

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0371-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240210

## 沉默FOXX1基因对胃癌HGC-27细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈爽, 李红

(锦州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 锦州 121000)

**[摘要]** **目的:** 探讨沉默叉头框K1 (FOXX1) 对胃癌HGC-27细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 并阐明其可能的机制。**方法:** 基于基因表达水平值的交互式分析平台 (GEPIA) 数据库查询在胃癌组织和正常胃组织中FOXX1 mRNA表达水平; 利用化学合成的si-FOXX1体外转染胃癌HGC-27细胞, 实验分为空白对照组、nc-FOXX1组和si-FOXX1组, 采用Western blotting法评估各组的转染效率, MTT法检测si-FOXX1转染后各组胃癌HGC-27细胞的增殖能力, 克隆形成实验检测si-FOXX1转染后各组胃癌HGC-27细胞的克隆形成数, 细胞划痕实验检测si-FOXX1转染后各组胃癌HGC-27细胞的迁移率, Transwell小室实验检测si-FOXX1转染后各组胃癌HGC-27细胞的细胞迁移数和细胞侵袭数, Western blotting法检测si-FOXX1转染后各组胃癌HGC-27细胞中核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路相关蛋白 [NF- $\kappa$ B p65和磷酸化核因子 $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65)] 的表达水平。**结果:** GEPIA数据库查询, 在胃癌组织中FOXX1 mRNA表达水平高于正常胃组织 ( $P < 0.05$ ); Western blotting法检测, 在胃癌HGC-27细胞中FOXX1蛋白表达水平高于人正常胃黏膜GES-1细胞 ( $P < 0.01$ ); 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组FOXX1蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); MTT法检测, 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组胃癌HGC-27细胞的增殖能力降低 ( $P < 0.05$ ); 克隆形成实验检测, 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组胃癌HGC-27细胞克隆形成数减少 ( $P < 0.05$ ); 细胞划痕实验检测, 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组胃癌细胞的迁移率降低 ( $P < 0.05$ ); Transwell小室实验检测, 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组胃癌HGC-27细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.05$ ); Western blotting法检测, 与空白对照组和nc-FOXX1组比较, si-FOXX1组胃癌HGC-27细胞中p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** FOXX1在胃癌HGC-27细胞中高表达, 沉默FOXX1可抑制胃癌HGC-27细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 其作用机制可能与NF- $\kappa$ B通路有关。

**[关键词]** 叉头框K1; 胃肿瘤; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭; 核因子 $\kappa$ B

**[中图分类号]** R735.2 **[文献标志码]** A

## Effect of silencing FOXX1 gene on proliferation, migration, and invasion of gastric cancer HGC-27 cells

CHEN Shuang, LI Hong

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the effect of silencing Forkhead box K1 (FOXX1) on the proliferation, migration, and invasion of the gastric cancer HGC-27 cells, and to clarify the possible mechanism.

**[收稿日期]** 2023-03-21

**[基金项目]** 辽宁省教育厅面上项目 (LJKZ0803)

**[作者简介]** 陈爽 (1996-), 女, 黑龙江省安达市人, 在读硕士研究生, 主要从事胃癌发病机制方面的研究。

**[通信作者]** 李红, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: 7109919@qq.com)

**Methods:** The expression levels of FOXK1 mRNA in gastric cancer tissue and normal gastric tissue were consulted based on the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) Database; the synthetic si-FOXK1 was used to transfect the gastric cancer HGC-27 cells *in vitro*, and the cells were divided into blank control group, nc-FOXK1 group, and si-FOXK1 group. Western blotting method was used to detect the transfection efficiencies of the cells in various groups; MTT assay was used to detect the proliferation abilities of the HGC-27 gastric cancer cells in various groups after transfected with si-FOXK1. The clone formation assay was used to detect the number of clone-forming of the HGC-27 gastric cancer cells after transfected with si-FOXK1; wound healing assay was used to detect the migration rates of the gastric cancer HGC-27 cells in various groups after transfected with si-FOXK1; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of NF- $\kappa$ B pathway-related proteins [nuclear factor  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65)] in the gastric cancer HGC-27 cells in various groups after transfected with si-FOXK1. **Results:** The GEPIA Database results showed that compared with normal gastric tissue, the expression level of FOXK1 mRNA in gastric cancer tissue was increased ( $P < 0.05$ ). The Western blotting method results showed that the expression level of FOXK1 protein in the gastric cancer HGC-27 cells was higher than that in normal gastric mucosal GES-1 cells ( $P < 0.01$ ). Compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the expression level of FOXK1 protein in the cells in si-FOXK1 group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The MTT assay results showed that compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the proliferation ability of the gastric cancer HGC-27 cells in si-FOXK1 group was decreased ( $P < 0.05$ ). The clone formation assay results showed that compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the number of clone-forming of the gastric cancer HGC-27 cells in si-FOXK1 group was decreased ( $P < 0.05$ ). The cell scratch healing results showed that compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the migration rate of the gastric cancer HGC-27 cells in si-FOXK1 group was decreased ( $P < 0.05$ ). The Transwell chamber assay results showed that compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the number of invasion cells of the gastric cancer HGC-27 cells in si-FOXK1 group was decreased ( $P < 0.05$ ). The Western blotting results showed that compared with blank control group and nc-FOXK1 group, the expression level of p-NF- $\kappa$ B p65 protein in the cells in si-FOXK1 group was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** FOXK1 is highly expressed in the gastric cancer HGC-27 cells, and silencing FOXK1 can inhibit the proliferation, migration, and invasion abilities of the HGC-27 gastric cancer cells; its mechanism is possibly associated with the NF- $\kappa$ B pathway.

**KEYWORDS** Forkhead box k1; Gastric neoplasm; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion; Nuclear factor- $\kappa$ B

胃癌是全球范围内第五大常见的癌症<sup>[1]</sup>。胃癌发病隐匿,早期诊断率低,预后较差,严重危害人类的健康,目前胃癌患者的治疗方式主要有手术治疗、放射治疗和化学治疗,但上述治疗方式在治疗的同时会对患者身体带来一些负面影响,随着生物技术的不断发展,科研人员开始在基因水平寻找肿瘤的治疗方法。叉头框 K1 (forkhead box K1, FOXK1) 最初被称为肌细胞核因子,是叉头框 (forkhead box, FOX) 转录因子的家族成员。FOXK1 作为 FOX 转录因子家族的重要成员之一,其生物学功能丰富,不仅能够调节基因的表达,还能参与细胞代谢等过程。近年来 FOXK1 被认为是

多种癌症的关键转录调控因子,其在卵巢癌<sup>[2]</sup>、胆囊癌<sup>[3]</sup>、胶质母细胞瘤<sup>[4]</sup>和胃癌<sup>[5]</sup>等多种肿瘤中呈高表达,在乳腺癌<sup>[6]</sup>等肿瘤中呈低表达。其在肿瘤中的作用复杂,既可作为促癌因子,也可作为抑癌因子,如 FOXK1 可以调控磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路抑制肝癌细胞自噬,促进肝癌的迁移和侵袭,诱导上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程<sup>[7]</sup>; FOXK1 能够激活 AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 信号通路促进胆囊癌的增殖和转移; FOXK1 能够激活

Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)通路促进神经胶质瘤细胞的生长<sup>[8]</sup>。在胃癌HGC-27细胞中沉默FOXK1对胃癌细胞的恶性生物学行为的影响及其可能机制鲜有文献报道,因此本研究检测胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达情况,并分析FOXK1敲低后胃癌HGC-27细胞的增殖、迁移和侵袭情况及可能的作用机制,为胃癌相关基因的靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 胃癌HGC-27细胞和人正常胃黏膜GES-1细胞购自中国科学院上海细胞库,保存于锦州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学实验室;DMEM培养基(索莱宝科技有限公司),胎牛血清(四季青生物工程材料有限公司),siRNA(阴性对照组引物序列为F:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',R:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3';转染组引物序列为F:5'-CGACAAAGGCUGGCAGAAUTT-3',R:5'-AUUCUGCCAGCCUUUGUCGTT-3') (通用生物股份有限公司)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000(美国Thermo公司),MTT(碧云天生物技术有限公司),DMSO(北京索莱宝科技有限公司),基质胶(上海诺娃医药科技有限公司),FOXK1抗体、 $\beta$ -actin抗体、B细胞淋巴瘤(lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associate X protein, Bax)抗体,剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved cysteinyl asparatate specific protease-3, Cleaved Caspase-3)抗体,核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)-p65抗体和磷酸化NF- $\kappa$ B(phosphorylated NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B) p65抗体(爱博泰克生物公司);二氧化碳培养箱(型号:150i,美国Thermo公司),倒置显微镜(型号:Ti-S,日本尼康公司),电泳仪(型号:1658025,美国伯乐公司)。

**1.2 基因表达谱在线数据库平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库分析人胃癌组织中FOXK1 mRNA表达水平** 利用GEPIA数据库(网址: <http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析胃癌组织及正常胃组织中FOXK1 mRNA表达水平,在首页检索框输入:FOXK1,点击Boxplots,在设定条件数据集(Datasets Selection)处选择胃癌(stomach adenocarcinoma),P-value Cutoff设为0.05,其他

设定为默认,点击plot进行查询。

**1.3 细胞培养及实验分组** 胃癌HGC-27细胞在DMEM完全培养基(含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素)于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。实验分为空白对照组、nc-FOXK1组和si-FOXK1组。

**1.4 si-FOXK1和nc-FOXK1转染** 转染前确认6孔细胞培养板中每孔细胞汇合度达到70%以上且细胞状态良好,转染步骤按照Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000说明书进行,转染当日去除6孔细胞培养板中的旧培养基,用PBS缓冲液清洗1次,各孔再加入1.75 mL无血清培养基,在无菌离心管中用125  $\mu$ L无血清培养基稀释5  $\mu$ L siRNA,在另一个离心管用125  $\mu$ L无血清培养基稀释3.75  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000转染试剂,室温下静置5 min。混合转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000和siRNA稀释液,轻轻吹吸混匀,将该转染复合物室温静置15 min,加入到6孔细胞培养板中,每孔250  $\mu$ L,轻摇细胞培养板混合均匀。将细胞培养板置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h以上,采用Western blotting法检测转染效果,实验重复3次。

**1.5 Western blotting法检测各组胃癌HGC-27细胞中FOXK1、NF- $\kappa$ B p65和p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平** 收集转染后细胞提取总蛋白并测定蛋白浓度,加入SDS上样缓冲液,100℃煮沸离心后上样,待电泳分离蛋白后转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,再分别与稀释后的FOXK1、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65和 $\beta$ -actin抗体孵育过夜, TBST洗膜3次,加入稀释后的二抗孵育1 h,洗膜3次,滴加ECL发光液显色,拍照。采用Image J软件分析条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin蛋白条带灰度值,实验重复3次。

## 1.6 MTT法检测各组胃癌HGC-27细胞增殖能力

将胃癌HGC-27细胞重悬后计数,接种于3个96孔细胞培养板中,每孔200  $\mu$ L,每孔约 $2 \times 10^3$ 个细胞,每组6个复孔。分别在转染后的24、48、72和96 h各取出1个96孔细胞培养板,每孔加入质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无菌MTT溶液15  $\mu$ L,置于培养箱37℃避光孵育4 h。4 h后弃掉培养基,每孔再加入150  $\mu$ L的DMSO溶液,置于摇床上震荡15 min后,显微镜下观察甲臞结晶完全溶解,将96孔细胞培养板放置在酶标仪上,在转染后24、48、72和96 h于490 nm波长处分别检测各组吸光度

(A)值,以A值代表相应时间点的细胞增殖能力,实验重复3次。

**1.7 克隆形成实验检测各组胃癌HGC-27细胞克隆形成数** 将转染后的胃癌HGC-27细胞用胰酶消化、重悬,接种于6孔细胞培养板中,每孔约300个细胞,细胞培养约14 d,期间每3 d换液1次,显微镜下观察单株群落细胞数量超过50个,将细胞培养板取出,使用PBS缓冲液清洗3次,加入4%多聚甲醛固定10 min,弃掉多聚甲醛后加入0.1%结晶紫染色15 min, PBS缓冲液清洗3次,晾干后拍照并记录各组细胞克隆形成数,实验重复3次。

**1.8 细胞划痕实验检测各组胃癌HGC-27细胞迁移率** 在6孔细胞培养板背面画3条间隔0.5 cm横穿过孔的平行线,接种细胞后待细胞密度达70%时开始转染,细胞长满6孔细胞培养板时用枪头垂直于6孔细胞培养板底面划痕,使用PBS缓冲液清洗2次,加入不含血清的培养基继续培养,在0、24和48 h观察胃癌HGC-27细胞迁移情况并在倒置显微镜下拍照,实验重复3次,采用Image J软件计算细胞迁移率,细胞迁移率(24 h) = (0 h划痕面积 - 24 h划痕面积) / 0 h划痕面积 × 100%,细胞迁移率(48 h) = (0 h划痕面积 - 48 h划痕面积) / 0 h划痕面积 × 100%。

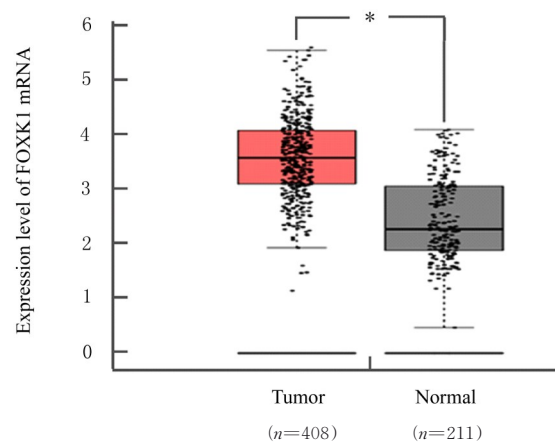
**1.9 Transwell小室实验检测各组胃癌HGC-27细胞的细胞迁移数和细胞侵袭数** 该实验分为铺基质胶和不铺基质胶,铺胶检测FOXK1敲低后胃癌HGC-27细胞的侵袭能力,不铺胶检测FOXK1敲低后胃癌HGC-27细胞的迁移能力,将Matrigel基质胶和基础培养基以1:8比例混合,每个小室加入60 μL稀释好的基质胶,放入培养箱培养3 h,使基质胶聚成薄膜,将上室多余液体吸出,加入100 μL基础培养基后放入培养箱中30 min进行基底膜水化,吸去培养基,在下室加入500 μL完全培养基,上室接种含 $5 \times 10^4$ 个细胞的基础培养基200 μL,同时避免上室和下室间产生气泡,24 h后取出小室,吸弃培养基,使用PBS缓冲液清洗3次,加入甲醇固定后,用0.1%结晶紫染色15 min, PBS缓冲液清洗3次,用棉签轻柔地擦去小室上层细胞,晾干,在显微镜下拍照并分别记录细胞迁移数和细胞侵袭数,实验重复3次。

**1.10 统计学分析** 采用GraphPad Prism 8.0.1统计软件进行统计学分析。各组中FOXK1、NF-κB

p65和p-NF-κB p65蛋白表达水平,克隆形成数,细胞迁移率,细胞迁移数和细胞侵袭数均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本t检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌组织样本和正常胃组织样本中FOXK1 mRNA表达水平** 通过GEPID数据库检索并提取来源于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)数据库的408例胃癌组织样本及211例正常胃组织样本,并分析FOXK1 mRNA表达水平。结果显示:在胃癌组织中FOXK1 mRNA表达水平高于正常胃组织( $P < 0.05$ ),见图1。



\* $P < 0.05$  vs normal group.

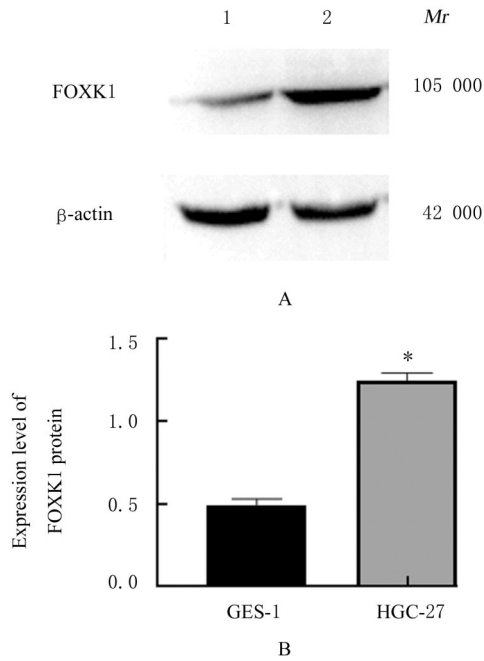
图1 胃癌组织样本和正常胃组织样本中FOXK1 mRNA表达水平

Fig. 1 Expression levels of FOXK1 mRNA in human gastric cancer tissue and normal gastric tissue

**2.2 正常胃黏膜GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达水平** Western blotting法检测结果显示:在胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达水平高于正常胃黏膜GES-1细胞( $P < 0.01$ )。见图2。

**2.3 各组胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达水平** Western blotting法检测结果显示:与空白对照组和nc-FOXK1组比较,si-FOXK1组FOXK1蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ )。见图3。

**2.4 各组胃癌HGC-27细胞的增殖能力** MTT法

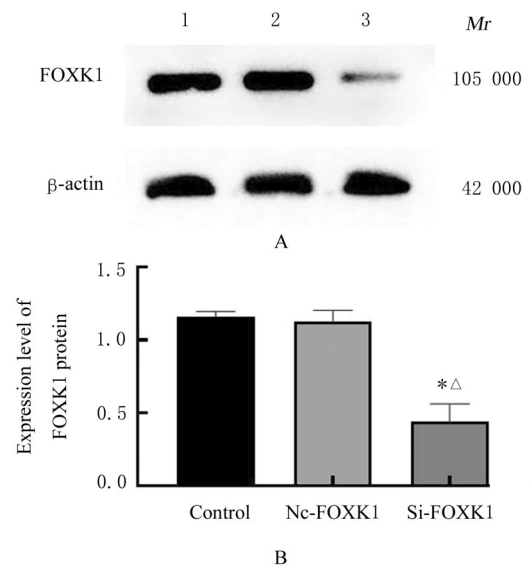


A: Electrophoregram (Lane 1: GES-1 cells; Lane 2: HGC-27 cells); B: Histogram. \* $P < 0.01$  vs GES-1 cells.

图2 正常胃黏膜GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of FOXK1 protein in normal gastric mucosa GES-1 cells and gastric cancer HGC-27 cells

检测结果显示: 与空白对照组和nc-FOXK1组比



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: Nc-FOXK1 group; Lane 3: Si-FOXK1 group); B: Histogram. \* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs Nc-FOXK1 group.

图3 各组胃癌HGC-27细胞中FOXK1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of FOXK1 protein in gastric cancer HGC-27 cells in various groups

较, si-FOXK1组胃癌HGC-27细胞的增殖能力在不同时间段(24、48和96 h)均降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见表1。

表1 各组胃癌HGC-27细胞增殖能力

Tab. 1 Proliferation abilities of gastric cancer HGC-27 cells in various groups

( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	A(490) value				
	(t/h)	24	48	96	
Control		0.65±0.06	0.74±0.04	0.93±0.03	1.15±0.07
Nc-FOXK1		0.61±0.01	0.73±0.04	0.83±0.18	1.13±0.08
Si-FOXK1		0.53±0.01* $\Delta$	0.58±0.01** $\Delta\Delta$	0.67±0.03	0.79±0.01** $\Delta\Delta$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs nc-FOXK1 group.

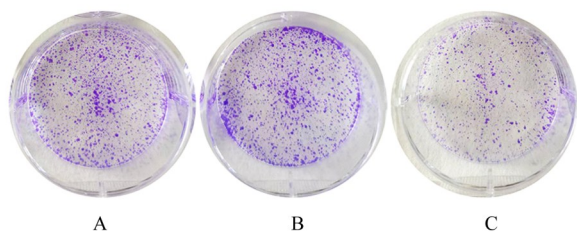
2.5 各组胃癌HGC-27细胞的克隆形成数 克隆形成实验检测结果显示: 与空白对照组[(327.30±34.43)个]和nc-FOXK1组[(340.00±33.87)个]比较, si-FOXK1组[(239.00±11.79)个]胃癌HGC-27细胞的克隆形成数减少( $P < 0.05$ )。见图4。

2.6 各组胃癌HGC-27细胞的迁移细胞率 采用倒置显微镜分别对划痕0、24和48 h的细胞进行拍

照, 结果显示: 在细胞划痕后48 h, 与空白对照组(35%±2%)和nc-FOXK1组(37%±2%)比较, si-FOXK1组(27%±1%)胃癌HGC-27细胞的细胞迁移率有所降低( $P < 0.05$ )。见图5。

2.7 各组胃癌HGC-27细胞的细胞侵袭数

Transwell小室实验检测结果显示: 与空白对照组(163.30个±14.74个)和nc-FOXK1组(158.30个±21.78个)比较, si-FOXK1组迁移细



A: Control group; B: Nc-FOXK1 group; C: Si-FOXK1 group.

图4 各组胃癌HGC-27细胞的克隆形成数

Fig. 4 Clone-forming numbers of gastric cancer HGC-27 cells in various groups

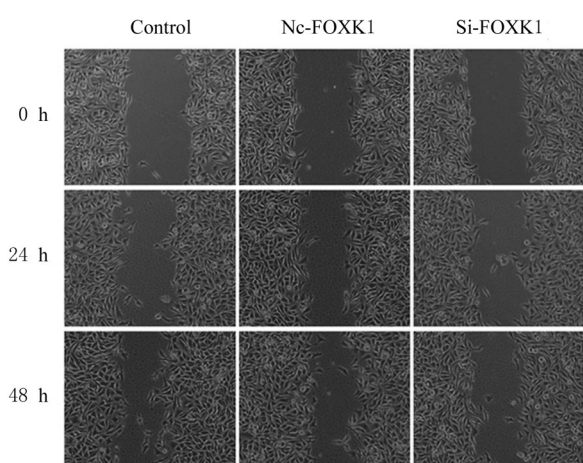
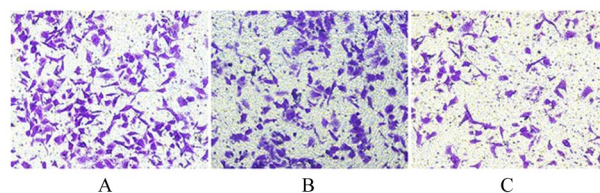


图5 各组胃癌HGC-27细胞的迁移情况

Fig. 5 Migration of gastric cancer HGC-27 cells in various groups

胞数 (95.67个±19.40个) 明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图6。Transwell小室实验检测结果显示: 与空白对照组 (98.67个±4.93个) 和 nc-FOXK1组

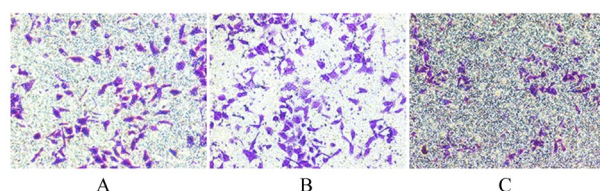


A: Control group; B: Nc-FOXK1 group; C: Si-FOXK1 group.

图6 各组胃癌HGC-27细胞的迁移能力

Fig. 6 Migration ability of gastric cancer HGC-27 cells in various groups

(101.30个±6.66个) 比较, si-FOXK1组 (69.33个±8.08个) 侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图7。



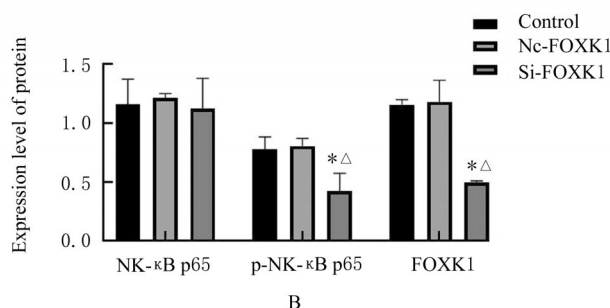
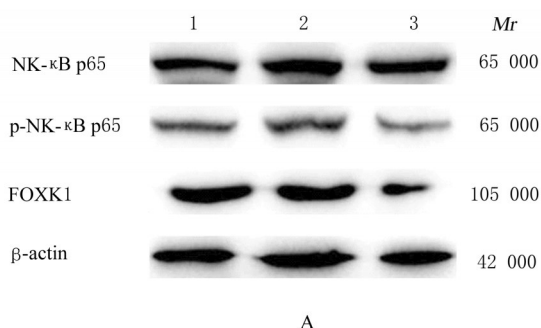
A: Control group; B: Nc-FOXK1 group; C: Si-FOXK1 group.

图7 各组胃癌HGC-27细胞的侵袭情况

Fig. 7 Invasion of gastric cancer HGC-27 cells in various groups

### 2.8 各组胃癌 HGC-27 细胞中 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达水平

Western blotting法检测结果显示: 与空白对照组和 nc-FOXK1组比较, si-FOXK1组胃癌 HGC-27细胞中 p-NF-κB p65蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), NF-κB p65蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图8。



Lane 1: Control group; Lane 2: Nc-FOXK1 group; Lane 3: Si-FOXK1 group. \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs nc-FOXK1 group.

图8 各组胃癌 HGC-27 细胞中 NF-κB 通路蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of NF-κB pathway proteins in gastric cancer HGC-27 cells in various groups

### 3 讨论

FOXK1是FOX家族成员之一,其结构中的叉头结构域具有转录激活和抑制作用,使FOX具有肿瘤抑制和潜在致癌的双重作用<sup>[9]</sup>。WANG等<sup>[10]</sup>的研究显示:FOXK1能与卷曲螺旋结构域蛋白43(coiled coil domain containing protein 43, CCDC43)作用,从而促进结肠癌细胞侵袭和转移;LONG等<sup>[11]</sup>研究显示:FOXK1和miR-195-5p相互作用能够抑制肺癌细胞的发展。为了探讨FOXK1在胃癌中的表达及作用,本研究选取了人正常胃黏膜上皮GES-1细胞和未分化胃癌HGC-27细胞,利用GEPIA在线数据库和Western blotting法分别在mRNA水平及蛋白水平检测FOXK1的表达情况,发现FOXK1在胃癌细胞中高表达,这与王艺璇<sup>[5]</sup>、沙金平等<sup>[12]</sup>和ZHANG等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。

因胃癌的发生发展是一个多阶段的过程,其中涉及不受控制的细胞增殖<sup>[14]</sup>。本研究采用RNA干扰技术将FOXK1沉默后,采用MTT法和克隆形成实验探讨其对胃癌HGC-27细胞增殖能力的影响,结果表明:与空白对照组和nc-FOXK1组比较,si-FOXK1组胃癌HGC-27细胞的细胞增殖能力下降,表明沉默FOXK1后抑制了胃癌HGC-27细胞的增殖,WANG等<sup>[15]</sup>研究结果表明:FOXK1过表达促进胃癌细胞的增殖并与胃癌患者的不良预后有关。肿瘤的复发转移是导致患者死亡的原因之一,肿瘤细胞能够穿透基底膜和细胞外基质侵袭周围组织进而发生转移<sup>[16]</sup>,因此控制肿瘤细胞的迁移和侵袭成为肿瘤治疗的一个有效途径<sup>[17]</sup>。本研究采用细胞划痕实验和Transwell小室实验检测沉默FOXK1后胃癌HGC-27细胞的迁移及侵袭能力,结果表明:沉默FOXK1后,与空白对照组和nc-FOXK1组比较,si-FOXK1组HGC-27细胞的迁移及侵袭能力下降,这与FENG等<sup>[18]</sup>和WANG等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。

为了探讨FOXK1对胃癌HGC-27细胞增殖影响的机制,本研究采用Western blotting法检测NF- $\kappa$ B通路相关蛋白(p-NF- $\kappa$ B p65和NF- $\kappa$ B p65蛋白)的表达情况。NF- $\kappa$ B是在细胞中广泛存在并参与肿瘤细胞分化、增殖和凋亡的核转录因子,通常是指p50/p65二聚体,静息状态下p50/p65二聚体与其抑制剂结合,处于失活状态,当细胞受到刺激时,NF- $\kappa$ B p65被磷酸化激活<sup>[20]</sup>,可与特异性

DNA序列结合进而参与抗凋亡Bcl-2等不同靶基因的表达。本研究结果显示:沉默FOXK1后,与空白对照组和nc-FOXK1组比较,si-FOXK1组p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平明显降低,表明FOXK1可能参与调控NF- $\kappa$ B通路进而调节胃癌HGC-27细胞的增殖。研究<sup>[21]</sup>证实:miR-187-3p过表达可通过下调FOXK1蛋白的表达从而抑制破骨细胞增殖和分化并促进破骨细胞凋亡,其作用机制与抑制NF- $\kappa$ B信号通路的活化有关。与本研究结果一致。

综上所述,沉默FOXK1后能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。FOXK1蛋白可能通过调控NF- $\kappa$ B通路促进胃癌的发展。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

李红负责论文的整体设计,陈爽负责论文撰写和统计学分析。

#### [参考文献]

- [1] SMYTH EC, NILSSON M, GRABSCH HI, et al. Gastric cancer[J].Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [2] LI L, GONG M, ZHAO Y, et al. FOXK1 facilitates cell proliferation through regulating the expression of p21, and promotes metastasis in ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(41): 70441-70451.
- [3] MA W C, WANG J H, YU Y, et al. FOXK1 promotes proliferation and metastasis of gallbladder cancer by activating AKT/mTOR signaling pathway [J]. Front Oncol, 2020, 10: 545.
- [4] XU H T, HUANG S L, ZHU X N, et al. FOXK1 promotes glioblastoma proliferation and metastasis through activation of Snail transcription [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(3): 3108-3116.
- [5] 王艺璇. FOXK1介导自噬效应调控胃癌的增殖、侵袭和迁移[D]. 青岛:青岛大学, 2020.
- [6] CHEN D, WANG K, LI X W, et al. FOXK1 plays an oncogenic role in the development of esophageal cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 494(1/2): 88-94.
- [7] 罗赛芳, 马向明, 曹立瀛. 肝细胞癌中糖异生代谢异常的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(9): 2165-2171.
- [8] JI Z G, JIANG H T, ZHANG P S. FOXK1 promotes cell growth through activating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and emerges as a novel target of miR-137 in glioma[J].

- Am J Transl Res, 2018, 10(6): 1784-1792.
- [9] 李恬雨, 闫会敏. 叉头转录因子家族在肝细胞癌中的作用机制及其作为治疗靶点的前景[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(4): 931-934.
- [10] WANG J, LIU G N, LIU M W, et al. The FOXK1-CCDC43 axis promotes the invasion and metastasis of colorectal cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2547-2563.
- [11] LONG Z Q, WANG Y D. MiR-195-5p suppresses lung cancer cell proliferation, migration, and invasion via FOXK1 [J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820922587.
- [12] 沙金平, 徐 赟, 刁云辉. FOXK1、SATB2在胃癌组织中的表达及其与临床病理参数及预后的相关性分析[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(5): 728-732.
- [13] ZHANG H, WU X S, XIAO Y Z, et al. Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT, migration, and invasion in gastric cancer cells [J]. J Mol Med, 2019, 97(2): 163-176.
- [14] KLAUNIG J E. Oxidative stress and cancer [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(40): 4771-4778.
- [15] WANG Y X, QIU W S, LIU N, et al. Forkhead box K1 regulates the malignant behavior of gastric cancer by inhibiting autophagy[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(4): 107.
- [16] NOVIKOV N M, ZOLOTARYOVA S Y, GAUTREAU A M, et al. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2021, 124(1): 102-114.
- [17] DUFF D, LONG A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion [J]. Cell Signal, 2017, 35: 250-255.
- [18] FENG Y J, BAI Z G, SONG J N, et al. FOXK1 plays an oncogenic role in the progression of hilar cholangiocarcinoma[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 91.
- [19] WANG Y, SUN L, QIU W, et al. Inhibiting forkhead box K1 induces autophagy to reverse epithelial-mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer by regulating Myc-associated zinc finger protein in an acidic microenvironment[J]. Aging, 2020, 12(7): 6129-6150.
- [20] LOGAN M K, LETT K E, MCLAURIN D M, et al. Coilin as a regulator of NF- $\kappa$ B mediated inflammation in preeclampsia[J]. Biol Open, 2022, 11(7): bio059326.
- [21] 张 涛, 杨扉扉, 王黎策, 等. miR-187-3p调控FOXK1/NF- $\kappa$ B信号通路影响破骨细胞增殖、凋亡及分化的分子机制[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(5): 1128-1133.