

- [10] WEILL F X, GUESNIER F, GUIBERT V, et al. Multi-drug resistance in salmonella enterica serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003) [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 700-708.
- [11] ROTIMI V O, JAMAL W, PAL T, et al. Emergence of multidrug-resistant salmonella spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates [J]. Diagn Microbiol Infect Dis,

2008, 60(1): 71-77.

- [12] WONG M H, YAN M, CHAN E W, et al. Emergence of clinical salmonella enterica serovar Typhimurium isolates with concurrent resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(7): 3752-3756.

(收稿日期: 2019-02-18 修回日期: 2019-05-28)

• 短篇论著 •

丝裂霉素 C 抑制 FOXO1 磷酸化调控结直肠癌细胞增殖和活力研究

龙道国, 徐细明[△]

(武汉大学人民医院/湖北省人民医院肿瘤科, 湖北武汉 431900)

摘要:目的 探讨丝裂霉素 C、FOXO1 磷酸化与结直肠癌细胞增殖、活力的关系。方法 选用结直肠癌细胞系 HCT116, PBS 处理的 HCT116 为对照组, 丝裂霉素 C 处理的 HCT116 为丝裂霉素 C 处理组, HA-Foxo1-WT 转染的 HCT116 为 FOXO1-WT 组, HA-Foxo1-MT 转染的 HCT116 为 FOXO1-MT 组, 每组 3 例。通过免疫印迹试验检测 FOXO1 的磷酸化水平, 通过 MTT 试验检测细胞增殖情况, 通过 CCK-8 试验检测细胞活力。结果 与对照组比较, 丝裂霉素 C 处理组的 FOXO1 的总量无明显差异, 但是 S256 位点的磷酸化 FOXO1 的蛋白量明显减少 ($t=4.801, P=0.039$), 结直肠癌细胞 HCT116 的增殖在第 3 天和第 4 天受到明显抑制 ($t=8.023, P=0.016; t=6.814, P=0.021$), 其细胞活力在第 2 天、第 3 天和第 4 天受到明显的抑制 ($t=8.472, P=0.014; t=13.887, P=0.007; t=2.943, P=0.042$)。同时用丝裂霉素 C 处理, FOXO1-WT 组的 HCT116 的增殖在第 2 天和第 3 天均明显小于 FOXO1-MT 组 ($t=4.926, P=0.031; t=7.037, P=0.019$); FOXO1-WT 组 HCT116 的细胞活力在第 3 天和第 4 天均明显小于 FOXO1-MT 组 ($t=14.089, P=0.005; t=13.741, P=0.008$)。结论 丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化来降低结直肠癌细胞的增殖和活力。

关键词: 丝裂霉素 C; FOXO1; 磷酸化; HCT116; 结直肠癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.026

中图法分类号: R735.3

文章编号: 1673-4130(2019)17-2154-04

文献标识码: B

结直肠癌是许多国家发病率和病死率的主要原因, 尽管近年来其发病率在世界发展中国家增加, 但在较发达国家更严重^[1]。目前, 丝裂霉素 C 是最常用于加热腹腔内化疗的化学治疗剂^[2], 是一种具有抗肿瘤活性的天然抗菌药物, 已被用于多种实体肿瘤, 包括乳腺癌、结直肠癌、非小细胞癌和膀胱癌^[3]。WU 等^[4]研究发现, FOXO1 的表达水平和磷酸化水平与结直肠癌细胞的增殖密切相关。SHEN 等^[5]研究发现, 丝裂霉素 C 能调控肿瘤细胞中蛋白的磷酸化水平。本研究旨在探讨丝裂霉素 C、FOXO1 磷酸化与结直肠癌细胞增殖和活力的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 丝裂霉素 C 购自北京百奥莱博科技有限公司(货号: BP1618-KWB)。HA-Foxo1-WT 和 HA-Foxo1-MT 的质粒购自北京中原公司(ADDGNE 货号: # 10693、# 9025)。HA、FOXO1A (phospho S256)、FOXO1A、TUBULIN 抗体购自 Abcam 公司(货号: ab18181、ab131339、ab39670、ab32124)。结直

肠癌细胞 HCT116 购自上海子实生物科技有限公司(货号: Qs101092)。RPMI 培养基购自上海优予生物科技有限公司(货号: lffs1847), 胎牛血清购自赛默飞世尔科技公司(货号: 10099-133)。蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, mini 片剂) 购自 Bbimake 公司(货号: B14011)。PBS 购自生工生物工程(上海)股份有限公司(货号: E607008)。青链霉素混合液(100×) 购自北京索莱宝科技有限公司(货号: P1400)。2×十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白电泳上样缓冲液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(货号: WB-0081)。蛋白裂解液购自碧云天生物技术有限公司(货号: P0013)。NanoFect 转染试剂购自南通柯徕克生物科技有限公司(货号: NF100)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、药物处理和转染 结直肠癌细胞 HCT116 维持在补充有 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10% 热灭胎牛血清

[△] 通信作者, E-mail: 78316825@qq.com。

的 RPMI-1640 培养基中,并在潮湿气氛(37 ℃,5% CO₂)中培养。丝裂霉素 C 以终浓度 0.5 μg/mL 处理结直肠癌细胞 HCT116。通过 NanoFect 转染 HCT116 细胞。将含 HA-Foxo1-WT 和 HA-Foxo1-MT 质粒分别与脂质体混合,静止大约 20 min 后,缓缓滴入 HCT116 细胞。选用结直肠癌细胞系 HCT116,PBS 处理的 HCT116 为对照组,丝裂霉素 C 处理的 HCT116 为丝裂霉素 C 处理组,HA-Foxo1-WT 转染的 HCT116 为 FOXO1-WT 组,HA-Foxo1-MT 转染的 HCT116 为 FOXO1-MT 组,每组 3 例。

1.2.2 免疫印迹 行 10%或 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),然后转移到 PVDF 膜。将 PVDF 膜在室温下用 5%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液封闭 1 h,然后在 4 ℃下与 HA、FOXO1A (phospho S256)、FOXO1A、TUBULIN 抗体温育过夜。然后将膜在室温下与缀合有 HRP 的相应二抗孵育 1 h。观察特定蛋白质使用 ECL Plus 免疫印迹检测系统。

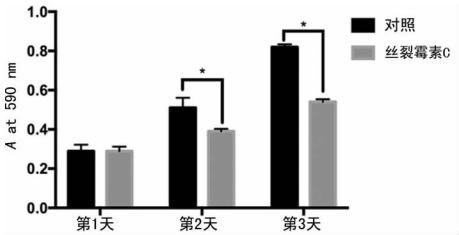
1.2.3 MTT 试验 第 1 天使用胰蛋白酶消化 HCT116 细胞,将 HCT116 细胞稀释至每毫升 75 000 个细胞,使用完全培养基稀释细胞。根据 MTT 试剂盒的说明书进行操作。

1.2.4 CCK-8 试验 在 96 孔板中分配 100 μL HCT116 细胞悬浮液(每孔 5 000 个细胞)。将板在潮湿的培养箱中预孵育 24 h。根据 CCK-8 试剂盒的说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丝裂霉素 C 抑制 HCT116 细胞的增殖和活力 用丝裂霉素 C 处理细胞后,与对照相比,MTT 试验结果显示,在第 2 天和第 3 天结直肠癌细胞 HCT116 的增殖受到明显的抑制($t = 8.023, P = 0.016; t = 6.814, P = 0.021$);同时,CCK-8 试验结果显示,第 2 天、第 3 天和第 4 天的细胞活力受到明显的抑制($t = 8.472, P = 0.014; t = 13.887, P = 0.007; t = 2.943, P = 0.042$)。见图 1、2。

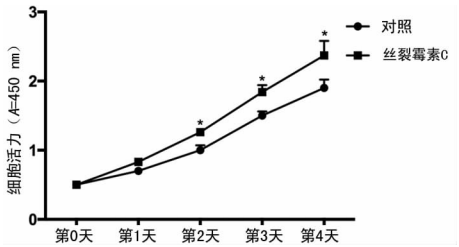


注:与对照组比较,* *P* < 0.05

图 1 丝裂霉素 C 抑制 HCT116 细胞增殖

2.2 丝裂霉素 C 抑制 FOXO1 磷酸化 用丝裂霉素 C 处理细胞后,与对照相比,免疫印迹试验发现细胞中 FOXO1 的总量无明显差异,但是 S256 位点的磷酸

化 FOXO1 的蛋白量明显减少($t = 4.801, P = 0.039$),见图 3。



注:与对照组比较,* *P* < 0.05

图 2 丝裂霉素 C 抑制 HCT116 细胞活力

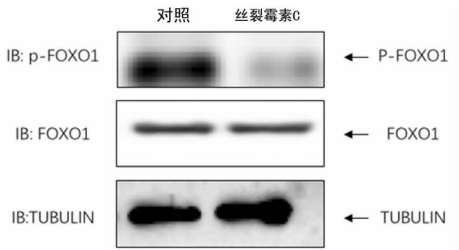


图 3 丝裂霉素 C 抑制 FOXO1 磷酸化

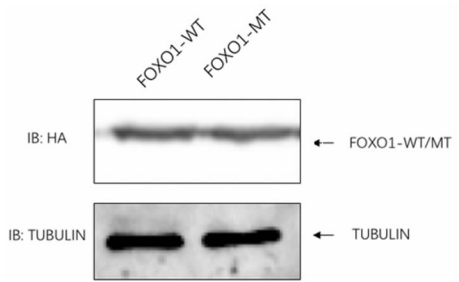


图 4 FOXO1-WT 和 FOXO1-MT 的表达

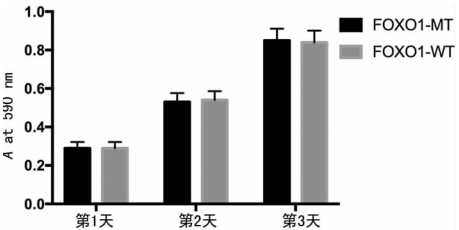
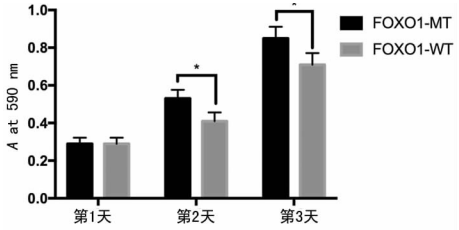


图 5 转染 FOXO1-WT 和 FOXO1-MT 后 HCT116 细胞的增殖情况

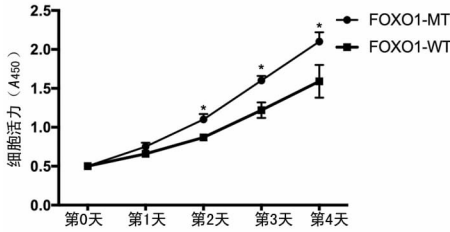


注:2 组比较,* *P* < 0.05

图 6 丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化抑制 HCT116 细胞的增殖

2.3 丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化抑制 HCT116 细胞的增殖和活力 分别转染 HA-FOXO1-WT 和 HA-FOXO1-MT, HCT116 细胞的增殖差异无统计学意义($t = 0.079, P = 0.77$)。同时用丝裂霉

素 C 处理,发现 FOXO1-WT 组的细胞增殖在第 2 天和第 3 天均明显小于 FOXO1-MT 组($t=4.926, P=0.031; t=7.037, P=0.019$);FOXO1-WT 组的 HCT116 的细胞活力在第 3 天和第 4 天均明显小于 FOXO1-MT 组($t=14.089, P=0.005; t=13.741, P=0.008$)。见图 4~7。



注:与 FOXO1-WT 组比较, * $P<0.05$

图 7 丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化抑制 HCT116 细胞的活力

3 讨论

据报道,结直肠癌是全球第 3 大常见癌症,2012 年诊断出 136 万人^[6]。结直肠癌的预后与诊断有关,早期诊断时的 5 年生存率为 90%,结直肠癌远处转移诊断时的生存率低于 10%^[7]。目前的治疗药物选择包括丝裂霉素 C、5-氟尿嘧啶、伊立替康、奥沙利铂、替加氟-尿嘧啶/亚叶酸钙和 5-氟尿嘧啶前药卡培他滨^[8]。此外,最近将贝伐单抗、西妥昔单抗和帕尼单抗纳入治疗组合方案中^[9]。然而,新的治疗方案以增加毒性为代价改善了预后,并且患有转移性疾病的患者最终将对可用药物产生耐药性,且其分子机制并未明确。因此,阐明分子机制和开发新的、有效的、毒性较小的药物已成为当务之急。

FOXO1 是 FOX 转录因子 O 亚家族的成员^[10]。FOXO1 与 FOXO3、FOXO4 等其他成员一起参与细胞周期退出和 G1 停滞,诱导细胞凋亡、氧化和细胞应答的细胞功能调节^[11]。在本研究中,当细胞被丝裂霉素 C 处理后,发现磷酸化的 FOXO1 的表达被下调($P<0.05$)。细胞中的 FOXO1 蛋白呈现磷酸化的无活性形式和未受磷酸化的活性形式^[12]。因此,磷酸化的 FOXO1 的表达被下调,且未受磷酸化的 FOXO1 的活性形式被上调,HCT116 的细胞增殖和活力明显下降($P<0.05$)。FOXO1-MT 的突变体是在 FOXO1 磷酸化位点上进行的磷酸化模拟型突变,即 FOXO1-MT 持续磷酸化且无法被去磷酸化。分别转染 HA-FOXO1-WT 和 HA-FOXO1-MT,同时用丝裂霉素 C 处理,发现 FOXO1-WT 组的 HCT116 的细胞增殖和活力均明显小于 FOXO1-MT 组($P<0.05$)。本研究所用的 FOXO1-MT 的突变为 T24A、S256A 和 S319A,提示丝裂霉素 C 调控的 FOXO1 磷酸化位点至少有 T24、S256、S319 中的一个。FOXO1 的磷酸化酶和去磷酸化酶有 PKB/AKT1、PKB/AKT2、SGK1、STK4/MST1、CDK1^[13],提示丝裂霉素 C 可能影响这些磷酸化酶的转录水平、蛋白水平或酶活性来

抑制其功能。而仅分别转染 HA-FOXO1-WT 和 HA-FOXO1-MT,HCT116 的细胞增殖差异无统计学意义($P>0.05$),提示在 HCT116 细胞中 FOXO1 处于高度磷酸化的无活性形式。而用丝裂霉素 C 处理后,野生型的 FOXO1 发生去磷酸化。因此,相比于持续磷酸化且无法被去磷酸化的 FOXO1 突变型,表达野生型的 FOXO1 的 HCT116 细胞的增殖和细胞活力明显降低。随着未磷酸化的 FOXO1 增加,蛋白质 FOXO1 易于进入细胞核^[14]。因此,丝裂霉素 C 处理 HCT116 细胞后,入核的转录因子 FOXO1 对各种基因的转录调节活性,包括 p27Kip1、p130-Rb2 和细胞周期蛋白 D1/2(细胞周期调节),肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL),进而抑制 HCT116 的增殖和细胞活力^[15-17]。

综上所述,丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化来降低结直肠癌细胞的增殖和活力。

参考文献

- [1] 陈功. 2017 年美国临床肿瘤学会年会结直肠癌研究进展解析[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(7): 668-673.
- [2] 冷松. 洛铂联合表柔比星、丝裂霉素在肝癌介入治疗中的应用观察[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(15): 198-199.
- [3] 吴萍, 许厚强, 赵佳福, 等. 敲减 BLM 解旋酶表达增强前列腺癌 PC3 细胞对丝裂霉素 C 的敏感性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(2): 93-100.
- [4] WU L, LI H, JIA C, et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation[J]. FEBS Lett, 2012, 586(7): 1038-1043.
- [5] SHEN C Y, CHEN L H, LIN Y F, et al. Mitomycin C treatment induces resistance and enhanced migration via phosphorylated Akt in aggressive lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79995-80007.
- [6] 《结直肠癌分子生物标志物检测专家共识》编写组. 结直肠癌分子生物标志物检测专家共识[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2018, 25(5): 637.
- [7] 王晴美, 谢亚莉, 陈婷, 等. 长链非编码 RNA 参与结直肠癌转移途径的相关研究[J/CD]. 转化医学电子杂志, 2018, 3(5): 590-592.
- [8] 陈育苗. 奥沙利铂、伊立替康联合 5-氟尿嘧啶、亚叶酸治疗转移或复发胃癌的临床疗效及不良反应观察[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(9): 869-871.
- [9] 王肇炎, 王尔兵. 治疗结直肠癌的靶向药物帕尼单抗临床评价[J]. 世界临床药物, 2008, 29(2): 91-93.
- [10] 哈依努尔, 李俊, 陈永恒, 等. 翼螺旋转录因子 FOXO1 的 DNA 结合域的表达、纯化及结合特性[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(1): 1-7.
- [11] KUSCU N, CELIK-OZENCI C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development[J]. Gene Expr Patterns, 2015, 18(1/2): 16-20.
- [12] 刘焯, 郑晓雅, 夏佳佳, 等. 高糖通过下调 FoxO1 磷酸化诱导 β 细胞去分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报,

2016,32(1):74-79.

[13] CAO J, YU Y, ZHANG Z, et al. SCP4 promotes gluconeogenesis through FoxO1/3a dephosphorylation[J]. Diabetes, 2017, 67(1):46-57.

[14] 雷雨欣. 胰岛素对小鼠 MIN6 细胞 FoxO1 细胞核-细胞质穿梭定位的影响[D]. 西安: 第四军医大学, 2015.

[15] MEDEMA R H, KOPS G J, BOS J L, et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by ras and PKB through p27kip1[J]. Nature, 2000, 404(6779):782-787.

• 短篇论著 •

肺炎链球菌感染型小儿支气管肺炎中 C 反应蛋白的水平分析

叶彩虹¹, 王 辉², 咸子超¹

(1. 深圳市康宁医院/深圳市精神卫生中心检验科, 广东深圳 518000;
2. 深圳市龙岗中心医院检验科, 广东深圳 518000)

摘 要:目的 分析肺炎链球菌感染型小儿支气管肺炎中 C 反应蛋白(CRP)的水平,探讨小儿支气管肺炎中血清 CRP 与炎性反应严重程度之间的关系。方法 患儿根据病原学检出结果分为肺炎链球菌感染组($n=37$)、其他细菌感染组($n=39$)和非细菌感染组($n=44$)。对比一般感染和严重感染患儿的肺炎链球菌组、其他细菌感染组及非细菌感染组小儿支气管肺炎在治疗前、后的血清 CRP 水平,分析血清 CRP 水平与患儿气促、喘憋、咳嗽、肺部啰音和哮鸣音等临床症状缓解或消失时间的相关性。结果 肺炎链球菌感染组患儿血清 CRP 水平高于其他细菌感染组和非细菌感染组。肺炎链球菌感染组和其他细菌感染组的严重感染患儿血清 CRP 在治疗前明显低于一般感染患儿,在治疗后血清 CRP 均有明显降低。肺炎链球菌感染患儿临床症状缓解或消失时间均与血清 CRP 值呈正相关($P<0.05$)。结论 血清 CRP 水平可以反应细菌感染型小儿支气管肺炎的严重程度,在细菌感染型小儿支气管肺炎中肺炎链球菌感染的炎性反应较其他细菌感染更重。

关键词:小儿支气管肺炎; 肺炎链球菌; C 反应蛋白; 炎性反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.027

中图法分类号:R563.1,R446.1

文章编号:1673-4130(2019)17-2157-03

文献标识码:B

小儿支气管肺炎是一种常见的儿科疾病,发病季节主要在冬春季,其临床表现主要有咳嗽、气促、发热、肺部湿啰音及哮鸣音等^[1]。小儿支气管肺炎多由细菌、病毒和支原体等病原微生物感染引起。一般认为肺炎链球菌是引起小儿社区获得性下呼吸道感染的主要致病菌之一,能够引起小儿支气管肺炎等多种呼吸道疾病^[2]。C 反应蛋白(CRP)是一种早期炎性因子,对由细菌感染引起的急性炎性反应较敏感,CRP 的水平可有效反映炎性反应的严重程度^[3]。同时,CRP 水平在机体受到感染时可迅速升高,在临床上对于鉴别感染种类等有重要作用。本研究通过对不同病原微生物感染的小儿支气管肺炎治疗前后血清 CRP 水平对比,以及肺炎链球菌感染患儿临床症状改善的时间与血清 CRP 水平的相关性,探讨 CRP 在肺炎链球菌感染型小儿支气管肺炎中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1 月至 2018 年 12 月于深圳市龙岗中心医院呼吸内科进行治疗的小儿支气

[16] DIJKERS P F, MEDEMA R H, PALS C, et al. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1)[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(24):9138-9148.

[17] PARK S, RAMNARAIN D B, HATANPAA K J, et al. The death domain-containing kinase RIP1 regulates p27(Kip1) levels through the PI3K-Akt-forkhead pathway[J]. EMBO Rep, 2008, 9(8):766-773.

(收稿日期:2019-01-25 修回日期:2019-05-18)

管肺炎患儿 120 例为研究对象,患儿年龄 3~6 岁。患儿根据病原学检出结果分为肺炎链球菌感染组(37 例)、其他细菌感染组(39 例)和非细菌感染组(44 例)。其中其他细菌感染组的菌种包括 7 例铜绿假单胞菌,17 例肺炎克雷伯菌,3 例流感嗜血杆菌,5 例鲍曼不动杆菌,7 例大肠埃希菌;非细菌感染组的菌种包括 28 例病毒性感染和 16 例支原体感染。所有患儿均符合 1999 年 WHO 对小儿支气管肺炎的诊断标准,根据小儿肺炎的感染程度分为一般感染组和严重感染组^[3]。各组间基本信息比较差异无统计学意义($P>0.05$),各病原学分组患儿的基本信息见表 1。

表 1 各组间患儿基本信息比较

组别	n	性别 (男/女,n/n)	年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$)	感染程度(n)	
				一般感染	严重感染
非细菌感染组	44	25/19	4.17 $\pm$ 1.92	27	17
其他细菌感染组	39	24/15	3.98 $\pm$ 1.74	24	15
肺炎链球菌感染组	37	21/16	4.38 $\pm$ 2.25	23	14