

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.032

成纤维细胞生长因子 23 在胃癌中的表达及作用研究

黄秋晗¹ 姚 雷² 相娜娜¹ 郑锐锋¹ 郭淑利^{1△}

(1 湖北第三人民医院肿瘤科 湖北 武汉 430000; 2 96784 部队 河南 洛阳 471000)

摘要 目的:探讨成纤维细胞生长因子 23 (Fibroblast growth factor 23, FGF23)在胃癌中的表达,并研究其对胃癌细胞增殖和侵袭的作用。**方法:**收集 2014 年 7 月-2017 年 12 月来我院手术治疗的胃癌患者,免疫组化检测 FGF-23 和 Ki-67 的表达;采用 Transwell 小室进行胃癌细胞侵袭实验;MTT 实验检测胃癌细胞的增殖情况。**结果:**免疫组化的结果显示胃癌组 FGF-23 的平均光密度是 477.5,对照组为 46.65($t=10.53$, $P<0.0001$),相关性分析的结果显示胃癌组织中 FGF-23 与 Ki-67 增殖指数具有正相关性($r=0.6489$, $P=0.0020$);Transwell 侵袭实验的结果显示低浓度的 FGF-23 具有一定的促进胃癌细胞侵袭的作用,高浓度的 FGF-23 能够显著的促进胃癌细胞侵袭,相对于对照组和低浓度组,侵袭的细胞数目分别上升了 2.19 倍和 74.77%,结果差异明显($t=16.24$, $P<0.0001$; $t=9.811$, $P<0.0001$);MTT 实验的结果显示低浓度的 FGF-23 具有一定的促进胃癌细胞增殖的作用,高浓度的 FGF-23 能够显著的促进胃癌细胞增殖,相对于对照组和低浓度组,吸光度分别上升了 1.70 倍和 37.37%倍,结果差异明显($t=13.81$, $P<0.0001$; $t=4.227$, $P=0.0018$)。**结论:**我们的研究发现 FGF-23 在胃癌组织中高表达,其能促进胃癌细胞的增殖和侵袭,我们的研究为胃癌的诊断和精准治疗提供了一个新的靶点。

关键词:FGF-23;胃癌;侵袭;增殖

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-751-04

Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 23 in Gastric Cancer

HUANG Qiu-han¹, YAO Lei², XIANG Na-na¹, ZHENG Rui-feng¹, GUO Shu-li^{1△}

(1 Department of Oncology, Third People's Hospital of Hubei, Wuhan, Hubei, 430000, China;

2 96784 Troops, Luoyang, Henan, 471000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of Fibroblast growth factor (FGF23) in gastric cancer and to study the effect of Fibroblast on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Methods:** We collected gastric cancer patients who underwent surgical treatment in our hospital from July 2014 to December 2017. Immunohistochemistry was used to detect the expression of FGF-23 and Ki-67. Transwell was used to detect gastric cancer cell invasion and MTT assay was used to detect the proliferation of gastric cancer cells. **Results:** Immunohistochemistry showed that the average optical density of FGF-23 in gastric cancer group was 477.5, and that in control group was 46.65 ($t=10.53$, $P<0.0001$). Correlation analysis showed that there was a positive correlation between FGF-23 and Ki-67 proliferation index in gastric cancer ($r=0.6489$, $P=0.0020$). The Transwell invasion experiment showed that low concentration of FGF-23 had a certain effect on the invasion of gastric cells, and the high concentration of FGF-23 could significantly promote the invasion of gastric cancer cells. Compared with the control group and low concentration group, the number of invasive cells increased by 2.19 times and 74.77%, respectively ($t=16.24$, $P<0.0001$; $t=9.811$, $P<0.0001$); The results of the MTT experiment showed that low concentration of FGF-23 had a certain effect on promoting the proliferation of gastric cells. The high concentration of FGF-23 could significantly promote the proliferation of gastric cancer cells. Compared with the control group and the low concentration group, the absorbency increased by 1.70 times and 37.37% times respectively. The results were significantly different ($t=13.81$, $P<0.0001$; $t=4.227$, $P=0.0018$). **Conclusion:** Our study found that FGF-23 is highly expressed in gastric cancer tissue, which can promote the proliferation and invasion of gastric cancer cells. Our study provides a new target for the diagnosis and accurate treatment of gastric cancer.

Key words: FGF-23; Gastric cancer; Invasion; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-751-04

前言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,给社会和家庭造成了

重大的经济负担。由于早期症状与胃炎或者胃溃疡类似,胃癌发现时很大部分已经发展到了晚期^[1]。靶向治疗是目前常见的治疗手段,目前已经有赫赛汀和雷莫芦单抗等数种药物进入临床使用,具有较好的治疗效果^[2]。成纤维细胞生长因子 23 (Fibroblast growth factor 23, FGF23) 成纤维细胞因子家族的成员之一,在细胞增殖、代谢和分化中发挥着重要的作用^[3-5]。最新的研究发现 FGF-23 能够促进前列腺癌的进展,体外实验显示其能促进前列腺癌细胞的增殖和迁移^[6]。然而目前国内外还未见

作者简介:黄秋晗,医师,主要研究方向:肿瘤的靶向治疗,

E-mail: huangqiuhan8485@163.com

△通讯作者:郭淑利,副主任医师,主要研究方向:肿瘤的基础与临床, E-mail: 1141447427@163.com

(收稿日期:2018-05-27 接受日期:2018-06-23)

FGF-23 与胃癌的相关报道。本文拟研究 FGF-23 在胃癌的表达及作用,以便为胃癌的诊断和治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 研究对象

入组患者为 2014 年 7 月 -2017 年 12 月来我院手术治疗的胃癌患者,肿瘤组共 20 例患者,病例纳入标准:年龄范围在 18-65 岁;病理诊断为胃腺癌,且术前未经过放化疗;排除合并自身免疫疾病和糖尿病等慢性疾病患者;排除艾滋病和乙肝病毒等感染患者。对照组采用离肿瘤组织距离超过 5 cm 的周围正常胃组织。

1.2 免疫组化

石蜡切片经过酒精脱蜡后,滴加 3%的 H_2O_2 ,室温处理 5 min。PBS 清洗 3 次后,封闭液封闭 30 min,滴加 FGF-23 或者 Ki-67 的一抗(美国 Abcam 公司),4 度冰箱中过夜。PBS 清洗 3 次,之后加入生物素标记二抗(北京中杉金桥公司),37 度孵育 30 min。PBS 清洗 3 次后加入碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液(北京中杉金桥公司),37 度 15 min,PBS 清洗。显色剂(北京中杉金桥公司)显色 10 min,自来水冲洗,苏木精复染后,脱水,透明,封片,之后置于显微镜下观察拍照。

1.3 细胞侵袭实验

我们采用人胃癌细胞株 SGC-7901 进行体外实验。胃癌细胞采用含有 10%胎牛血清的 DMEM/12 培养基(美国 Gibco 公司)进行培养,待调整细胞处于对数生长期后,使用 Transwell 小室(美国 Corning 公司)进行细胞侵袭实验。在 Transwell 上室加入适量的 Matrigel,置于培养箱中静置 30 min。在 Transwell 板上室加入 100 μ L 的胃癌细胞悬液,下室加入低浓度(10 ng/mL)和高浓度(50 ng/mL)的 FGF-23。置于细胞孵箱中培养 24 小时后,抹去小室上层的细胞。4%的多聚甲醛固定,PBS 清洗 3 次后,0.1%的结晶紫染色 5 min,PBS 清洗 3 次后,置于显微镜下观察侵袭细胞的数目。

1.4 细胞增殖实验

取对数生长期的胃癌细胞,0.25%的胰酶(美国 Hyclone 公司)消化后,按照 5000 个/孔的密度传代到 96 孔板中,同时加入低浓度(10 ng/mL)和高浓度(50 ng/mL)的 FGF-23,继续培养 24 小时。每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 小时,PBS 清洗 3 次后,每孔加入 150 μ L 的 DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.5 统计学分析

体外实验每组均重复 6 次,实验数据用平均数 $\pm$ 标准误差表示,使用 SPSS22.0 进行统计分析,采用卡方检验进行组之间的比较,相关性分析采用 pearson 法, $P < 0.05$ 被认为各组之间具有统计学差异。

2 结果

2.1 胃癌组织高表达 FGF-23

免疫组化的结果显示胃癌组 FGF-23 的平均光密度是 477.5,对照组为 46.65,两组之间具有显著的统计学差异($t=10.53, P < 0.0001$)。相关性分析的结果显示胃癌组织中 FGF-23 与

Ki-67 增殖指数具有正相关性($r=0.6489, P=0.0020$)。见图 1。

2.2 FGF-23 促进胃癌细胞的侵袭

Transwell 侵袭实验的结果显示低浓度的 FGF-23 具有一定的促进胃细胞侵袭的作用,相对于对照组,侵袭的细胞数目上升了 82.32%,结果具有统计学意义($t=5.548, P=0.0002$);高浓度的 FGF-23 能够显著的促进胃癌细胞侵袭,相对于对照组和低浓度组,侵袭的细胞数目分别上升了 2.19 倍和 74.77%,结果差异明显($t=16.24, P < 0.0001; t=9.811, P < 0.0001$)。见图 2。

2.3 FGF-23 促进胃癌细胞的增殖

MTT 实验的结果显示低浓度的 FGF-23 具有一定的促进胃细胞增殖的作用,相对于对照组,吸光度上升了 96.52%,结果具有统计学意义($t=5.670, P=0.0002$);高浓度的 FGF-23 能够显著的促进胃癌细胞增殖,相对于对照组和低浓度组,吸光度分别上升了 1.70 倍和 37.37%倍,结果差异明显($t=13.81, P < 0.0001; t=4.227, P=0.0018$)。见图 3。

3 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,腺癌是最常见的病理类型。近几年,生活习惯的改变、幽门螺旋杆菌感染和压力增大使得胃癌的发病年龄趋于年轻化^[7]。靶向治疗是目前肿瘤治疗的重要研究方向,主要是针对肿瘤细胞中过表达的某些基因或者蛋白,选择性的阻断肿瘤生物学相关的信号通路,达到高度特异性抑制肿瘤生长和转移的治疗目的。相对于传统的放化疗,具有目的性强和副作用小等优点。现在靶向药物相关的主要信号通路包括人类表皮生长因子受体(HER)、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶 - 蛋白激酶 / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/mTOR)信号通路和 NF- κ B 信号通路等。目前已经有相关的靶向药物已经进入临床应用,包括贝伐珠单抗和依维莫司等,具有较好的治疗效果^[8]。此外,c-Met 抑制剂和细胞周期抑制剂等也被认为是潜在的靶向治疗药物^[9]。然而由于缺乏适当的生物学标志物,很多分子靶向药物应用人群的范围均十分的狭窄,因此研究精准化和个体化的靶向药物对于胃癌患者具有十分重大的意义^[10]。

FGF 与恶性肿瘤的生物学行为紧密相关,大量的研究发现采用药物阻断 FGF 的表达能够抑制肿瘤的营养供给,促进其凋亡,阻断其生长和转移,因此其被认为可能是肿瘤治疗的十分有效的靶点^[11-14]。FGF-23 在前列腺和结直肠癌中均高表达,FGF-23 高表达的结直肠癌更容易发生钙磷代谢紊乱^[15]。FGF-23 能够通过 MAPK/ERK 信号通路作用于甲状旁腺和肾脏等,调控钙磷等矿物质、维生素 D 与甲状旁腺素的相互作用,间接的调控机体的骨代谢。我们的研究发现 FGF-23 在胃腺癌组织中高表达,细胞的实验显示其能促进胃癌细胞的增殖和侵袭,这说明 FGF23 在胃癌的发生和发展中发挥着重要的作用,因此其可能做为一个有效的靶点,应用于胃癌的诊断和靶向治疗。

FGF-23 是一种调节磷和活性维生素 D 代谢的一种骨源性激素,FGF-23 高表达的肿瘤患者发生钙磷代谢紊乱的比例更高,更容易加剧病情的恶化^[15]。FGF-23 及其共受体 Klotho 还被做为重要的抗衰老蛋白,最新的研究发现 α -Klotho 保护器官的方式均来自于 FGF23 信号的辅助^[16-18]。目前 FGF-23 与肿瘤

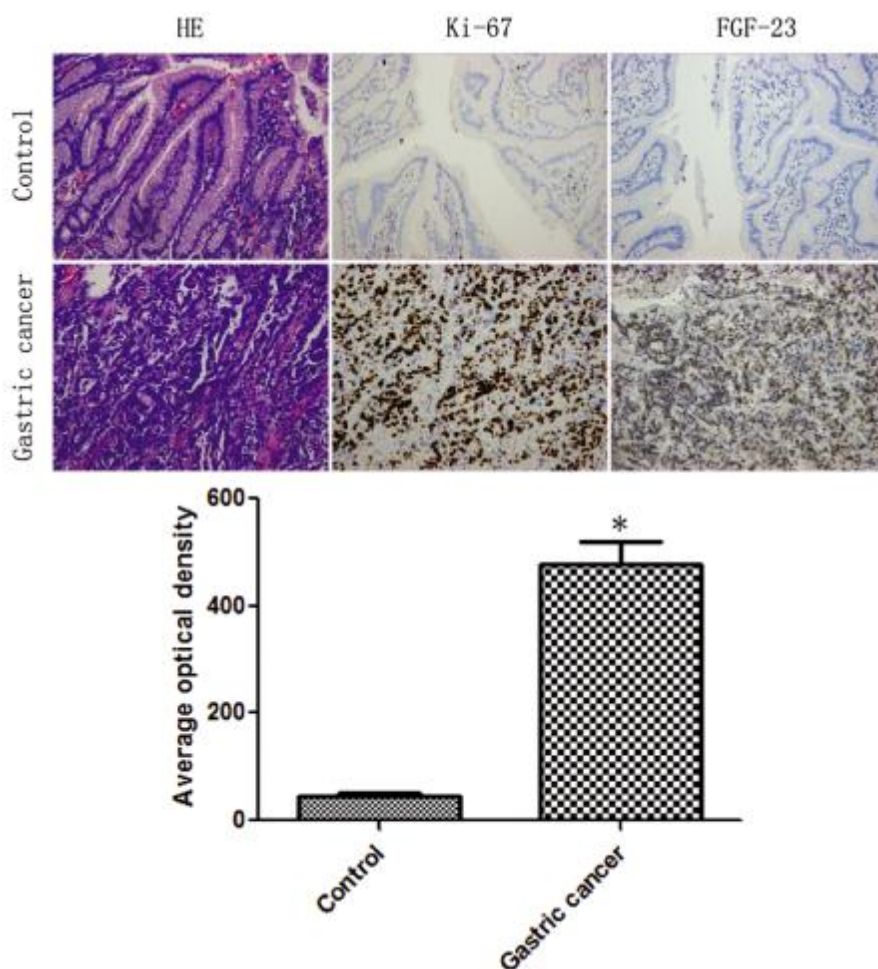


图 1 胃癌组织高表达 FGF-23

Fig.1 High expression of FGF-23 in gastric cancer. * $P < 0.05$, vs. control

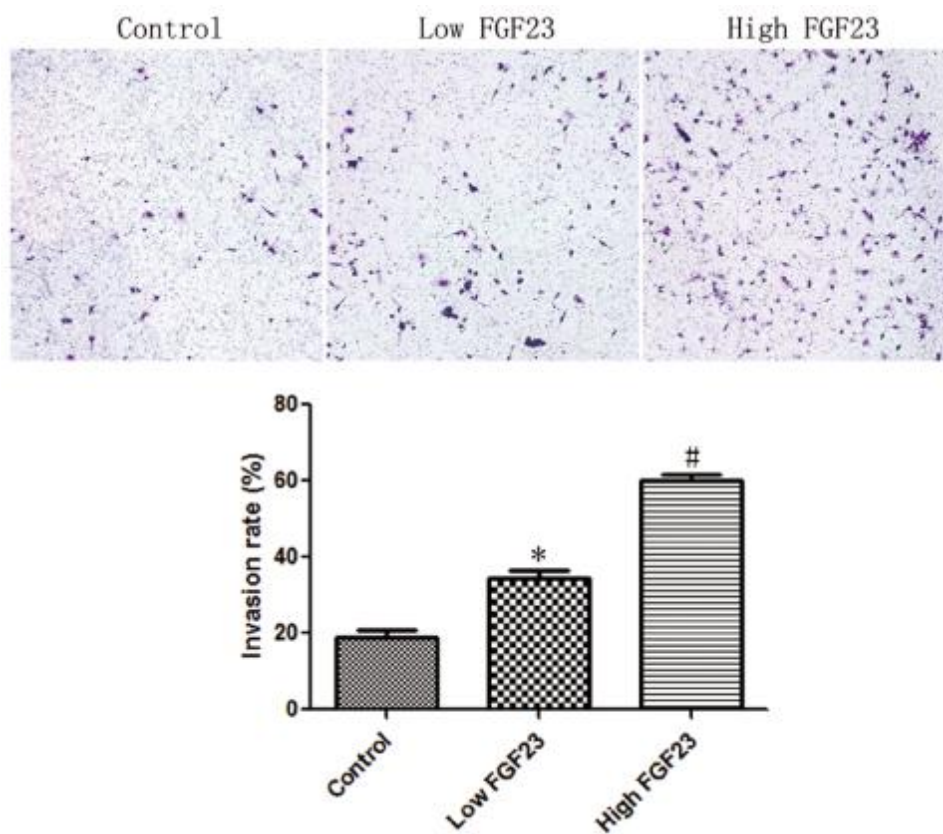


图 2 FGF-23 促进胃癌细胞的侵袭

Fig.2 FGF-23 promoted the invasion of gastric cancer cells. * $P < 0.05$, vs. control; # $P < 0.05$, vs. control

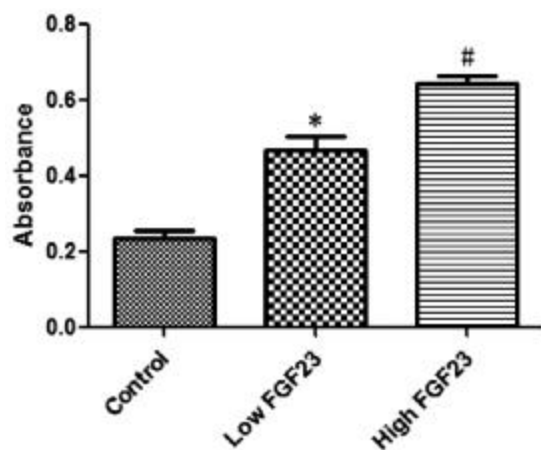


图3 FGF-23 促进胃癌细胞的增殖

Fig.3 FGF-23 promoted the proliferation of gastric cancer cells

*P<0.05, vs. control; #P<0.05, vs. control.

相关性的研究主要集中在前列腺癌, 研究发现 FGF23 基因表达与前列腺癌的发生紧密相关, FGF23 预示着前列腺癌的预后更差, 然而也有研究认为血浆中 FGF-23 的浓度与前列腺癌不具有很强的相关性^[19,22]。我们的研究发现胃癌组织中 FGF-23 高表达, 且与 Ki-67 增殖指数呈正相关, 这说明 FGF-23 与胃癌的发展具有一定的相关性, 体外实验进一步证实了我们的结论。然而由于样本量较小, 没有进一步明确 FGF-23 与胃癌分化和转移的相关性。

总之, 我们的研究发现 FGF-23 在胃癌组织中高表达, 其能促进胃癌细胞的增殖和侵袭, 我们的研究为胃癌的诊断和精准治疗提供了一个新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Petroianu A. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer [J]. *Cancer*, 2015, 72(1): 37-41
- [2] Van C E, De H S, Kang Y K, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, 30(17): 2119-2127
- [3] David V, Martin A, Isakova T, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production[J]. *Kidney International*, 2016, 89(1): 135-146
- [4] Singh S, Grabner A, Yanucil C, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease[J]. *Kidney International*, 2016, 90(5): 985-996
- [5] Qin Z, Xi L, Song M, et al. Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 261: 1-11
- [6] Feng S, Wang J, Zhang Y, et al. FGF23 promotes prostate cancer progression [J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2015, 6 (19): 17291-17301
- [7] Zhang J Z, Liu C M, Peng H P, et al. Association of genetic variations in IL-6/IL-6R pathway genes with gastric cancer risk in a Chinese population[J]. *Gene*, 2017, 623: 1-4
- [8] Zhang H, Deng T, Liu R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15016
- [9] Al-U'Datt D G, Al-Husein B A, Qasaimeh G R. A mini-review of c-Met as a potential therapeutic target in melanoma[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88: 194-202
- [10] Hughes P E, Caenepeel S, Wu L C. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer[J]. *Trends in Immunology*, 2016, 37(7): 462-476
- [11] Katoh M, Nakagama H. FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2014, 34(2): 280-300
- [12] Sawey E T, Chanrion M, Cai C, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 347-358
- [13] Knights V, Cook S J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, 125 (1): 105-117
- [14] Khurana A, Liu P, Mellone P, et al. HSulf-1 Modulates FGF-2 and Hypoxia Mediated Migration and Invasion of Breast Cancer Cells[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(6): 2152-2161
- [15] Leaf D E, Pereira R C, Bazari H, et al. Oncogenic osteomalacia due to FGF23-expressing colon adenocarcinoma [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98(3): 887-891
- [16] Yamada S, Giachelli C M. Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho[J]. *Bone*, 2017, 100: 87-93
- [17] Kuro-O M, Moe O W. FGF23- α Klotho as a paradigm for a kidney-bone network[J]. *Bone*, 2016, 100: 4-18
- [18] Schlitt A, Sester U, Sester M, et al. Letter to the Editor regarding Dounousi E et al. Intact FGF23 and α -Klotho during acute inflammation/sepsis in CKD patients[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2017, 47(6): 468-469
- [19] Kim H J, Kim K H, Lee J, et al. Single nucleotide polymorphisms in fibroblast growth factor 23 gene, FGF23, are associated with prostate cancer risk[J]. *Bju International*, 2013, 114(2): 303-310
- [20] Lee E K, Martinez M C, Blakely K, et al. FGF23: mediator of poor prognosis in a sizeable subgroup of patients with castration-resistant prostate cancer presenting with severe hypophosphatemia?[J]. *Medical Hypotheses*, 2014, 83(4): 482-487
- [21] Vlot M C, Bijnsdorp I, Den M H, et al. Plasma FGF23 is not elevated in prostate cancer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2017, 478: 129-131
- [22] Lee E K, Martinez M C, Blakely K, et al. FGF23, prostate cancer[J]. *Medical Hypotheses*, 2014, 83(4): 482-487