

文章编号: 1674-8085 (2023) 01-0062-10

基于数据库分析 *FOXG1* 在非小细胞肺癌中的表达和临床意义及稳定过表达 *FOXG1* 肺癌细胞株 A549 的构建

王雨晴¹, 马雪艳¹, 陈艳¹, 刘永新¹, 杨彩婷¹, *姜慧杰^{1, 2}, *来明名¹

(1.大理大学基础医学院, 云南, 大理 671000; 2.中山大学孙逸仙纪念医院深汕中心, 广东, 广州 51000)

摘要: 通过 TCGA 数据库分析 *FOXG1* 在非小细胞肺癌中的表达及预后相关性, 建立稳定过表达人源 *FOXG1* 基因的肺癌细胞株 A549。利用 TCGA 数据库中下载基因表达数据和临床信息, 分析 *FOXG1* 在非小细胞肺癌和正常组织的表达差异、*FOXG1* 表达水平与临床病理特征及生存预后的相关性并进行基因集富集分析。通过 HEK-293T 包装慢病毒表达载体, 收集病毒上清液侵染 A549 细胞, 嘌呤霉素筛选稳定过表达 *FOXG1* 的 A549 细胞株。细胞核染色鉴定外源 *FOXG1* 表达定位, Western blot 检测外源 *FOXG1* 的表达情况。结果发现 *FOXG1* 在非小细胞肺癌组织中高表达, 且 *FOXG1* 高表达能够降低患者总体生存率。*FOXG1* 的表达水平与患者年龄相关, 与性别, 分级以及 TMN 分期无关; 细胞周期、P53、Notch 等信号通路在高表达 *FOXG1* 的非小细胞肺癌组织中被激活; 慢病毒表达载体共转染 HEK-293T 细胞成功; 病毒上清液侵染 A549 细胞, 24 h 后可见绿色荧光表达, 72 h 后对照组空载体病毒颗粒侵染效率高达 80% 左右, 实验组过表达 *FOXG1* 病毒颗粒侵染效率为 50% ~ 60%; 经嘌呤霉素筛选培养后, 对照组和实验组荧光效率均达到 90% 以上; 细胞核染色外源 *FOXG1* 基因定位在细胞核中, Western blot 结果显示外源 *FOXG1* 在细胞中正确表达。因此可以认为 *FOXG1* 基因在非小细胞肺癌患者中高表达, 其表达水平与患者总体预后有关且稳定表达 *FOXG1* 的 A549 肺癌细胞株构建成功。

关键词: *FOXG1*; TCGA; A549 细胞; 稳定过表达; 慢病毒

中图分类号: Q354

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8085.2023.01.010

ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF *FOXG1* IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER BASED ON THE DATABASE AND THE CONSTRUCTION OF A LUNG CANCER CELL LINE A549 WITH STABLE OVEREXPRESSION OF *FOXG1*

WANG Yu-qing¹, MA Xue-yan¹, CHEN Yan¹, LIU Yong-xin¹, YANG Cai-ting¹, *JIANFG Hui-jie^{1, 2}, *LAI Ming-ming¹

(1. School of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Shenshan Center of Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 51000, China)

Abstract: In this paper, based on the TCGA database, the expression and prognosis correlation of *FOXG1* in non-small cell lung cancer were analyzed, and a lung cancer cell line A549 with stably overexpressed human

收稿日期: 2022-04-15; 修改日期: 2022-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660465); 云南省应用基础研究计划项目(2014FD045); 云南省教育厅科学研究基金研究生项目(2019Y0267)

作者简介: 王雨晴(1995-), 女, 河北廊坊人, 硕士, 主要从事肿瘤细胞生物学研究(E-mail: 2560635467@qq.com);

*姜慧杰(1992-), 女, 湖北武汉人, 硕士, 主要从事肿瘤细胞生物学研究(E-mail: 541043558@qq.com);

*来明名(1985-), 女, 安徽淮南人, 副教授, 博士, 主要从事肿瘤细胞生物学研究(E-mail: jz1507@dali.edu.cn).

FOXG1 gene was established. We downloaded the gene expression data and clinical information from the TCGA database, analyzed the expression difference of *FOXG1* in non-small cell lung cancer and normal tissues, the correlation of *FOXG1* expression level with clinicopathological characteristics and survival prognosis, and performed gene set enrichment analysis. The lentiviral expression vector was packaged by HEK-293T, and the virus supernatant was collected to infect A549 cell line, and puromycin screening was performed to establish an A549 cell line stably overexpressing *FOXG1*. The expression and localization of exogenous *FOXG1* were identified by nuclear staining, and the expression of exogenous *FOXG1* was detected by Western blot. The results showed that *FOXG1* was highly expressed in non-small cell lung cancer tissues, and high expression of *FOXG1* could reduce the overall survival rate of patients. The expression level of *FOXG1* was related to the age of patients, but not related to gender, grade and TMN stage; cell cycle, P53, Notch and other signaling pathways were activated in non-small cell lung cancer tissues with high expression of *FOXG1*; Lentiviral expression vector was successfully co-transfected into HEK-293T cells. the virus supernatant infected A549 cell line, green fluorescence expression was visible after 24 h, and the infection efficiency of the empty vector virus particles in the control group was as high as about 80% after 72 h. The infection efficiency of the experimental group overexpressing *FOXG1* virus particles was 50%-60%. After being filtered by puromycin, the fluorescence efficiency of both the control groups and the experimental groups reached more than 90%. The staining experiment showed that the exogenous *FOXG1* gene was located in the nucleus, Western blot showed that exogenous *FOXG1* was correctly expressed. Therefore, it can be considered that *FOXG1* gene is highly expressed in patients with non-small cell lung cancer, and its expression level is related to the overall prognosis of patients. The A549 cell line stably expressing *FOXG1* was successfully constructed.

Key words: *FOXG1*; TCGA; A549 cells; stable overexpression; lentivirus

FOXG1 是一个在进化上高度保守的 winged-helix 转录抑制因子, 属于 forkhead-box 转录因子家族, 在大脑发育过程中高表达, 主要通过调节神经细胞的增殖和分化, 参与端脑和大脑皮层的发育^[1-3]。目前对于 *FOXG1* 的研究多集中在神经系统中, 而对其在肿瘤方面的研究却很少。近年来, 许多研究将 *FOXG1* 转录因子和人类肿瘤联系起来。人们发现表达癌蛋白 *Qin/BF-1/FOXG1*, 在鸡中可导致肿瘤生成, 在鸡胚纤维母细胞中可诱导癌基因转化^[4-10]。*FOXG1* 在神经胶质瘤、肝胚细胞瘤、卵巢癌中呈现高表达, 能够增强肿瘤细胞的增殖能力。但是, 在乳腺癌中 *FOXG1* 呈低表达, 过表达 *FOXG1* 可以诱导乳腺癌细胞的凋亡^[11]。此研究表明, *FOXG1* 在乳腺癌中可能是作为一种抑癌基因发挥作用。尽管 *FOXG1* 在多种肿瘤中都有表达, 但是其在不同肿瘤类型中生理功能也不同, 并且在肿瘤发生发展中的分子机制仍不明确。

肺癌是对人类健康和生命威胁最大的常见恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类生命健康。当前肺

癌的治疗方式主要是外科手术、放、化疗等。放化疗一定程度上改善了肺癌患者生存率, 但是其 5 年生存率仍然不足 20%^[12]。因此, 对肺癌发生发展机制进行更深入的研究, 发现更多有效的治疗靶点是提高治疗效果的必然和迫切要求。*FOXG1* 作为一种重要的转录因子, 通过基因表达谱分析, 发现 *FOXG1* 在肺癌细胞系中的表达增高, 提示该基因可能成为肺癌的一个潜在治疗靶点^[13]。但是关于 *FOXG1* 在肺癌中的具体生物学功能及作用机制目前还未见相关报道。根据病理类型可以将肺癌分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中非小细胞肺癌约占我国肺癌的 80-85%。本研究旨在通过生物信息学分析 *FOXG1* 在非小细胞肺癌中的表达、预后相关性以及功能特性, 并通过慢病毒侵染的方法构建稳定表达人源 *FOXG1* 基因的肺癌 A549 细胞模型, 为后续进一步研究 *FOXG1* 的生物学功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

肺腺癌细胞株 A549、人胚胎肾细胞 HEK-293T 均购自中科院上海细胞库。

1.1.2 试剂与仪器

DMEM 培养液(批号: L110KJ)(培源生物公司)、胎牛血清(批号: 10270-106)(gibco 公司)、PBS(批号: G4200)(塞维尔生物公司)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号: T1300)(美仑生物公司)、嘌呤霉素(批号: P8230)(索莱宝生物公司)、lipo8000 转染试剂(批号: C0533)(碧云天生物公司)、一次性针头过滤器 0.45 μ m(批号: SLHV033RB)(Millipore 公司)、超滤离心管(批号: UFC901096)(Millipore 公司)、聚凝胺(批号: H8761)(索莱宝生物公司)、RIPA 蛋白裂解液(批号: R0100)(索莱宝生物公司)、6 $\times$ Loading buffer(批号: P0015F)(碧云天生物公司)、SDS-PAGE 凝胶(批号: PG112)(雅酶生物医药科技有限公司)、PVDF 膜(批号: IPVH00010)(Millipore 公司)、脱脂奶粉(批号: D8340)(索莱宝生物公司)、anti-FOXG1 antibody(批号: ab18259)(Abcam 公司)、GAPDH-antibody(批号: AC002)(ABclonal 公司)、HRP goat anti-Rabbit IgG(批号: AS014)(ABclonal 公司)、ECL 显影液(批号: PE0010)(索莱宝生物公司)、多聚甲醛(批号: P1110)(索莱宝生物公司)、TritonX(批号: 1139)(BioFroxx-赛国生物公司)、DAPI(批号: C0065)(索莱宝生物公司)、CO₂ 培养箱(批号: 3111 型)(Thermo Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

选用 TCGA(The cancer genome atlas, 癌症基因组图谱)数据库获取非小细胞肺癌相关数据, 设置筛选条件为: “Cases”、“bronchus and lung”、“TCGA”、“TCGA-LUAD”“TCGA-LUSC”、

“Files”、“transcriptome profiling”、“Gene Expression Quantification”及“HTSeq-FPKM”。应用 R(v3.5.3)软件提取“FOXG1”表达数据, 对 FOXG1 基因在非小细胞肺癌和正常组织中进行配对差异分析。利用“survival”包根据 FOXG1 在非小细胞肺癌中表达的中位数将患者分为高表达组和低表达组, 并根据两部分患者的总体生存情况绘制生存曲线。应用 R(v3.5.3)软件读取 TCGA 数据库中非小细胞肺癌基因表达数据及临床资料数据, 进行 Wilcoxon 秩和检验, 分析 FOXG1 表达与年龄、性别和肿瘤分期分级之间关系。应用基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)分析 FOXG1 基因表达水平对生物学通路基因集富集的影响。将下载准备的.cls、.gct 文件按默认的加权富集统计方法进行富集分析, 分析结果将 $P < 0.05$ 且界定为显著富集基因集。

1.2.2 细胞培养

肺腺癌细胞株 A549 以及人胚胎肾细胞 HEK-293T 生长于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中, 放置在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中进行培养。待细胞长满后, PBS 冲洗 2 次, 用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化, 将细胞重悬后制备成单细胞悬液用于后续实验。

1.2.3 嘌呤霉素筛选

将处于对数生长期 A549 细胞按照 5×10^4 个/mL 的密度接种至 24 孔板中, 待第二天细胞贴壁后, 将细胞分为空白对照组和实验组。空白组不加嘌呤霉素, 实验组分别加入 2.0 μ g/mL, 4.0 μ g/mL, 6.0 μ g/mL, 8.0 μ g/mL, 10.0 μ g/mL 的嘌呤霉素继续培养。在倒置显微镜下观察 0、24、48、72 h 的细胞状态, 以确定嘌呤霉素最佳浓度。

1.2.4 慢病毒包装与浓缩

将处于对数期的 HEK-293T 细胞以 1×10^6 /mL 的密度接种至 6 孔板中, 待细胞融合度达到 70%~80%时, 按照 lipo8000 转染试剂说明书进行操作, 将包装质粒 pSPAX2、包膜质粒 pMD2.G 和核心穿梭质粒 pWPXLd-IRES puro 或 pWPXLd-IRES puro-

FOXG1 以 3:1:4 的比例共转染入 HEK-293T 细胞。分别于 24、48、72 h 在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达。72 h 后, 收集细胞上清液, 3,500 rpm 离心 10 min 去除细胞碎片, 用孔径为 0.45 μm 的过滤器过滤上清液至超滤离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3,500 rpm 离心 25 min 后得到病毒原液, 分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.5 慢病毒侵染细胞

将 A549 单细胞悬液以 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 密度铺于六孔板, 次日待细胞融合至 40% ~ 50% 时, 我们将 300 μL 病毒原液和 1 μL 浓度为 10 mg/mL 的聚凝胺滴入六孔板八字混匀, 分别于 24、48、72h 置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表达。

1.2.6 Western blot

将单细胞悬液分别接种于六孔板, 待细胞贴壁长满后, 弃细胞上清后用预冷的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每孔加入 60 μL RIPA 蛋白裂解液静置 5 min; 细胞刮刀将细胞转移至 1.5mL Eppendorf 管中, 每隔 10 min 涡旋振荡 30 s, 共 3 次; 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 rpm 离心 30 min, 上清液即细胞总蛋白; 蛋白定量后, 加入 6 $\times$ Loading buffer 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min, 分装置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

取 50 μL 蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜; 5% 的脱脂奶粉封闭 1h, 加入一抗 anti-FOXG1 (1:1000 稀释)、anti- GAPDH (1:5000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜; 次日, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记二抗 (1:5000 稀释) 孵育 1 h; TBST 漂洗 3 次后, 使用 ECL 显影液进行显色, 通过 Bio-Rad image lab 成像系统扫描并保存图像。

1.2.7 细胞核染色

将 A549 细胞以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种至放有细胞爬片的 12 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 培养箱过夜培养。次日细胞贴壁且密度达到 70% ~ 80% 时, 丢弃培养基, PBS 冲洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min; PBS 洗 3 次后, 用 0.2% Triton X 通透 10 min; 加入浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染核 15 min 后, 将细

胞爬片进行封片, 置于倒置荧光显微镜下观察并保存图片。

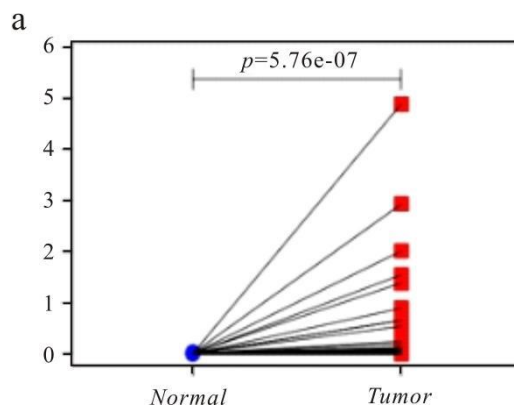
1.3 统计学方法

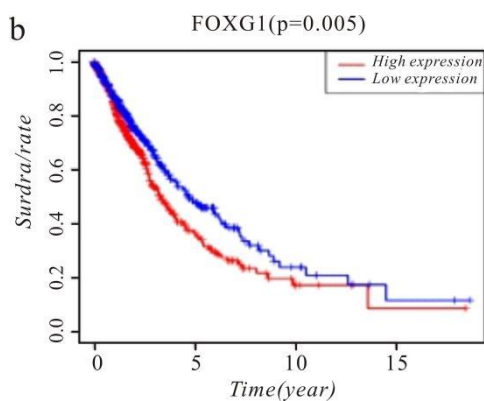
采用 R (v3.5.3) 软件处理经数据库下载的数据。Log-rank 检验计算 FOXG1 基因表达与非小细胞肺癌患者生存的关系。配对差异文件、临床病理特征采用 Wilcoxon 秩和检验进行分析。当 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXG1 在非小细胞肺癌中的表达和临床意义

从 TCGA 数据库下载了 FOXG1 在非小细胞肺癌中的相关数据, 最终获得 1037 例非小细胞肺癌和 108 例癌旁组织的 mRNA 表达水平及患者的临床信息, 包括年龄、性别、生存时间、死亡状态、病理组织类型、肿瘤分级等。通过配对差异分析发现, 与正常组织相比, FOXG1 在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显增高, 且差异存在统计学意义 ($P = 5.76\text{e-}07$, $***P < 0.001$) (图 1a)。生存曲线分析结果显示, 与 FOXG1 低表达组相比, 高表达组非小细胞肺癌患者的总生存时间显著降低 ($P = 0.005$, $*P < 0.05$) (图 1b)。同时, 我们分析了 FOXG1 与非小细胞肺癌患者临床相关性, 发现 FOXG1 表达与患者年龄相关 ($P = 0.043$, $*P < 0.05$), 但是与性别、肿瘤分级、TMN 分期等临床特征无明显相关性 (图 2)。以上结果提示, FOXG1 在非小细胞肺癌中高表达, 且 FOXG1 高表达影响患者的预后。



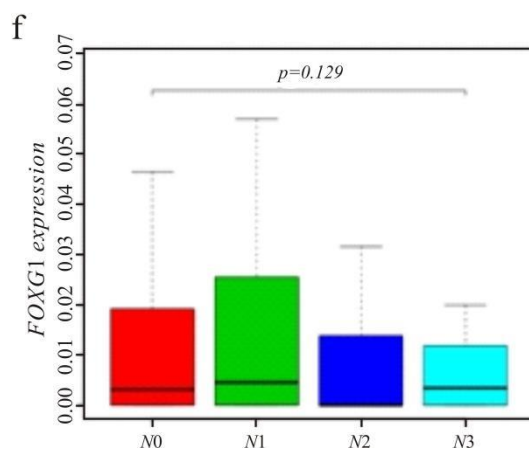
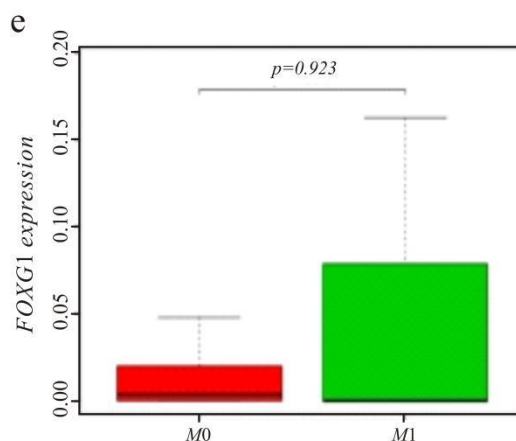
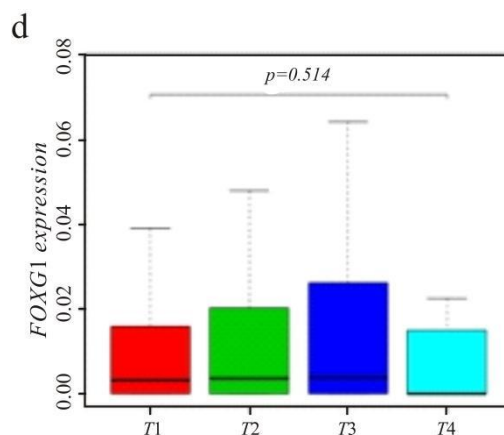
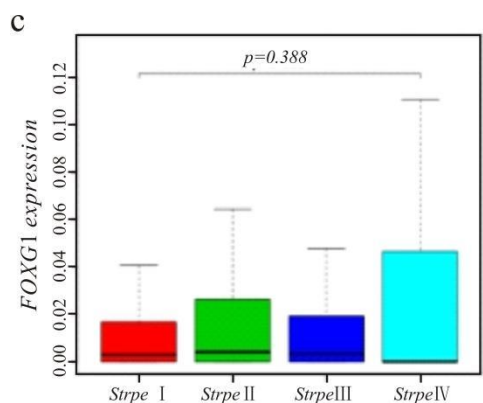
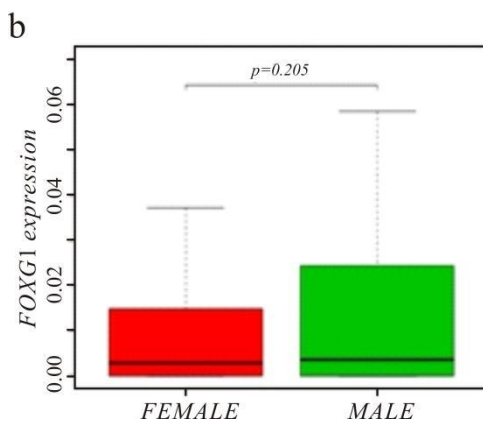
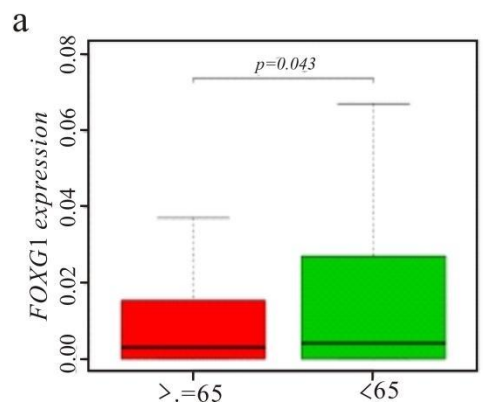


a. *FOXG1* 在非小细胞肺癌与正常组织中的表达;

b. *FOXG1* 的表达与非小细胞肺癌患者生存期的相关性

图1 TCGA 数据库分析 *FOXG1* 与非小细胞肺癌的相关性

Fig. 1 Analysis of the relevance between *FOXG1* and non-small cell lung cancer by TCGA database



a-f: *FOXG1* 分别与非小细胞肺癌患者的年龄、性别、肿瘤分级、TMN 分期的相关性

图2 *FOXG1* 与非小细胞肺癌患者临床病理特征相关性分析

Fig. 2 Analysis of correlation between *FOXG1* and clinicopathological features of patients with non-small cell lung cancer

2.2 *FOXG1* 基因富集分析

为了进一步探讨 *FOXG1* 在非小细胞肺癌发生发展过程中可能参与的细胞生物学行为和信号通路, 我们进行了基因富集分析。结果显示, 与正

常组织相比, 非小细胞肺癌组织中主要富集了细胞周期、Notch 信号通路、P53 信号通路、泛素介导的蛋白降解以及非小细胞肺癌等一系列高表达基因(表 1, 图 3), 提示 *FOXG1* 可能参与调控以上信号通路, 为后续研究 *FOXG1* 的功能提供了理论依据。

表 1 *FOXG1* 基因正相关富集的通路基因集
Table 1 Pathway gene set enriched in positive correlation of *FOXG1* gene

名称	ES	NES	P 值
细胞周期	0.69	2.22	0.00
Notch 信号通路	0.46	1.62	< 0.05
P53 信号通路	0.43	1.62	< 0.05
泛素介导的蛋白降解	0.40	1.58	< 0.05
非小细胞肺癌通路	0.50	1.83	< 0.05
胶质瘤通路	0.41	1.53	< 0.05

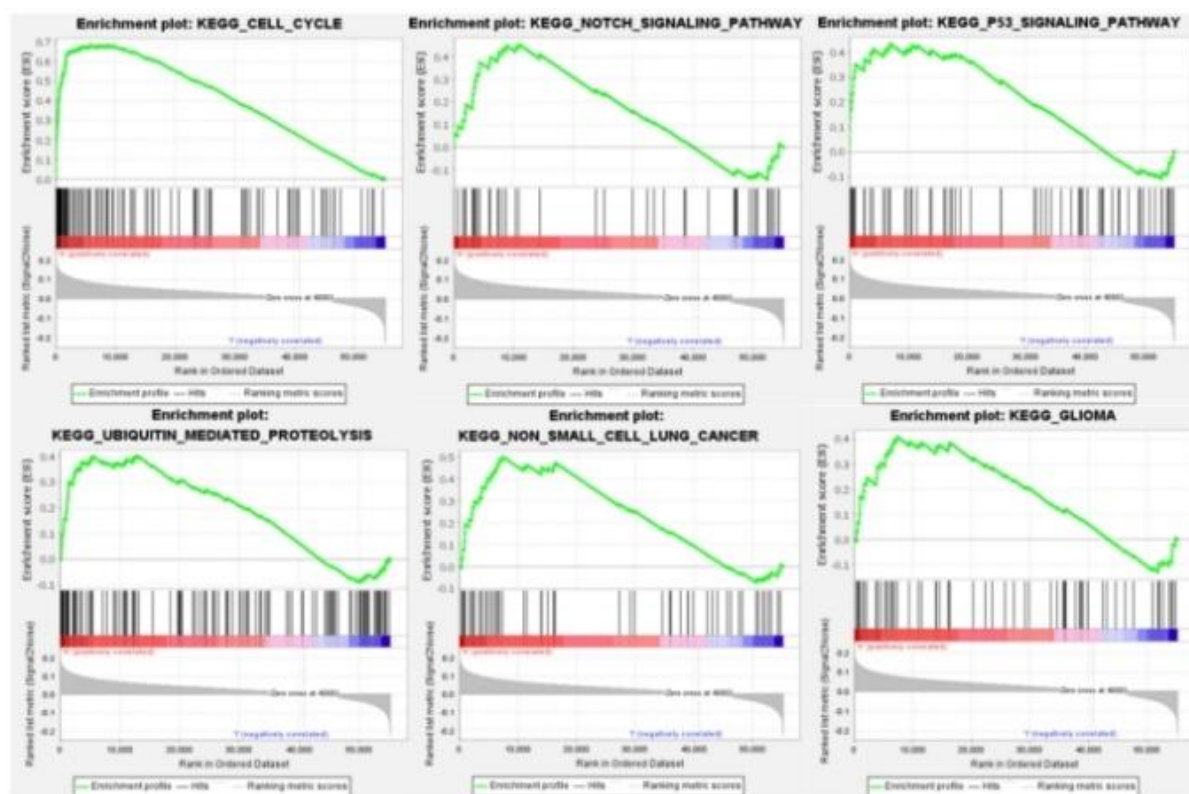


图 3 *FOXG1* 高表达的基因集富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of *FOXG1* high expression gene set

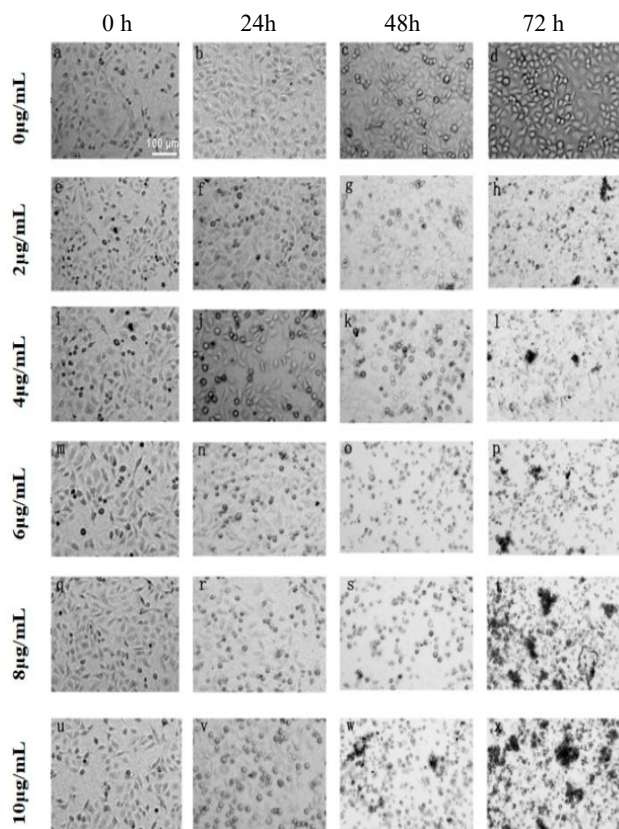
2.3 嘌呤霉素最佳浓度的筛选

为了确定嘌呤霉素对 A549 细胞的最佳筛选浓度, 在 A549 细胞中分别加入 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素, 并于 0、24、48、72 h 后观察细胞存活状态。结果显示, 与空白对照组相比, 实验组嘌呤霉素浓度越高、培养时间越长, 细胞死亡率越高(图 4)。当嘌呤霉素浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 大部分细胞在 72 h 内死亡; 当浓度大于 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞在 48 h 内基本死亡(表

2)。以上结果提示, A549 稳定细胞株筛选的嘌呤霉素最佳浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 不同浓度的嘌呤霉素与 A549 细胞死亡时间的关系
Table 2 Relationship between different concentrations of purinomycin and death time of A549 cells

嘌呤霉素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	A549 细胞死亡时间 (h)
0	-
2	72
4	72
6	48
8	48
10	48



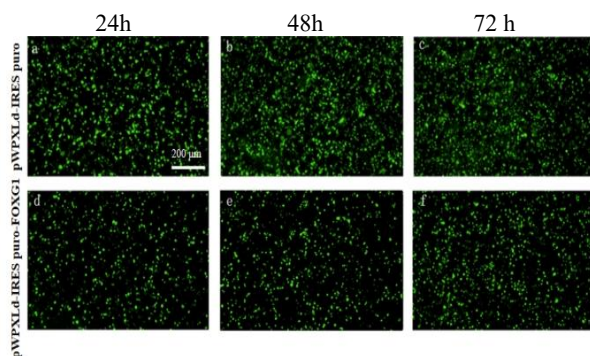
a-d: 空白对照组细胞 0、24、48、72 h 的细胞状态;
e-h: 2 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素作用于 A549 0、24、48、72 h 的细胞状态;
i-l: 4 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素作用于 A549 0、24、48、72 h 的细胞状态;
m-p: 6 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素作用于 A549 0、24、48、72 h 的细胞状态;
q-t: 8 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素作用于 A549 0、24、48、72 h 的细胞状态;
u-x: 10 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素作用于 A549 0、24、48、72 h 的细胞状态

图 4 不同浓度的嘌呤霉素作用于 A549 细胞 0、24、48、72 h 的细胞状态

Fig. 4 The cell status of A549 cells at 0、24、48、72h at different concentrations of puromycin

2.4 慢病毒包装

通过脂质体转染 HEK-293T 细胞进行病毒包装,并分别在 24、48、72 h 倒置荧光显微镜下观察细胞状态以及荧光强度。结果显示,转染 24 h 后细胞内有绿色荧光蛋白表达;随着时间的延长,绿色荧光的表达逐渐增多,转染效率达到 80% 以上(图 5)。转染 72 h 后,细胞培养上清液为澄清淡黄色,收集上清液浓缩得到高滴度、无复制能力和具有良好生物安全性的病毒原液用于感染 A549 细胞。



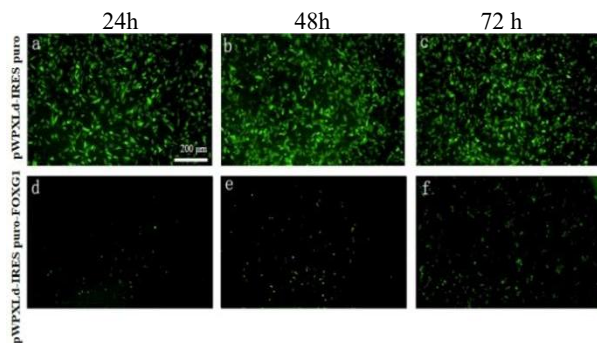
a-c: 对照组质粒转染 HEK-293T 细胞后 24、48、72 h 绿色荧光图; d-f: 实验组质粒转染 HEK-293T 细胞后 24、48、72 h 绿色荧光图

图 5 慢病毒表达载体共转染 HEK-293T 细胞荧光效率

Fig. 5 Fluorescence efficiency of HEK-293T cells transfected with lentivirus expression vectors.

2.5 慢病毒感染 A549 细胞以及稳定细胞株的筛选

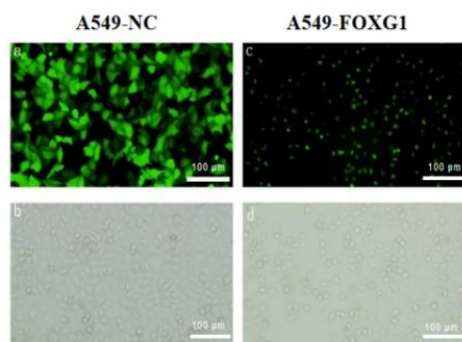
我们将获得的病毒原液感染 A549 细胞,并于 24、48、72 h 在倒置荧光显微镜下进行观察。结果显示,24 h 后对照和实验组细胞均可见绿色荧光表达,且随着时间延长荧光强度和感染效率逐渐增高,72 h 后对照组感染效率高达 80%,而实验组感染效率为 50% 左右(图 6)。我们在培养液中加入 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素进行筛选。对照组细胞筛选 3 d 后,实验组细胞筛选 1 周后,倒置荧光显微镜镜下观察发现 95% 以上的细胞均表达绿色荧光,分别命名为 A549-NC 和 A549-FOXG1(图 7)。



a-c: 对照组 pWPXLd-IRES puro 病毒感染 A549 细胞后 24、48、72 h 绿色荧光图; d-f: 实验组 pWPXLd-IRES puro-FOXG1 病毒感染 A549 细胞后 24、48、72 h 绿色荧光图

图 6 病毒感染 A549 细胞荧光效率

Fig. 6 Fluorescence efficiency of virus infecting A549 cells



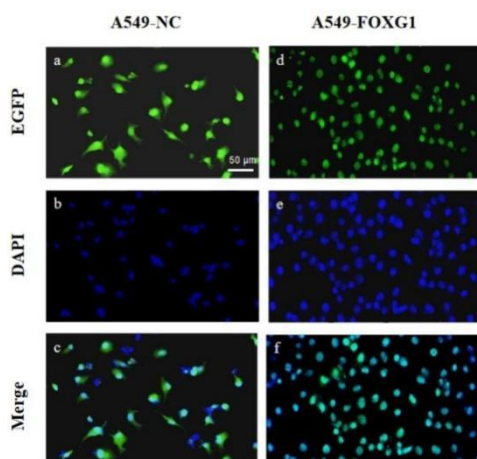
a, c: A549-NC、A549-FOXG1 稳定细胞株绿色荧光图;

b, d: A549-NC、A549-FOXG1 稳定细胞株白光图

图 7 A549-NC 和 A549-FOXG1 稳定细胞株的荧光效率

Fig. 7 Fluorescence efficiency of A549-NC and A549-FOXG1 stable cell lines

2.6 稳定细胞株的鉴定



a-c: 分别为 A549-NC 细胞的绿色荧光、DAPI 核染色、以及共定位图; d-f: 分别为 A549-FOXG1 细胞的绿色荧光、DAPI 核染色、以及共定位图

图 8 细胞核染色鉴定外源 FOXG1 的表达定位

Fig. 8 Identification of the expression location of exogenous FOXG1 by nuclear staining

我们分别通过细胞核染色和 Western blot 对 A549-NC 和 A549-FOXG1 两株稳定细胞株进行鉴定。首先, 我们通过细胞核染色观察 FOXG1 的定位。结果如图 8 所示, 蓝色荧光代表细胞核, A549-FOXG1 细胞的绿色荧光与蓝色荧光重叠, 表明 EGFP-FOXG1 融合蛋白定位在细胞核内。而对对照组 A549-NC 细胞的绿色荧光则分布在整個细胞。接着我们通过 Western blot 在蛋白水平上检测了 FOXG1 的表达, 与对照组 A549-NC 细胞相比, 在

稳定表达 FOXG1 的 A549-FOXG1 细胞中, 不仅可以检测到内源 FOXG1 的表达 (分子量 50 kDa), 还可以检测到大量外源融合蛋白 EGFP-FOXG1 的表达 (分子量为 77 kDa) (图 9)。结果表明, FOXG1 在 A549 细胞中能够正确表达和稳定细胞株构建成功。

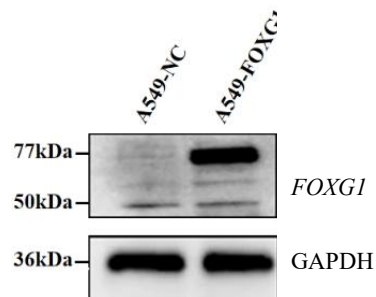


图 9 A549-NC 和 A549-FOXG1 细胞中 FOXG1 蛋白的表达

Fig. 9 FOXG1 protein expression in A549-NC and A549-FOXG1 cells

3 讨论

肺癌在我国是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在男性肿瘤中居于首位, 且发病率及死亡率均迅速增长。肺癌的发生发展是一个复杂的过程, 涉及的基因众多, 包括癌基因和抑癌基因、信号传导和细胞周期相关基因、侵袭转移相关基因等。大多数研究认为肺癌的发病原因与遗传和环境因素有关, 肺癌患者常见的驱动基因有 EGFR、KRAS、BRAF、ALK、ROS1、MET 等^[14-20], 肺癌的发生与这些驱动基因的突变和异常表达密切相关。

FOXG1 作为转录抑制因子, 可直接作用于靶基因或与其它转录因子相互作用共同发挥负调控作用。目前已有的报道表明, FOXG1 主要通过调控细胞增殖、凋亡、迁移等过程参与多种肿瘤的发生发展。在神经胶质瘤中, FOXG1 可以通过与 FOXO-Smad 形成复合物抑制其转录活性, 进一步抑制生长抑制基因 p21Cip1 的表达, 从而调控胶质瘤细胞的增殖^[6,21]。在卵巢癌中, 过表达 FOXG1 可以抑制 TGF- β 引起的 p21WAF1/CIP1 的表达, 并

且增强细胞的增殖能力^[10]。在结直肠癌和肝癌中, *FOXG1* 可以通过促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进细胞的侵袭和转移^[9,22-23]。在乳腺癌中, *FOXG1* 可以通过上调致癌基因 *AIB1* 的表达诱导乳腺癌细胞的凋亡^[24]。对于 *FOXG1* 是否参与肺癌的发生发展, 目前并没有相关报道。

在本研究中, 我们通过 TCGA 数据库分析发现, *FOXG1* 在非小细胞肺癌中呈现高表达, 并且 *FOXG1* 的高表达能够引起患者的预后不良, 提示 *FOXG1* 可能参与非小细胞肺癌的发生发展。同时, 通过基因富集分析研究了 *FOXG1* 基因表达水平对信号通路基因集富集的影响, 共筛选出 6 个信号通路: 细胞周期、Notch 信号通路、P53 信号通路、泛素介导的蛋白降解、非小细胞肺癌以及胶质瘤相关通路。其中, 已有研究证明 *FOXG1* 可以调控细胞周期负调控蛋白 *P21Cip1* 的表达; *FOXG1* 与 Notch 信号的下游激活因子 *Groucho* 和 *Hes* 蛋白相互作用, 共同发挥转录抑制作用; 在胶质瘤中, *FOXG1* 过表达能够促进胶质瘤细胞的增殖, 且表达量与胶质瘤分级正相关^[6,21,25-28]表明我们通过基因富集分析筛选的信号通路结果可信。P53 信号通路和泛素介导的蛋白降解途径参与调节多种生命过程, 如细胞增殖、凋亡、分化、衰老等。因此, 我们推测 *FOXG1* 可能通过 P53、Notch 等信号通路参与非小细胞肺癌的发生发展。

基于以上生物信息学分析结果, 为了进一步了解 *FOXG1* 在非小细胞肺癌发生、发展过程中的作用, 选择合适的肺癌细胞系中进行功能研究。通过查阅 Cancer Cell Line Encyclopedia 数据库发现 *FOXG1* 在不同非小细胞肺癌细胞系中的表达水平, 在 92 种非小细胞肺癌细胞系中 *FOXG1* 的表达水平不同且差异较大。A549 细胞作为非小细胞肺癌细胞的一种, 被广泛用作非小细胞肺癌分子机制的实验探索。数据库中显示 *FOXG1* 在 A549 细胞中表达水平相对较低, 因此, 为了进一步研究 *FOXG1* 在非小细胞肺癌中发挥的作用, 选取了内源 *FOXG1* 表达量相对较低的肺癌细胞系 A549

进行过表达, 通过慢病毒包装、侵染、嘌呤霉素筛选和鉴定, 获得了稳定过表达 *FOXG1* 的肺癌细胞株 A549, 为后续进一步探讨 *FOXG1* 对肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭等细胞生物学功能的影响奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hanashima C, Li SC, Shen L, et al. Foxg1 suppresses early cortical cell fate[J]. Science, 2004, 303(5654): 56-59.
- [2] Siegenthaler J A, Tremper-Wells B A, Miller M W. Foxg1 haploinsufficiency reduces the population of cortical intermediate progenitor cells: effect of increased p21 expression[J]. Cereb Cortex, 2008, 18(8): 1865-1875.
- [3] Bourguignon C, Li J, Papalopulu NJD. XBF-1, a winged helix transcription factor with dual activity, has a role in positioning neurogenesis in *Xenopus* competent ectoderm[J]. Development, 1998, 125(24): 4889-4900.
- [4] Jian, Thurm, America HJPotNAoSotUSo. Oncogenic transformation induced by the Qin protein is correlated with transcriptional repression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(20): 10885-10888.
- [5] Sonderegger C K, Narisawa-Saito M, Vogt P K. The C-terminal region of cellular Qin oligomerizes: correlation with oncogenic transformation and transcriptional repression[J]. Oncogene, 2003, 22(13): 1908-1915.
- [6] Chen J, Wu X, Xing Z, et al. FOXG1 Expression Is Elevated in Glioma and Inhibits Glioma Cell Apoptosis[J]. J Cancer, 2018, 9(5): 778-783.
- [7] Seoane J, Le HV, Shen L, et al. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation[J]. Cell, 2004, 117(2): 211-223.
- [8] Verginelli F, Perin A, Dali R, et al. Transcription factors FOXG1 and Groucho/TLE promote glioblastoma growth[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2956.
- [9] Adesina A M, Nguyen Y, Guanaratne P, et al. FOXG1 is overexpressed in hepatoblastoma[J]. Hum Pathol, 2007, 38(3): 400-409.
- [10] Chan DW, Liu V, To R, et al. Overexpression of FOXG1 contributes to TGF- β resistance through inhibition of P21WAF1/CIP1 expression in ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 2009, 101(8): 1433-1443.
- [11] Li J V, Chien C D, Garee J P, et al. Transcriptional Repression of AIB1 by FoxG1 Leads to Apoptosis in Breast Cancer Cells[J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(7): 1113-1127.

- [12] 李冰. 转录因子 SOX7 在肺癌中的表达及其临床意义[D]. 长沙:中南大学, 2014.
- [13] 蔡彤惠. miR-96 靶向调节 DAL-1 及 CADM1 表达对非小细胞肺癌细胞生物学行为的影响[D]. 广州:广州医科大学, 2017.
- [14] 沈琴琴. Lyn 在肺腺癌中的表达及 Lyn 高表达对 A549 细胞生物学行为的影响[D]. 重庆:西南医科大学, 2016.
- [15] Bircan, Ahmet, Baloglu, et al. EGFR and KRAS mutations in Turkish non-small cell lung cancer patients: a pilot study[J]. *Med. Oncol*, 2014, 31(8):1-8.
- [16] Barlesi F, Mazieres J, Merlio J P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT)[J]. *Lancet*, 2016, 387(10026): 1415-1426.
- [17] Tsao A S, Scagliotti G V, Bunn P A, et al. Scientific Advances in Lung Cancer 2015[J]. *J. Thorac Oncol*, 2016, 11(5): 613-638.
- [18] 宋圆红, 黄玲, 顾俊菁. 大蒜素对肺腺癌细胞侵袭生物学行为影响的初步研究[J]. *井冈山大学学报:自然科学版*, 2022, 43(1):52-56.
- [19] Engelman J A, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [20] Liang W, Wu X, Fang W, et al. Network meta-analysis of erlotinib, gefitinib, afatinib and icotinib in patients with advanced non-sm all-cell lung cancer harboring EGFR mutations[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e85245.
- [21] Richard S A, Jia-Hao Z. Elucidating the pathogenic and biomarker potentials of FOXG1 in glioblastoma[J]. *Oncol Rev*, 2020, 2020(14): 444.
- [22] 吴海霞, 钱程, 刘春刚, 等. FOXG1 在结直肠癌侵袭及转移中的作用及机制[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(5): 752-760.
- [23] Zheng X, Lin J, Wu H, et al. Forkhead box (FOX) G1 promotes hepatocellular carcinoma epithelial-Mesenchymal transition by activating Wnt signal through forming T-cell factor-4/Beta-catenin/FOXG1 complex[J]. *J EXP CLIN CANC RES*, 2019, 38(1): 475-475.
- [24] Marcal N, Patel H, Dong Z, et al. Antagonistic Effects of Grg6 and Groucho/TLE on the Transcription Repression Activity of Brain Factor 1/FoxG1 and Cortical Neuron Differentiation[J]. *Int Rev Cel Mol Bio*, 2005, 25(24): 10916-10929.
- [25] Yao J, Lai E, Stifani S. The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(6):1962-1972.
- [26] Maral N, Patel H, Dong Z, et al. Antagonistic effects of Grg6 and Groucho/TLE on the transcription repression activity of brain factor 1/FoxG1 and cortical neuron differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24):10916-10929.
- [27] Verginelli F, Perin A, Dali R, et al. Transcription factors FOXG1 and Groucho/TLE promote glioblastoma growth[J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2956.
- [28] Wang L, Wang J, Jin T, et al. FoxG1 facilitates proliferation and inhibits differentiation by downregulating FoxO/Smad signaling in glioblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(1): 46-53.