DOI:10.16016/j.2097-0927.202201116

转录因子 SP1 上调 STMN1 促进子宫平滑肌瘤细胞增殖并抑制凋亡

方 芳[1],潘盛青[2],陈培芳[1],刘姗姗[1],徐彩虹[1] 211102 南京,东南大学医学院附属南京同仁医院:妇产科[1],重症医学科[2]

[摘要] **目的** 研究微管解聚蛋白 1(Stathmin-1,STMN1)受特化蛋白 1(specialized protein 1,SP1)转录调控对子宫平滑肌瘤细胞增殖和凋亡的作用。**方法** 收集 2017 年 6 月至 2019 年 6 月在南京同仁医院妇产科接受子宫全切除和次全切除的 30 例子宫肌瘤患者的肌瘤组织及周围(瘤旁)平滑肌,RT-qPCR 检测子宫平滑肌瘤组织和周围平滑肌组织中 STMN1 和 SP1 mRNA 水平。CCK-8、TUNEL 和 Western blot 检测敲低 STMN1 后人子宫平滑肌瘤(human uterine leiomyoma,HuLM)细胞增殖和凋亡。利用 JASPAR 网站预测转录因子 SP1 和 STMN1 启动子的结合位点。采用 RT-qPCR、Western blot、荧光素酶、ChIP 验证 SP1 和 STMN1 的转录调控,进行功能拯救实验。**结果** 相较于正常平滑肌细胞,子宫平滑肌瘤组织中 STMN1 和 SP1 表达上调($P<0.001$)。敲低 STMN1 抑制 HuLM 细胞增殖并促进凋亡($P<0.001$)。SP1 作为转录因子正向调控 STMN1 表达水平,敲低 SP1 能够抑制 HuLM 细胞增殖并促进凋亡($P<0.001$),进一步过表达 STMN1 逆转敲低 SP1 对细胞增殖和凋亡的作用($P<0.001$)。**结论** 转录因子 SP1 通过上调 STMN1 促进子宫平滑肌瘤细胞增殖并抑制凋亡。

[关键词] 子宫平滑肌瘤;STMN1;转录因子;SP1;增殖;凋亡
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.33 [文献标志码] A

Up-regulation of stathmin by specialized protein 1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in uterine leiomyoma cells

FANG Fang[1], PAN Shengqing[2], CHEN Peifang[1], LIU Shanshan[1], XU Caihong[1] [1]Department of Gynaecology and Obstetrics, [2]Department of Critical Care Medicine, Nanjing Tongren Hospital, School of Medicine of Southeast University, Nanjing, 211102, Jiangsu Province, China

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of microtubule depolymerization protein 1 (stathmin, STMN1) on the proliferation and apoptosis of uterine leiomyomas cells under the transcriptional regulation of specialized protein 1 (SP1). **Methods** A total of 30 patients of uterine leiomyomas undergoing total and subtotal hysterectomy in our hospital from June 2017 to June 2019 were recruited in this study. The mRNA expression levels of STMN1 and SP1 in the uterine leiomyoma tissues and surrounding smooth muscle tissues were detected with qRT-PCR. After STMN1 was knocked down in human uterine leiomyoma (HuLM) cells, CCK8 assay, TUNEL and Western blotting were used to detect the cell proliferation and apoptosis. JASPAR online tool was employed to predict the binding site of transcription factor SP1 and STMN1 promoter. qRT-PCR, Western blotting, luciferase reporter assay, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) were applied to verify the transcriptional regulation of SP1 for STMN1, and functional rescue experiments were also carried out. **Results** The expression levels of STMN1 and SP1 were significantly higher in the uterine leiomyoma tissues than the normal smooth muscle tissues ($P<0.05$). Knockdown of STMN1 inhibited the proliferation

[通信作者] 潘盛青,E-mail:pansq@njtrh.org

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and promoted the apoptosis in HuLM cells ($P<0.001$). SP1, as a transcription factor, positively regulated the expression level of STMN1. Knockdown of SP1 could also inhibit the proliferation and promote the apoptosis of HuLM cells ($P<0.001$), and overexpression of STMN1 reversed the effect of knockdown of SP1 on cell proliferation and apoptosis ($P<0.001$). **Conclusion** The transcription factor SP1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis in the uterine leiomyoma cells by up-regulating STMN1.

[**Key words**] uterine leiomyoma; stathmin; transcription factor; specialized protein 1; proliferation; apoptosis

Corresponding author: PAN Shengqing, E-mail: pansq@njtrh.org

子宫平滑肌瘤(uterine leiomyoma, UL)是育龄妇女生殖系统常见的良性肿瘤之一。主要的临床表现与肌瘤的大小,生长部位有关,包括月经量多、经期延长、继发贫血、盆腔疼痛及压迫症状等。目前手术治疗是主要治疗方法,而非手术疗法并未显示出令人满意的效果[4-5]。因此,检测与子宫平滑肌瘤相关的生物标志物,并阐明其潜在的机制是十分必要的。

微管解聚蛋白1(Stathmin-1, STMN1)在细胞质中广泛表达,也被称为编码高度保守的18-kDa胞质磷蛋白的癌基因。STMN1蛋白具有一个微管蛋白结合结构域和一个在N端区域具有4个丝氨酸磷酸化位点的Stathmin样结构域,通过隔离α/β-微管蛋白异二聚体和促进微管失稳,在调节微管动力学方面起着至关重要的作用[6]。STMN1被报道在许多癌症中上调,例如非小细胞肺癌[7]、乳腺癌[8]和胃癌[9],它可以诱导实体瘤中的细胞分化、增殖和迁移,并且与不良的临床预后有关[10-11]。文献[12-13]报道,子宫平滑肌肉瘤中STMN1表达明显高于正常子宫平滑肌组织,但其对子宫平滑肌瘤的具体调控机制少见报道。

据报道,转录因子特异性蛋白1(specialized protein 1,SP1)在子宫肌瘤中表达增加[14],这说明SP1可能在子宫肌瘤的进展中起作用。利用JASPAR网站查询发现转录因子SP1能够结合STMN1启动子并调控STMN1转录和表达,因此,本研究选定SP1作为STMN1的分子进行进一步研究,探索STMN1在子宫平滑肌瘤增殖和凋亡中的作用以及机制,以期为子宫平滑肌瘤的治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 组织收集

收集2017年6月至2019年6月在南京同仁医院妇产科接受子宫次全切除或全子宫切除术的30例子宫平滑肌瘤女性患者的肌瘤组织及周围(瘤旁)平滑肌,患者年龄(47.7±2.3)岁,已婚,术前3个月内未经激素治疗,术后被确诊为子宫平滑肌瘤。所有患者签署知情同意书,本研究经南京同仁医院医学伦理委员会批准(批件号:TRLLKY2017006.01)。

1.2 试剂

DMEM/F12培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;青霉素和链霉素购自北京索莱宝科技有限公司;STMN1敲低组-1/2、SP1敲低组-1/2、STMN1过表达组、SP1过表达组和它们各自的阴性对照(NC)从上海吉玛基因股份有限公司获得;提取总RNA的TRIzol试剂盒和转染试剂Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司; Fermentas反转录试剂盒、SYBR Green PCR试剂盒均从赛默飞公司购得;STMN1、SP1和内参基因GAPDH引物均合成并购自中国上海生工生物技术有限公司;一抗STMN1(ab52630)、SP1(ab231778)、PCNA(ab92552)、Ki67(ab15580)、Bcl-2(ab182858)、Bax(ab182733)、cleaved Caspase-3(ab2302)、caspase-3(ab32150)、cleaved Caspase-9(ab2324)、caspase-9(ab32351)、PI3K(ab32089)、phosphorylated(p)-PI3K(phospho Y607)、AKT(ab18785)、phosphorylated(p)-AKT(ab38449)、GAPDH(ab1816)、二抗山羊抗兔IgG H&L(HRP)购自Abcam公司;ECL发光液由美国Milipore提供;RIPA裂解液由西安赫特生物技术有限公司;从南京碧云天生物科技研究所购得BCA蛋白定量试剂盒和CCK-8试剂;TUNEL检测溶液购自Sigma公司;海肾荧光素酶报告基因细胞裂解液和ChIP检测试剂盒购自南京碧云天生物科技研究所;萤火虫荧光素酶反应液购自武汉赛思锐公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 原代人子宫平滑肌细胞(human uterine smooth muscle cells,UtSMC)购自PromoCell公司,人子宫平滑肌瘤(human uterine leiomyoma,HuLM)细胞购自Coriell医学研究所,并在含有10%胎牛血清100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM/F12培养基中在37 ℃和5% CO_2中培养。细胞通过胰蛋白酶消化传代用于进一步实验。

1.3.2 实时定量PCR(RT-qPCR) 所有患者术后

从瘤体取 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 组织 1 块,作为观察组样本;从瘤体旁正常平滑肌组织中取 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 组织 1 块,作为对照组样本。使用 TRIzol 法提取样本组织和细胞中的 RNA,使用 Fermentas 反转录试剂盒进行反转录以合成 cDNA。然后用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 RT-qPCR。GAPDH 作为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算 STMN1 和 SP1 的相对表达量,每个样本独立重复实验 3 次。

表 1 实时定量 PCR 引物序列与片段长度

基因	序列(5′→3′)	长度/bp
STMN1	正向:TCTGTCCCCGATTTCCCCC	19
	反向:AGCTGCTTCAAGACTTCCGC	20
SP1	正向:TTGAAAAAGGAGTTGGTGGC	20
	反向:TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG	20
GAPDH	正向:TCCCATCACCATCTTCCA	18
	反向:CATCACGCCACAGTTTTCC	19

1.3.3 转染 以每孔 2×10^5 个细胞接种生长至对数期的子宫平滑肌瘤细胞于 6 孔板中,细胞生长融合达 70%后,将干扰 STMN1、SP1 和/或过表达 STMN1、SP1 质粒以及相应的阴性对照按 Lipofectamine™ 2000 说明书步骤进行转染。收集转染 48 h 的细胞用于实验。

1.3.4 CCK-8 实验 将 HuLM 细胞接种到 96 孔板(5×10^3 个细胞/孔)中,每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂和 90 μL 培养基,37 ℃孵育 1.5 h。结果由酶标仪在 450 nm 处以 24、48、72 h 的间隔确定,整理数据结果并绘制细胞生长曲线。

1.3.5 TUNEL 染色 细胞转染 48 h 后,以 1×10^6 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板中,按照制造商的说明检测细胞凋亡。使用 DAPI 染色计数细胞总数,并计算 TUNEL 阳性细胞的平均比例。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测 进行双荧光素酶报告基因检测以检测 STMN1 启动子的活性。Luc/Ren 载体和目的基因载体共转染细胞 24 h,向 96 孔板的每个孔中加入 100 μL 海肾荧光素酶报告基因细胞裂解液,在冰上孵育 5 min 后,将裂解的细胞以 16 000 r/min 的速度离心 1 min 以收集上清液。随后,在黑色微孔板上加入 20 μL 裂解缓冲液,然后加入 100 μL 1×萤火虫荧光素酶反应液检测萤火虫荧光素酶活性。然后加入 100 μL 1×海肾荧光素酶反应液检测海肾荧光素酶活性。Luc 值与 Ren 值之比为实验结果。

1.3.7 染色质免疫沉淀反应实验(ChIP)试剂盒 按照制造商的方案对样品进行交联和超声处理后,将样品在 4 ℃下以 14 000×*g* 离心 5 min。在冰上用 2 mL 管中收集 0.2 mL 上清液。制备含有 1 mmol/L PMSF 的 1.8 mL ChIP 稀释缓冲液,并将其添加到样品中,用于在 4 ℃下用 70 μL Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA 离心 1 min。然后将样品与一抗在 4 ℃下孵育过夜,然后与 60 μL 蛋白 A+G Agarose/Salmon Sperm DNA 孵育 60 min。在 1 000×*g* 4 ℃下离心 1min 后,沉淀物依次用低盐免疫复合物洗涤缓冲液、高盐免疫复合物洗涤缓冲液、LiCl 免疫复合物洗涤缓冲液洗涤 1 次,然后用 TE 缓冲液洗涤 2 次。最后通过蛋白质印迹检查 ChIP 的产生。

1.3.8 Western blot 实验 利用 RIPA 裂解液抽提细胞中的总蛋白并用 BCA 法进行蛋白定量。将待检测蛋白样品按 40 μg/孔上样后进行 SDS-PAGE 电泳,然后通过运用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,将膜用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h 后孵育一抗 4 ℃过夜。第 2 天用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;最后,在暗室进行 ECL 化学发光显影。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 21.0 统计软件进行计算。数据表示为来自至少 3 个独立实验的 $\bar{x}\pm s$。两组比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

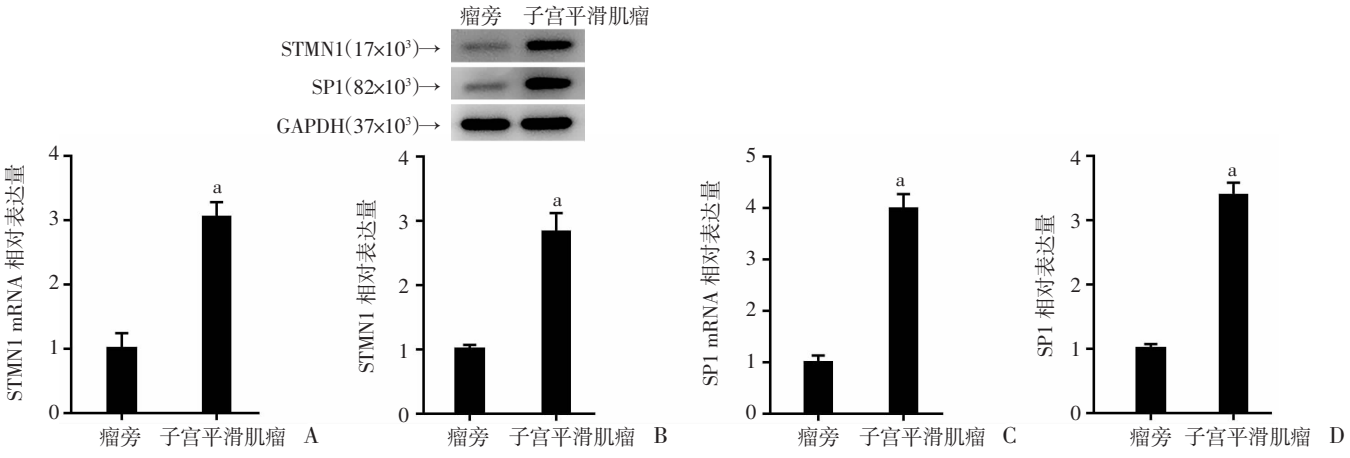
2.1 STMN1 和 SP1 在子宫平滑肌瘤组织中高表达

通过 RT-qPCR 检测 30 例配对子宫平滑肌瘤组织和周围平滑肌组织中 STMN1 和 SP1 mRNA 水平。结果显示,与配对的周围平滑肌组织相比,子宫平滑肌瘤组织中 STMN1 和 SP1 表达均上调($P<0.001$,图 1)。

2.2 干扰 STMN1 抑制子宫平滑肌瘤细胞增殖并促进凋亡

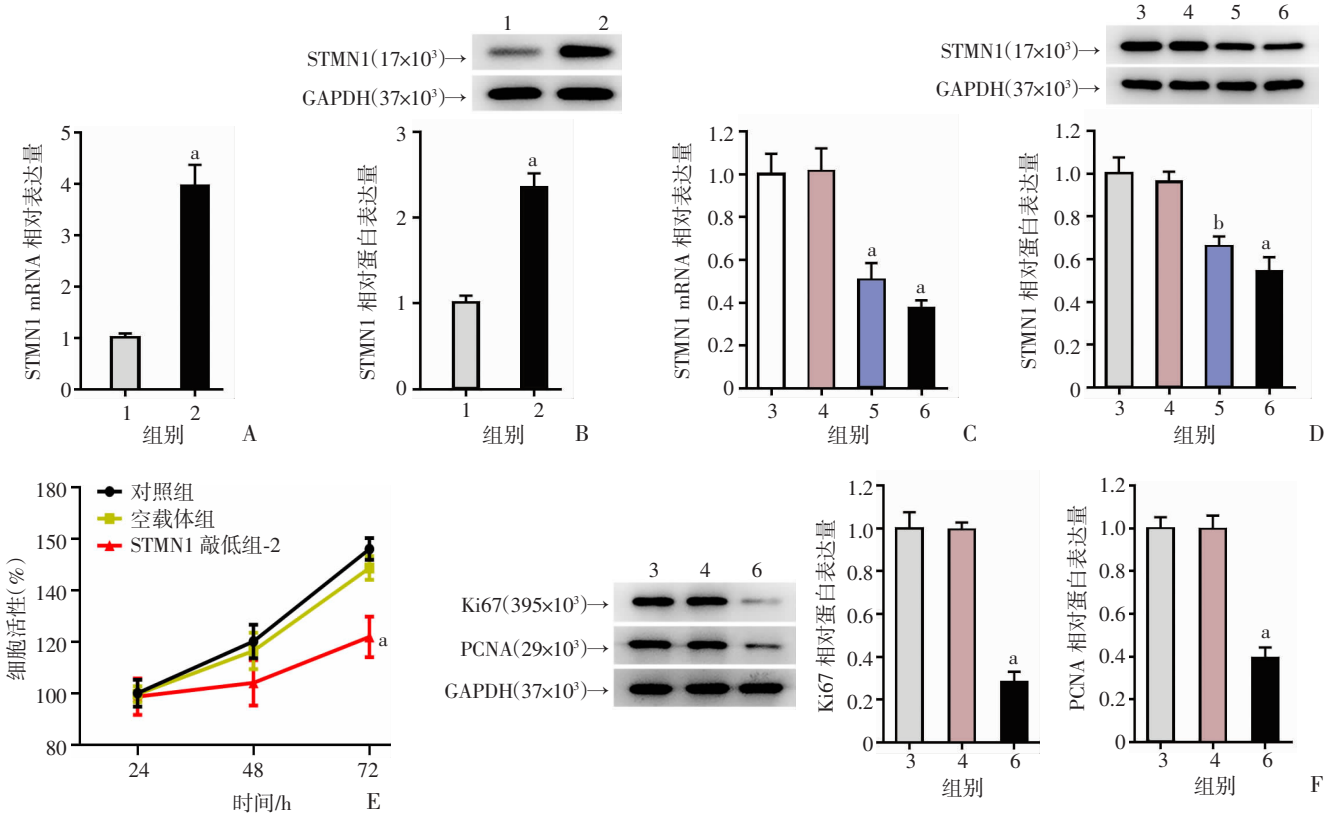
RT-qPCR 和 Western blot 检测原代 UtSMC 和 HuLM 细胞中 STMN1 表达差异,相较于 UtSMC,HuLM 中 STMN1 mRNA 和蛋白表达上调($P<0.001$,图 2A、B)。对 HuLM 细胞进行转染已敲低 STMN1 表达,RT-qPCR 和 Western blot 检测 STMN1 敲低组的转染效率,STMN1 敲低组-2 转染后,STMN1 表达水平更低,于是后续选择 STMN1 敲低组-2 进行实验($P<0.01$ 和 $P<0.001$,图 2C、D)。通过 CCK-8 和 TUNEL 染色检测细胞增殖和凋亡水平,Western blot 检测增殖和凋亡相关蛋白表达水平,与 control 组和 sh-NC 组相比,STMN1 敲低组-2 组细胞活性降低而凋亡水平升高($P<0.001$,图 2E,图 3A);增殖相关蛋白表达 Ki67、PCNA 在 STMN1 敲低组-2 组中下调($P<0.001$,图 2F);STMN1 敲低组-2 组促凋亡相关蛋白 Bax、cleaved Caspase-3、

cleaved Caspase-9 表达上调,但抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达下调($P<0.001$,图 3B)。以上结果显示 STMN1 在子宫平滑肌细胞中高表达,干扰 STMN1 抑制 HuLM 细胞增殖并促进凋亡。



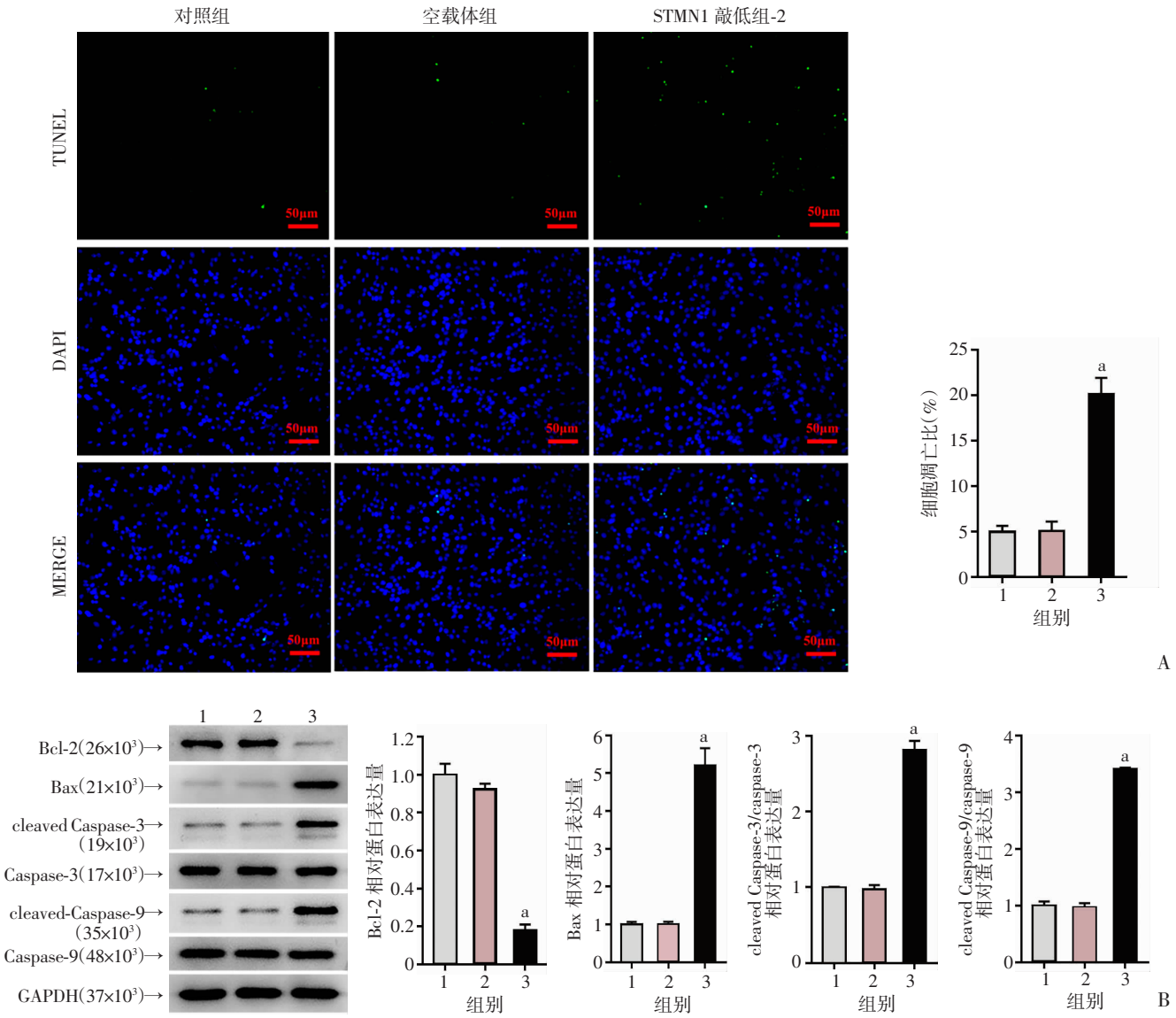
A:RT-qPCR 检测 STMN1 和 SP1 mRNA 表达水平;B:Western blot 检测 STMN1 和 SP1 表达水平 a:$P<0.001$,与瘤旁组织比较

图 1 STMN1 和 SP1 在子宫平滑肌瘤及瘤旁组织中的表达水平 ($n=30$,$\bar{x}\pm s$)



1:原代人子宫平滑肌细胞;2:人子宫平滑肌瘤细胞;3:对照组;4:空载体组;5:STMN1 敲低组-1;6:STMN1 敲低组-2 A:RT-qPCR 检测 UtSMC 和 HuLM 细胞中 STMN1 mRNA 表达水平 a:$P<0.001$,与原代子宫平滑肌细胞比较;B:Western blot 检测 UtSMC 和 HuLM 细胞中 STMN1 蛋白表达水平 a:$P<0.001$,与原代子宫平滑肌细胞比较;C、D 分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 HuLM 细胞中 STMN1 干扰效率 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与对照组比较;E:CCK-8 检测 24、48、72 h 3 个时间点细胞活性 a:$P<0.001$,与对照组比较;F:Western blot 检测增殖相关蛋白 Ki67、PCNA 表达水平 a:$P<0.001$,与对照组比较

图 2 干扰 STMN1 对 HuLM 细胞增殖的作用 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



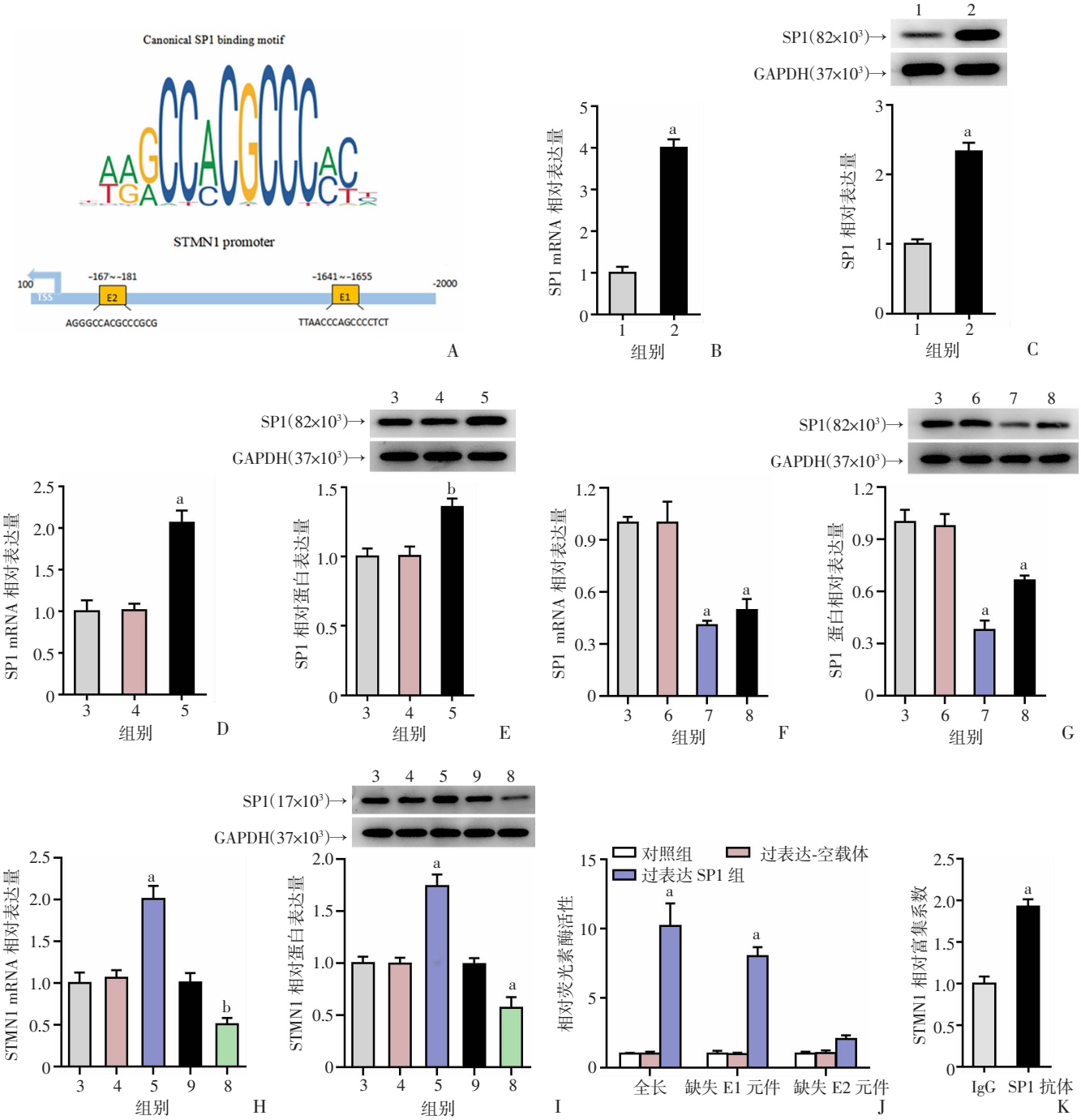
a: $P<0.001$,与对照组比较;1: 对照组; 2: 空载体组;3: STMN1 敲低组-2

A:TUNEL 染色检测细胞凋亡水平;B:Western blot 检测凋亡相关蛋白表达水平

图 3 干扰 STMN1 对 HuLM 细胞凋亡的作用 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.3 转录因子 SP1 结合 STMN1 启动子并调控其表达

利用 JASPAR 网站预测转录因子 SP1 与 STMN1 启动子的结合位点(图 4A)。RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,相对于 UtSMC,HuLM 细胞中表达较高($P<0.001$,图 4B、C)。为了观察 SP1 对 STMN1 的调控作用,构建 SP1 过表达以及干扰质粒并采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测转染效率,细胞中过表达 SP1 上调 STMN1 表达水平,而干扰 SP1 则下调 STMN1 水平($P<0.01$ 和 $P<0.001$,图 4D~G),shRNA-SP1-1 组 SP1 表达水平更低,后续选择 shRNA-SP1-1 进行实验。与 control 和 Oe-NC 相比,过表达 SP1 后,细胞中 STMN1 表达增加,而与 shRNA-NC 组相比,干扰 SP1 后,细胞中 STMN1 表达减少($P<0.01$ 和 $P<0.001$,图 4H、I)。在 JASPAR 网站中我们发现了 STMN1 启动子中与 SP1 结合的两个位点(成为 E1 和 E2 元件),为了探究哪个位点是 SP1 介导 STMN1 转录所必需的,将两个结合位点单独删除,发现在缺失 E2 元件的情况下几乎无法促进 STMN1 转录活性($P<0.001$,图 4J)。ChIP 分析表明,使用 E2 元件的特异性引物进行 PCR 检测,与 IgG 相比,抗 SP1 组 STMN1 相对富集($P<0.001$,图 4K),这也证实了转录因子 SP1 和 STMN1 的启动子的结合。



1：原代人子宫平滑肌细胞；2：人子宫平滑肌瘤细胞；3：对照组；4：过表达-空载体组；5：过表达 SP1 组；6：空载体组；7：SP1 敲低组-1；8：SP1 敲低组-2；9：敲低-空载体组

A：利用 JASPAR 网站预测 SP1 和 STMN1 启动子的结合位点；B、C 分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 UtSMC 和 HuLM 细胞中 SP1 表达水平　a：$P<0.001$，与原代子宫平滑肌细胞比较；D、E：分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 SP1 过表达质粒转染效率　a：$P<0.001$，b：$P<0.01$，与对照组比较；F、G：分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 SP1 干扰质粒转染效率　a：$P<0.001$，与对照组比较；H、I：分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 SP1 过表达和干扰后，HuLM 细胞中 STMN1 表达水平　a：$P<0.001$，b：$P<0.01$，与对照组比较；J：采用双荧光素酶报告基因检测 SP1 过表达后，两种 STMN1 启动子缺失突变体的荧光素酶活性　a：$P<0.001$，与对照组比较；K：ChIP 测定 STMN1 的相对富集　a：$P<0.001$，与 IgG 比较；

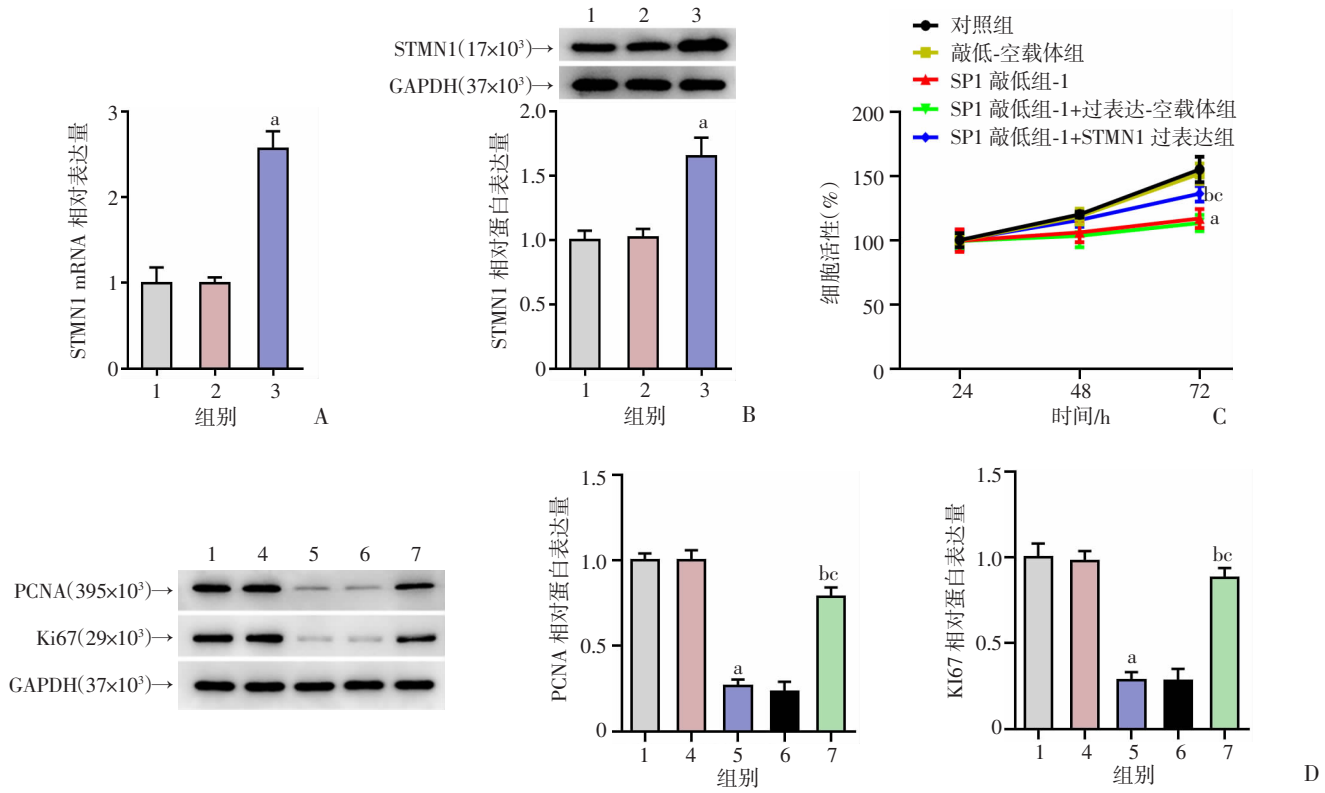
图 4　SP1 作为转录因子结合 STMN1 启动子，并调控其表达　（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

2.4　过表达 STMN1 部分逆转了干扰 SP1 对子宫平滑肌瘤细胞增殖和凋亡的作用

构建 STMN1 过表达质粒,RT-qPCR 和 Western blot 用来检测过表达效率,过表达质粒转染后,细胞中 STMN1 表达上调($P<0.001$,图 5A、B)。CCK-8 和 Western blot 的结果显示,相较于对照组和敲低-空载体组,SP1 敲低组-1 组细胞活性、Ki67 和 PCNA 蛋白表达水平降低,而进一步过表达 STMN1 能够逆转干扰 SP1 对细胞增殖的抑制作用($P<0.001$,图 5C、D)。TUNEL 和 Western blot 结果显示,相较于对照组和敲低-空载体组,SP1 敲低组-1 组细胞凋亡水平、促凋亡相关蛋白 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 水平升高,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 水平降低,而进一步过表达 STMN1 能够逆转干扰 SP1 对细胞凋亡的促进作用($P<0.001$,图 6)。以上结果显示,干扰 SP1 抑制 HuLM 细胞增殖并促进凋亡,过表达 STMN1 部分逆转了干扰 SP1 对增殖和凋亡的作用。

3　讨论

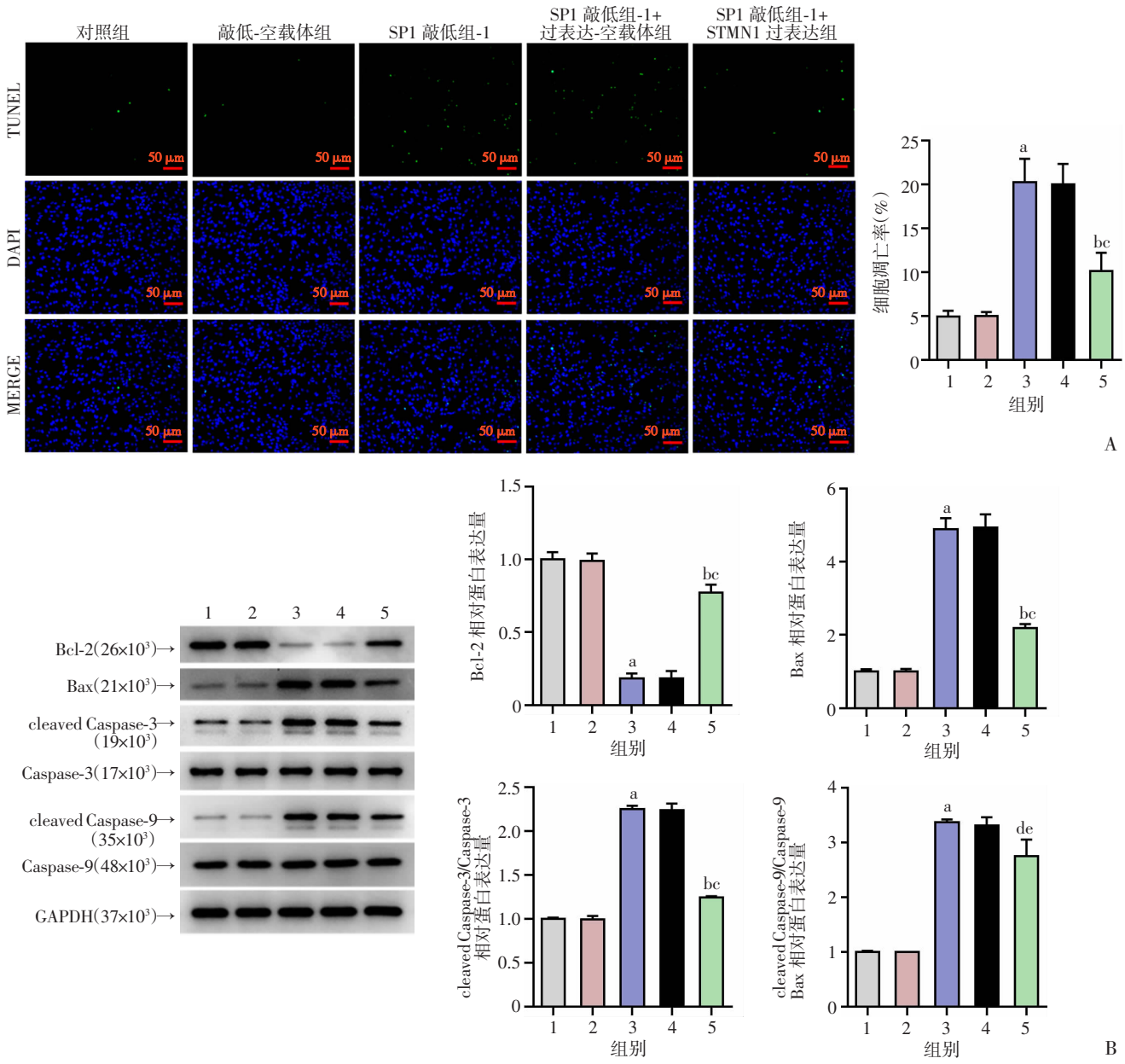
子宫平滑肌瘤好发于 30~50 岁的女性,机制尚不明确[15]。在维持正常组织生长过程中,细胞凋亡与细胞增殖的平衡是维持机体正常生理功能和细胞状态、数量前题,而平衡被打破后极有可能通过多种方式诱导肿瘤的发生[16]。现认为,在子宫平滑肌瘤的生长过程中有增殖和凋亡的失衡,体内细胞的凋亡受到抑制是该病的一个重要特征[17]。



1:对照组;2:过表达-空载体组;3:STMN1 过表达组;4:敲低-空载体组;5:SP1 敲低组-1;6:SP1 敲低-1+过表达-空载体组;7:SP1 敲低-1+STMN1 过表达组

A、B:分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 STMN1 过表达质粒转染效率　a:$P<0.001$,与对照组比较;C:CCK-8 检测细胞 24、48、72 h 3 个时间点细胞活性　a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 SP1 敲低组-1+过表达-空载体组比较;c:$P<0.05$,与 SP1 敲低组-1 比较;D:Western blot 检测增殖相关蛋白 Ki67、PCNA 表达水平及定量分析　a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1 比较;c:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1+过表达-空载体组比较

图 5　干扰 SP1 通过下调 STMN1 的表达对 HuLM 细胞增殖的作用　($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:敲低-空载体组;3:SP1 敲低组-1;4:SP1 敲低-1+过表达-空载体组;5:SP1 敲低-1+STMN1 过表达组

A:TUNEL 染色检测细胞凋亡水平及定量分析 a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1 比较;c:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1+过表达空载体组比较;B:Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 的表达水平 a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1 比较;c:$P<0.001$,与 SP1 敲低组-1+过表达-空载体组比较;d:$P<0.01$,与 SP1 敲低组-1 比较;e:$P<0.01$,与 SP1 敲低组-1+过表达-空载体组比较

图 6 干扰 SP1 通过下调 STMN1 的表达对 HuLM 细胞凋亡的作用 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

STMN1 是一种胞质蛋白,在微管动力学中起着重要的调节作用。最近,阐明 STMN1 在癌症中的功能的可能机制引起了越来越多的关注。皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, cSCC)组织和细胞系中 STMN1 的显着上调,STMN1 上调与 cSCC 细胞的增殖和凋亡有关[18]。STMN1 的沉默导致 Bcl-2 和存活蛋白的表达降低,以及 caspase-3 的激活[19]。有研究表明人乳腺癌细胞中 STMN1 的沉默诱导了 cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 的过度表达[20]。STMN1 的沉默导致 G_2/M 期阻滞甚至胆囊癌细胞系的凋亡[21]。据报道,STMN1 是一种高度敏感的平滑肌肉瘤标记物,但对于诊断目的的特异性欠佳[13]。我们的研究发

现,STMN1 在子宫平滑肌瘤组织和细胞中高表达,干扰其表达后抑制子宫平滑肌瘤细胞增殖并促进凋亡。

为了探索 STMN1 调控子宫平滑肌瘤细胞作用的上下游机制,通过查阅文献我们发现,SP1 在平滑肌瘤中表达升高[14],并且在 JASPAR 网站中预测到 SP1 与 STMN1 启动子的结合位点。SP1 是锌指家族的成员,在共享的 GC 盒中与 DNA 结合[22]。除了 SP1,锌指家族成员还包括 SP2、SP3 和 SP4,它们具有相似的 DNA 结合特异性,但在基因调控中表现出不同的作用[23]。各种研究表明,转录因子 SP1 各种类型人类癌症的发生和进展中发挥作用。抑制 SP1 随后会降低 Sp3/4、VEGF 和 Survivin 的表达,然后上调前列腺癌细胞中的细胞凋亡相关蛋白并下调细胞周期相关蛋白[24]。转录因子 SP1 诱导 DLEU1 在人胶质母细胞瘤细胞中上调促进细胞增殖并抑制凋亡[25]。LINC0163 在非小细胞肺癌组织和细胞中表达上调,高表达的 LINC01638 受转录因子 SP1 调控,通过 PTEN/AKT 信号通路促进细胞增殖但抑制其凋亡[26]。我们的研究也证实,转录因子 SP1 作为上游调控因子,结合并上调 STMN1 表达水平,从而发挥调控子宫平滑肌瘤细胞增殖和凋亡的作用。

综上,我们的研究结果证实,STMN1 和 SP1 在子宫平滑肌瘤组织和细胞中高表达,干扰转录因子 SP1 下调 STMN1 表达水平抑制子宫平滑肌瘤细胞增殖,并促进凋亡。

参考文献:

[1] WALKER C L, STEWART E A. Uterine fibroids: the elephant in the room[J]. Science, 2005, 308(5728): 1589-1592. DOI: 10.1126/science.1112063.

[2] MARSH E E, BULUN S E. Steroid hormones and leiomyomas [J]. Obstet Gynecol Clin N Am, 2006, 33(1): 59-67. DOI: 10.1016/j.ogc.2005.12.001.

[3] GUPTA S, JOSE J, MANYONDA I. Clinical presentation of fibroids[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2008, 22(4): 615-626. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2008.01.008.

[4] MOORE A B, YU L D, SWARTZ C D, *et al*. Human uterine leiomyoma-derived fibroblasts stimulate uterine leiomyoma cell proliferation and collagen type I production, and activate RTKs and TGF beta receptor signaling in coculture[J]. Cell Commun Signal, 2010, 8: 10. DOI: 10.1186/1478-811X-8-10.

[5] SHEN Y, XU Q, REN M L, *et al*. Measurement of phenolic environmental estrogens in women with uterine leiomyoma [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79838. DOI: 10.1371/journal.pone.0079838.

[6] ZHANG R, GAO X M, ZUO J L, *et al*. STMN1 upregulation mediates hepatocellular carcinoma and hepatic stellate cell crosstalk to aggravate cancer by triggering the MET pathway [J]. Cancer Sci, 2020, 111(2): 406-417. DOI: 10.1111/cas.14262.

[7] NIE W, XU M D, GAN L, *et al*. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. Lab Invest, 2015, 95(1): 56-64. DOI: 10.1038/labinvest.2014.124.

[8] OBAYASHI S, HORIGUCHI J, HIGUCHI T, *et al*. Stathmin1 expression is associated with aggressive phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients [J]. Int J Oncol, 2017, 51(3): 781-790. DOI: 10.3892/ijo.2017.4085.

[9] KE B, WU L L, LIU N, *et al*. Overexpression of stathmin 1 is associated with poor prognosis of patients with gastric cancer [J]. Tumor Biol, 2013, 34(5): 3137-3145. DOI: 10.1007/s13277-013-0882-0.

[10] HSIEH S Y, HUANG S F, YU M C, *et al*. Stathmin1 overexpression associated with polyploidy, tumor-cell invasion, early recurrence, and poor prognosis in human hepatoma [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(5): 476-487. DOI: 10.1002/mc.20627.

[11] ZHENG P, LIU Y X, CHEN L, *et al*. Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer[J]. J Proteome Res, 2010, 9(10): 4897-4905. DOI: 10.1021/pr100712t.

[12] HU X Q, ZHANG H P, ZHENG X D, *et al*. STMN1 and MKI67 are upregulated in uterine leiomyosarcoma and are potential biomarkers for its diagnosis[J]. Med Sci Monit, 2020,26: e923749. DOI: 10.12659/MSM.923749.

[13] ALLEN M M, DOUDS J J, LIANG S X, *et al*. An immunohistochemical analysis of stathmin 1 expression in uterine smooth muscle tumors: differential expression in leiomyosarcomas and leiomyomas[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 2795-2801.

[14] CHUANG T D, KHORRAM O. Mechanisms underlying aberrant expression of miR-29c in uterine leiomyoma[J]. Fertil Steril, 2016, 105(1): 236-245.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.020.

[15] NAMKUNG J, KANG S Y, CHUNG Y J, *et al*. Multidisciplinary approach in large-sized submucosal myoma: hysteroscopic myomectomy after uterine artery embolization[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2019, 26(4): 643-647. DOI: 10.1016/j.jmig.2018.06.016.

[16] 刘文博, 封全灵. 孕激素对子宫肌瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2019, 29(4): 20-21. DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2019.04.009.
LIU W B, FENG Q L. Effects of progesterone on proliferation and apoptosis of uterine fibroids [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 29(4): 20-21. DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2019.04.009.

[17] 林薇, 马莎, 王莉. MLCK 和 FAP 表达量与子宫肌瘤细胞增殖、侵袭相关性的研究[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(12): 1661-1663, 1667. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20170627.001.
LIN W, MA S, WANG L. Study on the correlation of MLCK and FAP expression with uterine fibroid cell proliferation and invasion[J]. J Hainan Med Univ, 2017, 23(12): 1661-1663, 1667. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20170627.001.

[18] LI X Y, WANG L L, LI T J, *et al*. STMN1 overexpression correlates with biological behavior in human cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2015, 211(11): 816-823. DOI: 10.1016/j.prp.2015.07.009.

[19] WANG F, WANG L X, LI S L, *et al*. Downregulation of stathmin is involved in malignant phenotype reversion and cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(7): 704-715. DOI: 10.1002/jso.21870.

[20] ALLI E, YANG J M, HAIT W N. Silencing of stathmin induces tumor-suppressor function in breast cancer cell lines harboring mutant p53[J]. Oncogene, 2007, 26(7): 1003-1012. DOI: 10.1038/sj.onc.1209864.

[21] WANG J W, YAO Y L, MING Y, *et al*. Downregulation of stathmin 1 in human gallbladder carcinoma inhibits tumor growth in vitro and in vivo[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28833. DOI: 10.1038/srep28833.

[22] NARAYAN S, WILSON S H. Kinetic analysis of Sp1-mediated transcriptional activation of the human DNA polymerase beta promoter [J]. Oncogene, 2000, 19(41): 4729-4735. DOI: 10.1038/sj.onc.1203823.

[23] VALDEZ L, GIORELLO F, FEIJOO M, *et al*. Characterization of the kidney transcriptome of the long-haired mouse Abrothrix hirta (Rodentia, Sigmodontinae) and comparison with that of the olive mouse A. olivacea[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0121148. DOI: 10.1371/journal.pone.0121148.

[24] KANG D, ZUO W R, WU Q X, *et al*. Inhibition of specificity protein 1 is involved in phloretin-induced suppression of prostate cancer [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1358674. DOI: 10.1155/2020/1358674.

[25] LIU X L, CHEN R W, LIU L J. SP1-DLEU1-miR-4429 feedback loop promotes cell proliferative and anti-apoptotic abilities in human glioblastoma[J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): BSR20190994. DOI: 10.1042/BSR20190994.

[26] GUO L, FANG L, LIU Y. SP1-regulated LINC01638 promotes proliferation and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(20): 8913-8920. DOI: 10.26355/eurrev_201910_19287.

(收稿:2022-01-13;修回:2022-03-24)
(编辑 王 红)