

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0746

## LIM同源盒基因8对卵巢癌细胞SKOV3生物学行为的影响

黄铮<sup>1</sup>, 马伟<sup>1</sup>, 陆欢<sup>1</sup>, 王斌<sup>1</sup>, 金国华<sup>2</sup>, 吕广明<sup>2</sup>, 张新化<sup>2</sup>, 张睿<sup>3\*</sup>

1. 上海交通大学附属第六人民医院南院妇产科, 上海 201499

2. 南通大学医学院解剖教研室, 南通 226001

3. 上海交通大学附属第六人民医院妇产科, 上海 200233

**[摘要]** **目的** 探讨 LIM 同源盒基因 8(Lhx8)对卵巢癌细胞株 SKOV3 增殖、转移和侵袭的影响。**方法** 采用 Lhx8 过表达慢病毒(LV-Lhx8)转染卵巢癌细胞株 SKOV3 构建过表达模型;设阴性对照慢病毒(LV-NC)组通过 Lipofectamine 2000 转染 Lhx8-siRNA 构建细胞干扰模型并设阴性对照序列(FAM-siRNA;NC)组;野生(WT)组细胞仅给予等量不含病毒或任何干扰片段的转染试剂。通过免疫荧光、蛋白质印迹法和 qPCR 验证过表达和干扰效果。采用 EDU 和细胞周期实验检测过表达或干扰 Lhx8 后细胞的增殖能力;采用 Transwell 和划痕实验分别检测转染后细胞的迁移和侵袭能力。**结果** Lhx8 过表达组 SKOV3 细胞中 Lhx8 的表达高于 LV-NC 和 WT 组( $P<0.01$ ),干扰后 Lhx8 的 mRNA 和蛋白表达均降低,与 NC 和 WT 组相比差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与 WT 和 LV-NC 组相比,Lhx8 过表达抑制 SKOV3 细胞的增殖( $P<0.01$ ),而干扰 Lhx8 后其增殖能力增加( $P<0.01$ );细胞周期实验结果示过表达 Lhx8 能够增加进入 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞数目,从而抑制细胞增殖( $P<0.01$ ),干扰 Lhx8 表达后进入 S 期的细胞数目多于 WT 和 NC 组( $P<0.01$ )。划痕和 Transwell 实验结果示 SKOV3 细胞过表达 Lhx8 后其迁移和侵袭能力均低于 WT 和 LV-NC 组( $P<0.01$ ),干扰 Lhx8 表达后细胞的迁移和侵袭能力均高于 WT 和 NC 组( $P<0.01$ )。SKOV3 细胞过表达 Lhx8 后基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的表达均低于 WT 和 LV-NC 组( $P<0.01$ ),干扰 Lhx8 后 MMP-2、MMP-9 表达均高于 WT 和 NC 组( $P<0.01$ )。**结论** Lhx8 能够抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭,同时能够下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达。

**[关键词]** 卵巢肿瘤;LIM 同源盒基因 8;细胞增殖;细胞迁移;肿瘤侵袭

**[中图分类号]** R 737.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0746-06

## Effect of LIM homeobox gene-8 on biological behavior of human ovarian cancer SKOV3 cells

HUANG Zheng<sup>1</sup>, MA Wei<sup>1</sup>, LU Huan<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, JIN Guo-hua<sup>2</sup>, LÜ Guang-ming<sup>2</sup>, ZHANG Xin-hua<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>3\*</sup>

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Sixth People's Hospital of Shanghai (South Branch), Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China

2. Department of Anatomy, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

3. Department of Obstetrics and Gynecology, Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of LIM homeobox gene-8 (Lhx8) on the proliferation, metastasis and invasion of human ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods** Lhx8-overexpression lentivirus (LV-Lhx8) was transfected into ovarian cancer SKOV3 cells to establish Lhx8-overexpression model and the negative control lentivirus (LV-NC) was used as control. Then Lhx8-siRNA and FAM-siRNA (used as control; NC group) siRNA was transfected into SKOV3 cells using Lipofectamine 2000 to construct cell interference model. Cells in wild type (WT) group were only given equivalent transfection reagent without virus or any interference fragment. The expression of Lhx8 was detected by immunofluorescence, qPCR and Western blotting. The proliferation of cells after overexpressing or interfering Lhx8 was measured by EDU assays and cell cycle assay. The migration and invasion of cells after transfection were measured by wound scratch experiments and Transwell assay. **Results** The expression of Lhx8 in SKOV3 cells in the LV-Lhx8 group was significantly higher than that in the LV-NC and WT groups ( $P<0.01$ ), and its mRNA and protein expressions were significantly decreased after interfering Lhx8 ( $P<0.01$ ). Compared with the WT and LV-NC groups, the proliferation of SKOV3 cells was significantly decreased in the LV-Lhx8 group and was significantly

**[收稿日期]** 2017-02-04 **[接受日期]** 2017-04-10

**[作者简介]** 黄铮,主治医师, E-mail: lfm-858222@sohu.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-57421763, E-mail: rzhang9992002@yahoo.com

increased in the Lhx8-siRNA group ( $P < 0.01$ ). The cell cycle assay showed that *Lhx8* overexpression significantly inhibited cell proliferation by increasing the number of cells in the  $G_0/G_1$  phase, while the number of cells in the S phase in the Lhx8-siRNA group was significantly higher than that in the WT and NC groups ( $P < 0.01$ ). The migration and invasion of SKOV3 cells and the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the LV-Lhx8 group were significantly lower than those in the WT and LV-NC groups ( $P < 0.01$ ), while those in the Lhx8-siRNA group were significantly higher ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Lhx8* can inhibit the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells, and down-regulate the expressions of MMP-2 and MMP-9.

**[Key words]** ovarian neoplasms; LIM homeobox 8; cell proliferation; cell migration; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 746-751]

卵巢癌是妇科目前第二常见、病死率最高的肿瘤,据统计全世界每年新增 238 700 例卵巢癌患者<sup>[1]</sup>。大部分卵巢癌患者在就诊时已处于晚期[国际妇产科联盟大会(FIGO)Ⅲ~Ⅳ期],且多数发生腹腔内转移<sup>[2]</sup>。发生转移是卵巢癌患者的主要病死原因,但不幸的是其转移机制仍不清楚。

同源盒基因是指含有 180 bp 的高度保守的同源盒 DNA 序列的基因,能够通过同源域蛋白抑制或者激活靶基因的表达,在调节细胞分化、生长和发育过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。LIM 同源盒基因 8 (LIM homeobox gene-8, *Lhx8*) 含有 2 个重复串联的富含半胱氨酸的双锌指结构(LIM 结构域)和 1 个 DNA 结合的同源结构域,参与了多种组织的分化过程<sup>[3]</sup>。在早期卵子分裂时,*Lhx8* 在卵母细胞分化和维持过程中扮演着重要角色<sup>[4]</sup>;并且对裸鼠模型研究发现,*Lhx8* 是牙胚间充质细胞生存的重要因素<sup>[5]</sup>。*Lhx8* 对基底前脑胆碱能神经元的形成和功能维持具有重要作用<sup>[6]</sup>。目前研究显示 *Lhx* 家族的一些成员与肿瘤发生有关<sup>[3-4]</sup>,然而尚无研究报道 *Lhx8* 在卵巢癌细胞生物行为过程中的作用。本研究通过在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中过表达或干扰 *Lhx8*,探讨 *Lhx8* 对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞培养** 人卵巢癌细胞株 SKOV3 购自广州行知生物科技有限公司。细胞用含 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液(Gibco)培养于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中。细胞融合率达 90% 时进行传代,第 2~3 代细胞用于实验。

**1.2 *Lhx8* 过表达细胞模型构建** 使用 GV287 慢病毒表达系统(上海吉玛制药技术有限公司)构建 *Lhx8* 过表达慢病毒(LV-*Lhx8*)和阴性对照慢病毒(LV-NC)。将 SKOV3 细胞种植于 6 孔板中,细胞密度为  $1 \times 10^5$  /孔,培养 24 h 后分别加入 LV-*Lhx8*、LV-NC 转染细胞,野生(WT)组细胞给予等量不含

病毒的转染试剂处理,48 h 后收集细胞。通过免疫荧光和蛋白质印迹法观察过表达效果。

**1.3 *Lhx8* 干扰细胞模型构建** 合成 3 种目的基因的 siRNA 序列。*Lhx8*-siRNA-1: sense 5'-GAU GCU CAU UCA CCA ACA ATT-3', anti-sense 5'-UUG UUG GUG AAU GAG CAU CTT-3'; *Lhx8*-siRNA-2: sense 5'-CCA CCC AUG UUA GAA GAA ATT-3', anti-sense 5'-UUU CUU CUA ACA UGG GUG GTT-3'; *Lhx8*-siRNA-3: sense 5'-GCA UGC UGG AUA AUU UAA ATT-3', anti-sense 5'-UUU AAA UUA UCC AGC AUG CTT-3'。同时合成标记羧基荧光素(carboxyfluorescein mixed isomers, FAM)的阴性对照序列(FAM-siRNA)。培养细胞,使用 Lipofectamine 2000 将 3 种 *Lhx8*-siRNA 和 FAM-siRNA 分别转入 SKOV3 细胞,WT 组细胞仅给予不加任何干扰片段的转染试剂处理。于培养 6 h 和 24 h 后分别采用 qPCR 和蛋白质印迹法验证干扰效果。

**1.4 蛋白质印迹法** 按照胞核-胞质蛋白制备试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)说明书操作说明提取细胞的胞质胞核蛋白。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所在)蛋白定量后,进行 SDS-PAGE、转膜(NC 膜);用 1% 的小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭 NC 膜 1 h;然后 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜标记一抗:*Lhx8*(稀释比例 1:500, Abcam)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2(稀释比例 1:1 000, Abcam)、MMP-9(稀释比例 1:1 000, Abcam),以  $\beta$ -actin(稀释比例 1:15 000, Sigma)作为内参蛋白;次日标记相应二抗。采用自动电泳凝胶成像分析仪(Bio-Rad)采集结果并计算灰度值。

**1.5 RNA 的提取和 qPCR 反应** 使用 TRIzol 试剂(TaKaRa)提取细胞总 RNA。采用反转录试剂盒(TaKaRa)反转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板、采用 Corbett Rotor-Gene 6000 qPCR 仪进行 qPCR 反应。引物序列:*Lhx8* sense 5'-GTA TCA CTT GGC TTG CTT-3', anti-sense:5'-ATT ACC GTT

CTC CAC TTC-3', 内参基因 *GAPDH* sense 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', anti-sense 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 15 s,56 °C 30 s,72 °C 40 s,40 个循环;72~95 °C 收集荧光信号行熔解曲线分析。计算 Ct 值,采用 Pfaffl 法<sup>[7]</sup>分析结果,将 *Lhx8* 和 *GAPDH* 比值作为 *Lhx8* 基因 mRNA 的相对表达量。

1.6 EDU 实验 将 SKOV-3 细胞种植于 24 孔板,调整细胞密度为  $2 \times 10^4$ /孔。培养 24 h 后,加入 50  $\mu\text{mol/L}$  EDU 孵育 2 h,然后用 Apollo-567 荧光染料染色 30 min,Hoechst 对细胞核进行复染。使用 Olympus 激光共聚焦显微镜观察细胞荧光表达情况。

1.7 Transwell 实验 将 SKOV-3 细胞悬浮于含 0.2% FBS 的 RPMI 1640 培养液中,取 200  $\mu\text{L}$ (含  $2 \times 10^4$  细胞)加入 24 孔 Transwell 上室;下室加入 500  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液。在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后,用棉签去除上室底部未侵袭细胞,膜滤器固定,结晶紫染色,用 Olympus 倒置显微镜随机取 4 个视野观察、计数。

1.8 划痕实验 细胞接种于 24 孔板中,生长融合到 80%~90%,用枪头进行划痕、PBS 清洗。分别在划痕后和培养 18 h 时进行拍照,以评估细胞迁移能力。

1.9 免疫荧光染色 细胞培养 24 h 后,依次用 2% 甲醛固定、PBS(pH=7.4)冲洗 15 min、Triton X-100 透化、PBS 冲洗 1 min、3% BSA 封闭 1 h,然后 4 °C 过夜标记 *Lhx8* 兔单抗(稀释比例 1:300,Abcam)。室温下标记 Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 二抗(稀释比

例 1:1 000,Life Technologies) 1 h 后,Hoechst 染核 20 min。利用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

1.10 细胞周期实验 细胞于 6 孔板培养 24 h 后,用 1 mmol/L 胸苷(Sigma)处理细胞 24 h 使同步在  $G_1/S$  交界期。然后用无血清培养液培养 24 h,胰酶消化,预冷 PBS 清洗 2 次,乙醇 4 °C 过夜固定,然后用 PBS 清洗 2 次。在室温下,用含 0.2 mg/mL RNase A 和 20  $\mu\text{g/mL}$  碘化丙啶(PI)的 PBS 孵育 15 min。最后用流式细胞仪(BD)分析细胞周期。

1.11 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均值的比较采用方差分析。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 过表达和干扰效果鉴定 为明确 *Lhx8* 对卵巢癌细胞生物学行为的影响,我们用 LV-*Lhx8* 转染 SKOV3 细胞,同时设置 LV-NC 和 WT 型为对照组。转染 48 h 后通过免疫荧光染色检测,结果显示 LV-*Lhx8* 组 *Lhx8* 的表达多于 LV-NC、WT 组( $P < 0.01$ ,图 1A、1B),同时蛋白质印迹法结果显示, LV-*Lhx8* 组 *Lhx8* 蛋白表达较 LV-NC 和 WT 组相比上调( $P < 0.01$ ,图 1C)。

此外,我们分别转染 3 种 *Lhx8*-siRNA 对 SKOV3 细胞进行干扰,干扰后 *Lhx8* 蛋白和 mRNA 的表达均低于 NC 和 WT 组,且以 *Lhx8*-siRNA-3 降低最为明显( $P < 0.01$ ,图 1D、1E),因此将 *Lhx8*-siRNA-3 干扰的细胞模型用于后续实验。

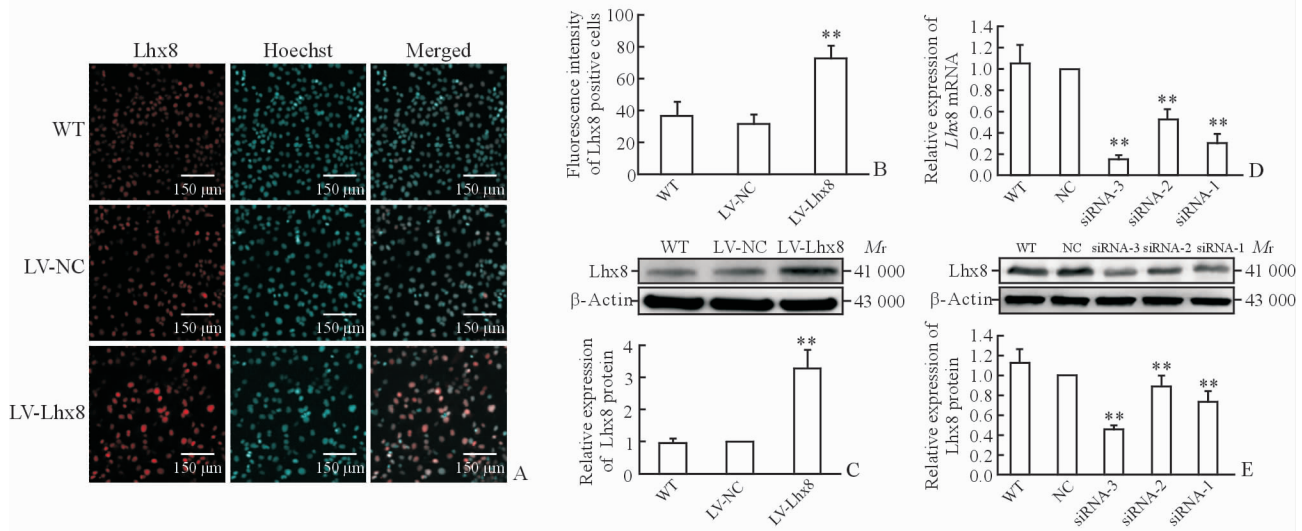


图 1 *Lhx8* 过表达和干扰后 SKOV3 细胞 LIM 同源盒基因 8 的表达情况

Fig 1 LIM homeobox gene-8 (*Lhx8*) expression in SKOV3 cells transfected with LV-*Lhx8* or *Lhx8*-siRNA

A, B; Immunofluorescence results of *Lhx8*; C: Western blotting results of *Lhx8* expression in SKOV3 cells transfected with lentivirus-mediated *Lhx8* overexpression (LV-*Lhx8*); D: The relative expression of *Lhx8* mRNA normalized by NC group; E: Western blotting results of *Lhx8* expression in SKOV3 cells transfected with *Lhx8*-targeted small interfering RNA (*Lhx8*-siRNA). \*\*  $P < 0.01$  vs LV-NC and WT groups in Fig 1B and 1C, and vs NC and WT groups in Fig 1D and 1E.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 Lhx8 对 SKOV3 细胞增殖的影响 与 LV-NC 和 WT 组相比, LV-Lhx8 组 SKOV3 细胞的增殖能力降低( $P<0.01$ ,图 2A、2C), 而干扰 *Lhx8* 表达后细胞的增殖能力高于 NC 和 WT 组( $P<0.01$ ,图 2B、2D), 提示 *Lhx8* 过表达可抑制 SKOV3 细胞的增殖。

为了进一步验证 *Lhx8* 对于 SKOV3 细胞增殖的影响, 我们利用流式细胞仪分析过表达或者干扰

*Lhx8* 后的细胞周期变化。LV-*Lhx8* 转染的 SKOV3 细胞处于  $G_0/G_1$  期细胞数目的比例高于 LV-NC 和 WT 组( $P<0.01$ ,图 2E)。然而, 采用 siRNA 干扰 *Lhx8* 表达后, SKOV3 细胞处于 S 期的细胞数目的比例高于 NC 和 WT 组( $P<0.01$ ,图 2F)。提示 *Lhx8* 可通过增加进入  $G_0/G_1$  期的细胞数目抑制 SKOV3 细胞增殖。

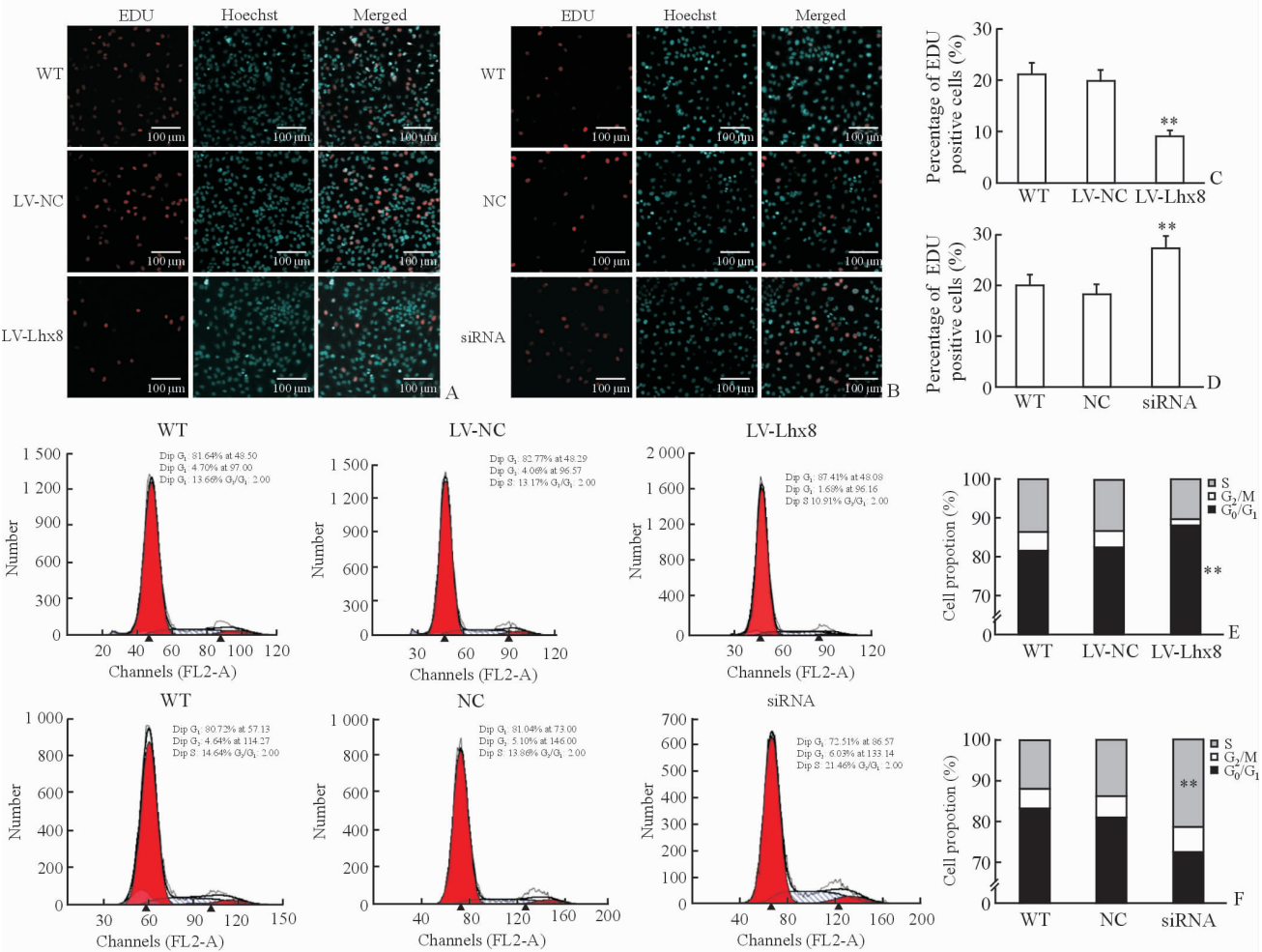


图 2 过表达和干扰 *Lhx8* 后 SKOV3 细胞增殖能力的变化

Fig 2 Proliferation ability of SKOV3 cells transfected with LV-*Lhx8* or *Lhx8*-siRNA

A, C: Cell proliferation ability of SKOV3 cells transfected with lentivirus-mediated *Lhx8* overexpression (LV-*Lhx8*) by EDU assay; B, D: Cell proliferation ability of SKOV3 cells transfected with *Lhx8*-targeted small interfering RNA (*Lhx8*-siRNA) by EDU assay; E: The cell number of SKOV3 cells transfected with LV-*Lhx8* at different phases of cell cycle by flow cytometry; F: The cell number of SKOV3 cells transfected with *Lhx8*-siRNA at different phases of cell cycle by flow cytometry. \*\*  $P<0.01$  vs LV-NC and WT groups in Fig 2C and 2E, and vs NC and WT groups in Fig 2D and 2F.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.3 *Lhx8* 对 SKOV3 细胞迁移和侵袭的影响 相比 LV-NC、WT 组, 过表达 *Lhx8* 抑制 SKOV3 细胞的迁移( $P<0.01$ ,图 3A、3B)和侵袭 ( $P<0.01$ ,图 3C、3D)。干扰 *Lhx8* 表达后则 SKOV3 细胞迁移 ( $P<0.01$ ,图 3E、3F)和侵袭能力高于 NC 和 WT 组( $P<0.01$ ,图 3G、3H)。

2.4 *Lhx8* 对 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响 由于 MMP 在肿瘤侵袭转移中发挥关键作用, 因此我

们通过蛋白质印迹法检测了过表达或干扰 *Lhx8* 后 MMP-2、MMP-9 的表达。结果显示在 LV-*Lhx8* 组 SKOV3 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达低于 LV-NC 和 WT 组 ( $P<0.01$ ,图 4A)。然而用 siRNA 干扰 *Lhx8* 的表达后, MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达均上调, 与 NC 和 WT 组相比差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ,图 4B)。

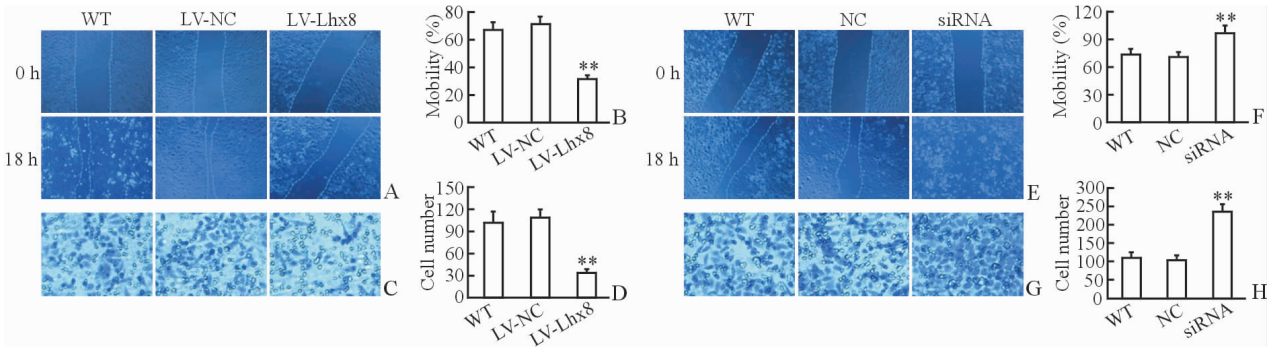


图3 过表达或干扰 *Lhx8* 后 SKOV3 细胞迁移和侵袭能力的变化

Fig 3 Migration and invasion abilities of SKOV3 cells transfected with LV-Lhx8 or *Lhx8*-siRNA

A, B; Migration ability by scratch assay in SKOV3 cells transfected with lentivirus-mediated *Lhx8* overexpression (LV-Lhx8); C, D; Invasion ability by Transwell assay in the SKOV3 cells transfected with LV-Lhx8; E, F; Migration ability by scratch assay in SKOV3 cells transfected with *Lhx8*-targeted small interfering RNA (*Lhx8*-siRNA); G, H; Invasion ability by Transwell assay in the SKOV3 cells transfected with *Lhx8*-siRNA. Original magnification:  $\times 100$  (A, C, E, G). \*\*  $P < 0.01$  vs LV-NC and WT groups in Fig 3B and 3D, and vs NC and WT groups in Fig 3F and 3H.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

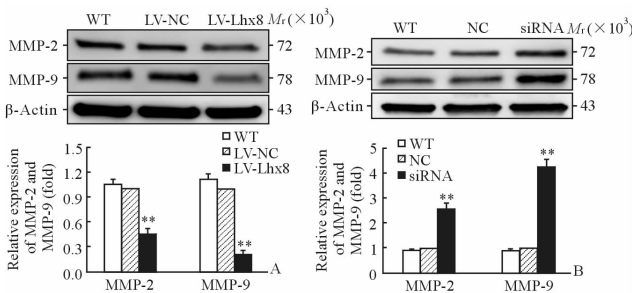


图4 蛋白质印迹法检测过表达或干扰 *Lhx8* 后 SKOV3 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达

Fig 4 Expression of MMP-2 and MMP-9 in SKOV3 cells

transfected with LV-Lhx8 or *Lhx8*-siRNA by Western blotting  
MMP: Matrix metalloproteinase. \*\*  $P < 0.01$  vs LV-NC and WT groups in Fig 4A, and vs NC and WT groups in Fig 4B.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

LIM 结构域被认为是蛋白质相互作用的功能模型,与其他蛋白结构域相互作用,介导功能复合物成员之间的特异性接触以及调节某些组成蛋白的活性<sup>[8]</sup>。研究表明,*LIM* 基因在肿瘤发生、发展过程中扮演重要角色,而且多种 LIM 同源盒基因与不同类型的肿瘤发生有关<sup>[3-4]</sup>。*Lhx8* 基因编码高保守 LIM 同源结构域(LIM-HD),*LIM-HD* 基因在组织分化中发挥重要作用,尤其是神经组织和生殖细胞<sup>[7,9-11]</sup>。Choi 等<sup>[4]</sup>研究发现,小鼠 *Lhx8* 基因敲除不能生成原始卵泡,也不会出现从原始卵泡到成熟卵泡转化过程,最后导致卵母细胞特异基因 *Gdf9*、*Pou5f1* 和 *Nobox* 表达缺失。Li 等<sup>[12]</sup> 研究发现 *Lhx8* 能够抑制嗜铬细胞瘤 PC12 细胞的增殖,且过

表达 *Lhx8* 能够使 PC12 细胞增殖停留在  $G_1$  期。我们的研究结果显示过表达 *Lhx8* 能够使 SKOV3 细胞发育停留在  $G_1/G_0$  期,从而使细胞增殖能力降低,和 Li 等<sup>[12]</sup> 的研究结果一致。

此外,细胞的增殖、迁移、侵袭能力是肿瘤恶性程度的主要评价指标。如 Dormoy 等<sup>[13]</sup> 研究发现,*LIM1* 的沉默能够减少肾细胞癌的迁移和侵袭,但是 *Lhx9* 不能直接影响细胞增殖和凋亡。我们的研究结果显示,*Lhx8* 过表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭,而干扰 *Lhx8* 表达则可促进 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭;这与肾细胞癌中 *LIM1* 的研究结果<sup>[13]</sup> 不同,但是与 *Lhx8* 对 PC12 细胞增殖能力的研究结果<sup>[12]</sup> 一致。由此可见,虽然 *LIM1*、*Lhx8*、*Lhx9* 属于同一个家族,但是它们的作用机制并不完全一致。更详细的机制仍需要更多的体内外实验进一步阐明。

MMP 通过激活蛋白 1 转录因子途径介导肿瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[14]</sup>。在裸鼠体内使用 siRNA 或封闭抗体下调 MMP-2 的表达能够降低异种肿瘤体积并减少转移灶<sup>[15]</sup>。肿瘤发生转移后,可通过封闭 MMP-2 抑制肿瘤生长,这提示 MMP-2 能够抑制早期卵巢癌转移<sup>[16-17]</sup>。在体外研究中 MMP-9 主要参与路易斯肺癌的转移<sup>[18]</sup>。而且细丝蛋白 A 结合蛋白 1 (FILIP1L) 可能通过减少  $\beta$ -catenin 水平使 WNT 靶基因的转录水平下调,如 MMP-9,最终抑制转移<sup>[19]</sup>。因此,我们通过蛋白质印迹法检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平研究 *Lhx8* 与 MMP-2、MMP-9 之间的关系,结果显示在 SKOV3

细胞中过表达 *Lhx8* 减少了 MMP-2、MMP-9 的表达,干扰 *Lhx8* 后结果相反。

总之,*Lhx8* 过表达能够抑制 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭,反之,干扰 *Lhx8* 能够促进细胞增殖、迁移和侵袭,并且能够下调 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达;这一研究结论将为进一步研究卵巢癌转移机制提供依据。

## [参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.
- [2] KHALIL I, BREWER M A, NEYARAPALLY T, RUNOWICZ C D. The potential of biologic network models in understanding the etiopathogenesis of ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116: 282-285.
- [3] DAWID I B, TOYAMA R, TAIRA M. LIM domain proteins[J]. *C R Acad Sci III*, 1995, 318: 295-306.
- [4] CHOI Y, BALLOW D J, XIN Y, RAJKOVIC A. Lim homeobox gene, *Lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival[J]. *Biol Reprod*, 2008, 79: 442-449.
- [5] ZHAO M, GUPTA V, RAJ L, ROUSSEL M, BEI M. A network of transcription factors operates during early tooth morphogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 3099-3112.
- [6] MORI T, YUXING Z, TAKAKI H, TAKEUCHI M, ISEKI K, HAGINO S, et al. The LIM homeobox gene, *L3/Lhx8*, is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19: 3129-3141.
- [7] PFAFFL M W, GRAHAM W H, DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR[J/OL]. *Nucl Acids Res*, 2002, 30: e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36.
- [8] DAWID I B, BREEN J J, TOYAMA R. LIM domains; multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions[J]. *Trends Genet*, 1998, 14: 156-162.
- [9] RICHTER K, PINTO DO O P, HÄGGLUND A C, WAHLIN A, CARLSSON L. *Lhx2* expression in hematopoietic progenitor/stem cells *in vivo* causes a chronic myeloproliferative disorder and altered globin expression[J]. *Haematologica*, 2003, 88: 1336-1347.
- [10] JUNG S, JEONG D, KIM J, YI L, KOO K, LEE J, et al. Epigenetic regulation of the potential tumor suppressor gene, *hLHX6.1*, in human cervical cancer [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38: 859-869.
- [11] DIETRICH D, LESCHE R, TETZNER R, KRISPIN M, DIETRICH J, HAEDICKE W, et al. Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57: 477-489.
- [12] LI H, QIN J, JIN G, ZOU L, SHI J, HAN X, et al. Overexpression of *Lhx8* inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in PC12 cell line[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51: 329-335.
- [13] DORMOY V, BÉRAUD C, LINDNER V, THOMAS L, COQUARD C, BARTHELMEBS M, et al. LIM-class homeobox gene *Lim1*, a novel oncogene in human renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2011, 30: 1753-1763.
- [14] BENBOW U, BRINCKERHOFF C E. The AP-1 site and *MMP* gene regulation; what is all the fuss about? [J]. *Matrix Biol*, 1997, 15(8/9): 519-526.
- [15] WESTERMARCK J, KÄHÄRI V M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion [J]. *FASEB J*, 1999, 13: 781-792.
- [16] KENNY H A, LENGYEL E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8: 683-638.
- [17] HU X, LI D, ZHANG W, ZHOU J, TANG B, LI L. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286: 1537-1543.
- [18] CHOU C H, TENG C M, TZEN K Y, CHANG Y C, CHEN J H, CHENG J C. MMP-9 from sublethally irradiated tumor promotes Lewis lung carcinoma cell invasiveness and pulmonary metastasis[J]. *Oncogene*, 2012, 31: 458-468.
- [19] KWON M, LEE S J, WANG Y, RYBAK Y, LUNA A, REDDY S, et al. Filamin A interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135: 48-60.