

本文引用:王安生,王祖义,郑传明,等.转化生长因子 β 调节子4对人肺鳞状细胞癌类器官增殖、侵袭和转移的影响[J].新乡医学院学报,2022,39(10):907-911,918. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.10.002.

【基础研究】

转化生长因子 β 调节子4对人肺鳞状细胞癌类器官增殖、侵袭和转移的影响

王安生¹, 王祖义¹, 郑传明², 陈娜娜¹, 李伟³, 洪海宁^{1,4}, 桑海威¹, 王康武¹, 李其才¹, 陈力维¹, 朱浩楠^{1,5}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院胸外科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院第一附属医院急诊外科, 安徽 蚌埠 233004; 3. 蚌埠医学院第一附属医院呼吸内科, 安徽 蚌埠 233004; 4. 蚌埠医学院研究生院, 安徽 蚌埠 233030; 5. 阜阳市人民医院胸外科, 安徽 阜阳 236012)

摘要: 目的 探讨转化生长因子 β 调节子4(TBRG4)在肺癌细胞中的表达及其对人肺鳞状细胞癌类器官增殖、侵袭和转移的影响,并分析可能的分子机制。方法 收集2020年1月至2021年1月蚌埠医学院第一附属医院手术切除的肺鳞状细胞癌患者的癌组织和癌旁组织,采用Western blot法检测癌组织和癌旁组织中TBRG4蛋白的表达。采用胰蛋白酶消化癌组织,分离肿瘤细胞,将分离的肿瘤细胞培养形成人肺鳞状细胞癌类器官。将人肺鳞状细胞癌类器官分为对照组和TBRG4沉默组,对照组类器官转染空载体慢病毒,TBRG4沉默组类器官转染TBRG4沉默慢病毒。采用细胞计数试剂盒-8检测人肺鳞状细胞癌类器官转染24、48、72、96 h时的增殖活力,Transwell法检测人肺鳞状细胞癌类器官的迁移和侵袭能力,Western blot法检测人肺鳞状细胞癌类器官中TBRG4、增殖细胞核抗体(PCNA)、磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)、磷酸化磷脂酰肌醇激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)蛋白表达。结果 肺鳞状细胞癌组织中TBRG4蛋白相对表达量显著高于癌旁组织($P < 0.05$)。TBRG4沉默组人肺鳞状细胞癌类器官转染24、48、72、96 h时的增殖活力均显著高于对照组($P < 0.05$)。TBRG4沉默组穿膜细胞数和迁移细胞数均显著少于对照组($P < 0.05$)。TBRG4沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中TBRG4、PCNA、p-PI3K、p-AKT蛋白的相对表达量均显著低于对照组($P < 0.05$),PTEN蛋白的相对表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。结论 TBRG4在肺鳞状细胞癌组织中高表达,其可能是通过PTEN/PI3K/AKT信号通路调节人肺鳞状细胞癌类器官的增殖、侵袭和转移,TBRG4有望成为肺癌治疗的新靶点。

关键词: 肺鳞状细胞癌;增殖;侵袭;转移;转化生长因子 β 调节子4;类器官

中图分类号: R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2022)10-0907-06

Effect of transforming growth factor β regulator 4 on proliferation, invasion and metastasis of human lung squamous cell carcinoma organoids

WANG Ansheng¹, WANG Zuyi¹, ZHENG Chuanming², CHEN Nana¹, LI Wei³, HONG Haining^{1,4}, SANG Haiwei¹, WANG Kangwu¹, LI Qicai¹, CHEN Liwei¹, ZHU Haonan^{1,5}

(1. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China; 2. Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China; 3. Department of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China; 4. Graduate School of Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui Province, China; 5. Department of Thoracic Surgery, Fuyang People's Hospital, Fuyang 236012, Anhui Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of transforming growth factor β regulator 4(TBRG4) in lung cancer cells and its effect on proliferation, invasion and metastasis of human lung squamous cell carcinoma organoids, and to analyze the possible molecular mechanism. **Methods** The cancerous tissues and adjacent tissues removed from patients with human lung squamous cell carcinoma admitted at the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College from January 2020 to January 2021 were collected, and the expression of TBRG4 protein in cancerous tissues and adjacent tissues was detected by Western blot. Cancer tissue was digested with trypsin, and the tumor cells were isolated, then the isolated tumor cells were cultured to

DOI:10.7683/xyxyxb.2022.10.002

收稿日期:2021-07-19

基金项目:安徽省中央引导地方科技发展项目(编号:2020b07030008);蚌埠医学院转化医学重点专项项目(编号:BYTM2019019)。

作者简介:王安生(1983-),男,安徽蚌埠人,博士,副主任医师,研究方向:肺癌发生发展的分子机制。

通信作者:朱浩楠(1996-),男,安徽阜阳人,硕士,住院医师,研究方向:肺癌的诊断与治疗;E-mail:xxzhuhaonan@163.com。

form human lung squamous cell carcinoma organoids. The human lung squamous cell carcinoma organoids divided into control group and TBRG4 silencing group. The organoids in the control group were transfected with empty vector lentivirus, the organoids in the TBRG4 silencing group were transfected with TBRG4 silencing lentivirus. The proliferation activity of human lung squamous cell carcinoma organoids was detected by cell counting kit-8, the migration and invasion ability of human lung squamous cell carcinoma organoids were detected by Transwell method, and the expressions of TBRG4, proliferating cell nuclear antibody (PCNA), phosphatase and tensin homolog (PTEN), phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-AKT) protein were detected by Western blot. **Results** The relative expression of TBRG4 protein in lung squamous cell carcinoma tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The proliferation activity of human lung squamous cell carcinoma organoids in the TBRG4 silencing group was significantly higher than that in the control group at 24, 48, 72, 96 h after transfection. The number of transmembrane cells and the number of cell migration in the TBRG4 silencing group were significantly less than those in the control group ($P < 0.05$). The relative expressions of TBRG4, PCNA, p-PI3K and p-AKT protein in human lung squamous cell carcinoma organoids in the TBRG4 silencing group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), the relative expression of PTEN protein was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TBRG4 is highly expressed in human lung squamous cell carcinoma, which may regulate the proliferation, invasion and metastasis of human lung squamous cell carcinoma organoids through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. TBRG4 is expected to become a new target for the treatment of lung cancer.

Key words: lung squamous cell carcinoma; proliferation; invasion; metastasis; transforming growth factor β regulator 4; organoids

肺癌作为全球最常见的恶性肿瘤,其病死率一直位于肿瘤相关病死率的首位。据报道,2018 年肺癌的发生率占全部恶性肿瘤的 15% 左右,肺癌的死亡比例占全部恶性肿瘤死亡病例的 25% 左右^[1]。尽管靶向治疗和免疫治疗相关的新药研发提高了肺癌的总体生存期(overall survival, OS),但 2012 ~ 2015 年中国的肺癌患者 5 a 存活率仍仅为 19.7%,其中农村地区患者 5 a 生存率仅为 15.4%^[2],而预计肺癌仍会是未来 10 年病死率最高的肿瘤之一。有研究报道,肺癌的发生是由众多基因的突变引起的,包括上皮生长因子细胞增殖和信号传导的受体基因、鼠类肉瘤病毒癌基因、p53 和磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)基因等基因,但肺癌发生的具体机制尚不完全清楚,值得深入探讨^[3]。

原始干细胞或成体干细胞在体外 3D 环境下培养形成类器官模型,是最近新兴起来的体外模型,其在结构和功能上与成体组织高度接近^[4]。类器官模型弥补了细胞系和小鼠品系等传统模型存在细胞系细胞类型单一和某些小鼠品系胚胎容易致死等问题^[5]。肺癌类器官是收集患者手术切除的癌组织,然后进行消化分离出肿瘤细胞,紧接着进行 3D 细胞培养,使得肿瘤细胞形成“微器官”。与传统的肿瘤细胞系相比,该模型的优点是具有更高的临床相关性和个体多样性。

转化生长因子 β 调节子 4(transforming growth factor β regulator 4, TBRG4)是编码转化生长因子- β

(transforming growth factor- β , TGF- β)的调节子。近年来越来越多的研究发现,TBRG4 的异常高表达与肿瘤的发生、发展密切相关^[6],但其在肺癌中的作用尚未阐明。因此,本研究采用沉默 TBRG4 的慢病毒转染人肺鳞状细胞癌类器官观察 TBRG4 是否通过 PTEN/磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)信号通路调节人肺鳞状细胞癌类器官增殖、侵袭和迁移等生物学行为,为初步探讨 TBRG4 基因作为治疗肺鳞状细胞癌的可能潜在靶点提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 TBRG4 沉默慢病毒购自汉恒生物科技(上海)有限公司,细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海贝博生物有限公司,小鼠抗 β -actin 抗体、兔抗增殖细胞核抗体(proliferating cell nuclear antibody, PCNA)、兔抗 PTEN 抗体、兔抗磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)抗体以及兔抗磷酸化 AKT (phosphorylated PI3K, p-AKT)抗体均购自英国 Abcam 公司,所有抗体稀释比例均为 1 : 1 000;双面超净操作台购自苏州净化设备有限公司,冷冻离心机购自德国 Beckman 公司;光学显微镜购自重庆光电仪器厂,电热恒温水浴锅购自北京医疗设备厂,低速大容量离心机购自上海安亭科学仪器厂,小型固定转速离心机购自美国 SCILOGEX 公司,立式压力蒸汽灭菌器购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂,电热鼓风干燥

箱购自上海市实验仪器总厂, Millipore 实验室纯水机购自美国 Pall 公司, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱购自日本三洋公司, CO_2 细胞培养箱、酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司, 恒温多功能振荡器购自美国 HRYSTAL 公司, 旋涡混合器购自邯郸天仪电子仪表有限公司, 电子分析天平购自上海精科天平厂, 移液器购自法国 PIPETMAN 公司, PowerPac TM Basic 电泳仪电源、垂直电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司, 化学发光成像系统购自北京天伦生物科技有限公司。

1.2 Western blot 法检测人肺鳞状细胞癌患者癌组织和癌旁组织中 TBRG4 蛋白表达 收集 2020 年 1 月至 2021 年 1 月蚌埠医学院第一附属医院手术切除的早期肺鳞状细胞癌患者癌组织和癌旁组织(距病灶 $>5\text{ cm}$ 以上的正常肺组织), 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存以供后续研究使用。取 1 g 冻存的癌组织和癌旁组织加入 1 mL 裂解液[苯甲基磺酰氟/RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer)], 使用前加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂与 $5\text{ }\mu\text{L}$ 磷酸酶抑制剂 Cocktail ($2\times$) 混合, 用研磨器充分研磨组织, 置于冰盒上, 震荡裂解约 15 min 后, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $14\text{ }000\times g$ 离心 15 min , 用移液器吸出上清液保存于新的离心管中, 将其置入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。紧接着用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度。取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 等量蛋白上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析细胞蛋白后, 进行常规湿法转膜。用 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶在室温条件下封闭膜 1 h , 然后加入一抗稀释液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用含吐温-20 的 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline and Tween-20, TBST)洗膜后, 加入二抗稀释液室温孵育 1 h 。洗膜后进行化学发光显色。以 β -actin 作为内参对照, 应用 Image J 软件对目的蛋白的表达进行量化。

1.3 人肺鳞状细胞癌肿瘤细胞的分离及体外类器官培养 将收集的癌组织标本冰上切割成直径约 4 mm 的组织块, 用提前预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)冲洗干净。然后用胶原酶消化组织 1 h , 用胰蛋白酶 TrypLE Express 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下轻微振荡消化 10 min , 最后形成的单细胞悬液既分离得到的肿瘤细胞。用细胞计数仪对单细胞悬液进行计数, 调节细胞密度为 $1\times 10^7\text{ L}^{-1}$, 然后将细胞和基质胶均匀混合后重悬, 最后按照每孔 $50\text{ }\mu\text{L}$ 细胞接种于 24 孔板中形成基质胶凝固液滴, 将其放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中固化 $10\sim 20\text{ min}$ 。每孔中加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 肺鳞状细胞癌类器官条件培养基, 使其完全淹没基质胶凝固液滴, 最后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体

积分数 $5\%\text{ CO}_2$ 培养箱中培养 48 h 。所有与获取人肺鳞状细胞癌标本相关的实验程序均在蚌埠医学院第一附属医院伦理委员会的监督和指导下完成, 符合医学伦理要求。获取人肺鳞状细胞癌标本已获得患者知情同意。

1.4 慢病毒转染人肺鳞状细胞癌类器官 将培养的人肺鳞状细胞癌类器官分为对照组和 TBRG4 沉默组。对照组类器官转染空载体慢病毒, TBRG4 沉默组类器官转染 TBRG4 沉默慢病毒, 具体方法为: 将含有慢病毒的肺癌类器官培养基与人肺鳞状细胞癌组织单细胞悬液均匀混合, 然后将其接种于 48 孔板中, 用封口膜密封 48 孔板, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h , 然后继续培养 6 h 。最后按照“1.3”项所述方法对细胞进行肺鳞状细胞癌类器官培养。 72 h 后用荧光显微镜观察 TBRG4 在肺鳞状细胞癌类器官中的沉默效率, 培养 2 代后即可获得稳定沉默目的基因的肺鳞状细胞癌类器官。

1.5 CCK-8 法检测人肺鳞状细胞癌类器官增殖活力 取对照组和 TBRG4 沉默组类器官消化制备单细胞悬液, 按每孔 $1\text{ }500$ 个细胞接种到 96 孔板进行培养。对照组和 TBRG4 沉默组各铺 9 个孔。分别在转染 24 、 48 、 72 、 96 h 时, 每孔加 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 继续培养 2 h , 应用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的吸光度值, 绘制细胞活力曲线。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次, 取均值。

1.6 Transwell 法检测人肺鳞状细胞癌类器官的迁移和侵袭能力 取 2 组转染慢病毒后的人肺鳞癌类器官, 消化制备单细胞悬液。将 Transwell 小室置于 24 孔板中。侵袭实验前, 取 $50\text{ }\mu\text{L}$ ($1:8$ 稀释) 基质胶铺于小室内, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 凝固后备用。迁移实验无需铺胶。收集转染 48 h 的各组细胞, 消化后制成 $3\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液。向小室上室内加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞悬液, 下室加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的含 20% 血清的培养基, 将含有小室的 24 孔板置于细胞培养箱常规培养 24 h 。取出小室, 擦去上室面未过膜细胞, 甲醇固定下室面 15 min , 结晶紫染色后置于显微镜下观察并拍照, 计算穿膜细胞数。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.7 Western blot 法检测人肺鳞癌类器官 TBRG4、PCNA、PTEN、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达 取 2 组转染慢病毒后的人肺鳞癌类器官, 消化制备单细胞悬液, 收集细胞加入 RIPA 裂解 15 min 后提取细胞蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度。取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 等量蛋白上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析细胞蛋白后, 进行常规湿法转膜。 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

脱脂牛奶室温下封闭膜 1 h, 然后加入 TBRG4、PCNA、PTEN、p-PI3K、p-AKT 一抗稀释液 4 ℃ 孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗稀释液室温孵育 1 h。洗膜后进行化学发光显色。以 β -actin 作为内参对照, 应用 Image J 软件对目的蛋白进行量化, 分析其表达水平。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件进行数据统计与分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺鳞状细胞癌组织和癌旁组织中 TBRG4 蛋白表达比较 结果见图 1。肺鳞状细胞癌组织和癌旁组织中 TBRG4 蛋白的相对表达量分别为 0.98 ± 0.04 、 0.50 ± 0.12 , 肺鳞状细胞癌组织中 TBRG4 蛋白相对表达量显著高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($t = 3.120$, $P < 0.05$)。

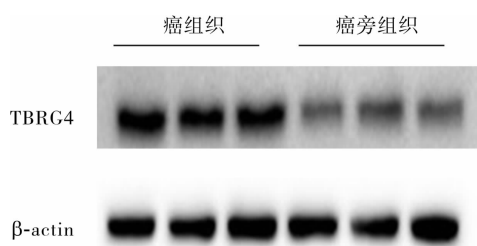


图 1 肺鳞状细胞癌组织和癌旁组织中 TBRG4 蛋白的表达
Fig.1 Expression of TBRG4 protein in lung squamous cell carcinoma tissues and paracancerous tissues of patients with human lung squamous cell carcinoma

2.2 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官增殖活力比较 结果见表 1。TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官在转染 24、48、72、96 h 时的增殖活力均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官增殖活力比较

Tab.1 Comparison of proliferative activity of human lung squamous cell carcinoma organoids between the control group and TBRG4 silencing group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖活力(吸光度值)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	3	0.51 ± 0.24	0.61 ± 0.17	0.80 ± 0.23	1.25 ± 0.23
TBRG4 沉默组	3	0.53 ± 0.13	0.82 ± 0.24	1.28 ± 0.37	1.93 ± 0.26
t		2.843	5.761	7.638	9.870
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 对照组与 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官的迁移和侵袭能力比较 结果见图 2。TBRG4 沉默组、对照组穿膜细胞数分别为 (46.73 ± 8.26) 、 (148.72 ± 11.90) 个, 迁移细胞数分别为 $(38.64 \pm$

$7.92)$ 、 (178.53 ± 10.87) 个; TBRG4 沉默组穿膜细胞和迁移细胞数均显著少于对照组, 差异有统计学意义 ($t = -8.220$ 、 -10.518 , $P < 0.05$)。

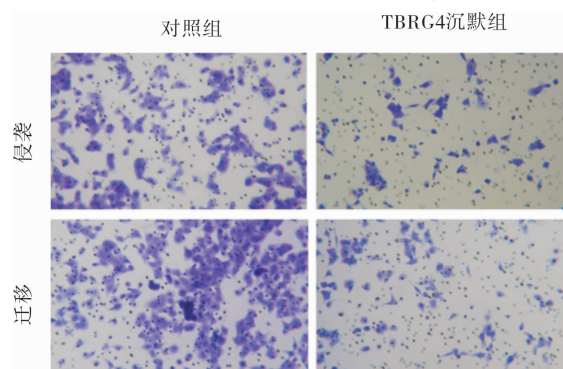


图 2 2 组人肺鳞状细胞癌类器官的侵袭和迁移情况

Fig.2 Invasion and migration of human lung squamous cell carcinoma organoids in the two groups

2.4 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 TBRG4 和 PCNA 蛋白表达的比较 结果见图 3 和图 4。TBRG4 沉默组和对照组人肺鳞状细胞癌类器官中 TBRG4 蛋白的相对表达量分别为 0.16 ± 0.12 、 0.63 ± 0.02 , PCNA 蛋白的相对表达量分别为 0.530 ± 0.243 、 1.390 ± 0.560 ; TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 TBRG4、PCNA 蛋白的相对表达量均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = -3.214$ 、 -4.324 , $P < 0.05$)。

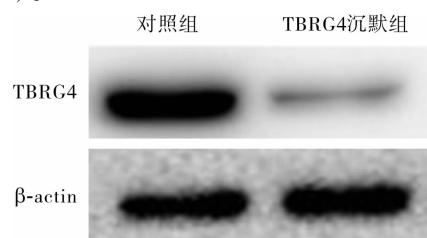


图 3 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 TBRG4 蛋白的表达

Fig.3 Expression of TBRG4 protein in human lung squamous cell carcinoma organoids in the control group and TBRG4 silencing group

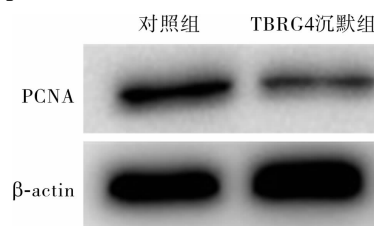


图 4 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 PCNA 蛋白的表达

Fig.4 Expression of PCNA protein in human lung squamous cell carcinoma organoids in the control group and TBRG4 silencing group

2.5 对照组与 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 PTEN、p-PI3K、p-AKT 相对表达量比较 结果见表 2 和图 5。TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 PTEN 蛋白的相对表达量显著高于对照组, p-PI3K、p-AKT 蛋白的相对表达量显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 PTEN、p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量比较

Tab. 2 Comparison of the relative expression levels of the PTEN, p-PI3K, p-AKT protein in human lung squamous cell carcinoma organoids between the control group and TBRG4 silence group ($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白相对表达量		
	PTEN	p-PI3K	p-AKT
对照组	0.54 \pm 0.17	1.25 \pm 0.27	1.39 \pm 0.46
TBRG4 沉默组	3.47 \pm 0.86	0.72 \pm 0.30	0.79 \pm 0.54
<i>t</i>	7.319	-8.213	-9.372
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

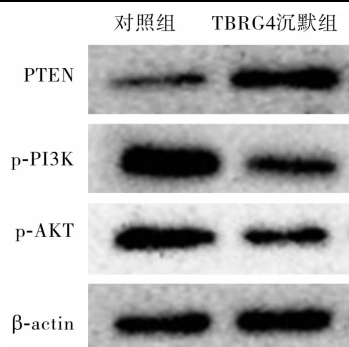


图 5 对照组和 TBRG4 沉默组人肺鳞状细胞癌类器官中 PTEN、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of PTEN, p-PI3K, p-AKT protein in human lung squamous cell carcinoma organoids in the control group and TBRG4 silence group

3 讨论

使用靶向药物治疗肺癌可以提高部分临床患者的生存率^[7],但耐药性和药物不良反应的存在仍然限制了其使用,患者的生存率仍较低,不超过 15%^[8]。基于此,深入研究肺癌发生发展的新机制和关键分子具有重要意义。小干扰 RNA 沉默技术是一种主要通过外源性小分子干扰 RNA 或内源性小分子 RNA 沉默靶基因的调控方法^[9]。慢病毒载体具有低免疫原性,能转染细胞并将携带的外源基因片段整合到宿主基因组中,因此,在基因工程中得到广泛应用^[10-11]。

TBRG4 是位于 7 号染色体上可以编码 TGF- β 调节子的基因。有研究报道,TBRG4 不仅可以参与细胞周期调控,还可以维持细胞的稳定性^[12]。张伟^[13]研究表明,TBRG4 可能通过调节线粒体 mRNA 的稳定性和细胞周期蛋白 CLN1 和 CLN2 的转录来

调节细胞增殖。此外,TBRG4 蛋白在多发性骨髓瘤患者髓外肿瘤组织^[14]、原代乳腺癌细胞中^[15]异常高表达,且其表达水平与乳腺癌的恶性程度呈正相关^[15]。目前,成体组织来源的干细胞培养类器官发展较为迅速,正逐渐成为研究疾病发生发展的良好模型。基于此,本研究采用沉默 TBRG4 基因的慢病毒对人肺鳞状细胞癌类器官进行特异性干扰,以期探索 TBRG4 对肺癌生物学行为的影响。本研究结果显示,沉默 TBRG4 基因能够抑制人肺鳞状细胞癌类器官的增殖,这表明 TBRG4 可以在体外抑制肺癌增殖;此外,沉默 TBRG4 基因还能够抑制人肺鳞状细胞癌类器官的侵袭和迁移能力。

PTEN 具有脂质和蛋白的双重特异性磷酸酶活性,是继 p53 之后第 2 个被发现的抑癌基因。PTEN 发挥作用的主要方式是调控多种信号通路,以此达到抑制肿瘤细胞增殖、转移、黏附,促进肿瘤细胞分化、凋亡等目的^[16]。研究发现,PTEN 低表达是促进非小细胞肺癌发生和转移的原因^[17-18]。本研究结果表明,TBRG4 基因敲低可能通过激活人肺鳞状细胞癌类器官中 PTEN 的表达,进而下调 p-PI3K、p-AKT 等下游基因的表达,从而发挥抑制人肺鳞状细胞癌类器官增殖、侵袭和迁移的作用。

综上所述,TBRG4 可能成为肺癌的潜在治疗靶点,在调节肺癌的增殖、侵袭和迁移等方面发挥重要的作用,但其具体调节机制有待进一步深入研究。

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.
- [2] ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003 - 15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5):e555-e567.
- [3] HANNIGAN B, YE W, MEHROTRA M, et al. Liquid biopsy assay for lung carcinoma using centrifuged supernatants from fine needle aspiration specimens[J]. *Ann Oncol*, 2019, 1(1):1-9.
- [4] HUCH M, KOO B K. Modeling mouse and human development using organoid cultures[J]. *Development*, 2015, 142(18):3113-3125.
- [5] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 24(15):211-234.
- [6] MONTAZER-TORBATI M B, HUE-BEAUVAIS C, DROINEAU S, et al. Epigenetic modifications and chromatin loop organization explain the different expression profiles of the Tbrg4, WAP and Ramp3 genes[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(5):975-987.
- [7] 潘有光, 傅文凡, 莫益俊, 等. miR-92b-3p 通过靶向 RAD21 增强非小细胞肺癌对顺铂的化学敏感性[J]. *实用医学杂志*, 2020, 11(14):1897-1902.
- PAN Y G, FU W F, MO Y J, et al. Enhancement of chemosensitivity to cisplatin in non small cell lung cancer through miR-92b-3p by targeting RAD21[J]. *J Pract Med*, 2020, 11(14):1897-1902.

- cal characteristics and high risk factors of cervical cancer in our country[J]. *Matern Child Health Care China*, 2019, 34(5): 1206-1208.
- [13] 张韶凯,赵方辉,乔友林. 中国宫颈癌防治研究 20 年历程与成就[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(6): 809-812.
ZHANG S K, ZHAO F H, QIAO Y L. Development and achievements regarding the prevention and control of cervical cancer in the last 20 years in China[J]. *Chin J Epidemiol*, 2020, 41(6): 809-812.
- [14] KU M K, NT T T, HA M I, et al. Randomized, open label, multicenter, phase II trial of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) therapy in combination with sorafenib as compared with TACE alone in patients with hepatocellular carcinoma; TACTICS trial[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(15 suppl).
- [15] 刘人杰. 索拉菲尼治疗原发性肝癌的效果及对患者血清 HSP90 α 、VEGF 水平的影响[J]. 中国医学创新, 2021, 18(14): 15-19.
LIU R J. Effect of sorafenib in the treatment of primary liver cancer and its influence on serum HSP90 α and VEGF levels[J]. *Med Innov China*, 2021, 18(14): 15-19
- [16] OKUYAMA H, IKEDA M, KUWAHARA A, et al. Prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma refractory or intolerant to sorafenib[J]. *Oncology*, 2015, 88(4): 241-246.
- [17] SONG C, ZHANG J, WEN R, et al. Improved anti-hepatocellular carcinoma effect by enhanced Co-delivery of Tim-3 siRNA and sorafenib via multiple pH triggered drug-eluting nanoparticles[J]. *Mater Today Bio*, 2022, 16: 100350.
- [18] DUVAL A P, TROQUIER L, DE SOUZA SILVA O, et al. Diclofenac potentiates sorafenib-based treatments of hepatocellular carcinoma by enhancing oxidative stress[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10): 1453.
- [19] ABDEL-RAHMAN O, FOUAD M. Sorafenib-based combination as a first line treatment for advanced hepatocellular carcinoma; a systematic review of the literature[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 91(1): 1-8.
- [20] CHRISTEN K E, DAVIS R A, KENNEDY D. Psammalyisin F increases the efficacy of bortezomib and sorafenib through regulation of stress granule formation[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 112: 24-38.
- [21] GONG G, LIU Q, DENG Y, et al. Arabinogalactan derived from Lycium barbarum fruit inhibits cancer cell growth via cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 149: 639-650.
- [22] KIM I S. Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites for humans[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(7): 1064.
- [23] HILLMAN G G. Soy isoflavones protect normal tissues while enhancing radiation responses[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2019, 29(1): 62-71.
- [24] BROWNLOW B, NAGARAJ V J, NAYEL A, et al. Development and *in vitro* evaluation of vitamin E-enriched nanoemulsion vehicles loaded with genistein for chemoprevention against UVB-induced skin damage[J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(10): 3510-3523.

(本文编辑:周二强)

(上接第 911 页)

- [8] 郭浩,周淑妮,冉瑞智. 吉非替尼联合培美曲塞和顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的安全性和有效性[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(5): 796-800.
GUO H, ZHOU S N, RAN R Z. Safety and efficacy of gefitinib combined with pemetrexed and cisplatin in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Modern Oncol*, 2019, 27(5): 796-800.
- [9] GUO D, WANG B, HAN F, et al. RNA interference therapy for glioblastoma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(6): 927-936.
- [10] WIZNEROWICZ M, TRONO D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology[J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(1): 42-47.
- [11] SUI G, SOOHOO C, AFFAR EL B, et al. A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515-5520.
- [12] 叶柯,郑晓丽,葛红,等. TBRG4 在肺腺癌中的作用及其机制研究[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(4): 265-271.
YE K, ZHENG X L, GE H, et al. Study on the role of TBRG4 in lung adenocarcinoma and its mechanism[J]. *China Oncol*, 2019, 29(4): 265-271.
- [13] 张伟. 线粒体蛋白 TBRG4 在乳腺癌中的功能研究[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
ZHANG W. Function of the mitochondrial protein TBRG4 in breast cancer[D]. Shanghai: Fudan University, 2011.
- [14] 廖法学. 转化生长因子 β 调节蛋白 4 在骨肉瘤增殖、凋亡中的作用及其机制的初步探讨[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
LIAO F X. The role of transformative growth factor β regulatory protein 4 in osteosarcoma proliferation and apoptosis and its mechanism are preliminary discussion[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [15] 徐晓恩. 以同一病人来源的系列乳腺细胞系研究乳腺癌致病的蛋白质基础[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
XU X E. Protein basis for studying breast cancer pathogenesis using a series of breast cell lines of the same patient source[D]. Shanghai: Fudan University, 2011.
- [16] DE ASSIS L V, ISOLDI M C. The function, mechanisms, and role of the genes PTEN and TP53 and the effects of asbestos in the development of malignant mesothelioma: a review focused on the genes' molecular mechanisms[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2): 889-901.
- [17] PÉREZ-RAMÍREZ C, CAÑADAS-GARRE M, MOLINA M Á, et al. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer[J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(16): 1843-1862.
- [18] 柳亮,张志强,吴瑞峰,等. PTEN 及 FOXC1 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(13): 1980-1983.
LIU L, ZHANG Z Q, WU R F, et al. Expression and significance of PTEN and FOXC1 in the tissues of non-small cell lung cancer[J]. *J Mod Med Health*, 2020, 36(13): 1980-1983.

(本文编辑:孟月)