

三结构域家族蛋白 22 在宫颈癌中的表达及其对高危型人乳头瘤病毒阳性宫颈癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响

王海鹏¹, 刘屹¹, 陈庆芬², 王希方¹, 侯银银¹

(1. 陕西省人民医院, 陕西 西安 710068; 2. 陕西省第四人民医院, 陕西 西安 710043)

摘要: [目的] 探讨三结构域家族蛋白 22 (tripartite motif protein 22, TRIM22) 在宫颈癌中的表达及其与临床病理学特征的关系, 并分析 TRIM22 对高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 阳性宫颈癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。[方法] 收集 2017 年 8 月至 2018 年 9 月 41 例手术切除或活检的宫颈癌组织和 18 例正常子宫颈组织, 分别提取总 RNA 和总蛋白。实时定量 PCR 分析 TRIM22 mRNA 表达, Western blot 分析 TRIM22 蛋白水平, 并分析 TRIM22 mRNA 表达变化与患者临床病理学特征的关系。以 HPV16 阳性宫颈癌细胞系 CaSki 和 HPV18 阳性宫颈癌细胞系 HeLa 为研究对象, 用 TRIM22 表达质粒 (pUNO1-hTRIM22a) 和对照表达质粒 (pUNO1) 稳定转染 CaSki 细胞和 HeLa 细胞, 以未转染细胞为对照组。实时定量 PCR 和 Western blot 检测转染后细胞中 TRIM22 mRNA 表达和蛋白水平。采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖; Transwell 细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力; 流式细胞术检测细胞周期和凋亡; Western blot 检测抗磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 和磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 蛋白表达。[结果] TRIM22 在宫颈癌组织中 mRNA 表达 (0.99 ± 0.16 vs 4.39 ± 1.41 , $t=15.40$, $P<0.001$) 和蛋白水平 (0.30 ± 0.12 vs 1.32 ± 0.27 , $t=19.97$, $P<0.001$) 均明显低于正常子宫颈组织, TRIM22 在 HPV 阳性宫颈癌组织中 mRNA 表达 (0.94 ± 0.14 vs 1.17 ± 0.12 , $t=4.21$, $P<0.001$) 和蛋白水平 (0.27 ± 0.08 vs 0.43 ± 0.18 , $t=3.86$, $P<0.001$) 均明显低于 HPV 阴性宫颈癌组织。TRIM22 mRNA 表达与淋巴结转移明显相关 (1.04 ± 0.16 vs 0.89 ± 0.13 , $t=3.15$, $P=0.003$), 与肿瘤大小、临床分期无明显相关 ($P>0.05$)。pUNO1 转染 CaSki 细胞和 HeLa 细胞与未转染细胞在 TRIM22 mRNA 和蛋白水平、细胞增殖、侵袭数、细胞周期、凋亡率、PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达量的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。pUNO1-hTRIM22a 转染后 CaSki 细胞和 HeLa 细胞中 TRIM22 mRNA 和蛋白水平显著性高于 pUNO1 组和对照组 ($P<0.001$), 细胞增殖、侵袭数量 (CaSki 细胞: 31.00 ± 5.30 vs 135.30 ± 17.24 vs 120.40 ± 22.95 , $F=56.01$, $P<0.001$; HeLa 细胞: 27.20 ± 9.04 vs 112.80 ± 12.03 vs 117.00 ± 18.56 , $F=67.45$, $P<0.001$)、处于 G₂-M 期的细胞比例 (CaSki 细胞: $2.04\% \pm 0.36\%$ vs $12.72\% \pm 1.98\%$ vs $12.40\% \pm 1.62\%$, $F=57.82$, $P<0.001$; HeLa 细胞: $3.07\% \pm 1.08\%$ vs $8.26\% \pm 2.98\%$ vs $10.92\% \pm 3.56\%$, $F=22.82$, $P<0.001$)、PI3K、p-AKT 蛋白表达量均显著性低于 pUNO1 转染细胞和未转染细胞, 而凋亡率显著性高于 pUNO1 组和对照组 (CaSki 细胞: $11.90\% \pm 2.78\%$ vs $5.27\% \pm 1.78\%$ vs $6.64\% \pm 1.19\%$, $F=16.78$, $P<0.001$; HeLa 细胞: $18.79\% \pm 4.64\%$ vs $6.78\% \pm 1.03\%$ vs $5.23\% \pm 1.09\%$, $F=27.91$, $P<0.001$)。[结论] TRIM22 在宫颈癌中的表达明显减低, 其表达水平与高危型 HPV 感染、转移恶化密切相关。上调 TRIM22 表达可明显减弱高危型 HPV 阳性宫颈癌细胞的增殖、侵袭能力, 促进宫颈癌细胞凋亡。

关键词: 宫颈癌; 乳头状瘤病毒; 三结构域家族蛋白; 细胞增殖; 细胞凋亡; 侵袭能力

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)09-0758-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.09.B011

Expression of Tripartite Motif Protein 22 in Cervical Cancer and Its Influence on Proliferation, Invasion and Apoptosis of Cervical Cancer Cells with High Risk Human Papillomavirus Infection

WANG Hai-peng¹, LIU Yi¹, CHEN Qing-fen², WANG Xi-fang¹, HOU Yin-yin¹

(1. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. The Fourth People's Hospital of Shaanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of tripartite motif protein 22 (TRIM22) and its effects on proliferation, invasion and apoptosis of cervical cancer cells infected with high risk human papilloma virus (HPV). [Methods] Forty-one cervical cancer tissue samples and 18 normal cervical tissue samples were collected between August 2017 and September 2018. Total RNA and protein in tissue samples were extracted respectively. TRIM22 mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR, while TRIM22 protein level was analyzed by Western blot. The relationship between TRIM22 mRNA expression and clinical pathological features of patients was analyzed. The HPV16-positive cervical cancer CaSki cells and HPV18-positive cervical cancer HeLa cells were transfected with TRIM22 expression plasmid (pUNO1-hTRIM22a) and control plasmid (pUNO1), the corresponding untransfected cells

基金项目: 国家自然科学基金 (81402012); 陕西省自然科学基金 (2015JQ8321, 2019JM-547); 西安交通大学基本业务项目 (xyz012019112); 西安市科技计划项目 [2019114613YX001SF035(3)]

通信作者: 侯银银, 主治医师, 硕士; 陕西省人民医院肿瘤内科, 陕西省西安市碑林区友谊西路 256 号 (710068); E-mail: houyinyin@foxmail.com

收稿日期: 2021-05-12; **修回日期:** 2021-06-15

were used as control group. TRIM22 mRNA and protein expression was analyzed by qRT-PCR and Western blot, respectively. Cell proliferation was measured by cell counting kit-8 (CCK-8), cell invasion ability was detected by Transwell assay, cell cycle and apoptosis was determined by flow cytometry, the expression of phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), protein kinase B(AKT) and phosphorylated AKT(p-AKT) was detected by Western blot. [Results] TRIM22 mRNA(0.99 ± 0.16 vs 4.39 ± 1.41 , $t=15.40$, $P<0.001$) and protein level(0.30 ± 0.12 vs 1.32 ± 0.27 , $t=19.97$, $P<0.001$) in cervical cancer tissues was significantly lower than those in normal cervical tissues. TRIM22 mRNA (0.94 ± 0.14 vs 1.17 ± 0.12 , $t=4.21$, $P=0.001$) and protein level (0.27 ± 0.08 vs 0.43 ± 0.18 , $t=3.86$, $P<0.001$) in high risk HPV-positive cervical cancer tissues was significantly lower than that in high risk HPV-negative cervical cancer tissues. TRIM22 mRNA expression was correlated with lymph node metastasis(1.04 ± 0.16 vs 0.89 ± 0.13 , $t=3.15$, $P=0.003$), however, did not correlate with tumor size or clinical stage ($P>0.05$). After transfection, TRIM22 mRNA and protein level was remarkably elevated in pUNO1-hTRIM22a group ($P<0.001$). Cell proliferation, cell migration (CaSki cells: 31.00 ± 5.30 vs 135.30 ± 17.24 vs 120.4 ± 22.95 , $F=56.01$, $P<0.001$, HeLa cells: 27.20 ± 9.04 vs 112.80 ± 12.03 vs 117.0 ± 18.56 , $F=67.45$, $P<0.001$), percentage of cells in G₂-M stage(CaSki cells: $2.04\%\pm 0.36\%$ vs $12.72\%\pm1.98\%$ vs $12.40\%\pm1.62\%$, $F=57.82$, $P<0.001$, HeLa cells: $3.07\%\pm1.08\%$ vs $8.26\%\pm2.98\%$ vs $10.92\%\pm 3.56\%$, $F=22.82$, $P<0.001$), protein levels of PI3K and p-AKT in pUNO1-hTRIM22a group was significant lower, the percentage of apoptotic cells was significantly higher(CaSki cells: $11.90\%\pm2.78\%$ vs $5.27\%\pm 1.78\%$ vs $6.64\%\pm1.19\%$, $F=16.78$, $P<0.001$, HeLa cells: $18.79\%\pm4.64\%$ vs $6.78\%\pm1.03\%$ vs $5.23\%\pm1.09\%$, $F=27.91$, $P<0.001$) than those in pUNO1 group and control group. While there were no significant differences in TRIM22 mRNA or protein level, cell proliferation, invasion cell number, cell cycle, percentage of apoptotic cells, protein levels of PI3K, AKT or p-AKT between pUNO1 group and control group ($P>0.05$). [Conclusion] The expression of TRIM22 is significantly decreased in cervical cancer tissues. TRIM22 level is closely related to high risk HPV infection and metastasis. Up-regulation of TRIM22 expression can robustly attenuate proliferation and invasion ability and promote apoptosis of high risk HPV-positive cervical cancer cells.

Subject words: cervical neoplasms; papillomavirus; tripartite motif protein; cellular proliferation; apoptosis; invasion ability

高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)持续感染是促进宫颈癌发生发展的首要因素,高危型 HPV 相关的早期宫颈癌可能没有任何临床症状,如未定期进行筛查则容易发生子宫颈上皮细胞恶性转化,导致宫颈癌的发生^[1]。HPV 感染不但可直接促进子宫颈上皮细胞的致瘤突变,还可影响机体免疫系统,促进肿瘤免疫逃逸,导致宫颈癌疾病进展和转移^[2]。三结构域家族蛋白(tripartite motif protein, TRIM)在机体抗病毒的固有免疫应答中发挥重要作用,TRIM22 是 TRIM 家族的重要成员,主要由干扰素刺激诱导产生,在体内和体外均具有抗病毒活性^[3]。TRIM22 也可作为抑癌基因 p53 的靶基因,通过诱导多种重要信号分子的磷酸化,在恶性肿瘤的发生发展中发挥重要的作用^[4]。研究发现,TRIM22 在宫颈癌中的表达水平降低,并可能与 HPV 载量相关的宫颈癌的进展相关^[5-6]。有关 TRIM22 在高危型 HPV 阳性宫颈癌的作用及相关信号通路机制尚未完全阐明。本研究通过收集临床样本,在 mRNA 和蛋白水平上分析 TRIM22 在高危型 HPV 阳性宫

颈癌中的表达变化,进而利用过表达慢病毒载体将 TRIM22 基因转入 HPV16 阳性宫颈癌细胞系 CaSki 和 HPV18 阳性宫颈癌细胞系 HeLa,分析 TRIM22 过表达对 CaSki 和 HeLa 细胞生物学活性的影响,初步阐释 TRIM22 在宫颈癌中的调控机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象和细胞系

选择 2017 年 8 月至 2018 年 9 月在陕西省人民医院初治的经宫颈三阶梯筛查诊断、并经组织病理证实的宫颈癌患者 41 例,年龄 28~65 岁,中位年龄 42.7 岁;肿瘤大小: <4 cm 28 例, ≥ 4 cm 13 例;淋巴结转移 14 例,无淋巴结转移 27 例。根据 2009 年国际妇产科联盟修订的宫颈癌临床分期标准:Ⅰ期 16 例,Ⅱ期 20 例,Ⅲ期及以上 5 例。采用广东凯普生物科技股份有限公司提供的试剂盒对宫颈癌患者中 14 种高危型 HPV(分别为 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68)E6、E7 mRNA 进行荧光

PCR 检测评估高危型 HPV 感染情况, 41 例宫颈癌患者中高危型 HPV 阳性 33 例 (80.5%)。另选择 18 例正常子宫颈组织作为对照组, 年龄 25~58 岁, 中位年龄 41.3 岁。本研究经医院伦理委员会批准, 入组者均知情并签署知情同意书。活检或手术取下的组织用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 立即放入液氮中保存及运输, 用于总 RNA 和蛋白提取。CaSki 细胞和 HeLa 细胞均购自美国典型培养物保藏中心, 使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液、在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞稳定转染

pUNO1 表达质粒和 pUNO1-hTRIM22a 表达质粒均购自美国 InvivoGen 公司, 使用美国 Invitrogen 公司的脂质体 2000 对 CaSki 细胞和 HeLa 细胞进行转染。在转染前 24 h 向 6 孔板内接种 10⁵ 个细胞, 使用不含双抗的 DMEM 培养液+10% 胎牛血清进行培养, 在转染时细胞融合率达到 90%。使用 DMEM 培养液将 4 μg 表达质粒溶解, 总体积 50 μl, 向 40 μl DMEM 培养液中加入 10 μl 脂质体 2000, 混匀后静置 5 min, 将稀释的表达质粒与稀释的脂质体 2000 混合, 室温孵育 20 min, 将混合液加入含有细胞的 6 孔板中, 转染 6 h 后换液, 48 h 后对转染细胞传代, 并在传代后第 2 d 加入杀稻瘟菌素 (20 μg/ml), 筛选稳定转染细胞。

1.2.2 反转录实时定量 PCR 反应检测 TRIM22 mRNA 表达

RNeasy Minikit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 按说明书要求提取组织及细胞总 RNA。使用美国 Themro 公司 NanoDrop-1000 分光光度计对 RNA 纯度和浓度进行检测。使用美国 Promega 公司 GoTaq 2-Step RT-qPCR System 进行 RT-qPCR 反应。反转录反应体系: 取 1 μg RNA, 加入 1 μl Oligo(dT)₁₅ 引物 (0.5 μg/μl) 和 1 μl 随机引物 (0.5 μg/μl), 使用 DEPC 处理 H₂O 调整总体积至 10 μl, 于 70 °C 孵育 5 min, 立即转入冰水浴中孵育 5 min, 然后向其中加入 4 μl GoScript 5×反应缓冲液、2 μl MgCl₂、1 μl PCR 寡核苷酸混合物、0.5 μl 重组核糖核酸酶抑制剂、1 μl GoScript 反转录酶, 加入 DEPC 处理 H₂O 调整总体积至 20 μl。反转录反应条件: 25 °C 孵育 5 min, 42 °C 孵育 1 h, 70 °C 孵育 15 min。定量 PCR 反应体系:

GoTaq qPCR Master Mix (2×) 10 μl、上游引物 (20×) 1 μl、下游引物 (20×) 1 μl、cDNA 模板 2 μl、去离子水 6 μl, 总体积为 20 μl。使用美国 Applied Biosystem 公司的 ABI7500 实时定量 PCR 仪进行检测, PCR 反应条件: 预变性 95 °C 2 min; PCR 反应: 变性 95 °C 15 s, 退火/延伸 60 °C 1 min, 共 40 个循环。TRIM22 和 GAPDH 引物序列参考已发表文献^[5], 由上海生工生物工程有限公司合成。采用 2^{-ΔΔCT} 法以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参照计算 TRIM22 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达

抗 TRIM22 抗体、抗磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体、抗蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体、抗磷酸化 AKT (phospho T308) 抗体、抗 GAPDH 抗体均购自美国 Abcam 公司。子宫颈组织标本于液氮中研磨成粉状, 培养细胞离心收集。加入美国 Sigma 公司的 RIPA 蛋白裂解液, 冰浴裂解, 使用上海生工生物工程有限公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白样本进行定量。每个样本取 40 μg 蛋白, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白转移至美国 Millipore 公司的硝酸纤维素膜, 采用含有 5% 脱脂牛奶的 1×Tris 缓冲液对非特异性抗体进行封闭, 室温孵育 2 h。使用含有 5% 脱脂牛奶的 1×TBS 缓冲液以 1:1 000 稀释第一抗体, 4 °C 孵育过夜。1×TBS 缓冲液洗涤 5 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠或抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 2 h。1×TBS 缓冲液洗涤 5 次后, 采用 ECL 发光。图像使用 Quantitative One 软件进行分析, 以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 细胞计数试剂盒检测细胞增殖

采用武汉碧云天公司细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 对细胞增殖进行检测。在 96 孔板中, 每孔接种 2×10³ 个细胞, 总培养液体积为 100 μl, 每组设置 5 个复孔。在铺板后的 1、2、3、4 和 5 d 共 5 个时间点, 分别向细胞中加入 10 μl CCK-8 试剂, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 4 h。将 96 孔板在美国伯乐公司 M680 酶标仪中进行检测, 读取并记录每孔在 450 nm 的光密度 (D_{450nm}) 值。

1.2.5 细胞凋亡和细胞周期检测

采用美国 Invitrogen 公司的碘化丙啶 (propidium

iodide,PI) 分析细胞凋亡和细胞周期。胰酶消化细胞,重悬成细胞悬液,1 200 r/min 离心 5 min,4 ℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,然后使用 4 ℃预冷的 70%乙醇固定细胞,1 500 r/min 离心 5 min,PBS 重悬,加入 1 ml PI 进行染色,4 ℃避光孵育 30 min,以 300 目尼龙网过滤,使用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪进行检测。

1.2.6 Transwell 检测细胞侵袭能力

采用美国 Corning 公司的 Transwell 培养平板对细胞侵袭能力进行检测。将 100 μ l Matrigel 加入冰预冷的 300 μ l 无血清 DMEM 培养液中,充分混匀。将 25 μ l 稀释的 Matrigel 加入 Transwell 培养板上层小室,覆盖整个聚碳脂膜,在 37 ℃孵育 30 min,使 Matrigel 聚合成胶。向 Transwell 培养板上层小室中加入含有 5×10^4 个细胞悬液,体积为 100 μ l,并加入 200 μ l 无血清 DMEM 培养液。下层小室中加入 700 μ l 含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h。用湿棉签轻轻擦去 Matrigel 和聚碳脂膜上表面的细胞。取出上层小室,用冰预冷的甲醛固定 30 min。苏木素染色 1 min,80%、95%、100%乙醇梯度脱水,小心将聚碳脂膜自上室基底切取,在高倍镜下随机取 5 个视野计数。

1.3 统计学处理

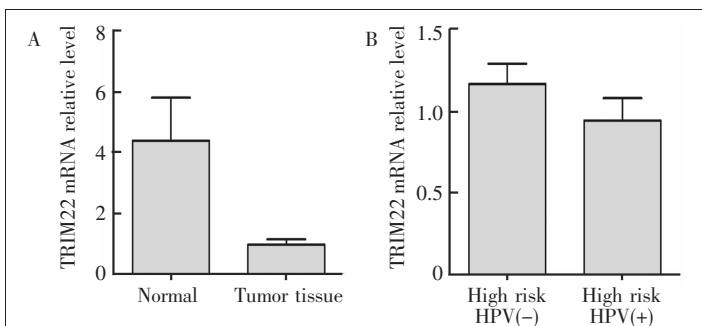
采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。所有实验至少重复 3 遍。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 *t* 检验、单因素方差分析、SNK-*q* 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRIM22 在宫颈癌组织中的表达及其与临床病理学特征的关系

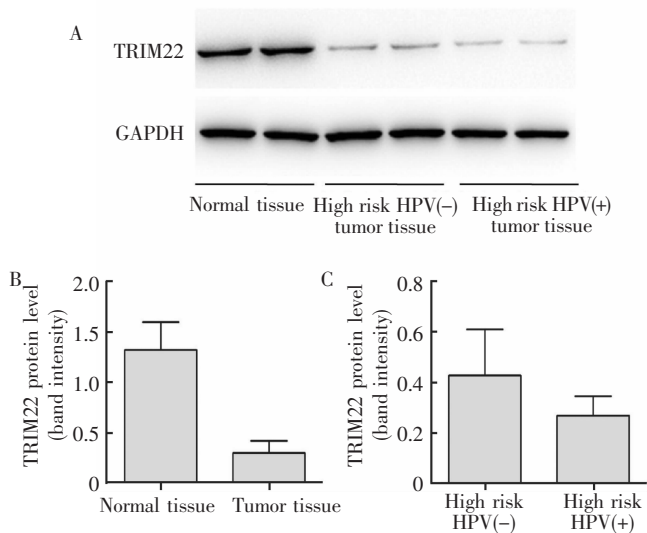
TRIM22 在宫颈癌组织中 mRNA 相对表达量显著性低于正常宫颈组织 (0.99 ± 0.16 vs 4.39 ± 1.41 , $t = 15.40$, $P < 0.001$) (Figure 1A)。TRIM22 在高危型 HPV 阳性宫颈癌组织中 mRNA 相对表达量显著性低于高危型 HPV 阴性宫颈癌组织 (0.94 ± 0.14 vs 1.17 ± 0.12 , $t =$

4.21 , $P < 0.001$) (Figure 1B)。TRIM22 蛋白在宫颈癌组织中的水平亦显著性低于正常宫颈组织 (0.30 ± 0.12 vs 1.32 ± 0.27 , $t = 19.97$, $P < 0.001$) (Figure 2A、2B);TRIM22 蛋白在高危型 HPV 阳性宫颈癌组织中的水平亦显著性低于高危型 HPV 阴性宫颈癌组织 (0.27 ± 0.08 vs 0.43 ± 0.18 , $t = 3.86$, $P < 0.001$) (Figure 2A、2C)。TRIM22 mRNA 相对表达量与宫颈癌患者临床病理学特征关系分析显示,TRIM22 mRNA 水平与淋巴结转移明显相关,而与肿瘤大小和临床分期无明显相关 (Table 1)。



A: Compared with the normal cervical tissue, TRIM22 mRNA relative level in cervical cancer tissue was significantly down-regulated ($P < 0.0001$); B: Compared with the high risk HPV negative cervical cancer tissue, TRIM22 mRNA relative level in high risk positive cervical cancer tissue was significantly down-regulated ($P < 0.001$)

Figure 1 TRIM22 mRNA relative level in cervical cancer tissue and normal cervical tissue



A: Western blot results; B: Compared with the normal cervical tissue, TRIM22 protein level in cervical cancer tissue was significantly down-regulated ($P < 0.0001$). C: Compared with the high risk HPV negative cervical tumor tissue, TRIM22 protein level in high risk positive cervical cancer tissue was significantly down-regulated ($P < 0.001$)

Figure 2 TRIM22 protein level in cervical cancer tissue and normal cervical tissue

2.2 pUNO1-hTRIM22a 表达质粒转染对 TRIM22 的影响

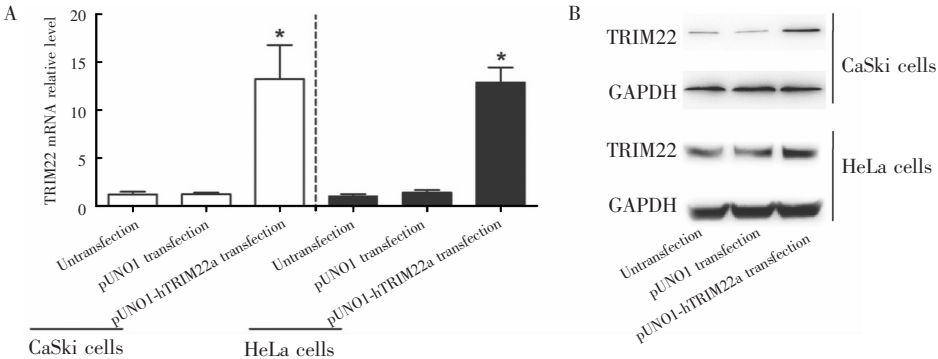
pUNO1 表达质粒和 pUNO1-hTRIM22a 表达质粒稳定转染 CaSki 细胞和 HeLa 细胞后, TRIM22 mRNA 和蛋白在细胞中的表达发生变化。pUNO1-hTRIM22a 转染后,TRIM22 在转录水平 (CaSki 细胞:SNK-q 检验, $q=7.604, P<0.0001$;HeLa 细胞:SNK-q 检验, $q=16.83, P<0.0001$) (Figure 3A) 和翻译水平 (Figure 3B) 的表达均较未转染细胞明显上调,而 pUNO1 表达质粒转染后,TRIM22 在转录水平 (CaSki 细胞: SNK-q 检验, $q=0.278, P=0.787$;HeLa 细胞:SNK-q 检验, $q=2.259, P=0.061$) (Figure 3A) 和翻译水平 (Figure 3B) 的表达与未转染细胞比较无明显变化。

2.3 TRIM22 过表达对 CaSki 细胞和 HeLa 细胞增殖、侵袭、凋亡和细胞周期的影响

pUNO1hTRIM22a 表达质粒稳定转染后,CaSki 细胞和 HeLa 细胞的增殖受到明显抑制, 培养后 3、4 和 5 d 后细胞增殖均显著性低于未转染和 pUNO1 转染细胞 (Figure 4)。Transwell 实验表明,pUNO1hTRIM22a 表达质粒稳定转染后, CaSki 细胞和 HeLa 细胞的侵袭能力较未转染和 pUNO1 转染细胞显著性下降 (CaSki 细胞: 31.00 ± 5.30 vs 135.30 ± 17.24 vs $120.40\pm22.95, F=56.01, P<0.0001$;HeLa 细胞: 27.20 ± 9.04 vs 112.80 ± 12.03 vs $117.00\pm18.56, F=67.45, P<0.001$) (Figure 5)。流式细胞分析结果发现, pUNO1-hTRIM22a 表达质粒稳定转染后,CaSki 细胞

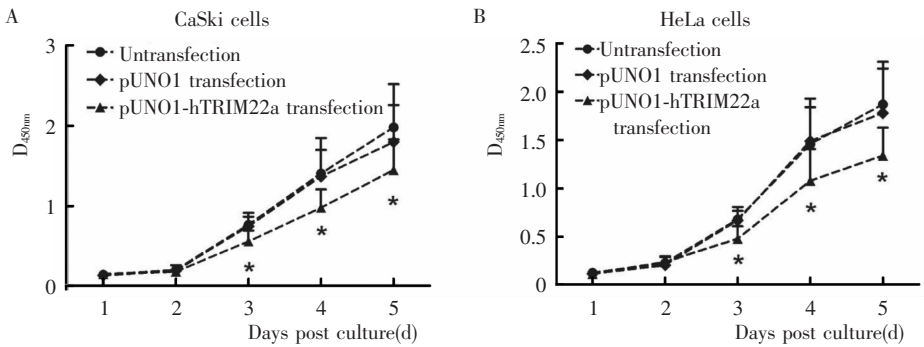
Table 1 Relationship between TRIM22 mRNA relative level and clinical pathological features of patients with cervical cancer

Variant	N	TRIM22 mRNA relative level	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
Tumor size (cm)				
<4	28	1.00±0.17	0.27	0.790
≥4	13	0.98±0.14		
Lymph node metastasis				
N ₀	27	1.04±0.16	3.15	0.003
N ₁₋₂	14	0.89±0.13		
Clinical stage				
I	16	1.05±0.18	2.38	0.107
II	20	0.94±0.14		
Ⅲ~Ⅳ	5	1.02±0.15		



A:TRIM22 mRNA relative level was significantly up-regulated after pUNO1-hTRIM22a transfection when compared with untransfection and pUNO1 transfection in both CaSki and HeLa cells(* $P<0.0001$);B:TRIM22 protein level was significantly up-regulated after pUNO1-hTRIM22a transfection when compared with untransfection and pUNO1 transfection in both CaSki and HeLa cells

Figure 3 Changes of TRIM22 mRNA relative level and protein level in CaSki cells and HeLa cells with pUNO1 and pUNO1-hTRIM22a transfection



Cellular proliferation of CaSki cells and HeLa cells was significantly inhibited after pUNO1-hTRIM22a transfection when compared with untransfection and pUNO1 transfection(* $P<0.05$)

Figure 4 Effect of CaSki and HeLa cells proliferation with pUNO1 and pUNO1-hTRIM22a transfection by CCK-8 assay

和 HeLa 细胞凋亡的比例较未转染和 pUNO1 转染细胞显著性增加(CaSki 细胞:11.90%±2.78% vs 5.27%±1.78% vs 6.64%±1.19%, $F=16.78, P<0.0001$; HeLa 细胞:18.79%±4.64% vs 6.78%±1.03% vs 5.23%±1.09%, $F=27.91, P<0.001$)(Figure 6), 处于 S 期的细胞比例亦较未转染和 pUNO1 转染细胞显著性增加,但处于 $G_2\sim M$ 期的细胞比较则较未转染和 pUNO1 转染细胞显著性降低 (CaSki 细胞:2.04%±0.36% vs 12.72%±1.98% vs 12.40%±1.62%, $F=57.82, P<0.001$; HeLa 细胞:3.07%±1.08% vs 8.26%±2.98% vs 10.92%±3.56%,

$F=22.82, P<0.001$)(Figure 6)。

2.4 TRIM22 过表达对 CaSki 细胞和 HeLa 细胞中 PI3K/AKT 信号通路分子的影响

Western blot 结果显示, pUNO1-hTRIM22a 表达质粒稳定转染后, CaSki 细胞和 HeLa 细胞中 PI3K 蛋白和磷酸化 AKT 蛋白水平较未转染和 pUNO1 转染细胞显著性下降, 但总 AKT 蛋白水平在未转染、pUNO1 转染和 pUNO1-hTRIM22a 转染之间无统计学差异(Figure 7)。

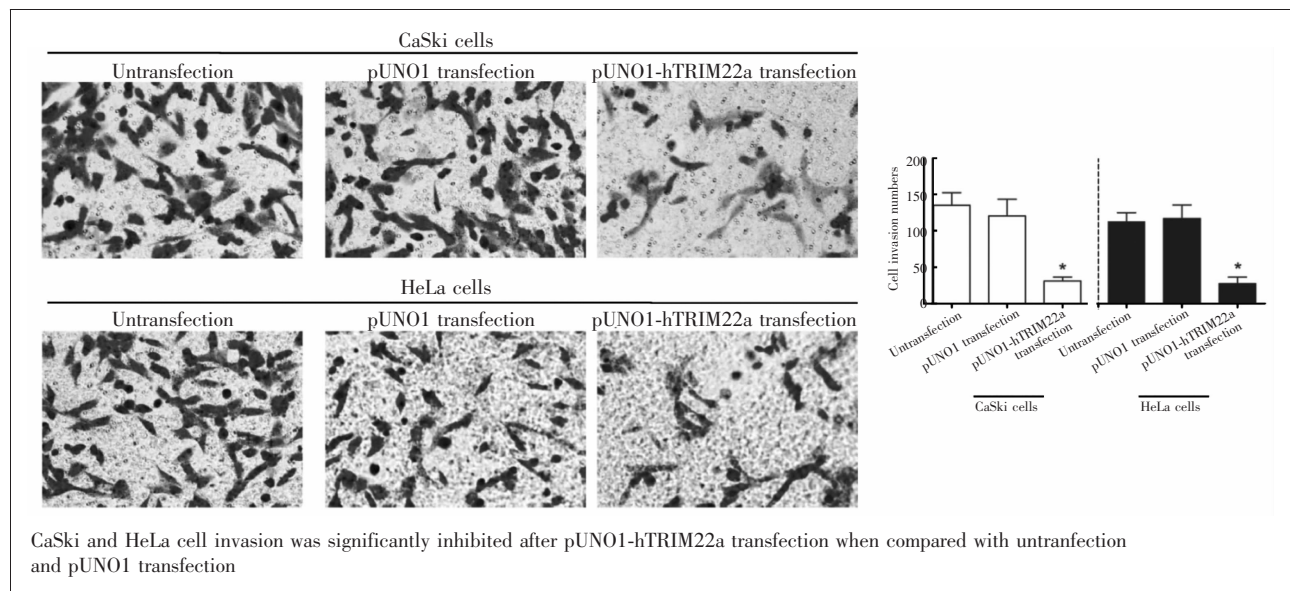


Figure 5 Effect of invasion of CaSki and HeLa cells with pUNO1 and pUNO1-hTRIM22a transfection by Transwell assay

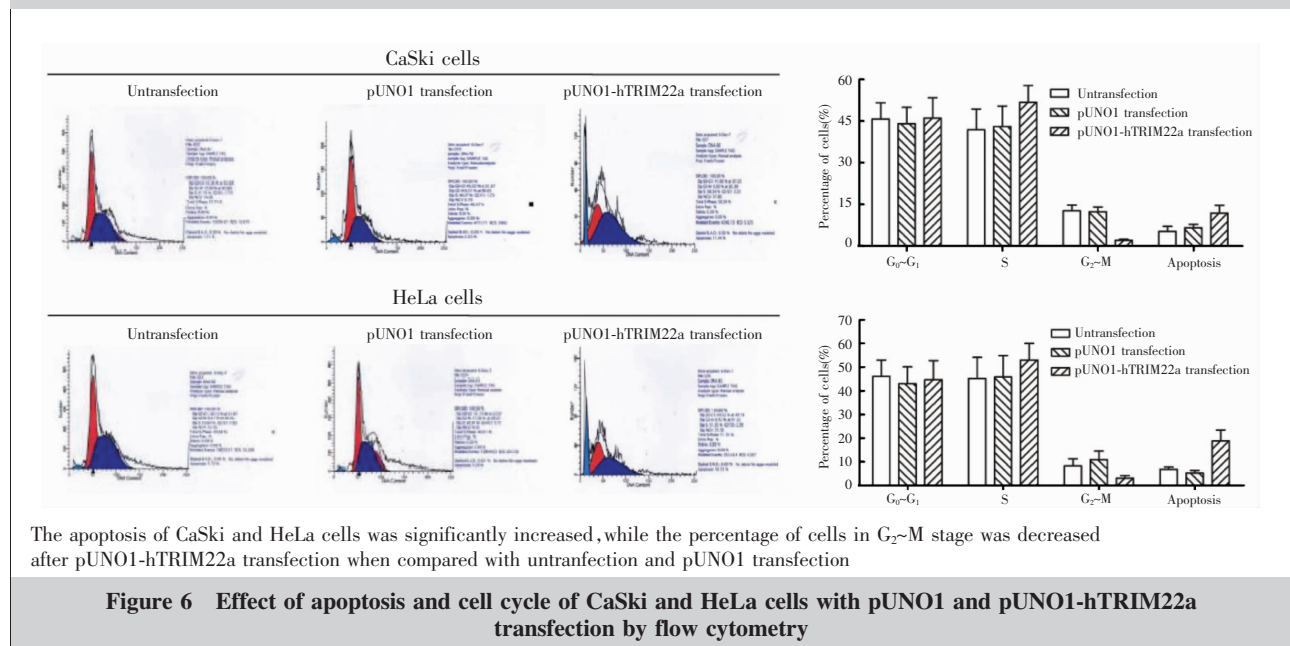
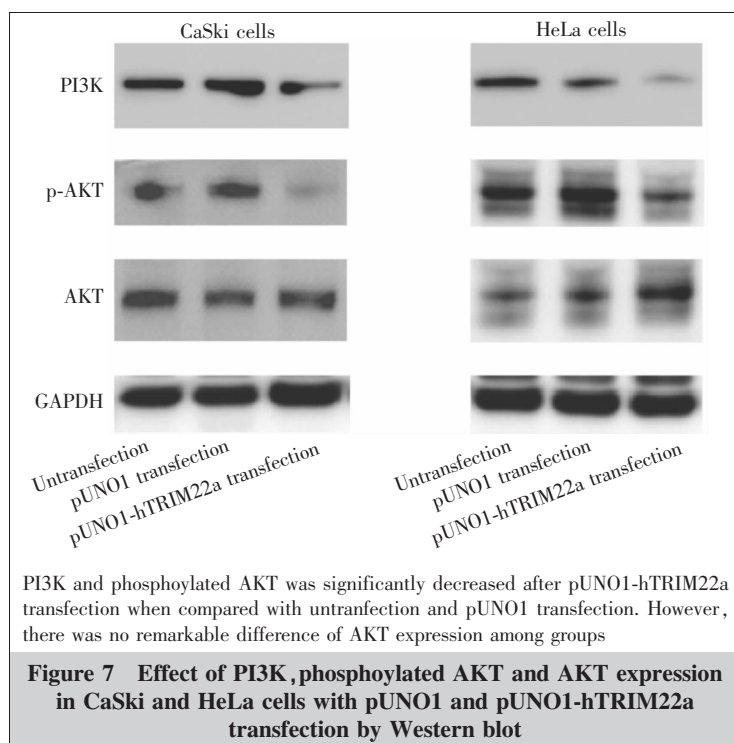


Figure 6 Effect of apoptosis and cell cycle of CaSki and HeLa cells with pUNO1 and pUNO1-hTRIM22a transfection by flow cytometry



3 讨 论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤。揭示宫颈癌发生发展机制、探讨宫颈癌细胞增殖转移的病理生理机制对疾病的预防和治疗具有重要意义。TRIM22 是 TRIM 家族成员。生理状态下, TRIM22 构成性表达于人外周血单核细胞、淋巴细胞和淋巴组织中,在病毒感染后,在以干扰素为主的多种因素刺激下, TRIM22 在组织细胞中上调表达,发挥抗病毒效应^[7-8]。更为重要的是,抑癌基因 p53 能上调 TRIM22 的表达,通过对人类基因组 p53 结合位点筛查结果推断, TRIM22 可能是 p53 的靶基因,在调控肿瘤细胞生物学活性中发挥重要作用^[9]。

TRIM22 在不同类型恶性肿瘤中的表达变化不尽一致。基因芯片结果分析发现,头颈部鳞状细胞癌患者的肿瘤组织中 TRIM22 mRNA 水平较正常组织升高约 1.5 倍^[10]。免疫组织化学研究结果发现, TRIM22 蛋白水平在非小细胞肺癌组织中升高, TRIM22 过表达与 TNM 分期、淋巴结转移和预后不良密切相关^[11]。相反, TRIM22 在乳腺癌、子宫内膜癌组织中的表达则显著性降低,且与 p53 蛋白水平呈正相关^[12-13]。本研究结果发现, TRIM22 在宫颈组织中的表达水平显著性降低,这与既往的研究

结果一致^[5-6]。TRIM22 在宫颈癌组织中的表达与其他恶性肿瘤组织中的表达不同,可能是由于如下原因造成:(1)不同组织器官和不同病理类型的恶性肿瘤中的表达水平存在差异;(2)宫颈癌组织标本中存在 HPV 感染,病毒感染和恶性肿瘤的双重因素可能造成了 TRIM22 水平明显降低;(3)宫颈细胞恶性转化过程中,靶向 TRIM22 的 mir-coRNA 和长链非编码 RNA 水平升高,诱导 TRIM22 间接或抑制 TRIM22 翻译,造成宫颈癌组织中 TRIM22 表达水平降低^[14-15]。虽然 TRIM22 mRNA 相对表达量与肿瘤大小及临床分期无显著性相关,但与淋巴结转移密切相关,但仍提示 TRIM22 低表达与宫颈癌预后不良有关,与既往研究结果一致^[6],这可能与以下因素密切相关:(1)正常细胞恶性转化过程中, TRIM22 表达已经受到抑制,无论肿瘤大小和分期如何, TRIM22 抑制不会受到进一步影响,仅与恶性肿瘤的

形成相关;(2)由于 TRIM22 可促进上皮细胞间质转化,造成侵袭和迁移能力的增强^[11], TRIM22 水平降低可能造成宫颈癌转移概率的升高;(3) TRIM22 可促进核因子- κ B 活化,诱导下游多种抗肿瘤因子的表达,可能抑制肿瘤增殖和转移^[16]。因此, TRIM22 表达降低可能诱导宫颈癌细胞转移。进一步分析则发现, TRIM22 在高危型 HPV 阳性宫颈癌组织中水平较高,在 HPV 阴性宫颈癌组织中显著性降低。这可能与高危型 HPV 感染后 E6 蛋白泛素化诱导 p53 降解,导致 p53 抑癌效应失活密切相关^[17]。据此推断, TRIM22 低表达可作为宫颈癌特别是高危型 HPV 阳性宫颈癌的肿瘤相关标志物之一,进一步研究 TRIM22 与高危型 HPV 阳性宫颈癌的关系,有助于为宫颈癌的辅助治疗提供靶点。

有关 TRIM22 对肿瘤细胞生物学活性影响的结果也不尽相同。下调 TRIM22 可抑制慢性粒细胞白血病细胞增殖、侵袭和迁移^[18]。由于本研究发现高危型 HPV 阳性宫颈癌中 TRIM22 表达降低,因此,本研究应用 TRIM22 表达质粒转染高危型 HPV 阳性宫颈癌细胞系,结果显示, TRIM22 过表达可抑制 HPV16 阳性宫颈癌细胞 CaSki 细胞和 HPV18 阳性宫颈癌细胞 HeLa 细胞的增殖和侵袭,影响细胞周期,并促进细胞凋亡。研究结果提示 TRIM22 抑制宫

颈癌的进展,一方面可能由于 TRIM 家族蛋白可影响细胞周期相关蛋白(如 CDC25C、CDK1),抑制肿瘤细胞有丝分裂^[19];另一方面可能由于 TRIM22 可作为泛素化酶诱导 Bak 蛋白聚合,介导细胞凋亡^[20]。

多个信号转导通路均参与了 TRIM22 的抗肿瘤和抗病毒效应^[11,13,18]。PI3K/AKT 信号转导通路主导细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移过程,一旦发生信号分子磷酸化紊乱可导致恶性肿瘤等相关疾病的发生,PI3K/AKT 信号通路抑制剂也成为抗肿瘤治疗的研究热点之一^[21]。多种类型恶性肿瘤细胞的凋亡和相关生物学活性的变化均与 PI3K/AKT 信号通路有关^[18]。本研究结果发现,TRIM22 过表达可下调高危型 HPV 阳性宫颈癌细胞中 PI3K 蛋白表达和 AKT 蛋白磷酸化,与宫颈癌细胞侵袭能力的降低密切相关,提示 TRIM22 抑制高危型 HPV 阳性宫颈癌细胞增殖和侵袭、促进其凋亡可能是通过抑制 PI3K/AKT 信号转导通路实现的。

综上所述,TRIM22 在宫颈癌中的表达明显减低,其表达水平与高危型 HPV 感染、转移恶化密切相关。上调 TRIM22 表达可明显减弱高危型 HPV 阳性宫颈癌细胞的增殖、侵袭能力,促进子宫颈癌细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Olusola P, Banerjee HN, Philley JV, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities [J]. *Cells*, 2019, 8(6):622.
- [2] Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: molecular pathways and targets [J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(2): 161–174.
- [3] Vicenzi E, Poli G. The interferon-stimulated gene TRIM22: a double-edged sword in HIV-1 infection [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 40:40–47.
- [4] Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11):792–804.
- [5] 杜萍, 农文政, 甘精华, 等. 不同程度子宫颈病变组织中 TRIM22 基因的表达及作用 [J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(1):60–62.
Du P, Nong WZ, Gan JH, et al. Expression and function of TRIM22 in different degrees of cervical lesion tissues [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015, 50(1):60–62.
- [6] 梁革, 杜萍, 农文政, 等. TRIM22 在宫颈癌中的表达及其与临床病理特征的关系 [J]. *广西医科大学学报*, 2016, 33(3):412–415.
Liang G, Du P, Nong WZ, et al. The significance of TRIM22 expression and its pathological feature in cervical cancer [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2016, 33(3):412–415.
- [7] Reddi TS, Merkl PE, Lim SY, et al. Tripartite motif 22 (TRIM22) protein restricts herpes simplex virus 1 by epigenetic silencing of viral immediate-early genes [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(2):e1009281.
- [8] Wang Y, Chen Y, Lin Y, et al. TRIM22 inhibits respiratory syncytial virus replication by targeting JAK-STAT1/2 signaling [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(6):3412–3419.
- [9] Wei CL, Wu Q, Vega VB, et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome [J]. *Cell*, 2006, 124(1):207–219.
- [10] Dysvik B, Vasstrand EN, Løvlie R, et al. Gene expression profiles of head and neck carcinomas from Sudanese and Norwegian patients reveal common biological pathways regardless of race and lifestyle [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4):1109–1120.
- [11] Liu L, Zhou XM, Yang FF, et al. TRIM22 confers poor prognosis and promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of AKT/GSK3 β / β -catenin signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37):62069–62080.
- [12] Sun Y, Ho GH, Koong HN, et al. Down-regulation of tripartite-motif containing 22 expression in breast cancer is associated with a lack of p53-mediated induction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(3):600–606.
- [13] Zhang L, Zhang B, Wei M, et al. TRIM22 inhibits endometrial cancer progression through the NOD2/NF κ B signaling pathway and confers a favorable prognosis [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(5):1225–1239.
- [14] Liu R, Zhao W, Wang H, et al. Long noncoding RNA LINC01207 promotes colon cancer cell proliferation and invasion by regulating miR-3125/TRIM22 axis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:1216325.
- [15] Tian H, He Z. miR-215 enhances HCV replication by targeting TRIM22 and inactivating NF- κ B signaling [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(4):511–518.
- [16] Ji J, Ding K, Luo T, et al. TRIM22 activates NF- κ B signaling in glioblastoma by accelerating the degradation of I κ B α [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1):367–381.
- [17] Li S, Hong X, Wei Z, et al. Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:2483.
- [18] Li L, Qi Y, Ma X, et al. TRIM22 knockdown suppresses chronic myeloid leukemia via inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9):1192–1199.
- [19] Zhan W, Han T, Zhang C, et al. TRIM59 promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells by upregulating cell cycle related proteins [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11):e0142596.
- [20] Chen C, Zhao D, Fang S, et al. TRIM22-mediated apoptosis is associated with Bak oligomerization in monocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:39961.
- [21] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59:125–132.