

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.17.007

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210506.1556.005.html\(2021-05-07\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210506.1556.005.html(2021-05-07))

DJ-1 和 TET1 在宫颈癌的表达及临床意义*

朱小雨¹, 谭玉洁^{2△}

(1. 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院临床检验中心, 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 探讨帕金森病相关蛋白 7(PARK7/DJ-1)和甲基胞嘧啶双加氧酶(TET1)在宫颈癌组织的表达情况,及其与宫颈癌发生、发展的关系。**方法** 选取 2018 年 1—9 月诊治的 40 例宫颈疾病患者为研究对象,按照检查结果分为宫颈癌 I 组、宫颈上皮内瘤变 III 级组(CIN III 级组)和子宫肌瘤组,采用免疫组织化学法检测宫颈组织 DJ-1 表达情况。另选取 2020 年 6—8 月手术切除的 10 例宫颈癌患者作为宫颈癌 II 组,并以其癌旁组织作为癌旁对照组,采用 Western blot 法检测 DJ-1 和 TET1 的表达情况。培养人正常宫颈上皮细胞 HcerEpic 和宫颈癌细胞 SiHa、HeLa, Western blot 法检测 DJ-1 和 TET1 表达水平。**结果** DJ-1 主要在细胞质表达,部分细胞核也有表达,呈棕色。DJ-1 在子宫肌瘤组(20%)、CIN III 级组(60%)和宫颈癌 I 组(80%)阳性表达率逐渐上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与癌旁对照组比较,宫颈癌 II 组 DJ-1 表达水平更高, TET1 表达水平更低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与人正常宫颈上皮细胞 HcerEpic 比较,宫颈癌细胞 SiHa 和 HeLa 的 DJ-1 表达水平更高, TET1 表达水平更低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** DJ-1 和 TET1 在宫颈癌异常表达,其可能与宫颈癌发生、发展密切相关。

[关键词] 宫颈肿瘤; 帕金森病相关蛋白 7; 甲基胞嘧啶双加氧酶; 免疫组织化学; Western blot

[中图法分类号] R737.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)17-2912-05

Expression and clinical significance of DJ-1 and TET1 in cervical cancer*

ZHU Xiaoyu¹, TAN Yujie^{2△}

(1. School of Medical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of parkinson protein 7 (PARK7/DJ-1) and ten eleven translocation 1 (TET1) in cervical cancer tissues and their relationship with the occurrence and development of cervical cancer. **Methods** Forty patients with cervical disease diagnosed and treated from January to September 2018 were selected and divided into the cervical cancer group I, the cervical intraepithelial neoplasia level III group (the CIN III group) and the uterine fibroids group according to the examination results, immunohistochemistry was used to detect the expression of DJ-1 in cervical tissue. In addition, 10 patients with cervical cancer who were surgically removed from June to August 2020 were selected as the cervical cancer group II, and their adjacent tissues were used as the adjacent control group, Western blot was used to detect the expression of DJ-1 and TET1. Human normal cervical epithelial cell HcerEpic and cervical cancer cell SiHa and HeLa were cultured, and the expression levels of DJ-1 and TET1 were also detected by Western blot. **Results** DJ-1 mainly expressed in the cytoplasm, and part of the nucleus also expressed, which was brown. The positive expression rate of DJ-1 in uterine fibroids group (20%), the CIN III group (60%) and the cervical cancer group I (80%) gradually increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the adjacent control group, the expression level of DJ-1 in the cervical cancer group II was higher, while the expression level of TET1 was lower, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with human normal cervical epithelial cell HcerEpic, cervical cancer cell SiHa and HeLa had higher DJ-1

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81960473); 贵州省贵阳市科技计划项目(筑科合同[2017]30-36号)。 作者简介: 朱小雨(1996—), 在读硕士研究生, 主要从事 HPV 感染宫颈癌的相关机制研究。 △ 通信作者, E-mail: tanyujie@gmc.edu.cn。

expression levels, and lower TET1 expression levels, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion DJ-1 and TET1 abnormally expressed in cervical cancer, which may be closely related to the occurrence and development of cervical cancer.

[Key words] cervical neoplasmas; parkinson protein 7; ten eleven translocation 1; immunohistochemical; Western blot

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,严重威胁女性生命健康。随着筛查技术的不断提升,其发病率和病死率已经明显下降,但在发展中国家仍然是女性死亡的重要原因^[1]。因此,探究宫颈癌发生、发展的影响因素,发现有效的早期诊断标志物和治疗靶点尤为重要。帕金森病相关蛋白 7 (parkinson protein 7, PARK7/DJ-1) 是一种高度保守的蛋白,以同源二聚体的形式广泛表达于机体各组织细胞,参与转录调控、细胞增殖等生理病理活动^[2-4]。它以二聚体的形式参与多种病理生理过程的调控,在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的作用。研究发现 DJ-1 与肝癌细胞增殖相关^[5],此外, DJ-1 在胆管癌中表达上调且与其预后相关^[6]。甲基胞嘧啶双加氧酶 (ten eleven translocation 1, TET1) 是 TET 蛋白家族的主要成员之一,是新近发现的一种基因甲基化调节酶,其主要功能是通过将 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5-mC) 转化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC), 从而发挥 DNA 去甲基化的作用^[7]。DNA 甲基化作为表观遗传学的重要部分,与肿瘤的发生密切相关。有研究报道,在肝癌^[8]、乳腺癌^[9]、卵巢癌^[10] 组织中 TET1 表达明显下调。此外, TET1 还参与结直肠癌的发生、发展^[11]。目前, DJ-1 和 TET1 在宫颈癌中的作用还尚未明确。因此,本研究探讨宫颈癌患者 DJ-1 和 TET1 的表达水平与宫颈癌发生、发展的关系,为进一步寻找宫颈癌早期诊断的生物标志物和治疗相关靶点提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1—9 月贵州医科大学附属医院妇科诊治的 40 例宫颈疾病患者为研究对象。纳入标准:(1) 子宫肌瘤经妇科和 B 超确诊^[12], 宫颈癌及宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 参照《中国子宫颈癌筛查及异常管理相关问题专家共识》^[13] 标准并结合病史、细胞学检查、病理活检结果确诊;(2) 患者入院前未接受化疗、放疗及激素治疗,同时也未服用过其他类型的药物。排除标准:(1) 合并传染性疾病;(2) 合并自身免疫性疾病;(3) 继发性盆腔癌,或合并乳腺、肝、肾、肺等其他脏器恶性肿瘤;(4) 入院前半年接受免疫抑制剂治疗。40 例患者按照检查结果分为宫颈癌 I 组、CIN III 级组和子宫肌瘤组。其中宫颈癌 I 组 15 例,年龄 38~70 岁,平均 (50.60±3.49) 岁; CIN III 级组 15 例,年龄 28~59 岁,

平均 (42.80±9.45) 岁; 子宫肌瘤组 10 例,年龄 43~54 岁,平均 (47.10±2.92) 岁。3 组年龄比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。另选取 2020 年 6—8 月行妇科手术切除的 10 例宫颈癌患者作为宫颈癌 II 组, 并以其癌旁组织作为癌旁对照组, 患者年龄 38~62 岁, 平均 (47.00±8.15) 岁。本研究所有研究对象知情同意, 且经医院医学伦理委员会审核批准 (伦理批件号: 2018 伦审第 075 号)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学

宫颈癌 I 组、CIN III 级组、子宫肌瘤组组织用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 烤片, 脱蜡, 水化, 柠檬酸钠抗原修复液修复 3 min, 3% 过氧化氢 30 min; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 5 min, 山羊血清封闭 30 min, 滴加 DJ-1 抗体 (1:1 000), 湿盒 4 °C 过夜, 次日取出, 平衡至室温 30 min, 弃去一抗, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 滴加酶标山羊抗兔 IgG 聚合物, 室温放置 2 h; 弃掉二抗, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; DAB 显色, 显色时间为 3~5 min, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 返蓝, 脱水透明, 封片。用已知宫颈癌的阳性切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。根据组织切片着色的阳性细胞数和着色面积进行评分, 挑选 5 个高倍镜视野 (×400) 观察, 采用二级计分法进行结果判断, 染色强度评分标准为: 未着色, 阴性, 0 分; 着色呈浅黄色, 弱阳性, 1 分; 着色呈黄色或深黄色, 中度阳性, 2 分; 着色较强呈黄褐色, 强阳性, 3 分。染色面积评分标准为: 无阳性细胞, 0 分; 阳性细胞计数小于 25%, 1 分; 阳性细胞计数占 25%~50%, 2 分; 阳性细胞计数大于 50%, 3 分。免疫组织化学着色评分 = 染色强度评分 × 染色面积评分, 0 分记为“-”, 表示阴性; 1~2 分记为“+”, 表示弱阳性; 3~4 分记为“++”, 表示中阳性; ≥5 分记为“+++”, 表示强阳性。为方便统计, 本研究将“-”“+”定为阴性, “++”“+++”定为阳性^[14]。

1.2.2 细胞培养

人正常子宫颈上皮细胞 HcerEpic (北京北纳创联生物技术研究院)、宫颈癌细胞 SiHa 和 HeLa (南京科佰生物科技有限公司) 均用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C, CO₂ 体积分数为 5%, 湿度为 97% 的培养箱中培养, 每 2~3 天更换 1 次新鲜培养基, 待细胞融合度达 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代培养。

1.2.3 Western blot

称取宫颈癌 II 组和癌旁对照组组织各 50~80 mg, 剪碎, 在液氮中充分研磨, 或将对数生长期的 HcerEpic、SiHa 和 HeLa 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 收集细胞, 加入约 100 μ L RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min, 4°C 下 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 测定蛋白浓度。配制 5% 浓缩胶和 12% 或 8% 的分离胶, 每泳道加总蛋白量 25 μ g 进行电泳分离; 恒压 80 V, 30 min, 后转 120 V 至当样品中的溴酚蓝移动至胶底边上时, 即可结束电泳。将蛋白转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 在含 5% 脱脂奶粉溶液中常温封闭 2 h, 分别加入兔抗人 DJ-1 单克隆抗体 (1:10 000)、兔抗人 TET1 多克隆抗体 (1:1 500), 4°C 孵育过夜。TBST 洗膜, 每次 10 min, 共 3 次, 后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 每次 10 min, 共 3 次。电化学发光 (ECL) 进行显影, GAP-

DH 作为内参, 采用 Image J 图像分析软件, 分别用 DJ-1 和 TET1 与 GAPDH 灰度比值表示 DJ-1 和 TET1 蛋白相对表达水平。

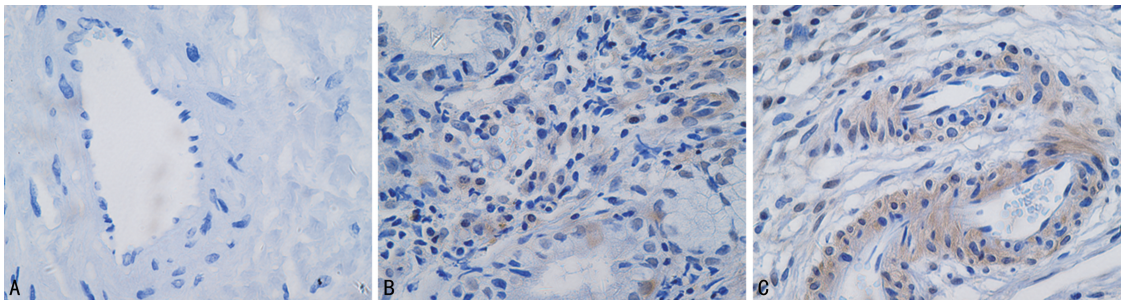
1.3 统计学处理

采用 SPSS24.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以频数或百分率表示, 两组间比较采用 χ^2 检验, 多组间比较采用 Kruskal Wallis 秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同宫颈组织 DJ-1 表达情况比较

DJ-1 主要在细胞质表达, 部分细胞核也有表达, 呈棕色。DJ-1 在子宫肌瘤组 [2/10 (20%)]、CIN III 级组 [9/15 (60%)] 和宫颈癌 I 组 [12/15 (80%)] 阳性表达率逐渐升高, 3 组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.091, P = 0.004$), 见图 1。



A: 子宫肌瘤组; B: CIN III 级组; C: 宫颈癌 I 组。

图 1 不同宫颈组织 DJ-1 表达情况 (免疫组织化学法, $\times 400$)

2.2 宫颈癌及癌旁正常组织 DJ-1 和 TET1 表达情况

Western blot 结果显示, 与癌旁对照组比较, 宫颈癌 II 组 DJ-1 表达水平升高, TET1 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、3。

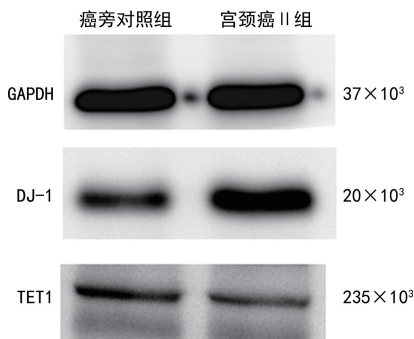
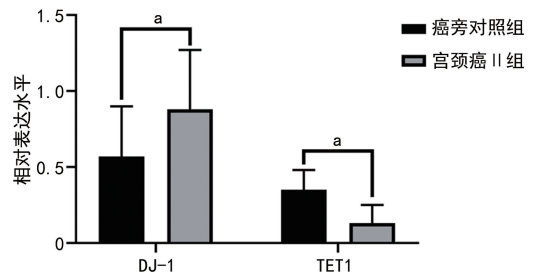


图 2 宫颈癌及癌旁正常组织 DJ-1 和 TET1 表达情况

2.3 不同宫颈细胞 DJ-1 和 TET1 表达情况

Western blot 结果显示, 与人正常宫颈上皮细胞 HcerEpic 比较, 宫颈癌细胞 SiHa 和 HeLa 的 DJ-1 表达水平升高, TET1 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4、5。



^a: $P < 0.05$, 与癌旁对照组比较。

图 3 宫颈癌及癌旁正常组织 DJ-1 和 TET1 表达水平比较

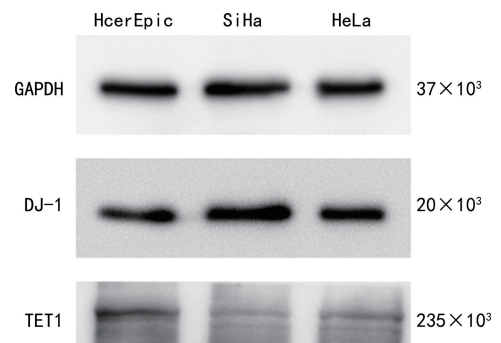
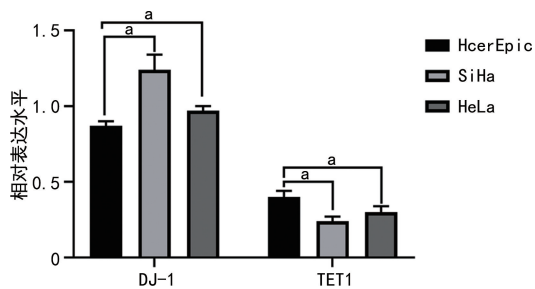


图 4 不同宫颈细胞 DJ-1 和 TET1 表达情况



^a: $P < 0.05$, 与 HcerEpic 比较。

图 5 不同宫颈细胞 DJ-1 和 TET1 表达水平比较

3 讨 论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其治疗手段有限,手术、放化疗等对早期的宫颈癌来说还尚有效,但对于晚期宫颈癌来说,疗效及预后较差。对此,寻找更为有效的、针对性的早期诊断与治疗靶点就显得尤为重要。

DJ-1 主要存在于细胞质,也可存在于细胞核,与线粒体功能密切相关^[15]。目前发现体内野生型 DJ-1 以二聚体形式参与人体中多种病理生理过程的调控,其中包括细胞转化、抗凋亡、抗氧化应激、分子伴侣活性及负性调节等,这些调控功能均可能在促进肿瘤的发生、发展中具有重要意义^[16]。在原发性非小细胞肺癌组织中,DJ-1 的表达高于正常细胞,并发现 DJ-1 高表达与患者预后和复发风险相关^[17]。多项研究表明 DJ-1 与结直肠癌的发生、发展密切相关,可通过多种途径调节肿瘤生长、侵袭、促进细胞存活及增殖等^[18-20]。

本研究采用免疫组织化学法检测宫颈癌 I 组、CIN III 级组和子宫肌瘤组 DJ-1 的表达情况,结果表明,DJ-1 阳性表达率随着宫颈病变严重程度的增加而逐渐升高,提示 DJ-1 与宫颈癌的发生、发展相关。为了进一步了解 DJ-1 在宫颈癌组织中的表达水平,本研究采用 Western blot 检测 DJ-1 在宫颈癌细胞 SiHa、HeLa 及宫颈癌 II 组的表达水平,结果显示 DJ-1 在宫颈癌组织中的表达水平升高,这与 WANG 等^[21] 研究结果一致。

表观遗传学是指在不改变核苷酸序列的前提下染色体所发生的、可以遗传给后代的变化。而 DNA 甲基化是迄今为止哺乳动物研究最多的表观遗传修饰之一,它的异常表现与多种疾病的发生、发展密切相关。TET1 是 TET 蛋白家族的主要成员之一,是新发现的一种基因甲基化调节酶。文献报道在许多实体瘤的研究中,发现与癌旁组织比较,肿瘤组织中 TET1 的表达水平明显减少,且还伴随着 5-hmC 的表达降低及异常 DNA 甲基化积累,表明在肿瘤的发生、发展中,TET1 具有重要作用。研究报道在卵巢癌组织中,TET1 的表达与临床分期呈负相关关系^[22]。此

外,文献报道 TET1 可因自身被甲基化而表达沉默,促进肿瘤的发展,表明 TET1 自身也具有抑癌基因的作用^[23]。还有研究发现,TET1 可抑制乳腺癌细胞的增殖和转移能力^[24],但在宫颈癌研究中少有报道。本研究用 Western blot 检测宫颈癌细胞 SiHa、HeLa 及宫颈癌 II 组 TET1 的表达情况,发现 TET1 在宫颈癌中的相对表达水平降低,提示 TET1 可能与宫颈癌的发生有关。

综上所述,DJ-1 和 TET1 在宫颈癌的异常表达可能与其发生、发展相关,但由于本研究样本量较小,未对肿瘤患者临床病理特征做相关性分析,需加大样本量进一步证实。此外,DJ-1 和 TET1 之间是否存在相互作用的途径,下调 DJ-1 或上调 TET1 表达在宫颈癌发生、发展过程中的影响还有待进一步研究,而这一机制的阐明可为宫颈癌的早期诊断、干预和靶向治疗提供试验依据。

参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADÉ, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] BIOSA A, SANDRELLI F, BELTRAMINI M, et al. Recent findings on the physiological function of DJ-1: beyond Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis, 2017, 108: 65-72.
- [3] ZHOU J, ZHANG L, WANG M, et al. CPX targeting DJ-1 triggers ROS-induced cell death and protective autophagy in colorectal cancer [J]. Theranostics, 2019, 9(19): 5577-5594.
- [4] ZHOU J, LIU H, ZHANG L, et al. DJ-1 promotes colorectal cancer progression through activating PLAGL2/Wnt/BMP4 axis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 865.
- [5] QIU B J, WANG J Q, YU Y X, et al. DJ-1 promotes development of DEN-induced hepatocellular carcinoma and proliferation of liver cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 8499-8511.
- [6] TABATA Y, NAKANISHI Y, HATANAKA K C, et al. DJ-1 is a useful biomarker for invasive extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Human Pathology, 2018, 76: 28-36.
- [7] ITO S, ALESSIO A C, TARANOVA O V, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification [J]. Nature, 2010, 466(7310): 1129-

- 1133.
- [8] CHEN Q, YIN D, ZHANG Y, et al. MicroRNA-29a induces loss of 5-hydroxymethylcytosine and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through a TET-SOCS1-MMP9 signaling axis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6):e2906.
- [9] DUAN H, YAN Z, CHEN W, et al. TET1 inhibits EMT of ovarian cancer cells through activating Wnt/ β -catenin signaling inhibitors DKK1 and SFRP2[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 147(2):408-417.
- [10] LI B T, YU C, XU Y, et al. TET1 inhibits cell proliferation by inducing RASSF5 expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49):86395-86409.
- [11] CHENG Y W, CHOU C J, YANG P M. Ten-eleven translocation 1 (TET1) gene is a potential target of miR-21-5p in human colorectal cancer[J]. *Surg Oncol*, 2018, 27(1):76-81.
- [12] 张璐芳, 蔡晶, 黄邦杏, 等. 术前如何鉴别诊断子宫肉瘤与子宫肌瘤[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(8):861-864.
- [13] 魏丽惠, 赵的, 沈丹华, 等. 中国于宫颈癌筛查及异常管理相关问题专家共识(一)[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2017, 18(2):101-103.
- [14] 顾晨文, 刘现立. LSD1 在人直肠腺癌组织中高表达[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(1):7-10.
- [15] MAITA C, MAITA H, IGUCHI-ARIGA S M, et al. Monomer DJ-1 and its N-terminal sequence are necessary for mitochondrial localization of DJ-1 mutants[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54087.
- [16] SHEN Z, REN Y, YE D, et al. Significance and relationship between DJ-1 gene and surviving gene expression in laryngeal carcinoma[J]. *Eur J Histochem*, 2011, 55(1):e9.
- [17] 祝小林, 文卫平, 雷文斌, 等. DJ-1 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及其与复发和转移的关系[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 58(6):497-501.
- [18] LIN Y, CHEN Q, LIU Q X, et al. High expression of DJ-1 promotes growth and invasion via the PTEN-AKT pathway and predicts a poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(3):809-819.
- [19] ZHENG H, ZHOU C, LU X, et al. DJ-1 promotes survival of human colon cancer cells under hypoxia by modulating HIF-1A expression through the PI3K-AKT pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10:4615-4629.
- [20] 朱小坚. DJ-1 通过 Cyclin-D1/MDM2-p53 信号途径促进结肠扩散的机制研究[D]. 南昌:南昌大学, 2020.
- [21] WANG H, GAO W W. DJ-1 Expression in cervical carcinoma and its effects on cell viability and apoptosis[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22:2943-2949.
- [22] DUAN H, YAN Z, CHEN W, et al. TET1 inhibits EMT of ovarian cancer cells through activating Wnt/ β -catenin signaling inhibitors DKK1 and SFRP2[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 147(2):408-417.
- [23] JEREMY S, WILLIAMSON D A. HARRIS J B, et al. Review of the development of DNA methylation as a marker of response to neoadjuvant therapy and outcomes in rectal cancer[J]. *Clinical Epigenetics*, 2015, 7(1):70-79.
- [24] HUA W, AN X, HAO Y, et al. MiR-29b/TET1/ZEB2 signaling axis regulates metastatic properties and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):102119-102133.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-05-08)