

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230592

· 论 著 ·

三氧化二砷通过降低 Pin1 表达及调节 Wnt/ β -连环素通路抑制肝癌细胞增殖

李欣, 万迁迁, 黄念*, 万旭英*

海军军医大学(第二军医大学)第三附属医院中西医结合科, 上海 200438

[摘要] **目的** 探讨三氧化二砷(ATO)在肝癌中对肽基脯氨酰基顺反异构酶 NIMA 相互作用蛋白 1(Pin1)表达的抑制作用及其分子机制。**方法** 使用 DepMap 数据库和 GEPIA 数据库中的数据分析 Pin1 在人肝癌细胞系和肝癌组织中的表达情况。以人肝癌细胞系 Huh7 和小鼠肝癌细胞系 H22 为细胞模型,通过 ATP 法检测 ATO 对肿瘤细胞活力的影响;通过蛋白质印迹法、免疫荧光染色和 qPCR 检测 ATO 对 Pin1 在蛋白质水平和转录水平表达的作用。用氯喹预处理 Huh7 细胞抑制溶酶体途径后,通过蛋白质印迹法和免疫荧光染色检测 ATO 对 Pin1 表达的调控作用。通过皮下荷瘤小鼠模型和免疫组织化学染色验证 ATO 在体内对肝癌细胞生长和 Pin1 表达的影响。采用 RNA 测序分析 ATO 可能影响的信号通路,并通过蛋白质印迹法和 qPCR 验证。**结果** 在 DepMap 数据库 23 种人肝癌细胞系和 GEPIA 数据库人肝癌组织中,Pin1 的表达均呈现较高水平。在体外实验中,ATO 处理后 Huh7 和 H22 细胞的细胞活力均降低,细胞中 Pin1 在蛋白质和转录水平的表达均降低,但用氯喹抑制溶酶体途径逆转了 ATO 对 Pin1 表达的影响。在皮下荷瘤小鼠模型中,ATO 表现出一定的抗肿瘤效果,免疫组织化学染色显示 ATO 处理后 Pin1 表达和肿瘤细胞增殖受到抑制。在 ATO 处理的 H22 细胞中 Wnt/ β -连环素通路相关基因富集,抑制 H22 细胞中 Pin1 的表达后 β -连环素表达减少。**结论** ATO 通过溶酶体途径抑制 Pin1 表达,以及影响 Wnt/ β -连环素信号通路来抑制肝癌细胞增殖。

[关键词] 三氧化二砷;肽基脯氨酰基顺反异构酶 NIMA 相互作用蛋白 1;肝癌;Wnt/ β -连环素

[引用本文] 李欣,万迁迁,黄念,等.三氧化二砷通过降低 Pin1 表达及调节 Wnt/ β -连环素通路抑制肝癌细胞增殖[J].海军军医大学学报,2024,45(4):433-440. DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20230592.

Arsenic trioxide inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by decreasing expression of Pin1 and regulating Wnt/ β -catenin pathway

LI Xin, WAN Qianqian, HUANG Nian*, WAN Xuying*

Department of Integrative Medicine, The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of arsenic trioxide (ATO) on the expression of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1) in liver cancer and its molecular mechanism. **Methods** The expression of Pin1 in human hepatocellular carcinoma cell lines and liver cancer tissue was analyzed using DepMap database and GEPIA database. Human hepatocellular carcinoma cell line Huh7 and mouse hepatocellular carcinoma cell line H22 were used as cell models to detect the effect of ATO on tumor cell viability by adenosine triphosphate method. The effects of ATO on Pin1 expression at protein and transcription levels were detected by Western blotting, immunofluorescence staining and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). After pretreatment with chloroquine to inhibit lysosome pathway in Huh7 cells, the regulation effect of ATO on Pin1 expression was detected by Western blotting and immunofluorescence staining. The effects of ATO on hepatoma cell growth and Pin1 expression *in vivo* were verified by subcutaneous tumor-bearing mouse model and immunohistochemical staining. The possible signaling pathways affected by ATO were analyzed by RNA sequencing and were verified by Western blotting and qPCR. **Results** The expression of Pin1 in 23 kinds of human hepatocellular carcinoma cell lines in DepMap database and human hepatocellular carcinoma tissue in GEPIA database showed a high level. *In vitro*, the viability of Huh7 and H22 cells was decreased after ATO treatment, and the protein and transcription levels of Pin1 were decreased. The effect of ATO on Pin1 expression was reversed after inhibiting lysosomal pathway by chloroquine. In the subcutaneous tumor-bearing mouse model, ATO showed certain anti-tumor effects, and immunohistochemical staining showed that Pin1 expression and tumor cell proliferation were inhibited after ATO treatment. The genes related to Wnt/

[收稿日期] 2023-10-30 [接受日期] 2024-01-18

[基金项目] 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项(202340091)。Supported by Clinical Research Project for Health Industry of Shanghai Municipal Health Commission (202340091).

[作者简介] 李欣, 硕士生. E-mail: arcenciel_lixin@126.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81887471, E-mail: tcm2008nian@126.com; Tel: 021-81887473, E-mail: wanxuying@126.com

β -catenin pathway were enriched in ATO-treated H22 cells, and the expression of β -catenin was decreased after inhibiting Pin1 expression in H22 cells. **Conclusion** ATO inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Pin1 expression through lysosomal pathway and affecting Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[**Key words**] arsenic trioxide; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; liver cancer; Wnt/ β -catenin

[**Citation**] LI X, WAN Q, HUANG N, et al. Arsenic trioxide inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by decreasing expression of Pin1 and regulating Wnt/ β -catenin pathway[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(4): 433-440. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230592.

肝癌起病隐匿,以手术切除为主的综合治疗是肝癌的首选治疗方法,但是大部分患者在确诊时已发展至肝癌中晚期,失去了手术治疗机会。WHO国际癌症研究机构发布的2020年全球最新癌症负担数据显示,全球新确诊肝癌人数超过90万,因肝癌死亡人数超过83万,死亡人数接近新发病人数;中国新发肝癌病例约41万例,位居癌症发病率第5位,死亡病例约39万例,高居癌症死亡率第2位^[1]。肝癌的发病率稍低但死亡率偏高,这提示肝癌的治疗效果和预后相对较差^[2]。因此,肝癌患者急需安全、有效的抗癌新技术以延长生存时间和提高生活质量。

三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)是一种无机化合物,化学式为 As_2O_3 ,有剧毒,无臭、无味,为白色霜状粉末,是砒霜的主要成分。作为一种传统中医药,砒霜味辛、酸,性热,归肺、脾、胃、大肠经,具有蚀疮去腐、杀虫、劫痰、截疟之功效。现代医学研究发现,ATO联合全反式维甲酸可将急性早幼粒白血病患者的无病生存率提高至95%以上,达到基本治愈标准^[3]。在胰腺导管腺癌中,ATO可以通过靶向肽基脯氨酰基顺反异构酶NIMA相互作用蛋白1(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, Pin1)明显抑制癌相关成纤维细胞的增殖,且联合程序性死亡蛋白1抗体治疗可以达到消除胰腺导管腺癌的效果^[4]。

本研究利用DepMap和GEPIA数据库探索Pin1在人肝癌细胞系和组织中的表达情况,通过体内外实验检测ATO在肝癌中对Pin1异常激活的抑制作用,并通过RNA测序分析具体的信号通路,为寻找新的肝癌治疗策略提供参考。

1 材料和方法

1.1 DepMap数据库和GEPIA数据库中Pin1表达数据分析 统计DepMap数据库23种人肝癌细胞系中Pin1的表达情况,以及GEPIA数据库中肝癌

组织和正常肝组织中Pin1的表达情况并绘图。

1.2 细胞培养、传代与质粒转染 小鼠肝癌细胞系H22购自中国典型培养物保藏中心,人肝癌细胞系Huh7购自中国科学院上海细胞库。H22细胞在添加10% FBS(货号C04001-500,上海道鹏生物科技有限公司)的RPMI 1640培养基(货号L210KJ,上海源培生物科技股份有限公司)中培养。Huh7细胞在添加10% FBS的DMEM(货号L110KJ,上海源培生物科技股份有限公司)中培养。所有培养基均含有抗生素-抗真菌素三抗溶液(货号S120JV,上海源培生物科技股份有限公司)。从37℃培养箱(型号KBF115,德国BINDER公司)中取出细胞,用显微镜观察细胞形态和状态,去除旧培养基,用生理盐水清洗1次。加入适量胰蛋白酶,于37℃培养箱消化3~5 min,在显微镜下观察到细胞悬浮后,加入适量含血清培养基终止消化。随后将细胞转移到无菌离心管中,放入离心机(型号Microfuge 20R,美国Beckman Coulter公司)于140×g离心3 min。弃上清后加入适量培养基吹打混匀,接种在细胞培养皿或培养板中进行实验。当单层贴壁细胞生长密度达到80%~95%时进行细胞传代或给药处理。

1.3 ATP法检测细胞活力 使用CellTiter-Glo[®]发光法细胞活力检测试剂盒(北京普洛麦格生物技术有限公司)进行实验。在96孔白色底透板中每孔接种8 000~10 000个细胞(细胞密度为30%~40%),每孔加培养基100 μ L,每组设3个复孔。在第2天每孔加入含不同浓度(0.01、0.05、0.1、0.5、1、3、5 μ g/mL)注射用ATO(北京双鹭药业股份有限公司)的培养基继续培养,H22和Huh7细胞均在加药处理48 h开始测量发光信号。室温避光融化CellTiter试剂,将CellTiter试剂和无血清培养基按1:3的比例配成混合液。吸弃96孔白色底透板中的培养基,用生理盐水清洗1次,然后每孔加入100 μ L配好的混合液,轻轻混匀,于

37 °C 孵育 15 min。使用多功能酶标仪(中国安捷伦科技有限公司)读取发光(全波长)信号值,以未加药孔为对照,各浓度 ATO 孔的测量值与对照孔测量值的比值即为各浓度 ATO 孔的细胞活力。

1.4 细胞免疫荧光染色 在共聚焦培养小皿中加入适量 Huh7 细胞,用 ATO (1 μg/mL) 处理细胞 16 h 后加入 4% 中性甲醛溶液固定 10 min,用 PBS 清洗 1 次;加入适量的 0.2% TritonX-100 进行样品穿孔,室温放置 5 min,用 TBS 清洗 3 次;加入封闭液,室温封闭 45~60 min;加入 Pin1 多克隆抗体(货号 10495-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,稀释比例为 1 : 200)、溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1) 多克隆抗体(货号 9091S,美国 CST 公司,稀释比例为 1 : 200),于 4 °C 孵育过夜, TBS 清洗 3 次;加入对应的荧光二抗(货号分别为 A11008、A21424,美国 Invitrogen 公司,稀释比例均为 1 : 200),于 37 °C 避光孵育约 1 h,用 TBS 清洗 3 次;再用 DAPI 染核 10~15 min,最后用共聚焦荧光显微镜(德国 Leica 公司)进行观察和拍照。

1.5 蛋白质印迹法检测 Huh7 细胞用或不用 10 μmol/L 氯喹预处理 3 h 后再加入 ATO (0.5 μg/mL 或 1 μg/mL) 处理 20 h 进行检测。Huh7 细胞用或不用 5 μmol/L Pin1 抑制剂 sulfopin (别名 PIN1-3; 货号 S9782,美国斯莱克生物技术有限公司)处理 48 h 进行检测。H22 细胞用 ATO (0.5 μg/mL 或 1 μg/mL) 处理 20 h 进行检测。吸弃培养基,加入 RIPA 强裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(上海陶术生物技术有限公司)混合液(体积比均为 100 : 1),于冰上超声处理 30 s 破碎细胞(UP-250 型超声仪,上海净信实业发展有限公司; 30% 强度, 3 s/次, 间隔 1 s), 4 °C、13 201×g 离心 15 min。使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒并通过多功能酶标仪进行蛋白质定量。根据待检测蛋白质的分子量分别配制 10% 和 12% 的 SDS-PAGE 胶,将胶固定在电泳槽(E260-10A-1.0 型电泳仪,江苏博美达生命科学有限公司)中并倒入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,当蛋白质样品分离至 SDS-PAGE 胶底部时结束电泳。用湿转法(VE-186 型转膜仪,上海天能科技有限公司)、3M 滤纸、NC 膜转膜 80 min。转膜

结束后,用 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 NC 膜 1 h。用 TBST 清洗 NC 膜 3 次,每次 5 min。加入用 5% 牛血清白蛋白溶液稀释的 Pin1 多克隆抗体(货号 10495-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,稀释比例为 1 : 1 000)、β-连环素多克隆抗体(货号 8480,美国 CST 公司,稀释比例为 1 : 1 000)、GAPDH 多克隆抗体(货号 AC002,武汉爱博泰克生物技术有限公司,稀释比例为 1 : 1 000)、β-肌动蛋白多克隆抗体(货号 AC026,武汉爱博泰克生物技术有限公司,稀释比例为 1 : 1 000),于 4 °C 过夜孵育。第 2 天用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。然后加入用 5% 牛血清白蛋白溶液稀释的荧光二抗(货号分别为 D28802-25、D20621-05,北京安诺伦生物技术有限公司,稀释比例为 1 : 5 000),室温避光孵育 1 h,用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。最后用 Odyssey 光扫描仪(北京安诺伦生物技术有限公司)进行图像扫描。

1.6 qPCR 检测 Huh7 细胞用或不用 ATO (0.5 μg/mL 或 1 μg/mL) 处理 20 h 或 5 μmol/L PIN1-3 处理 48 h 后进行检测。H22 细胞用 ATO (0.5 μg/mL 或 1 μg/mL) 处理 20 h 后进行检测。吸弃培养基,加适量生理盐水清洗 1 次,采用 TRIzol 法提取总 RNA,使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司)测量 RNA 浓度。用 R223-01 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)合成 cDNA,将 cDNA 用 ddH₂O 稀释 10 倍。将稀释好的 cDNA、引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]和 SYBR Green 试剂(货号 70871300,瑞士 Roche 公司)按比例混合成 10 μL 体系(384 孔板),每个样品设 3 个复孔,使用 PCR 仪(LightCycler[®] 384 孔,瑞士 Roche 公司)进行扩增。人 *Pin1* 正向引物序列为 5'-ACAGTTCAGCGACTGCAGCTCA-3',反向引物序列为 5'-GCAGCGCAAACGAGGCGTCTT-3';小鼠 *Pin1* 正向引物序列为 5'-GAGGAAGACTTTGATCTCTGGC-3',反向引物序列为 5'-TGTCCTGAGAGTCCAAAG-ACAG-3';人 β-连环素正向引物序列为 5'-CACAAGCAGAGTGCTGAAGGTG-3',反向引物序列为 5'-GATTCCTGAGAGTCCAAAG-ACAG-3';内参 18S RNA 正向引物序列为 5'-CG-GCTACCACATCCAAGGAA-3',反向引物序列为 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'。

1.7 H22 细胞皮下荷瘤小鼠模型的构建 生理盐水重悬的H22 细胞悬液与基质胶按照1 : 1 的体积比混合后再次重悬,然后接种于6 周龄雄性BALB/c 小鼠皮下,每只小鼠接种体积为100 μL ,接种细胞数量为 1×10^6 个。接种后第5~7 天观察肿瘤生长情况,第7 天将小鼠随机分为两组($n \geq 5$),分别予腹腔注射PBS、ATO (3 mg/kg) 处理,每2 d 1 次。每2 d 测量1 次肿瘤体积(计算方法为 $0.5LW^2$,其中 L 为肿瘤最长直径, W 为肿瘤最短直径)。第17 天用 CO_2 窒息法处死小鼠,然后收取新鲜肿瘤组织备用或采用石蜡包埋制作标本。

1.8 H-E 染色 收集小鼠肿瘤组织样本进行石蜡包埋(EG1150H 型包埋机,德国Leica 公司)和切片(RM2245 型切片机,德国Leica 公司),采用KD-PI 型摊片机(金华科迪仪器设备有限公司)、KD-HI 型烘片机(金华科迪仪器设备有限公司)对切片进行相应处理后常温保存。在65 $^\circ\text{C}$ 电热恒温箱(型号DHP-9272,上海一恒科学仪器有限公司)中烘烤组织切片1 h,然后采用Autostainer XL 型全自动染色机(德国Leica 公司)进行H-E 染色处理。将样本切片置于苏木精染液中染色10 min,用 ddH_2O 洗掉多余苏木精染液,迅速在盐酸乙醇分化液中涮洗2 次,用缓慢流动的自来水冲洗返蓝30 min,取出片子后沥干水分,放置在 ddH_2O 中5 min,最后用全自动染色机进行脱水处理。滴加约50 μL 中性树脂,取盖玻片封片,放在烘箱中烘烤过夜,干燥后在显微镜下观察染色结果。

1.9 免疫组织化学染色 将组织切片在60~65 $^\circ\text{C}$ 电热恒温箱中烘烤1 h 后,使用全自动染色机进行脱蜡处理。脱蜡后加入3% 过氧化氢溶液清洗,然后选择合适的酸性修复或碱性修复方式进行抗原修复。自然冷却到室温后,用 ddH_2O 清洗切片3 次,每次5 min,再用PBS (pH=7.4) 清洗5 min。用1% 牛血清白蛋白溶液于37 $^\circ\text{C}$ 封闭30~60 min。吸弃封闭液,滴加Pin1 多克隆抗体(货号10495-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,稀释比例为1 : 1 000)、Ki-67 多克隆抗体(货号9949,美国CST 公司,稀释比例为1 : 1 000),每个组织切片约50 μL ,于湿盒中4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。第2 天室温复温湿盒中的切片15 min,用PBS 清洗4 次,

每次5 min,再滴加相应二抗,于37 $^\circ\text{C}$ 孵育30~50 min。PBS 同前清洗4 次后用DAB 溶液(A 液与B 液的体积比为50 : 1) 显色至出现明显砖红色为止,显色时间为1~10 min。将切片放进 ddH_2O 中终止反应,再用 ddH_2O 清洗2 次,每次5 min。然后将切片置于苏木精染液中复染10 min,用 ddH_2O 洗去多余苏木精染液,迅速在盐酸乙醇分化液中涮洗2 次,用自来水流水冲洗返蓝30 min 后取出切片,沥干水分,在 ddH_2O 中放置5 min,最后进行脱水处理。滴加中性树脂封片,待彻底干燥后在显微镜下观察染色结果。

1.10 RNA 测序分析 从ATO 处理和未处理的H22 细胞样品中分别提取总RNA (1 μg) 并去除污染的DNA,按照Poly (A) 法构建链特异mRNA 文库并合成cDNA 文库。测序前使用Agilent 4200 型生物分析仪评估cDNA 文库的浓度和分布,然后使用Illumina NovaSeq 6000 系统进行测序。高通量测序过程完全按照制造商说明书(美国Illumina 公司)进行。用Seqtk 工具过滤原始reads,使用Hisat2 2.0.4 软件定位基因组。使用StringTie 1.3.3b 软件对基因片段进行计数。差异表达基因是指错误发现率高于阈值($q < 0.05$) 和差异倍数(fold-change) > 2 的基因。在联川生物云平台上进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 基因集富集分析。

1.11 统计学处理 所有实验重复至少3 次。应用SPSS 21.0 软件及GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析与绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析。检验水准(α) 为0.05。

2 结果

2.1 Pin1 在人类肝癌细胞系中的表达 对DepMap 数据库23 种人肝癌细胞系(HEP3B217、JHH7、SNU878、SNU739、SKHEP1、SNU449、JHH4、HLF、SNU182、SNU761、JHH2、JHH5、Huh7、SNU886、PLCPRF5、SNU423、SNU398、HUH1、JHH1、LI7、SNU387、JHH6、SNU475) 和GEPIA 数据库人肝癌组织中Pin1 的表达情况进行分析,结果显示Pin1 在肝癌细胞系和肝癌组织中高表达(图1)。根据数据库和实验条件,选择Pin1 表达水平相对较高的Huh7 细胞进行后续实验。

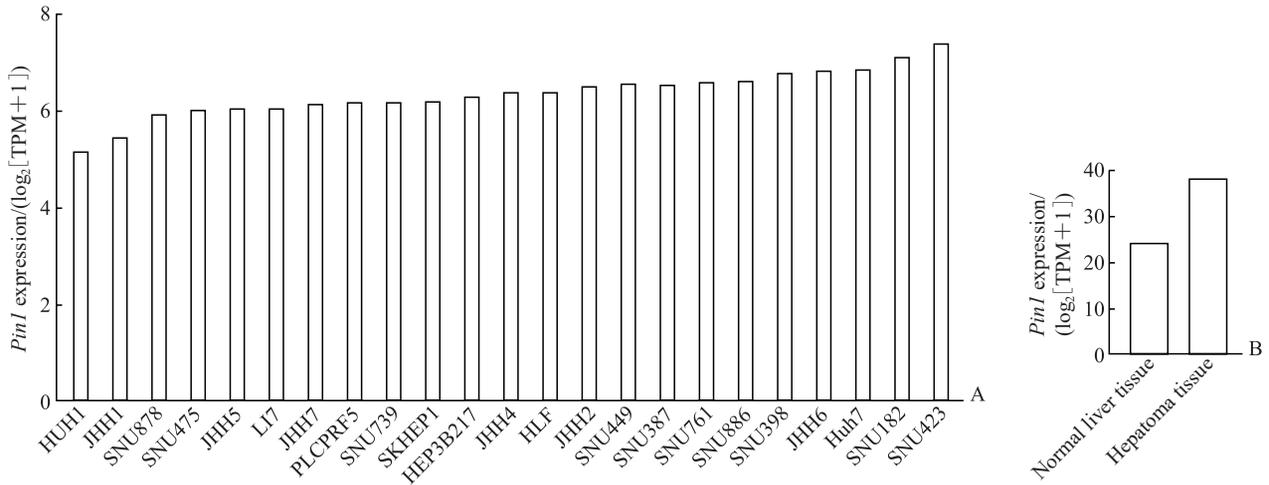


图1 DepMap数据库人肝癌细胞系和GEPIA数据库人肝癌组织中Pin1基因的表达情况

Fig 1 Expression of Pin1 gene in human hepatocellular carcinoma cell lines in DepMap database and human hepatocellular carcinoma tissue in GEPIA database

A: Analysis of Pin1 expression in 23 kinds of human hepatocellular carcinoma cell lines from DepMap database; B: Analysis of Pin1 expression in human hepatoma tissue from GEPIA database. Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; TPM: Transcripts per million.

2.2 ATO在体外对Pin1表达的抑制作用 ATP法检测结果显示, ATO在Huh7和H22细胞中具有明显的细胞毒性, ATO处理后Huh7和H22细胞的细胞活力均降低, IC₅₀分别为1.087 μg/mL和0.245 9 μg/mL(图2)。

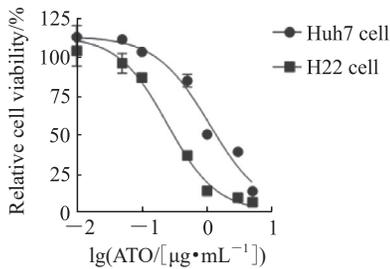


图2 ATP法检测ATO对Huh7和H22细胞活力的影响
Fig 2 Effect of ATO on viability of Huh7 and H22 cells detected by ATP method

$n=3, \bar{x} \pm s$. ATP: Adenosine triphosphate; ATO: Arsenic trioxide.

免疫荧光染色结果显示, ATO处理后Huh7细胞中Pin1的表达降低(图3A)。蛋白质印迹法检测结果显示, ATO处理后Huh7和H22细胞中Pin1表达均降低(图3B)。qPCR检测结果显示, ATO处理后Huh7和H22细胞中Pin1在转录水平上表达下调(图3C)。

2.3 ATO可能通过溶酶体途径抑制Pin1表达 预先用氯喹预处理抑制溶酶体途径后, 通过蛋白质印迹法检测观察到ATO处理的Huh7细胞中Pin1表达降低被逆转(图4A)。随后通过免疫荧光染色进

行共定位分析, Pin1和LAMP1在Huh7细胞中的分布呈现一定相关性(图4B), 表明ATO可能通过溶酶体途径影响Pin1的表达。

2.4 ATO在体内对Pin1表达的抑制作用 用H22细胞对小鼠进行皮下荷瘤造模后, 第7天开始腹腔注射ATO(3 mg/kg, 每2 d 1次); 第17天处死小鼠并取肿瘤组织, 观察肿瘤体积发现ATO在体内具有一定抗肿瘤效果(图5A)。对肿瘤组织进行H-E染色可见肝癌细胞多行排列, 核质分布异常, 而在ATO干预后肝癌细胞皱缩变圆(图5B)。免疫组织化学染色结果显示, ATO治疗组小鼠肝癌组织中Pin1阳性染色和Ki-67阳性染色均减少(图5C)。上述结果说明ATO抑制了肝癌细胞增殖及Pin1表达。

2.5 ATO通过抑制Pin1调节Wnt/β-连环素通路 RNA测序数据的基因集富集分析结果显示, 在ATO处理的H22细胞中Wnt/β-连环素通路相关基因显著富集($P=0.0309$, 图6A)。蛋白质印迹法检测结果显示, 在ATO处理的Huh7细胞中β-连环素表达降低(图6B), 说明ATO通过抑制Pin1减缓肝癌细胞生长可能与下调Wnt/β-连环素信号通路有关。进一步使用PIN1-3抑制Huh7细胞中Pin1的表达后, 检测观察到抑制Pin1对Wnt/β-连环素通路在蛋白质水平有抑制作用(图6C), 但在转录水平没有明显影响(图6D), 这表明抑制Pin1对肝癌生长的影响可能与β-连环素的蛋白质降解有关。

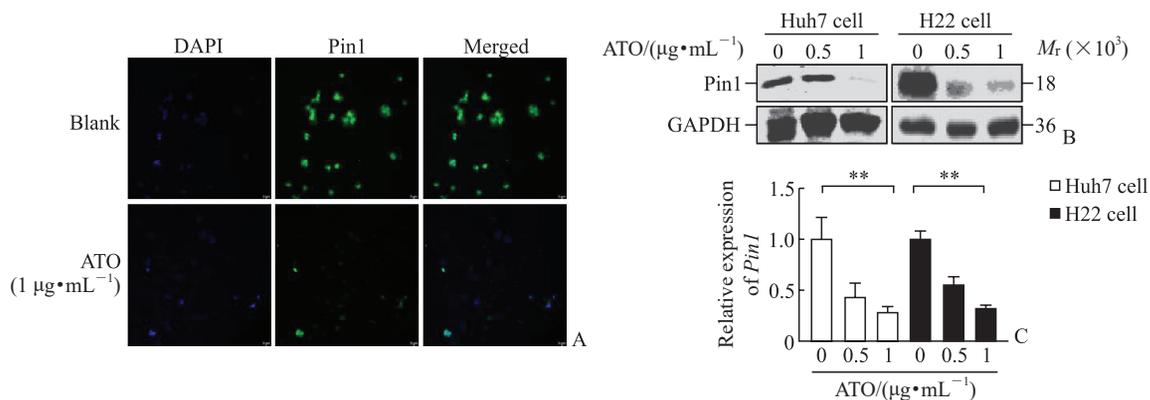


图3 ATO对Huh7和H22细胞中Pin1表达的影响

Fig 3 Effect of ATO on Pin1 expression in Huh7 and H22 cells

A: Immunofluorescence diagram of Huh7 cells (200×); B: Western blotting pictures; C: Results of quantitative polymerase chain reaction (** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$). ATO: Arsenic trioxide; Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

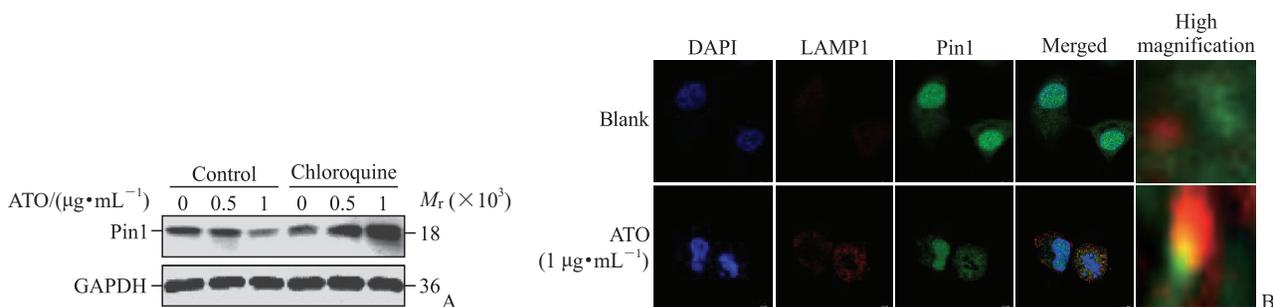


图4 Huh7细胞中氯喹预处理对ATO处理后Pin1表达的影响

Fig 4 Effect of chloroquine pretreatment on expression of Pin1 in Huh7 cells after ATO treatment

A: Expression of Pin1 in Huh7 cells detected by Western blotting; B: Co-localization expression of LAMP1 and Pin1 proteins in Huh7 cells detected by immunofluorescence (630× in the left 4 column images and 12 000× in the right 1 column image). Chloroquine is an autophagy lysosome inhibitor. ATO: Arsenic trioxide; Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein 1.

3 讨论

Pin1 是一种肽基脯氨酰基顺反异构酶,参与调节细胞增殖等多种重要细胞行为学过程。在正常组织和细胞中,Pin1 的表达水平随着年龄的增长而下降^[5]。然而,Pin1 在大多数恶性肿瘤中广泛过表达,其过度激活与临床预后不良密切相关^[6-7]。异常高表达的Pin1 通过激活包括致癌Kras 信号转导通路中多个分子在内的60 多种癌蛋白和灭活30 多种抑癌因子来促进肿瘤发生^[8]。研究发现,敲除Pin1 的小鼠对肿瘤有高度的抵抗性,且自身发育正常^[9-10]。本研究分析发现,Pin1 在肝癌中过度表达,通过ATO 降低Pin1 在肿瘤细胞中的表

达可以抑制肝癌细胞增殖。

ATO 在我国中医药领域具有悠久的历史,多项研究表明ATO 具有抑制肝癌细胞增殖的效果^[11-13]。哈佛医学院华人科学家卢坤平教授与周小珍教授等探寻了ATO 靶向抑制Pin1 治疗胰腺导管腺癌的可能性,结果显示ATO 非共价结合Pin1 活性位点,直接抑制Pin1 蛋白并激发Pin1 降解,从而下调Pin1 水平,抑制癌细胞生长^[4]。在乳腺癌中ATO 和全反式维甲酸协同抑制Pin1 表达,阻断β-连环素等途径,从而抑制乳腺癌细胞生长^[14]。本研究观察到在抗肝癌治疗中,ATO 对Pin1 在蛋白质水平上有抑制作用,并通过RNA 测序数据富集分析发现ATO 抑制Pin1 可能与Wnt/β-连环素通路有关。

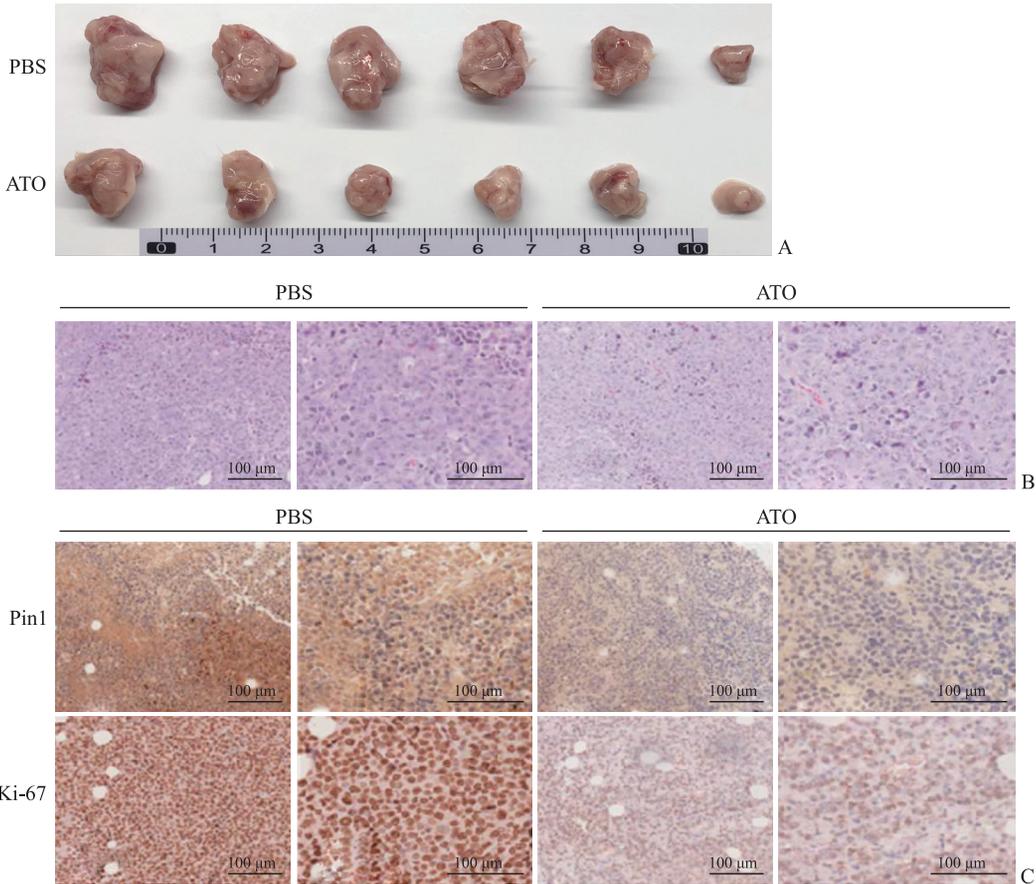


图5 ATO对H22细胞皮下荷瘤小鼠肝癌生长及肿瘤组织中Pin1和Ki-67表达的影响

Fig 5 Effects of ATO on hepatocellular carcinoma growth and Pin1 and Ki-67 expression in tumor tissue of H22 cell subcutaneous tumor-bearing mice

A: Therapeutic effect of ATO on tumor growth; B: Hepatocellular carcinoma pathology detected by hematoxylin-eosin staining; C: Expression of Pin1 and Ki-67 in tumor tissue detected by immunohistochemical staining. ATO: Arsenic trioxide; Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; PBS: Phosphate-buffered saline.

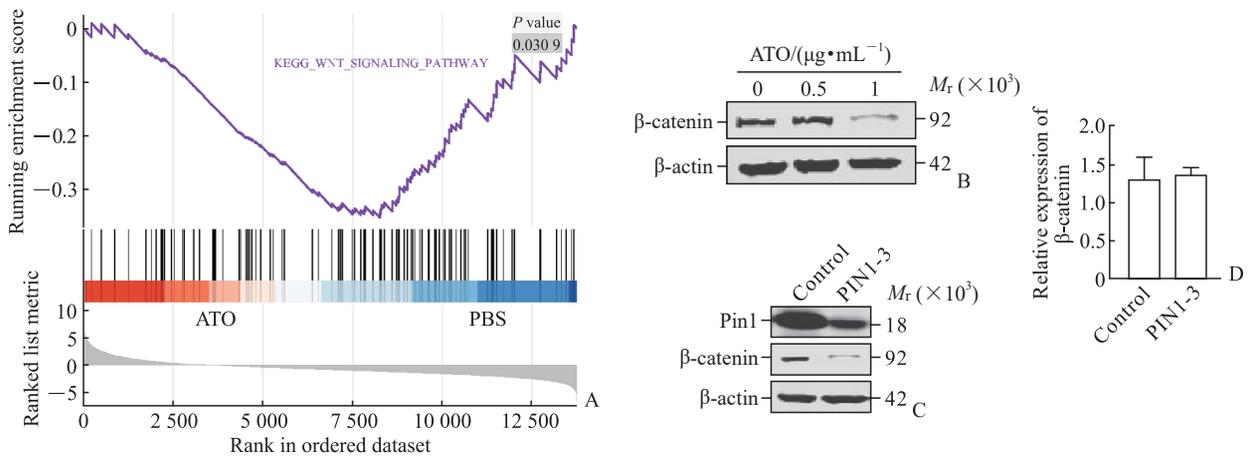


图6 ATO处理和抑制Pin1表达对肝癌细胞Wnt/β-连环素通路的影响

Fig 6 Effects of ATO treatment and inhibiting Pin1 expression on Wnt/β-catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells

A: Gene set enrichment analysis results showed that Wnt/β-catenin pathway-related genes were significantly enriched in H22 cells after ATO treatment; B: The effect of ATO on β-catenin expression in Huh7 cells detected by Western blotting; C: The effect of PIN1-3 on β-catenin expression in Huh7 cells detected by Western blotting; D: The effect of PIN1-3 on β-catenin transcriptional level in Huh7 cells detected by quantitative polymerase chain reaction ($n=3, \bar{x} \pm s$). PIN1-3, also known as sulfopin, is an inhibitor of Pin1. ATO: Arsenic trioxide; Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; PBS: Phosphate-buffered saline; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Wnt/ β -连环素信号通路是一条进化的高度保守信号通路,参与细胞分化、增殖等多个过程^[15]。Pin1与 β -连环素相互作用,抑制 β -连环素的细胞核输出和蛋白质降解^[16]。研究表明,Pin1表达与人食管鳞状细胞癌中的细胞周期蛋白D1表达呈正相关,且通过调节Wnt/ β -连环素通路促进肿瘤发生^[17]。在肝癌中Wnt/ β -连环素信号通路往往过度激活^[18]。本实验结果显示,ATO可能通过溶酶体途径抑制Pin1表达,并且抑制Wnt/ β -连环素信号通路。

本研究结果表明,ATO在肝癌中通过溶酶体途径抑制Pin1表达,并且下调Wnt/ β -连环素通路。在肝癌临床治疗中,对于Pin1异常激活和Wnt/ β -连环素信号通路过度活跃的患者ATO不失为一种潜在的治疗方案。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- [3] DE THÉ H, PANDOLFI P P, CHEN Z. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for oncoprotein-targeted cure[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(5): 552-560. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.10.002.
- [4] KOIKAWA K, KIBE S, SUIZU F, et al. Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy[J]. *Cell*, 2021, 184(18): 4753-4771.e27. DOI: 10.1016/j.cell.2021.07.020.
- [5] SAEGUSA M, HASHIMURA M, KUWATA T. Pin1 acts as a modulator of cell proliferation through alteration in NF- κ B but not β -catenin/TCF4 signalling in a subset of endometrial carcinoma cells[J]. *J Pathol*, 2010, 222(4): 410-420. DOI: 10.1002/path.2773.
- [6] LU Z, HUNTER T. Prolyl isomerase Pin1 in cancer[J]. *Cell Res*, 2014, 24(9): 1033-1049. DOI: 10.1038/cr.2014.109.
- [7] SHINODA K, KUBOKI S, SHIMIZU H, et al. Pin1 facilitates NF- κ B activation and promotes tumour progression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(9): 1323-1331. DOI: 10.1038/bjc.2015.272.
- [8] ZHOU X Z, LU K P. The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7): 463-478. DOI: 10.1038/nrc.2016.49.
- [9] GIRARDINI J E, NAPOLI M, PIAZZA S, et al. A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(1): 79-91. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.004.
- [10] LIOU Y C, RYO A, HUANG H K, et al. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1335-1340. DOI: 10.1073/pnas.032404099.
- [11] KITO M, AKAO Y, OHISHI N, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 861-867. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6525.
- [12] JIANG H, MA Y, CHEN X, et al. Genistein synergizes with arsenic trioxide to suppress human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(4): 975-983. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01464.x.
- [13] CAI X, YU L, CHEN Z, et al. Arsenic trioxide-induced upregulation of miR-1294 suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma by targeting TEAD1 and PIM1[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 28(2): 221-230. DOI: 10.3233/CBM-190490.
- [14] KOZONO S, LIN Y M, SEO H S, et al. Arsenic targets Pin1 and cooperates with retinoic acid to inhibit cancer-driving pathways and tumor-initiating cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3069. DOI: 10.1038/s41467-018-05402-2.
- [15] ZHANG Y, WANG X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165. DOI: 10.1186/s13045-020-00990-3.
- [16] RYO A, NAKAMURA M, WULF G, et al. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of β -catenin by inhibiting its interaction with APC[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(9): 793-801. DOI: 10.1038/ncb0901-793.
- [17] FUKUCHI M, FUKAI Y, KIMURA H, et al. Prolyl isomerase Pin1 expression predicts prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlates with cyclinD1 expression[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(2): 329-334.
- [18] MANI S K K, ZHANG H, DIAB A, et al. EpCAM-regulated intramembrane proteolysis induces a cancer stem cell-like gene signature in hepatitis B virus-infected hepatocytes[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(5): 888-898. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.05.022.