

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.010

· 临床研究 ·

转录因子 FOXP4 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其对喉鳞癌 TU177 细胞生物学特性的影响

赵岩¹, 刘胜辉¹, 王晶田¹, 石艳凤², 石健¹, 吴千勋¹, 兰利利¹ (1. 河北医科大学第四医院 耳鼻喉头颈外科, 河北石家庄 050011; 2. 滦南县医院 五官科, 河北唐山 063000)

[摘要] **目的:** 检测转录因子 FOXP4 (Forkhead box P4) 在喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 组织和细胞系中的表达, 及其对 LSCC 细胞 TU177 体外增殖、迁移、侵袭、细胞周期及凋亡的影响, 并探讨其与上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程间的关系。 **方法:** 从河北医科大学第四医院生物标本库选取 2013 年 6 月至 2015 年 12 月收治的 40 例 LSCC 手术患者的癌及癌旁组织标本, 应用 qPCR 法检测 FOXP4 在 LSCC 与相应癌旁组织中的表达水平, 应用 qPCR 法和 Western blotting 检测 FOXP4 在人 LSCC 细胞系 (AMC-HN-8、TU177、TU686 及 TU212) 中的表达水平。采用小干扰 RNA 敲低 TU177 细胞中 FOXP4 的表达, MTS 实验、克隆形成实验、Transwell 实验及流式细胞术分别检测 FOXP4 敲低对 TU177 细胞增殖、迁移、侵袭、周期及凋亡的影响。应用 qPCR 法检测 si-FOXP4 转染 TU177 细胞后 EMT 标志物 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、波形蛋白 (Vimentin)、扭曲蛋白 (Twist)、转录因子 Snail 及锌指 E 盒结合蛋白 1 (zinc finger E box binding homeobox 1, ZEB1) mRNA 的变化情况, 应用 Western blotting 测定 FOXP4 敲低后 N-cadherin、 β -catenin、Vimentin 及 Twist 蛋白水平的改变。 **结果:** 在 LSCC 组织中 FOXP4 的表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$), 且与肿瘤的 TNM 分期及淋巴结转移相关 (均 $P < 0.05$)。FOXP4 在 LSCC 细胞中的表达亦高于癌旁组织 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转染 si-FOXP4 的 TU177 细胞中 FOXP4 的表达显著低于对照组 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 敲低 FOXP4 可抑制 TU177 细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$), 敲低 FOXP4 可使细胞周期阻滞于 G0/G1 期 ($P < 0.01$), 减少 S 期的复制 ($P < 0.01$), 促进细胞凋亡 ($P < 0.01$), 敲低 FOXP4 可降低 TU177 细胞中 N-cadherin、 β -catenin、Vimentin、Twist、Snail、ZEB1 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 以及 N-cadherin、 β -catenin、Vimentin、Twist 的蛋白水平。 **结论:** FOXP4 的高表达可能与 LSCC 的发生和发展相关, FOXP4 敲低可以抑制 LSCC 细胞的体外增殖、迁移与侵袭能力, 使细胞 G0/G1 期阻滞及促进凋亡, 且可能参与 EMT 进程。

[关键词] 转录因子; FOXP4; 喉鳞状细胞癌; TU177 细胞; 生物学特性; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R739.65; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)08-0895-08

Expression of transcription factor FOXP4 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and its effects on biological characteristics of laryngeal squamous cell carcinoma TU177 cells

ZHAO Yan¹, LIU Shenghui¹, WANG Jingtian¹, SHI Yanfeng², SHI Jian¹, Wu Ganxun¹, Lan Lili¹ (1. Department of Otolaryngology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Luannan County Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of transcription factor FOXP4 (Forkhead box P4) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) tissues and cell lines, and to investigate its effects on the proliferation, migration, invasion, cell cycle, and apoptosis of LSCC TU177 cells *in vitro* as well as to explore its relationship with epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. **Methods:** A total of 40 pairs of tumor tissues and adjacent tissues that resected from LSCC patients were collected from the biological specimen bank of the Forth Hospital of Hebei Medical University between 2013 and 2015. The expression of FOXP4 in LSCC tissues and corresponding adjacent tissues was detected by qPCR. qPCR and Western blotting were used to detect the FOXP4 expression level in human LSCC cell lines (AMC-HN-8, TU177, TU686, and TU212). Small interfering RNA (si-RNA) was used to knock down FOXP4 expression in

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题资助项目 (No. 20201511, 20180588)。Project supported by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province (No. 20201511, 20180588)

[作者简介] 赵岩 (1972-), 男, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事头颈部肿瘤相关的基础与临床研究, E-mail: z13833187907@163.com

[通信作者] 赵岩 (ZHAO Yan, corresponding author), E-mail: z13833187907@163.com

TU177 cells. The effects of FOXP4 knockdown on the proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis of TU177 cells were measured by MTS assay, clone formation assay, Transwell chamber migration and invasion assay, and flow cytometry, respectively. The mRNA levels of EMT markers N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Twist, Snail and zinc finger E box binding homeobox 1 (ZEB1) after transfection of si-FOXP4 in TU177 cells were detected by qPCR. The changes of protein levels of N-cadherin, β -catenin, Vimentin and Twist after FOXP4 knockdown were measured by Western blotting. **Results:** The expression of FOXP4 in LSCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$), and it was related to the TNM stage of tumors and lymph node metastasis (all $P<0.05$). The expression of FOXP4 in LSCC cells was higher than that in the adjacent tissues ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of FOXP4 in TU177 cells transfected with si-FOXP4 was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). Compared with the control group, knocking down FOXP4 could inhibit the proliferation, migration and invasion but promote the apoptosis of TU177 cells *in vitro* (all $P<0.01$), block the cell cycle at G0/G1 phase ($P<0.01$), and reduce cell replication in S phase ($P<0.01$); in addition, knocking down FOXP4 could reduce the mRNA levels of N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Twist, Snail, ZEB1 ($P<0.05$ or $P<0.01$) and the protein levels of N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Twist in TU177 cells. **Conclusion:** The high expression of FOXP4 may be related to the occurrence and development of LSCC. FOXP4 knockdown can inhibit the proliferation, migration and invasion of laryngeal cancer cells *in vitro*, block cell cycle at G0/G1 phase, promote apoptosis, and may participate in the EMT process.

[Key words] transcription factor; FOXP4; laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC); TU177 cell; biological characteristics; cell cycle; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(8): 895-902. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.08.010]

根据《2018年全球癌症统计》^[1]报告,2018年全球有177 422例新发喉癌病例,占有新发癌症病例的1%,全球喉癌死亡94 771例,占有癌症死亡的1%。随着人口老龄化进程的加快,吸烟率的提高和城市化、工业化的发展,环境污染日益严重,中国喉癌的发病率也不容乐观。所有喉癌病例中,95%以上是喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)^[2],因此,寻找LSCC早期诊断的分子诊断学标志物是亟待解决的问题。本课题组采用TGF- β 处理LSCC细胞TU177后进行转录组表达谱基因芯片测序,分析发现,叉头盒蛋白4(Forkhead box P4, FOXP4)的表达显著上调,推测FOXP4的失调可能影响LSCC的发生发展。FOX蛋白是一个大的转录调节子家族,其中FOXP子家族由FOXP1~4四个成员构成^[3-4],其中FOXP1可抑制成神经细胞瘤的生长^[5],同时其高表达与肝癌细胞侵袭性恶性表型相关^[6];FOXP2的转录在多种肿瘤中显著下调,且其可能在体外抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[7];FOXP3在子宫颈癌中高表达,能促进子宫颈癌的增殖和侵袭,改变细胞周期,抑制其凋亡,从而导致子宫颈癌的发生发展和转移^[8];FOXP4在肝细胞癌及乳腺癌组织中均为高表达,促进癌细胞的增殖,迁移及侵袭^[9-10]。但FOXP4在LSCC中的角色及作用机制尚不明确,本研究检测FOXP4在LSCC组织及细胞中的表达水平,并进一步探讨其表达对LSCC细胞生物学特征的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

4株LSCC细胞系(AMC-HN-8、TU177、TU686及TU212)均购自美国ATCC细胞库。AMC-HN-8细

胞系用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养液培养,其余3株细胞(TU177、TU686及TU212)均用含10%FBS的RPMI 1640培养液培养,置于37℃、5%CO₂的培养箱中进行培养,4株细胞均为贴壁生长,每24h更换培养液。细胞汇合至80%左右时,0.25%胰酶消化并传代培养。

人重组TGF- β 购自美国R&D公司,小干扰RNA si-FOXP4及阴性对照 si-NC由上海吉玛基因公司合成,引物由上海生工公司合成,逆转录试剂盒、Lipofectamine2000转染试剂、MTS试剂均购自美国Promega公司,胰蛋白酶、TRIzol试剂购自北京索莱宝公司,胎牛血清购自美国BI公司,RPMI 1640及DMEM培养液购自美国Gibco公司,Transwell小室和基质胶(Matrigel)购自美国Corning公司,蛋白提取试剂购自康为世纪生物科技有限公司,Western blotting(WB)所用一抗:兔抗人N-钙黏蛋白(N-cadherin)、 β -连环蛋白(β -catenin)、波形蛋白(Vimentin)与扭曲蛋白(Twist)及 β -actin单克隆抗体均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,WB所用二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)购自美国KPL公司,ECL发光剂购自北京索莱宝生物科技有限公司,细胞周期及细胞凋亡试剂盒购自联科生物有限公司,细胞结果图片采用德国莱卡公司显微系统(Leica Microsystems)进行拍照。FOXP4 siRNA序列:5'-UGUAGAACUCAUGAUUCUGGGTT-3',5'-CAGAAUCAUGAGUUCUACAAGTT-3';NC siRNA序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.2 病理标本与临床资料

从河北医科大学第四医院生物标本库选取2013

年6月至2015年12月收治的40例LSCC手术患者的标本,所有患者术前均未接受放疗和化疗,全部为男性,中位年龄63岁(44~80岁)。每例患者取LSCC原发灶组织及距原发灶边缘3~5 cm以上的癌旁组织。每例标本一部分常规制作蜡块行H-E染色;一部分新鲜标本放入-80℃低温冰箱保存,用于提取总RNA。所有组织标本经H-E染色,癌组织由3位病理医师确诊为LSCC组织,癌旁组织未见癌细胞浸润。按照国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)标准进行TNM分期:I+II期13例(32.5%)、III+IV期27例(67.5%)。按照WHO肿瘤病理学分级标准:高中分化患者30例(75.0%),低分化患者10例(25.0%)。无淋巴结转移者18例(45.0%),有淋巴结转移者22例(55.0%)(表1)。

表1 40例食管鳞癌患者的临床病理资料
Tab.1 Clinical and pathological characteristics of 40 LSCC patients

Group	n (%)
Age (t/a)	
<63	19 (47.5)
≥63	21 (52.5)
Lymph node metastasis	
Negative	18 (45.9)
Positive	22 (55.0)
Pathological differentiation	
Well-moderate	30 (75.0)
Poor	10 (25.0)
TNM stage	
I+II	13 (32.5)
III+IV	27 (67.5)

1.3 qPCR法检测LSCC组织和细胞系中FOXP4的表达

收集40例LSCC组织及相应癌旁组织和4株LSCC细胞悬液,称取约100 mg组织标本置于EP管中,加入1 ml TRIzol裂解液,使用匀浆器充分研磨组织;细胞标本用PBS冲洗3次,加入1 ml TRIzol完全混匀,将细胞悬液移入EP管,然后在低温下提取组织及4株细胞系的总RNA,将总RNA反转录成cDNA,再以cDNA为模板进行qPCR检测,以 β -actin作为组织表达的内参照,随机取10例癌旁组织的cDNA混合后作为细胞表达的对照组(Pools),PCR引物序列:FOXP4 F为5'-GTGAGATGAGTCCCLSCCGAG-3', R为5'-AGLSCCGACTGTTTGCTGTCA-3'; β -actin F为5'-ACCGAGCGCGGCTACAG-3', R为5'-CT-TAATGTCACLSCCCGATTTC-3'。反应条件为95℃预变性10 min;95℃变性15 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸7 min,4℃保

存。在反应达到阈值的循环数被记录为该组织中FOXP4和 β -actin的CT值。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量,实验重复3次取平均值。

1.4 si-FOXP4转染TU177细胞敲降FOXP4 mRNA的表达

选择生长状态良好的TU177细胞用胰蛋白酶消化并计数,将细胞均匀铺于6孔板(2×10^5 个/孔),于光学显微镜下观察,待每孔细胞生长至70%~80%汇合时进行转染。分别在2个EP管中加入95 μ l无血清培养液与5 μ l si-FOXP4或si-NC,以及95 μ l无血清培养基与5 μ l转染试剂Lipofectamine2000,室温孵育5 min,将两EP管中的液体混合,室温孵育15 min。其中一孔加200 μ l转染试剂与si-FOXP4的混合液作为实验组(si-FOXP4),一孔加等量转染试剂与si-NC的混合液作为对照组(si-NC),培养48 h后,收集TU177细胞提取总RNA,qPCR检测干扰FOXP4 mRNA的表达的效果。

1.5 MTS实验检测敲低FOXP4对TU177细胞增殖能力的影响

将上述两组TU177细胞培养24 h后常规消化并收集细胞,调整细胞浓度至 1×10^4 个/ml, 1×10^3 个/孔接种于96孔板,每组设置6个复孔。分别于细胞贴壁后0、24、48、72和96 h时在每孔加入20 μ l(500 μ g/ml)MTS试剂,培养箱孵育2 h后用酶标仪测定490 nm处的光密度(D)值,以D值代表细胞增殖水平,绘制增殖曲线。

1.6 平板克隆形成实验检测敲低FOXP4对TU177细胞克隆形成能力的影响

将上述两组TU177细胞培养24 h后常规消化并收集细胞,调整细胞浓度,分别接种于6孔板(5×10^3 个/孔),常规培养7~10 d,显微镜下观察,当每个克隆团中的细胞数大于50个时终止培养。4%多聚甲醛固定20 min后用0.1%结晶紫染色20 min,将6孔板倒置用肉眼直接计数克隆数,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell实验检测敲低FOXP4对TU177细胞迁移和侵袭能力的影响

迁移实验:将上述两组TU177细胞培养24 h后常规消化并悬浮于RPMI 1640培养基中,调整细胞浓度接种于小室(1×10^5 个/孔),上室中加入无血清培养基补齐200 μ l,下室加600 μ l含10% FBS的完全培养基。常规培养24 h后取出小室,用棉签擦去上室内的细胞,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定20 min后用0.1%结晶紫染色20 min,显微镜下观察计数穿膜细胞,比较两组间的差异。

侵袭实验:将无血清培养基与Matrigel基质胶按

1:19 比例稀释,加入上层小室,37 °C培养箱烘干,后续步骤同迁移实验。

1.8 流式细胞术检测敲低 FOXP4 对 TU177 细胞周期的影响

将上述两组 TU177 细胞培养 48 h 后常规消化,收集 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞至 15 ml 离心管中,用 PBS 洗涤一次,离心弃上清。加入 500 μ l DNA Staining solution 和 10 μ l Permeabilization solution,涡旋振荡 5~10 s 混匀,室温避光孵育 30 min。选择最低上样速度,在流式细胞仪上进行细胞周期的检测。

1.9 流式细胞术检测敲低 FOXP4 对 TU177 细胞凋亡的影响

将上述两组 TU177 细胞培养 48 h 后常规消化,

收集 1×10^6 个细胞至 15 ml 离心管中,用预冷的 PBS 洗涤细胞两次,将细胞重悬于 $1 \times$ Binding Buffer 中,将 100 μ l 细胞悬液转移至 5 ml 离心管中,加入 5 μ l PE Annexin V 及 5 μ l 7-AAD,温和涡旋混匀,室温避光孵育 15 min,加入 400 μ l $1 \times$ Binding Buffer,在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

1.10 qPCR 法检测敲低 FOXP4 对 TU177 细胞 EMT 标志物 mRNA 水平的影响

应用 qPCR 法检测敲低 FOXP4 后 TU177 细胞中 N-cadherin、 β -catenin、Vimentin 及 Twist 的 mRNA 的表达情况。步骤同 1.3.3,所用引物、退火温度及目的基因产物大小见表 2。

表 2 qPCR 引物序列及反应条件

Tab.2 Primer sequences and reaction conditions of qPCR

Gene	Primer sequence	Annealing temperature ($t/^\circ\text{C}$)	Product size(bp)
N-cadherin	F: 5'-CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG-3'	59	205
	R: 5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'		
β -catenin	F: 5'-ATGGCTTGAATGAGAC-3'	50	189
	R: 5'-AACTGGATAGTCALSCCCC-3'		
Vimentin	F: 5'-CGCCTLSCCGGATGAGATTCAG-3'	58	175
	R: 5'-TCAGGGAGGAAAAGTTTGGAAA-3'		
Twist	F: 5'-ACCATCCTCACACCTCTG-3'	60	132
	R: 5'-GATTGLSCCCGACCTCTTG-3'		
Snail	F: 5'-ACGAGGTGTGACTAACTAT-3'	58	197
	R: 5'-CGACAAGTGACAGCCATT-3'		
ZEB1	F: 5'-TCATCGCTACTCCTACTGT-3'	54	171
	R: 5'-TCACTGTCTTCATCCTCTTC-3'		

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

1.11 WB 法检测敲低 FOXP4 对 TU177 细胞 EMT 标志物蛋白水平的影响

按照蛋白提取试剂盒操作流程抽提细胞总蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。取适量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE,以 80 V 为起始电压进行电泳,分离胶电压至 120 V,电泳约 90 min。将分离后的蛋白转至 PVDF 膜上,取出后放入 5% 脱脂奶粉封闭液室温孵育 1 h,加入稀释后的一抗(兔抗人 N-cadherin、 β -catenin、Vimentin、Twist 及 β -actin 单克隆抗体,抗体稀释比例 1:300),在摇床上 4 °C 孵育过夜后,用 TBST 清洗 3 次、每次 5 min。加入二抗工作液,室温孵育 1 h 后,用 TBST 清洗,在 PVDF 膜上滴入 ECL 发光剂,迅速曝光,凝胶成像显影。采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行分析,获取目的蛋白和内参条带的灰度值,计算二者的比值得到目的蛋白的相对表达量。

1.12 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,呈正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。FOXP4 在 LSCC 组织及相应癌旁正常组织中的表达差异及其与临床病理资料间的关系均采用秩和检验,两独立样本比较采用 t 检验和近似 t 检验,以上均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXP4 mRNA 在 LSCC 组织中的表达及其与临床病理特征的关系

qPCR 检测结果(图 1)显示,FOXP4 mRNA 在 LSCC 组织中的相对表达量显著高于相应癌旁组织 ($P < 0.05$)。分析 40 例 LSCC 患者的临床病理资料发现,在 III+IV 期 LSCC 患者组织中 FOXP4 mRNA 的表达显著高于 I+II 期 ($P < 0.05$),有淋巴结转移组 FOXP4 mRNA 的表达显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$),按照年龄及分化程度分组进行统计分析,各组 LSCC 组

组织中FOXP4 mRNA的表达差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(图2)。

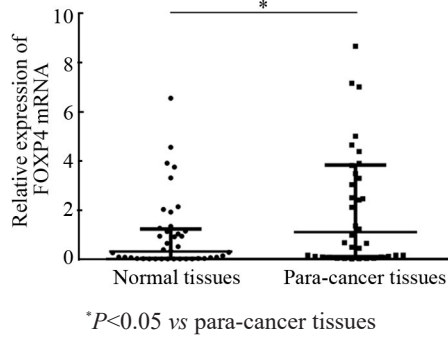


图1 FOXP4 mRNA在LSCC组织中呈高表达
Fig.1 FOXP4 mRNA was highly expressed in LSCC tissues

2.2 LSCC细胞中FOXP4呈高表达且可被si-FOXP4敲低

qPCR及WB检测结果(图3)显示,FOXP4在4株LSCC细胞中的表达均高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中TU177细胞的表达最高,故选用TU177细胞进行后续实验。

向TU177细胞中转染si-FOXP4后,qPCR检测结果(图4)显示,与对照组相比,实验组TU177细胞中FOXP4表达水平显著低于对照组($P<0.01$),说明FOXP4敲低效率较高,可进行后续实验。

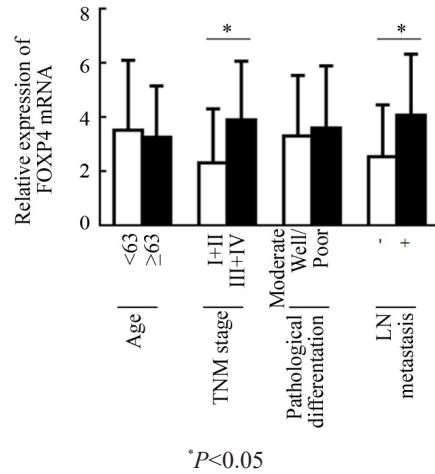


图2 LSCC组织中FOXP4的表达水平与患者临床病理特征的关系
Fig.2 Relationship between FOXP4 expression and clinicopathological features in LSCC patients

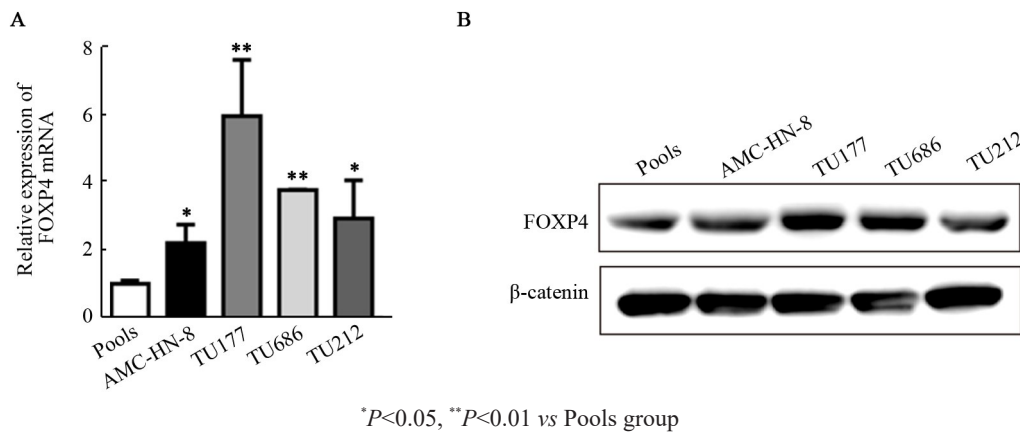


图3 qPCR法(A)及WB实验(B)检测FOXP4在LSCC细胞系中的表达水平
Fig.3 The expression of FOXP4 in LSCC lines was detected by qPCR (A) and WB (B)

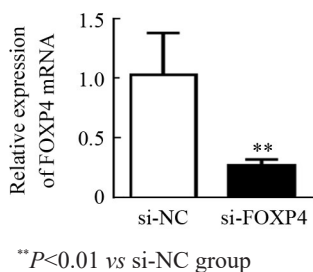


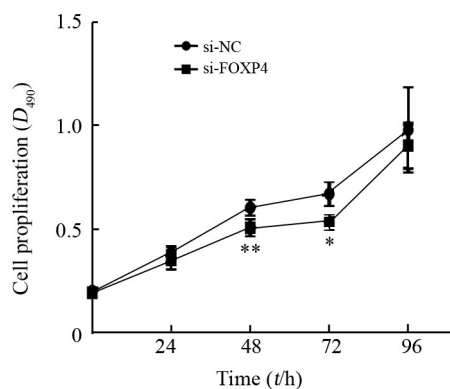
图4 转染si-FOXP4敲低TU177细胞中FOXP4 mRNA的表达
Fig.4 The expression level of FOXP4 mRNA in TU177 cells were knocked down by si-FOXP4 transfection

2.3 敲低FOXP4抑制TU177细胞的增殖能力

MTS实验结果(图5)显示,转染si-FOXP4 48和72 h后,FOXP4敲低组TU177细胞的D值较对照组显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。克隆形成实验结果(图6)显示,FOXP4敲低组TU177细胞克隆形成率显著低于对照组[(10.1±0.8)% vs (15.3±1.3)%, $P<0.01$]。

2.4 FOXP4敲低抑制TU177细胞的迁移能力

Transwell小室迁移实验结果(图7)显示,si-FOXP4组TU177细胞通过小室底部膜的数量明显低于对照组[(531.0±22.5) vs (718.0±69.5)个, $P<0.01$],说明敲低FOXP4可以减弱TU177细胞的迁移能力。



P*<0.05, *P*<0.01 vs si-NC group

图5 敲低FOXP4抑制TU177细胞的增殖

Fig.5 The proliferation ability of TU177 cells were inhibited by si-FOXP4 transfection

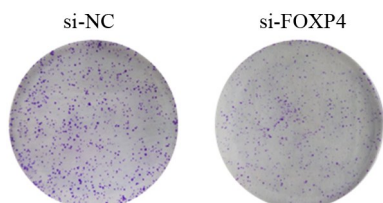


图6 敲低FOXP4抑制TU177细胞的克隆形成能力
Fig.6 The clone formation ability of TU177 cells was inhibited after FOXP4 knockdown

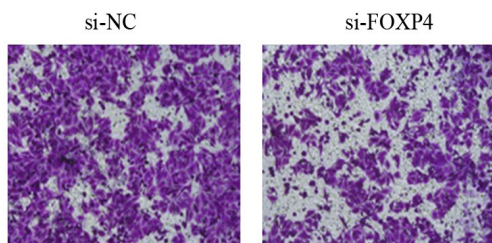


图7 Transwell迁移实验检测敲低FOXP4后TU177细胞的迁移能力(×100)

Fig.7 The migration ability of TU177 cells after transfection with si-NC or si-FOXP4 was detected by Transwell migration assay (×100)

2.5 FOXP4敲低抑制TU177细胞的侵袭

Transwell侵袭实验结果(图8)显示,敲低FOXP4的TU177细胞通过人工基底膜的数量显著低于对照组[(222.0±22.3) vs (457.0±50.2)个, *P*<0.01],说明FOXP4的表达降低可以减少细胞的侵袭。

2.6 FOXP4敲低使TU177细胞周期阻滞于G0/G1期

流式细胞术检测结果(图9)显示,转染si-FOXP4的TU177细胞的G0/G1期细胞比例显著高于对照组[(61.9±0.3)% vs (51.3±0.1)%, *P*<0.01],S+G2/M期细胞比例显著低于对照组[(38.1±0.0)% vs (48.7±0.1)%, *P*<0.01],说明敲低FOXP4可以显著影响细胞周期的分布,并使细胞阻滞于G0/G1期而减少S期的复制。

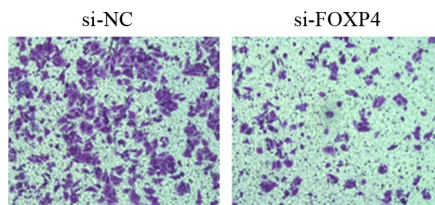


图8 Transwell侵袭实验检测敲低FOXP4后TU177细胞的侵袭能力(×100)

Fig.8 The invasion ability of TU177 cells after transfection with si-NC or si-FOXP4 was detected by Transwell invasion assay (×100)

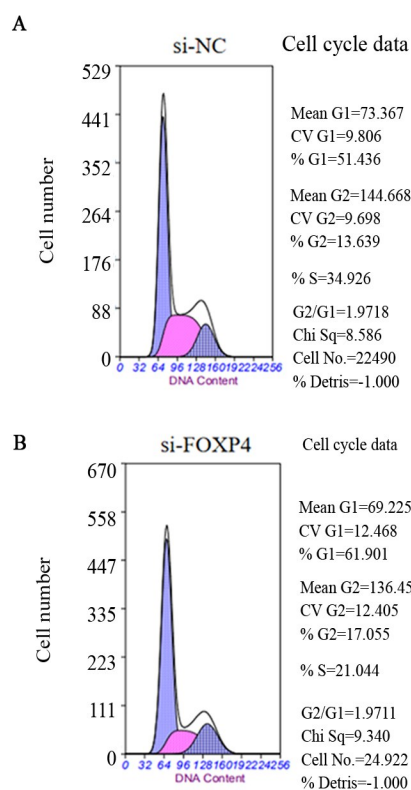


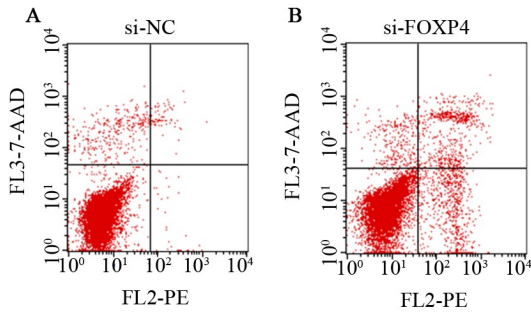
图9 流式细胞术实验检测敲低FOXP4后TU177细胞周期的变化
Fig.9 The cell cycles of TU177 cells after transfection with si-NC or si-FOXP4 was detected by Flow cytometry

2.7 FOXP4敲低促进TU177细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图10)显示,实验组细胞总凋亡率显著高于对照组[(13.7±1.9)% vs (2.4±2.0)%, *P*<0.01],说明敲低FOXP4可以诱导TU177细胞的凋亡。

2.8 FOXP4敲低对TU177细胞中EMT标志物mRNA水平的影响

qPCR检测结果(图11)显示,敲低FOXP4后TU177细胞中N-cadherin、Vimentin、β-catenin、Twist、Snail及ZEB1的mRNA表达水平较对照组显著降低(*P*<0.05或*P*<0.01)。



A: Cell apoptosis of TU177 cells transfected with si-NC;
B: Cell apoptosis of TU177 cells transfected with si-FOXP4

图10 流式细胞术实验检测敲低FOXP4后TU177细胞凋亡的变化

Fig.10 The cell apoptosis of TU177 cells after transfection with si-NC or si-FOXP4 was detected by Flow cytometry

2.9 FOXP4 敲低对 TU177 细胞中 EMT 标志物蛋白水平的影响

WB 检测结果(图12)显示,在TU177细胞中,与对照组比较,FOXP4敲低组的N-cadherin、β-catenin、Vimentin及Twist的蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。

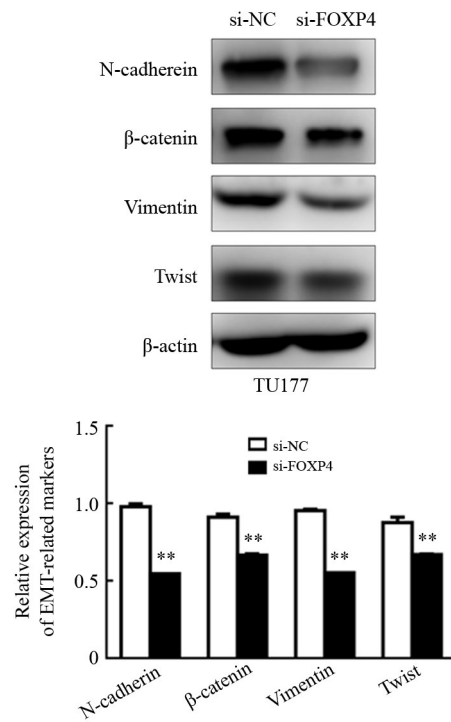
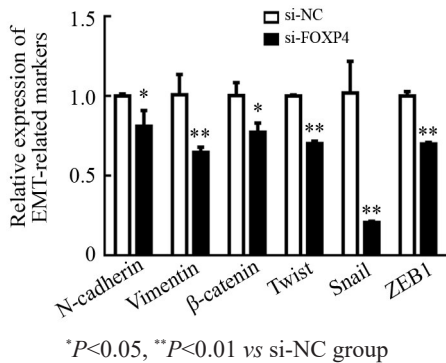


图12 WB法检测敲低FOXP4后EMT标志物的蛋白表达水平
Fig.12 The protein expressions of EMT markers after transfection with si-NC or si-FOXP4 were detected by WB assay



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group

图11 qPCR法检测敲低FOXP4后EMT标志物的mRNA表达水平

Fig.11 The mRNA expressions of EMT markers after transfection with si-NC or si-FOXP4 were detected by qPCR

3 讨论

转录因子在转录起始调控基因表达,其异常调控对癌症的发生发展、预后及耐药等方面有重要作用^[11-12]。在哺乳动物基因组中已经鉴定出40多个FOX基因,其中FOXP家族起着转录因子的作用,并具有独特的转录调节域和DNA结合域^[4]。TGF-β能促进癌细胞的EMT过程、侵袭性和血管生成^[13-14],故本研究通过测序筛选出了TGF-β处理LSCC细胞后表达升高的基因FOXP4。FOXP4在人骨肉瘤^[12]等肿瘤中均为高表达,但其在LSCC中的作用及机制尚不清楚,因此本研究围绕FOXP4与LSCC的关系展开研究。

本研究首先发现,与正常组织和细胞相比,FOXP4在LSCC组织及细胞中均呈高表达,通过分析LSCC患者临床病理资料发现,FOXP4的高表达与LSCC的高TNM分期和淋巴结转移相关。于是进一步在LSCC细胞TU177中应用siRNA降低FOXP4的表达,发现降低FOXP4的表达可明显抑制LSCC细胞的体外增殖、迁移及侵袭能力。类似地,在骨肉瘤中也有同样的现象,YIN等^[15]采用siRNA敲降FOXP4的表达后,可减弱骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力。抑制G1-S期转录可使细胞以不受限制的方式进入S期,这是癌症的标志^[16]。本研究发现,敲低FOXP4可以将细胞周期阻滞于G0/G1期,从而减少S期的复制,抑制癌症的进展。凋亡机制的失调会引起疾病,包括发育异常,肿瘤发生和自身免疫性疾病^[17-18]。本研究发现敲低FOXP4可以使发生凋亡的TU177细胞增加。

EMT是发育和疾病进展的基本过程,该过程会导致细胞失去其分化的上皮样状态并获得间充质样的表型,有助于肿瘤的进展和转移。发生EMT的细胞其上皮基因(例如E-钙黏蛋白、ZO-1和闭合蛋白)的表达水平降低,而间充质基因(例如N-钙黏蛋白,波形蛋白和纤连蛋白)的表达水平升高。Snail、Twist和ZEB已被确定为EMT的主要调节因子^[19]。还有研究^[20-21]表明,一些关键的信号通路参与了EMT,包括TGF-β、Wnt、Notch和Hedgehog等。在肝细胞癌^[9]

中,FOXP4可以转录调控EMT相关转录因子Slug,从而促进肝细胞癌的EMT过程;在乳腺癌^[10]中,FOXP4可以结合EMT相关转录因子Snail的启动子来促进Snail的表达,说明FOXP4可以激活Snail的表达,加速乳腺癌细胞中EMT进程。本研究发现,敲低FOXP4可以抑制EMT通路相关因子的mRNA和蛋白水平的表达,推测FOXP4可能通过直接影响EMT某个相关转录因子的表达并参与到EMT过程中,从而促进LSCC的增殖和转移。在本研究结果中,敲低FOXP4后TU177细胞中Snail和ZEB1的mRNA表达水平均降低,今后的研究可继续探讨LSCC中FOXP4是否能转录调控这两个因子的表达,影响EMT的发生。

综上所述,转录因子FOXP4在LSCC中可能扮演着癌基因的角色,促进LSCC的发生和进展,这为深入探讨FOXP4在LSCC中的作用以及今后LSCC的诊断和治疗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] MARIONI G, MARCHESE-RAGONA R, CARTEI G, et al. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(7): 504-515. DOI:10.1016/j.ctrv.2006.07.002.
- [3] LAMBERT M, JAMBON S, DEPAUW S, et al. Targeting transcription factors for cancer treatment[J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1479. DOI:10.3390/molecules23061479.
- [4] LALMANSINGH A S, KARMAKAR S, JIN Y T, et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(7): 707-715. DOI:10.1016/j.bbagr.2012.02.018.
- [5] ACKERMANN S, KOCÁK H, HERO B, et al. FOXP1 inhibits cell growth and attenuates tumorigenicity of neuroblastoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 840[2019-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251948/>. DOI:10.1186/1471-2407-14-840.
- [6] ZHANG Y X, ZHANG S Q, WANG X D, et al. Prognostic significance of FOXP1 as an oncogene in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(6): 528-533. DOI:10.1136/jclinpath-2011-200547.
- [7] CHEN M T, SUN H F, LI L D, et al. Downregulation of FOXP2 promotes breast cancer migration and invasion through TGFβ/SMAD signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8582-8588. DOI: 10.3892/ol.2018.8402.
- [8] LUO Q S, ZHANG S L, WEI H, et al. Roles of Foxp3 in the occurrence and development of cervical cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 8717-8730.
- [9] ZHANG G, ZHANG G Y. Upregulation of FoxP4 in HCC promotes migration and invasion through regulation of EMT[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(4): 3944-3951. DOI:10.3892/ol.2019.10049.
- [10] MA T, ZHANG J. Upregulation of FOXP4 in breast cancer promotes migration and invasion through facilitating EMT[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 2783-2793[2019-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459146/>. DOI:10.2147/CMAR.S191641.
- [11] WANG Q, YU C R. Expression profiling of small intestinal neuroendocrine tumors identified pathways and gene networks linked to tumorigenesis and metastasis[J/OL]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20193860[2020-06-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7298166/>. DOI:10.1042/BSR20193860.
- [12] QIAN M J, YAN F J, YUAN T, et al. Targeting post-translational modification of transcription factors as cancer therapy[J]. *Drug Discov Today*, 2020: S1359-S6446(20)30230-0. DOI:10.1016/j.drudis.2020.06.005.
- [13] MOUSTAKAS A, HELDIN C H. Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor B[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5/6): 446-454. DOI:10.1016/j.semcancer.2012.04.002.
- [14] TU S, HUANG W, HUANG C H, et al. Contextual regulation of TGF-β signaling in liver cancer[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(10): E1235 [2020-04-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829617/>. DOI:10.3390/cells8101235.
- [15] YIN Z X, DING H M, HE E X, et al. Up-regulation of microRNA-491-5p suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP4 in human osteosarcoma[J/OL]. *Cell Prolif*, 2017, 50(1): e12308. [2019-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6529106/>. DOI:10.1111/cpr.12308.
- [16] BERTOLI C, SKOTHEIM J M, DE BRUIN R A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(8): 518-528. DOI:10.1038/nrm3629.
- [17] KAWAMOTO Y, NAKAJIMA Y I, KURANAGA E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E2144[2019-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187944/>. DOI: 10.3390/ijms17122144.
- [18] ZHAI K, LISKOVA A, KUBATKA P, et al. Calcium entry through TRPV1: a potential target for the regulation of proliferation and apoptosis in cancerous and healthy cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): E4177[2020-06-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312732/>. DOI:10.3390/ijms21114177.
- [19] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: Mechanisms and therapeutic implications[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80-94[2019-11-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28834698/>. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
- [20] GONZALEZ D M, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8[2019-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4372086/>. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- [21] WU H T, ZHONG H T, LI G W, et al. Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer[J/OL]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 51[2020-06-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6998212/>. DOI:10.1186/s12967-020-02240-z.

[收稿日期] 2020-02-16

[修回日期] 2020-06-20

[本文编辑] 黄静怡