DOI:10.16016/j.2097-0927.202203089

RNA 传感器 IFIH1 对 HPV 阳性的宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

喻 琳,罗 莹,吴 迪,洪世垣 400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院

[摘要] **目的** 探讨 RNA 传感器干扰素诱导的解旋酶 C 结构域蛋白 1(interferon-induced helicase C domain protein 1,IFIH1)对人乳头瘤病毒 18 型(human papillomavirus 18,HPV18)阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 利用 GEPIA 数据库分析 IFIH1 在正常宫颈组织和宫颈癌组织中的表达。Western blot 检测 IFIH1 在 C33A 和 HeLa 细胞中的表达。将 HPV18 基因组转染到正常上皮细胞 HaCaT 中,并利用 Western blot 和实时定量 PCR 检测 IFIH1 的表达水平。利用实时无标记动态细胞分析技术和 CCK8 法检测细胞的增殖能力。划痕愈合实验、Transwell 迁移实验和侵袭实验分别检测细胞的迁移能力和侵袭能力。Western blot 和免疫荧光实验检测 STAT3 和磷酸化 STAT3 的蛋白表达和定位。**结果** GEPIA 数据库分析显示 IFIH1 在宫颈癌组织中的表达量明显高于正常宫颈组织($P<0.05$);相比于 C33A 细胞,HeLa 细胞中 IFIH1 的表达水平明显增加($P<0.01$);与正常 HaCaT 细胞相比,转染 HPV18 的 HaCaT 细胞中 IFIH1 的表达增加($P<0.01$);与阴性对照相比,敲低 IFIH1 明显抑制 HeLa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而过表达 IFIH1 则促进 C33A 细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.01$);敲低 IFIH1 后,磷酸化 STAT3 蛋白的表达减少($P<0.01$)。**结论** IFIHI 在被 HPV 感染的宫颈癌细胞中表达增加,这将促进细胞的增殖、迁移和侵袭能力,可能与激活 STAT3 有关。

[关键词] 宫颈癌;IFIH1;增殖;迁移;侵袭
[中图法分类号] R341; R730.23; R737.33 [文献标志码] A

Effect of RNA sensor IFIH1 on proliferation, migration and invasion of HPV positive cervical cancer cells

YU Lin, LUO Ying, WU Di, HONG Shiyuan Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of RNA sensor interferon-induced helicase C domain protein 1 (IFIH1) on the proliferation, migration and invasion of HPV18 positive human cervical cancer HeLa cell line. **Methods** The Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database was used to analyze the expression of IFIH1 in normal cervical tissues and cervical cancer tissues. The expression of IFIH1 in C33A cells and HeLa cells was detected by Western blotting. After the HPV18 genome was transfected into normal epithelial HaCaT cells, the expression of IFIH1 was detected by Western blotting and real-time quantitative PCR. The ability of cell proliferation was detected by real time cell analysis (RTCA) system and CCK8 assay, and the ability of cell migration and invasion were examined by wound scratch healing assay and transwell assay. The expression and localization of STAT3 and phosphorylated STAT3 were analyzed by Western blotting and immunofluorescence assay. **Results** GEPIA database analysis showed that the expression of IFIH1 was significantly higher in cervical cancer tissues than normal cervical tissues ($P<0.05$). Compared with the C33A cells, the expression of IFIH1 in HeLa cells was significantly increased ($P<0.01$). And its expression was increased in the HaCaT cells with HPV18 genome transfection than the normal HaCaT cells ($P<0.01$). IFIH1 knockdown resulted in obviously decreased proliferation, migration and invasion abilities in HeLa cells when compared with the negative control cells, while overexpression of IFIH1 promoted

[通信作者] 洪世垣,E-mail:hongshiyuan@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the proliferation, migration and invasion in the C33A cells ($P<0.01$). Meanwhile, the expression of phosphorylated STAT3 protein was decreased in HeLa cells with IFIH1 knockdown ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of IFIH1 is increased in cervical cancer cells infected by HPV, which promotes cell proliferation, migration and invasion and may be related to the activation of STAT3.

[**Key words**] cervical cancer; interferon-induced helicase C domain protein 1; proliferation; migration; invasion

Corresponding author: HONG Shiyuan, E-mail: hongshiyuan@cqmu.edu.cn

宫颈癌在全世界女性肿瘤发病率和死亡率中都位居第四[1]。GLOBOCAN 数据显示,2018 年全球新增宫颈癌确诊病例 570 000 例,并有 311 000 名女性死于宫颈癌[1]。持续感染高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)是导致宫颈癌发生的最大危险因素[2-3],但 HPV 导致宫颈癌发生的机制尚不完全清楚。目前预防性疫苗可通过阻断高危型 HPV 的初始感染来预防 HPV 相关癌症的发展,但疫苗本身没有治疗效果。因此探索宫颈癌的发病机制对其诊断、治疗和开发新的治疗药物具有重要意义。

越来越多的研究表明,HPV 可通过不同机制逃逸免疫监视,从而导致宫颈癌发生[4-5]。先天免疫反应是抵御病毒感染的第一道防线,其激活依赖于识别病原体相关分子模式(pathogen-related molecular patterns,PAMPs)的细胞模式识别受体(pattern recognition receptors,PRRs)[6]。病毒核酸传感器干扰素诱导的解旋酶 C 结构域蛋白 1(interferon-induced helicase C domain protein 1,IFIH1)是一个重要的细胞模式识别受体,在许多病毒的感染和复制、以及自身免疫性疾病和癌症的发生发展中都发挥着重要作用[7-9]。IFIH1 是 RNA 传感器,它可以识别并结合病毒 RNA,从而抑制 RNA 病毒的感染和复制。最近研究表明,RNA 传感器也可以抑制 DNA 病毒复制,如豆苗病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒等[10-13]。此外,研究表明,IFIH1 在癌症治疗中起着至关重要的作用,如乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌等[14-16]。目前,IFIH1 在 DNA 病毒 HPV 感染导致的宫颈癌中的作用尚不清楚。因此,本研究拟在人宫颈癌细胞 HeLa 中探讨 IFIH1 对 HeLa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制,并在正常上皮细胞 HaCaT 中探讨 HPV 对 IFIH1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HPV 阴性宫颈癌细胞 C33A、HPV 阳性宫颈癌细胞 HeLa 和正常上皮细胞 HaCaT 均购于武汉 Procell 公司;DMEM 高糖和 MEM 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购于以色列 Bioind 公司;TRIzol 试剂购于美国 Invitrigen 公司;PEI 转染试剂购于美国 Ployscience 公司;G418 试剂购于美国 Sigma 公司;无内毒素小提中量质粒提取试剂盒购于北京天根公司;高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒、反转录及实时荧光定量 PCR 相关试剂均购于南京 Vazyme 公司;蛋白质提取试剂高效 RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和 DAPI 均购于北京 Solarbio 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blot 检测相关试剂盒及免疫染色封闭液购于上海碧云天公司;Transwell 小室和基质胶购于美国 Corning 公司;HPR 标记的山羊抗鼠 IgG,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和兔抗人 IFIH1 抗体均购于美国 CST 公司;鼠抗人 GAPDH 抗体和兔抗人 STAT3 抗体购于美国 Proteintech 公司;兔抗人 p-STAT3 抗体购于美国 Abclone 公司;兔抗人 FLAG 抗体购于美国 Sigma 公司;荧光二抗购于美国 Invitrigen 公司;T_4 连接酶、美国 *Bam*HⅠ酶和 *Eco*RⅠ酶均购于美国 Biolabs 公司。shRNA 相关序列及实时荧光定量 PCR 相关引物购于上海生物工程股份有限公司;带 FLAG 标签的 IFIH1 过表达质粒以及阴性对照质粒购于上海吉凯基因化学技术有限公司。HPV18 基因组,psi-LVRU6GP、pMD2.G、pSPAX2、PSV2-neo 质粒由本实验室保存。

1.2 细胞培养

C33A 细胞、HeLa 细胞和 HEK293T 细胞用含 100 mL/L FBS 的高糖 DMEM 培养基培养,HaCaT 细胞用含 100 mL/L FBS 的 MEM 培养基培养,并静置于含 37 ℃和 50 mL/L CO_2 的培养箱中。使用含 0.25% 的 EDTA 胰蛋白酶对细胞消化传代。细胞处于对数生长期时进行实验。

1.3 构建 IFIH1 敲低的质粒

使用慢病毒载体 psi-LVRU6GP 连接 shRNA 靶向序列,构建能敲低 IFIH1 的质粒(shIFIH1)。对照质粒(shNC)为载体连接一段无意序列。将合成的 shRNA 靶向序列正义和反义寡核苷酸链退火,序列见表 1。按照试剂说明书操作,将 psi-LVRU6GP 载体使用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ进行双酶切。利用 T_4 连接酶连接退火后的寡核苷酸链和酶切后的载体。将连接产物转化入大肠杆菌 stable3,并按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒。

表 1 shRNA 靶向序列

名称	序列(5′→3′)
shNC	上游 GTTCTCCGAACGTGTCACGT
	下游 ACGTGACACGTTCGGAGAAC
shIFIH1#1	上游 GCAGAGAAGATCCATTTAAA
	下游 TTTAAATGGATCTTCTCTGC
shIFIH1#2	上游 GTGCCAATCTTGATGCATTT
	下游 AAATGCATCAAGATTGGCAC

表 2 引物序列

基因名称	序列(5′→3′)
*HPV*18 *E6/E7*	上游 ATGCATGGACCTAAGGCAAC
	下游 AGGTCGTCTGCTGAGCTTTC
IFIH1	上游 ACCAAATACAGGAGCCATGC
	下游 GCGATTTCCTTCTTTTGCAG
GAPDH	上游 GCAAATTCCATGGCACCGT
	下游 GCCCCACTTGATTTTGGAGG

1.4 细胞转染

IFIH1 转染 C33A 细胞:取对数生长期的 C33A 细胞(1×10^6/皿)于 6 cm 培养皿中,20 h 后细胞融合度达到 70%~80%时,以 PEI∶质粒=3∶1的比例将带 Flag 标签的 IFIH1 过表达质粒与对应的阴性对照质粒分别转染 C33A 细胞。实验分为 2 组:①阴性对照组(NC);②IFIH1 过表达组(O/E IFIH1)。转染 6~8 h 后,将培养基更换为含 100 mL/L FBS 的高糖 DMEM 培养基,在培养箱中培养 48 h 后收集细胞进行后续实验。HPV18 基因组转染 HaCaT 细胞:取对数生长期的 HaCaT 细胞(3×10^6/皿)于 6 cm 培养皿中,20 h 后细胞融合度达到 60%~70%时,以 PEI∶HPV18∶psv2-neo 质粒=6∶1∶1的比例将 HPV18 基因组转染进 HaCaT 细胞,转染 6~8 h 后换液,48 h 后用 G418 溶液(800 μg/mL)筛选转染成功的细胞。每 2 天换 1 次液并加药筛选细胞,待添加 G418 溶液培养皿中无细胞死亡,且细胞处于对数生长期时用于后续实验。

1.5 慢病毒包装与感染

取对数生长期的 HEK293T 细胞(1×10^6/皿)于 6 cm 培养皿中,20 h 后细胞融合度达到 60%~70%时,按照试剂说明书操作,利用 PEI 转染试剂将 1 μg pMD2.G 质粒,3 μg pSPAX2 质粒,4 μg shIFIH1#1 质粒、shIFIH1#2 质粒或对照质粒共转染 HEK293T 细胞。转染 6~8 h 后换液,48 h 后收集上清,并用 0.22 μm 滤器过滤,所得的上清即为病毒原液,于-80 ℃保存。取对数生长期的 HeLa 细胞(1×10^6/皿)于 6 cm 培养皿中,20 h 后细胞融合度达到 60%~70%时,以培养基∶病毒原液=1∶1的比例感染 HeLa 细胞,培养 48 h 后换液,并用 puro 溶液(1 μg/mL)筛选感染成功的细胞。待添加 puro 溶液培养皿中无细胞死亡,且细胞处于对数生长期时用于后续实验。实验分为 2 组:①阴性对照组(shNC);②实验组(shIFIH1#1,#2)。

1.6 实时定量 PCR(qRT-PCR)

利用 TRIzol 试剂法提取细胞中的总 RNA,取 1 μg RNA,利用反转录试剂盒得到相应的 cDNA。利用 qRT-PCR 检测 HPV18 E6/E7、IFIH1、GAPDH 的 mRNA 表达水平,引物序列见表 2。qRT-PCR 的反应条件:95℃ 1 min(预变性),95 ℃ 10 s(变性),60 ℃退火,延伸,共 40 个循环。

1.7 Western blot

收集细胞沉淀,使用高效 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,并利用 BCA 法测定蛋白总浓度。取 20 μg 蛋白上样,在 80 V 30 min,120 V 60 min 的条件下经 8% SDS-PAGE 分离后,350 mA 恒流将分离后的蛋白湿转至 PVDF 膜上。使用 5%的脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,分别加入兔抗人 IFIH1 抗体(1∶1 000)、兔抗人 p-STAT3 抗体(1∶1 000)、兔抗人 STAT3 抗体(1∶1 000)、兔抗人 FLAG 抗体(1∶1 000)、鼠抗人 GAPDH 抗体(1∶100 000),4 ℃摇床孵育 12~16 h;TBST 洗膜 5 min×5 次后,加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1∶10 000)和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1∶10 000),室温摇床 1 h;TBST 洗膜 5 min×5 次,利用高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒发光显色。

1.8 实时无标记动态细胞分析技术(RTCA)

将细胞接种于 RTCA 的增殖板中(HeLa 细胞每孔接种 4 000 个细胞,C33A 细胞每孔接种 20 000 个细胞),设置 3 个复孔。将增殖板置于 37 ℃,50 mL/L 的 CO_2 培养箱中,利用 RTCA Software Lite 实时检测细胞的增殖情况。

1.9 CCK8 法

将细胞接种于 96 孔板中(HeLa 细胞每孔细胞数目为 2 000 个,C33A 细胞每孔接种 10 000 个细胞),并设置 5 个复孔。分别在 0、24、48、72、96 h 时每孔加 10 μL CCK8 试剂,混匀后将培养板放在培养箱内孵育,1 h 后在酶标仪 450 nm 处测定光密度值,并绘制生长曲线。

1.10 划痕愈合实验

将 Hela 细胞和 C33A 细胞按 5×10^5/孔接种于 6 孔板中培养,待细胞长满 6 孔板时,用 10 μL 无菌枪头在每孔细胞中间垂直划线,用 PBS 洗 2 次,随后加入 3 mL 无血清的 DMEM 培养基,并在显微镜下观察划痕和拍照,记作 0 h。将拍照后的 6 孔板继续放在培养箱中培养,分别在 24 h 和 48 h 取出,并在相同位置拍照。利用 Image J 软件计算划痕面积。细胞迁移率按以下公式计算:

细胞迁移率=[0 h 划痕面积-24 h(48 h)划痕面积]/0 h 划痕面积×100%

1.11 Transwell 迁移和侵袭实验

迁移实验是将细胞用无血清的 DMEM 培养基重

悬,混匀后取 100 μL 细胞悬液(HeLa 细胞 4×10^4/孔,C33A 细胞 1×10^6/孔)到小室中,下室中添加含 20% FBS 的培养基,在培养箱中培养 24 h 或 48 h,取出;用棉签擦去未穿孔的细胞,4% 的多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 洗 3 次,结晶紫染色 20 min,流水冲洗染料,晾干,显微镜观察并拍照。侵袭实验需提前取 100 μL 基质胶于上室中,37 ℃培养箱中孵育 2 h,其余实验步骤与迁移实验一致。

1.12 免疫荧光

将细胞重悬至 1×10^5/mL,取 500 μL 细胞接种于 24 孔板爬片内,常规培养 24 h 后,弃去培养基,PBS 洗 1 次,取 300 μL 4%多聚甲醛固定细胞 10 min;PBS 洗 3 次,取 300 μL 0.1% Triton X-100 通透细胞 15 min;PBS 洗 3 次,取 300 μL 免疫染色封闭液室温摇床封闭细胞 1 h;分别加入 200 μL 兔抗人 STAT3 抗体(1∶200)和兔抗人 p-STAT3 抗体(1∶100)4 ℃摇床 12~16 h;PBS 洗 3 次,加入 200 μL 荧光二抗(1∶500),室温避光摇床 1 h;PBS 洗 3 次,取 200 μL DAPI(1∶10)染核 30 min;将爬片取出封片至载玻片上,晾干后拍照。

1.13 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析,每组实验均重复 3 次。采用 Student's t 检验比较两组间数据。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IFIH1 在人宫颈癌组织和 HPV 阳性的宫颈癌细胞中高表达

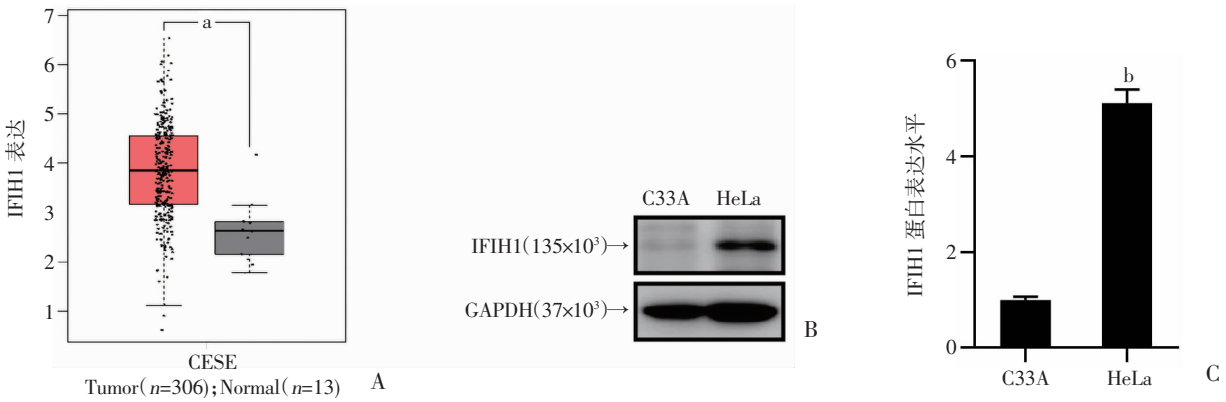
为观察 IFIH1 在宫颈癌组织中的表达,利用基因表达谱交互分析数据库(GEPIA,http://gepia.cancer-pku.cn/)内收集的 306 例人宫颈癌组织和 13 例正常人宫颈组织的分析得知,IFIH1 在肿瘤组织中的表达明显高于正常宫颈组织($P<0.05$,图 1A)。在 HPV18 阳性的宫颈癌细胞中验证 IFIH1 的表达,Western blot 实验结果显示,相比于对照组 C33A 细胞,HPV18 阳性的 HeLa 细胞中 IFIH1 的蛋白表达水平明显增加($P<0.01$,图 1B、C)。提示 HPV 阳性宫颈癌的发生可能与 IFIH1 的高表达有关。

2.2 转染 HPV18 基因组促进正常上皮细胞 HaCaT 中 IFIH1 的表达

本研究选择在人角质形成细胞 HaCaT 中探究 HPV 是否通过 IFIH1 促进宫颈癌的发生。将 HPV18 基因组转染 HaCaT 细胞,并通过 qRT-PCR 检测转染效率。实验结果显示转染 HPV18 基因组的 HaCaT 细胞中 HPV18 E6/E7 mRNA 水平明显增高($P<0.01$,图 2A),表明 HaCaT 细胞中 HPV18 基因组成功转染。Western blot 和 qRT-PCR 检测结果显示,与正常 HaCaT 细胞相比,转染 HPV18 基因组的 HaCaT 细胞,IFIH1 的蛋白水平和 mRNA 水平明显增加($P<0.01$,图 2B~D)。结果提示,HPV 上调 IFIH1 可能是其诱导宫颈癌发生的机制之一。

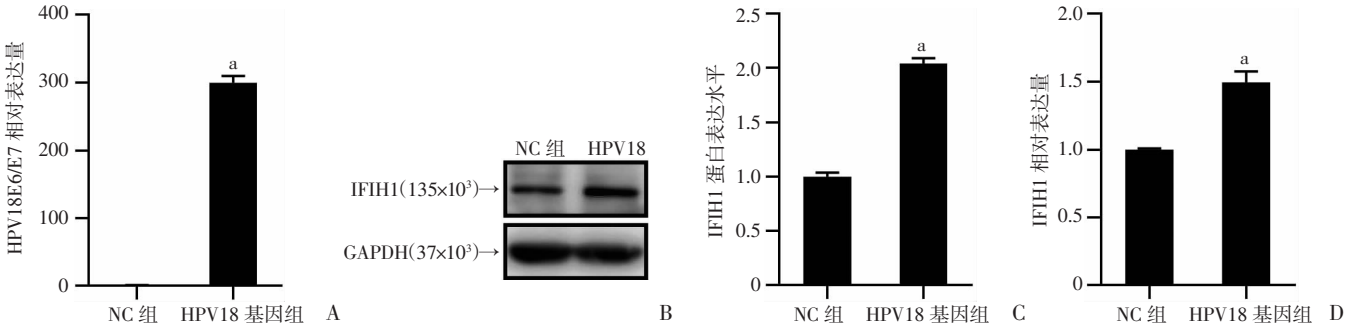
2.3 IFIH1 在人宫颈癌 HeLa 细胞中成功敲低

为研究 IFIH1 在宫颈癌细胞中的作用,利用 shRNA 构建敲低 IFIH1 的宫颈癌 HeLa 细胞株。Western blot 和 qRT-PCR 实验结果显示,与对照组相比,HeLa-shIFIH1#1 和 HeLa-shIFIH1#2 细胞中 IFIH1 的蛋白水平和 mRNA 水平均明显降低($P<0.01$,图 3)。以上实验结果表明 IFIH1 在 HeLa 细胞中成功敲低。



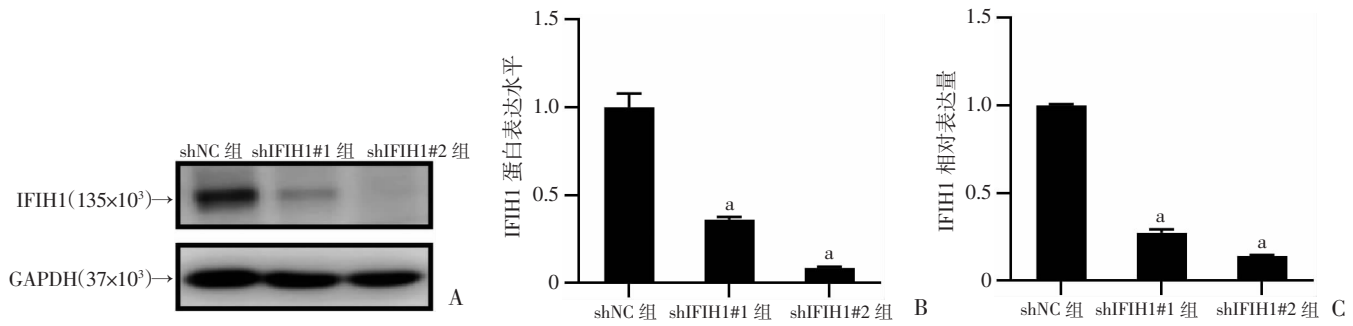
A:GEPIA 数据库分析 IFIH1 在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达;B:Western blot 检测 HeLa 细胞中 IFIH1 的蛋白表达水平;C:HeLa 细胞中 IFIH1 蛋白水平的半定量分析;a:$P<0.05$,与正常宫颈组织比较;b:$P<0.01$,与 C33A 比较

图 1 宫颈癌组织和 HPV 阳性的宫颈癌细胞中 IFIH1 表达增加



A:qRT-PCR 检测 HaCaT 细胞中 HPV18 转染效率;B:Western blot 检测 HaCaT 细胞中 IFIH1 蛋白表达水平;C:HaCaT 细胞中 IFIH1 蛋白水平的半定量分析;D:qRT-PCR 检测 HaCaT 细胞中 IFIH1 mRNA 水平 a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 2 HPV18 促进 HaCaT 细胞 IFIH1 的表达



A:Western blot 检测 HeLa 细胞中 IFIH1 的蛋白表达水平;B:HeLa 细胞中 IFIH1 蛋白水平的半定量分析;C:qRT-PCR 检测 HeLa 细胞中 IFIH1 的 mRNA 表达水平 a:$P<0.01$,与 shNC 组比较

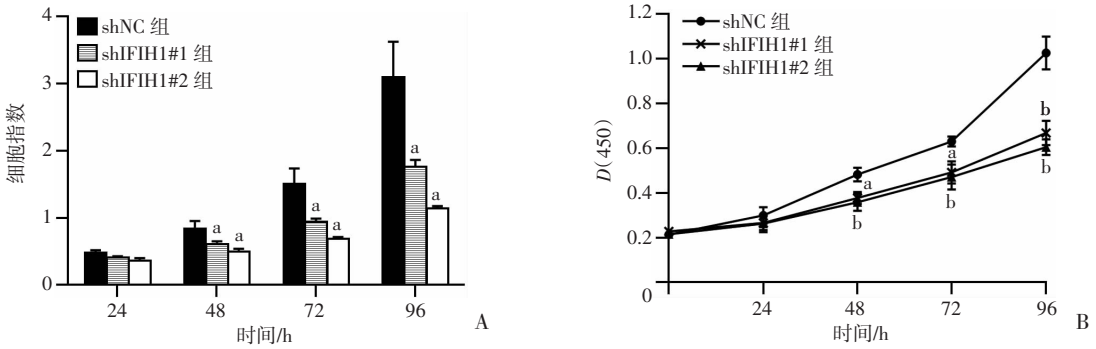
图 3 IFIH1 在 HeLa 细胞中成功敲低

2.4 敲低 IFIH1 抑制人宫颈癌细胞 HeLa 的增殖

为探究 IFIH1 对宫颈癌细胞增殖的影响,使用 RTCA 实验和 CCK8 法检测 IFIH1 敲低后对 HeLa 细胞增殖的影响。结果显示,相比于对照组,敲低 IFIH1 的 HeLa 细胞在 48、72、96 h 的增殖能力明显减弱($P<0.05$,图 4)。结果表明,敲低 IFIH1 后抑制宫颈癌细胞的增殖能力。

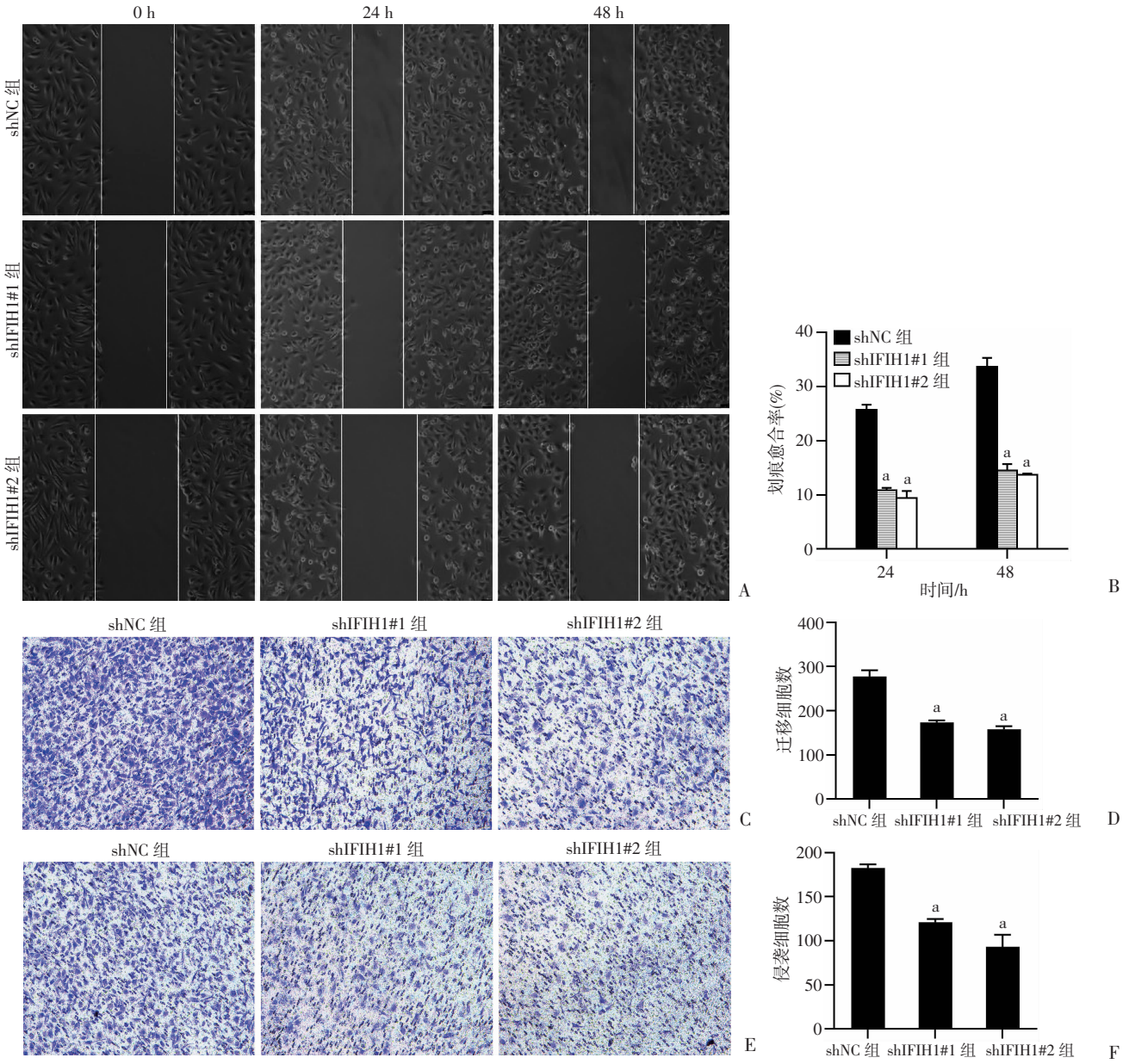
2.5 敲低 IFIH1 抑制人宫颈癌细胞 HeLa 的迁移和侵袭

为探究 IFIH1 对宫颈癌细胞迁移和侵袭的影响,利用划痕愈合实验、Transwell 迁移和侵袭实验分别检测敲低 IFIH1 后对 HeLa 细胞横向迁移、纵向迁移和侵袭能力的影响。划痕愈合实验结果显示,与对照组相比,敲低 IFIH1 的 HeLa 细胞在 24 h 和 48 h 的划痕愈合率明显降低($P<0.01$,图 5A、B)。Transwell 迁移实验结果显示,相比于对照组,敲低 IFIH1 的 HeLa 细胞穿透小室膜的细胞数目明显减少($P<0.01$,图 5C、D)。Transwell 侵袭实验结果显示,敲低 IFIH1 后,穿膜的 HeLa 细胞明显少于对照组($P<0.01$,图 5E、F)。结果表明,敲低 IFIH1 后可抑制宫颈癌细胞迁移和侵袭能力。



A RTCA 检测 HeLa 细胞的增殖能力;B:CCK8 法检测 HeLa 细胞的增殖能力 a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 shNC 组比较

图 4 敲低 IFIH1 抑制 HeLa 细胞增殖



A:划痕愈合实验检测 HeLa 细胞横向迁移能力(×100);B:HeLa 细胞划痕愈合率的半定量分析;C:Transwell 迁移实验检测 HeLa 细胞的迁移能力(结晶紫染色×100);D:HeLa 细胞迁移细胞数的半定量分析;E:Transwell 侵袭实验检测 HeLa 细胞的侵袭能力(结晶紫染色×100);F:HeLa 细胞侵袭细胞数的半定量分析 a:$P<0.01$,与 shNC 组比较

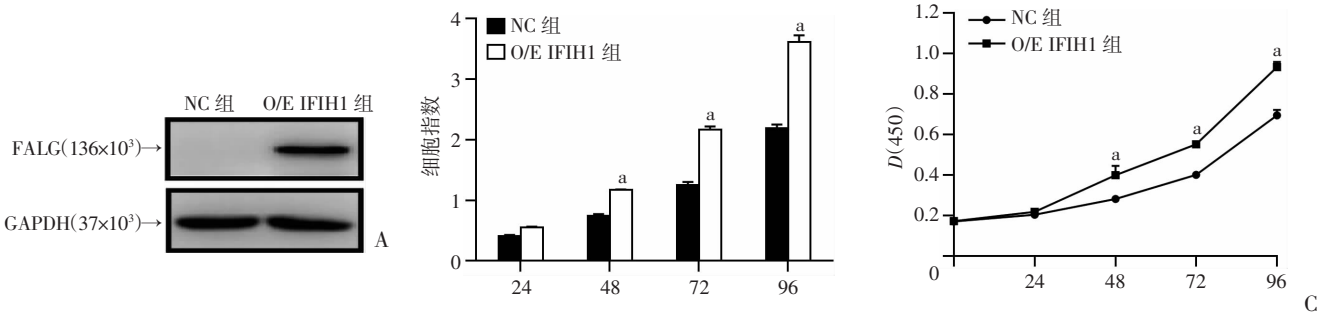
图 5 敲低 IFIH1 抑制 HeLa 细胞迁移和侵袭

2.6 过表达 IFIH1 促进 C33A 细胞增殖

为探究 IFIH1 对 C33A 细胞增殖的影响,利用 PEI 将带 FLAG 标签的 IFIH1 过表达质粒与阴性对照质粒转染 C33A 细胞。Western blot 实验结果表明,IFIH1 在 C33A 细胞中过表达成功(图 6A)。RTCA 实验结果显示,与对照组相比,过表达 IFIH1 促进 C33A 细胞的增殖($P<0.01$,图 6B、C)。CCK8 实验结果显示,相比于对照组,过表达 IFIH1 的 C33A 细胞在 48、72、96 h 的增殖能力增强($P<0.01$,图 6D)。结果表明过表达 IFIH1 可以促进 C33A 细胞的增殖。

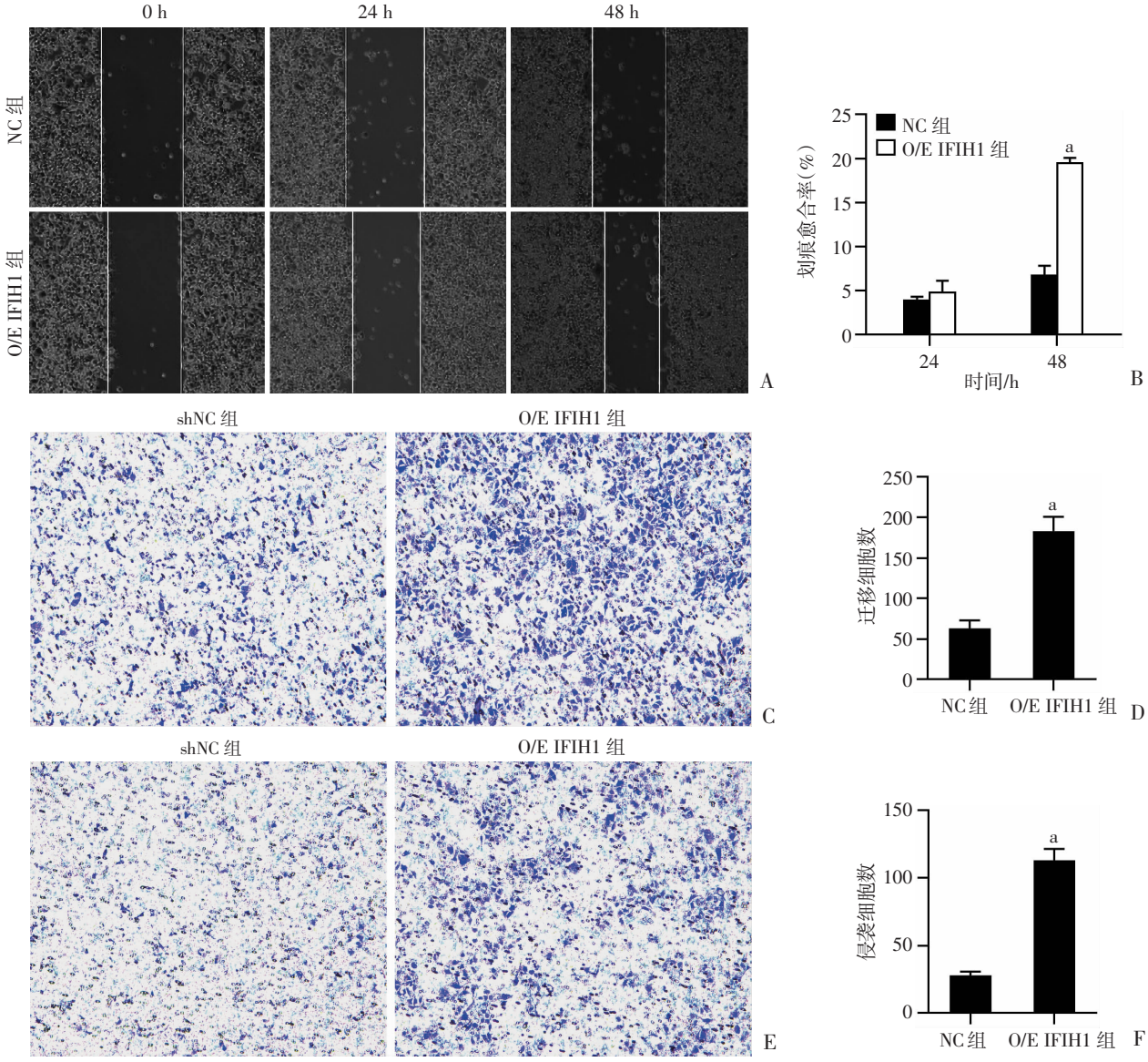
2.7 过表达 IFIH1 促进 C33A 细胞迁移和侵袭

划痕愈合实验结果显示,与对照组相比,过表达 IFIH1 的 C33A 细胞在 48 h 划痕愈合率明显增加($P<0.01$,图 7A、B);Transwell 迁移实验结果显示,相比于对照组,过表达 IFIH1 组的 C33A 细胞穿透小室膜的细胞数目明显增加($P<0.01$,图 7C、D)。Transwell 侵袭实验结果显示,过表达 IFIH1 后,穿膜的 C33A 细胞明显多于对照组($P<0.01$,图 7E、F)。结果表明,过表达 IFIH1 可促进 C33A 细胞的迁移和侵袭。



A:Western blot 检测 IFIH1 在 C33A 细胞中的过表达效果;B:RTCA 检测 C33A 细胞的增殖能力;C:CCK8 法检测 C33A 细胞的增殖能力　a:$P<0.01$,与 NC 比较

图 6　过表达 IFIH1 促进 C33A 细胞增殖



A:划痕愈合实验检测 C33A 细胞横向迁移能力(×100);B:C33A 细胞划痕愈合率的半定量分析;C:Transwell 迁移实验检测 HeLa 细胞的纵向迁移能力(结晶紫×100);D:HeLa 细胞迁移细胞数的半定量分析;E:Transwell 侵袭实验检测 HeLa 细胞的侵袭能力(结晶紫×100);F:HeLa 细胞侵袭细胞数的半定量分析　a:$P<0.01$,与 NC 组比较

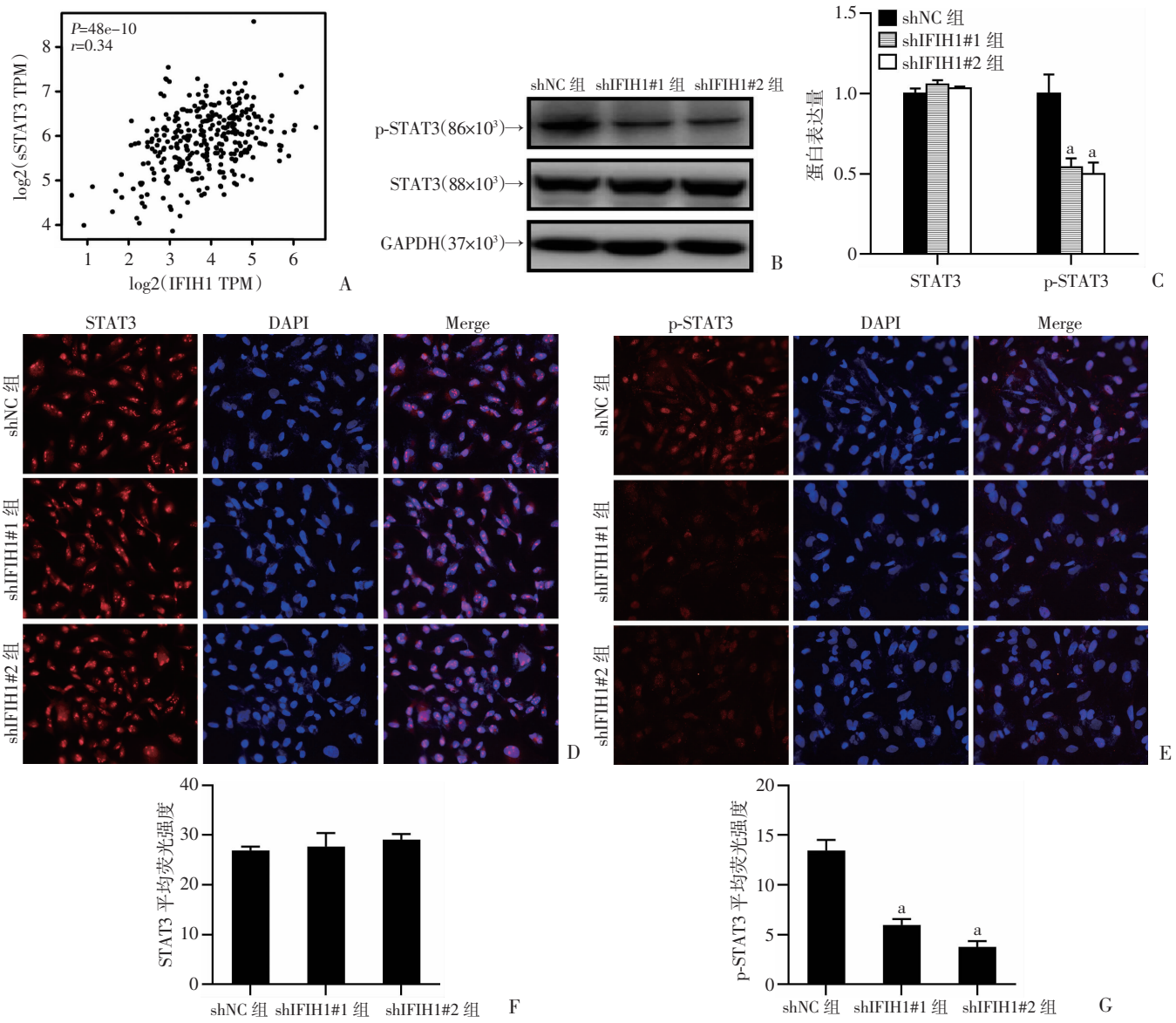
图 7　过表达 IFIH1 促进 C33A 细胞迁移和侵袭

2.8 敲低 IFIH1 抑制人宫颈癌细胞 HeLa 中磷酸化 STAT3 蛋白的表达

为探究 IFIH1 在宫颈癌中发挥作用的机制,利用 GEPIA 数据库分析发现,宫颈癌中 IFIH1 与 STAT3 有一定的相关性(r = 0.34,P<0.01),见图 8A,提示 IFIH1 可能通过 STAT3 通路影响宫颈癌的发生发展。Western blot 实验结果显示,敲低 IFIH1 后,HeLa 细胞中 STAT3 蛋白水平无明显变化,而 p-STAT3 蛋白水平明显降低(P<0.01,图 8B、C)。免疫荧光实验结果显示 STAT3 和 p-STAT3 主要位于细胞核。敲低 IFIH1 后,STAT3 和 p-STAT3 的定位未发生改变,STAT3 的表达也无明显变化,而 p-STAT3 的表达减少(P<0.01,图 8D~G)。结果表明,敲低 IFIH1 可抑制 STAT3 的磷酸化。

3 讨论

宫颈癌的发生与 HPV 感染密切相关。从 HPV 感染到宫颈癌的发生是一个缓慢且复杂的过程。在这个过程中,肿瘤细胞和免疫系统之间存在着持续的斗争。由于持续不断的免疫压力,肿瘤形成了不同的逃避免疫监视的机制,从而逃避免疫系统的控制[17]。



A:GEPIA 数据库分析宫颈癌中 IFIH1 与 STAT3 的相关性;B:Western blot 检测 HeLa 细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白的表达水平;C:HeLa 细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白水平的半定量分析;D:免疫荧光实验检测 Hela 细胞中 STAT3 的表达和定位(×400);F:HeLa 细胞中 STAT3 平均荧光强度的半定量分析;E:免疫荧光实验检测 HeLa 细胞中 p-STAT3 的表达和定位(×400);G:HeLa 细胞中 p-STAT3 平均荧光强度的半定量分析 a:P<0.01,与 shNC 比较

图 8 敲低 IFIH1 抑制 HeLa 细胞中 STAT3 的磷酸化

一般来说,当外界有病毒入侵时常常在第一线发挥哨兵作用的是病毒核酸传感器。核酸传感器包括 DNA 传感器和 RNA 传感器,分别识别并结合病毒 DNA 和 RNA,从而发挥抗病毒功能。由于 HPV 是 DNA 病毒,大多数研究主要集中在 DNA 传感器上。而本研究发现,在转染 HPV18 基因组的 HaCaT 细胞中,作为 RNA 传感器的 IFIH1 的 mRNA 水平和蛋白水平都升高。这表明 IFIH1 不仅可以识别病毒 RNA,对 DNA 病毒也有一定的作用。此外,越来越多的证据表明,IFIH1 的异位表达可导致癌细胞的生长停滞和凋亡[18-19]。在神经母细胞瘤中,IFIH1 的高表达与良好的预后相关[20]。IFIH1 可通过内源性 IFIH1/MAVS 途径和外源性 Fas 介导的凋亡诱导胰腺癌细胞凋亡[21]。IFIH1 也可激活 Caspase-3/7 途径诱导肝癌细胞凋亡并抑制小鼠肝癌移植瘤生长[22]。IFIH1/MAVS 和促凋亡蛋白 NOXA 的激活协同黑色素瘤细胞凋亡,并抑制小鼠黑色素瘤的肺转移[23]。目前,IFIH1 与 HPV 诱导的宫颈癌的关系尚不清楚,因此对 IFIH1 在宫颈癌中发挥的作用的研究,可能为宫颈癌的治疗和开发新的药物提供帮助。

本研究首先利用 GEPIA 数据库分析发现,IFIH1 在宫颈癌组织中表达上调。其次,通过 Western blot 实验发现 IFIH1 在 HPV 阳性的宫颈癌细胞中高表达,这提示 IFIH1 可能参与 HPV 阳性宫颈癌的发生。为探讨 HPV 感染诱导的宫颈癌是否与 IFIH1 的高表达有关,本研究将 HPV18 基因组转染 HaCaT 细胞,并利用 Western blot 和 qRT-PCR 实验检测 IFIH1 的表达。结果表明,转染 HPV18 基因组后,HaCaT 细胞中 IFIH1 的表达上调。通过 shRNA 在宫颈癌 HeLa 细胞中敲低 IFIH1,利用 RTCA 和 CCK8 法检测其对 HeLa 细胞增殖的影响。结果显示,敲低 IFIH1 的 HeLa 细胞增殖能力明显减弱。划痕愈合实验、Transwell 迁移实验和侵袭实验表明,敲低 IFIH1 的 HeLa 细胞迁移能力和侵袭能力明显减弱。同样,在 C33A 细胞中过表达 IFIH1,发现其能促进 C33A 细胞增殖、迁移和侵袭。以上结果显示,IFIH1 可增强宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这与 IFIH1 在其他癌症细胞中所报道的作用不一致,表明 IFIH1 在不同癌症细胞中发挥的作用可能不同。其具体的作用以及分子机制需要进一步阐释。

为了进一步探讨 IFIH1 在宫颈癌细胞中发挥的作用,本研究通过 GEPIA 数据库分析发现,宫颈癌中 IFIH1 与信号传导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)有一定的相关性。STAT3 是 STAT 家族的重要成员,其可通过调节细胞增殖、迁移、侵袭、细胞凋亡和细胞周期的方式参与癌症的发生和发展[24-25]。有研究发现乳腺癌组织中磷酸化的 STAT3(phosphorylated STAT3,p-STAT3)的表达显著升高,且与淋巴结转移呈正相关,这表明 p-STAT3 可能与乳腺癌细胞的增殖和侵袭有关[26]。p-STAT3 在结直肠癌组织中高表达,与肿瘤浸润深度、血管浸润和淋巴结转移有关[27]。p-STAT3 在非小细胞肺癌中的表达与分期、分化、淋巴结转移及预后有关[28]。同时,有研究表明 STAT3 的激活与宫颈癌发生和转移有关[29]。本研究发现,在宫颈癌细胞中敲低 IFIH1 可抑制 STAT3 的磷酸化,这提示 IFIH1 促进宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭可能与 STAT3 信号通路有关。然而,IFIH1 调控 STAT3 磷酸化的机制以及 HPV 上调 IFIH1 的机制需做进一步的研究。

综上所述,本研究证明 IFIH1 在宫颈癌中高表达,HPV 感染可导致宫颈癌细胞中 IFIH1 的表达上调。敲低 IFIH1 抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭,该抑制作用可能是通过阻碍 STAT3 的磷酸化实现。IFIH1 有望成为开发新的宫颈癌治疗药物的候选靶点。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, *et al*. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19. DOI:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:112:AID-PATH431>3.0.CO;2-F.

[3] BODILY J, LAIMINS L A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression[J]. Trends Microbiol, 2011, 19(1): 33-39. DOI:10.1016/j.tim.2010.10.002.

[4] HEMMAT N, BANNAZADEH BAGHI H. Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer[J]. Pathog Dis, 2019, 77(5): ftz048. DOI:10.1093/femspd/ftz048.

[5] SENBA M, MORI N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection[J]. Oncol Rev, 2012, 6(2): e17. DOI:10.4081/oncol.2012.e17.

[6] FENSTERL V, CHATTOPADHYAY S, SEN G C. No love lost between viruses and interferons[J]. Annu Rev Virol, 2015, 2(1): 549-572.

[7] DIAS JUNIOR A G, SAMPAIO N G, REHWINKEL J. A balancing act: MDA5 in antiviral immunity and autoinflammation[J]. Trends Microbiol, 2019, 27(1): 75-85. DOI:10.1016/j.tim.2018.08.007.

[8] WU Y B, WU X Q, WU L H, *et al*. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy[J]. Transl Res, 2017, 190: 51-60. DOI:10.1016/j.trsl.2017.08.004.

[9] CHAN Y K, GACK M U. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(6): 360-373. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.45.

[10] PHAM A M, SANTA MARIA F G, LAHIRI T, *et al*. PKR transduces MDA5-dependent signals for type I IFN induction [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(3): e1005489. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005489.

[11] LU H L, LIAO F. Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication[J]. J Immunol, 2013, 191(6): 3264-3276. DOI: 10.4049/jimmunol.1300512.

[12] MELCHJORSEN J, RINTAHAKA J, SØBY S, *et al*. Early innate recognition of Herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase Ⅲ-independent pathways[J]. J Virol, 2010, 84(21): 11350-11358. DOI:10.1128/JVI.01106-10.

[13] PICHLMAIR A, SCHULZ O, TAN C P, *et al*. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection[J]. J Virol, 2009, 83(20): 10761-10769. DOI:10.1128/JVI.00770-09.

[14] ROULOIS D, LOO YAU H, SINGHANIA R, *et al*. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts[J]. Cell, 2015, 162(5): 961-973. DOI:10.1016/j.cell.2015.07.056.

[15] PALCHETTI S, STARACE D, DE CESARIS P, *et al*. Transfected poly(I: C) activates different dsRNA receptors, leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2015, 290(9): 5470-5483. DOI: 10.1074/jbc.M114.601625.

[16] INAO T, HARASHIMA N, MONMA H, *et al*. Antitumor effects of cytoplasmic delivery of an innate adjuvant receptor ligand, poly(I: C), on human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 89-100. DOI:10.1007/s10549-011-1930-3.

[17] PIERSMA S J. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients[J]. Cancer Microenviron, 2011, 4(3): 361-375. DOI:10.1007/s12307-011-0066-7.

[18] LIN L, SU Z, LEBEDEVA I V, *et al*. Activation of Ras/Raf protects cells from melanoma differentiation-associated gene-5-induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(11): 1982-1993. DOI:10.1038/sj.cdd.4401899.

[19] KANG D C, GOPALKRISHNAN R V, LIN L, *et al*. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type Ⅰ interferon-responsive apoptosis-inducing gene[J]. Oncogene, 2004, 23(9): 1789-1800. DOI:10.1038/sj.onc.1207300.

[20] HSU W M, HUANG C C, LEE H Y, *et al*. MDA5 complements TLR3 in suppression of neuroblastoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 24935-24946. DOI:10.18632/oncotarget.4511.

[21] DUEWELL P, BELLER E, KIRCHLEITNER S V, *et al*. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(10): e1029698. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1029698.

[22] PENG S, GENG J L, SUN R, *et al*. Polyinosinic-polycytidylic acid liposome induces human hepatoma cells apoptosis which correlates to the up-regulation of RIG-I like receptors[J]. Cancer Sci, 2009, 100(3): 529-536. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01062.x.

[23] BESCH R, POECK H, HOHENAUER T, *et al*. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells[J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2399-2411. DOI:10.1172/JCI37155.

[24] CHAI E Z, SHANMUGAM M K, ARFUSO F, *et al*. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy[J]. Pharmacol Ther, 2016, 162: 86-97. DOI:10.1016/j.pharmthera.2015.10.004.

[25] TURKSON J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery[J]. Expert Opin Ther Targets, 2004, 8(5): 409-422. DOI:10.1517/14728222.8.5.409.

[26] DIEN J, AMIN H M, CHIU N, *et al*. Signal transducers and activators of transcription-3 up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and decreases invasiveness of breast cancer[J]. Am J Pathol, 2006, 169(2): 633-642. DOI:10.2353/ajpath.2006.051109.

[27] KUSABA T, NAKAYAMA T, YAMAZUMI K, *et al*. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(8): 833-838. DOI: 10.1136/jcp.2004.023416.

[28] XU Y H, LU S. A meta-analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression and survival of patients with non-small-cell lung cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2014, 40(3): 311-317. DOI:10.1016/j.ejso.2013.11.012.

[29] SHI S, MA H Y, ZHANG Z G. Clinicopathological and prognostic value of STAT3/p-STAT3 in cervical cancer: a meta and bioinformatics analysis[J]. Pathol Res Pract, 2021, 227: 153624. DOI:10.1016/j.prp.2021.153624.

(**收稿**:2022-03-10;**修回**:2022-05-03)

(编辑 张 维)