

· 基础研究 ·

FABP4通过上调 GLUT1 表达和有氧糖酵解促进肠癌细胞侵袭转移

王克强¹,戴文鹏¹,黄湖南¹,车河龙¹,邓小荣²¹中国人民解放军第一八四医院普外科,江西 鹰潭 335000;²南昌大学第二附属医院胃肠外科,江西 南昌 330006

[摘要] 目的:探讨脂肪酸转运蛋白4(fatty acid binding protein 4, FABP4)在肠癌细胞侵袭转移中的作用和机制。方法:通过ELISA和Western blot检测不同侵袭转移能力肠癌细胞中FABP4表达水平;采用Transwell实验检测肠癌细胞侵袭转移能力;使用siRNA技术干扰HT29细胞中葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)表达,检测肠癌细胞葡萄糖摄取、乳酸脱氢酶含量、乳酸生成水平。结果:在高转移性肠癌细胞系HTCC116、SW620、Lovo的培养基上清和细胞中,FABP4表达显著高于低转移性肠癌细胞系HT29、Colo-2、SW116。用hrFABP4处理的HT29,其侵袭能力增强;而用FABP4抑制剂BMS处理的HTC116,其侵袭能力被明显抑制。过表达hrFABP4促进肠癌细胞中GLUT1的表达和有氧糖酵解。下调GLUT1或抑制有氧糖酵解能够削弱hrFABP4引起的肠癌细胞侵袭和转移。结论:FABP4可促进肠癌细胞侵袭转移,其机制可能通过促进GLUT1表达,进而诱导有氧糖酵解。

[关键词] 肠癌;转移;脂肪酸转运蛋白4;有氧糖酵解;葡萄糖转运蛋白1**[中图分类号]** R735.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)02-210-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190210

FABP4 accelerates colon cancer cells metastasis by promoting GLUT1 expression and Aerobic glycolysis

Wang Keqiang¹, Dai Wenpeng¹, Huang Hunan¹, Che Helong¹, Deng Xiaorong²¹Department of General Surgery, the 184th Hospital of People's Liberation Army, Yintan 335000; ²Department of Gastrointestinal Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role of fatty acid binding protein 4 (FABP4) in colon cancer cell invasion. **Methods:** The expression of FABP4 in a panel of colon cancer cell lines was detected by ELISA and Western blot. Transwell assays were performed to determine invasion of colon cancer cells. The glucose transporter 1 (GLUT1) expression in HT29 cell was knocked down by siRNA and glucose uptake. LDH level and lactate production of colon cancer cells were analysed. **Results:** The expression of FABP4 in medium supernatant and cells was increased in colon cancer cells HTCC116, SW620 than that in HT29, Colo-2 and SW116 cells. Overexpression of hrFABP4 promoted invasion in HT29 cells, whereas inhibitor of FABP4 impaired the invasion rate of HTC116 cells. The expression of GLUT1 and aerobic glycolysis of colon cancer cells were upregulated by hrFABP4. Knockdown of GLUT1 or inhibition of aerobic glycolysis in HT29 cell abrogated the effect of hrFABP4 on cell invasion. **Conclusion:** FABP4 may promote invasion in colon cancer cells through upregulation of GLUT1 and increased aerobic glycolysis.

[Key words] colon cancer; metastasis; fatty acid binding protein 4; aerobic glycolysis; glucose transporter 1

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02):210-214]

肠癌是病死率第3的恶性肿瘤,也是导致肿瘤相关死亡的第4位因素^[1]。导致死亡的主要原因是发生了转移,因此进一步阐明肠癌转移的机制是肠癌诊治的热点问题^[2]。脂肪酸转运蛋白4(fatty acid

binding protein 4, FABP4)是一类将脂肪酸转运到各种细胞间的脂肪素,其不仅参与脂肪代谢,还能影响基因表达、细胞增殖分化等^[3]。现有研究表明,FABP4和乳腺癌^[4]、宫颈癌^[5]、肝癌^[6]等细胞增殖、转

移有密切关系。但FABP4在肠癌中的作用鲜有报道。因此本研究意在探讨FABP4在肠癌转移中的作用和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人重组 FABP4 (hrFABP4) (Biovendor, Brno, Czech), BMS (Robert Costa Memorial druge)、1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-Propen-1-one (PFK15, Selleckchem, 美国), Transwell 小室 (Corning 公司, 美国), 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3-PO, Merck Millipore 公司, 德国), FABP4、GLUT1 兔来源多克隆一抗 (Abcam 公司, 美国), β -actin 鼠来源单克隆一抗 (CST 公司, 美国), 高糖型 DMEM、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 胰蛋白酶 (吉诺公司, 中国), Lipofectamine[®] 2000 Reagent (Invitrogen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

肠癌细胞株 HT29、Colo-2、SW116、HTC116、SW620 和 Lovo 由本院实验室保存。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱中培养。

1.2.2 小干扰 RNA 转染

siGLUT1 和对照 siNC 小干扰 RNA 转染由上海吉玛生物公司合成。siGLUT1 干扰系列: siGLUT1-1, 5'-GATCCCCGATTTTCGAGTCG-3'; siGLUT1-2, 5'-UAU-UAAAUACAGACACUAA-3', siGLUT1-3, 5'-GAAT-TAAGACGACTCGAAA-3', si-NC 干扰系列: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。转染步骤按 Lipofectamine[®] 2000 Reagent 说明进行。转染 48 h 后, Western blot 检测效率。

1.2.3 ELISA 检测 FABP4 水平

以含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 溶液为封闭液, 每孔 350 μ L, 室温封闭 1 h。封闭结束后, 弃去封闭液, 洗板, 加入细胞培养基上清 (制作标准曲线以标准 Purified Rat IgG 代替样品) 100 μ L, 室温孵育 2 h。一抗孵育结束后, 洗板, 每孔加 Anti-Rat IgG-HRP Antibody 100 μ L, 室温孵育 2 h。酶标二抗孵育结束后, 洗板, 每孔加入 TMB 底物溶液 100 μ L, 室温避光显色 30 min 后, 每孔加入 2 mol/L H₂SO₄ 50 μ L 终止反应。用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度值。绘制标准曲线, 通过标准曲线计算样品浓度。

1.2.4 Western blot

收集肠癌细胞, 提取蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 加入 5 \times loading buffer 沸水浴 10 min 变性。

5% 浓缩胶 80 V 恒压 30 min, 10% 分离胶恒压 110 V, 60 min, 湿转 90 V 恒压 80 min, 37 °C 摇床 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, 封闭后加入一抗 4 °C 过夜。TBST 洗膜 5 min \times 3 次, 山羊抗兔或山羊抗鼠近红外二抗 (1:15 000), 常温避光摇床孵育 1 h, 避光 TBST 洗膜 15 min \times 4 次。Odyssey V3.0 扫描仪扫描膜。重复 3 次。

1.2.5 细胞侵袭实验

50 mg/L Matrigel 1:5 稀释液, 50 μ L 包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 孵箱 37 °C 凝固。使用前用上室加入 100 μ L 无血清培养基 DMEM 37 °C 湿化 30 min。细胞消化后用无血清培养基 DMEM 制成细胞悬液, 调整细胞密度为 5 \times 10⁴ 个/mL。吸取 200 μ L 细胞悬液加入 Transwell 小室上室, 下室加入含 10% 血清的 DMEM 600 μ L。12 h 后取出小室, 去除培养基, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后, 结晶紫染色 2 h, 显微镜下拍照。

1.2.6 葡萄糖摄取率检测

细胞对葡萄糖的摄取效率通过检测细胞对 2-NBDG [2-N(7-硝基苯-2-乙二酸, 3-4 羟氨基)-2-脱氧葡萄糖, 南京凯基生物] 摄取量来反映。细胞汇合至 95% 后, 饥饿 24 h 后, 更换含 10 mg/mL 2-NBDG 的 DMEM 培养液继续培养 24 h。PSB 洗 3 次后, 荧光酶标仪 (发射/激发波长: 465 nm/540 nm) 检测 荧光值。相对葡萄糖的摄取效率 = (吸光度值_{实验组} - 吸光度值_{空白组}) / (吸光度值_{对照组} - 吸光度值_{空白组})。

1.2.7 检测乳酸脱氢酶 (LDH)

参照南京建成生物工程所 LDH 检测说明书进行。处理好的细胞胰酶消化, 裂解后离心收集上清。依次加入 20 μ L 样品 (或 0.2 mmol/L 的标准品)、25 μ L 基质缓冲液、5 μ L 辅酶 I、25 μ L 2,4-二硝基苯肼和 250 μ L 0.4 mol/L 的 NaOH, 酶标仪 (波长 450 nm) 测定吸光度值。细胞中 LDH = (吸光度值_{实验组} - 吸光度值_{空白组}) / (吸光度值_{标准品} - 吸光度值_{空白组}) \times 0.2 mmol/L。

1.2.8 乳酸试剂盒检测肠癌细胞培养基上清液中乳酸产生水平

乳酸水平检测根据产品说明书进行。各组细胞按 1 \times 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 12 h 后更换无血清培养基 (1 mL/孔) 继续培养 24 h。收集细胞培养基上清, 13 000 g 离心 10 min 去除杂质, 消化细胞计数。将 20 μ L 样品、26 μ L 乳酸盐测定缓冲液、2 μ L 乳酸酶混合物和 2 μ L 乳酸盐探针混合, 在室温下孵育 30 min。酶标仪 570 nm 测量样品吸光度值。用 1 mmol/L 乳酸盐标准物 0、2、4、6、8、10 μ L 分别加入由 26 μ L 乳酸盐测定缓冲液、2 μ L 乳酸酶混合

物和 2 μL 乳酸盐探针混合物中建立标准曲线并计算培养基上清中乳酸浓度。乳酸水平(μg/h/10⁵ cells)= 乳酸浓度×体积/24 h/细胞数。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计学软件,采用 One-way ANOVA 方差分析法,首先利用 Levene 方法进行方差齐性检验,确定方差齐性且整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较,多重比较采用 LSD 法。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FABP4 对肠癌细胞侵袭能力的影响

首先检测了肠癌细胞中 FABP4 的表达情况,发现高转移性的肠癌细胞系 HTCC116、SW620、Lovo 培养基上清中的 FABP4 (图 1A) 和细胞中表达的 FABP4 (图 1B) 较低转移性肠癌细胞系 HT29、Colo-2、SW116 显著增高。并且,用重组人 FABP4 (hr FABP4) 处理 HT29 后,细胞侵袭能力增强 (图 1C); 而用 FABP4 抑制剂 BMS 处理的 HTC116 后,细胞侵袭能力被明显抑制 (图 1D)。由此可见, FABP4 可促进肠癌细胞侵袭。

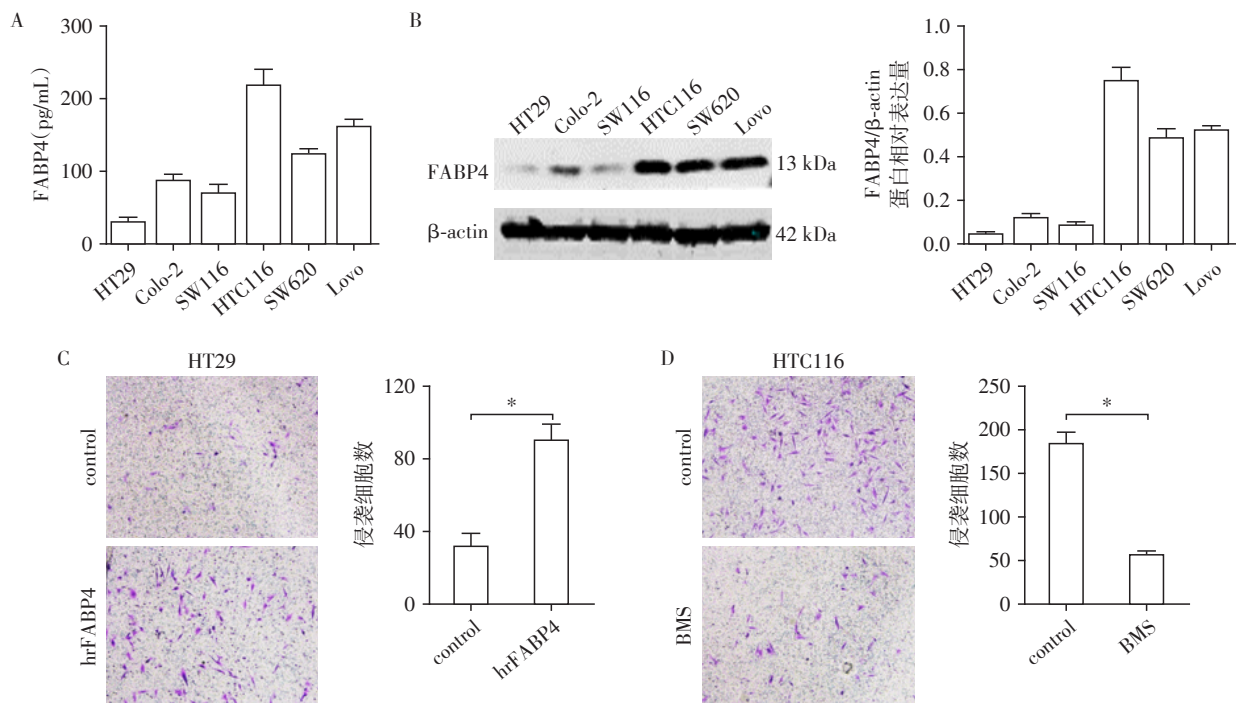
2.2 FABP4 对肠癌细胞 GLUT1 表达和有氧糖酵解

的影响

有氧糖酵解是肿瘤代谢的主要机制之一,在肿瘤侵袭转移中有重要作用。研究结果发现, hr-FABP4 处理了 24 h 的 HT29 细胞中,糖代谢关键蛋白之一 GLUT1 表达显著升高 (图 2A); 同时, hr-FABP4 处理的 HT29 细胞葡萄糖摄取率、LDH 活性和乳酸生成都显著增加 (图 2B)。相反,用 FABP4 抑制剂 BMS 处理的 HTC116 细胞中, GLUT1 表达被明显抑制 (图 2C), 葡萄糖摄取率、LDH 活性和乳酸生成都显著减少 (图 2D)。以上结果提示, FABP4 可增加肠癌细胞 GLUT1 表达和有氧糖酵解。

2.3 抑制 GLUT1 表达和有氧糖酵解对 FABP4 功能的影响

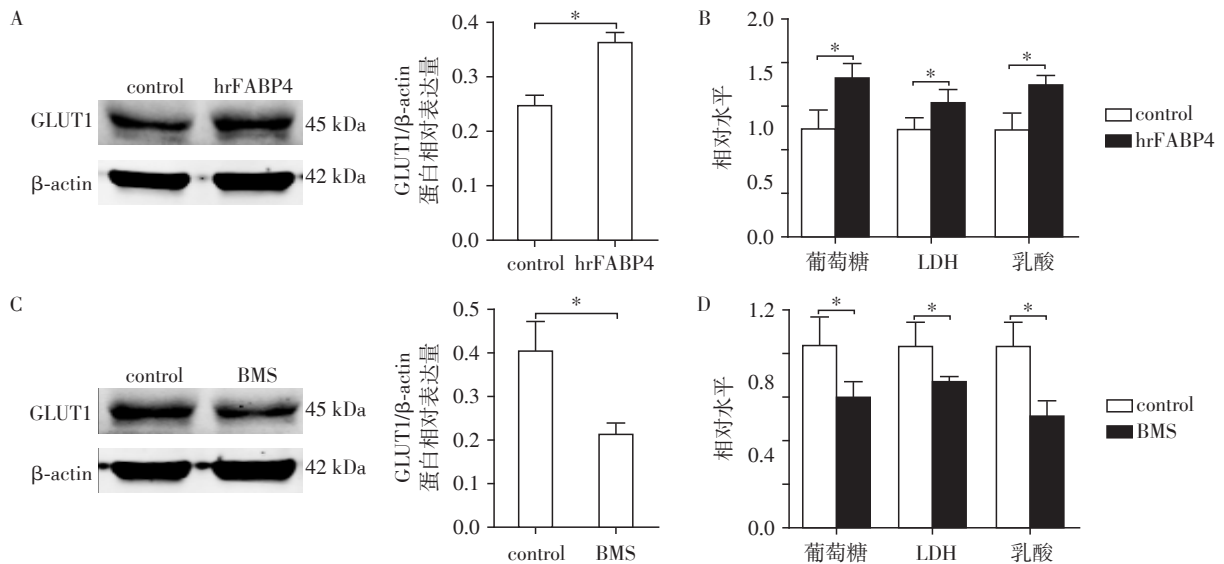
FABP4 可促进肠癌细胞 GLUT1 表达和有氧糖酵解,那么 GLUT1 和有氧糖酵解在 FABP4 促进肠癌细胞侵袭转移中的作用如何? 结果显示,用 siRNA 敲低 HT29 细胞 GLUT1 蛋白表达后 (图 3A), FABP4 诱导的 HT29 细胞有氧糖酵解减少 (图 3B)、侵袭能力减弱 (图 3C); 并且,进一步用有氧糖酵解的抑制剂 3-PO 和 PFK15 抑制 FABP4 诱导的 HT29 细胞有氧糖酵解 (图 3D), FABP4 诱导的 HT29 细胞侵袭能力增加也被抑制 (图 3E)。结果提示, FABP4 通过促



A: ELISA 检测肠癌细胞 HT29、Colo-2、SW116、HTCC116、SW620 和 Lovo 培养基上清中 FABP4 表达情况; B: Western blot 检测肠癌细胞 HT29、Colo-2、SW116、HTCC116、SW620 和 Lovo 中 FABP4 表达情况; C: hrFABP4 (100 ng/mL) 处理 HT29 细胞 24 h 后, Transwell 检测 HT29 侵袭能力的变化; D: BMS (10 mmol/L) 处理 HTC116 细胞 24 h, Transwell 检测 HTC116 侵袭能力的变化。两组比较, *P < 0.05。

图 1 FABP4 对肠癌细胞侵袭能力的影响

Figure 1 Effect of FABP4 on the invasion of colon cancer cells



A: hrFABP4(100 ng/mL)处理 HT29 细胞 24 h 后, Western blot 检测 HT29 细胞中 GLUT1 表达的变化; B: HT29 细胞中葡萄糖摄取、LDH 活性和乳酸生成情况; C: Western blot 检测 BMS 处理后 HTC116 细胞中 GLUT1 表达的变化; D: HTC116 细胞中葡萄糖摄取、LDH 活性和乳酸生成情况。两组比较, ($P < 0.05$)。

图2 FABP4对肠癌细胞 GLUT1 表达和有氧糖酵解的影响

Figure 2 Effect of FABP4 on GLUT1 protein expression and aerobic glycolysis in colon cancer cells

进肠癌细胞 GLUT1 表达和有氧糖酵解进而增加肠癌细胞的侵袭转移能力。

3 讨论

FABP4 是一类重要的脂类伴侣,在脂质介导的细胞生理过程和代谢中发挥重要作用。研究发现, FABP4 与乳腺癌^[4]、宫颈癌^[5]、肝癌^[6]等疾病进展密切相关;进一步也发现 FABP4 可通过促进 EMT 等促进肿瘤细胞侵袭^[6]。本研究也发现,在高侵袭力肠癌细胞中 FABP4 表达增加,其侵袭转移能力可以被 FABP4 抑制剂 BMS 抑制;而低转移的肠癌细胞中给予 hrFABP4,其侵袭转移力增加。由此可见, FABP4 可以促进肠癌细胞的侵袭转移。

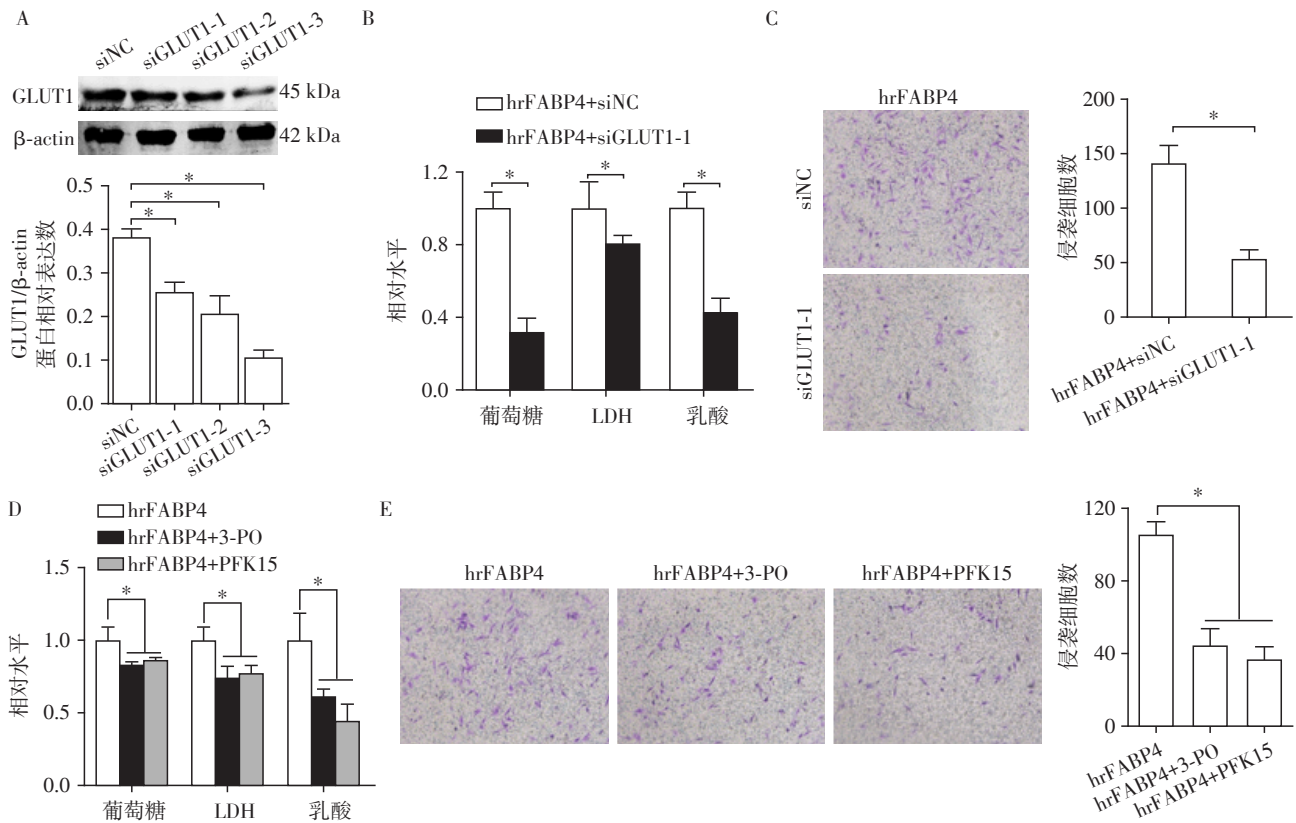
有氧糖酵解(也叫做 warburg effect)是指细胞在有氧的环境中,由于快速增殖、代谢等需要,也进行大量的糖酵解^[7]。既往研究表明,肿瘤细胞中有氧糖酵解明显增加,其与肿瘤细胞的增殖、转移等密切相关^[8]。在肠癌细胞中,也存在明显的有氧糖酵解,有氧糖酵解的产物给肠癌快速增长提供 DNA 合成的原料和 ATP,生成大量乳酸形成的酸环境也为肿瘤转移提供了微环境^[9]。本研究结果显示, FABP4 可以诱导肠癌细胞有氧糖酵解增加,同时也促进了 GLUT1 的表达。GLUT1 是葡萄糖转运到细胞内的关键蛋白,其高表达可促进肿瘤细胞的有氧糖酵解和转移^[10]。在敲低肠癌细胞 GLUT1 表达后,

FABP4 诱导肠癌细胞有氧糖酵解增加的作用被减弱。提示 FABP4 通过促进 GLUT1 表达,进而诱导肠癌细胞有氧糖酵解增加。更为有趣的是,还观察到通过敲低肠癌细胞 GLUT1 表达或使用有氧糖酵解抑制剂减少肠癌细胞有氧糖酵解后, FABP4 促进肠癌细胞侵袭转移的作用被减弱。这些结果表明 FABP4 促进肠癌细胞侵袭转移的作用与促进有氧糖酵解有关。

综上所述, FABP4 在高转移肠癌细胞中表达增加,并且可促进肠癌细胞侵袭转移,其机制可能是通过增加肠癌细胞 GLUT1 表达,进而诱导有氧糖酵解。这也为肠癌侵袭转移治疗提供了治疗的靶点。

[参考文献]

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Tang X, Zha L, Li H, et al. Upregulation of GNL3 expression promotes colon cancer cell proliferation, migration, invasion and epithelial - mesenchymal transition via the Wnt/beta - catenin signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2023-2032
- [3] Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, et al. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(10): 1533-1541
- [4] Guaita-Esteruelas S, Bosquet A, Saavedra P, et al. Exogenous FABP4 increases breast cancer cell proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins



A: Western blot 检测转染了 siRNA 的 HT29 细胞 GLUT1 的表达; B: hrFABP4(100 ng/mL) 处理用 siGLUT1-3 敲低 GLUT1 表达的 HT29 细胞, 检测细胞中葡萄糖摄取、LDH 活性和乳酸生成情况; C: Transwell 检测 HT29 侵袭能力变化; D: 3-PO(10 μmol/L) 和 PFK15(10 μmol/L) 预处理 1 h, 再加入 hrFABP4 处理 HT29 细胞 24 h 后, 检测细胞中葡萄糖摄取、LDH 活性和乳酸生成情况; E: Transwell 检测 HT29 侵袭能力的变化。两组比较, **P* < 0.05。

图3 抑制 GLUT1 表达和有氧糖酵解对 FABP4 功能的影响

Figure 3 The changes of FABP4 function by knockdown of GLUT1 and inhibition of aerobic glycolysis

[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(1): 208-217

[5] Jin J, Zhang Z, Zhang S, et al. Fatty acid binding protein 4 promotes epithelial-mesenchymal transition in cervical squamous cell carcinoma through AKT/GSK3β/Snail signaling pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 461: 155-164

[6] Thompson KJ, Austin RG, Nazari SS, et al. Altered fatty acid binding protein 4 (FABP4) expression and function in human and animal models of hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2018, 38(6): 1074-1083

[7] Danhier P, Banski P, Payen VL, et al. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1858(8): 556-572

[8] Yang L, Zhang W, Wang Y, et al. Hypoxia-induced miR-214 expression promotes tumour cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in gastric carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 414(1): 44-56

[9] Hussain A, Qazi AK, Mupparapu N, et al. Modulation of glycolysis and lipogenesis by novel PI3K selective molecule represses tumor angiogenesis and decreases colorectal cancer growth [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(2): 250-260

[10] Xiao H, Wang J, Yan W, et al. GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2018, 78(2): 86-94

[收稿日期] 2018-06-13