

# 血管抑制素-2通过调控上皮细胞间质化促进宫颈癌细胞的增殖和转移

王君, 俞彩仙, 江晓霞, 伍小柳, 贾岳, 张红平, 李政

昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院)妇科, 云南 昆明 650118

**摘要:**目的 探讨血管抑制素-2(VASH2)能否促进宫颈癌细胞在体外的增殖和转移及其可能的分子机制。方法 在外源性过表达和干扰内源性 flotillin-1 表达的宫颈癌细胞中,通过公共数据库结合 RNA-seq 挖掘分析差异表达基因;在宫颈正常上皮细胞(HcerEpic 细胞)和宫颈癌细胞(HeLa、C-33A、Ca ski、SiHa 和 MS751)以及不同淋巴结转移状态的新鲜宫颈组织中检测 VASH2 的表达;运用慢病毒稳定表达载体构建外源性过表达 VASH2 和干扰内源性 VASH2 表达的宫颈癌细胞及对照细胞,并检测其增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成的情况;在上述细胞模型中检测上皮细胞间质化(EMT)过程关键分子及 TGF- $\beta$  的表达水平。结果 RNA-seq 发现在外源性过表达 flotillin-1 的宫颈癌细胞中 VASH2 的表达上调( $P<0.05$ ),而在抑制内源性 flotillin-1 表达的细胞中 VASH2 表达下调( $P<0.05$ ),并在公共数据库中证实 VASH2 在有淋巴结转移的宫颈癌组织中相对于无淋巴结转移的癌组织呈高表达( $P<0.01$ )。相对于 HcerEpic 细胞和淋巴结未转移的宫颈癌组织, VASH2 在 Ca Ski、SiHa、MS751 细胞和有淋巴结转移的宫颈癌组织中表达上调( $P<0.05$ );相对于对照细胞,外源性过表达 VASH2 的宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成能力增强,而抑制内源性 VASH2 表达的宫颈癌细胞上述能力则受到抑制( $P<0.05$ );相对于对照细胞,外源性过表达 VASH2 的宫颈癌细胞中 EMT 过程的关键分子 E-cadherin 下调, N-cadherin、Vimentin 和 VEGF-C 上调,而抑制内源性 VASH2 表达的宫颈癌细胞中 E-cadherin 上调, N-cadherin、Vimentin 和 VEGF-C 下调( $P<0.05$ );外源性过表达 VASH2 的宫颈癌细胞中 TGF- $\beta$  的 mRNA 表达水平上调,而抑制内源性 VASH2 表达的宫颈癌细胞中 TGF- $\beta$  的 mRNA 表达水平下调( $P<0.001$ )。结论 flotillin-1 可能通过下游靶基因 VASH2 参与 TGF- $\beta$  信号通路诱导 EMT 过程在体外促进宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成。

**关键词:** 宫颈肿瘤; flotillin-1; 血管抑制素-2; 细胞增殖; 肿瘤转移; 上皮细胞间质化

## Vasohibin-2 promotes proliferation and metastasis of cervical cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition

WANG Jun, YU Caixian, JIANG Xiaoxia, WU Xiaoliu, JIA Yue, ZHANG Hongping, LI Zheng

Department of Gynecology, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Yunnan Cancer Hospital), Kunming 650118, China

**Abstract: Objective** To explore the role of vasohibin-2 (VASH2) in regulation of proliferation and metastasis of cervical cancer cells. **Methods** We analyzed the differentially expressed genes between cervical cancer cells with flotillin-1 overexpression and knockdown by RNA-seq combined with analysis of public databases. The expression levels of VASH2 were examined in normal cervical epithelial cells (HcerEpic), cervical cancer cell lines (HeLa, C-33A, Ca ski, SiHa and MS751) and fresh cervical cancer tissues with different lymph node metastasis status. We further tested the effects of lentivirus-mediated overexpression and interference of VASH2 on proliferation, migration, invasion and lymphatic vessel formation of the cervical cancer cells and detected the expression levels of key epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and TGF- $\beta$  mRNA. **Results** RNA-seq and analysis of public databases showed that VASH2 expression was significantly upregulated in cervical cancer cells exogenously overexpressing flotillin-1 ( $P<0.05$ ) and downregulated in cells with flotillin-1 knockdown ( $P<0.05$ ), and was significantly higher in cervical cancer tissues with lymph node metastasis than in those without lymph node metastasis ( $P<0.01$ ). In cervical cancer cell lines Ca Ski, SiHa, and MS751 and cervical cancer tissue specimens with lymph node metastasis, VASH2 expression was also significantly upregulated as compared with HcerEpic cells and cervical cancer tissues without lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). Exogenous overexpression of VASH2 significantly promoted proliferation, migration, invasion and lymphatic vessel formation of cervical cancer cells, whereas these abilities were significantly inhibited in cells with VASH2 knockdown ( $P<0.05$ ). The cervical cancer cells overexpressing VASH2 showed significant down-regulation of e-cadherin and up-regulation of N-cadherin, Vimentin and VEGF-C, while the reverse changes were detected in cells with VASH2 knockdown ( $P<0.05$ ). TGF- $\beta$  mRNA expression was significantly up-regulated in cervical cancer cells overexpressing VASH2 and down-regulated in cells with VASH2 knockdown ( $P<0.001$ ). **Conclusion** Flotillin-1 may participate in TGF- $\beta$  signaling pathway-mediated EMT through its down-stream target gene VASH2 to promote the proliferation, migration, invasion and lymphatic vessel formation of cervical cancer cells *in vitro*.

**Keywords:** cervical cancer; flotillin-1; vasohibin-2; cell proliferation; tumor metastasis; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期:2021-09-19

基金项目:国家自然科学基金(81760469);中国博士后科学基金第61批面上资助(182749);云南省科技厅科技计划项目(2019FE001(-085));昆明医科大学科技创新团队(CXTD201906);云南省教育厅科学研究基金项目教师类(2022J0215)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81760469).

作者简介:王君, 硕士, E-mail: 1658834103@qq.com

通信作者:李政, 博士, 副教授, E-mail: lengyueds@outlook.com

宫颈癌是全球女性发病率和死亡率第4位的恶性肿瘤,严重威胁女性生命和健康<sup>[1,2]</sup>。研究证实,腹膜后淋巴结转移是宫颈癌患者最重要的独立预后因素<sup>[3]</sup>,淋巴结转移的患者5年生存率明显降低,但目前缺乏淋巴结转移的有效分子治疗手段和敏感特异的分子标志物,无法为患者选择个体化的治疗方案,导致同时接受根治性手术和放疗的不良反应叠加。

本课题组前期研究发现,脂筏蛋白 flotillin-1 参与宫颈癌淋巴结转移的调控<sup>[4]</sup>,其机制可能与上皮细胞间质化(EMT)过程有关,但其下游关键的中介分子尚不明确。我们通过在体外过表达和干扰内源性 flotillin-1 表达的宫颈癌细胞株中运用 RNA-seq 分析改变 flotillin-1 表达水平后宫颈癌细胞中的差异表达基因,发现血管抑制素-2(VASH2)的表达与 flotillin-1 呈正相关。VASH2 是血管抑制素家族蛋白成员<sup>[5]</sup>,通过与血管内皮生长因子(VEGF)家族蛋白相互作用,参与新生血管形成和 EMT 途径的调控<sup>[6]</sup>。研究表明,VASH2 与多种人类肿瘤的增殖、转移和侵袭相关<sup>[7-9]</sup>。VASH2 能通过激活 TGF- $\beta$  信号通路,参与 EMT 过程的调控进而增强卵巢癌和乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力<sup>[10,11]</sup>,但其在宫颈癌中的作用和分子机制尚未见报道。

因此,本研究通过公共数据库挖掘分析差异表达基,发现 VASH2 在有淋巴结转移的宫颈癌组织中呈显著高表达,结合其与 flotillin-1 表达水平的相关性,推测其可能在作为 flotillin-1 蛋白的关键下游靶分子,在宫颈癌的淋巴结转移中发挥作用。本研究进一步检测了 VASH2 在宫颈癌细胞和组织中的表达情况,并通过体外实验检测了 VASH2 对宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成能力的影响,最后初步探索了其可能的分子机制,为证实 VASH2 可能作为宫颈癌淋巴结转移的潜在分子治疗靶点和诊断分子标志物提供了初步依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本和细胞

于2020年10~12月从昆明医科大学第三附属医院采集宫颈癌组织标本。本研究经昆明医科大学第三附属医院伦理委员会批准,所有患者在采集标本前均已签署知情同意书。采集标本前患者未接受过化疗、放疗或免疫治疗。将手术中获得的新鲜组织标本切块后分别立即在 $-80^{\circ}\text{C}$ 中冷冻,用于随后的蛋白质提取;在 $-80^{\circ}\text{C}$  RNAlater 液中冻存,用于后续提取 RNA;在福尔马林中固定,用于石蜡包埋。人宫颈正常上皮细胞(HcerEpic)(通泰生物科技有限公司);人宫颈癌细胞(C-33A、HeLa、SiHa、Ca Ski、MS751)(武汉普诺赛 Procell 生命科技有限公司);人淋巴管内皮细胞(HLEC)(北纳生物科技有限公司),由昆明医科大学附属第三医院实验室

保存培养。

### 1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇(广州金华大化学试剂有限公司);PBS 缓冲液粉末、柠檬酸盐修复液(北京中杉金桥公司);DMEM 高糖培养基(Gibco),MEM 培养基(Gibco);胎牛血清及青霉素、链霉素(Gibco);RNA-seq(广州基迪奥);VASH2RNAi 慢病毒载体(中国锐博),VASH2 过表达慢病毒载体(吉满生物);FastKing RT Kit (With gDNase)cDNA 第一链合成试剂盒(KR116, FastKing);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天);兔抗人 VASH2 抗体(Abcam),兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、VEGF-C(Abcam);二抗(山羊抗兔 IgG/HRP 标记,山羊抗鼠 IgG/HRP 标记)(Abcam);ECL 发光液(Biosharp);CCK-8 试剂盒(同仁化学公司);划痕插件(IBIDI 80466);基质胶(Corning),Transwell 试剂盒(Corning)。

### 1.3 方法

1.3.1 公共数据库挖掘 首先利用外源性过表达和抑制内源性 flotillin-1 表达的宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞的 RNA-seq 测序结果分析得到的差异基因,通过 GEO2R 工具验证这些差异基因在 GEO 数据库中的数据集 GSE26511(包含 N+ 和 N0 的宫颈癌组织样本)的差异表达情况,筛选条件: $P < 0.05$ ,  $|\log \text{fold-change(FC)}| > 1$ 。对 TCGA 数据中的宫颈癌患者数据,根据是否发生淋巴结转移进行分组,验证 RNA-seq 测序的差异基因在两组间的表达情况,筛选条件: $P < 0.05$ ,  $|\log \text{fold-change(FC)}| > 1$ 。最终得到 flotillin-1 下游可能参与调控宫颈癌淋巴结转移的基因 VASH2。

1.3.2 细胞培养 正常宫颈上皮细胞 HcerEpic 和宫颈癌细胞 SiHa、HeLa 用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS、1% 氨苄青霉素、卡那链霉素),MS751 和 C-33A 用 MEM 培养基(含 10% FBS、1% 氨苄青霉素、卡那链霉素),Ca ski 和 HLEC 细胞用 1640 培养基(含 15% FBS、1% 氨苄青霉素、卡那链霉素)在  $37^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$  的孵箱中静置培养。当细胞长满细胞培养瓶的 85%~90%,用胰酶消化传代。

1.3.3 RNA-seq 测序 将外源性过表达和抑制内源性 flotillin-1 表达的宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞进行 RNA-seq 测序。样品提取总 RNA 后,去除其中的核糖体 RNA,以最大限度地保留所有 codingRNA 和 ncRNA。得到的 RNA 随机打断成为短片段,再以片断化后的 RNA 为模板,用六碱基随机引物合成 cDNA 第一链;接着加入缓冲液、dNTPs(dUTP 代替 dTTP)、RNase H 和 DNA polymerase I 合成 cDNA 第二链,经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱经末端修复、加碱基 A,加测序接头,然后通过 UNG 酶降解第二条链。用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,进行 PCR 扩增。

最后建好的测序文库用Illumina HiSeq™ 4000进行测序。  
 1.3.4 慢病毒转染及分组 将处于对数生长期的HeLa细胞用0.25%胰酶消化并分别接种至6孔板内(5×10<sup>4</sup>/孔),当细胞贴壁后更换为含5 μg/mL VASH2过表达慢病毒载体或过表达慢病毒空载体病毒的无双抗完全培养基感染48 h,感染后细胞融合度达到85%左右,进行传代处理,传代后加入嘌呤霉素持续作用,筛选3代后收集细胞,分组为:HeLa-VASH2和HeLa-VASH2-vector。用同样的方法在Ca ski和MS751细胞中分别转染VASH2干扰慢病毒载体和干扰慢病毒空载体,其中VASH2干扰慢病毒载体分别构建3条,待细胞转染传代后收集细胞进行PCR验证,筛选其中干扰效果最佳的2条慢病毒载体,分组为:Ca ski-VASH2RNAi#1、

Ca ski-VASH2RNAi#2、Ca ski-VASH2RNAi-vector以及MS751-VASH2RNAi#1、MS751-VASH2RNAi#2、MS751-VASH2RNAi-vector。

1.3.5 RT-qPCR检测各组细胞和组织中的mRNA表达水平 Trizol试剂法分别提取各组细胞和宫颈癌组织的总RNA,取1 μg RNA逆转录成cDNA,运用RT-qPCR检测VASH2、TGF-β和GAPDH的mRNA表达水平,以GAPDH为内参。按照试剂盒说明书进行反转录和扩增实验。使用2<sup>-ΔΔCt</sup>法对目标mRNA的表达水平进行测定,ΔΔCt=(Ct,目标-Ct,内参照)干预组(-Ct,目标-Ct,内参照)对照组。引物序列(表1),研究中各细胞系干扰序列(表2)。

表1 各引物序列

Tab.1 Sequence of primers

Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
VASH2	CCCAGTTCCTTTGAAATTAGGA	TGATAGGCAAGGACTCTC
TGF-β	CGTGCTAATGGTGGAAAC	GCTCTGATGTGTTGAAGAAC
GAPDH	AAAGGGTCATCATCTCTG	GCTGTTGTCATACTCTC

表2 各干扰引物序列

Tab.2 Sequence of shRNA

shRNA	Sequence of loop	Sequence of shRNA (5'→3')
VASH2RNAi#1	CTCGAG	GCCACATGTATTTCAGATGTTT
VASH2RNAi#2	CTCGAG	GCAGGCTTTGATTCTTCTGAA
VASH2RNAi#3	CTCGAG	CAGGGACATGAGAATGAAGA

1.3.6 Western blot检测各组细胞和组织中的蛋白表达水平 收集各组细胞和宫颈癌组织标本提取细胞总蛋白质,BCA法检测蛋白质浓度,取相应量的蛋白质用10%的SDS-PAGE上样缓冲液调至蛋白浓度为1 mg/mL,并变性,采用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法将蛋白条带完全跑开,恒流(210 mA)转移分离后的蛋白质至PVDF膜上。5%的BSA 37 °C封闭2 h后,分别加入一抗4 °C孵育过夜(VASH2/E-cadherin/N-cadherin/Vimentin/VEGF-C, 1:1000 稀释)。TBST溶液洗去游离抗体,分别加入HRP标记的山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释)或HRP标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5000 稀释),37 °C孵育1 h,1×TBST洗膜10 min×3后用ECL化学发光液显色。

1.3.7 免疫组织化学(IHC)检测组织中VASH2的蛋白表达水平 石蜡包埋的宫颈癌组织切片常规脱蜡,逐层乙醇和蒸馏水水化,柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)处理后微波修复抗原,5%羊血清25 °C 1 h封闭处理,一抗4 °C孵

育过夜(15 h),二抗和二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水、封片。晾干的切片置于光镜(×200)下观察。免疫反应(IRS)评分:由2位病理学专家评分;染色强度0~3分:依次为阴性、浅黄色、浅褐色、深褐色;阳性范围0~4分:依次为0~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%。免疫反应评分=染色强度评分×阳性范围。

1.3.8 CCK-8增殖实验 将各组细胞接种至96孔板中,约3000/孔,培养0、24、48、72、96 h后,加入CCK-8试剂,每组设定3个复孔,混匀后放培养箱继续培养,2 h后酶标仪检测450 nm处各孔细胞光密度A<sub>450 nm</sub>,绘制生长曲线,计算细胞活力=(A<sub>实验</sub>-A<sub>空白</sub>)/(A<sub>对照</sub>-A<sub>空白</sub>)×100%。

1.3.9 划痕愈合实验 用0.25%胰酶消化各组细胞,以2000/孔接种至Ibidi划痕插件内,当细胞融合度达到95%时移除插件,培养基洗3次,加入500 μL/孔基础培养基后于0、12、24 h时间点各组细胞相同位置拍照,每组设定3个复孔。使用imagine J Pro软件分析0、12、24 h



各组细胞之间迁移的面积,计算细胞迁移百分率=0 h平均面积-24 h平均面积/0 h平均面积 $\times$ 100%。

1.3.10 Transwell 侵袭实验 Matrigel在4℃隔天融化,枪头、Transwell小室、24孔板提前置于4℃预冷。取50  $\mu$ L融化好的Matrigel加入到Transwell小室中,使Matrigel均匀铺在Transwell膜上,37℃干胶30 min。0.25%胰酶消化收集各组细胞,计数,将细胞浓度调整为 $1\times 10^5$ /mL,接种100  $\mu$ L细胞悬液至Transwell-matrigel小室内,3孔/组重复,培养箱内培养24 h。随后取出小室移入加有1 mL 4%多甲固定液的孔内,小心吸干上室液体,往上室小心滴加200  $\mu$ L 4%多聚甲醛固定液,室温固定30 min;吸取固定液,擦去Matrigel胶,把小室放入加有500  $\mu$ L结晶紫染色液的孔中,室温染色15 min。染色后PBS清洗3次,于显微镜下观察拍照,使用imagine J Pro软件分析各组穿越Transwell膜的细胞数目。

1.3.11 淋巴管形成实验 Matrigel在4℃隔天融化,枪头、Transwell小室、24孔板提前置于4℃预冷。4℃预冷96孔板,加入50  $\mu$ L/孔基质胶,培养箱内放置30 min使其凝固。0.25%胰酶消化收集HLEC细胞,使用各组细胞培养基分别调整悬液浓度为 $2.5\times 10^4$ /mL,往含有Matrigel的孔中加入100  $\mu$ L的细胞悬液,培养箱内培养4 h后倒置显微镜下观察管腔形成情况拍照,随机挑选显微镜摄片中3个同等大小视野对淋巴管形成数量计数并求算术和。

#### 1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件和GraphPad prism7统计软件进行数据分析,所有数据经正态性检验。数据用均数 $\pm$ 标准差表示,独立两组间比较采用非配对双尾*t*检验,组间两两比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VASH2在宫颈癌细胞中的表达与flotillin-1呈正相关

本研究在外源性过表达和抑制内源性flotillin-1表达的SiHa和HeLa细胞中进行RNA-seq测序,结果显示flotillin-1能够调控一系列下游基因的表达(图1A、B),结合flotillin-1下游调控基因在TCGA及GEO数据库中宫颈癌淋巴结转移和宫颈癌淋巴结未转移标本中的表达情况,发现基因VASH2受flotillin-1显著正调控,且在TCGA及GEO数据库中发现,相对于无淋巴结转移的宫颈癌组织,其在有淋巴结转移的宫颈癌组织中表达明显上调(图1C、D)。

### 2.2 VASH2在宫颈癌细胞和有淋巴结转移的宫颈癌组织中表达显著上调

运用RT-qPCR、Western blotting和免疫组织化学

(IHC)检测VASH2的mRNA和蛋白表达水平,结果显示:相对于正常宫颈上皮HcerEpic细胞,VASH2在宫颈癌细胞Ca ski、SiHa和MS751中的表达上调( $P<0.05$ ,图2A、C),而相对于无淋巴结转移的宫颈癌组织,VASH2在有淋巴结转移的宫颈癌组织中的表达也上调( $P<0.05$ ,图2B、D~G)。

### 2.3 VASH2在体外促进宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成

根据上述VASH2在宫颈癌细胞中的表达情况,我们通过慢病毒稳定表达载体构建了外源性过表达VASH2的HeLa细胞(HeLa-VASH2)和过表达空白载体的对照细胞(HeLa-VASH2-vector,图3A~C),以及抑制内源性VASH2表达的Ca ski、MS751细胞(Ca Ski-VASH2RNAi#1、Ca Ski-VASH2RNAi#2; MS751-VASH2RNAi#1、MS751-VASH2RNAi#2)和相应的对照细胞(Ca Ski-VASH2RNAi-vector、MS751-VASH2RNAi-vector,图4A~C)。

在上述细胞中通过CCK-8实验显示,相对于对照细胞,外源性过表达VASH2的HeLa细胞增殖能力增强( $P<0.05$ ,图3D),而抑制内源性VASH2表达的Ca Ski和MS751细胞增殖能力则明显减弱( $P<0.01$ ,图4D)。划痕愈合实验和Transwell侵袭实验显示,相对于对照细胞,外源性过表达VASH2后HeLa细胞的迁移( $P<0.01$ ,图3E、F)和侵袭能力( $P<0.001$ ,图3G、H)增强,而在抑制内源性VASH2表达后,Ca Ski和MS751细胞的迁移( $P<0.001$ ,图4E、F)和侵袭能力( $P<0.001$ ,图4G、H)减弱。淋巴管形成实验显示,相对于对照细胞,过表达VASH2后HeLa细胞形成新生淋巴管腔的数量明显增加,长度明显增长( $P<0.01$ ,图3I、J),而抑制内源性VASH2表达后,Ca Ski和MS751细胞形成新生淋巴管腔的数量明显减少,长度明显变短( $P<0.001$ ,图4I、J)。

### 2.4 VASH2可能通过调控EMT途径促进宫颈癌细胞的转移

本研究先构建了外源性过表达VASH2的HeLa细胞和其对照细胞以及抑制内源性VASH2表达的Ca ski、MS751细胞和其对照细胞( $P<0.01$ ,图5A、B),再通过Western blot检测EMT途径关键分子的蛋白表达水平(图5C),结果显示:外源性过表达VASH2后,上皮细胞的表面标记E-cadherin的表达下调( $P<0.01$ ,图5C、D),而间质细胞的表面标记N-cadherin和Vimentin的表达上调( $P<0.05$ ,图5C、E、F),同时调控新生血管形成的关键分子VEGF-C的表达也上调( $P<0.001$ ,图5C、G)。抑制内源性VASH2表达后,E-cadherin的表达明显恢复( $P<0.001$ ,图5C、D),N-cadherin、Vimentin和VEGF-C的表达下调( $P<0.05$ ,图5C、E~G)。为进一步探寻其可能的分子机制,通过RT-qPCR检测以上细胞模型中调

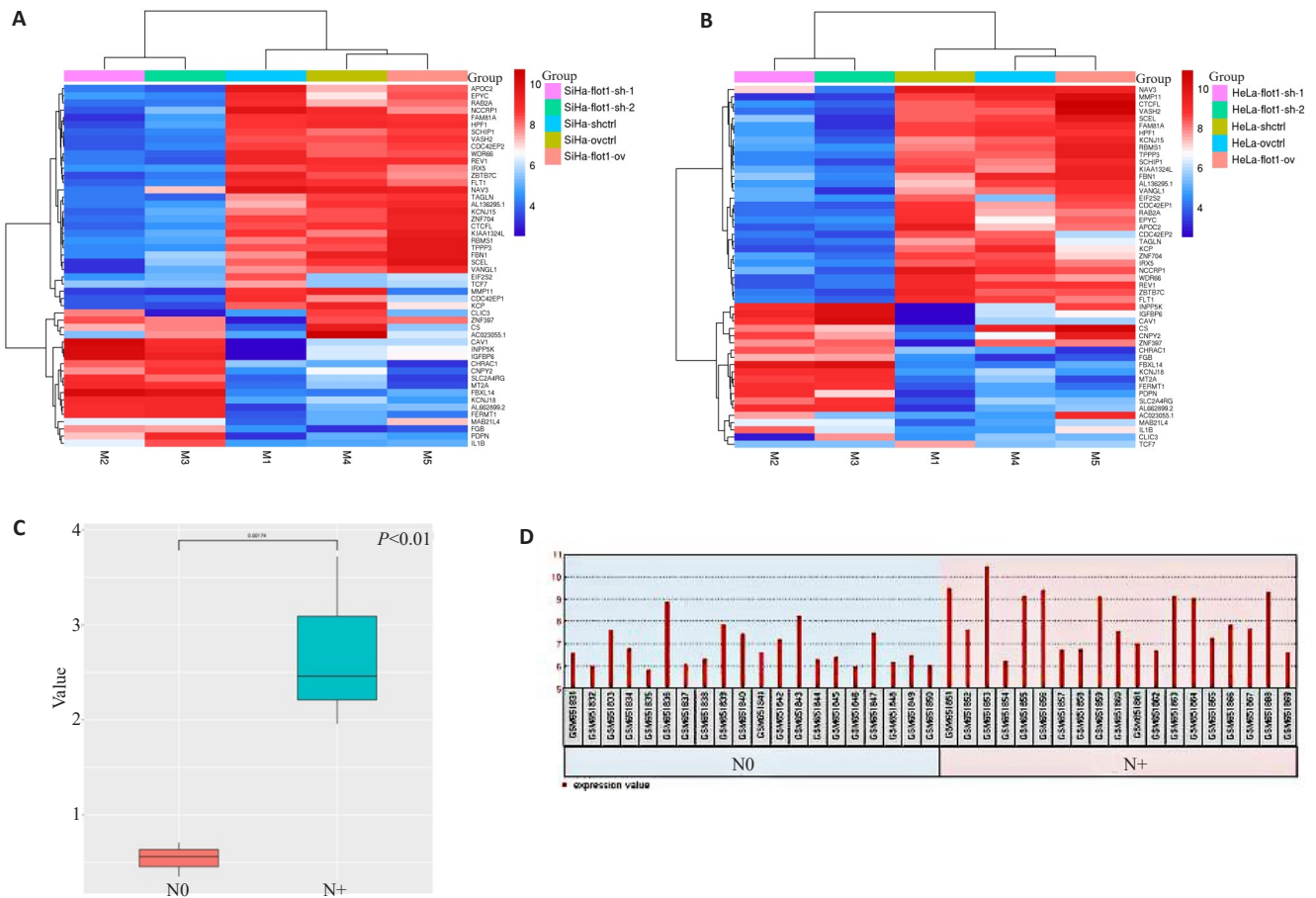


图1 Flotillin-1在宫颈癌细胞中正向调控VASH2的表达

Fig.1 Flotillin-1 positively regulates VASH2 expression in cervical cancer cells. **A:** Heatmap of RNA seq performed in SiHa cells with exogenous overexpression and inhibition of endogenous flotillin-1 expression. **B:** Heatmap of RNA seq performed in HeLa cells with flotillin-1 overexpression and knockdown. **C, D:** Expression of N+ and N0 of VASH2 in TCGA database and GEO database. M1 (shctrl): Control cells transfected with the blank vector; M2 (flot-sh-1): Cells transfected with interference sequence 1 of flotillin-1; m3 (flot-sh-2): Cells transfected with interference sequence 2 of flotillin-1; M4 (ovctrl): Control cells transfected with blank vector; M5 (flot OV): Cells transfected with flotillin-1 overexpression vector; N+: Fresh cervical cancer tissues with lymph node metastasis; N0: Fresh cervical cancer tissues without lymph node metastasis.

控转化生长因子β(TGF-β)的mRNA表达情况,发现外源性过表达VASH2后,TGF-β的表达上调( $P<0.0001$ ,图5H),而抑制内源性VASH2表达后,TGF-β的表达下调( $P<0.0001$ ,图5I)。

### 3 讨论

flotillin-1是脂筏的重要组成部分<sup>[12]</sup>,其参与多种细胞生物学功能,包括细胞粘附、肌动蛋白细胞骨架重组、内吞、吞噬和细胞信号转导等,研究发现其在肿瘤的发生发展中也发挥着重要作用<sup>[13-15]</sup>。我们前期研究发现flotillin-1与宫颈癌淋巴结转移密切相关,在进一步研究其分子机制时,通过干扰和过表达flotillin-1进行RNA-seq测序寻找其下游调控基因,发现促进新生血管形成的基因VASH2的表达与flotillin-1呈现正相关,进而推测flotillin-1可能是通过VASH2调控宫颈癌的淋巴结

转移。本研究通过细胞和组织标本检测、建立过表达和抑制内源性VASH2表达的宫颈癌细胞模型及一些列体外实验,初步证实了VASH2在可能通过调控EMT促进宫颈癌细胞在体外的增殖和转移。

新生血管形成被认为是由血管生成刺激因子和血管生成抑制因子之间的局部平衡所调节的,而肿瘤的发生和发展离不开新生血管的形成<sup>[16, 17]</sup>。研究表明,VASH2与新生血管形成和肿瘤增殖、转移密切相关<sup>[18]</sup>;VASH2还可以通过调控内皮细胞迁移促进新生血管形成进而影响浆液性卵巢癌的生长和腹腔播散<sup>[19]</sup>。本研究通过RT-qPCR、Western blot和IHC检测VASH2的在宫颈癌细胞和不同淋巴结转移状态的宫颈癌组织中的表达水平,发现VASH2在宫颈癌细胞HeLa、Ca ski和MS751中的表达水平显著高于宫颈正常上皮细胞,特别是在宫颈癌肠转移来源细胞Ca ski和淋巴结转移来

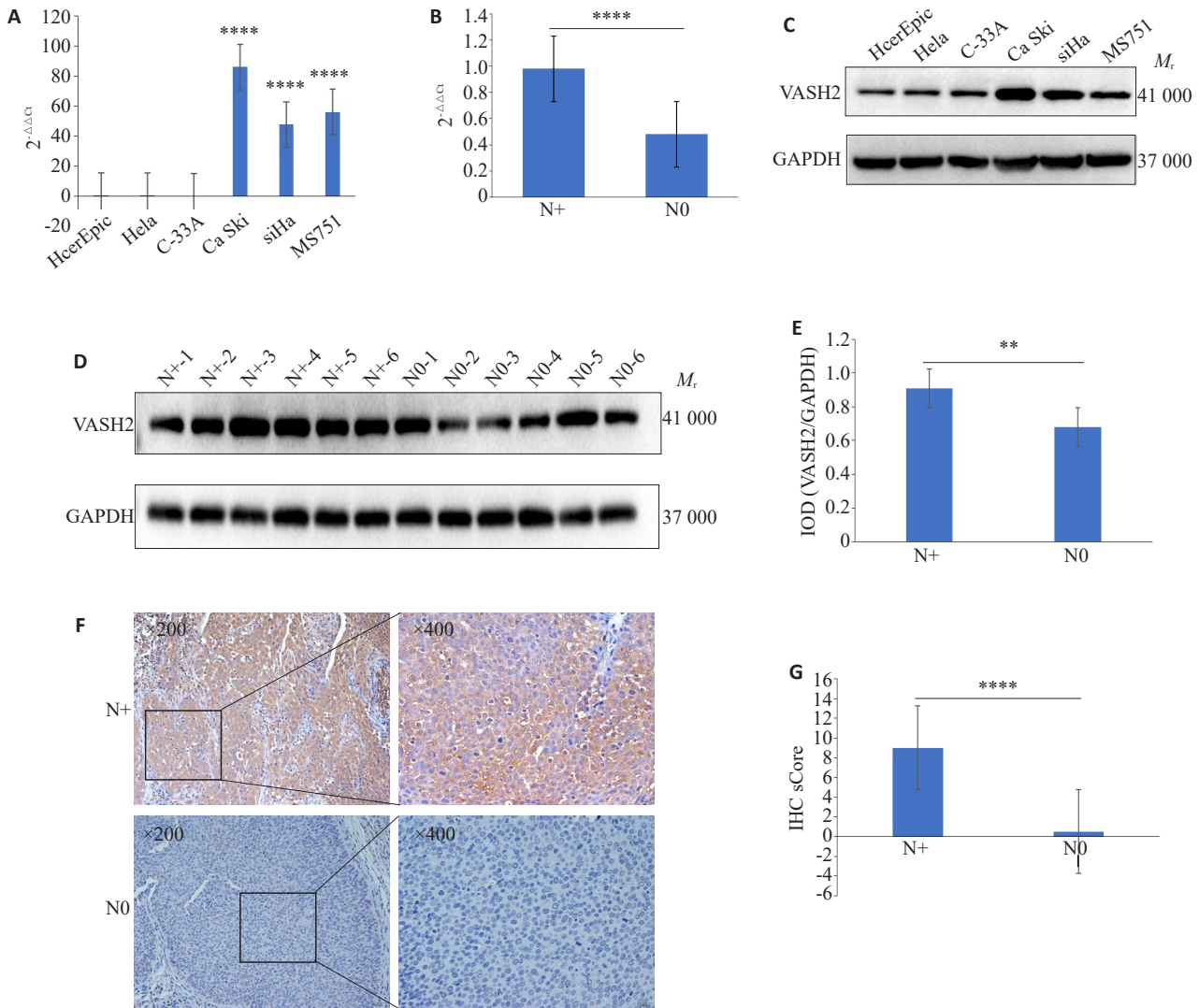


图2 VASH2在部分宫颈癌细胞及有淋巴结转移的宫颈癌组织中呈高表达

Fig.2 VASH2 is highly expressed in cervical cancer cells and cervical cancer tissues with lymph node metastasis. A: VASH2 mRNA expression levels in normal cervical epithelial cells and 5 cervical cancer cell lines detected by RT-qPCR. B: VASH2 mRNA expression in N+ and N0 cervical cancer tissues detected by RT-qPCR. C: VASH2 protein expression in normal cervical epithelial cells and 5 cervical cancer cell lines detected by Western blotting. D: VASH2 protein expression in cervical cancer tissues with different lymph node metastasis status detected by Western blotting. E: Quantitative analysis of VASH2 protein expression levels in cervical cancer tissues; F: Immunohistochemical detection of VASH2 in cervical cancer tissues with different lymph node metastasis status. G: Immunoreactivity (IHC) scoring of VASH2 in cervical cancer tissues. N+: Fresh cervical cancer tissues with lymph node metastasis; N0: Fresh cervical cancer tissues without lymph node metastasis; IOD: Average optical density. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

源细胞MS751中呈异常高表达;VASH2在有淋巴结转移的宫颈癌组织中其mRNA和蛋白表达水平均显著高于无淋巴结转移的宫颈癌组织,提示其可能与宫颈癌的淋巴结转移密切相关。本研究进而构建了外源性过表达和抑制内源性VASH2表达的宫颈癌细胞模型,通过CCK-8实验证实VASH2能在体外促进宫颈癌细胞的增殖。而研究显示VASH2具有微管羧基酶活性,参与形成细胞内微管,微管作为细胞骨架的重要部分是细胞有丝分裂过程中必不可少的<sup>[20]</sup>,这也可能是VASH2能促进宫颈癌细胞增殖的原因。我们进而通过划痕愈合、Transwell侵袭和淋巴管形成实验证实VASH2能在体

外促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和淋巴管形成。

研究证实,VASH2能对微管蛋白进行许多翻译后修饰以产生异质微管,这些修饰包括去除和连接 $\beta$ -微管蛋白的C末端酪氨酸等<sup>[21-23]</sup>;同时VASH2具有微管羧基酶活性,能通过改变细胞骨架参与EMT途径。EMT途径是多种肿瘤如乳腺癌、胃癌、肺癌转移过程中的关键步骤<sup>[24-26]</sup>。本研究发现外源性过表达VASH2后EMT途径的关键分子E-cadherin蛋白表达水平明显降低,而N-cadherin和Vimentin的蛋白表达水平则明显升高;在抑制内源性VASH2表达后,这些分子的表达水平则呈现相反的趋势。E-cadherin作为上皮细胞的表面标志物,



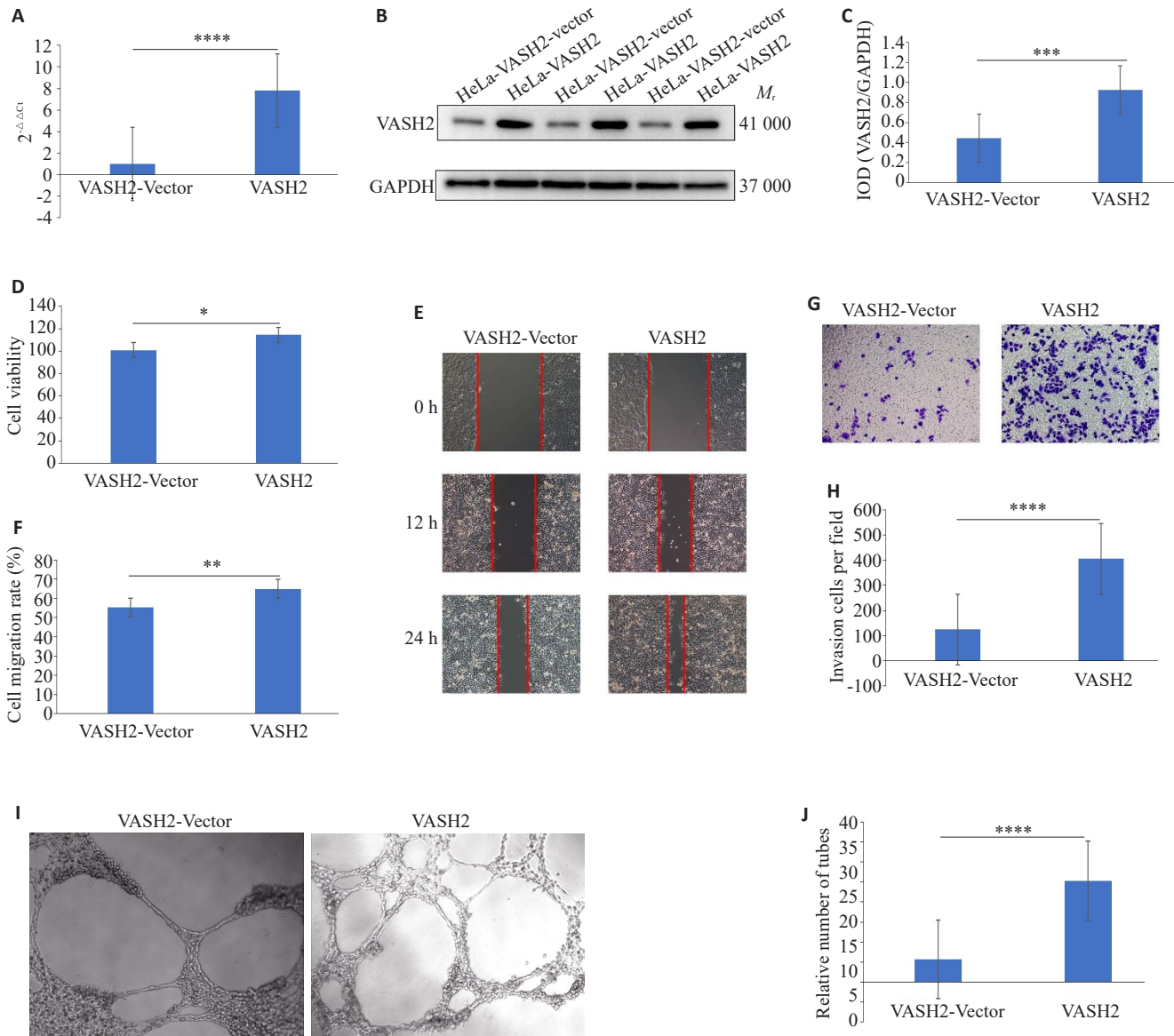


图3 过表达VASH2能促进宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成

Fig.3 Overexpression of VASH2 promotes cell proliferation, mobility, invasion and lymphatic vessel formation in cervical cancer HeLa cells. A-C: VASH2 mRNA and protein expression in cells overexpressing VASH2 and control cells detected by RT-qPCR and Western blotting and quantitative analysis Western blotting results. D: Viability of cells overexpressing VASH2 at 48 h assessed using CCK-8 assay. E, F: Migration of VASH2-overexpressing cells determined by wound-healing assay. G, H: Invasion ability of VASH2-overexpressing cells determined by Transwell invasion assay. I, J: Lymphatic vessel formation in VASH2-overexpressing cells quantified by lymph angiogenesis assay. VASH2: cells overexpressing VASH2. VASH2-vector: Control cells transfected with a blank vector. Cell migration rate: percentage of cell migration; Invasion cells per field: number of cells invaded per plate; Relative number of tubes: total length of nascent lymphatic vessels. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

通过其细胞内外粘附功能,维持细胞间连接及上皮细胞的诸多功能<sup>[27]</sup>;N-cadherin作为间质细胞的表面标志物,能促进肿瘤细胞的转移<sup>[28]</sup>;Vimentin又作为上皮细胞向间质细胞转化的表面标志物<sup>[29]</sup>,与VASH2的表达呈正相关,进一步证实了VASH2能在体外诱导宫颈癌细胞发生EMT过程。EMT途径受到多种信号转导通路的调控。有研究表明,VASH2可以通过TGF-β、Hedgehog等信号转导通路诱导EMT途径<sup>[10, 30-32]</sup>,而

后者在宫颈癌的淋巴结转移过程中发挥着重要的作用<sup>[33]</sup>。本研究发现TGF-β通路中总TGF-β的mRNA表达水平在宫颈癌细胞中受到VASH2的调控,同时VASH2也能促进VEGF家族关键分子VEGF-C的表达,提示VASH2可能通过TGF-β通路调控EMT过程从而促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移和转移。

综上所述,本研究发现flotillin-1下游靶基因VASH2在转移宫颈癌细胞和有淋巴结转移的癌组织中

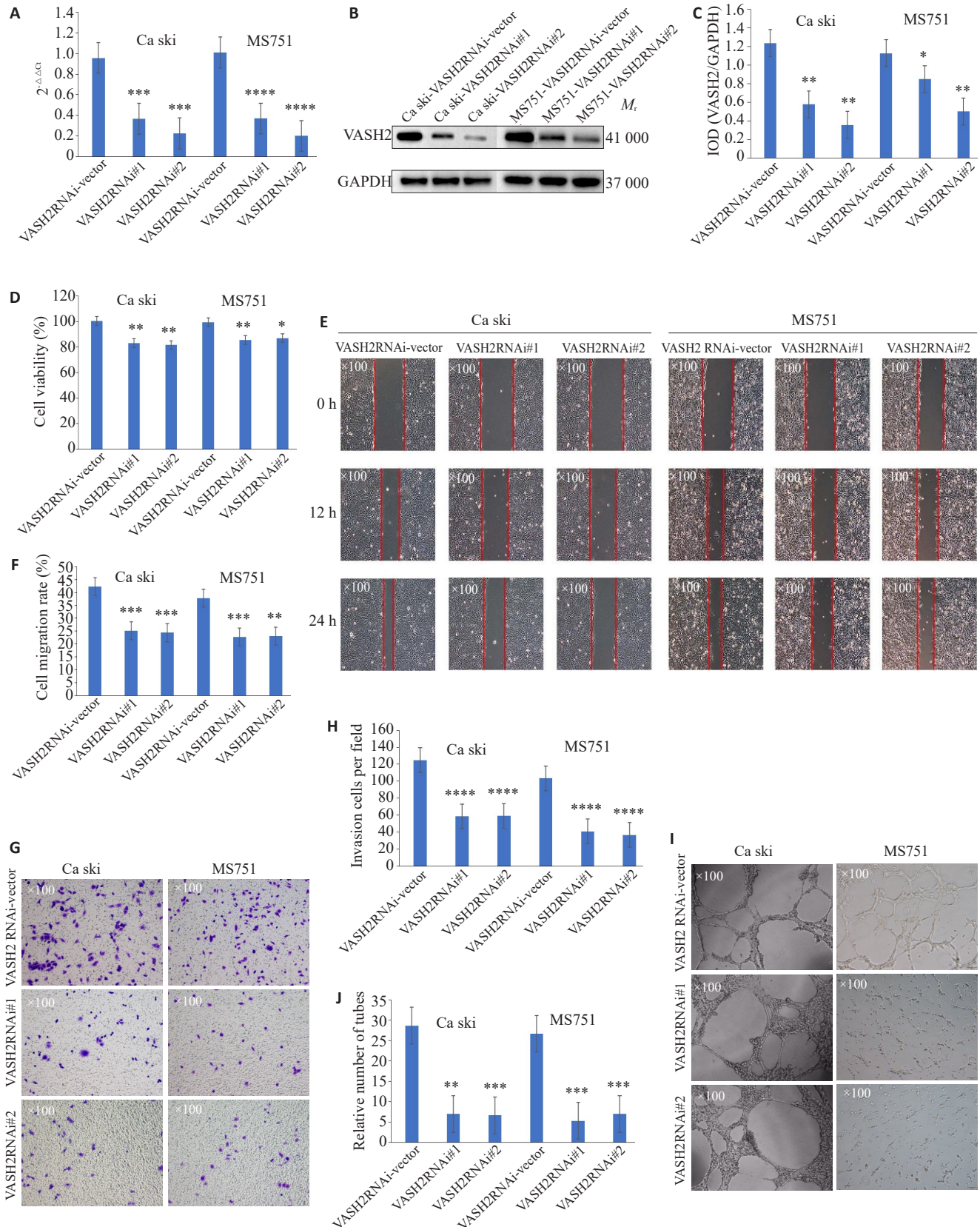


图4 抑制内源性VASH2表达能抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成

Fig.4 Interference of VASH2 expression suppresses cervical cancer cell proliferation, migration, invasion and lymphatic vessel formation. A-C: VASH2 mRNA and protein expressions in cells with VASH2 knockdown detected by RT-qPCR and Western blotting. D: Viability of cells with VASH2 knockdown assessed with CCK-8 assay at 48 h. E, F: Migration of the cells assessed with wound-healing assay. G, H: Invasion ability of the cells quantified by Transwell invasion assay. I, J: Lymphatic vessel formation in the cells quantified by lymph angiogenesis assay. VASH2RNAi#1: cells stably expressing interfering sequence 1 of VASH2; VASH2RNAi#2: cells stably expressing VASH2 interference sequence 2; VASH2-RNAi-vector: Control cells transfected with blank vector. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



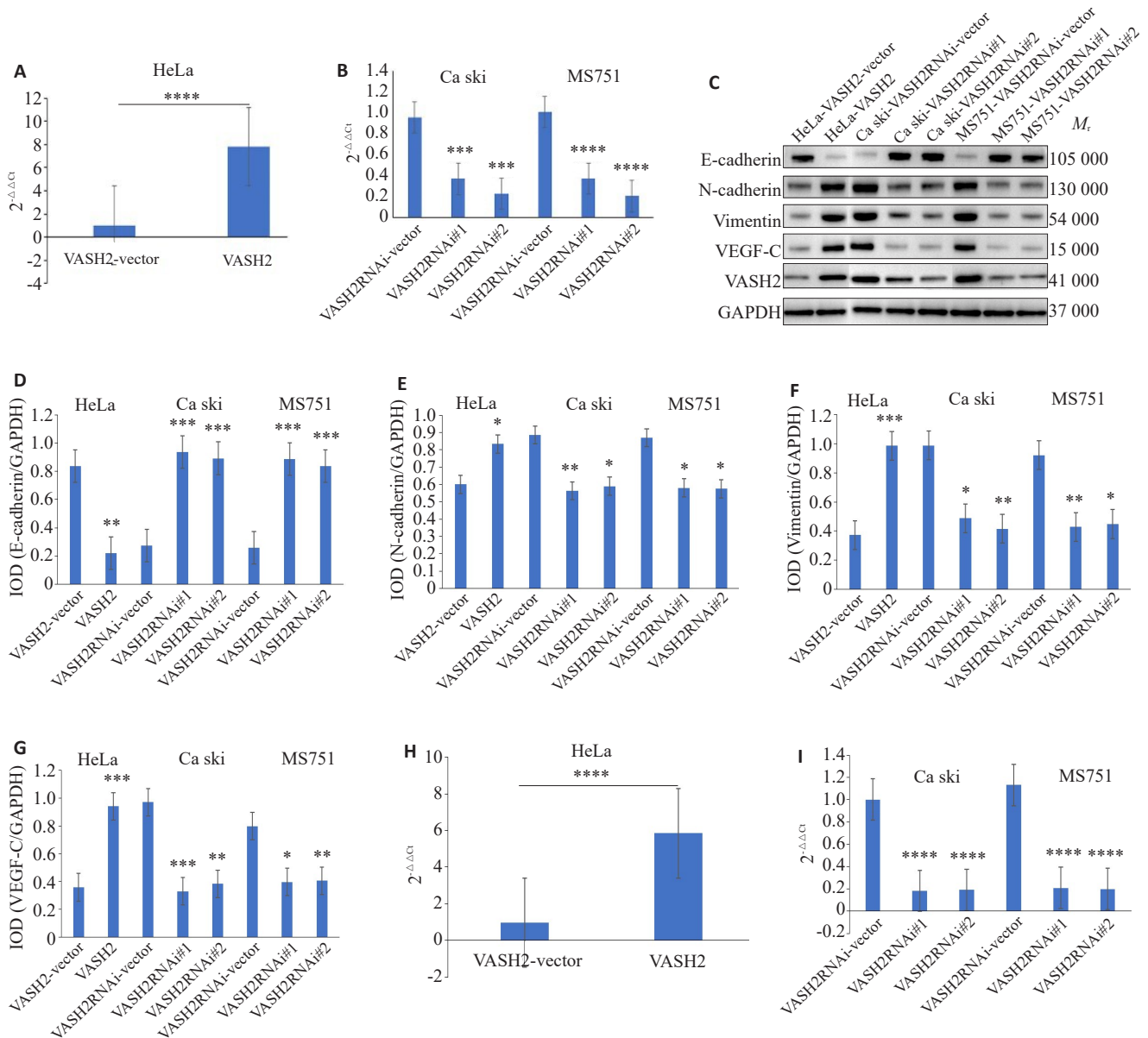


图5 VASH2在宫颈癌细胞中诱导EMT过程并正调控TGF-β的mRNA表达

Fig.5 VASH2 induces EMT and positively regulates TGF-β mRNA expression in cervical cancer cells. A, B: VASH2 mRNA expression levels in cells with VASH2 overexpression and knockdown determined by RT-qPCR. C-G: Western blotting results of protein expression levels of E-cadherin, N-cadherin, vimentin and VEGF-C in cells with VASH2 overexpression and knockdown. H, I: Detection of TGF-β mRNA expression in cells with VASH2 overexpression and knockdown by-RT qPCR. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

呈异常高表达,并能在体外促进宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和淋巴管形成,其机制可能与TGF-β通路调控的EMT途径有关,可能作为flotillin-1促进宫颈癌淋巴结的下游途径,同时本研究为证实VASH2可能作为宫颈癌淋巴结转移的潜在分子治疗靶点和诊断分子标志物提供了初步依据。

参考文献:

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CAA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.

[2] Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(2): e191-203.

[3] Benedetti Panici P, Basile S, Angioli R. Pelvic and aortic lymphadenectomy in cervical cancer: the standardization of surgical procedure and its clinical impact[J]. Gynecol Oncol, 2009, 113(2): 284-90.

[4] Li Z, Yang Y, Gao Y, et al. Elevated expression of flotillin-1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in early-stage cervical cancer[J]. Am J Cancer Res, 2015, 6(1): 38-50.

[5] Hu XN, Ni Y, Luan J, et al. A review on vasohibin and ocular neovascularization[J]. Int J Ophthalmol, 2020, 13(6):1004-8.

[6] Kang Z, Ji Y, Zhang G, et al. Ponatinib attenuates experimental

- pulmonary arterial hypertension by modulating Wnt signaling and vasohibin-2/vasohibin-1[J]. *Life Sci*, 2016, 148:1-8.
- [7] Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 5-11.
- [8] Yamamoto M, Ozawa S, Ninomiya Y, et al. Plasma vasohibin-1 and vasohibin-2 are useful biomarkers in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Esophagus*, 2020, 17(3): 289-97.
- [9] Kitahara S, Suzuki Y, Morishima M, et al. Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 99-108.
- [10] Norita R, Suzuki Y, Furutani Y, et al. Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating transforming growth factor- $\beta$  signaling[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3): 419-26.
- [11] Tu M, Li Z, Liu X, et al. Vasohibin 2 promotes epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer *via* activation of transforming growth factor beta 1 and hypoxia dependent repression of GATA-binding factor 3[J]. *Cancer Lett*, 2017, 388:187-97.
- [12] Yokoyama H, Matsui I. The lipid raft markers stomatin, prohibitin, flotillin, and Hflk/C (SPFH)-domain proteins form an operon with NfeD proteins and function with apolar polyisoprenoid lipids [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(1): 38-48.
- [13] Gauthier-Rouvière C, Bodin S, Comunale F, et al. Flotillin membrane domains in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(2): 361-74.
- [14] Zhao F, Zhang J, Liu YS, et al. Research advances on flotillins [J]. *Virology*, 2011, 8: 479-86.
- [15] Banning A, Tomasovic A, Tikkanen R. Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2011, 12(8): 725-35.
- [16] Parmar D, Apte M. Angiopoietin inhibitors: a review on targeting tumor angiogenesis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 899: 174021-30.
- [17] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 401-10.
- [18] Tu M, Liu X, Han B, et al. Vasohibin-2 promotes proliferation in human breast cancer cells *via* upregulation of fibroblast growth factor-2 and growth/differentiation factor-15 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 663-9.
- [19] Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, et al. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(9): 1135-46.
- [20] Lechler T, Mapelli M. Spindle positioning and its impact on vertebrate tissue architecture and cell fate[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(10): 691-708.
- [21] Li FX, Hu YJ, Qi ST, et al. Structural basis of tubulin detyrosination by vasohibins[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(7): 583-91.
- [22] van der Laan S, Leveque MF, Marcellin G, et al. Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for tubulin detyrosination[J]. *Cell Rep*, 2019, 29(12): 4159-71.
- [23] Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, et al. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity[J]. *Science*, 2017, 358(6369): 1453-6.
- [24] Beuran M, Negoï I, Paun S, et al. The epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer: A systematic review [J]. *Pancreatology*, 2015, 15(3):217-25.
- [25] Sun X, Lin F, Sun W, et al. Exosome-transmitted miRNA-335-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by facilitating EMT *via* targeting RASA1 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 164-74.
- [26] Wang SJ, Tong X, Li C, et al. Quaking 5 suppresses TGF- $\beta$ -induced EMT and cell invasion in lung adenocarcinoma [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(6): 52079-83.
- [27] Bai YP, Sha JJ, Kanno T. The role of carcinogenesis-related biomarkers in the Wnt pathway and their effects on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(3): 555-62.
- [28] Derycke LDM, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5/6): 463-76.
- [29] Wei T, Zhang XY, Zhang Q, et al. Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 237-43.
- [30] Zhang Y, Xue XF, Zhao XQ, et al. Vasohibin 2 promotes malignant behaviors of pancreatic cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition *via* Hedgehog signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5567-76.
- [31] Xue XF, Zhang Y, Zhi QM, et al. MiR200-upregulated Vasohibin 2 promotes the malignant transformation of tumors by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 62-9.
- [32] Katsuno Y, Derynck R. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- $\beta$  family[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(6): 726-46.
- [33] Liu P, Zhang CY, Liao YD, et al. High expression of PTPRM predicts poor prognosis and promotes tumor growth and lymph node metastasis in cervical cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 687-96.

(编辑:林萍)