

GPX1 基因在肺癌中的表达特征及其对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响

殷悦^{1,2}, 莫振飞^{1,2}, 吴培昕³, 刘金霞², 魏元辉³, 任佳博^{1,2}, 李春笋²

(1.解放军医学院,北京 100853; 2.中国人民解放军总医院第一医学中心呼吸与危重症医学科,北京 100853; 3.南开大学医学院,天津 300071)

摘要:目的 探讨谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase-1, GPX1) 在不同病理类型肺癌细胞系中的表达特征、亚细胞定位以及对肺腺癌细胞生物学功能的影响。方法 分别采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹检测正常肺上皮细胞 HPAEpic、肺腺癌细胞系 A549 和 H292、肺鳞癌细胞系 Calu1、大细胞肺癌细胞系 95D、小细胞肺癌细胞系 H446 中 GPX1 在 mRNA 和蛋白水平的表达情况,通过方差分析对比不同病理类型肺癌细胞系与正常肺上皮细胞之间的 GPX1 表达差异;通过免疫荧光染色明确 GPX1 在肺腺癌细胞中的亚细胞定位;构建肺腺癌细胞系 H292 和 A549 GPX1 基因稳定敲低细胞株,于 mRNA 和蛋白水平验证敲低效率。分别采用 CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 侵袭实验和流式细胞术检测 H292 和 A549 细胞株增殖、迁移、侵袭能力和细胞凋亡。结果 实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常肺上皮细胞 HPAEpic 相比,GPX1 基因在肺腺癌细胞系 H292 中的表达上调 ($P=0.006$)。蛋白质免疫印迹结果显示,与正常肺上皮细胞 HPAEpic 相比,GPX1 在多种肺癌细胞系 (A549、H292、Calu1、95D、H446) 中表达均上调 ($P<0.001$)。CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 侵袭实验、流式细胞术结果显示,敲低 GPX1 基因表达后,H292 和 A549 细胞增殖 ($P<0.001$)、迁移 ($P<0.001$, $P=0.002$)、侵袭能力均减弱 ($P=0.039$, $P=0.014$),细胞凋亡增加 ($P=0.008$, $P=0.040$)。结论 GPX1 基因在多种病理类型肺癌细胞系中高表达,且在肺腺癌细胞系中表达水平最高,GPX1 主要定位于细胞质。敲低 GPX1 基因表达可显著抑制 A549 和 H292 肺腺癌细胞株的增殖、迁移及侵袭能力,并促进细胞凋亡。

关键词:肺腺癌;谷胱甘肽过氧化物酶 1;增殖;迁移;侵袭;凋亡

中图分类号:R574

文献标志码:A

Expression of GPX1 in lung cancer cell lines and its influence on the proliferation, migration, invasion abilities and apoptosis in lung adenocarcinoma cell lines

YIN Yue^{1,2}, MO Zhenfei^{1,2}, WU Peixin³, LIU Jinxia², WEI Yuanhui³, REN Jiabo^{1,2}, LI Chunsun²

(1. Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; 2. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics, subcellular localization of glutathione peroxidase-1 (GPX1) in different pathological types of lung cancer cell lines and the influence on the biological functions of lung adenocarcinoma cell lines. **Methods** The expressions of GPX1 at mRNA and protein levels in normal lung epithelial cells HPAEpic, lung adenocarcinoma cell line A549 and H292, lung squamous cell carcinoma cell line Calu1, large cell lung cancer cell line 95D, and small cell lung cancer cell line H446 were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. The expression differences of GPX1 between different pathological types of lung cancer cell lines and normal lung epithelial cells were compared through analysis of variance. The subcellular localization of GPX1 in lung adenocarcinoma cell lines was clarified by immunofluorescence staining. The lung adenocarcinoma cell lines H292 and A549 GPX1 stably knocked down cell strains were constructed, and the knockdown efficiency was veri-

fied at mRNA and protein levels, respectively. The proliferation, migration, invasion abilities and apoptosis of H292 and A549 cell strains were detected by CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. **Results** The quantitative real-time PCR results showed that the expression of *GPX1* was upregulated in lung adenocarcinoma cell line H292 compared with the normal lung epithelial cells HPAEpic ($P=0.006$). The results of Western blotting showed that compared with the normal lung epithelial cells HPAEpic, expression of *GPX1* was upregulated in multiple lung cancer cell lines (A549, H292, Calu1, 95D, and H446) ($P<0.001$). The results of CCK-8, wound healing assay, Transwell assay and flow cytometry showed that after knockdown of *GPX1*, the proliferation ($P<0.001$), migration ($P<0.001$, $P=0.002$) and invasion abilities ($P=0.039$, $P=0.014$) of H292 and A549 cell strains were all weakened, while apoptosis rate increased ($P=0.008$, $P=0.040$). **Conclusion** The expression of *GPX1* is highly upregulated in various pathological types of lung cancer cell lines, and its expression level is the highest among lung adenocarcinoma cell lines. *GPX1* is mainly located in cytoplasm. Down-regulation of *GPX1* expression can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion abilities of A549 and H292 lung adenocarcinoma cell strains, and promote cell apoptosis.

Key words: Lung adenocarcinoma; Glutathione peroxidase-1; Proliferation; Migration; Invasion; Apoptosis

肺癌在全球癌症相关死亡原因中居首位^[1],其发生发展涉及驱动基因突变、甲基化以及肿瘤微环境等多方面交互作用^[2]。虽然免疫治疗和表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂靶向治疗药物的出现极大改变了肺癌的治疗格局^[3],但是获得性耐药限制了患者的预后获益^[4],因此从分子层面深入探究肺癌发生发展的作用机制,寻找新的治疗靶点至关重要。

越来越多的证据显示,癌细胞的代谢重编程促进了肿瘤生长。与正常细胞相比,肿瘤细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高^[5],而过量的ROS会对蛋白质、脂质和DNA造成氧化损伤^[6],因此肿瘤细胞通过上调ROS清除系统——如谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、硫氧还原蛋白(thioredoxin, Trx)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物还原蛋白(peroxiredoxin, PRX)——的表达来控制ROS引起的损伤^[7]。其中GPX家族以谷胱甘肽为底物,催化还原过氧化氢,减少脂质过氧化物,是人体抗氧化系统的重要组分。*GPX1*是GPX家族表达最广泛的成员,在多种实体肿瘤中表达异常^[8]。然而,近年来关于*GPX1*基因在恶性肿瘤中的作用始终存在争议,其功能具有显著的肿瘤类型依赖性:在胰腺癌^[9]和早期胃癌^[10]中,*GPX1*基因起抑癌作用,而在肝细胞癌^[11]、结肠癌^[12]、食管鳞状细胞癌^[13]中,*GPX1*是明确的促癌因子,其高表达与不良预后相关。这种矛盾的表达模式与功能定位提示*GPX1*基因在不同肿瘤微环境中可能通过差异调控通路发挥作用,其分子机制具有高度复杂性。尽管*GPX1*基因在多种肿瘤中的作用已被探讨,但针对肺癌尤其是肺腺癌的研究尚不充分,其在肺腺癌中的表达特征、生物学功能及临床意义尚未明确,成为制约其在肺癌领域转化应用的

障碍。因此,本研究旨在探索*GPX1*基因在肺腺癌发生发展中的功能定位,为肺腺癌的临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源

肺腺癌细胞系A549和H292、肺鳞癌细胞系Calu1、小细胞肺癌细胞系H446以及正常肺上皮细胞HPAEpic均购自中国医学科学院细胞中心,大细胞肺癌细胞系95D由中国人民解放军总医院病理科陈乐真教授惠赠。

1.1.2 主要试剂与仪器

慢病毒购自镇江维根生物科技有限公司。胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司(T1300),胎牛血清购自美国Gibco公司(10099141),RIPA裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司(C1053),BCA蛋白定量试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司(P1511),CCK-8购自上海碧云天生物技术有限公司(C0038),细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司(559763),*GPX1*抗体购自英国Abcam公司(ab108429)和杭州华安生物有限公司(EM1701-96),GAPDH抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(81640-5-RR),山羊抗兔IgG抗体购自北京阳光英锐生物科技有限公司(C081802),山羊抗鼠IgG(AB0142)购自英国Abcam公司,荧光倒置显微镜购自日本Olympus公司,37℃恒温细胞培养箱购自美国Thermofisher公司,天能发光成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代

HPAEpic细胞及95D、H446和H292细胞系使

用 1640 培养基、A549 细胞系使用 F12-K 培养基、Calu1 细胞系使用 McCoy's5A 培养基,均添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素,于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱中培养。待细胞达到 80% 融合度时进行传代等操作。

1.2.2 实时荧光定量 PCR

使用 Trizol 试剂按照说明书提取正常肺上皮细胞和肺癌细胞系 RNA,测 RNA 浓度后定量逆转为 cDNA,按照 SYBR FAST qPCR Master Mix 说明书以 10 μL 体系以 β-actin 为内参进行荧光聚合酶链式反应,引物序列如下:GPX1 F-GCGGGCAAGG-TACTACTTA, R-GTGGCAGTGATGGAAGTGTG; β-actin F-CCTGGGCATGGAGTCCTGTG, R-TCTTCAT-TGTGCTGGGTGCC。

1.2.3 蛋白质免疫印迹

按照蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂:RIPA 缓冲液=1:1:100 体积比配置蛋白裂解液,提取总蛋白用来检测目标蛋白的表达。在恒定电压下,将裂解液在 10%SDS-PAGE 凝胶上分离。凝胶电泳后,立即在恒定电流下将蛋白质转印到 PVDF 膜上。使用 5% BSA 在室温下封闭 1 h,然后在 GPX1 (1:1 000)、GAPDH (1:50 000)一抗中 4 °C 孵育过夜,然后应用二抗 (HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗,1:100 000)室温孵育 1 h,之后用 TBST 快速冲洗 3 次,每次 10 min。所有条带在冲洗后均匀覆盖 ECL 试剂,并使用天能系统进行显像。

1.2.4 细胞爬片免疫荧光染色

取对数生长期 H292 细胞,调整至次日可生长至 50%~70% 的细胞密度,接种至事先放好合适大小盖玻片的 12 孔板中,在 37 °C 细胞培养箱培养过夜。弃去培养基,PBS 洗涤 2 遍后,每孔加入 1 mL 多聚甲醛固定 15 min。使用 PBS 洗涤 3 次,加入破膜工作液 2 mL,室温孵育 20 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。使用 3% BSA 室温封闭 30 min。轻轻弃去封闭液,使用 PBS 按 1:100 体积比配置 GPX1 一抗,细胞培养板放在湿盒内 4 °C 孵育过夜。弃去一抗,加入 PBS,把细胞培养板放在摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。按体积比 1:400 配置二抗山羊抗鼠 IgG,室温孵育 50 min。弃去二抗,加入 PBS,把细胞培养板放在摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。爬片稍甩干后滴加 DAPI 染液,复染细胞核,避光室温孵育 10 min。爬片置于 PBS 中摇床晃动洗涤 3 次,每次 5 min。稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。将爬片置于荧光显微镜下观察。

1.2.5 短发夹 RNA (short-hairpin RNA, shRNA) 慢病毒感染肺腺癌细胞及分组

基于 NCBI GeneBank 中 GPX1 的参考转录本

设计 3 个不同的靶点序列,构建慢病毒载体,转入 Stb13 大肠杆菌感受态细胞,抽提 shRNA 慢病毒载体重组质粒。使用二代自我失活慢病毒包装系统,在 293T 细胞系中包装质粒,收集上清,获得慢病毒浓缩液。GPX1 敲低慢病毒共分为 a、b、c 3 个靶点序列,分别检测敲低效率后,选取敲低效率最高同时细胞状态最好的一株进行后续实验。取处于对数生长期的 A549 和 H292 肺腺癌细胞系,消化重悬后调整密度至 2×10⁶/mL;向每个 EP 管加入 100 μL 对应细胞悬液,然后加入 20 μL 对应靶点慢病毒液,以及 1 mg/mL 的聚凝胺助感染。随后放入 37 °C 细胞培养箱孵育 60 min。按照 1:1 000 的体积比配置聚凝胺-全培养基,按照每孔 2 mL 的体积加入 6 孔板。将孵育好的慢病毒-细胞悬液混合物接种到对应孔中。培养 24~48 h 后吸出培养基,加入含有 2 μg/mL 嘌呤霉素的全培养基进行筛选。将所得细胞株分为 2 组: H292-NC 和 H292-shGPX1 组、A549-NC 和 A549-shGPX1 组,其中 NC 代表对照组,shGPX1 代表 GPX1 敲低组。shRNA 序列如下: Lv-GFP-Puro+shRNA-GPX1-a: GCATCAGGAGAACGCCAAGAA; Lv-GFP-Puro+shRNA-GPX1-b: GCAAGGTACTACTTATCGAGA; Lv-GFP-Puro+shRNA-GPX1-c: CTCGAGAAGTGCAGGTGAA。

1.2.6 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

分别选取处于对数生长期的 A549-NC、A549-shGPX1、H292-NC 和 H292-shGPX1 细胞株,消化离心后重悬,以每孔 100 μL、3×10³ 个细胞的数量接种至 96 孔板中,每个细胞株重复 3 个孔,每个实验重复独立 3 个批次,放入细胞培养箱培养 24、48、72、96、120 h 时分别取出细胞培养板,加入 CCK-8 工作液在 450 nm 波长下检测 OD 值,借以判断细胞的增殖能力。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力

将 A549-shGPX1、H292-shGPX1 及各自的对照细胞株接种到 6 孔板内,每个细胞株重复 3 个孔,每个实验重复独立 3 个批次,待细胞融合度达到 90% 以上时,使用 200 μL 移液器枪头在孔内垂直画一条直线。用 PBS 轻轻洗掉脱落细胞,加入基础培养基后分别于 0、24 h 在倒置显微镜下拍照。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

使用 1640 培养基将 Matrigel 胶按 4:1 的比例进行稀释,在 Transwell 小室的每个上室中铺入 20 μL Matrigel 胶。置于细胞培养箱凝固 2 h 后,将胰酶消化后的 A549-shGPX1、H292-shGPX1 及各自的对照细胞株用基础培养基重悬,按 5×10⁴ 个/孔的数量接

种于上室,下室每孔加入 600 μL 完全培养基。每个细胞株重复 3 个孔,每个实验重复独立 3 个批次。将上室放入细胞培养箱中继续培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定,1% 结晶紫染液染色,清水反复洗涤,晾干后在倒置显微镜下拍照,使用 ImageJ 软件计算穿过小室小孔的细胞数目。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡

将 A549-shGPX1 细胞株、H292-shGPX1 细胞株及其对应的对照细胞株培养至对数生长期,消化计数后,取 1 mL 1×10^6 个/mL 的细胞悬液离心、弃上清。每种细胞系分别设置未加染料组、PE 单染组、Annexin V 单染组以及双染组。每个细胞株重复 3 次,每个实验重复独立 3 个批次。将 $10 \times$ Binding Buffer 用水稀释成 $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液。每管加入 1 mL $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液洗细胞 1 次,离心 1 500 r/min, 5 min, 去上清。每管加入 $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液 100 μL 重悬细胞。未加染料组不染色,PE 单染组只加 5 μL PE 染料,Annexin V 单染组只加 5 μL Annexin V 染料,双染组加入 5 μL PE 和 5 μL Annexin V 染料,混匀后室温避光孵育 15 min。然后转移到新流式管中,各试管中分别加入 $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液 100 μL , 上机检测。

1.3 统计学处理

实验数据的统计学处理和可视化采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行。每组实验重复 3 次,每次

设置 3 个技术重复。对于数值变量,使用 Shapiro-Wilk 检验评估数据的正态分布特性,本研究数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本 t 检验。多组间比较且方差齐的数据采用单因素方差分析,整体有差异后,使用 Dunnett 法比较各实验组与对照组之间的差异。多个时间点比较且方差齐的数据采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 GPX1 在肺癌细胞中的表达及亚细胞定位

在 mRNA 水平上,与正常肺上皮细胞 HPAEpic 相比,GPX1 基因在肺腺癌细胞系 H292 中的表达升高 ($F = 5.80, P = 0.006$)。在蛋白水平上,与正常肺上皮细胞 HPAEpic 相比,GPX1 在 A549、H292 肺腺癌细胞系、Calu1 肺鳞癌细胞系、95D 大细胞肺癌细胞系、H446 小细胞肺癌细胞系中表达均升高 ($F = 412.00, P < 0.001$)。与其他病理类型的肺癌细胞系相比,GPX1 在肺腺癌细胞系中的蛋白表达升高尤为显著,因此选取肺腺癌细胞系 A549 和 H292 进行后续实验。在肺腺癌细胞系中使用免疫荧光染色检测 GPX1 的细胞内定位,结果显示 GPX1 主要分布于细胞质和细胞核。见图 1。

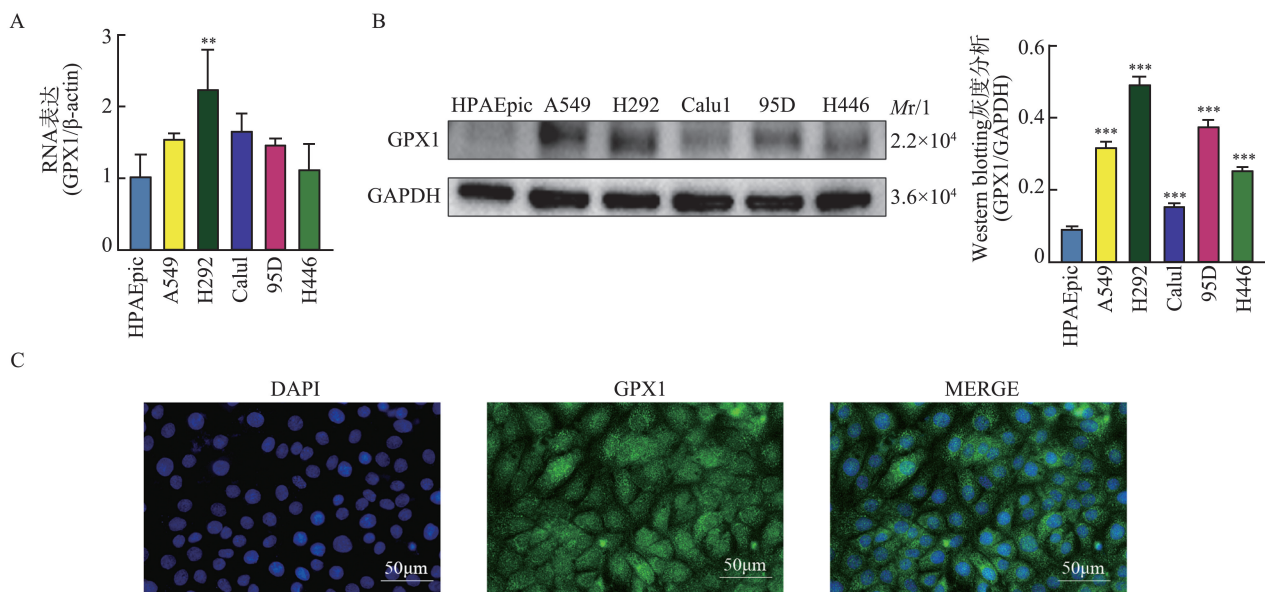


图 1 GPX1 在肺癌细胞中的表达及亚细胞定位

A: GPX1 在肺癌细胞系和正常肺上皮细胞中的 mRNA 表达; B: GPX1 在肺癌细胞系和正常肺上皮细胞中的蛋白表达; C: GPX1 的亚细胞定位。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. HPAEpic。

Figure 1 Expression and subcellular localization of GPX1 in lung cancer cell lines

A: mRNA expressions of GPX1 in lung cancer cell lines and normal lung epithelial cells; B: Protein expressions of GPX1 in lung cancer cell lines and normal lung epithelial cells; C: Subcellular localization of GPX1. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. HPAEpic.

2.2 慢病毒感染肺腺癌细胞 GPX1 基因敲低效果验证

由于 GPX1 在 H292 和 A549 肺腺癌细胞系中表达最高,选取这两种细胞系使用慢病毒感染的方式对 GPX1 基因表达进行敲低,同时构建 H292 和 A549 对照细胞株。使用实时荧光定量 PCR 验证 GPX1 基因敲低效率,结果显示,H292 对照细胞株和 3 个靶点 GPX1 基因敲低细胞株的 GPX1 mRNA 表达水平分别为 1.04 ± 0.35 、 0.01 ± 0.01 、 0.03 ± 0.01 和 0.17 ± 0.06 ,A549 对照细胞株和 3 个靶点 GPX1 基因敲低细胞株的 GPX1 mRNA 表达水平分别为 1.08 ± 0.16 、 0.07 ± 0.02 、 0.13 ± 0.03 和 0.18 ± 0.03 ,在

H292 和 A549 3 个靶点敲低细胞株中 GPX1 表达均显著降低 ($F_{H292} = 23.06, P_{H292} < 0.001$; $F_{A549} = 98.56, P_{A549} < 0.001$),其中在 H292 和 A549 细胞系中均为 sh-a 靶点敲低效率最强。使用蛋白质免疫印迹的方法从蛋白水平验证 sh-a 靶点 GPX1 基因敲低细胞株的敲低效率,结果显示与 H292 对照细胞株相比,H292 sh-a 靶点敲低细胞株蛋白水平 GPX1 基因表达显著降低 ($t = 6.75, P = 0.003$),与 A549 对照细胞株相比 A549 sh-a 靶点敲低细胞株蛋白水平 GPX1 表达显著降低 ($t = 9.95, P < 0.001$),因此选取 sh-a 细胞株进行后续实验。见图 2。

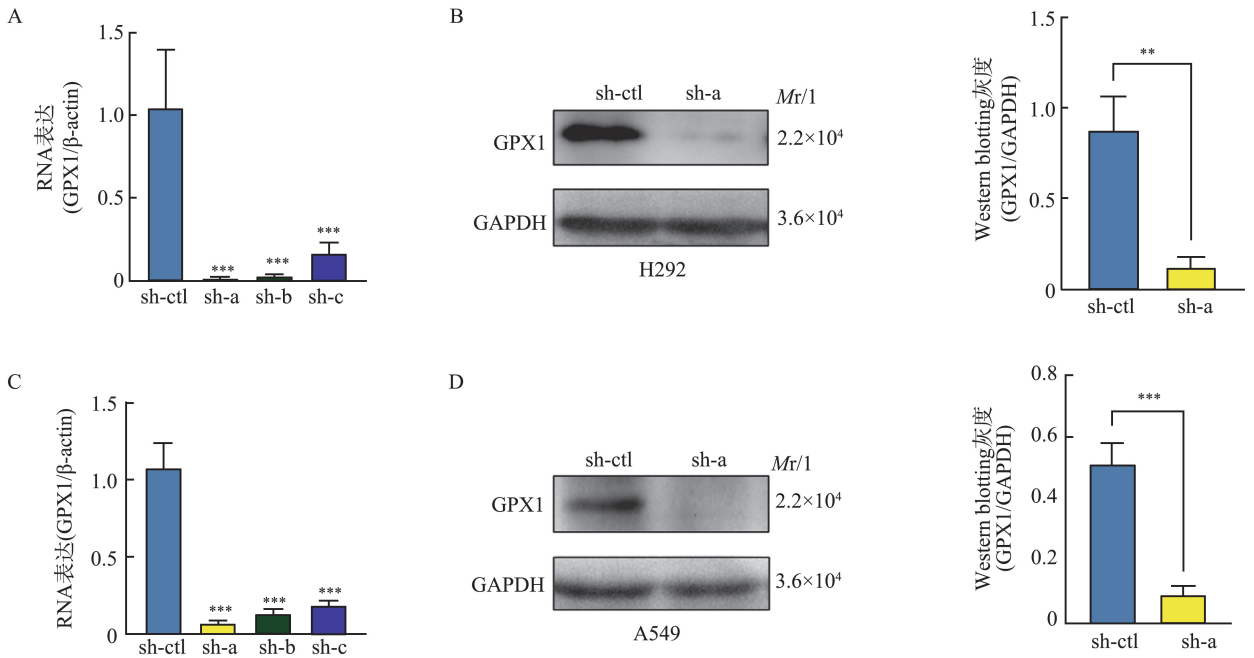


图 2 慢病毒感染肺腺癌细胞 GPX1 基因敲低效果验证

A: qPCR 检测 H292 GPX1 基因敲低细胞株及对照细胞株 mRNA 水平 GPX1 表达; B: Western blotting 检测 H292 GPX1 基因敲低细胞株及对照细胞株蛋白水平 GPX1 表达; C: qPCR 检测 A549 GPX1 基因敲低细胞株及对照细胞株 mRNA 水平 GPX1 表达; D: Western blotting 检测 A549 GPX1 基因敲低细胞株及对照细胞株蛋白水平 GPX1 表达。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. sh-ctl。

Figure 2 Verification of the effect of GPX1 knockdown in lentivirus infected lung adenocarcinoma cell strains

A: qPCR detection of GPX1 mRNA expression in H292 GPX1 knockdown cell strain and control cell strain; B: Western blotting detection of GPX1 protein expression in H292 GPX1 knockdown cell strain and control cell strain; C: qPCR detection of GPX1 mRNA expression in A549 GPX1 knockdown cell strain and control cell strain; D: Western blotting detection of GPX1 protein expression in A549 GPX1 knockdown cell strain and control cell strain. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. sh-ctl.

2.3 敲低 GPX1 基因表达对肺腺癌细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验显示,与对照肺腺癌细胞株相比,GPX1 基因敲低肺腺癌细胞株 H292 ($F_{\text{组间}} = 87.84, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 226.4, P < 0.001$; $F_{\text{交互}} = 5.307, P =$

0.002) 和 A549 ($F_{\text{组间}} = 71.28, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 241.7, P < 0.001$; $F_{\text{交互}} = 6.226, P = 0.001$) 培养 1~5 d 后在 450 nm 处 OD 值减低,提示敲低 GPX1 基因可抑制肺腺癌细胞的增殖能力。见表 1、表 2。

表1 对照和 *GPX1* 敲低 H292 细胞株 CCK-8 实验 450 nm OD 值比较Table 1 Comparison of OD values at 450 nm in CCK-8 assay of H292 cell strains in the control group and the *GPX1* knockdown group

细胞株	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
H292-NC	0.28±0.05	0.41±0.03	0.56±0.06	0.95±0.13	1.50±0.13
H292-shGPX1	0.22±0.06	0.28±0.05	0.41±0.05	0.70±0.09	1.10±0.14

$F_{\text{组间}} = 87.84, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 226.4, P < 0.001; F_{\text{交互}} = 5.307, P = 0.002。$

表2 对照和 *GPX1* 敲低 A549 细胞株 CCK-8 实验 450 nm OD 值比较Table 2 Comparison of OD values at 450 nm in CCK-8 assay of A549 cell strains in the control group and the *GPX1* knockdown group

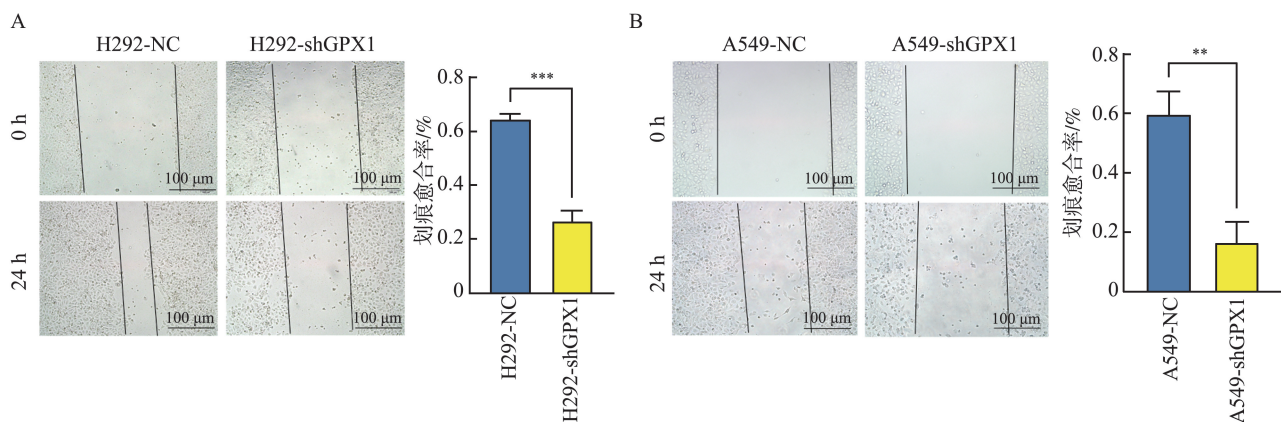
细胞株	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
A549-NC	0.22±0.02	0.39±0.06	0.63±0.08	1.00±0.14	1.50±0.16
A549-shGPX1	0.15±0.01	0.26±0.07	0.40±0.08	0.62±0.07	1.10±0.14

$F_{\text{组间}} = 71.28, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 241.7, P < 0.001; F_{\text{交互}} = 6.226, P = 0.001。$

2.4 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,细胞迁移 24 h 后, H292-NC 和 H292-shGPX1 细胞株的划痕愈合率分别为 (64.64±1.59)% 和 (26.70±3.88)%, 与对照肺腺癌细胞株相比, *GPX1* 基因敲低 H292 肺腺癌细胞株划痕

愈合率减低 ($t = 15.67, P < 0.001$); A549-NC 和 A549-shGPX1 细胞株的划痕愈合率分别为 (59.55±7.82)% 和 (16.54±6.91)%, 与对照肺腺癌细胞株相比, *GPX1* 基因敲低的 A549 肺腺癌细胞株划痕愈合率减低 ($t = 7.14, P = 0.002$), 提示敲低 *GPX1* 基因可降低肺腺癌细胞的迁移能力。见图 3。

图3 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞株 H292(A) 和 A549(B) 迁移能力的影响 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)Figure 3 Effect of knocking down *GPX1* gene expression on the migration ability of lung adenocarcinoma cells H292(A) and A549(B) (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2.5 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示, H292-NC 和 H292-shGPX1 细胞株穿越基质胶的细胞数量分别为 (167.00±12.53) 个和 (141.30±7.63) 个, 与对照 H292 肺腺癌细胞株相比, *GPX1* 基因敲低 H292 肺腺癌细胞株侵袭能力减低 ($t = 3.03, P = 0.039$); A549-NC 和 A549-shGPX1 细胞株穿越基质胶的细胞数量分别为 (141.30±6.03) 个和 (123.30±4.51) 个, 与对照肺癌细胞株相比, *GPX1* 基因敲低 A549 肺腺癌细胞株穿越基质胶的细胞数量减低 ($t = 4.14, P = 0.014$), 提示敲低 *GPX1* 基因可降低肺腺癌细胞的侵袭能力。见图 4。

2.6 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示, H292-NC 和 H292-shGPX1 细胞株的凋亡细胞比例分别为 (9.40±0.89)% 和 (18.35±3.00)%, 与对照肺腺癌 H292 细胞株相比, *GPX1* 基因敲低 H292 肺腺癌细胞株凋亡细胞比例增加 ($t = 4.95, P = 0.008$)。A549-NC 和 A549-shGPX1 细胞株凋亡细胞比例分别为 (9.91±0.81)% 和 (11.84±0.76)%, 与对照 A549 肺腺癌细胞株相比, *GPX1* 敲低的 A549 肺腺癌细胞株凋亡细胞比例增加 ($t = 3.00, P = 0.040$), 提示敲低 *GPX1* 基因可增加肺腺癌细胞的凋亡比例。见图 5。

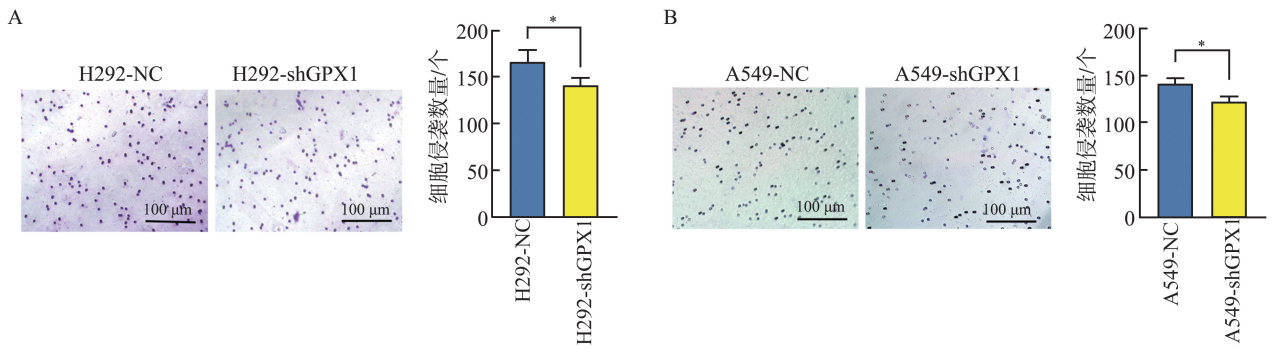


图4 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞株 H292(A) 和 A549(B) 侵袭能力的影响 (* $P < 0.05$)

Figure 4 Effect of knocking down *GPX1* expression on the invasion ability of lung adenocarcinoma cells H292 (A) and A549 (B) (* $P < 0.05$)

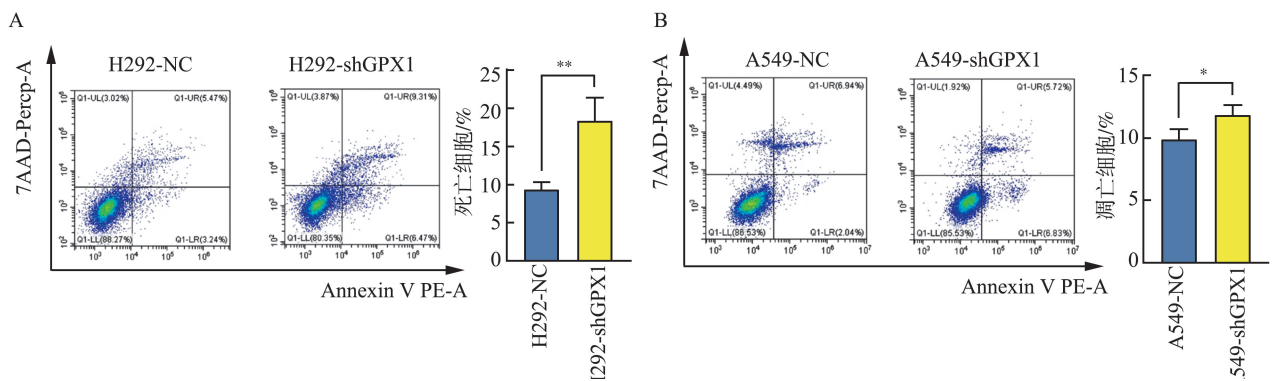


图5 敲低 *GPX1* 基因表达对肺腺癌细胞株 H292(A) 和 A549(B) 凋亡的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Figure 5 Effect of knocking down *GPX1* expression on apoptosis of lung adenocarcinoma cells H292 (A) and A549 (B) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3 讨论

GPX 通过将谷胱甘肽转化为氧化谷胱甘肽来催化过氧化氢和脂类氢过氧化物的还原^[8]。其中, *GPX1* 蛋白在所有过氧化物酶中表达水平最高, 且在所有细胞中广泛表达, 其在细胞内主要定位于细胞质、线粒体、细胞核和过氧化物酶体^[14]。 *GPX1* 在头颈鳞状细胞癌^[15]、乳腺癌^[16]、卵巢癌^[17]、胰腺癌^[9]、胃癌^[18]、白血病^[19]、肝细胞癌^[11]等多种癌症中异常表达, 并与肿瘤发生发展相关。然而, 在以上不同癌症类型中, *GPX1* 基因扮演着看似矛盾的抑癌、促癌的双重角色, 并且在肺癌中 *GPX1* 基因究竟起到抗癌还是促癌作用, 尚无充分研究。本研究发现相对于正常肺上皮细胞, *GPX1* 在多种肺癌细胞系中表达均升高, 并且 *GPX1* 在 H292 和 A549 肺腺癌细胞系中表达上调尤为显著, 揭示了 *GPX1* 在不同病理类型肺癌中的特异性表达模式, 提示 *GPX1* 基因可能对肺腺癌的发生发展起促进作用。

无限增殖和凋亡逃逸是癌症的经典恶性能表

型, 抑制肿瘤增殖与诱导肿瘤细胞凋亡也是抗肿瘤药物的常见机制。本研究通过在 A549 和 H292 两种肺腺癌细胞系中感染 *GPX1* 基因敲低慢病毒, 从基因组水平下调 *GPX1* 基因表达, 并进行 CCK-8 和流式细胞术实验, 发现肺腺癌细胞株 H292 和 A549 在不同生长时间的 OD 值明显减低, 而细胞凋亡比例显著升高, 表明敲低 *GPX1* 基因显著抑制了肺腺癌细胞的增殖能力, 并且同时促进肺腺癌细胞的凋亡, 提示 *GPX1* 蛋白可能成为肺腺癌临床治疗的分子靶标。由于肿瘤细胞的高代谢特性, 氧化应激在肿瘤细胞中显著增强, *GPX1* 蛋白作为一种经典的抗氧化酶, 可以高效清除过量的活性氧。既往研究发现, *GPX1* 基因可以通过调控肿瘤细胞内 ROS 水平来促进头颈部鳞状细胞癌的增殖^[15]。在卵巢癌中, 既往研究发现 *GPX1* 基因表达的敲低可以导致肿瘤细胞增殖的减低和凋亡比例的增加, 同时使癌细胞内活性氧负荷增加^[17]。本研究结果提示, *GPX1* 基因可能通过将癌细胞内氧化还原状态维持在一个利于存活和增殖的“最佳窗口”, 协助癌细胞逃避高氧化应激导致的细胞凋亡以及大量活性氧介

导的细胞周期阻滞。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是介导极早期肺腺癌由癌前病变进展为浸润性腺癌的重要过程,也是临床早诊早治的最关键检测和治疗阶段。本研究通过在肺腺癌细胞 A549 和 H292 的 *GPX1* 基因敲低细胞株和对照细胞株中开展划痕迁移实验和 Transwell 侵袭实验,发现 A549 和 H292 敲低细胞株的划痕愈合率以及穿过基质胶的细胞数量均减低,表明 *GPX1* 基因表达敲低显著抑制了肺腺癌细胞的迁移和侵袭能力。氧化还原过程能够影响 ROS 敏感型的众多核心致癌通路,进而促进肺癌细胞迁移侵袭,*GPX1* 基因可能通过此机制促进肿瘤迁移侵袭。既往研究发现:在喉癌中,*GPX1* 基因的表达敲低可以逆转 miR-646 过表达导致的肿瘤细胞侵袭能力升高^[20];在胃癌中,敲低 *GPX1* 基因表达使肝细胞生长因子介导的胃癌细胞增殖和侵袭减低^[18];在肝细胞癌中,硒结合蛋白 1 降低能够上调 *GPX1* 活性,诱导氧化应激,促进肝细胞癌的侵袭性^[11]。结合本实验结果,*GPX1* 基因可能通过调控氧化应激,促进肺癌细胞的迁移侵袭能力。

在既往研究中,*GPX1* 基因在肿瘤中的作用具有促癌和抑癌的双向性。在胃癌^[18]、肝细胞癌^[11]、食管鳞状细胞癌^[13]、肉瘤^[21]和结肠癌^[12]中,*GPX1* 基因促进肿瘤细胞增殖^[13]、迁移^[13]、侵袭^[11,13,20-21],抑制肿瘤细胞凋亡^[12],发挥促癌作用。与以上癌症类型中报道的趋势一致,本研究在肺腺癌中验证了敲低 *GPX1* 基因表达抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力,并增加肺腺癌细胞的凋亡比例。然而在胰腺癌中,既往研究结论相反,在接受辅助化疗的胰腺导管腺癌患者中,*GPX1* 低表达与不良预后正相关,并且 *GPX1* 基因沉默可以促进胰腺导管腺癌细胞的上皮-间质转化和化疗耐药性^[9]。并且在甲状腺癌中,与正常组织相比,癌组织中 *GPX1* 表达更低^[22]。针对 *GPX1* 基因在不同研究中截然相反的发现,考虑主要与肿瘤微环境中的氧化应激平衡以及肿瘤组织特异性有关。首先,*GPX1* 基因在癌症中的双重作用与氧化应激在癌症中的双重作用密切相关。氧化应激是一种由 ROS 水平升高引起的氧化还原信号失调和大分子氧化损伤的病理性状况,氧化应激与肿瘤细胞生长调控和肿瘤微环境重塑相互作用,是癌症的关键特征^[23]。适当的 ROS 升高可以诱导原癌基因 RAS 突变以及抑癌基因 TP53

的突变,加速肿瘤发生^[24]。ROS 作为关键信使,还可以通过氧化信号蛋白中特定的氨基酸残基(如半胱氨酸)来激活独特的信号通路,从而促进肿瘤增殖和存活,例如,过氧化氢可能氧化 PTP1B 催化域中的半胱氨酸 Cys215,氧化后的 PTP1B 促进肝细胞癌和表皮癌细胞的克隆形成^[25]。这时抗氧化酶 *GPX1* 上调会减弱 ROS 的促癌作用。然而,过量 ROS 会直接造成肿瘤细胞 DNA 损伤、线粒体蛋白受损,最终导致肿瘤细胞凋亡^[26],此时抗氧化酶 *GPX1* 表达上调有助于肿瘤细胞存活,发挥促癌作用。因此,*GPX1* 基因在肿瘤中的功能作用与不同类型癌症的基础氧化应激水平有关,不同类型癌症具有不同的抗氧化应激水平^[27],谷胱甘肽对不同类型癌细胞的作用也截然不同。在自身氧化应激水平极高的癌症类型中,*GPX1* 基因通过强力清除 ROS,可能将 ROS 降至维持癌细胞存活和增殖所需的阈值以下,反而抑制了肿瘤生长。而在肺癌,特别是肺腺癌中,其基础氧化应激水平可能处于能使 *GPX1* 基因发挥促癌效应的阈值范围内^[28]。据此,本研究结果初步提示:在体外实验体系中,*GPX1* 基因可能通过下调肺腺癌细胞内 ROS 水平,解除对 ROS 敏感型促生存信号通路的抑制效应,同时下调促凋亡相关蛋白的表达丰度,最终促进肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,并抑制其凋亡。

然而,本研究尚存在局限性:*GPX1* 基因发挥作用的具体分子机制还需进一步明确,仍需要通过分子对接、质谱分析,利用蛋白质组学/CRISPR 筛选等技术,系统解析其下游调控网络。本研究属于探索性研究,未来将完善空白对照组、计算样本量,收集临床样本进行验证性实验。体外实验对于肿瘤微环境的模拟具有局限性,未来还需在更接近于人体环境的模型中,对 *GPX1* 基因进行更全面、更细致的研究,同时还需开展 *GPX1* 基因特异性抑制剂的临床前药效学评价,评估其临床应用价值。

综上所述,本研究通过体外基础实验探索 *GPX1* 在肺癌细胞系中的表达特征,以及该基因对肺腺癌细胞生物学功能的影响,研究结果提示 *GPX1* 基因可能通过促进肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,并抑制其凋亡,参与肺腺癌的发生发展进程。

参考文献:

- [1] Han G, Sinjab A, Rahal Z, et al. An atlas of epithelial cell states and plasticity in lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2024, 627(8004): 656-663.
- [2] Succony L, Rassl DM, Barker AP, et al. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: detection, pathology and treatment strategies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 99: 102237. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102237
- [3] Jeon H, Wang S, Song J, et al. Update 2025: management of nonsmall-cell lung cancer [J]. *Lung*, 2025, 203(1): 53. doi: 10.1007/s00408-025-00801-x
- [4] Zhou F, Guo H, Xia Y, et al. The changing treatment landscape of EGFR-mutant nonsmall-cell lung cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2025, 22(2): 95-116.
- [5] Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, et al. Oxidative stress and its role in cancer [J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(1): 22-28.
- [6] Humphries BA, Zhang A, Buschhaus JM, et al. Enhanced mitochondrial fission inhibits triple-negative breast cancer cell migration through an ROS-dependent mechanism [J]. *iScience*, 2023, 26(6): 106788. doi: 10.1016/j.isci.2023.106788
- [7] Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 280-297.
- [8] Zhao Y, Wang H, Zhou J, et al. Glutathione peroxidase GPX1 and its dichotomous roles in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(10): 2560. doi: 10.3390/cancers14102560
- [9] Meng Q, Shi S, Liang C, et al. Abrogation of glutathione peroxidase-1 drives EMT and chemoresistance in pancreatic cancer by activating ROS-mediated Akt/GSK3 β /Snail signaling [J]. *Oncogene*, 2018, 37(44): 5843-5857.
- [10] 包舒晴, 杨明月, 刘端瑞, 等. NOX4 在幽门螺旋杆菌诱导胃癌细胞 ROS 中的作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(6): 19-25.
BAO Shuqing, YANG Mingyue, LIU Duanrui, et al. Role of NOX4 in ROS induction by *Helicobacter pylori* in gastric cancer cells [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2022, 60(6): 19-25.
- [11] Huang C, Ding G, Gu C, et al. Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 α to promote hepatocellular carcinoma invasiveness [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(11): 3042-3053.
- [12] Huang Y, Fang W, Wang Y, et al. Transforming growth factor- β 1 induces glutathione peroxidase-1 and protects from H₂O₂-induced cell death in colon cancer cells via the Smad2/ERK1/2/HIF-1 α pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(5): 906-912.
- [13] Gan X, Chen B, Shen Z, et al. High GPX1 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma invasion, migration, proliferation and cisplatin-resistance but can be reduced by vitamin D [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2530-2540.
- [14] Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 146-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004
- [15] He R, Jiang H, Zhang C, et al. CXCL16 promotes proliferation of head and neck squamous cell carcinoma by regulating GPX1-mediated antioxidant levels [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2024, 26(1): 92-106.
- [16] Lee E, Choi A, Jun Y, et al. Glutathione peroxidase-1 regulates adhesion and metastasis of triple-negative breast cancer cells via FAK signaling [J]. *Redox Biol*, 2020, 29: 101391. doi: 10.1016/j.redox.2019.101391
- [17] Gong TT, Guo Q, Li X, et al. Isothiocyanate iberin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in the progression of ovarian cancer by mediating ROS accumulation and GPX1 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 111533. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111533
- [18] Jang BI, Jung JY, Koh SA, et al. The important role of GPX1 and NF- κ B signaling pathway in human gastric cancer: implications for cell proliferation and invasion [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2024, 21(3): 305-315.
- [19] Pang B, Mao H, Wang J, et al. MiR-185-5p suppresses acute myeloid leukemia by inhibiting GPX1 [J]. *Microvasc Res*, 2022, 140: 104296. doi: 10.1016/j.mvr.2021.104296
- [20] Yuan X, Liu Y, Chen E, et al. MiR-646 regulates proliferation and migration of laryngeal carcinoma through the PI3K/AKT pathway via targeting GPX1 [J]. *Oral Dis*, 2021, 27(7): 1678-1686.
- [21] Huergo C, Tornín J, Estuplián O, et al. GPX1 expression promotes stemness and aggressiveness in myxoid liposarcomas [J]. *Int J Biol Sci*, 2025, 21(13): 5609-5627. doi: 10.7150/ijbs.105217
- [22] Metere A, Frezzottl F, Graves CE, et al. A possible role for selenoprotein glutathione peroxidase (GPX1) and thioredoxin reductases (TrxR1) in thyroid cancer: our experience in thyroid surgery [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 7. doi: 10.1186/s12935-018-0504-4
- [23] Liang X, Weng J, You Z, et al. Oxidative stress in cancer: from tumor and microenvironment remodeling to therapeutic frontiers [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 219. doi: 10.1186/s12943-025-02375-x
- [24] Son Y, Cheong YK, Kim NH, et al. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? [J]. *J Signal Transduct*, 2011, 2011: 792639. doi: 10.1155/2011/792639