

## FDI-6 下调 FoxM1 抑制人肝癌细胞增殖迁移

熊婷, 周迎

长沙医学院 湖南长沙

**【摘要】目的** 探讨 FDI-6 调控叉头框转录因子 M1(FoxM1) 对人肝癌细胞增殖、侵袭的影响。**方法** 应用定量聚合酶链反应检测肝癌细胞 HepG2 中加入 FDI-6 后 FoxM1 的表达影响, 细胞增殖实验和细胞迁移实验检测 FoxM1 下调肝癌细胞的增殖和侵袭能力。**结果** 在 HepG2 细胞中, FDI-6  $\geq 20 \mu\text{mol/L}$  可明显下调 FoxM1 的表达。**结论** FDI-6 能下调 FoxM1 的表达, 抑制肝癌细胞增殖, 导致细胞周期发生停滞, 降低细胞迁移能力。

**【关键词】** 肝癌细胞; FDI-6; FoxM1; 细胞增殖

**【基金形目】**湖南省教育厅科研一般项目“FDI-6 抑制肝癌细胞增殖的新机制: FoxM1/MAT2A”(19C0194); 湖南省教育厅科研一般项目“脂质体构建线粒体靶向给药系统的研究”(18C1150)

**【收稿日期】**2022年11月15日 **【出刊日期】**2022年12月29日 **【DOI】**10.12208/j.ijcr.20220499

### FDI-6 down-regulation of FoxM1 inhibits proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells

Ting Xiong, Ying Zhou

Changsha Medical College Changsha, Hunan

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of FDI-6 regulating forkhead box transcription factor M1 (FoxM1) on the proliferation and invasion of human hepatoma cells. **Methods:** Quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of FoxM1 in HepG2 cells after adding FDI-6. Cell proliferation and migration tests were used to detect the ability of FoxM1 to down regulate the proliferation and invasion of empty hepatoma cells. **Results:** In HepG2 cells, FDI-6  $\geq 20 \mu\text{mol/L}$  could significantly down regulate the expression of FoxM1. **Conclusion:** FDI-6 can down regulate the expression of FoxM1, inhibit the proliferation of hepatoma cells, lead to cell cycle arrest, and reduce the ability of cell migration.

**【Keywords】** Hepatoma cells; FDI-6; FoxM1; cell proliferation

#### 背景

肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 肝细胞型肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 和胆管细胞型肝癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是两种常见的肝癌, 恶性程度高、发展迅速、容易复发和转移<sup>[1-3]</sup>。尽管目前肝癌患者经手术治疗和化疗后存活率显著提高, 但由于肿瘤转移速度快、发病机制复杂、诊断时多处于中晚期, 使得死亡率依旧很高。

叉头框蛋白 M1 (forkhead box M1, FoxM1) 属于 Fox 转录因子家族<sup>[3]</sup>。Fox 家族是以翼状 DNA 结构域为主要特征的细胞周期调节因子。它可以通过诱导细胞周期蛋白 B1 和 D1 的表达促进细胞周期进程从而诱导细胞增殖。FoxM1 已被确定是肿瘤发生的起始因子

<sup>[4]</sup>, 在肝癌、乳腺癌和结肠癌等多种恶性肿瘤中高表达。同时 FoxM1 过表达也与 HCC 通过上皮间质转化和转移有关<sup>[5]</sup>。研究表明沉默 FoxM1 能引起细胞周期阻滞而抑制肝癌细胞的增殖<sup>[6]</sup>。FoxM1 通过结合靶基因启动子中的保守序列发挥调控作用, 因此 FoxM1 可能是肝癌治疗的重要靶点之一。FDI-6 是一种选择性靶向 FoxM1 的小分子抑制剂, 已被证实可选择性靶向抑制 FoxM1 的转录<sup>[7]</sup>。本研究将进一步对 FDI-6 靶向 FoxM1 抑制肝癌细胞增殖机制进行研究。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 细胞培养

从-80°C冰箱中取出 HepG2 细胞冻存管, 迅速投入 37°C 水浴中摇动融化, 待融化后取出, 将细胞转移到

10 ml 有 10%胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 的离心管中进行稀释, 1500 rpm 离心 5 min 后移去上清液, 加 10%FBS 的培养基重悬, 放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。

### 1.2 Western blot

**蛋白提取:** 细胞: 细胞进行相应的处理后, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 每个 10 cm<sup>2</sup> 培养皿内加 1 ml 预冷的 PBS。迅速将培养皿放置在冰上, 用细胞刮匙收集皿内的细胞, 转移到预冷的 EP 管中, 4°C 下 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。2×10<sup>6</sup> 个细胞中加 50 μL 裂解液 (RIPA : PMSF=100 : 1), 冰上放置 30 min 以上, 使细胞充分裂解。4°C 下, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清液移至新的 EP 管中。蛋白定量、转膜、封闭、抗体孵育和显影: 转膜完毕后, 室温下封闭 (5%脱脂牛奶) 1h, 用 TBST 洗膜两遍, 每次 5 min。然后加入适当比例 1% BSA 稀释的待测一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜三次, 每次 15 分钟。再加入一抗相对应的二抗, 室温孵育 50 min, TBST 洗膜三次, 每次 15 min。避光配发光剂 (A 液: B 液=1:1), 加入到 PVDF 膜上, 置于显影仪中显影, 使用灰度扫描软件 Quantity One 4.5.0 对条带进行定量分析。

### 1.3 RNA 分离和 Real Time-qPCR

**总 RNA 提取:** 将细胞或组织用预冷的 PBS 洗一遍, 直接加入 TRIzol 裂解细胞 (组织 50mg 加 1mL, 6 孔板细胞加 200μL)。将 TRIzol 提取液 12000×g 离心 5min, 取上清放入除酶 EP 管中。1 mL TRIzol 内加入 200 μL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温放置 20 min。4°C12000g 离心 15min。离心样本分三层: 底层为黄色有机相, 上层为无色水相和中间层, RNA 主要在水相 (300-400 μL 左右), 小心取上层液体入新管中。加入 500μL 异丙醇 (大于水相的体积), 震荡 15 次, 室温放置半小时。4°C12000g 离心 15min, 离心后管底出现胶状沉淀, 弃上清。用 75%去酶乙醇洗涤 RNA, 4°C、7400×g 离心 5 min, 弃上清。加 20μL 去酶水溶解 RNA, 测 OD 值, -80°C 保存。PCR 扩增: 将提取出来的 RNA 按浓度算出体积, 依次加入 dNTP, primer, Rnase, Revert, 然后用去酶超纯水补齐到总体积 20μL, -20°C 保存。Real Time-PCR: 去酶水稀释 cDNA, 每个样本加 10μL supermix 混合 0.5μL 待测引物, cDNA 和混合后的引物按 1:1 的比例加到 PCR 板中, 两个复孔, qPCR 仪检测。

### 1.4 MTT

细胞消化后吹打成细胞悬液, 吸取 10μL 细胞悬

液于细胞计数板进行计数 96 孔板每孔所需要的细胞数可设为 5×10<sup>3</sup> 个, 液体量为 100μL。按细胞计数的结果进行稀释后充分混匀种入培养板中, 每组设 4-8 个复孔, 96 孔板外圈滴加 PBS 以减少培养基蒸发。相应的处理因素处理后, 每孔加入无菌的 MTT 液 20μL (避光操作)。作用 4h 后去掉液体, 每孔加 DMSO 150μL, 37°C 放置 30 min, 490 nm 测 OD 值。

### 1.5 流式细胞术检测细胞周期

胰酶消化后收集细胞, 细胞用 70%乙醇吹散后于 -20°C 固定。离心后弃上清, 加入碘化丙啶 (propidium iodide) 及 RnaseA 0.5ml 重悬细胞, 避光放置 37°C, 30min。利用流式细胞仪检测。

## 2 结果

### 2.1 FDI-6 对 FoxM1 表达的影响

不同浓度 (10~50) μmol/L FDI-6 处理 HepG2 细胞, 培养 24 h 后, 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 检测 FoxM1 的 mRNA 水平, 结果显示, FDI-6 ≥ 20 μmol/L 可明显下调 FoxM1 的表达 (图 1)。

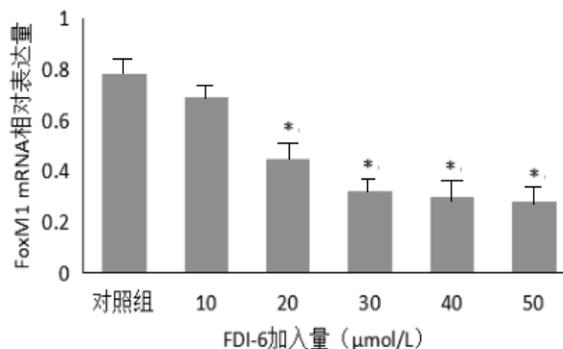


图 1 FDI-6 对 FoxM1 表达的影响

2.2 FDI-6 下调 FoxM1 对细胞增殖能力的影响 (MTT 实验)。

以加入 FDI-6 的 HepG2 细胞为实验组, 24、48、时, 实验组 450 nm 处吸光度值与对空白照组比较差异均无统计学意义 [(0.213 ± 0.004) 比 (0.236 ± 0.005)、(0.415 ± 0.014) 比 (0.526 ± 0.015)] (均 P > 0.05, 实验 72 h 时, 实验组 450 nm 处吸光度值明显低于对照组 [(1.256 ± 0.042) 比 (2.245 ± 0.049)] (P < 0.05)。

### 2.3 FDI-6 下调 FoxM1 对细胞周期的影响。

在 HepG2 细胞系中, FDI-6 下调 FoxM1 后, HepG2 细胞系的实验组 G2/M 期细胞比例均明显低于对照组 [(15.7 ± 2.4) % 比 (26.8 ± 2.8) %] (P < 0.05)。

### 2.4 FDI-6 下调 FoxM1 对 MMP2 的影响

FoxM1 在 HepG2 及 BEL7402 细胞系中沉默后,

24 h 时 HepG2 细胞系的实验组的划痕愈合率均低于对照组 [ (65 ± 7) % 比 (82 ± 4) % (P < 0.05) (图 2) ]。

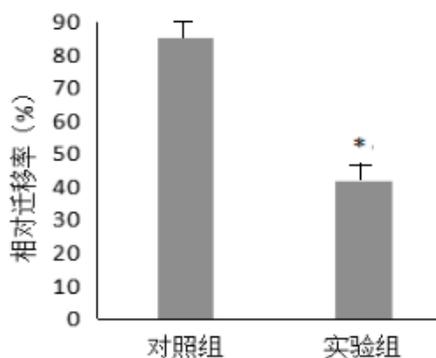


图 2 实验组的划痕愈合率均低于对照组

### 2.5 FDI-6 下调 FoxM1 对 MMP2 的影响

Western bolt 结果显示: 与对照组比较, 实验组与对照组相比 MMP2 蛋白表达明显下降, 提示 FDI-6 下调 FoxM1 能抑制人肝癌细胞 MMP2 表达 (图 3)。

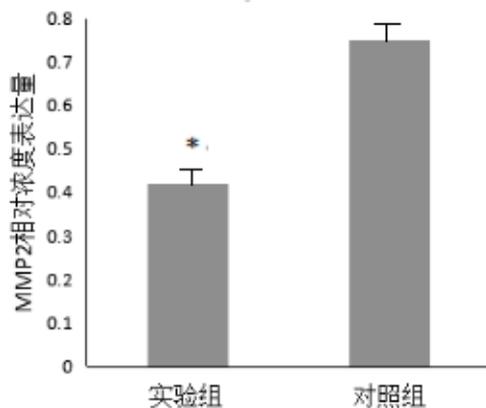


图 3 MMP2 表达量较对照组明显降低

### 3 讨论

FOXM1 是 Forkhead 家族的一个致癌转录因子, 已被证实在多种肿瘤细胞增殖和细胞周期进展中发挥至关重要的作用, 同时也参与肿瘤细胞增殖、凋亡、代谢、转移等相关进程的调控, 与肿瘤细胞的转移、血管形成和上皮间质转化 (EMT) 等关系密切<sup>[8]</sup>。MMP 2 是基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族中被描述的人类明胶酶之一, 因其具有降解明胶的能力而命名。肿瘤的侵袭和转移是一个连续多步骤的过程, 对细胞外基质的降解、肿瘤微血管的形成是导致肿瘤侵袭转移不可缺少的因素。本研究通过 CCK-8 实验检测细胞的增殖

能力, 结果显示 FoxM1 在 HepG2 细胞系中下调后, 细胞增殖能力明显减弱, 细胞周期阻滞 G2/M。细胞划痕实验检测肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。结果显示 FoxM1 在 HepG2 细胞系中沉默后, 对细胞运动能力产生阻滞作用, 表现为细胞向中间划痕空隙部位回补的速度减慢, 与对照组相比差异有统计学意义。

### 参考文献

- [1] Shi J Y, Xing Q, Meng D, et al. Inferring the progression of multifocal liver cancer from spatial and temporal genomic heterogeneity[J]. *Oncotarget*. 2016, 7(3): 2867-2877.
- [2] Chino F, Stephens SJ, Choi SS. The role of external beam radiotherapy in the treatment of hepatocellular cancer, *Cancer*. 2018.
- [3] Lu X F, Zeng, Liang W Q, et al. FoxM1 is a promising candidate target in the treatment of breast cancer[J]. *Oncotarget*. 2018, 9(1): 842-852.
- [4] Yu M, Tang Z, Meng F, et al. Elevated expression of FoxM1 promotes the tumor cell proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2016(1):1-9.
- [5] Weiler S M E, Pinna F, Wolf T, et al. Induction of Chromosome Instability by Activation of Yes Associated Protein and Forkhead box M1 in Liver Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(8): 2037-2051.
- [6] Bi Z, Liu W, Ding R, et al. A novel peptide, 9R-P201, strongly inhibits the viability, proliferation and migration of liver cancer HepG2 cells and induces apoptosis by down-regulation of FoxM1 expression[J]. *European Journal of Pharmacology*. 2017, 796: 175-189.
- [7] Gormally M V, Dexheimer T S, Marsico G, et al. Suppression of the FoxM1 transcriptional program via novel small molecule inhibition[J]. *Nature Communications*. 2014, 5(5):5165.

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS