

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.023

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.023>

叉头框蛋白M1过表达在结直肠癌中的作用

张海鸽, 罗晓勇

(郑州大学附属洛阳中心医院放疗科, 河南 洛阳 471000)

[摘要] 目的: 评估叉头框蛋白M1(forkhead box protein M1, FOXM1)在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发生发展中的作用。方法: 研究103例原发CRC和配对的正常组织标本, 探讨FOXM1表达变化的潜在机制及其对体外CRC细胞模型的增殖和转移的影响。结果: 103例CRC组织染色后FOXM1阳性率为85.44%(88/103), 癌旁正常组织中阳性率为20.39%(21/103)。两组间的FOXM1的表达差异具有统计学意义($P < 0.001$); FOXM1沉默能抑制结肠癌细胞的增殖, 且侵袭和迁移也明显受抑。结论: CRC的发病机制可能是由FOXM1介导, FOXM1可能代表CRC分子靶向治疗的选择性靶点。

[关键词] 结直肠癌; FOXM1; siRNA; 靶向治疗

Role of forkhead box protein M1 overexpression in colorectal cancer

ZHANG Haige, LUO Xiaoyong

(Department of Radiotherapy, Affiliated Luoyang Central Hospital of Zhengzhou University, Luoyang Henan 471000, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the role of the forkhead box M1 (FOXM1) in colorectal cancer (CRC) tumorigenesis. **Methods:** We investigated FOXM1 expression in 103 cases of primary CRC and matched normal tissue specimens and explored the underlying mechanisms of altered FOXM1 expression and the impact of this altered expression on CRC proliferation and metastasis using in vitro models of CRC. **Results:** The results showed that high expression of FOXM1 staining was 85.44% (88/103) in 103 cases of CRC and 20.39% (21/103) in 103 cases of adjacent non-cancerous tissue samples; the difference of FOXM1 expression between two groups was statistically significant ($P < 0.001$). Silencing of FOXM1 inhibited the proliferation of CRC cells, and the invasion and migration of CRC cells were distinctly suppressed. **Conclusion:** The pathogenesis of CRC maybe mediated by FOXM1, and FOXM1 could represent selective targets for the molecularly targeted treatments of CRC.

Keywords colorectal cancer; FOXM1; siRNA; target therapy

收稿日期 (Date of reception): 2016-12-25

通信作者 (Corresponding author): 张海鸽, Email: 932588559@qq.com

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的恶性肿瘤。在我国, CRC在恶性肿瘤中发病率仅次于肺癌和胃癌, 病死率位居第五位^[1]。转录因子叉头框M1(forkhead box protein M1, FOXM1)是FOX基因家族中的一员, 在多种恶性肿瘤中常呈高表达, 且FOX M1的过表达与疾病进展和肿瘤的预后差相关^[2]。目前FOX M1与CRC间的关系尚不明确, 本研究采用免疫组织化学、qRT-PCR和Western印迹检测FOX M1在CRC中的表达水平, 并探讨其对CRC的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究通过了郑州大学伦理委员会批准, 标本采集前获得每位患者的许可。在RT-PCR实验和Western印迹实验分析中, 我们收集了从2008年5月到2014年11月郑州大学附属洛阳中心医院38位患者的肿瘤组织和癌旁组织标本(距肿瘤边缘超过5 cm)。在免疫组织化学分析中, 103例CRC病理标本来自病理存档。病理诊断由郑州大学附属洛阳中心医院根据UICC标准制定, 由两位病理专家诊断。所有患者均为初次治疗, 未接受过放、化疗。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组织化学

手术标本10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm 切片, 二甲苯脱蜡和水化, 柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH6.0)中抗原修复。内源性过氧化酶活性用0.3%过氧化氢甲醇阻断, 非特异性免疫球蛋白结合用10%山羊血清孵育10 min阻断30~60 min。用PBS冲洗后, 室温下, 用兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz生物科技公司, 1:50稀释)孵育60 min。PBS冲洗3次, 将玻片用生物素标记的羊抗兔二抗孵育30 min, 然后与DAB反应, 以苏木精复染。阴性对照省略一抗, 以PBS代替。FOX M1表达阳性的细胞百分比被分级和计数如下: 1, 1%~25%; 2, 26%~50%; 3, 51%~75%; 4, 76%~100%。两位病理学专家双盲读片。染色强度评分如下: 0(无信号), 1(弱), 2(中等), 3(显著)。FOX M1阳性得分 \times 染色强度=最终得分, 最终得分决定FOX M1的表达(-, 0; +, 1~4; ++, 5~8; +++, 9~12)。本研究我们根据蛋白表达将

所有标本分为高表达组(++或+++)和低表达组(-或+)^[3]。

1.2.2 Western 印迹分析

蛋白质样品进行10%十二烷基硫酸盐聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移到聚偏氟乙烯膜。在用一抗孵育前后, 膜封闭在5%非脂肪奶粉缓冲液中(10 mmol/L Tris, pH值为7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween20)。然后二抗, 并显影成像显影, 用Bio-Rad数量一维软件分析数据。

1.2.3 定量 PCR

使用SYBR Green试剂盒, GAPDH为内参。每个独立实验重复3次, 每个标本检测3次。引物序列为: FOX M1上游5'-GCGACAGGTTAAGGTTGAG-3'; 下游5'-AGGTTGTGGCGGATGGAGT-3'; GAPDH上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; 下游5'-TGGTGAAGACG CCAGTGA-3'。使用比较阈值周期法和计算RT反应效率进行定量(相对定量, $2^{-\Delta\Delta C_t}$)。

1.2.4 基因沉默

FOX M1 siRNA((GGACCACUUUCCCUACUUU; CUCUUCUCCUCAGAUUAUAdTdT)和对照组siRNA(GGACCUGUAUGCGUACAUU)购自上海吉玛制药技术有限公司。用Lipofectamine2000按照操作说明操作, 转染48 h后获取mRNA和蛋白水平的表达。

1.2.5 细胞增殖实验

细胞种植在96孔板, 每孔种植 1×10^4 个细胞, 在DMEM培养基中加入10%FBS培养过夜。转染后, CCK-8 10 mL加入对应的检测孔培养1 h, 波长450 nm处检测吸光度值。

1.2.6 Transwell 实验

细胞种在上室, 每孔 $1 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞, 每孔加入DMEM培养基, 下室加入1%FBS。培养12~48 h, 过滤器上表面的细胞用棉签擦除。那些侵入Transwell小室的细胞用甲醛固定并以0.1%结晶紫染色。在每个小室中随机选出10个高倍视野, 使用倒置显微镜计数。

1.3 统计学处理

数据分析采用SPSS 15.0统计学软件处理数据, 连续变量采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据分析采用 χ^2 检验和Fisher精确检验, 以 $P < 0.05$ 为统计学有显著意义。

2 结果

2.1 FOXM1 在 CRC 组织中在 mRNA 和蛋白水平均过表达

通过免疫组织化学, 对103例CRC组织中FOXM1的表达和癌旁组织中表达进行对比, 结果提示FOXM1的阳性率为85.44%(88/103), 而癌旁组织阳性率为20.39%(21/103)FOXM1的表达两组间有显著差异($P < 0.001$, 图1)。QRT-PCR和Western印迹分析38对CRC临床标本, 结果显示FOXM1在CRC标本中的表达显著高于癌旁组织($P < 0.01$, 图2), 提示FOXM1的表达与CRC的发生和发展显著相关。

2.2 FOXM1 的缺失对结肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

用qRT-PCR检测6种结肠癌细胞株中FOXM1的表达。如图3A所示, FOXM1在LOVO中的表达最高, 所以我们选择LOVO进行后续研究。为了判断FOXM1是否能成为CRC的有效靶点, 我们通过RNA干扰敲除FOXM1在细胞中的表达。Western印迹验证在蛋白水平FOXM1的敲除效率。图3B显示转染siRNA后FOXM1的表达显著下降。CCK8实验提示转染siRNA后细胞增殖率显著下降(图4A)。通过细胞的迁移与侵袭实验, 我们发现沉默FOXM1后LOVO细胞的迁移和侵袭能力显著降低($P < 0.05$, 图4B)。

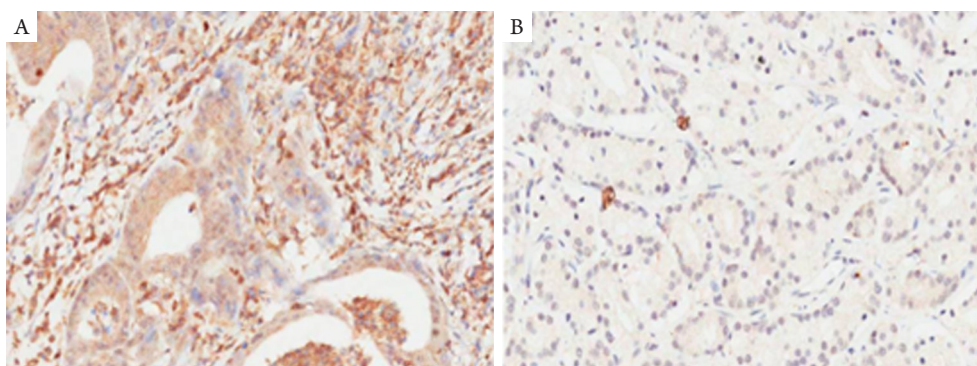


图1 FOXM1在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达

Figure 1 Expression of FOXM1 in CRC tissue sample and the adjacent non-cancerous tissue sample

(A) FOXM1在结直肠癌组织中高表达(SP, $\times 40$); (B) FOXM1在癌旁正常组织中低表达(SP, $\times 40$)。

(A) High expression of FOXM1 in CRC tissue sample (SP, $\times 40$); (B) low expression of FOXM1 in the adjacent non-cancerous tissue samples (SP, $\times 40$).

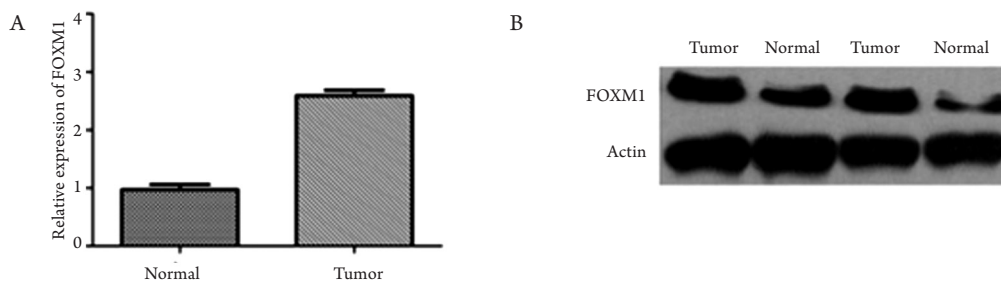


图2 FOXM1在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达

Figure 2 Expression of FOXM1 in CRC tissue sample and the adjacent non-cancerous tissue sample

(A)qRT-PCR检测结直肠癌组织与癌旁正常组织中FOXM1的表达; (B) Western印迹检测结直肠癌组织与癌旁正常组织中FOXM1的表达。

(A) qRT-PCR showing expression level of FOXM1 mRNA in CRC tissue samples and the adjacent non-cancerous tissue samples; (B) Western blot showing expression of FOXM1 in CRC.

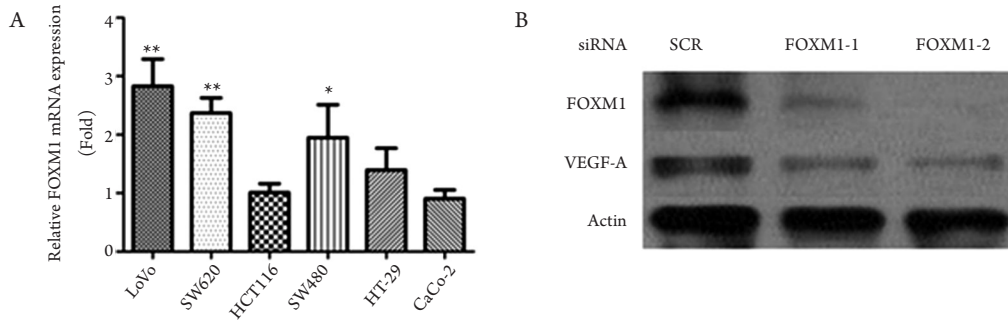


图3 结直肠癌细胞株的筛选及siRNA的转染实验

Figure 3 Screening of colorectal cancer cell lines and siRNA transfection experiment

(A) QRT-PCR检测不同的结直肠癌细胞株中FOXM1 mRNA的表达水平; (B) Western印迹检测转染siRNA后FOXM1在蛋白水平的表达。

(A) Quantitative real-time PCR showing expression level of FOXM1 mRNA in CRC cells; (B) Western blot showing that siRNA treatment of FOXM1 markedly decreased FOXM1 levels and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) levels in LOVO cells.

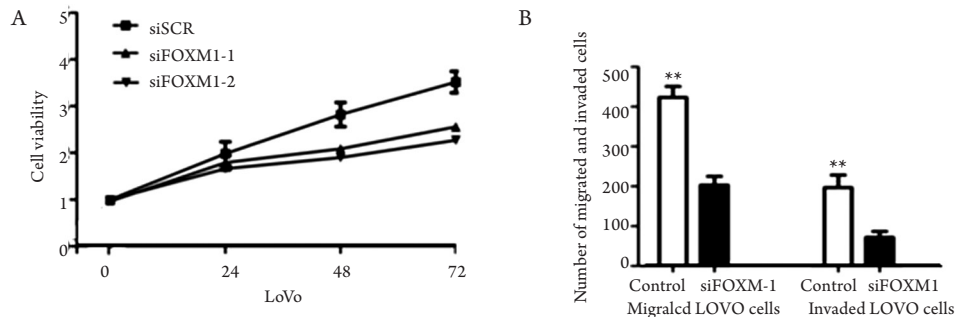


图4 细胞功能学实验

Figure 4 Cellular function experiment

(A) FOXM1敲低后对LOVO细胞增殖的影响; (B) FOXM1敲低后对LOVO细胞迁移和侵袭的影响。

(A) FOXM1 knock down inhibited cell proliferation of LOVO cell; (B) inhibition of invasion and migration of LOVO cells by siRNA treatment of FOXM1.

3 讨论

CRC是一种常见的恶性肿瘤。进展期CRC的5年生存率低于10%。大部分CRC患者术后复发和转移, 导致生存率下降。然而, CRC真正的生物学行为和肿瘤形成机制尚不完全明确。为了改善CRC患者的预后, 发掘新的生物标志物来预测或检测隐匿性转移已迫在眉睫。FOXM1是转录因子FOX家族中的一员, 在细胞分裂时表达, 对细胞周期的进程起关键作用。可靠的证据^[4]显示FOXM1在许多肿瘤中的表达上调, FOXM1的高表达与多种肿瘤的OS相关。已有研究^[5-9]表明FOXM1在卵巢癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌和胶质瘤中呈高表达。然而目前FOXM1对CRC的影响尚知之甚少。本研究中, FOXM1的mRNA和蛋白水平都已被证实在CRC中对

比癌旁非肿瘤组织的表达显著上调, 并且这种高表达与淋巴结转移和远处转移相关。免疫组织化学结果显示FOXM1在结肠癌组织和癌旁非肿瘤组织中的统计学差异。我们还通过QRT-PCR和Western印迹的结果显示FOXM1的表达水平也显著高于癌旁非肿瘤组织。这一系列实验结果提示FOXM1与CRC的进程有关, 并有可能是一个合理的靶向治疗目标。

肿瘤转移是肿瘤相关性死亡的主要原因。多位研究者^[10-11]已经证实FOXM1促进肿瘤的侵袭、迁移和转移。为了进一步研究FOXM1的生物学功能, 我们采用siRNA敲低CRC细胞株LOVO中FOXM1的表达, 结果提示FOXM1能够抑制LOVO细胞的生长、侵袭和转移。FOXM1在CRC的进展中扮演重要角色。进一步研究FOXM1能为CRC的治疗提供新机遇。

参考文献

1. Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1): 48-58.
2. Li Q, Zhang N, Jia Z, et al. Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3501-3509.
3. 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
XU Liangzhou, YANG Wentao. Criteria for judging the results of immunohistochemistry[J]. China Oncology, 1996, 6(4): 229-231.
4. Jiang LZ, Wang P, Deng B, et al. Overexpression of Forkhead Box M1 transcription factor and nuclear factor-κB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis[J]. Hum Pathol, 2011, 42(8): 1185-1193.
5. Wu YH, Chiu WT, Young MJ, et al. Solanum incanum extract downregulates aldehyde dehydrogenase 1-mediated stemness and inhibits tumor formation in ovarian cancer cells[J]. J Cancer, 2015, 6(10): 1011-1019.
6. Mitrofanova A, Aytes A, Zou M, et al. Predicting drug response in human prostate cancer from preclinical analysis of in vivo mouse models[J]. Cell Rep, 2015, 12(12): 2060-2071.
7. Hu C, Ni Z, Li BS, et al. hTERT promotes the invasion of gastric cancer cells by enhancing FOXO3a ubiquitination and subsequent ITGB1 upregulation[J]. Gut, 2017, 66(1): 31-42.
8. Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, et al. FOXM1 targets XIAP and survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance[J]. Cell Signal, 2015, 27(12): 2496-2505.
9. 李晨龙, 谢靖红, 蒋传路. FoxM1与胶质瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(10): 2481-2483.
LI Chenlong, XIE Jinghong, JIANG Chuanlu. Research progress of FoxM1 and glioma[J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(10): 2481-2483.
10. Chandran UR, Ma C, Dhir R, et al. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 64.
11. Park HJ, Gusarova G, Wang Z, et al. Deregulation of FoxM1b leads to tumour metastasis[J]. EMBO Mol Med, 2011, 3(1): 21-34.

本文引用: 张海鸽, 罗晓勇. 叉头框蛋白M1过表达在结直肠癌中的作用[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(3): 580-584. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.023

Cite this article as: ZHANG Haige, LUO Xiaoyong. Role of forkhead box protein M1 overexpression in colorectal cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(3): 580-584. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.023