

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.005

· 基础研究 ·

## TRIM21 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控卵巢癌细胞增殖及耐药

常旺燕<sup>1</sup>, 李爱明<sup>1</sup>, 窦丽<sup>1</sup>, 李红霞<sup>2</sup> (1. 延安市人民医院 妇产科, 陕西 延安 716000; 2. 延安大学附属医院 妇科, 陕西 延安 716000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 TRIM21 通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控卵巢癌细胞增殖以及 PARP 抑制剂耐药的相关机制。 **方法:** 收集 2018 年 1 月至 2019 年 1 月于延安市人民医院手术切除的 8 例卵巢癌组织及宫颈上皮组织标本, 并根据患者是否对 PARP 抑制剂尼拉帕尼耐药分为耐药组和非耐药组 (4 例/组); 卵巢癌细胞系 CAOV3、SKOV3、OVCAR3、ES-2、HO8910、A2780 和 OV2008。用 qPCR 法和 Western blotting (WB) 分别检测卵巢癌组织和细胞系中 TRIM21 和  $\beta$ -catenin 表达水平。构建 TRIM21 过表达及敲减细胞系, 用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖活力, 用 TOP/FOP 双荧光素酶实验检测 TRIM21 对 Wnt 信号通路激活的影响, qPCR 法和 WB 检测 TRIM21 对  $\beta$ -catenin mRNA 和蛋白水平的影响, 并通过 Wnt 通路抑制剂 XAV-939 作进一步验证。 **结果:** TRIM21 在卵巢癌组织中的表达水平显著高于宫颈上皮组织 ( $P < 0.01$ ), 且在耐药组织中表达水平较高 ( $P < 0.01$ ); TRIM21 在卵巢癌 ES-2 细胞中表达水平相对最高, 而在 CAOV3 和 A2780 中表达水平相对较低 (均  $P < 0.01$ )。敲减 TRIM21 后, ES-2 细胞中 TRIM21 的表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞的增殖能力明显降低 ( $P < 0.01$ ); 过表达 TRIM21 后, CAOV3 细胞的增殖能力显著增强 ( $P < 0.01$ ), 并可抑制尼拉帕尼的抗肿瘤增殖活性, 其可调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的激活, 而敲减  $\beta$ -catenin 或使用 Wnt/ $\beta$ -catenin 抑制剂 XAV-939 后, TRIM21 在卵巢癌中的作用被显著逆转。 **结论:** TRIM21 可通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路增强卵巢癌细胞的增殖能力并在 PARP 抑制剂尼拉帕尼耐药过程中发挥一定的作用。

**[关键词]** 卵巢癌; TRIM21; PARP 抑制剂; Wnt/ $\beta$ -catenin 抑制剂; 增殖; 耐药

**[中图分类号]** R737.33; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)07-0749-08

## TRIM21 regulates proliferation and drug resistance of ovarian cancer cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

CHANG Wangyan<sup>1</sup>, LI Aiming<sup>1</sup>, DOU Li<sup>1</sup>, LI Hongxia<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Yan'an People's Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi, China; 2. Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of TRIM21 regulating the proliferation of ovarian cancer cells and the resistance of PARP inhibitors by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods:** Eight pairs of ovarian cancer tissues and cervical epithelial tissues that surgically removed at Yan'an People's Hospital from January 2018 to January 2019 were collected for this study. And the tissues were classified into resistant group and non-resistant group (4 case/group) according to whether the patients were resistant to PARP inhibitor (nilaparib). Ovarian cancer cell lines CAOV3, SKOV3, OVCAR3, ES-2, HO8910, A2780 and OV2008 were also collected for this study. qPCR and Western blotting (WB) were used to detect the expression levels of TRIM21 and  $\beta$ -catenin in the above mentioned tissues and cell lines. Cell lines with TRIM21 overexpression and knockdown were constructed. CCK-8 method was used to detect the proliferation activity of ovarian cancer cells in each group, TOP/FOP dual luciferase assay was used to detect the effect of TRIM21 on Wnt signaling pathway activation, qPCR and WB were used to detect the effect of TRIM21 on mRNA and protein levels of  $\beta$ -catenin, which was further verified by Wnt pathway inhibitor XAV-939. **Results:** The expression level of TRIM21 in ovarian cancer tissues was significantly higher than that in cervical epithelial tissues ( $P < 0.01$ ), and its expression was more higher in the drug-resistant tissues ( $P < 0.01$ ). TRIM21 expression was the highest in ES-2 cells but comparatively low in CAOV3 and A270 cells (all  $P < 0.01$ ). After TRIM21 knockdown, the expression of TRIM21 in ES-2 cells was significantly decreased, and the cell proliferation was significantly reduced (all  $P < 0.01$ ). After overexpressing TRIM21, the proliferative capacity of ovarian cancer CAOV3 cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the antitumor effect of nilaparib was inhibited; TRIM21 overexpression could regulate

**[基金项目]** 陕西省教育厅自然科学研究项目资助 (No. 2013JK0782)。Project supported by the Natural Science Research Project of Education Department of Shaanxi Province (No. 2013JK0782)

**[作者简介]** 常旺燕 (1981-), 女, 学士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的研究, E-mail: yancwyan@163.com

**[通信作者]** 窦丽 (DOU Li, corresponding author), 学士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究, E-mail: 3151103623@qq.com

Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation, while  $\beta$ -catenin knockdown or Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor XAV-939 could significantly reverse the effect of TRIM21 in ovarian cancer. **Conclusion:** TRIM21 can enhance the proliferation of ovarian cancer cells *via* regulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, it plays a certain role in the process of drug resistance of PARP inhibitor niraparib.

**[Key words]** ovarian cancer; TRIM21; PARP inhibitor; Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor; proliferation; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(7): 749-756. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.07.005]

卵巢癌病死率位居女性生殖系恶性肿瘤的首位<sup>[1-2]</sup>。目前,手术、化疗、放疗和免疫治疗提高了卵巢癌的疗效,但对晚期、耐药和术后复发卵巢癌仍然缺少有效的疗法<sup>[3-4]</sup>。三结构域蛋白家族(tripartite motif, TRIM)与多种肿瘤的发展密切相关<sup>[5]</sup>。TRIM21是TRIM重要家族成员,是一种调控免疫反应如抗病毒感染、调控炎症反应和细胞因子、趋化因子分泌的蛋白。TRIM21蛋白在卵巢癌中表达异常,可促进卵巢癌细胞的恶性表型并与患者不良预后相关<sup>[6]</sup>,但其具体的调控机制尚未明了。Wnt作为影响机体生长发育重要的信号通路,参与调控多种细胞的增殖、分化以及器官的形成;当Wnt信号被激活后可引起细胞间黏附功能缺失,具有一定的促癌作用,在胃癌、前列腺癌、宫颈癌和卵巢癌的发生发展中起重要的作用<sup>[7-10]</sup>。 $\beta$ -catenin作为Wnt信号通路的效应分子,可引起肿瘤细胞生物学的改变;当肿瘤细胞受到一定程度的损伤后,其可通过增加一系列类似于乳腺癌1号基因(breast cancer gene 1, BRCA1)的相关基因表达促进DNA损伤修复,从而维持肿瘤细胞的增殖。本研究通过检测卵巢癌组织及细胞中TRIM21的表达并观察其对卵巢癌细胞增殖的影响,进一步通过siRNA技术及通路抑制剂验证TRIM21与Wnt/ $\beta$ -catenin通路在卵巢癌中的作用及其机制,旨在为其作为卵巢癌治疗及其药物研发的新靶标提供实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本、细胞系和主要试剂

收集2018年1月至2019年1月在延安市人民医院手术切除的8例卵巢癌患者的癌组织及宫颈上皮组织标本,所有患者均为首次进行手术、术前未接受过放化疗,平均年龄(48.3±2.1)岁。所有组织切片经病理学专家复核,病理类型为卵巢浆液性癌3例、透明细胞癌2例、黏液性癌3例;病理分化程度为高中分化3例、低分化5例。同时根据患者是否对聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂尼拉帕尼(niraparib)耐药分为耐药组(4例)和非耐药组(4例)。

卵巢癌细胞系CAOV3、SKOV3、OVCAR3、ES-2、HO8910、A2780和OV2008细胞均购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。

所有细胞常规培养于含10%胎牛血清(FBS)-DMEM中于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中。DMEM培养基、FBS购自Sigma公司,尼拉帕尼、XAV-939(Wnt通路抑制剂)购自美国MCE公司,psPAX2、pMD2G、pLKO.1-NO或pLKO.1-siTRIM21以及pLent-GFP和pLent-hyperTRIM21质粒均购于Addgene公司, TOP glow/FOP glow TCF试剂盒购自美国Merck公司, $\beta$ -catenin、TRIM21和GAPDH引物均购自广州锐博生物科技有限公司,RNA提取试剂盒购自TaKaRa公司,RNA逆转录试剂盒Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit以和Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,GAPDH、TRIM21、 $\beta$ -catenin一抗及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔或抗鼠二抗均购自三鹰生物科技有限公司,CCK-8、Western blotting(WB)试剂盒及BCA蛋白浓度测量试剂盒均购自碧云天生物技术公司。

### 1.2 慢病毒包装和感染细胞

慢病毒包装:胰酶消化收集处于对数期生长293T细胞,于6 cm皿中培养至汇合度达70%时进行转移,按照转染试剂以及病毒包装要求,将质粒pLKO.1-NO/pLKO.1-siTRIM21/pLent-3F/pLent-hyperTRIM21:psPAX2:pMD2G=4:3:1混合后,转染进293T细胞,培养4 h后更换新鲜DMEM培养基,48 h后收集细胞上清用于感染卵巢癌CAOV3或A2780细胞。

稳定敲减细胞系的构建:使用胰酶消化生长于对数期的卵巢癌细胞系,细胞汇合度达60%时,严格按照试剂盒说明书操作要求感染卵巢癌ES-2细胞,培养24 h后更换新鲜DMEM,采用嘌呤霉素(2 mg/L)持续筛选,2周后用qPCR和WB检测其敲减效率。

检测TRIM21对卵巢癌增殖能力及 $\beta$ -catenin表达的影响分为过表达TRIM21组(hyperTRIM21)、敲减TRIM21组(siTRIM21)、空白对照组(Control)、阴性对照组(siNC)及PARP抑制剂干预组(niraparib+TRIM21);检测TRIM21对 $\beta$ -catenin信号通路的影响分为空白对照组(Control)、TRIM21过表达组(hyperTRIM21)、阴性对照组(siNC)及 $\beta$ -catenin敲减组(si $\beta$ -catenin),检测抑制Wnt通路对TRIM21功能的影响分为空白对照组(Control)、TRIM21过表达组(hyperTRIM21)及Wnt通路抑制剂干预组(XAV-939)。

### 1.3 qPCR 法检测卵巢癌组织和细胞系中 TRIM21 和 $\beta$ -catenin mRNA 的表达水平

使用 RNA 提取试剂盒提取卵巢癌组织、宫颈上皮组织和细胞系中 RNA, 将提取的 RNA 严格按照逆转录试剂盒要求逆转录为 cDNA, 合成的 cDNA 按照 Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix 试剂盒说明书要求进行 PCR 扩增, 以 GAPDH 为内参检测 TRIM21 和  $\beta$ -catenin 的表达。PCR 引物序列: TRIM21, F 为 5'-TGTAAGGTGAGTGAACCCCACTA-3', R 为 5'-GACCGGCTCAAGGATGGA-3';  $\beta$ -catenin, F 为 5'-TCTGAGGACAAGCCACAAGATTACA-3', R 为 5'-TGGGCACCAATATCAAGTCCAA-3'; GAPDH, F 为 GGCATGGACTGTGGTCATGAG, R 为 5'-TGCAC-CACCAACTGTTAGC-3'。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 变性 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 TRIM21 和  $\beta$ -catenin 的相对表达量。

### 1.4 WB 检测卵巢癌组织和细胞中 TRIM21 和 $\beta$ -catenin 蛋白的表达水平

取各组卵巢癌细胞, 加入 RIPA 裂解液后冰浴 20 min, 待细胞充分裂解后, 以 4 °C 下 2 250 $\times$ g 离心 5 min, 取上清, BCA 法蛋白定量, 进行 SDS-PAGE、转膜, 用 5% 脱脂奶粉的 TBST 液室温下封闭 1 h, 加入 TRIM21 (1:3 000)、 $\beta$ -catenin (1:3 000) 一抗和 GAPDH (1:5 000), 4 °C 孵育过夜。次日, TBST 液洗 3 次 (10 min/次), 加入 HRP 标记的羊抗兔或抗鼠二抗 (1:5 000), 室温下孵育 1 h, TBST 溶液洗 3 次后进行曝光、显影。使用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参计算 TRIM21、 $\beta$ -catenin 的相对表达量。

### 1.5 CCK-8 法检测卵巢癌细胞的增殖活力

取各组卵巢癌细胞分别接种于 96 孔 ( $2\times 10^3$  个/孔) 板中, 每组设 4 个平行复孔。其中干预组加入 50  $\mu$ g/ml 尼拉帕尼或 25  $\mu$ g/ml XAV-939, 分别于 0、12、24、36、48 h 加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 孵育 4 h 后, 于多功能酶标仪检测波长 450 nm 处的光密度 ( $D$ ) 值, 然后据此计算细胞的增殖能力。

### 1.6 TOP/FOP 双荧光素酶检测 TRIM21 对 Wnt 信号通路的影响

稳定过表达 TRIM21 和敲减 TRIM21 的卵巢癌细胞系以及对照细胞接种于 24 孔板 ( $1\times 10^5$  个/孔)。24 h 后, 将 FOP 以及 TOP 质粒转染稳定过表达的上述细胞, 将含有 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 的 Opti-MEM 加入含有质粒的 DNA 液体中, 混匀后, 室温孵育 6 h, 将上清更换为完全培养基, 继续培养 24 h 后, 收集细胞进行检测, 海肾荧光素酶作为内参, 以 TOP/FOP 值进行比较, 以分析细胞中 Wnt 信号通路的激活状态。

### 1.7 Wnt 通路抑制实验观察该通路对 TRIM21 在卵巢癌中作用的影响

使用 Wnt 通路抑制剂 XAV-939 进行干预, 检测其对 TRIM21 过表达所诱导的  $\beta$ -catenin 及卵巢癌细胞增殖能力的影响, 具体方法同 1.4~1.6 中所述。

### 1.8 统计学处理

qPCR、WB、CCK-8 法等实验均重复 3 次。应用 SPSS12.0 软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较均采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TRIM21 在卵巢癌组织和细胞系中高表达

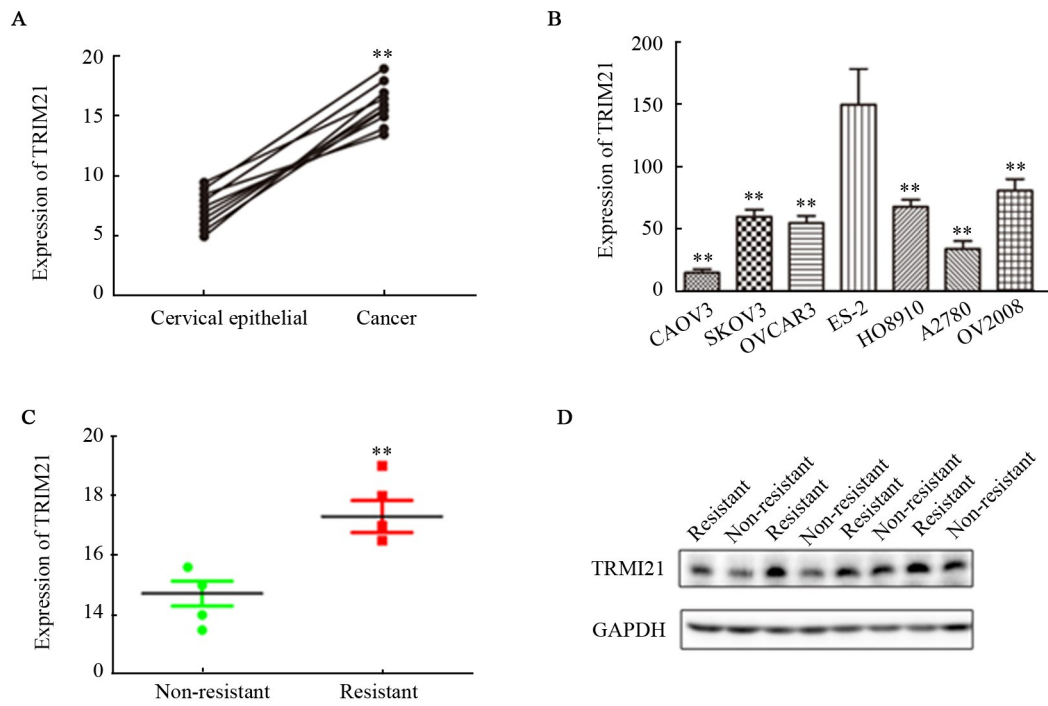
qPCR 检测结果显示, 卵巢癌组织中 TRIM21 mRNA 水平明显高于正常宫颈上皮组织 ( $t=13.22$ ,  $P<0.01$ ; 图 1A); 卵巢癌细胞系中 TRIM21 的表达水平, 以 ES-2 细胞中 TRIM21 表达水平相对最高, 而在 CAOV3 和 A2780 中表达水平相对较低 (均  $P<0.01$ , 图 1B); 耐药组患者 TRIM21 表达水平明显高于非耐药组 ( $t=14.36$ ,  $P<0.01$ ; 图 1C)。耐药组组织中 TRIM21 蛋白水平明显高于非耐药组 ( $4.23\pm 0.27$  vs  $2.51\pm 0.14$ ,  $t=5.81$ ,  $P<0.01$ ; 图 1D)。结果显示, TRIM21 在卵巢癌组织及细胞中表达显著增高, 并且其在卵巢癌耐药过程发挥一定作用。

### 2.2 TRIM21 促进卵巢癌细胞的增殖能力

敲减 TRIM21 后, WB 检测其敲减效率 (图 2A) 显示, ES-2 细胞中 TRIM21 的表达水平显著降低 ( $2.11\pm 0.17$  vs  $6.37\pm 0.44$ ,  $t=21.73$ ,  $P<0.01$ ); CCK-8 检测结果显示, ES-2 细胞的增殖能力明显降低 ( $t=15.36$ ,  $P<0.01$ ; 图 2B); 过表达 TRIM21 后, CAOV3 细胞中 TRIM21 表达水平显著升高 ( $5.81\pm 0.63$  vs  $0.94\pm 0.05$ ,  $t=15.39$ ,  $P<0.01$ ; 图 2A), CAOV3 细胞的增殖能力显著增强 ( $t=17.45$ ,  $P<0.01$ ; 图 2C)。在过表达 TRIM21 的 CAOV3 细胞中加入尼拉帕尼后, 与对照组比较, TRIM21 过表达可降低尼拉帕尼对 CAOV3 细胞增殖的抑制作用 ( $t=11.73$ ,  $P<0.01$ ; 图 2D)。上述结果表明, TRIM21 可显著增加卵巢癌细胞的增殖能力, 并降低细胞对 PARP 抑制剂的反应性。

### 2.3 TRIM21 影响 $\beta$ -catenin 的表达水平

在 TRIM21 过表达和敲减的卵巢癌细胞中检测信号通路是否被激活, 荧光素酶实验结果显示, TOP/FOP 相对比率证明 TRIM21 过表达可明显激活 Wnt 信号通路 ( $t=17.34$ ,  $P<0.01$ ; 图 3A), 而敲减 TRIM21 则可抑制 Wnt 信号通路的激活 ( $t=22.75$ ,  $P<0.01$ ; 图 3B)。同时, qPCR 检测结果 (图 3C、D) 显示, 过表达 TRIM21 可上调  $\beta$ -catenin mRNA 水平 ( $t=14.93$ ,  $P<0.01$ ), 而敲



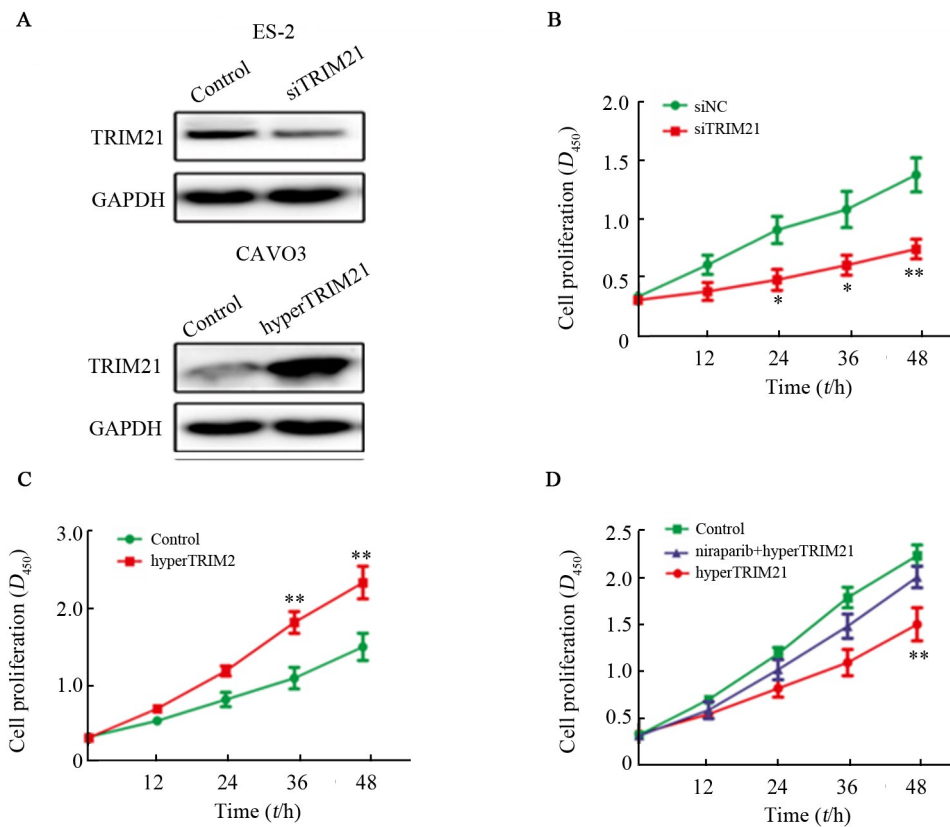
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Cervical epithelial or Non-resistant or ES-2 group

A, B and C: qPCR was used to detect the mRNA expression of TRIM21;

D: WB was used to detect the protein expression of TRIM21

图1 TRIM21在卵巢癌组织和细胞系及耐药和非耐药组织中的表达

Fig.1 TRIM21 expression in ovarian cancer tissues and cell lines as well as in resistant and non-resistant tissues



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs siNC or Control group

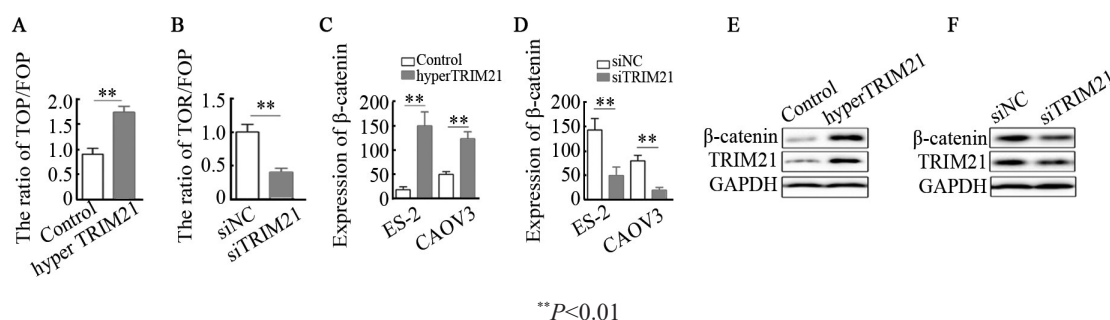
A: WB was used to detect the expression of TRIM21; B, C and D: CCK-8 was used to detect the proliferation of ovarian cancer cells

图2 TRIM21敲低及过表达对卵巢癌细胞增殖能力的影响

Fig.2 The effect of TRIM21 knockdown and overexpression on the proliferation of ovarian cancer cells

减 TRIM21 则可显著降低其  $\beta$ -catenin mRNA 水平 ( $t=9.32, P<0.01$ )。此外, WB 实验结果(图 3E、F)同样证明, TRIM21 过表达可显著上调  $\beta$ -catenin 蛋白水平 ( $4.72\pm 0.37$  vs  $0.45\pm 0.04, t=12.18, P<0.01$ ), 而敲减

TRIM21 则显著降低  $\beta$ -catenin 表达水平 ( $2.73\pm 0.14$  vs  $1.32\pm 0.07, t=3.44, P<0.05$ )。上述结果表明, TRIM21 可激活 Wnt- $\beta$ -catenin 信号通路。



A and B: TOP/FOP experiment was used to detect the effect of TRIM21 overexpression/knockdown on Wnt signaling pathway;

C and D: qPCR was used to detect the effect of TRIM21 overexpression/knockdown on  $\beta$ -catenin mRNA level;

E and F: WB was used to detect the effect of TRIM21 overexpression/knockdown on  $\beta$ -catenin expression

图3 TRIM21 激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

Fig.3 TRIM21 activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

#### 2.4 TRIM21 通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路增强卵巢癌细胞的增殖能力

在卵巢癌 CAOV3 及 A2780 细胞中过表达 TRIM21 后,用 siRNA 敲低  $\beta$ -catenin 抑制 Wnt 信号通路, WB 实验证明敲低  $\beta$ -catenin 可明显降低 TRIM21 过表达所引起的  $\beta$ -catenin 蛋白的上调 ( $0.25\pm 0.03$  vs  $3.27\pm 0.24, t=17.59, P<0.01$ , 图 4A;  $1.46\pm 0.13$  vs  $3.34\pm 0.18, t=15.43, P<0.01$ ; 图 4B); CCK-8 实验证明在 CAOV3 及 A2780 细胞中敲低  $\beta$ -catenin 可明显抑制 TRIM21 过表达所促进的细胞增殖能力 ( $t=12.53, P<0.01$ ;  $t=20.31, P<0.01$ ; 图 4C、D)。实验表明, TRIM21 是通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进卵巢癌细胞的增殖。

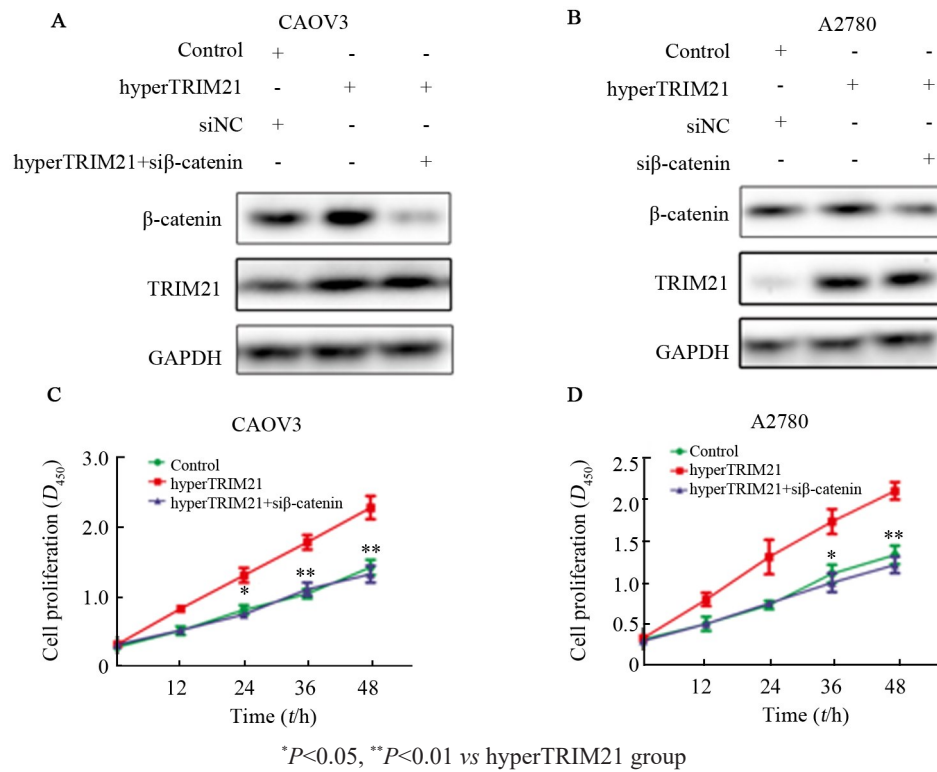
#### 2.5 抑制 Wnt 信号通路降低 TRIM21 对卵巢癌细胞增殖的影响

WB 检测结果显示,过表达 TRIM21 后 CAOV3 及 A2780 细胞中  $\beta$ -catenin 表达水平显著上调 ( $3.27\pm 0.24$  vs  $0.25\pm 0.03, t=17.59, P<0.01$ ; 图 5A), 而加入 XAV-939 后,细胞中  $\beta$ -catenin 水平显著下调 ( $0.25\pm 0.03$  vs  $3.27\pm 0.24, t=17.59, P<0.01$ ; 图 5B)。同样, CCK-8 实验结果(图 5C、D)也证明, TRIM21 过表达后, CAOV3 及 A2780 细胞的增殖能力显著增强 ( $t=21.43, P<0.01$ ), 而 XAV-939 刺激后,细胞的增殖能力受到了明显的抑制 ( $t=15.86, 12.65, 均 P<0.01$ )。结果表明, TRIM21 可通过激活 Wnt 信号通路上调  $\beta$ -catenin 水平促进卵巢癌细胞的增殖。

### 3 讨论

卵巢癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌<sup>[1]</sup>,其发病机制复杂,受多种因素影响,因此,

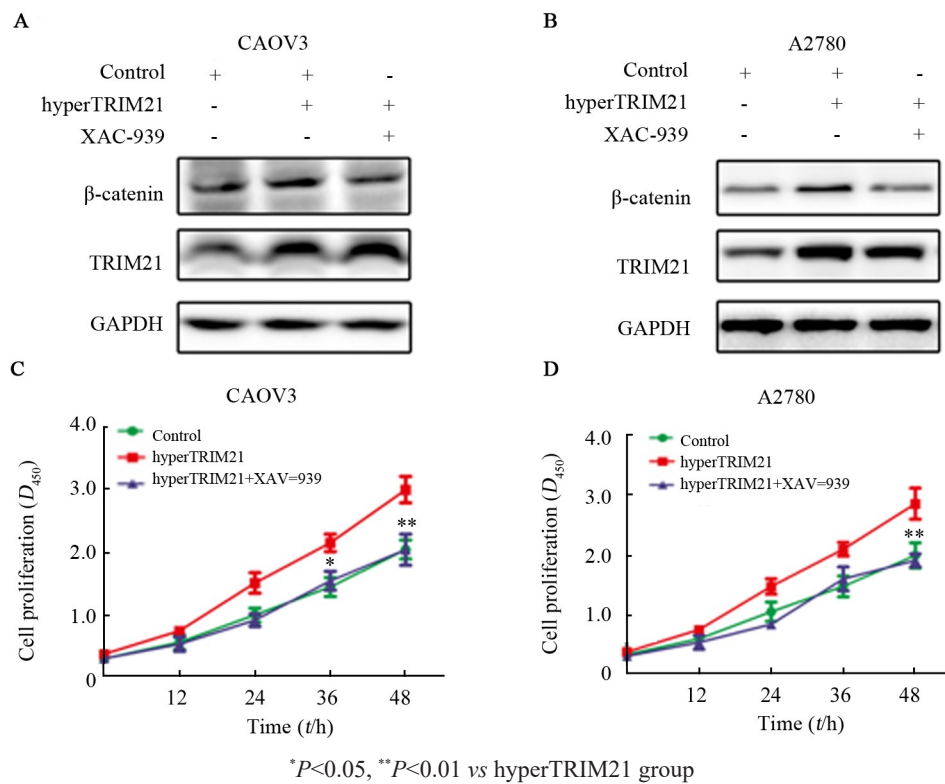
阐明影响卵巢癌发病的多种因素的调控机制是目前卵巢癌研究的最大挑战,只有从这些关键环节入手,才能在卵巢癌的早期诊断、治疗和预防方面取得突破。TRIM 家族广泛存在于哺乳动物中,其包含 70 余种蛋白,该家族成员存在典型的 3 个结构域,这 3 个结构域从 N 端到 C 端的依次是锌指结构域(RING finger)>1 个或者 2 个 B-box、1 个卷曲螺旋(coiled-coil)结构域,部分 TRIM 家族蛋白成员与肿瘤发生发展过程相关,不同的 TRIM 家族蛋白在不同种类肿瘤中通过不同的调控方式参与肿瘤进程。TRIM 家族成员可作为抑癌基因或者促癌基因影响肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、凋亡等生物学过程。TRIM52 可通过激活 STAT3 信号通路影响卵巢癌细胞的增殖<sup>[12]</sup>; TRIM24 在前列腺癌中可通过泛素化降解 P53 促进肿瘤进展<sup>[13]</sup>; TRIM24 也可与 TRIM 家族的 TRIM28、TRIM33 共同作用影响肝细胞癌的进展<sup>[14]</sup>。TRIM 家族蛋白除参与影响肿瘤进展外,也调控机体免疫以及自噬等生理过程; TRIM5 $\alpha$  可抑制多种病毒包括逆转录病毒的感染能力<sup>[15]</sup>,而 TRIM25 则通过与甲型流感非特异性蛋白 1 相互作用抑制 RIG-1 介导的干扰素的产生,从而使病毒达到免疫逃逸的目的<sup>[16]</sup>。此外, TRIM63 可通过与自噬底物分子 P62 的结合影响乙酰胆碱 N1 型受体的转运<sup>[17]</sup>, TRIM5 $\alpha$  也可通过泛素化自噬相关分子 ULK1 参与调节自噬体的形成<sup>[18]</sup>。近年来, TRIM21 被发现在卵巢癌中表达异常,同时与患者的不良预后密切相关。本研究发现 TRIM21 在卵巢癌组织和细胞中高表达,过表达 TRIM21 可增强卵巢癌细胞的增殖能力,同时其在 PARP 抑制剂耐药的卵巢癌中表达较高,提示其与卵巢癌耐药具有一定的相关性。



A and B: WB was used to detect the effect of siβ-catenin on the protein level of β-catenin upregulated by TRIM21 overexpression; C and D: CCK-8 test was used to detect the effect of siβ-catenin on the increased proliferation ability caused by TRIM21 overexpression

图4 TRIM21 通过激活 Wnt 信号通路影响细胞增殖

Fig.4 TRIM21 affected cell proliferation by activating the Wnt signaling pathway



A and B: WB was used to detect the effect of XAV-939 stimulation on β-catenin upregulated by TRIM21 overexpression; C and D: CCK-8 experiment was used to detect the effect of XAV-939 stimulation on TRIM21-induced proliferation of CAOV3 and A2780 cells

图5 XAV-939 抑制 TRIM21 介导的促进卵巢癌细胞的增殖能力

Fig.5 XAV-939 inhibited TRIM21-mediated proliferation of ovarian cancer cells

PARP 抑制剂可通过抑制肿瘤细胞 DNA 损伤修复、促进肿瘤细胞发生凋亡, 从而可增强放疗以及铂类等药物的疗效<sup>[19-22]</sup>。目前 PARP 抑制剂已经广泛运用于各种肿瘤中, 在 BRCA1 野生型的卵巢癌中, PARP 抑制剂联合化疗药物的使用可明显延长患者的生存时间。而目前 PARP 抑制剂的临床应用受其耐药性限制, 本研究发现 TRIM21 过表达后, PARP 抑制剂的抗肿瘤增殖活性显著降低, 提示 TRIM21 与卵巢癌 PARP 抑制剂耐药具有一定的相关性。经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路作为影响机体发育的关键信号通路同时也参与多种肿瘤的进程, FBXW2 可通过促进  $\beta$ -catenin 的泛素化降解抑制非小细胞肺癌的转移<sup>[23]</sup>; TRAF6 则通过自噬溶酶体途径降解  $\beta$ -catenin 影响结直肠癌细胞的增殖<sup>[24]</sup>; Kinesin-2 和 IFT-A 所形成的复合体促进  $\beta$ -catenin 入核激活 Wnt 信号通路影响肿瘤免疫<sup>[25]</sup>, 而组蛋白去甲基化酶 JMJD2D 通过与  $\beta$ -catenin 的相互作用激活核内基因的转录促进卵巢癌细胞的增殖<sup>[26]</sup>。本研究发现, TRIM21 可通过调节  $\beta$ -catenin 的转录, 激活 Wnt 信号通路, 促进卵巢癌进展, 抑制 Wnt 通路后可显著逆转 TRIM21 对卵巢癌细胞的影响。

综上所述, 本研究发现 TRIM21 在卵巢癌中表达显著增加, 同时与 PARP 抑制剂耐药具有一定的相关性, 其可能是通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路发挥上述作用, 为卵巢癌的靶向治疗提供了新的策略。本研究的不足之处在于仅限于细胞层面进行, 未在动物体内进一步验证 TRIM21 的作用及其调控机制。

## [参 考 文 献]

- PARADKAR P H, JOSHI J V, MERTIA P N, et al. Role of cytokines in Genesis, progression and prognosis of cervical cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(9): 3851-3864. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.9.3851.
- 张国楠, 黄建鸣. 对卵巢癌治疗中 PARP 抑制剂适应证从 BRCA 突变到 HRD、铂敏感变迁的思考[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(5): 551-553. DOI:10.19538/j.fk2019050114.
- PECTASIDES D, KAMPOSITORAS K, PAPAXOINIS G, et al. Chemotherapy for recurrent cervical cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(7): 603-613. DOI:10.1016/j.ctrv.2008.05.006.
- DEL CAMPO J M, PRAT A, GIL-MORENO A, et al. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3 Suppl 2): S72-S76. DOI:10.1016/j.ygyno.2008.04.016.
- 孙静静, 王淼, 伍会健. TRIM 在肿瘤发生发展中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, (1): 114-121. DOI:10.11844/cjcb.2017.01.0207.
- 薛翠凤. TRIM21 和 TRIM24 的表达在卵巢癌预后中的价值[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017(52):25-27. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-3141.2017.52.007.
- CHANG H R, NAM S, KOOK M C, et al. HNF4 $\alpha$  is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer[J/OL]. *Gut*, 2016, 65(1): 19-32[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4717359/>. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307918.
- MURILLO-GARZÓN V, GORROÑO-ETXEBARRIA I, ÅKER-FELT M, et al. Frizzled-8 integrates Wnt-11 and transforming growth factor- $\beta$  signaling in prostate cancer[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1747[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5931552/>. DOI:10.1038/s41467-018-04042-w.
- YANG Z, SUN Q, GUO J F, et al. GRSF1-mediated MIR-G-1 promotes malignant behavior and nuclear autophagy by directly upregulating TMED5 and LMNB1 in cervical cancer cells[J/OL]. *Autophagy*, 2019, 15(4): 668-685[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526811/>. DOI:10.1080/15548627.2018.1539590.
- 何概易南, 简晓顺, 尹一子. 复发性卵巢癌新药 PARP 抑制剂 niraparib[J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(15): 1714-1717.
- TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- PAN S L, DENG Y Y, FU J, et al. TRIM52 promotes colorectal cancer cell proliferation through the STAT3 signaling[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 57[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6419475/>. DOI:10.1186/s12935-019-0775-4.
- HERQUEL B, OUARARHNI K, KHETCHOUMIAN K, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(20): 8212-8217 [2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3100982/>. DOI:10.1073/pnas.1101544108.
- 聂金霞, 刘娅, 徐明明. 长链非编码 RNA PVT1 调控 miR-551 通过 Wnt 信号通路对卵巢癌迁移和侵袭的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 232-238.
- 郭玉霞, 马利国, 陈递林, 等. Wnt 信号通路中  $\beta$ -catenin、GSK $\beta$  及 Lef-1 在卵巢癌中的表达及其意义[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(8): 773-776. DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2015.08.016.
- 丁界先, 张津, 陈永刚, 等. Wnt 信号通路与肿瘤发生的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33(1): 73-77. DOI: 10.11904/j.issn.1002-3070.2019.01.013.
- 王丽娟, 史惠蓉. 白藜芦醇通过调控 SIRT1 抑制卵巢癌细胞生长及 Wnt 信号通路的研究[J]. *中草药*, 2019, 50(3): 675-680. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.021.
- WANG Q D, ZHOU Y N, RYCHAHOU P, et al. Deptor is a novel target of wnt/ $\beta$ -catenin/c-myc and contributes to colorectal cancer cell growth[J/OL]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3163-3175[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004255/>.
- SU D X, MA S, SHAN L, et al. Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis [J/OL]. *J Clin Invest*, 2018, 128(10): 4280-4296[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159995/>. DOI: 10.1172/JCI120518.
- ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer [J/OL]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5357762/>. DOI: 10.1038/onc.2016.304.
- SCHNEIDER J A, LOGAN S K. Revisiting the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in prostate cancer[J/OL]. *Mol Cell Endocrinol*,

- 2018, 462(Pt A): 3-8[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5550366/>. DOI:10.1016/j.mce.2017.02.008.
- [22] DUCHARTRE Y, KIM Y M, KAHN M. The Wnt signaling pathway in cancer[J/OL]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 141-149 [2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853106/>. DOI:10.1016/j.critrevonc.2015.12.005.
- [23] YANG F, XU J, LI H, et al. FBXW2 suppresses migration and invasion of lung cancer cells via promoting  $\beta$ -catenin ubiquitylation and degradation[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1382[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6437151/>. DOI: 10.1038/s41467-019-09289-5.
- [24] WU H, LU X X, WANG J R, et al. TRAF6 inhibits colorectal cancer metastasis through regulating selective autophagic CTNBN1/ $\beta$ -catenin degradation and is targeted for GSK3B/GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation[J/OL]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1506-1522[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6693460/>. DOI:10.1080/15548627.2019.1586250.
- [25] VUONG L T, IOMINI C, BALMER S, et al. Kinesin-2 and IFT-A act as a complex promoting nuclear localization of  $\beta$ -catenin during Wnt signalling[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5304[2020-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6294004/>. DOI: 10.1038/s41467-018-07605-z.
- [26] PENG K S, KOU L L, YU L, et al. Histone demethylase JMJD2D interacts with  $\beta$ -catenin to induce transcription and activate colorectal cancer cell proliferation and tumor growth in mice[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(4): 1112-1126. DOI:10.1053/j.gastro.2018.11.036.

[收稿日期] 2020-01-12

[修回日期] 2020-05-10

[本文编辑] 党瑞山