

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.008

· 临床研究 ·

## GPX1 在结直肠癌组织中的表达及其对癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响

陈文彬, 钟文洲(海口市人民医院滨江分院 消化内科, 海南 海口 570208)

**[摘要]** **目的:**探讨谷胱甘肽过氧化物酶-1(GPX1)在结直肠癌(CRC)组织中的表达水平及其对CRC细胞株HT29和LOVO细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。**方法:**收集2015年6月至2016年3月间海口市人民医院滨江分院普外科手术切除的60例临床CRC组织及癌旁组织,应用实时荧光定量PCR(qPCR)技术检测CRC组织及癌旁组织中GPX1 mRNA水平。在高表达GPX1 mRNA的HT29细胞株用慢病毒shRNA感染的方法构建敲除GPX1的细胞株,瞬时转染法在低表达GPX1 mRNA的LOVO细胞系构建过表达GPX1的细胞株,并在GPX1 mRNA及蛋白水平进行验证。通过MTS法检测CRC细胞的增殖能力的变化,用划痕实验、Transwell侵袭实验分别检测CRC细胞迁移侵袭能力的变化,同时用Western blotting检测E-钙黏蛋白和波形蛋白表达的变化。**结果:**CRC组织中GPX1 mRNA表达水平显著低于癌旁组织( $0.051 \pm 0.024$  vs  $0.142 \pm 0.051$ ,  $P < 0.01$ )。敲除GPX1后,HT29细胞的增殖能力显著增强( $12.901 \pm 2.790$  vs  $6.617 \pm 2.462$ ,  $P < 0.01$ )、侵袭能力显著增强[( $384.7 \pm 37.9$ ) vs ( $209.2 \pm 31.2$ )个,  $P < 0.01$ ]、迁移能力显著增强[( $0.251 \pm 0.038$ ) vs ( $0.139 \pm 0.025$ )mm,  $P < 0.01$ ]、E-钙黏蛋白表达下调( $P < 0.01$ )、波形蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。过表达GPX1的LOVO细胞的增殖能力显著降低( $P < 0.01$ )、迁移和侵袭能力下降(均 $P < 0.05$ )、E-钙黏蛋白上调( $P < 0.01$ )、波形蛋白表达下调( $P < 0.01$ )。**结论:**GPX1 mRNA在人CRC组织中低表达,GPX1负向调控CRC细胞的增殖、迁移和侵袭,其在CRC中可能发挥抑癌作用。

**[关键词]** 谷胱甘肽过氧化物酶-1;结直肠癌;增殖;侵袭;迁移

**[中图分类号]** R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0851-08

## Expression of glutathione peroxidase-1 in colorectal cancer tissue and its effect on cell proliferation and migration

CHEN Wenbin, ZHONG Wenzhou (Department of Gastroenterology, Binjiang Branch of Haikou People's Hospital, Haikou 570208, Hainan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression level of glutathione peroxidase-1 (GPX1) in colorectal cancer (CRC) tissues, and its effect on the proliferation and migration of CRC HT29 and LOVO cell lines. **Methods:** Colorectal cancer tissues and para-cancerous tissues that resected from 60 CRC patients at Binjiang Branch of Haikou People's Hospital from June, 2015 to March, 2016 were collected for this study. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression level of GPX1 mRNA in sample tissues. HT29 cell line expressing higher GPX1 mRNA was transfected with lentivirus shRNA to stably knock-down GPX1 expression, while LOVO cell line expressing lower GPX1 mRNA was subjected to transient transfection method to stably over-expressing GPX1, and the protein and mRNA expression level of GPX1 were verified in cells. The change in cell proliferation ability was detected by MTS assay, and the invasion and migration ability was detected by Transwell invasion assay and wound healing assay. The changes in expression of E-cadherin and vimentin were detected by Western blotting. **Results:** GPX1 mRNA expression was significantly lower in CRC tissues compared with para-cancerous tissues. ( $0.051 \pm 0.044$  vs  $0.142 \pm 0.051$ ,  $P < 0.01$ ) After knock-down of GPX1: the proliferation ability of HT29 cells was significantly improved ( $12.901 \pm 2.790$  vs  $6.617 \pm 2.462$ ,  $P < 0.01$ ), the invasion

**[作者简介]** 陈文彬(1982-),男,学士,主治医师,主要从事消化道疾病的研究,E-mail:wenbincc1982@163.com

**[通信作者]** 钟文洲(ZHONG Wenzhou, corresponding author),硕士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤的研究,E-mail:bingge1122@126.com

and migration ability of HT29 cells were significantly enhanced (invasion:  $[384.7 \pm 37.9]$  vs  $[209.2 \pm 31.2]$ ,  $P < 0.01$ ; migration:  $[0.251 \pm 0.038]$  vs  $[0.139 \pm 0.025]$  mm,  $P < 0.01$ ); and there was a down-regulation of E-cadherin ( $P < 0.01$ ) and an up-regulation of vimentin ( $P < 0.01$ ). After over-expression of *GPXI*: the proliferation ability of LOVO cell was significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the invasion and migration ability of LOVO cell was significantly decreased (all  $P < 0.01$ ); and there was an up-regulation of E-cadherin ( $P < 0.01$ ) and a down-regulation of vimentin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *GPXI* mRNA was low-expressed in human colorectal cancer tissues. *GPXI* may inhibit the proliferation, invasion and migration of CRC cell lines, and may play an important anti-carcinoma role in CRC.

**[Key words]** glutathione peroxidase-1 (GPX1); colorectal cancer; proliferation; invasion; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 913-925. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.006]

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是消化道常见的恶性肿瘤之一, 人群发病率为 56/10 万, 并呈逐年上升的趋势, 现已经成为发病率世界第三的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 严重威胁着人类的健康。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 能够在原癌基因和抑癌基因中诱导广泛的突变, 并加剧炎症反应, 参与肿瘤微环境的形成, 促进肿瘤的发生发展<sup>[2]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶-1 (glutathione peroxidase-1, GPX1) 作为机体内重要的抗氧化酶之一, 在体内承担着不可替代的抗氧化应激的作用<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4-5]</sup>显示, *GPXI* 低表达与胃癌和前列腺癌的发生密切相关。目前尚未见到 *GPXI* 在 CRC 组织和细胞株中的表达及其对 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响的相关报道。因此, 本课题拟通过检测 *GPXI* 在人 CRC 组织标本中的表达水平, 及其对 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 为进一步揭示 CRC 发生发展的机制提供线索, 为更精准的临床治疗及预后判断提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞株及主要试剂

收集海口市人民医院滨江分院普外科 2015 年 6 月至 2016 年 3 月间 CRC 切除术标本及相应癌旁组织 (距癌变边缘 15 cm 切取) 各 40 例, 经病理切片确诊为 CRC, 标本于液氮中保存。

人结直肠癌细胞系 HT29、SW620、SW480、LOVO、HCT116 及人胚肾细胞 293T 均来自中国医学科学院研究中心。

RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基和 10% 的胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 逆转录试剂盒 (Maxima<sup>®</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自美国 Fermentas 公司, 定量 PCR 试剂盒 (iQ SYBR Green Supermix) 购自美国 BioRad 公司, 细胞增殖能力检测试剂盒 (MTS) 购自美国 Promega 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BCA Assay Reagent) 购自美国 Pierce Chemical 公司, PVDF 膜购自 Mill-

pore 公司, Cat NO. IPVH00010 购自美国 Millipore 公司, Matrigel 胶 (353504) 购自美国 BD-Falcon 公司。一抗: GPX1 抗体 (ab22604)、E-钙黏蛋白抗体 (ab15148) 和波形蛋白抗体 (ab92547) 购自美国 Abcam 公司,  $\beta$ -actin 抗体 (sc-4778) 购自美国 Santa cruz 公司, 二抗鼠二抗 (ab6728)、兔二抗 (ab6721) 购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 细胞培养与分组

人结直肠癌细胞系使用 RPMI 1640 培养基 + 10% 胎牛血清培养, 293T 细胞使用 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清培养, 培养条件 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 100% 的 3110 生化培养箱中培养。传代时 400  $\mu$ l 胰蛋白酶消化 5 min, 1 ml 含血清培养基终止消化, 1:3 传代。将 HT29 分为对照组及 4 组干扰组 (GV248 及 shGPX1 1~4#), 选取 2 组干扰效率最高的细胞进行实验。将 LOVO 细胞分为对照组及过表达组 (control 及 GPX1)。

### 1.3 qPCR 检测 CRC 组织和细胞中 *GPXI* 基因的表达

用 TRIzol 法抽提组织或细胞总 RNA。紫外分光光度仪检测 RNA 浓度, 取 5  $\mu$ g RNA 进行逆转录反应, 采用 qPCR 反应体系检测基因表达水平。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。GPX1 上游引物为 TATC-GAGAATGTGGCGTCCC, 下游引物为 CCGGAC-GTACTTGAGGGAAT; 扩增产物大小为 248 bp。以  $\beta$ -actin 为内参基因, 其上游引物为 TGGCAC-CCAGCACAATGAA, 下游引物为 CTAAGT-CATAGTCCGCCTAGAAGCA; 扩增产物大小为 186 bp (primer3.ut.e 网站设计序列, 经 UCSC 数据库验证), 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$  法确定 GPX1 的表达量。

### 1.4 Western blotting 检测 CRC 细胞 GPX1、E-钙黏蛋白和波形蛋白的表达

收集 CRC 细胞, 裂解液裂解, 提取蛋白质, BCA 法行蛋白定量分析, 配制 10% 丙烯酰胺胶, 上样, 80V 稳压跑胶 30 min, 120V 稳压跑胶 1 h, 湿转至 PVDF

膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入3 ml一抗(1:1 000) 4 °C孵育过夜,后加入3 ml二抗(1:3 000) 37 °C孵育1.5 h,ECL发光液曝光显影,以 $\beta$ -actin作为内参。ImageLab4.0软件进行灰度分析。

### 1.5 慢病毒感染构建稳定敲除GPX1的CRC细胞系

利用二代慢病毒包装系统在HT29细胞中构建稳定敲除GPX1细胞系,用Lipofectamine 2000以2.5:1的体积比将慢病毒shRNA质粒(6  $\mu$ g/ml)、包装(packaging)质粒(psPAX2, 4.5  $\mu$ g/ml)和包膜(envelop)质粒(pMD2.G, 1.5  $\mu$ g/ml)一并转入293T细胞,7 h后更换正常培养基培养48 h,过滤收集上清液,并将带有慢病毒的上清液感染HT29细胞,感染3 d后,使用嘌呤霉素筛选稳定细胞系,并进行Western blotting验证。有效shRNA序列为shGPX1#1: GGCTCGGCCCTCCTCAGCC; shGPX1#2: TGAGGCGGGACCCTCAGGCC; shCtrl: CCTATTCCCATGATTCCTTCATA,具体步骤参照文献[6]。

### 1.6 瞬时转染构建过表达GPX1的CRC细胞系

采用瞬时转染的方法构建GPX1过表达细胞系,合成基因全长,利用基因剪接技术插入感受态质粒中,质粒构建具体步骤参照文献[7]。接种LOVO细胞系于6孔板中,将4  $\mu$ g目的质粒及空白载体通过10  $\mu$ l Lipofectamine 2000转染试剂转入LOVO细胞,嘌呤霉素筛选(筛选浓度1  $\mu$ g/ml)细胞,待细胞生长良好后收集细胞RNA及蛋白进行验证,并进行后续实验。

### 1.7 MTS法检测CRC细胞的增殖活力

收集对数生长期细胞,以 $4 \times 10^3$ 个/孔的细胞密度接种至96孔板中,每孔加入100  $\mu$ l细胞悬液(设5个复孔),置于5%CO<sub>2</sub>、37°C培养箱中培养。分别检测细胞0、24、48和72 h的细胞增殖活力,MTS试剂与培养基以1:5的比例混合均匀,混匀后于生化培养箱中孵育60 min后用多孔板酶标仪在波长490 nm处检测光密度(D)值,以5个复孔的平均数表示相对增殖能力。

### 1.8 Transwell小室法及细胞划痕实验检测CRC细胞的迁移侵袭能力

Transwell侵袭试验:用50 mg/L的1:8的Matrigel胶稀释液包被Transwell上小室面,4°C风干。吸出残余液体,每孔加入50  $\mu$ l含10 g/L的BSA无血清培养基,37°C 30 min水化基底膜。将对数生长期的细胞用BSA无血清培养基重悬后,取200  $\mu$ l,以 $1 \times 10^6$ /ml细胞加入Transwell上小室。24孔板下室加入600  $\mu$ l 10% FBS 1640培养基,37°C、5%CO<sub>2</sub>培养细胞48 h。10%甲醇固定,0.1%结晶紫染色后,光镜下观察细胞并计数(计数采用随机视野计数

法<sup>[8]</sup>,40×光镜下观察膜背面侵袭的细胞数,随机计数中间和四周5个视野的总数)。实验重复3次。

细胞划痕实验:将对数生长的细胞接种至6孔板( $6 \times 10^5$ /孔),37°C、5%CO<sub>2</sub>培养细胞至长满,弃去培养基,加入2 ml PBS,用100  $\mu$ l移液枪头垂直水平面进行划痕,每孔3~5条,PBS清洗2次后,加入无血清培养基培养过夜,于24 h或48 h进行拍照。

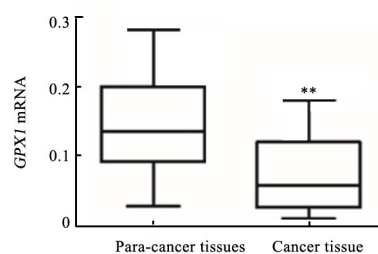
### 1.9 统计学处理

采用SPSS18.0统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组计量资料比较采用 $t$ 检验,多组计量资料比较采用方差分析,相关性分析采用Spearman相关分析法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GPX1 mRNA在CRC组织中低表达

qPCR检测结果(图1)显示,GPX1 mRNA在CRC组织中表达水平显著低于癌旁组织( $t=3.31, P < 0.01$ )。



\*\* $P < 0.01$  vs para-cancerous tissue

图1 结直肠癌组织中GPX1 mRNA的表达

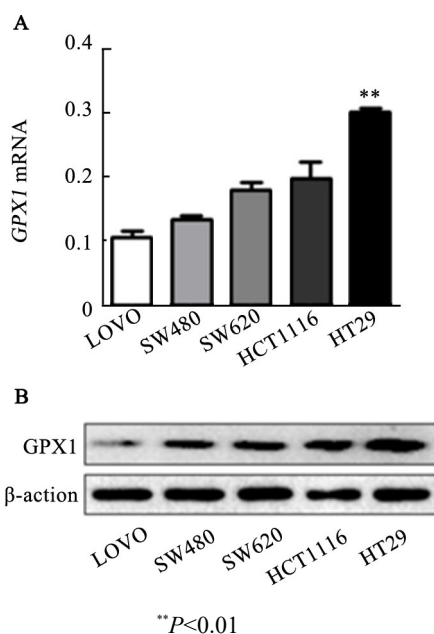
Fig.1 Expression of GPX1 mRNA in colorectal cancer tissues

### 2.2 GPX1 mRNA和蛋白在CRC细胞系的表达变化

qPCR和Western blotting检测结果(图2)显示,在结肠癌HT29、SW620、SW480、LOVO、HCT116细胞系中均有GPX1 mRNA和蛋白的表达,其中以HT29细胞GPX1表达水平最高( $P < 0.01$ ),LOVO细胞的表达水平最低( $P < 0.01$ )。因此,选择HT29细胞构建稳定敲除GPX1细胞株、LOVO细胞株构建过表达GPX1细胞株,用于后续实验。

### 2.3 敲除GPX1下调HT29细胞GPX1 mRNA和蛋白的表达水平

qPCR检测结果(图3A)显示,序列shGPX1#1、shGPX1#2组及shGPX1#4组HT29细胞GPX1 mRNA水平下调显著( $F=10.50, P < 0.01$ );Western blotting检测结果(图3B)表明,各组HT29细胞GPX1蛋白表达水平印证了qPCR的结果,故选取干扰效率均在50%以上的有效序列shGPX1#1和shGPX1#2( $F=8.37, P < 0.01$ ),进行后续实验。



A: Expression of *GPX1* mRNA; B: Expression of *GPX1* protein

图2 结肠癌细胞中 *GPX1* mRNA 和蛋白的表达

Fig. 2 mRNA and protein expressions of *GPX1* in colorectal cancer cells

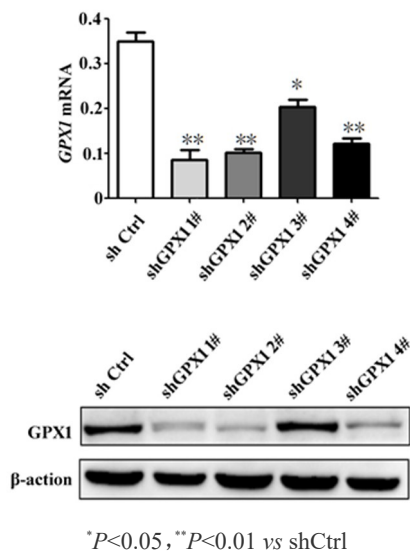
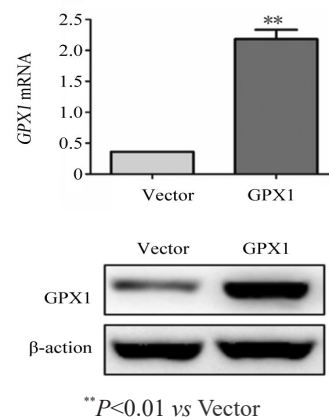


图3 敲除 *GPX1* 对 HT29 细胞 *GPX1* mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *GPX1* knock-down on mRNA and protein expression of *GPX1* in HT29 cells

#### 2.4 过表达 *GPX1* 上调 LOVO 细胞 *GPX1* mRNA 和蛋白的表达水平

qPCR 和 Western blotting 检测结果(图4)显示, 过表达 *GPX1* 的 LOVO 细胞 *GPX1* mRNA 和蛋白表达水平均较对照组明显上调(均  $P<0.01$ )。



A: Expression of *GPX1* mRNA; B: Expression of *GPX1* protein

图4 过表达 *GPX1* 对 LOVO 细胞 *GPX1* mRNA 和蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of *GPX1* over-expression on mRNA and protein expression of *GPX1* in LOVO cells

#### 2.5 敲除 *GPX1* 增强 HT29 细胞的增殖能力

MTS 法检测结果(图5)显示, 敲除 *GPX1* 24 h HT29 细胞的增殖能力上调, 48 h 后 HT29 细胞的增殖能力显著高于对照组细胞( $t=4.393, 3.776$ ; 均  $P<0.01$ )。

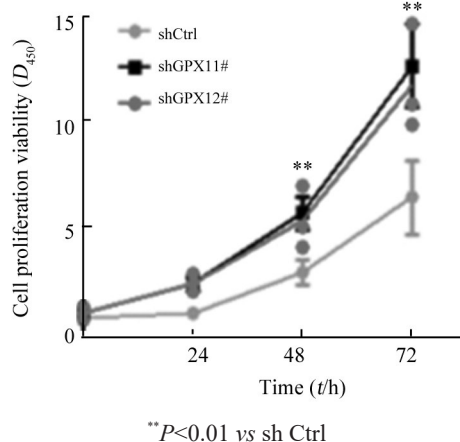


图5 敲除 *GPX1* 对 HT29 细胞增殖能力的影响

Fig. 5 Effect of *GPX1* knock-down on the proliferation of HT29 cells

#### 2.6 过表达 *GPX1* 降低 LOVO 细胞的增殖能力

MTS 法检测结果(图6)显示, 过表达 *GPX1* 72 h LOVO 细胞的增殖能力显著低于对照组细胞( $t=2.554, P<0.05$ )。提示 *GPX1* 可能具有抑制 CRC 细胞增殖的作用。

#### 2.7 敲除 *GPX1* 增强 HT29 细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验检测结果(图7A)显示, 敲除 *GPX1* 的 HT29 细胞穿膜数目显著高于对照组细胞 [ $(384.7 \pm 37.9)$  vs  $(209.2 \pm 31.2)$  个,  $t=7.991, P<$

0.01]。

2.8 过表达GPX1降低LOVO细胞的侵袭能力

Transwell侵袭实验检测结果(图7B)显示,过表达GPX1的LOVO细胞穿膜数量显著低于对照组细胞[(229.6±44.3) vs (346.8±42.5)个,  $t=4.269, P<0.01$ ]。结果提示,GPX1可能在CRC中具有对抗侵袭的作用。

2.9 敲除GPX1提高HT29细胞的迁移能力

细胞划痕修复实验结果(图8A)显示,敲除GPX1 24 h后,HT29细胞划痕修复能力显著增强[(0.251±0.038) vs (0.139±0.025) mm,  $t=4.265, P<0.01$ ]。结果表明,敲除GPX1后增强HT29细胞的迁

移能力。

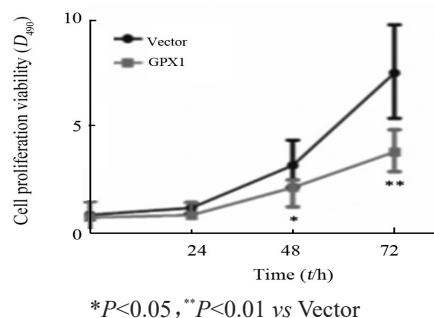


图6 过表达GPX1对LOVO细胞增殖的能力影响  
Fig.6 Overexpression of GPX1 affects the proliferation of LOVO cells

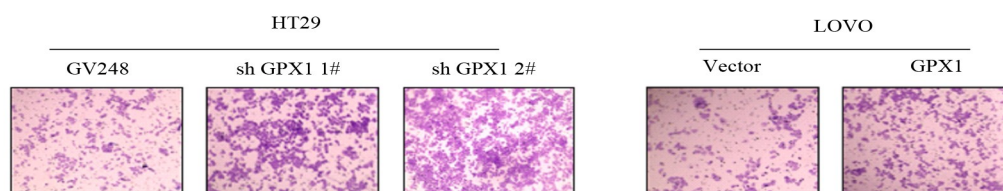
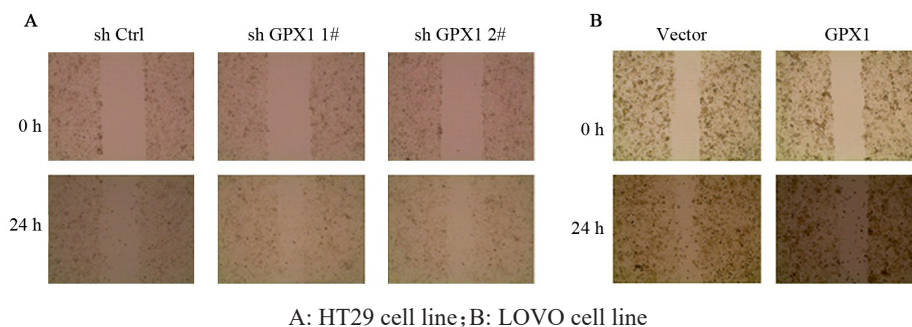


图7 敲除或过表达GPX1对HT29和LOVO细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色,×100)  
Fig.7 Effect of GPX1 knock-down or over-expression on the invasive ability of HT29 or LOVO cells (Crystalviolet staining, ×100)



A: HT29 cell line; B: LOVO cell line  
图8 敲除或过表达GPX1对HT29和LOVO细胞迁移能力的影响  
Fig.8 Effect of GPX1 knock-down or over-expression on migration ability of HT29 or LOVO cells

2.10 过表达GPX1降低LOVO细胞的迁移能力

细胞划痕实验结果(图8B),过表达GPX1 24 h后,LOVO细胞的划痕修复能力显著降低[(0.165±0.039) vs (0.237±0.030) mm,  $t=3.511, P<0.05$ ]。结果表明,GPX1在CRC细胞迁移过程中发挥抑制作用。

2.11 敲除GPX1对HT29细胞E-钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图9)显示,敲除GPX1后,HT29细胞E-钙黏蛋白的表达水平显著低于对照组细胞(0.205±0.036 vs 0.681±0.071,  $t=6.27, P<0.01$ );波形蛋白表达水平显著高于对照组细胞(0.425±0.039 vs 0.238±0.041,  $t=4.67, P<0.05$ )。

2.12 过表达GPX1对LOVO细胞E-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测结果(图10)显示,过表达GPX1,LOVO细胞E-钙黏蛋白表达水平显著高于对照组细胞(0.348±0.027 vs 0.162±0.030,  $t=4.67, P<0.01$ );波形蛋白表达水平显著低于对照组细胞(0.183±0.032 vs 0.495±0.054,  $t=7.03, P<0.01$ )。结果进一步证实了GPX1在CRC细胞侵袭转移中的抑制作用。

3 讨论

GPX1基因位于染色体3p21上,其表达产物GPX1主要存在于肺、肝、肾等氧张力较高的组织中,

亚细胞定位主要位于细胞质及线粒体<sup>[9]</sup>。*GPXI*的主要功能是降解 ROS, 保护细胞免受氧化应激<sup>[10-11]</sup>。ROS 在肿瘤的发生发展过程中起到了重要的推动作用。

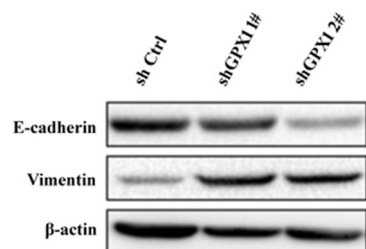


图9 敲除 *GPXI* 对 HT29 细胞 E-钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of *GPXI* knock-down on expression of E-cadherin and vimentin in HT29 cells

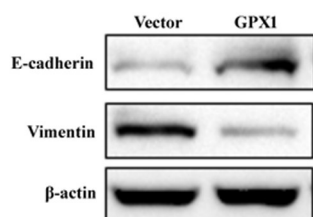


图10 过表达 *GPXI* 对 LOVO 细胞 E-钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

Fig.10 Effect of *GPXI* overexpression on expression of E-cadherin and vimentin in LOVO cells

肿瘤细胞内相比正常细胞存在更高水平的 ROS<sup>[12]</sup>, 肿瘤细胞可通过多种途径产生过量的 ROS<sup>[13-17]</sup>。过量的 ROS 能够刺激肿瘤细胞发生、增殖、侵袭、迁移及血管生成, 且能够启动逃避凋亡的机制, 并诱导化疗药物耐药性的产生, 涉及的相关机制包括导致点突变, 活化原癌基因、促进上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、介导间质结构破坏、血管内皮细胞通透性增强、刺激缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF1 $\alpha$ )表达等<sup>[18-23]</sup>。近年来有研究<sup>[24-26]</sup>显示, *GPXI* 在肺癌、结肠癌、乳腺癌及胃癌等组织中低表达, 针对 *GPXI* 表达的各种肿瘤研究中, 对比肿瘤细胞和正常上皮细胞, 出现了几乎一致的结果, 表明低表达 *GPXI* 与肿瘤的恶性化程度密切相关。Jablonska 等<sup>[27]</sup>的研究显示, *GPXI* 基因存在多态性, 其中 *GPXI* Pro198Leu 的出现与乳腺癌风险显著相关; Kulak 等<sup>[28]</sup>的报道中提出转录因子 TFAP2C 可负调节 *GPXI* 的表达, 导致 *GPXI* 启动子甲基化沉默, 影响氧化还原平衡诱导氧化应激, 这可能是乳腺癌发生的重要因素之一。邵帅等<sup>[29]</sup>发现, 在肺癌细胞内

上调 *GPXI* 可能通过清除细胞内活性氧降低 DNA 氧化损伤水平, 从而抑制细胞增殖、迁移和锚定独立生长能力等恶性表型。而在 CRC 相关 *GPXI* 的研究中, Huang 等<sup>[30]</sup>发现转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)可通过促进 *GPXI* 的表达, 可对抗 CRC 细胞中过氧化氢的损伤作用。这些研究都提示 *GPXI* 在 CRC 中可能发挥抑癌作用。

为明确 *GPXI* 在 CRC 细胞中的表达及具体的生物学效应, 本研究中运用 qPCR 技术检测临床 CRC 组织及癌旁正常组织中 *GPXI* mRNA 表达水平, 发现 CRC 组织 *GPXI* mRNA 表达水平明显低于癌旁正常组织, 进一步通过构建稳定敲除 *GPXI* 的 HT29 细胞株和过表达 *GPXI* 的 LOVO 细胞株, 发现 *GPXI* 下调后, 肿瘤细胞增殖活力升高, *GPXI* 过表达后结果相反, 证明 *GPXI* 具有抑制肿瘤细胞的增殖作用。因此, 本研究结合临床研究结果中 *GPXI* 突变对 CRC 患者预后及复发性侵袭转移的促进作用, 在体外水平监测了下调 *GPXI* 后, CRC 细胞的侵袭和转移能力明显上调, *GPXI* 过表达后 CRC 细胞的侵袭和转移能力明显下降, 确认了 *GPXI* 的抑癌作用。

EMT 是由上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程, 在癌细胞转移的过程中发挥着重要的作用, 其中代表性分子 E-钙黏蛋白和波形蛋白。E-钙黏蛋白是上皮细胞表达的一种重要的黏附分子, 代表着细胞的黏附强度, 恶变过程中 E-钙黏蛋白的表达下调往往意味着细胞活动性增加, 肿瘤细胞转移能力增强; 波形蛋白是构成细胞骨架的重要成分, 在细胞移行、黏附中起关键作用, 有许多研究指出波形蛋白在恶性肿瘤中表达增强且与细胞侵袭转移正相关<sup>[31]</sup>。本研究发现, 通过划痕修复实验及 Transwell 实验可知 *GPXI* 可负调控 CRC 细胞的侵袭转移能力。在分子水平, *GPXI* 下调后, 能够显著下调 E-钙黏蛋白水平的表达, 并上调波形蛋白的表达; *GPXI* 过表达后, E-钙黏蛋白表达显著上调, 波形蛋白表达下调, 与划痕修复实验及 Transwell 实验结果一致。此结果提示, 在肿瘤发生侵袭转移的过程中, CRC 细胞低表达 *GPXI* 可能导致 EMT 过程的倾向更明显, 进而有助于肿瘤细胞的侵袭转移。

综上所述, 本研究表明 *GPXI* 能够抑制 CRC 细胞增殖、侵袭、转移及 EMT。在下一步的研究中, 笔者将进一步通过动物体内实验验证 *GPXI* 在肿瘤发生发展中的抑癌作用; 并结合临床标本分析临床病例资料, 阐明 *GPXI* 在 CRC 的发生、侵袭转移的早期和后期分别扮演着何种角色, 确定其分子间的相互作用及具体机制, 从而为 CRC 的临床诊治提供新的依据。

## [参考文献]

- [1] 宋乐乐, 李月敏, 宫媛, 等. 利用SEPT9基因甲基化检测筛查结直肠癌的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(5):589-594. DOI:10.3872/J.ISSN.1007-385x.2014.05.020.
- [2] HE G, HE G, ZHOU R, et al. Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS in vitro, and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(4): 1075-1082. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.12.100.
- [3] 魏志权. CAT和GPX1过表达对人支气管上皮细胞辐射致癌模型DNA氧化损伤和恶性表型的影响[D]. 中国疾病预防控制中心, 2013.
- [4] MIN S Y, KIM H S, JUNG E J, et al. Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer[J/OL]. *Anticancer Res*, 2012, 32(8):3169-3175 [2016-11-16]. <http://ar.iiarjournals.org/content/by/year>. PMID:22843889.
- [5] KUCUKGERGIN C, GOKPINAR M, SANLI O, et al. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene, GPx activity and the risk of prostate cancer[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2011, 63(3): 183-190. PMID:21993316.
- [6] 赵世义, 徐胜平, 李桂云, 等. RNA干扰Rac1基因表达对结直肠癌LoVo细胞骨架和细胞周期的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(5):486-490. DOI:10.3872/J.ISSN.1007-385x.2012.05.004.
- [7] 师锐赞, 胡晓玲, 许华, 等. 靶向CK18的shRNA表达载体的构建及其对乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(3): 348-351. DOI:10.3872/J.ISSN.1007-385x.2013.03.016.
- [8] 邢德广, 王军, 欧绍武, 等. 人脑胶质瘤组织高表达nNav1.5促进肿瘤细胞的迁移和侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(4): 444-449. DOI:10.3872/J.ISSN.1007-385x.2014.04.015.
- [9] AHWACH S M, THOMAS M, ONSTEAD-HAAS L, et al. The glutathione mimic ebselen inhibits oxidative stress but not endoplasmic reticulum stress in endothelial cells[J/OL]. *Life Sci*, 2015, 134: 9-15 [2016-11-16]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00243205>. DOI:10.1016/j.lfs.2015.05.004.
- [10] BRIGELIUS-FLOHÉ R, MAIORINO M. Glutathione peroxidases [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2013, 1830(5): 3289-3303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [11] TAN S M, STEFANOVIC N, TAN G, et al. Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 (GPx1) exacerbates retinopathy of prematurity in mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(1): 555-562. DOI:10.1167/iov.12-10685.
- [12] SANG W K, LEE S, LEE E K. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(3): 338-345. DOI:10.1007/s12272-015-0550-6.
- [13] LI W J, NIE S P, YAO Y F, et al. Ganoderma atrum polysaccharide ameliorates hyperglycemia-induced endothelial cell death via a mitochondria-ROS pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(37): 8182-8191. DOI:10.1021/acs.jafc.5b03462.
- [14] JANDA J, NFONSAM V, CALIENES F, et al. Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing[J]. *Arch Dermatol Res*, 2016, 308(4): 239-248. DOI:10.1007/s00403-016-1628-9.
- [15] BRANDES R P, WEISSMANN N, SCHRÖDER K. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation[J/OL]. *Free Rad Biol Med*, 2014, 76: 208-226 [2016-11-16]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914003827> via %3 Duh. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.
- [16] 王凤杰, 王科坤, 陈显兵, 等. 宫颈癌组织中硒结合蛋白1表达与肿瘤微环境中抗氧化酶活性有关[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 711-714. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.05.024.
- [17] CHOUDHURY S, GHOSH S, GUPTA P, et al. Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF- $\kappa$ B and SAPK/JNK pathway[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(11): 1371-1383. DOI:10.3109/10715762.2015.1075016.
- [18] VITAL P, CASTRO P, ITTMANN M. Oxidative stress promotes benign prostatic hyperplasia[J]. *Prostate*, 2015, 76(1): 58-67. DOI: 10.1002/pros.23100.
- [19] BASU S, DE D, DEV K H, et al. Lipid peroxidation, DNA damage and total antioxidant status in neonatal hyperbilirubinemia[J]. *J Perinatol*, 2014, 34(7):519-523. DOI:10.1038/jp.2014.45.
- [20] HUO Y N, CHEN W, ZHENG X X. ROS, MAPK/ERK and PKC play distinct roles in EGF-stimulated human corneal cell proliferation and migration[J/OL]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(7): 6-11 [2016-11-16]. <http://www.cellmolbiol.org/index.php/CMB>. PMID:26567598.
- [21] GONG E Y, YU J S, HWANG I Y, et al. Combined treatment with vitamin C and sulindac synergistically induces p53- and ROS-dependent apoptosis in human colon cancer cells[J/OL]. *Toxicol Lett*, 2016, 258: 126-133 [2016-11-16]. <http://sciencedirect.com/science/journal/03784274>. DOI:10.1016/j.toxlet.2016.06.019.
- [22] KIM Y M, CHO M. Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells[J]. *Cel Signal*, 2014, 26(4): 784-796. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.12.005.
- [23] XIA L, MO P, HUANG W, et al. The TNF- $\alpha$ /ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2250-2259. DOI:10.1093/carcin/bgs249.
- [24] MIAR A, HEVIA D, MUÑOZ-CIMADEVILLA H, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer[J/OL]. *Free Rad Biol Med*, 2015, 85:45-55 [2016-11-16]. <http://sciencedirect.com/science/journal/08915849>. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.001.
- [25] ERDEM O, EKEN A, AKAY C, et al. Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31(1):24-31. DOI:10.1177/0960327111411499.
- [26] ARSOVASARAFINOVSKA Z, MATEVSKA N, EKEN A, et al. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk[J]. *Int Urol Nephrol*, 2009, 41(1): 63-70. DOI:10.1007/s11255-008-9407-y.
- [27] JABLONSKA E, GROMADZINSKA J, PEPLONSKA B, et al. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 1-12 [2016-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4597452/>. DOI:10.1186/s12885-015-1680-4.
- [28] KULAK M V, CYR A R, WOODFIELD G W, et al. Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer[J/OL]. *Oncogene*, 2012, 32(34): 4043-

- 4051 [2016- 11- 16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522755/>. DOI:10.1038/onc.2012.400.
- [29] 邵帅, 魏志权, 张伟, 等. GPX1 过表达对肺癌 BERP35T1 细胞 DNA 氧化损伤和恶性表型的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28 (1):8-13.DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2016.01.002.
- [30] HUANG Y, FANG W, WANG Y, et al. Transforming growth factor- $\beta$  1 induces glutathione peroxidase-1 and protects from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in colon cancer cells via the Smad2/ERK1/2/HIF-1 $\alpha$  pathway[J]. Int J Mol Med,2012, 29(5):906-912. DOI:10.3892/ijmm.2012.901.
- [31] 笄正. 上皮-间质细胞转化的分子机制及其在肿瘤转移中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16(5) 541-545.DOI:10.3872/J. ISSN.1007-385x.2009.05.025.

[收稿日期] 2017-02-10

[修回日期] 2017-07-08

[本文编辑] 党瑞山