

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.006

干扰素诱导的跨膜蛋白 1 在宫颈鳞癌中的表达及其生物学作用 *

刘晓英 沈 鑫 张 静 荣 晔 邓 卓

(陕西省人民医院妇科 陕西 西安 710068)

摘要 目的: 探讨干扰素诱导的跨膜蛋白 1 (IFITM1) 在宫颈鳞癌中的表达及其生物学作用。**方法:** 通过免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 检测宫颈鳞癌组织和癌旁组织中 IFITM1 的表达。使用靶向 IFITM1 的 siRNA (si-IFITM1 组) 和高表达 IFITM1 基因的重组 pcDNA3.1 质粒 (pcDNA3.1-si-IFITM1 组) 转染 SiHa 细胞下调或上调 IFITM1 的表达。通过伤口愈合实验、Transwells 迁移实验和基质胶侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力。细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测细胞增殖; 流式细胞术测定细胞凋亡。Western blot 检测 PTEN、PI3K 和 AKT 的表达。通过对 BALB/c Nude 裸鼠接种 SiHa 细胞来考察 IFITM1 在体外对肿瘤生长的影响。**结果:** 癌组织中 IFITM1 的表达水平明显高于癌旁组织 ($P<0.05$)。与对照组比较, si-IFITM1 组的迁移和侵袭能力明显增强, 而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组明显降低 ($P<0.05$)。细胞转染 48 h 和 72 h 后, 与对照组比较, si-IFITM1 组的细胞增殖明显增强, 而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组明显减弱 ($P<0.05$)。与对照组比较, si-IFITM1 组的细胞凋亡率明显降低, 而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组明显升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, si-IFITM1 组的 PTEN 被下调, 而 PI3K 和 AKT 被上调 ($P<0.05$); pcDNA3.1-si-IFITM1 组的 PTEN 的被上调, 而 PI3K 和 AKT 被下调 ($P<0.05$)。与对照组比较, si-IFITM1 组裸鼠的肿瘤体积显著增大, 而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组显著减小 ($P<0.05$)。**结论:** IFITM1 过表达抑制人宫颈鳞癌细胞 SiHa 的生长和转移能力, 并在体外抑制肿瘤的形成, 从而发挥抗癌作用。IFITM1 可能通过调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路发挥抗癌作用。

关键词: 干扰素诱导的跨膜蛋白 1; 宫颈鳞癌; 细胞增殖; 迁移; 侵袭; PTEN/PI3K/AKT 信号通路

中图分类号: R-33; R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2021)01-34-08

Expression of Interferon-induced Transmembrane Protein 1 in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Biological Effects*

LIU Xiao-ying, SHEN Xin, ZHANG Jing, RONG Xuan, DENG Zhuo

(Department of Gynaecology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and biological roles of interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) in cervical squamous cell carcinoma. **Methods:** The expression of IFITM1 in cervical squamous cell carcinoma and paracancerous tissues was detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot. The siRNAs targeting IFITM1 (si-IFITM1 group) and recombinant pcDNA3.1 plasmid that highly express IFITM1 gene (pcDNA3.1-si-IFITM1 group) were transfected into SiHa cells to down-regulate or up-regulate IFITM1 expression, respectively. Cell migration and invasion were tested by wound healing experiments, Transwells migration experiments, and matrigel invasion experiments. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation. Apoptosis was measured by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of PTEN, PI3K and AKT. The effect of IFITM1 on tumor growth in vitro was investigated by inoculating BALB/c Nude nude mice with SiHa cells. **Results:** The expression level of IFITM1 in cancer tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues ($P<0.05$). Compared with the control group, the migration and invasion capabilities in the si-IFITM1 group were significantly enhanced, while that of the pcDNA3.1-si-IFITM1 group were significantly reduced ($P<0.05$). At 48 h and 72 h after cell transfection, compared with the control group, the cell proliferation of the si-IFITM1 group was significantly enhanced, while that of the pcDNA3.1-si-IFITM1 group was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the control group, the apoptosis rate of the si-IFITM1 group was significantly reduced, while that of the pcDNA3.1-si-IFITM1 group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, PTEN in the si-IFITM1 group was down-regulated, while PI3K and AKT were up-regulated ($P<0.05$). PTEN in the pcDNA3.1-si-IFITM1 group was up-regulated, while PI3K and AKT were down-regulated ($P<0.05$). Compared with the control group, the tumor volume of the nude mice in the si-IFITM1 group increased significantly, while that in the pcDNA3.1-si-IFITM1 group decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Overexpression of IFITM1 can inhibit the growth and metastasis of human cervical squamous carcinoma cell line SiHa, and inhibit tumor formation in vitro, thereby exerting anti-cancer effect. IFITM1 may play an anti-cancer role by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Interferon-induced transmembrane protein 1; Cervical squamous cell carcinoma; Cell proliferation; Migration; Invasion;

* 基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目 (2016SF-181)

作者简介: 刘晓英 (1972-), 女, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤及计划生育, 电话: 13892807518, E-mail: liuxiaoying720319@126.com

(收稿日期: 2020-04-27 接受日期: 2020-05-23)

PTEN/PI3K/AKT signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)01-34-08

前言

宫颈癌是全世界女性的主要癌症类型,并且具有较高的复发率。多药耐药性和放疗耐药性是复发性宫颈癌的主要原因^[1-3]。尽管人类在宫颈癌研究中已取得很大进展,但仍缺乏可靠的生物标志物来预测宫颈癌的发展。基因表达分析等技术可用于鉴定与宫颈癌的发展有关的遗传改变,而这种改变是宫颈癌患者诊断和预后的潜在生物标志物。据报道,干扰素诱导跨膜蛋白(interferon induced transmembrane protein, IFITM)的30个超家族成员参与抗病毒防御、免疫细胞信号转导、细胞粘附、致癌作用和生殖细胞成熟^[4,5]。干扰素诱导的跨膜蛋白(interferon induced transmembrane protein-1, IFITM1)属于干扰素诱导跨膜蛋白家族,具有跨膜结构域和保守的细胞内环^[6]。IFITM1与多种癌症有关,例如,IFITM1可促进结直肠癌细胞的侵袭性^[7]。IFITM1的过表达增强了SUM149炎性乳腺癌细胞的侵袭性^[8]。然而,其他研究报道,IFITM1的过表达负调控肝细胞的生长,抑制IFITM1则阻断了IFN- γ 的抗增殖作用并增加了裸鼠非恶性肝细胞的致癌性^[9]。此外,IFITM1的高表达与慢性粒细胞白血病患者的存活率呈正相关。先前的研究发现在宫颈鳞癌组织中,IFITM1的mRNA表达水平明显降低^[9]。因此,IFITM1在不同的癌症类型中发挥不同的作用。本研究旨在揭示IFITM1在宫颈鳞癌发展中的作用,并探讨靶向IFITM1治疗宫颈鳞癌的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂、动物和细胞 人宫颈鳞癌细胞SiHa细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;SPF级6周龄雌性BALB/c Nude裸鼠由陕西省人民医院动物实验中心提供,使用许可证号:SYXK(陕)2016-006;靶向IFITM1的siRNA和对照siRNA由上海吉玛制药技术有限公司设计合成;高表达IFITM1基因的pcDNA3.1(-)的质粒和对照空质粒由上海吉玛制药技术有限公司设计合成;IFITM1、PTEN、PI3K、AKT和GAPDH抗体均购自英国Abcam公司;HRP标记的抗兔IgG二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;二氨基联苯胺(DAB)购自艾美捷科技有限公司;TRIzol试剂、Super-Script一步式RT-PCR试剂盒、10%胎牛血清、青霉素、链霉素、DMEM培养基、Lipofectamine 2000、Alexa Fluor 488 Annexin V试剂盒均购自美国Invitrogen公司;细胞裂解液、二辛可宁酸(BCA)蛋白测定试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;硝酸纤维素膜购自美国Millipore公司;Transwells购自美国Corning Costar公司;24孔细胞培养细胞池购自美国BD Biosciences公司;细胞计数试剂盒8(CCK-8)购自日本Dojindo公司。

1.1.2 组织样本收集 收集30份我院确诊的宫颈鳞癌(SCC)患者的癌组织和正常癌旁组织。本研究均获得患者的书面知情

同意书。样本采集前,患者均未接受放化疗治疗。将患者组织样品保存在-80℃下。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将癌组织和癌旁组织固定在10%福尔马林中,石蜡包埋并切成4 μ m厚的切片。将组织切片在二甲苯中脱蜡并在梯度乙醇中再水化。用含0.3% H₂O₂的甲醇封闭内源性过氧化物酶活性30 min,然后在PBS中洗涤。用柠檬酸磷酸盐缓冲液(pH 6.0)进行高温高压抗原修复。然后将切片与IFITM1(1:50)一抗在4℃下孵育过夜。孵育后,将切片在PBS中洗涤3 min。然后将在37℃下用生物素化的二抗孵育30 min,然后用PBS洗涤3次。与二抗孵育后,使用DAB,对切片进行显色,用苏木精复染。根据以下标准对IFITM1蛋白信号进行染色评分:0分,无细胞染色;1分,弱或无核染色,<5%的细胞染色;2分,核染色,5-25%的细胞染色;3分,核染色,26-50%的细胞染色;4分,核染色,>50%的细胞染色。

1.2.2 RT-PCR 使用TRIzol试剂从细胞或组织样品中提取总RNA。使用Super-Script一步式RT-PCR试剂盒合成cDNA;每个反应均包含2 μ g总RNA、2 μ L Oligo(dT)(500 μ g/mL)和7.5 μ L DEPC水。将反应混合物在65℃加热变性5 min,冰上淬灭5 min。每种反应均添加以下试剂:4 μ L 5 $\times$ 第一缓冲液、1 μ L dNTP(10 mM)、2 μ L 0.1 M DTT、0.5 μ L RNase抑制剂(40 U/ μ L)和1 μ L M-MLV(200 U/ μ L),每个反应的总体积为20 μ L。反应在25℃下保持10 min,在37℃下保持1 h。在70℃下终止反应10 min。使用正向引物5'-ACACCCCCCAACCTTTTCTCA-3'和反向引物5'-CCCTACTTCCGTTG-CACGACTT-3'在Roche Light Cycler 480 II实时荧光定量PCR系统上进行IFITM1 mRNA的PCR扩增。扩增子大小为231 bp。使用甘油三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为管家基因(正向:5'-TCCATTGACCTTGACCTCAGT-3';反向:5'-CCCTAACT-GCGCTCAACGG-3');扩增子的大小为202 bp。PCR反应总体积为20 μ L,包括500 ng cDNA、10 μ L 2 $\times$ PCR缓冲液、10 μ L 2 $\times$ EvaGreen PCR缓冲液、0.3 μ L CapTaq聚合酶(5 U/ μ L)、0.6 μ L 20 $\times$ EvaGreen和0.6 μ L正向和反向引物(10 μ M),加入DEPC水使体积达到20 μ L。反应条件如下:95℃初始变性5 min,95℃变性15 s,55℃退火15 s,在72℃延伸20 s,40个循环。

1.2.3 Western blot 使用细胞裂解液裂解细胞,用二辛可宁酸(BCA)蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。在10% SDS-PAGE凝胶上分离总蛋白,并转移到硝酸纤维素膜。将膜用5%脱脂牛奶封闭1 h,然后将膜与IFITM1(1:500)、PTEN(1:1000)、PI3K(1:1000)、AKT(1:500)和GAPDH(1:500)一抗在4℃下孵育过夜。TBST洗涤后与HRP标记的抗兔IgG二抗(1:1000)室温孵育1 h。超敏ECL化学发光试剂盒进行显影。GAPDH用作内部对照。

1.2.4 细胞培养及分组 SiHa细胞在添加10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)的DMEM培养基中培养。气相:空气,95%;二氧化碳,5%;温度:37℃。将SiHa细胞共

分为6组进行后续实验:Control组(不进行 siRNA 或 pcDNA3.1(-)质粒转染)、si-NC 组(用阴性对照 siRNA 转染)、si-IFITM1-1 组(用 si-IFITM1-1 转染)、si-IFITM1-2 组(用 si-IFITM1-2 转染)、pcDNA3.1-NC 组(用 pcDNA3.1(-)空质粒转染)和 pcDNA3.1-IFITM1 组(用高表达 IFITM1 基因的 pcDNA3.1(-)质粒转染)。

1.2.5 siRNA 转染 2个靶向 IFITM1 (si-IFITM1-1 和 si-IFITM1-2) 的 siRNA 和对照 siRNA(si-NC)用于转染 SiHa 细胞。序列是: si-IFITM1-1:UAUCUUA AUGCGCUCAGUCAAG, CUAUAUGCGGAAGGAGACCUUAUU; si-IFITM1-2:ACUGU CCUAGGAGCCUUAATT, UUGCUCCUGGCAUACUGG-AAGCA C; si-NC, UCGGUGACGUACGCGAGACAGUUA; UUCGGCU UCAGGAAAGACGCGUCC。使用 Lipofectamine 2000 将 20 μ M siRNA 在 SiHa 细胞中进行瞬时转染。

1.2.6 质粒转染 高表达 IFITM1 基因的 pcDNA3.1(-) (pcDNA3.1-IFITM1) 的质粒和对照空质粒(pcDNA3.1-NC)通过基因测序进行确认。转染前 24 h, 将 SiHa 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种在六孔板上。随后将 2 μ g IFITM1 质粒与 6 μ L Lipofectamine 2000 混合。将混合物在室温下孵育 10 min。用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞后, 将 SuperFectin II DNA 转染试剂加入 SiHa 细胞中。然后将转染的 SiHa 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h。

1.2.7 伤口愈合实验 将细胞接种到六孔板(1×10^5 细胞/孔)中, 当细胞达到超过 90% 融合时, 用移液枪在单层细胞上留下一个划痕。用 PBS 轻轻洗涤细胞 3 次, 并保持在新培养基中。将细胞孵育 24 h, 在显微镜下以 100 倍放大倍数拍照。

1.2.8 细胞迁移和侵袭实验 将细胞血清饥饿过夜。在无血清培养基中, 将 6.5 mm Transwells 的上部小室中加入 0.2 mL 细胞(5×10^5 细胞/mL)。将完全培养基(0.6 mL)加入到下室中, 并将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。然后固定穿过膜的迁移细胞, 用 0.1% 的结晶紫染色, 并在光学显微镜下观察并拍照。为了进行

细胞侵袭测定, 将细胞血清饥饿过夜, 在无血清培养基中, 将 0.5 mL 细胞(5×10^5 细胞/mL)加入 24 孔细胞培养细胞池上室中(孔径 8 mm), 上室底部用 Matrigel 基质胶覆盖。将完全培养基(0.5 mL)添加下室中, 并将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h。如上所述将细胞固定、染色和分析。

1.2.9 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖 通过细胞计数试剂盒 8(CCK-8)测定法测定细胞增殖。将 SiHa 细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中, 该孔含 10% FBS 的 DMEM。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h、48 h 和 72 h。用美国 Bio-Rad 公司的 X-Mark 酶标仪测定 450nm 处的光密度(OD)。

1.2.10 流式细胞仪检测细胞凋亡 使用 Alexa Fluor 488 Annexin V 试剂盒, 通过 Annexin-V-异硫氰酸荧光素(FITC)染色分析细胞凋亡。将 1×10^6 个细胞用冷 PBS 洗涤 3 次, 然后将细胞重悬于 1 $\times$ Annexin-结合缓冲液中 30 min。通过 Annexin-V-FITC/PI 双重染色确定细胞凋亡。

1.2.11 裸鼠异种移植肿瘤模型 将 1×10^6 个 SiHa 细胞加入 200 μ L PBS 中, 将各组细胞皮下注射到 BALB/c Nude 裸鼠的背部(n=10)。定期测量肿瘤体积, 肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 。

1.3 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件进行统计分析。结果表示为平均值 $\pm$ 标准差, 组间比较采用单因素方差分析和 LSD 事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈鳞癌和癌旁组织中 IFITM1 的表达

免疫组化分析结果显示, IFITM1 蛋白在宫颈组织的细胞膜和胞浆中被染成棕色。免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 的定量分析结果均显示, 与癌旁组织相比, 癌组织中 IFITM1 的表达明显上调($P < 0.05$)。见图 1。

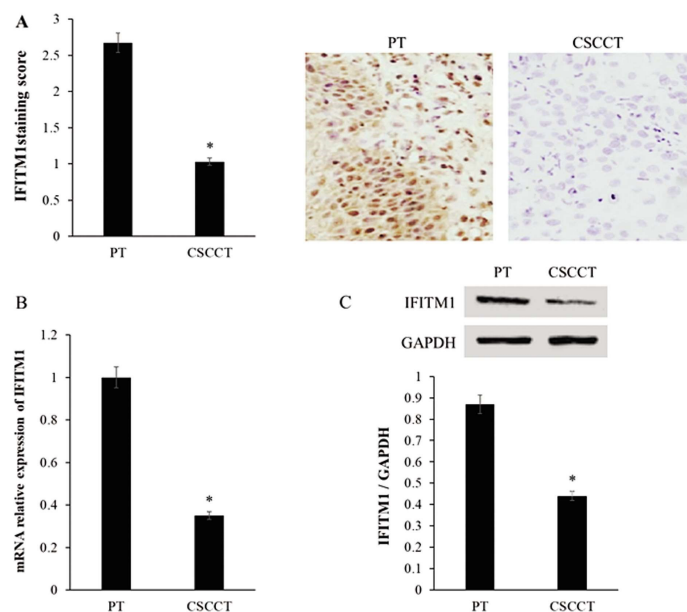


图1 宫颈鳞癌组织和癌旁组织中 IFITM1 的表达

Fig.1 Expression of IFITM1 in cervical squamous cell carcinoma and paracancerous tissues

Note: A: Immunohistochemical staining (x200); B: RT-PCR result; C: Western blot result; PT: paracancerous tissues;

CSCCT: Cervical squamous cell carcinoma tissues; Compared with paracancerous tissues, * $P < 0.05$.

2.2 IFITM1 对 SiHa 细胞迁移和侵袭的影响

结果显示,将 SiHa 细胞转染靶向 IFITM1 的 siRNA 后,IFITM1 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调($P<0.05$),本研究采用敲低效率更高的 si-IFITM1-1 进行后续实验。此外,将高表达 IFITM1 基因的重组 pcDNA3.1 质粒和对照质粒转染到 SiHa 细胞后,IFITM1 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。通

过伤口愈合实验、Transwells 迁移实验和基质胶侵袭实验发现,与对照组比较,si-IFITM1 组的伤口面积最小,且迁移和侵袭细胞数明显增多($P<0.05$)。然而,pcDNA3.1-si-IFITM1 组的伤口面积最大,且迁移和侵袭细胞数明显减少($P<0.05$)。见图 2、图 3 和图 4。

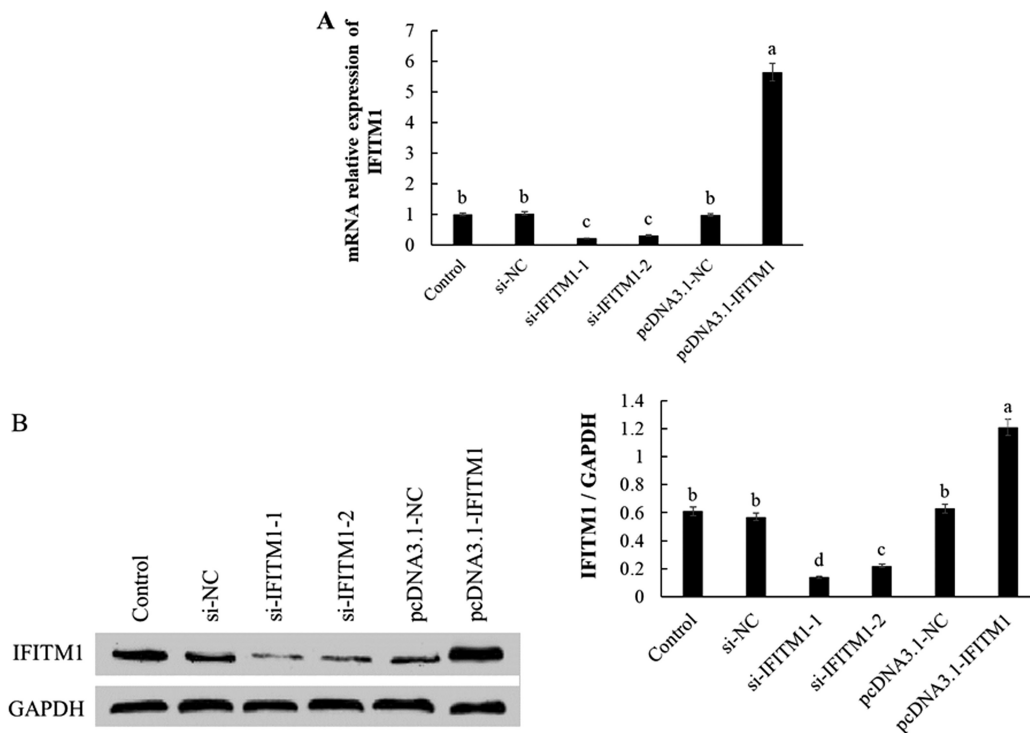


图 2 IFITM1 的 mRNA (A) 和蛋白 (B) 的表达

Fig.2 The mRNA and protein expression of IFITM1 gene

Note: Different lowercase letters indicate comparison between groups, $P<0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P>0.05$.

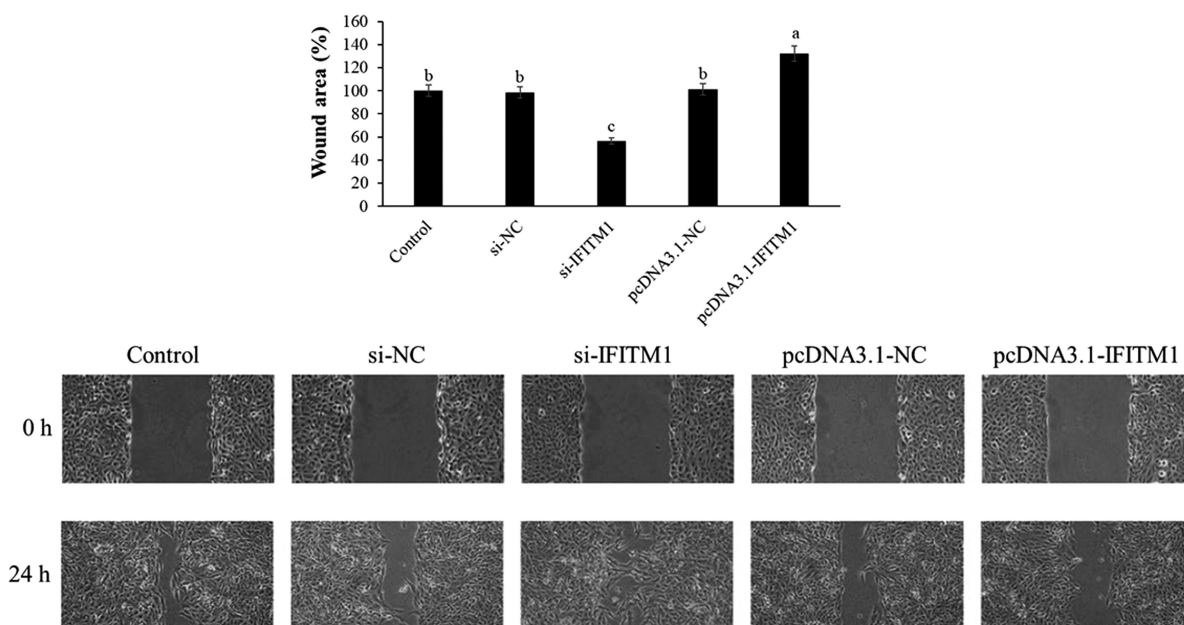
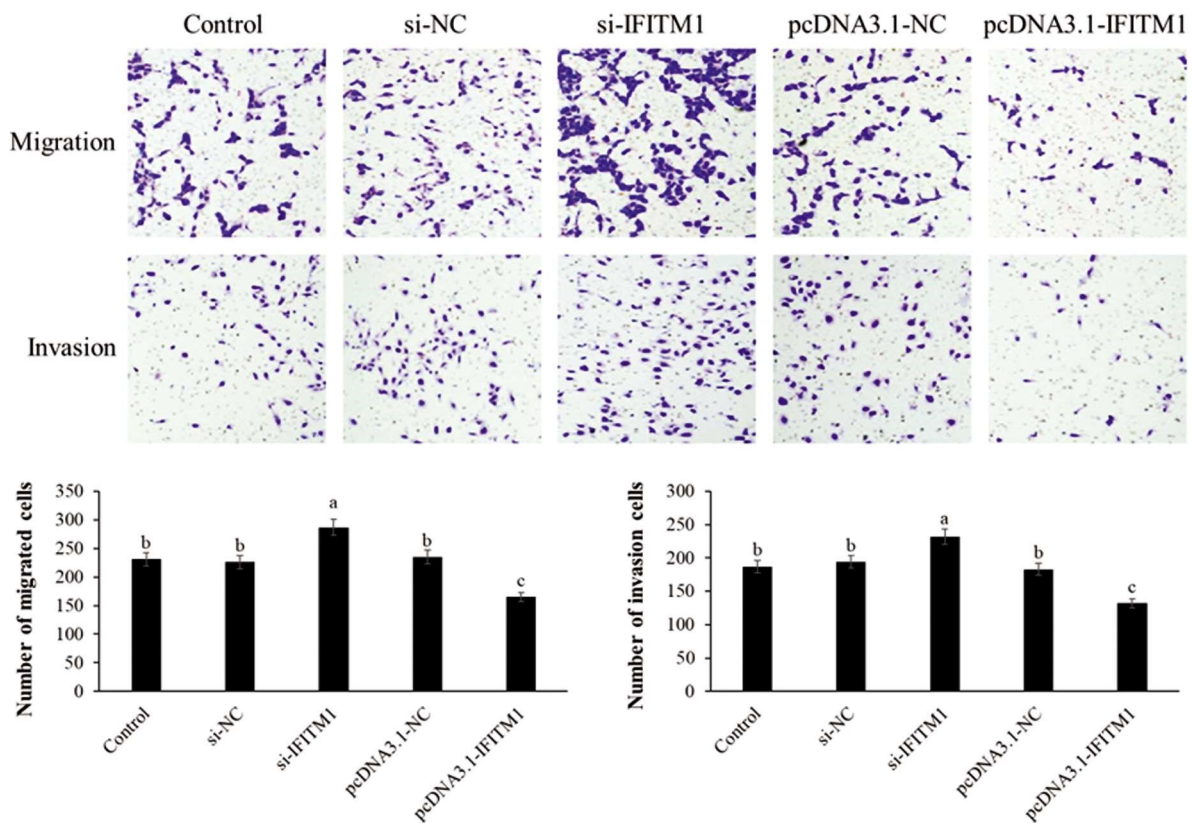


图 3 伤口愈合实验(×100)

Fig.3 Wound healing experiment (×100)

Note: Different lowercase letters indicate comparison between groups, $P<0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P>0.05$.

图4 Transwell 细胞迁移和侵袭实验($\times 200$)Fig.4 Transwell cell migration and invasion experiments ($\times 200$)

Note: Different lowercase letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

2.3 IFITM1 对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响

细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测显示,细胞转染 48 h 和 72 h 后,与对照组比较,si-IFITM1 组的细胞增殖明显增强,而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组的细胞增殖明显减弱($P < 0.05$)。流式细

胞术测定显示,与对照组比较,si-IFITM1 组的细胞凋亡率明显降低,而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组的细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$)。见图 5。

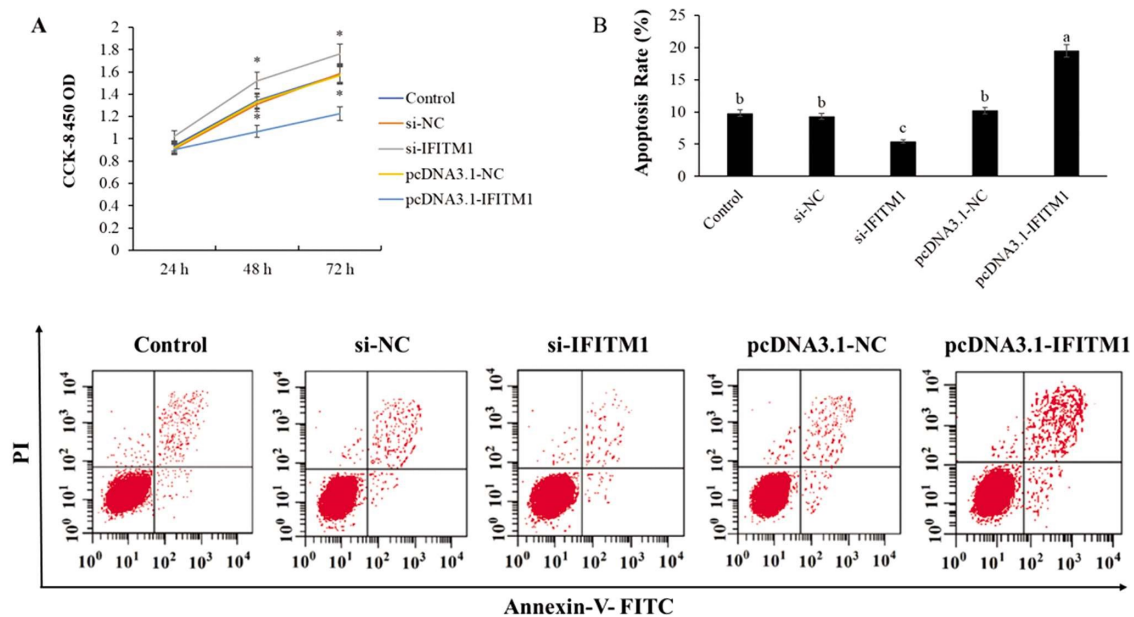


图5 IFITM1 对 SiHa 细胞的增殖和凋亡的影响

Fig.5 Effect of IFITM1 on the proliferation and apoptosis of SiHa cells

Note: A: CCK-8 method to detect cell proliferation; Compared with the control group, $*P < 0.05$; B: flow cytometry to detect apoptosis;

Different lowercase letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

2.4 IFITM1 对 SiHa 细胞中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的影响

Western blot 结果显示,与对照组比较,si-IFITM1 组的 PTEN 的蛋白相对表达水平显著降低,而 PI3K 和 AKT 显著升

高($P<0.05$)。此外,与对照组比较,pcDNA3.1-si-IFITM1 组的 PTEN 的蛋白相对表达水平显著升高,而 PI3K 和 AKT 显著降低($P<0.05$)。见图 6。

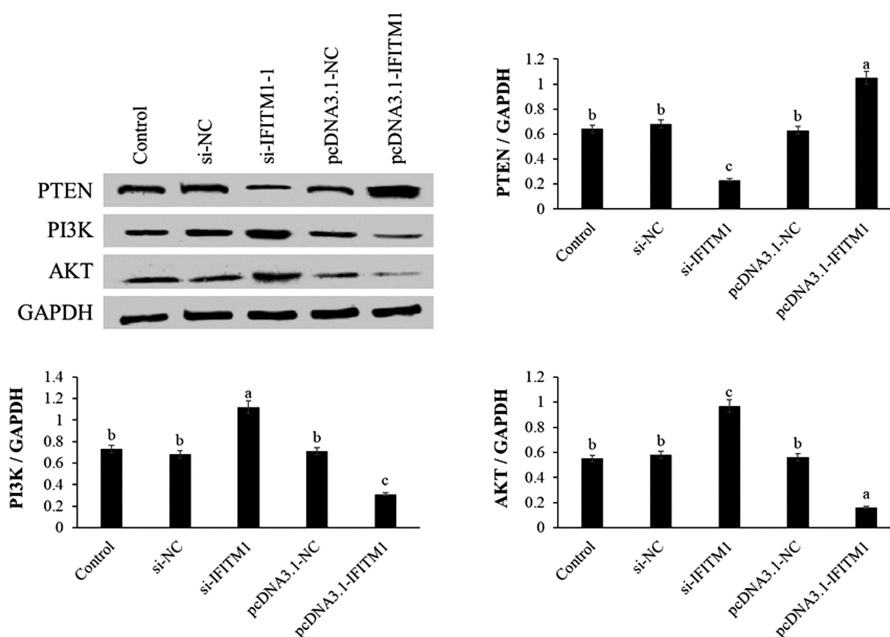


图 6 IFITM1 对 SiHa 细胞中 PTEN、PI3K 和 AKT 的蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of IFITM1 on protein expression of PTEN, PI3K and AKT in SiHa cells

Note: Different lowercase letters indicate comparison between groups, $P<0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P>0.05$.

2.5 IFITM1 对体外肿瘤生长的影响

通过建立裸鼠异种移植肿瘤模型来考察 IFITM1 在体外对宫颈鳞癌肿瘤生长的影响,结果显示,裸鼠在接种 SiHa 细胞

21 d 和 28 d 时,与对照组比较,si-IFITM1 组的肿瘤体积显著增大,而 pcDNA3.1-si-IFITM1 组的肿瘤体积显著减小($P<0.05$)。见图 7。

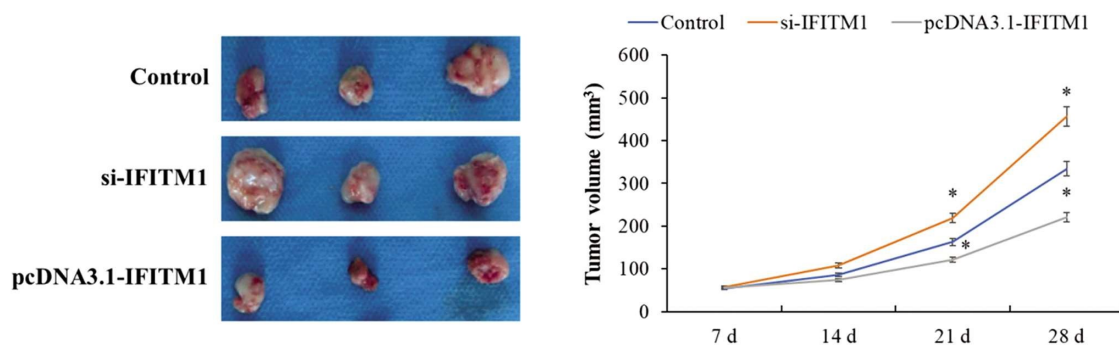


图 7 IFITM1 对裸鼠肿瘤生长的影响

Fig.7 Effect of IFITM1 on tumor growth in nude mice

Note: Compared with the control group, $*P<0.05$.

3 讨论

我国宫颈癌的患病率和病死率居高不下,严重威胁着女性的生命安全。虽然放射疗法、化学疗法、靶向疗法等多种治疗方式已经应用于宫颈癌的治疗中,然而,患者的生存率未见明显升高,并且缺乏有效的早期诊断生物标志物。因此,迫切需要在分子层面研究宫颈癌的发病机制并探索更有效的治疗手段。

IFITM1 是在 11 号染色体短臂上编码的 17 kDa 跨膜蛋白^[10],属于干扰素刺激基因(ISG)的蛋白质家族,已知 IFITM1 可以帮助抵抗病毒感染并介导细胞存活和细胞死亡^[11]。IFITM1

的表达与几种高侵袭性癌症的进展有关,包括宫颈癌、食道癌、结肠癌、卵巢癌和脑癌。IFITM1 促进肿瘤进展的机制尚不清楚,但是,已知 IFITM1 在抗 DNA 损伤中发挥作用^[12]。IFITM1 基因是控制细胞生长的重要基因,IFITM1 蛋白最初被证明具有 Leu-13 蛋白功能,Leu-13 是一种已知的白细胞抗原,它形成一种膜复合物并参与淋巴细胞的转导、抗增殖和同型粘附信号^[13]。还有研究发现,IFITM1 是抗丙型肝炎病毒(HCV)干扰素刺激的基因,通过中断病毒共受体功能来控制 HCV 感染^[14]。IFITM1 可抑制甲型流感病毒的早期复制^[15]。另外,IFITM1 基因的过度表达可以增加食管鳞癌、头颈癌和神经胶

质瘤的细胞增殖、迁移和侵袭^[15-17]。然而,在宫颈癌组织中 IFITM1 基因的表达低于正常宫颈组织^[9]。本研究也发现 IFITM1 在宫颈鳞癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织。宫颈癌组织中 IFITM1 蛋白的下调的原因目前尚不清楚。远处转移是宫颈癌治疗的主要难题,其机制与肿瘤细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化密不可分^[18,19]。IFITM1 在不同类型的癌症中具有不同的作用。在肝癌细胞中,IFITM1 的过表达可抑制细胞增殖。而 IFITM1 促进头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的侵袭。IFITM1 在不同类型癌症中的作用机制仍需要进一步研究。在本研究中,将 SiHa 细胞转染靶向 IFITM1 的 siRNA 或高表达 IFITM1 基因的重组 pcDNA3.1 质粒来下调和上调 IFITM1 的表达,从而考察其在宫颈鳞癌生长和转移中的作用。研究显示,下调 IFITM1 的表达明显促进了 SiHa 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制了细胞凋亡。然而,上调 IFITM1 则会抑制细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。上述结果说明,在宫颈鳞癌细胞中,IFITM1 发挥了抗肿瘤的作用。

近年来,其他学者已鉴定出多种引起多种器官和组织致癌和进展的异常分子,其中包括 p53、EGFR、TGF- β 、PTEN 和 PI3K / AKT 等^[20]。PTEN 是一种主要的肿瘤抑制因子,在多种癌症的发生中起着至关重要的作用。PTEN 功能被许多非基因组机制(例如翻译后修饰)调节,磷酸化是 PTEN 调节其功能的最常见的翻译后修饰之一^[21]。PTEN 蛋白包含一个 N 末端磷酸酶结构域,一个脂质结合 C2 结构域和一个 C 末端尾部区域。PTEN C 末端尾部区域的磷酸化,包括 Ser380、Thr382 和 Thr383 的磷酸化,可降低 PTEN 磷酸酶的活性^[22],并显著降低其抑制癌变和进展的能力^[23]。此外,PTEN 作为磷酸肌醇脂质的磷酸酶,在调节肿瘤转移中也起着重要作用。PTEN 位于 10q23 染色体,其在子宫内膜癌、前列腺癌、胃癌中存在突变和缺失^[24]。

有文献指出,PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控恶性肿瘤的生长和转移,在前列腺癌、甲状腺癌、三阴性乳腺癌中均发现了该信号通路的异常^[25-27]。AKT 是一种原癌基因,也是 PI3K 的下游靶标,活化的 PI3K 可激活蛋白激酶 AKT,AKT 被激活后可导致细胞进入分裂周期并开始增殖。PI3K/AKT 途径可通过多种细胞刺激来激活,调节各种生理功能,例如细胞生长、细胞存活、细胞周期、蛋白质翻译和代谢。PTEN 的功能异常(PTEN 表达缺失、基因突变或基因缺乏)在 PI3K / AKT 途径的异常激活中起因果作用。PTEN 通过抑制致癌的 PI3K / AKT 信号通路来诱导脂质磷酸酶活性并调节细胞存活和凋亡。研究表明,PTEN 功能丧失是 AKT 激活的基础,与多种癌症的发生和发展密切相关^[20]。通过磷酸化使 PTEN 失活可以激活 PI3K / AKT 途径并促进恶性细胞的生长和增殖^[28]。本研究发现,IFITM1 的下调抑制了 PTEN 的活性,并提高了 PI3K 和 AKT 的活性。而上调 IFITM1 则会升高 IFITM1 的表达并抑制 PI3K 和 AKT。上述结果说明,在宫颈鳞癌细胞中,上调 IFITM1 可通过调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路发挥抗癌作用。

此外,本研究还建立了裸鼠异种移植肿瘤模型,研究发现 IFITM1 的下调可促进裸鼠的肿瘤生长,而上调 IFITM1 则会抑制肿瘤生长。证实了 IFITM1 在宫颈鳞癌中的抗癌作用。

综上所述,本研究证实在宫颈鳞癌中 IFITM1 被下调。IFITM1 的过表达可抑制人宫颈鳞癌细胞 SiHa 的生长和转移

能力,并在体外抑制肿瘤的形成,从而发挥抗癌作用。而敲低 IFITM1 的表达则会逆转上述变化。IFITM1 可能通过调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路发挥抗癌作用。因此,靶向 IFITM1 的疗法有望成为治疗宫颈鳞癌的新策略。

参考文献(References)

- [1] Tian Y, Ding WC, Wang YY, et al. Ubiquitin B in cervical cancer: critical for the maintenance of cancer stem-like cell characters[J]. Plos One, 2016, 11(3): e0152813
- [2] 井佳雨,牟婧玮,王轶英,等. 宫颈癌及癌前病变筛查方法研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(2): 203-205
- [3] 尹逊哲,陈爽,李文杰,等. 携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒 ATV 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(12): 1356-1361
- [4] 万佳,张硕,李阿茜,等. 干扰素诱导的跨膜蛋白 IFITM1/2/3 对 SFTS 病毒感染的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2016, 30(3): 279-282
- [5] Umber A, Derek K. G3BP1 and G3BP2 regulate translation of interferon-stimulated genes: IFITM1, IFITM2 and IFITM3 in the cancer cell line MCF7[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2019, 459(19): 1-16
- [6] Yang J, Li L, Xi Y, et al. Combination of IFITM1 knockdown and radiotherapy inhibits the growth of oral cancer [J]. Cancer Science, 2018, 109(10): 3115-3128
- [7] Yu F, Xie D, Ng SS, et al. IFITM1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via CAV-1[J]. Cancer Letters, 2015, 368(1): 135-143
- [8] Ogony J, Choi HJ, Lui A, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) overexpression enhances the aggressive phenotype of SUM149 inflammatory breast cancer cells in a signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2)-dependent manner[J]. Breast Cancer Res, 2016, 18: 25
- [9] Yang G, Xu Y, Chen X, et al. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma [J]. oncogene, 2007, 26(4): 594-603
- [10] Smith S, Weston S, Kellam P, et al. IFITM proteins-Cellular inhibitors of viral entry[J]. Curr Opin Virol, 2014, 4: 71-77
- [11] Tymoszyk P, Charoentong P, Hackl H, et al. High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 257-269
- [12] Yu Q, Katlinskaya Y, Carbone C, et al. DNA-Damage-Induced Type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function[J]. Cell Reports, 2015, 11(5): 785-797
- [13] Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, et al. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules [J]. Journal of Immunology, 1992, 149(9): 2841-2850
- [14] Wilkins C, Woodward J, Lau DT, et al. IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry [J]. Hepatology, 2013, 57(2): 461-469
- [15] Brass AL, Huang IC, Benita Y, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, west nile virus, and dengue virus[J]. Cell, 2009, 139(7): 1243-1254
- [16] Ma Z, Guo W, Niu H J, et al. Transcriptome network analysis reveals

- potential candidate genes for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2012, 13 (3): 767-773
- [17] Busca A, Djordjevic B, Giassi A, et al. IFITM1 Is Superior to CD10 as a Marker of Endometrial Stroma in the Evaluation of Myometrial Invasion by Endometrioid Adenocarcinoma [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2016, 145(4): 486-96
- [18] 颜欣, 金晶兰, 董洪静, 等. 以发热为主要临床表现的子宫颈癌肝转移误诊为肝脓肿 1 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2400-2402
- [19] 吴乾凤, 高国兰, 孔为民. I ~ II A2 期宫颈癌淋巴结转移高危因素及对预后的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2016, 17(5): 407-409
- [20] Ola CPB, De MIUD, Cenaglia LLG, et al. Prognostic implications of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway activation in gastric carcinomas [J]. Archives of Medical Science, 2017, 13 (6): 1262-1268
- [21] Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors[J]. Frontiers in Oncology, 2015, 5: 24-37
- [22] Fragoso R, Barata JT. Kinases, tails and more: Regulation of PTEN function by phosphorylation[J]. Methods, 2015, 77-78: 75-81
- [23] Yang Z, Xie C, Xu W, et al. Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by Helicobacter pylori promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31916-31926
- [24] Lopez C, Abuel-Haija M, Pena L, et al. Novel Germline PTEN Mutation Associated with Cowden Syndrome and Osteosarcoma [J]. Cancer Genomics & Proteomics, 2018, 15(2): 115-120
- [25] Yang X, Cheng Y, Li P, et al. A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. Tumor Biology, 2015, 36(1): 383-391
- [26] Zhang S, Cui R. The targeted regulation of miR-26a on PTEN-PI3K/AKT signaling pathway in myocardial fibrosis after myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(2): 523-531
- [27] Yang WB, Zhang WP, Shi JL, et al. MiR-4299 suppresses non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through modulating PTEN/AKT/PI3K pathway [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2018, 22(11): 3408
- [28] Cai J, Li R, Xu X, et al. CK1 α suppresses lung tumour growth by stabilizing PTEN and inducing autophagy [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(4): 465-478

(上接第 33 页)

- [18] Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici P G. From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure[J]. Circ J, 2016, 80(3): 555-564
- [19] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 123-145
- [20] Rockey D C, Bell P D, Hill J A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure[J]. N Engl J Med, 2015, 372(12): 1138-1149
- [21] Zhai M, Liu Z, Zhang B, et al. Melatonin protects against the pathological cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction through activating PGC-1 β : In vivo and in vitro studies[J]. J Pineal Res, 2017, 63(3): 10.1111/jpi.12433
- [22] Marian A J, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy [J]. Circ Res, 2017, 121(7): 749-770
- [23] Maulik S K, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review[J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22(5): 359-366
- [24] Rababa'H A M, Guillery A N, Mustafa R, et al. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge [J]. Curr Cardiol Rev, 2018, 14(1): 53-59
- [25] Tham Y K, Bernardo B C, Ooi J Y, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1401-1438
- [26] Seddon M, Looi Y H, Shah A M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Heart, 2007, 93 (8): 903-907
- [27] Facundo H, Brainard R E, Caldas F, et al. Mitochondria and Cardiac Hypertrophy[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 982: 203-226
- [28] Lu Y, Wang Y D, Wang X Y, et al. SIRT3 in cardiovascular diseases: Emerging roles and therapeutic implications [J]. Int J Cardiol, 2016, 220: 700-705
- [29] Parodi-Rullan R M, Chapa-Dubocq X R, Javadov S. Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3 [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1094
- [30] Zhu L, Li C, Liu Q, et al. Molecular biomarkers in cardiac hypertrophy[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 1671-1677
- [31] Pillai V B, Sundaresan N R, Gupta M P. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging [J]. Circ Res, 2014, 114(2): 368-378
- [32] Xu M, Xue R Q, Lu Y, et al. Choline ameliorates cardiac hypertrophy by regulating metabolic remodelling and UPRmt through SIRT3-AMPK pathway[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(3): 530-545
- [33] Sundaresan N R, Gupta M, Kim G, et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2758-2771
- [34] Pillai V B, Samant S, Sundaresan N R, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6656