论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412156

异位表达 FOXO4 对胃癌细胞凋亡的影响

赵 亮[1],高 蕊[2],刘 菁[3],黄慧哲[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:组织胚胎学教研室[1],发育生物学研究室[2],生物化学与分子生物学教研室[3])

[摘要] **目的** 应用 pCMV5-Flag 和 pLL3.7 真核表达载体构建 Forkhead box O4 (FOXO4)基因的过表达质粒和干扰 RNA 表达质粒,研究其对胃癌细胞凋亡的影响。**方法** 将 FOXO4 基因的开放阅读框克隆入 pCMV5-Flag 载体,将靶向 FOXO4 基因的 siRNA 克隆入 pLL3.7 载体,获得 FOXO4 的表达质粒 Flag-FOXO4 和干扰质粒 FOXO4-shRNA。将获得的质粒及对照质粒通过脂质体转染 MKN45 和 SGC7901 胃癌细胞,Western blot 检测其对细胞中 FOXO4 蛋白的表达和沉默效率。FCM 检测其对细胞凋亡的影响,Western blot 检测 Cleaved Caspase-3 的表达以及应用 Real-time PCR 检测其对促凋亡转录因子 BCL-6 的表达的变化。**结果** 成功构建 FOXO4 的表达质粒 Flag-FOXO4 和干扰质粒 FOXO4-shRNA。Western blot 结果表明,Flag-FOXO4 可以明显增加细胞 FOXO4 的表达,FOXO4-shRNA 明显抑制细胞 FOXO4 的表达。FCM 结果显示,Flag-FOXO4 组与 Control 组相比较,MKN45 细胞和 SGC7901 细胞凋亡显著增加了 16.54%($P<0.001$)和 26.23%($P<0.001$)。Western blot 结果显示 Cleaved Caspase-3 表达与 FCM 结果一致。Real-time PCR 结果表明 Flag-FOXO4 组细胞 FOXO4 下游促凋亡基因 BCL-6 的表达显著增加($P<0.01$),FOXO4-shRNA 明显抑制了细胞 BCL-6 的表达($P<0.01$)。**结论** FOXO4 的过表达可能通过增加 FOXO4 下游促凋亡基因 BCL-6 的表达促进了胃癌细胞的凋亡。FOXO4 的沉默降低了 BCL-6 的表达。

[关键词] FOXO4 基因;过表达;RNA 干扰;细胞凋亡;胃癌细胞
[中图法分类号] R394-33;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Effects of ectopic expression of Forkhead box O4 on cell apoptosis in human gastric cancer cells

Zhao Liang[1], Gao Rui[2], Liu Jing[3], Huang Huizhe[2] ([1]Department of Histology and Embryology, [2]Department of Developmental Biology, [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the expression vector and the small interfering RNA containing human Forkhead box O4 gene (FOXO4) by using the pCMV5-Flag and pLL3.7 eukaryon expression vector, and determine the effects on the apoptosis of gastric cancer cells after transfected with the vectors. **Methods** The open reading frame sequence of FOXO4 gene was cloned into the plasmid pCMV5-Flag, and the siRNA sequence targeting FOXO4 gene was cloned into the plasmid pLL3.7 in order to generate the expression plasmid Flag-FOXO4 and interference plasmid FOXO4-shRNA. The plasmids and control of the plasmids were transfected into the gastric cancer MKN45 and SGC7901 cells respectively by lipofectamine-mediated transfection. The expression and silencing efficiency were determined by Western blotting. Cell apoptosis were

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31171388);重庆市杰出青年科学基金(CSTC2012jjjq10001)
[通信作者] 黄慧哲,电话:(023)68485826,E-mail: devbiology@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1321.014.html(2015-03-24)

detected by flow cytometry, and the protein levels of cleaved Caspase-3 was detected by Western blotting. Real-time PCR was employed to measure the mRNA expression of apoptosis promoting transcription factor BCL-6 (a downstream gene of FOXO4 gene) in the gastric cancer cells after transfection with the vectors. **Results** The expression plasmid (Flag-FOXO4) and interference plasmid (FOXO4-shRNA) were successfully constructed respectively. The protein level of FOXO4 was significantly increased in the gastric cancer MKN45 and SGC7901 cells after plasmid Flag-FOXO4 transfection, and was obviously decreased in the cells transfected with FOXO4-shRNA vector. Flow cytometry showed that the Flag-FOXO4 transfection enhanced the apoptotic rates of the MKN45 cells and SGC7901 cells by 16.54% ($P<0.01$) and 26.23% ($P<0.01$) respectively when compared with the cells without transfection. Western blot result showed the expression level of cleaved Caspase-3 was also increased. Real-time PCR showed that ,the mRNA expression level of BCL-6 was increased in the gastric cancer cells with Flag-FOXO4 transfection than the cells without ($P<0.01$), and it was decreased in the cells with FOXO4-shRNA transfection ($P<0.01$). **Conclusion** Over-expression of FOXO4 enhances the apoptosis in gastric cancer cells through up-regulating the expression of its downstream pro-apopotic gene BCL-6, while, silencing of FOXO4 decreases the expression of BCL-6.

[**Key words**] Forkhead box O4 gene; over-expression; RNA interfering; cell apoptosis; gastric cancer cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31171388) and the Science Fund for Distinguished Young Scholars of Chongqing (CSTC2012jjjq10001). Corresponding author: Huang Huizhe, ,E-mail: devbiology@cqmu.edu.cn

胃癌导致人类死亡的第三大肿瘤疾病[1-2]。随着分子生物学研究的推进,分子的靶向治疗也将肿瘤的个体化治疗推向了另一个高峰。Forkhead box O4 蛋白(又称 FOXO4,AFX)是 Forkhead 转录因子家族的成员之一,参与了细胞的增殖、凋亡等多种生理过程[3],在多种肿瘤细胞中表达异常。有研究发现,FOXO4 在胃癌细胞中表达异常,可能与胃癌的发生与发展有关[4-5]。本研究通过构建 FOXO4 表达载体及基因表达干扰的短发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA)载体,研究 FOXO4 的异位表达对胃癌细胞系 MKN45 和 SGC7901 凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株和细胞

真核表达骨架质粒pLL3.7、真核表达骨架质粒 pCMV5-Flag、大肠埃希菌 DH5α、人胃癌细胞 MKN45 和 SGC7901 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ、*Hpa*Ⅰ、*Xho*Ⅰ、*Taq* 聚合酶、DNA Marker、dNTP、Prime-Script RT reagent Kit 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司;兔抗 Cleaved Caspase-3 多克隆抗体和兔抗 FOXO4 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司,山羊抗鼠 β-actin 单克隆抗体购自天津三箭生物技术有限公司,HRP 标记的山羊抗兔和抗鼠 IgG 二抗购自江苏三联生物工程有限公司;TRIzol 试剂、脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司;siRNA 序列的合成及测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.3 FOXO4 真核表达载体的构建

FOXO4 基因序列引自 GenBank(序列号:NM_001170931.1),应用 Primer Premier 5.0 设计 FOXO4 引物序列,正义链:5′-ATGGATCCGGGGAATGAGAATTCA-3′,反义链:5′-TCAGGGATCTGGCTCAAAGTTGA-3′,送上海英骏生物技术有限公司合成。提取胃癌细胞 MKN45 细胞 RNA,以逆转录成 cDNA 为模板,PCR 扩增。按照 PCR 扩增反应试剂盒说明书,30 μL 反应体系,预变性 95 ℃,5 min,1 个循环。95 ℃变性 15 s;55 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 90 s,30 个循环。72 ℃延伸 10 min。将 PCR 产物与 *Nde*Ⅰ和 *Xba*Ⅰ充分酶切的 pCMV5-Flag 质粒共同纯化回收后,通过 T_4 连接酶连接后,转入大肠埃希菌 DH5α 中,在含氨苄抗性 LB 平板上培养过夜,挑取阳性克隆,即得到 pCMV5-Flag-FOXO4 真核表达载体。

1.4 siRNA 的设计与 siRNA 重组载体的构建

应用美国 Oligo Engine 公司提供的干扰 RNA 双链在线设计软件,选取抑制率最高的 FOXO4 siRNA 序列正义链:5′-GGAAATCAGTCATATGCAGAA-3′,反义链:

5′-TTCTGCATATGACTGATTTCC-3′;在人的基因组中无意义的对照 siRNA 序列正义链:5′-TTGATGTGTTTAGTCGCTA-3′,反义链:5′-TAGCGACTAAACACATCAA -3′,送上海英骏生物技术有限公司合成。将合成的靶向 FOXO4 siRNA 序列按从 95 ℃至 25 ℃,每下降 5 ℃维持 5 min,退火成双链 DNA 片段后,与经 *Hpa* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切并回收纯化后的 pLL3.7 质粒用 T_4 DNA 连接酶连接后,转入大肠埃希菌 DH5α 中,在含氨苄抗性 LB 平板上培养过夜,挑取阳性克隆,即得到siRNA真核表达载体 pLL3.7-FOXO4-shRNA与 pLL3.7-Control-shRNA。

1.5 细胞培养及转染

胃癌细胞系 MKN45 和 SGC7901 培养于含 10% 灭活胎牛血清 RPMI1640 培养基中(37 ℃,5% CO_2),隔天换液,待细胞生长至合适密度用于实验。采用脂质体介导的方法,将重组质粒 pCMV5-Flag-FOXO4、pLL3.7-FOXO4-shRNA 转入细胞系 MKN45 和 SGC7901,同时转入空载 pCMV5-Flag、pLL3.7-Control-shRNA 作为对照。转染操作按照脂质体转染试剂盒说明书进行。转染 24 h 后收集细胞,用于实验处理。

1.6 Western blot 检测 FOXO4 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

收集各组细胞,PBS 洗涤,蛋白裂解液裂解提取蛋白,BCA 法测定细胞总蛋白浓度,样品经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,FOXO4、Cleaved Caspase-3 一抗(参照说明书稀释抗体)及 β-actin 抗体 4 ℃孵育过夜,洗膜,HRP 标记的二抗(1∶8 000)室温孵育 1 h,洗膜,ECL 发光。采用 Quantity One 软件进行半定量分析,用目的条带的光密度值与 β-actin 条带的光密度值的比值来反映目的蛋白表达的相对量,β-actin 为内参对照。

1.7 FCM 法检测 FOXO4 异位表达状态下对胃癌细胞凋亡的影响

取对数期生长期的细胞,按 2×10^6/mL 接种于 6 cm 盘中,按上述转染处理。收集各组细胞,送重庆医科大学生命科学院流式检测中心检测 FOXO4 异位表达时对胃癌细胞凋亡的影响。

1.8 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(Real-time PCR, qPCR)是利用 SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ (TaKaRa,Japan)在 Bio-Rad CFX 96 qPCR 仪上通过两个阶段完成的。第一阶段,95 ℃ 30 s,为使其变性。第二阶段设置 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。GAPDH 正义链:5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGTA-3′,反义链:5′-ATGGGATTTCCATTGATGACA-3′; FOXO4 正义链:5′-CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGTG-3′,反义链:5′-GATCTAGGTCTATGA-TCGCGGCAG-3′;BCL-6 正义链:5′-CTGCATCAAGCCTCCTC-3′,反义链:5′-GTTCTCCACCACCTCACG-3′。

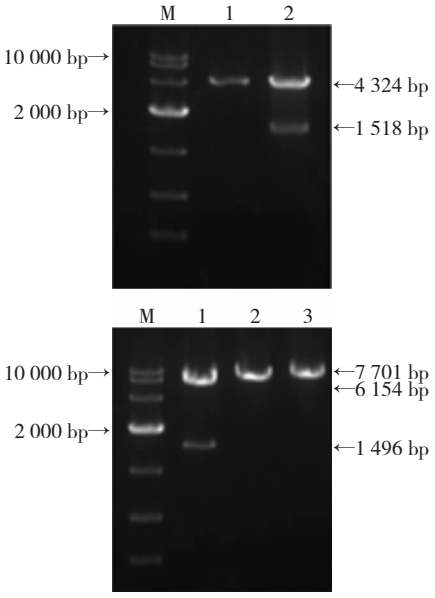
1.9 统计学方法

计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件,两样本均数比较采用 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

以 DL10000 为参照,重组质粒 pCMV5-Flag-FOXO4 经 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,阳性克隆为 1.5 kb 和 4.7 kb 片段,重组质粒 pLL3.7-FOXO4-shRNA、pLL3.7-Control-shRNA 经 *Hpa* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切,阳性克隆较对照组只能被 *Eco*R Ⅰ单酶切。基本与预期研究结果相符(图 1)。阳性克隆送上海英骏生物公司测序,结果正确。表明成功构建 pCMV5-Flag-FOXO4 和 pLL3.7-FOXO4-shRNA、pLL3.7-Control-shRNA 表达载体。



A:重组质粒 pCMV5-Flag-FOXO4 *Bam*H Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切鉴定 M:标准(DL10000);1:pCMV5-Flag;2:pCMV5-Flag-FOXO4;B:重组质粒 pLL3.7-FOXO4-shRNA、pLL3.7-Control-shRNA 经 *Hpa* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定 M:标准(DL10000);1:pLL3.7;2:pLL3.7-FOXO4-shRNA;3:pLL3.7-Control-shRNA

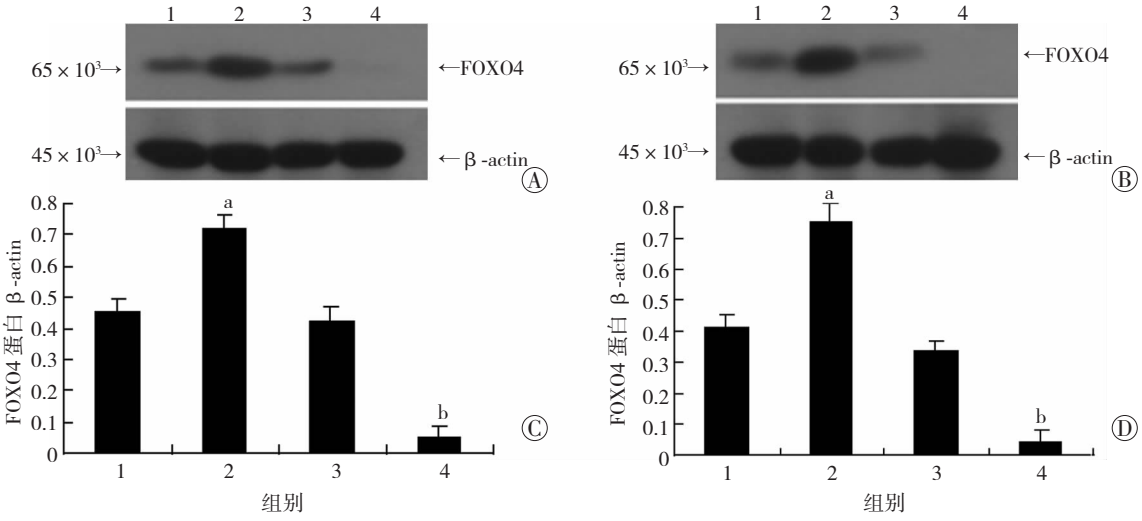
图 1 重组质粒双酶切鉴定结果

2.2 pCMV5-Flag-FOXO4 和 pLL3.7-FOXO4-shRNA 质粒对胃癌细胞中 FOXO4 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示，pCMV5-Flag-FOXO4 转染组 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞中 FOXO4 蛋白的表达水平明显高于 pCMV5-Flag 转染的阴性对照组（$P<0.01$，图 2）；pLL3.7-FOXO4-shRNA 转染组 MKN45 细胞中 FOXO4 蛋白的表达水平明显低于 pLL3.7-Control-shRNA 转染的阴性对照组（$P<0.01$，图 2）。说明 pCMV5-Flag-FOXO4 和 pLL3.7-FOXO4-shRNA 可分别明显增加和降低胃癌细胞中 FOXO4 蛋白的表达水平。

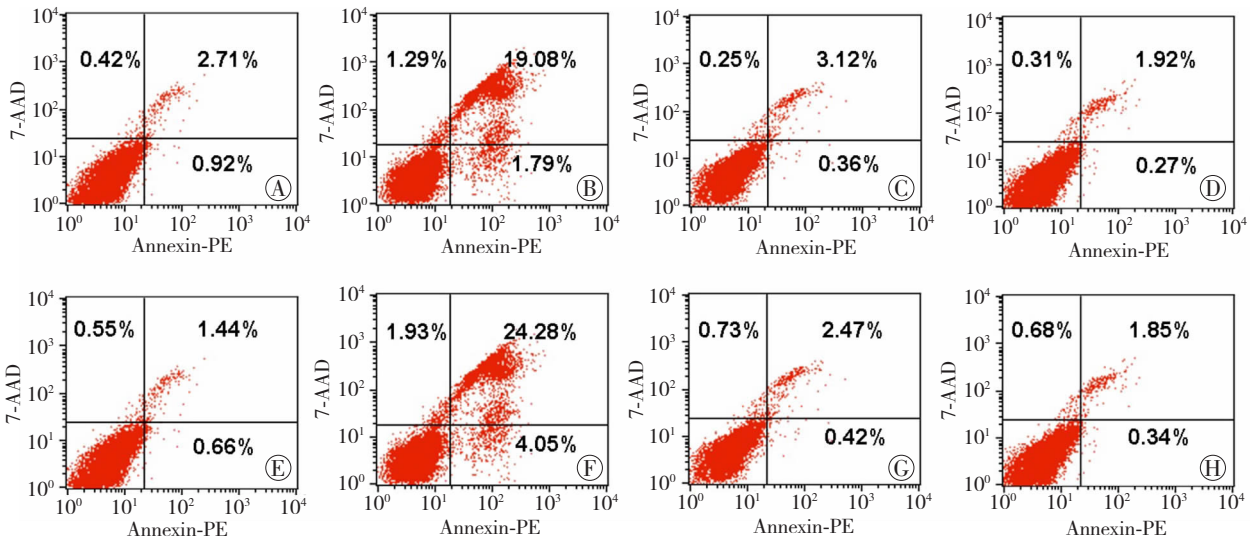
2.3 FCM 检测过表达和沉默 FOXO4 对胃癌细胞凋亡的影响

FCM 检测结果显示，转染 24 h 后，pCMV5-Flag-FOXO4 组较转染 pCMV5-Flag 组的 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞的凋亡率分别增加 16.54% 和 26.23%，差异有统计学意义（$P<0.01$，图 3）；转染 pLL3.7-FOXO4-shRNA 组较转染 pLL3.7-Control-shRNA 组的 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞的凋亡率并无明显变化，差异无统计学意义（$P>0.05$，图 3）。结果表明，FOXO4 的过表达会增加胃癌细胞的凋亡。



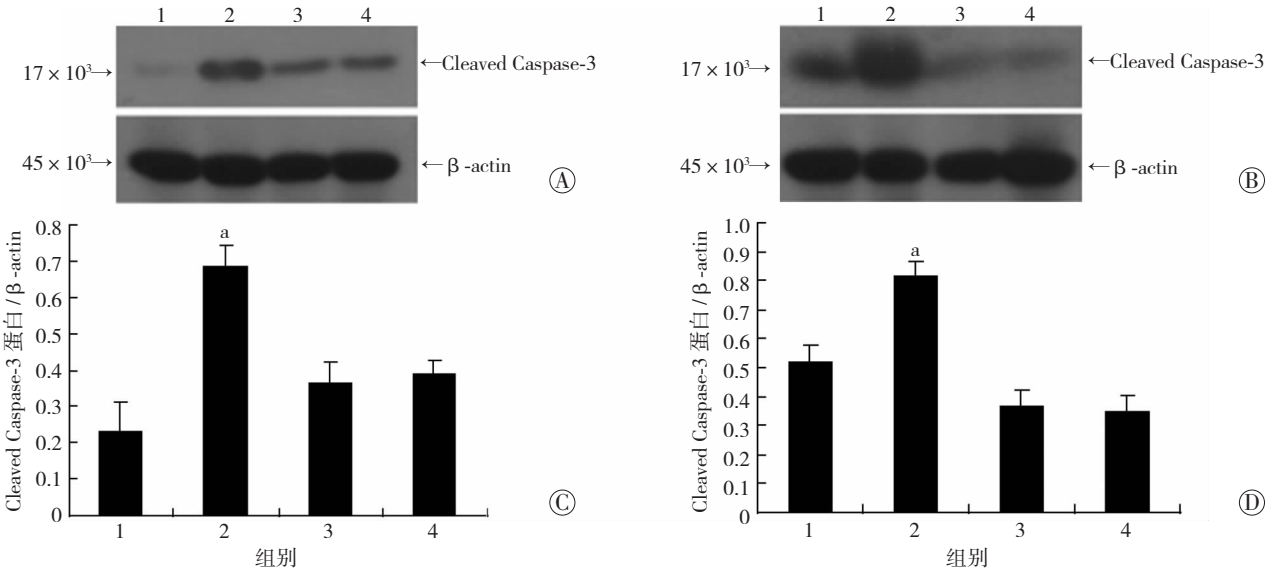
A：Western blot 检测 FMNK45 细胞中 FOXO4 蛋白表达；B：Western blot 检测 SGC7901 细胞中 FOXO4 蛋白表达　1：阴性对照组；2：FOXO4组；3：Control-shRNA 组；4：FOXO4-shRNA 组；C－D：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 Control-shRNA 组比较

图 2　Western blot 检测质粒转染胃癌细胞后 FOXO4 蛋白表达



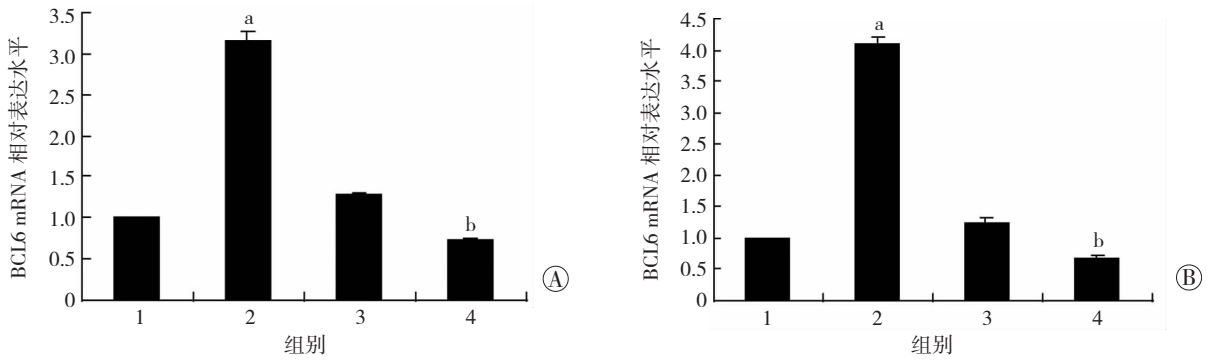
A～D：转染质粒后 MKN45 细胞凋亡情况；E～H：转染质粒后 SGC7901 细胞凋亡情况；A、E：阴性对照组；B、F：FOXO4 组；C、G：Control-shRNA 组；D、H：FOXO4-shRNA 组

图 3　流式细胞术检测 FOXO4 对各组胃癌细胞凋亡的影响



1:阴性对照组;2:FOXO4 组;3:Control-shRNA 组;4:FOXO4-shRNA 组 A、C:MKN45 细胞;B、D:SGC7901 细胞 a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

图4 Western blot 检测 FOXO4 对胃癌细胞 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响



1:阴性对照组;2:FOXO4 组;3:Control-shRNA 组;4:FOXO4-shRNA A:MKN45 细胞;B:SGC7901 细胞 a:$P<0.01$,与阴性对照组比较;b:$P<0.01$,与 Control-shRNA 组比较

图5 qPCR 检测 FOXO4 对胃癌细胞 BCL-6 mRNA 表达的影响

2.4 过表达和沉默 FOXO4 对胃癌细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,pCMV5-Flag-FOXO4 转染组 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平明显高于 pCMV5-Flag 转染的阴性对照组($P<0.01$,图4);转染 24 h 后,pLL3.7-FOXO4-shRNA 组较转染 pLL3.7-Control-shRNA 组的 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞中的 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平并无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$,图4)。结果表明,FOXO4 的过表达导致凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 表达上调。

2.5 过表达和沉默 FOXO4 对胃癌细胞中 BCL-6 mRNA 表达的影响

qPCR 结果显示,在胃癌细胞 MKN45 和 SGC7901 中,转染 pCMV5-Flag-FOXO4 组较转染 pCMV5-Flag 组,FOXO4 下游促凋亡基因 BCL-6 mRNA 表达水平明显上调了约 3 倍和 4 倍,差异有统计学意义($P<0.01$,图5);转染 pLL3.7-FOXO4-shRNA 组较转染 pLL3.7-Control-shRNA 组,BCL-6 mRNA 表达水平明显下调了约 1 倍,差异有统计学意义($P<0.01$,图5)。结果表明,FOXO4 的过表达导致的胃癌细胞的凋亡,可能是通过激活 BCL-6 的转录实现的。

3 讨论

胃癌仍是世界难以攻克的常见癌症之一。胃癌的治疗仍主要以化疗和放疗方式为主,但治疗效果有限,患者预后效果差、生存率低。FOXO 蛋白是 Forkhead 转录因子家族的成员之一。在哺乳动物中,FOXO 基

因亚家族共有4个成员,分别是FOXO1(之前被称为FKHR)、FOXO3(之前被称为FKHRL1)、FOXO4(之前被称为AFX)和FOXO6。许多研究发现,FOXO转录因子参与到细胞的增殖、凋亡、分化、迁移、能量代谢等多种生理过程,并在不同的环境刺激下,FOXO可以很好地协调起不同的基因表达模式,而起到不同的作用[3,6-10]。Kim等[11]发现,FOXO1的磷酸化抑制了胃癌的血管生成。Yamamura等[12]研究发现,FOXO3a可以和RUNX3结合共同调节胃癌细胞的凋亡。FOXO4在成人胃肠道中表达较FOXO家族其他成员(FOXO1、FOXO3a、FOXO6)较高,但FOXO4在胃癌中的研究报道较少。

有研究表明,FOXO4在胃癌细胞中较正常胃细胞表达下调。张超等[4]报道FOXO4在正常胃黏膜组织的阳性率为100%,而在胃腺癌组织的阳性率仅为40.0%。Su等[5]研究发现,在早期胃癌组织中,FOXO4的阳性率为42.5%,在侵袭性胃癌组织中,FOXO4的阳性率仅为17.9%。本研究利用在不同分化程度胃癌细胞中过表达和沉默FOXO4,研究FOXO4对胃癌细胞生存能力的影响,结果显示,在低分化胃癌细胞株MNK45和高分化胃癌细胞株SGC7901中过表达FOXO4可明显增加细胞的凋亡($P<0.01$),表明FOXO4对低分化、高分化胃癌细胞均有明显的促凋亡作用。

已有研究发现,FOXO4可以介导细胞的凋亡。Chen等[13]研究发现microRNA-421可以通过下调其靶基因FOXO4的表达,介导鼻炎癌细胞的增殖和凋亡。Chuang等[14]通过酶联免疫吸附等实验发现FOXO4可以介导足细胞的凋亡。Takaharu等[15]通过siRNA沉默细胞FOXO4,抑制了在双氧水刺激下早期的促血管生成细胞的凋亡。本研究结果显示,高表达FOXO4,可以引起胃癌细胞系MKN45和SGC7901细胞系的凋亡($P<0.001$),表明FOXO4基因对胃癌细胞具有促凋亡能力。

细胞中凋亡蛋白Cleaved Caspase-3的变化也是细胞凋亡的一个重要指标。Tang等[16]在可诱导的高表达的FOXO4的HeLa细胞株中,加入Caspase通路的抑制剂zVAD-fmk [Z-ValAla-Asp (OMe)-fluoromethyl ketone],细胞的凋亡较没有加入Caspase抑制剂组基本完全被消除,说明caspase蛋白是FOXO4引起细胞凋亡的终末途径。本研究结果显示,高表达的FOXO4,使得胃癌细胞的凋亡蛋白Cleaved Caspase-3表达量增加,验证了,FOXO4促进了胃癌细胞的凋亡。但是减少FOXO4表达,并没有明显引起Cleaved Caspase-3蛋白表达变化,可能由于细胞本身凋亡并没有改变。

FOXO4在细胞信号通路中起着重要作用。FOXO4可以响应生长因子的调控而被磷酸化导致其出核,不能激活下游的转录因子。对于很多生长因子激活的蛋白激酶,其特异磷酸化位点已有报道。比如对于细胞有促生存作用的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)细胞信号通路的蛋白激酶B(PKB/AKT)可以将FOXO4磷酸化,导致其从细胞核穿梭至细胞质,失去了激活下游转录因子,而这些转录因子多有促进细胞凋亡的作用[3,16-20]。Tang等[16]通过蛋白免疫印迹及荧光素酶报告基因实验等多种实验方法证实了BCL-6(B-Cell Lymphoma)是FOXO4的下游转录因子。BCL-6转录因子可以与抗凋亡基因BCL-XL的启动子位点结合,而抑制BCL-XL转录,导致细胞的凋亡[21-22]。本研究结果显示,高表达FOXO4,可以增加胃癌细胞系MKN45和SGC7901细胞系BCL-6转录因子的表达,促进细胞的凋亡,沉默FOXO4,可以明显抑制胃癌细胞系MKN45和SGC7901细胞系BCL-6转录因子的表达,增强了细胞的生存能力。

综上所述,本研究结果显示FOXO4的高表达可以促进胃癌细胞系MKN45和SGC7901细胞的凋亡;FOXO4的沉默增强了胃癌细胞的潜在生存能力。为进一步探讨FOXO4与肿瘤细胞的凋亡及相关调节基因表达的信号转到机制提供了实验数据,为研究胃癌发生、发展的分子机制奠定了基础,有利于在个体化分子治疗中开创新的治疗思路,提供新的实验依据。

参考文献:

[1] Leja M, You W, Camargo M C, *et al*. Implementation of gastric cancer screening - the global experience[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(6): 1093-1106.

[2] Herrero R, Park J Y, Forman D. The fight against gastric cancer - the IARC Working Group report[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(6): 1107-1114.

[3] Zhang Y, Gan B, Liu D, *et al*. FoxO family members in cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(4): 253-259.

[4] 张超, 王德荣, 曲飞, 等. 转录因子FOXO4与胃癌及Hp感染关系的临床研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2013, 16(3): 210-213.

[5] Su L, Liu X, Chai N, *et al*. The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 378.

[6] Srisuttee R, Koh S S, Park E H, *et al*. Up-regulation of Foxo4 mediated by hepatitis B virus X protein confers resistance to oxidative stress-induced cell death[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(2): 255 - 260.

[7] Maiese K, Chong Z Z, Shang Y C, *et al*. A "FOXO" in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer[J]. Med Res Rev, 2009, 29(3): 395 - 418.

[8] Brunet A, Bonni A, Zigmond M J, *et al*. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor[J]. Cell, 1999, 96(6): 857 - 868.

[9] Glauser D A, Schlegel W. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells[J]. J Endocrinol, 2007, 193(2): 195 - 207.

[10] 甘立霞. FoxO转录因子在代谢调节及肿瘤抑制中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(12): 1347 - 1350.

[11] Kim S Y, Yoon J, Ko Y S, *et al*. Constitutive phosphorylation of the FOXO1 transcription factor in gastric cancer cells correlates with microvessel area and the expressions of angiogenesis-related molecules[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 264.

[12] Yamamura Y, Lee W L, Inoue K, *et al*. RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(8): 5267 - 5276.

[13] Chen L, Tang Y, Wang J, *et al*. miR-421 induces cell proliferation and apoptosis resistance in human nasopharyngeal carcinoma *via* downregulation of FOXO4[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(4): 745 - 750.

[14] Chuang P Y, Dai Y, Liu R, *et al*. Alteration of forkhead box O (foxo4) acetylation mediates apoptosis of podocytes in diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23566.

[15] Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, *et al*. FOXO4-knockdown suppresses oxidative stress-induced apoptosis of early pro-angiogenic cells and augments their neovascularization capacities in ischemic limbs[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92626.

[16] Tang T T, Dowbenko D, Jackson A, *et al*. The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor[J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 14255 - 14265.

[17] Ruggieri S, Tamma R, Marzullo A, *et al*. Translocation of the proto-oncogene Bcl-6 in human glioblastoma multiforme [J]. Cancer Lett, 2014, 353(1): 41 - 51.

[18] Zhang X, Tang N, Hadden T J, *et al*. Akt, FoxO and regulation of apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813 (11): 1978 - 1986.

[19] Sun Y, Tian H, Wang L, *et al*. The effects of silencing of PI3K p85alpha on 5-FU-induced colorectal cancer cells apoptosis[J]. Med Oncol, 2013, 30(4): 704.

[20] Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(11): 1938 - 1945.

[21] Chiang C, Ihrie R A. Controlling COR competence: BCL-6 regulates neurogenesis and tumor suppression[J]. Cancer Cell, 2014, 26(6): 773 - 774.

[22] Lee E J, Kim J M, Lee M K, *et al*. Splice variants of the forkhead box protein AFX exhibit dominant negative activity and inhibit AFXalpha-mediated tumor cell apoptosis[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2743.

(**收稿**:2014-12-15;**修回**:2015-01-05)

(编辑 汪勤俭)