

硫氧还蛋白在宫颈癌中的表达及作用机制*

吴和刚 朱坤婷 王姣姣 庄翔

(宜宾市第一人民医院病理科, 四川 宜宾 644000)

【摘要】 目的 研究硫氧还蛋白(Trx1)在宫颈癌中的表达水平及其作用机制。方法 在 3 对宫颈癌和癌旁组织中,采用蛋白质免疫印迹法(Western Blot)检测 Trx1 蛋白的表达水平;同时在 3 对宫颈癌和癌旁组织中,通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测与宫颈癌密切相关的 SND1 分子的表达水平;用免疫组织化学(IHC)检测宫颈癌组织中 Trx1 蛋白的表达水平以及亚细胞定位;用免疫荧光(IF)实验检测蛋白 Trx1 和 HLA-DR 在宫颈癌细胞中的表达水平以及通过不同的荧光标记后分析两种蛋白的荧光共定位情况。结果 Trx1 蛋白在宫颈癌组织中显著高表达;SND1 分子在宫颈癌组织中显著高表达;免疫组化显示 Trx1 在主要定位于宫颈癌细胞的细胞质中并且表达显著增加;细胞内绿色荧光标记的 Trx1 和红色荧光标记的 HLA-DR 在荧光显微镜下存在共定位现象(均 $P < 0.05$)。结论 Trx1 蛋白在宫颈癌组织中显著高表达,并且与 HLA-DR 共定位于细胞质中。

【关键词】 硫氧还蛋白;HLA-DR 蛋白;宫颈癌;人类高危乳头瘤病毒

【中图分类号】 Q71;R737.3;R394.3 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.05.008

Expression of thioredoxin-1 and analysis of its role in cervical cancer

WU Hegang, ZHU Kunting, WANG Jiaojiao, ZHUANG Xiang

(Department of Pathology, The First People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan, China)

【Abstract】 **Objective** To research the expression of thioredoxin-1 (Trx1) and its role in cervical cancer. **Methods** Western blot was used to detect the protein expression of Trx1 in 3 pairs of cervical cancer tissues and adjacent tissues. Reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the level of staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1(SND1) which was closely related to cervical cancer in 3 pairs of cervical cancer tissues and adjacent tissues. The levels and subcellular localization of Trx1 were detected by immunohistochemical staining (IHC) in cervical cancer. Fluorescence microscope analysis was used to observe the expression and co-location between Trx1 and HLA-DR in cervical cancer cells. **Results** The protein levels of Trx1 were significantly higher in cervical cancer tissues. The mRNA levels of SND1 were significantly increased in cervical cancer tissues. The IHC results showed that the expression of Trx1 was higher in cervical cancer tissues and localized in cytoplasm. We found that Trx1 was co-localized with HLA-DR in cervical cancer cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Trx1 is significantly increased in cervical cancer and co-localizes with HLA-DR in cytoplasm.

【Key words】 Thioredoxin-1; HLA-DR; Cervical cancer; hrHPV

在世界范围内,宫颈癌是公认的导致女性死亡的主要因素之一;每年大约有 53000 新增病例及 27500 死亡病例^[1-3]。与宫颈癌发生发展密切相关的主要危险因素有:人类高危乳头瘤病毒(high-risk human papilloma virus, hrHPV)感染、年龄、吸烟、分娩以及饮食^[1,3-7]。宫颈癌的进展过程主要包括以下几个阶段:正常的宫颈上皮,宫颈低级别上皮内瘤变,宫颈高

级别上皮内瘤变,在此过程中,hrHPV 的感染为主要的致病因素。宫颈上皮感染 hrHPV 后,宿主细胞的基因发生改变,最终导致多种抑癌因子被沉默以及多种癌基因被激活,从而引起一系列的功能异常改变。Trx1 在肿瘤的病理生理改变中起到重要作用,并且在多种肿瘤中检测到 Trx1 的异常表达^[8]。已有研究发现 Trx1 参与了各种重要的细胞功能,并且在多种人

基金项目:宜宾市科技计划项目(20172SF005-9)

引用本文:吴和刚,朱坤婷,王姣姣,等. 硫氧还蛋白在宫颈癌中的表达及作用机制[J]. 西部医学,2022,34(5):671-674. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.05.008

类肿瘤中表达上调,参与了肿瘤进展过程和耐药现象^[9]。已知 Trx1 主要是通过与其下游的过氧化物酶相互作用而发挥其抗氧化的功能^[10]。本研究将在目前研究的基础上进一步验证 Trx1 在宫颈癌中的表达情况,探讨 Trx1 发挥作用的分子学机制,为抑制宫颈癌的发生发展寻找新的方法和药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 鼠抗人 GAPDH 抗体(Santa Cruz 公司); DAPI(Sigma 公司); 兔抗人 Trx1, HLA-DR (Bioworld 公司); 荧光二抗 (Santa Cruz 公司); 0.01M 柠檬酸钠缓冲液颗粒、苏木素染液(重庆鼎国生物技术有限公司); S-P 免疫组化试剂盒、DAB 染色试剂盒(北京中杉金桥公司); PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara 公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织标本收集:宜宾市第一人民医院病理科标本库中提取 3 对宫颈癌及癌旁组织标本。

1.2.2 组织蛋白检测:称取相同重量的宫颈癌组织,放入 EP 管中备用。加入预冷的含 PMSF 的 RIPA 裂解液,用匀浆器使组织完全裂解后,14000 × g, 4℃ 离心取上清, -80℃ 保存。取上清液加入 loading buffer, 进行 SDS-PAGE 以及 Western blot 检测蛋白表达。

1.2.3 基因表达检测:根据 GenBank 提供的 SND1 cDNA 序列(NM_014390.4)用 Primer 5.0 设计合成引物。上游 5'-AACAAGAACTGCGTCCCCT-3'; 下游 5'-GATGTGCAGCCAGCCGATAA-3'。GAPDH 引物序列:上游 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'; 下游 5'-GTCAAAGGTGGAGGAGTGGG-3'。从宫颈癌中提取人的 mRNA,以其为模板反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增各组 SND1 基因。并用琼脂糖凝胶电泳检测表达情况。

1.2.4 免疫组织化学检测蛋白定位和表达:人宫颈癌组织和癌旁组织固定并制成蜡块后,对组织进行切片、脱蜡、梯度乙醇水化、通透、抗原修复、一抗 Trx1 于 4℃ 孵育过夜、显色,最后复染和封片。于光学显微

镜下观察结果并拍照。

1.2.5 免疫荧光检测蛋白定位和表达:人宫颈癌组织和癌旁组织在冰冻切片机上切片后,对组织进行通透、封闭、一抗 Trx1 和 HLA-DR 于 4℃ 孵育过夜、第二天加入稀释的荧光二抗,甘油封片后,荧光显微镜下观察结果并拍照。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,配对组间比较采用 *t* 检验、多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 Trx1 蛋白在宫颈癌和癌旁组织中的表达情况

Trx1 在宫颈癌组织中高表达,在癌旁组织中表达相对较低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

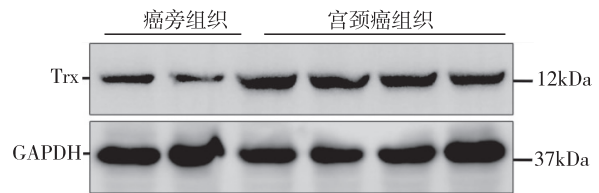


图 1 Trx1 蛋白在宫颈癌组织和癌旁组织中的表达

Figure 1 The expression of Trx1 in cervical cancer and adjacent tissues

2.2 RT-PCR 结果 SND1 在宫颈癌组织中表达显著高于癌旁组织,见图 2。

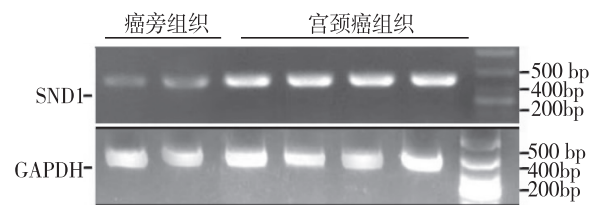


图 2 SND1 基因的 RT-PCR 检测结果

Figure 2 Identification of gene expression of SND1 by RT-PCR

2.3 免疫组织化学实验结果 与对照组相比,Trx1 蛋白在宫颈癌组织中表达明显高于癌旁组织,并且主要定位于细胞质中,见图 3。

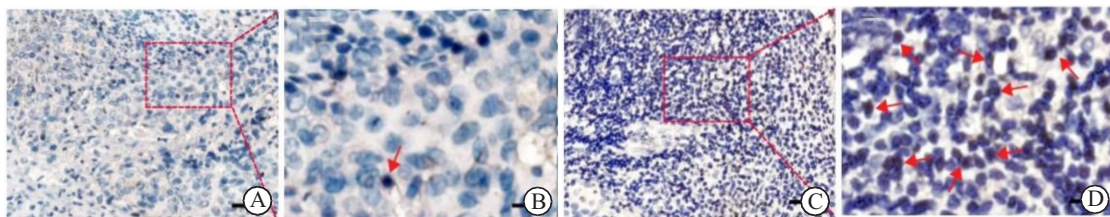


图 3 免疫组织化学实验鉴定 Trx1 在宫颈癌和癌旁组织中的表达

Figure 3 Verification of Trx1 in cervical cancer and adjacent tissues by IHC

注:A. 癌旁组织(40×); B. 癌旁组织(200×); C. 宫颈癌组织(40×); D. 宫颈癌组织(200×)

2.4 免疫荧光实验结果 Trx1 和 HLA-DR 均表达在胞

浆中,且 Trx1 和 HLA-DR 表达有共定位现象,见图 4。

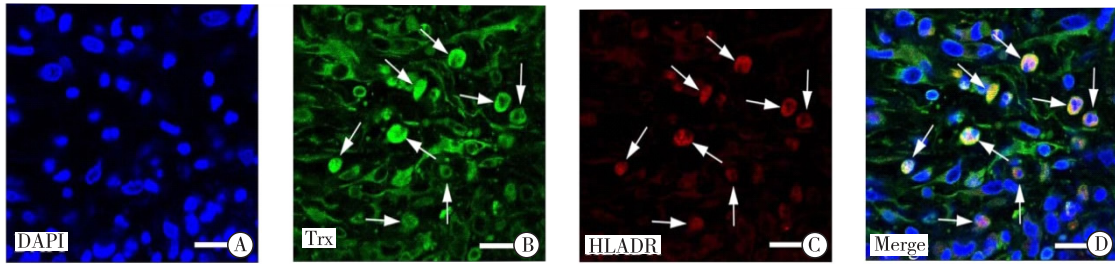


图 4 免疫荧光观察 Trx1 与 HLA-DR 的共定位

Figure 4 Co-localization of Trx1 and HLA-DR in cervical cancer tissues by IF

注: A. DAPI 在宫颈癌组织中; B. Trx1 在宫颈癌组织中; C. HLA-DR 在宫颈癌组织中; D. 宫颈癌组织中 Trx1 和 HLA-DR 共定位现象(200×)

3 讨论

目前为止,宫颈癌中已发现了多种分子层面改变。最近的研究证明多种致癌因子能够促进宫颈癌的进展过程,其中包括 HMAG1、KLF5、miR-146b-3p 以及多种长链非编码 RNAs^[11-14]。另一方面,miR-27a, miR-328 等被证实具有抑制宫颈癌的作用^[15,16]。同时,通过高通量的基因测序,发现了在宫颈癌中多种基因突变,如 *FAT1*, *MLL3* 和 *FADD* 等^[16]。以上这些研究都提示了在宫颈癌的发生发展过程中存在多种机制及信号通路,然而 Trx1 与宫颈癌的关系的研究并不充分。

Trx1 是一种 12 kDa 的具有氧化还原活性的二硫醇蛋白质;它位于半胱氨酸-甘氨酸-脯氨酸-半胱氨酸的活性区域,并且在人体内广泛存在^[17]。多种应激因素可以诱导产生这种防御蛋白;Trx1 具有抗氧化、抗凋亡和抗炎等作用^[18]。已有研究证明 Trx1 与多种肿瘤的发生发展有关^[8]。本实验通过检测人宫颈癌和癌旁组织中 Trx1 蛋白的表达,证明了 Trx1 在宫颈癌组织中显著高表达(图 1),这与它在其他肿瘤中的表达一致^[8],同时也提示 Trx1 很可能促进宫颈癌的发生发展过程。目前普遍认为 *SND1* 也能促进多种人类肿瘤的进展^[19]。本研究检测了宫颈癌和癌旁组织中 *SND1* mRNA 的表达情况,发现其在宫颈癌组织中表达高于癌旁组织,推测 *SND1* 也能促进宫颈癌的进展,并且与 Trx1 在宫颈癌中的表达趋势很可能是一致。

基因多态性与多种肿瘤的发生发展有关^[20]。最近的研究发现人白细胞抗原的多态性突变与宫颈癌的进展有关^[20]。通过对多个非洲国家(南非、津巴布韦、摩洛哥、苏丹、突尼斯、塞内加尔)的研究,确定了 *TGFBI10C*、*TGFBI509T*、*HLADRB1*、*CCR2V6L*、*IL-10-1082G/A* 和 *FasR-1377G* 的基因多态性与宫颈癌的危险因素相关^[21]。本研究中检测了宫颈癌组织中 Trx1 与 HLA-DR 表达以及定位,发现二者均在

宫颈癌细胞中表达,且主要定位于细胞质中;通过不同的荧光标记两种蛋白质,还确定了这两种蛋白质在宫颈癌细胞中存在共定位现象。这一发现提示了 Trx1 和 HLA-DR 很可能存在相互作用。结合已有报道^[21],我们推测 Trx1 与 HLA-DR 之间可能存在相互作用,并且对宫颈癌的发生发展起到促进作用。

4 结论

本研究证实了 Trx1 在宫颈癌中显著高表达,且与 HLA-DR 可能存在相互作用,但是两者之间发生相互作用的机制以及如何影响宫颈癌的发生发展仍不够清楚。后期将继续探讨它们之间的相互作用是通过哪些信号通路或者中间分子实现的,以及对宫颈癌的增殖转移等生物学特征产生怎样的促进作用,以便为宫颈癌的预后判断以及早期诊断提供新的思路和方法。

【参考文献】

- [1] SCHIFFMAN M, SOLOMON D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic co-testing[J]. N Engl J Med, 2013,369(24):2324-2331.
- [2] TEWARI K S, SILL M W, LONG H J, 3 R D, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2014,370(8):734-743.
- [3] GAFFNEY D K, HASHIBE M, KEPKA D, et al. Too many women are dying from cervix cancer: Problems and solutions [J]. Gynecol Oncol, 2018,151(3):547-554.
- [4] CROSBIE EJ, EINSTEIN MH, FRANCESCHI S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. Lancet, 2013, 382 (9895):889-899.
- [5] DASGUPTA S, CHAKRABORTY S B, ROY A, et al. Differential deletions of chromosome 3p are associated with the development of uterine cervical carcinoma in Indian patients[J]. Mol Pathol, 2003,56(5):263-269.
- [6] TSU V, JERÓNIMO J. Saving the World's Women from Cervical Cancer[J]. N Engl J Med, 2016, 374(26):2509-2511.
- [7] KAHN J A. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia[J]. N Engl J Med, 2009,361(3):271-

- 278.
- [8] LINCOLN D T, ALI EMADI E M, TONISSEN K F, *et al.* The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(3b):2425-2433.
- [9] RANINGA P V, TRAPANI G D, TONISSEN K F. Cross Talk between Two Antioxidant Systems, Thioredoxin and DJ-1: Consequences for Cancer[J]. *Oncoscience*, 2014, 1(1):95-110.
- [10] WOOLSTON C M, STORR S J, ELLIS I O, *et al.* Expression of thioredoxin system and related peroxiredoxin proteins is associated with clinical outcome in radiotherapy treated early stage breast cancer[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 100(2):308-313.
- [11] FU F, WANG T, WU Z, *et al.* HMGAI exacerbates tumor growth through regulating the cell cycle and accelerates migration/invasion via targeting miR-221/222 in cervical cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6):594.
- [12] MA D, CHANG L Y, ZHAO S, *et al.* KLF5 promotes cervical cancer proliferation, migration and invasion in a manner partly dependent on TNFRSF11a expression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15683.
- [13] LIU C, TIAN X, ZHANG J, *et al.* Long Non-coding RNA DLEU1 Promotes Proliferation and Invasion by Interacting With miR-381 and Enhancing HOXA13 Expression in Cervical Cancer [J]. *Front Genet*, 2018, 9:629.
- [14] YAO S, XU J, ZHAO K, *et al.* Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11):1055.
- [15] FANG F, HUANG B, SUN S, *et al.* miR-27a inhibits cervical adenocarcinoma progression by downregulating the TGF- β RI signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):395.
- [16] HUANG J, QIAN Z, GONG Y, *et al.* Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(3):186-194.
- [17] POWIS G, MONTFORT W R. Properties and biological activities of thioredoxins [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001, 30:421-455.
- [18] WATANABE R, NAKAMURA H, MASUTANI H, *et al.* Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 127(3):261-270.
- [19] CUI X, ZHANG X, LIU M, *et al.* A pan-cancer analysis of the oncogenic role of staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (SND1) in human tumors[J]. *Genomics*, 2020, 112(6):3958-3967.
- [20] PAASO A, JAAKOLA A, SYRJÄNEN S, *et al.* From HPV Infection to Lesion Progression: The Role of HLA Alleles and Host Immunity[J]. *Acta Cytol*, 2019, 63(2):148-158.
- [21] KUGUYO O, TSIKAI N, THOMFORD N E, *et al.* Genetic Susceptibility for Cervical Cancer in African Populations: What Are the Host Genetic Drivers? [J]. *OMICS*, 2018, 22(7):468-483.

(收稿日期:2021-06-03;编辑:张翰林)

(上接第 670 页)

- [17] 俞维. HGF/c-Met 信号通路与肿瘤的研究进展[J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(23):5565-5566.
- [18] 艾碧, 方科. MET/HGF 抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2014, 6(6):387-391.
- [19] 郭宏艳, 何利珍, 张云霏, 等. 结肠癌转移相关基因 1 及其在肿瘤中的作用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2016, 43(1):32-35.
- [20] 段会平. c-Met 蛋白在老年结肠癌患者组织中的表达及其意义[J]. *医学临床研究*, 2016, 32(1):148-149, 150.
- [21] TEKCHAM D S, D CHEN, LIU Y, *et al.* F-box proteins and cancer: an update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects[J]. *Theranostics*, 2020, 10(9):4150-4167.
- [22] 徐光辉, 汤善宏, 陈康, 等. 神经生长因子及受体与肿瘤发生关系研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 19(7):1510-1513.
- [23] WANG J, XX LUO, TANG Y L, *et al.* The prognostic values of insulin-like growth factor binding protein in breast cancer[J]. *Medicine*, 2019, 98(19):e15561.
- [24] 高春英, 刘金钰, 李慧. 神经生长因子及其受体 TrkA 在卵巢癌中的作用[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(8):1310-1312.
- [25] H KONISHI, KASHIMA S, GOTO T, *et al.* The Identification of RNA-Binding Proteins Functionally Associated with Tumor Progression in Gastrointestinal Cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(13):3165.
- [26] 王弘, 郝良纯, 薛辛东. Γ 干扰素诱导功能性 TrkA 的表达激活 NGF/TrkA 传导通路诱导原代神经母细胞瘤细胞分化的实验研究[J]. *中国医学工程*, 2008, 6(1):1-4.
- [27] PAULETTO E, EICKHOFF N, PADRO N A, *et al.* TRIMming Down Hormone-Driven Cancers: The Biological Impact of TRIM Proteins on Tumor Development, Progression and Prognostication[J]. *Cells*, 2021, 10(6):1517.
- [28] 刘凤娟, 全进毅. 神经生长因子和血管内皮生长因子在上皮性卵巢癌中表达及意义研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017, 33(9):985-987.
- [29] RAYCHAUDHURI S, RAYCHAUDHURI S. Regulatory Role of T Cell TrkA Receptor in Human Autoimmune Disease: NGF/TrkA System Disrupts Peripheral Tolerance[J]. *Clinical Immunology*, 2010, 135(7):S8-S9.
- [30] 娄淑清, 熊向前, LOU, 等. MACC1 及 c-met 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2017, 3(41):20-23.
- [31] SAJI M, KIM C S, WANG C, *et al.* Akt isoform-specific effects on thyroid cancer development and progression in a murine thyroid cancer model[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1):18316.

(收稿日期:2021-06-18;修回日期:2022-03-27;编辑:张翰林)