

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

Slug通过下调CDH3/ β -catenin/C-myc表达抑制宫颈癌细胞增殖

刘宪, 张燕茹, 陈茜, 冯倩, 王海燕, 崔南

引用本文:

刘宪, 张燕茹, 陈茜, 等. Slug通过下调CDH3/ β -catenin/C-myc表达抑制宫颈癌细胞增殖[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(8): 751-756.
LIU Xian, ZHANG Yanru, CHEN Qian, et al. Slug Inhibits Proliferation of Cervical Cancer Cells Through Down-regulating CDH3/ β -catenin/C-myc Expression[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2021, 48(8): 751-756.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2021.21.0209>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

miR-198靶向MAPK1调控宫颈癌HeLa细胞增殖、凋亡和侵袭

miR-198 Targets MAPK1 to Regulate Proliferation, Apoptosis and Invasion of Cervical Cancer HeLa Cells

肿瘤防治研究. 2018, 45(12): 959-964 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0537>

沉默YAP通过Wnt/ β -catenin信号通路影响胃癌BGC823细胞的凋亡

Effect of Yes-associated Protein Knockdown on Apoptosis of Gastric Cancer BGC823 Cells Through Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

肿瘤防治研究. 2018, 45(11): 864-869 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0495>

长链非编码RNA FILNC1靶向调控c-Myc表达对肾细胞癌生物学行为的影响

Effect of Long-chain Non-coding RNA FILNC1 Targeting c-Myc Expression on Biological Behavior of Renal Cell Carcinoma

肿瘤防治研究. 2018, 45(09): 629-633 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1692>

HPV16-E6上调MIF对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响

HPV16-E6 Influences Growth and Apoptosis of Cervical Cancer Cells Through Upregulation of MIF

肿瘤防治研究. 2018, 45(07): 468-474 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1406>

宫颈癌细胞中 Δ Np63 α 的MicroRNA表达谱及其对hsa-let-7b-3p的调控机制

MicroRNA Expression Profile of Δ Np63 α in Cervical Cancer Cells and Its Regulation Mechanism on hsa-let-7b-3p

肿瘤防治研究. 2018, 45(03): 138-143 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.0542>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2021.21.0209

• 基础研究 •

Slug通过下调CDH3/ β -catenin/C-myc表达抑制宫颈癌细胞增殖

刘宪¹, 张燕茹^{1,2}, 陈茜¹, 冯倩^{1,2}, 王海燕¹, 崔南¹**Slug Inhibits Proliferation of Cervical Cancer Cells Through Down-regulating CDH3/ β -catenin/C-myc Expression**LIU Xian¹, ZHANG Yanru^{1,2}, CHEN Qian¹, FENG Qian^{1,2}, WANG Haiyan¹, CUI Nan¹

1. Department of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding Author: CUI Nan, E-mail: cuin2003@xjtu.edu.cn; WANG Haiyan, E-mail: 9939896@qq.com

Abstract: Objective To investigate the related mechanism of Slug inhibiting the proliferation of cervical cancer cell through CDH3/ β -catenin/C-myc. **Methods** SiHa cells with stable Slug expression were screened. The expression of CDH3 in Slug-overexpressed SiHa cell was detected by RNA-sequence, Real-time PCR, Western blot and immunocytochemistry. The expression of CDH3 in SiHa and HeLa cells were detected by Western blot and immunocytochemistry. The protein level of CDH3 was up-regulated in HeLa cells or rescued in SiHa-Slug cells by transient transfection of CDH3 expression vector. The protein levels of β -catenin and C-myc were detected by Western blot, the cell growth was detected by cell counting and CCK-8 assays. Luciferase reporter assay and chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) were performed to detect the effect of Slug on regulating the promoter region of CDH3. **Results** SiHa cell line with stable Slug expression was successfully constructed. Slug overexpression inhibited CDH3 expression in SiHa cells. CDH3 promoted cell proliferation and up-regulated the protein level of β -catenin and C-myc in HeLa and SiHa-Slug cells. Slug could recognize and bind to the E-boxes in the CDH3 promoter region and inhibited the transcription of CDH3 in SiHa cells. **Conclusion** Slug could inhibit the expression of β -catenin and C-myc by inhibiting CDH3 transcription in SiHa cells, and then attenuate the growth of SiHa cells.

Key words: Slug; CDH3; β -catenin; Cell proliferation; Cervical cancer**Funding:** Natural Science Foundation of China (No. 81903042, 81702579)**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨Slug通过下调CDH3/ β -catenin/C-myc表达抑制宫颈癌细胞增殖的作用机制。方法 G418压力筛选获取Slug稳定表达的SiHa细胞系; 行转录组测序分析, Real-time PCR、Western blot和细胞免疫化学检测CDH3在Slug过表达SiHa细胞中的表达; Western blot和细胞免疫化学检测CDH3在SiHa和HeLa细胞中的表达; 在瞬转CDH3表达载体的HeLa细胞和挽救CDH3表达的SiHa-Slug细胞中通过Western blot检测 β -catenin和C-myc蛋白的表达; 细胞计数和CCK-8检测CDH3对HeLa和SiHa-Slug细胞增殖的影响; 双荧光素酶报告系统和染色质免疫共沉淀实验检测Slug对CDH3启动子区的调节作用。结果 成功构建Slug稳定表达的SiHa细胞系; 过表达Slug可以下调CDH3在SiHa细胞中的表达; 在HeLa和SiHa-Slug细胞中分别上调和挽救CDH3表达可以上调 β -catenin和C-myc蛋白的表达并促进细胞增殖; Slug可以识别并结合CDH3启动子区的E-box, 从而抑制CDH3在SiHa细胞中的转录。结论 Slug通过抑制CDH3在SiHa细胞中的转录, 可下调 β -catenin和C-myc蛋白的表达, 抑制SiHa细胞增殖。

收稿日期: 2021-02-25; 修回日期: 2021-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(81903042, 81702579)

作者单位: 1. 710061 西安, 西安交通大学第一附属医院生殖医学科; 2. 710061 西安, 西安交通大学医学部

通信作者: 崔南(1985-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤分子生物学、宫颈癌干细胞及生殖医学的临床与基础研究, E-mail: cuin2003@xjtu.edu.cn; 王海燕(1978-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤分子生物学、宫颈癌干细胞及生殖医学的临床与基础研究, E-mail: 9939896@qq.com

作者简介: 刘宪(1987-), 女, 博士, 住院医师, 主要从事宫颈癌和宫颈癌干细胞的临床与基础研究

细胞增殖; Slug可以识别并结合CDH3启动子区的E-box, 从而抑制CDH3在SiHa细胞中的转录。结论 Slug通过抑制CDH3在SiHa细胞中的转录, 可下调 β -catenin和C-myc蛋白的表达, 抑制SiHa细胞增殖。

关键词: Slug; CDH3; β -catenin; 细胞增殖; 宫颈癌

中图分类号: R737.33

开放科学(资源服务)

标识码(OSID):



0 引言

在全球范围内, 宫颈癌是仅次于乳腺癌、结直肠癌和肺癌的女性第四种常见肿瘤类型, 严重威胁女性的健康和生命^[1]。Slug又称为Snai2 (snail family transcriptional repressor 2, Snail家族转录抑制因子2), 是Snail锌指转录因子家族的一员, 在细胞上皮-间充质转换 (EMT) 过程中发挥重要作用。目前的研究表明Slug可以促进多种类型肿瘤细胞的上皮-间充质转换过程, 并兼具促进或抑制肿瘤细胞增殖的双重作用^[2]。我们前期的研究发现, 在宫颈癌细胞中, Slug可以降低Wnt/ β -catenin信号转导通路活性, 显著下调CDH3在宫颈癌细胞系SiHa中的表达^[3]。CDH3又称为P-cadherin (cadherin 3, 钙黏蛋白3), 是钙黏蛋白家族的一员。CDH3通过调节Wnt/ β -catenin信号转导通路的活性, 参与肿瘤细胞的增殖及肿瘤的生长^[4]。但在宫颈癌中, 关于Slug能否调节CDH3表达及Slug通过CDH3如何调节wnt/ β -catenin信号转导通路活性的研究仍不多见。本研究通过检测Slug对CDH3启动子区的转录调节作用, 探讨Slug通过转录抑制CDH3表达下调 β -catenin和C-myc在SiHa细胞中的表达从而抑制细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌细胞系SiHa和HeLa购自美国ATCC公司。CDH3表达载体3FLAG-SV40-EGFP-IRER购于上海吉凯基因公司, 质粒表达载体pCAG-IRES2-AcVEC-neo由本实验室保存。DMEM培养基购于上海源培生物科技有限公司, 胎牛血清购于以色列Biological Industries公司, Slug蛋白抗体购于美国Cell Signaling Technology公司, CDH3、 β -catenin、C-myc和GAPDH蛋白抗体均购于美国Santa Cruz公司, 染色质免疫共沉淀试剂盒购于美国Millipore公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国Promega公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞SiHa和HeLa培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 置于5%CO₂的37℃培养箱中进行常规培养。稳定表达Slug蛋白的SiHa细胞系SiHa-Slug (SiHa-Slug-2和SiHa-Slug-3) 及其对照细胞SiHa-Vec (SiHa-Vec-2和SiHa-Vec-3) 通过G418压力筛选获取, 保存于本实验室^[3]。在HeLa和SiHa-Slug细胞中通过脂质体瞬转CDH3表达载体3FLAG-SV40-EGFP-IRER,

分别获得HeLa-NC、HeLa-CDH3和SiHa-Slug-CDH3细胞。

1.2.2 RNA提取及转录组测序 使用TRIzol试剂盒 (美国Invitrogen公司) 提取SiHa-Vec (Vec2、Vec3和Vec5) 和SiHa-Slug (Slug2、Slug3和Slug5) 两组细胞的总RNA, 之后将样本交于华大基因公司通过BGISEQ-500平台进行转录组测序, 随后的数据通过华大基因公司的Dr.Tom在线系统进行分析。

1.2.3 Real-time PCR检测细胞mRNA表达 通过Cancer Cell Line Encyclopedia数据库分析CDH3在HeLa和SiHa细胞中mRNA的表达。使用TRIzol试剂提取细胞的总RNA, 按照反转录试剂盒说明书将RNA反转录成cDNA, 以NCBI Gene bank提供的人基因序列为模板设计特异性Real-time PCR引物, 见表1。Real-time PCR按照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II说明书进行。将各管混匀离心后, 置于Bio-Rad iQ5荧光定量PCR仪中进行扩增反应。每个样品准备3个复管, 实验至少重复3遍。

1.2.4 免疫细胞化学 对数生长期的细胞胰酶消化后制备成细胞悬液, 接种于0.5 cm×0.5 cm的爬片上。细胞融合度达到70%左右后, 依次进行下述步骤: PBS洗涤5min×3次, 4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS洗涤5 min×3次, 加入0.2%TritonX-100, 室温放置10 min, PBS洗涤5 min×3次, 将细胞爬片粘在载玻片上滴加一抗, 4℃湿盒过夜。次日, 取出湿盒, 室温放置30 min, PBS洗涤5 min×3次, 滴加二抗, 室温放置30 min, PBS洗涤5 min×3次, DAB显色, 苏木素染色2 min, 盐酸酒精分化15 s, 氨水反蓝15 s, 梯度酒精脱水各5 min, 二甲苯透明2 min, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察拍照。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖 将细胞胰酶消化后制成单细胞悬液, 以1000个/孔细胞浓度接种于96孔培养板中。接种后1、2、3、4、5 d, 采用CCK-8法检测各组OD值。步骤如下: 每孔加入10 μ l CCK-8, 5%CO₂培养箱孵育2 h, 吸弃上清液, 于酶标仪上测定450 nm波长吸光度值, 根据吸光度值绘制生长曲线, 各实验组均设置3个复孔, 实验重复3次。

1.2.6 细胞计数法检测细胞增殖 将细胞胰酶消化后制备成单细胞悬液, 按照4×10⁴个/皿细胞的浓度接种于6孔板。接种后1、2、3、4、5 d, 分别进行细胞计数。根据细胞计数结果绘制细胞生长曲线, 每组实验设置3个复孔。实验重复3次。

1.2.7 Western blot实验 收集处于对数生长期的细胞, 加入细胞裂解液收集细胞蛋白, 并测定各

表1 Real-time PCR引物

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	Forward GGACCTCGTGGCGCTG
	Reverse GTGTTCGCTCAGCTCTTGC
P2	Forward CGACGCGTCGTAAAGAACAGCTCC
	Reverse GAAGATCTTCCGCCACGAGGTCC
P3	Forward TAATGAATGCGGAGCCT
	Reverse GAAGAGAAATGTTTCCTTGC
P4	Forward TTGTGGGGTAGTGATT
	Reverse TCATTCCACTACGTTAGA
P5	Forward TGGCATCCAGGGCTTC
	Reverse CCTTCCCCACGGAGCT
P6	Forward TAATCCCAGCACTTTAG
	Reverse GATTTCGCTATATTGGC
P7	Forward CTTACGCGCTACTAAGG
	Reverse TTGCTCTCTCAGGCCT
CDH3	Forward ATCATCGTGACCGACCAGAAT
	Reverse GACTCCCTCTAAGACACTCCC
Slug	Forward TGTGACAAGGAATATGTGAGCC
	Reverse TGAGCCCTCAGATTGACCTG

组细胞的蛋白浓度，进行SDS-PAGE电泳分离蛋白。转膜结束后，将膜于5%的脱脂奶粉（TBST缓冲液配置）中室温封闭1 h后加入一抗，4℃孵育过夜。次日，TBST洗膜（10 min×4次），二抗室温孵育1 h后TBST洗膜（10 min×4次），然后用化学发光检测液进行发光反应，通过Western blot化学发光成像一体机（陕西鑫来博生物工程有限公司）拍照分析。

1.2.8 CDH3启动子区双荧光素酶报告系统实验 通过使用UCSC在线数据库分析CDH3基因启动子区后，在其启动子区427 bp到-1483 bp的序列中发现了多个E-box（CANNTG）的特异序列。选择Promega公司的pGL3 Luciferase Reporter Vectors构建CDH3双荧光素酶报告载体，以*Mlu* I和*Bgl* II作为酶切位点，设计特异性引物，引物见表2。构建包含CDH3启动子区不同E-box作用元件的双荧光素酶报告质粒。之后取对数生长期的各组细胞，0.25%胰酶消化重悬为单细胞悬液，以 5×10^4 个/孔细胞浓度接种于24孔板。将CDH3启动子区报告基因质粒与内参载体海参（pRL-TK）报告基因质粒按照Lipofectamine™ 2000脂质体转染系统操作说明分别共转染于SiHa-Vec和SiHa-Slug细胞。转染48 h后，按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作说明检测荧光素酶活性：弃去24孔板中的培养基，加入PBS，轻轻洗涤细胞后弃去洗涤液，加入100 μl的1×PLB细胞裂解液裂解细胞，将细胞悬液移入1.5 ml EP管，待测。取待测样品20 μl加入EP管中，然后加入100 μl荧光素酶测试试剂LAR II吹打混合后，放入发光检测仪中检测萤火

表2 双荧光素酶报告载体引物

Table 2 Primer sequences for luciferase reporter vectors

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	Forward CGACGCGTCACCAATCAGCAC
	Reverse GAAGATCTTCCGCTCAGCTCTTGC
P2	Forward CGACGCGTCGTAAAGAACAGCTCC
	Reverse GAAGATCTTCCGCCACGAGGTCC
P3	Forward CGACGCGTCGAAGCTTTG
	Reverse GAAGATCTTCGGAAGAGAAATGTTTC
P4	Forward CGACGCGTCGGGTAGTGATTGAG
	Reverse GAAGATCTTCGACCTGGGATTCGTT
P5	Forward CGACGCGTAAGGACCAGGAGGT
	Reverse GAAGATCTTCCATGAAAACGGTCCT
P6	Forward CGACGCGTCGTTAAAACCTCCAG
	Reverse GAAGATCTTCTTTAGTAGAGACGGGATT
P7	Forward CGACGCGTCGGTTATTTTACTT
	Reverse GAAGATCTTCTTGTCTCTCAGG

虫荧光素酶活性，记录第一次发光值（FLU）。加入等体积的1×Stop & Glo™试剂，轻轻混匀，发光检测仪中检测Renilla荧光素酶活性，记录第二次发光值（RLU）。以FLU/RLU比值评估TOP/FOP-Flash报告基因的相对表达量。

1.2.9 染色质免疫共沉淀 按照染色质免疫共沉淀试剂盒说明书进行实验：在培养的细胞中加入37%甲醛，37℃孵育10 min，进行细胞的甲醛交联。后加入2 ml 10×甘氨酸终止交联。将细胞收集于1.5 ml离心管中，重悬于SDS裂解缓冲液中。将细胞裂解液在冰上进行超声破碎DNA，12 000 g，4℃离心10 min收集上清液，-80℃保存待用。在100 μl的超声破碎产物中，加入900 μl ChIP稀释缓冲液和20 μl的50×蛋白酶抑制剂II，再加入60 μl G蛋白琼脂糖。4℃颠转混匀1 h，3000~5000 g离心1 min。收集上清液，留取20 μl做为阳性对照。分别加入5.0 μg Slug抗体、1.0 μg阴性对照和1.0 μg阳性对照，4℃摇床颠转过夜。过夜孵育后，按说明书步骤洗脱回收DNA样品。设计特异性引物，见表1。以回收的DNA样品进行实时荧光定量PCR。PCR扩增反应条件如下：94℃，10 min；94℃，20 s，60℃，60 s，50循环。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0进行数据的统计学分析，实验数据结果以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组样本间的均数比较采用单因素方差分析，两组样本间的均数比较采用t检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Slug抑制CDH3在SiHa细胞中的表达

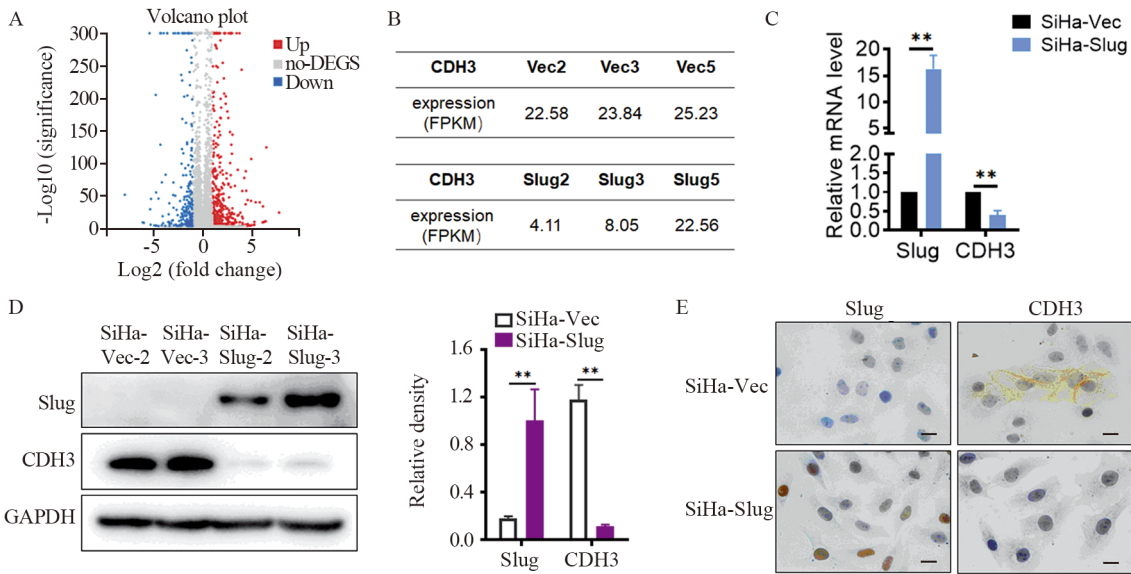
转录组测序分析结果显示，同对照组（SiHa-Vec）相比，在SiHa-Slug细胞中，共检测到500

个上调基因和294个下调基因,见图1A。其中,CDH3表达在SiHa-Slug组中显著降低,见图1B。Real-time PCR、Western blot和细胞免疫化学的结果显示,在SiHa细胞中过表达Slug可以下调CDH3的表达,见图1C~E。

2.2 CDH3通过上调β-catenin和C-myc蛋白表达促进HeLa细胞的增殖

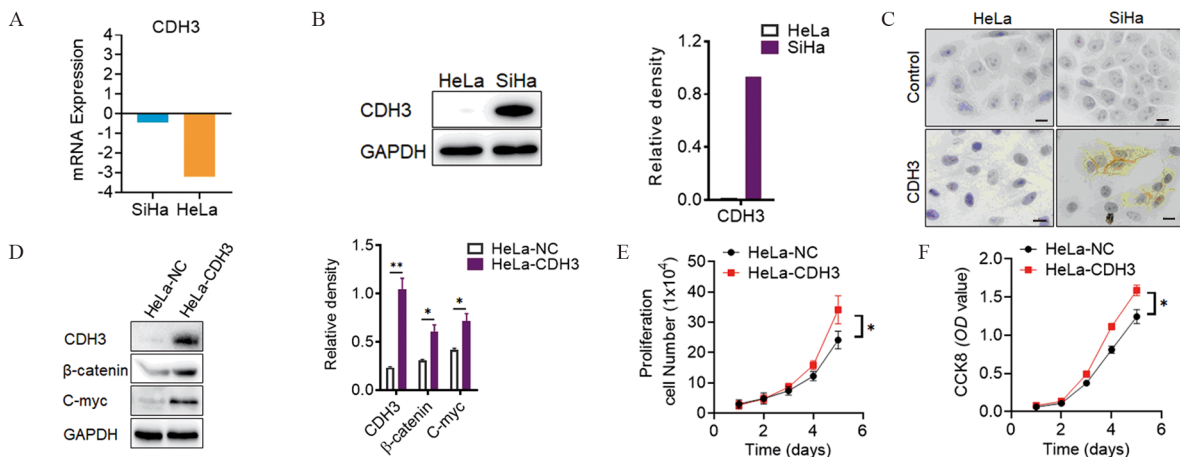
Cancer Cell Line Encyclopedia数据库的结果显

示CDH3在HeLa细胞中低表达,见图2A。Western blot和细胞免疫化学的结果显示,CDH3在HeLa细胞中低表达,在SiHa细胞中的表达高于HeLa细胞,见图2B~C。在HeLa细胞中瞬转CDH3后,可以上调CDH3、β-catenin和C-myc在HeLa细胞中的表达 ($P<0.05$),见图2D。细胞计数和CCK-8实验表明,在HeLa细胞中上调CDH3表达后可以促进HeLa细胞的增殖 ($P=0.0337, P=0.0010$),见图2E~F。



** $P<0.01$; Scale bar: 10 μ m. A: the volcano plot of the differential genes in SiHa-Slug cells; B: the mRNA expression of CDH3 in SiHa-Vec and SiHa-Slug cells were detected by transcriptome sequencing analysis; C-E: the mRNA and protein levels of CDH3 in SiHa-Vec and SiHa-Slug cells were detected by Real-time PCR(C), Western blot(D) and immunocytochemistry (E, $\times 100$), respectively.

图1 Slug抑制CDH3在SiHa细胞中的表达
Figure 1 Slug inhibited CDH3 expression in SiHa cells



* $P<0.05$, ** $P<0.01$; Scale bar: 10 μ m. A: the mRNA level of CDH3 in SiHa and HeLa cells from Cancer Cell Line Encyclopedia database; B, C: the protein levels of CDH3 in HeLa and SiHa cells were detected by Western blot (B) and immunocytochemistry (C, $\times 100$), respectively; D: the expression of CDH3, β-catenin, and C-myc in HeLa cells with transient transfection of CDH3 expression vector were detected by Western blot; E, F: the proliferation of HeLa-CDH3 cells were detected by growth curves (E) and CCK-8(F), respectively.

图2 CDH3促进HeLa细胞的增殖
Figure 2 CDH3 promoted proliferation of HeLa cells

2.3 Slug通过转录抑制CDH3表达下调β-catenin/C-myc蛋白表达

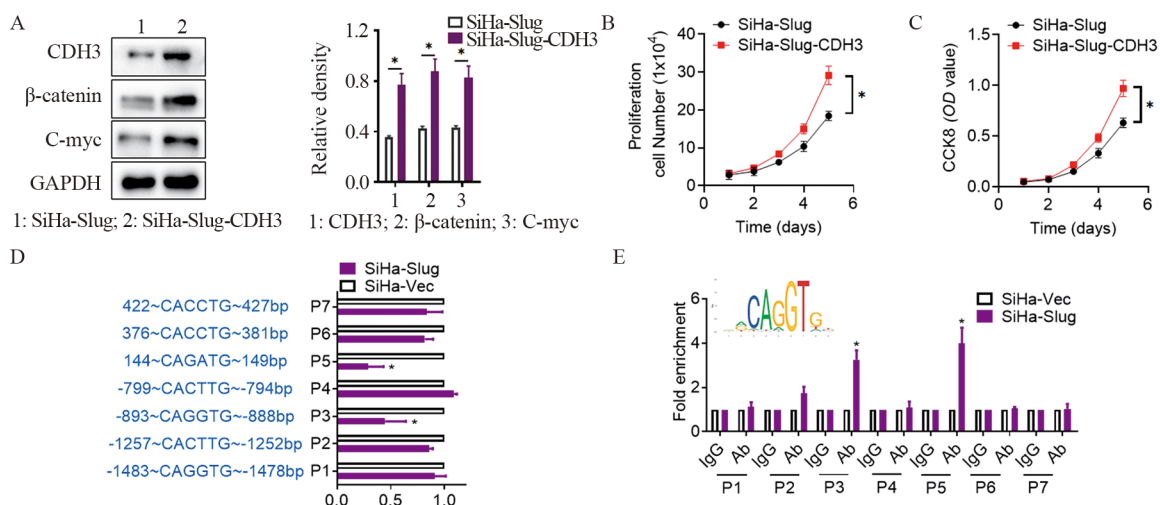
在SiHa-Slug细胞中挽救CDH3表达后,可以显著上调CDH3、β-catenin和C-myc蛋白的表达 ($P<0.05$),见图3A。细胞计数和CCK-8实验表明,挽救CDH3表达可以恢复SiHa-Slug细胞的增殖活力 ($P=0.0024, P=0.0032$),见图3B~C。双荧光素酶报告系统和染色质免疫共沉淀实验结果显示Slug可以识别并结合于CDH3启动子区的E-box,从而转录抑制CDH3表达,见图3D~E。

3 讨论

Slug被认为参与多种肿瘤细胞的生理过程,促进多种肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,增加肿瘤发生转移的风险^[5]。Slug可以促进肺癌及成胶质细胞瘤的增殖,但也可以抑制前列腺癌细胞和人表皮角质形成细胞的增殖^[6]。我们前期的研究发现,Slug通过抑制Wnt/β-catenin信号转导通路的活性可以抑制宫颈癌细胞的增殖和肿瘤生长^[6]。在本研究中, RNA-sequence测序的结果提示Slug表达可以显著抑制CDH3在SiHa细胞中的表达。CDH3 (P-cadherin)最早于1986年在发育中的小鼠胚胎中发现^[7]。与钙黏蛋白家族的其他成员类似,CDH3在细胞的生长和迁移过程中发挥重要作用。但是CDH3在不同类型肿瘤的发生及发展过程中呈现不同的作用^[4]。有研究表明CDH3

可以促进胃癌、胰腺癌及乳腺癌等肿瘤的发生,相反的,在肝细胞癌、非小细胞肺癌和黑色素瘤中,CDH3抑制肿瘤的发生^[8-10]。通过调节Wnt/β-catenin信号转导通路的活性,CDH3可以参与调节多种肿瘤细胞的增殖及肿瘤的生长^[11]。本研究证实了在SiHa细胞中过表达Slug可以显著抑制CDH3的表达。因此,我们推测在宫颈癌中,Slug是否可以通过CDH3调节Wnt/β-catenin信号转导通路的活性。

Cancer Cell Line Encyclopedia数据库的结果显示,CDH3 mRNA水平在HeLa细胞中低于SiHa细胞。Western blot和细胞免疫化学的结果也证实CDH3的表达在SiHa细胞中高于HeLa细胞。因此,为了进一步研究CDH3在宫颈癌细胞中的作用,在HeLa细胞中通过瞬转CDH3表达载体上调了CDH3蛋白水平,细胞计数和CCK-8的结果显示CDH3可以促进HeLa细胞的增殖。Western blot的结果证实,在HeLa细胞中瞬转CDH3表达载体后可以上调β-catenin及其下游分子C-myc的表达。此外,在Slug过表达的SiHa细胞中通过瞬转CDH3表达载体挽救CDH3表达后,也可以上调β-catenin及其下游分子C-myc的表达,并恢复细胞的增殖能力。目前的研究也证实,C-myc可以促进多种肿瘤细胞的增殖^[12]。因此,我们推测,Slug通过抑制CDH3的转录,可以下调β-catenin及其下游分子C-myc的表达,从而抑制宫颈癌细胞的增殖。



*: $P<0.05$; A: the expression of CDH3, β-catenin and C-myc in CDH3 rescued SiHa-Slug cells were detected by Western blot; B, C: the proliferation of SiHa-Slug and SiHa-Slug-CDH3 cells were detected by growth curves (B) and CCK-8 (C), respectively; D: the activity of CDH3 promoter was measured by dual luciferase assay and was presented as the fold change in the activity of SiHa-Slug cells versus SiHa-Vec cells; E: a quantitative ChIP assay of the CDH3 promoter region in SiHa-Slug and SiHa-Vec cells.

图3 Slug在SiHa细胞中转录抑制CDH3表达

Figure 3 Slug transcription inhibited CDH3 expression in SiHa cells

Slug通过识别并结合于目的基因启动子区的E-box (CANNTG) 作用元件转录抑制目的基因的表达^[5]。通过UCSC在线数据库分析CDH3基因启动子区, 发现在其启动子区427 bp到-1483 bp的序列中包含多个E-box (CANNTG) 特异序列。包括有: CACCTG (P7, P6), CAGATG (P5), CACTTG (P2, P4), CAGGTG (P3, P1)。本研究结果表明, 和SiHa-Vec相比, 荧光素酶报告载体P5和P3的酶活性都出现了不同程度的下降。此外, 染色质免疫共沉淀 (ChIP) 的结果显示, 在SiHa-Slug细胞中, Slug同P3和P5位的E-box (CANNTG) 有不同程度的结合。以上结果表明Slug可以特异性的识别并且结合于CDH3启动子区的E-box, 转录抑制CDH3的表达。综上所述, Slug通过转录抑制CDH3的表达, 可以下调 β -catenin及其下游分子C-myc的表达, 从而抑制宫颈癌细胞的增殖。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Hultgren NW, Fang JS, Ziegler ME, *et al.* Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5400.
- [3] Liu X, Feng Q, Zhang Y, *et al.* Absence of EpCAM in cervical cancer cells is involved in slug induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 163.
- [4] Li B, Guo X, Li N, *et al.* WNT1, a target of miR-34a, promotes cervical squamous cell carcinoma proliferation and invasion by induction of an E-P cadherin switch via the WNT/ β -catenin pathway[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(3): 489-503.
- [5] Meng J, Ai X, Lei Y, *et al.* USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2019, 9(2): 573-587.
- [6] Cui N, Yang WT, Zheng PS. Slug inhibits the proliferation and tumor formation of human cervical cancer cells by up-regulating the p21/p27 proteins and down-regulating the activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway via the trans-suppression Akt1/p-Akt1 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26152-26167.
- [7] Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos[J]. *J Cell Biol*, 1986, 103(6Pt2): 2649-2658.
- [8] Sridhar S, Rajesh C, Jishnu PV, *et al.* Increased expression of P-cadherin is an indicator of poor prognosis in breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 179(2): 301-313.
- [9] Dobrițoiu M, Stepan AE, Mărgărețescu C, *et al.* Immunoeexpression of E-cadherin, P-cadherin and fibronectin in gastric carcinomas[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2019, 60(2): 573-579.
- [10] Subbiah V, Erwin W, Mawlawi O, *et al.* Phase I Study of P-cadherin-targeted Radioimmunotherapy with 90Y-FF-21101 Monoclonal Antibody in Solid Tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(22): 5830-5842.
- [11] Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, *et al.* Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia[J]. *J Pathol*, 2003, 199(4): 471-478.
- [12] Feng YC, Liu XY, Teng L, *et al.* c-Myc inactivation of p53 through the pan-cancer lncRNA MILIP drives cancer pathogenesis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4980.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]

作者贡献:

刘宪、崔南: 设计实验、撰写及修改论文
张燕茹、冯倩: 实验实施、采集数据、统计分析
陈茜、王海燕: 分析和解释数据