doi:10.11659/jjssx.11E019120

·基础研究·

调控 FOXM1 基因对乳腺癌 BT474 细胞赫赛汀药物敏感性的影响

谢 佳,曾春兰,王 俊,赵 攀 (重庆两江新区第一人民医院普外科,重庆 401121)

[摘 要] **目的** 探究调控叉头框转录因子 M1(FOXM1)基因对乳腺癌 BT474 细胞赫赛汀药物敏感性的影响。**方法** 将 FOXM1 过表达及特异性靶向 FOXM1 基因的小干扰 RNA(FOXM1-siRNA)转染至乳腺癌 BT474 细胞,将细胞分为上调 FOXM1 基因组、下调 FOXM1 基因组和对照组。Western blot 检测 FOXM1 蛋白以及 PI3K/AKT 信号通路蛋白的表达。MTT 法检测不同浓度赫赛汀药物对 BT474 细胞增殖能力的影响。Transwell 实验检测不同浓度赫赛汀药物对 BT474 细胞迁移、侵袭能力的影响。**结果** 下调 FOXM1 基因后,FOXM1 蛋白的相对表达量明显减少($P<0.05$)。上调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的增殖率、迁移数量、侵袭数量显著高于对照组,且随着赫赛汀浓度的增加其增殖率、迁移数量、侵袭数量逐渐增加,上调 FOXM1 基因可增强 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,促进增殖、迁移及侵袭。下调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的增殖率、迁移数量、侵袭数量显著低于对照组,低浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭能力的抑制过度,而中浓度的赫赛汀抑制能力介于低、高浓度之间,能够有效抑制 BT474 细胞增殖、迁移及侵袭,但无抑制过度的表现。不同赫赛汀浓度下下调 FOXM1 基因组细胞的增殖率、迁移数量、侵袭数量显著低于上调 FOXM1 基因组。下调 FOXM1 基因组 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白相对表达量均低于对照组和上调 FOXM1 基因组($P<0.05$)。**结论** 上调 FOXM1 基因可增强乳腺癌 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,下调 FOXM1 基因在中浓度赫赛汀的干预下,可通过作用于 PI3K/AKT 信号通路,抑制乳腺癌 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭,从而抑制乳腺癌的发展。

[关键词] FOXM1 基因;乳腺癌;BT474 细胞;赫赛汀;药物敏感性

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-11-06

Effect of FOXM1 gene regulation on Herceptin sensitivity in breast cancer BT474 cells

XIE Jia, ZENG Chun-lan, WANG Jun, ZHAO Pan (Department of General Surgery, First People's Hospital of Chongqing Liangjiang District, Chongqing 401121, China)

Abstract: Objective To explore the effect of fork-head box transcription factor M1 (FOXM1) gene regulation on Herceptin sensitivity in breast cancer BT474 cells. **Methods** FOXM1 and FOXM1-specific small interfering RNA (FOXM1-siRNA) targeting FOXM1 gene were transfected into breast cancer BT474 cells, and the cells were divided into the up-regulation of FOXM1 genome, the down-regulation of FOXM1 genome, and the control group. Western blot was used to detect the expression of FOXM1 protein and PI3K/AKT signaling pathway protein. MTT method was used to detect the proliferation of BT474 cells with different concentrations of Herceptin drugs. Transwell test was used to detect the migration and invasion of BT474 cells with different concentrations of Herceptin drugs. **Results** After down-regulation of FOXM1 gene, the relative expression of FOXM1 protein decreased significantly ($P<0.05$). The proliferation rate, migration quantity and invasion quantity of BT474 cells in the up-regulation of FOXM1 genome were significantly higher than those of the control group. With the increase of Herceptin concentration, the proliferation rate, migration quantity and invasion quantity increased gradually. Up-regulated FOXM1 gene could enhance the resistance of BT474 cells to Herceptin, and promote the proliferation, migration and invasion. The proliferation rate, migration quantity and invasion quantity of BT474 cells in the down regulated FOXM1 genome were significantly lower than those in the control group. The inhibition degree of low concentration Herceptin on the proliferation, migration and invasion of BT474 cells was weak. The inhibition degree of high concentration Herceptin on the proliferation, migration and invasion of BT474 cells was excessive. Meanwhile, the inhibition degree of medium concentration Herceptin was between low and high concentration Herceptin, which could effectively inhibit the proliferation, migration and invasion of BT474 cells without over inhibition. The proliferation rate, migration quantity and invasion quantity of the down regulated FOXM1 cells were significantly lower than those of the up-regulated FOXM1 cells at different Herceptin concentrations. The relative expression of PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt protein in down-regulated FOXM1 genome was lower than those in the control group and up-regulated FOXM1 genome ($P<0.05$). **Conclusion** Up-regulation of FOXM1 gene can enhance the resistance of BT474 cells to Herceptin.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972891)

[通信作者] 赵 攀,E-mail:574534972@qq.com

Down-regulation of FOXM1 genecan inhibits the proliferation, migration and invasion of BT474 cells by acting on PI3K/Akt signal pathway under the intervention of medium concentration Herceptin, thus inhibiting the development of breast cancer.

Keywords: FOXM1 gene; breast cancer; BT474 cells; Herceptin; drug sensitivity

乳腺癌是一种在女性中常见的恶性肿瘤,随着社会的快速发展,乳腺癌的发病率逐渐升高,且发病人群逐渐趋于年轻化,严重影响女性人群的生活质量[1-3]。FOXM1 属于 FOX 基因家族中的一员,参与多种恶性肿瘤的发生,在肿瘤患者中呈高表达状态[4]。有研究表明,FOXM1 在乳腺癌、胃癌、前列腺癌等恶性肿瘤中的表达均高于正常人[4]。临床上乳腺癌常采用化学治疗,其中赫赛汀为常用一线药物,但目前对于赫赛汀具体的使用剂量无明确的定论,不同研究使用的剂量也有所不同[5-7]。本研究通过调控 FOXM1 基因,探究其对乳腺癌 BT474 细胞赫赛汀药物敏感性的影响,以期为乳腺癌的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌 BT474 细胞购自上海泽业生物科技有限公司。主要试剂:赫赛汀,购自 Genentech 罗氏子公司基因泰克(国药准字 J20110020);兔抗大鼠 FOXM1 抗体购自 Proteintech 中国公司,小鼠抗大鼠 PI3K、p-PI3K抗体、兔抗人 AKT、p-AKT 抗体均购自上海陶素生化科技有限公司,MTT 试剂盒、Transwell 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司;PBS 缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的乳腺癌 BT474 细胞取出后,快速采用 40 ℃的温度火浴,迅速摇晃均匀至融化,加入 2 mL 的完全培养基(10% PBS,10% ~15% 的 56 mL胎牛血清,1% 的 5.56 mL 青链霉素,500 mL RPMI 1640 培养基),1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,使用完全培养基重悬,传代至培养瓶中,培养体系为5 mL,置于 CO_2 培养箱中培养(饱和湿度95%、温度 37 ℃、CO_2 浓度 5%),第 2 天换液,当培养瓶中细胞融合率达到 80% ~90% 时进行传代。

1.2.2 转染及分组 构建 FOXM1 过表达、FOXM1-shRNA 质粒,取对数的生长期乳腺癌 BT474 细胞,每孔中大约 20×10^4 个 BT474 细胞,接种于 6 孔板中,对其进行培养,培养 24 h 后,按照转染试剂说明书将 100 nmol/L FOXM1、100 nmol/L FOXM1-siRNA 及 RPMI 1640 培养液 3 组中均加入 BT474 细胞进行转染。转染后继续培养 48 h,提取细胞蛋白。按转染物的不同,将细胞分为上调 FOXM1 基因组(转染 FOXM1)、下调 FOXM1 基因(转染 FOXM1-siRNA)和对照组(加入等体积空载体质粒)。

1.2.3 Western blot 检测 FOXM1 蛋白的表达 将采集到的细胞,使用 PBS 缓冲液清洗 3 遍以上,分离缓冲液,加入 IP 细胞裂解液,裂解处理 35 min,之后提取总蛋白,BCA 测定蛋白浓度。每孔加入 20 μg 蛋白,通过 10% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白缓冲液 100 V 恒压,电泳 120 min,350 mA 恒流,电转 90 min,之后再将电转膜浸泡在 10% 的牛奶中,37 ℃环境下的摇床上封闭 1.5 h;与一抗结合,加入 TBST 按 1∶1 000 稀释 FOXM1 和 β-actin 一抗,在 4 ℃的环境下孵育过夜保存;24 h 后用 TBST 缓冲液清洗,与二抗结合在室温下孵育 1 h,再次用 TBST 缓冲液反复清洗。最后加入显影剂将其浸在底物溶液中进行显色,严格按照显影定影试剂盒操作说明书进行。

1.2.4 不同浓度赫赛汀药物干预 细胞转染 48 h 后,收集细胞制成细胞悬液,将细胞按照每孔 2.0×10^4 (100 μL),接种于 96 孔板中,培养细胞过夜后,基于前期预实验的趋势各加入 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L低、中、高浓度的赫赛汀,置于恒温 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,吸取各孔内的培养液,对照组使用 0.1% 的 DMSO 完全培养液培养,上调 FOXM1 基因组、下调 FOXM1 基因组分别使用不同浓度的赫赛汀进行培养。

1.2.5 MTT 法检测不同浓度赫赛汀对 BT474 细胞增殖能力的影响 待所有细胞组培养到相应的时间后,在每孔中加入 MTT 20 μL 继续孵育 4 h,将上清液仔细吸取,然后在孔中加入 150 μL 的 DMSO,振荡 10 s,采用酶标仪测定波长为 570 mm 的细胞组 OD 值,按照肿瘤细胞增殖率计算公式,增殖率 =(细胞组 OD 值/参照值 -1) ×100%,计算 BT474 细胞的增殖率。

1.2.6 细胞划痕实验 将乳腺癌 BT474 细胞接种到 18 孔板中,待细胞增长到 90% 时,使用 100 μL 的枪头,垂直划出 3 条直线。之后经过 PBS 缓冲液清洗 2 ~3 次,分别加入 0.5% 的完全培养基培养 24 h 后使用倒置显微镜观察各组细胞的迁移变化。

1.2.7 Transwell 实验检测不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的侵袭能力 将处于对数生长期的

BT474 细胞取出,调整细胞密度为 3×10^5/mL,并使用浓度为 1% 的完全培养基重悬细胞,将 100 μL 的细胞悬液加入每个小室中。在培养板上放入 Transwell 小室,加入无血清培养基,静置 30 min 后使基质胶再水化。向 Transwell 小室中加入细胞悬液,混合血清培养基在饱和湿度环境下培养 24 h,之后进行染色处理,将其取出用 PBS 缓冲液漂洗,使用多聚甲醛将其固定后采用结晶紫染色法进行染色,每组均染色 15 min,最后用 PBS 漂洗 3 次。使用显微镜对随机选取的 5 个小孔视野拍照,每组进行 3 次细胞数目统计。

1.2.8 适宜赫赛汀浓度下 PI3K/AKT 信号通路蛋白检测 使用 Western blot 对 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白进行检测,方法同 1.2.3。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件包对数据进行统计学处理。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,3 组间比较采用 F 值检验,两组间比较采用独立样本 t 检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜下 BT474 细胞转染 FOXM1 过表达和 FOXM1-siRNA 效果

BT474 细胞成功转染 FOXM1 过表达和 FOXM1-siRNA 的荧光质粒以及空载荧光质粒。显微镜下观察转染效率达到 60% 以上(图 1)。

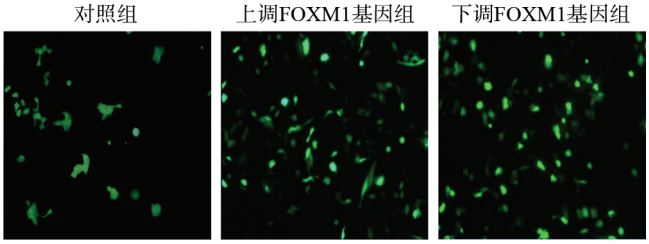
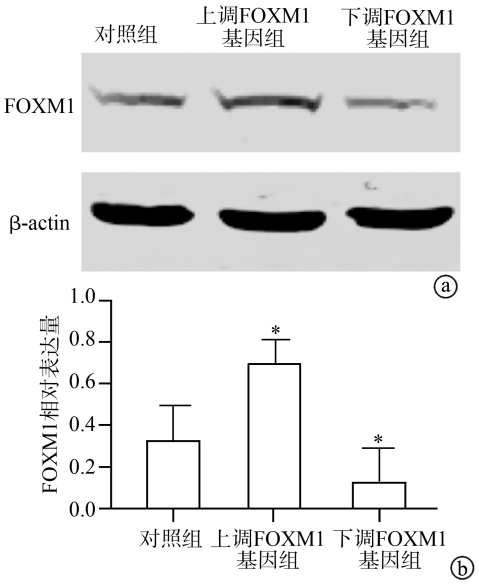


图 1 荧光显微镜下 BT474 细胞与 BT474 细胞成功转染 FOXM1 及 FOXM1-siRNA 图(×200)

2.2 干预 FOXM1 基因后 FOXM1 蛋白相对表达量比较

上调 FOXM1 基因组中 FOXM1 蛋白的相对表达量明显增高,是对照组的 1.5 倍,而下调 FOXM1 基因组中 FOXM1 蛋白的相对表达量明显减少,是对照组的 30%,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



*:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 对照组、上调 FOXM1 基因组和下调 FOXM1 基因组 FOXM1 蛋白相对表达量比较

2.3 不同浓度赫赛汀对 BT474 细胞增殖能力的影响

上调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的增殖率显著高于对照组,且随着赫赛汀浓度的增加增殖率逐渐增加,上调 FOXM1 基因可增强 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,促进增殖(图 3)。下调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的增殖率显著低于对照组,低浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖能力的抑制过度,而中浓度的赫赛汀增殖抑制能力介于低、高浓度之间,能够有效地抑制 BT474 细胞增殖,但无抑制过度的表现。不同赫赛汀浓度下,下调 FOXM1 基因组细胞的增殖率显著低于上调 FOXM1 基因组。

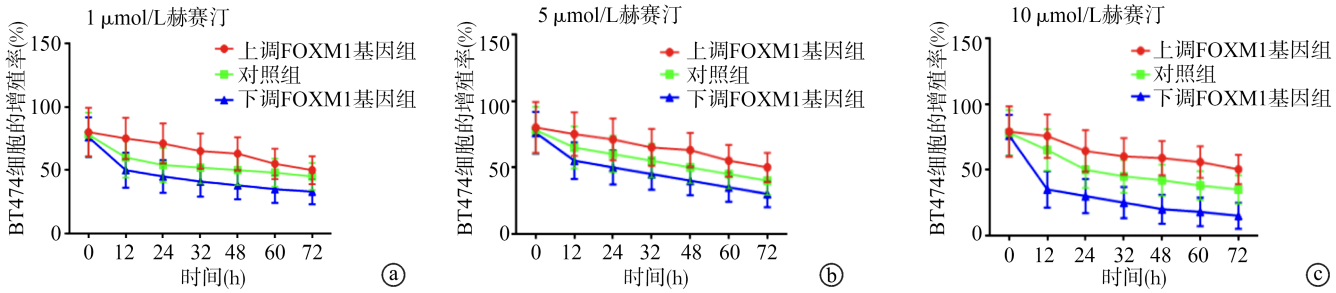


图 3 不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的增殖能力比较

2.4 不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的迁移能力比较

上调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的迁移数量显著多于对照组,且随着赫赛汀浓度的增加迁移数量逐渐增加,上调 FOXM1 基因可增强 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,促进迁移(图 4)。下调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的迁移数量显著少于对照组,低浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的迁移能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的迁移能力的抑制过度,而中浓度的赫赛汀对细胞迁移的影响介于低、高浓度之间,能够有效地抑制 BT474 细胞迁移,无抑制过度的表现。不同赫赛汀浓度下,下调 FOXM1 基因组细胞的迁移数量显著低于上调 FOXM1 基因组。

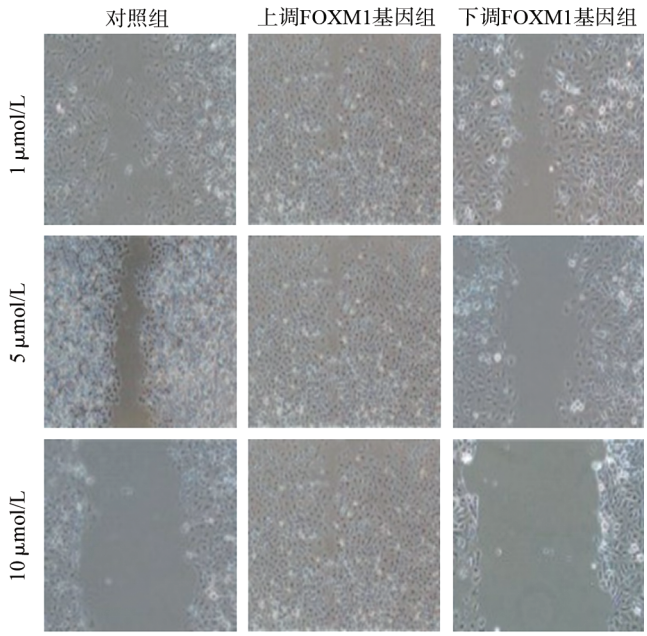


图 4 不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的迁移能力比较

2.5 不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的侵袭能力比较

上调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的侵袭数量显著多于对照组,且随着赫赛汀浓度的增加侵袭数量逐渐增加,上调 FOXM1 基因可增强 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,促进侵袭(图 5)。下调 FOXM1 基因组 BT474 细胞的侵袭数量显著少于对照组,低浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的侵袭能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的侵袭能力的抑制过度,而中浓度的赫赛汀对细胞侵袭能力介于低、高浓度之间,能够有效地抑制 BT474 细胞侵袭,无抑制过度的表现。不同赫赛汀浓度下下调 FOXM1 基因组细胞的侵袭数量显著少于上调 FOXM1 基因组。

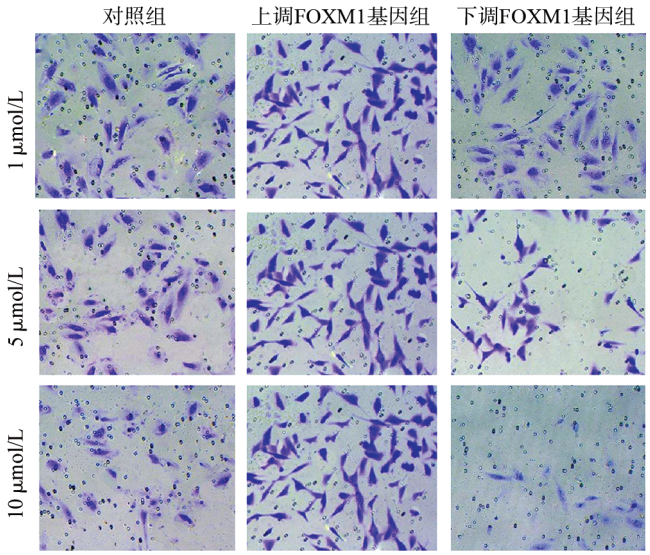
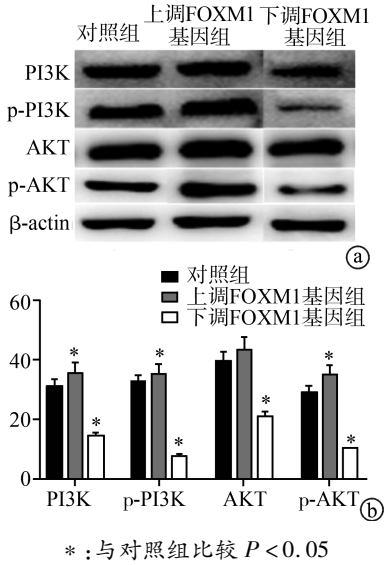


图 5 不同浓度赫赛汀药物下 BT474 细胞的侵袭能力比较

2.6 适宜赫赛汀浓度下 3 组 PI3K/AKT 信号通路蛋白相对表达量比较

基于上述研究结果,低浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭能力的抑制过度,而中浓度的赫赛汀的抑制能力介于低、高浓度之间,能够有效地抑制 BT474 细胞增殖、迁移及侵袭,无抑制过度的表现。因此,使用 5 μmol/L 赫赛汀抑制癌细胞的增殖、迁移及侵袭为适宜浓度,既能抑制但又无抑制过度的表现。因此在 5 μmol/L 赫赛汀浓度下检测 3 组 PI3K/AKT 信号通路蛋白相对表达量。下调 FOXM1 基因组 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白相对表达量均低于对照组和上调 FOXM1 基因组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 6。



*:与对照组比较 $P<0.05$

图 6 适宜赫赛汀浓度下 3 组 PI3K/AKT 信号通路蛋白相对表达量比较

3 讨论

FOXM1 在乳腺癌患者中呈现出异常表达,参与乳腺癌的发生和发展,可能是乳腺癌分子治疗的新靶点[8-9]。赫赛汀作为靶向治疗乳腺癌的药物之一,其应用剂量暂无明确的规定,不同浓度的赫赛汀对乳腺癌细胞的影响不同[10-12]。本研究通过调控 FOXM1 基因,建立上调基因组和下调基因组,对比研究上调和下调 FOXM1 基因,在赫赛汀的不同浓度下对乳腺癌 BT474 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。

本研究选取乳腺癌 BT474 细胞作为研究对象,分别转染 FOXM1 和 FOXM1-siRNA,分为上调 FOXM1 基因组和下调 FOXM1 基因组,并设置正常乳腺癌 BT474 细胞对照组,运用不同浓度的赫赛汀进行干预,探究调控 FOXM1 基因对乳腺癌 BT474 细胞赫赛汀药物敏感性的作用。有研究表明,FOXM1 蛋白在乳腺癌患者中的表达显著高于健康人群[13-14]。本研究建立上调 FOXM1 基因组和下调 FOXM1 基因组后,对其 FOXM1 蛋白水平进行检测,结果显示,与对照组相比,上调 FOXM1 基因组细胞 FOXM1 蛋白的水平显著升高,下调 FOXM1 基因组 FOXM1 蛋白水平显著降低,说明下调 FOXM1 基因可有效抑制 FOXM1 蛋白的表达,与临床上多项研究中,调控 FOXM1 基因可对 FOXM1 蛋白的高表达进行抑制的研究一致[15-16]。有多项研究表明,对乳腺癌患者使用不同浓度的赫赛汀进行干预治疗,患者效果不一,临床对于赫赛汀的使用剂量尚无统一的标准[17-19]。本研究中,设置 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L 3 个浓度,分别对上调 FOXM1 基因组、下调 FOXM1 基因组进行干预,探讨其对不同浓度下乳腺癌细胞增殖率的影响。结果显示,不同浓度下下调 FOXM1 基因组的细胞增殖率均低于对照组及上调 FOXM1 基因组。有研究对 FOXM1 基因进下调,检测下调 FOXM1 基因对乳腺癌细胞增殖的影响,结果显示,下调 FOXM1 基因能够有效抑制乳腺癌细胞增殖,抑制乳腺癌的恶化,起到抵抗癌细胞增殖的作用,本研究中下调 FOXM1 基因能够抑制乳腺癌 BT474 细胞增殖的研究结果与之一致[20-21]。另外本研究对不同浓度赫赛汀下 3 组细胞迁移、侵袭能力进行检测,结果显示,下调 FOXM1 基因组在不同浓度赫赛汀作用下乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力均低于上调 FOXM1 基因组和对照组,与临床上多项研究中,通过调控 FOXM1 基因能够有效抑制乳腺癌细胞迁移、侵袭能力的研究结果一致[22-23]。

本研究使用不同浓度的赫赛汀对细胞进行培养干预,结果显示,低浓度的赫赛汀对乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力的抑制程度较弱,高浓度的赫赛汀对乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力出现抑制过度,而中浓度抑制作用介于低、高浓度之间,能够有效地抑制乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭,无抑制过度的表现。说明使用 5 μmol/L 赫赛汀抑制癌细胞的增殖、迁移及侵袭为适宜浓度,既能抑制又无抑制过度的表现。有研究表明,使用不同浓度的赫赛汀对乳腺癌患者进行治疗,其适宜浓度能够有效抑制乳腺癌的恶化,治疗效果较为理想,本研究结果与之一致[24-26]。研究表明,PI3K/AKT 信号通路参与乳腺癌的发展,与乳腺癌细胞的迁移、侵袭有明显的相关性[27-29]。乳腺癌患者中 PI3K/AKT 信号通路蛋白 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 表达水平显著升高[30-33]。本研究采用 5 μmol/L 赫赛汀干预乳腺癌 BT474 细胞,并对 PI3K/AKT 信号通路蛋白进行检测,结果显示,下调 FOXM1 基因组 PI3K/AKT 信号通路中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的表达水平均显著低于上调 FOXM1 基因组及对照组,说明下调 FOXM1 基因组在适宜赫赛汀浓度下能够有效调节 PI3K/AKT 信号通路,从降低 PI3K/AKT 信号通路蛋白水平,达到抑制乳腺癌发展的目的。

综上所述,上调 FOXM1 基因可增强乳腺癌 BT474 细胞对赫赛汀的耐药性,下调 FOXM1 基因在 5 μmol/L 赫赛汀的干预下,可通过作用于 PI3K/AKT 信号通路,抑制乳腺癌 BT474 细胞的增殖、迁移及侵袭,从而抑制乳腺癌的发展。

[参考文献]

[1] Carvalho MI, Silva-Carvalho R, Pires I, et al. A Comparative approach of tumor-associated inflammation in mammary cancer between humans and dogs[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 4917387. doi: 10.1155/2016/4917387.

[2] Nguyen NM, de Oliveira Andrade F, Jin L, et al. Maternal intake of high n-6 polyunsaturated fatty acid diet during pregnancy causes transgenerational increase in mammary cancer risk in mice[J]. Breast Cancer Res, 2017, 19(1): 77. doi: 10.1186/s13058-017-0866-x.

[3] Waters DJ, Kengeri SS, Maras AH, et al. Life course analysis of the impact of mammary cancer and pyometra on age-anchored life expectancy in female Rottweilers: Implications for envisioning ovary conservation as a strategy to promote healthy longevity in pet dogs[J]. Vet J, 2017, 224: 25-37. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.05.006.

[4] Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, et al. FOXM1 transcriptionally regulates expression of integrin β1 in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 163(3): 485-493. doi: 10.1007/s10549-017-4207-7.

[5] Xue YJ, Xiao RH, Long DZ, et al. Overexpression of FOXM1 is associated with tumor progression in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. J Transl Med, 2012, 24(10): 200. doi: 10.1186/1479-5876-10-200.

[6] Liu L, Wu J, Guo Y, et al. Overexpression of FOXM1 predicts poor prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Aging (Albany NY),

2018,10(12):4120-4140. doi:10.18632/aging.101706.

[7] Cameron D,Piccart-Gebhart MJ,Gelber RD,et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial[J]. Lancet,2017,89(10075):1195-1205. doi:10.1016/S0140-6736(16)32616-2.

[8] Ring A,Nguyen C,Smbatyan G,et al. CBP/β-Catenin/FOXM1 is a novel therapeutic target in triple negative breast cancer[J]. Cancers (Basel),2018,10(12):525. doi:10.3390/cancers10120525.

[9] Izumi T,Imai J,Yamamoto J,et al. Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FOXM1 activation[J]. Nat Commun,2018,9(1):5300. doi:10.1038/s41467-018-07747-0.

[10] Kast K,Schoffer O,Link T,et al. Trastuzumab and survival of patients with metastatic breast cancer[J]. Arch Gynecol Obstet,2017,296(2):303-312. doi:10.1007/s00404-017-4421-x.

[11] Stebbing J,Baranau Y,Baryash V,et al. CT-P6 compared with reference trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a randomised,double-blind,active-controlled,phase 3 equivalence trial[J]. Lancet Oncol,2017,18(7):917-928. doi:10.1016/S1470-2045(17)30434-5.

[12] Rodallec A,Sicard G,Giacometti S,et al. From 3D spheroids to tumor bearing mice:efficacy and distribution studies of trastuzumab-docetaxel immunoliposome in breast cancer[J]. Int J Nanomedicine,2018,23(13):6677-6688. doi:10.2147/IJN.S179290.

[13] Ferrer CM,Lu TY,Bacigalupa ZA,et al. O-GlcNAcylation regulates breast cancer metastasis via SIRT1 modulation of FOXM1 pathway[J]. Oncogene,2017,36(4):559-569. doi:10.1038/onc.2016.228.

[14] Khongkow P,Gomes AR,Gong C,et al. Paclitaxel targets FOXM1 to regulate KIF20A in mitotic catastrophe and breast cancer paclitaxel resistance[J]. Oncogene,2016,35(8):990-1002. doi:10.1038/onc.2015.152.

[15] Song X,Fiati Kenston SS,Zhao J,et al. Roles of FOXM1 in cell regulation and breast cancer targeting therapy[J]. Med Oncol,2017,34(3):41. doi:10.1007/s12032-017-0888-3.

[16] Lee JH,Lee HJ,Sim DY,et al. Apoptotic effect of lambertianic acid through AMPK/FOXM1 signaling in MDA-MB231 breast cancer cells[J]. Phytother Res,2018,32(9):1755-1763. doi:10.1002/ptr.6105.

[17] Stefanou D,Kokkali S,Tripodaki ES,et al. Subcutaneous trastuzumab combined with pertuzumab and docetaxel as first-line treatment of advanced HER2-positive breast cancer[J]. Anticancer Res,2018,38(11):6565-6569. doi:10.21873/anticanres.13023.

[18] Arciniegas Calle MC,Sandhu NP,Xia H,et al. Two-dimensional speckle tracking echocardiography predicts early subclinical cardiotoxicity associated with anthracycline-trastuzumab chemotherapy in patients with breast cancer[J]. BMC Cancer,2018,18(1):1037. doi:10.1186/s12885-018-4935-z.

[19] Christodoulou C,Oikonomopoulos G,Koliou GA,et al. Evaluation of the insulin-like growth factor receptor pathway in patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab[J]. Cancer Genomics Proteomics,2018,15(6):461-471. doi:10.21873/cgp.20105.

[20] Abdeljaoued S,Bettaieb L,Nasri M,et al. Forkhead box M1 (FOXM1) expression predicts disease free survival and may mediate resistance to chemotherapy and hormonotherapy in male breast cancer[J]. Breast Dis,2018,37(3):109-114. doi:10.3233/BD-170315.

[21] Liu L,Shen H,Wang Y. CRY2 is suppressed by FOXM1 mediated promoter hypermethylation in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2017,490(1):44-50. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.003.

[22] Rinaldetti S,Wirtz RM,Worst TS,et al. FOXM1 predicts overall and disease specific survival in muscle-invasive urothelial carcinoma and presents a differential expression between bladder cancer subtypes[J]. Oncotarget,2017,8(29):47595-47606. doi:10.18632/oncotarget.17394.

[23] Abdeljaoued S,Bettaieb I,Nasri M,et al. Overexpression of FOXM1 is a potential prognostic marker in male breast cancer[J]. Oncol Res Treat,2017,40(4):167-172. doi:10.1159/000458156.

[24] Yang N,Wang C,Wang Z,et al. FOXM1 recruits nuclear Aurora kinase A to participate in a positive feedback loop essential for the self-renewal of breast cancer stem cells[J]. Oncogene,2017,36(24):3428-3440. doi:10.1038/onc.2016.490.

[25] Liu Y,Liu YP,Liu JY,et al. Expression of FOXM1 and BCRP in invasive breast carcinoma of no special type and its prognosis significance[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi,2017,46(1):30-33. doi:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.01.007.

[26] Wolter P,Hanselmann S,Pattschull G,et al. Central spindle proteins and mitotic kinesins are direct transcriptional targets of MuvB,B-MYB and FOXM1 in breast cancer cell lines and are potential targets for therapy[J]. Oncotarget,2017,8(7):11160-11172. doi:10.18632/oncotarget.14466.

[27] Guerrero-Zotano A,Mayer IA,Arteaga CL. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression,drug resistance,and treatment[J]. Cancer Metastasis Rev,2016,35(4):515-524. doi:10.1007/s10555-016-9637-x.

[28] Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Treat Rev,2014,40(7):862-871. doi:10.1016/j.ctrv.2014.03.004.

[29] Ma Z,Liu X,Zhang Q,et al. Carvedilol suppresses malignant proliferation of mammary epithelial cells through inhibition of the ROSmediated PI3K/AKT signaling pathway[J]. Oncol Rep,2019,41(2):811-818. doi:10.3892/or.2018.6873.

[30] Sai J,Owens P,Novitskiy SV,et al. PI3K inhibition reduces mammary tumor growth and facilitates antitumor immunity and anti-PD1 responses[J]. Clin Cancer Res,2017,23(13):3371-3384. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2142.

[31] Li J,Ho WY,Tsang JY,et al. Expression of biomarkers in AKT pathway correlated with malignancy and recurrence in phyllodes tumors of the breast[J]. Histopathology,2018,74(4):567-577. doi:10.1111/his.13782.

[32] Xue M,Ji X,Xue C,et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancerby fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3β pathway in vivo and in vitro[J]. Biomed Pharmacother,2017,94:898-908. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.013.

(编辑:左艳芳)