

硫氧还蛋白-1 减弱脂连蛋白对小鼠移植性肝癌生长的抑制作用

杨荟敏¹⁾, 邢素倩^{1), 2)}, 白晓旭¹⁾, 张红^{1)*}

(¹⁾ 首都医科大学神经生物学系 教育部神经变性重点实验室, 北京 100069;

²⁾ 沧州市人民医院生殖科, 河北 沧州 061000)

摘要 硫氧还蛋白-1 (thioredoxin 1, Trx1) 是机体氧化还原调控的重要蛋白质。脂连蛋白 (adiponectin, APN) 是一种由脂肪组织分泌的细胞因子。二者在癌症特别是肝癌的发展中具有重要调控作用, 但其在调控肝癌的进程中是否存在相关性, 且改变这种相关性是否直接影响肝癌的发生发展, 目前尚未见报道。本文通过分析癌症和肿瘤基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中大量肝癌患者组织样本数据后, 首次发现 Trx1 与 APN 在肝癌的进程中存在显著负相关表达。在荷瘤鼠中分别过量表达 Trx1、APN 和 Trx1, 采用 Western 印迹、免疫组织化学染色及 TUNEL 等方法检测发现, 过量表达的 Trx1 缓解了 APN 引起的瘤内 Trx1 蛋白水平下降, 减弱 APN 对肿瘤的抑制作用, 同时增加 Ki67 阳性细胞数目, 减少细胞凋亡和 p-JNK 阳性细胞数目。上述结果表明, 改变 Trx1 与 APN 的负相关性后, APN 对肝癌细胞成瘤的抑制作用明显减弱。提示在抑制肝癌细胞生长及肝癌治疗的过程中, 调控 Trx1 及 APN 的相关性可能起到十分重要的作用, 这为临床肝癌的治疗提供更为全面有效的理论机制。

关键词 硫氧还蛋白-1; 脂连蛋白; 表达相关性; 肝癌细胞; 细胞凋亡
中图分类号 Q2

Thioredoxin 1 Alleviates the Inhibitory Effect of APN on Mouse Grafted Hepatocellular Carcinoma

YANG Hui-Min¹⁾, XING Su-Qian^{1), 2)}, BAI Xiao-Xu¹⁾, ZHANG Hong^{1)*}

(¹⁾ Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of Ministry of Education, Department of Neurobiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²⁾ Reproductive Clinics of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China)

Abstract Thioredoxin 1 (Trx1) acts as an important systemic redox regulator. Adiponectin (APN) is secreted by adipose tissues. Although the roles of Trx1 and APN in cancer especially hepatocellular carcinoma (HCC) has been reported, it is necessary to further investigate the relationship between Trx1 and APN in inhibiting HCC development and progression. In order to analyze whether the expression of Trx1 is associated with APN in the pathogenesis of HCC, the Cancer Genome Atlas (TCGA) data set was used in this study and the gene expression profile analyses of liver cancer patients revealed that Trx1 expression was negatively correlated with APN in the progression of HCC. To further investigate the effect of the negative correlation between Trx1 and APN in HCC and its underlying mechanism, HepG2 hepatocellular carcinoma cells overexpressed with APN combined with/without Trx1 were subcutaneously injected into the nude mice. Results of Western blotting, immunohistochemistry and TUNEL staining of the

收稿日期: 2017-06-07; 修回日期: 2017-07-16; 接受日期: 2017-07-21

国家自然科学基金项目 (No. 81372587) 资助

* 通讯作者 Tel: 010-83950066; E-mail: hzhang@cmmu.edu.cn

Received: June 7, 2017; Revised: July 16, 2017; Accepted: July 21, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81372587)

* Corresponding author Tel: 010-83950066; E-mail: hzhang@cmmu.edu.cn

xenograft tumors showed that overexpression of Trx1 altered the negative correlation between Trx1 and APN through alleviation of APN induced intratumoral downregulation of Trx1. Moreover, overexpression of Trx1 resulted in an increase of Ki67 positive cells and a decrease of cell apoptosis and phosphorylated JNK positive cells induced by APN. Taken together, these findings suggested that the suppressive effect of APN on tumor growth was significantly depressed by the altered Trx1-APN correlation. The regulatory role of the negative correlation between Trx1 and APN on hepatocarcinogenesis might provide a potential and effective rationale for clinical therapy of HCC.

Key words thioredoxin 1; adiponectin; expression correlation; hepatocellular carcinoma; cell apoptosis

硫氧还蛋白-1 (thioredoxin 1, Trx1) 是一种广泛存在于原核和真核生物中的小分子蛋白质。Trx1 由 104 个氨基酸组成, 分子量 12 kD, 以保守的氨基酸还原序列 Cys-Gly-Pro-Cys 为活性中心位点^[1]。Trx1 作为氧化还原调控的重要蛋白质, 主要分布在细胞浆和细胞核中。还原态的 Trx1 可通过其活性位点中 32 和 35 位的 2 个半胱氨酸残基, 与其他含有二硫键的氧化蛋白质相互作用, 将被氧化的蛋白质还原; 而氧化态的 Trx1 则可被硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxR) 还原至还原态后, 继续发挥作用。Trx1 通过巯基、二硫键相互转换的形式, 使其氧化还原状态发生改变, 从而维持细胞内氧化还原的平衡状态, 调控细胞信号转导等^[2,3]。Trx1 作为氧化还原调控的重要蛋白质, 不仅调控细胞内的氧化应激状态, 促进细胞的生长, 抑制细胞的凋亡, 还可以通过自身表达量的改变调节机体内的炎症反应等参与肝疾病的发病过程^[4,5]。有研究表明, 肿瘤患者血清中 Trx 的水平明显增高^[6,7], 而将肿瘤组织切除后, 血清中 Trx 的水平则有所降低^[8]。这提示 Trx 水平的增高可能是由于机体氧化应激状态的改变和肿瘤组织自身释放所导致。由此可见, Trx1 的过度表达与肿瘤的侵袭、生长以及预后不良等密切相关。虽然 Trx1 已成为目前研究肿瘤生成与癌症治疗的十分重要的靶点, 但是在癌症的进展中, 其表达量的改变是否对其他蛋白质产生直接或者间接的影响进而抑制肿瘤细胞的凋亡, 还有待进一步阐明。

脂连蛋白 (adiponectin, APN) 是由脂肪组织分泌的细胞因子, 在机体多种组织中表达, 但仅由脂肪细胞分泌。作为胰岛素增敏激素, APN 通过与靶细胞表面的受体相互作用, 激活下游信号通路, 发挥其在糖和脂肪代谢等方面重要的调节作用^[9,10]。APN 的功能尚未完全证实, 但其与多种肿瘤的发生发展密切相关。大量临床数据证明, APN 具有抗感染、抗动脉粥样硬化以及促进肿瘤细胞死亡的作用^[11]。由于 APN 对肝糖生成具有调节作用, 因此 APN 已

成为肝病研究中十分重要的靶蛋白。近年来, APN 在肝癌中的作用更是得到越来越多的关注。已有研究表明, APN 可以通过调节 C-Jun 氨基末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的磷酸化水平, 抑制肝癌细胞的增殖^[12]。另外, APN 通过降低 Trx1 的表达量, 引起肝癌细胞内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的过量产生, 促进肝癌细胞的凋亡, 且在肝癌患者组织标本中检测到 APN 水平的降低和 Trx1 水平的增高^[13]。由此推测, 在肝癌的发展过程中, 氧化还原调控蛋白 Trx1 与抑制肝癌生长的 APN 之间可能存在一定的相关性, 或是发挥一定的协同作用, 且这种相关性可能直接影响 APN 对肝癌细胞生长的抑制作用。

本文通过对癌症和肿瘤基因图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中的大规模肝癌患者的组织样本数据进行分析, 发现随着肝癌患者病情恶化程度的增加, Trx1 与 APN 在表达量上呈显著的负相关。而通过在荷瘤鼠中过量表达 Trx1 改变其与 APN 的负相关性后, APN 的促凋亡作用受到明显的抑制, 进一步阐明了 Trx1 与 APN 之间的负相关性在肝癌细胞生长及肝癌治疗中的重要作用, 希望为临床肝癌的治疗提供更为全面的理论及重要的药物靶位点。

1 材料与方法

1.1 材料

人原发性肝癌细胞系 HepG2 购于美国 ATCC (American Type Culture Collection) 细胞库, Anti-Ki67 抗体购于 Santa Cruz 公司, Anti-Trx1, Anti-GAPDH, Anti-p-JNK 抗体均购于美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司, 重组人全长脂连蛋白购于美国 R&D 公司, 小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒和浓缩型 DAB 试剂盒均购于北京中杉金桥公司, TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (In Situ Cell Death Detection) 购于瑞士罗氏公司, 辣根过氧化物

酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 购于美国 CST 公司, ECL 超敏发光检测试剂盒购于美国 Bio-Rad 公司, Hoechst 33258 购于美国 Sigma 公司, 人脂联素过表达腺病毒以及同时过量表达人脂联素和硫氧还蛋白-1 的腺病毒均由上海吉凯基因化学技术有限公司包装合成, 清洁级雌性 BALB/c 裸鼠 (4 周龄) 购自北京维通利华实验动物中心 (SCXK 20120001), 由首都医科大学实验动物部饲养, 3 只/笼, 恒温恒湿 24 h 循环光照, 自由进食水。

1.2 HepG2 肝癌荷瘤鼠模型的建立

取对数生长期的 HepG2 细胞, PBS 吹打细胞至单细胞悬液, 计数后以 5×10^6 个/0.1 mL 的浓度将细胞悬液在 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠右臀部皮下注射, 以建立人肝癌细胞裸鼠移植瘤动物模型。待肿瘤细胞在裸鼠体内生长至 2 周时, 将成功建立的肝癌荷瘤鼠 15 只随机分为 3 组, 每组 5 只: 阴性病毒对照组 (Ad-N), 脂连蛋白腺病毒实验组 (Ad-APN) 以及共同表达脂连蛋白和硫氧还蛋白-1 的腺病毒实验组 (Ad-APN + Trx1)。每组病毒注射总量均为 10^8 单位 (plaque-forming units, pfu), 每周注射 1 次, 连续 4 周。

1.3 肿瘤的观察和测量

不同分组的荷瘤鼠接种病毒后, 继续于恒温恒湿、无菌的系统内饲养, 每日观察, 并用游标卡尺测量肿瘤直径。根据公式 $V = a/2 \times b^2$ 计算肿瘤体积, 其中 V 表示肿瘤体积, 单位 mm^3 , a 和 b 分别为最长直径和最短直径, 单位均为 mm。根据平均值绘制肿瘤生长曲线。最后一次注射病毒 1 周后处死动物, 剥离肿瘤组织并编号待用。

1.4 组织中 Trx1, Ki67 和 p-JNK 表达量的检测

取新鲜肝癌组织固定于 4% 多聚甲醛 24 h, 采用常规石蜡进行包埋, 切片 (厚度 4 μm)。应用小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒和浓缩型 DAB 试剂盒对组织中的 Trx1、Ki67 和 p-JNK 染色。以中性树胶封片并设立 PBS 代替一抗组为阴性对照组, 具体操作方法详见试剂说明书 (北京中杉金桥公司, PV-9005 / ZLI-9017)。显微镜下观察。

1.5 组织中细胞凋亡的检测

将制备好的石蜡切片置于二甲苯中浸洗 2 次, 每次 5 min, 取出后分别用梯度乙醇 (100, 95, 90, 80, 70%) 浸泡, 每个浓度 3 min, 最后用 PBS 漂洗 2 次。完成切片的脱蜡和水合后, 按照 TUNEL 检测试剂盒说明书 (Roche, 12156792910) 的方法对各切片

进行染色, 应用 10 mg/mL 的 Hoechst 对细胞核进行染色, 镜下观察。

1.6 蛋白质免疫印迹法

取 20 mg 待测组织, 加入 300 μL RIPA 组织裂解液, 冰上超声破碎, 13 000 r/min 离心收集上清。BCA 法蛋白质定量后, 将 50 μg 变性蛋白质于不同浓度 SDS-PAGE 胶上进行电泳分离。100 V 恒压电泳 20 min, 150 V 继续电泳大约 50 min, 取出凝胶, 40 V 恒压 3 h 转移到 PVDF 膜上。转膜结束, 取出 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入不同稀释浓度的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。TBST 洗膜 4 次, 每次 7 min, 加入相应的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜。滴加 ECL 超敏发光液并于凝胶成像仪上进行蛋白质水平检测。

1.7 统计学方法

实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据进行独立样本 t 检验, 两组以上数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织标本中 Trx1 和 APN 呈负相关表达

Trx1 和 APN 对肝癌细胞生长均起十分重要的调控作用。那么, 这两种蛋白质的表达量在肝癌进展过程中是否改变, 且二者之间是否存在一定的联系? 为了回答这个问题, 通过对 TCGA 癌症数据库中的肝癌患者肿瘤组织及癌旁组织标本各基因 mRNA 的检测结果进行统计, 结果显示, 在肝癌患者肿瘤组织中, Trx1 的表达量明显高于癌旁组织 (Fig. 1A), 且随着肿瘤恶性程度的增加, Trx1 的表达量呈现进一步的增加趋势 (Fig. 1B); 与之相反, APN 随着肝癌患者肿瘤恶性程度的增加, 表达量则呈现出逐渐减少的趋势 (Fig. 1C)。对上述样本中 Trx1 和 APN 的表达量进行 Pearson 相关性分析后, 发现两者之间存在显著负相关性 ($r = -0.552$, $P < 0.01$) (Fig. 1D)。以上结果提示, 在肝癌进展过程中, Trx1 和 APN 呈负相关表达, 且这种负相关表达可能在肝癌发生发展的过程中发挥一定的作用。

2.2 过量表达的 Trx1 改变其与 APN 之间的负相关性

APN 通过减少 Trx 蛋白的表达量, 增加细胞凋亡, 从而抑制肝癌细胞生长和增殖。结合 Fig. 1 的实验结果, 推测 Trx1 和 APN 在表达量上的负相关性可能对肝癌的发展产生一定的影响。而改变

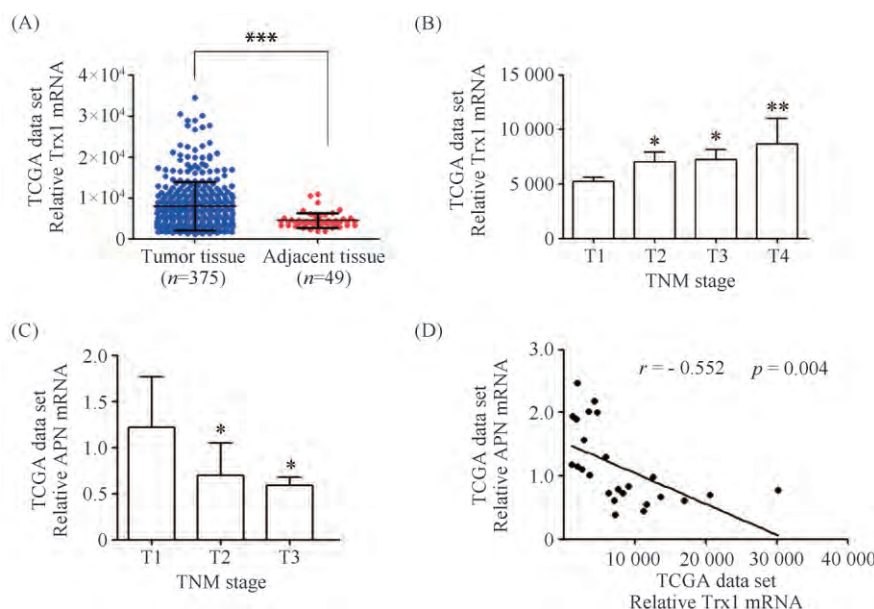


Fig. 1 Expression of Trx1 is negatively correlated with APN in patients with hepatocellular carcinoma (A) Analysis of Trx1 expression in liver cancer ($n = 375$) and adjacent tissues ($n = 49$) from TCGA RNA-sequence data. (B) Analysis of Trx1 ($n = 148$) and (C) APN ($n = 20$) expression in liver cancers at different TNM stage from TCGA data set. (D) Pearson correlation coefficient was performed to analyze the correlation between Trx1 and APN ($n = 25$) in patients with hepatocellular carcinoma. Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Trx1 和 APN 之间的负相关性,可能直接影响 APN 对肝癌的抑制作用。为了验证该假设,首先在荷瘤鼠中单独加入 APN,通过 Western 印迹实验以及免疫组织化学染色的方法,对瘤组织内的 Trx1 表达量进行检测。实验结果发现,单独加入 APN 组,瘤内 Trx1 蛋白水平与对照组相比,明显降低 (Fig. 2A, B),且通过对组织内 Trx1 进行免疫组织化学染色后同样发现,单独加入 APN 组,瘤内 Trx1 阳性细胞数较对照组明显减少 (Fig. 2C, D)。而同时过量表达 Trx1 及 APN,可以逆转由 APN 表达量升高引起的瘤内 Trx1 蛋白水平的降低,使 Trx1 的表达量回升至单独加入病毒阴性对照组水平。以上结果表明,过量表达的 Trx1 可以改变其与 APN 之间的负相关性,这为后续研究 Trx1 和 APN 在肝癌进展中的作用提供了实验基础。

2.3 改变 Trx1 与 APN 的相关性减弱 APN 对肝癌细胞成瘤的抑制作用

上述实验结果 (Fig. 1, 2) 证明,Trx1 与 APN 之间呈现负相关性。为了进一步研究二者的负相关性在肝癌发生发展中的作用,分别取阴性病毒对照组、APN 单独处理组及 Trx1 和 APN 共同处理组的荷瘤鼠肿瘤组织进行检测。通过形态学 (Fig. 3A) 以及对肿瘤体积进行测量 (Fig. 3C) 分析后发现,不同处理 4 周后,腺病毒对照组的肿瘤体积随时间

延长逐渐增大,单独加入 APN 组的肿瘤体积明显减小,而 Trx1 和 APN 共同处理组,肿瘤体积基本与对照组相同。免疫组织化学染色的方法同样观察到,同时过量表达 Trx1 和 APN 后,细胞增殖相关蛋白 ki67 阳性细胞数与 APN 单独处理组相比明显回升 (Fig. 3D)。上述结果表明,过量表达的 Trx1 改变了其与 APN 的负相关性后,APN 对肝癌细胞成瘤的抑制作用明显减弱。

2.4 过量表达的 Trx1 通过凋亡途径抑制 APN 在肝癌细胞中的作用

细胞凋亡是机体进行正常新陈代谢所必须的,参与介导细胞凋亡的途径分别是受体配体结合的外源途径和线粒体参与的内源途径。而上述两种途径中所涉及的诸多凋亡因子都与 Trx 密切相关。为了进一步验证 Trx1 和 APN 的负相关性在抑制肝癌细胞生长中的作用是否与凋亡途径相关,分别采用 TUNEL 和 JNK 磷酸化水平的变化,来分析不同处理组荷瘤鼠的肿瘤组织内的凋亡情况。实验结果如图 4A 所示,与对照组相比,APN 处理组肿瘤组织内 TUNEL 阳性细胞数明显增加,而过量表达的 Trx1 则明显抑制由 APN 引起的 TUNEL 阳性细胞数的增加。Fig. 4B 为不同处理组 TUNEL 阳性细胞数统计结果。从 p-JNK 的活化程度同样可以看到,过量表达的 Trx1 缓解 APN 引起的 JNK 磷酸化水平的增加

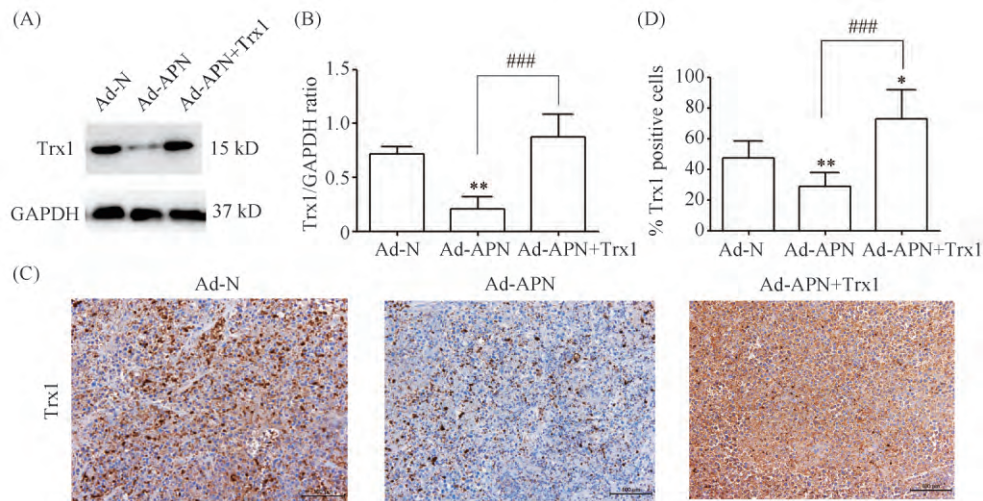


Fig. 2 Trx1 overexpression alleviates APN-induced decrease of intratumoral protein levels of Trx1 Ad-N, Ad-APN and Ad-APN + Trx1 (10^8 pfu) was injected into HepG2-xenograft tumor sites. After 5 weeks, tumors were collected and subjected to Western blotting and immunohistochemistry tests. (A) Lysates of totally 50 μ g protein from each group were loaded into the lanes. Anti-Trx1 was used to detect the expression of intratumoral Trx1, and Anti-GAPDH was used as a loading control. (B) The levels of Trx1 and GAPDH expression were measured by scanning densitometry and quantified ratio was shown in the graph. Data were expressed as mean \pm SD, ** $P < 0.01$ compared to the Ad-N infected groups. ### $P < 0.001$ compared to the Ad-APN infected groups. (C) Tumor samples were subjected to immunohistochemistry analysis by staining with Anti-Trx1. The percentages of positive cells of Trx1 were quantified in the graph (D). Data were expressed as mean \pm SD. Scale bar = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the Ad-N infected groups. ### $P < 0.001$ compared to the Ad-APN infected groups. ($n = 5$ per group)

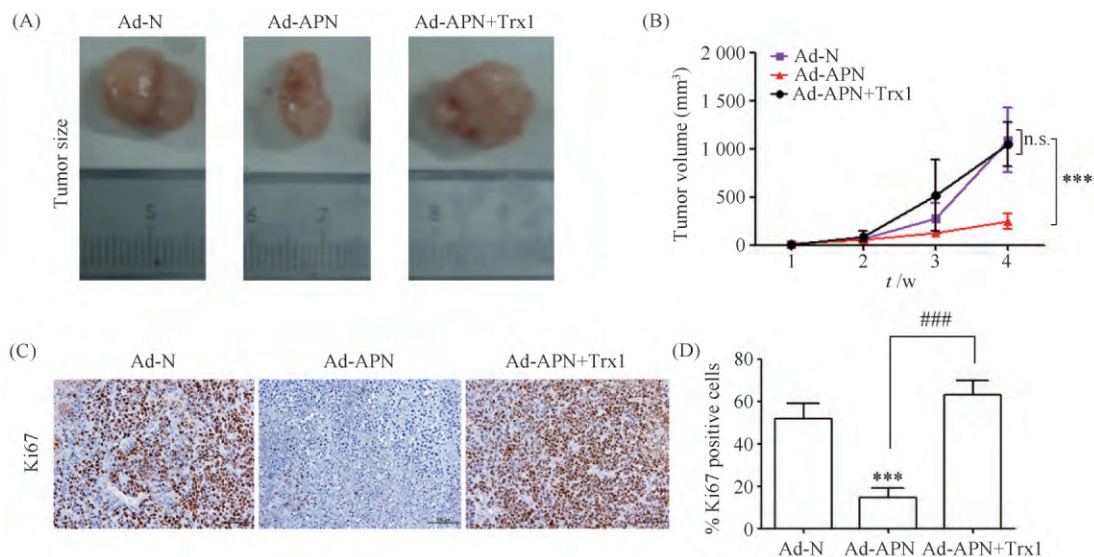


Fig. 3 Trx1 overexpression suppresses the inhibitory effects of adiponectin on xenograft tumor growth (A, B) Tumor growth was monitored by measuring tumor volume once a week. After 5 weeks injection, tumors were collected, measured, weighed and photographed. *** $P < 0.001$ compared to the Ad-N infected groups. (C) Tumor samples were subjected to immunohistochemistry analysis using a Ki67 antibody. Scale bar = 100 μ m and the percentages of positive cells of Ki67 were quantified in the graph (D). Data were expressed as mean \pm SD. *** $P < 0.001$ compared to the Ad-N infected groups. ### $P < 0.001$ compared to the Ad-APN infected groups. ($n = 5$ per group)

(Fig. 4C, D)。上述实验结果表明,过量表达的 Trx1 改变其与 APN 的负相关性,并通过凋亡途径抑制 APN 在肝癌中的作用。

3 讨论

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发生发

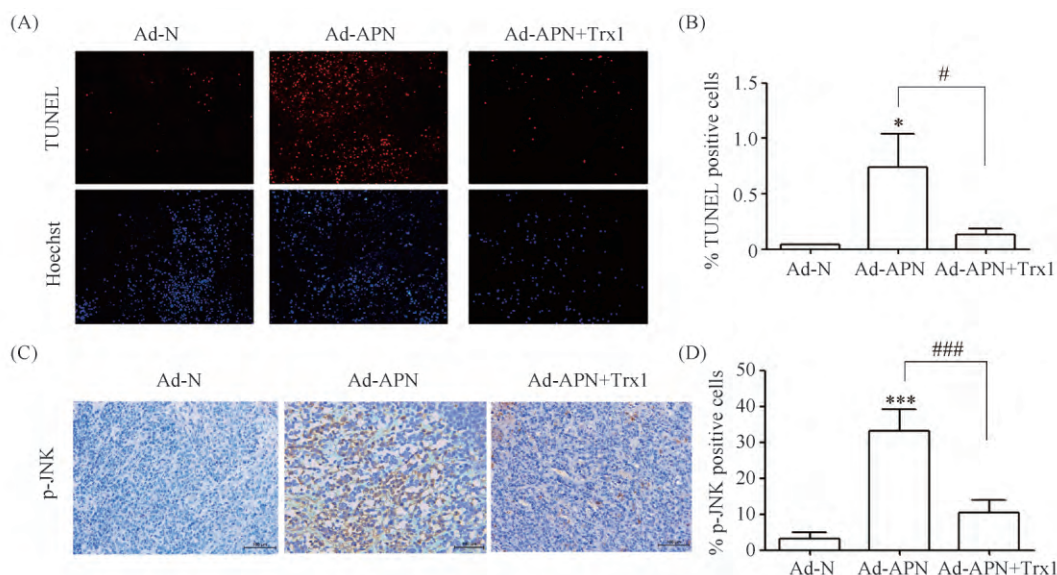


Fig.4 Trx1 overexpression reduces TUNEL positive cells and inhibits JNK activation induced by APN Tumor samples of HepG2 xenograft were subjected to immunohistochemistry by using TUNEL staining (A) and p-JNK antibody (C) . Scale bar = 100 μ m. Densitometric analyses of cell apoptosis by TUNEL-positive cells in each group (B) and the percentages of positive cells of p-JNK (D) were quantified and shown in the graph. Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared to the Ad-N infected groups. ### $P < 0.001$ compared to the Ad-APN infected groups. ($n = 5$ per group)

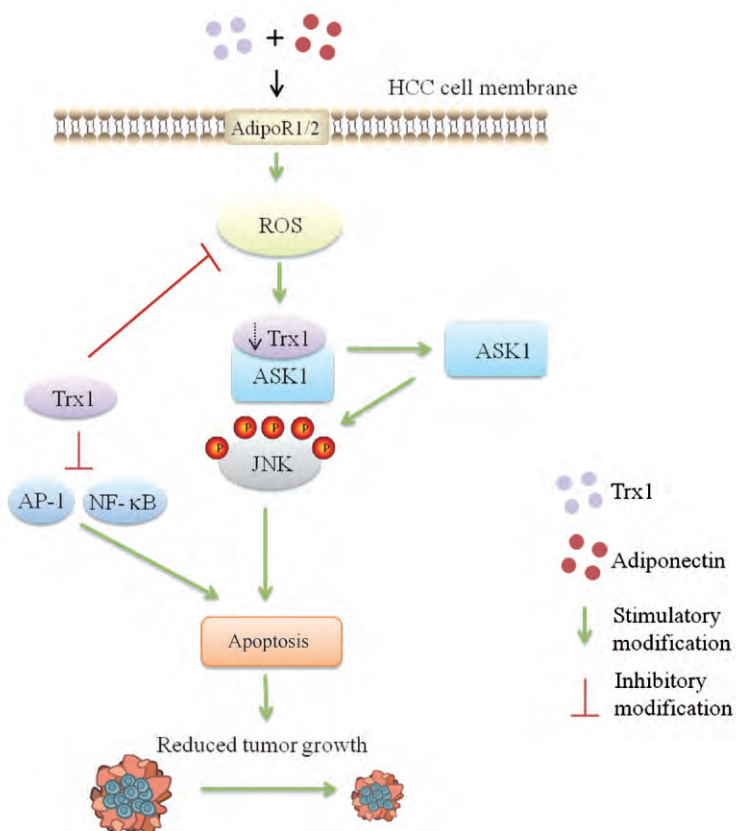


Fig.5 Schematic diagram of the correlation between Trx1 and APN in regulating tumor growth APN-induced apoptosis inhibited tumor growth through decreasing intratumoral Trx1 expression and activating ROS-ASK1-JNK signaling pathway. Overexpression of Trx1 abolished the activation of APN-induced MAPK signaling pathway and the activity of downstream transcription factors. The altered relationship resulted in significantly enhanced tumor growth *via* inhibition of cell apoptosis

展是一个复杂的生物学过程,其具体机制尚未完全阐明,如何找到有效的治疗靶点成为目前诸多研究的重点。已有研究表明,Trx1 和 APN 在不同肿瘤发生发展的过程中都发挥着重要的调控作用,调控这两种蛋白质的表达在癌症的治疗上具有十分重要的意义。

TCGA 数据库为目前最大的癌症基因信息数据库,是美国政府发起的癌症和肿瘤基因图谱计划。通过收集该数据库中大规模的肝癌患者肝癌组织和癌旁组织中的 Trx1 和 APN 的基因测序结果,并对其数据进行整理及统计学分析后发现,伴随着肝癌患者 TNM 分期的增加(T1-T4),即随着肝癌患者癌症恶性程度的增加,癌组织中 Trx1 的表达量逐渐增高,APN 的表达量逐渐降低,如 Fig. 1 B, C 所示。这与文献报道的在疾病状态及癌症患者血浆中检测到的 Trx1 和 APN 的变化趋势等结果相吻合^[14, 15]。此外,在肝癌进展过程中,Trx1 和 APN 在表达量上呈显著的负相关(Fig. 1D)。已有文献证实,APN 通过显著下调 Trx1/2 的表达,改变 Trx1 的氧化还原状态,并促进其核转位的发生,进而促进肝癌细胞的凋亡^[13]。这一结论则为本文实验结果提供更深入的理论支持。而依据 Trx1 和 APN 之间相关性及其对肝癌的调控作用,可以推测,在肝癌的进程中,抑制 APN 的活性可使 Trx1 的表达升高,进一步促进肝癌的恶性进程。但是,Trx1 和 APN 之间是如何互相调控的,这两者之间是否存在直接的相互作用等,尚还未见文献报道。Trx1 通过调控 CREB 和 Nrf1 等转录因子的活性^[16, 17],调控蛋白质与蛋白质之间的相互作用,以及参与调控翻译后的修饰等作用,发挥其对细胞内多种功能的调控,包括细胞生长、死亡以及炎症反应等^[18]。近年来更有文献报道,Trx1 不仅调控某些信号分子和转录因子的活性,还直接调控某些基因的 miRNA 水平^[19],从而发挥其对细胞生长的调控作用。本实验中发现,过量表达 Trx1 后,APN 对 Trx1 表达的抑制作用明显减弱(Fig. 2)。依据参考文献推测,过量表达的 Trx1 可能直接对 APN 的表达产生一定的影响,进而影响其下游的信号通路及对 Trx1 的抑制作用。但是,Trx1 具体是如何调控 APN 的表达还有待进一步研究。

APN 对多种恶性肿瘤包括肝癌的发病均有一定的抑制作用^[13]。但是,具体的调控机制还未完全阐明。AMPK-JNK-mTOR 是目前研究较多,且被认为是 APN 抑制癌症的重要的信号转导通路^[12],而 ROS 在该通路中也发挥着十分重要的作用。JNK 通

路的激活,ROS 的过量产生或者抗氧化系统的缺失,都会使机体氧化还原能力失衡,进而导致氧化应激,细胞功能和代谢发生紊乱,最终导致其细胞的不可逆损伤或死亡^[20-22]。目前,很多临床化疗药物,都是通过选择性增加肿瘤细胞内的 ROS 水平,发挥药物对癌细胞的抑制或杀伤作用,进而抑制癌症的进程。本实验中同样发现,在荷瘤鼠中注射 APN 后,肿瘤的生长速度受到明显的抑制(Fig. 3),这可能是通过 APN 介导的过量的 ROS 生成以及 Trx1 的表达降低实现的。而 ROS 除参与氧化应激的调节外,还可作为第二信使,通过氧化蛋白的氨基酸残基改变蛋白质的结构与功能,其更是促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族成员的重要激动剂^[23]。有文献报道,Trx1 表达量的下调和氧化还原状态的改变,都会促使 Trx1/ASK1 复合体的分离,释放出有活性的 ASK1,调节下游蛋白激酶 JNK 的活化程度^[13, 24],最终导致细胞凋亡的发生。这与本实验中所发现的,单独加入 APN 后,肝癌细胞中 TUNEL 阳性细胞数和 p-JNK 表达量明显升高,细胞凋亡水平增加(Fig. 4)的结果相一致。通过在裸鼠中同时过量表达 Trx1 和 APN 后,对 APN 在肝癌的促凋亡作用通路进行更为深入的研究,并且发现,过量表达的 Trx1 通过改变与 APN 的负相关性,减弱 APN 对 Trx1 表达的抑制作用。而恢复至正常水平的 Trx1 则通过抑制 ROS 的过量生成及其介导的 JNK 磷酸化水平的增高,抑制 APN 诱导的肝癌细胞的凋亡。

综上所述,本研究通过对大规模肝癌患者组织标本数据进行分析及在荷瘤鼠中过量表达 Trx1 和 APN 后,对二者间的相关性及在肝癌发展中的作用进行了进一步的研究,如 Fig. 5 所示。过量表达的 Trx1 通过抑制 APN 引起的 ROS-ASK1-JNK 通路的激活,抑制细胞凋亡^[25];另外,APN 通过抑制 Trx1 表达并促进其向细胞核内转移,诱导肝癌细胞凋亡^[13]。进入核内的 Trx1 则进一步抑制转录因子 NF- κ B 以及 AP-1 的活化,抑制细胞的凋亡^[26]。即过量表达的 Trx1 改变其与 APN 的负相关性后,通过抑制 ROS 的产生和对核转录因子的调控,使 APN 对肝癌细胞生长的抑制作用明显减弱或消失。以上结果提示,调控 Trx1 和 APN 的表达相关性可能对肝癌的治疗起到十分重要的作用。本文通过过量表达 Trx1 进一步对 APN 抑制肝癌的分子机制进行研究,希望为临床肝癌的治疗提供更为全面有效的理论依据。

参考文献(References)

- [1] 高卫, 谷利, 杨荟敏, 等. 硫氧还蛋白-1 (Trx1) 氧化还原状态的检测[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Gao W, Gu L, Yang HM, *et al.* Assay for thioredoxin-1 (Trx1) redox state [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2010, **26**(4): 374-379
- [2] Esen H, Erdi F, Kaya B, *et al.* Tissue thioredoxin reductase-1 expression in astrocytomas of different grades [J]. J Neurooncol, 2015, **121**(3): 451-458
- [3] Gu L, Gao W, Yang HM, *et al.* Control of Trx1 redox state modulates protection against methyl methanesulfonate-induced DNA damage via stabilization of p21 [J]. J Biochem, 2016, **159**(1): 101-110
- [4] Kondo N, Nakamura H, Masutani H, *et al.* Redox regulation of human thioredoxin network [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, **8**(9-10): 1881-1890
- [5] Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, *et al.* Overexpression of redox-active protein thioredoxin-1 prevents development of chronic pancreatitis in mice [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, **8**(9-10): 1835-1845
- [6] Nissom PM, Lo SL, Lo JC, *et al.* Hcc-2, a novel mammalian ER thioredoxin that is differentially expressed in hepatocellular carcinoma [J]. FEBS Lett, 2006, **580**(9): 2216-2226
- [7] Cunnea P, Fernandes AP, Capitano A, *et al.* Increased expression of specific thioredoxin family proteins; a pilot immunohistochemical study on human hepatocellular carcinoma [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007, **20**(1): 17-24
- [8] Miyazaki K, Noda N, Okada S, *et al.* Elevated serum level of thioredoxin in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Biotherapy, 1998, **11**(4): 277-288
- [9] Yue L, Zhao L, Liu H, *et al.* Adiponectin protects against glutamate-induced excitotoxicity via activating SIRT1-dependent PGC-1 α expression in HT22 hippocampal neurons [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, **2016**: 2957354
- [10] Xiao Y, Deng T, Shang Z, *et al.* Adiponectin inhibits oxidization-induced differentiation of T helper cells through inhibiting costimulatory CD40 and CD80 [J]. Braz J Med Biol Res, 2017, **50**(6): e6227
- [11] 张同梅. 脂联素与多种疾病关系的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志 (Zhang TM. Progress on relationship between adiponectin and various diseases [J]. Pract J Cardiac Cereb Pneum Vasc Dis), 2015, **23**(2): 4-7
- [12] Saxena NK, Fu PP, Nagalingam A, *et al.* Adiponectin modulates C-jun N-terminal kinase and mammalian target of rapamycin and inhibits hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2010, **139**(5): 1762-1773
- [13] Xing SQ, Zhang CG, Yuan JF, *et al.* Adiponectin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma through differential modulation of thioredoxin proteins [J]. Biochem Pharmacol, 2015, **93**(2): 221-231
- [14] Jung SH, Kim SM, Lee CE. Mechanism of suppressors of cytokine signaling 1 inhibition of epithelial-mesenchymal transition signaling through ROS regulation in colon cancer cells: suppression of Src leading to thioredoxin up-regulation [J]. Oncotarget 2016, **7**(38): 62559-62571
- [15] 解寒冰, 夏云展, 薛建锋, 等. 脂联素在结直肠癌患者中的表达及其对结直肠癌细胞增殖和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志 (Xie HB, Xia YZ, Xue JF, *et al.* Expression of adiponectin in patients with colorectal cancer and its influence on colorectal cancer cell proliferation and caspase-3 expression [J]. China J Mod Med), 2016, **26**(19): 47-51
- [16] Chiueh CC, Andoh T, Chock PB. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, **1042**: 403-418
- [17] Ago T, Yeh I, Yamamoto M, *et al.* Thioredoxin1 upregulates mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation and TCA cycle in the heart [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, **8**(9-10): 1635-1650
- [18] Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins [J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2001, **30**: 421-455
- [19] Yang Y, Ago T, Zhai P, *et al.* Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7 [J]. Circ Res, 2011, **108**(3): 305-313
- [20] Sook SH, Lee HJ, Kim JH, *et al.* Reactive oxygen species-mediated activation of AMP-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase plays a critical role in beta-sitosterol-induced apoptosis in multiple myeloma U266 cells [J]. Phytother Res, 2014, **28**(3): 387-394
- [21] Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, *et al.* Involvement of the JAK-STAT pathway and SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells [J]. J Cell Biochem, 2010, **111**(3): 597-606
- [22] Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, *et al.* Globular adiponectin-induced RAW 264 apoptosis is regulated by a reactive oxygen species-dependent pathway involving Bcl-2 [J]. Free Radic Biol Med, 2009, **46**(9): 1308-1316
- [23] 李梦, 钱海兵. ROS-MAPK 信号通路心肌纤维化的研究进展[J]. 长春中医药大学学报 (Li M, Qian HB. Research progress on ROS-mediated MAPK signaling pathway and myocardial fibrosis [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med), 2017, **33**(1): 166-168
- [24] Gu L, Gao W, Yang HM, *et al.* Control of Trx1 redox state modulates protection against methyl methanesulfonate-induced DNA damage via stabilization of p21 [J]. J Biochem, 2016, **159**(1): 101-110
- [25] Zhang R, Al-Lamki R, Bai L, *et al.* Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner [J]. Circ Res, 2004, **94**(11): 1483-1491
- [26] 徐涛, 于涛. 硫氧还蛋白在凋亡途径中的作用机制[J]. 中国比较医学杂志 (Xu T, Yu T. Mechanism of thioredoxin in the process of apoptosis [J]. Chin J Comp Med), 2012, **22**(11): 73-77