

FOX M1 基因在卵巢癌中的表达及紫杉醇对其表达的作用

范丽丽, 薛玲玲, 焦娜, 马会峰, 张毓毓

河南科技大学第一附属医院, 河南 洛阳 471000

摘要: 目的 探究紫杉醇对卵巢癌治疗效果以及对相关基因 FOX M1 表达影响。方法 通过荧光定量 PCR, Western blot 方法从 RNA 以及蛋白质水平分别对卵巢癌患者卵巢标本(卵巢癌组)及因其他原因而行卵巢切除的卵巢标本(对照组)中 FOX M1 基因的表达进行测定,同时运用酶联免疫吸附法(ELISA)检测二者血清中 FOX M1 蛋白含量及卵巢癌患者服用紫杉醇后不同时间段(1、2、3、4、5、6 月)血清 FOX M1 含量变化。结果 卵巢癌患者卵巢中 FOX M1 基因在 mRNA 以及蛋白水平的表达量、血清中 FOX M1 含量均显著高于对照组($P < 0.05$);与治疗前相比,卵巢癌患者服用紫杉醇后血清中 FOX M1 含量随治疗时间的延长逐步降低($P < 0.05$),但治疗 6 个月后,仍显著高于对照组($P < 0.05$)。结论 FOX M1 基因与卵巢癌发病之间存在密切关系,服用紫杉醇可以降低患者体内 FOX M1 基因表达量。

关键词: FOX M1 基因; 卵巢癌; 紫杉醇

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2017)08-1002-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.033

2013 年国际抗癌协会的统计资料显示,卵巢癌已经与宫颈癌、子宫癌、乳腺癌等疾病成为女性发病率较高的几类癌症之一,其约占女性癌症总数的 18.4%^[1]。统计资料表明,我国女性当中罹患卵巢癌的患者比例也在逐年增加,其比例已经占到女性恶性肿瘤的 17.4%,其在我国女性中的发病率约为 26.4%,死亡率约为 35.4%,略高于国际平均水平^[2]。卵巢癌疾病的诊断以及治疗已经成为我国关爱女性健康的重要研究方向,因此寻找卵巢癌发病的分子机制势在必行,其对卵巢癌的治疗具有重大意义。

Forkhead 家族转录因子(Forkhead box M1 transcription factor, FOX M1)是近年来人们发现的一种与细胞异常增殖以及癌症相关的转录因子^[3-5]。有相关研究表明^[6],FOX M1 与人体内某些恶性肿瘤的发生、发展、预后均存在紧密关联。研究发现紫杉醇对于肺癌等具有很好的治疗效果^[7],紫杉醇对于结肠癌^[8]、卵巢癌^[9]等具有很好的治疗效果,但是对于其中的分子机制尚待进一步研究。本研究对 FOX M1 基因与卵巢癌之间的相互关系进行了初步研究,并对紫杉醇与 FOX M1 以及卵巢癌之间相互关系进行了一定的探讨,以期后续卵巢癌的治疗提供一定的理论指导。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取河南省人民医院肿瘤外科 2012-2014 年间就诊收的 32 例上皮性卵巢癌患者作为本

作者简介: 范丽丽(1974-),女,河南人,硕士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤。

次研究对象,所选的卵巢癌患者的分类分期均为 II 期和 III 期,其中 II 期 21 人,III 期 11 人(所有的分期分类均由本院病理科显微切片观察确认),患者平均年龄(45.2±4.8)岁。所有的卵巢癌患者均为初次发现,且均选择手术治疗,术后选择紫杉醇化疗,紫杉醇治疗每周一次,剂量按照体表面积 130 mg/m² 计算,静滴约 3 h。术中取出的卵巢癌组织立即置于液氮中保存,且所有的患者均保留完整的病例资料,所用于实验的患者组织以及血液标本均向患者讲明实验的目的和用途,并签署知情同意书。正常卵巢标本选自因其他原因而切除的卵巢标本共 18 例,作为对照组,平均年龄(44.6±4.3)岁。

1.2 药品与试剂 在本研究中使用的卵巢癌检测试剂盒购自 Roche 公司;其余相关药品均购自 Thermo 公司,相关荧光定量引物由 TAKARA 公司合成,FOX M1 抗体由 ACRIS 提供。

1.3 方法

1.3.1 卵巢癌细胞 RNA 提取引物序列 以对照组以及卵巢癌患者卵巢组织样本作为研究对象,按照相关操作提取其组织样本中的 RNA 用于荧光定量 PCR 反应,其引物序列为: F5' TTTTGCTAGCTCAAGCCCT-GTCAACTTTACC-3' R; F5' -ATATAAGCTT TTGCTG-CATCCCCGCTCACCT-3'。

从液氮中取出 0.1 g 左右的冻存组织样品,在冰上溶化后加入 0.45 ml RNA Plus,随后在预冷的研钵中将组织研碎,移入 1.5 ml EP 管中,在研钵中再加入

0.45 ml RNAPlus, 洗涤后转入离心管中。(2)向离心管中加入 200 μ l 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 冰上静置 15 min。(3)12 000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。(4)将上清转移到去 RNase 的 EP 管中, 加入等量异丙醇, 颠倒混匀后冰上静置 10 min。(5)12 000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。(6)弃上清, 加入 750 μ l 75% 乙醇, 轻轻混匀, 12 000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。(7)弃上清, 尽量去清残留乙醇。(8)加入适量去 RNase 水, 测定提取 RNA 质量, 剩余用于反转录。相对表达量 = (目的基因 ct 值 - 内参基因 ct 值) / 内参基因 ct 值。

1.3.2 荧光定量 PCR 测定卵巢组织中的 FOXM1 基因的 mRNA 水平 参照 TAKARA 荧光定量 PCR 说明书进行操作。

1.3.3 ELISA 检测血清中 FOXM1 蛋白的表达水平 按照 ELISA 试剂盒说明书进行相关操作。标准品通过 Assay Buffer 按照 1:50 的比例进行稀释, 然后按照说明书设定标准曲线。实验中将获得样本先按照 1:200 的比例稀释之后, 每孔加入 100 μ l 卵巢癌患者血清样本, 然后向每孔中加入 50 μ l FOXM1 检测液, 25 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h, 然后加入 50 μ l TMB 显色液进行显色, 随后置于 495 nm 处测定吸光值, 然后根据标准曲线计算各个待测样品中 FOXM1 含量及浓度。

1.3.4 Western blot 检测卵巢癌组织中 FOXM1 表达量 采用 Thermo 动物细胞蛋白提取试剂盒提取样本中的总蛋白, 然后进行 Western blot 检测, Western blot 相关操作参照《分子克隆手册》^[11]。

1.4 统计学方法 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织中 FOXM1 mRNA 表达量 荧光定量 PCR 结果显示, FOXM1 基因在卵巢癌患者体内 mRNA

平均表达水平 (57.91 ± 6.31) 是对照组卵巢组织 (12.32 ± 2.56) 的 4.5~5.7 倍, 二者差异有统计学意义 ($t = 29.224, P < 0.001$)。见图 1。

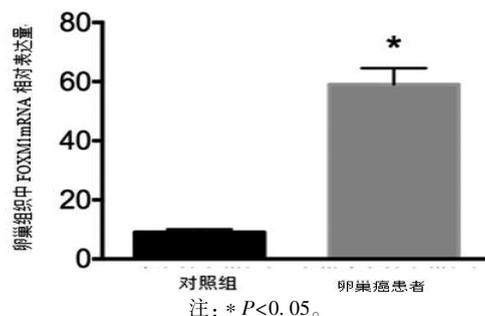


图 1 卵巢组织中 FOXM1 mRNA 相对表达量

2.2 卵巢组织中 FOXM1 蛋白水平的表达量 Western blot 结果显示, 卵巢癌患者体内 FOXM1 蛋白的表达量 (6.54 ± 0.79) 约为对照组表达水平 (1.00 ± 0.45) 的 6.1~7.2 倍, 二者差异有统计学意义 ($t = 27.289, P < 0.001$)。见图 2。

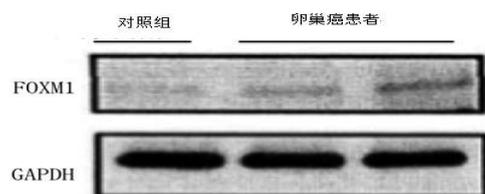
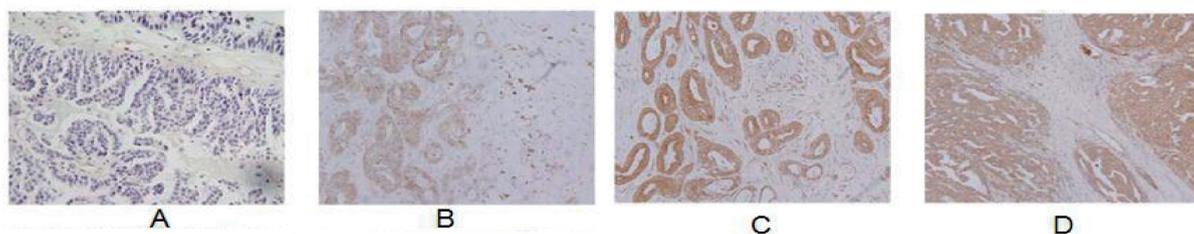


图 2 卵巢组织中 FOXM1 蛋白的表达

2.3 卵巢组织中 FOXM1 蛋白的免疫组织化学染色结果 卵巢癌组织 FOXM1 的免疫组织化学染色结果显示, 对照组卵巢组织中 FOXM1 蛋白表达近乎为阴性 A(-), 而卵巢癌患者卵巢组织中 FOXM1 蛋白均为阳性, B: 弱阳性 (+)、C: 中等强阳性 (++)、D: 强阳性 (+++), 阳性染色主要集中在卵巢癌细胞膜当中 (B/C/D), 其主要的特征为大小不均匀的棕黄色小颗粒, 而在对照组卵巢组织中则未发现。见图 3。



(A) 对照组卵巢组织 ($\times 200$); (B) 卵巢癌组织 ($\times 200$); (C) 卵巢癌组织 ($\times 200$); (D) 卵巢癌组织 ($\times 200$)

图 3 卵巢组织中 FOXM1 蛋白免疫化学染色观察结果

2.4 对照组以及卵巢癌患者血清中 FOXM1 蛋白含量 ELISA 检测对照组以及卵巢癌患者血清中 FOXM1 蛋白含量结果显示, 卵巢癌患者血清中 FOXM1 蛋白含量 (11.32 ± 1.15) 显著高于对照组血清中的 FOXM1 蛋

白含量 (4.23 ± 0.69), 为对照组血清中的 FOXM1 蛋白含量的 3.5~4.3 倍, 二者差异有统计学意义 ($t = 23.795, P < 0.001$)。

2.5 卵巢癌患者紫杉醇治疗前后血清中 FOXM1 的含

量变化 经紫杉醇治疗 1 个月后,卵巢癌患者血清中 FOXM1 含量即开始降低,此后随治疗时间延长,逐步降低($P<0.05$)。但治疗 6 个月后,仍显著高于对照组水平($t=6.110, P<0.001$)。见表 1。

表 1 卵巢癌患者采用紫杉醇治疗后血清中

FOXM1 含量的变化($n=32$)

时间	FOXM1 含量($\bar{x}\pm s$)	t 值	P 值
治疗前	11.32±1.15	-	-
治疗后 1 月	9.22±1.19	8.018	<0.001
治疗后 2 月	8.62±1.15	10.194	<0.001
治疗后 3 月	6.41±1.41	18.746	<0.001
治疗后 4 月	5.71±1.15	21.419	<0.001
治疗后 5 月	5.62±0.45	21.763	<0.001
治疗后 6 月	5.11±0.33	24.432	<0.001

3 讨论

近年来,随着我国女性罹患卵巢癌比例的逐年升高,对于卵巢癌疾病的快速诊断已经成为目前研究的热点^[12]。有研究指出,与卵巢癌发病以及恶化相关的基因可以分为两类:其一是在 mRNA 水平上与卵巢癌疾病相关;其二是在蛋白水平上与卵巢癌疾病相关,其中有 61 个基因可能与卵巢癌疾病相关,而 FOXM1 即为其中一个。FOXM1 作为 Forhead 转录因子家族的重要成员之一,其与癌症的发生、发展具有紧密的关联性^[13]。

有研究报道,FOXM1 与病程之间存在一定的正相关性,即随着患者患病时间的延长,FOXM1 基因在血清中的含量逐渐增加^[14]。本文研究发现,与对照组相比,罹患卵巢癌的女性血清中 FOXM1 基因 mRNA 以及蛋白水平均显著升高。并且 FOXM1 在卵巢癌患者血清中含量亦较对照组血清中含量高,本研究结果与报道一致。

紫杉醇最初有由 Wain 等学者于 1971 年从短叶红豆杉(*taxus dreifololin*)的树皮当中分离得到,并且命名为紫杉醇^[15]。近年来有学者研究表明^[16],紫杉醇可以作为一种广谱抗肿瘤药物,具有独特的抗癌机制,例如其可以作用于细胞微管并且通过与微管蛋白 N 端的第 31 位氨基酸以及第 217~231 位氨基酸相互作用进而可以在一定程度上诱导原本与微管蛋白结合的相关蛋白发生蛋白质分离,进而将细胞阻断于 G2PM 期,并最终导致有丝分裂发生异常或者停止,使机体内的癌细胞无法大量增殖进而引起癌细胞凋亡或者死亡,并最终达到治疗癌症的功效。此外紫杉醇对于女性卵巢癌的治疗效果在一项研究中也体现,研究发现经紫杉醇治疗之后,卵巢癌患者体内相关卵巢癌敏感标记物(例如 CA125)含量显著降低^[17]。

本文对紫杉醇治疗女性卵巢癌效果进行初步评

价,与未经紫杉醇治疗前相比,经紫杉醇治疗的卵巢癌患者血清中 FOXM1 含量显著下降,说明紫杉醇对卵巢癌具有一定的治疗效果,其可以通过降低患者体内 FOXM1 含量对卵巢癌进行治疗。这为卵巢癌后期的治疗研究提供了一定的理论以及实验基础。

本研究证实 FOXM1 基因与卵巢癌之间存在一定的关联性,即 FOXM1 在卵巢癌患者血清以及卵巢组织中表达量较高,且与对照组之间存在显著差异。并且通过对比紫杉醇治疗前后卵巢癌患者体内 FOXM1 基因表达量发现,与治疗前相比,治疗后 FOXM1 基因表达量显著降低。这说明,FOXM1 在卵巢癌患者当中含量较正常人高且主要集中于卵巢组织当中。由于时间以及科研条件的限制,本研究对于 FOXM1 在卵巢癌患者体内具体的作用方式并没有进行深入的探究,对于紫杉醇对卵巢癌治疗机制及其对 FOXM1 基因作用机制也没有进行深入研究。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [2] Zhang XY, Zhang PY. Recent perspectives of epithelial ovarian carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5):3055-3058.
- [3] 魏翻艳. FOXM1 与卵巢癌关系的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013, 14(5):469-472.
- [4] 公小迪, 姜斌. FOXM1 转录因子在肿瘤研究中的新进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(1):165-168.
- [5] Yap KL, Fraley SI, Thiaville MM, et al. NAC1 is an actin-binding protein that is essential for effective cytokinesis in cancer cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(16):4085-4096.
- [6] He SY, Shen HW, Xu L, et al. FOXM1 promotes tumor cell invasion and correlates with poor prognosis in early-stage cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2012, 127(3):601-610.
- [7] Wang Z, Ahmad A, Li Y, et al. Forkhead box M1 transcription factor: A novel target for cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 36(2):151-156.
- [8] Ducreux M, Bennouna J, Adenis A, et al. Efficacy and safety of nab-paclitaxel in patients with previously treated metastatic colorectal cancer: a phase II COLO-001 trial [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(1):9-16.
- [9] Kim JE, Park YJ. Paclitaxel-loaded hyaluronan solid nanoemulsions for enhanced treatment efficacy in ovarian cancer [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12:645-658.
- [10] 许宁, 郭志强, 殷丽玲. 紫杉醇联合顺铂腹腔和静脉双途径治疗晚期卵巢癌的临床观察[J]. 当代医学, 2011, 17(1):134-135.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 2010:75-78.
- [12] Smolle E, Taucher V, Haybaeck J, et al. Malignant ascites in ovarian cancer and the role of targeted therapeutics[J]. Anticancer Res, 2014, 34(4):1553-1561.
- [13] Francis RE, Myatt SS, Krol J, et al. FOXM1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer[J]. Inter J Oncol, 2009, 35(1):57-68.
- [14] 宫艳秋, 韩凤娟, 吴效科, 等. 卵巢上皮性癌病因学研究进展[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(1):78-96.
- [15] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Am Chem Soc, 1971, 93(9):2317-2325.
- [16] 罗光华, 郭莉莉, 刘丽华. 紫杉醇与肿瘤免疫的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(2):251-254.
- [17] Lei KJ, Jia YM, Wang J, et al. Effects of CMNa combined with paclitaxel and carboplatin on elevated CA125 levels in post-operation advanced ovarian cancer patients [J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2008, 7(10):600-602.

收稿日期:2017-03-01