

Pin1对宫颈癌细胞干性及诱导上皮-间质转化的作用及其分子机制

海燕¹, 尚香玉², 马俊旗³, 阿仙姑·哈斯木^{2*}

¹新疆医科大学第一附属医院病理科, 新疆乌鲁木齐 830011; ²新疆医科大学基础医学院, 新疆乌鲁木齐 830011; ³新疆医科大学第一附属医院妇科, 新疆乌鲁木齐 830011

[中图分类号] R737.33 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0149.2024.1219

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 海燕, 尚香玉, 马俊旗, 等. Pin1对宫颈癌细胞干性及诱导上皮-间质转化的作用及其分子机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(5): 558-565.

[收稿日期] 2024-02-01 [录用日期] 2024-04-03 [上线日期] 2024-12-19

[摘要] **目的** 探讨宫颈癌细胞中肽基脯氨酰顺反异构酶1(Pin1)介导肿瘤细胞干性的作用及诱导上皮-间质转化(EMT)的分子机制。**方法** 选取宫颈癌细胞系 Siha(鳞状细胞癌)、Hela(腺癌)细胞, 采用慢病毒转染技术构建 Pin1 低表达稳转细胞株, 根据不同处理分为3组: 敲低组1(shPin1-1)、敲低组2(shPin1-2)及对照组(shPin1-NON)。采用qRT-PCR及Western blotting检测敲低Pin1后宫颈癌细胞中性别决定区Y转录因子2(SOX2)、醛脱氢酶1A1(ALDH1A1)、细胞黏附分子44(CD44)mRNA及蛋白的表达情况。以无血清成球法诱导宫颈癌成球细胞, 以贴壁培养宫颈癌细胞为对照, 并采用qRT-PCR及Western blotting检测SOX2、ALDH1A1、CD44 mRNA及蛋白的表达情况进行验证。采用球体形成实验检测Pin1敲低后各组宫颈癌细胞的球体形成情况, Transwell检测各组细胞的迁移、侵袭能力, qRT-PCR及Western blotting检测各组细胞中上皮属性蛋白E-钙黏蛋白(E-cadherin)、间质属性蛋白N-钙黏蛋白(N-cadherin)以及激活蛋白1(AP-1)转录复合物关键蛋白(c-Jun、c-Fos)mRNA及蛋白的表达情况。采用免疫荧光结合免疫共沉淀实验检测Pin1与c-Jun的相互作用及其共定位情况。**结果** Siha和Hela细胞中, 下调Pin1后shPin1-1组及shPin1-2组Pin1、SOX2、ALDH1A1、CD44 mRNA及蛋白表达水平明显低于shPin1-NON组($P<0.05$); 无血清宫颈癌球体细胞中SOX2、ALDH1A1及CD44 mRNA及蛋白表达水平明显高于宫颈癌贴壁细胞($P<0.05$)。与shPin1-NON组比较, shPin1-1组、shPin1-2组细胞成球性及迁移、侵袭能力明显降低($P<0.05$), E-cadherin mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 而N-cadherin mRNA及蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); shPin1-1组及shPin1-2组c-Jun、c-Fos mRNA及蛋白表达水平明显低于shPin1-NON组($P<0.05$)。**结论** 下调Pin1可抑制宫颈癌细胞的干性和迁移、侵袭能力, Pin1可能通过介导AP-1调控宫颈癌细胞干性诱导EMT的发生。

[关键词] 宫颈癌; 肿瘤干细胞; NIMA互作肽基脯氨酰顺反异构酶; 上皮-间质转化

The effect of Pin1 on stemness-induced epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer cells and its mechanism

Hai Yan¹, Shang Xiang-Yu², Ma Jun-Qi³, Hasim Ashamgul^{4*}

¹Department of Pathology, ²Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

²School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

*Corresponding author, E-mail: axiangu75@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81960463)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of peptidyl prolyl cis-trans isomerase 1 (Pin1) in mediating stemness of tumor cells and the molecular mechanism of inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cervical cancer cells. **Methods** The

[基金项目] 国家自然科学基金(81960463)

[作者简介] 海燕, 硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

[通信作者] 阿仙姑·哈斯木, E-mail: axiangu75@126.com

Siha and Hele cells of Pin1 low-expression stable transfection uterine cervical neoplasm cell lines were constructed using lentivirus transfection technology and were divided into control group (shPin1-NON), knockdown group 1 (shPin1-1) and knockdown group 2 (shPin1-2). Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the expressions of Sex-determining region Y transcription factor 2 (SOX2), Aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), and Cell adhesion molecule 44 (CD44). The serum-free spheroidization method was used to induce cervical cancer spheroids, with the adherent culture of cervical cancer cells as a control. Subsequently, Western blotting and qRT-PCR were employed to detect the expression of SOX2, ALDH1A1 and CD44 in both spheroid cells and adherent cells. Spheroid formation assay was used to detect the spheroid formation of cervical cancer cells after Pin1 knockdown. Transwell assay was used to detect the migration and invasion abilities of cervical cancer cells following down-regulation of Pin1. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of E-cadherin and N-cadherin attribute proteins in cervical cancer cells after transfection with pin1 low expression lentivirus. Western blotting and qRT-PCR were also used to assess the effects of Pin1 low expression on the expression levels of key proteins (c-Jun and c-Fos) of the transcriptional complex of Activator protein 1 (AP-1). Immunofluorescence combined with co-immunoprecipitation assays were conducted to detect the interaction and colocalization of Pin1 with c-Jun. **Results** In Siha and Hele cells, the mRNA and protein expression levels of Pin1, SOX2, ALDH1A1 and CD44 in shPin1-NON group were significantly higher than those in shPin1-1 group and shPin1-2 group ($P<0.05$). The expression levels of SOX2, ALDH1A1 and CD44 mRNA and protein in cervical cancer spheroid group were significantly higher than those in adherent cervical cancer cells ($P<0.05$). Compared with shPin1-NON group, the spheroidism and migration invasion abilities of shPin1-1 group and shPin1-2 group were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with shPin1-NON group, the mRNA and protein expressions of E-cadherin in shPin1-1 and shPin1-2 groups were significantly increased ($P<0.05$), while the mRNA and protein expression levels of N-cadherin were significantly decreased ($P<0.05$). The mRNA and protein expression levels of c-Jun and c-Fos in shPin1-NON group were significantly higher than those in shPin1-1 group and shPin1-2 group ($P<0.05$). **Conclusions** Down-regulation of Pin1 can inhibit the stemness and migration invasion of cervical cancer cells, and Pin1 may mediate AP-1 to regulate the occurrence of stemness-induced epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer cells.

[Key words] uterine cervical neoplasms; neoplastic stem cells; NIMA-interacting peptidylprolyl isomerase; epithelial-mesenchymal transition

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤，多数患者因发生转移或复发而死亡^[1-2]。根据癌症干细胞(cancer stem cells, CSC)假说，CSC是唯一可形成新肿瘤及转移的亚群^[3]。宫颈癌中的干细胞是通过高风险人乳头瘤病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)癌基因与细胞之间的相互作用转化而来，这些细胞的改变可导致肿瘤的发生发展^[4]。蛋白质磷酸化是重要的信号调控机制，参与细胞周期调节、凋亡、发育、分化及增殖等过程^[5]。肽基脯氨酰顺反异构酶1(peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1, Pin1)在多种肿瘤组织中高表达，介导磷酸化后蛋白质功能的调节，并可激活一系列致癌信号通路，不仅可调节上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，还可影响干细胞标志物的表达^[6]。本课题组前期研究发现，Pin1在宫颈癌组织及细胞中呈高表达，且与宫颈癌细胞的侵袭、迁移相关^[7-9]。因此，本研究选取宫颈癌细胞系 Siha(鳞状细胞癌)、Hela(腺癌)细胞，通过慢病毒感染使Pin1稳定低表达，并检测与肿瘤干性相关的干细胞标志物的表达及干细胞球的形成能力，以探讨Pin1在宫颈癌干性维持中的作用，以期为宫颈癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 宫颈癌 Siha、Hela 细胞系购自武

汉普诺赛生命科技有限公司，Pin1低表达慢病毒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司，Pin1抗体购自美国Abcam公司，性别决定区Y转录因子2(sex determining region Y-box 2, SOX2)、醛脱氢酶1A1(aldehyde dehydrogenase 1A1, ALDH1A1)、细胞黏附分子44(cluster of differentiation 44, CD44)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、c-Jun(兔)、c-Fos、CoraLite594偶联的山羊抗兔IgG(H+L)[CoraLite594-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)](SA00013-4)及CoraLite488偶联的山羊抗小鼠IgG(H+L)[CoraLite488-conjugated Goat Anti-Mouse IgG(H+L)](SA00013-1)抗体购自美国Proteintech公司，c-Jun(鼠)抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司，B27、BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo公司。SDS-PAGE电泳装置购自美国Bio-Rad公司，磁力架购自美国Bimake公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及分组 Siha、Hela细胞培养于含90% DMEM(高糖)+10% FBS+1%青链霉素混合液的完全培养基中，置于37℃培养箱中培养。待细胞密度生长至80%~90%时，胰酶消化，收集细胞沉淀后PBS重悬并计数，将 1×10^5 个细胞铺于6孔板中，置于培养箱培养。培养12 h后，根据慢病毒说明书分别对Siha、Hela细胞进行转染，12 h后换液，72 h后

置于荧光显微镜下观察转染效率。将细胞分为 Pin1 敲低组 1(shPin1-1 组)、Pin1 敲低组 2(shPin1-2 组)及对照组(shPin1-NON 组),其中 shPin1-1 组、shPin1-2 组细胞分别转染两种敲低 Pin1 表达的慢病毒,而 shPin1-NON 组细胞转染空载慢病毒。

1.2.2 宫颈癌细胞无血清成球培养与传代 收集各组细胞沉淀,用 1 ml 含 2% B27、20 ng/ml 成纤维生长因子、20 ng/ml 表皮生长因子、1% 双抗溶液、DMEM/F12 的无血清干细胞培养基重悬,加入含 2 ml 干细胞培养基的 6 孔板中,置于 37 °C 培养箱中培养,每 3 d 加 1 ml 培养基。培养至第 6 天时,可见明显增大的肿瘤细胞球,当观察到球体中间致密发黑时,对球体细胞进行传代,采用第二代以上球体细胞进行后续实验。

1.2.3 Western blotting 检测 Pin1、干细胞标志物(SOX2、ALDH1A1、CD44)、EMT 相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin)及激活蛋白 1(activator protein 1, AP-1)转录因子相关蛋白(c-Jun、cFos)的表达情况

收集各组细胞沉淀,加入适量细胞裂解液于冰上裂解 30 min 后,离心(15 000 r/min, 4 °C, 15 min)收集上清,根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定各蛋白样品浓度。将蛋白样品进行电泳、转膜、封闭液封闭,加入一抗、二抗后采用化学发光成色仪曝光条带。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 Pin1、干细胞标志物、EMT 相关蛋白及 AP-1 转录因子相关蛋白 mRNA 的表达情况 收集各组细胞沉淀,Trizol 法提取 RNA,取 4 μl RNA 样品,稀释 100 倍后采用微量分光光度计测定 260 nm、280 nm 处的吸光度值。采用反转录试剂盒将 RNA 样品反转录为 cDNA。将 cDNA、2× 核酸凝胶染液预混液、引物、无酶水配制成 10 μl 体系后行 qRT-PCR 检测。引物序列详见表 1。

1.2.5 Transwell 检测宫颈癌细胞的侵袭、迁移能力 将基底膜基质胶用基础培养基按照 1:8 的比例稀释后,取 50 μl 加入 Transwell 上室,置于培养箱 4 h (迁移实验省略此步骤)。取出小室,将细胞悬液加入上室,下室加入 600 μl 完全培养基,置于培养箱 24 h。取出小室,洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛于下室中固定 30 min。0.1% 结晶紫溶液染色 30 min。擦去小室底部细胞,将小室置于载玻片上,显微镜下观察并拍照,采用 ImageJ 软件统计细胞数量。

1.2.6 细胞免疫荧光实验 将细胞接种于激光共聚焦小皿中,待细胞密度至 40% 时取出。4% 多聚甲醛固定 1 h。分别于 4 °C 加入 0.5% Triton-100(15 min)、3% BSA 溶液(30 min)、一抗(Pin1 兔源、c-Jun 鼠源)作

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列(5'-3')
Pin1	正向: CTGCCTTCAGCAGAGGTCAGATC
	反向: CAGTGC GGAGGATGATGTGGATG
SOX2	正向: CTCCATGACCAGCTCGCAGA
	反向: GGACTTGACCACCGAACCCA
ALDH1A1	正向: GACAATGCTGTTGAATTGACAC
	反向: AAGGATATACTTCTTAGCCCGC
CD44	正向: TCTGAATCAGATGGACACTCAC
	反向: CATTGCCACTGTTGATCACTAG
c-Jun	正向: CAAACCTCAGCAACTTCAACC
	反向: CTGGGACTCCATGTGCGATG
c-Fos	正向: CTTCCCAGAAGAGATGTCTGTG
	反向: TGGGAACAGGAAGTCATCAAAG
E-cadherin	正向: GTATACCCTGGTGGTTCAG
	反向: AAAATCCAAGCCCGTGGT
N-cadherin	正向: TGTTCACTAAGCAGAAGGAAT
	反向: GCTCACTGCTCTCATATTGTA
β-actin	正向: TAGTTGCGTTACACCCTTCTTTG
	反向: TCACCTTCACCGTTCAGTTT

Pin1. 肽基脯氨酰顺反异构酶 1; SOX2. 性别决定区 Y 转录因子 2; ALDH1A1. 醛脱氢酶 1A1; CD44. 细胞黏附分子 44; E-cadherin. E-钙黏蛋白; N-cadherin. N-钙黏蛋白; β-actin. β-肌动蛋白

用 24 h, 室温静置 1 h, 再加入二抗(CoraLite594 偶联的山羊抗兔 IgG 及 CoraLite488 偶联的山羊抗小鼠 IgG)孵育 2 h, 加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)10 min。共聚焦显微镜下随机选取 5 个视野拍照记录。

1.2.7 免疫共沉淀实验 取 200 μl 蛋白样品于 EP 管内,加入相应体积的抗体,慢速晃动蛋白-抗体混合物过夜。将磁珠混悬液加入含 150 μl 结合缓冲液的 EP 管内,置于磁力架 2 min 后弃液,反复 3 次,将蛋白-抗体混合物加入其中,慢速晃动 2 h。磁力架分离磁珠,弃上清,加入上样缓冲液。水浴锅加热蛋白样品(95 °C, 10 min)以游离抗原、抗体、磁珠,置于磁力架 2 min,取上清液于新的 EP 管中,后续行 Western blotting 检测,实验步骤同 1.2.3。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料且符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验。所有实验均独立重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

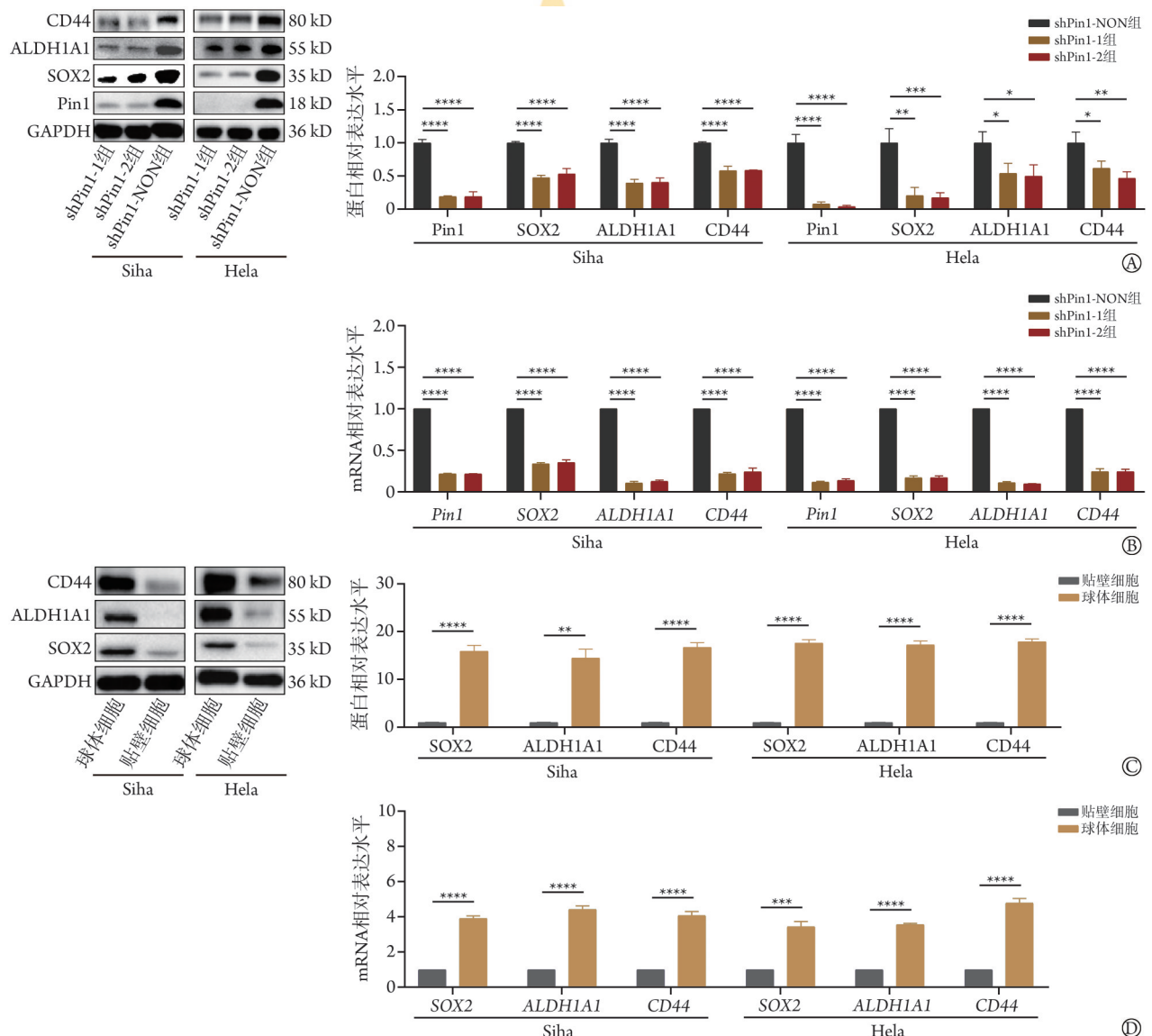
2.1 下调 Pin1 对宫颈癌细胞 Pin1 及干性标志物表达的影响 Western blotting 检测结果显示,下调 Pin1 表

达后 shPin1-1 组、shPin1-2 组 Siha、Hela 细胞中 Pin1 表达水平明显低于 shPin1-NON 组 ($P < 0.0001$), 且宫颈癌细胞干性标志物(SOX2、ALDH1A1、CD44)蛋白表达水平明显低于 shPin1-NON 组 ($P < 0.05$, 图 1A); qRT-PCR 实验结果与 Western blotting 结果相似(图 1B)。与贴壁培养的宫颈癌细胞相比, 无血清成球培养法培养的宫颈癌球体细胞中干性标记物(SOX2、ALDH1A1、CD44)表达水平明显上调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$, 图 1C); qRT-PCR 实验结果与 Western blotting 结果相似(图 1D)。

无血清成球法结果显示, Siha 细胞可在无血清

培养条件下呈球体形态生长(图 2A); 在 Pin1 低表达的 Siha 细胞中, 与 shPin1-NON 组比较, shPin1-1 组、shPin1-2 组细胞成球性明显降低 ($P < 0.05$), Hela 细胞中的结果与之一致(图 2B)。

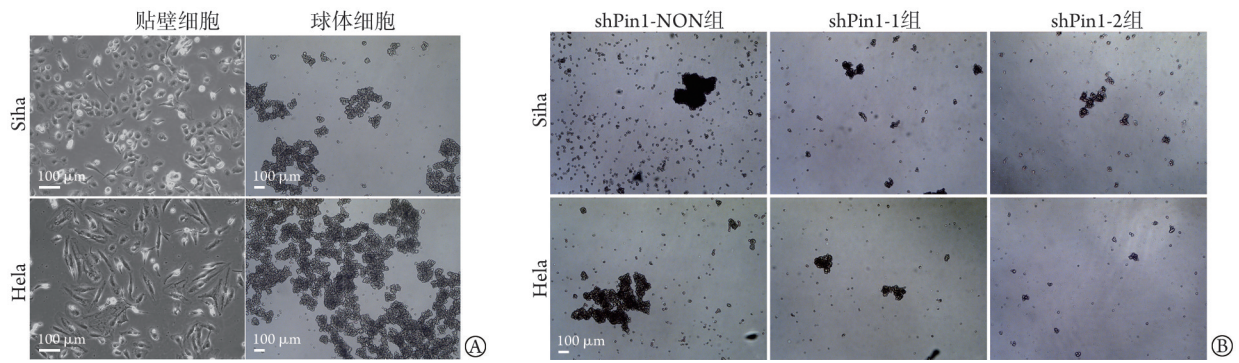
2.2 下调 Pin1 表达对宫颈癌细胞迁移、侵袭能力及 EMT 的影响 Transwell 实验结果显示, 在 Siha 细胞中, 与 shPin1-NON 组比较, shPin1-1 组、shPin1-2 组迁移细胞数及入侵细胞数均明显减少 ($P < 0.05$), 而 shPin1-1 组与 shPin1-2 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3A、B)。Western blotting 检测结果显示, 与 shPin1-NON 组比较, shPin1-1 组及 shPin1-2 组 Siha、



Pin1. 肽基脯氨酰顺反异构酶 1; CD44. 细胞黏附分子 44; ALDH1A1. 醛脱氢酶 1A1; SOX2. 性别决定区 Y 转录因子 2; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; A. Western blotting 检测下调 Pin1 后 Pin1、干细胞标志物蛋白的表达情况; B. qRT-PCR 检测下调 Pin1 后干细胞标志物 mRNA 的表达情况; C. Western blotting 检测贴壁细胞及球体细胞中干细胞标志物蛋白的表达情况; D. qRT-PCR 检测贴壁细胞及球体细胞中干细胞标志物 mRNA 的表达情况; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图 1 Pin1 敲低对宫颈癌细胞干性标志物表达的影响及宫颈癌球体细胞干性验证

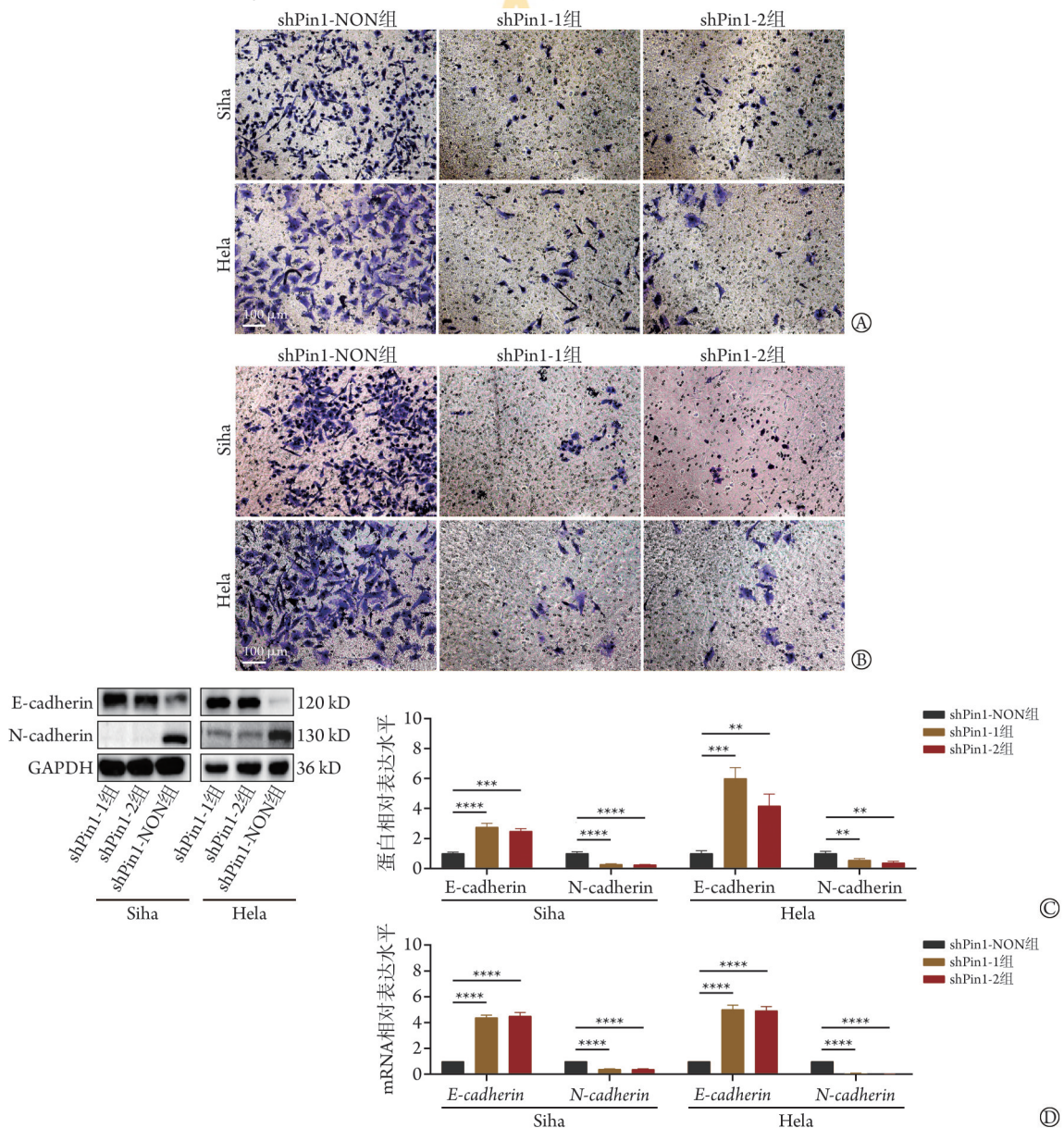
Fig. 1 Effect of Pin1 knockdown on the expression of stemness markers in cervical cancer cells and validation of spheroid stemness in cervical cancer cell



Pin1. 肽基脯氨酰顺反异构酶 1; A. 成球实验观察球体细胞和贴壁细胞生长情况; B. 成球实验观察各组细胞球体形成情况

图2 Pin1 敲低对宫颈癌细胞成球性的影响

Fig.2 Effect of Pin1 knockdown on spheroidism of cervical cancer cells



Pin1. 肽基脯氨酰顺反异构酶 1; E-cadherin. E-钙黏蛋白; N-cadherin. N-钙黏蛋白; A. Transwell 迁移实验检测下调 Pin1 对宫颈癌细胞迁移能力的影响; B. Transwell 侵袭实验检测下调 Pin1 对宫颈癌细胞侵袭能力的影响; C. Western blotting 检测下调 Pin1 对宫颈癌细胞 EMT 相关蛋白表达的影响; D. qRT-PCR 检测下调 Pin1 对宫颈癌细胞 EMT 相关 mRNA 表达的影响; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

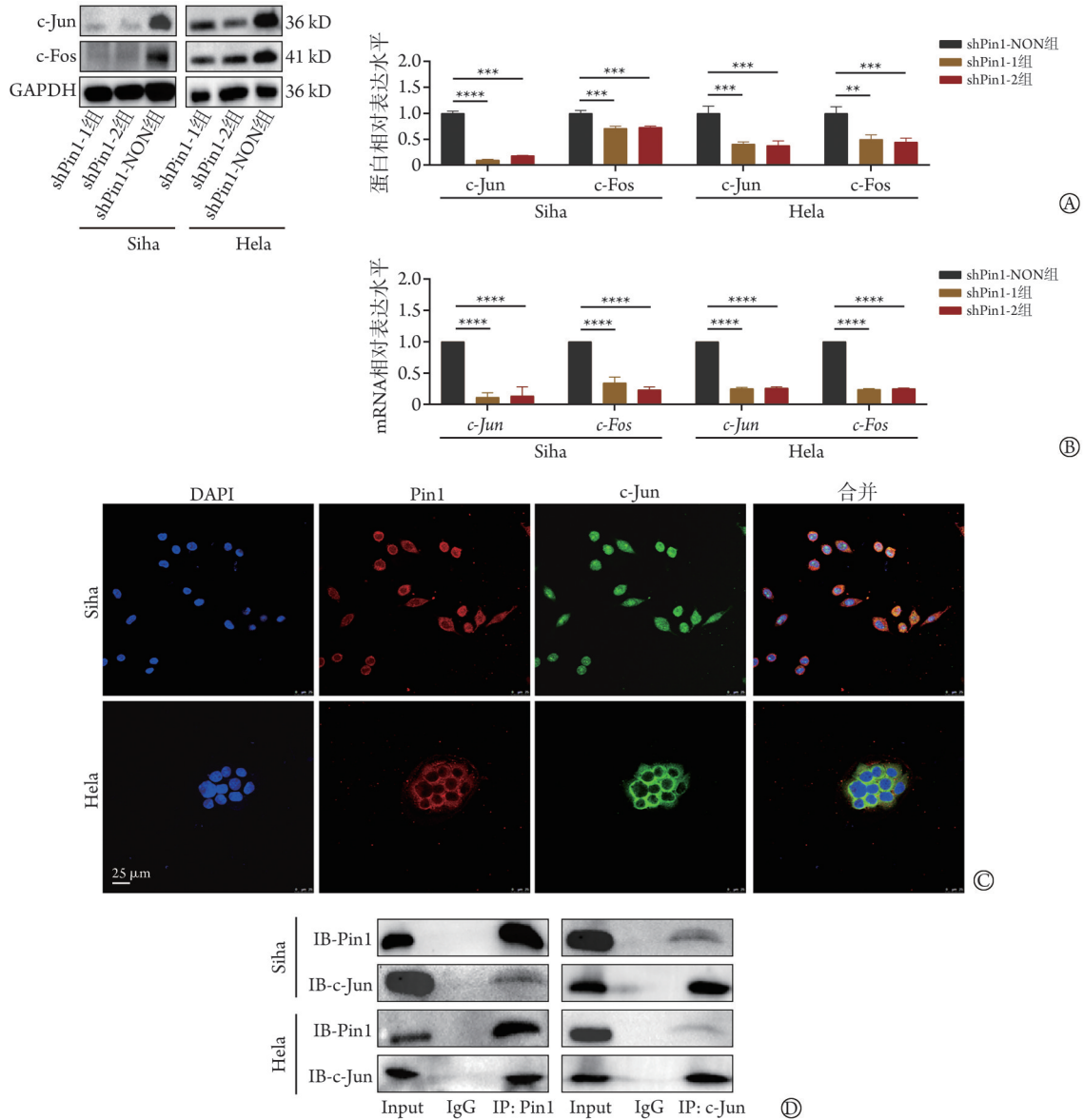
图3 Pin1 敲低对宫颈癌细胞迁移、侵袭能力及上皮-间质转化(EMT)的影响

Fig.3 The effect of down-regulation of Pin1 expression on migration invasion and EMT of cervical cancer cells

Hela 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, 而 N-cadherin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$, 图 3C); qRT-PCR 实验结果与 Western blotting 结果一致(图 3D)。

2.3 下调 Pin1 对宫颈癌细胞 c-Jun、c-Fos 蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 下调 Pin1 表达后 shPin1-1 组、shPin1-2 组 Siha、Hela 细胞中 c-Jun、

c-Fos 蛋白表达水平明显低于 shPin1-NON 组 ($P < 0.05$, 图 4A); qRT-PCR 实验结果与 Western blotting 结果一致(图 4B)。免疫荧光实验结果显示, 在 Siha 及 Hela 宫颈癌细胞系中, Pin1 与 c-Jun 均存在共表达区域(图 4C)。免疫共沉淀实验结果显示, 使用抗 Pin1 抗体沉淀的蛋白质中可检测到 c-Jun 蛋白, 而在使用抗 c-Jun 抗体沉淀的蛋白质中可检测到 Pin1 蛋白(图 4D)。



Pin1. 肽基脯氨酰顺反异构酶 1; DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; IP. 免疫沉淀; IB. 免疫印迹; Input. 阳性对照; A. Western blotting 检测下调 Pin1 后 c-Jun、c-Fos 蛋白的表达情况; B. qRT-PCR 检测下调 Pin1 后 c-Jun、c-Fos mRNA 的表达情况; C. 免疫荧光实验观察 Pin1 与 c-Jun 的共定位情况; D. 免疫共沉淀实验检测 Pin1 与 c-Jun 的蛋白相互作用; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图 4 下调 Pin1 对宫颈癌细胞 c-Jun、c-Fos 蛋白表达的影响

Fig.4 The effects of down-regulation of Pin1 on protein expression of c-Jun and c-Fos in cervical cancer cells

3 讨 论

CSC 与宫颈癌的起始、进展相关, 且可能与转移及复发有关^[10]。然而, 宫颈癌中 CSC 的确切作用

机制尚不清楚。CSC 的超强自我更新和分化能力导致了其高致瘤性^[11]。据报道, CSC 对化疗^[12]、放疗^[13]及免疫疗法^[14]的耐药性可能诱发其对肿瘤群体产生选择性压力。因此, 靶向 CSC 的方法有望攻克

宫颈肿瘤。CSC培养富集的方法较多,其中无血清成球法已广泛应用于CSC的研究中^[15]。Pin1参与调节多种肿瘤细胞中磷酸化丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸基序的构象转化,进而影响肿瘤驱动途径^[16],而抑制Pin1被认为是一种有效的抗癌策略^[17-18]。此外,有研究表明Pin1在乳腺癌、结肠癌及卵巢癌驱动CSC样细胞的过程中发挥了关键作用^[19-21]。既往研究表明,在宫颈癌组织和细胞系中Pin1表达上调^[7-9]。然而关于Pin1对宫颈癌中CSC样细胞的研究鲜有报道。本研究发现,在宫颈癌细胞中,下调Pin1的表达可抑制CSC标志物的表达,同时可降低肿瘤干细胞球的形成能力,抑制肿瘤细胞的侵袭及迁移能力,提示Pin1可能是宫颈癌临床干预的潜在靶点。

AP-1是一种二聚体转录因子复合物,主要由c-Jun及c-Fos组成,在CSC介导的肿瘤发生及侵袭性生长中发挥关键作用^[22-26]。AP-1的组成型激活及过度表达可随宫颈癌的严重程度而变化^[27]。本研究发现,下调Pin1可明显降低宫颈癌细胞中c-Jun及c-Fos的表达。既往研究表明,c-Jun是AP-1转录复合物的主要作用基因^[28]。本研究通过免疫荧光共定位结合免疫共沉淀实验的方法明确了Pin1与c-Jun的相互作用关系,表明Pin1对宫颈癌干性的影响可能是通过激活AP-1转录复合物实现的。

此外有研究表明,在转移之前,肿瘤细胞可能具有涉及上皮基因转录抑制和间充质基因激活的EMT潜能,主要体现在上皮属性蛋白E-cadherin、 β -catenin等表达下调,而间质细胞中相关蛋白波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、N-cadherin等的表达则上调^[29]。在肿瘤组织中癌巢边缘发生EMT的单个癌细胞大多具有干细胞样特性^[30],由此推测肿瘤组织中发生EMT表型的细胞可能是肿瘤干细胞^[31]。本研究发现,敲低Pin1后宫颈癌细胞干性明显降低,且E-cadherin表达水平升高,N-cadherin表达水平降低。

综上所述,本研究选取了两种宫颈癌细胞株,以验证Pin1与宫颈癌细胞致瘤性及恶性进展的关系,结果发现,在宫颈癌中Pin1可能通过激活AP-1影响宫颈癌细胞的干细胞特性来诱导EMT,进而影响宫颈癌的发生进展,该结果有助于宫颈癌的靶向治疗研究。但本研究仅在体外细胞及蛋白水平进行分析,尚未对体内分子机制进行深入挖掘,未来可进行深入探讨,以加深Pin1对宫颈癌干性影响的具体分子作用机制的理解。

【参考文献】

[1] Guo M, Xu J, Du J. Trends in cervical cancer mortality in China from 1989 to 2018: an age-period-cohort study and Joinpoint

analysis[J]. BMC Public Health, 2021, 21(1): 1329.

- [2] 刘绪,张欣冉,李堂华,等. KDM5C通过Hippo-YAP1通路调控人宫颈癌发生的初步机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(9): 1023-1033.
- [3] Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, et al. Cancer stem cells: significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma[J]. Cells, 2021, 10(3): 621.
- [4] Barillari G, Bei R, Manzari V, et al. Infection by high-risk human papillomaviruses, epithelial-to-mesenchymal transition and squamous pre-malignant or malignant lesions of the uterine cervix: a series of chained events?[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13543.
- [5] Li J, Mo C, Guo Y, et al. Roles of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in disease pathogenesis[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3348-3358.
- [6] Zhang ZZ, Yu WX, Zheng M, et al. PIN1 inhibition sensitizes chemotherapy in gastric cancer cells by targeting stem cell-like traits and multiple biomarkers[J]. Mol Cancer Ther, 2020, 19(3): 906-919.
- [7] 焦娟,徐丽秀,肖金宝,等. Pin1蛋白与上皮间质转化相关蛋白在宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(10): 1333-1337.
- [8] 郝立君,徐丽秀,李金秋,等. 肽基脯氨酸同分异构酶(Pin1)对子宫颈癌细胞脂质代谢的作用[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(1): 12-16.
- [9] 海燕,美力班·吐尔逊,阿仙姑·哈斯木. Pin1通过调控脂质代谢关键酶影响子宫颈癌细胞的增殖及凋亡[J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(1): 1-6.
- [10] Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, et al. Cancer stem cells and their possible implications in cervical cancer: a short review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5167.
- [11] Wang W, Liu W, Chen Q, et al. Targeting CSC-related transcription factors by E3 ubiquitin ligases for cancer therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 87: 84-97.
- [12] Nandi SK, Roychowdhury T, Chattopadhyay S, et al. Deregulation of the CD44-NANOG-MDR1 associated chemoresistance pathways of breast cancer stem cells potentiates the anti-cancer effect of Kaempferol in synergism with Verapamil[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2022, 437: 115887.
- [13] Huang J, Li H, Yang Z, et al. SALL4 promotes cancer stem-like cell phenotype and radioresistance in oral squamous cell carcinomas via methyltransferase-like 3-mediated m6A modification[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(2): 139.
- [14] Schoenfeld AJ, Antonia SJ, Awad MM, et al. Clinical definition of acquired resistance to immunotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2021, 32(12): 1597-1607.
- [15] Deshmukh AP, den Hollander P, Kuburich NA, et al. Enrichment of cancer stem cells in a tumorsphere assay[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2429: 501-507.
- [16] Koikawa K, Kibe S, Suizu F, et al. Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunotherapy[J]. Cell, 2021, 184(18): 4753-4771.e27.
- [17] Duan Y, Zhang X, Ying H, et al. Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunotherapy via remodeling the matrix[J]. Oncogene, 2023, 42(25): 2061-2073.
- [18] Malter JS. Pin1 and Alzheimer's disease[J]. Transl Res, 2023, 254: 24-33.

- [19] Gholamzadeh Khoei S, Saidijam M, Amini R, *et al.* Impact of PIN1 inhibition on tumor progression and chemotherapy sensitivity in colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2022, 53(2): 299-310.
- [20] Long J, Wang J, Dong Y, *et al.* Prolyl isomerase Pin1 promotes autophagy and cancer cell viability through activating FoxO3 signalling[J]. *Cell Signal*, 2024, 113: 110940.
- [21] Caligiuri I, Vincenzo C, Asano T, *et al.* The metabolic crosstalk between PIN1 and the tumour microenvironment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 91: 143-157.
- [22] Zhang H, Pei L, Ouyang Z, *et al.* AP-1 activation mediates post-natal cardiomyocyte maturation[J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(2): 536-550.
- [23] Schnoegl D, Hiesinger A, Huntington ND, *et al.* AP-1 transcription factors in cytotoxic lymphocyte development and antitumor immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2023, 85: 102397.
- [24] Hung SY, Lin CY, Yu CC, *et al.* Visfatin promotes the metastatic potential of chondrosarcoma cells by stimulating AP-1-dependent MMP-2 production in the MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8642.
- [25] Chen D, Zhang W, Jia L, *et al.* Generation of a squamous cell carcinoma mouse model for lineage tracing of BMI1+cancer stem cells[J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(2): 100484.
- [26] Marques C, Unterkircher T, Kroon P, *et al.* NF1 regulates mesenchymal glioblastoma plasticity and aggressiveness through the AP-1 transcription factor FOSL1[J]. *Elife*, 2021, 10: e64846.
- [27] Díaz-Tejeda Y, Guido-Jiménez MC, López-Carbajal H, *et al.* Nanog, in cooperation with AP1, increases the expression of E6/E7 oncogenes from HPV types 16/18[J]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1482.
- [28] Ruiz EJ, Lan L, Diefenbacher ME, *et al.* JunD, not c-Jun, is the AP-1 transcription factor required for Ras-induced lung cancer[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(13): e124985.
- [29] Lin Q, Long C, Wang Z, *et al.* Hirudin, a thrombin inhibitor, attenuates TGF- β -induced fibrosis in renal proximal tubular epithelial cells by inhibition of protease-activated receptor 1 expression *via* S1P/S1PR2/S1PR3 signaling[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(1): 3.
- [30] Yan Z, Sheng Z, Zheng Y, *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-18b promotes breast cancer invasion and metastasis by regulating TCEAL7[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1120.
- [31] Zhao Z, Zhu Y. FAP, CD10, and GPR77-labeled CAFs cause neoadjuvant chemotherapy resistance by inducing EMT and CSC in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): S07.

(责任编辑: 张小利)

解放军医学杂志®