

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.005

靶向下调 FOXM1 基因表达对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 *

艾振华 王 宇 吴 波 王 毅 刘文超[△]

(第四军医大学西京医院肿瘤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨靶向抑制 FOXM1 对乳腺癌细胞增殖能力的影响,为乳腺癌的个性化靶向治疗提供理论依据。**方法:**利用重组真核转录载体 pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA,脂质体法转染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,下调其 FOXM1 基因表达。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法、平板克隆形成实验观察细胞增殖曲线以及克隆形成能力;采用实时定量-聚合酶链反应 (Real-time qPCR)、蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测 FOXM1 基因在 mRNA、蛋白水平的表达变化。**结果:**重组载体 pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA 转染 MDA-MB-231 细胞后,与对照组相比,增殖速率明显下降 ($P<0.05$),平板克隆形成显著减少 ($P<0.05$),重组载体转染后显著抑制 MDA-MB-231 细胞中 FOXM1 基因在 mRNA、蛋白水平的表达。**结论:**沉默 FOXM1 基因对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 生长具有抑制作用,为阐明乳腺癌发病机制提供了新的切入点,也为临床抑制肿瘤生长提供了新的作用靶点。

关键词: FOXM1; 乳腺癌; 细胞增殖; RNA 干扰

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)01-23-04

Effects of Silencing FOXM1 on Cell Proliferation of Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231*

AI Zhen-hua, WANG Yu, WU Bo, WANG Yi, LIU Wen-chao[△]

(Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: This experiment is designed to figure out the effect of breast cancer cells proliferation after target silencing of FOXM1, thus providing a mineral strategy for individualized and target breast cancer therapy. **Methods:** The recombinant vectors with shRNA targeting FOXM1 (pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA) were transfected into MDA-MB-231 cells with the help of lipofectamine 2000 to down regulate the expression of FOXM1. MTT assay and Colony Forming Assay were used to evaluate the proliferation and colony forming efficacy of MDA-MB-231 cells. Meantime, Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and Western blot assay were performed to monitor the expression of mRNA and protein level of FoxM1. **Results:** After transfection of the pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA target FOXM1, cell proliferation was enormously decreased compared to control groups ($P<0.05$). FOXM1 expression in the transfected MDA-MB-231 cells was significantly depressed both at mRNA and protein level. **Conclusion:** The pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA target FOXM1 could efficiently inhibit FOXM1 gene expression in breast cancer cell line MDA-MB-231. Stable silence of FOXM1 gene by shRNA could negatively regulate cell proliferation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. This experiment could provide a new insight into the mechanism of breast cancer and suggest a promising target of suppression cancer growth.

Key words: FOXM1; Breast cancer; Cell proliferation; RNA interference

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-23-04

前言

Forkhead box M1(FOXM1)是叉头框转录因子家族成员之一,定位于 12p13.3 号染色体,长约 23 kb,广泛存在于具有分裂活性的细胞中,具有调节细胞增殖、分化等功能,在 DNA 损伤和肿瘤形成等诸多病理过程中均发挥重要的作用^[1-5]。近年来,研究表明 FOXM1 在许多恶性实体瘤中表现为异常高表

达,包括胃癌、肺癌、胰腺癌等^[6-10]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着女性的健康;近年来,其特异性靶向治疗已成为基础与临床研究的热点^[11]。研究表明^[12,13],FoxM1 在乳腺癌中也存在异常高表达现象,因此,FOXM1 可能对乳腺癌的发生与发展也同样起着重要的作用,并可能成为乳腺癌分子治疗的新靶点。本研究拟以体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究模型,利用脂质体转染质粒介导 RNAi 技术沉默

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272202)

作者简介:艾振华(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤内科学的研究,

电话:18392187048;E-mail: azhfmmu@foxmail.com

△ 通讯作者:刘文超(1962-),女,博士生导师,教授,主任医师,主要研究方向:肿瘤化疗和生物学治疗工作,

E-mail: liuch@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-09-23 接受日期:2013-10-24)

FOXMI 表达,观察乳腺癌细胞增殖等生物学特性的变化,初步在细胞与分子水平阐释 FOXMI 对于乳腺癌细胞增殖的调控机制,进一步探讨乳腺癌的发病机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L15 培养基(Gibco, USA),胎牛血清(FBS, 杭州四季青),胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, USA), Opti-MEM (optimum-minimum essential medium)去血清培养基, Lipofectamine2000 (Life technologies, USA); 二甲基亚砜(DMSO, Ventec, USA); 酶标仪(Bio-Rad 680, USA), 冷冻离心机(Eppendorf, Germany), 兔抗人 FOXMI、 β -actin 抗体 (Santa Cruz, USA), HRP 标记羊抗兔 IgG (Pierce, USA), 垂直电泳槽、电泳仪 (Bio-Rad, USA), Total RNA Kit II (OMEGA, USA), PrimeScript RT reagent kit, Real time PCR kit (TaKaRa, Japan)。

1.2 细胞培养

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞获自第四军医大学细胞工程中心,添加含 10%胎牛血清的 L15 培养基,于 37℃、低浓度 CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内培养,每 48 h 更换培养基 1 次。

1.3 重组质粒转染 MDA-MB-231 细胞

重组质粒 pSilencer1.0-U6-FOXMI-shRNA 获赠于第四军医大学细胞工程中心李郁副教授。将 MDA-MB-231 细胞以 6×10^5 接种于 100 mm 细胞培养皿,按上述条件下培养至细胞融合度约 70%,更换 Opti-MEM 去血清培养基。实验分为 3 组:实验组细胞转染 pSilencer1.0-U6-FOXMI-shRNA 质粒,阴性对照组细胞(NC 组)转染空白对照质粒 pSilencer1.0-U6,空白对照组细胞(Blank 组)。脂质体与质粒用量参照 Life Technologies 公司 Lipofectamine2000 说明书。转染 10 h 后 PBS 缓冲液清洗 1 遍,更换为含 10%胎牛血清的 L15 培养基,按上述条件继续培养,用于进一步实验。

1.4 MTT 比色法测细胞增殖

转染后 48 h,胰蛋白酶消化各实验组细胞,以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板培养,同时添加多西他赛用作阳性对照,每组细胞分 4 个复孔,外周孔以去离子水代替,共铺 4 块 96 孔板,添加 10%胎牛血清的 L15 培养基,37℃、无 CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内培养。在培养 24 h、48 h、72 h、96 h 时,各取 1 块 96 孔板,每孔加入 MTT 溶液 20 μ L,37℃ 孵育 4 h 后,避光下小心吸取上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,酶标仪中震荡 10 min,使紫色结晶物充分溶解,在 490 nm (参考波长 630 nm) 处测量并记录每孔的光密度 OD 值(A490)。每组细胞 4 复孔光密度 OD 值取平均值,以时间(h)为横坐标,OD 平均值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.5 平板克隆形成实验

MDA-MB-231 细胞经转染实验后,分为三组:空白组,NC 组和实验组。取生长状态良好的培养细胞,用胰酶消化各组细胞,充分吹打细胞悬液使细胞分散,6 孔板中接种 3000 个/孔细胞,每组细胞接种 2 孔,培养箱中培养一周。然后用体积分数为 0.95%乙醇固定,显微镜下拍照,随机选取 7 个视野计数其克隆形成数。

1.6 Real-time qPCR 检测 FOXMI mRNA 表达水平

转染 48 h 后收集各实验组细胞,采用 SYBR Green I 染料法检测各组细胞 FOXMI 基因表达变化,FOXMI 基因 PCR 引物为:上游引物 5'-GAAGAACTCCATCCGCCACA-3',下游引物 5'-GCCTTAAACACCTGGTCCAATGTC-3'; β -actin 引物为:上游引物 5'-TGGCATTGTTACCAACTGGGTC-3',下游引物 5'-TCACGGTTGGCCTTAGGGTTC-3'。总 RNA 抽提与反转录 cDNA 合成均严格按照 OMEGA、TaKaRa 相关试剂盒说明书进行,PCR 反应条件如下:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 1 min,共进行 40 个循环,循环结束后 71℃ 30 s,所得结果进行读数分析。采用相对定量法分析实验组、NC 组及 Blank 组细胞转染 48 h 后各组 Δ Ct 值计算 $\Delta\Delta$ Ct,进而换算为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,即为转染 48 h 后各组 FOXMI 相对表达量。

1.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 FOXMI 蛋白表达水平

实验组、NC 组及 Blank 组细胞转染 48 h 后常规提取总蛋白,测定蛋白浓度调整蛋白上样量,灌制 10%分离胶,每泳道上样 30 μ g,行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭,抗 FOXMI 一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,ECL 显色,置入仪器观察,拍照记录。

1.8 统计学分析

数据使用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对多个样本均数进行完全随机设计的单因素方差分析,各均数间两两比较行 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 稳定沉默 FOXMI 表达抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖

噻唑蓝比色法(MTT)检测显示,阴性对照组细胞与空白对照组细胞间细胞增殖速率无明显差异($P > 0.05$),实验组转染重组质粒 pSilencer1.0-U6-FOXMI-shRNA 后与阴性对照组相比细胞增殖速率降低,具有统计学意义($P < 0.05$),而阳性对照多西他赛对细胞增殖显示出明显的抑制作用,表明实验方法具有可行性,见图 1。

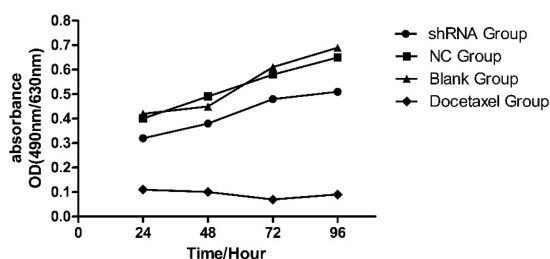
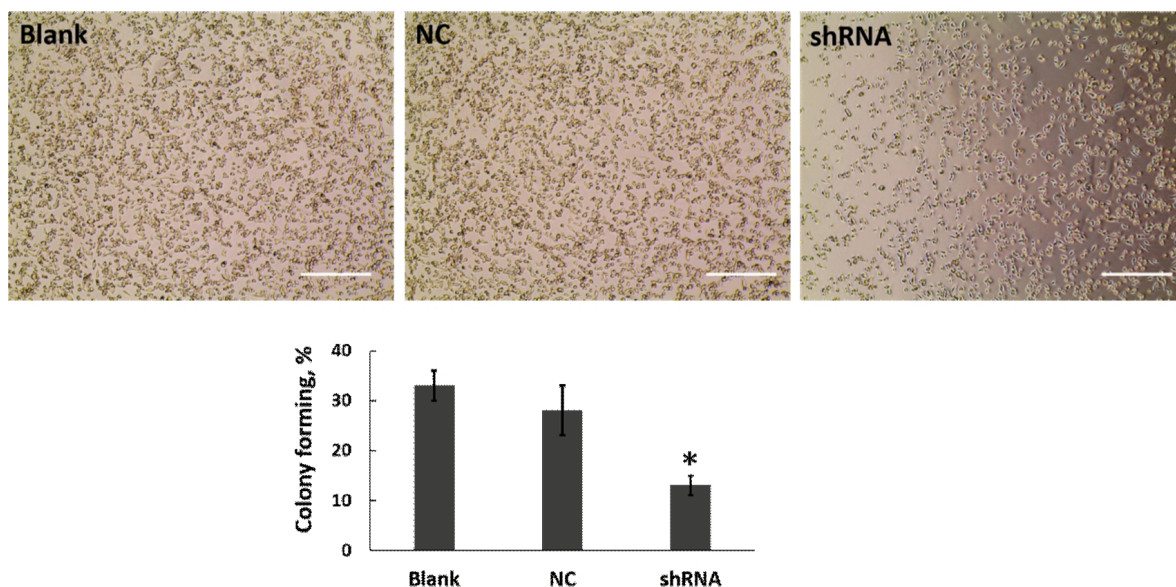


图 1 转染后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生长曲线图

Fig.1 Growth curve of transfected breast cancer MDA-MB-231 cells

2.2 稳定沉默 FOXMI 表达抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞克隆

平板克隆实验检测显示,阴性对照组与空白对照组细胞间细胞克隆形成率无明显差异($P > 0.05$),实验组转染重组质粒 pSilencer1.0-U6-FOXMI-shRNA 后与阴性对照组相比细胞克隆形成率明显降低,具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

图2 转染后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 克隆形成,标尺=200 μ m, *P<0.05Fig.2 Colony forming assay of transfected breast cancer MDA-MB-231cells. Scale bar=200 μ m, *P<0.05

2.3 稳定沉默 FOXM1 表达抑制 FOXM1mRNA 表达水平

Real-time qPCR 检测显示,转染靶向特异性 shRNA 后,实验组与阴性对照组、空白对照组相比,FOXM1 表达水平显著降低,具有统计学意义($P < 0.05$),阴性对照组细胞与空白对照组细胞间 FOXM1 表达水平未见明显差异($P > 0.05$),见图 3。

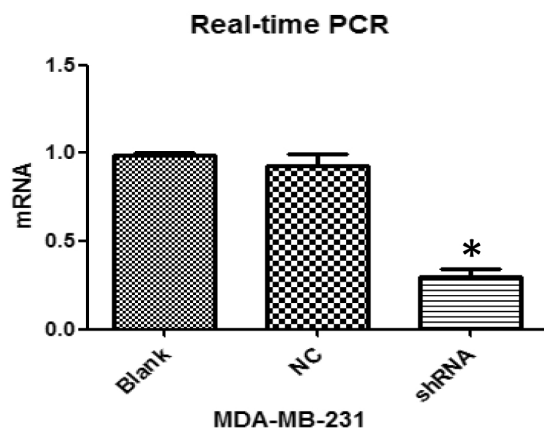


图3 转染后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 FOXM1 的 mRNA 相对表达, *P<0.05

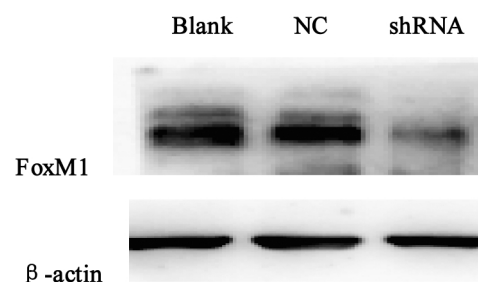
Fig.3 Relative mRNA level of FOXM1 in breast cancer MDA-MB-231cells after transfection. *P<0.05

2.4 稳定沉默 FOXM1 表达抑制 FOXM1 蛋白表达水平

Western blot 结果显示,稳转靶向特异性 shRNA 后,实验组与阴性对照组、空白对照组相比,FOXM1 蛋白条带明显变细、变浅,相对表达量显著下降,具有统计学意义($P < 0.05$),阴性对照组与空白对照组蛋白条带无明显差别,相对表达量未见明显差异 ($P > 0.05$),内参 β -actin 三组蛋白条带无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 4。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率占所有肿瘤

图4 转染后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 FOXM1 及 β -actin 的 western blot 实验结果Fig.4 Western blot of FOXM1 and β -actin in breast cancer MDA-MB-231cells after transfection

的 7%~10%,在我国其发病率呈逐年上升的趋势,发病年龄趋向年轻化,居女性恶性肿瘤的前两位^[14]。乳腺癌是一种多因素共同作用的恶性肿瘤,与年龄、遗传、环境、心理、社会等因素密切相关。其发生、发展及预后与多基因突变或异常表达有关,包括原癌基因的过表达,抑癌基因的沉默等。

乳腺癌治疗过程中,科学合理的分子靶向药物治疗给予了患者赢得更长的生存时间以及更好的生活质量^[15],因此,研发新型特异性高、副作用小的靶向药物成为乳腺癌基础与临床研究热点。许多肿瘤的发生发展与基因表达的异常增高有密切关系,采用 RNA 干扰技术,设计靶向针对乳腺癌致病基因的小 RNA 分子转染细胞,使得靶基因沉默,对肿瘤治疗具有重要意义^[16]。因此,寻找乳腺癌关键的分子,是 RNA 干扰技术应用的前提。

FOXM1 是人 FOX 转录因子家族中的一员,普遍表达于发育中的胚胎,在成人体内,FOXM1 高表达于胸腺组织和睾丸组织。FOXM1 与细胞周期关系密切,G0 期的细胞中几乎检测不到 FOXM1 的表达,当细胞受到各种因素的影响后进入细胞周期时,FOXM1 表达增高;相反,FOXM1 表达缺失则导致纺锤体损伤和有丝分裂延迟^[1]。FOXM1 与细胞增殖密切相关,其表达

水平的异常势必在肿瘤的发生发展过程中扮演者重要作用,包括肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡与 DNA 损伤修复等。例如 Calvisi 等报道人肝癌组织中 FOXM1 表达程度与增殖指数呈正相关,与凋亡和预后成负相关^[17]。Li 等报道上调 FOXM1 表达水平可促进胃癌细胞的增殖与转移^[18]。可以推测,FOXM1 也具有正向的促进乳腺癌增殖的作用,将 FOXM1 作为乳腺癌的治疗靶点,应用 RNA 干扰技术沉默其表达,从而抑制肿瘤生长,具有一定的可能性。

事实上,近年来确有研究也表明乳腺癌组织中亦存在 FOXM1 异常高表达现象^[12-13]。为深入研究这一问题,我们采用自行设计的重组质粒 pSilencer1.0-U6-FOXM1-shRNA 进行体外稳定转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,观察其抑制效应。转染后 FOXM1 在 MDA-MB-231 细胞中表达量显著降低,细胞增殖速率明显降低,克隆形成能力也严重受损,提示 FOXM1 在乳腺癌的增殖中确实扮演者重要的角色。更为重要的是,这种 RNA 干扰的方法对乳腺癌的治疗也具有一定的可行性。虽然也有报道采用 siRNA 沉默 FOXM1 后观察乳腺癌相关分子表达的变化^[19],然而相对我们设计的质粒嵌入的 shRNA 而言,外源性 siRNA 极为脆弱,发挥作用有限,不具有很长期的高效性和稳定性。

FOXM1 对肿瘤增殖的促进作用机制较为复杂,目前研究也逐渐深入。肿瘤细胞的增殖本质源自于肿瘤细胞的有丝分裂,其成功分裂依赖于纺锤体的正确装配,而由细胞微管组织形成的中心体则是纺锤体的构成基础。最近研究发现的中心体相关蛋白 Cep55,可将中心体与处于分裂细胞赤道面的分裂沟内的中间体偶联,并与 CGNAP 及 KenDrin 蛋白共同作用参与纺锤体装配。而研究证明,中心体相关蛋白 Cep55 是 FOXM1 下游的靶基因。而 FOXM1 不但调控着 Cep55 的转录和生成,还通过 Ras-MAPK 信号通路影响其活性,这可能是 FOXM1 促进细胞增殖的机制之一^[20]。进一步深入研究 FOXM1 在乳腺癌中的重要作用,将会对阐明乳腺癌发生、发展机制具有重大意义,同时也为寻找乳腺癌分子靶向的治疗方案提供重要的理论支撑。

参考文献(References)

- [1] Korver W, Roose J, Clevers H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1715-1719
- [2] Yao KM, Sha M, Lu Z, et al. Molecular analysis of a novel winged helix protein, WIN. Expression pattern, DNA binding property, and alternative splicing within the DNA binding domain [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 1927-1936
- [3] Ye H, Kelly TF, Samadani U, et al. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17: 1626-1641
- [4] Wierstra I, Alves J. FoxM1, a typical proliferation-associated transcription factor[J]. Biol Chem, 2007, (388): 1257-1274
- [5] Schuler U, Zhao Q, Godinho SA, et al. Forkhead transcription factor FoxM1 regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors[J]. Mol Cell Biol, 2007, (27): 8259-8270
- [6] Zeng J, Wang L, Li Q, et al. FoxM1 is up-regulated in gastric cancer and its inhibition leads to cellular senescence, partially dependent on p27 kip[J]. J Pathol, 2009, (218): 419-427
- [7] Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, et al. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas[J]. Lung Cancer, 2009, (66): 64-74
- [8] Zhang Y, Zhang N, Dai B, et al. FoxM1 B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells[J]. Cancer Res, 2008, (68): 8733-8742
- [9] Uddin S, Ahmed M, Hussain A, et al. Genome-wide expression analysis of Middle Eastern colorectal cancer reveals FOXM1 as a novel target for cancer therapy[J]. Am J Pathol, 2011, (178): 537-547
- [10] Chan DW, Yu SY, Chiu PM, et al. Overexpression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis[J]. J Pathol, 2008, (215): 245-252
- [11] Fan Y, Sun ZJ. Expression of sIL-2R before and after Chemotherapy in Patients with Breast Cancer [J]. Chin J Cancer Res, 2008, 20(2): 150-154
- [12] Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, et al. Identification of early molecular markers for breast cancer[J]. Mol Cancer, 2011, (10): 15-26
- [13] Bektas N, Haaf At, Veeck J, et al. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 42
- [14] 张敏璐,黄哲宙,郑莹.中国 2008 年女性乳腺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测[J].中华流行病学杂志, 2012, 33(10): 1049-1051
Zhang Min-lu, Huang Zhe-zhou, Zheng Ying. Estimates and prediction on incidence, mortality and prevalence of breast cancer in China, 2008[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(10): 1049-1051
- [15] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(8): 2784-2789
- [16] Macino G, Romano N. Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences[J]. Mol Microbiol, 1992, 22: 3343-3353
- [17] Calvisi DF, Pinna F, Ladu S, et al. Forkhead box M1B is a determinant of rat susceptibility to hepatocarcinogenesis and sustains ERK activity in human HCC[J]. Gut, 2009, 58: 679-687
- [18] 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: 3501-3509
- [19] Wang M, Gartel AL. The suppression of FOXM1 and its targets in breast cancer xenograft tumors by siRNA[J]. Oncotarget, 2011, 2: 1218-1226
- [20] 陈国庆,姚珍薇,罗欣.转录因子 FOXM1 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J].生命科学研究, 2011, 15(1): 70-74
Chen Guo-qing, Yao Zhen-wei, Luo Xin. Expression and Clinical Significance of FOXM1 in Epithelial Ovarian Carcinoma[J]. Life Science Research, 2011, 15(1): 70-74