DOI:10.16016/j.1000-5404.201411182

论著

下调 FoxM1 表达对人喉癌 Hep-2 细胞顺铂敏感性的影响

魏 蕾,江黎珠,于 超,文韬宇,陈鸿雁 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科)

[**摘要**] **目的** 探讨下调 FoxM1 表达对人喉癌 Hep-2 细胞顺铂敏感性的影响及其可能机制。**方法** 分别选用 FoxM1 siRNA 以及 FoxM1 特异性抑制剂(硫链丝菌肽)下调 Hep-2 细胞 FoxM1 表达。实时定量 PCR、Western blot 检测 siRNA 或硫链丝菌肽处理细胞后 FoxM1 mRNA、蛋白表达量;MTT 法检测下调 FoxM1 表达后 Hep-2 细胞的顺铂敏感性;流式细胞术检测下调 FoxM1 表达后顺铂诱导的凋亡率变化;实时定量 PCR、Western blot 检测顺铂作用于 FoxM1 下调组及对照组细胞,其 FoxM1 mRNA、蛋白及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达变化。**结果** siRNA 及硫链丝菌肽均能下调 FoxM1 表达($P<0.05$);两种方式均能降低顺铂作用下细胞存活率以及 IC_{50}[NC 组顺铂 $IC_{50}=(2.609\pm0.102)\mu g/mL$,干扰组 $IC_{50}=(0.771\pm0.058)\mu g/mL$,$P<0.05$;对照组顺铂 $IC_{50}=(2.142\pm0.198)\mu g/mL$,抑制剂组 $IC_{50}=(0.773\pm0.063)\mu g/mL$,$P<0.05$],siRNA 法处理后 NC 组、干扰组、NC + 顺铂组、干扰 + 顺铂组凋亡率依次为 $(4.197\pm0.273)\%$、$(12.553\pm0.183)\%$、$(37.465\pm4.305)\%$、$(82.373\pm7.214)\%$,干扰 + 顺铂组凋亡率显著升高($P<0.05$);抑制剂处理后对照组、抑制剂组、顺铂组、抑制剂 + 顺铂组凋亡率依次为 $(2.343\pm0.194)\%$、$(10.127\pm0.479)\%$、$(35.075\pm1.995)\%$、$(62.843\pm1.824)\%$,抑制剂 + 顺铂组凋亡率显著升高($P<0.05$);下调 FoxM1 表达,凋亡抑制蛋白 Bcl-2 下调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调($P<0.05$)。**结论** 下调 FoxM1 表达可提高 Hep-2 细胞对顺铂的敏感性,其机制可能与凋亡相关蛋白 Bcl-2 下调、Bax 上调相关。

[**关键词**] FoxM1;硫链丝菌肽;Hep-2 细胞;顺铂;化疗敏感性;细胞凋亡
[**中图法分类号**] R73-361;R739.65;R979.19 [**文献标志码**] A

FoxM1 down-regulation promotes sensitivity of laryngeal carcinoma Hep-2 cells to cisplatin

Wei Lei, Jiang Lizhu, Yu Chao, Wen Taoyu, Chen Hongyan (Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of down-regulation of forkhead box protein M1 (FoxM1) on the cisplatin sensitivity of human laryngeal carcinoma Hep-2 cells and investigate the potential mechanisms. **Methods** Small interfering RNA (siRNA) and FoxM1 inhibitor thiostrepton were used respectively to suppress FoxM1 expression in Hep-2 cells. The expression of FoxM1 at mRNA and protein levels was detected by qRT-PCR and Western blotting respectively. Cell viability and apoptosis of Hep-2 cells were detected by MTT assay and flow cytometry. Furthermore, qRT-PCR and Western blotting were used to investigate the changes of FoxM1 in Hep-2 cells with FoxM1 suppression and cisplatin treatment. The changes of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. **Results** Both of siRNA and thiostrepton suppressed FoxM1 expression, reduced the cell survival after cisplatin treatment and IC_{50} (cisplatin treated normal cells $IC_{50}=2.609\pm0.102$ g/mL, siRNA infected cells $IC_{50}=0.771\pm0.058$ g/mL, $P<0.05$; cisplatin

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81272980);国家临床重点专科建设项目([2012]649)
[**通信作者**] 陈鸿雁, E-mail:chenhongyan1963@hotmail.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150310.1659.018.html(2015-03-10)

treated cells IC_{50} = 2.142 ± 0.198 g/mL, thiostrepton treated cells IC_{50} = 0.773 ± 0.063 g/mL, P < 0.05). The apoptotic rate was (4.197 ± 0.273)%, (12.553 ± 0.183)%, (37.465 ± 4.305)% and (82.373 ± 7.214)% respectively in the normal Hep-2 cells and the cells with siRNA infection, cisplatin treatment and infection plus cisplatin treatment, with that of the latter group of cells the highest (P < 0.05). The rate was (2.343 3 ± 0.193 6)%, (10.127 ± 0.479)%, (35.075 ± 1.995)% and (62.843 ± 1.824)% separately in the normal Hep-2 cells and the cells after thiostrepton treatment, cisplatin treatment and thiostrepton plus cisplatin treatment, with that of the latter group of cells the highest (P < 0.05). Down-regulation of FoxM1 inhibited the expression of Bcl-2 and up-regulated that of Bax. **Conclusion** FoxM1 promotes the sensitivity of Hep-2 cells to cisplatin, which potentially is due to its down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax.

[**Key words**] forkhead box protein M1; thiostrepton; Hep-2 cells; cisplatin; chemosensitivity; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272980) and the Project of National Clinical Key-discipline Construction Program (2012-649). Corresponding author: Chen Hongyan, E-mail: chenhongyan1963@hotmail.com

喉癌是我国较为常见的恶性肿瘤,其发病率在头颈部恶性肿瘤中位居第二[1]。目前临床上喉癌早期主要选择手术治疗,中晚期首选包括手术、放化疗以及新辅助治疗在内的综合治疗,然而中晚期喉癌患者五年生存率依然不高[1-2]。导致肿瘤复发的原因除了肿瘤侵袭和转移,化疗药物不敏感也是影响其疗效的重要因素[1,3]。顺铂作为喉癌化疗的首选用药,但患者对其耐药在很大程度上影响了其临床应用[2]。FoxM1(forkhead box protein M1)是Forkhead box(FOX)家族中的一员,仅表达于增殖活跃的细胞,参与调控胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡。近年研究发现,FoxM1在肝癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中高表达,参与了肿瘤的发生发展及耐药[4-5]。硫链丝菌肽(thiostrepton,TST)作为一种来源于自然界链霉菌属的抗生素,是目前世界上公认的FoxM1抑制剂,它能特异性抑制FoxM1转录[6]。本课题组前期研究发现FoxM1在喉癌组织中高表达,并与喉癌患者的不良预后相关[7],使用硫链丝菌肽可下调人喉癌Hep-2细胞FoxM1表达,并抑制细胞增殖[8]。目前喉癌的化疗敏感性与FoxM1表达是否相关尚不清楚。本实验以FoxM1 siRNA以及FoxM1特异性抑制剂硫链丝菌肽分别下调人喉癌Hep-2细胞FoxM1表达,探讨FoxM1对喉癌Hep-2细胞顺铂敏感性的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人喉癌Hep-2细胞株购于ATCC公司,特级胎牛血清购于康源生物公司,RPMI1640购于Gibco公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、顺铂(cisplatin)、硫链丝菌肽(thiostrepton)购于Sigma公司,siRNA购于上海吉玛公司,脂质体2000、PCR引物购于Invitrogen公司,FoxM1抗体购于Santa Cruz公司,Bcl-2、Bax抗体购于Immunoway公司,GAPDH购于proteintech公司,二抗购于中杉金桥公司,ECL发光液、PVDF膜购于Millipore公司,BCA试剂盒、SDS配胶试剂盒、RIPA裂解液(RIPA Lysis Buffer)、BSA(牛血清白蛋白)、DEPC(diethyl pyrocarbonate,焦碳酸二乙酯)购于碧云天,RNA提取试剂Trizol、逆转录试剂盒、QRT-PCR SYBR Green购于TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 FoxM1 siRNA设计 按照siRNA设计原则设计3条FoxM1 siRNA。FoxM1-441上游:5′-GCUGGGAUCAAGAUUAUUATT-3′,下游:5′-UAAUAAUCUUGAUCCCAGTT-3′;FoxM1-565上游:5′-GUGGGCCCAACAAAUUCAUTT-3′,下游:5′-AUGAAUUUGUUGGGCCCACTT-3′;FoxM1-783上游:5′-GGCUGCACUAACAAUATT-3′,下游:5′-UAUUGUUGAUAGUGCAGCCTT-3′;阴性对照FAM(NC组)上游:5′-UUCUCCGAACGUCUCACGUTT-3′,下游:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。

1.2.2 细胞培养与转染 人喉癌Hep-2细胞培养于含10%胎牛血清的1640培养液(1%青/链霉素),置于5%饱和二氧化碳,37 ℃恒温培养箱。细胞培养2~3 d,取对数生长期的细胞,用2.5 mg/mL胰酶(+0.02% EDTA)消化,每孔约20×10^4细胞均匀铺于6孔板,细胞贴壁生长过夜,待细胞长满50%~60%,按转染说明书将脂质体包裹的100 nmol/L FoxM1,脂质体包裹的100 nmol/L NC以及100 nmol/L脂质体、1 640培养液三组对照分别转染细胞。转染24 h后,于荧光倒置显微镜初判转染效果。48 h后提取RNA、蛋白以及进

行MTT、流式细胞术后续实验。

1.2.3 实时定量PCR检测FoxM1 mRNA水平 使用Trizol提取各处理组总RNA,使用紫外分光光度计于波长260 nm处测RNA光密度值[$D(260)$],根据逆转录试剂盒说明逆转录RNA为cDNA,FoxM1上游:5′-TGCAGCTAGGGATGTGAATCTTC-3′,下游:5′-GGAGCCCAGTCCATCAGAACT-3′;GAPDH上游:5′-CAGCGACACCCACTCCTC-3′,下游:5′-TGAGGTCCACCACCCTGT-3′。实时定量PCR体系为:5 μL SYBR Green、2 μL×0.2 g cDNA、0.4 μL上游引物、0.4 μL下游引物、2.2 μL DEPC水,循环:95 ℃ 60 s,95 ℃ 20 s、58 ℃ 25 s重复39次。采用CFX96TM Real-Time系统(Bio-Rad),内参为GAPDH。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。

1.2.4 Western blot检测FoxM1及凋亡相关蛋白表达 使用RIPA裂解液提取各处理组细胞总蛋白,冰上裂解,12 000 r/min、4 ℃离心,提取上清,使用BCA法测定蛋白浓度。按SDS配胶试剂盒说明书制备10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔50 μg上样,电泳,半干法转膜,5% BSA封闭,分别加FoxM1(1∶500)、GAPDH(1∶5 000)、Bax(1∶500)、Bcl-2(1∶500)一抗,4 ℃过夜,37 ℃复温2 h,TBST洗膜,37 ℃相应二抗孵育2 h,洗膜,ECL Bio-Rad成像系统显影。

1.2.5 MTT检测FoxM1对顺铂敏感性的影响

1.2.5.1 FoxM1 siRNA转染对顺铂敏感性的影响 实验分两组:FoxM1干扰组和NC组(NC组、脂质体对照组、1640培养液对照组细胞行实时定量PCR差异无统计学意义,故选用NC组)。胰酶消化转染细胞,以每孔5×10^3细胞、180 μL培养基均匀铺于96孔板,两组细胞依次加入20 μL各浓度顺铂,使终浓度依次为0(加入等体积生理盐水)、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL,并设置对照组(仅培养基),各浓度均设7个重复孔。继续培养48 h,每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL,溶于PBS)作用4 h,吸去培养液,每孔加入200 μL DMSO,振荡10 min,酶标仪于波长570 nm处检测光密度值[$D(570)$]。生存率=(各浓度光密度平均值-对照组光密度平均值)/(0 μg/mL光密度平均值-对照组光密度平均值),抑制率=1-存活率,计算出半数抑制浓度IC_{50}。

1.2.5.2 FoxM1抑制剂对顺铂敏感性的影响 胰酶消化人喉癌Hep-2细胞株,将其分为2组,一组依次加入各浓度顺铂(终浓度为0、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL),另一组为2 μmol/L硫链丝菌肽依次加入各浓度顺铂(终浓度为0、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL),硫链丝菌肽(2 μmol/L)浓度参照文献[8],余同1.2.5.1。

1.2.6 流式细胞术检测FoxM1下调对凋亡的影响

1.2.6.1 FoxM1siRNA转染对凋亡率的影响 实验分四组:NC组、NC+顺铂组、干扰组、干扰+顺铂组。FoxM1-siRNA、NC转染细胞48 h后,弃上清,PBS清洗3次,分别加入约1/3 IC_{50}(终浓度0.7 μg/mL)顺铂以及相应体积培养液作对照,继续培养48 h终止。PBS清洗3次,胰酶消化,离心,1 mL PBS混匀,取其中1/10,向其加入AnnexinV/FITC、碘化丙锭(PI),避光、室温孵育15 min,分析采用流式细胞仪(BD公司)。

1.2.6.2 FoxM1抑制剂对凋亡的影响 实验分为四组:对照组、对照+顺铂组、抑制剂组、抑制剂+顺铂组。胰酶消化Hep-2细胞,分别加入培养液、约1/3 IC_{50}顺铂(终浓度0.7 μg/mL)、1/2 IC_{50}硫链丝菌肽(终浓度2 μmol/L)、顺铂+硫链丝菌肽(终浓度0.7 μg/mL+2 μmol/L),培养48 h,后续处理如1.2.6.1。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0,数据以$\bar{x}\pm s$表示,检验水准为0.05。多样本均数比较选用方差分析,不符合正态分布或者方差不齐时选择非参数检验。

2 结果

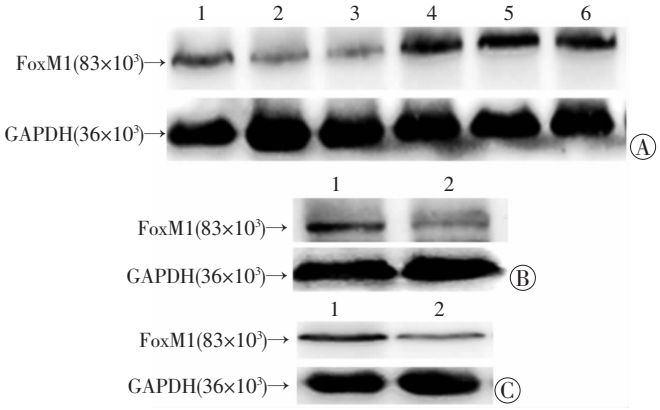
2.1 最优siRNA筛选以及siRNA、硫链丝菌肽对FoxM1 mRNA、蛋白的影响

与NC组比较,FoxM1-441、FoxM1-565、FoxM1-783组siRNA均可下调FoxM1表达($P<0.05$,图1A);FoxM1-441组抑制效果最明显,故后续实验选用该组;NC组、1640培养液组、脂质体组差异无统计学意义($P>0.05$),故后续实验选用NC组作为对照。NC组与FoxM1-441组FoxM1 mRNA相对表达量分别是1、0.145±0.010($P<0.05$);NC组与干扰组FoxM1蛋白相对表达量分别是0.79±0.093、0.426±0.045($P<0.05$,图1B);FoxM1 mRNA、蛋白表达分别下降85.48%、57.6%(图1A、B)。2 μmol/L硫链丝菌肽作用于Hep-2细胞,对照组与抑制剂组FoxM1 mRNA相对表达量分别是1.45±0.35、0.24±0.07,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与抑制剂组FoxM1蛋白相对表达量分别是0.743±0.138、0.255±0.059,差异也有统计学意义($P<0.05$,图1C);FoxM1 mRNA、蛋白表达分别下降81.88%、56.05%。

2.2 下调FoxM1对顺铂处理Hep-2细胞存活率的影响

MTT测试siRNA处理细胞存活率结果见图2A:不同浓度的顺铂作用于干扰组细胞和NC组细胞48 h,细胞存活率均随药物浓度增加而降低,而干扰组

细胞下降的幅度明显高于 NC 组($P<0.05$)。NC 组 $IC_{50}=(2.609\pm0.102)\mu g/mL$,干扰组 $IC_{50}=(0.771\pm0.058)\mu g/mL$,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。



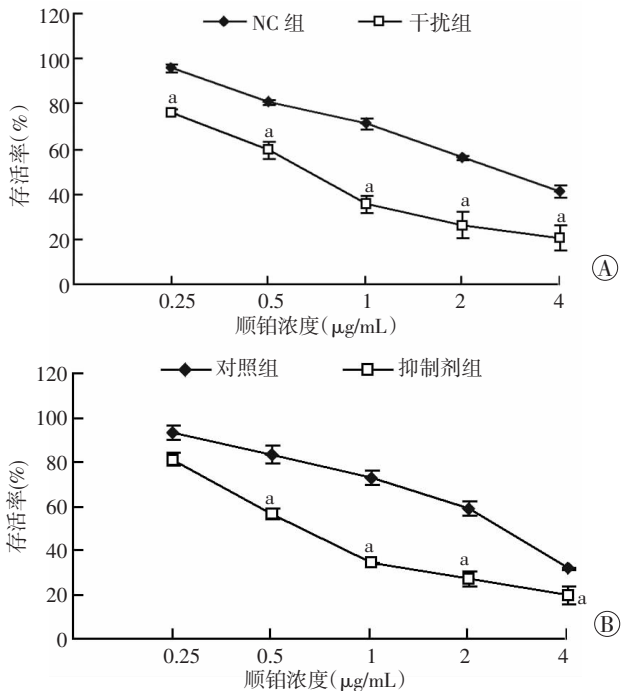
A:各组细胞的 FoxM1 蛋白表达　1:FoxM1-565 组;2:FoxM1-441 组;3:FoxM1-783 组;4:培养基对照组;5:脂质体对照组;6:NC 组;B:FoxM1-441 组 siRNA 处理下各组细胞的 FoxM1 蛋白表达　1:NC 组;2:干扰组;C:硫链丝菌肽对 FoxM1 蛋白表达的影响　1:对照组;2:抑制剂组

图1　Western blot 检测最优 siRNA 筛选以及 siRNA、硫链丝菌肽对 FoxM1 mRNA、蛋白的影响

MTT 测试抑制剂处理细胞存活率结果见图 2B:不同浓度的顺铂作用于对照组、抑制剂组细胞 48 h,细胞存活率随药物浓度增加而降低,具有浓度依耐性;作用于抑制剂组后,相同浓度比对照组存活率低(顺铂浓度分别为 0.5、1、2、4 μg/mL 时,$P<0.05$),差异具有统计学意义。对照组顺铂 $IC_{50}=(2.142\pm0.198)\mu g/mL$,抑制剂组顺铂 $IC_{50}=(0.773\pm0.063)\mu g/mL$,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　下调 FoxM1 对顺铂处理 Hep-2 细胞凋亡率的影响

NC 组、NC + 顺铂组、干扰组、干扰 + 顺铂组细胞凋亡率分别为(4.197 ± 0.273)%、(12.553 ± 0.183)%、(37.465 ± 4.305)%、(82.373 ± 7.214)%,干扰组与 NC 组顺铂作用 48 h 后凋亡率均较相应未加顺铂组增加,而且干扰 + 顺铂组凋亡率明显高于其余各组($P<0.05$);对照组、对照 + 顺铂组、抑制剂组、抑制剂 + 顺铂组细胞凋亡率分别为(2.343 ± 0.194)%、(10.127 ± 0.479)%、(35.075 ± 1.995)%、(62.843 ± 1.824)%,抑制剂组、对照组顺铂作用 48 h 后均较相应未加顺铂组增加,而且抑制剂 + 顺铂组凋亡率明显高于其他组($P<0.05$)。



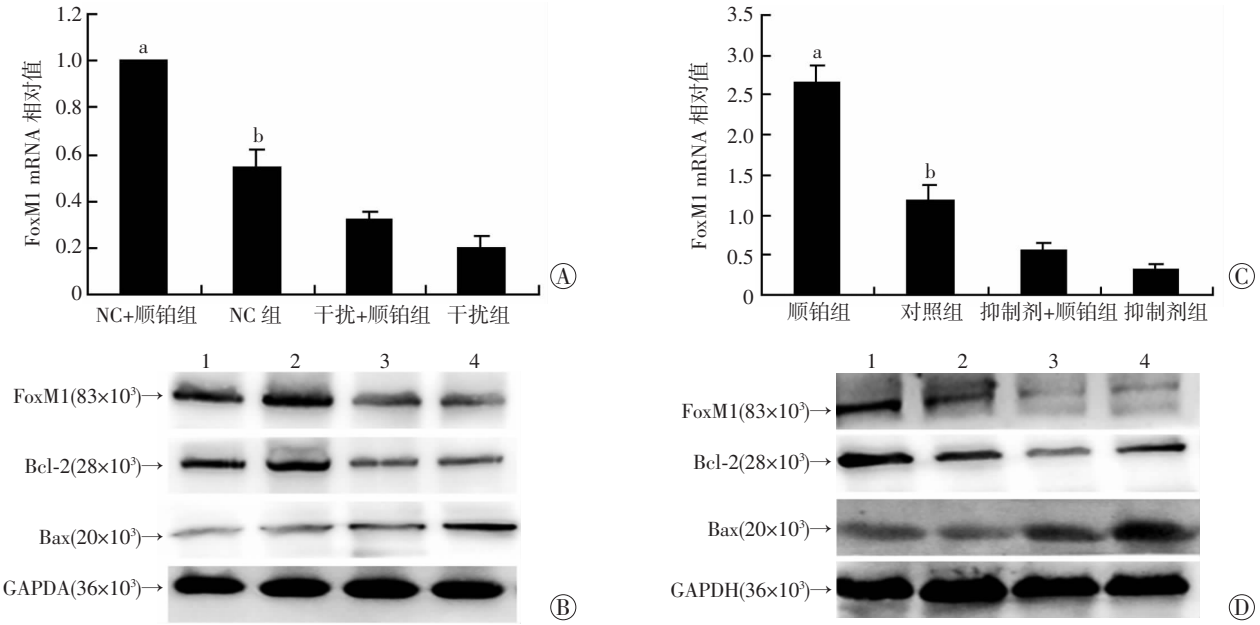
A:顺铂作用于 NC 组和干扰组　a:$P<0.05$,与 NC 组比较;B:顺铂作用于对照组和抑制剂组　a:$P<0.05$,与对照组比较

图2　顺铂作用于对照组以及 FoxM1 下调组细胞的存活率变化

2.4　下调 FoxM1 表达对顺铂作用下 Hep-2 细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响

顺铂作用于 FoxM1 干扰细胞,FoxM1 mRNA、FoxM1 蛋白、Bax、Bcl-2 蛋白表达如图 3A、B:顺铂作用于 Hep-2 细胞,FoxM1 表达上调($P<0.05$);转染后干扰组与 NC 组相比 FoxM1 mRNA、蛋白表达下调($P<0.05$),顺铂作用于转染细胞,干扰 + 顺铂组与 NC + 顺铂组相比 FoxM1 mRNA 表达下调($P<0.05$);FoxM1 蛋白表达与 FoxM1 mRNA 一致($P<0.05$);干扰组与 NC 对照组相比、干扰 + 顺铂组与 NC + 顺铂组相比 Bcl-2 蛋白表达与 FoxM1 一致($P<0.05$),Bax 相反($P<0.05$)。

FoxM1 抑制剂与顺铂合用下 FoxM1 mRNA、FoxM1 蛋白以及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达如图 3C、D 所示:顺铂作用于 Hep-2 细胞,FoxM1 表达上调($P<0.05$);抑制剂作用于 Hep-2 细胞,FoxM1 mRNA、蛋白表达下降(抑制剂组与对照组相比 $P<0.05$),抑制剂 + 顺铂组与单顺铂组相比 FoxM1 mRNA、蛋白表达降低($P<0.05$);Bcl-2 表达与此一致(抑制剂组与对照组相比,抑制剂 + 顺铂组与顺铂组相比 $P<0.05$),Bax 相反(抑制剂组与对照组相比,抑制剂 + 顺铂组与顺铂组相比 $P<0.05$)。



A:qRT-PCR 检测干扰后各组细胞的 FoxM1 mRNA 表达 a:$P<0.05$,与 NC 组及干扰 + 顺铂组比较;b:$P<0.05$,与干扰组比较;B:Western blot 检测干扰后各组细胞的 FoxM1、Bcl-2、Bax 蛋白表达 1:NC 组;2:NC + 顺铂组;3:干扰组;4:干扰 + 顺铂组;C:qRT-PCR 检测各组药物作用后 FoxM1 mRNA a:$P<0.05$,与对照组及抑制剂 + 顺铂组比较;b:$P<0.05$,与抑制剂组比较;D:Western blot 检测各组药物处理后细胞的 FoxM1、Bcl-2、Bax 蛋白表达 1:顺铂组;2:对照组;3:抑制剂组;4:抑制剂 + 顺铂组

图 3 下调 FoxM1 表达对顺铂作用下 Hep-2 细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响

3 讨论

FoxM1 是高表达于增殖活跃的正常细胞或组织的转录因子,FoxM1 调控着一系列下游基因,参与调控增殖、DNA 修复、抗凋亡基因。随着在各类肿瘤中对 FoxM1 的陆续报道,其对肿瘤的调控作用越来越受到重视,大量证据证实其参与肿瘤发生发展各个阶段,其中包括肿瘤耐药[1,4-5]。顺铂是目前喉癌的临床一线用药,耐药的出现阻碍了顺铂在临床的应用。目前本课题组已证实 FoxM1 参与调控喉癌的发生发展,本研究进一步以特异性小干扰 RNA 以及特异性抑制剂硫链丝菌肽两种方式下调 FoxM1,观察 FoxM1 对顺铂敏感性的影响。结果显示顺铂作用 Hep-2 细胞,FoxM1 表达上调,与文献[9]报道一致。具体机制尚不明确,可能是因为其参与 DNA 修复,化疗药物造成的损伤促使其转录更活跃[9-13]。但本实验更重要的发现是下调 FoxM1 使 Hep-2 细胞对顺铂更加敏感。FoxM1 siRNA 与顺铂共同作用于 Hep-2 细胞,细胞存活率低于单顺铂组,凋亡率高于单顺铂组,说明下调 FoxM1 增强了顺铂的抗肿瘤作用;硫链丝菌肽与顺铂联用,其细胞存活率明显低于顺铂或硫链丝菌肽单药,凋亡率明显高于单药组,与 FoxM1 siRNA 结果一致。以上结果与学者发现 FoxM1 参与调控卵巢癌[9]、乳腺癌[10]和非小细胞肺癌[14]的顺铂耐药是一致的。有研究发现在肝癌、胰腺癌、直肠癌细胞中抑制 FoxM1 可导致化疗药物敏感性增加,同时 Bcl-2 表达降低[12]。而 Bcl-2 是 BCL2 家族中的一员,在凋亡信号通路中扮演了重要角色,它抑制 Bax 等一系列凋亡相关基因激活,减少凋亡。过表达 Bcl-2,细胞常表现耐药性和耐放疗性[15],Bcl-2 可能参与了 FoxM1 对化疗敏感性的调控。本实验检测下调 FoxM1 后 Bcl-2、Bax 的表达情况,发现 FoxM1 siRNA 以及硫链丝菌肽均能导致 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白增加,凋亡率也增高。Kwok 等[10]发现 FoxM1 调控乳腺癌的顺铂耐药与 BRCA2、XRCC1 等 DNA 修复基因相关;我国学者发现 FoxM1 作用于 Exo1 基因启动子,其高表达后凋亡减少,导致顺铂敏感性下降,下调 FoxM1 表达后顺铂敏感性增强[14]。他们发现作用于 FoxM1 下游基因如 BRCA2、XRCC1、Exo1,其致敏效果均不及直接作用于 FoxM1,其原因可能是因为 FoxM1 直接调控着一系列下游基因,如增殖、DNA 修复、抗凋亡基因,所以作用于单一下游基因效果不及 FoxM1 这一枢纽基因[4,10,13]。这一结果体现了 FoxM1 研究的重要性以及复杂性,也侧面肯定了 FoxM1 抑制剂硫链丝菌肽的临床意义。

综上所述,本实验以 FoxM1 siRNA 以及特异性抑制剂两种方式下调 FoxM1 表达,发现两种方式均能使 Hep-2 细胞对顺铂敏感性增强,其机制可能与凋亡蛋白 Bcl-2 下调、Bax 上调相关。本研究为临床上预测顺铂疗效、提高顺铂化疗敏感性以及硫链丝菌肽的临床应用提供了初步的实验室依据。

参考文献:

[1] Li D W, Dong P, Wang F, *et al*. Hypoxia induced multidrug resistance of laryngeal cancer cells *via* hypoxia-inducible factor-1α[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(8): 4853 – 4858.

[2] Jenckel F, Knecht R. State of the art in the treatment of laryngeal cancer[J]. Anticancer Res, 2013, 33(11): 4701 – 4710 .

[3] Xu Y Y, Wu T T, Zhou S H, *et al*. Apigenin suppresses GLUT-1 and p-AKT expression to enhance the chemosensitivity to cisplatin of laryngeal carcinoma: Hep-2 cells: an *in vitro* study[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 3938 – 3947.

[4] Halasi M, Gartel A L. FOX(M1) news--it is cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(3): 245 – 254.

[5] Halasi M, Gartel A L. Targeting FOXM1 in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(5): 644 – 652.

[6] Hegde N S, Sanders D A, Rodriguez R, *et al*. The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton[J]. Nat Chem, 2011, 3(9): 725 – 731.

[7] Jiang L Z, 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.

[8] 林力, 邓碧, 寿铸, 等. 硫链丝菌肽对人喉癌 Hep-2 细胞生长及 FoxM1 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(20): 2086 – 2089.

[9] Zhou J, Wang Y, Wang Y, *et al*. FOXM1 modulates cisplatin sensitivity by regulating EXO1 in ovarian cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96989.

[10] Kwok J M, Peck B, Monteiro L J, *et al*. FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(1): 24 – 34.

[11] Chetty C, Bhoopathi P, Rao J S, *et al*. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 enhances radiosensitivity by abrogating radiation-induced FoxM1-mediated G2/M arrest in A549 lung cancer cells[J]. Int J Cancer, 2009, 124(10): 2468 – 2477.

[12] Tan Y, Raychaudhuri P, Costa R H. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(3): 1007 – 1016.

[13] Halasi M, Gartel A L. Suppression of FOXM1 sensitizes human cancer cells to cell death induced by DNA-damage[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31761.

[14] Wang Y, Wen L, Zhao S H, *et al*. FoxM1 expression is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2013, 79(2): 173 – 179.

[15] Cory S, Huang D C, Adams J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8590 – 8607.

(**收稿**:2014-11-19;**修回**:2015-01-04)

(编辑　汪勤俭)