DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0145 **文章编号** 1671-8852(2025)05-0606-06

成纤维细胞生长因子7抑制膀胱癌细胞增殖及上皮间质转化过程

郭林发 杨丽洁 王晓龙 白小杰 刘同族
武汉大学中南医院泌尿外科 湖北 武汉 430071

摘要 目的：研究成纤维细胞生长因子7(FGF7)在膀胱癌中的表达情况及其对膀胱癌细胞增殖、上皮间质转化(EMT)的影响。方法：采用免疫组化、qRT-PCR及Western Blot检测正常膀胱组织/细胞系和膀胱癌组织/细胞系中FGF7的表达情况。使用质粒构建过表达FGF7的膀胱癌细胞模型。采用CCK-8、平板克隆形成试验、划痕实验和Transwell侵袭实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力。采用Western Blot实验检测EMT相关蛋白表达情况。结果：膀胱癌组织/细胞系中FGF7水平低于正常膀胱组织/上皮细胞。FGF7过表达后，膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力受到抑制。Western Blot结果显示，FGF7过表达后，膀胱癌细胞的E-cadherin蛋白表达上升，N-cadherin、Vimentin及Snail蛋白表达下降。结论：FGF7在膀胱癌中表达下调，过表达FGF7可以抑制膀胱癌细胞增殖及上皮间质转化过程。

关键词 成纤维细胞生长因子7；膀胱癌；增殖；迁移；侵袭；上皮间质转化
中图分类号 R737.14
文献标识码 A **开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

Fibroblast growth factor 7 inhibits the proliferation and epithelial-mesenchymal transformation process of bladder cancer cells

GUO Linfa, YANG Lijie, WANG Xiaolong, BAI Xiaojie, LIU Tongzu
Dept. of Urology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the expression of fibroblast growth factor 7 (FGF7) in bladder cancer and its influence on the proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of bladder cancer cells. **Methods:** The expression of FGF7 in normal bladder tissues/cell lines and bladder cancer tissues/cell lines was evaluated using immunohistochemistry, qRT-PCR, and Western Blot. We further generated a bladder cancer cell model with FGF7 overexpressed. Cell proliferation, migration, and invasion capabilities were assessed using CCK-8 assay, colony formation assay, scratch assay, and Transwell invasion assay. Western Blot analysis was employed to evaluate the expression of EMT-related proteins. **Results:** FGF7 levels were significantly lower in bladder cancer tissues/cell lines compared to normal bladder urothelial tissues/cells. Overexpression of FGF7 inhibited the proliferation, migration, and invasion of bladder cancer cells. Besides, up-regulation of FGF7 could increase the expression of E-cadherin while decreasing the expression of N-cadherin, Vimentin, and Snail. **Conclusion:** FGF7 is downregulated in bladder cancer, and up-regulation of FGF7 can inhibit

课题来源：湖北省卫生健康委员会科研项目(编号：WJ2021M160)
作者简介：郭林发，男，1997—，医学硕士生，主要从事泌尿系恶性肿瘤研究，E-mail:guolinfa@whu.edu.cn
通信作者：刘同族，男，1971—，医学博士，主任医师，主要从事泌尿系结石及肿瘤研究，E-mail:liutongzu@163.com

the proliferation and EMT process of bladder cancer cells.

Key Words　Fibroblast Growth Factor 7; Bladder Cancer; Proliferation; Migration; Invasion; Epithelial-Mesenchymal Transition

膀胱癌(bladder cancer，BLCA)是泌尿外科最常见的恶性肿瘤之一，其发病率呈逐年上升趋势[1]。2020年，全球有57万余膀胱癌确诊病例，死于膀胱癌者超过21万，这对医疗保健系统是一个相当大的负担[2]。膀胱癌是一种异质性疾病，根据肿瘤浸润的深度分为非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer，NMIBC)和肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer，MIBC)[3]。非肌层浸润性膀胱癌患者的治疗包括经尿道膀胱肿瘤切除术和辅助膀胱灌注治疗[3]。对于肌层浸润性膀胱癌，需要更积极的治疗，包括根治性膀胱切除术＋尿流改道术及辅助放/化疗等，以降低转移和死亡风险[4]。然而，晚期膀胱癌复发和转移风险高，预后极差。因此，探寻与膀胱癌复发和转移相关的基因对改善晚期膀胱癌患者预后具有重要意义。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor，FGF)包含一大类肝素结合生长因子，参与调控许多细胞和生理过程，包括胚胎发育、细胞增殖、血管生成、侵袭和迁移等[5-6]。FGF通过结合和激活FGF受体(fibroblast growth factor receptor，FGFR)家族成员来发挥其不同的功能[6]。研究[7-9]发现，FGF7在多种恶性肿瘤如子宫内膜癌、乳腺癌及胃癌中表达异常，并与肿瘤发生发展密切相关。然而，目前尚无FGF7在膀胱癌中表达情况及功能的相关研究。为此，本研究首先应用人膀胱癌组织及细胞系，探究FGF7在膀胱癌中的表达情况；同时构建FGF7过表达细胞模型研究FGF7对膀胱癌细胞增殖、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition，EMT)的影响。

1　材料与方法

1.1　主要材料　膀胱癌细胞系UMUC3、T24、5637及人尿路上皮永生化细胞系SV-HUC-1保存于武汉大学中南医院科研中心。DMEM/高糖培养基、McCoy′s 5A培养基及RPMI 1640培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司。胎牛血清(foetal bovine serum，FBS)、0.25%胰酶购自美国Gibco公司。空载质粒及搭载FGF7基因的过表达质粒构建由湖南丰晖生物科技有限公司完成。GP-transfect-Mate转染试剂购自苏州吉玛生物科技有限公司。GAPDH、FGF7、E-cadherin、N-cadherin、Snail、Vimentin抗体和二抗、RNA逆转录试剂盒及PCR荧光实时定量SYBR Green qPCR试剂盒购自武汉ABclonal生物科技有限公司。RNA提取试剂盒TRIzol购自美国Invitrogen公司。CCK-8 kit试剂购自中国诺唯赞公司。Transwell小室及Matrigel基质胶购自美国Corning公司。GP-transfect-Mate转染试剂购自苏州吉玛生物科技有限公司，酶标仪购自芬兰Thermo Labsystems公司。

1.2　临床样本　选取2020年9月—2021年6月在武汉大学中南医院经病理检测首次确诊为膀胱癌的患者，并在其术中获取肿瘤组织及癌旁组织样本，共25对。本研究经本院伦理委员会审核并批准(伦理号：JC2019-025)，所有病人术前均签署知情同意书。

1.3　免疫组化　采用链霉亲和素-生物素复合物技术法，简要步骤如下：4%多聚甲醛溶液固定样本、石蜡包埋、切片后，依次脱水、抗原修复、封闭、一抗4 ℃孵育过夜、室温孵育二抗1 h、DAB显色、苏木素染胞核，最后脱水封片。染色结果判定：光学显微镜200×视野下，根据阳性着色强度，将FGF7表达量评为0分(无色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)和3分(棕褐色)。

1.4　细胞培养及转染　UMUC3使用含10%FBS的DMEM/高糖培养基培养，T24使用含10%FBS的McCoy′s 5A培养基培养，5637及SV-HUC-1使用含10%FBS的RPMI 1640培养基培养；细胞培养于37 ℃、含5%CO_2的培养箱中，每48 h换液一次，待细胞密度为80%左右时，使用0.25%胰酶进行消化传代，传代比例为1∶3。构建过表达FGF7细胞模型(OE组)时，将处于对数生长期的细胞接种于6孔板，待细胞密度达到近40%时，使用GP-transfect-Mate转染试剂依照说明书进行转染，用空载质粒构建对照组(Vector组)。

1.5　实时荧光定量PCR(qRT-PCR)　以RNA提取试剂盒TRIzol提取细胞总RNA，RNA逆转录试剂盒合成cDNA，利用SYBR Green qPCR试剂盒进行实时荧光定量PCR。每组设立3个复孔，实验重复3次。以GAPDH为内参，引物序列见表1。

表1 引物序列

Gene (Human)	Forward primer (5′−3′)	Reverse primer (5′−3′)
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
FGF7	TCCTGCCAACTTTGCTCTACA	CAGGGCTGGAACAGTTCACAT

1.6 CCK-8法检测细胞增殖 本研究采用CCK-8法检测细胞增殖能力。简言之,将待测细胞以3 000细胞/孔的密度接种在96孔板后,置于37 ℃、含5%CO_2的培养箱中。分别于培养的第0,1,2,3天取出,吸去原培养基,每个孔加入100 μL无血清培养基+10 μL CCK-8试剂,在培养箱中孵育1 h后,使用酶标仪测量各孔在450 nm处的吸光度,依据结果绘制细胞生长曲线。每组设立4个复孔,

1.7 平板克隆形成实验 取经处理后的对数生长期细胞,以400个细胞/孔的密度分别接种于6孔板中培养约2周。依次使用4%多聚甲醛固定25 min、0.3%结晶紫溶液染色25 min。

1.8 细胞划痕实验 转染后待细胞密度达到90%~100%时长至接近完全汇合,用200 μL移液枪枪头沿中轴垂直轻画直线,PBS缓冲液清洗2遍后,加入无血清培养基,置于培养箱中继续培养。分别于划线后0,24,48 h使用倒置光学显微镜观察细胞的迁移情况并拍照记录。

1.9 Transwell侵袭实验 以无血清培养基Matrigel基质胶=1∶8的比例配置稀释基质胶,各小室加入100 μL稀释基质胶,均匀铺满上室底部,37 ℃孵育过夜。将处于对数生长期的细胞用胰酶消化后,用无血清培养基重悬并调整细胞浓度为2×10^5个•mL^{-1}。取200 μL(约含4×10^4个细胞)接种在Transwell上室,下室内加入含10%FBS的完全培养基,在37 ℃、含5%CO_2的培养箱中培养24 h。取出小室,4%多聚甲醛固定25 min,0.3%结晶紫溶液染色25 min,棉签拭去上室底部未穿过的细胞。清洗小室,使用倒置光学显微镜随机选取4个视野,拍照并计数穿过膜的细胞。

1.10 Western Blot 转染后72 h,胰酶消化后离心收集细胞,加入适量RIPA、PMSF冰上裂解30 min,BCA法蛋白定量,100 ℃水浴10 min,使蛋白质样品充分变性。上样后进行SDS-PAGE电泳,然后转至PVDF膜上。室温下使用5%脱脂牛奶封闭2 h,随后加入一抗GAPDH(1∶1 000)、FGF7(1∶1 000)、E-cadherin(1∶1 000)、N-cadherin(1∶1 000)、Snail(1∶1 000)、Vimentin(1∶1 000)在4 ℃摇床慢摇过夜,次日用二抗孵育2 h,TBST洗膜3次之后ECL显影,检测蛋白条带,用Image J软件定量分析目标蛋白的灰度值。

1.11 统计学分析 实验数据采用SPSS 16.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。所有实验均重复3次,定量数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用方差分析。双侧$P<0.05$被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌中FGF7表达情况 与癌旁组织相比,膀胱癌组织中的FGF7表达水平明显降低(图1A)。此外,与人膀胱正常尿路上皮细胞SV-HUC-1相比,UMUC3、T24和5637细胞中FGF7的mRNA及蛋白表达水平均显著降低(图1B、1C),这与FGF7在膀胱癌组织中的表达一致。其中UMUC3和T24细胞中FGF7的表达水平最低,因而选用UMUC3和T24细胞进行后续研究。

2.2 膀胱癌细胞中FGF7过表达效率验证 分别用搭载FGF7的质粒和空载质粒转染膀胱癌细胞后,对不同组细胞中FGF7的mRNA水平和蛋白水平进行检测,OE-FGF7组的mRNA水平和蛋白水平均显著高于Vector组($P<0.001$)(图2)。

2.3 过表达FGF7抑制膀胱癌细胞增殖 CCK-8实验显示,与对照组相比,OE-FGF7组UMUC3和T24细胞系的增殖能力显著降低(图3A);与此结果相一致,平板克隆形成实验显示,OE-FGF7组细胞的集落数目较Vector组明显减少,集落数目差异有统计学意义($P<0.001$)(图3B)。

2.4 过表达FGF7抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭能力 划痕实验结果显示,与对照组相比,OE-FGF7组细胞划痕愈合率显著降低,表明过表达FGF7降低了膀胱癌细胞的迁移能力($P<0.001$);Transwell侵袭实验结果显示,与对照组相比,OE-FGF7组侵袭的细胞数显著减少,表明过表达FGF7降低膀胱癌细胞的侵袭能力($P<0.001$)(图4)。

2.5 过表达FGF7抑制膀胱癌细胞上皮-间质转化 Western Blot法检测转染后EMT相关蛋白的变化,结果显示,OE-FGF7组E-cadherin的蛋白表达水平较对照组增加($P<0.001$),而N-cadherin、Vimentin和Snail的表达水平下降($P<0.01$)(图5)。

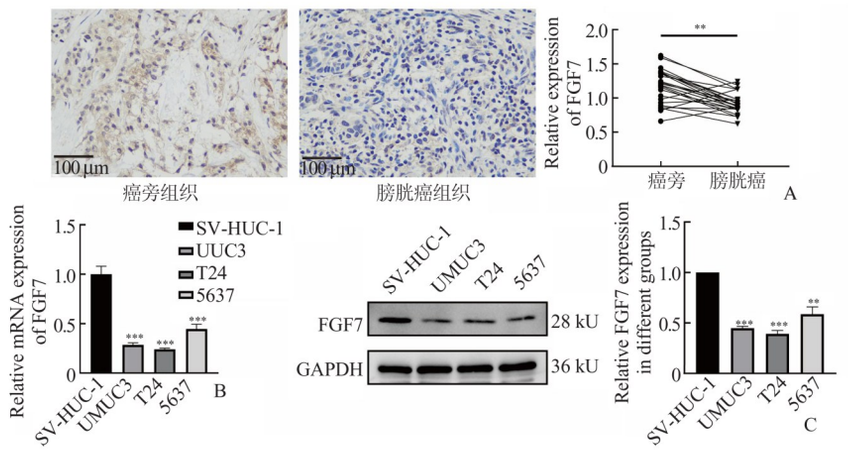


图 1　FGF7 的表达在膀胱癌组织和细胞系中均显著下调

A. 免疫组化检测癌旁组织和膀胱癌组织中 FGF7 的表达情况（×200 倍）及其量化分析（癌旁组织 $n=25$，膀胱癌组织 $n=25$），$^{**}P<0.01$；B. qRT-PCR 检测正常膀胱尿路上皮细胞系（SV-HUC-1）和膀胱癌细胞系（UMUC3、T24 和 5637）中 FGF7 的 mRNA 水平；C. Western Blot 检测正常膀胱尿路上皮细胞系和膀胱癌细胞系中 FGF7 的蛋白表达情况及量化分析。与 SV-HUC-1 相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

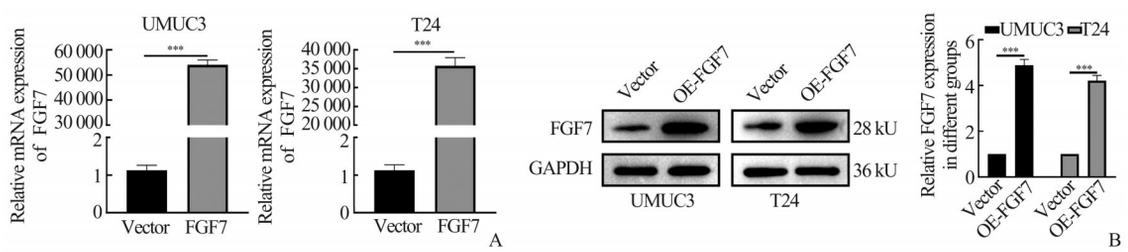


图 2　qRT-PCR 和 Western Blot 验证转染后 FGF7 的过表达效率

A. qRT-PCR 检测转染后膀胱癌细胞系（UMUC3 和 T24）中 FGF7 的 mRNA 水平；B. Western Blot 检测转染后膀胱癌细胞系（UMUC3 和 T24）中 FGF7 的蛋白表达及量化分析。与 Vector 组相比，$^{***}P<0.001$

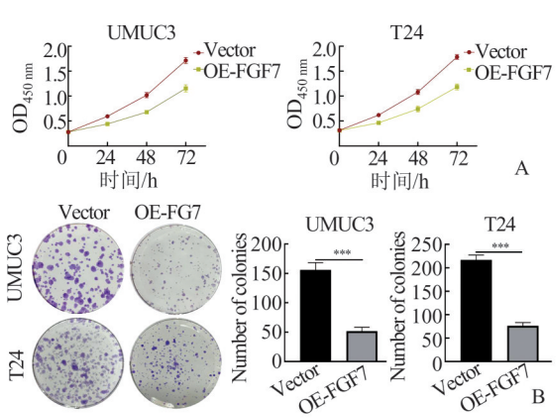


图 3　过表达 FGF7 对膀胱癌细胞增殖能力的影响

A. CCK-8 实验检测过表达后膀胱癌细胞的增殖能力；B. 平板克隆形成实验显示过表达 FGF7 后膀胱癌细胞的增殖能力显著下降。和 Vector 组相比，$^{***}P<0.001$

3　讨论

肿瘤转移是导致膀胱癌患者死亡的主要原因之一，其发生发展的具体机制尚不明确。对于肌层浸润性膀胱癌，其主要治疗是根治性膀胱切除术及术后辅助性放化疗[4]。虽然最新兴起的免疫治疗及靶向治疗，如 PD-1、PD-L1 等药物的应用，可使部分患者受益，然而膀胱癌患者的复发率和转移率仍无明显降低[10]。因此，了解膀胱癌转移相关的分子机制，寻找潜在的治疗靶标，对改善膀胱癌患者的预后具有重要价值。

成纤维细胞生长因子 7（FGF7），又名为角化细胞生长因子（keratinocyte growth factor，KGF），是成纤维细胞生长因子家族中的一员[5]。FGF7 最初是作为一种强大的具有有丝分裂原作用的生长因子而被发现[11]。后续研究[12]发现，FGF7 具有一系列的生物学功能，如调节细胞增殖、迁移、分化、凋亡及上皮间质相互作用等。近年来，越来越多的研究表明，FGF7 参与多种肿瘤的发生发展过程。LIU 等[13]发现 FGF7 在胆管癌组织中表达增高，FGF7 能够促进胆管癌细胞增殖，并与肿瘤耐药相关。HUANG 等[9]研究显示，FGF7 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 上调血小板反应蛋白-1，最终促进胃癌的迁移和侵袭。MILTON 等[14]

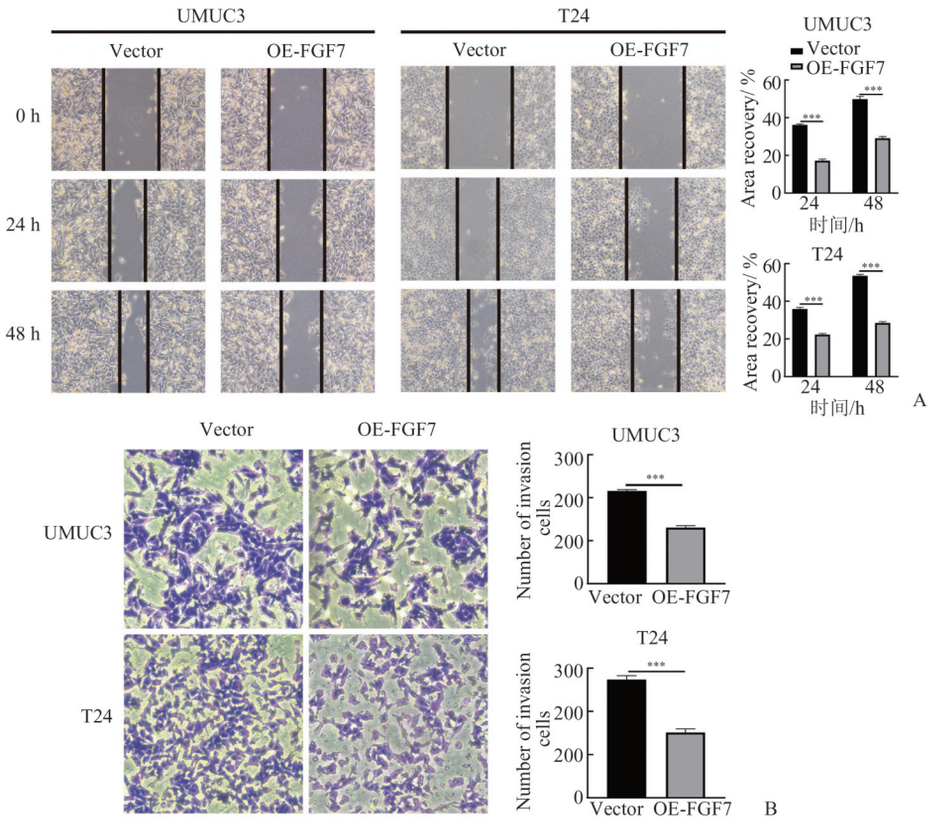


图4 过表达FGF7对膀胱癌细胞(UMUC3、T24)迁移及侵袭能力的影响

A. 划痕实验检测FGF7过表达后膀胱癌细胞的迁移能力;B. Transwell侵袭实验检测FGF7过表达后膀胱癌细胞的侵袭能力。和Vector组相比,$^{***}P<0.001$

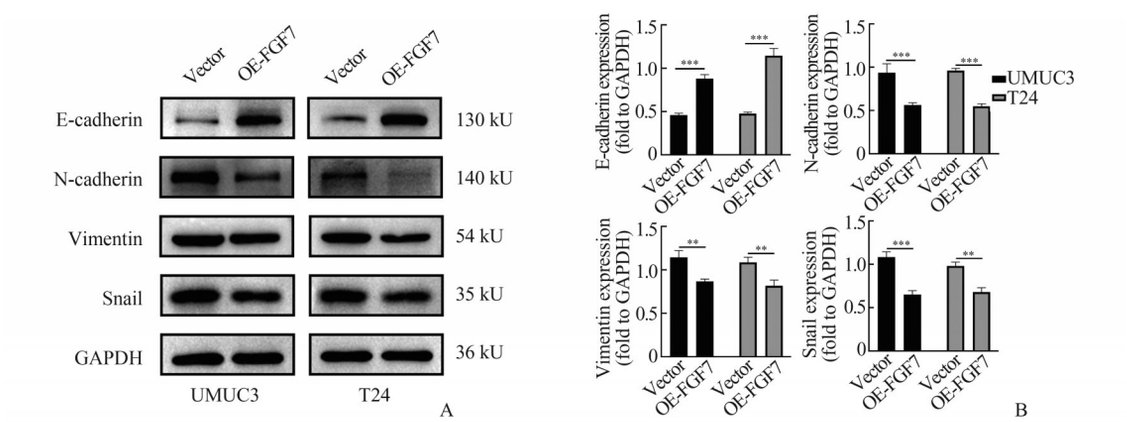


图5 过表达FGF7后膀胱癌细胞(UMUC3、T24)中EMT标志物的变化情况

A. Western Blot检测过表达FGF7后膀胱癌细胞中EMT相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin及Snail)水平变化;B. 过表达FGF7后EMT相关蛋白变化的量化分析。与Vector组相比,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

研究发现,FGF7通过与受体FGFR2结合,促进横纹肌肉瘤的增殖,并提高其化疗耐药性。

本研究首先通过免疫组化、实时荧光定量PCR及Western Blot证实FGF7在膀胱癌组织及细胞中低表达。为进一步研究FGF7在膀胱癌中的功能,我们使用搭载FGF7的质粒构建了FGF7过表达细胞模型。采用CCK-8、平板克隆形成实验、划痕实验、Transwell侵袭实验等检测FGF7过表达对膀胱癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。实验结果显示,过表达FGF7后,膀胱癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力均明显降低,这些结果说明FGF7具有抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

EMT是极化的上皮细胞失去黏附特性而获得间充质特性,导致细胞迁移和侵袭功能改变的细胞过程[15]。EMT已被证实参与多种生物学过程,包括胚胎发育、伤口愈合、纤维化和恶性肿瘤,尤其是恶

性肿瘤的转移[16-17]。研究[18]证实，EMT是肿瘤转移的关键过程，在肿瘤转移的启动至完成各阶段均发挥重要作用。EMT导致细胞去极化、细胞-细胞连接的破坏、基底膜的变性及癌细胞迁移和侵袭能力的增强，从而促进肿瘤的转移[19]。EMT的一个重要标志是上皮标志物如E-cadherin、zonula occluden-1表达减少；而间充质标志物如N-cadherin、Vimentin及Snail的表达增多[20]。为研究FGF7对膀胱癌细胞EMT的影响，我们采用Western Blot检测FGF7过表达后EMT相关标志物的变化。实验结果显示，FGF7过表达后，E-cadherin的表达水平显著升高，而N-cadherin、Vimentin及Snail的表达水平显著下降。结果提示，FGF7抑制膀胱癌细胞的EMT过程。

综上，FGF7在膀胱癌中表达下调。FGF7的表达能够抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移及侵袭，并抑制膀胱癌细胞的EMT过程。本研究有助于了解膀胱癌转移的相关机制，并有望成为膀胱癌治疗的一个新靶点。但本研究还存在一定局限性，若能进一步完善敲低FGF7对膀胱癌细胞的生物学特性的影响，则结论更有说服力。此外，FGF7如何调控膀胱癌细胞增殖及EMT过程，其具体分子机制有待进一步研究。

参考文献

[1] COMPÉRAT E, AMIN MB, CATHOMAS R, et al. Current best practice for bladder cancer: A narrative review of diagnostics and treatments[J]. Lancet, 2022, 400(10364): 1712-1721.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[3] BABJUK M, BURGER M, CAPOUN O, et al. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma in situ) [J]. Eur Urol, 2022, 81(1): 75-94.

[4] WITJES J A, BRUINS H M, CARRIÓN A, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: Summary of the 2023 guidelines[J]. Eur Urol, 2024, 85(1): 17-31.

[5] ZHANG X Y, PU X H, PI C X, et al. The role of fibroblast growth factor 7 in cartilage development and diseases[J]. Life Sci, 2023, 326: 121804.

[6] GIACOMINI A, GRILLO E, REZZOLA S, et al. The FGF/FGFR system in the physiopathology of the prostate gland[J]. Physiol Rev, 2021, 101(2): 569-610.

[7] DIXIT G, GONZALEZ-BOSQUET J, SKURSKI J, et al. FGFR2 mutations promote endometrial cancer progression through dual engagement of EGFR and Notch signalling pathways[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(5): e1223.

[8] MIECZKOWSKI K, KITOWSKA K, BRAUN M, et al. FGF7/FGFR2-JunB signalling counteracts the effect of progesterone in luminal breast cancer[J]. Mol Oncol, 2022, 16(15): 2823-2842.

[9] HUANG T T, WANG L, LIU D, et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1 [J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1501-1512.

[10] DYRSKJØT L, HANSEL D E, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 58.

[11] FINCH P W, RUBIN J S, MIKI T, et al. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth[J]. Science, 1989, 245(4919): 752-755.

[12] LIU X Y, BAI M R, SUN Y M, et al. FGF7-induced E11 facilitates cell-cell communication through connexin43[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(14): 3862-3874.

[13] LIU Z L, LIU J L, CHEN T L, et al. Wnt-TCF7-SOX9 axis promotes cholangiocarcinoma proliferation and pemigatinib resistance in a FGF7-FGFR2 autocrine pathway[J]. Oncogene, 2022, 41(20): 2885-2896.

[14] MILTON C I, SELFE J, ALADOWICZ E, et al. FGF7-FGFR2 autocrine signaling increases growth and chemoresistance of fusion-positive rhabdomyosarcomas [J]. Mol Oncol, 2022, 16(6): 1272-1289.

[15] TAKI M, ABIKO K, UKITA M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(17): 4669-4679.

[16] HUANG Y H, HONG W Q, WEI X W. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 129.

[17] LI D D, XIA L Y, HUANG P, et al. Heterogeneity and plasticity of epithelial - mesenchymal transition (EMT) in cancer metastasis: Focusing on partial EMT and regulatory mechanisms[J]. Cell Prolif, 2023, 56(6): e13423.

[18] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212-226.

[19] KHAN S U, FATIMA K, MALIK F, et al. Cancer metastasis: Molecular mechanisms and clinical perspectives[J]. Pharmacol Ther, 2023, 250: 108522.

[20] BRABLETZ S, SCHUHWERK H, BRABLETZ T, et al. Dynamic EMT: A multi-tool for tumor progression[J]. EMBO J, 2021, 40(18): e108647.

（2024-03-03 收稿）
编辑　袁　靓