doi:10.11659/jjssx.03E024143

·基础研究·

FOXM1上调ELK1介导铁死亡促进宫颈癌细胞顺铂耐药性

陆美荣[1],孙亮亮[1],王 彤[2] (1.西安国际医学中心医院妇科,陕西 西安 710000;2.榆林市第一医院药学部,陕西 榆林 719000)

[摘 要] **目的** 探讨FOXM1通过ELK1对宫颈癌细胞顺铂(DDP)耐药性的影响及其潜在机制。**方法** 生物信息学分析FOXM1和ELK1在宫颈癌组织中的表达;qPCR检测FOXM1和ELK1在宫颈癌细胞中的表达;双荧光素酶报告基因实验、ChIP实验验证二者结合情况。GSEA分析ELK1富集通路;*Pearson*相关性分析ELK1和抑制铁死亡关键基因的相关性。CCK-8检测细胞活力;PI染色及流式细胞术检测细胞凋亡情况。透射电镜观察线粒体形态变化;Lipid Peroxidation(MDA)Assay试剂盒检测丙二醛(MDA)含量;Werstern blot检测GPX4、SLC7A11、ACSL4蛋白表达。**结果** ELK1与FOXM1在宫颈癌组织和细胞中显著高表达,且二者存在结合位点。与oe-NC组相比,oe-ELK1组细胞存活率和IC_{50}值显著提高;而与si-NC组相比,si-ELK1组细胞存活率和IC_{50}值显著降低。与oe-NC+DMSO组相比,oe-ELK1+DMSO组线粒体没有出现萎缩、线粒体脊减少情况;而与oe-ELK1+DMSO组相比,oe-ELK1+erastin组线粒体出现了明显的萎缩、线粒体脊减少甚至消失现象。与oe-NC+DMSO组相比,oe-ELK1+DMSO组细胞内MDA含量显著降低,GPX4、SLC7A11蛋白表达增加,ACSL4蛋白表达降低,进一步用erastin处理则逆转了这一现象。与oe-NC+DMSO组相比,oe-ELK1+DMSO组CaSki/DDP细胞的IC_{50}值显著提高,而erastin处理能够减弱这一促进作用。此外,与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC组线粒体出现了明显的萎缩、线粒体脊减少甚至消失现象;而与si-FOXM1+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-ELK1组线粒体形态得到恢复。与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC组细胞内MDA含量显著提高,GPX4、SLC7A11蛋白表达显著降低,ACSL4蛋白表达显著提高;而与si-FOXM1+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-ELK1组细胞内MDA含量显著降低,GPX4、SLC7A11蛋白表达显著提高,ACSL4蛋白表达显著降低。与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC转染抑制了不同浓度DDP处理CaSki/DDP细胞的IC_{50}值,而同时oe-ELK1转染能够逆转这一抑制作用。**结论** FOXM1通过上调ELK1的表达介导铁死亡,进而促进宫颈癌细胞DDP耐药。

[关键词] FOXM1;ELK1;宫颈癌;铁死亡;顺铂耐药
[中图分类号] R737.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-03-26

FOXM1 mediates ferroptosis and promotes cisplatin resistance in cervical cancer cells by up-regulating ELK1

LU Mei-rong[1], SUN Liang-liang[1], WANG Tong[2] (1.Department of Gynecology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an Shaanxi 710000, China; 2.Department of Pharmacy, Yulin First Hospital, Yulin Shaanxi 719000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of FOXM1 on cisplatin (DDP) resistance in cervical cancer cells through ELK1. **Methods** The expressions of FOXM1 and ELK1 in cervical cancer tissues were analyzed by bioinformatics. The expressions of FOXM1 and ELK1 in cervical cancer cells were detected by qPCR. Double luciferase reporter gene experiment and ChIP experiment were performed to verify the combination of the two. ELK1 enrichment pathway was analyzed by GSEA. The correlation between ELK1 and the key genes of inhibiting ferroptosis was analyzed by *Pearson* correlation analysis. Cell viability was detected by CCK-8, and cell apoptosis was detected by PI staining and flow cytometry. The morphological changes of mitochondria were observed by transmission electron microscopy. Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit was used to detect the MDA content. The expressions of GPX4, SLC7A11 and ACSL4 were detected by Werstern blot. **Results** ELK1 and FOXM1 were highly expressed in cervical cancer tissues and cells, and and there were binding sites for them. Compared with the oe-NC group, the cell survival rate and IC_{50} value of the oe-ELK1 group were significantly increased. Compared with the si-NC group, the cell survival rate and IC_{50} value of the si-ELK1 group were significantly decreased. Compared with the oe-NC+DMSO group, mitochondrial atrophy and mitochondrial ridge reduction were not observed in the oe-ELK1+DMSO group. Compared with the oe-ELK1+DMSO group, it showed obvious mitochondriaatrophy, mitochondrial ridge reduction or even disappearance in the oe-ELK1+erastin group. Compared with the oe-NC+DMSO group, intracellular MDA content was significantly decreased, the expressions of GPX4 and SLC7A11 proteins were increased, and the expression of ACSL4 protein was decreased in the oe-ELK1+DMSO group. And the use of erastin had reversed the above phenomenon. Compared with the oe-NC+DMSO group, the IC_{50} value of CaSki/DDP cells in the oe-ELK1+DMSO group was significantly increased, while the use of erastin had reduced the facilitation. In addition, compared with the si-NC+oe-NC group, the si-FOXM1+oe-NC group showed obvious mitochondriaatrophy, mitochondrial ridge reduction or even disappearance.

[基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-223)
[通信作者] 王 彤,E-mail:117903681@qq.com

Compared with the si-FOXM1+oe-NC group, the mitochondrial morphology was restored in the si-FOXM1+oe-ELK1 group. Compared with the si-NC+oe-NC group, the intracellular MDA content in the si-FOXM1+oe-NC group was significantly increased, the expressions of GPX4 and SLC7A11 protein were decreased, and the expression of ACSL4 protein was increased. Compared with the si-FOXM1+oe-NC group, the intracellular MDA contentin the si-FOXM1+oe-ELK1 group was significantly decreased, and the expressions of GPX4 and SLC7A11 protein were increased, while the expression of ACSL4 protein was decreased. Compared with the si-NC+oe-NC group, the IC_{50} value of CaSki/DDP cells in the si-FOXM1+oe-NC group was significantly decreased. Meanwhile, oe-ELK1 transfection has reversed the inhibition effect. **Conclusion** FOXM1 can mediate ferroptosis by up-regulating the expression of ELK1, thus promoting DDP resistance in cervical cancer cells.

Keywords: FOXM1; ELK1; cervical cancer; ferroptosis; cisplatin resistance

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一，当前其治疗主要依赖顺铂（cisplatin，DDP）化疗方案，但有30%~40%的患者对治疗不完全响应，这归因于肿瘤耐药性的产生[1-2]。因此，提高宫颈癌细胞对DDP的敏感性迫在眉睫。铁死亡在各种生理病理过程（如组织稳态、癌症和神经变性等）中起着关键作用，其可能参与宫颈癌的发病机制，并可能是一个潜在的治疗靶点[3]。研究发现，DHODH抑制和PIN1调节等分子机制可通过特定途径（如mTOR和NRF2/GPX4）影响宫颈癌细胞的铁死亡和对DDP的敏感性[4-5]，表明铁死亡在肿瘤抑制中具有一定作用，为宫颈癌治疗提供了新的视角。然而，铁死亡与宫颈癌DDP耐药性之间的具体机制还需进一步明确。有报道称ELK1过表达可导致细胞内Fe^{2+}浓度下降，而下调Fe^{2+}浓度能够抑制癌细胞铁死亡[6-7]，这表明ELK1可能与癌细胞铁死亡进程有关。因此，本研究将探讨ELK1在宫颈癌组织中的表达及在DDP耐药宫颈癌细胞中的生物学作用，以期为克服宫颈癌DDP耐药性寻找有效的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

宫颈癌细胞系Hela、CaSki、C33A1以及人胚胎肾细胞系293T购自河南商城北纳创联生物科技有限公司，人宫颈上皮细胞系HcerEpic购自美国ATCC公司，RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司，DDP购自美国MedChemExpress公司。si-ELK1、oe-ELK1、si-FOXM1及其对应的阴性对照均购自上海吉凯基因公司。erastin、ferrostatin-1、ZVAD-FMK、necrosulfonamide试剂均购自美国MedChemExpress公司。Lipofectamine 3000试剂、TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司，SuperScript™ Ⅲ第一链合成系统购自美国Thermo Fisher公司，PowerUp™ SYBR™ Green预混液购自美国Applied BioSystems公司。FLUOstar Omega微孔板读数器购自德国BMG Labtech公司。BD Accuri C6流式细胞仪购自美国BD Biosciences公司。Model H-7650透射电子显微镜购自日本Hitachi公司。Lipid Peroxidation（MDA）Assay试剂盒、RIPA裂解缓冲液、SDS-PAGE均购自上海碧云天公司。PVDF膜、ECL试剂盒均购自美国Thermo Fisher公司。GPX4、SLC7A11、β-actin抗体和HRP标记的山羊抗兔IgG（H+L）二抗购自英国Abcam公司。ACSL4抗体购自美国Thermo Fisher公司。pmirGLO-ELK1报告载体由上海吉凯基因公司合成，Simple ChIP enzymatic chromatin IP kit购自Cell Signaling Technology公司，IP级anti-FOXM1抗体购自Invitrogen公司。

1.2 生物信息学分析

从TCGA数据库下载宫颈癌的mRNA表达量数据（正常样本：3；肿瘤样本：306），通过edgeR包进行差异分析，并结合文献引证确定研究的靶基因为ELK1。通过hTFtarget预测、*Pearson*相关性分析确定靶基因ELK1上游的转录因子FOXM1，然后通过JASPAR分析靶基因ELK1上游2 000 bp的motif结合位点。采用GSEA富集分析以及相关性分析研究ELK1影响宫颈癌的途径。

1.3 宫颈癌DDP耐药细胞的建立

宫颈癌细胞系（Hela、CaSki和C33A1）、人胚胎肾细胞系293T及人宫颈上皮细胞系HcerEpic在37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养。在含有浓度梯度增加的DDP培养基中培养建立CaSki/DDP和C33A1/DDP细胞系。

1.4 细胞转染和分组

加入试剂si-ELK1、oe-ELK1、si-FOXM1以及对应的阴性对照、铁死亡通路诱导剂erastin(10 μmol/L)和细胞铁死亡抑制剂（ferrostatin-1，1 μmol/L；ZVAD-FMK，10 μmol/L；necrosulfonamide，0.5 μmol/L）。将细胞预先接种到6孔板（3×10^5个/孔）中，根据Lipofectamine 3000说明书，将质粒转染至CaSki/DDP或C33A1/DDP细胞中，48 h后收集细胞用于后续实验。CaSki/DDP细胞分组：oe-NC组、oe-ELK1组；oe-NC+DMSO组、oe-ELK1+DMSO组、oe-ELK1+erastin组；

si-NC+oe-NC 组、si-FOXM1+oe-NC 组、si-FOXM1+oe-ELK1组。C33A1/DDP细胞分组:si-NC组、si-ELK1组。

1.5 qPCR

根据说明书,使用TRIzol试剂提取总RNA。使用Primer Express v2.0软件(Applied BioSystems,美国)设计引物,引物序列见表1。使用SuperScript™ Ⅲ第一链合成系统进行逆转录合成cDNA。使用PowerUp™ SYBR™ Green预混液进行实时qPCR。以β-actin作为内参基因,并通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达量。

表1 qPCR引物序列

基因	方向	序列
FOXM1	正向	5′-CGTCGGCCACTGATTCTCAAA-3′
	反向	5′-GGCAGGGGATCTCTTAGGTTC-3′
ELK1	正向	5′-GGCAGGGGATCTCTTAGGTTC-3′
	反向	5′-CTCCTGTGGAGGGACTTCTG-3′
β-actin	正向	5′-CGGCTACAGCTTCACCACCAC-3′
	反向	5′-GCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG-3′

1.6 CCK-8检测细胞活力

将宫颈癌细胞以2×10³个/孔的密度接种到96孔板中,分别在0、24、48、72 h向每孔中加入10 μL CCK-8试剂,共培养2 h后使用FLUOstar Omega微孔板读数器测定450 nm波长处的吸光度。使用不同浓度(0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 μmol/L)的DDP处理细胞48 h,检测吸光度并计算IC_{50}值,分析细胞的DDP耐药性。

1.7 细胞凋亡分析

将细胞以2×10³个/孔的密度接种到12孔板中,24 h后用不同试剂(ferrostatin-1,1 μmol/L;ZVAD-FMK,10 μmol/L;necrosulfonamide,0.5 μmol/L)处理细胞。48 h后收集细胞(包括漂浮的死细胞),用5 μg/mL PI染色,随后通过流式细胞仪FL2检测器分析PI阳性死细胞的占比。每孔至少分析1 000个单细胞,所有实验至少进行3次。

1.8 透射电镜

用2.5%戊二醛溶液固定细胞,4 ℃过夜。样品用分级系列的乙醇脱水,再用无水丙酮和Spurr树脂混合物渗透,随后包埋、超薄切片、染色。最后,在透射电子显微镜下观察样品。

1.9 丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平检测

使用Lipid Peroxidation(MDA)Assay试剂盒检测MDA含量以评估脂质过氧化水平。

1.10 Werstern blot

细胞在含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液中裂解。裂解物在4°C下以12 000 r/min离心5 min,并使用SDS-PAGE分离。将蛋白质转移到PVDF膜上,用5%牛奶封闭膜,然后与一抗在4 ℃下孵育过夜。随后将膜与HRP偶联的二抗一起孵育1 h。ECL试剂盒及化学发光成像系统检测蛋白条带。一抗:兔抗人GPX4、SLC7A11、ACSL4、β-actin;二抗:HRP标记的山羊抗兔IgG(H+L)。

1.11 双荧光素酶报告基因实验

将293T细胞接种到24孔板中,将pmirGLO-ELK1-promoter-WT和pmirGLO-ELK1-promoter-MUT荧光素酶报告载体、si-NC和si-FOXM1共转染到293T细胞中,培养48 h后测定荧光素酶活性。

1.12 ChIP实验

使用IP级anti-FOXM1抗体以及对应的Simple ChIP enzymatic chromatin IP kit进行染色质免疫共沉淀实验。使用iQ SYBR Green Supermix进行ChIP-PCR检测。引物序列:正向,5′-CTTCCAATGGGCACAGACCT-3′;反向,5′-CAGGGCAGCTCTACGGTTAG-3′。

1.13 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件和GraphPad 8.0软件对数据进行分析。计数资料(分类变量)以率(%)表示,组间比较采用χ^2检验。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

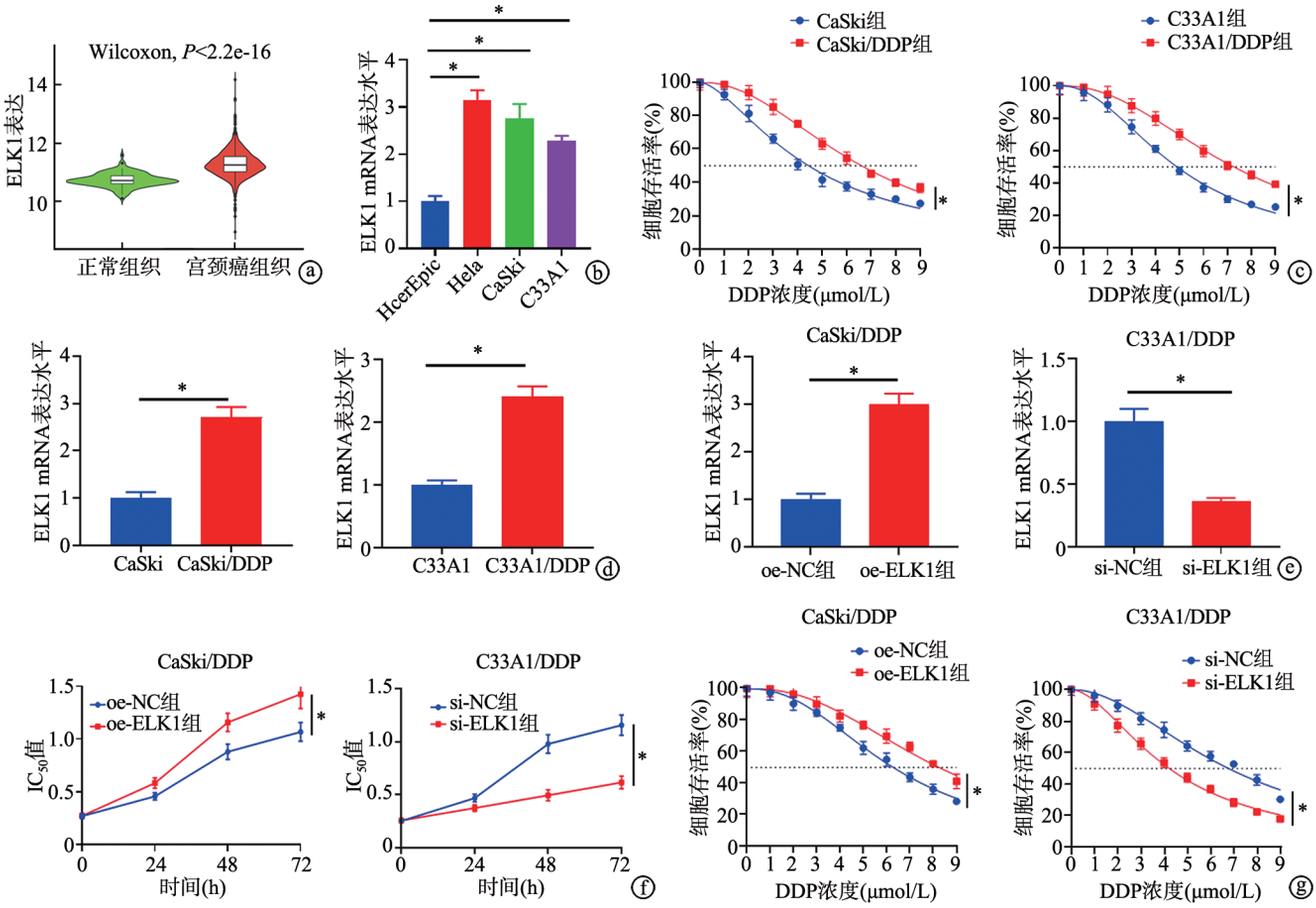
2 结果

2.1 ELK1在宫颈癌中特异性上调并促进DDP耐药

TCGA数据分析结果显示,与正常组织相比,ELK1在宫颈癌组织中高表达(图1a)。与HcerEpic相比,ELK1在宫颈癌细胞系(Hela、CaSki和C33A1)中显著高表达(图1b)。通过逐渐增加DDP浓度处理宫颈癌细胞(CaSki和C33A1)来构建宫颈癌DDP耐药细胞系,结果显示CaSki/DDP和C33A1/DDP细胞系构建成功(图1c)。与CaSki和C33A1细胞相比,CaSki/DDP和C33A1/DDP细胞表现出较高的ELK1表达水平(图1d)。与oe-NC组相比,oe-ELK1组CaSki/DDP细胞中ELK1表达显著提高;与si-NC组相比,si-ELK1组C33A1/DDP细胞中ELK1的表达显著降低(图1e)。此外,与oe-NC组相比,oe-ELK1组CaSki/DDP细胞存活率和IC_{50}值显著提高;而与si-NC组相比,si-ELK1组C33A1/DDP细胞存活率和IC_{50}值显著降低(图1f、g)。

2.2 ELK1介导铁死亡并促进宫颈癌DDP耐药

GSEA富集分析表明,ELK1能够富集在铁死亡相关通路上(图2a),且ELK1与抑制铁死亡的关键基因(GPX4、SLC7A11和SLC3A2)表达呈正相关(图2b)。PI染色及流式细胞术检测细胞凋亡情况发现,只有铁死亡抑制剂(ferrostatin-1)才能阻止敲低ELK1表达对



a:ELK1在正常组织和宫颈癌组织中的表达;b:ELK1在宫颈癌细胞系和人宫颈上皮细胞系中的表达;c:CaSki/DDP、C33A1/DDP细胞系构建情况;d:ELK1在DDP敏感和耐药细胞中的表达;e:敲低或过表达ELK1转染细胞后ELK1的表达;f:不同浓度DDP处理的各组宫颈癌细胞IC_{50}值;g:CCK-8检测细胞存活率 *:$P<0.05$

图1 ELK1在宫颈癌中特异性上调并促进DDP耐药

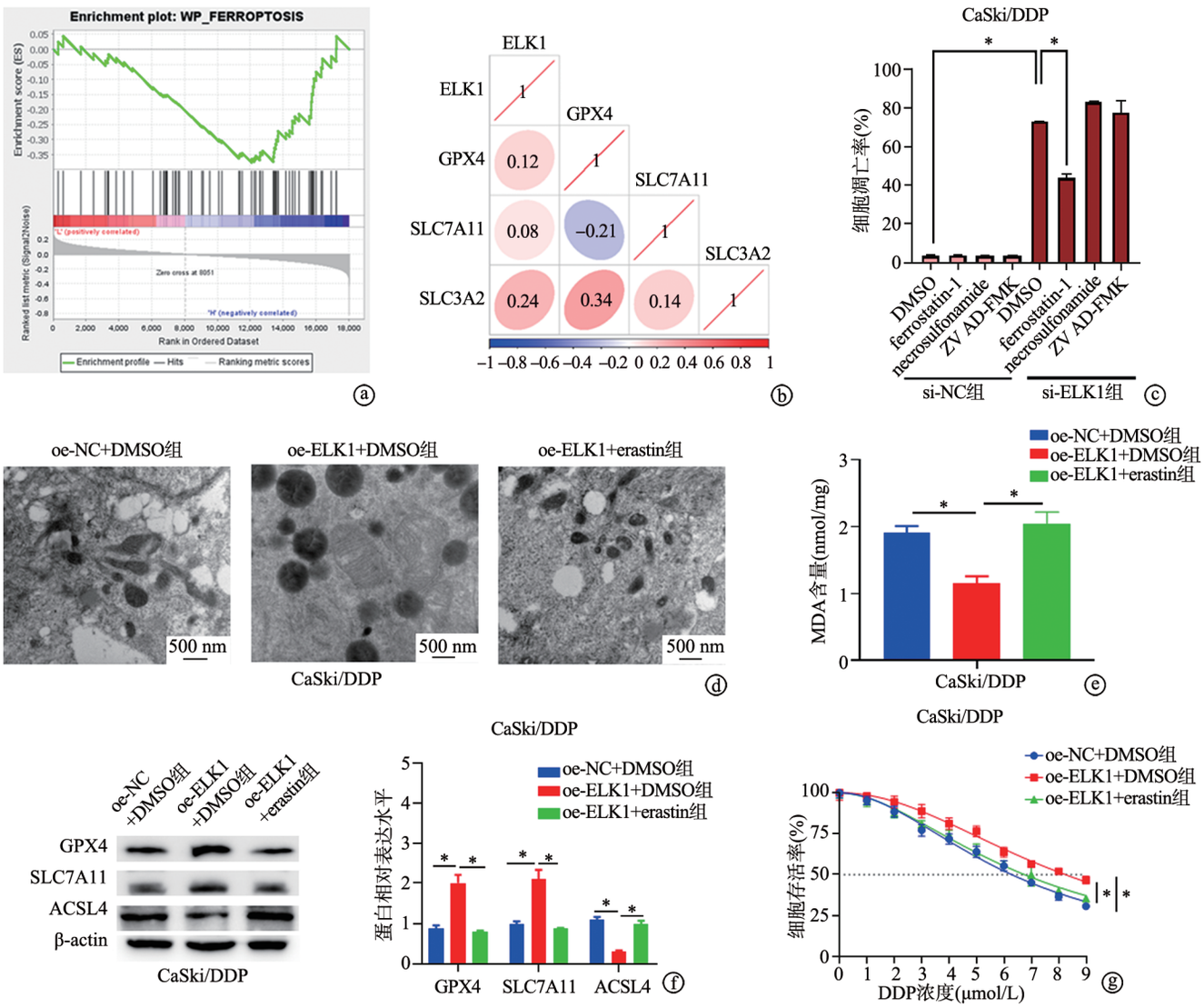
细胞凋亡的促进作用(图2c)。透射电镜观察线粒体形态变化,结果显示,与oe-NC+DMSO组相比,oe-ELK1+DMSO组线粒体没有出现萎缩、线粒体脊减少情况;而与oe-ELK1+DMSO组相比,oe-ELK1+erastin组线粒体出现了明显的萎缩、线粒体脊减少甚至消失现象(图2d)。随后检测MDA含量,结果显示,过表达ELK1显著降低了CaSki/DDP细胞内MDA含量,进一步用erastin处理则逆转了这一现象(图2e)。此外,过表达ELK1显著增加了GPX4、SLC7A11蛋白表达量,抑制了ACSL4蛋白表达量,进一步用erastin处理细胞后其表达水平恢复到对照水平(图2f)。与oe-NC+DMSO组相比,oe-ELK1+DMSO组CaSki/DDP细胞的IC_{50}值显著提高;而与oe-ELK1+DMSO组相比,oe-ELK1+erastin组CaSki/DDP细胞的IC_{50}值显著降低(图2g)。

2.3 转录因子FOXM1能够上调ELK1的表达

hTFtarget预测与*Pearson*相关性分析显示,FOXM1为ELK1的转录因子(图3a、b),并且JASPAR预测显示,FOXM1与ELK1上游2 000 bp存在motif结合位点(图3c)。Wilcoxon分析显示,FOXM1在宫颈癌组织中高表达(图3d)。qPCR检测宫颈癌细胞中FOXM1的表达也进一步证实了这一结果(图3e)。双荧光素酶和ChIP结果表明,敲低FOXM1能够下调ELK1-WT的荧光酶活性(图3f)。同样,与Anti-IgG相比,Anti-FOXM1能够显著提高ELK1的富集(图3g)。

2.4 FOXM1上调ELK1促进宫颈癌细胞DDP耐药性

与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC组细胞中ELK1的表达降低;而与si-FOXM1+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-ELK1组细胞中ELK1的表达升高(图4a)。与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC组细胞IC_{50}值显著降低;而与si-FOXM1+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-ELK1组细胞IC_{50}值显著升高(图4b)。透射电镜观察线粒体形态变化,结果显示,与si-NC+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-NC组细胞线粒体出现萎缩、线粒体脊减少甚至消失;而与si-FOXM1+oe-NC组相比,si-FOXM1+oe-ELK1组细胞线粒体形态



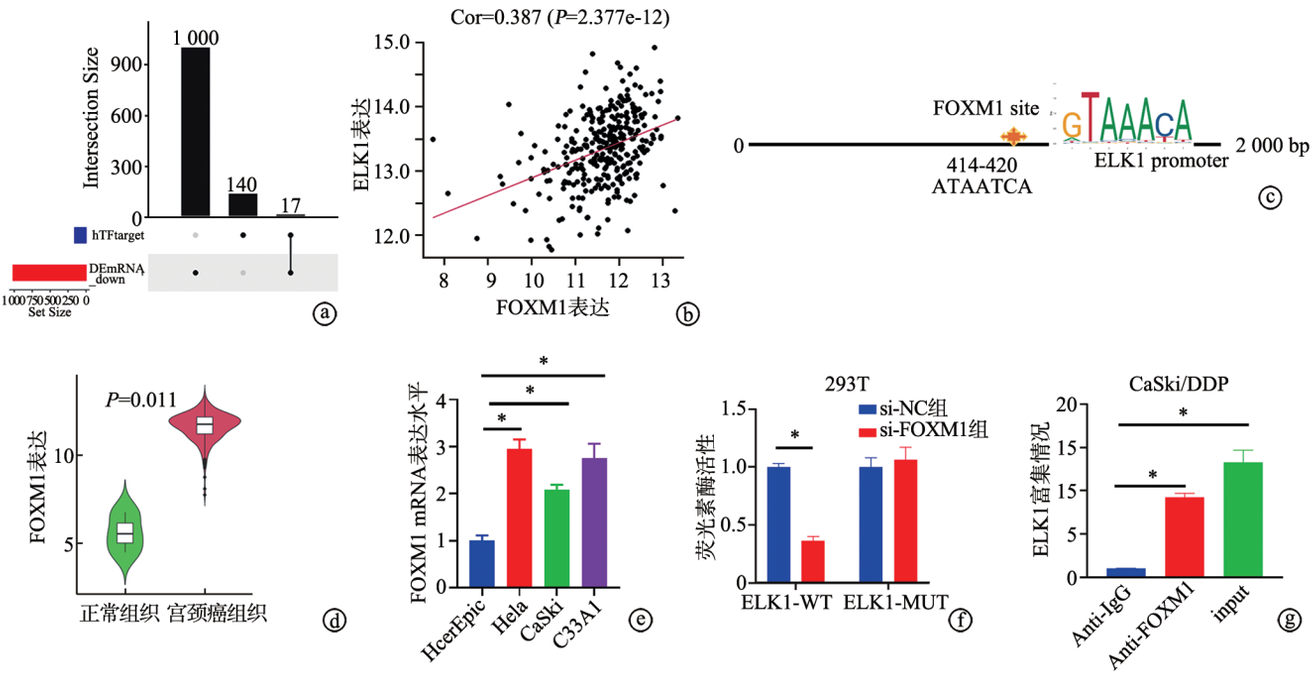
a:ELK1 富集在铁死亡通路上;b:ELK1 与铁死亡抑制基因呈正相关;c:不同处理组细胞凋亡情况;d:透射电镜观察线粒体形态变化;e:各组 CaSki/DDP 细胞中 MDA 含量比较;f:各组 CaSki/DDP 细胞中 GPX4、SLC7A11、ACSL4 表达比较;g:不同浓度 DDP 处理的各组宫颈癌细胞存活率 *:$P<0.05$

图 2 ELK1 抑制铁死亡并促进宫颈癌 DDP 耐药

得到恢复(图 4c)。MDA 含量检测结果显示,与 si-NC+oe-NC 组相比,si-FOXM1+oe-NC 组细胞内 MDA 含量显著提高;而与 si-FOXM1+oe-NC 组相比,si-FOXM1+oe-ELK1 组细胞内 MDA 含量显著降低(图 4d)。与 si-NC+oe-NC 组细胞相比,si-FOXM1+oe-NC 组细胞中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达显著降低,而 ACSL4 蛋白表达显著提高;与 si-FOXM1+oe-NC 组相比,si-FOXM1+oe-ELK1 组细胞中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达显著提高,而 ACSL4 蛋白表达显著降低(图 4e)。此外,与 si-NC+oe-NC 组相比,si-FOXM1+oe-NC 组 CaSki/DDP 细胞的存活率显著降低;而与 si-FOXM1+oe-NC 组相比,si-FOXM1+oe-ELK1 组 CaSki/DDP 细胞的存活率显著提高(图 4f)。

3 讨论

目前,对宫颈癌 DDP 耐药的机制研究主要包括药物摄入量降低、药物外流增加、谷胱甘肽或金属硫蛋白系统解毒功能增强、DNA 修复增强、细胞凋亡抑制及氧化应激等[8]。已有不少研究通过靶向上述机制的方式改善患者耐药,提高患者的化疗敏感性。最近的证据表明,诱导铁死亡可以提高肿瘤新辅助治疗的效果[9];DDP 通过引起宫颈癌细胞的铁死亡激活肿瘤相关巨噬细胞,进而达到有效杀伤肿瘤细胞的效果[10]。这表明诱导铁死亡可能是促进化疗敏感性的新策略。因此,需要阐明铁死亡影响宫颈癌细胞化疗耐药的潜在机制,为靶向铁死亡治疗宫颈癌提供新的理论支撑。



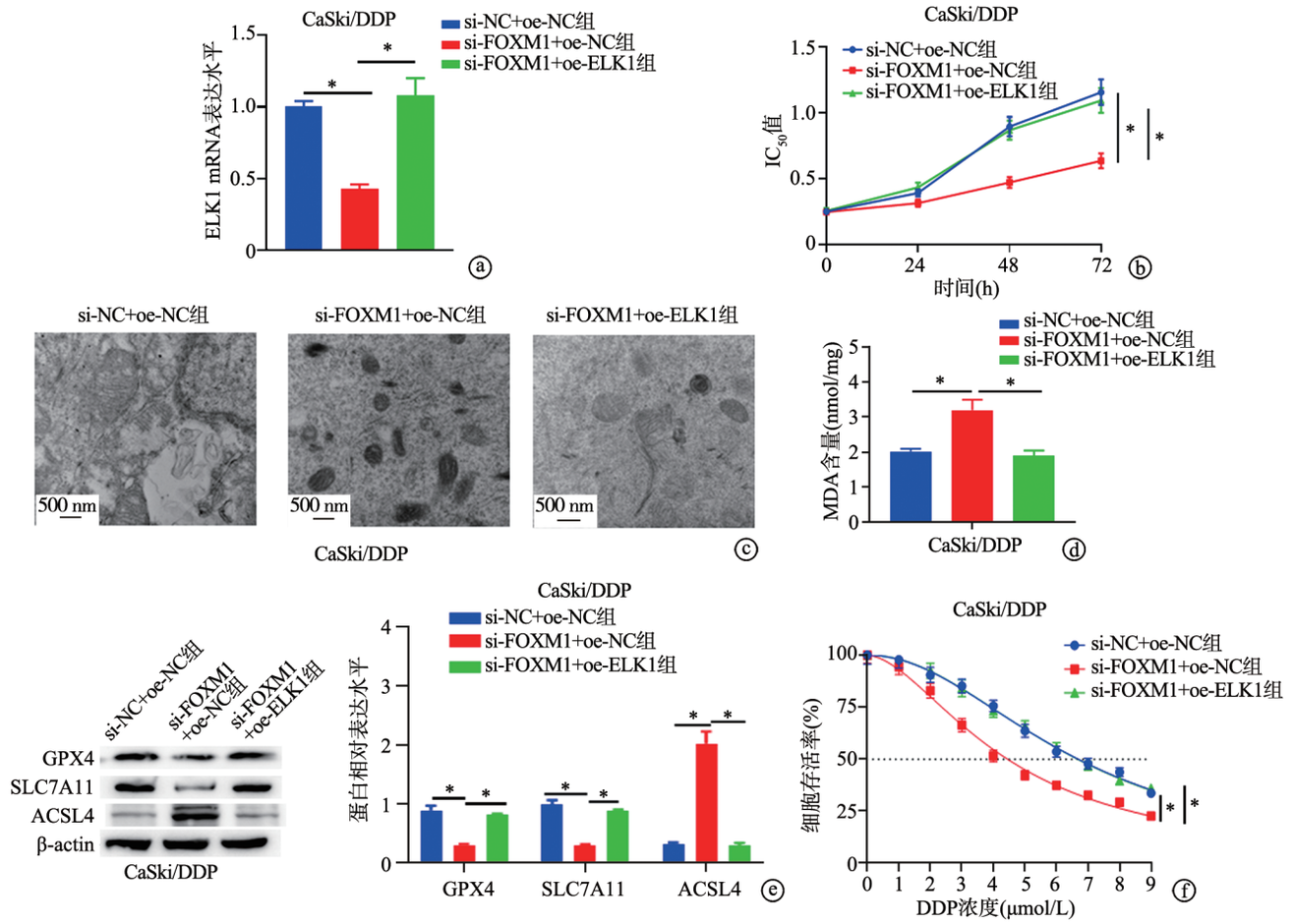
a:hTFtarget预测ELK1上游差异上调的转录因子;b:*Pearson*相关性分析FOXM1与ELK1表达的相关性;c:JASPAR预测FOXM1与ELK1上游2 000 bp存在motif结合位点;d、e:FOXM1在宫颈癌组织及细胞中的表达;f:双荧光素酶报告基因验证FOXM1与ELK1结合关系;g:ChIP验证FOXM1与ELK1结合关系 *:$P<0.05$

图3 FOXM1激活ELK1的转录

ELK1属于ETS家族的转录因子和三元复合因子亚家族成员,通过调节其启动子直接或通过蛋白质-蛋白质相互作用间接影响几种癌基因和肿瘤抑制基因的表达[11]。先前的研究报道了ELK1在肺癌组织中表达上调,敲低ELK1表达能够抑制肿瘤细胞迁移和侵袭,促进细胞凋亡[12];Ahmad等[13]的研究表明,ELK1在乳腺癌组织和细胞中表达上调,沉默hsa_circRPPH1_015可以上调miR-326的表达,下调ELK1的表达,从而抑制细胞的增殖、集落形成和侵袭能力;Li等[14]的研究表明ELK1可以与KIF26B的启动子区结合并激活其转录,进而促进前列腺癌细胞周期进展;上调miR-130b-5p可有效逆转ELK1过表达引起的细胞表型变化和体内肿瘤形成,进一步强调了miR-130b-5p/ELK1轴在宫颈癌进展中的关键作用[15]。此外,ELK1还参与多种癌症的DDP耐药性,如PTGER3高表达能够促进卵巢癌细胞生长、抑制细胞周期停滞和细胞凋亡,并能够通过上调Ras-MAPK/Erk-ETS1-ELK1/CFTR1轴提高卵巢癌细胞DDP耐药性[16];EGR1-CCL2反馈环可以激活CCR2-ERK-ELK1-EGR1通路,促进肿瘤血管生成,维持DDP耐药胃癌细胞的上皮-间充质转化[17];丹参酮Ⅰ具有抗癌作用,其通过抑制ELK1和下调KRAS-AKT轴抑制宫颈癌细胞的增殖和DDP耐药性[18]。本研究显示,ELK1在宫颈癌肿瘤组织和细胞系中显著高表达,这表明ELK1在肿瘤进展中发挥着致癌基因的作用,同时,ELK1能够抑制宫颈癌细胞铁死亡(降低MDA水平,促进GPX4、SLC7A11蛋白表达),并促进细胞DDP耐药性,提示ELK1在宫颈癌进展中起着重要作用,其可能成为宫颈癌治疗的新靶点,这与以往报道的ELK1参与多种癌症的DDP耐药性相一致。

进一步生物信息学分析发现,ELK1存在上游转录因子FOXM1,同时FOXM1能够结合ELK1启动子区域,并起到正向调控作用。FOXM1是叉头盒转录因子家族的重要成员之一,参与肿瘤进展的多个方面,包括肿瘤细胞的增殖、生长、血管生成、上皮-间充质转化等[19]。Zhu等[20]报道,m6A甲基转移酶KIAA1429通过稳定FOXM1的表达促进胃癌细胞对DDP的耐药性。本研究结果也发现FOXM1作为转录因子在宫颈癌中发挥着促癌作用,且沉默FOXM1能够抑制宫颈癌细胞对DDP的耐药性。Jiang等[21]报道,HNRNPA2B1介导的FOXM1的m6A修饰通过调节LCN2促进子宫内膜癌细胞的DDP耐药性并抑制铁死亡。但在宫颈癌中,FOXM1对细胞铁死亡的影响尚未见报道。本研究结果显示,敲低FOXM1能够通过促进铁死亡抑制宫颈癌细胞对DDP的耐药性,而进一步过表达ELK1能够逆转这一作用。这为FOXM1在宫颈癌中的作用提供了新的见解,并具有临床转化的潜力。

综上,本研究证明了转录因子FOXM1通过上调



a:qPCR检测各组CaSki/DDP细胞ELK1的表达;b:CCK-8检测各组CaSki/DDP细胞IC_{50}值;c:透射电镜观察各组CaSki/DDP细胞线粒体形态变化;d:各组CaSki/DDP细胞MDA含量比较;e:Werstern blot检测各组CaSki/DDP细胞GPX4、SLC7A11、ACSL4的表达;f:CCK-8检测不同浓度DDP处理各组宫颈癌细胞存活率 *:$P<0.05$

图4 FOXM1上调ELK1促进宫颈癌细胞DDP耐药性

ELK1的表达介导铁死亡途径促进宫颈癌细胞DDP耐药。然而,本研究仍然存在一定局限性,未构建小鼠模型探究FOXM1/ELK1轴对宫颈癌细胞DDP耐药的影响,未来将进一步在动物水平验证我们的观点。总之,本研究结果发现了影响宫颈癌DDP耐药的新的分子机制,并揭示了FOXM1/ELK1轴有望成为宫颈癌治疗的新靶标。

[参考文献]

[1] Kumar L, Harish P, Malik PS, et al. Chemotherapy and targeted therapy in the management of cervical cancer[J]. Curr Probl Cancer, 2018, 42(2): 120-128. doi: 10.1016/j. currproblcancer. 2018. 01. 016.

[2] Gennigens C, Jerusalem G, Lapaille L, et al. Recurrent or primary metastatic cervical cancer: current and future treatments [J]. ESMO Open, 2022, 7(5): 100579. doi: 10.1016/j. esmoop. 2022. 100579.

[3] Chang X, Miao J. Ferroptosis: mechanism and potential applications in cervical cancer [J]. Front Mol Biosci, 2023, 10: 1164398. doi: 10.3389/fmolb. 2023. 1164398.

[4] Jiang M, Song Y, Liu H, et al. DHODH inhibition exerts synergistic therapeutic effect with cisplatin to induce ferroptosis in cervical cancer through regulating mTOR pathway [J]. Cancers (Basel), 2023, 15(2): 546. doi: 10.3390/cancers15020546.

[5] Zhang Z, Hu Q, Ye S, et al. Inhibition of the PIN1-NRF2/GPX4 axis imparts sensitivity to cisplatin in cervical cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2022, 54(9): 1325-1335. doi: 10.3724/abbs. 2022109.

[6] Wei S, Yu Z, Shi R, et al. GPX4 suppresses ferroptosis to promote malignant progression of endometrial carcinoma via transcriptional activation by ELK1[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 881. doi: 10.1186/s12885-022-09986-3.

[7] He GN, Bao NR, Wang S, et al. Ketamine induces ferroptosis of liver cancer cells by targeting lncRNA PVT1/miR-214-3p/GPX4 [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3965-3978. doi: 10.2147/DDDT. S332847.

[8] 毛万丽,李杰慧,冉 立. 宫颈癌顺铂耐药研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(16): 6. doi: 10.3969/j. issn. 1672-4992 2021. 16. 036.

[9] Tong X, Tang R, Xiao M, et al. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 174. doi: 10.1186/s13045-022-01392-3.