

# TRIP13 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进非小细胞肺癌细胞的增殖与侵袭\*

董岩<sup>1</sup> 阿米娜·曲海<sup>2</sup> 蒋小君<sup>3</sup> 张峤<sup>2</sup>

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院重症医学科, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院肺癌一病区, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆生产建设兵团第二师库尔勒医院肿瘤内科, 新疆 库尔勒 841000)

**【摘要】** 目的 探讨甲状腺激素受体因子(TRIP13)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及其相关作用机制。方法 通过免疫组化法对比 105 例 NSCLC 组织与癌旁肺组织中 TRIP13 的表达差异,分析其表达与临床病理特征的关系。利用脂质体瞬时转染技术将 si-TRIP13 转染入人肺癌细胞系 H1299,并将转染 si-TRIP13-1 与 si-TRIP13-2 的细胞设为实验组,转染 siRNA 对照组的细胞设为阴性对照组(si-NC)组,未经任何处理的 H1299 细胞设为正常对照组。利用 RT-PCR 与 Western blot 法检测 siRNA 转染效果;利用 MTT、Transwell 检测实验组与阴性对照组的细胞增殖与侵袭能力,最后利用 Western blot 检测实验组与阴性对照组细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键蛋白  $\beta$ -catenin 及其下游相关靶蛋白 cyclin D1 和 survivin 的表达水平。**结果** 与癌旁肺组织相比,TRIP13 在 NSCLC 组织中表达明显增高,且 TRIP13 阳性表达率与肿瘤分化程度、有无淋巴结转移及 TNM 分期有显著相关性(均  $P < 0.05$ );肺癌细胞系 H1299 在转染 siRNA 后,实验组细胞中 TRIP13 的 mRNA 与蛋白表达显著低于阴性对照组与正常对照组( $P < 0.05$ );与阴性对照组相比,实验组细胞的增殖、侵袭能力均显著降低,且 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中的  $\beta$ -catenin、cyclin D1、survivin 蛋白表达水平亦明显下降(均  $P < 0.05$ )。**结论** TRIP13 可能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控 NSCLC 细胞的增殖、侵袭能力,从而促进 NSCLC 的发生、发展。

**【关键词】** TRIP13; NSCLC; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; H1299 细胞

**【中图分类号】** R734 **【文献标志码】** A **doi:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2020. 12. 003

## TRIP13 promotes proliferation and invasion of NSCLC cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

DONG Yan<sup>1</sup>, AMINA·Quhai<sup>2</sup>, JIANG Xiaojun<sup>3</sup>, ZHANG Jiao<sup>2</sup>

(1. Department of Critical Care Medicine, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Lung Cancer Ward 1, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3. Department of Oncology, Korla Hospital, The Second Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Korla 841000, Xinjiang, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of TRIP13 in NSCLC and its related mechanisms. **Methods** The difference of trip13 expression between NSCLC and paracancerous lung was compared by immunohistochemistry, and the relationship between trip13 expression and clinicopathological features was analyzed. Human lung cancer cell line H1299 was divided into experimental group si-TRIP13-1, si-TRIP13-2 and negative control group (si-NC) by using si-RNA transfection, and untreated H1299 cells were set as normal control group. The transfection effect of si-RNA was detected by RT-PCR and Western blot. MTT and Transwell experiments were used to determine the cell proliferation and invasion ability between experimental group and negative control group. Finally, Western blot was used to detect the expression of beta-catenin, a key molecule of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and its downstream target proteins cyclin D1 and survivin in experimental and negative control cells. **Results** The expression of TRIP13 in NSCLC was significantly higher than that in normal lung tissue ( $P < 0.05$ ). In NSCLC, the positive expression rate of TRIP13 was only significantly correlated with the degree of tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM stage ( $P < 0.05$ ). After transfection

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01C376);新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项(WJWY-201907)

通信作者:张峤, E-mail: dongyandf@163.com

of si-TRIP13 into lung cancer cell line H1299, the gene expression of si-TRIP13-1 and si-TRIP13-2 in the experimental group was significantly lower than that in the negative control group and the normal control group ( $P < 0.05$ ). Compared with the negative control group, the proliferation ( $P < 0.01$ ), invasiveness ( $P < 0.05$ ) of the cells in the si-TRIP13 experimental group were significantly inhibited, and the expression of beta-catenin, cyclin D1, survivin in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway was significantly inhibited. The expression level of survivin protein also decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TRIP13 may enhance the proliferation and invasion of NSCLC cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote the occurrence and development of NSCLC.

**【Key words】** TRIP13; NSCLC; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; H1299 cell

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病率与死亡率均居人类恶性肿瘤首位<sup>[1]</sup>。肺癌分为小细胞肺癌与非小细胞肺癌(Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC),NSCLC 占 80%以上<sup>[2-3]</sup>。尽管目前对 NSCLC 的研究领域众多,但对其发病机制的认识仍有限且患者 5 年生存率较低,故积极深入探讨 NSCLC 的发生、发展机制具有重要意义。甲状腺激素受体因子(TRIP13)是一种与甲状腺蛋白受体相互作用的蛋白,其基因位于 5 号染色体短臂 1 区 5 带,属于抗激动蛋白抗体(AAA)-ATP 家族成员<sup>[4]</sup>。最新有研究发现,无论在体内或体外实验中,TRIP13 能促进多种癌细胞的增殖、转移及侵袭功能<sup>[5-11]</sup>,如卵巢癌、前列腺癌、肝癌中高表达的 TRIP13 蛋白与患者临床进展与不良预后相关。而在肺腺癌中亦有研究证实,TRIP13 存在显著高表达,且高表达的 TRIP13 与较低的总体存活期具有相关性<sup>[12]</sup>。但 TRIP13 在 NSCLC 中的相关机制的研究甚少,本研究推测 TRIP13 可能同样能够促进 NSCLC 的进展。为了验证此推测,探讨 TRIP13 对 NSCLC 细胞的生物学作用,本研究通过分析其在 NSCLC 和对应癌旁肺组织中的表达并通过下调其表达水平进行进一步的研究,旨在为肺癌的早期诊断和治疗提供新的临床思路和实验室依据。

## 1 材料与方法

1.1 标本采集 选取 2016 年 1 月~2019 年 1 月新疆医科大学附属肿瘤医院经病理证实的且经手术治疗的 105 例 NSCLC 患者为研究对象。纳入标准:①患者术前均未接受任何化疗、放疗及免疫治疗。②年龄 $\geq 18$  岁。③至少有一个测量病灶,靶病灶的测量遵循实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST1.1)。④临床分期遵循美国癌症联合会第八版(AJCC)TNM 分期<sup>[1]</sup>。⑤对照肺组织为对应 105 例患者肿瘤周围( $> 5$  cm)的癌旁肺组织。⑥所有标本的使用均征得患者的同意,并签署知情同意书。

1.2 细胞系及主要试剂 本实验所用的人 NSCLC 细胞系 H1299 购于中国科学院上海细胞所;DMEM/HG、胎牛血清(美国 Gibco 公司),Trizol 试剂(美国

Hyclone 公司)、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司),BCA 蛋白定量试剂盒、MTT 试剂盒(美国 Sigma 公司),Transwell 小室(8  $\mu$ m, 德国 Millipore 公司)、基质胶、结晶紫(美国 BD 公司),RT-PCR(Real-time Polymerase Chain Reaction)试剂盒(日本 TaKaRa 公司);抗 TRIP13、 $\beta$ -catenin、细胞周期蛋白(cyclin D1)、凋亡抑制蛋白(survivin)抗体(美国 Santa Cruz 公司),小干扰 RNA(siRNA)(上海吉玛),转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司),免疫组化 EnVison 二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 免疫组化法 将收集的组织蜡块经切片机连续切片,每张切片厚度为 4  $\mu$ m,然后采用 EnVison 两步法。具体步骤:将切片放入 60  $^{\circ}$ C 的烤箱内烘烤 2 h 后置于二甲苯中脱蜡,然后再将切片依次置于 100%、95%、85%及 75%四个梯度的乙醇溶液各浸泡 1 min 使切片组织水化,流水冲洗干净,完成标本的脱蜡、水化。在经 3%过氧化氢湿盒内室温下处理 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。用柠檬酸缓冲液进行微波炉高温抗原修复 2 min,自然冷却至室温,滴加 5% BSA 封闭液封闭,放入 37  $^{\circ}$ C 孵箱孵育 20 min,以减少非特异性结合。滴加稀释(1:200)后的鼠抗人 TRIP13 单克隆抗体 4  $^{\circ}$ C 过夜,第二天取出后于室温下复温 20 min,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37  $^{\circ}$ C 恒温反应半小时,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。加 DAB 显色液显色,显微镜下观察,显示适当时及时清水冲洗以终止显色。苏木精轻微复染,盐酸酒精分化,充分水洗返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察。组织标本的临床病理学分期根据国际肺癌研究协会第八版肺癌 TNM 分类标准(2016)<sup>[12]</sup>。所有标本由 2 名高级职称的病理医师通过双盲法独立评估。结果判定采用 Sini-crope<sup>[13]</sup>改良法,按肿瘤细胞染色强度进行评分:0 分为无色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。按肿瘤细胞阳性百分比评分:0 分:阴性;1 分:<

10%；2分：11%~50%；3分：51%~75%；4分：>75%。按照染色强度和阳性细胞百分比的总和决定最终染色结果：其中0~3分为阴性，4分以上为阳性。

1.3.2 H1299 肺癌细胞培养、分组及转染 在 37℃，5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内，将 H1299 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/HG 培养液中培养。取处于对数生长期的 H1299，并在转染前 24 h 接种至 6 孔板中，将细胞密度调节至 3×10<sup>5</sup> 个/孔，继续培养，在细胞生长融合达 70%~80% 时进行转染，依照转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书将上海吉玛公司设计的两段不重复的 si-TRIP13 按 50 nmol/L 转染入 H1299 细胞并将转染 si-TRIP13-1 与 si-TRIP13-2 的细胞设为实验组，将转染 siRNA 对照组的细胞设置为阴性对照组 si-NC，正常对照组为未进行处理的 H1299 细胞。置于 5 mL 含 10% 的胎牛血清 DMEM/HG 中于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 的条件下继续进行培养，用于后续相关实验的检测。除特殊说明，实验均取转染 48 h 后的细胞用于研究。

1.3.3 RT-PCR 实验 按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA，置于紫外分光光度计中检测 RNA 的质量与浓度。取约 1 μg 总 RNA 为模板进行逆转录。逆转录按 Thermo 逆转录试剂盒进行。RT-PCR 按试剂盒进行。RT-PCR 引物：TRIP13 上游：5'-ACT-GTTGCACTTCACATTTTCCA-3'，下游：5'-TC-GAGGAGATGGGATTTGACG-3'；GAPDH 上游：5'-CTGGGCTACACTACACTGAGCACC-3'，下游：5'-AAGTGGTTCGTTGAGGGCAATG-3'。反应条件：95℃预变性 15 min，94℃变性 12 s，55℃退火 35 s，72℃延伸 30 s，扩增 30 个循环。以 GAPDH 作为内参，根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [Ct = Ct(实验组) - Ct(对照组)] 进行计算各组细胞中 TRIP13 的基因表达水平。以上检测独立重复 3 次。

1.3.4 MTT 实验 按 2×10<sup>5</sup>/mL 细胞/孔接种至 96 孔板，每孔 200 μL 含 10% 胎牛血清 DMEM/HG 培养液常规培养细胞，分别在培养 24、48、72 及 96 h 时测细胞的增值率。主要步骤如下：待细胞培养至规定时间后，弃原培养液。加入 20 μL/孔 MTT 溶液，继续培养 4 h 后，再加入二甲亚砜 150/孔，室温震荡混匀 10 min。置于酶标仪上选择 492 nm 波长处测定每孔吸光度值(OD value)，根据公式(对照组 OD - 实验组 OD)/对照组 OD 计算各组的细胞增殖率。实验重复 3 次，每组设定 5 个复孔。

1.3.5 Transwell 实验 在 8 μm 孔径 Transwell 上室底膜均匀铺上经无血清的 RPMI1640 稀释(1:3)的 Matrigel30 μL，37℃ 孵育半小时。用含 5% 胎牛血

清的 DMEM/HG 将转染后的细胞调整浓度为 2×10<sup>5</sup>/mL，上室加入 200 μL 细胞悬液，下室加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/HG 培养液，后置 37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h；弃除上室培养液，无水乙醇室温固定 15 min。取出上室于室温下晾干后用湿棉签擦拭上室残存细胞，0.1% 结晶紫固定染色半小时，后用 PBS 反复冲洗 3~5 次，冲洗掉多余的结晶紫染色剂。最后置于倒置显微镜 20 倍镜下拍照，每个处理组随机选择 5 个不同的视野进行细胞计数，取其平均值为浸润细胞数。以上实验重复 3 次。

1.3.6 Western blot 实验 收集实验组 si-TRIP13-1、si-TRIP13-2 与阴性对照组 si-NC 和正常对照组 H1299 细胞，加入 RIPA 及 PMSF 裂解细胞并提取细胞总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，加 5× 上样缓冲液煮沸 5 min 使蛋白变性，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，电泳结束后经 PVDF 膜进行转膜，后将 PVDF 膜置于由 TBST 与脱脂奶粉制成的 5% 封闭液中于室温下进行封闭 2 h。将 PVDF 膜与由 TBST 稀释的抗 TRIP13 (1:500)、β-catenin (1:500)、cyclin D1 (1:500)、survivin (1:500)、GAPDH (1:1000) 抗体，置于 4℃ 下过夜。将孵完一抗的 PVDF 膜用 TBST 清洗 3~5 次，每次 5 min 后，再将 PVDF 膜置于由 TBST 配置的 HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:8000) 二抗中，室温孵化 1 h。最后加入显色剂，ECL 发光。Image J 软件测定条带灰度值，以其与 GAPDH 蛋白的比值作为目的蛋白的相对含量。以上实验重复 3 次，结果取其平均值。

1.4 统计学分析 所有数据采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析，数据结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。计数资料用例或率表示，组间比较用  $\chi^2$  检验；采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法分析 TRIP13 与 NSCLC 临床病理特征关系。计量资料组间差异使用方差分析(one-way ANOVA)，两组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NSCLC 组织与癌旁肺组织中 TRIP13 的表达差异 TRIP13 在 NSCLC 组织中的表达阳性率(74.27%)明显高于 TRIP13 在癌旁肺组织中的表达(15.19%)( $\chi^2 = 74.032, P < 0.05$ )，见图 1。

2.2 TRIP13 在 NSCLC 组织中的表达与临床特征的关系 NSCLC 患者 TRIP13 蛋白的高表达率与患者的性别、年龄、组织学类型无关(*P* > 0.05)，与 NSCLC 是否有淋巴结转移、肿瘤分化程度及 TNM 分期相关(*P* < 0.05)。见表 1。

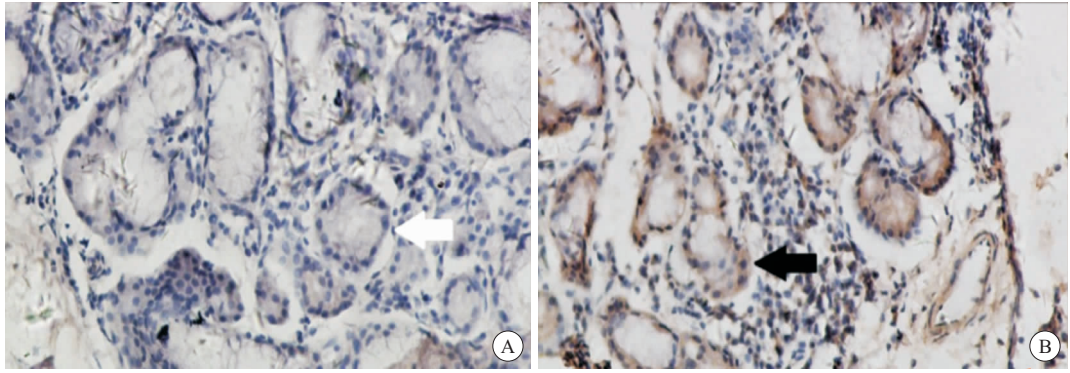


图 1 TRIP13 在肺癌组织和癌旁肺组织中的表达 (IHC×200)

Figure 1 TRIP13 expression in lung cancer tissues and adjacent lung tissues

注: A. TRIP13 在癌旁肺组织中的表达 (白色箭头指示 TRIP13 阴性表达); B. TRIP13 在 NSCLC 组织中的表达 (黑色箭头指示 TRIP13 阳性表达)

表 1 105 例 NSCLC 组织中 TRIP13 表达与临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between trip13 expression and clinicopathological characteristics in 105 NSCLC tissues

临床病例特征	n	TRIP13 的表达率			$\chi^2$	P
		阳性	阴性	阳性率 ( $\times 10^{-2}$ )		
性别					0.319	0.572
男	61	38	23	62.3		
女	44	25	19	56.8		
年龄(岁)					0.800	0.371
>60	63	40	23	63.5		
≤60	42	23	19	54.8		
组织类型					0.008	0.927
腺癌	78	47	31	60.3		
鳞癌	27	16	11	59.3		
分化程度					6.648	0.010
低	14	4	10	28.6		
中、高	91	59	32	64.8		
淋巴结转移					7.908	0.005
有	88	58	30	65.9		
无	17	5	12	29.4		
TNM 分期					23.628	<0.05
I	52	19	33	36.5		
II+III	53	44	9	83.0		

表 2 转染 siRNA 后 NSCLC 细胞中 TRIP13 mRNA、TRIP13 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The expression level of trip13 mRNA in NSCLC cells after siRNA transfection

组别	n	mRNA 表达量	TRIP13
H1299	3	10.23 ± 4.47	0.761 ± 0.032
Si-NC	3	9.51 ± 6.16	0.728 ± 0.017
Si-TRIP13-1	3	2.44 ± 5.38 <sup>①</sup>	0.263 ± 0.005 <sup>①</sup>
Si-TRIP13-2	3	2.17 ± 7.49 <sup>①</sup>	0.244 ± 0.010 <sup>①</sup>
F		10.462	672.618
P		0.023	<0.05

注: 与正常对照组 H1299 相比, ①P<0.05

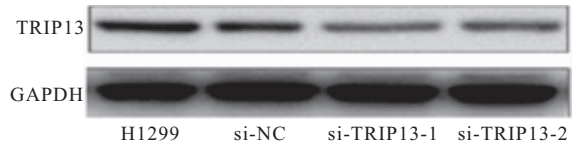


图 2 转染 siRNA 后 NSCLC 细胞中 TRIP13 蛋白的表达

Figure 2 Expression of trip13 protein in NSCLC cells after siRNA transfection

### 2.3 转染 siRNA 后 NSCLC 细胞中 TRIP13 的表达

与正常对照组 H1299 相比, 阴性对照组 si-NC 中 TRIP13 在 mRNA 与蛋白的表达上无明显差异 (均  $P>0.05$ ), 提示阴性对照序列不影响 TRIP13 的 mRNA 与蛋白表达; 与正常对照组 H1299 相比, 实验组 si-TRIP13-1, si-TRIP13-2 中 TRIP13 在 mRNA 与蛋白上的表达显著降低 (均  $P<0.05$ ), 提示 siRNA 转染成功。见表 2、图 2。

### 2.4 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞增殖与侵袭能力的影响

MTT 实验显示, 与阴性对照组 si-NC 相比, 实验组 si-TRIP13-1, si-TRIP13-2 在转染后的 48、72 和 96 h 的细胞增殖显著降低 ( $P<0.05$ ), 见图 3; Transwell 实验结果显示, 与阴性对照组 si-NC 相比,

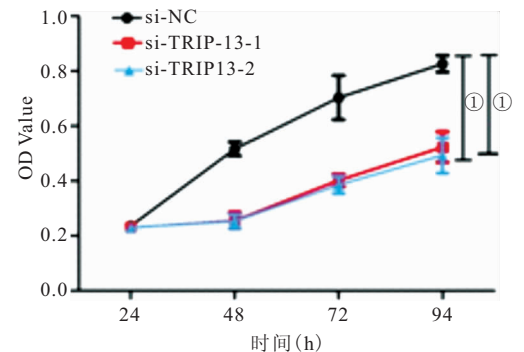


图 3 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞的增殖能力的影响

Figure 3 Effect of siRNA on the proliferation of NSCLC cells

注: 与阴性对照组 si-NC 组相比, ①P<0.05

实验组 si-TRIP13-1, si-TRIP13-2 的浸润细胞数显著减少 (均  $P<0.05$ )。见表 3。

2.5 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响 Western blot 实验提示,与阴性对照组 SI-NC 相比,实验组 si-TRIP13-1, si-TRIP13-2 中  $\beta$ -catenin、其靶蛋白 cyclin D1 及 survivin 的表达显著降低(均  $P < 0.05$ )。见图 4,表 4。

表 3 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞的侵袭能力的影响 $(\bar{x} \pm s)$ ,个

Table 3 Effect of siRNA transfection on the invasiveness of NSCLC cells

组别	n	侵袭细胞数量
Si-NC	3	105.50 $\pm$ 8.52
Si-TRIP13-1	3	44.62 $\pm$ 13.81 <sup>Ⓛ</sup>
Si-TRIP13-2	3	39.83 $\pm$ 11.75 <sup>Ⓛ</sup>
F		29.195
P		0.021

注:与阴性对照组 si-NC 相比,Ⓛ $P < 0.05$

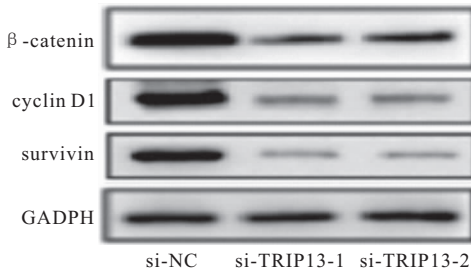


图 4 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of siRNA on the expression of  $\beta$ -catenin, cyclin D1 and Survivin in NSCLC cells

表 4 转染 siRNA 后对 NSCLC 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 及 Survivin 蛋白表达的影响 $(\bar{x} \pm s)$

Table 4 Effect of siRNA on the expression of  $\beta$ -catenin, cyclin D1 and Survivin in NSCLC cells

组别	n	$\beta$ -catenin	Cyclin D1	Survivin
Si-NC	3	1.45 $\pm$ 0.044	1.23 $\pm$ 0.050	1.19 $\pm$ 0.022
Si-TRIP13-1	3	0.54 $\pm$ 0.017 <sup>Ⓛ</sup>	0.19 $\pm$ 0.006 <sup>Ⓛ</sup>	0.11 $\pm$ 0.004 <sup>Ⓛ</sup>
Si-TRIP13-2	3	0.63 $\pm$ 0.011 <sup>Ⓛ</sup>	0.14 $\pm$ 0.008 <sup>Ⓛ</sup>	0.09 $\pm$ 0.007 <sup>Ⓛ</sup>
F		64.619	22.017	19.675
P		$< 0.05$	0.025	0.038

注:与阴性对照组 si-NC 相比,Ⓛ $P < 0.05$

### 3 讨论

肺癌是恶性肿瘤死亡的首要原因,约占全世界所有癌症死亡人数的 1/3,其中 NSCLC 患者又占肺癌总数的 80% 以上<sup>[14]</sup>。尽管近年来对肺癌的研究及治疗已取得很大进步,但是肺癌的发生、发展是一个多基因突变的过程,同时又有蛋白、细胞因子等多个因素互相作用,其早期诊断率及 5 年生存率仍然较低<sup>[15]</sup>。TRIP13 因其所含有的 AAA+ 的保守结构域能够通过该家族 ATP 蛋白酶水解诱导底物蛋白质构象形成六聚体,从而参与细胞分裂、增殖等多个生物学行为过程<sup>[16]</sup>。有研究发现,在头颈部恶性肿瘤中过表达的

TRIP13 可阻断 DNA 双链断裂的修复从而导致正常细胞的恶性转化<sup>[7]</sup>。在多发性骨髓瘤患者体内发现 TRIP13 基因显著上调,进一步的体外实验提示 TRIP13 可与有丝分裂检查点沉默蛋白 p31 互相作用,从而导致减数分裂中染色体的错误分离<sup>[17]</sup>。在慢性淋巴细胞白血病中抑制 TRIP13 的表达可诱导癌细胞凋亡并抑制其增殖<sup>[18]</sup>。但 TRIP13 与 NSCLC 的关系研究甚少。

本实验采用免疫组化法对比肺癌组织与癌旁肺组织,结果提示 TRIP13 在 NSCLC 组织中高表达,TRIP13 可能是一个促癌基因。结合患者的临床病理特征发现,TRIP13 表达与患者肿瘤分化程度、TNM 分型及有无淋巴结转移高度相关( $P < 0.05$ )。进一步通过 siRNA 转染干扰肺癌细胞系 H1299 细胞内的 TRIP13 的表达,再通过 RT-PCR 及 Western blot 验证转染 si-TRIP13 细胞成功后,利用 MTT 及 Transwell 实验对转染 si-TRIP13 后的肺癌细胞进行增殖及侵袭能力的验证发现,转染 si-TRIP13 后的实验组细胞的增殖及侵袭能力明显降低(均  $P < 0.05$ )。本研究结果提示,TRIP13 在 NSCLC 中高表达,并通过促进细胞的增殖与侵袭能力促进肿瘤的发生、发展,而 TRIP13 具体通过何种机制造成以上影响,本实验又进一步设计了 Western blot 实验进行探讨。

Wnt 通路是胚胎的发育、器官形成和组织再生的重要信号通路<sup>[19]</sup>。其中最经典的是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,该通路由 Wnt 配体和家族受体结合而激活。有研究发现,当 Wnt 配体与家族受体结合时,可触发细胞内一系列反应,致使大量  $\beta$ -catenin 蛋白大量聚集,而异常增多的  $\beta$ -catenin 蛋白转入细胞核并与核内受体相结合从而诱导靶基因过表达,并活化下游靶蛋白 cyclin D1、survivin 等从而参与肿瘤的发生、发展<sup>[20-21]</sup>。在肝癌与胃癌中高表达的 TRIP13 可能分别通过上调 Wnt 信号通路中 survivin 与 cyclin D1 蛋白的表达促进肿瘤的进展<sup>[22]</sup>。本实验通过 Western blot 实验在转染 si-TRIP13 的肺癌细胞中发现,与阴性对照组相比,实验组细胞中的  $\beta$ -catenin 及其下游靶蛋白 cyclin D1、survivin 的表达明显降低,这提示 TRIP13 可能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号发挥作用。

### 4 结论

本研究结果显示,TRIP13 可能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进肺癌细胞的增殖、侵袭,进而影响 NSCLC 的发生、发展。本研究丰富了对 NSCLC 侵袭、转移的分子机制认识,对肺癌的早期诊断及临床治疗具有一定的指导意义。

## 【参考文献】

- [1] 张晓芳,樊莉,尤江云,等. 外周血免疫细胞表达水平对肺癌患者生存期的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(2):180-185.
- [2] 张孝钦,陈玄一,邹盛昌. 循环肿瘤细胞在晚期非小细胞肺癌化疗疗效监测及预后预测中的价值研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(2):183-188.
- [3] 孙洪帅,朱华,高海燕,等. 肿瘤标志物 SCC-Ag、CEA、CY-FRA21-1 和 D-二聚体联合检测对非小细胞肺癌的早期诊断价值[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(5):1020-1024.
- [4] 柳杰,肖成,胡家伦,等. TRIP13 在多种恶性肿瘤中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(44):101-105.
- [5] HAI J, ZHU C, WANG T, *et al.* TRIM14 is a Putative Tumor Suppressor and Regulator of Innate Immune Response in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 214-217.
- [6] KURITA K, MAEDA M, MANSOUR M A, *et al.* TRIP13 is expressed in colorectal cancer and promotes cancer cell invasion [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):5240-5246.
- [7] 高彦俊. TRIP13 对膀胱癌的作用研究[D]. 兰州:兰州大学, 2019.
- [8] DI S, LI M, MA Z, *et al.* TRIP13 upregulation is correlated with poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Pathology-Research and Practice*, 2019, 215(6):152415.
- [9] YAO J, ZHANG X, LI J, *et al.* Silencing TRIP13 inhibits cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating of TGF- $\beta$ 1/smad3 [J]. *Cancer Cell International*, 2018, 18(1):208.
- [10] 王清松,青刚. 沉默 TRIP13 位点对慢性淋巴细胞白血病患者细胞株生物学影响及通路机制[J]. 解剖学研究, 2019, 41(5): 430-433.
- [11] ZHOU X Y, SHU X M. TRIP13 promotes proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells through Notch signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2): 522-529.
- [12] LI W, ZHANG G, LI X, *et al.* Thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13) overexpression associated with tumor progression and poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 499(3):416-424.
- [13] SINICROPE F A, RUAN S B, CLEARY K R, *et al.* bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(2):237-241.
- [14] BALLESTER B, MILARA J, CORTIJO J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3):593.
- [15] SINGHI E K, HORN L, SEQUIST L V, *et al.* Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Sequencing Agents in the EGFR-Mutated/ALK-Rearranged Populations [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2019, 39:e187-197.
- [16] WENDLER P, CINIANSKY S, KOCK M, *et al.* Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(1):2-14.
- [17] TAO Y, YANG G, YANG H, *et al.* TRIP13 impairs mitotic checkpoint surveillance and is associated with poor prognosis in multiple myeloma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16):26718.
- [18] ZHOU K, ZHANG W, ZHANG Q, *et al.* Loss of thyroid hormone receptor interactor 13 inhibits cell proliferation and survival in human chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):25469-25481.
- [19] DU Z, ZHANG H, CHEN Q, *et al.* Intranasal Calcitonin Gene-Related Peptide Protects Against Focal Cerebral Ischemic Injury in Rats Through the Wnt/beta-Catenin Pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8860-8869.
- [20] FANG F, VANCEAVE A, HELMUTH R, *et al.* Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in human osteosarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(95):36780-36792.
- [21] CHEN Y, PEG Y, XU Z, *et al.* Knockdown of lncRNA SNHG7 inhibited cell proliferation and migration in bladder cancer through activating Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(2):302-307.
- [22] DAZHI W, MENGXI Z, FUFENG C, *et al.* Elevated expression of thyroid hormone receptor-interacting protein 13 drives tumorigenesis and affects clinical outcome [J]. *Biomark Med*, 2017, 11(1):19-31.

(收稿日期:2020-02-03;修回日期:2020-04-05;编辑:郭翠)