] Prevete N, Rossi FW, Rivellesse F, et al. *Helicobacter pylori* HP(2-20) induces eosinophil activation and accumulation in superficial gastric mucosa and stimulates VEGF-alpha and TGF-beta release by interacting with formyl-peptide receptors [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013, 26(3): 647-662
- [21] Rossi FW, Prevete N, Montuori N, et al. Hp (2-20) peptide of *Helicobacter pylori* and the innate immune receptors: specific role(s) of the formyl peptide receptors[J]. Infez Med, 2012, 20(2): 19-25
- [22] de Paulis A, Prevete N, Rossi FW, et al. *Helicobacter pylori* Hp(2-20) promotes migration and proliferation of gastric epithelial cells by interacting with formyl peptide receptors in vitro and accelerates gastric mucosal healing in vivo[J]. J Immunol, 2009, 183(6): 3761-3769
- [23] Prevete N, Liotti F, Visciano C, et al. The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis[J]. Oncogene, 2015, 34(29): 3826-3838
- [24] Abdi E, Latifi-Navid S, Yazdanbod A, et al. *Helicobacter pylori* babA2 Positivity Predicts Risk of Gastric Cancer in Ardabil, a Very High-Risk Area in Iran[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(2): 733-738
- [25] Ydy LR, do Espf rito Santo GF, de Menezes I, et al. Study of the Annexin A1 and Its Associations with Carcinoembryonic Antigen and Mismatch Repair Proteins in Colorectal Cancer [J]. J Gastrointest Cancer, 2016, 47(1): 61-68
- [26] Sato Y, Kumamoto K, Saito K, et al. Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(2): 239-243
- [27] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1- binding protein 1 pathway [J]. Cancer, 2012, 118(23): 5757-5767
- (上接第 1123 页)
- [25] Bourlière M, Rabiega P, Ganne-Carrie N, et al. Effect on HBs antigen clearance of addition of pegylated interferon alfa-2a to nucleos(t)ide analogue therapy versus nucleos (t)ide analogue therapy alone in patients with HBe antigen-negative chronic hepatitis B and sustained undetectable plasma hepatitis B virus DNA: a randomised, controlled, open-label trial[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(3): 177-188
- [26] Huang YH, Lee SD. Predictors of response to antiviral treatment for chronic hepatitis B[J]. J Chin Med Assoc, 2017, 80(6): 329-330
- [27] de Niet A, Jansen L, Stelma F, et al. Peg-interferon plus nucleotide analogue treatment versus no treatment in patients with chronic hepatitis B with a low viral load: a randomised controlled, open-label trial[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(8): 576-584
- [28] Yong YK, Tan HY, Saeidi A, et al. Decrease of CD69 levels on TCR V α 7.2+ CD4 $^{+}$ innate-like lymphocytes is associated with impaired cytotoxic functions in chronic hepatitis B virus-infected patients[J]. Innate Immun, 2017, 23(5): 459-467
- [29] Salarnia F, Besharat S, Zhand S, et al. Mutations in Hepatitis-B X-Gene Region: Chronic Hepatitis-B versus Cirrhosis[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(3): OC31-OC34
- [30] Sohn W, Cho JY, Kim JH, et al. Risk score model for the development of hepatocellular carcinoma in treatment-naïve patients receiving oral antiviral treatment for chronic hepatitis B [J]. Clin Mol Hepatol, 2017, 23(2): 170-178