

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.001>

· 论著 ·

FOXO1 和 Smad4 对前列腺癌增殖和转移的协同抑制作用

瞿根义, 张玉龙, 徐勇, 阳光, 聂海波

(中南大学湘雅医学院附属株洲医院泌尿外科, 湖南 株洲 412007)

[摘要] 目的: 探讨FOXO1和Smad4协同抑制前列腺癌进展和转移的作用机制。方法: 体外培养前列腺癌PC3细胞, 采用脂质体转染方法将pEGFP-N1, pEGFP-FOXO1, pDsRed2-Smad4分别转染入PC3细胞, 并依次分为pEGFP-N1组、pEGFP-FOXO1组、pDsRed2-Smad4组和pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4组4组, 采用蛋白质印迹法和qPCR检测FOXO1和Smad4的蛋白和mRNA表达, CCK-8法检测细胞增殖活性, 细胞划痕法检测细胞的迁移能力。结果: 质粒成功转染, 与pEGFP-N1组比, pEGFP-FOXO1组、pDsRed2-Smad4组和pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4组PC3细胞增殖能力、迁移能力显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。PC3细胞中过表达FOXO1可以上调Smad4的mRNA和蛋白表达水平, 过表达Smad4可以明显增强FOXO1对PC3细胞增殖和迁移的抑制作用。结论: FOXO1与Smad4在前列腺癌中具有协同抑制前列腺癌增殖及转移的作用。

[关键词] FOXO1; Smad4; 前列腺癌; 协同; 转移

Coordinate repression effect of FOXO1 and Smad4 on proliferation and metastasis of prostate cancer

QU Genyi, ZHANG Yulong, XU Yong, YANG Guang, NIE Haibo

(Department of Urology, Affiliated Zhuzhou Hospital, Xiangya Medical College of Central South University, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract **Objective:** To investigate the mechanism of synergistic inhibition of FOXO1 and Smad4 on prostate cancer progression and metastasis. **Methods:** Prostate PC3 cells were cultured in vitro, and pEGFP-N1, pEGFP-FOXO1 and pDsRed2-Smad4 were transfected into PC3 cells by lipofection. They were divided into 4 groups: pEGFP-N1 group, pEGFP-FOXO1 group, pDsRed2-Smad4 group and pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4 group. The protein and mRNA expressions of FOXO1 and Smad4 were detected by Western blotting and qPCR in the group. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 method, and cell migration ability was detected by cell scratch method. **Results:** The plasmid was successfully transfected. Compared with the pEGFP-N1 group, the cell proliferation and migration ability of the pEGFP-FOXO1 group, pDsRed2-Smad4 group and pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4 group were significantly decreased ($P < 0.05$). Overexpression of FOXO1 in prostate

收稿日期 (Date of reception): 2019-08-01

通信作者 (Corresponding author): 徐勇, Email: tigerhnl@126.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省科技创新计划项目 (2017SK51003); 株洲市科技指导性计划项目 (20180004)。This work was supported by the Science and Technology Innovation Project of Hunan Province (2017SK51003) and Science and Technology Guiding Program of Zhuzhou City, Hunan (20180004), China.

cancer cell PC3 up-regulated the mRNA and protein expression levels of Smad4. Overexpression of Smad4 significantly enhanced the inhibitory effect of FOXO1 on proliferation and migration of PC3 cells. **Conclusion:** FOXO1 and Smad4 have synergistic effects in prostate cancer, synergistically inhibit prostate cancer proliferation and metastasis.

Keywords forkhead transcription factor O1; Smad4; prostate cancer; synergy; metastasis

前列腺癌是导致老年男性死亡的最主要的恶性肿瘤之一,近年来我国前列腺癌的发病率呈明显上升的趋势^[1]。由于前列腺癌早期发病隐匿,且具有侵袭性生长的生物学特性,临床上许多患者在就诊时多已经发生扩散转移。此外,早期局限性前列腺癌患者进行根治性治疗后最后都几乎不可避免复发,并出现远处的侵袭转移^[2]。临床上迄今无法对其进行有效的干预和预防,而前列腺癌侵袭转移机制的不明则是导致这种现状的关键因素之一。

研究^[3-4]表明:叉头状转录因子O1(forkhead transcription factor O1, FOXO1)和Smad4在前列腺癌中均出现低表达,而且均与前列腺癌的恶性程度密切相关。本研究将FOXO1和Smad4作为一个整体研究对象,通过细胞实验,探讨其在前列腺癌进展及侵袭转移过程中的协同作用与分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

前列腺癌PC3细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,人源性pEGFP-N1-FOXO1和pDsRed2-N1-Smad4的荧光质粒购自美国Clontech公司,FOXO1 mRNA引物、Smad4 mRNA引物和 β -actin引物均购自美国Sigma公司,PCR试剂盒购自美国Stratagen公司,TRIzol RNA提取试剂购自美国Invitrogen公司,PCR marker购自德国Qiagen公司,兔抗人FOXO1和Smad4 GAPDH单克隆抗体购自美国Cell Signaling公司。HRP标记的羊抗兔IgG、蛋白质印迹发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

前列腺癌PC3细胞按 5×10^3 个/孔的细胞数量接种于96孔板,24 h后,利用脂质体(lipofectamine[®] 2000)转染方法将pEGFP-N1, pEGFP-FOXO1, pDsRed2-Smad4, pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4分别单独转染或者共同转染入细胞;转染48 h后,使用激光共聚焦显微镜(Carlzeiss LSM510, Jena,

Germany)观察pEGFP和pDsRed的表达,同时采用蛋白质印迹法检测FOXO1和Smad4的表达,鉴定转染效果。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖活性

取对数生长期的细胞接种于96孔板,根据产品说明书,每孔细胞数 4×10^3 个,每个时间点设置5个复孔,分别于转染后0, 24, 48和72 h每孔加入CCK-8 10 μ L,继续培养2~4 h。酶标仪测定450 nm处吸光度值(A),吸光度值越高代表活细胞数越多,增殖活性越强。

1.2.3 细胞划痕法检测细胞的迁移能力

前列腺癌PC3细胞转染后48 h,将 $(5 \sim 10) \times 10^5$ 个/mL的瞬时转染各重组质粒的PC3细胞接种于24孔细胞培养板(500 μ L/孔),以含10%FBS的细胞培养基培养,24 h后形成单层细胞,用10 μ L的无菌白色枪头在单层细胞上划“|”字划痕,PBS洗3次后继续以含10%FBS的细胞培养基进行培养,在划痕后24 h进行拍照,拍照前用PBS洗3次并更换细胞培养基,对比分析检测FOXO1和Smad4协同表达对PC3细胞迁移能力的影响。采集图像测定各组细胞的划痕修复率。划痕修复率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度) $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染效果及鉴定

利用脂质体(lipofectamine[®] 2000)转染方法将pEGFP-N1, pDsRed2-N1, pEGFP-FOXO1, pDsRed2-Smad4分别转染入细胞;转染48 h后,使用激光共聚焦显微镜(Carlzeiss LSM510, Jena, Germany)观察pEGFP和pDsRed的表达,镜下可见FOXO1和Smad4荧光质粒成功转染。同时蛋白质印迹法检测示FOXO1和Smad4显著表达,差异有统计学差异($P < 0.05$),证实转染成功(图1)。

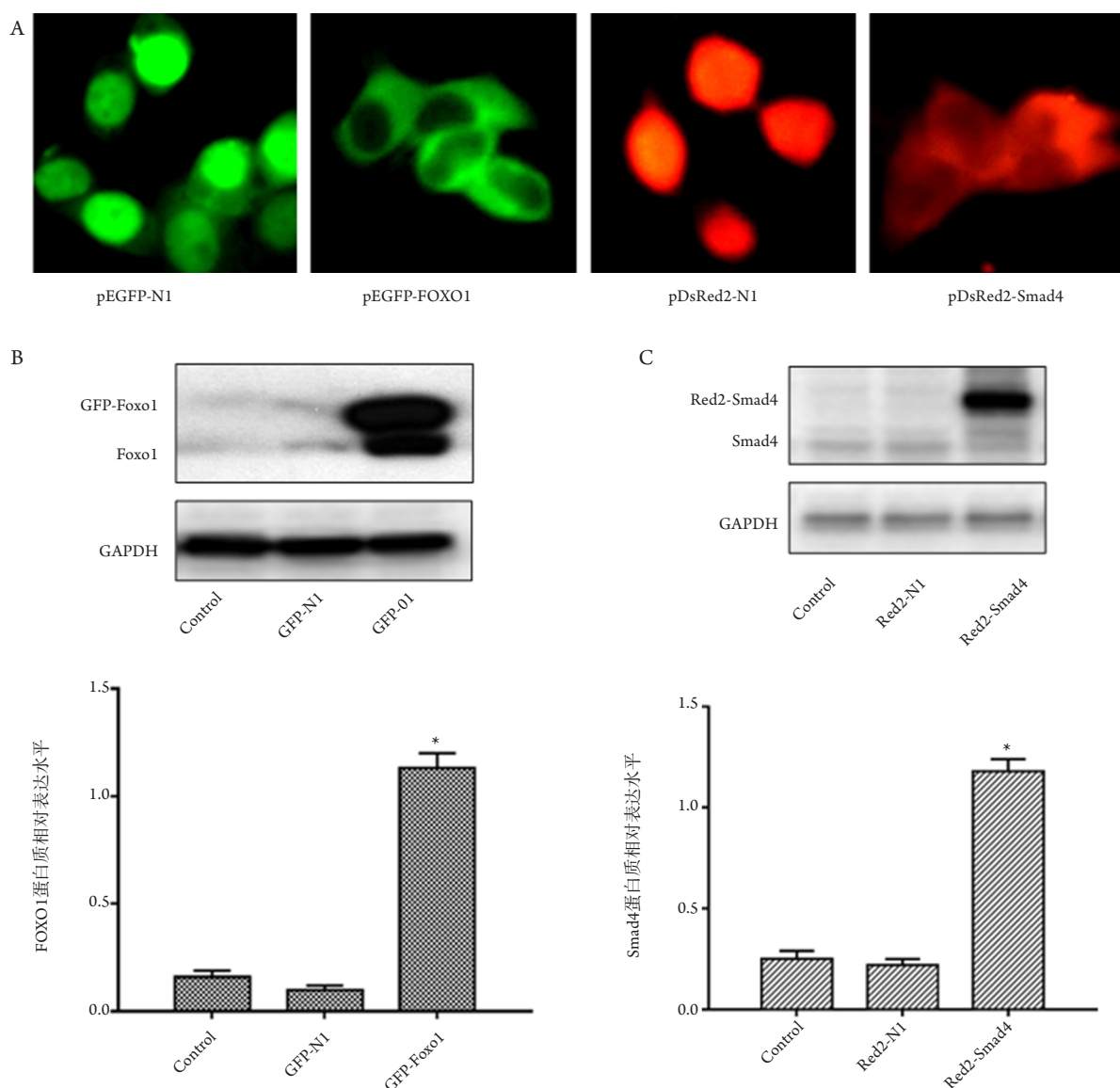


图1 前列腺癌PC3细胞转染效果及鉴定($\times 400$)

Figure 1 Transfection efficiency and identification of prostate cancer PC3 cells ($\times 400$)

(A)显微镜下pEGFP和pDsRed的表达; (B)FOXO1转染效果检测(与Control组比较, $*P<0.05$; 与GFP-N1组比较, $*P<0.05$);

(C)Smad4转染效果检测(与Control组比较, $*P<0.05$; 与Red2-N1组比较, $*P<0.05$)。

(A) Expression of pEGFP and pDsRed under microscope; (B) Detection of FOXO1 transfection effect (compared with the Control group, $*P<0.05$; compared with the GFP-N1 group, $*P<0.05$); (C) Smad4 transfection effect detection (compared with the Control group, $*P<0.05$; compared with the Red2-N1 group, $*P<0.05$).

2.2 FOXO1 和 Smad4 对前列腺癌细胞增殖能力的影响

转染24 h后, 4组前列腺癌细胞吸光度差异无统计学意义($P>0.05$)。在转染48 h和72 h后, pEGFP-FOXO1, pDsRed2-Smad4和pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4组前列腺癌细胞吸光度低于pEGFP-N1组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.3 过表达 FOXO1 对 Smad4 表达的影响

转染48 h后, 通过RT-PCR法和蛋白质印迹法检测对照组、pEGFP-N1和pEGFP-FOXO1组FOXO1和Smad4 mRNA及蛋白表达水平, 结果显示: 通过脂质体转染方法在PC3细胞中瞬时过表达FOXO1, 可以明显升高Smad4的mRNA和蛋白表达水平(图2)。

表1 不同组细胞不同时间点吸光度(450 nm)值比较

Table 1 Comparison of absorbance (450 nm) values of different groups of cells at different time points

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
pEGFP-N1组	0.52 ± 0.05	0.64 ± 0.05	1.57 ± 0.06	2.03 ± 0.08
pEGFP-FOXO1组	0.41 ± 0.04	0.55 ± 0.03	0.80 ± 0.05*	0.95 ± 0.07*
pDsRed2-Smad4组	0.43 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.78 ± 0.06*	0.96 ± 0.07*
pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4组	0.39 ± 0.05	0.45 ± 0.06	0.55 ± 0.07* [#] ^{&}	0.63 ± 0.08* [#] ^{&}

与pEGFP-N1组比较, * $P < 0.05$; 与pEGFP-FOXO1组比较, [#] $P < 0.05$; 与pDsRed2-Smad4组比较, [&] $P < 0.05$ 。

Compared with the pEGFP-N1 group, * $P < 0.05$; compared with the pEGFP-FOXO1 group, [#] $P < 0.05$; compared with the pDsRed2-Smad4 group, [&] $P < 0.05$.

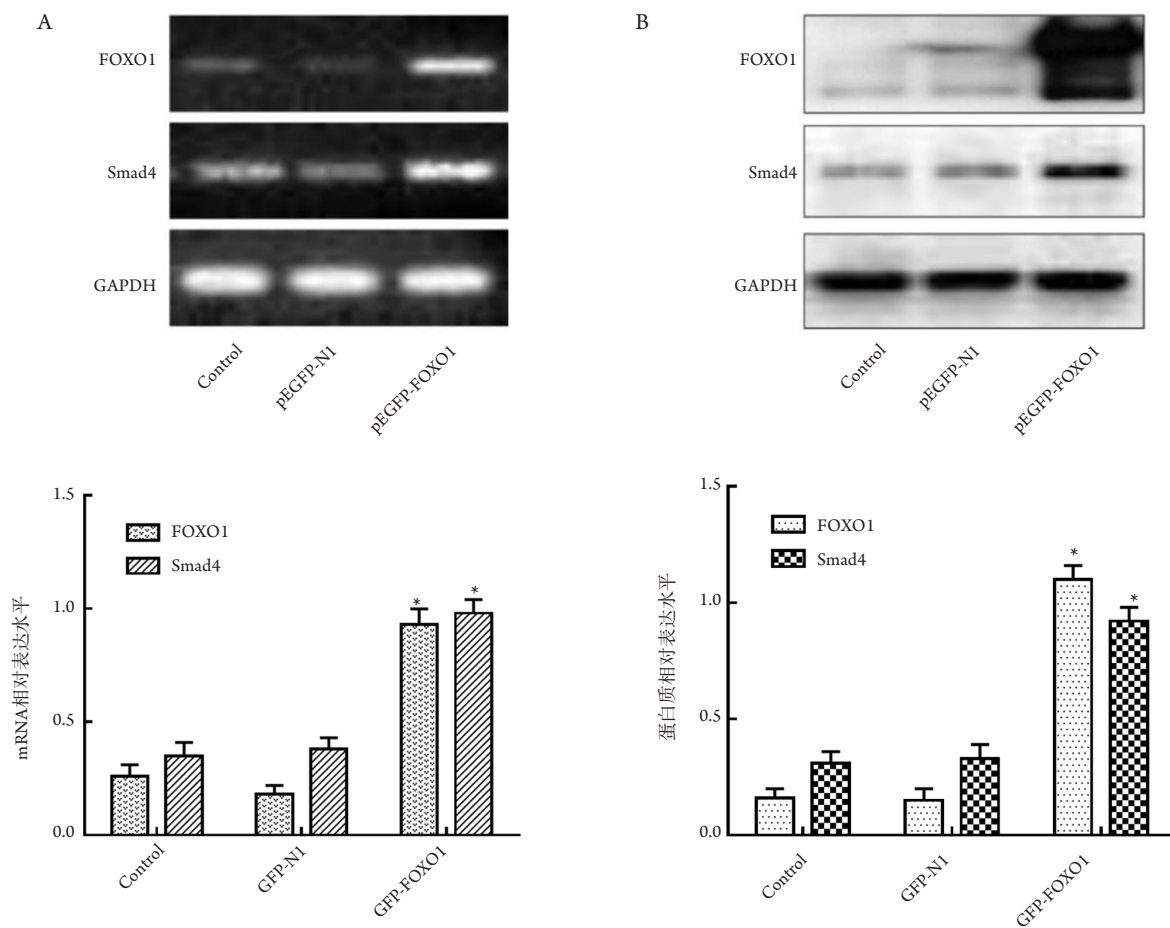


图2 过表达FOXO1对Smad4表达的影响

Figure 2 Effect of overexpression of FOXO1 on Smad4 expression

(A)mRNA表达水平; (B)蛋白质表达水平。与Control组比较, * $P < 0.05$; 与GFP-N1组比较, * $P < 0.05$ 。

(A) mRNA expression level; (B) Protein expression level. Compared with the Control group, * $P < 0.05$; compared with the GFP-N1 group, * $P < 0.05$.

2.4 FOXO1 和 Smad4 对前列腺癌细胞迁移能力的影响

采用划痕修复实验检测对FOXO1和Smad4前列腺癌PC3细胞迁移的调控, 结果显示: pEGFP-FOXO1组修复率为(75.53±3.42)%, pDsRed2-Smad4组修复率为(73.75±3.82)%, pEGFP-FOXO1+pDsRed2-Smad4修复率为(23.65±4.57)%;

而pEGFP-N1组24h修复率为(93.76±2.34)%, 较其他3组差异均有统计学意义($P<0.05$), pEGFP-FOXO1组和pDsRed2-Smad4组修复率差异无统计学意义($P>0.05$)。表明过表达FOXO1和Smad4可以抑制PC3细胞的迁移, 过表达Smad4则可以促进FOXO1对PC3细胞迁移的抑制作用(图3)。

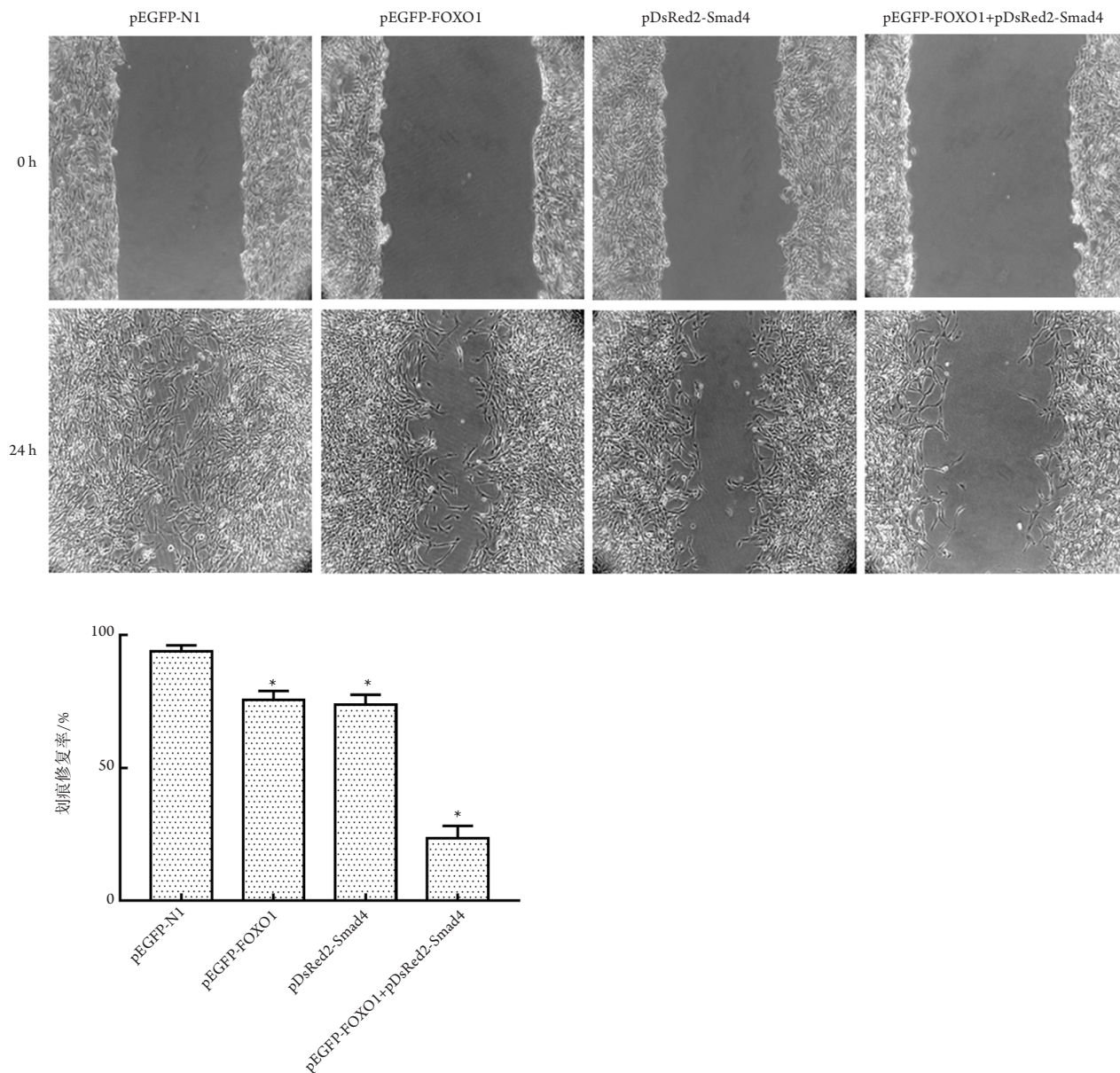


图3 过表达FOXO1和Smad4对前列腺癌细胞迁移能力的影响(与pEGFP-N1组比较, $*P<0.05$)

Figure 3 Effect of overexpression of FOXO1 and Smad4 on migration ability of prostate cancer cells (compared with the pEGFP-N1 group, $*P<0.05$)

3 讨论

叉头蛋白家族成员FOXO1转录因子是PI3K/Akt信号通路调控细胞存活的一个关键底物,在细胞的增殖、发育、凋亡和代谢的过程中发挥重要作用^[5-6]。FOXO1参与了包括前列腺癌在内的等多种癌症的发生发展,与癌症的进展、侵袭与转移密切相关^[7]。前列腺癌的细胞系和临床标本的研究^[3,8]表明:前列腺癌中FOXO1的表达明显降低,与前列腺癌侵袭转移相关,并且与前列腺癌特异性抗原水平、病理T分期、淋巴结转移和Gleason评分即恶性程度密切相关,表明FOXO1在前列腺癌中起到抑基因的作用。

TGF- β 1的表达随前列腺癌的分期、分级的增加而降低,对前列腺癌的发病及进展起负性调控的作用^[9]。成骨蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)可以促进成纤维细胞增殖和成骨细胞生成,并抑制破骨细胞,从而增加骨形成。BMPs在有骨转移前列腺癌中的表达明显高于无骨转移前列腺癌中的表达,且随前列腺癌病理分级、临床分期的增加而升高,与肿瘤的浸润性和转移性密切相关^[10]。Smad超家族是哺乳动物TGF- β /BMP家族信号转导的下游信号蛋白,具有将TGF- β 和BMPs信号由细胞膜转导进入细胞核,并进一步与相关转录因子和基因结合,影响其转录和表达,调控TGF- β 和BMPs的生物学功能。Smad4在TGF- β 和BMPs信号转导过程中发挥核心作用,其异常表达与前列腺癌、胰腺癌等多种肿瘤的发生发展有密切关系^[11-12]。一项前列腺癌的研究^[13]发现Smad4突变率达10%,而且Smad4蛋白表达水平较正常前列腺组织明显减少,与前列腺癌的临床分期、病理分级密切相关:临床分期、病理分级越高,Smad4蛋白表达越少,肿瘤更具浸润性。Smad4可以抑制AR的转录活化并降低前列腺癌特异性抗原的表达,并且可以抑制Smad3诱导的AR转录激活^[14]。前列腺癌跨膜蛋白PMEPA1促进非AR依赖性前列腺癌细胞生长与增殖的作用也与其对Smad4的抑制有关^[15]。Smad4在前列腺癌的进展过程中发挥关键的调控作用^[14]。

FOXO1转录因子可以通过与Smads的相互作用而在TGF- β /BMPs超家族的信号转导过程中起重要的调控作用,且在前列腺癌细胞中的Microarray分析结果显示过表达FOXO1可以增加Smad4 mRNA表达水平^[5,7,13]。本研究结果表明:在前列腺癌细胞PC3中过表达FOXO1可以上调Smad4 mRNA和蛋白表达水平,过表达FOXO1和过表达Smad4均可抑制

前列腺癌PC3细胞增殖和迁移,共同过表达Smad4和FOXO1可进一步抑制PC3细胞增殖和迁移,表明Smad4与FOXO1在前列腺癌中具有协同抑制前列腺癌增殖及转移的作用。

参考文献

1. Sierra MS, Soerjomataram I, Antoni S, et al. Cancer patterns and trends in Central and South America[J]. *Cancer Epidemiol*, 2016, 44(Suppl 1): S23-S42.
2. Syed JS, Javier-Desloges J, Tatzel S, et al. Current management strategy for active surveillance in prostate cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19(2): 11.
3. 瞿根义, 徐勇, 聂海波, 等. 转录因子FOXO1在前列腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2019, 34(4): 293-296.
4. QU Genyi, XU Yong, NIE Haibo, et al. Expression and clinical significance of transcription factor FOXO1 in prostate cancer tissues[J]. *Journal of Clinical Urology*, 2019, 34(4): 293-296.
4. 李丹丹, 王迎宾. 前列腺癌组织中Smad4、p53蛋白的表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(8): 914-915.
5. LI Dandan, WANG Yingbin. Expression of Smad4 and p53 proteins in prostate cancer and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 31(8): 914-915.
5. Coomans de Brachene A, Demoulin JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(6): 1159-1172.
6. Kim S, Koh H. Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, 49(4): 335-341.
7. Yang Y, Blee AM, Wang D, et al. Loss of FOXO1 Cooperates with TMPRSS2-ERG overexpression to promote prostate tumorigenesis and cell invasion[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6524-6537.
8. Tan Y, Wang L, Du Y, et al. Inhibition of BRD4 suppresses tumor growth in prostate cancer via the enhancement of FOXO1 expression[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(6): 2503-2517.
9. Zhang Q, Chen L, Helfand BT, et al. TGF-beta regulates DNA methyltransferase expression in prostate cancer, correlates with aggressive capabilities, and predicts disease recurrence[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25168.
10. Nishimori H, Ehata S, Suzuki HI, et al. Prostate cancer cells and bone stromal cells mutually interact with each other through bone morphogenetic protein-mediated signals[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(24): 20037-20046.
11. Sun B, Fan Y, Yang A, et al. MicroRNA-539 functions as a tumour suppressor in prostate cancer via the TGF-beta/Smad4 signalling

- pathway by down-regulating DLX1[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 5934-5948.
12. Liang C, Xu J, Meng Q, et al. TGFB1-induced autophagy affects the pattern of pancreatic cancer progression in distinct ways depending on SMAD4 status[J]. Autophagy, 2020, 16(3): 486-500.
 13. Ding Z, Wu CJ, Chu GC, et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression[J]. Nature, 2011, 470(7333): 269-273.
 14. Valkenburg KC, De Marzo AM, Williams BO. Deletion of tumor suppressors adenomatous polyposis coli and Smad4 in murine luminal epithelial cells causes invasive prostate cancer and loss of androgen receptor expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80265-80277.
 15. Liu R, Zhou Z, Huang J, et al. PMEPA1 promotes androgen receptor-negative prostate cell proliferation through suppressing the Smad3/4-c-Myc-p21 Cip1 signaling pathway[J]. J Pathol, 2011, 223(5): 683-694.

本文引用: 瞿根义, 张玉龙, 徐勇, 阳光, 聂海波. FOXO1和Smad4对前列腺癌增殖和转移的协同抑制作用[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(7): 1625-1631. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.001

Cite this article as: QU Genyi, ZHANG Yulong, XU Yong, YANG Guang, NIE Haibo. Coordinate repression effect of FOXO1 and Smad4 on proliferation and metastasis of prostate cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(7): 1625-1631. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.001