

FOX M1 影响人宫颈癌细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗敏感性的作用

徐冰南¹ 金亚彬¹ 徐丽南²

(1. 佛山市第一人民医院肿瘤妇科, 广东 佛山 528000; 2. 广东省中山医科大学附属第六医院生殖中心, 广东 广州 510000)

【摘要】 目的 探讨叉头盒蛋白 M1(FOX M1)对人宫颈癌细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗敏感性的作用。方法 将含有正义 FOX M1 互补的脱氧核糖核酸(cDNA)的真核表达载体、空质粒的真核表达载体采用脂质体转染法转染至人宫颈癌细胞株 HeLa/DDP,分别记为过表达组、过表达对照组;另构建干扰 FOX M1 基因表达的重组载体、空载体,利用脂质体介导将其转染至人宫颈癌细胞株 HeLa/DDP,分别记为沉默组、沉默对照组;并设置空白组、抑制剂组。上述每组 5 个复孔,均加入顺铂,抑制剂组另加入硫链丝菌肽,培养 48 h。实时逆转录荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)、蛋白质免疫印迹法(Western Blot)检测各组 FOX M1 信使核糖核酸(mRNA)及蛋白表达;倒置显微镜观察细胞形态学改变;噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖抑制率;流式细胞仪双染法检测各组细胞凋亡率;RT-qPCR、Western Blot 检测各组细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)、细胞分裂周期因子 25B(CDC25B)、存活蛋白(Survivin)、p21 mRNA 及蛋白表达。结果 与空白组比较,沉默组和抑制剂组 FOX M1、Cyclin B1、CDC25B、Survivin mRNA 及蛋白表达均下降($P < 0.05$),过表达组上述指标均升高($P < 0.05$);与空白组比较,沉默组和抑制剂组增殖抑制率、凋亡率、p21 mRNA 及蛋白表达均升高($P < 0.05$),过表达组上述指标均下降($P < 0.05$);空白组、沉默对照组、过表达对照组细胞连接紧密、形态均匀、轮廓清楚,过表达组细胞连接致密,沉默组和抑制剂组细胞减少,轮廓不清、形态不均、大小不一,且可见细胞皱缩及细胞碎片。结论 FOX M1 表达下调可增加人宫颈癌细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗敏感性,FOX M1 表达上调则可降低其化疗敏感性,推测与正反馈调节 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达,负反馈调节 p21 表达有关。

【关键词】 叉头盒蛋白 M1;宫颈癌;顺铂;化疗敏感性

【中图分类号】 R737.33 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.11.011

Effect of FOX M1 on cisplatin chemosensitivity of human cervical cancer cell line HeLa/DDP

XU Bingnan¹, JIN Yabin¹, XU Linan²

(1. Department of Oncology, Foshan First People's Hospital, Foshan 528000, Guangdong, China;

2. Reproductive Center, The Sixth Affiliated Hospital of Guangdong Sun Yat Sen Medical University, Guangzhou 510000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of forkhead box protein M1 (FOX M1) on the chemosensitivity of human cervical cancer cell line HeLa / DDP to cisplatin. **Methods** The eukaryotic expression vector containing sense FOX M1 complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) and empty plasmid were transfected into human cervical cancer cell line HeLa / DDP by liposome transfection, which were recorded as over-expression group and over-expression control group respectively. In addition, the recombinant vector and empty vector interfering with FOX M1 gene expression were constructed and transfected into human cervical cancer cell line HeLa / DDP mediated by liposome, which were recorded as silencing group and silencing control group respectively. Blank group and inhibitor group were set. Every group set 5 wells, and cisplatin was added to each of well, and thiostreptomycetes peptide was added to the inhibitor group for 48h. The expressions of FOX M1 messenger RNA (mRNA) and protein were detected by real-time reverse transcription fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot (WB). The morphological changes were observed by inverted microscope. The inhibition rates of cell proliferation were detected by thiazole blue (MTT). The

apoptosis rates were detected by flow cytometry. RT-qPCR and WB were used to detect the expressions of Cyclin B1, CDC25B, survivin, p21 mRNA and proteins. **Results** Compared with the blank group, the expressions of FOXM1, Cyclin B1, CDC25B, Survivin mRNA and proteins decreased in the silencing group and inhibitor group ($P < 0.05$), and the above indexes increased in the over-expression group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the proliferation inhibition rates, apoptosis rates, p21 mRNA and protein expressions increased in the silencing group and inhibitor group ($P < 0.05$), and the above indexes decreased in the over-expression group ($P < 0.05$). The cells in the blank group, the silencing control group and the over-expression control group were tightly connected, uniform in shape and clear in outline. The cells in the over-expression group were tightly linked. The cells in the silencing group and the inhibitor group were reduced, with unclear outline, uneven in shape and different in size, and cell shrinkage and cell fragments were seen. **Conclusion** Down regulation of FOXM1 expression can increase the chemosensitivity of human cervical cancer cell line HeLa / DDP to cisplatin, while up regulation of FOXM1 expression can reduce its chemosensitivity. It is speculated that it is related to positive feedback regulating the expressions of Cyclin B1, CDC25B and survivin, and negative feedback regulating the expression of p21.

【Key words】 Forkhead box protein M1; Cervical cancer; Cisplatin; Chemosensitivity

宫颈癌作为常见的妇科恶性肿瘤给女性的健康与生命造成了极大的危害。有调查资料显示^[1],我国每年新发宫颈癌病例约占全球的 1/5,且每年死于宫颈癌的病例占全球的 10%左右。尽管近年来宫颈癌的发病率和死亡率有所下降,但该病有年轻化趋势,且针对该病的防治形势仍十分严峻^[2]。顺铂是宫颈癌常用的化疗药物,可抑制脱氧核糖核酸(DNA)的复制和转录,减少细胞增殖,但宫颈癌使用顺铂化疗易产生耐药性^[3]。因此如何增强宫颈癌顺铂化疗的敏感性已成为研究的重点。叉头盒蛋白 M1(FOXM1)属于 Fox 转录因子家族成员,与细胞增殖密切相关,且还可参与细胞凋亡与分化等^[4]。既往研究表明^[5-7],FOX M1 可参与多种恶性肿瘤的发生,包括肺癌、宫颈癌等,另外 FOX M1 表达上调可激活下游的细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)、细胞分裂周期因子 25B(CDC25B)、存活蛋白(Survivin),抑制 p21,参与患者的病情进展导致预后不良。另有研究显示^[8],FOX M1 表达下调可增强人喉癌细胞株 Hep-2 顺铂化疗的敏感性,促进细胞凋亡。但 FOX M1 是否会影响人宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗的敏感性及其可能的机制尚不清楚。基于此,本研究展开体外细胞实验,设计 FOX M1 表达上调、下调及对照组,并增加空白组和抑制剂组,探讨上述问题,旨在为增强宫颈癌顺铂化疗敏感性提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP(购自美国 ATCC 细胞库,货号:FB06008)。

1.1.2 主要药品与试剂 含有正义 FOX M1 互补的脱氧核糖核酸(cDNA)的真核质粒、空真核质粒、干扰 FOX M1 基因表达的重组、空载重组质粒构建和载体

鉴定均委托宝生物(大连)公司完成;脂质体 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司);改良伊格尔培养基(DMEM)高糖培养液(美国 Gibco 公司);洛斯维·帕克纪念研究所(RPMI)1640 培养液(美国 Gibco 公司);顺铂(美国 Sigma 公司);硫链丝菌肽(江苏艾康生物医药研发有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);FOX M1、Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 及 β -actin 引物均委托深圳晶美生物工程有限公司合成;二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);鼠抗人 FOX M1、Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 单克隆抗体(一抗),兔抗鼠 FOX M1、Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 多克隆抗体(二抗,辣根过氧化物酶标记)(美国 Santa Cruz 公司);细胞增殖抑制率噻唑蓝(MTT)法试剂盒(上海歌凡生物科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(江苏永健化工有限公司);Binding Buffer(江苏凯基生物技术股份有限公司);膜联蛋白-V 异硫氰基荧光素(Annexin-V FITC)(美国 Sigma 公司);碘化丙啶(PI)(美国 Sigma 公司)。

1.1.3 仪器 MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司);7900-Fast 型聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司);Compact XS 型电泳仪(德国 Biometra 公司);Trans-Blot® Turbo™ 型转膜仪(美国 Bio Rad 公司);iBright FL1000 型成像扫描仪(Odyssey)(美国 Thermo Fisher 公司);XDS-18 型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);TDZ5-BP 型医用离心机(长沙湘锐离心机有限公司);CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒与载体的构建 构建含有正义 FOX M1 cDNA 的真核表达载体(质粒正义链:5'-AUCUU

GAGAUCUAG-3', 反义链: 5'-CGUAGAUUCUAGA GAC-3')、空质粒的真核表达载体(质粒正义链: 5'-AGGGGUCUCUAA-3', 反义链: 5'-CUGGGUUAUACGAU-3')、干扰 FOXM1 基因表达的重组载体(质粒正义链: 5'-UCGUAUAGCUUAUAGGA-3', 反义链: 5'-AUCUAGGAUCUGAGAGCA-3')和空载载体(质粒正义链: 5'-AGUUACGATAGCTUAGC-3', 反义链: 5'-AGATTTCUATAUCUATAC-3'), 转染脂质体 Lipofectamine2000。

1.2.2 细胞培养、转染和分组 人宫颈癌耐药细胞株 Hela/DDP 以 DMEM 高糖培养液培养, 含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素, 培养至对数生长期, 条件: 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱。取上述细胞接种至 6 孔板, 每孔 2.0×10^5 个细胞。次日, 按照转染试剂说明书分别将 100 nmol/L 的载体加入细胞进行转染, 利用嘌呤霉素筛选转染成功的细胞, 并分别记为过表达组(含有正义 FOXM1 cDNA 的真核表达质粒与干扰 FOXM1 基因表达的重组质粒分别上调)、过表达对照组(转染空质粒的真核表达载体)、沉默组(抑制 FOXM1 表达)、沉默对照组(空载载体)。另设置空白组(无转染、未添加抑制剂、无特殊干预的细胞)和抑制剂组(添加 FOXM1 抑制剂培养的人宫颈癌细胞株 Hela/DDP)。空白组和抑制剂组仅加入 RPMI1640 培养液。每组 5 个复孔, 均加入顺铂使其终浓度为 100 ng/mL, 抑制剂组另加入 FOXM1 特异性抑制剂硫链丝菌肽使其终浓度为 2 μ mol/L, 培养 48 h。

1.2.3 FOXM1 基因干扰的验证 ①采用实时逆转录荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞 FOXM1 信使核糖核酸(mRNA)表达: 取各组细胞采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 鉴定并反转录, 将获取的 cDNA 作为模板进行扩增反应。FOXM1 引物序列: 正向 5'-TAGAGCTTAGAGCTAG-3', 反向 5'-CTGATAGGCTATAGCTAGC-3', 预计扩增产物长度 240 bp; 持家基因 β -actin 引物序列: 正向 5'-AGGCTAGAGCTAGACA-3', 反向 5'-CTGAGAGCTTAGAGCTAGAGC-3', 预计扩增产物长度 196 bp。反应流程: 94 $^{\circ}$ C (60 s), 40 个循环: 72 $^{\circ}$ C (90 s)、54 $^{\circ}$ C (30 s), 最后 72 $^{\circ}$ C (5 min)。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。②采用蛋白质免疫印迹法(Western Blot)检测各组 FOXM1 蛋白表达: 各组分别加入细胞裂解液, 收集总蛋白, BCA 法定量。100 $^{\circ}$ C 煮 5 min 使蛋白变性, 配置十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶, 上样量 50 μ L/孔。电泳参数: 浓缩胶电泳恒定电压 60 V, 分离胶电泳恒定电压 100 V, 直至溴酚蓝跑至胶底部。湿转膜, 100 mA, 90 min。封闭 1 h 后加入一抗稀释液(稀释倍数:

1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗膜 3 次、10 min/次, 加入二抗稀释液(稀释倍数: 1:2000), 室温孵育 1 h, 再次洗膜。暗室曝光显影, 利用成像扫描仪扫描, 系统软件计算目的蛋白条带累计光密度值与内参的比值。

1.2.4 细胞形态学观察 于倒置显微镜下观察各组培养 48 h 后的细胞形态学变化。

1.2.5 细胞增殖抑制率检测 采用 MTT 法, 每孔加入 MTT 溶液 25 μ L, 浓度 5 g/L, 避光孵育 4 h。加入 DMSO 继续孵育 4 h, 150 μ L/孔。震荡 10 min, 测定各孔在 490 nm 处的光密度值, 该实验另设置无干预组, 即仅常规培养的人宫颈癌耐药细胞株 Hela/DDP, 增殖抑制率 = 1 - (观察组光密度值/无干预组光密度值)^[9]。

1.2.6 细胞凋亡率检测 采用流式细胞仪双染法, 取各组细胞磷酸盐缓冲液洗涤, 胰酶消化, 并以细胞上清液终止消化。1000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min, 以 500 μ L Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 mL Annexin-V FITC 混匀, 再加入 5 mL PI 混匀, 室温避光。20 min 后上机检测, 计算早期凋亡和晚期凋亡细胞占比总和记作细胞凋亡率^[10]。

1.2.7 FOXM1 下游相关 mRNA 表达检测 采用 RT-qPCR 法, 具体操作同上, 其中 Cyclin B1 引物序列: 正向 5'-ATCGGTATAGGTATAGCGTAG-3', 反向 5'-CGGTATAGGAGGCTAGAGCTAG-3', 预计扩增产物长度 286 bp; CDC25B 引物序列: 正向 5'-CGTATAGGCTATAGC-3', 反向 5'-AGAGCTTGAGAGCTGA-3', 预计扩增产物长度 162 bp; Survivin 引物序列: 正向 5'-CGGTAAGGCTATAG-3', 反向 5'-AGAGCTTAGAGCTG-3', 预计扩增产物长度 152 bp; p21 引物序列: 正向 5'-AGAGTCTGAGAGCTAGAG-3', 反向 5'-CGAGTATAGCGTATAGCTAA-3', 预计扩增产物长度 218 bp。

1.2.8 FOXM1 下游相关蛋白表达检测 采用 Western Blot 法, 具体操作同上, 其中一抗稀释倍数: 1:1000、1:1000、1:2000、1:1000; 二抗稀释倍数: 1:2000、1:2000、1:5000、1:2000。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 24.0 软件进行数据统计, 首先利用 R 软件验证计量资料的正态性和方差齐性, 若符合正态分布且方差齐, 用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以单因素方差分析和 SNK-*q* 检验, 否则需先进行正态性转化。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXM1 基因干扰验证结果 与空白组比较, 沉默组和抑制剂组 FOXM1 mRNA 及蛋白表达均下降 (P < 0.05), 过表达组上述指标均升高 (P < 0.05); 空

白组、过表达对照组和沉默对照组 FOXM1 mRNA 及蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 沉默组和抑制剂组 FOXM1 mRNA 及蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 细胞形态学改变观察 空白组、沉默对照组、过表达对照组细胞均贴壁生长、状态良好、呈片状、紧密连接, 且细胞饱满, 大小和形态均匀; 过表达组细胞呈贴壁生长、状态理想, 连接致密, 且细胞数量多; 沉默组和抑制剂组细胞密度下降、体积不均、形态不一、轮廓不清, 细胞间空隙加大、部分细胞呈悬浮状态, 且二者可见细胞大量皱缩的细胞, 且细胞碎片增多, 见图 1。

表 1 各组 FOXM1 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of FOXM1 mRNA and protein expression in each group

组别	n	FOXM1 mRNA 表达	FOXM1 蛋白表达
空白组	5	0.85 ± 0.17	0.92 ± 0.19
过表达对照组	5	0.88 ± 0.19	0.91 ± 0.17
过表达组	5	1.23 ± 0.25 ^{①②}	1.38 ± 0.29 ^{①②}
沉默对照组	5	0.89 ± 0.18	0.90 ± 0.18
沉默组	5	0.15 ± 0.04 ^{③④}	0.22 ± 0.05 ^{③④}
抑制剂组	5	0.16 ± 0.03 ^{③④}	0.24 ± 0.07 ^{③④}

注: 与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与过表达对照组比较, ② $P < 0.05$; 与沉默对照组比较, ③ $P < 0.05$; 与过表达组比较, ④ $P < 0.05$

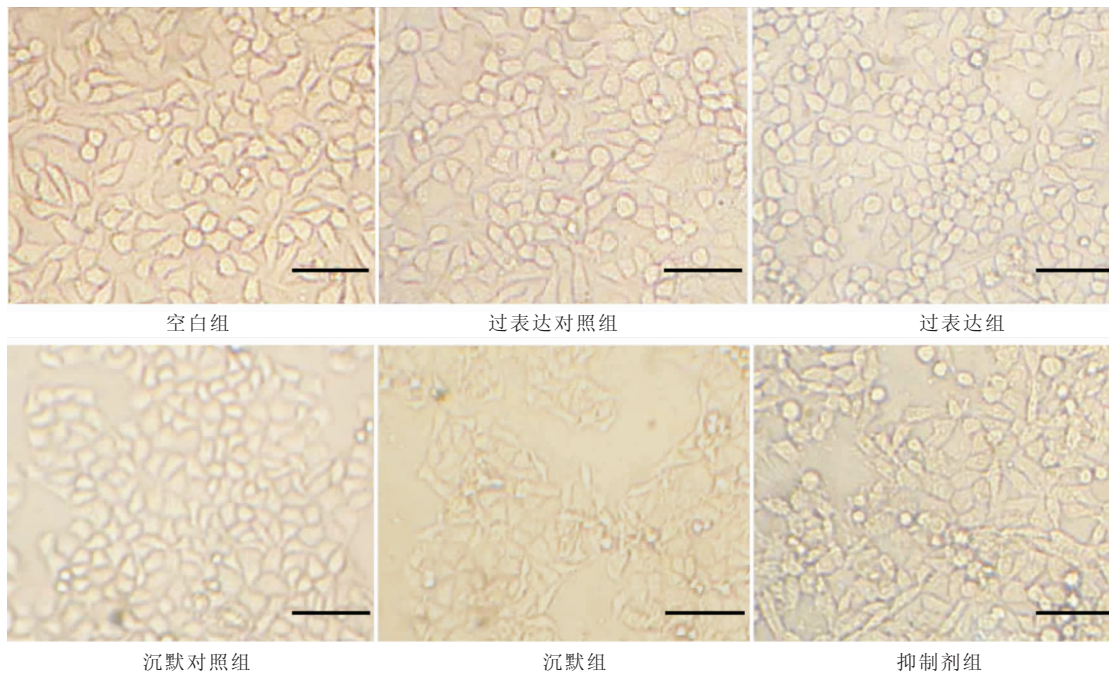


图 1 各组细胞形态学改变(倒置显微镜, 200×, 刻度尺: 100 μm)

Figure 1 Morphological changes of cells in each group

2.3 各组细胞增殖抑制率比较 与空白组比较, 沉默组和抑制剂组增殖抑制率均升高 ($P < 0.05$), 过表达组增殖抑制率下降 ($P < 0.05$); 空白组、过表达对照组和沉默对照组增殖抑制率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 沉默组和抑制剂组增殖抑制率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.4 各组细胞凋亡率比较 与空白组比较, 沉默组和抑制剂组凋亡率均升高 ($P < 0.05$), 过表达组凋亡率下降 ($P < 0.05$); 空白组、过表达对照组和沉默对照组凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 沉默组和抑制剂组凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3、图 2。

表 2 各组细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cell proliferation inhibition rate in each group

组别	n	增殖抑制率(%)
空白组	5	14.12 ± 2.08
过表达对照组	5	14.54 ± 2.16
过表达组	5	-4.05 ± 0.60 ^{①②}
沉默对照组	5	14.36 ± 2.28
沉默组	5	52.69 ± 8.10 ^{③④}
抑制剂组	5	51.83 ± 7.06 ^{③④}

注: 与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与过表达对照组比较, ② $P < 0.05$; 与沉默对照组比较, ③ $P < 0.05$; 与过表达组比较, ④ $P < 0.05$

表 3 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of apoptosis rate in each group

组别	n	凋亡率(%)
空白组	5	12.15 ± 2.89
过表达对照组	5	11.96 ± 2.57
过表达组	5	2.04 ± 0.51 ^{①②}
沉默对照组	5	11.78 ± 2.63
沉默组	5	49.43 ± 7.04 ^{③④}
抑制剂组	5	48.85 ± 6.76 ^{③④}

注: 与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与过表达对照组比较, ② $P < 0.05$; 与沉默对照组比较, ③ $P < 0.05$; 与过表达组比较, ④ $P < 0.05$

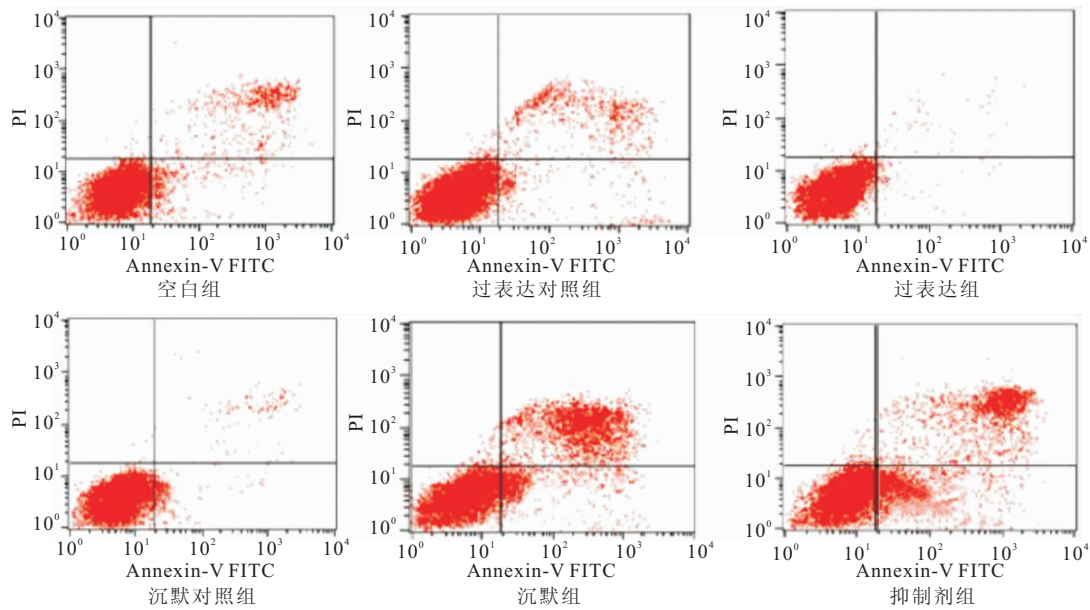


图 2 各组细胞凋亡率检测(流式细胞仪, Annexin-V FITC/PI 双染法)

Figure 2 The apoptosis rate of each group was detected

2.5 各组细胞 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 mRNA 表达比较 与空白组比较,沉默组和抑制剂组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin mRNA 表达均下降($P < 0.05$),过表达组上述指标均升高($P < 0.05$);与空白组比较,沉默组和抑制剂组 p21 mRNA 表达均升高

($P < 0.05$),过表达组上述指标下降($P < 0.05$);空白组、过表达对照组和沉默对照组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 mRNA 表达比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),沉默组和抑制剂组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 各组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of mRNA expression of Cyclin B1, CDC25B, Survivin and p21 in each group

组别	n	Cyclin B1 mRNA 表达	CDC25B mRNA 表达	Survivin mRNA 表达	p21 mRNA 表达
空白组	5	0.72±0.15	0.68±0.12	0.96±0.17	1.04±0.22
过表达对照组	5	0.75±0.17	0.70±0.15	0.94±0.18	1.06±0.24
过表达组	5	1.29±0.28 ^{①②}	1.19±0.24 ^{①②}	1.32±0.27 ^②	0.20±0.05 ^{①②}
沉默对照组	5	0.74±0.16	0.67±0.14	0.97±0.19	1.05±0.25
沉默组	5	0.20±0.04 ^{①③④}	0.15±0.03 ^{①③④}	0.19±0.04 ^{①③④}	1.38±0.29 ^{①③④}
抑制剂组	5	0.22±0.06 ^{①④}	0.15±0.04 ^{①④}	0.21±0.05 ^{①④}	1.35±0.31 ^{①④}

注:与空白组比较,① $P < 0.05$;与过表达对照组比较,② $P < 0.05$;与沉默对照组比较,③ $P < 0.05$;与过表达组比较,④ $P < 0.05$

2.6 各组细胞 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 蛋白表达比较 与空白组比较,沉默组和抑制剂组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 蛋白表达均下降($P < 0.05$),过表达组上述指标均升高($P < 0.05$);与空白组比较,沉默组和抑制剂组 p21 蛋白表达均升高($P <$

0.05),过表达组上述指标下降($P < 0.05$);空白组、过表达对照组和沉默对照组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 蛋白表达比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),沉默组和抑制剂组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 5、图 3。

表 5 各组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 The protein expressions of Cyclin B1, CDC25B, Survivin and P21 in each group were compared

组别	n	Cyclin B1 蛋白表达	CDC25B 蛋白表达	Survivin 蛋白表达	p21 蛋白表达
空白组	5	0.86±0.19	0.72±0.16	0.45±0.07	0.88±0.16
过表达对照组	5	0.90±0.22	0.72±0.18	0.47±0.08	0.91±0.20
过表达组	5	1.45±0.31 ^{①②}	1.35±0.26 ^{①②}	1.17±0.24 ^{①②}	0.21±0.04 ^{①②}
沉默对照组	5	0.88±0.20	0.69±0.17	0.46±0.09	0.89±0.18
沉默组	5	0.16±0.04 ^{①③④}	0.24±0.04 ^{①③④}	0.09±0.03 ^{①③④}	1.25±0.24 ^{①③④}
抑制剂组	5	0.18±0.05 ^{①④}	0.22±0.05 ^{①④}	0.10±0.03 ^{①④}	1.27±0.27 ^{①④}

注:与空白组比较,① $P < 0.05$;与过表达对照组比较,② $P < 0.05$;与沉默对照组比较,③ $P < 0.05$;与过表达组比较,④ $P < 0.05$

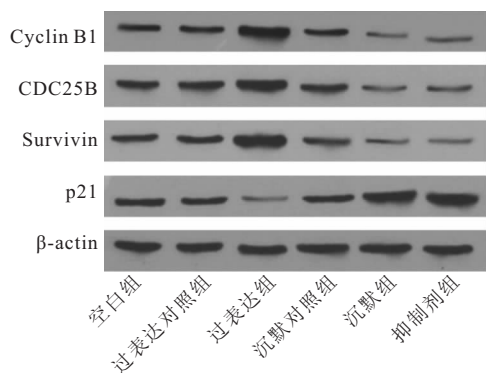


图 3 Western Blot 检测各组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin、p21 蛋白表达
Figure 3 The protein expressions of Cyclin B1, CDC25B, Survivin and p21 were detected by Western Blot

3 讨论

顺铂在宫颈癌治疗中应用广泛,可作为化疗药物、放疗增敏剂发挥双重作用^[11]。有报道显示^[12],宫颈癌患者采用顺铂化疗的缓解率可达 25%,且该药物在宫颈癌治疗中占据着重要的地位。然而顺铂副作用大,且长期应用易产生耐药性。据吴少敏等^[13]报道,宫颈癌患者采用顺铂单药化疗的耐药率为 32.35%,提示顺铂化疗耐药也是宫颈癌治疗中的重要难题。而目前人们关于宫颈癌顺铂化疗耐药的原因及机制认识尚浅,如何有效提高其敏感性仍需重点研究。

FOXM1 属于增殖特异性因子,与细胞增殖活性、侵袭转移能力及新血管生成等均有关,当其表达水平上调不仅可通过上述途径促进肿瘤发生和进展,还可激活参与肿瘤发生和进展的多种因子,如基质金属蛋白酶-2 等。关于 FOXM1 表达与恶性肿瘤化疗敏感性的相关性既往也有相关报道证实^[14],提示 FOXM1 蛋白阳性表达是恶性肿瘤化疗耐药的危险因素,也说明可尝试将其作为恶性肿瘤治疗的新靶点,使用 FOXM1 抑制剂以增强患者化疗的敏感性。但此类研究目前仍处于实验阶段,尚未应用于临床。本研究结果显示,沉默组和抑制剂组 FOXM1 基因与蛋白表达水平均较空白组下降,过表达组则均升高,证实干扰 FOXM1 表达的载体构建成功。本研究中利用空白组评价过表达组、沉默组的基因干扰效率,了解干扰 FOXM1 基因表达对此类细胞的具体作用及分子机制,同时可利用过表达对照组、沉默对照组排除阳性干扰,避免结果偏倚。本研究以脂质体 LiperfectimineTM2000 为载体,可确保转染效率;将上述载体分别于宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP 共培养可保证成功干扰 FOXM1 表达。此外,本研究设置抑制剂组,主要是因为硫链丝菌肽是 FOXM1 特异性抑制剂^[15],设

置该组可验证沉默组增强顺铂化疗敏感性的作用。FOXM1 主要是通过影响细胞周期进而影响细胞增殖活性的,而顺铂则是通过破坏 DNA 的复制与功能、干扰细胞周期进而杀灭癌细胞的,因此推测干扰 FOXM1 表达很可能能够影响人宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗的敏感性。另外,本研究细胞形态学、增殖抑制率和凋亡率结果均证实上调 FOXM1 表达可降低人宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗的敏感性,而抑制 FOXM1 表达则可增强其顺铂化疗的敏感性,与上述分析相符。

FOXM1 可正反馈调节其下游的 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达,负反馈调节其下游的 p21 表达,而各分子均是参与恶性肿瘤细胞周期进展的重要指标^[16-17]。研究发现^[18],FOXM1 表达上调可激活其靶基因 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 等,并抑制 p21 等,进而在 DNA 合成前期末发挥作用,并持续整个 DNA 合成期、DNA 合成后期、细胞分裂期等,而 p21 表达下调不仅可促进 DNA 合成前期向 DNA 合成期、DNA 合成后期向细胞分裂期转换,还可抑制细胞凋亡。FOXM1 表达缺失则可阻滞细胞周期进展,且常导致有丝分裂纺锤体缺陷,可引发非整倍体及多倍体产生^[19]。目前肿瘤学专家普遍认为^[20-22],FOXM1 上调可通过 DNA 损伤修复、细胞增殖、细胞凋亡及组织稳态等多种途径参与实体瘤的形成,并且还可诱导恶性肿瘤细胞对铂类化疗药物产生耐药性,因此抑制 FOXM1 表达、阻断该信号通路的转导是增强铂类化疗药物敏感性的新方案。由此可知,抑制 FOXM1 表达有助于增强恶性肿瘤细胞对铂类化疗药物的敏感性,且与抑制 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达,上调 p21 表达有关;而上调 FOXM1 表达则可增强恶性肿瘤细胞对铂类化疗药物的耐药性,且很可能与上调 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达,下调 p21 表达有关。本研究结果中过表达组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达均较其余各组升高,p21 表达则均较各组下降,且沉默组 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达则显著低于沉默对照组和空白组,p21 表达显著高于沉默对照组和空白组,研究结果与上述分析一致,提示干扰 FOXM1 可影响宫颈癌顺铂化疗的敏感性,建议深入研究以服务于临床。

4 结论

上调 FOXM1 表达可降低人宫颈癌耐药细胞株 HeLa/DDP 顺铂化疗的敏感性,而抑制 FOXM1 表达可增强其敏感性,并且有助于促进细胞形态学改变,提高增殖抑制率和凋亡率,推测与调控 FOXM1 信号通路,正反馈调节 Cyclin B1、CDC25B、Survivin 表达,

负反馈调节 p21 表达有关。但该结论应用于临床的策略及可行性仍需要进一步探讨,应作为后期研究的重点。

【参考文献】

- [1] 李道娟,师金,靳晶,等. 宫颈癌的流行病学趋势[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(9): 912-916.
- [2] 尤华,万之灵,王辉. 宫颈癌和 HPV 疫苗[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(10): 1751-1752.
- [3] WU X, ZHONG Y, CHEN Q, *et al.* Enhancer of mRNA Decapping protein 4 (EDC4) interacts with replication protein a (RPA) and contributes to Cisplatin resistance in cervical Cancer by alleviating DNA damage[J]. *Hereditas*, 2020, 157(1): 41.
- [4] SONG Z, LI J, ZHANG L, *et al.* UCHL3 promotes pancreatic cancer progression and chemo-resistance through FOXM1 stabilization[J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(9): 1970-1981.
- [5] ARCECI A, BONACCI T, WANG X, *et al.* FOXM1 Deubiquitination by USP21 Regulates Cell Cycle Progression and Paclitaxel Sensitivity in Basal-like Breast Cancer[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(11): 3076-3086.
- [6] HONG H, ZHU H, ZHAO S, *et al.* The novel circCLK3/miR-320a/FoxM1 axis promotes cervical cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 950.
- [7] HASEGAWA T, KIKUTA J, SUDO T, *et al.* Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1631-1643.
- [8] 李丹丹. FoxM1 通过 MRN/ATM 通路介导的 DNA 损伤修复调控人鼻咽癌细胞的顺铂敏感性[D]. 重庆:重庆医科大学, 2019.
- [9] 武志丹,杨志谋,岳天孚. 四甲基偶氮唑蓝法测定植酸对 HeLa 细胞的作用[J]. 国际妇产科学杂志, 2012, 39(5): 533-534, 封 3.
- [10] 刘钰妮,王世恩,汪湘,等. Annexin V-FITC/DAPI 细胞凋亡检测法[J]. 生物技术, 2020, 30(4): 352-361.
- [11] 杨燕丽,李富娟,牛宁. NOS1 在宫颈癌干细胞中的表达及对化疗敏感性的影响[J]. 西部医学, 2020, 32(9): 1286-1291.
- [12] NEGI D, SINGH A, JOSHI N, *et al.* Cisplatin and Probiotic Biomass Loaded Pessaries for the Management of Cervical Cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(5): 589-598.
- [13] 吴少敏,关灵,郑锐年,等. ERCC1 核苷酸多态性 C118T 与中晚期宫颈癌患者顺铂耐药的相关性[J]. 广东医学, 2019, 40(1): 105-108.
- [14] ZHOU H E, PAN S S, HAN H. TRIM24 aggravates the progression of ovarian cancer through negatively regulating FOXM1 level[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10647-10656.
- [15] SHUKLA S, MILEWSKI D, PRADHAN A, *et al.* The FOXM1 Inhibitor RCM-1 Decreases Carcinogenesis and Nuclear β -Catenin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(7): 1217-1229.
- [16] HU G, YAN Z, ZHANG C, *et al.* FOXM1 promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating KIF4A expression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 188.
- [17] CHENG Z, YU C, CUI S, *et al.* circTP63 functions as a ceRNA to promote lung squamous cell carcinoma progression by up-regulating FOXM1[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3200.
- [18] LIU C, SHI J, LI Q, *et al.* STAT1-mediated inhibition of FOXM1 enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(5): 645-663.
- [19] UEDA Y, MORIWAKI K, TAKEUCHI T, *et al.* O-GlcNAcylation-mediated degradation of FBXL2 stabilizes FOXM1 to induce cancer progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 632-638.
- [20] ZHOU D M, LIU J, LIU F, *et al.* A novel FoxM1-PSMB4 axis contributes to proliferation and progression of cervical cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 746-752.
- [21] TAN Y, WANG Q, XIE Y, *et al.* Identification of FOXM1 as a specific marker for triple-negative breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 87-97.
- [22] XIN L, ZHOU Q, YUAN Y W, *et al.* METase/lncRNA HULC/FoxM1 reduced cisplatin resistance in gastric cancer by suppressing autophagy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(10): 2507-2517.

(收稿日期:2021-11-19;修回日期:2022-09-21;编辑:刘灵敏)

(上接第 1616 页)

- [18] KALKAVAN H, GREEN D R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 46-55.
- [19] LIU Z, SONG T, DOU C, ZHENG X, *et al.* Detection of Bcl-2 in human hepatocellular carcinoma and down-regulation with siRNA[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2015, 31(2): 221-225, 230.
- [20] JIANG N, CHEN W, ZHANG J W, *et al.* Aberrantly regulated dysadherin and B-cell lymphoma 2/B-cell lymphoma 2-associated X enhances tumorigenesis and DNA targeting drug resistance of liver cancer stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7239-7246.

(收稿日期:2022-01-13;修回日期:2022-08-23;编辑:刘灵敏)