

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.12.001

❖ 基础研究 ❖

Foxp3/SMARCE1 信号轴促进宫颈癌细胞侵袭和迁移

龙嘉莉, 刘曙光, 马红梅, 曾超

(中山大学附属第八医院病理科, 广东 深圳 518033)

【摘要】目的: 探讨叉头样转录因子 3 (Foxp3) 是否通过 SMARCE1 促进宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭和迁移。**方法:** 基因芯片筛选下调 Foxp3 后下游差异表达基因。宫颈癌 HeLa 细胞转染 Foxp3 shRNA 干扰后, Western blot 和细胞免疫荧光实验检测 SMARCE1 的表达。Transwell 迁移及侵袭实验观察 HeLa 细胞共转染 Foxp3 shRNA 和 SMARCE1 质粒后迁移和侵袭情况。**结果:** 基因芯片结果显示 SMARCE1 是 Foxp3 的下游基因; Western blot 和细胞免疫荧光实验结果表明, Foxp3 增强 HeLa 细胞中 SMARCE1 蛋白的表达; Transwell 迁移及侵袭实验证实 Foxp3 增强 SMARCE1 促进 HeLa 细胞的迁移和侵袭。**结论:** Foxp3 通过调控 SMARCE1 促进宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭和迁移, Foxp3/SMARCE1 信号轴在宫颈癌的进展中可能起着重要作用。

【关键词】 宫颈癌; 叉头样转录因子 3; SMARCE1; 侵袭; 迁移

【中图分类号】 R737.33 **【文献标志码】** A

Foxp3/SMARCE1 signal axis promotes invasion and migration of cervical cancer cells

LONG Jia-li, LIU Shu-guang, MA Hong-mei, ZENG Chao

(Department of Pathology, the Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518033, Guangdong, China)

【Abstract】 Objective: To investigate whether Foxp3 can promote invasion and migration of cervical cancer HeLa cells by SMARCE1. **Methods:** The downstream differential expression genes of Foxp3 down-regulated were screened by gene chip. After HeLa cells were transfected with Foxp3 shRNA interference, the expression of SMARCE1 was detected by Western blot and immunofluorescence assay. Transwell migration and invasion assay was used to observe the migration and invasion of HeLa cells after co-transfection with Foxp3 shRNA and SMARCE1 plasmids. **Results:** Microarray results showed that SMARCE1 was the downstream gene of Foxp3. Western blot and immunofluorescence assay showed that Foxp3 enhanced the expression of SMARCE1 protein in HeLa cells. Transwell migration and invasion assay confirmed that Foxp3 enhanced SMARCE1 and promoted migration and invasion of HeLa cells. **Conclusion:** Foxp3 promotes invasion and migration of cervical cancer HeLa cells by regulating SMARCE1, and Foxp3/SMARCE1 signaling axis may play an important role in the progression of cervical cancer.

【Key words】 Cervical cancer; Foxp3; SMARCE1; Invasion; Migration

目前, 宫颈癌仍是妇女癌症相关死亡的主要原因。虽然近年来宫颈癌在全世界的发病率已显著下降, 但其死亡率在发展中国家仍在增加。一般来说, 早期宫颈癌患者治疗后的 5 年生存率可达 90% 以上, 而中晚期患者的 5 年生存率不到 30%^[1]。因此, 找到驱动宫颈癌进展的因素尤为重要。本团队前期实验研究^[2]发现, 随着宫颈病变级别的增加, 叉头样转录因子 3 (forkhead box protein 3, Foxp3) 表达强度和阳性率增加, 证实 Foxp3 在宫颈癌的进展过程中起着重要作用。为进一步探究 Foxp3 对宫颈癌生物学行为的影响及分子调控机制, 本实验采用基因芯片筛选出 Foxp3 下游基因 SMARCE1, 并证实

Foxp3 调控 SMARCE1 促进宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭和迁移。

1 材料与方 法

1.1 材 料

宫颈癌 HeLa 细胞系由本实验室保存。DMEM 培养基、10% 胎牛血清、胰蛋白酶、Lipofectamine 2000 均购自美国赛默飞公司; 蛋白浓度测量试剂盒购自上海碧云天公司; 一抗兔抗人单克隆抗体 Foxp3、SMARCE1 购自美国 Abcam 公司; 兔多抗 GAPDH 购自杭州贤至生物公司; HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉博士德公司; Transwell 小室购自美国康宁公司。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81302245); 深圳市福田区卫生公益科研项目 (FTWS2019015、FTWS2018045)

作者简介: 龙嘉莉 (1992 -), 硕士, 住院医师。E-mail: 515955250@qq.com

通讯作者: 曾超, 博士。E-mail: zengchaosysu@126.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染

宫颈癌 HeLa 细胞采用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素和 1% 链霉素的 RPMI-1640 培养基进行培养,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中。将生长状态良好、汇合度为 85% 左右的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。Foxp3 shRNA 序列为:

CCTCCAGAGAGAGATGGTA, 质粒表达载体由上海吉玛公司合成。Foxp3 shRNA 配套的阴性对照质粒的 HeLa 细胞作为对照组。利用从 HeLa 细胞中提取的 mRNA, 通过逆转录聚合酶链反应扩增人 Foxp3 全长 cDNA。引物序列设计如下:

Foxp3-F: 5'-TGGTACCGAGCTCGCCACCATGCCACCCAGGCCTGGCAAG-3';

Foxp3-R: 5'-GATATCTGCAGAATTCTCAGGGGC-CAGGTGTAGGGTTG-3'。将 Foxp3 DNA 片段克隆入 pcDNA3.1 构建重组 pcDNA3.1-Foxp3 质粒。取对数生长期的 HeLa 细胞进行转染,按照脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书转染干扰或过表达质粒表达载体,转染对应的空质粒的 HeLa 细胞作为对照组。

1.2.2 Western blot (WB) 实验

转染后继续培养 48 h 后采用 WB 法检测 HeLa 细胞中 Foxp3 的表达情况。采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, PVDF 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭后使用 1:1 000 稀释后的一抗过夜孵育,选择 HRP 标记的二抗标记后采用 ECL 发光试剂盒显影后采用 Bio-Rad 凝胶成像系统检测染色条带的强度,计算目的蛋白和内参蛋白的光密度比值。

1.2.3 细胞迁移和侵袭实验

取转染 24 h 的后的 HeLa 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化收集,无血清培养基调整细胞密度为 3 × 10⁵ 个/mL 备用。在 24 孔板中预先加入 1 mL 的 DMEM 完全培养基 (含双抗), 并放入 Transwell 小室, 1 h 后在 Transwell 上室分别接入 200 μL 各组细胞悬液, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h。培养完成后,取出 Transwell, 固定、清洗后染色,于显微镜下观察拍照。侵袭实验需制备带 Matrigel 胶的 Transwell 上室,余步骤同迁移实验。

1.2.4 生物信息分析

基因芯片分析 HeLa 细胞敲低 Foxp3 表达后的差异表达基因。生物信息分析由上海 GENECHM 公司进行。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件分析数据。两组间比较用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染效率

采用 WB 法观察 Foxp3 shRNA 转染 HeLa 细胞

的 Foxp3 表达情况。结果显示, Foxp3 shRNA 转染组的 HeLa 细胞中 Foxp3 蛋白表达比对照组下降 (P < 0.05)。见图 1。

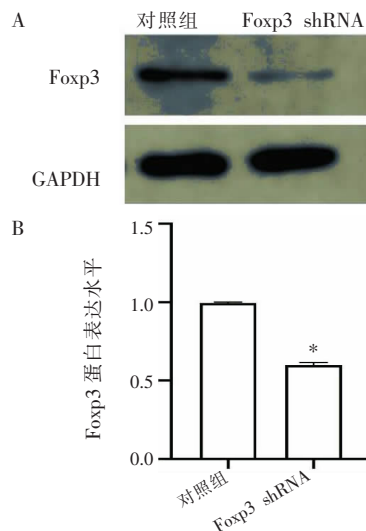


图 1 WB 检测 Foxp3 shRNA 转染宫颈癌 HeLa 细胞中 Foxp3 蛋白表达

A. Foxp3 蛋白表达条带; B. 柱状分析图。*P < 0.05, 与对照组比较。

2.2 Foxp3 shRNA 转染后对细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验结果表明, 转染 Foxp3 shRNA 的 HeLa 细胞迁移细胞数量较对照组 HeLa 细胞迁移数量少 (P < 0.05)。见图 2。

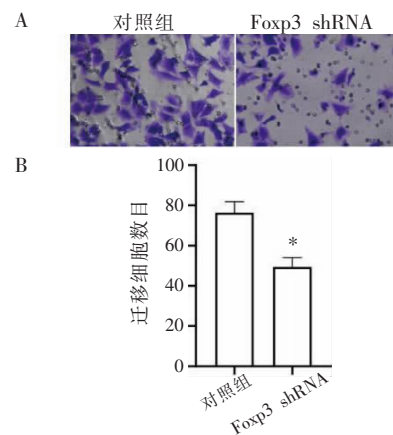


图 2 Foxp3 shRNA 转染后宫颈癌 HeLa 细胞 Transwell 迁移实验

A. 迁移细胞数目; B. 柱状分析图。*P < 0.05, 与对照组比较。

2.3 Foxp3 shRNA 转染后对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果表明, 转染 Foxp3 shRNA 的 HeLa 细胞侵袭细胞数量较对照组 HeLa 细胞侵袭数量少 (P < 0.05)。见图 3。

2.4 SMARCE1 是 Foxp3 下游表达相关基因

采用基因芯片技术寻找 Foxp3 下游基因。通过 shRNA 敲除 HeLa 细胞中 Foxp3 的表达后, 发现 1 427

个基因上调,1 511 个基因下调,其中包括 SMARCE1。见图 4。

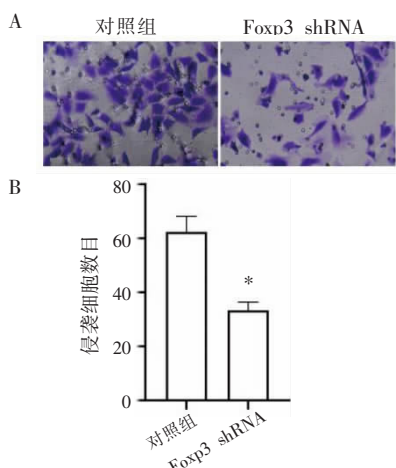


图 3 Foxp3 shRNA 转染后宫颈癌 Hela 细胞 Transwell 侵袭实验

A. 侵袭细胞数目;B. 柱状分析图。* $P < 0.05$,与对照组比较。

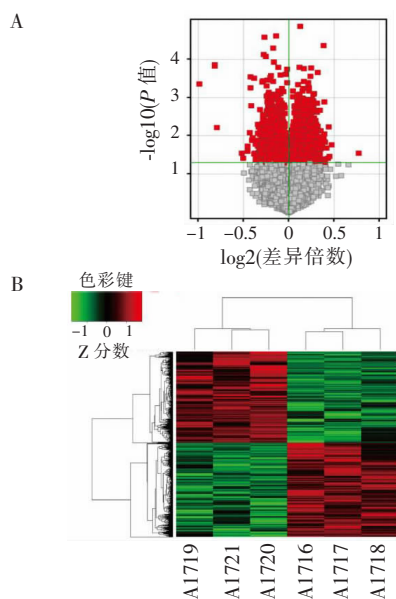


图 4 Hela 细胞敲低 Foxp3 后筛选下游差异表达基因

A.火山图;B.热图。

2.5 Foxp3 shRNA 转染后宫颈癌 Hela 细胞 SMARCE1 表达下调

WB 验证 Foxp3 shRNA 转染后 Hela 细胞中 SMARCE1 的表达情况。WB 显示,转染 Foxp3 shRNA 后,与对照组相比,SMARCE1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 Foxp3 shRNA 和转染 SMARCE1 质粒共转染后宫颈癌 Hela 细胞迁移情况

Transwell 迁移实验表明,共转染 Foxp3 shRNA 和 SMARCE1 质粒组的细胞较共转染 Foxp3 shRNA 和 pcDNA3.1 空质粒组细胞迁移数量多 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.7 Foxp3 shRNA 和转染 SMARCE1 质粒共转染后宫颈癌 Hela 细胞侵袭情况

Transwell 侵袭实验表明,共转染 Foxp3 shRNA 和 SMARCE1 质粒组的细胞较共转染 Foxp3 shRNA 和 pcDNA3.1 空质粒组细胞侵袭数量多 ($P < 0.05$)。见图 7。

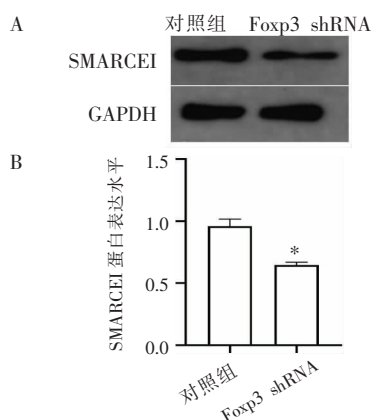


图 5 WB 检测 SMARCE1 蛋白在宫颈癌 Hela 细胞中的表达

A. SMARCE1 蛋白表达条带;B. 柱状分析图。* $P < 0.05$,与对照组比较。

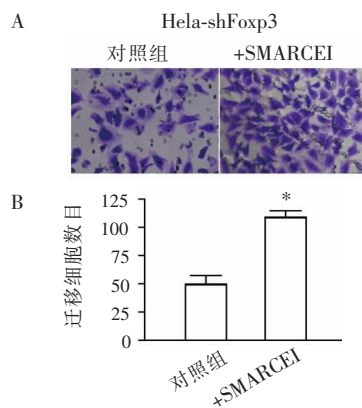


图 6 Foxp3 shRNA 与 SMARCE1 过表达质粒共转染后宫颈癌 Hela 细胞 Transwell 迁移情况

A. 迁移细胞数目;B. 柱状分析图。* $P < 0.05$,与对照组比较。

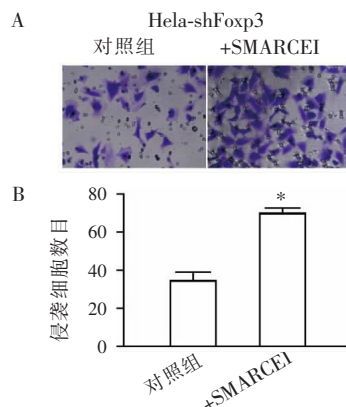


图 7 Foxp3 shRNA 与 SMARCE1 过表达质粒共转染后宫颈癌 Hela 细胞 Transwell 侵袭情况

A. 侵袭细胞数目;B. 柱状分析图。* $P < 0.05$,与对照组比较。

3 讨论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,近年来更有向年轻化发展的趋势。宫颈癌的发生、发展是一个多基因改变且多步骤的复杂过程,因此,探讨宫颈癌发生发展过程中的分子机制,寻找有效分子的靶向治疗方法,将对加强和促进宫颈癌的防治工作提供实验研究的基础。

最新研究^[3]表明,除了 T 细胞谱系之外,Foxp3 在一系列癌症中表达,包括卵巢^[4]、肺^[5]和前列腺癌。然而,Foxp3 对癌症的影响非常有争议。在结肠直肠癌^[6]、黑色素瘤^[7]和肺癌^[8]中,高水平的 Foxp3 提示与不良的预后有关。相反,高水平的 Foxp3 却有利于乳腺癌的预后^[9]。本团队前期实验发现,随着宫颈病变级别的增加,Foxp3 表达强度和阳性率增加,提示 Foxp3 可能在宫颈病变组织水平的分化和生长中发挥重要作用^[2]。研究组进一步证实,Foxp3 通过外源敲低 Foxp3 表达抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。染色质重塑对于全身性生理稳态是必不可少的。染色质重塑的异常通常导致癌症的发生和发展^[10]。因此,在许多类型的癌症中经常观察到参与染色质重塑的基因突变^[11]。SMARCE1 是 SWI/SNF 染色质重塑复合物的组分,通过以 ATP 依赖性方式改变核小体内的 DNA-组蛋白触点而改变染色质结构^[12]。证据^[13-15]表明,较高的 SMARCE1 表达与乳腺癌、胃癌和卵巢癌的预后相关,SMARCE1 可以作为预测癌细胞侵袭和迁移能力的指标。在本研究中,课题组通过基因芯片分析,筛选出 SMARCE1 作为宫颈癌细胞中 Foxp3 的下游差异表达基因。此外,SMARCE1 的过表达可以拮抗 Foxp3 敲低介导的宫颈癌细胞迁移和侵袭的抑制,表明 SMARCE1 至少部分促进 Foxp3 介导的迁移和宫颈癌细胞的侵袭。这是首次提出 SMARCE1 可作为 Foxp3 下游作用基因,并揭示了 SMARCE1 调节对 Foxp3 在宫颈癌中的致癌作用的功能意义。

综上,Foxp3 可调控下游 SMARCE1 促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭,该结果对 Foxp3 在宫颈癌中的致癌功能提供了新线索,这表明 Foxp3/SMARCE1 信号轴可能是宫颈癌进展的新途径。

参考文献

[1] Matsuo K, Machida H, Blake EA, et al. Significance of uterine cor-

pus tumor invasion in early-stage cervical cancer [J]. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2017, 43(4): 725 - 734.

[2] 周有俭,刘曙光,龙嘉莉,等. Foxp3 和 SMARCE1 在宫颈癌中的表达及临床意义 [J]. *川北医学院学报*, 2022, 37(4): 411 - 415.

[3] Karpishev V, Mousavi S, Naghavi Sheykhholeslami P, et al. The role of regulatory T cells in the pathogenesis and treatment of prostate cancer [J]. *Life Science*, 2021, 284: 119 - 132.

[4] Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e191 - e203.

[5] Jiang M, Wu C, Zhang L, et al. FOXP3-based immune risk model for recurrence prediction in small-cell lung cancer at stages I-III [J]. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2021, 9(5): e002339.

[6] Grimmig T, Kim M, Germer CT, et al. The role of Foxp3 in disease progression in colorectal cancer patients [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(6): e24521.

[7] Redpath M, Xu B, van Kempen LC, et al. The dual role of the X-linked Foxp3 gene in human cancers [J]. *Molecular Oncology*, 2011, 5(2): 156 - 163.

[8] Dimitrakopoulos FI, Papadaki H, Antonacopoulou AG, et al. Association of Foxp3 expression with non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Research*, 2011, 31(5): 1677 - 1683.

[9] Martin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Human Foxp3 and cancer [J]. *Oncogene*, 2010, 29(29): 4121 - 4129.

[10] Biegel JA, Busse TM, Weissman BE. SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer [J]. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2015, 166(3): 350 - 366.

[11] Centore R, Sandoval G, Soares L, et al. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes: emerging mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Trends in Genetics*, 2020, 36(12): 936 - 950.

[12] Sokol E, Feng Y, Jin D, et al. SMARCE1 is required for the invasive progression of in situ cancers [J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States*, 2017, 114(16): 4153 - 4158.

[13] Liu H, Zhao YR, Chen B, et al. High expression of SMARCE1 predicts poor prognosis and promotes cell growth and metastasis in gastric cancer [J]. *Cancer Management and Research*, 2019, 11: 3493 - 3509.

[14] Yamaguchi T, Kurita T, Nishio K, et al. Expression of BAF57 in ovarian cancer cells and drug sensitivity [J]. *Cancer science*, 2015, 106(4): 359 - 366.

[15] Sethuraman A, Brown M, Seagroves T, et al. SMARCE1 regulates metastatic potential of breast cancer cells through the HIF1A/PTK2 pathway [J]. *Breast Cancer Research*, 2016, 18(1): 81.

(收稿日期: 2022 - 06 - 11

修回日期: 2022 - 08 - 22)