

## 缺氧对宫颈癌 SiHa 细胞中 Gli1 与 Sox2 表达的影响

朱长吉, 刘兴哲, 玄延花

(延边大学医学院病理教研室, 吉林 延吉 133002)

**[摘要]** **目的:** 分析胶质瘤相关癌基因同源物 1 (Gli1) 和性别决定区 Y 框蛋白 2 (Sox2) 在宫颈癌细胞中的表达及其病理学意义, 探讨 Gli1 与宫颈癌干性特征的相关性。**方法:** 采用免疫组织化学染色方法检测 159 例宫颈癌组织中 Gli1、缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、Sox2、性别决定区 Y 框蛋白 9 (Sox9)、分化簇 44 (CD44)、八聚体结合转录因子 4 (OCT4) 和赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (LSD1) 的表达并分析其相关性; 使用基因表达谱数据动态分析 (GEPIA) 明确 Gli1 对宫颈癌状细胞患者预后的影响及其与干细胞标志物的相关性; 缺氧条件下检测 SiHa 细胞的球体形成能力及其干细胞标志物表达。**结果:** 免疫组织化学染色, 在宫颈癌组织中 Gli1 表达率与 HIF-1 $\alpha$  ( $r=0.374$ ,  $P<0.001$ ) 和 Sox2 表达水平 ( $r=0.176$ ,  $P<0.05$ ) 呈正相关关系; GEPIA 数据库分析, 宫颈癌中 Gli1 阳性表达的患者预后差 ( $P<0.05$ )。缺氧条件下 SiHa 细胞中 Gli1、HIF-1 $\alpha$  和 Sox2 的 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.001$ ), 且具有较强的球体形成能力。**结论:** 缺氧上调宫颈癌细胞 Gli1 和 Sox2 mRNA 及蛋白表达水平, 促进癌细胞的干性特征形成。

**[关键词]** 宫颈肿瘤; 胶质瘤相关癌基因同源物 1; 缺氧; 干性; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标志码]** A

## Effect of hypoxia on expressions of Gli1 and Sox2 in cervical cancer SiHa cells

ZHU Changji, LIU Xingzhe, XUAN Yanhua

(Department of Pathology, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133002, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To analyze the expressions of glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli1) and sex determining region Y 2 (Sox2) in the cervical cancer cells and their pathological significances, and to discuss the correlation between the expression of Gli1 and the stemness characteristics of the cervical cancer. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of Gli1, hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ), Sox2, sex determining region Y 9 (Sox9), cluster of differentiation 44 (CD44), octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), and lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in 159 cases of cervical cancer tissues and their correlations were analyzed. Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) was used to clarify the effect of Gli1 expression on the prognosis of the patients with cervical carcinoma and its correlation with the stem cell markers. The sphere-forming ability and the expression of stem cell markers in the SiHa cells under hypoxic status were detected. **Results:** The immunohistochemical staining results showed that the expression rate of Gli1 in cervical cancer tissue was positively correlated with the expression level of HIF-1 $\alpha$  ( $r=0.374$ ,  $P<0.001$ ) and the expression level of

[收稿日期] 2023-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160594)

[作者简介] 朱长吉 (1991-), 男, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤分子病理学方面的研究。

[通信作者] 玄延花, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: xuanyh1@ybu.edu.cn)

Sox2 ( $r=0.176$ ,  $P<0.05$ ). The GEPIA Database analysis results showed that the cervical cancer patients with positive Gli1 expression had poor prognosis ( $P<0.05$ ). Under hypoxic status, the expression levels of Gli1, HIF-1 $\alpha$ , and Sox2 mRNA and proteins in the SiHa cells were significantly increased ( $P<0.001$ ), and the cells exhibited a strong sphere-formation ability. **Conclusion:** Hypoxia upregulates the expression levels of Gli1 and Sox2 mRNA and protein in the cervical cancer cells, and promotes the formation of stemness characteristics of the cancer cells.

**KEYWORDS** Cervical neoplasm; Glioma-associated oncogene homolog 1; Hypoxia; Stemness; Hypoxia-inducible factor 1-alpha

宫颈癌在全球女性常见癌症中排名第 3 位<sup>[1]</sup>, 是全球女性死亡的主要原因之一, 高居女性生殖系统相关死亡的第 1 位, 每年约有 53 万宫颈癌新发病例及 27.5 万因宫颈癌死亡病例<sup>[2-3]</sup>。我国每年约有 13 万宫颈癌新发病例, 年轻女性宫颈癌发病率和死亡率的上升趋势尤为显著<sup>[1, 4]</sup>。宫颈癌的复发和转移与肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 密切相关, 这是导致患者预后较差的重要因素<sup>[3, 5]</sup>。在实体瘤细胞及大部分肿瘤组织中, 缺氧可维持或增强肿瘤细胞的干性特征, 促进肿瘤的恶性进展和耐药<sup>[6]</sup>。其中缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 主要参与调控内皮细胞增殖、迁移和肉芽组织形成, 调节肿瘤组织的新陈代谢、肿瘤细胞的增殖及血管生成、肿瘤的侵袭和转移<sup>[7-9]</sup>。刺猬信号通路 (Hedgehog, Hh) 通过调节相关基因调控肿瘤发生发展各个阶段, 其中胶质瘤相关癌基因同源物 1 (glioma-associated oncogene homolog 1, Gli1) 作为 Hh 通路的重要转录因子, 可诱导肿瘤的发生并参与调控胶质瘤 CSCs 和内源性脑干细胞的生长及增殖, 并且 Gli1 可能是食管鳞状细胞癌、肺鳞癌和乳腺导管癌潜在的干细胞标志物<sup>[10]</sup>。先前研究<sup>[5, 10-14]</sup>表明: Gli1 在乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、前列腺癌和结肠直肠癌组织中均高表达, 是判定患者预后的独立因素, 且与性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex determining region Y2, Sox2)、性别决定区 Y 框蛋白 9 (sex determining region Y9, Sox9)、分化簇 44 (cluster of differentiation, CD44) 和赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (lysine-specific demethylase 1, LSD1) 等干性相关标志物及 HIF-1 $\alpha$  呈正相关关系<sup>[5, 10-14]</sup>, 但研究并未探讨缺氧条件下 Gli1 蛋白及干性标志物的表达情况。目前, Gli1 在宫颈癌中的表达与干性特征以及缺氧之间的相关关系尚不清楚。本研究探讨 Gli1 蛋白对宫颈癌发生和预后的影响, 分析 Gli1 蛋白表达与宫颈癌干细胞标志物以及缺氧的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 41 例正常宫颈上皮组织、19 例宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I/II 级和 110 例 CIN III 级及 159 例宫颈癌组织标本来自上海芯超生物科技有限公司以及延边大学附属医院病理科 1996—2006 年诊断并行锥形切除或子宫切除的组织蜡块存档标本。组织病理学 CIN 分级参照 Richart 标准: CIN I 级、CIN II 级和 CIN III 级。本研究获得延边大学科技伦理委员会的批准 (伦理批号: YD20231027007)。组织标本常规苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色观察, 选取适当蜡块进行免疫组织化学染色。

**1.2 细胞、主要试剂和仪器** 人宫颈癌 SiHa 细胞购自美国标准细胞库 (American Type Culture Collection, ATCC); Gli1 (ab151796)、Sox2 (ab97959)、Sox9 (ab185966)、LSD1 (ab62582)、CD44 (ab51037)、八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4) (ab181557) 和 actin (ab8277) 抗体购自英国 Abcam 公司, HIF-1 $\alpha$  (2136621) 抗体购自美国 Millipore 公司, RIPA 裂解液、聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)、双吡啶甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒和免疫组织化学试剂盒购自上海碧云天公司, TE 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司); 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: nexus), 和 Western blotting 电泳系统及凝胶成像仪 (型号: Power Pac) 购自美国 Bio-Rad 公司, TRIzol 试剂和反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 激光共聚焦显微镜购自日本尼康株式会社。

**1.3 免疫组织化学染色检测正常宫颈组织和宫颈癌组织中 Gli1、HIF-1 $\alpha$  及干细胞相关标志物 Sox2、Sox9、CD44、OCT4 和 LSD1 的表达** 常规脱蜡和水化后, 切片用 98 °C 的 Tris-EDTA 缓冲液

(pH9.2) 进行抗原修复。Gli1、HIF-1 $\alpha$ 和干细胞相关标志物 Sox2、Sox9、CD44、OCT4和LSD1一抗室温孵育2 h, 抗鼠/兔二抗与组织标本在室温下孵育1 h, 使用显色剂3, 3-二氨基联苯胺对组织标本进行染色。染色结果按阳性细胞所占百分比和阳性细胞着色强度分别计分: 阳性细胞数所占百分比 $\leq 25\%$ 计为1分,  $\leq 26\% \sim 50\%$ 计为2分,  $< 51\% \sim 75\%$ 为3分,  $\geq 76\%$ 计为4分; 细胞着色淡黄色计为1分, 棕黄色计为2分, 棕褐色计为3分。将2项得分的乘积作为最终评分, 总分 $< 4$ 分为阴性,  $\geq 4$ 分为阳性。

**1.4 细胞培养及分组** SiHa细胞常氧状态下置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中, SiHa细胞缺氧状态下置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$ 和94%  $\text{N}_2$ 的培养箱中, 用含10%胎牛血清、100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素G和100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的DMEM培养液培养。细胞分为常氧条件和缺氧条件组。

**1.5 RT-qPCR法检测不同的缺氧时间宫颈癌细胞中HIF-1 $\alpha$ 、Gli1及干细胞相关标志物mRNA表达水平** 使用TRIzol法提取细胞中的RNA, 并用反转录试剂盒反转录为cDNA。反转录条件: 37  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 4  $^{\circ}\text{C}$ 进行保存。按照表1所示, 设计Gli1、HIF-1 $\alpha$ 和干细胞相关标志物引物, 进行RT-qPCR法扩增, 扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共计35个循环, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因mRNA的表达情况。

**1.6 Western blotting法检测不同缺氧时间宫颈癌细胞中HIF-1 $\alpha$ 和Gli1及干细胞相关标志物蛋白表达水平** 用含苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的RIPA缓冲液裂解肿瘤细胞检测缺氧0、24和48 h条件下Gli1、HIF-1 $\alpha$ 、Sox2和 $\beta$ -actin的蛋白表达水平。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶分离相同数量的蛋白, 电泳后将蛋白转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶在室温条件下封闭2 h, 然后与Gli1、HIF-1 $\alpha$ 和Sox2蛋白及 $\beta$ -actin抗体孵育2 h。二抗孵育2 h后, 使用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒显影。使用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带

表1 目的基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of target genes

Target gene	Sequence(5'-3')
HIF-1 $\alpha$	F:TTGCTCATCAGTTGCCACTTCC R:AGCAATTCATCTGTGCTTTCATGTC
Gli1	F:TCTGTGATGGGCAATGGTCT R:TCTGGGGTGGGATCAGGATA
Sox2	F:ATGCACCGCTACGACGTGA R:CTTTTGCACCCCTCCATT
Sox9	F-GAGGCCACGGAACAGACTCA R-CAGCGCCTTGAAGATAGCATT
CD44	F:CCAAGATGATCAGCCATTCTGG R-AAGACATCTACCCAGCAAC
OCT4	F-CAGAAGGGCAAGCGATCAAG R-GGGCCAGAGGAAAGGACACT
LSD1	F-CTGTGCTTGTCCACCGAGTT R:ACCTGTTACCACCATGGCTC

灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.7 球体形成实验检测球体形成能力** SiHa细胞在常氧或缺氧环境下用含有20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  EGF, 10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  bFGF和2% B27的无血清DMEM培养液培养。2周后用显微镜观察细胞形态和大小, 根据计数直径 $\geq 100 \mu\text{m}$ 的肿瘤球体数, 代表球体形成能力。

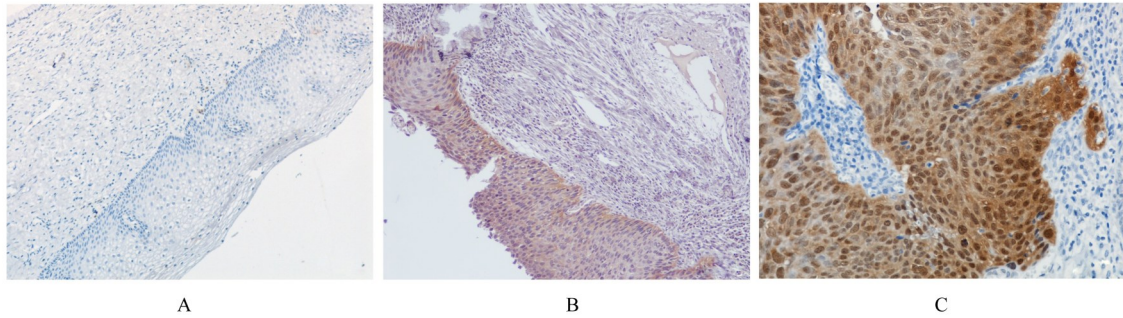
**1.8 基因表达谱数据动态分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)网站分析Gli1表达水平和宫颈癌患者生存率及干细胞标志物关系** 利用GEPIA网站分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中Gli1表达水平与宫颈癌患者生存率的关系, 以及其与干细胞标志物 Sox2、Sox9、LSD1、CD44和OCT4的相关关系。

**1.9 统计学分析** 采用SPSS 25.0统计软件进行统计学分析。免疫组织化学法和Western blotting法的量化结果符合正态分布且方差齐性, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本 $t$ 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK- $q$ 检验。采用Spearman相关性分析进行相关性分析。Kaplan-Meier法测定总生存率(overall survival rate, OS), 并采用Log-rank进行比较。所有实验重复3次。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 正常组织、CIN 组织和宫颈鳞状细胞癌组织中 Gli1 蛋白表达** 观察 Gli1 蛋白在宫颈正常组织、CIN 组织及宫颈鳞状细胞癌组织中的蛋白表达, 结

果显示: Gli1 蛋白在正常组织和 CIN 组织中主要表达于胞质, 在宫颈鳞状细胞癌组织中主要表达于胞核和胞质 (图 1)。与正常组织比较, CIN Ⅲ 级组织和宫颈鳞状细胞癌组织中 Gli1 蛋白阳性表达率升高, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (表 2)。



A: Normal cervical tissue; B: CIN Ⅲ tissue; C: Cervical cancer tissue.

图 1 Gli1 在正常宫颈组织、CIN Ⅲ 组织和宫颈鳞状细胞癌组织中的表达 (Bar=100 μm)

Fig. 1 Expression of Gli1 in normal cervical mucosa tissue, CIN Ⅲ tissue, and cervical squamous cell carcinoma tissue (Bar=100 μm)

表 2 Gli1 蛋白表达与宫颈病理诊断的关系

Tab. 2 Correlation between expression of Gli1 protein and cervical pathological diagnosis [n(η/%)]

Pathological diagnosis	n	Gli1(-)	Gli1(+)	$\chi^2$	P
Normal	41	28(68.3)	13(31.7)	5.322	0.150
CIN I/II	19	13(68.4)	6(31.6)		
CIN Ⅲ	110	46(41.8)	64(58.2)		
Squamous cell carcinoma	159	91(57.2)	68(42.8)		

**2.2 Gli1 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理特征及预后的关系** 在宫颈鳞状细胞癌组织中 Gli1 蛋白表达与患者年龄和淋巴结是否转移无关 ( $P>0.05$ ) (表 3)。生物信息库 GEPIA 分析结果显示: 高表达 Gli1 蛋白的宫颈癌患者生存率明显低于低表达 Gli1 蛋白患者 ( $P<0.05$ ) (图 2), 表明高表达 Gli1 蛋白的宫颈癌患者预后不良。

表 3 Gli1 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系

Tab. 3 Correlation between expression of Gli1 protein and clinicopathological features of patients with cervical squamous cell carcinoma [n(η/%)]

Variable	Total specimens(%)	Gli1(-)	Gli1(+)	$\chi^2$	P
Age(year)				0.301	0.583
<35	28(17.6)	15(53.6)	13(46.4)		
≥35	131(82.4)	78(59.5)	53(40.5)		
Lymphnode metastasis				2.287	0.130
Negative	121(76.1)	75(62.0)	46(38.0)		
Positive	38(23.9)	34(89.5)	4(10.5)		
Stage				8.396	0.039
I	75(47.2)	39(52.0)	36(48.0)		
II	22(13.8)	13(59.1)	9(40.9)		
III	34(21.4)	30(88.2)	4(11.8)		
IV	28(17.6)	11(39.3)	17(60.7)		

**2.3 宫颈癌组织中 Gli1 与肿瘤干细胞标志物表达的相关性** 宫颈癌组织中 Gli1 蛋白表达与 Sox2 的

表达呈正相关关系 ( $r=0.176$ ,  $P<0.05$ ); 与 Sox9、CD44、OCT4 (POU5F1) 和 LSD1

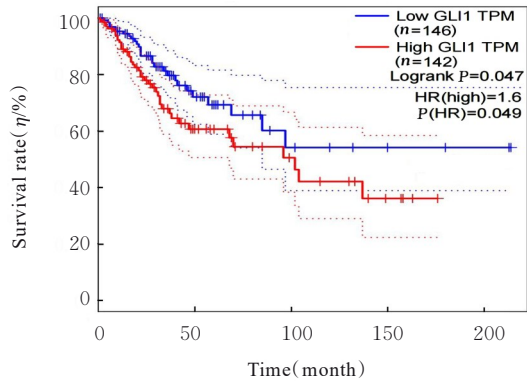


图2 低和高表达Gli1蛋白的宫颈鳞状细胞癌患者生存曲线

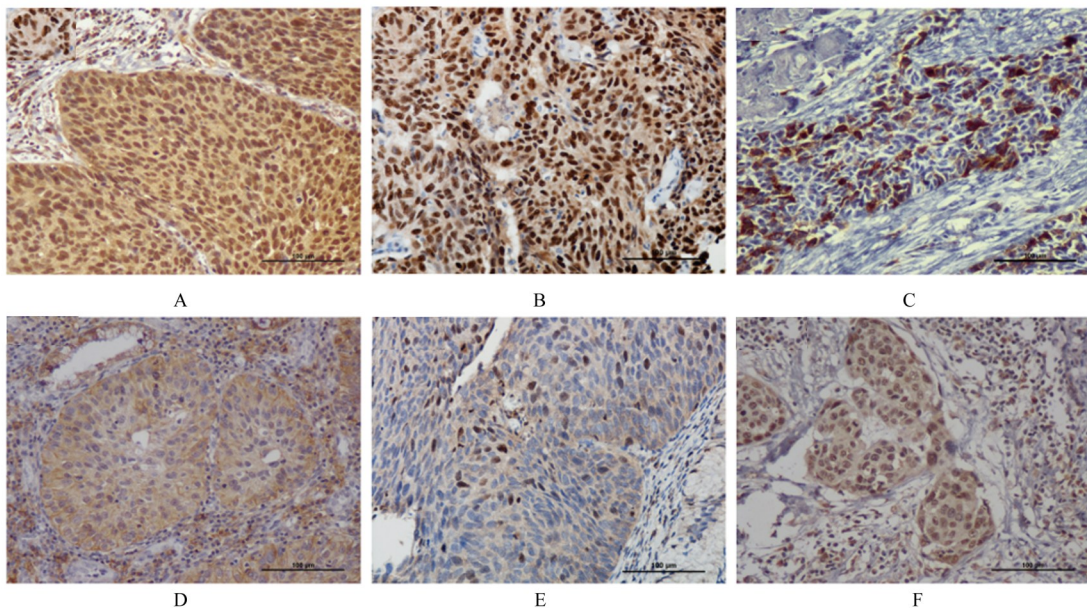
Fig. 2 Survival curves of cervical squamous cell carcinoma patients with low and high expressions of Gli1 protein

(KDM1A) 表达无相关性(图3和表4)。GEPIA

分析结果显示:宫颈癌组织中Gli1 mRNA表达水平与Sox2的mRNA表达水平呈正相关关系( $P < 0.05$ ),而与Sox9、CD44、OCT4和LSD1的mRNA表达水平无相关性( $P > 0.05$ )(图4)。

**2.4 不同缺氧时间宫颈癌细胞中HIF-1 $\alpha$ 、Gli1和干细胞标志物mRNA及蛋白表达水平** 缺氧24 h时SiHa细胞中HIF-1 $\alpha$ 和Gli1及干细胞标志物Sox2、Sox9、CD44、OCT4和LSD1的mRNA表达水平随着时间的延长而递增。缺氧48 h时HIF-1 $\alpha$ 、Gli1和Sox2 mRNA及蛋白表达水平较缺氧0 h组明显升高( $P < 0.001$ )。见图5和6。

**2.5 常氧/缺氧条件下SiHa肿瘤球体的数量** 球体形成实验检测结果显示:缺氧条件下SiHa细胞球体的形成数量较常氧状态下明显增多( $P < 0.001$ )(图7)。



A: Expression of Gli1 protein; B: Expression of Sox2 protein; C: Expression of Sox9 protein; D: Expression of CD44 protein; E: Expression of OCT4 protein; F: Expression of LSD1 protein.

图3 宫颈癌组织中Gli1蛋白和干细胞标志物的表达(免疫组织化学, Bar=100  $\mu$ m)

Fig. 3 Expressions of Gli1 protein and stem cell markers in cervical cancer tissue(Immunohistochemistry, Bar = 100  $\mu$ m)

**2.6 宫颈癌组织中Gli1蛋白表达与HIF-1 $\alpha$ 、Sox2、Sox9、CD44和OCT4表达的关系** 缺氧48 h时SiHa细胞中HIF-1 $\alpha$ 的mRNA和蛋白表达水平较缺氧0 h组明显升高( $P < 0.001$ )。宫颈癌组织中HIF-1 $\alpha$ 阳性表达率与Gli1蛋白(63.0%, 58/92;  $r = 0.374$ ,  $P < 0.001$ )及干细胞标志物Sox2(80.0%, 44/55;  $r = 0.294$ ,  $P < 0.001$ )、Sox9

(72.9%, 35/48;  $r = 0.216$ ,  $P = 0.016$ )、CD44(68.3%, 56/82;  $r = 0.189$ ,  $P = 0.029$ )和OCT4(71.9%, 46/64;  $r = 0.248$ ,  $P = 0.005$ )表达水平呈正相关关系。见表5和6。

### 3 讨论

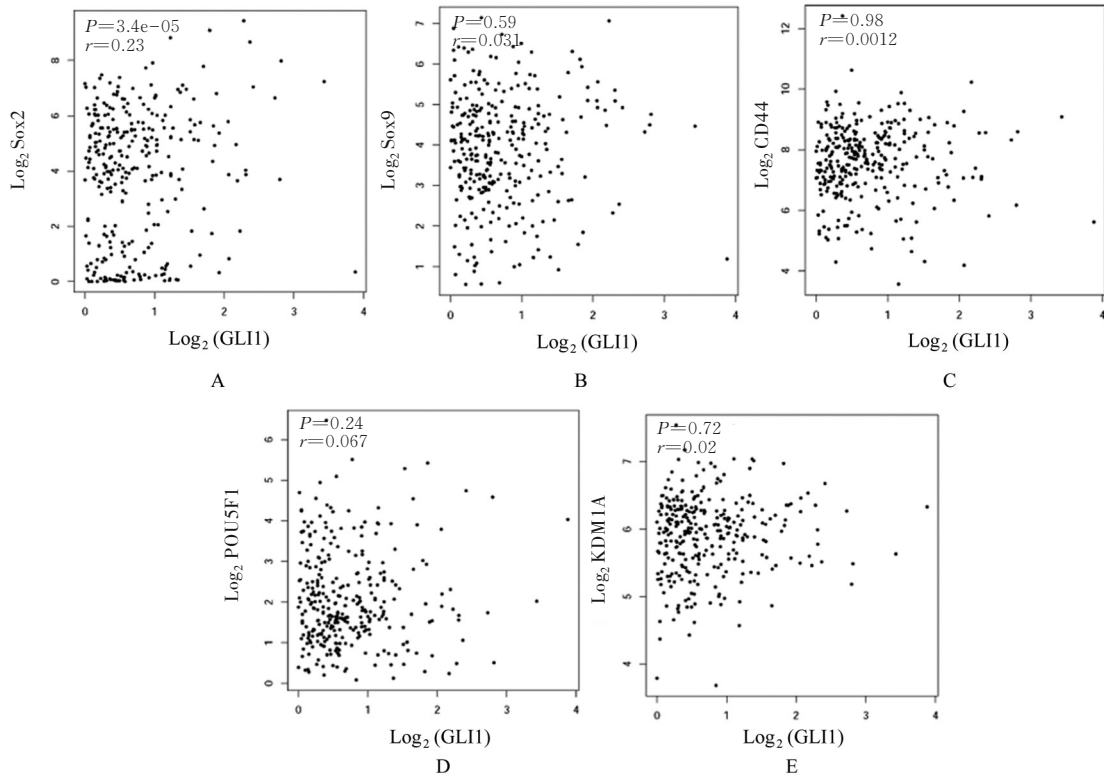
全球95%宫颈癌是由人乳头瘤病毒(helium pressure vessel, HPV)感染引起的<sup>[15]</sup>, 宫颈癌患

表4 宫颈癌组织中 Gli1 蛋白与干细胞标志物表达的关系

Tab. 4 Correlation between expression of Gli1 protein and expressions of stem cell markers in cervical cancer tissue

[n( $\eta$ /%)]

Variable	Total specimens	Gli1(-)	Gli1(+)	$\chi^2$	$r$	$P$
Sox2						
Negative	104(65.4)	70(67.3)	34(32.7)	4.834	0.176	0.028
Positive	55(34.6)	16(29.1)	39(70.9)			
Sox9						
Negative	111(69.8)	63(56.8)	48(43.2)	1.244	0.091	0.265
Positive	48(30.2)	23(47.9)	25(52.1)			
CD44						
Negative	77(48.4)	42(54.5)	35(45.5)	0.705	0.063	0.401
Positive	82(51.6)	43(52.4)	39(47.6)			
OCT4						
Negative	95(59.7)	53(55.8)	42(44.2)	0.516	0.057	0.473
Positive	64(40.3)	32(50.0)	32(50.0)			
LSD1						
Negative	77(48.4)	37(48.1)	40(51.9)	1.498	0.128	0.221
Positive	82(51.6)	48(58.5)	34(41.5)			



A: Correlation between Gli1 and Sox2; B: Correlation between Gli1 and Sox9; C: Correlation between Gli1 and CD44; D: Correlation between Gli1 and OCT4; E: Correlation between Gli1 and LSD1.

图4 宫颈癌组织中 Gli1 蛋白表达与干细胞标志物的关系

Fig. 4 Correlation between expression of Gli1 protein and stem cell markers in cervical cancer tissue

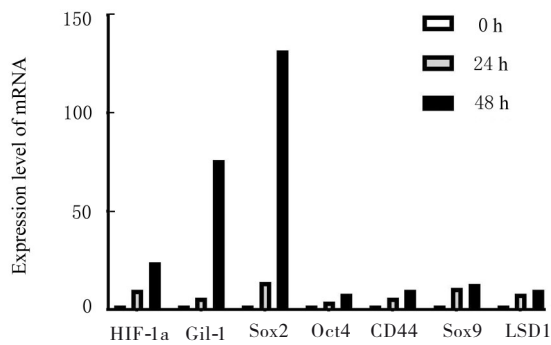
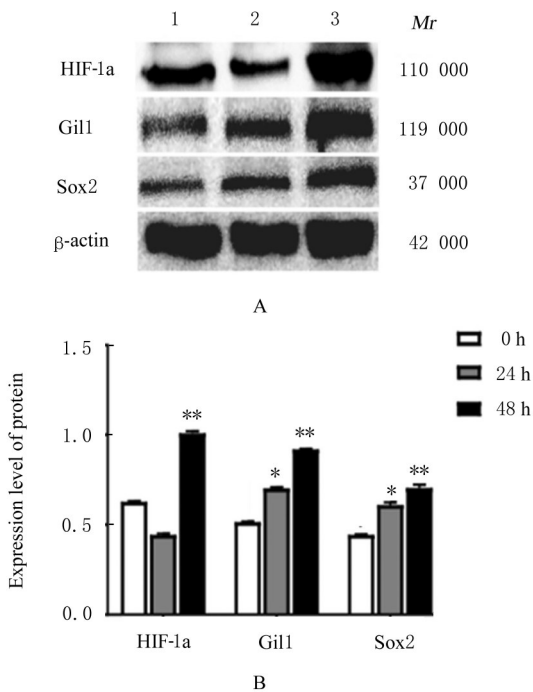


图5 缺氧状态下SiHa细胞中Gli1和HIF-1 $\alpha$ 及干细胞标志物的mRNA表达水平

Fig. 5 Expression levels of Gli1, HIF-1 $\alpha$  and stem cell markers mRNA in SiHa cells under hypoxia status



Lane 1: 0 h; Lane 2: 24 h; Lane 3: 48 h. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with normoxia group.

图6 缺氧状态下SiHa细胞中Gli1和HIF-1 $\alpha$ 及干细胞标志物的蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Gli1, HIF-1 $\alpha$ , and stemness cell marker proteins in SiHa cells under hypoxia status

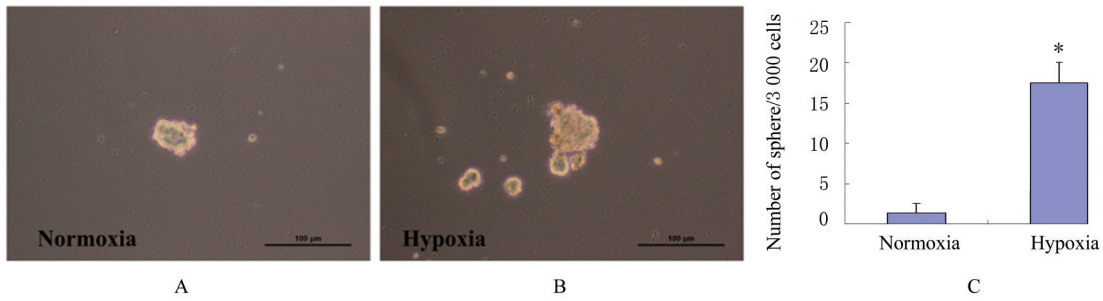
者中有50%以上存在HPV16型感染<sup>[1]</sup>。研究<sup>[16-17]</sup>表明:Hh信号通路分子中音猬因子(sonic hedgehog, Shh)和Gli1蛋白的表达与HPV16型感染密切相关。Gli1蛋白是Hh信号传导的主要效应因子,其中Gli1作为一种转录活性很高的激活因子

常与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[16]</sup>。当Gli1异常活化时,常与肿瘤发生、细胞增殖分化、上皮间质转化、侵袭转移及预后不良相关<sup>[18-20]</sup>。Gli1作为促癌基因在许多类型的癌症中高表达,如非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌和结肠癌<sup>[21-22]</sup>。何焯等<sup>[23]</sup>研究发现:Gli1在宫颈癌中高表达并与TNM分期、分化程度和淋巴结转移有关联,而与年龄无关。本研究结果显示:Gli1蛋白在CIN III和宫颈癌组织中高表达,但差异无统计学意义。GEPIA分析结果显示:Gli1蛋白高表达的宫颈癌患者与较差的生存率密切相关,表明Gli1可能是判定宫颈癌患者不良预后的有效指标。

宫颈癌的复发率为35%,肿瘤复发与CSCs较高的化疗耐药性、DNA修复和自我更新能力等密切相关<sup>[24]</sup>。因此,研究宫颈癌CSCs是了解肿瘤生长、复发、转移和化疗耐药的必要步骤。CSCs是一群具有较强自我更新能力和侵袭迁移能力的细胞,对肿瘤细胞的存活、增殖、转移和复发有着至关重要的作用。本课题组先后研究了Gli1在乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、前列腺癌和结直肠癌中与干性特征基因的相关关系,发现各种肿瘤组织中Gli1蛋白表达与干性特征标志物表达均存在密切关联<sup>[5, 10-14]</sup>。本研究结果显示:宫颈癌组织中Gli1蛋白表达与Sox2呈正相关关系,表明Gli1蛋白也是肿瘤干细胞的一种标志物。

HIF-1转录因子促进癌症中CSC的形成和扩增<sup>[25]</sup>。球体形成能力是CSCs体外鉴定的一个重要方法,其判断的是单个细胞在合适的条件培养基中自我更新的能力,成球的大小及数目是衡量肿瘤细胞干性的金标准<sup>[25]</sup>。本研究结果显示:缺氧状态提高了宫颈癌细胞的球体形成能力,增加了宫颈癌细胞中干细胞标志物Sox2、Sox9、CD44、OCT4和LSD1 mRNA表达水平,并且随着缺氧时间的延长SiHa细胞中Gli1和Sox2的蛋白表达水平也升高。因此,在缺氧状态下Gli1可能通过Sox2促进宫颈癌细胞具有干性特征,但Gli1调控肿瘤干细胞的机制有待进一步研究。

综上所述,在宫颈癌中Gli1与干细胞标志物的表达以及患者的生存率密切相关,并且缺氧状态促进Gli1和Sox2的表达。因此,Gli1在宫颈癌发生、发展及预后判定中起重要作用。



A: Normoxia status; B: Hhypoxia status; A, B: Bar=100 μm; C: Number of shpere, \*P<0.001 compared with normoxia group.

图7 常氧/缺氧状态下 SiHa 细胞的球体形成的情况

Fig. 7 Shpere formation of SiHa cells under normoxia and hypoxia status

表5 宫颈鳞状细胞癌组织中 HIF-1α 蛋白与 Gli1 蛋白表达的关系

Tab. 5 Relationship between expression of HIF-1α protein and expression of Gli1 protein in cervical squamous cell carcinoma tissue [n(η/%)]

Variable	Total specimen	Gli1(-)	Gli1(+)	χ <sup>2</sup>	r	P
HIF-1α						
Negative	67(42.1)	51(76.1)	16(23.9)	21.346	0.374	<0.001
Positive	92(57.9)	34(37.0)	58(63.0)			

表6 宫颈鳞状细胞癌组织中 HIF-1α 蛋白与干细胞标志物表达的关系

Tab. 6 Relationships between expression of HIF-1α protein and expressions of stem cell markers in cervical squamous cell carcinoma tissue [n(η/%)]

Variable	Total specimens	HIF-1α(-)	HIF-1α(+)	χ <sup>2</sup>	r	P
Sox2						
Negative	104(65.4)	56(53.8)	48(46.2)	12.020	0.294	0.001
Positive	55(34.6)	11(20.0)	44(80.0)			
Sox9						
Negative	111(69.8)	54(48.6)	57(51.4)	5.841	0.216	0.016
Positive	48(30.2)	13(27.1)	35(72.9)			
CD44						
Negative	77(48.4)	41(51.9)	36(48.1)	4.795	0.189	0.029
Positive	82(51.6)	26(31.7)	56(68.3)			
OCT4						
Negative	95(59.7)	49(51.6)	46(48.4)	7.811	0.248	0.005
Positive	64(40.3)	18(28.1)	46(71.9)			

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

朱长吉负责实验实施及论文撰写, 刘兴哲负责实验实施, 玄延花负责论文的整体设计。

[参考文献]

[1] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV - related cervical cancer: new concepts and clinical

implications[J]. Cancer Med, 2018, 7(10): 5217-5236.

[2] OLUSOLA P, BANERJEE H N, PHILLEY J V, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities[J]. Cells, 2019, 8(6): 622.

[3] 杨宝娟, 张庆, 王志红, 等. KDM5B在宫颈癌中的表达意义及对宫颈癌干细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(23): 2879-2885.

[4] 韩琛, 姜永杰, 王恒孝. 信号转导与转录激活因子3在宫颈癌发生发展中的作用机制研究进展[J]. 中国免疫

- 学杂志, 2019, 35(14): 1778-1783.
- [5] LV L, YANG Z, MA T, et al. Gli1, a potential cancer stem cell marker, is strongly associated with prognosis in prostate cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(10): 4957.
- [6] 马 苑, 付秀华, 王立红. 肿瘤缺氧微环境的研究进展[J]. *癌症进展*, 2020, 18(2): 109-112, 147.
- [7] 张春雷, 訾晓渊, 孙颖浩. 缺氧诱导因子在肿瘤中的作用研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1): 97-102.
- [8] 陈卓颖, 杨盛力, 柳湘洁. 生物钟与缺氧诱导因子在肿瘤领域的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(1): 152-158.
- [9] 司瑞丽, 李晓凤. 缺氧诱导因子1与肿瘤相关性的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(7): 1287-1291.
- [10] YANG Z, CUI Y, NI W, et al. Gli1, a potential regulator of esophageal cancer stem cell, is identified as an independent adverse prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(2): 243-254.
- [11] NI W, YANG Z, QI W, et al. Gli1 is a potential cancer stem cell marker and predicts poor prognosis in ductal breast carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2017, 69: 38-45.
- [12] CUI Y, CUI C A, YANG Z T, et al. Gli1 expression in cancer stem-like cells predicts poor prognosis in patients with lung squamous cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(2): 347-353.
- [13] QI W, YANG Z, FENG Y, et al. Gli1 regulates stemness characteristics in gastric adenocarcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2020, 15(1): 60.
- [14] YANG Z, ZHANG C, QI W, et al. GLI1 promotes cancer stemness through intracellular signaling pathway PI3K/Akt/NF $\kappa$ B in colorectal adenocarcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 373(1/2): 145-154.
- [15] LESLIE M. Cervical cancer analysis reveals new mutations[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(4): 344.
- [16] 玄延花, 李贵铃, 金铁峰, 等. 子宫颈癌中Gli蛋白过表达的临床病理学意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25(2): 122-126.
- [17] 玄延花, 李贵铃, 姜宏宇, 等. 子宫颈癌中Hedgehog信号通路蛋白表达与人乳头状瘤病毒16型感染的关系[J]. *中华病理学杂志*, 2009, 38(3): 178-182.
- [18] 郭丽梅, 杜 娟, 廖 鹰, 等. Hedgehog信号通路转录因子Gli1蛋白在结直肠癌组织中的表达[J]. *肿瘤基础与临床*, 2016, 29(1): 1-6.
- [19] 夏含笑, 刘陶文, 沈 冰, 等. 鼻咽癌组织中Gli1蛋白表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(3): 320-322.
- [20] 李 莉, 江皓男, 古扎努尔·阿吾提, 等. 奥拉帕利联合GANT61对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2022, 43(5): 618-625.
- [21] 文 琳, 曾家月, 马凤雨, 等. Sonic Hedgehog信号通路在重症急性胰腺炎大鼠模型肠黏膜屏障损伤中的作用探讨[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(5): 1134-1143.
- [22] WANG T, FENG J, ZHANG A. miR-584 inhibits cell proliferation, migration and invasion in vitro and enhances the sensitivity to cisplatin in human cervical cancer by negatively targeting GLI1[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 2059-2066.
- [23] 何 焯, 刘海军. Gli1蛋白在宫颈癌中的表达及意义[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(10): 151-152.
- [24] NAYAK A, SATAPATHY S R, DAS D, et al. Nanoquinacrine induced apoptosis in cervical cancer stem cells through the inhibition of hedgehog-GLI1 cascade: role of GLI-1[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20600.
- [25] HAO S Y, LI F, JIANG P, et al. Effect of chronic intermittent hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$ /ATAD2 expression on lung cancer stemness [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 44.