

## 沉默FOXC1基因对人胰腺癌细胞增殖的影响

喻超, 江建新, 孙诚谊

### 背景资料

胰腺癌高度恶性、预后较差, 5年生存率不到5%; 大多数患者因确诊时伴有局部和/或远处的侵袭转移而丧失手术时机, 即使行根治性切除术, 效果也不理想, 胰腺癌的早期转移、极易复发及化疗耐药是其致死的关键因素。所以, 研究促进胰腺癌发生发展的关键分子, 对治疗胰腺癌具有重要意义。

喻超, 江建新, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001  
喻超, 副主任医师, 主要从事肝胆胰腺疾病的基础与临床研究。国家国际科技合作专项基金资助项目, No. 2014DFA31420  
国家自然科学基金资助项目, No. 81160311  
贵州省卫生计生委科学技术基金资助项目, No. gzwjkj2014-2-112  
作者贡献分布: 主要实验、资料分析、统计及文章撰写由喻超完成; 研究设计、文章修改及审阅由江建新与孙诚谊完成。  
通讯作者: 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。sunchengyi2014@163.com  
收稿日期: 2015-01-07 修回日期: 2015-02-11  
接受日期: 2015-03-06 在线出版日期: 2015-04-18

### Effect of siRNA-mediated FOXC1 gene silencing on proliferation of pancreatic cancer cells

Chao Yu, Jian-Xin Jiang, Cheng-Yi Sun

Chao Yu, Jian-Xin Jiang, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Supported by: International Science & Technology Cooperation Program of China, No. 2014DFA31420; National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; Guizhou Provincial Health and Family Planning Commission of Science and Technology Fund, No. gzwjkj2014-2-112

Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. sunchengyi2014@163.com

Received: 2015-01-07 Revised: 2015-02-11

Accepted: 2015-03-06 Published online: 2015-04-18

### 同行评议者

刘亮, 副主任医师, 复旦大学胰腺癌研究所, 复旦大学附属肿瘤医院胰腺肝胆外科

### Abstract

**AIM:** To investigate small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of fork head box protein C1 (FOXC1) gene on the proliferation

human pancreatic cancer Capan-2 and PANC-1 cells and to explore the possible underlying mechanisms.

**METHODS:** Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to examine the expression of FOXC1 mRNA in pancreatic cancer cell lines and primary carcinoma tissues from human patients. The human pancreatic cancer cells were divided into two groups: an FOXC1 siRNA group (experimental group) and an NC siRNA group (negative control group). qRT-PCR and Western blot were used to detect FOXC1 mRNA and protein expression in pancreatic cancer cells and to determine proliferation rate after transfection with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). Flow cytometry was used to examine cell cycle distribution. Western blot analysis was used to detect the expression of cell cycle related proteins P21, P53, and Cyclin D1.

**RESULTS:** FOXC1 mRNA expression in pancreatic cancer cells and pancreatic cancer tissues were significantly higher than in normal epithelial cells and matched tumor adjacent pancreatic tissue, respectively ( $P < 0.05$ ). qRT-PCR and Western blot analysis showed that FOXC1 siRNA effectively silenced the transcription and expression of FOXC1 in pancreatic cancer cells. EdU cell proliferation experiments showed that compared with the control group, silencing FOXC1 gene expression in pancreatic cancer cells significantly decreased cell proliferation ( $P < 0.05$ ). FCM results showed that compared with the control group, FOXC1 silencing arrested the tumor cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

phase ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that compared with the control group, Cyclin D1 expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while P21 and P53 expression was unchanged.

**CONCLUSION:** FOXCI siRNA can effectively silence the FOXCI gene expression in human pancreatic cancer Capan-2 PANC-1 cells. FOXCI silencing inhibits pancreatic cancer cell proliferation and arrests cell cycle in  $G_0/G_1$  phase, suggesting that FOXCI alters cell proliferation possibly by regulation of the cell cycle through, in part, regulating the expression of Cyclin D1.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** FOXCI gene; Small interfering RNA; Pancreatic cancer; Proliferation

Yu C, Jiang JX, Sun CY. Effect of siRNA-mediated FOXCI gene silencing on proliferation of pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(11): 1712-1720 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1712.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i11.1712>

## 摘要

**目的:** 研究小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默人胰腺癌Capan-2、PANC-1细胞中叉头框蛋白C1(fork head box C1, FOXCI)基因对胰腺癌细胞增殖能力的影响及作用机制。

**方法:** 以胰腺癌细胞、原发胰腺癌组织为研究对象, 实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测FOXCI mRNA在胰腺癌细胞及组织中的表达情况; 将人胰腺癌细胞分为2组: FOXCI siRNA组(实验组)、NC siRNA组(阴性对照组), 脂质体转染法将FOXCI siRNA转染入胰腺癌细胞, qRT-PCR、Western blot技术检测胰腺癌细胞FOXCI mRNA及蛋白表达变化, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)细胞增殖法检测各组胰腺癌细胞增殖情况; 流式细胞技术(flow cytometry, FCM)检测各组胰腺癌细胞的周期分布, Western blot技术分析周期相关蛋白P21、P53、Cyclin D1蛋白表达情况。

**结果:** qRT-PCR结果提示: 相比正常胰腺

上皮细胞和癌旁胰腺组织, FOXCI mRNA在胰腺癌细胞及胰腺癌组织中表达较高( $P < 0.05$ ); qRT-PCR及Western blot结果显示FOXCI siRNA有效沉默了胰腺癌细胞FOXCI基因的转录和表达, EdU细胞增殖实验提示: 沉默了胰腺癌细胞FOXCI基因表达后, 胰腺癌细胞增殖能力明显下降, 较阴性对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); FCM结果显示: 沉默了胰腺癌细胞FOXCI基因表达后胰腺癌细胞被阻滞在 $G_0/G_1$ 期, 较阴性对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); Western blot结果显示: 较阴性对照组, P21、P53表达水平无明显变化, Cyclin D1表达水平下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:** FOXCI siRNA能够有效沉默人胰腺癌Capan-2、PANC-1细胞FOXCI基因的表达, 抑制其增殖, 将细胞周期阻滞于 $G_0/G_1$ 期, 提示FOXCI影响细胞增殖可能是通过调控细胞周期实现的, 其机制可能是部分通过调控细胞周期蛋白Cyclin D1的表达而实现。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** FOXCI基因; 小干扰RNA; 胰腺癌; 增殖

**核心提示:** 本研究采用小干扰RNA技术, 有效沉默了胰腺癌细胞中转录因子叉头框蛋白C1(fork head box C1, FOXCI)基因表达, 阻滞细胞周期于 $G_0/G_1$ 期, 抑制了胰腺癌细胞的增殖, 其机制可能部分通过调控细胞周期蛋白Cyclin D1的表达而实现, 可能为胰腺癌治疗提供参考靶点和理论依据。

喻超, 江建新, 孙诚谊. 沉默FOXCI基因对人胰腺癌细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23(11): 1712-1720 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1712.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i11.1712>

## 0 引言

胰腺癌恶性程度高, 预后差, 5年生存率不足5%, 其发生和发展与多种因素相关, 而多基因改变被认为是维持其恶性生物学行为的主要原因<sup>[1-7]</sup>。肿瘤细胞的主要生物学特征之一是细胞的异常增殖, 这也是决定肿瘤恶性生物学行为的一个重要参数。肿瘤细胞的异常增殖与肿瘤的浸润、转移以及肿瘤复发等行为

## 研究前沿

叉头框蛋白C1(fork head box C1, FOXCI)基因是一种转录因子, 早期对FOXCI的研究发现, 其主要与Axenfeld-Rieger综合症和胚胎发育有关; 近年来, 越来越多的研究发现FOXCI与肿瘤的发生、发展密切相关。FOXCI基因在胰腺癌中的作用却知之甚少。

**□ 相关报道**  
有研究报道, FOXCI基因高表达者颅内无瘤生存期显著缩短, 此外, FOXCI的异位表达可增强肿瘤侵袭性, 加快细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程, 应用shRNA敲除基底细胞样乳腺癌细胞中内源性高表达的FOXCI后, 肿瘤丧失侵袭性行为。

密切相关。因此, 抑制肿瘤增殖一直是肿瘤学研究的热点。转录因子叉头框蛋白C1(fork head box C1, FOXCI)是叉头框转录因子基因家族(FOX家族)的一员, FOX家族蛋白参与许多细胞生物学进程, 在胚胎发育和肿瘤发生发展中发挥重要作用, 参与乳腺癌<sup>[8,9]</sup>、胃癌<sup>[10]</sup>等的发生与发展, 但在胰腺癌中的报告很少。本研究以胰腺癌细胞和组织为研究对象, 通过实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测FOXCI基因的表达情况, 并通过小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默胰腺癌细胞中FOXCI基因表达, 观察其对胰腺癌细胞增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制, 为胰腺癌的基因诊断与治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞系: Capan-2、PANC-1购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC); 人胰腺导管上皮(HPDE)细胞(来源: Ontario Cancer Institute, Ontario, Canada), 原代人正常胰腺上皮细胞(Normal Epithelia, 来源: 上海睿星生物公司); 原发性胰腺癌组织: 住院并接受手术切除的胰腺癌组织和癌旁对应无瘤组织18例, 全部标本均经组织学确诊, 实验的设计与实施, 符合伦理学要求。胎牛血清购自美国Gibco公司; 逆转录(RT)试剂盒、聚合酶链反应(PCR)相关SYBR Premix试剂、FOXCI上游、下游引物购自宝生物工程(大连)有限公司; Lipofectamine2000购自Invitrogen公司; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)试剂盒, FOXCI siRNA购自广州市锐博生物科技有限公司, siRNA序列如下: 靶序列: 5'-CCAGTGAACGGGAATAGTA-3'; 正义链: 5'-CCAGUGAACGGGAUAGUAdTdT-3'反义链: 5'-dTdT GGUCACUUGCCCUUAUCAU-3'; FOXCI、GAPDH一抗购自Abcam公司; Cyclin D1、P53、P21一抗购自武汉博士德生物技术公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自Santa Cruz公司; 激光扫描共聚焦显微镜LSM710型(德国 ZEISS)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** Capan-2、PANC-1细胞常规

培养; HPDE, Normal Epithelia细胞培养在含有10%胎牛血清的CS-C培养基中<sup>[11,12]</sup>, 细胞培养在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内, 根据细胞的生长情况2-3 d更换新鲜培养基继续培养或细胞传代培养。

**1.2.2 qRT-PCR检测胰腺癌细胞及胰腺癌组织FOXCI mRNA表达:** 参考文献[13]: TRIzol法提取胰腺癌Capan-2和PANC-1细胞及18对原发性胰腺癌组织总RNA, 检测RNA的A<sub>260/280</sub>值为1.8-2.0之间为RNA样品合格。按宝生物(大连)工程有限公司提供的PCR反应步骤检查FOXCI mRNA的表达。PCR检测系统为BIO-RED公司, 采用两步法PCR扩增标准程序上机操作, 反应结束后确认FOXCI的扩增曲线和融解曲线, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算FOXCI mRNA相对表达量:

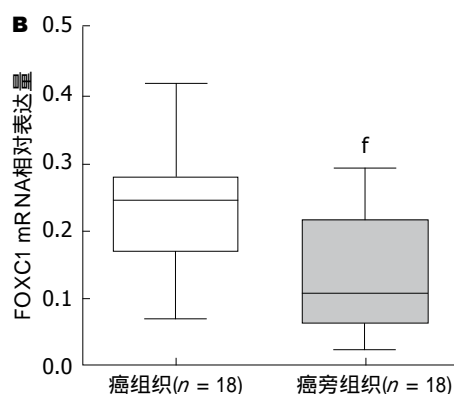
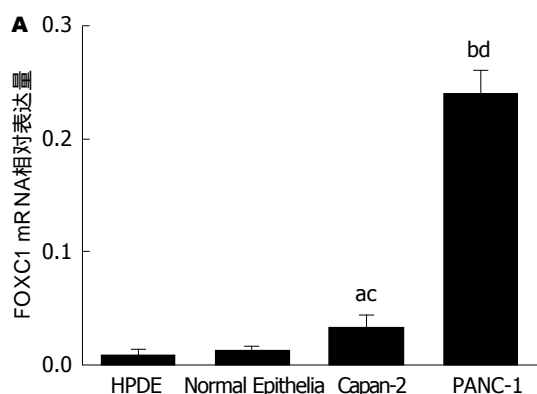
$Ct = Ct_{\text{待测基因}} - Ct_{U6}$ ; 2<sup>-ΔΔCt</sup>即为各实验组待测基因的相对表达量。

**1.2.3 FOXCI siRNA转染与验证:** 取对数生长期的Capan-2与PANC-1细胞, 胰酶消化后, 用10%FBS培养液重悬, 细胞接种于6孔板。根据说明书建议, 将siRNA浓度稀释为50 nmol/L, 用脂质体转染法转染siRNA, qRT-PCR及Western blot验证胰腺癌细胞FOXCI基因的沉默效率。

**1.2.4 EdU细胞增殖检测实验:** EdU是一种人工合成的胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在DNA复制时期代替胸腺嘧啶渗入正在合成的DNA分子中, 其连有的炔基基团在天然化合物中极少见, EdU可与荧光染料Apollo产生特异性反应, 根据Apollo染料的荧光数量即可直观地观察到细胞DNA的复制活性, 了解细胞增殖情况<sup>[14,15]</sup>。分别将NC siRNA组及FOXCI siRNA组接种于共聚焦培养皿, 100 μL 50 μmol/L EdU培养液孵育2 h, 4%多聚甲醛固定, 50 μL 2 mg/mL甘氨酸溶液脱色, 分步Apollo、Hoechst染色反应液染色, 激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照记录, 图像Merge后, 计算Apollo染色阳性细胞与Hoechst染色阳性细胞的比值, *t*检验分析组间差异。

**1.2.5 流式细胞技术检测细胞周期分布:** 胰酶消化对数生长期的各组人胰腺癌细胞, 收集到离心管中, 室温离心(1000 r/min, 5 min)收集细胞, 用4℃预冷的PBS重悬洗涤细胞2次后, 加入200 μL PBS重悬细胞, 缓慢滴加1.5 mL预冷处理的无水乙醇, 最后放置在-20℃固定过夜。





**创新亮点**  
文献报道FOXCI基因能促进肿瘤的血管生成和侵袭转移, 加快肿瘤的EMT进程, 而本研究发现胰腺癌组织及细胞中FOXCI基因高表达, 与胰腺癌细胞的恶性增殖密切相关。

图1 FOXCI mRNA在胰腺癌细胞及组织中相对表达量. A: FOXCI mRNA在2株正常胰腺上皮细胞及胰腺癌Capan-2、PANC-1细胞中相对表达量. B: FOXCI mRNA在18对胰腺癌及对应癌旁组织中相对表达量. <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs HPDE; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Normal Epithelia; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs 癌组织.

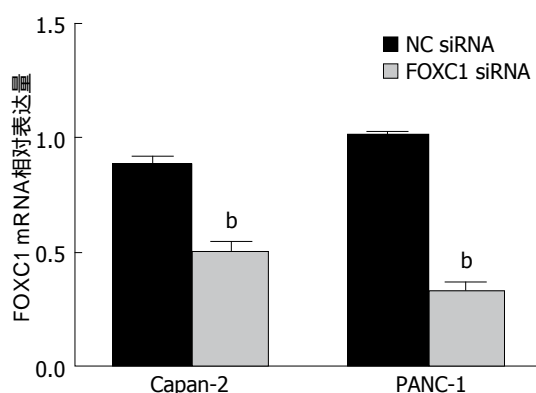


图2 qRT-PCR验证FOXCI siRNA转染后对FOXCI mRNA表达水平的改变. <sup>b</sup> $P<0.01$  vs NC siRNA.

第2天, 取出存放的固定好的细胞, 离心(1000 r/min, 4 °C, 5 min)收集细胞, 4 °C预冷的PBS洗2次, 500  $\mu$ L PBS重悬细胞, 然后加入终浓度为50  $\mu$ g/mL的RNA酶及碘化丙啶(propidium iodide, PI), 室温条件下避光反应30 min. 用300目筛网过滤得单细胞悬液, 流式仪检测细胞周期的分布, 采用CellQuest和ModFit软件分析实验结果, 每组细胞设置3个复孔.

**1.2.6 Western blot检测FOXCI基因沉默对胰腺癌细胞增殖相关蛋白的影响:** Western blot法检测胰腺癌细胞生长相关通路蛋白P21、P53及Cyclin D1的表达, 初步探讨FOXCI基因沉默对胰腺癌细胞增殖抑制的机制, 收集各组细胞, 裂解后提取总蛋白, BCA法检测蛋白浓度后, 蛋白上样量50  $\mu$ g, 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 电转至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭, 按抗体使用说明用5%脱脂奶粉稀释一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗3次, 每次15 min. 加入对应的HRP标记的二抗室温孵育1 h. TBST洗3次,

每次15 min, ECL发光, 曝光机上曝光, 根据曝光结果可调整曝光时间, 采集图像后用图像分析软件Image J进行灰度分析, 以GAPDH作为内参.

**统计学处理** 实验结果数据采用SPSS19.0进行统计分析, 以mean $\pm$ SD记录, 组间差异采用 $t$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义. 所有实验重复3次.

## 2 结果

**2.1 FOXCI mRNA在人胰腺癌细胞及正常胰腺癌组织中表达** 采用qRT-PCR检测目的基因FOXCI mRNA在2株人胰腺癌Capan-2和PANC-1细胞及2株正常胰腺上皮细胞(HPDE、Normal Epithelia)中表达情况, 结果显示, FOXCI mRNA在胰腺癌细胞中的相对表达量比正常胰腺上皮细胞低, 两组之间差异有统计学意义(图1A). 同时, 检测18例原发性胰腺癌组织和癌旁对应无瘤组织FOXCI mRNA表达情况, 结果显示, FOXCI mRNA在胰腺癌组织中表达比正常胰腺组织中高, 两组之间差异有统计学意义(图1B).

**2.2 FOXCI siRNA转染后FOXCI mRNA及蛋白验证** 人胰腺癌Capan-2和PANC-1细胞转染FOXCI siRNA后48 h, 采用qRT-PCR检测目的基因FOXCI mRNA的表达情况, 判断沉默效果, 实验组较阴性对照组, 2株胰腺癌细胞FOXCI mRNA的表达量均减少 $>70\%$ , 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图2). 同时, 采用Western blot进一步检测目的基因FOXCI蛋白的表达情况, 结果与qRT-PCR一致, 2株胰腺癌细胞FOXCI蛋白的表达量减少分别达72.56%和78.23%, 差异有统计

## 应用要点

研究发现FOXCI在胰腺癌中是一种癌基因, 其过表达会促进胰腺癌细胞增殖, 可望为胰腺癌的基因诊断和生物靶向治疗提供新的思路。

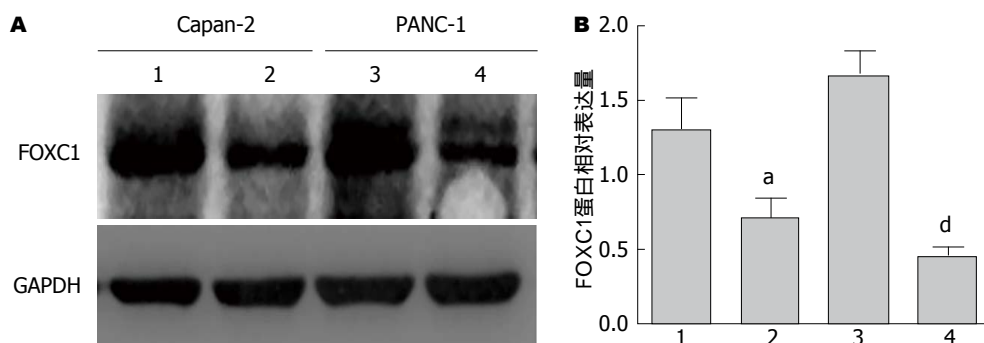


图3 Western blot验证FOXCI siRNA转染后对胰腺癌细胞FOXCI蛋白表达。A: Western blot结果; B: FOXCI蛋白相对表达量。1: Capan-2细胞阴性对照组; 2: Capan-2细胞FOXCI siRNA组; 3: PANC-1细胞阴性对照组; 4: PANC-1细胞FOXCI siRNA组。<sup>a</sup> $P<0.05$  vs Capan-2细胞阴性对照组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs PANC-1细胞阴性对照组。

学意义( $P<0.05$ , 图3)。

**2.3 EdU检测siRNA沉默胰腺癌细胞FOXCI基因表达后对其增殖能力的影响** 人胰腺癌Capan-2和PANC-1细胞转染FOXCI siRNA后48 h, 采用EdU检测siRNA沉默胰腺癌细胞增殖情况, FOXCI siRNA能够明显抑制胰腺癌Capan-2和PANC-1细胞增殖, 实验组较阴性对照组, 胰腺癌增殖细胞分别减少38.23%和42.17%, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图4)。

**2.4 流式细胞术检测siRNA沉默胰腺癌细胞FOXCI基因的表达后引起对人胰腺癌细胞周期分布的影响** 与阴性对照组比较, 两株胰腺癌细胞FOXCI siRNA组细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>细胞周期的细胞比例均明显增高, S期、G<sub>2</sub>/M期所占比例均减少, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ) (图5)。

**2.5 Western blot验证FOXCI基因沉默对周期相关蛋白的影响** 采用Western blot检测胰腺癌细胞生长相关通路蛋白, 内源性P21、P53及Cyclin D1的表达, 初步探讨FOXCI基因沉默对胰腺癌细胞增殖抑制的可能机制, 以GAPDH作为内参, 与阴性对照组比较, 结果显示, FOXCI siRNA组Cyclin D1的表达明显被抑制, 蛋白表达量分别下降了86.23%和52.71%, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ) (图6)。

### 3 讨论

转录因子FOXCI属于FOXC亚族, 该亚族目前发现2个成员, 分别为FOXCI和FOXC2, FOXCI基因位于染色体6p25, 全长3500 bp, 仅包含一个长于1600 bp的外显子, 编码的蛋白含553个氨基酸残基, 蛋白产物FOXCI从N端至C端依次为转录激活区(active domain 1, AD1)、叉

头区(forkhead domain, FHD)、抑制区/磷酸化区和转录激活区(active domain 2, AD2)<sup>[16]</sup>, 在叉头区内的两端各有一个核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 其中C端为经典NLS基序。早期对FOXCI的研究发现, 其主要与Axenfeld-Rieger综合征和胚胎发育有关<sup>[17-20]</sup>, 近年来的研究表明, FOXCI在肿瘤发生、发展中发挥重要作用。Hayashi等<sup>[21]</sup>发现FOXCI与Notch信号和血管内皮生长因子相互作用多步骤地调节血管基因的表达, 诱导肿瘤血管生成。Ray等<sup>[9]</sup>研究发现, FOXCI mRNA高表达者颅内无瘤生存期显著缩短, 此外, FOXCI的异位表达可诱导肿瘤侵袭性增强, 如促进细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程, 而EMT正是肿瘤细胞从原位向远处迁移和侵袭的重要细胞生物学机制<sup>[22,23]</sup>。应用shRNA敲除基底细胞样乳腺癌细胞中内源性高表达的FOXCI后, 肿瘤丧失侵袭性行为。

然而, FOXCI基因在胰腺癌中的作用却知之甚少, 首先, 我们应用qRT-PCR检测FOXCI基因在原发性胰腺癌组织及胰腺癌细胞中的表达情况, 我们发现, FOXCI在原发性胰腺癌组织及胰腺癌细胞中均高表达, 说明其可能跟胰腺癌的发生、发展相关, 为了进一步探讨FOXCI在胰腺癌中的具体作用, 我们通过siRNA技术, 沉默胰腺癌细胞FOXCI基因表达, 发现胰腺癌细胞的增殖受到明显抑制。细胞的增殖和细胞周期密切相关<sup>[24-26]</sup>。癌细胞和正常细胞一样细胞周期依次包括G<sub>0</sub>期、G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期、M期。S期为DNA合成期、M期为细胞分裂期、G<sub>1</sub>-S期的转换是细胞周期中的关键调节点, 外界因素影响干扰癌细

**同行评价**  
FOXC1基因在胰腺癌中的研究甚少, 其上下游调控机制尚未完全明确, 本文在揭示胰腺癌的进展机制方面具有一定的意义, 可能为治疗提供参考靶点和理论依据。

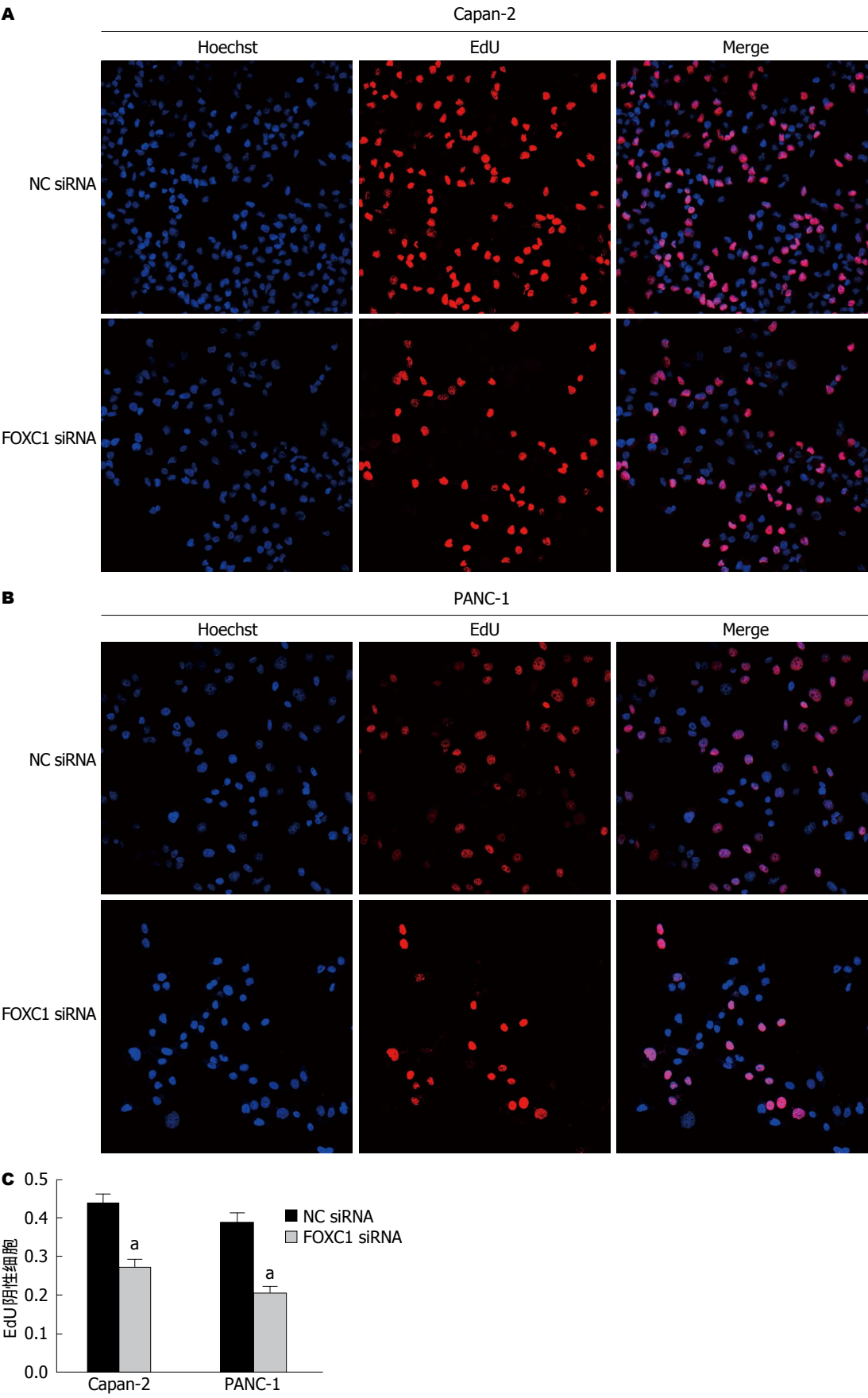


图 4 EdU检测siRNA沉默FOXC1基因表达后, 胰腺癌细胞增殖情况. A: 胰腺癌Capan - 2细胞; B: 胰腺癌PANC - 1细胞; C: 实验重复3次后定量统计结果. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NC siRNA. 红色为Apollo染色阳性, 代表处于增殖期的细胞; 蓝色为Hoechst染色阳性, 代表所有的细胞.

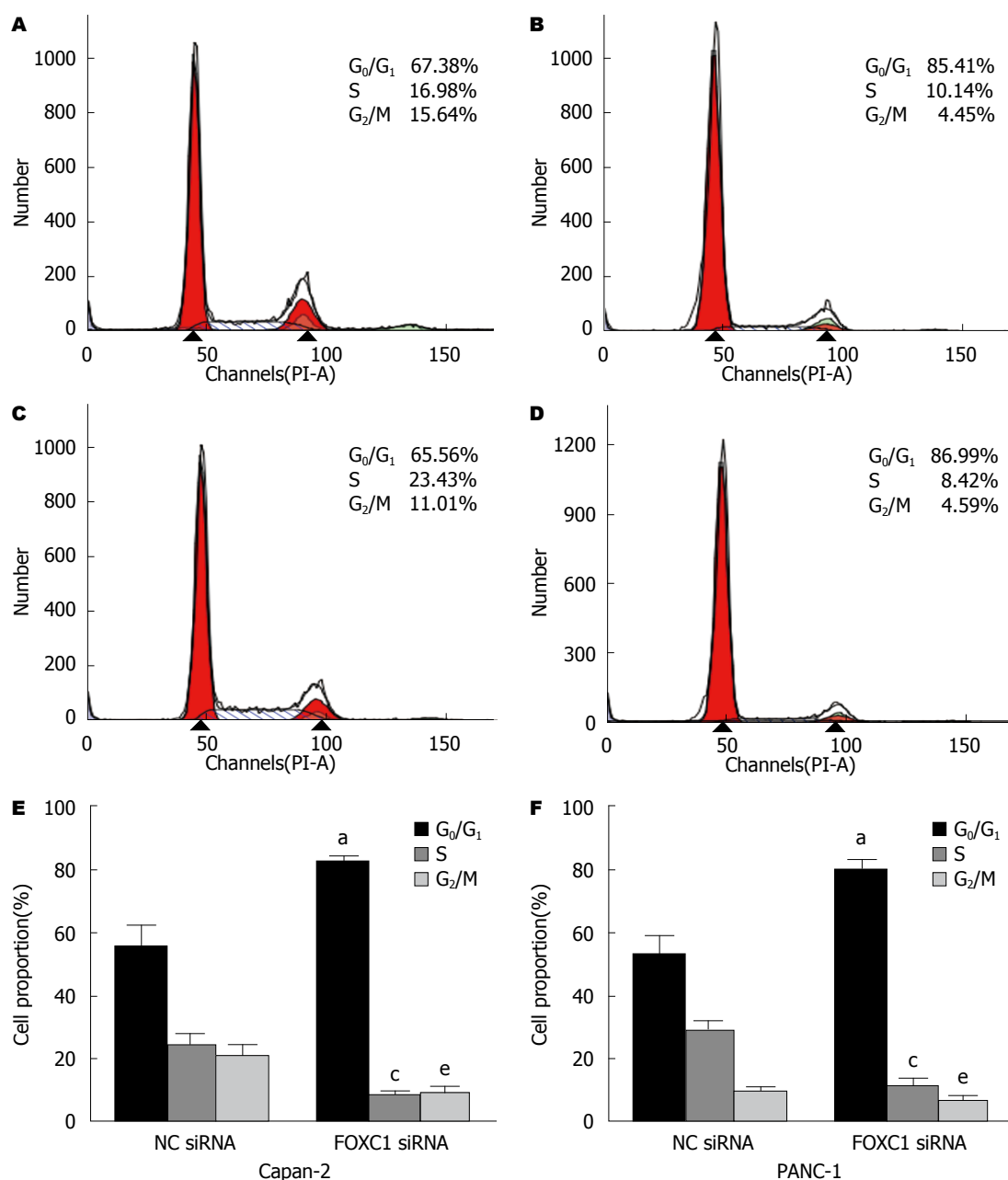


图 5 流式细胞术检测siRNA沉默FOXC1基因表达后, 胰腺癌细胞周期分布情况. A: Capan-2细胞阴性对照组; B: Capan-2细胞FOXC1 siRNA组; C: PANC-1细胞阴性对照组; D: PANC-1细胞FOXC1 siRNA组; E: Capan-2细胞周期分布统计图; F: PANC-1细胞周期分布统计图. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NC siRNA G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs NC siRNA S期; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs NC siRNA G<sub>2</sub>/M期.

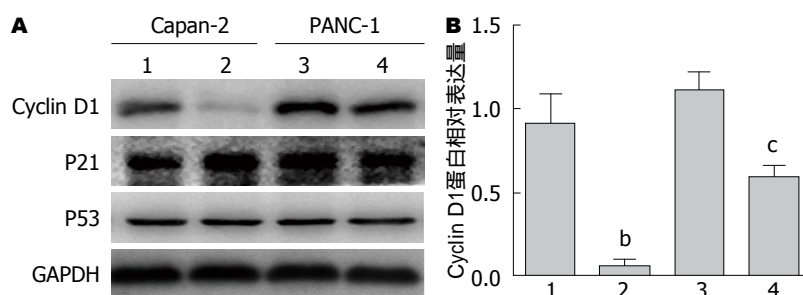


图 6 Western blot验证FOXC1基因沉默对细胞周期相关蛋白的影响. A: Western blot结果; B: Cyclin D1蛋白相对表达量. 1: Capan-2细胞阴性对照组; 2: Capan-2细胞FOXC1 siRNA组; 3: PANC-1细胞阴性对照组; 4: PANC-1细胞FOXC1 siRNA组. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Capan-2细胞阴性对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs PANC-1细胞阴性对照组.



胞G<sub>1</sub>-S期转换都可能影响到细胞周期的进行, 抑制癌细胞的增殖<sup>[27,28]</sup>, 我们通过流式细胞周期分析进一步发现siRNA沉默胰腺癌细胞FOXC1基因表达后, 细胞被阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并通过Western blot验证细胞周期相关的几个蛋白P53、P21、Cyclin D1的表达变化, 我们发现周期蛋白Cyclin D1的表达明显受到抑制。Cyclin D1是细胞周期蛋白中的一员, 主要负责细胞周期的G<sub>1</sub>-S期的转换, 是公认的癌基因<sup>[29-31]</sup>。可见, FOXC1影响胰腺癌细胞的增殖机制可能是部分通过调控细胞周期蛋白Cyclin D1而实现的。

总之, 本研究发现FOXC1在胰腺癌中是作为癌基因形式存在, 并通过调控细胞周期蛋白Cyclin D1的表达影响胰腺癌细胞的增殖, 这为胰腺癌的基因诊断和生物靶向治疗提供新的思路。

#### 4 参考文献

- 1 Danovi SA, Wong HH, Lemoine NR. Targeted therapies for pancreatic cancer. *Br Med Bull* 2008; 87: 97-130 [PMID: 18753179 DOI: 10.1093/bmb/ldn027]
- 2 Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, Li N, Zhao P, Li GL, Wu LY, He J. Report of incidence and mortality in china cancer registries, 2008. *Chin J Cancer Res* 2012; 24: 171-180 [PMID: 23359321 DOI: 10.1007/s11670-012-0171-2]
- 3 Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* 2010; 7: e1000267 [PMID: 20422030 DOI: 10.1371/journal.pmed.1000267]
- 4 Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 897-909 [PMID: 12459728 DOI: 10.1038/nrc949]
- 5 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 9-29 [PMID: 24399786 DOI: 10.3322/caac.21208]
- 6 Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 2013; 62: 317-326 [PMID: 23112132 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303588]
- 7 Rochefort MM, Ankeny JS, Kadera BE, Donald GW, Isacoff W, Wainberg ZA, Hines OJ, Donahue TR, Reber HA, Tomlinson JS. Impact of tumor grade on pancreatic cancer prognosis: validation of a novel TNMG staging system. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 4322-4329 [PMID: 23943022 DOI: 10.1245/s10434-013-3159-3]
- 8 Ray PS, Bagaria SP, Wang J, Shamonki JM, Ye X, Sim MS, Steen S, Qu Y, Cui X, Giuliano AE. Basal-like breast cancer defined by FOXC1 expression offers superior prognostic value: a retrospective immunohistochemical study. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3839-3847 [PMID: 21424368 DOI: 10.1245/s10434-011-1657-8]
- 9 Ray PS, Wang J, Qu Y, Sim MS, Shamonki J, Bagaria SP, Ye X, Liu B, Elashoff D, Hoon DS, Walter MA, Martens JW, Richardson AL, Giuliano AE, Cui X. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 3870-3876 [PMID: 20406990 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4120]
- 10 Xu Y, Shao QS, Yao HB, Jin Y, Ma YY, Jia LH. Overexpression of FOXC1 correlates with poor prognosis in gastric cancer patients. *Histopathology* 2014; 64: 963-970 [PMID: 24329718 DOI: 10.1111/his.12347]
- 11 Xiao J, Peng F, Yu C, Wang M, Li X, Li Z, Jiang J, Sun C. microRNA-137 modulates pancreatic cancer cells tumor growth, invasion and sensitivity to chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 7442-7450 [PMID: 25550779]
- 12 Li Z, Li X, Yu C, Wang M, Peng F, Xiao J, Tian R, Jiang J, Sun C. MicroRNA-100 regulates pancreatic cancer cells growth and sensitivity to chemotherapy through targeting FGFR3. *Tumour Biol* 2014; 35: 11751-11759 [PMID: 25344675 DOI: 10.1007/s13277-014-2271-8]
- 13 Yu C, Yang SL, Fang X, Jiang JX, Sun CY, Huang T. Hypoxia disrupts the expression levels of circadian rhythm genes in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2015; 11: 4002-4008 [PMID: 25591621 DOI: 10.3892/mmr.2015.3199]
- 14 Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung HF, Peng Y. Suppression of tumorigenicity by microRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1697-1707 [PMID: 23707559 DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.05.015]
- 15 Yang S, Luo A, Hao X, Lai Z, Ding T, Ma X, Mayinuer M, Shen W, Wang X, Lu Y, Ma D, Wang S. Peroxiredoxin 2 inhibits granulosa cell apoptosis during follicle atresia through the NFkB pathway in mice. *Biol Reprod* 2011; 84: 1182-1189 [PMID: 21248284 DOI: 10.1095/biolreprod.110.087569]
- 16 Berry FB, Saleem RA, Walter MA. FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain. *J Biol Chem* 2002; 277: 10292-10297 [PMID: 11782474 DOI: 10.1074/jbc.M110266200]
- 17 Nishimura DY, Searby CC, Alward WL, Walton D, Craig JE, Mackey DA, Kawase K, Kanis AB, Patil SR, Stone EM, Sheffield VC. A spectrum of FOXC1 mutations suggests gene dosage as a mechanism for developmental defects of the anterior chamber of the eye. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 364-372 [PMID: 11170889 DOI: 10.1086/318183]
- 18 Tanwar M, Kumar M, Dada T, Sihota R, Dada R. MYOC and FOXC1 gene analysis in primary congenital glaucoma. *Mol Vis* 2010; 16: 1996-2006 [PMID: 21031026]
- 19 Aldinger KA, Lehmann OJ, Hudgins L, Chizhikov VV, Bassuk AG, Ades LC, Krantz ID, Dobyns WB, Millen KJ. FOXC1 is required for normal cerebellar development and is a major contributor to chromosome 6p25.3 Dandy-Walker malformation. *Nat Genet* 2009; 41: 1037-1042 [PMID: 19668217]



- DOI: 10.1038/ng.422]
- 20 Kume T. The cooperative roles of Foxc1 and Foxc2 in cardiovascular development. *Adv Exp Med Biol* 2009; 665: 63-77 [PMID: 20429416]
  - 21 Hayashi H, Kume T. Forkhead transcription factors regulate expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells and CXCL12-induced cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 584-589 [PMID: 18187037 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.183]
  - 22 Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 2003; 22: 7155-7169 [PMID: 14562044 DOI: 10.1038/sj.onc.1206887]
  - 23 Strizzi L, Bianco C, Normanno N, Seno M, Wechselberger C, Wallace-Jones B, Khan NI, Hirota M, Sun Y, Sanicola M, Salomon DS. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol* 2004; 201: 266-276 [PMID: 15334661 DOI: 10.1002/jcp.20062]
  - 24 Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9408-9421 [PMID: 16361640 DOI: 10.1200/JCO.2005.01.5594]
  - 25 Olivera-Martinez I, Schurch N, Li RA, Song J, Halley PA, Das RM, Burt DW, Barton GJ, Storey KG. Major transcriptome re-organisation and abrupt changes in signalling, cell cycle and chromatin regulation at neural differentiation in vivo. *Development* 2014; 141: 3266-3276 [PMID: 25063452 DOI: 10.1242/dev.112623]
  - 26 Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 2003; 22: 5208-5219 [PMID: 12910258 DOI: 10.1038/sj.onc.1206558]
  - 27 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348 [PMID: 11357141 DOI: 10.1038/35077213]
  - 28 Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004; 432: 298-306 [PMID: 15549091 DOI: 10.1038/nature03094]
  - 29 Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512-515 [PMID: 1826542 DOI: 10.1038/350512a0]
  - 30 Lew DJ, Dulić V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 1991; 66: 1197-1206 [PMID: 1833066]
  - 31 Russell A, Thompson MA, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 1999; 18: 1983-1991 [PMID: 10208420 DOI: 10.1038/sj.onc.1202511]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

