

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.003

转录因子 FOXM1 在卵巢癌细胞中的表达及其对侵袭转移能力的影响 *

魏翻艳¹ 李 郁² 陈必良¹ 董曦文¹ 吴 娟¹ 杨 红^{1△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学细胞工程研究中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究上皮性卵巢癌细胞中 FOXM1 的表达,探讨 FOXM1 与 MMP9 之间的相关性以及与卵巢癌细胞侵袭、转移的关系。**方法:**采用 Real-time RT-PCR、Western blotting 技术检测 pcDNA3.1-FOXM1 和 FOXM1-siRNA 分别转染卵巢癌细胞株 HO-8910 (低转移) 和 HO-8910PM (高转移) 前后 FOXM1 的表达水平,用 Transwell 方法检测转染该序列后 HO-8910 和 HO-8910PM 细胞侵袭能力的改变,并用荧光素酶双报告基因分析技术检测 FOXM1 对 MMP9 的调控作用。**结果:**与对照组和空载体组相比,转染了 pcDNA3.1-FOXM1 的 HO-8910 细胞 FOXM1 mRNA、蛋白表达显著升高,而转染了 FOXM1-siRNA 的高转移细胞株 HO-8910PM FOXM1 mRNA、蛋白表达显著降低($P<0.05$);相对于空载体组和空白组,pcDNA3.1-FOXM1 转染组细胞的侵袭能力明显增强,而 FOXM1-siRNA 转染细胞的侵袭能力明显降低($P<0.05$); FOXM1 参与对 MMP9 的转录调控作用($P<0.05$)。**结论:**FOXM1 可能是一个潜在的治疗靶点,通过下调 FOXM1 的表达,从而抑制卵巢癌的侵袭和转移。

关键词:卵巢癌; FOXM1; MMP9; 侵袭; 转移

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)14-2610-05

Expression of FOXM1 Transcription Factor and Its Effect on Invasive Capacity in Ovarian Cancer*

WEI Fan-yan¹, LI Yu², CHEN Bi-liang¹, DONG Xi-wen¹, WU Juan¹, YANG Hong^{1△}

(1 Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China ;

2 Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The expression of FOXM1 in epithelial ovarian cancer cell was investigated to learn the relationship between FOXM1 and MMP-9 as well as its role in the invasiveness of ovarian cancer cell. **Methods:** Real-time RT-PCR and Western blotting were performed to detect the expression levels of FOXM1 before and after overexpression vectors pcDNA3.1-FOXM1 and FOXM1 siRNA were transfected into HO-8910 and HO-8910PM cells respectively. The change of invasion capacity was evaluated by Transwell chamber test. The involvement of FOXM1 in regulating MMP9 expression was explored by Dual-luciferase reporter assay system. **Results:** After overexpression vectors pcDNA3.1-FOXM1 was transfected into HO-8910, FOXM1 expression at both mRNA and protein levels were significantly increased and the invasion capacity of ovarian cancer cells was obviously enhanced compared to the control group ($P<0.05$). After FOXM1 siRNA was transfected into HO-8910PM, FOXM1 expression at both mRNA and protein levels were significantly decreased and the invasion capacity of ovarian cancer cells was obviously reduced compared to the control group ($P<0.05$). FOXM1 was involved in the transcription regulation of MMP9 ($P<0.05$). **Conclusion:** FOXM1 may serve as a promising therapeutic target for ovarian cancer. The invasion capacity of ovarian cancer cells can be inhibited through down-regulating FOXM1.

Key words: Ovarian cancer; FOXM1; MMP9; Invasion; Migration

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2610-05

前言

卵巢癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一,发病率位于女性生殖器三大恶性肿瘤之末,而其死亡率却位居第一。是严重威胁妇女健康的最大疾患。其发生与转移方面的研究越来越受到人们的广泛关注。近年来研究表明叉头蛋白 Forkhead box

protein M1 (FOXM1)在许多恶性肿瘤中均高表达,参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、浸润与转移等,从而影响肿瘤的发生发展^[1]。基质金属蛋白酶(MMPs)是介导肿瘤-间质间相互作用最重要的分子之一,能够降解细胞外基质(ECM),因而在肿瘤细胞侵袭和转移中发挥着关键的作用^[2],目前对基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)研究的最多,被认为与肿瘤细胞的侵袭、转移关系最

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072144)

作者简介:魏翻艳(1982-),女,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤基础与临床,

电话:029-84771233, E-mail:weiyan_photo@163.com

△ 通讯作者:杨红, E-mail:yanghong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-29 接受日期:2014-01-28)

为密切^[9]。本研究通过对 FOXM1 在上皮性卵巢癌细胞的表达,探讨 FOXM1 与 MMP-9 相关性及其对卵巢癌侵袭、转移能力的影响。为深入研究卵巢癌发病、转移的分子机制及有效治疗奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人上皮性高转移卵巢癌细胞株 HO-8910PM 及低转移卵巢癌细胞株 HO-8910 系第四军医大学西京医院妇产科实验室保存;1640 培养基、胎牛血清购于 HyClone 公司;兔抗人 FOXM1 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购于美国 Affinity 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购于 Beyo-time 公司;RNA 提取试剂盒购于陕西先锋生物公司;Lipofectamine 2000 试剂购于美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、real-time PCR 反应试剂盒均购自 TaKaRa 公司;Matrigel 购于美国 BD 公司,4%的多聚甲醛购于陕西晶彩生物公司;质粒小抽试剂盒和 DH5a 均购自 TIANGEN 公司;Dual-Luciferase Reporter Assay system 试剂盒购自 Promega 公司;pcDNA3.1-FOXM1、pcDNA3.1、pRL-TK vector 由第四军医大学细胞工程中心惠赠。pGL3-pM9 基因转录活性报告质粒由第四军医大学分子与生化教研室惠赠,FOXM1-siRNA 片段、阴性对照均由上海吉玛制药技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与瞬时转染 卵巢癌细胞株 HO-8910PM、HO-8910 经复苏后,用 1640 培养基培养细胞,培养基中加入含 10% FBS、100 U/mL 青霉素 / 链霉素。转染前一天,将细胞接种于 6 孔板(1×10^6 个细胞 / 孔),置于 37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养。待细胞贴壁良好,生长状态最佳时进行转染。转染 48 h 后收集细胞。

A: 重组质粒 pcDNA3.1-FOXM1 转染试验以低转移卵巢癌细胞 HO-8910 为研究对象,实验分为三组:转染组(pcDNA3.1-FOXM1),空载体组 (Control) 作为阴性对照,未转染组 (Blank) 作为空白对照,实验重复三次。

B: FOXM1-siRNA 转染试验以高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 为研究对象,实验分为三组:转染组(FOXM1-siRNA),空载体组(Control)作为阴性对照,未转染组 (Blank) 作为空白对照,实验重复三次。

C: MMP-9 启动子质粒 pGL3-pM9 与真核表达载体 pcDNA3.1-FOXM1 按不同剂量共转染,剂量分别为(0、0.5、1.0、2.0 μg),同时共转染入 10 ng PRL-TK 为内对照。以 pGL3-Basic 空载体作为阴性对照,每个样本设置 3 复孔实验,转染 48 h 以后检测荧光素酶报告基因活性。

1.2.2 Western blot 检测转染前后卵巢癌细胞中 FOXM1 蛋白水平的变化 提取细胞总蛋白,用 BCA 法蛋白定量后,取蛋白样品进行凝胶电泳,电转到 PVDF 膜上用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3~4 次,每次 5 min,加入兔抗人 FOXM1 多克隆抗体(用 TBST 按 1:200 稀释),摇床轻摇 1 h,4 °C 过夜;TBST 洗膜 3~4 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释)室温孵育 1 h,经 ECL 底物化学发光显影、扫描。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测卵巢癌细胞中 FOXM1 mRNA 水

平变化 总 RNA 提取试剂盒提取各组卵巢癌细胞中的 mRNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 提取质量,通过紫外分光光度计检测 mRNA 浓度和纯度,反转录合成 cDNA,按照反转录试剂盒说明书进行,反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s。将得到的 cDNA 反应液加入到 real-time PCR 反应液中,引物由上海生工生物技术公司合成,引物序列:FOXM1 上游 5'-GCGA-CAGGTTAAGGTTGAG-3',下游 5'-AGGTTGTGGCGGATGG-AGT-3';GAPDH 上游 5'-CCTGGGCATGGAGTC-3',下游 5'-TCTTCATIGTGCTGGGTGCC-3'。反应体系 25 μL。扩增条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s,56 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,45 个循环;72 °C 延伸 5 min。每一个反应做 3 复孔实验。

1.2.4 Transwell 检测 pcDNA3.1-FOXM1 和 FOXM1-siRNA 对卵巢癌细胞侵袭能力的影响 在 4 °C 冰箱溶解 Matrigel 胶,用预冷的不完全培养基 1640 稀释 Matrigel 混匀,每个小室加入 80 μL Matrigel 到小室的内膜上,37 °C 孵育 2 h。使 Matrigel 聚合成凝胶。无血清培养基稀释细胞密度为 3.0×10^5 ,每孔 Millicell 上室内加入细胞悬液 300 μL,下室加入含 10% FBS 的完全培养基,37 °C 培养箱中常规培养 24 h 后,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,结晶紫染色 10 min,观察是否有细胞穿透 Millicell 膜,每组设 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.5 双荧光素酶报告系统实验检测 FOXM1 对 MMP9 基因的转录激活作用 转染 48 h 以后检测荧光素酶报告基因活性,运用 Dual-Luciferase Reporter 检测系统检测报告基因的表达水平,检测方法参照试剂使用说明书。细胞先用冰浴的 $1 \times$ PBS 洗 2 次,加入 500 μL $1 \times$ PLB 裂解液,室温 120 r/min 摇 15 min 后,收集细胞裂解液,离心去除细胞碎片,收集上清。用化学发光检测仪检测荧光素酶活性,取细胞裂解液上清 20 μL 加入荧光素酶检测试剂(LAR II)100 μL,检测萤火虫荧光素酶活性,继续加 100 μL Stop&GloTM 试剂,将上述反应猝灭,同时启动海肾荧光素酶反应,检测海肾荧光素酶活性。计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值,即为报告基因的相对活性。每组实验重复三次,结果取平均值。

1.2.6 统计学分析 数据采用 SPSS18.0 统计软件进行处理,计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示,多组间的比较采用 t 检验和方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

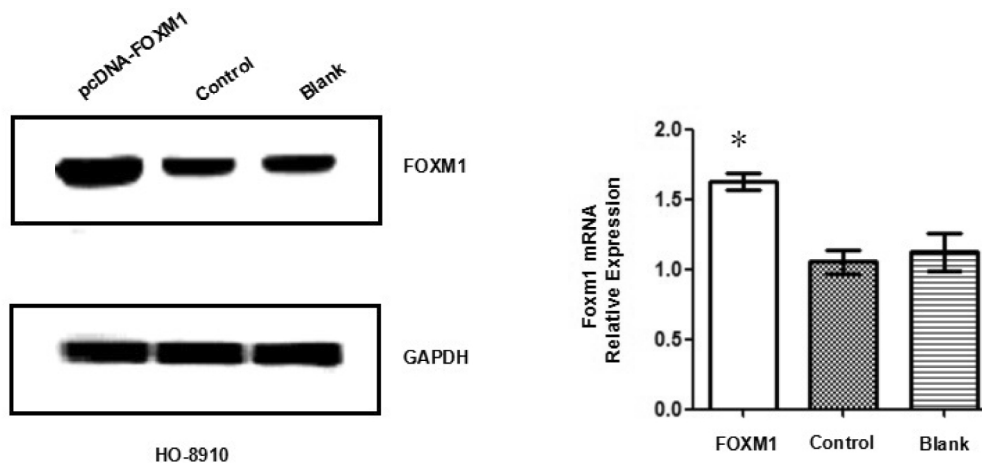
2 结果

2.1 pcDNA3.1-FOXM1 质粒转染 HO-8910 细胞后 FOXM1 的表达水平

检测 pcDNA3.1-FOXM1 质粒转染 HO-8910 卵巢癌细胞 48h 后 FOXM1 表达水平的变化,Western Blot 和 Real Time RT-PCR 结果表明:较对照组(未转染)和空载体组(pcDNA3.1)相比,转染组细胞(pcDNA3.1-FOXM1)中 FOXM1 mRNA 及蛋白表达显著增高($P < 0.05$,图 1)。

2.2 FOXM1-siRNA 质粒转染 HO-8910PM 卵巢癌细胞后 FOXM1 的表达水平

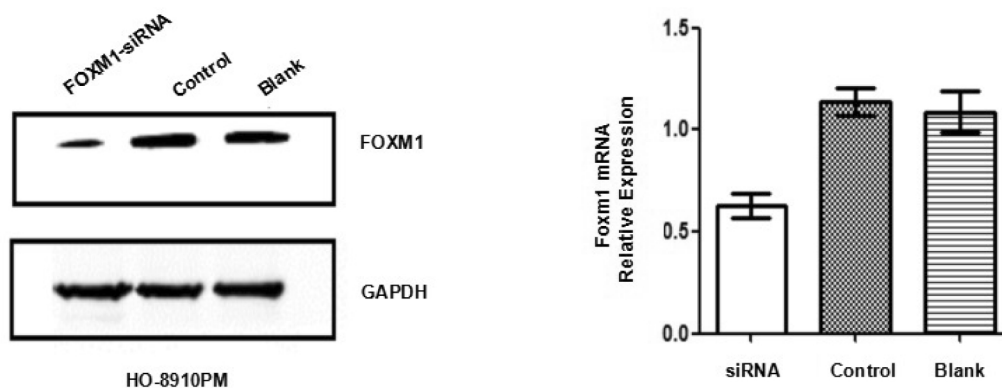
Western Blot 和 Real Time RT-PCR 结果表明:较空载体组 (Control)、未转染组 (Blank) 相比,转染组 (FOXM1-siRNA) 细胞中 FOXM1 mRNA 及蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$,图 2)。



HO-8910

图1 pcDNA3.1-FOXM1 转染 HO-8910 细胞后 FOXM1 的表达显著增加

Fig.1 Both protein and mRNA levels were significantly increased HO-8910 cells after transfection with FOXM1



HO-8910PM

图2 FOXM1-siRNA 转染 HO-8910PM 细胞后 FOXM1 的表达

Fig.2 Both protein and mRNA levels were significantly decreased HO-8910PM cells after transfection with FOXM1-si-RNA

2.3 pcDNA3.1-FOXM1 和 FOXM1-siRNA 质粒分别对 HO-8910 和 HO-8910PM 卵巢癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验是反映肿瘤细胞通过分泌基质降解酶分解人工基底膜,以穿过 Matrigel 微孔膜的细胞数表示细胞的侵袭运动的能力。pcDNA3.1-FOXM1 和 FOXM1-siRNA 质粒在分别转染 HO-8910 和 HO-8910PM 卵巢癌细胞 24 h 后,结果显示:相对于空载体组和空白组,pcDNA3.1-FOXM1 转染组细胞的侵袭能力明显增强($P<0.05$),而 FOXM1-siRNA 转染组细胞的侵袭能力明显降低($P<0.05$),说明 pcDNA3.1-FOXM1 能够明显促进卵巢癌细胞 HO-8910 的侵袭能力,与之相反,FOXM1-siRNA 能够明显下调卵巢癌细胞 HO-8910PM 的侵袭能力,见图 3,图 4。

2.4 FOXM1 对 MMP9 的转录激活作用

将重组质粒 pGL3-pM9 与真核表达载体 pcDNA3.1-FOXM1 按不同剂量共转染,结果显示:随着 FOXM1 质粒剂量的增加,基质金属蛋白酶-9(MMP9)启动子区的活性逐渐增强,呈现出剂量依赖的关系,荧光强度表示为相对 pGL3-Basic 的相对值,所有值都经过 pRL-TK 的校正($P<0.05$,图 5)。

3 讨论

FOXM1 是一种原癌基因,在多种癌组织中高表达,如基底

细胞癌、乳腺癌、小细胞肺癌、胃癌、前列腺癌等,是一个与癌发生、发展密切相关的重要分子^[4]。2010 年,因在恶性肿瘤中的重要作用,FOXM1 被分子和细胞生物学及生物技术学会及研究国际协会(简称为 ISMCBBPR)评为年度分子。一些著名的分子如 P53、NO、睡美人转座子/转座酶 SB100X 都曾经当选。研究发现,FOXM1 的蛋白水平和核苷酸水平在细胞周期进程中是不停改变的,在 G0 期表达很低,进入 G1 期后表达逐渐增高并在 G1 晚期和 S 期早期到达峰值,此后一直维持高峰值至 M 期,在 M 期迅速被降解而表达量剧减^[5]。FOXM1 的这种周期变化提示其参与细胞周期的调节,事实上这也是 FOXM1 最主要的功能。RNAi 能够高效抑制靶基因的表达,能对特定的基因产生专一的沉默效果^[6],因此应用 RNAi 和特异性 FOXM1 抑制剂降低肿瘤细胞中 FOXM1 表达,能够诱导细胞周期停滞、肿瘤细胞增生受抑、细胞凋亡增多^[7]。另外,越来越多的研究表明,FOXM1 与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[8-12],而侵袭和转移也是恶性肿瘤的重要特征,是其复发和致死的主要原因。目前关于 FOXM1 在卵巢癌中的侵袭、转移作用以及相关分子机制尚不完全清楚。基质金属蛋白酶 MMPs 在肿瘤的侵袭、转移和基质重建过程中发挥着关键的作用^[13,14],其中对 MMP-9 研究的最多,它在降解细胞外基质及基底膜中发挥重要作用,被认为与肿瘤的侵袭性和转移性关系最为密切的金属蛋白酶^[15-18]。在大多数

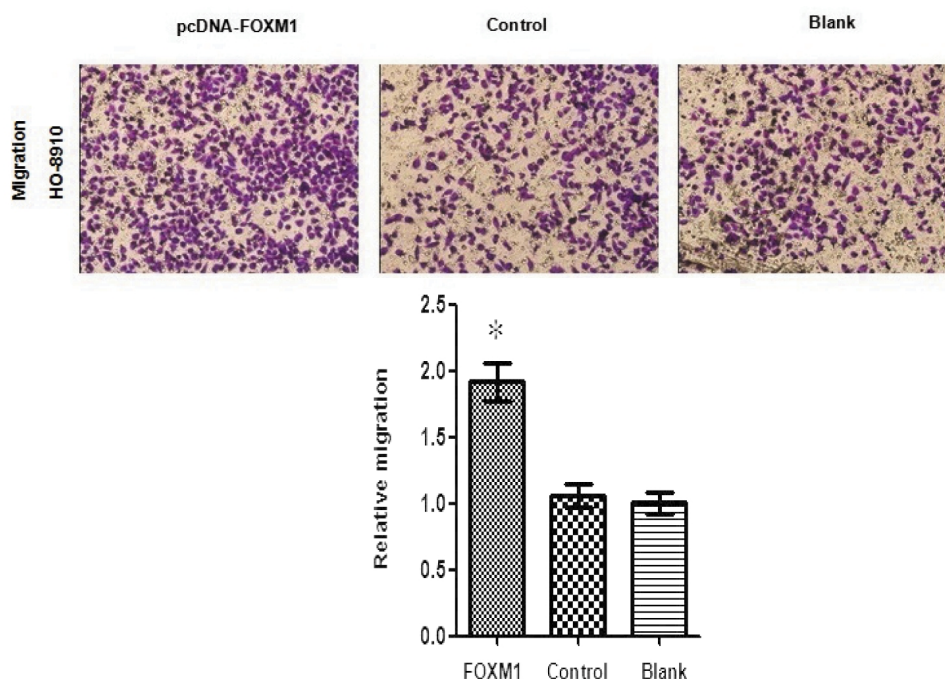


图3 Transwell 体外侵袭实验检测 FOXM1 对卵巢癌细胞 HO-8910 的侵袭能力

注: $P < 0.05$ 与空载体组和空白组比较

Fig.3 Overexpression of FOXM1 in HO-8910 cells resulted in an increase in cellular migrate capacity

Note: $P < 0.05$ compared with control and blank

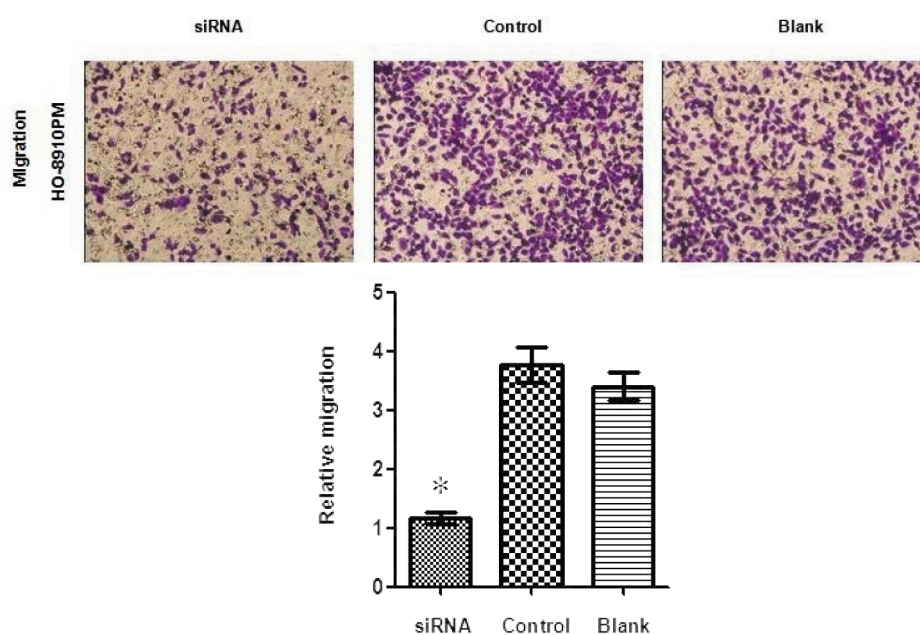


图4 Transwell 体外侵袭实验检测 FOXM1 对卵巢癌细胞 HO-8910PM 的侵袭能力

注: $P < 0.05$ 与空载体组和空白组比较

Fig.4 Suppression of FOXM1 expression in HO-8910PM cells resulted in significant reduction in cellular migration

Note: $P < 0.05$ compared with control and blank

肿瘤细胞中都发现 MMP-9 都高表达,如胆管癌细胞、宫颈癌、胃癌细胞、胰腺癌细胞和乳腺癌细胞等,特别在浸润性肿瘤,相反在良性肿瘤和非侵袭性生长的肿瘤中 MMP-9 表达都较低^[19]。因此,本实验首先通过 Western blot 和 qPCR 检测了过表达载体 pcDNA3.1-FOXM1 和基因沉默 FOXM1-siRNA 质粒分别转染卵巢癌低转移细胞株 HO-8910、高转移细胞株

HO-8910PM 后 FOXM1 的表达情况,结果表明,pcDNA3.1-FOXM1 转染组细胞的 FOXM1 mRNA 及蛋白表达明显增高,而 FOXM1-siRNA 转染细胞的 FOXM1 mRNA 及蛋白表达明显降低。为了进一步检测 FOXM1 在卵巢癌中的侵袭、转移机制,体外 Transwell 实验检测转染前后 FOXM1 侵袭能力的变化,结果显示,pcDNA3.1-FOXM1 转染组细胞的侵袭能力明

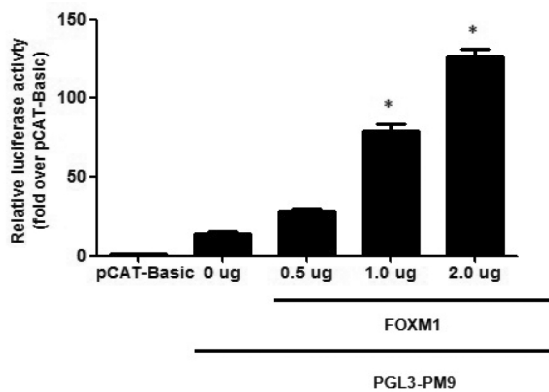


图5 双荧光素酶报告系统检测 FOXM1 对 MMP9 基因的转录激活作用

Fig.5 The involvement of FOXM1 in regulating MMP9 expression

显增强,而 FOXM1-siRNA 转染细胞的侵袭能力明显降低。此外,双荧光素酶报告系统检测 FOXM1 是否对 MMP9 基因有转录激活作用,结果发现随着 FOXM1 质粒剂量的增加,基质金属蛋白酶-9(MMP9)启动子区的活性逐渐增强,呈现出剂量依赖的特点,这说明转录因子 FOXM1 可以结合到 MMP9 启动子区并对其转录调控起着上调作用。结合上面三部分的实验结果,进一步说明 FOXM1 过表达影响卵巢癌侵袭、转移可能是通过促进基质金属蛋白酶 MMP9 的分泌,降解基质金属蛋白酶,从而促进卵巢癌的侵袭和转移。随着 FOXM1 转录因子与肿瘤关系的深入研究,我们对该转录因子有了进一步新的认识,本研究验证了 FOXM1 在卵巢癌细胞中的表达及其对侵袭转移能力的影响机制,这些研究结果为 FOXM1 为治疗靶点抑制卵巢癌转移提供了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Wierstra I. FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 119:191-419
- [2] Zhao SH, Zhao, Wang Y, Wen L, et al. Basigin-2 is the predominant basigin isoform that promotes tumor cell migration and invasion and correlates with poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. *J Transl Med*, 2013, 8(11): 92
- [3] Xu H, Chen X, Huang J, et al. Identification of GPR65, a novel regulator of matrix metalloproteinases using high throughput screening[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(1):96-103
- [4] Raychaudhuri P, Park HJ. FoxM1: a Master Regulator of Tumor Metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4329-4333
- [5] Laoukili J, Alvarez-Fernandez M, Stahl M, et al. FOXM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7 (17):2720-2726
- [6] Wang Z, Rao DD, Senzer N, et al. RNA interference and cancer therapy [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12):2983-2995
- [7] Kim IM, Ramakrishna S, Gusarova GA, et al. The forkhead box M1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23):22278-22286
- [8] Lok GT, Chan DW, Liu VW, et al. Aberrant Activation of ERK/FOX-M1 Signaling Cascade Triggers the Cell Migration/Invasion in Ovarian Cancer Cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23790
- [9] Chan DW, Hui WW, Cai PC, et al. Targeting GRB7/ERK/FOX-M1 Signaling Pathway Impairs Aggressiveness of Ovarian Cancer Cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e52578
- [10] Xu N, Jia D, Chen W, et al. FoxM1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients through promoting tumor metastasis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59412
- [11] Chen PM, Wu TC, Shieh SH, et al. MnSOD promotes tumor invasion via upregulation of FoxM1-MMP2 axis and related with poor survival and relapse in lung adenocarcinomas[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11 (3):261-271
- [12] He SY, Shen HW, Xu L, et al. FOXM1 promotes tumor cell invasion and correlates with poor prognosis in early-stage cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 127(3):601-610
- [13] Wang L, Cossette SM, Rarick KR, et al. Astrocytes directly influence tumor cell invasion and metastasis in vivo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80933
- [14] Hanahan D, Lanzavecchia A, Mihich E. Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11):3005-3008
- [15] Ath PT, Naxakis SS, Mastronikolis NS, et al. Determination of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein expression in laryngeal squamous cell carcinomas based on digital image analysis [J]. *J BUON*, 2013, 18(4):977-981
- [16] Chen X, Qiu J, Yang D, et al. MDM2 Promotes Invasion and Metastasis in Invasive Ductal Breast Carcinoma by Inducing Matrix Metalloproteinase-9[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78794
- [17] Park SY, Jin ML, Kim YH, et al. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(1):497-504
- [18] Nakahira K, Morita A, Kim NS, et al. Phosphorylation of FOX-P3 by LCK downregulates MMP9 expression and represses cell invasion[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e77099
- [19] 崔凯, 颜婷, 冯贤松. FOXM1 和 MMP-9 在肝细胞肝癌组织中的表达及意义[J]. *腹部外科杂志*, 2012, 25(5):306-308
- Cui Kai, Yan Ting, Feng Xian-song. The expression and significance of FOXM1 and MMP-9 in hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Abdominal Surgery*, 2012, 25(5):306-308