

学术学位博士学位论文

分 类 号: R734.2

单位代码: 10678

密 级:

学 号: 20211811

昆明医科大学

博 士 学 位 论 文



TRERF1 靶向 CXCL3 调控肺腺癌 细胞凋亡的分子机制研究

院 (系)、所 昆明医科大学第三附属医院

研究生姓名 黄秋博

学 科 专 业 外科学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 叶联华 教授

二〇二四年五月

昆明医科大学

博士学位论文

TRERF1 靶向 CXCL3 调控肺腺癌
细胞凋亡的分子机制研究

院（系）、所 昆明医科大学第三附属医院

姓 名 黄秋博

学 科 专 业 外科学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 叶联华 教授

指导小组成员 黄云超 教授

姚宏 教授

基 金 项 目 国家自然科学基金（NO. 82260508）

云南省科技计划项目（202201AY070001-156）

完 成 日 期

二〇二四年五月

目 录

前言	17
第一部分 TRERF1 对肺腺癌生物学功能作用研究	21
材料与方法	21
结果	42
讨论	61
结论	65
第二部分 TRERF1 影响肺腺癌生物学功能的分子机制研究	66
材料方法	66
结果	77
讨论	94
结论	98
第三部分 TRERF1 在肺腺癌中表达水平及与临床病理特征的关系和 对预后的影响	99
材料和方法	99
结果	104
讨论	109
结论	112
全文总结	113
参考文献	114
综述 转录调节因子 TRERF1 的研究现状	123
参考文献	129

缩 略 词 表

英文缩写	英文全称	中文全称
CHIP	chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
CI	Confidence Interval	可信区间
CO-IP	CO-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
CRISPR	Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats	成簇规律性间隔的短回文重复序列
CSF3	colony stimulating factor 3	集落刺激因子 3
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	趋化因子 1
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	趋化因子 2
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	趋化因子 3
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
EDTA	Ethytlene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	表皮生长因子受体
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
ERK	Extra regulatory regulated MAP kinase	细胞外信号调节激酶
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HE	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
HR	Hazard Ratio	风险比
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀
IRS	Immunoreactivity Scoring	免疫反应评分
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因和基因组百科全书
LUAD	Lung Adenocarcinoma	肺腺癌
Lv	Lenti-virus	慢病毒
MAPK	mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶

miRNA	microRNA	非编码微小 RNA
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NC	Negative Control	阴性对照
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	美国国立综合癌症网络
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer	非小细胞肺癌
OD	Optical Density	光密度
OE	over expression	过表达
OS	Overall Survival	总生存期
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pERK	Phosphorylation extra regulatory regulated MAP kinase	磷酸化细胞外信号调节激酶
PFS	progression-free survival	无进展生存期
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
qPCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNA-seq	RNA sequencing	转录组测序技术
sgRNA	single-guide RNAs	向导 RNA
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TRERF1	Transcriptional-regulating factor 1	转录调节因子 1
TUNEL	terminal -deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling	脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法
WB	Western Blot	蛋白印迹实验

TRERF1 靶向 CXCL3 调控肺腺癌细胞凋亡的分子机制研究

研究生：黄秋博

导 师：叶联华 教授

中文摘要

【目 的】

转录调节因子 1 (Transcriptional-regulating factor 1, TRERF1) 是非吸烟女性肺腺癌独特基因谱中的高频突变的基因, 但其在肺腺癌中的作用和机制尚未见报道。本研究旨在探索 TRERF1 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等生物学功能的作用及分子调控机制, 探讨 TRERF1 与肺腺癌患者临床特征的相关性, 为寻找肺腺癌新的潜在治疗靶点提供理论基础。

【方 法】

本研究共分为三部分

第一部分：TRERF1 对肺腺癌恶性生物学功能影响的研究

1.1 TRERF1在肺腺癌中表达情况的研究

利用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测 12 对肺腺癌及癌旁组织中 TRERF1 mRNA 的表达情况。

1.2 体外实验工具细胞的筛选及稳转细胞的构建

选取昆明医科大学第三附属医院生物样本细胞库中的 A549、PC-9、H1650、H1299、H1734、H1975、HCC827 的 7 株肺腺癌细胞, 利用蛋白印迹实验 (western blot) 方法检测 TRERF1 蛋白在不同类型肺腺癌细胞系以及正常肺上皮细胞系 BEAS2B 中的相对表达水平。根据 TRERF1 蛋白的表达情况从中选择表达量适中的肺腺癌细胞 H1975 和 H1734 为实验工具细胞, 分别采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和慢病毒过表达技术构建 TRERF1 敲除和过表达的质粒慢病毒载体, 通过病毒转染 H1975、H1734 细胞, 经嘌呤霉素筛选, 获得 TRERF1 敲除和过表达的稳定转染细胞。

1.3 敲除和过表达 TRERF1 肺腺癌细胞生物学特性的影响研究

利用 CCK8、EDU 增殖实验、划痕实验、transwell 小室细胞侵袭迁移实

验、TUNEL 细胞凋亡实验检测 TRERF1 基因过表达和敲除对增殖、迁移、侵袭及凋亡等恶性生物学功能的影响，通过 western blot 检测 BAX、BCL-2、cleaved caspase3、cleaved PARP 等凋亡相关蛋白，进一步研究 TRERF1 基因过表达和敲除对肺腺癌细胞凋亡的影响。

1.4 过表达 TRERF1 基因表达对肺腺癌裸鼠移植瘤的影响研究

将稳定转染的过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞接种于裸鼠背部皮下，同时以接种稳定转染的空载体细胞设为阴性对照，观测裸鼠一般情况、成瘤率、肿瘤生长情况，利用 western blot 检测 TRERF1 的蛋白表达情况，利用免疫组织化学技术检测移植瘤中 Ki-67、cleaved caspase3 的蛋白表达情况。

第二部分：TRERF1 对肺腺癌细胞生物学功能调控的分子机制研究

2.1 转录组测序分析筛选 TRERF1 的潜在靶基因及信号通路

利用 Illumina Novaseq™6000 对过表达的 H1975 细胞进行转录组测序，基于 GO 功能富集以及 KEGG 通路分析，筛选出与癌症密切相关的通路。利用韦恩分析筛选 TRERF1 的互作靶基因。最终用 qPCR、western blot 验证筛选出与 TRERF1 表达具有相关性的蛋白-CXCL3。

2.2 TRERF1 与 CXCL3 相互作用的研究

用 western blot 检测敲除和过表达 TRERF1 后 H1975、H1734 细胞中 CXCL3 的表达水平，免疫组织化学（IHC）检测在过表达 TRERF1 的裸鼠瘤体中 CXCL3 的蛋白表达水平，从细胞水平和裸鼠组织水平研究 TRERF1 对 CXCL3 的调控作用。染色质免疫共沉淀（CHIP）研究 TRERF1 对 CXCL3 的启动子的影响以及放线菌素 D 实验检测 TRERF1 对 CXCL3 的 RNA 稳定性影响。

2.3 TRERF1 调控 CXCL3 表达影响肺腺癌细胞增殖和凋亡的作用机制研究

构建过表达 CXCL3 慢病毒，采用回复实验，通过 CCK8、EDU、平板克隆形成实验、TUNEL 凋亡实验以及 western blot 检测凋亡相关蛋白 BCL-2、BAX、cleaved caspase3、cleaved PARP 研究 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞的增殖和凋亡能力的影响。根据通路富集分析提示 MAPK 是其潜在作用通路，进而检测 MAPK 信号通路中 pERK1/2 蛋白水平的表达是否受 TRERF1 抑制 CXCL3 的表达在影响，探讨其在 ERK 信号通路中的调节作用。

第三部分： TRERF1 与肺腺癌预后的相关性研究

应用免疫组化（Immunohistochemistry, IHC）技术比较 110 例在昆明医科大学第三附属医院经手术后病理确诊为肺腺癌患者癌和癌旁配对的组织中 TRERF1 蛋白的表达水平。结合患者临床资料特征，以 IRS 评分 4 分为截断值将肺腺癌患者分为 TRERF1 高表达组和 TRERF1 低表达组，通过组间比较 TRERF1 高表达和低表达与临床特征的相关性。分别以复发和死亡为结局，使用 Log-rank 检测比较 TRERF1 的表达水平对患者的生存的影响，使用 Cox 回归进行预后单因素和多因素分析，采用 Kaplan-Meier 法计算无病进展生存期（PFS）和总生存期（OS）。

【结 果】

1. TRERF1 的表达对肺腺癌生物学功能的影响

1.1 TRERF1 mRNA 在肺腺癌组织中的表达

TRERF1 在肺腺癌组织中 mRNA 的表达水平相对癌旁组织降低，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

1.2 筛选 H1975、H1734 为实验工具细胞，成功构建过表达和敲除稳转细胞

（1）TRERF1 蛋白在肺腺癌细胞 PC-9 中表达最高，在 H1650 中表达最低，H1975、H1734 表达适中。

（2）转染后 H1975、H1734 荧光转染率大于 90%，与对照组相比，TRERF1 的蛋白表达水平显著被过表达和敲低，统计学差异具有显著性（ $P < 0.01$ ）。

1.3 TRERF1 在肺腺癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移中的作用

（1）过表达 TRERF1 后，与对照组相比，抑制了 H1975、H1734 细胞增殖能力（ $P < 0.01$ ），减弱了 H1975、H1734 细胞迁移、侵袭能力（ $P < 0.05$ ），显著促进了 H1975、H1734 细胞的凋亡能力（ $P < 0.01$ ）。凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3 以及 BAX/BCL2 比值在过表达 TRERF1 后表达水平显著升高（ $P < 0.01$ ）。

（2）敲除 TRERF1 后，与对照组相比，显著促进了 H1975、H1734 细胞增殖能力（ $P < 0.01$ ），促进了 H1975、H1734 细胞迁移、侵袭能力（ $P < 0.05$ ），显著抑制了 H1975、H1734 细胞的凋亡能力（ $P < 0.01$ ）。凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3 以及 BAX/BCL2 比值在过表达 TRERF1 后，表达水平

显著降低 ($P<0.01$)。

1.4 TRERF1 对裸鼠皮下移植瘤成瘤和增殖的影响

1.4.1 过表达 TRERF1 对裸鼠皮下移植瘤成瘤和增殖的影响

过表达 TRERF1, 相比对照组, H1734 细胞移植瘤体积和重量统计学差异具有显著性 ($P<0.01$)。过表达 TRERF1 后 H1975 细胞对照组有 5 只裸鼠成瘤, 过表达组仅 1 只裸鼠皮下成瘤, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=5.333$, $P=0.021$)。

1.4.2 过表达 TRERF1 对移植瘤组织中增殖和凋亡相关蛋白的影响

Western blot 结果证实裸鼠实验组织中, TRERF1 较对照组表达显著升高 ($P<0.01$)。免疫组织化学染色显示: Ki-67 蛋白在实验组细胞中的表达低于 NC 组和空白对照组 ($P<0.05$), cleaved caspase3 蛋白在实验组细胞中的表达高于 NC 组和空白对照组 ($P<0.05$)。

2. TRERF1 对肺腺癌生物学功能调控的分子机制

2.1 转录组测序分析及验证筛选 TRERF1 的潜在靶基因

(1) 过表达 TRERF1 稳转细胞株经转录组测序 (RNA-seq) 发现 256 个与 TRERF1 相关的基因, 上调基因 144 个, 下调基因 112 个。

(2) GO 功能富集分析提示与细胞增殖、凋亡相关, KEGG 分析提示 TRERF1 与其差异基因共同作用于 6 条癌症相关通路分别为: MAPK、PI3K-AKT、NF- κ B、IL-17、细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞外基质受体相互作用信号通路。通过韦恩分析筛选初步筛选出 G-CSF3、CXCL3、CXCL1、CXCL5 这 4 个基因。

(3) qPCR 结果提示在过表达和敲除 TRERF1 的 H1975、H1734 细胞中, G-CSF3 mRNA、CXCL3 mRNA 与 TRERF1 mRNA 呈负向调控关系, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$);

(4) 相关性分析发现在人体肺腺癌组织中 G-CSF3 与 TRERF1 的相关性无统计学意义 ($r=0.26$, $P=0.56$), 而 CXCL3 的表达与 TRERF1 成负相关, 差异具有统计学意义 ($r=-0.810$, $P=0.027$) 选择 CXCL3 为 TRERF1 靶基因。

2.2 TRERF1 与 CXCL3 相互作用的研究

(1) 在 H1975、H1734 肺腺癌细胞中过表达 TRERF1 显著抑制了 CXCL3 蛋白的表达 ($P<0.01$), 敲除 TRERF1 显著促进了 CXCL3 的表达 ($P<0.01$);

(2) 免疫组化检测结果提示, 在过表达 TRERF1 后, 与对照组相比, 裸鼠移植瘤中 CXCL3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);

(3) 染色质免疫共沉淀 (CHIP) 提示 TRERF1 抗体中 CXCL3 启动子富集水平与对照组无统计学差异 ($P>0.05$)。

(4) 放线菌素 D (Actinomycin D) 实验结果提示, TRERF1 可能促进了 CXCL3 mRNA 的降解, 降低了 CXCL3 mRNA 的转录。

2.3 TRERF1 靶向 CXCL3 的表达通过 MAPK/ERK 信号通路抑制 H1975、H1734 肺腺癌细胞的增殖, 并促进了细胞凋亡

(1) TRERF1 对 H1975、H1734 细胞的增殖的抑制作用可以部分被 CXCL3 回复 ($P<0.05$)。

(2) TRERF1 对 H1975、H1734 细胞的凋亡作用可以被 CXCL3 回复 ($P<0.05$)。TRERF1 对凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3、cleaved PARP 的促进作用可以部分被 CXCL3 回复 ($P<0.05$)。

(3) TRERF1 抑制 ERK 信号通路中 pERK1/2 的表达, 可以部分被 CXCL3 回复 ($P<0.01$)。

3. TRERF1 的临床相关性分析

(1) 在 110 例肺腺癌组织及癌旁组织中, 与癌旁组织相比, TRERF1 蛋白表达水平表达降低, 统计学具有显著性差异 ($P<0.01$)。

(2) 在 TRERF1 的表达水平与 TNM 分期 ($P=0.027$) 以及是否复发 ($P=0.021$) 呈负相关, 存在统计学差异。

(3) COX 风险比例回归单因素、多因素分析, TRERF1 表达与复发影响无统计学意义 ($P>0.05$)

(4) TRERF1 的表达水平对无病生存期 (PFS) 影响无统计学意义 ($P>0.05$)。

(5) TRERF1 的表达水平对无病生存期 (OS) 影响无统计学意义 ($P>0.05$)。

【结 论】

1. 转录调节因子 TRERF1 抑制肺腺癌细胞增殖、侵袭、迁移能力, 显著促进了肺腺癌细胞的凋亡, 提示 TRERF1 可能是肺腺癌发展中的潜在的抑癌因子。

2. TRERF1 可能通过影响 CXCL3mRNA 的稳定性,抑制了 CXCL3 蛋白表达,负向调控 ERK 信号通路中关键蛋白 pERK1/2 的表达,影响了细胞的增殖、凋亡的能力,提示 TRERF1 通过 CXCL3 作用于 ERK 信号通路可能是抑制肺腺癌增殖,促进细胞凋亡的作用机制。

3. TRERF1 在肺腺癌组织中表达降低,其蛋白表达水平与肺腺癌患者的 TNM 分期和复发风险呈负相关,提示 TRERF1 高表达可能是肺腺癌发展中的保护因素。

关键词: 肺腺癌; TRERF1; 细胞增殖; 细胞凋亡

TRERF1 regulates CXCL3 on cell apoptosis in lung adenocarcinoma

Postgraduate: HUANG Qiubo

Supervisor: Prof. YE Lianhua

ABSTRACT

Objective

Transcriptional-regulating factor 1 (TRERF1) is a highly mutated gene in the unique gene profile of nonsmoking women with lung adenocarcinoma (LUAD), and its role and mechanism in LUAD have not been reported. The present study is designed to explore the role and Molecular mechanism of TRERF1 on the biological functions of LUAD cells such as proliferation, migration, invasion, and apoptosis, and to explore the correlation between TRERF1 and the clinical characteristics of patients with LUAD, so as to provide a theoretical basis for the investigation of potential therapeutic targets for LUAD.

Methods

The present study is divided into three parts as follows.

Part I: Effects of TRERF1 on biological functions of LUAD

1.1 Study of TRERF1 expression in LUAD

The expression of TRERF1 mRNA in 12 pairs of LUAD and adjacent tissues was detected using quantitative real-time PCR (qPCR).

1.2 Screening of *in vitro* cells and construction of stably-transfected cells

Seven types of LUAD cells, including H1975, PC-9, H1650, H1975, H1734, H1975, and H1734, were obtained from the Biological Sample Cell Bank of the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China. The relative expression levels of TRERF1 were examined in different types of LUAD cell lines, as well as in normal lung epithelial cell lines, using western blot assay. H1975

and H1734, the LUAD cells with moderate expression of TRERF1, were selected as experimental cells according to the protein expression of TRERF1. Lentiviral vectors (LVs) for TRERF1 knockdown and over-expression were constructed using CRISPR/Cas9 gene editing and LV-based technologies, respectively. The cells were transfected with viruses to obtain stably-transfected cells for TRERF1 knockdown and over-expression, which were screened by Puromycin.

1.3 Effects of knockdown and over-expression of TRERF1 on biological functions of LUAD cells

The effects of TRERF1 gene over-expression and knockdown on biological functions such as proliferation, migration, invasion, and apoptosis were detected using cell counting kit 8 (CCK8) assay, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) proliferation assay, wound healing assay, transwell migration and invasion assay, and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The effects of TRERF1 gene over-expression and knockdown on apoptosis in LUAD cells were further investigated by detecting apoptosis-related proteins, including BAX, BCL2, cleaved caspase3, and cleaved PARP, using western blot assay.

1.4 Effect of TRERF1 over-expression on transplantation tumors in nude mice with LUAD

Stably transfected H1734 and H1975 over-expressing TRERF1 were inoculated subcutaneously on the back of nude mice. The empty vectors stably transfected were set as the negative control. The general conditions, tumorigenicity, and tumor growth of the nude mice were observed. The expression of TRERF1, Ki-67, and proteins related to the mechanism were detected in the transplantation tumors using western blot assay and immunohistochemistry (IHC).

Part II: Molecular mechanism of TRERF1 regulation on biological functions of LUAD cells

2.1 Screening of potential target genes and signaling pathways of TRERF1 by RNA sequencing (RNA seq)

RNA seq was performed on over-expressed H1975 using II Illumina

NovaseqTM6000. Wayne analysis was utilized to screen for interactive target genes of TRERF1. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were carried out to screen the pathways that are closely related to cancer. Finally, CXCL3, a protein with correlation with TRERF1 expression, was selected and validated using qPCR and western blot assays.

2.2 Interaction between TRERF1 and CXCL3

Western blot assay was conducted to examine the expression level of CXCL3 in H1975 and H1734 after knockdown and over-expression of TRERF1. IHC was applied to measure the expression level of CXCL3 in tumors over-expressing TRERF1 in nude mice. The regulatory role of TRERF1 on CXCL3 was investigated at the regulatory and nude mouse tissue levels. Chromatin immunoprecipitation (CHIP) was performed to investigate the effect of TRERF1 on the promoter of CXCL3. Actinomycin D assay was utilized to detect the effect of TRERF1 on the RNA stability of CXCL3.

2.3 Mechanism of TRERF1 regulation on CXCL3 expression affecting proliferation and apoptosis of LUAD cells

Over-expression of CXCL3 lentivirus was constructed. A rescue experiment was performed. Apoptosis-related proteins, including BCL2, BAX, cleaved caspase3, cleaved PARP, and TRERF1, were detected by CCK8 assay, EDU assay, colony-formation assay, TUNEL assay, and western blot assay. The effect of TRERF1-regulated CXCL3 on the proliferation and apoptosis of LUAD cells was also investigated. The pathway enrichment analyses were performed to detect whether MAPK is a potential pathway. Then the expression level of pERK1/2 in the MAPK signaling pathway was tested to determine whether the inhibition of CXCL3 expression by TRERF1 affects pERK1/2 expression and its role in the regulation of the ERK signaling pathway.

Part III: Correlation study between TRERF1 and LUAD prognosis

IHC was applied to compare the expression levels of TRERF1 in cancer tissues and non-cancerous matched tissues (NCMTs) of 110 patients diagnosed with LUAD by postoperative pathological examination at the Third Affiliated Hospital of Kunming

Medical University. Taking into account the characteristics of the patient's clinical data, an immunoreactivity scoring system (IRS) score of 4 was adopted as the cutoff value to classify patients with LUAD into the high-expressing TRERF1 group and the low-expressing TRERF1 group. The correlation between the high and low expression of TRERF1 and the clinical characteristics was compared between groups. The Kaplan-Meier method was employed to calculate progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in terms of recurrence or not as the outcome; the Log-rank test was applied to compare the effect of the expression level of TRERF1 on the survival of the patients; and Cox regression was performed for the prognostic univariate and multivariate analyses.

Results

1. Effect of TRERF1 expression on the biological function of LUAD

1.1 Expression of TRERF1 mRNA in LUAD tissues

The expression level of TRERF1 mRNA was reduced in LUAD tissues compared to adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

1.2 Screening of H1975 and H1734 as experimental cells and construction of stably-transfected cell over-expression and knockdown

(1) TRERF1 expression was highest in PC-9, lowest in H1650, and moderate in H1975 and H1734;

(2) The IHC rates of H1975 and H1734 were greater than 90% after transfection; the expression level of TRERF1 was significantly over-expressed and knocked down compared with the control group, with statistically significant differences ($P < 0.0001$).

1.3 Role of TRERF1 in LUAD cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration

(1) Compared with the control group, over-expression of TRERF1 inhibited the proliferation of H1975 and H1734 ($P < 0.01$), attenuated the migration and invasion of H1975 and H1734 ($P < 0.05$), and significantly promoted the apoptosis of H1975 and H1734 ($P < 0.01$). Apoptosis-related proteins, including BAX, cleaved caspase3, and cleaved PARP, were expressed at elevated levels after over-expression of TRERF1 (P

< 0.01), BAX/BCL2 ratio significantly expressed ($P < 0.01$).

(2) Compared with the control group, knockdown of TRERF1 significantly promoted the proliferation of H1975 and H1734 ($P < 0.01$), enhanced the migration and invasion of H1975 and H1734 ($P < 0.05$), and significantly inhibited the apoptosis of H1975 and H1734 ($P < 0.01$). Apoptosis-related proteins, including BAX, cleaved caspase3, and cleaved PARP, were reduced in expression levels after over-expression of TRERF1 ($P < 0.01$), BAX/BCL2 ratio significantly expressed ($P < 0.01$).

1.4 Effect of TRERF1 on tumor formation and proliferation of subcutaneous transplantation tumors in nude mice

1.4.1 Effect of TRERF1 over-expression on tumor formation and proliferation of subcutaneous transplantation tumors in nude mice

Regarding over-expression of TRERF1, the transplantation tumor volume and weight of the H1734 cells were statistically significantly different compared to the control group ($P < 0.01$). After the over-expression of TRERF1, five nude mice in the H1975 cell control group and only one nude mouse in the over-expression group developed subcutaneous tumors, with statistically significant differences ($\chi^2 = 5.333$, $P = 0.021$).

1.4.2 Effect of TRERF1 over-expression on proliferation- and apoptosis-related proteins in transplantation tumor tissues

The Results of the Western blot assay confirmed that the expression of TRERF1 was significantly higher in the experimental tissues of nude mice compared with the control group ($P < 0.01$). IHC staining revealed that the expression of Ki-67 in the cells of the experimental group was lower than that in the NC group and the blank control group ($P < 0.05$); the expression of cleaved caspase3 in the cells of the experimental group was higher than that in the NC group and the blank control group ($P < 0.05$).

2. Molecular mechanism of TRERF1 regulation on the biological function of LUAD

2.1 Screening of potential target genes of TRERF1 by RNA seq analysis and validation

- (1) RNA seq identified 256 genes associated with TRERF1, of which 144 were up-regulated and 112 were down-regulated;
- (2) GO enrichment analysis suggested an association with cell proliferation and apoptosis; KEGG analysis suggested that TRERF1, together with its differential genes, acted in six cancer-related pathways, namely, MAPK, PI3K-AKT, NF- κ B, IL-17, cytokine-receptor interactions, and extra regulatory matrix (ECM) receptor interactions. Four genes, G-CSF3, CXCL3, CXCL1, and CXCL5, were initially selected by Wayne analysis.
- (3) The qPCR Results suggested that G-CSF3 mRNA and CXCL3 mRNA showed negative regulation with TRERF1 mRNA in H1975 and H1734, which over-expressed and knocked down TRERF1, and the difference was statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$).
- (4) Correlation analysis revealed that TRERF1 was not significantly correlated with G-CSF3 in LUAD tissues ($P = 0.8$), and was negatively and statistically correlated with the expression of CXCL3 ($P = 0.043$); therefore, CXCL3 was selected as the TRERF1 target gene.

2.2 Interaction between TRERF1 and CXCL3

- (1) Over-expression of TRERF1 in H1975 and H1734 significantly inhibited the expression of CXCL3 ($P < 0.01$); knockdown of TRERF1 significantly promoted the expression of CXCL3 ($P < 0.01$).
- (2) IHC Results suggested that after over-expression of TRERF1, the expression level of CXCL3 was significantly reduced in transplantation tumors of nude mice compared to the control group ($P < 0.01$).
- (3) CHIP Results suggested that the enrichment level of the CXCL3 promoter in the TRERF1 antibody was not statistically different from that of the control group ($P > 0.05$).
- (4) The Results of Actinomycin D experiments suggested that TRERF1 promoted the degradation of CXCL3 mRNA and decreased the expression of CXCL3 mRNA.

2.3 TRERF1 inhibited CXCL3 expression, suppressed the proliferation of H1975

and H1734 through the MAPK/ERK signaling pathway, and promoted apoptosis

(1) The inhibitory effect of TRERF1 on the proliferation of H1975 and H1734 could be partially rescued by CXCL3 ($P < 0.05$).

(2) The apoptotic effect of TRERF1 on H1975 and H1734 can be rescued by CXCL3 ($P < 0.05$). The promotion of BAX, cleaved caspase3, and cleaved PARP by TRERF1 could be partially rescued by CXCL3 ($P < 0.05$).

(3) TRERF1 inhibited pERK1/2 expression in the ERK signaling pathway and could be partially rescued by CXCL3 ($P < 0.01$).

3. Clinical correlation of TRERF1

(1) In 110 cases of LUAD tissues and normal NCMTs, TRERF1 was expressed at a reduced level compared with that of NCMTs, with a statistically significant difference ($P < 0.01$).

(2) The expression level of TRERF1 was negatively correlated with TNM classification ($P = 0.027$) and recurrence or not ($P = 0.021$), which were statistically different.

(3) According to the univariate and multivariate analyses performed by Cox regression, TRERF1 expression did not have a statistically significant difference with the impact of recurrence ($P > 0.05$).

(4) The expression level of TRERF1 had no statistically significant effect on progression-free survival (PFS) ($P > 0.05$).

(5) The expression level of TRERF1 had no statistically significant effect on overall survival (PFS) ($P > 0.05$).

Conclusion

1. TRERF1 inhibited the proliferation, invasion, and migration of LUAD cells and significantly promoted apoptosis of LUAD cells, suggesting that TRERF1 may be a potential tumor suppressor gene in LUAD progression.

2. TRERF1 may inhibit CXCL3 protein expression by affecting the stability of CXCL3 mRNA and negatively regulated the expression of pERK1/2, a key protein in the ERK signaling pathway, thus affecting the abilities of proliferation and apoptosis, suggesting that the mechanism of action of TRERF1 on the ERK signaling pathway through

CXCL3 may be to inhibit LUAD proliferation and promote apoptosis.

3. TRERF1 expression was reduced in LUAD tissues, and its protein expression was negatively correlated with TNM classification and recurrence risk in patients with LUAD, suggesting that high TRERF1 expression may be a protective factor in the progression of LUAD.

Keywords: Lung adenocarcinoma (LUAD); TRERF1; Proliferation; Apoptosis

TRERF1 靶向 CXCL3 调控肺腺癌细胞凋亡的分子机制研究

前 言

肺癌是严重威胁人民生命健康的恶性肿瘤，因环境和生活习俗的不同，肺癌的发病有明显的地区差异^[1]。据国家肿瘤登记中心数据统计，我国肺癌新发病例数和死亡病例数均位列恶性肿瘤首位^[2]。肺腺癌是非小细胞肺癌中最常见的组织学类型。近年来，全球肺腺癌的男、女发病率比例不断缩小^[3,4]，尤其是非吸烟女性肺腺癌发病率呈现出上升趋势^[5]。位于云南珠江源一带包括宣威、富源、麒麟和沾益等区县，是世界农村非吸烟女性肺腺癌的高发区域之一^[6,7]，构成比达 88.60%^[8,9]。严重威胁了宣威以及周边地区人民的生命健康。

吸烟和空气污染与肺癌的发生的关系密切，早期研究发现宣威肺癌高发可能由于烟煤燃烧释放的纳米二氧化硅、多环芳烃类物质（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）、尼古丁衍生的亚硝胺等引起^[10]。除已知的环境因素以外，当地居民的表现遗传因素，基因遗传易感性也逐渐受到更多的重视和关注^[11,12]。宣威地区人群遗传背景可能因受到长期的环境污染影响而发生改变，在同等暴露环境下，携带易感突变基因的人群更容易出现肺部不典型增生导致癌变。中国疾病预防控制中心何兴舟等人也发现父亲母亲患肺癌，增加了下一代罹患肺癌的风险^[13]。提示燃煤相关的空气污染导致当地居民基因谱改变以及环境和遗传因素的相互作用可能是非吸烟女性肺癌发病率升高的重要因素。既往的研究发现，长期暴露在环境中的有害物质可能促发基因突变，在宣威肺癌人群的癌组织中 TP53 基因集中在易与多环芳烃结合的 GC 富含区（外显子 153—158）的突变发生率较高^[14,15]，相比其他地区的平均水平，EGFR 21 号外显子的 L858R 突变频率降低，18 号外显子的 G719X 突变频率升高^[16,17]。除此之外，宣威非吸烟女性肺腺癌中存在更高的基因突变负荷，和基因拷贝数变异 CNVs（Copy number variations, CNVs）。提示宣威非吸烟女性肺腺癌基因谱具有显著的地区特异性^[8,18,19]。

云南省宣威地区居民长期以烟煤作为主要生活能源，燃煤中的多环芳烃类物质、尼古丁衍生的亚硝胺等有害物质对空气的污染，导致该地区肺癌整体发病率处于较高水平。课题组利用宣威非吸烟女性肺腺癌组织样本，通过基因组学分析发现，宣威非吸烟女性肺腺癌人群与吸烟人群都发生了碱基胞嘧啶

(C) 到腺嘌呤 (A) 的突变模式^[10,20], 提示其基因谱与吸烟人群有相似之处, 对燃煤和吸烟诱发肺癌的基因谱有一定代表性。因此, 以宣威非吸烟女性肺腺癌人群的基因组学特点为研究模型, 有助于进一步探索燃煤和吸烟诱发肺癌的发生发展机制, 为寻找该类人群治疗新靶点奠定研究基础。

目前针对燃煤和吸烟诱发人群相关突变基因的特征及功能研究较少, 课题组以宣威非吸烟女性肺腺癌人群为研究对象, 旨在从基因水平进一步探索燃煤和吸烟导致肺癌发生发展的机制。我们收集了对 117 例来自宣威的非吸烟女性初治肺腺癌患者肿瘤组织和正常肺组织样本, 通过行全外显子和转录组测序结果, 最终与 TCGA 数据库女性吸烟者和 102 例女性非吸烟者的数据比较分析发现, 该人群癌组织中有 35729 个体细胞突变, 包括 34287 个单核苷酸变体 (SNV) 和 1442 个插入或缺失 (IN-DEL)。由癌组织样本的突变负荷 (中位数 2.11) 高于 TCGA 数据库中肺鳞状细胞癌 (LUSC) (中位数 1.63) 和 LUAD (中位数 1.41)。运用 MutSig2CV 和 oncodriveCLUST 算法来识别宣威非吸烟女性肺腺癌中的显著突变基因, 筛选出 33 个优势突变基因, 其中, 最大突变频率基因是 EGFR (52.68%), 其次是 TP53 (41.07%), RBM10 (10.71%), TRERF1 (11%), KRAS (7.14%), NKX2-1 (4.46%), TRPN (4%), SPTLC (4%) 等。其中 EGFR、TP53、KRAS 等突变基因频率与既往已报道的东亚人群肺腺癌相似, 但是 LONRF3、KLK14、MCF2、FAM101A、POTEC、SLC39A5、CDX4、NKX2-1、TRERF1、PRSS55、SPTLC1、TPRN 等优势突变基因是此次研究中首次发现。进一步研究这些区域性特征及其在肺腺癌中的功能, 有助于宣威肺癌病因的深入探索。

转录调节因子 TRERF1 (Transcriptional-regulating factor 1) 在宣威非吸烟女性中显著突变, 但其在肺癌中的研究还未见报道。在 TCGA 数据库中, TRERF1 在肺腺癌和癌旁组织的表达具有差异下, 利用慢病毒技术, 将 TRERF1 表达上调后发现可以抑制肺癌 H1299 细胞的增殖能力, 进一步研究 TRERF1 在肺腺癌中的恶性生物学功能, 探究其在肺腺癌中的功能机制, 对解析燃煤和吸烟相关肺癌的发生发展有一定意义。

TRERF1 含有三个 C2H2 锌指结构, 具有转录调控蛋白功能的结构域。该基因位于 6p21.1, 蛋白分子量为 132KDa, 主要表达于细胞核内。TRERF1 在羧基

端有富含酸性和脯氨酸残基的结构域，类似于 p53 中鉴定的功能结构域^[21]。既往研究发现，TRERF1 在许多类固醇生成组织中表达，可以作为转录因子修饰调控胆固醇侧链裂解酶（P450_{scc}）的表达^[22, 23]，影响胆固醇向孕烯醇酮的转化，是类固醇形成因子 1（Steroidogenic Factor-1，SF-1）的激活剂，在类固醇激素的产生中起着至关重要的作用。此外，TRERF1 也在非类固醇生成组织中表达，如肺、皮肤、胸腺等。TRERF1 转录调控不仅是类固醇生长信号因子的主要靶点^[24]，还与肿瘤形成有关^[25]。2005 年，美国研究者，发现 TRERF1 具有抑制宫颈癌和乳腺癌细胞的增殖，其机制可能是从在转录水平上调细胞周期依赖性激酶抑制剂（cyclin-dependent kinases inhibitors，CDKI）p21 和 p27 的表达，从而抑制广泛的细胞周期激酶（cyclin-dependent kinases，CDK），降低 G1 细胞周期蛋白/CDK 复合物的激酶活性，降低 RB 磷酸化水平，影响了细胞周期 G1 向 S 期的发展，抑制细胞周期进程^[26]。相关研究报道 TRERF1 在多种肿瘤中表现十分活跃，可参与调控多种基因表达^[27, 28]，目前 SF-1 的激活剂，如 CBP/p300，也被证实可以影响癌细胞增殖以及非类固醇原性和类固醇源性癌症的发展^[29]。但目前，TRERF1 在肺癌中的研究还未见报道，通过生物信息数据库发现 TRERF1 在肺腺癌组织和癌旁组织中差异表达，TRERF1 可能通过影响细胞增殖、凋亡等信号通路发挥生物学功能（图 1），我们推测 TRERF1 可能在肺腺癌发生发展中起到一定的作用，靶向该蛋白可能为肺腺癌的分子治疗提供新的途径。

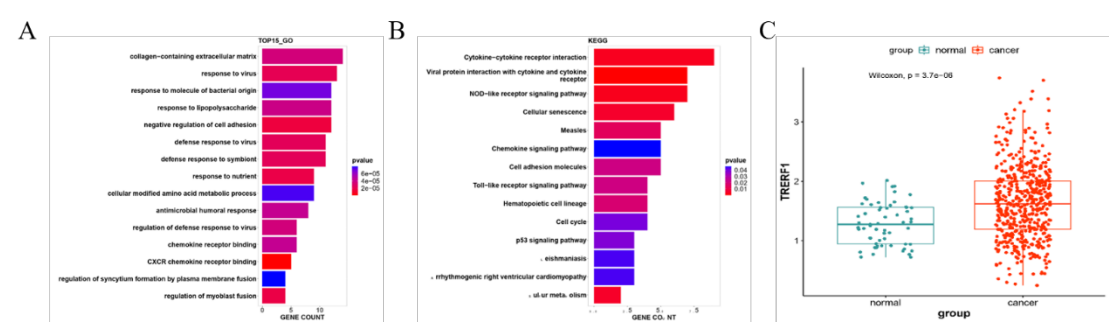


图 1 生信分析 TRERF1 mRNA 在肺腺癌组织和正常肺组织的表达以及 GO、KEGG 分析结果

A.单基因生信分析 TRERF1 GO 功能富集分析结果。B. 单基因生信分析 TRERF1 KEGG 通路分析结果。C. 在 TCGA 数据库中，肺腺癌组织中 TRERF1 mRNA 的表达水平与正常肺组

织相比差异有显著性,**** $P<0.0001$ 。

Figure 1 Bioinformatics analysis of TRERF1 mRNA expression in lung adenocarcinoma tissue and normal lung tissue, as well as GO and KEGG analysis result

A. Single gene bioinformatics analysis Results of TRERF1 GO functional enrichment analysis. B. Single gene bioinformatics analysis Results of TRERF1 KEGG pathway analysis. C. The expression levels of TRERF1 mRNA in cancer samples 526 and 59 adjacent lung adenocarcinoma tissues in TCGA were significantly different from those in normal lung tissues, **** $P<0.0001$.

本研究分三部分进行：第一部分研究 TRERF1 对肺腺癌生物学功能影响，第二部分研究 TRERF1 对肺腺癌生物学功能影响的分子机制；第三部分研究 TRERF1 与肺腺癌临床的相关性研究。

第一部分 TRERF1对肺腺癌生物学功能作用研究

宣威非吸烟女性肺腺癌高发与当地燃煤所致的空气污染有关^[30-33]，作为全球燃煤诱发非吸烟女性肺腺癌的典型代表，通过基因组学分析发现，宣威非吸烟女性肺癌人群有独特的基因图谱，对这些基因进行深入研究，有助于为燃煤诱发肺癌的新的治疗策略提供帮助。

通过对云南省宣威非吸烟女性肺腺癌组织的全外显子测序结果的初步分析发现转录调节因子 TRERF1 具有较高频突变，深入分析 TRERF1 在肺腺癌中发挥恶性生物学功能，可以为进一步探索和补充燃煤诱发肺癌的相关分子机制，寻找新的治疗靶点治疗提供依据。

TRERF1 此前作为类固醇形成因子已被广泛证实，后来有学者研究发现 TRERF1 可能通过影响细胞的增殖、迁移和凋亡等参与乳腺癌的发生发展，提示其可能在恶性肿瘤中扮演重要角色，但目前 TRERF1 在肺腺癌中的功能还未见研究报道。

前期通过生信分析发现 TRERF1 在非吸烟女性肺腺癌组织和癌旁组织具有表达差异，过表达 TRERF1 后可以抑制肺癌细胞的增殖，因此，本部分利用 qPCR 技术在组织水平上检测 TRERF1 在肺腺癌组织和癌旁组织的表达差异，并进一步通过体外和体内实验探讨 TRERF1 对肺腺癌恶性生物学功能的影响。

材料与方法

1.实验材料

1.1 主要仪器

仪器名称	品牌	型号
血细胞分离机	Gambro	Gambro Spectra TM
倒置显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CKX-31(双目)
显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CX31(双目)
荧光显微镜	赛默飞世尔(中国)有限公司	Ci-L
倒置显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CKX41

生物显微镜	德国徕卡仪器有限公司	DMI4000B
定量 PCR 仪	美国 ABI 公司	7500 型
梯度 PCR 仪	新加坡 Life Technologies	MiniAmp PCR
台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-15R
高速冷冻台式离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra 64R
台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-22R
多功能台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-25R
电子天平	瑞士梅特勒-托利多中国地区	AB204-L
电子天平	赛多利斯（上海）贸易有限公司	Quintix5102-1CN
流式细胞仪	美国 BD 公司	BD FACSAria
流式细胞仪	美国 BD 公司	BD CantoII
液氮冻存系统	美国 CBS	V-1500B
过滤系统	Millipore 公司	Elix 10
超纯水系统	Millipore 公司	Mill-QB
二氧化碳培养箱	ThermoFisher 集团	3111
生物安全柜	美国 Forma 公司	1287
荧光化学分析仪	赛默飞世尔(中国)有限公司	Vaio Skan Flash
超低温冰箱	美国 Forma 公司	8694
移液器	吉尔森	吉尔森
制冰机	马尼托瓦（中国）制冷有限公司	SF0406A(RF0650A)
酶标仪	赛默飞世尔(中国)有限公司	MuLtskanFC
净化工作台	济南康宝净化设备有限公司	JHT-SDC
微型台式离心机	日本 Tomyw	PMC-880(Micro ONE)
液氮生物容器罐	四川亚西橡塑机器有限公司	YDS-30-125

电动辅助吸液器	法国吉尔森公司(GisonS.A.S)	MAXROMAN1000PL+
多功能电融合和电穿孔系统	美国 BTX 公司	ECM201
微量紫外光光度计（紫外/可见光分光光度计	美国 NanoDrop	NanoDrop200
轮转切片机	德国徕卡仪器有限公司	RM2235
凝胶成像仪	上海天能科技有限公司	Tanon 4600SF
微生物培养箱	赛默飞世尔集团	B6060
程序冷冻仪	赛默飞世尔集团	7453
冷藏冷冻保存箱	青岛海尔生物医疗股份有限公司	HYCD-205
医用保存箱	青岛海尔特种电器有限公司	HYC-198S
高压灭菌锅	德国 Syste 公司	Syste VX-75
磁力搅拌器	IKA 艾卡（广州）仪器设备有限公司	RH BASIC2

1.2 主要试剂和材料

耗材名称	厂家名称	货号
重组胰蛋白酶	索莱宝	T8152
研磨珠（钢）	赛维尔	G0103-200g
细胞刮刀	Corning	3010
无血清快速细胞冻存液	博奥龙	KX0310041-100
屈臣氏蒸馏水 105 度高温蒸馏 650 mL	屈臣氏	9654
青霉素-链霉素“双抗”100x	博奥龙	BDXB0008
培养瓶 75cm ²	Corning	430641
梅笛医用擦手纸	梅笛	9619
慢病毒纯化试剂盒（磁珠型）	OMIGET	0mL-02
氯化钠（≥99.0%BioReagent）	碧云天	ST1641-1KG

酒精喷壶	国产	3607
干冰		3438
对氟苯甲醛	乐研	1033060
磁力架	百迈格	BMB08-1.5-2Q
彩色 PAGE 快速凝胶试剂盒（12%）	爱必信	abs9368-1Kit
TRERF1- Polyclonal Antibody Rabbit / IgG	protientech	20062-1-AP
RPMI-1640 含 L-谷氨酰胺	VivaCell	C3010-0500
RPMI 1640 液体培养基	Gibco	C11875500BT
Protein G Mag Sepharose Xtra	cytiva	28967070
Pen-strep solution 青霉素-链霉素溶液	VivaCell	C3420-0100
MATRIGEL MATRIX	BD	356234
HEPES 缓冲液 1.0 mol	VivaCell	C3544-0100
DTT (DNase, RNase & Protease free)	碧云天	ST040-1g
DMEM/高糖 含 L-谷氨酰胺，含丙酮酸钠	VivaCell	C3113-0500
DMEM(高糖)培养基	Biochannel	BC-M-005-500mL
Certified Fetal Bovine Serum 特级胎牛血清-南美	VivaCell	C04001-050X10
Cell Counting Kit-8（CCK-8）试剂盒	Proteintech	PF00004
APC/Cyanine7 anti-human CD68 Antibody	Biolegend	333821
96 孔细胞培养板，U 型底，TC 处理	Corning	3799
75%乙醇	天根	6848
50 mL 塑料离心管盒	国产	9632
50 mL 灭菌离心管	巴罗克	10-9501
25 mL 移液管，独立包装	Nest	328001
24 孔细胞标准培养板	Corning	3524

22 mm 透析袋	biosharp	BS-QT-020
2,4-二氯苯甲醛	乐研	1045426
1 mL 一次性无菌注射器	国产	8127
15 mL 塑料离心管盒	国产	9633
15 mL 灭菌离心管	巴罗克	10-9151
150 mm 细胞培养皿, TC	Nest	715001
10 mL 移液管	Nest	327001
100 mm 细胞培养皿	Corning	430167
1.5 mL 无色离心管	Axygen	MCT-150-C
0.5-20uL 透明吸头	AXYGEN	T-400
0.5-10uL 透明吸头	AXYGEN	T-300

2. 检测 TREFR1 在组织中 mRNA 表达情况

2.1 收集肺腺癌组织样本

收集 12 对肺腺癌癌和癌旁配对的组织样本, 检测 TRERF1 mRNA 在组织中的表达情况。

纳入标准: (1) 宣威地区 (当地出生并居住生活 3 代及以上) 无吸烟史的女性肺腺癌患者; (2) 患者病理冻存组织标本保存完整。

排除标准: (1) 术前接受过放、化疗及其他针对肿瘤的治疗; (2) 合并其他恶性肿瘤。

2.2 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测 TREFR1 在组织中 RNA 表达情况

(1) 肺腺癌组织中总 RNA 提取

利用 RNA 提取试剂盒 (天根) 提取肺腺癌组织中总 RNA:

- ① 将组织在液氮中磨碎, 加 1 mL 裂解液, 匀浆;
- ② 用无 RNase 水清洗磨碎组织 2 次, 静置 6 min, 待组织沉淀, 离心: 12000 r/min, 10min, 取上清装入 1.5mL EP 管;
- ③ 用 1mL 异丙醇重悬组织沉淀, 充分混匀, 静置 10 min, 离心: 12000

r/min, 10min, 弃上清, 保留组织沉淀;

④ 用无 RNase 水稀释无水乙醇为 75%乙醇, 加入 500 μ L 75%乙醇, 充分混匀, 8000 r/min 离心 3 min;

⑤ 弃上清, 静置, 待沉淀晾干, 加入 30 μ L DEPC 水, 上下振荡混匀, 用分光光度计检测 RNA 浓度与纯度。

(2) H1957、H19734 肺腺癌细胞 RNA 浓度、完整性和纯度的检测

①用分光光度计检测上述提取的 H1734、H1975 的总 RNA 的浓度和纯度, DEPC 水调零校准, 向检测柱加入 1-2 μ L 的样品, 检测 RNA 浓度值, 记录;

②用琼脂糖凝胶电泳检测 H1734、H1975 的总 RNA 的完整性, 制作 1%琼脂糖凝胶中, 用 RNA 液将 loading buffer 稀释为 1X, 上样电泳检测并观察;

③收集 RNA 后用于后续实验, 并储存在-80℃冰箱内。

(3) cDNA 逆转录的合成

①根据分光光度计所测的 RNA 浓度, 配置含 1000ng RNA 的 cDNA 模板, 加入 4 μ L 商品化 Mix 溶液, DEPC 水补齐至 20 μ L, 充分吹打混匀, 设定 PCR 仪中 42℃, 3min, 去除 gDNA;

②向完成第一步扩增的样品中加入 4 μ L 5X HiScript III qRT Super Mix 试剂, 设置 PCR 仪参数为 42℃, 15 min, 95℃, 3min, 最终合成 cDNA 模板;

③ -80℃保存 cDNA 模板。

(4) qPCR

① 取 200 μ L EP 管, 分组标记, 配制 20 μ L 的反应体系, TB GREEN 10 μ L, 0.8 μ L 的 Forward Primer, 0.8 μ L 的 Reverse Primer, 0.4 μ L 的 ROX, 2 μ L 的 cDNA 模板, DEPC 6 μ L。待测内参基因和目的基因各配制 3 个复孔;

②用 7500 qPCR 检测仪参数设置为: 95℃, 30 s; 95℃, 10s; 60℃, 30s, 共 40 个循环。熔解曲线: 95℃, 15s; 60℃, 60s; 95℃, 15s。记录 CT 值;

③根据目的基因与内参基因的 CT 值, 用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量。比较 12 对组织中 TRERF1 mRNA 的表达情况。

3 体外细胞实验研究 TRERF1 对肺腺癌细胞的生物学功能的影响

3.1 实验工具细胞的筛选

实验肺癌细胞系来源昆明医科大学第三附属医院生物样本库, 选取 1 株正常

支气管肺上皮细胞 Beas2B, 7 株肺腺癌细胞系分别为 A549、PC-9、H1975、H1734、H1299, H1650、HCC827。

3.1.1 细胞的复苏、培养、传代和冻存

(1) 细胞的复苏

- ① 培养基选择 A549 (F12-DMEM)、其余均用培养基 1640, 完全培养基制备: 10% 胎牛血清+1%的青链霉素双抗;
- ② 37℃预热水浴槽, 将冻存细胞放入水浴槽融化, 后用 1mL 培养基重悬细胞, 移至 15mL 离心管, 调整离心机转速为 1000 r/min, 离心 5 min, 弃上清;
- ③ 用 1mL 完全培养基重悬细胞, 充分混匀, 接种于 T25 细胞培养瓶, 补充 4mL 培养基, 混匀后静置放于 37℃细胞培养箱。

(2) 细胞培养

将上述充分混匀并继续培养, 24h 至 72h 后更换新鲜培养液。观察细胞铺满瓶底约 90%时, 进行细胞分瓶传代。

(3) 细胞传代

- ①按 1: 2 或 1: 3 传代;
- ②弃去原先培养基, 缓慢加入 1mL PBS 1mL 清洗 2 次, 保证 PBS 充分吸尽, 加入 1mL 胰酶进行消化, 待细胞可从培养瓶底部轻易脱落, 在显微镜下观察细胞变圆, 按 1: 2 加入完全培养基终止消化;
- ③ 用移液枪吹打均匀后移至 15mL 离心管, 1000 r/min, 离心 5 min, 按 1: 2 或 1: 3 传代在 T25 培养瓶内, 放置于培养箱中继续培养。

(4) 细胞计数

- ①取出细胞培养瓶, 消化、离心, 弃上清, 加入 1mL PBS 重悬收集细胞;
- ②准备血球计数板, 盖玻片, 取 10uL 细胞悬液, 稀释, 再取 10uL 通过虹吸作用加到计数板, 平移计数板至显微镜下。计数视野中四个方格中的细胞总数, 通过公式: 细胞总数/4×稀释倍数×10⁴ 计算得出 1 mL 细胞数量。

(5) 细胞冻存

收集部分生长状态良好的细胞冻存保种, 记录冻存时间和细胞代次。选择需要保种的细胞消化收集细胞于 15mL 离心管中, 用细胞冻存液 1mL 重悬后移入冻存管放入-80℃液氮罐中保存。

3.1.2 Western Blot 检测 TRERF1 在正常肺支气管上皮细胞 BEAS2B 和 7 株肺腺癌细胞中的蛋白表达水平

(1) 总蛋白提取

预先用 T25 培养 Beas2B, A549、PC-9、H1975、H1734、H1299, H1650、HCC827 细胞, 待细胞密度 90%左右, 取 T25 细胞培养皿。

弃培养液, 用 4℃预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞, 重复 1 次, 按照 RIPA: PMSF=100: 1, 配制裂解液, 根据细胞密度加入 300-500uL 裂解液, 混匀放于冰上裂解 30 min, 用移液枪、细胞刮将吹打, 刮下细胞混悬液, 移至 1.5 mL EP 管, 冰上裂解 5 -10min, 超声破碎机破碎 5 min; 4℃ 12000 rpm/min, 离心 15 min, 取上清液。

(2) 蛋白浓度测定 (索莱宝 BCA 试剂盒)

室温放置 RIPA, 沉淀溶解, 取 1mLRIPA 加入 10uL PMSF, 混匀。

稀释 BSA 标准品: 用 PBS 稀释 BSA 标准品, 终浓度为 0.5ug/uL; 按说明书配制 BCA 工作液, 按浓度梯度 0μL、2μL、4μL、6μL、8μL、12μL、16μL、20μL 上样于 96 孔板, 用 PBS 补齐至 20 μL, 分别取 4μL 待测蛋白样品上样到 96 孔板, 加 16uL PBS 补齐至 20 μL。

向标准品孔以及样品孔每孔加入 200 μL BCA 工作液, 放入培养箱孵育 30 min。

将待测 96 孔板放入酶标仪, 设定在 562 nm 波长检测吸光度 (Optical Density, OD) 值; 根据标准溶液的浓度 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.5 与实测浓度绘制标准曲线, 得出方程, 计算出待测蛋白的浓度。

(3) 蛋白变性

根据所需蛋白的定量浓度, 计算出蛋白原液, 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲, ddH₂O 分别补齐所需体积, 分别加入 1.5uLEP 管, 置于 100℃金属浴, 变性 5 min, 放入-20℃保存。

(4) SDS-PAGE 凝胶配置

根据目的蛋白的分子量大小 (TRERF1 132KDa, GAPDH 39KDa) 选择凝胶浓度。

配制凝胶厚度 1.5mm, 取等体积下层胶溶液和下层胶缓冲液混匀, 加入 80uL

促凝剂再次混匀后加入制胶玻璃板中，加入 1mL 无水乙醇压胶，待下层胶凝固后，弃掉乙醇。

配制上层胶取等体积上层胶溶液和上层胶缓冲液混匀，加入 30uL 促凝剂再次混匀后加入制胶玻璃板中，插入样品梳，待浓缩胶凝固。

下层胶配方			
凝胶厚度	下层胶溶液	下层胶缓冲液	促凝剂
1.5mm	4.0mL	4.0mL	80uL
上层胶配方			
凝胶厚度	下层胶溶液	下层胶缓冲液	促凝剂
1.5mm	1.0mL	1.0mL	30uL

取碧云天 SDS-PAGE 电泳液粉剂，倒入烧杯中，加入三蒸水 900mL 溶解，充分混匀，定溶制备 1000mL 1×电泳液。

将配制好的玻璃板固定于夹板，放入电泳槽，向内槽中加入电泳液，刮去上层电泳液气泡，垂直拔出梳子，避免气泡产生。

(5) 蛋白上样、电泳

取 1uL-3uL 适量体积的 Marker 和定量的变性蛋白样品，按照预设顺序上样，接通电源，浓缩胶：60v-80 v 恒压，分离胶后：120V，待蛋白样品到达分离胶底部时断电结束电泳，需注意观察，避免蛋白样品跑出胶外。

(6) 转膜、封闭

准备 2 张海綿，2-3 张厚滤纸，1 张 7*8.5cm 的 PVDF 膜，PVDF 膜先置于甲醇溶液中浸泡 30s 激活，后置于预冷的 1×电泳液中备用。

取 1 瓶可配置 1000mL 的碧云天转膜液粉剂，加入 700mL 三蒸水溶解，后加入 200mL 无水乙醇，预冷备用。

用回收的转膜液预先浸泡海绵和滤纸，用 ddH₂O 冲洗电泳完毕的分离胶，在回收转膜液中制备“夹心饼”从负极到正极（黑-白）顺序依次为：海绵垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫。按上述顺序依次制备转膜所需夹板，注意每种物品对其，排出气泡。

将新鲜配制的转膜液倒入转膜槽，将夹心饼按红对红，黑对黑放入装有转膜液的电泳槽中。接通电源，设置 200 mA 恒流模式，置于冰浴环境下转膜 200 min。

转膜结束后,取出 PVDF 膜,避免 PVDF 膜在转膜液中浸泡时间过长,用 1×TBST 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 分钟,

用 2.5g 脱脂牛奶+1X TBST 配制 5%的牛奶封闭液 50mL,将封闭液浸没 PVDF 膜置于摇床上,封闭 2h。参照 Marker 标志线,根据目的蛋白分子量裁剪 PVDF 膜,在左上角切角以标记上样的顺序。

(7) 抗原-抗体反应、显影分析

按 (TRERF1 1:500, GAPDH 1:50000) 的目的蛋白和内参,用配制一抗稀释液一抗,取适量的一抗加入抗体孵育盒,将对应的分子条带放入对应的一抗稀释溶液中,4℃孵育过夜。

第二天用 1×TBST 稀释二抗 (1: 5000),取出一抗孵育过的膜,用 1×TBST 在摇床上清洗 3 次,每次 5min。将膜放入二抗稀释液中,室温孵育 1 h。1×TBST 缓冲液于摇床上室温洗涤 3 次,每次 10 min。

等体积 1:1 混合 ECL 发光底物试剂盒中的两种液体,将 PVDF 膜浸泡在发光液中,室温避光浸泡 1-3 min,放入显像仪显像,调整曝光时间,拷贝图片,保存结果图,采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。选取蛋白表达适中的 2 株肺腺癌细胞株用于后续功能实验。

3.2. 构建 TRERF1 敲除的 H1975、H1734 细胞

3.2.1 构建 TRERF1 的 Crisper-cas9 慢病毒质粒载体

(1) sgRNA 序列

sgRNA	sgRNA 序列 (5'-3')
sgRNA1#	CGGGAAGGGATAGCCGGTGC
sgRNA2#	CTTCTGGGTCCGGATCTCGC
sgRNA3#	GCGGGCTGAACCACAACAT

(2) 慢病毒载体

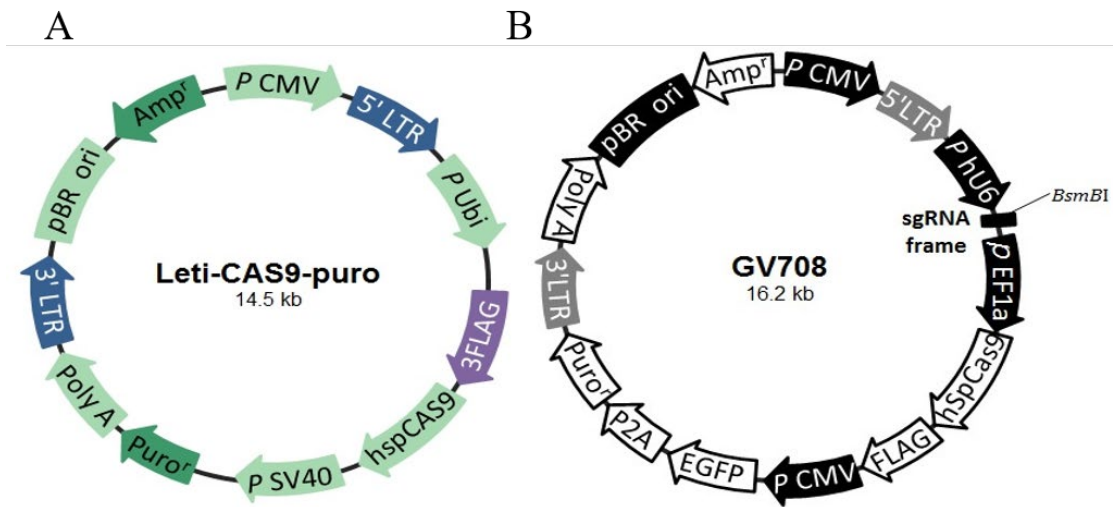


图 1-1TRERF1 crisper-case9 质粒和载体图谱

A Lenti-CAS9-puro 质粒； B GV708 慢病毒载体（购自上海吉凯基因公司）

载体名称：GV708；元件顺序：U6-sgRNA-EF1a-Cas9-FLAG-CMV-EGFP-P2A-puro；对照插入序列：CGCTTCCGCGGCCCGTTCAA。

(3) 合成 oligo 信息：

NO.	5'	STEM	3'
TRERF1-sgRNA1#-a	CACCg	CGGGAAGGGATAGCCGGTGC	
TRERF1-sgRNA1#-b	aaac	GCACCGGCTATCCCTTCCCG	c
TRERF1-sgRNA2#-a	CACCg	CTTCTGGGTCCGGATCTCGC	
TRERF1-sgRNA2#-b	aaac	GCGAGATCCGGACCCAGAAG	c
TRERF1-sgRNA3#-a	CACCg	GCGGGCTGAACCACA ACTAT	
TRERF1-sgRNA3#-b	aaac	ATAGTTGTGGTTCAGCCCGC	c

(4) 测序检测上述 3 条 sgRNA 是否与载体连接。

3.2.2 慢病毒转染构建 TRERF1 敲除的 H1975、H1734 的细胞

(1) 按分组为：H1975 阴性对照组(H1975-sh-NC)和 TRERF1 敲除组(H1975-sg-TRERF1-1#、H1975-sg-TRERF1-2#、H1975-sg-TRERF1-3#)，以及 H1734 阴性对照组(H1734-sh-NC)和 TRERF1 敲除组(H1734-sg-TRERF1-1#、H1734-sg-TRERF1-2#、H1975-sg-TRERF1-3#)进行细胞铺板。将生长状态良好的 H1975、H1734 细胞接种在 6 孔板，待细胞密度约 90%-95%后按进行转染。

(2) 慢病毒转染:

①依据 MOI 值计算病毒量, sh-NC 组滴入空载质粒液, sh-TRERF1-1#、sh-TRERF1-2#、sh-TRERF1-3#组滴入过表达病毒液。

②在敲除组中, 每个孔加入 1 mL 含 10%胎牛血清+1%双抗的完全培养液、5uL 病毒液, 其中对照组为空载质粒病毒液, 混匀后在继续进行细胞培养。

③培养 8h、12h、24h 观察细胞状态, 24h 后更换培养基, 24h、48h 后用荧光显微镜观察转染荧光效率, 待荧光效率大于 90%, 按照 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 的梯度配制不同浓度梯度的嘌呤霉素浓度, 观察细胞状态, 选择嘌呤霉素最佳浓度, 用于后续对敲除 TRERF1 的 H1975、H1734 稳转细胞的筛选。

用合适浓度嘌呤霉素筛选 H1975、H1734 敲除 TRERF1 稳转细胞, 继续培养细胞 3-4 天, 待未被成功转染的细胞死亡时, 挑选单克隆继续培养, 用于目的蛋白的检测。

(3) 在荧光显微镜下拍照记录, 将成功稳定转染的细胞一部分用于提取蛋白和 RNA 检测 TRERF1 蛋白和 mRNA 表达水平, 一部分冻存于-80℃冰箱备用。

3.2.3 检测敲除 TRERF1 后在肺腺癌细胞中的蛋白表达水平

Western Blot 检测 3 条 sgRNA 转染后, H1975、H1734 细胞中 TRERF1 的蛋白表达情况, 根据上述检测结果, 选取敲除效率较高的稳转细胞继续培养用于后续 TRERF1 在肺腺癌恶性生物学功能的研究。(WB 检测方法同前)

3.3 构建 TRERF1 过表达的 H1975、H1734 细胞

3.3.1 构建 TRERF1 的过表达慢病毒质粒载体

使用慢病毒重组载体做基因过表达, 外源 TRERF1 的 DNA 链接慢病毒载体多克隆位点。

(1) 引物序列

ID	seq
TRERF1(Lv)-p1	AGGTCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCATGGGTGACCAGCAACTGTACAAGACC
TRERF1(Lv)-p2	TCCTTG TAGTCCATACCGGTTAGTTCTGCGTCACCCTGAAGCAAGAC

(2) 载体

载体名称: GV492、元件顺序: Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin

克隆位点: BamHI / AgeI

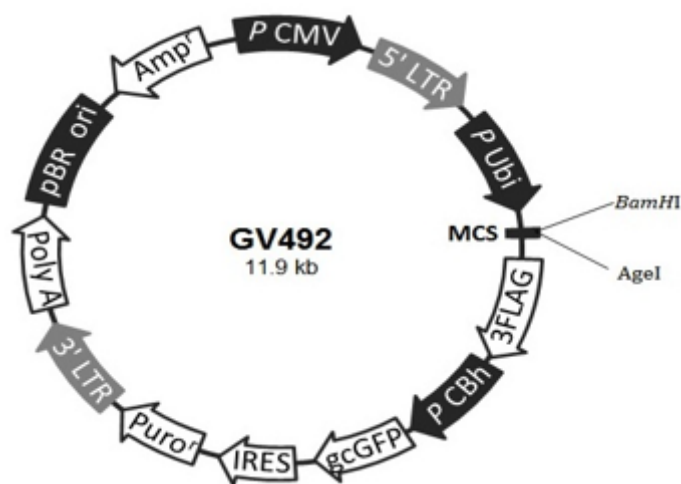


图 1-2 GV492 慢病毒载体

注: GV492 载体, BamHI / AgeI 酶切, 购自上海吉凯基因化学技术有限公司

3.3.2 慢病毒转染构建 TRERF1 敲除的 H1975、H1734 的细胞

(1) 按分组为:H1975 阴性对照组(H1975-Lv-NC)和 TRERF1 过表达组(H1975-Lv-TRERF1), 以及 H1734 阴性对照组 (H1734-Lv-NC) 和 TRERF1 敲除组 (H1734- Lv-TRERF1) 进行细胞铺板。将生长状态良好的 H1975、H1734 细胞接种在 6 孔板, 待细胞密度约 90%-95%后按进行转染。

①依据 MOI 值计算病毒量, Lv-NC 组滴入空载质粒液, Lv-TRERF1 组滴入过表达病毒液。

②在过表达组中, 每个孔加入 1 mL 含 10%胎牛血清+1%双抗的完全培养液、5uL 病毒液, 其中对照组为空载质粒病毒液, 混匀后在继续进行细胞培养。

③培养 8h、12h、24h 观察细胞状态, 24h 后更换培养基, 24h、48h 后用荧光显微镜观察转染荧光效率, 待荧光效率大于 90%, 按照 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 的梯度配制不同浓度梯度的嘌呤霉素浓度, 观察细胞状态, 选择嘌呤霉素最佳浓度, 用于后续对过表达 TRERF1 的 H1975、 H1734 稳转细胞的筛选。

用合适浓度嘌呤霉素筛选 H1975、 H1734 过表达 TRERF1 稳转细胞, 继续

培养细胞 3-4 天，待未被成功转染的细胞死亡时，挑选单克隆继续培养，用于目的蛋白的检测。

(3) 在荧光显微镜下拍照记录，将成功稳定转染的细胞一部分用于提取蛋白和 RNA 检测 TRERF1 蛋白和 mRNA 表达水平，一部分冻存于-80℃冰箱备用。

3.3.3 检测敲除 TRERF1 后在肺腺癌细胞中的 mRNA 表达水平

使用 qPCR 方法检测过表达 TRERF1 后肺腺癌细胞中 TRERF1 mRNA 表达水平。

(1) 利用 NCBI 网站设计 TRERF1 和内参 β -actin 的引物

引物名称		引物序列(5' to 3')
TRERF1	Forward Primer	GGGCTCTTCAGCAATGTCCT
	Reverse Primer	GCCAATGTTGATGCGTGGTT
β -actin	Forward Primer	AATCGTGCGTGACATTAAGGAG
	Reverse Primer	ACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT

(2) H1975、H1734 肺腺癌细胞中总 RNA 提取（使用天根 RNA 试剂盒）

①显微镜下观察 H1975、H1734 稳转肺腺癌，选择细胞密度超 90%的培养瓶提取 RNA，倒出培养液，用 PBS 洗 3 次，充分吸尽残余 PBS 液体；

②在每一个 T25 细胞培养瓶加入 500uL RNA 裂解液，用移液枪吹打培养瓶，使细胞充分裂解分离，收集细胞裂解混悬液至 1.5mL EP 管中，vortex10s；

③加入 500uL 无水乙醇，吹打，混匀，转移至离心柱；

④12000g 离心 1 min，向 RNA 柱加入 500uL 的 wash buffer，12000g 离心 1min，弃废液，空管再次离心 1 次，12000g 离心 1min，将柱子开盖放置于无 RNA 酶 1.5mL EP 管中，晾干 2min；

⑤向 RNA 柱中央加入 30uL elution buffer，室温静置 2min，12000g 离心 1min，将洗脱下的 RNA 重新加入柱中，静置 5min，再次离心 2min，收集 RNA 后用于后续实验，并储存在-80℃冰箱内。

(3) 检测稳转肺腺癌细胞 RNA 浓度、完整性和纯度

①用分光光度计检测上述提取的总 RNA 的浓度和纯度，DEPC 水调零校准，向检测柱加入 1-2uL 的样品，检测 RNA 浓度值，记录。

②用琼脂糖凝胶电泳检测所提取的总 RNA 的完整性，制作 1%琼脂糖凝胶

中，用 RNA 液将 loading buffer 稀释为 1X，上样电泳检测并观察。

③收集 RNA 后用于后续实验，并储存在-80℃冰箱内。

(4) cDNA 逆转录的合成

① 根据分光光度计所测的 RNA 浓度，配置含 1000ng RNA 的 cDNA 模板，取 1 μ g 的 RNA 原液，用 5 $\times$ gDNA Buffer 2 μ L 和无酶 ddH₂O，配置 10 μ L 的去 gDNA 体系，42℃孵育 3min，后置于冰上；

②10 $\times$ king RT buffer、FastKing RT Enzyme Buffer mix、FQ-RT Primer Mix 和无酶 ddH₂O 加入 gDNA 体系，配置 20 μ L 反转录体系，42℃孵育 15min，95℃孵育 3min，将所得 cDNA 稀释 5 倍，放-80℃备用。

③ -80℃保存 cDNA 模板。

(5) qPCR (使用 TakaRa 试剂盒)

① 取 200 μ LEP 管，分组标记，配制 20 μ L 的反应体系，TB GREEN 10 μ L，0.8 μ L 的 Forward Primer，0.8 μ L 的 Reverse Primer，0.4 μ L 的 ROX Reference DyeII 50 $\times$ ，2 μ L 的 cDNA 模板，DEPC6 μ L。待测内参基因和目的基因各配制 3 个复孔

②用 7500 qPCR 检测仪参数设置为：95℃，30 s；95℃，10s；60℃，30s，共 40 个循环。熔解曲线：95℃，15s；60℃，60s；95℃，15s。记录 CT 值。

③根据目的基因与内参基因的 CT 值，用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量。比较 12 对组织中 TRERF1mRNA 的表达情况。

3.3.4 检测敲除 TRERF1 后在肺腺癌细胞中的蛋白表达水平

Western Blot 检测验证过表达 TRERF1 后，H1975、H1734 细胞中 TRERF1 的蛋白表达是否升高。(WB 检测方法同前)

3.4 使用 CCK-8 实验方法检测细胞的增殖能力

收取敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC)，消化，收集细胞，使细胞浓度调整为 5000/100 μ L 个细胞，将待测细胞接种于 96 孔板内，进行 CCK8 的检测，分别在接种后的第 0h、8 h、24 h、48 h、72 h、96 h 加入每孔 10 μ L 的 CCK-8 工作液，37℃孵育 1 h，用酶标仪在 450 nm 波长计算不同节点的 OD 值，根据 OD 值大小评估细胞增殖能力。

3.5 使用 EDU 增殖实验方法检测细胞的增殖能力

(1) 将敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC) 细胞接种于 T25 瓶中培养, 观察细胞状态, 待密度大于 90%, 且生长状态良好, 收集敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC) 细胞, 计数, 配制调整, 使细胞终浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 每孔接种 1×10^4 个细胞于 96 孔板, 浓度为 $1 \times 10^4/100\mu\text{L}$, 置于细胞培养箱培养。

(2) 取 EDU 工作液, 用完全培养基稀释 EDU 工作液至 $20\mu\text{M}$, 在 96 孔板中每孔加入 $100\mu\text{l}$ 稀释好的 EDU 工作液, 使其终浓度为 $10\mu\text{M}$, 置于培养箱 37°C 孵育 2 小时。

(3) 倒弃细胞培养基, PBS 清洗 2 次, 每次 3 min。

(4) 倒弃 PBS 洗涤液, 加入 4% 多聚甲醛 $50\mu\text{l}$, 固定细胞 30 min。

(5) 去除固定液, PBS 清洗 2 次, 每次 3 min。

(6) 倒弃 PBS 洗涤液, 加入 $100\mu\text{l}$ 0.5% TritonX-100 的 PBS, 孵育 10~15 分钟。

(7) 去除通透液, 用 PBS 洗涤 1~2 次, 每次 5 min。

(8) 避光染色, 配置反应液, 向 96 孔板每孔加入 $50\mu\text{l}$ 反应液, 轻摇培养板, 充分混匀确保反应液均匀覆盖样本, 避光孵育 30 min。

(9) 去除反应液, PBS 洗涤 3 次, 每次 3~5 分钟。

(10) 避光细胞核染色, 去离子水稀释 Hoechst 反应液至 $1 \times \text{Hoechst}$, 去除 PBS, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ $1 \times \text{Hoechst}$, 避光染色 10 min。

(11) 去除 Hoechst, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 3~5 分钟。

(12) 用荧光显微镜观察 EDU 标记和未标记的细胞, 拍照并计数统计 EDU, Hoechst 染色细胞。重复 3 次。

3.6 细胞划痕实验检测侧向迁移能力

(1) 预先在 12 孔板背面用记号笔划 2 条平行与 12 孔板长边的横线, 以及 2 条与横线垂直的竖线。按照细胞分组, 每组设 3 个复孔, 将敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-

TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC) 细胞接种于 12 孔板中培养。

(2) 消化收集细胞, 用 PBS 重悬浮细胞, 计数, 取 1×10^5 个/mL 接种于预先划线标记的 12 孔板内, 加入 1 mL 完全培养基, 置于细胞培养箱。待细胞长满 (细胞密度接近 100%), 倒弃原培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 弃去 PBS, 用 10 μ L 无菌枪头垂直于 12 孔板沿背面竖线做细胞划痕, 再次用 PBS 清洗 2 次, 弃去 PBS。

(3) 每孔加入 1 mL 无血清的培养基, 后紧接在显微镜下采集 0 h 划痕面积图像, 继续培养, 分别于 12 h、24 h 于同一位置镜下拍照, 比较 12 h、24 h 细胞划痕的宽度。

(4) 用 Image J 软件框选计算划痕面积 (W), 用 12 h 和 24 h 相同地方的划痕面积-0 划痕面积, 得出划痕愈合面积。

3.7 Transwell 迁移实验检测纵向迁移能力

(1) 按照细胞分组, 将敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC) 接种于 24 孔板。实验每组设置 3 个复孔。

(2) 消化, 收集细胞, 用无血清培养液重悬细胞, 计数, 取 4×10^5 个/mL。

(3) 配制含 20% 高血清完全培养基, 取 600 μ L 高血清培养基分别加入 24 孔板内, 将 transwell 小室放入含有高血清的培养液中。

(4) 将用无血清重悬的细胞, 取 5×10^4 个细胞接种于小室内, 培养 48 h。

(5) 用棉签擦去小室上室的细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 放回 24 孔板中, 分别加入 800 μ L 的多聚甲醛, 固定 30 min。

(6) 用 PBS 清洗小室 2 次, 除去多聚甲醛, 滴入结晶紫溶液的板中浸泡小室染色 2 h。

(7) 最后用 ddH₂O 冲洗小室, 洗去多余的结晶紫, 放于吸水纸上晾干, 在显微镜下拍照, 取 4 个象限视野中着色的小室的细胞数拍照, 用 imageJ 图像处理软件计数, 取平均值。

3.8 Transwell 侵袭实验检测侵袭能力

(1) 按照细胞分组, 将敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的

H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC)，每组设置 3 个复孔接种于 24 孔板。预先准备基质胶，基质胶：无血清培养基=1：8。

(2) 在冰上用无血清培养基将基质胶按 1：8 浓度稀释，按 100 μ L/孔，加入小室上室，均匀铺平小室底部。放入培养箱中孵育 2h，使胶凝固。

(3) 取出小室，消化，收集细胞，计数，配制终浓度为 4×10^5 个/mL 个细胞的细胞悬液。配制含 20% 高血清完全培养基，取 600 μ L 高血清培养基分别加入 24 孔板内，将 transwell 小室放入含有高血清的培养液中。

(4) 将用无血清重悬的细胞，取 5×10^4 个细胞接种于小室内，培养 48 h。

(5) 用棉签擦去小室上室的细胞，用 PBS 清洗 2 次，放回 24 孔板中，分别加入 800 μ L 的多聚甲醛，固定 30 min。

(6) 用 PBS 清洗小室 2 次，除去多聚甲醛，滴入结晶紫溶液的板中浸泡小室染色 2 h。

(7) 最后用 ddH₂O 冲洗小室，洗去多余的结晶紫，放于吸水纸上晾干，在显微镜下拍照，取 4 个象限视野中着色的小室的细胞数拍照，用 imageJ 图像处理软件计数，取平均值。

3.9 肺腺癌细胞凋亡检测

3.9.1 Tunnel 凋亡实验检测 TRERF1 对肺腺癌细胞凋亡能力的影响。

①按照细胞分组，将敲除 (sh-TRERF1) 和过表达 (Lv-TRERF1) 的 H1975、H1734 细胞和阴性对照细胞 (sh-TRERF1-NC、Lv-TRERF1-NC) 培养，消化，收集细胞。准备适量大小的玻片，向 6 孔板中滴入少量培养基，将玻片放入 6 板各孔中，按照分组，将对应分组细胞接种到培养板，制备细胞爬片。待细胞爬片完成，取出爬片，PBS 清洗，3 次，每次 3min，浸泡于 4% 多聚甲醛，25min，PBS 清洗，2 次，每次 5min。

②用 1X PBS 配制 0.2% TritonX-100，浸泡爬片 5 分钟。PBS 清洗，2 次，每次 5min。晾干，各取 equilibration buffer 100 μ l，均匀地加在爬片上，孵育 10min。

③每张细胞片滴 100 μ l rTdT 反应液，放入湿盒中，37 $^{\circ}$ C, 60 分钟。

④倒弃 rTdT 反应液，用 ddH₂O 稀释 20X SSC 至 2X SSC，滴加 2X SSC 终止反应，静置 15 分钟。PBS 清洗，3 次，每次 5min。浸泡入 0.3% H₂O₂ 溶液中，5min。

PBS 清洗, 3 次, 每次 5min。每张细胞片加 100 μ l streptavidin HRP(1:500), 孵育 30 min。PBS 清洗, 3 次, 每次 5min。

⑤每张片子滴加 100 μ l DAB 显色液, 显色, 待浅棕褐色背景出现, 用 ddH₂O 清洗数次, 脱水, 透明, 封片, 镜下观察。

3.9.2 检测敲除和过表达 TRERF1 后在肺腺癌细胞中的凋亡相关蛋白表达水平

Western Blot 检测验证敲除和过表达 TRERF1 后, H1975、H1734 细胞中凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3、cleaved PARP 以及抗凋亡蛋白 BCL2 表达情况, 并计算 BAX/BCL2 比值降低。(WB 检测方法同前)

4 体内实验研究 TRERF1 对肺腺癌裸鼠移植瘤的影响的方法

本动物实验经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准(批准号: Kmmu20230763)。在中国医学科学院医学生物学研究所 SPF 级实验动物中心完成。

4.1 裸鼠的饲养和分组

4-5 周龄 Balb/C 裸鼠, 雌性, 体重 14-16g, 购买自斯贝福(北京)生物技术有限公司(许可证号: SCXK(京)K2019-0010)。本研究包括两个部分:(1)评价肺腺癌细胞 H1734 过表达 TRERF1 对 Balb/C 裸鼠肿瘤生长的影响。18 只小鼠根据动物体重, 随机分为三组: H1734-control 组 N=6, H1734-Lv-TRERF1-NC 组 N=6, H1734-Lv-TRERF1 组, N=6;(2)评价肺腺癌细胞 H1975 过表达 TRERF1 对 Balb/C 裸鼠肿瘤生长的影响。12 只小鼠根据动物体重, 随机分为两组: H1975-Lv-TRERF1-NC 组 N=6、H1975-Lv-TRERF1 组 N=6。所有小鼠均在 SPF 级实验动物中心饲养, 饲养温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 饲养环境为: 湿度 $40\% \pm 10\%$ 、光照时间 12 h/天。

4.2 构建 H1734 裸鼠皮下移植瘤模型

选择稳定过表达的 H1734 肺腺癌细胞, 分组为 H1734-Lv-TRERF1、H1734-Lv-TRERF1-NC 阴性对照组和 H1734-control 空白对照组, 在 T75 培养瓶扩增培养, 传代, 待细胞量充足满足小鼠接种总量后, 消化, 离心, 计数, 将过表达的 H1734 细胞浓度调整为每只裸鼠为 2×10^6 个/100 μ L。

接种前观察裸鼠生长状态, 称重记录。抓取裸鼠, 消毒, 用 1 mL 注射器按每只裸鼠接种 2×10^6 细胞, 抽取 100 μ L 细胞悬液, 自腹部向头部方向距腋窝 1cm

处进针，向前潜行推进，接种于左侧腋中线皮下。按照此方法分别注射三组（Lv-TRERF1-NC 组、Lv-TRERF1 组、H1734-control 组，每组各 6 只，此后每隔 3 天观察记录下裸鼠体重、移植瘤的长径（L）和短径(S)皮下肿瘤体积，皮下移植瘤体积计算公式为 $V=L \times S^2/2$ 。当裸鼠实验达仁慈终点后立即处死裸鼠，取下肿瘤，排列、清洗、拍照、分别用 RNA latter、福尔马林固定以及直接液氮冻存，用于后续组织水平相关蛋白检测。

4.3 构建 H1975 裸鼠皮下移植瘤模型

选择稳定过表达的 H1975 肺腺癌细胞，分组为 H1975-Lv-TRERF1、H1975-Lv-TRERF1-NC 阴性对照组和 H1975-control 空白对照组，在 T75 培养瓶扩增培养，传代，待细胞量充足满足小鼠接种总量后，消化，离心，计数，将过表达的 H1975 细胞浓度调整为每只裸鼠为 2×10^6 个/100uL。

接种前观察裸鼠生长状态，称重记录。抓取裸鼠，消毒，用 1 mL 注射器按每只裸鼠接种 2×10^6 细胞，抽取 100uL 细胞悬液，自腹部向头部方向距腋窝 1cm 处进针，向前潜行推进，接种于左侧腋中线皮下。按照此方法分别注射两组（Lv-TRERF1-NC 组、Lv-TRERF1 组，每组各 6 只，此后每隔 3 天观察记录下裸鼠体重、移植瘤的长径（L）和短径(S)皮下肿瘤体积，皮下移植瘤体积计算公式为 $V=L \times S^2/2$ 。当裸鼠实验达仁慈终点后立即处死裸鼠，取下肿瘤，排列、清洗、拍照、分别用 RNA latter、福尔马林固定以及直接液氮冻存，用于后续组织水平相关蛋白检测。

4.4 检测裸鼠移植瘤中 TRERF1 的蛋白表达水平

Western Blot 检测验证 H1734 过表达组与阴性对照组中 TRERF1 的蛋白表达是否升高。（WB 检测方法同前）

4.5 皮下移植瘤组织石蜡包埋和免疫组织化学染色

（1）取出冻存的裸鼠移植瘤组织置于冰上，每管组织中加入用 ddH₂O 清洗浸泡 50 min 后，按照脱水流程：70%乙醇 3h，80%乙醇 12h，30min，90%乙醇 1h，100%乙醇溶 1h,依次浸泡脱水。乙醇脱水后，在按顺序依次将组织放入二甲苯 I、二甲苯 II 中浸泡 30 min 使组织透明。

（2）准备石蜡模具，底部滴入液态石蜡，组织放入中心，补充石蜡液后盖上模具盖，-20℃冷冻固化石蜡后，包埋组织完成。

(3) 按上述步骤依次完成组织石蜡包埋后, 制作石蜡切片, 预先设置号石蜡切片机切片厚度, 本实验设置为 5 μ m, 将切下的石蜡切片平铺于载玻片上, 按照该步骤依次完成石蜡切片制作, 将切片放于 70℃干燥箱中持续烘烤 2h。

(4) 将烤好的石蜡切片按照二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 II 依次浸泡 15min, 无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、85%乙醇、80%乙醇、70%乙醇依次浸泡 5min 脱水。最后用 ddH₂O 水化浸泡 0.5h。

(5) 配制 1X 的组织抗原修复液, 将切片放入抗原修复液中, 高压高温 1.5h, 后水浴 30min, 待水浴结束后, 用 ddH₂O 和 PBS 清洗切片数次。将切片放入用 3%过氧化氢甲醇孵育 20min, 目的灭活切片的过氧化物。

(6) PBS 清洗切片 3 次, 每次 5min, 用羊血清封闭非特异性位点

(7) 用 0.5%的 BSA 溶液按说明书稀释目标分子的一抗原液, 切片上滴加按比例稀释好的一抗溶液, 室温孵育 3h。

(8) PBS 清洗切片 3 次, 每次 5min, 吸尽 PBS 溶液, 滴加二抗, 室温孵育 30min。

(9) 按说明书比例 (50: 1) 配制 DAB 显色液, 切片上滴加适量 DAB 显色液, 显色 2min 后, 用清水冲洗终止显色。用苏木素染核 1min, 立即用 PBS 冲洗擦干后在 1%乙醇分化液浸泡 3s 后再次冲洗。

(10) 按照顺序在 70%乙醇、80%乙醇、85%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇中依次进行脱水, 各 5min。

(11) 再将切片置于二甲苯中浸泡 5min, 透明切片。

(12) 将透明好的晾干, 用中性树脂处理封片, 在显微镜下观察记录。

6 统计分析方法

本研究使用统计软件包括 GraphPad Prism8 和 IBM SPSS 23.0 软件, 当数据满足正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述, 满足正态分布的两组间比较时采用独立样本 t 检验, 三组及以上的样本时使用单因素方差分析或多因素方差分析, 计数资料是用频数和百分比来描述, 非正态分布使用时使用非参数秩和检验分析各组之间的差异, 当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. TRERF1 在肺腺癌中的生物学功能研究

1.1 TRERF1 mRNA 在肺腺癌组织中的表达

qPCR 结果显示, 在 12 对肺腺癌组织中, 相对癌旁组织中 TRERF1 mRNA 的表达降低, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$) (图 1-3), 提示 TRERF1 在肺腺癌的恶性生物学行为中可能具有一定的作用。

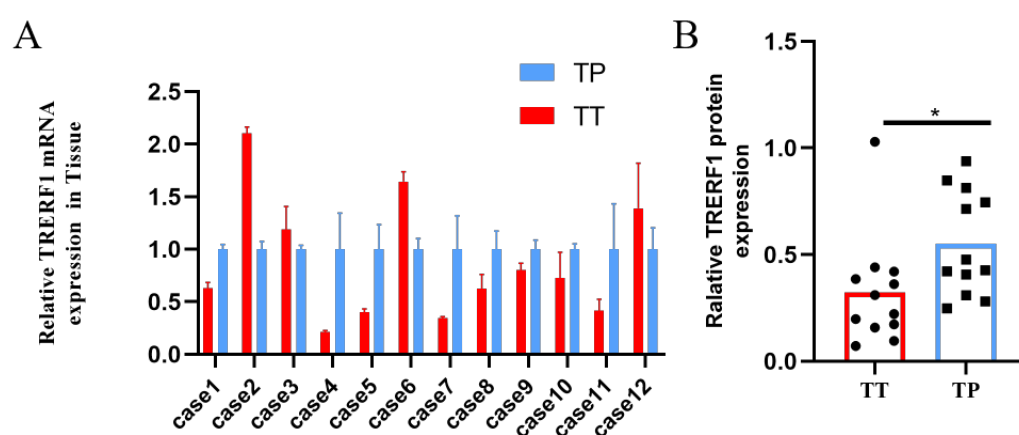


图 1-3 TRERF1 在肺腺癌组织中 mRNA 表达水平降低。

A qPCR 检测 12 对肺腺癌组织和癌旁组织中 TRERF1 mRNA 表达水平。B TRERF1 在肺腺癌组织和癌旁组织中 mRNA 表达水平的定量结果。t 检验, $*P < 0.05$ 。

Figure 1-3 The TRERF1 mRNA expression is reduced in lung adenocarcinoma tissues.

A. TRERF1 mRNA expression in 12 pairs lung adenocarcinoma tissues and adjacent tissues by qPCR assay. B. Quantitative Results of mRNA expression of TRERF1 in lung adenocarcinoma and adjacent tissues. t-test, $*P < 0.05$.

1.2 实验工具细胞的筛选及 TRERF1 敲除和过表达肺腺癌细胞的构建

1.2.1 实验工具细胞的筛选结果

在 A549、PC-9、H1975、H1734、H1650、H1299, HCC827 的 7 种肺腺癌细胞的 Western Blot 实验结果提示, H1975、H1734 这两种细胞中 TRERF1 蛋白的表达水平相对适中 (图 1-4), 筛选表达量适中上述两株肺腺癌细胞(H1734、H1975)为实验工具细胞。

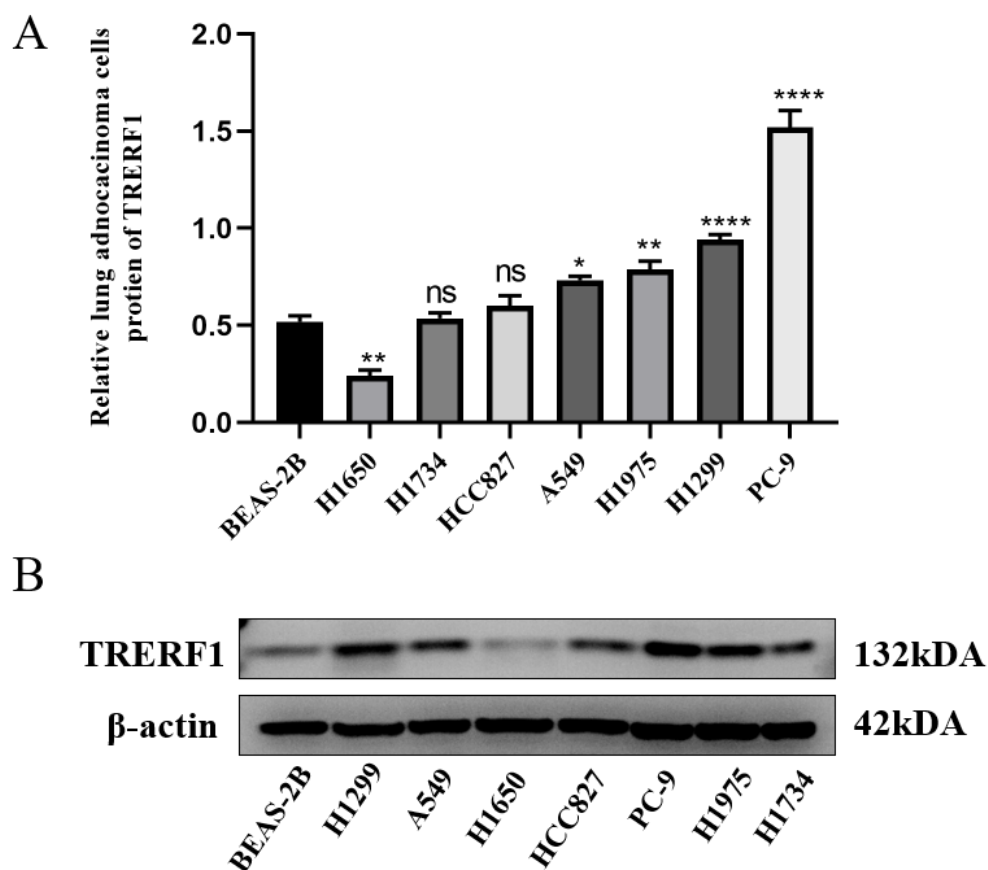


图 1-4 TRERF1 蛋白在肺腺癌细胞系中的表达。

A. TRERF1 蛋白表达水平的 WB 条带分析统计图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; B. Western Blot 条带的图片。

Figure 1-4 The expression level of TRERF1 protein in H1975 and H1734 lung adenocarcinoma cells.

A. Quantitative analysis Results of TRERF1 protein expression levels, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, B. Representative images of Western Blot bands.

1.2.2 敲除 TRERF1 的 H1975、H1734 细胞构建

(1) 测序结果显示 TRERF1 的 3 条 sgRNA 均成功与 GV708 载体连接 (图 1-5)。



图 1-5 TRERF1 的 3 条 sgRNA 成功与 GV708 载体连接序列图

红色方框中序列为 TRERF1 的 3 条 sgRNA 正义链 5'-3' 端碱基序列。

Figure 1-5 Three TRERF1 sgRNAs successfully connected to the GV708 vector.

The sequence in the red box is the 5'-3' end base sequence of three sgRNA sense chains of TRERF1.

(2) 荧光显微镜观察显示 3 条 sgRNA 转染荧光效率超过 90% (图 1-6), 提示 TRERF1 crisper-cas9 慢病毒转染成功。

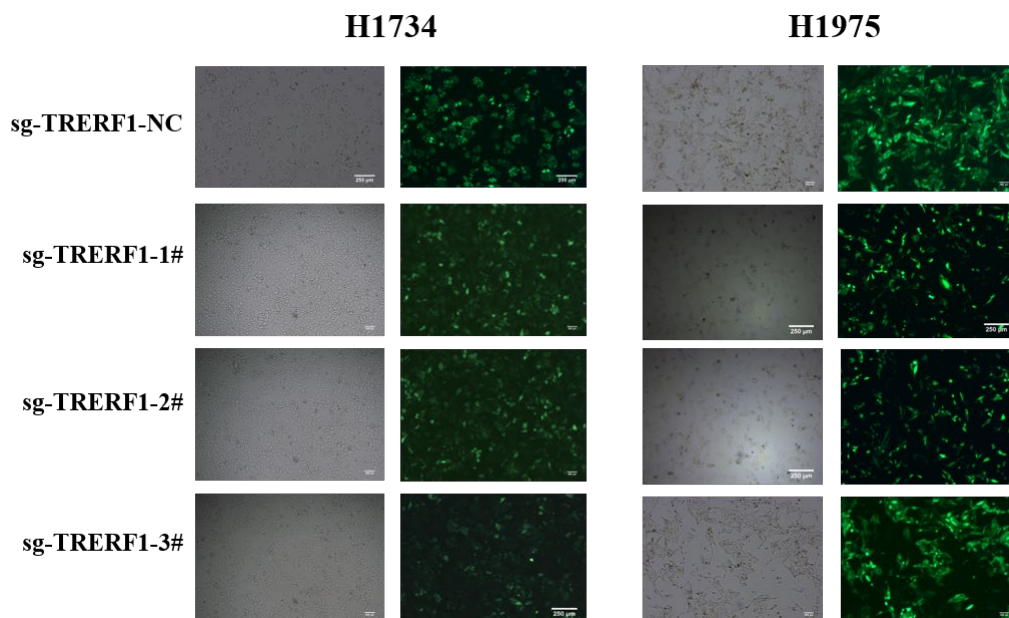


图 1-6 TRERF1 的 3 条 sgRNA 的转染荧光效率

TRERF1 的 3 条 sgRNA 在 H1734、H1975 中的荧光转染效率超过 90%

Figure 1-6 Fluorescence efficiency of three sgRNAs transfected with TRERF1

The fluorescence transfection efficiency of three sgRNAs of TRERF1 in H1734 and H1975 exceeded 90%.

(3) Crisper/cas9 编辑敲除 TRERF1 后 H1734、H1975 中 TRERF1 的表达情况

Western Blot 结果显示, 与阴性对照组相比, sg-TRERF1-1#、sg-TRERF1-2#、sg-TRERF1-3#,均成功敲低了的 H1734 和 H1975 细胞中 TRERF1 蛋白表达水平 (图 1-7), 选择敲除效率较好的 sg-TRERF1-3#构建稳转细胞进行后续功能实验。

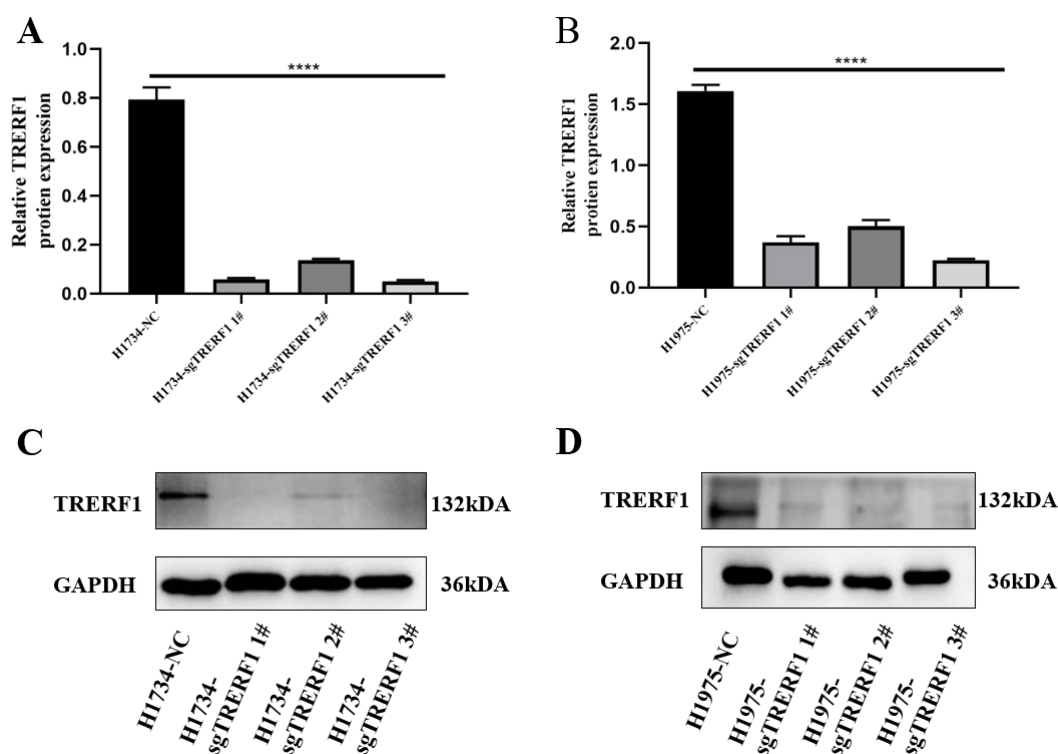


图 1-7 sg-TRERF1-1#、sg-TRERF1-2#、sg-TRERF1-3#成功敲除 H1734 和 H1975 细胞的 TRERF1 基因

A. TRERF1 蛋白表达水平在 H1734 细胞中的 WB 条带分析统计图，B. TRERF1 蛋白表达水平在 H1975 细胞中的 WB 条带分析统计图，C. H1734 细胞 Western Blot 条带的图片。D. H1975 细胞 Western Blot 条带的图片，**** $P < 0.0001$ 。

Figure 1-7 sg TRERF1-1 #, sg TRERF1-2 #, and sg TRERF1-3 # successfully knocked out the TRERF1 gene in H1734 and H1975 cells.

A. TRERF1 protein expression Quantitative in H1734 cells. B Western blot bands Representative images in H1734 cells. C. Quantitative analysis of TRERF1 protein expression levels in H1975 cells. D Western blot bands Representative images in H1975 cells , **** $P < 0.0001$.

1.2.3 成功构建 TRERF1 过表达的 H1975、H1734 细胞

(1) Lv-TRERF1 的 H1975、H1734 细胞的荧光转染效率>90% (图 1-8)。

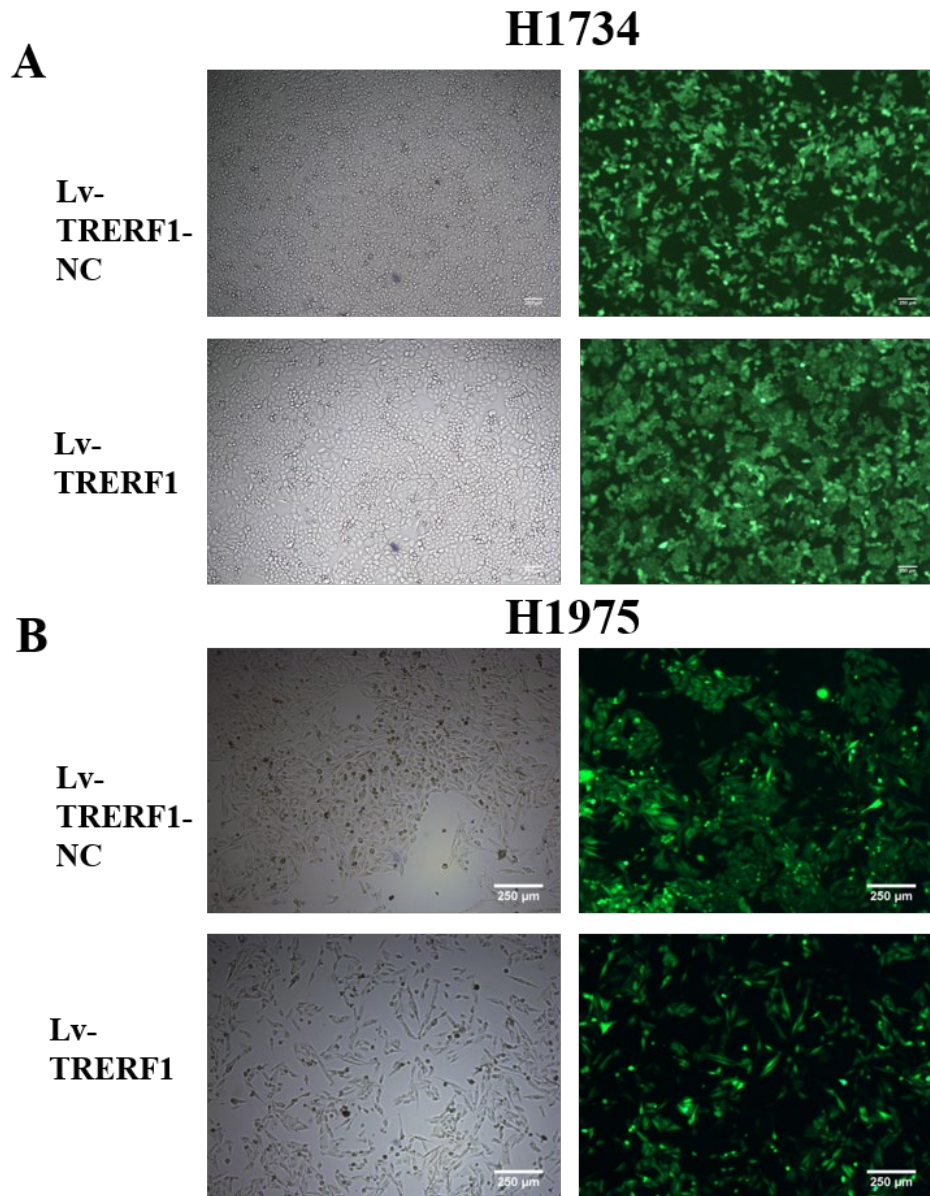


图 1-8 过表达 TRERF1 在 H1734、H1975 细胞中细胞中荧光转染效率

A.过表达 H1734 细胞的荧光转染效率。B.过表达 H1975 细胞的荧光转染效率。

Figure 1-8 fluorescence transfection efficiency in overexpressing cells in H1734 and H1975

A. The fluorescence transfection efficiency in H1734 overexpressing cells. B. The fluorescence transfection efficiency in H1975 overexpressing cells.

(2) 慢病毒过表达TRERF1后H1734、H1975中TRERF1的表达情况

Western Blot和qPCR结果显示，经TRERF1过表达质粒转染的H1734、H1975细胞中TRERF1的蛋白表达量显著高于阴性对照细胞。(图1-9)。

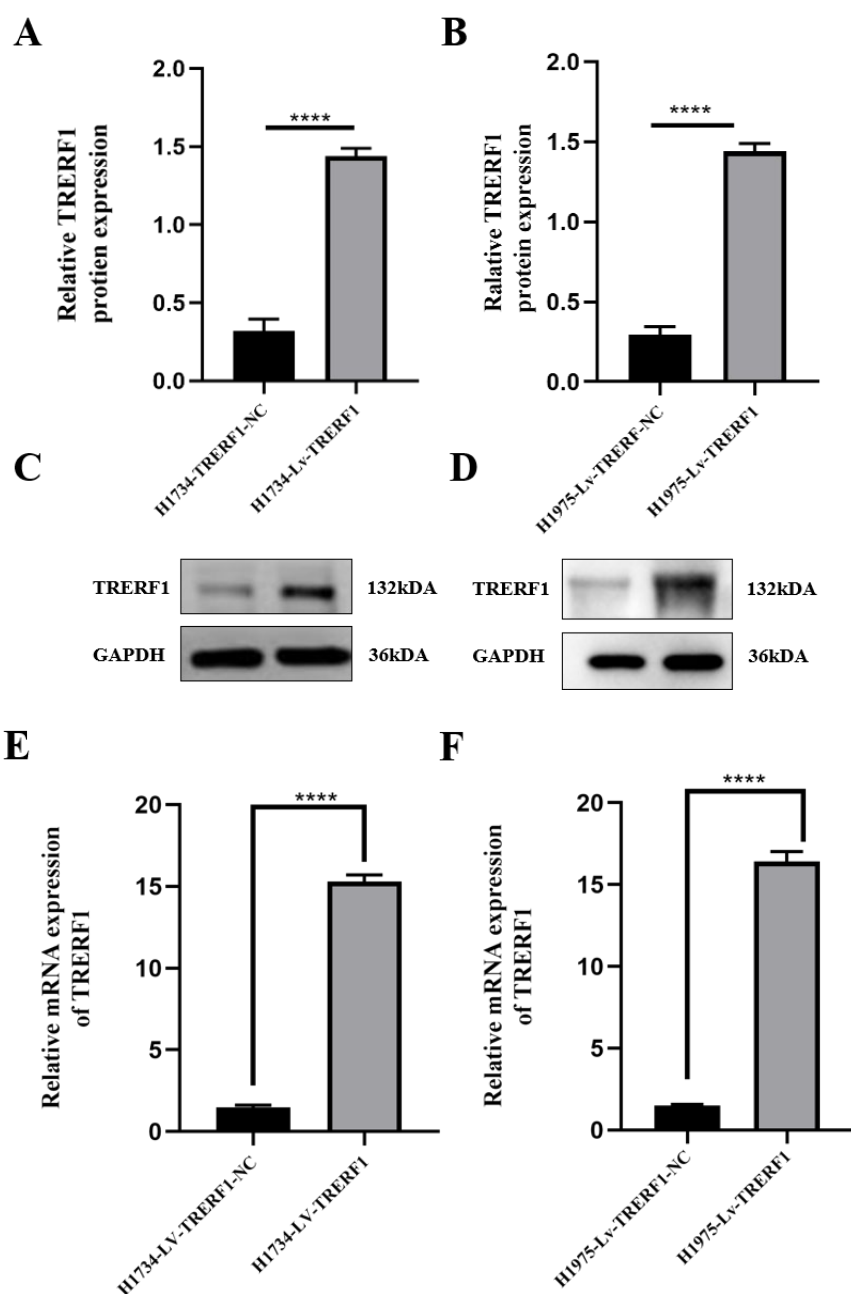


图 1-9 Lv-TRERF1 成功过表达了 H1734 和 H1975 细胞的 TRERF1 基因

A. TRERF1 蛋白表达水平在 H1734 细胞中的 WB 条带分析统计图, B. TRERF1 蛋白表达水平在 H1975 细胞中的 WB 条带分析统计图, C. TRERF1 蛋白在 H1734 细胞中的 Western Blot 条带图片, D. TRERF1 蛋白在 H1975 细胞中的 Western Blot 条带的图片; E. TRERF1 mRNA 表达水平在 H1734 细胞中的 WB 条带分析统计图, F. TRERF1 mRNA 表达水平在 H1975 细胞中的 WB 条带分析统计图。**** $P < 0.0001$ 。

Figure 1-9 Lv- TRERF1 successfully overexpressed the TRERF1 gene in H1734 and H1975 cells

A. Quantitative analysis Results of TRERF1 protein expression in H1734 cells and representative images of Western blot bands; B. Quantitative analysis of TRERF1 mRNA expression levels in H1734 cells; C. Quantitative analysis Results of TRERF1 protein expression in H1975 cells and representative images of Western blot bands; D. Quantitative analysis of TRERF1 mRNA expression levels in H1975 cells. **** $P < 0.0001$.

1.3 过表达和敲除 TRERF1 对肺腺癌细胞生物学功能的影响

1.3.1 TRERF1 对肺腺癌细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示,与阴性对照细胞相比,敲除 TRERF1 的 H1975 细胞,促进了肺腺癌细胞的增殖,在 72h 两组增殖差异具有显著性 ($p<0.001$),敲除 TRERF1 的 H1734 细胞,促进了肺腺癌细胞的增殖能力,在 24h 的细胞增殖差异具有统计学意义 ($p<0.05$),48h 后差异具有显著性 ($p<0.0001$)。过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞与阴性对照细胞相比,在 24h 后,两者增殖差异具有显著性 ($p<0.001$) (图 1-10)。CCK-8 实验结果表明 TRERF1 对肺腺癌细胞的增殖能力有抑制作用。

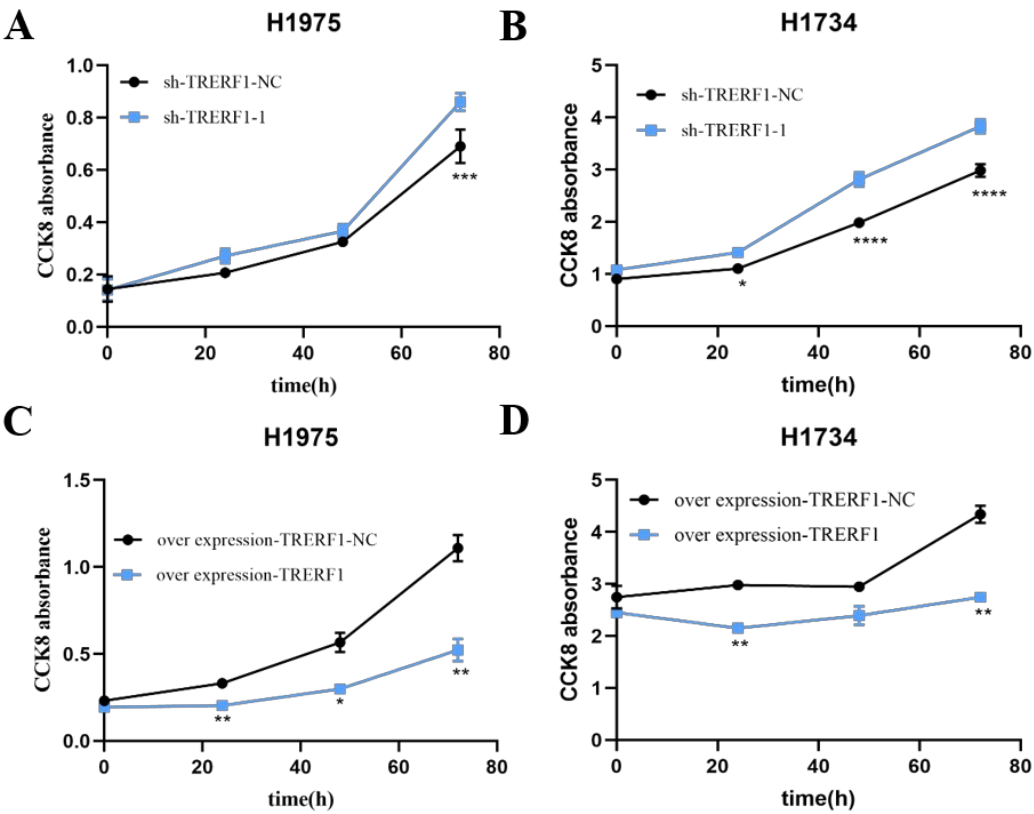


图 1-10 TRERF1 对肺腺癌细胞增殖能力的影响

A. 敲除 TRERF1 的 H1975 细胞不同时间点 OD 值; B. 敲除 TRERF1 的 H1734 细胞不同时间点 OD 值;
C. 过表达 TRERF1 的 H1975 细胞不同时间点 OD 值;; D. 过表达 TRERF1 的 H1734 细胞不同时间点 OD 值; OD 值代表细胞增殖能力。多因素方差分析, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

Figure 1-10 TRERF1 has an inhibitory effect on the proliferation ability of lung adenocarcinoma cells.

A. Knockout the OD values of H1975 cells with TRERF1 at various time points; B. Knockout the OD values of

H1734 cells with TRERF1 at various time points; C. OD values at various time points of H1975 cells overexpressing TRERF1; D. OD values at various time points of H1734 cells overexpressing TRERF1; t-test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, *** $P<0.001$.

EDU 增殖实验提示敲除 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞肺腺癌细胞的增殖能力增加；与阴性对照细胞相比，过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞，肺腺癌细胞的增殖能力下降（图 1-11）。EDU 增殖实验结果表明 TRERF1 对肺腺癌细胞的增殖能力有抑制作用。

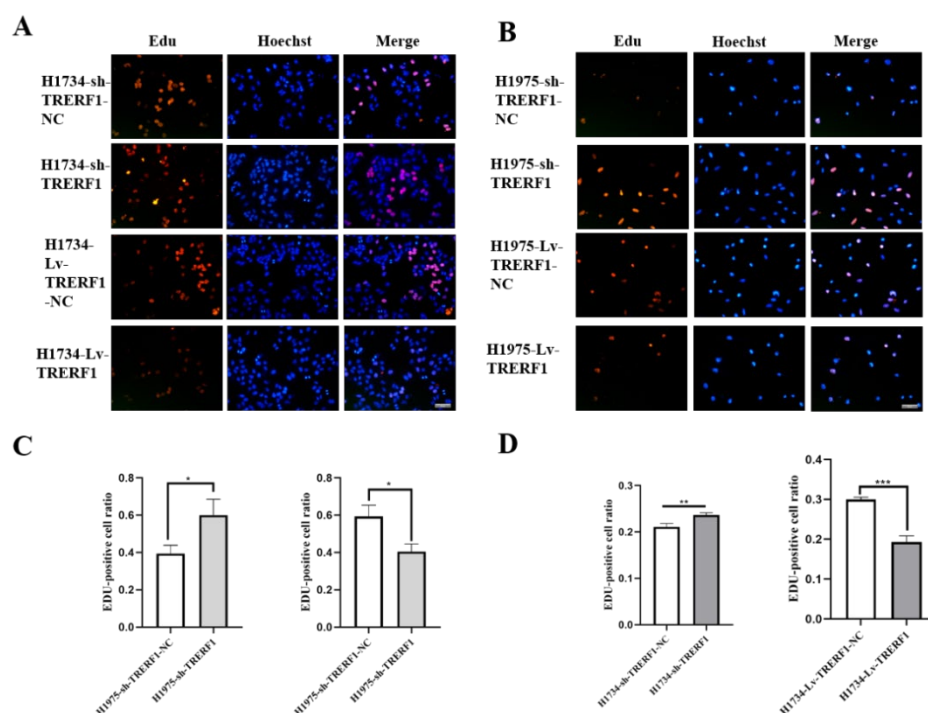


图 1-11 TRERF1 对肺腺癌细胞增殖能力 EDU 的检测结果

A. 敲除和过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1734 细胞的细胞数目；B. 敲除和过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1975 细胞的细胞数目；C. 敲除和过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1975 细胞的细胞数目的统计图；D. 敲除和过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1734 细胞的细胞数目的统计图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Figure 1-11 TRERF1 has an inhibitory effect on the proliferation ability of lung adenocarcinoma cells

A. The number of H1734 cells compared to the NC group after knocking out TRERF1; B. The number of H1734 cells overexpressing TRERF1 compared to the NC group; C. Knocking out TRERF1 compared to the number of H1975 cells in the NC group; D. Number of H1975 cells overexpressing TRERF1 compared to NC group.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

1.3.2 TRERF1 对肺腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

细胞划痕实验结果表明, 敲除 TRERF1 后, H1734、H1975 细胞, 两者在 24h 后愈合能力差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 提示敲除 TRERF1 后肺腺癌细胞划痕愈合能力增强, (图 1-12); 过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞与阴性对照细胞相比, 24h 后两者愈合能力差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 提示过表达 TRERF1 后划痕愈合能力下降 (图 1-12)。以上划痕实验结果说明敲除 TRERF1 促进肺腺癌细胞的侧向迁移, 过表达 TRERF1 抑制了 H1734、H1975 细胞的侧向迁移。

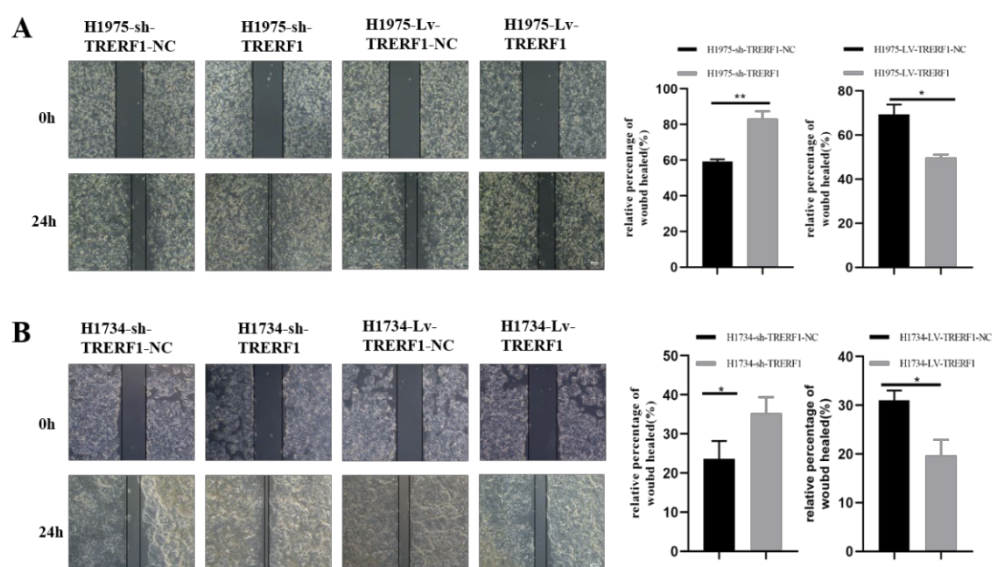


图 1-12 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞的侧向迁移的影响

A. H1975 细胞侧向迁移的图片和统计柱状图; B. H1734 细胞侧向迁移的图片和统计柱状图。t 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Figure 1-12 TRERF1 inhibits wound healed ability of H1975 and H1734 cells

A. Representative images and statistical bar charts of wound healed of H1975 cells; B. Representative images and statistical bar charts of wound healed of H1734 cells. t-test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Transwell 小室侵袭和迁移实验结果表明, 敲除 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞小室中细胞数量增多, 两组间差异具有显著性 ($P<0.01$), 过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞小室内细胞数量减少, 两组间差异具有显著性 ($P<0.01$) (图 1-13)。Transwell 小室侵袭和迁移实验结果提示敲除 TRERF1 能促进 H1734、H1975 细胞的侵袭、迁移, 过表达 TRERF1 能抑制 H1734、H1975 细胞的侵袭、迁移。

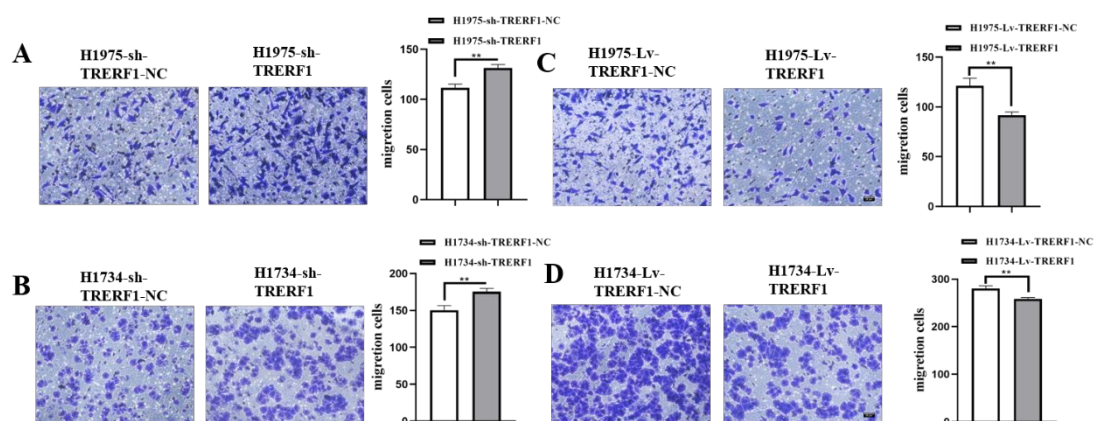


图 1-13 TRERF1 抑制细胞的纵向迁移

A. 敲除 TRERF1 后 H1975 细胞纵向迁移的图片和统计图; B. 敲除 TRERF1 后 H1734 细胞纵向迁移的图片和统计图; C. 过表达 TRERF1 后 H1975 细胞纵向迁移的图片和统计图; D. 过表达 TRERF1 后 H1734 细胞纵向迁移的图片和统计图. t 检验, ** $P < 0.01$ 。

Figure 1-13 TRERF1 inhibits vertical cell migration.

A. transwell and statistical images of longitudinal migration of H1975 cells after knocking out TRERF1; B. transwell and statistical images of longitudinal migration of H1734 cells after knocking out TRERF1; C. Representative and statistical images of longitudinal migration of H1975 cells after overexpression of TRERF1; D. Representative and statistical images of longitudinal migration of H1734 cells after overexpression of TRERF1. t-test. * * $P < 0.01$.

1.3.3 TRERF1 对肺腺癌细胞凋亡能力的影响

细胞 TUNEL 凋亡实验结果表明, 敲除 TRERF1 后的 H1734、H1975 细胞, 凋亡细胞数目显著减少, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 提示敲除 TRERF1 可以抑制肺腺癌细胞的凋亡能力; 过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞与阴性对照细胞相比, 凋亡细胞数目显著增多, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 提示过表达 TRERF1 可以促进肺腺癌细胞的凋亡能力 (图 1-14)。TUNEL 凋亡实验结果提示 TRERF1 对肺腺癌细胞的凋亡能力有显著促进作用。

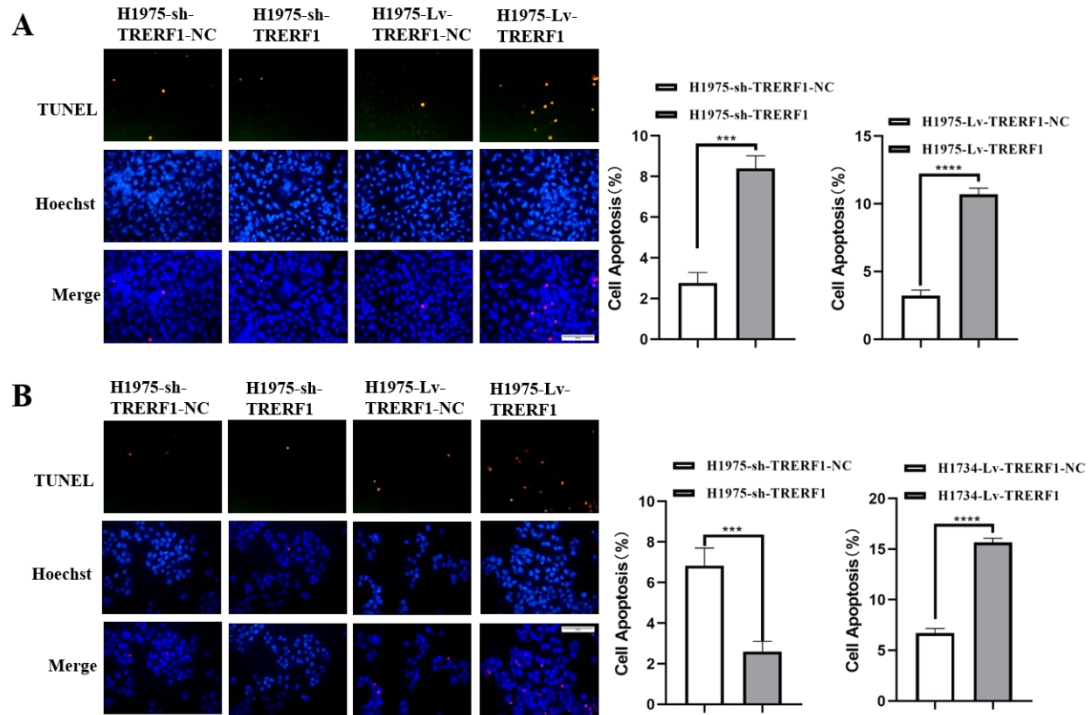


图 1-14 TRERF1 对肺腺癌细胞凋亡能力有促进作用

A. 敲除 TRERF1 与 NC 组比较的 H1734 细胞的细胞凋亡数目减少，过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1734 细胞的细胞凋亡数目增多；B. 敲除 TRERF1 与 NC 组比较的 H1975 细胞的细胞凋亡数目减少，过表达 TRERF1 与 NC 组比较的 H1975 细胞的细胞凋亡数目增多。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Figure 1-14 TRERF1 promotes apoptosis in lung adenocarcinoma cells.

A. The number of apoptosis in H1734 cells decreased compared to the NC group after knocking out TRERF1, while the number of apoptosis in H1734 cells overexpressing TRERF1 increased compared to the NC group; B. The number of apoptotic cells in H1975 cells compared to the NC group after knocking out TRERF1 decreased, while the number of apoptotic cells in H1975 cells overexpressing TRERF1 increased compared to the NC group. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Western blot 检测凋亡相关蛋白实验结果显示，敲除 TRERF1 的 H1734、H1975 细胞与阴性对照细胞相比，凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3 表达降低，差异具有显著性($P < 0.01$)、cleaved PARP 表达无明显变化，抗凋亡蛋白 BCL2 表达无明显变化，但 BAX/BCL2 比值降低，提示敲除 TRERF1 可以显著抑制肺腺癌细胞的凋亡能力；过表达 TRERF1 的 H1734、H1975 与阴性对照细胞相比，肺腺癌细胞凋亡相关蛋白 BAX、cleaved caspase3、cleaved PARP 蛋白表达量显著增强 ($P < 0.01$)，抗凋亡蛋白 BCL2 表达无明显变化，但 BAX/BCL2 比值增高

(图 1-15)。以上结果表明 TRERF1 对肺腺癌细胞的凋亡能力有显著促进作用。

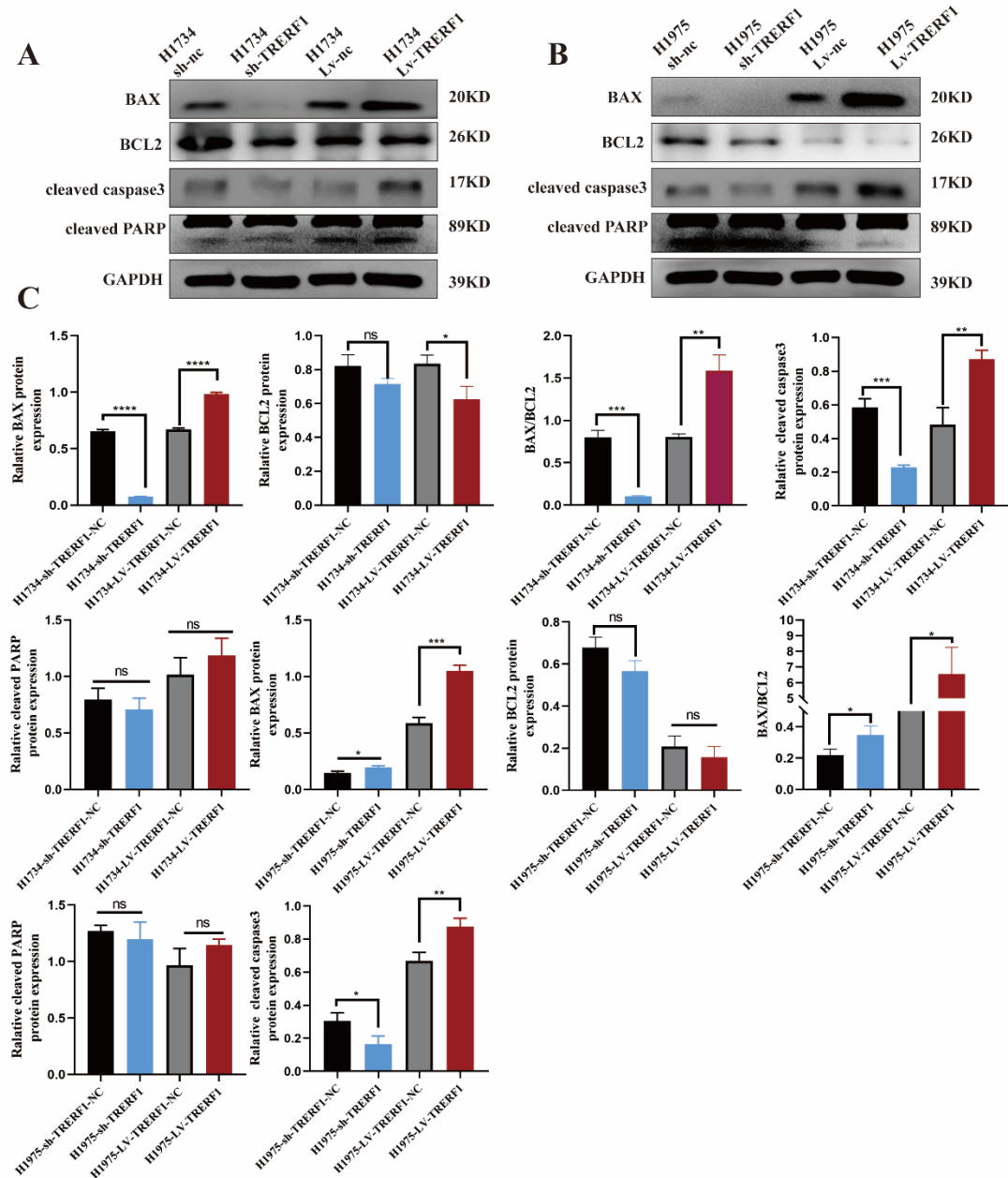


图 1-15 TRERF1 对肺腺癌细胞凋亡能力有促进作用

A. 敲除和过表达 TRERF1 蛋白表达水平在 H1734 细胞中凋亡相关蛋白 BAX、BCL2、BAX/BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 的 Western Blot 条带的图片；B. 敲除和过表达 TRERF1 蛋白表达水平在 H1975 细胞中凋亡相关蛋白 BAX、BCL2、BAX/BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 的 Western Blot 条带的图片；C. 敲除和过表达 TRERF1 在 H1734 和 H1975 中对凋亡相关蛋白影响 WB 条带分析统计图。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

Figure 1-15 TRERF1 promotes apoptosis in lung adenocarcinoma cells.

A. Western blot images of knockout and overexpression of TRERF1 protein expression levels in apoptosis related proteins BAX, BCL2, BAX/BCL2, cleared caspase3, and cleared PARP in H1734 cells; B. Western blot images of knockout and overexpression of TRERF1 protein expression levels in apoptosis related proteins BAX, BCL2, BAX/BCL2, cleared caspase3, and cleared PARP in H1975 cells; C. Knockout and overexpression of TRERF1 affect apoptosis related proteins in H1734 and H1975 using WB band analysis., * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

1.4 动物实验研究 TRERF 1 对皮下移植瘤形成和增殖的影响

1.4.1 过表达 TRERF1 对 H1734 细胞在裸鼠肺移植瘤的增殖的影响

18 只雌性裸鼠在 TRERF1 空白对照组 (control)、TRERF1 过表达组 (Lv-TRERF1) 和阴性对照组 (Lv-TRERF1-NC) 生长状态良好, 实验组和对照组裸鼠皮下肿瘤的外观、体重和瘤体积见 (图 1-16)。

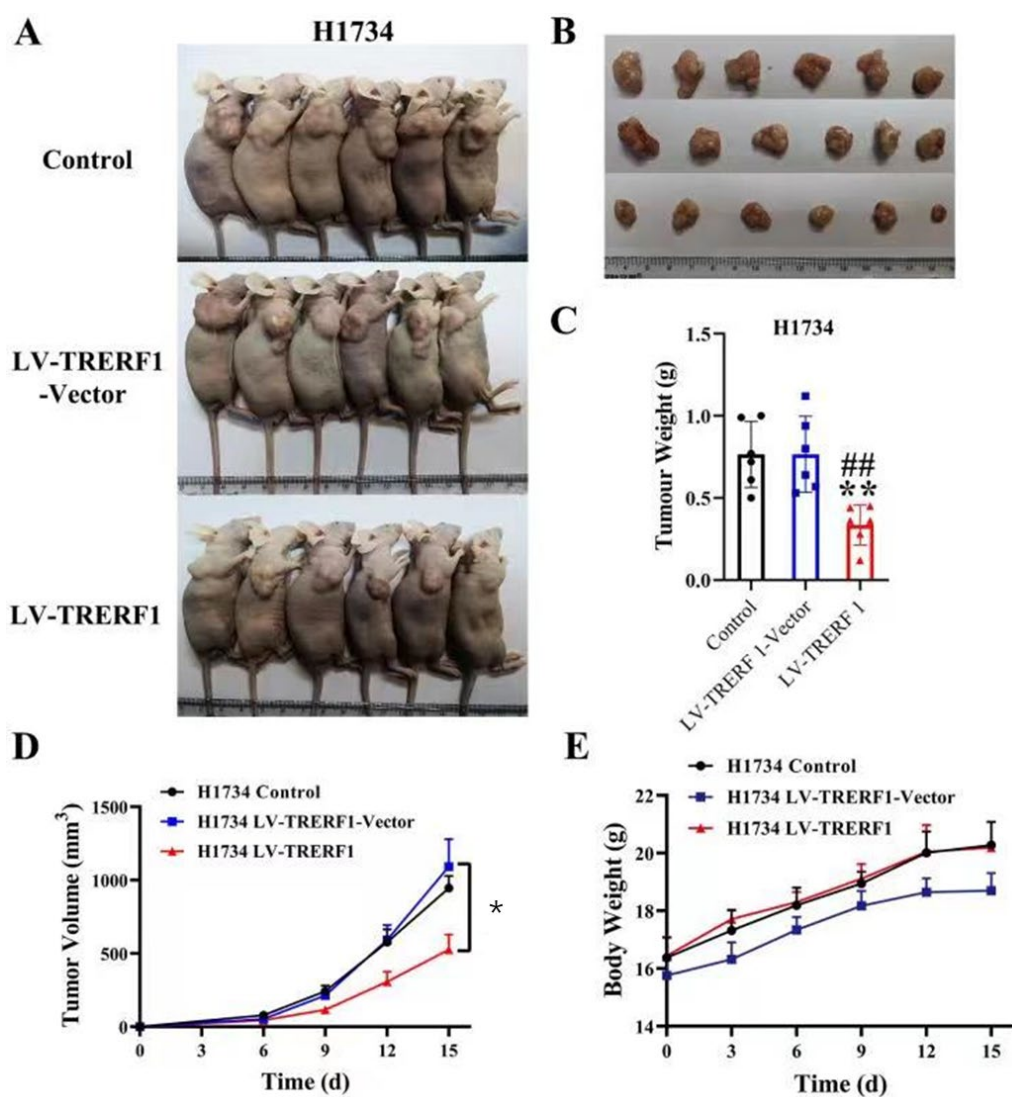


图 1-16 TRERF1 对 H1734 细胞在雌性裸鼠皮下形成瘤的增殖能力的影响

A.正常组、对照组、过表达组裸鼠整体外观图像；B. 三组裸鼠皮下移植瘤解剖图像；C.各组皮下移植瘤重量的均值比较，过表达组瘤重小于对照组，t 检验，** $P<0.01$ ；D. 不同时间节点各组移植瘤的体积，过表达组瘤体积小于对照组，t 检验，* $P<0.05$ ；E. 不同时间节点各组裸鼠的体重，无统计学意义。

Figure 1-16 TRERF1 inhibits the proliferation ability of H1734 cells in female nude mice.

A. The overall appearance images of nude mice in the normal group, control group, and overexpression group; B. Three sets of anatomical images of subcutaneous transplanted tumors in nude mice; C. Comparison of the mean weight of subcutaneous transplanted tumors in each group, the tumor weight in the overexpression group was smaller than that in the control group, t-test, * * $P<0.01$; D. At different time points, the volume of transplanted tumors in each group was smaller in the overexpression group than in the control group, t-test, * * * $P<0.001$; E. There was no statistically significant difference in the weight of each group of nude mice at different time points.

(1) 裸鼠体重

在 H1734 细胞中过表达 TRERF1 组和 NC 组裸鼠体重在第 0、3、6、9、12、15 天不同时间节点两组裸鼠总体体重无差异（表 1-1）。

表 1-1 Lv-TRERF1 组和 Lv-TRERF1-NC 组裸鼠体重（单位：g）

Table 1-1 Body weight of nude mice in the Lv TRERF1 and Lv TRERF1-NC groups (g)

Time(Day)	control	Lv-TRERF1-NC	Lv-TRERF1	<i>P</i>
0	16.44±1.60	16.38±1.71	15.76±1.31	0.498
3	17.71±0.81	17.32±1.72	16.32±1.43	0.3
6	18.30±0.86	18.19±1.50	17.34±1.10	0.289
9	19.11±1.26	18.94±1.00	18.17±1.27	0.269
12	20.04±2.28	20.01±1.79	18.56±1.16	0.149
15	20.19±2.18	20.28±1.95	18.70±1.48	0.145

(2) 裸鼠皮下移植瘤的体积

Lv-TRERF1 组裸鼠皮下移植瘤的体积低于 Lv-TRERF1-NC 组，第 6 天后荷瘤体积在有统计学意义（ $P<0.05$ ）。0、3、6、9、12、15 天，Lv-TRERF1 组和 Lv-TRERF1-NC 组裸鼠移植瘤的体积记录（表 1-2），结果表明 TRERF1 对 H1734 细胞在裸鼠移植瘤增殖有抑制作用。

表 1-2 Lv-TRERF1 组和 Lv-TRERF1-NC 组裸鼠移植瘤体积（体积：mm³）

Table 1-2 Transplanted tumor volume in nude mice of Lv TRERF1 group and Lv TRERF1-

Time(Day)	NC group (mm ³)			<i>P</i>
	control	Lv-TRERF1-NC	Lv-TRERF1	
6	53.49±13.32	77.61±28.54	44.12±12.12	0.025
9	212.92±53.45	241.98±94.63	115.29±43.72	0.014
12	591.51±249.79	576.86±214.44	306.32±170.08	0.036
15	1091.60±460.50	945.35±201.33	525.84±253.34	0.009

(3) TRERF1 在裸鼠瘤体中的蛋白水平的表达

Western blot结果提示，TRERF1在裸鼠肿瘤组织中过表达组蛋白的表达量高于NC组（ $P<0.01$ ），提示裸鼠移植瘤中TRERF1被成功过表达。（图1-17）。

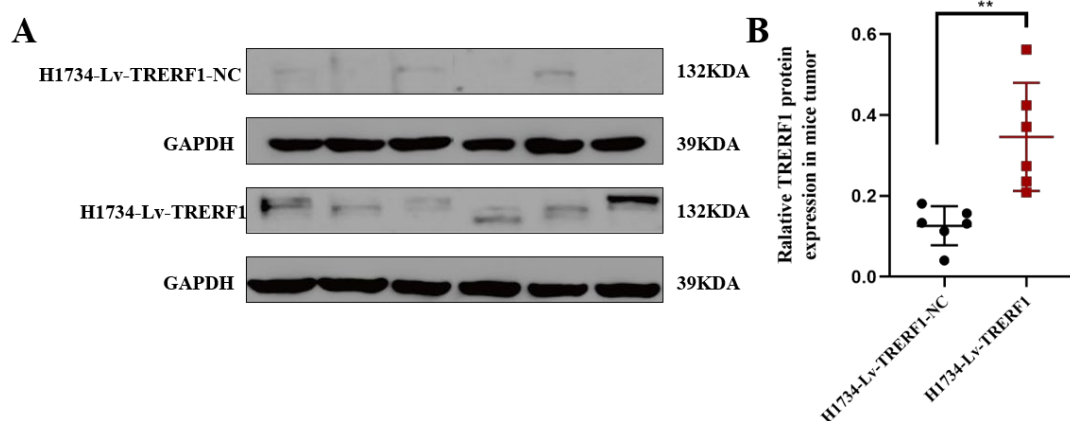


图 1-17 TRERF1 蛋白在过表达组中表达

A. TRERF1 在 NC 组和过表达组 WB 条带分析统计图和 Western Blot 条带的图片；B. TRERF1 蛋白表达水平的定量结果。t 检验 ** $P<0.01$ 。

Figure 1-17 TRERF1 protein expression in the overexpression group.

A. Quantitative analysis Results of TRERF1 in the NC group and overexpression group, as well as representative images of Western Blot bands; B. Quantitative Results of TRERF1 protein expression levels. T-test, ** $P<0.01$.

(4) Ki-67 在裸鼠瘤体中的蛋白水平的表达

免疫组化结果提示，增殖相关蛋白Ki-67在过表达TRERF1组的裸鼠肿瘤组织中，蛋白的表达量低于NC组，差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ），提示过表达TRERF1抑制了裸鼠肺腺癌细胞移植瘤的增殖能力（图1-18）。

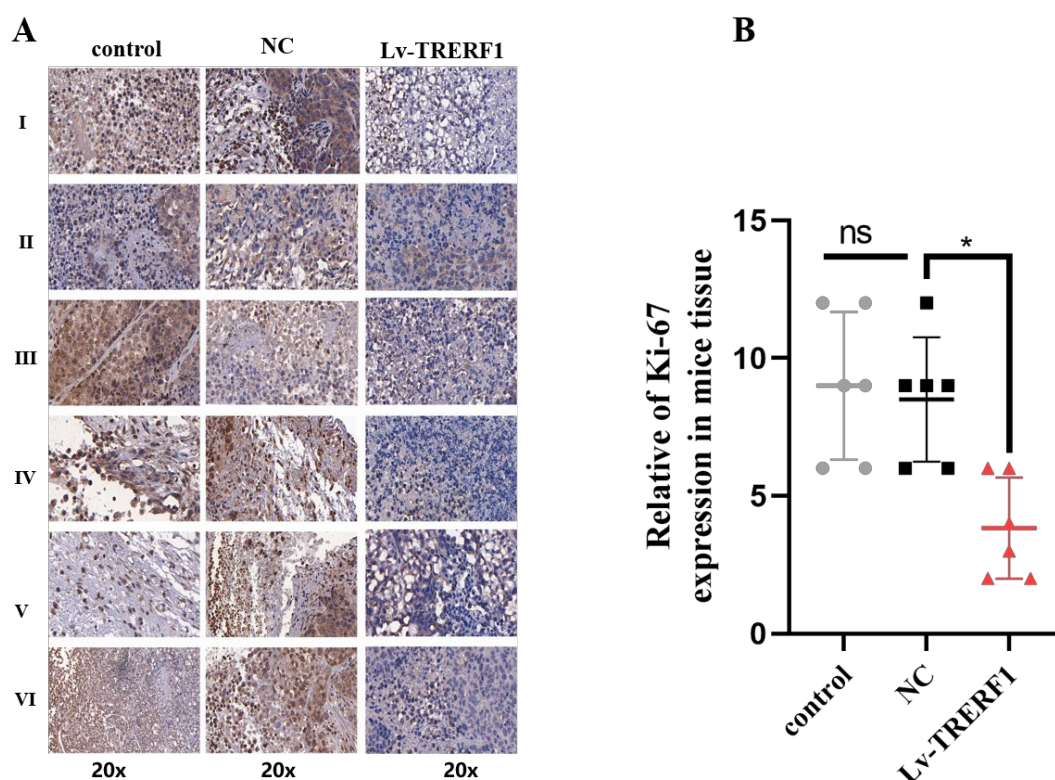


图 1-18 Ki-67 蛋白在过表达组 TRERF1 的裸鼠组织中的表达量水平

A. Ki-67 在 NC 组和过表达组免疫组织化学染色的图片；B. Ki-67 蛋白表达水平的半定量结果。t 检验, $*P<0.05$ 。

Figure 1-18 The expression level of Ki-67 protein in nude mouse tissues of overexpressing group TRERF1

A. Images of Ki-67 immunohistochemical staining in the NC group and overexpression group; B. Semi quantitative Results of Ki-67 protein expression levels. t-test, $*P<0.05$.

(5) Cleaved caspase3 在裸鼠瘤体中的蛋白水平的表达

免疫组化结果提示，凋亡相关蛋白cleaved caspase3在过表达TRERF1组的裸鼠肿瘤组织中，蛋白的表达量显著高于NC组，差异具有显著性 ($P<0.01$)，提示过表达TRERF1显著促进了裸鼠肺腺癌细胞移植瘤的凋亡能力 (图1-19)。

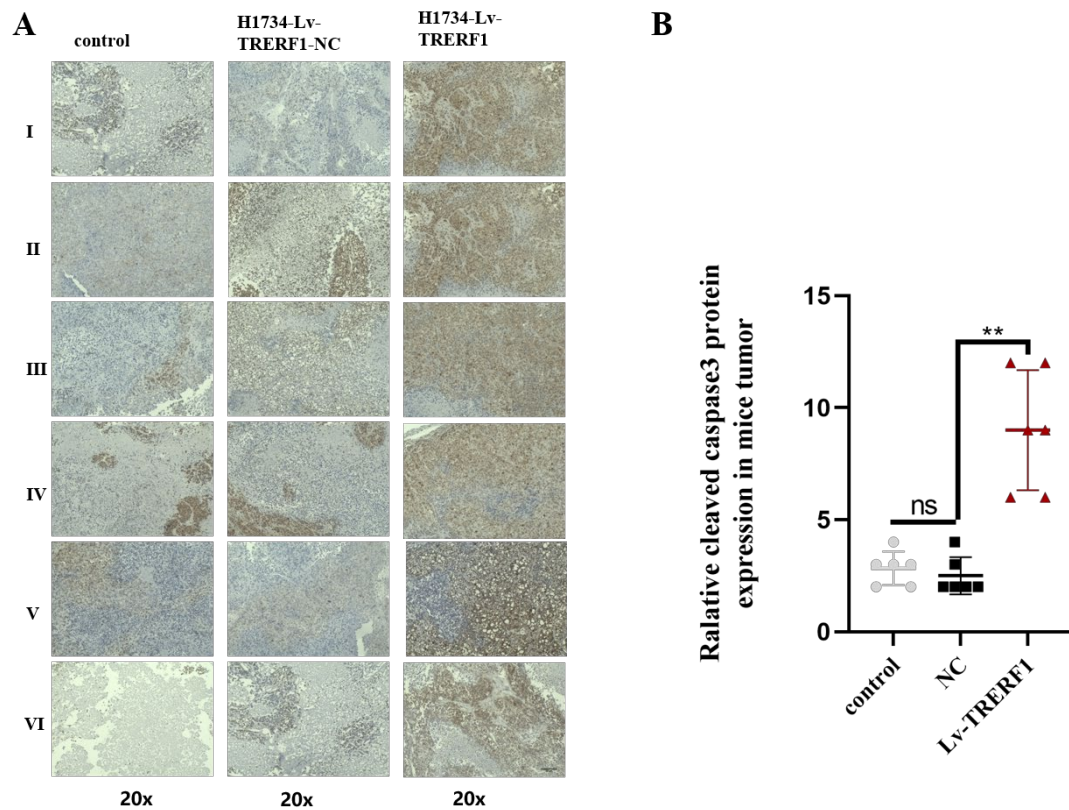


图 1-19 Cleaved caspase3 蛋白在过表达组 TRERF1 的裸鼠组织中的表达量水平

A. Cleaved caspase3 在 NC 组和过表达组免疫组织化学染色的图片；B. Cleaved caspase3 蛋白表达水平的半定量结果。t 检验, $*P<0.05$ 。

Figure 1-19 The expression level of cleaved caspase 3 protein in nude mouse tissues of overexpressing group TRERF1

A. Images of cleaved caspase 3 immunohistochemical staining in the NC group and overexpression group; B. Semi quantitative Results of Cleaved caspase3 protein expression levels. t-test, $*P<0.05$.

1.4.2 过表达 TRERF1 对 H1975 细胞在裸鼠肺移植瘤的形成的影响

12 只雌性裸鼠在 TRERF1 过表达组 (Lv-TRERF1) 和阴性对照组 (Lv-TRERF1-NC) 生长状态良好, 过表达 TRERF1 影响了 H1975 细胞的裸鼠皮下移植瘤形成能力 (表 1-3) (图 1-20)。

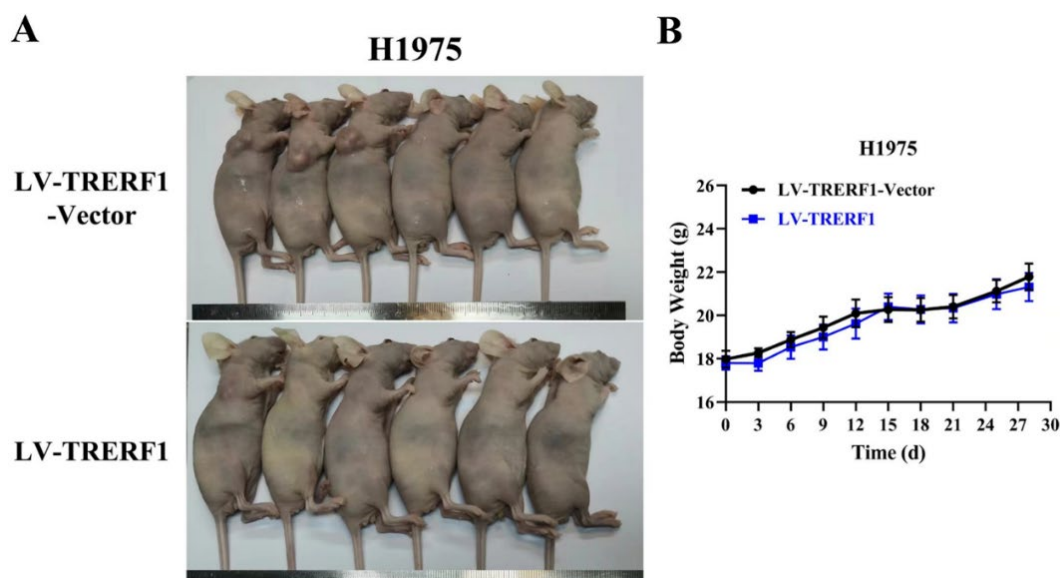


图 1-20 TRERF1 抑制 H1975 细胞在雌性裸鼠皮下形成瘤的增殖能力

A.对照组、过表达组裸鼠整体外观图像；B. 不同时间节点各组裸鼠的体重，无统计学意义。

Figure 1-20 TRERF1 inhibits the proliferation ability of H1975 cells in subcutaneous tumor formation in female nude mice.

A. The overall appearance images of the control group and overexpression group of nude mice; B. There was no statistically significant difference in nude mice weight of each group at different time points.

表 1-3 过表达 TRERF1 对 H1975 细胞在雌性裸鼠皮下瘤形成影响

Table 1-3 The effect of overexpression of TRERF1 on the formation of subcutaneous tumors in H1975 cells in female nude mice

Group	The animal number of tumor		χ^2	<i>P</i>
	Formation			
	Yes	No		
H1975 LV-TRERF1-Vector	5	1	5.333	0.021
H1975 LV-TRERF1	1	5		

过表达 TRERF1 组和 NC 组的 H1975 细胞在第 0、3、6、6、12、15、18、21、25、28 天裸鼠体重无差异 ($P>0.05$) (表 1-4)。

表 1-4 Lv-TRERF1 组和 Lv-TRERF1-NC 组裸鼠体重 (单位: 克)

Table 1-4 Body weight of nude mice in the Lv TRERF1 and Lv TRERF1-NC groups (g)

Time(Day)	Lv-TRERF1-NC	Lv-TRERF1	<i>P</i>
0	17.98±0.97	17.81±0.75	0.736
3	18.27±0.51	17.79±0.87	0.272
6	18.88±0.87	18.53±1.33	0.601
9	19.44±1.23	19.00±1.42	0.581
12	20.10±1.57	19.62±1.69	0.623
15	20.27±1.41	20.40±1.49	0.884
18	20.25±1.34	20.28±1.58	0.974
21	20.41±1.32	20.33±1.62	0.934
25	21.12±1.27	20.98±1.69	0.869
28	21.79±1.49	20.31±1.60	0.609

讨 论

肺癌是男女死亡率均居首位的恶性肿瘤，近年来，非吸烟女性肺腺癌的发病率在不断上升^[34]，云南“宣威地区”是非吸烟女性肺癌发病率较高的地区之一，究其原因与环境 and 人群基因易感性密切相关，其基因谱与吸烟人群有相似之处，对燃煤和吸烟诱发肺癌的基因谱有一定代表性。通过对该地区基因谱前期研究发现，宣威非吸烟女性肺腺癌具有肺腺癌的普遍性，但与其他地区同基因谱有所差异，通过多组学研究发现了多个与遗传易感相关的高频基因突变，并且具有较高的肿瘤突变负荷，首次发现了高频突变基因 TRERF1。

转录调节因子 TRERF1 是最初由美国学者在通过筛选类固醇合成关键酶 P450scc 基因 5 侧翼区 (-155/-131) 的胎盘 cDNA 表达文库，并克隆发现的一种新的蛋白质^[23]，其分子量约为 132KDA，由 17 个外显子组成。TRERF1 属于 C2H2 型锌指蛋白家族，具有多个锌指结构。锌指通常以 Cys2His2 (C2H2) 的结构方式排列，形成一个稳定的三维结构，这些结构决定了其与特定 DNA 序列结合的能力，从而调控相关基因的表达。Florence Gizard^[35]等发现 TRERF1 可以作为转录因子结合到 P450scc 的启动子区域，通过调节基因的转录水平影响靶基因的表达。此外，TRERF1 还参与细胞周期调控、细胞分化和凋亡等生物学过程^[26, 36]。TRERF1 的表达水平在不同肿瘤中呈现出多种不同的变化。在某些情况下，过度表达 TRERF1 可能抑制其生长和扩散影响细胞生长、分化和转移，从而对肿瘤的恶性程度产生影响。此外，TRERF1 异常表达或突变可能导致基因表达失调，从而影响细胞的正常功能，甚至参与疾病的发展过程^[28, 37]，因此，TRERF1 可能成为一种潜在的治疗靶点。

TRERF1 在肺腺癌中的功能还未见报道，所以在本研究首先探索 TRERF1 在肺腺癌中的功能。通过对 TRERF1 在 TCGA 数据库中的肺腺癌组织的表达情况进行生信分析，发现 TRERF1 在肺腺癌组织和癌旁组织中表达具有差异性，通过 qPCR 检测 TRERF1 在 12 对肺腺癌和癌旁组织中表达差异的验证，结果发现：TRERF1 在肺腺癌组织的表达低于癌旁组织，提示 TRERF1 可能参与了影响肺腺癌的增殖、侵袭、迁移等恶性生物学功能。为进一步探讨 TRERF1 在肺腺癌细胞中的生物学功能奠定基础。

既往的研究发现，TRERF1 可以作为肿瘤生长抑制蛋白，作用于乳腺癌细胞

周期,抑制细胞的增殖。但在肺癌中的恶性生物学功能还未见报道。为研究 TRERF1 在肺腺癌中的恶性生物学行为,本研究实验工具细胞均从肺腺癌细胞系中筛选,通过 western blot 分析了 TRERF1 蛋白在 7 种肺腺癌细胞系的表达水平,结果显示 TRERF1 蛋白在 H1650 细胞中表达最低,在 PC-9 细胞中表达最高, H1975、H1734 细胞中表达适中,因此,将构建过表达和敲除的 H1975、H1734 稳转细胞进行双向功能实验研究 TRERF1 在肺腺癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡等生物学功能中的作用。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对实验工具细胞 H1975、H734 基因组中 TRERF1 进行敲除编辑。其原理是核酸内切酶 Cas9 蛋白通过引导 sgRNA 识别 TRERF1 基因组位点并对双链 DNA 进行切割,导致断裂的 DNA 在修复过程中发生碱基插入或缺失的错配,发生移码突变,从而实现基因敲除^[38]。过表达基因技术,则采用慢病毒重组载体技术链接外源性基因序列,通过转染实现对细胞中的 TRERF1 的过表达。最后通过 western Blot 实验与空载体 NC 组比较,结果提示均成功完成了 TRERF1 在 H1975 和 H1734 中的敲除和过表达,并通过嘌呤霉素筛选,培养稳转细胞株用于后续实验。

在细胞基因功能的正反验证表型实验中,CCK8 实验检测发现敲除和过表达的 H1975、H1734 细胞增殖活力与 NC 组比较在 48 小时后开始出现差异,EDU 增殖实验也得到了和 CCK8 一致的结果,提示 TRERF1 可以抑制肺癌细胞增殖。在划痕实验和 transwell 小室侵袭迁移实验中,过表达 H1975、H1734 细胞的 TRERF1,能显著抑制细胞侵袭、迁移。敲除 H1975、H1734 细胞的 TRERF1,则促进细胞侵袭、迁移。TRERF1 在肿瘤当中恶性生物行为的功能研究较少,目前仅报道了其可以抑制 HeLa 细胞、MDA-MB-231 细胞和 T-47D 细胞的增殖^[26],这与本研究细胞实验的结果大致相同,同时我们也发现了 TRERF1 在肺腺癌细胞的迁移和侵袭能力可能也有作用。

增殖和抗凋亡是恶性肿瘤发展很重要的标志^[39, 40],在增殖表型实验中我们观察到了 TRERF1 具有抑制肺腺癌细胞的增殖能力,既往研究显示其可以通过调控细胞周期中细胞周期蛋白激酶抑制及 p21 和 p27 的表达可参与细胞增殖能力的调节,但未研究其在凋亡中的作用,为此本研究进一步探究 TRERF1 是否可以影响细胞的凋亡中。细胞凋亡中发生时,常伴有凋亡核心通路中的关键分子,

抗凋亡分子 BCL-2 降低, 促凋亡分子 BAX 升高以及细胞凋亡过程中的效应分子 cleaved caspase3, cleaved PARP 升高^[41], 由于染色体 DNA 单链或双链断裂产生大量的粘性 3'-OH 末端, 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下, 可以通过将脱氧核糖核苷酸、荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶和生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'-OH, 由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 基本不会被染色, 所以通过 TUNEL 检测 DNA 片段化是细胞凋亡细胞的常用的检测。本研究通过 western blot 检测与凋亡相关的关键蛋白表达和利用 TUNEL 凋亡检测实验, 发现过表达 TRERF1 可以促进 H1975 和 H1734 细胞的凋亡, 敲除 TRERF1 减弱了 H1975、H1734 细胞的凋亡, 说明 TRERF1 可以通过凋亡影响肺腺癌细胞的增殖。

在细胞实验结果的基础上, 我们选取抑制肿瘤生长的过表达 TRERF1 的 H1975 和 H1734 细胞构建动物成瘤模型, 进一步探索 TRERF1 对裸鼠皮下移植瘤的影响。实验过程中监测裸鼠体重, 成瘤情况, 瘤体体积。研究结果发现接种过表达 TRERF1 的 H1734 细胞中, 与对照组相比, 裸鼠体重无统计学差异, TRERF1 过表达组的裸鼠移植瘤的体积相对较小, 提示, TRERF1 表达上调可以影响裸鼠移植瘤的增殖能力。我们进一步运用同样的动物实验方法, 构建 H1975 的裸鼠皮下移植瘤模型, 但实验结果发现在接种过表达 TRERF1 的 H1975 细胞中仅有 1 只裸鼠有皮下, 这与肿瘤细胞彼此间异质性有关。由此, 推测 TRERF1 可以影响 H1975 肺腺癌细胞的增殖, 进而影响了细胞的 H1975 裸鼠移植瘤的成瘤能力。将成瘤的 H1734 组裸鼠瘤体组织行 western blot 检测 TRERF1 蛋白表达, 结果提示实验组 TRERF1 的 H1975 细胞组裸鼠移植瘤中 TRERF1 的表达量显著高于对照组, 提示 TRERF1 被显著过表达为进一步在组织水平检测 TRERF1 对裸鼠移植瘤的影响, 在后续实验中, 通过免疫组化检测发现过表达组瘤体中增殖相关蛋白 Ki-67 阳性率显著降低, 与凋亡相关的蛋白 cleaved caspase3 阳性率显著升高。结果表明 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞在裸鼠皮下成瘤有显著影响。体内实验结果与体外一致。

本部分研究首先通过体外细胞实验, 利用 crisper-cas9 和慢病毒过表达质粒构建了 TRERF1 过表达和敲除的 H1975、H1734 肺腺癌细胞模型, 通过 CCK8、EDU、细胞划痕、transwell 小室、TUNNEL 以及 WB 检测凋亡相关蛋白, 发现

了 TRERF1 对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用，并可显著细胞凋亡。进一步通过动物实验进一步研究 TRERF1 对肺腺癌细胞在裸鼠移植瘤形成和增殖的影响，利用 WB 检测增殖相关蛋白 Ki-67，凋亡相关蛋白 cleaved caspase3 在裸鼠移植瘤中的表达，发现 TRERF1 可以抑制裸鼠移植瘤的抑制增殖。体外和体内实验结果均提示 TRERF1 可能调节肺腺癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移等生物学功能。

结 论

转录调节因子 TRERF1 能够抑制肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭，促进细胞凋亡，提示 TRERF1 可能是肺腺癌发展中的潜在的抑癌因子。

第二部分 TRERF1 影响肺腺癌生物学功能的分子

机制研究

吸烟和燃煤相关的空气污染是诱发肺癌的重要因素，云南宣威地区燃煤中的多环芳烃类化合物、尼古丁衍生的亚硝胺等有害物质对空气的污染，导致该地区肺癌整体发病率处于较高水平。该地区非吸烟女性肺癌基因谱对燃煤和吸烟诱发肺癌的基因特点相似，具有一定代表性，是研究燃煤相关肺癌的典型模型。进一步探索燃煤和吸烟诱发肺癌的发生发展机制，为寻找该类人群治疗新靶点奠定研究基础。同时可为全球范围内类似由环境污染所致的相关肺癌的治疗提供重要参考。

TRERF1 是宣威非吸烟女性肺腺癌中首次发现的显著突变的基因，通过在本研究第一部分对 TRERF1 在肺腺癌细胞中恶性生物学功能的研究中发现，TRERF1 抑制了肺腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移，促进了肺腺癌细胞的凋亡，提示其在肺腺癌发展可能是一个抑癌因子，但是，其在肺腺癌生物学功能中的机制未完全阐明。相关研究发现 TRERF1 其分子结构有 C2H2 的锌指结构域，可以与靶蛋白的 DNA 结构域，影响相关靶基因的转录^[42, 43]，提示 TRERF1 可能参与某些基因的调控，在肺腺癌的发展中发挥作用，因此，本部分研究将进一步通过转录组测序寻找筛选在肺腺癌细胞增殖生物学功能中发挥重要作用的目标蛋白，探索 TRERF1 发挥抑制肺腺癌生物学功能中的作用机制。

材料方法

1.实验材料

1.1 主要仪器

仪器名称	品牌	型号
制冰机	马尼托瓦（中国）制冷有限公司	SF0406A(RF0650A)
荧光显微镜	赛默飞世尔(中国)有限公司	Ci-L
荧光化学分析仪	赛默飞世尔(中国)有限公司	Vaio Skan Flash
移液器	吉尔森	吉尔森

医用保存箱	青岛海尔特种电器有限公司	HYC-198S
液氮生物容器罐	四川亚西橡塑机器有限公司	YDS-30-125
液氮冻存系统	美国 CBS	V-1500B
血细胞分离机	Gambro	Gambro Spectra TM
显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CX31(双目)
微型台式离心机	日本 Tomyw	PMC-880(Micro
微生物培养箱	赛默飞世尔集团	B6060
微量紫外光光度计（紫外/可见	美国 NanoDrop	NanoDrop200
光分光光度计		
梯度 PCR 仪	新加坡 Life Technologies	MiniAmp PCR
台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-15R
台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-22R
生物显微镜	德国徕卡仪器有限公司	DMI4000B
生物安全柜	美国 Forma 公司	1287
凝胶成像仪	上海天能科技有限公司	Tanon 4600SF
酶标仪	赛默飞世尔(中国)有限公司	MuLtiskanFC
轮转切片机	德国徕卡仪器有限公司	RM2235
流式细胞仪	美国 BD 公司	BD FACSAria
流式细胞仪	美国 BD 公司	BD Canto II
冷藏冷冻保存箱	青岛海尔生物医疗股份有限公司	HYCD-205
净化工作台	济南康宝净化设备有限公司	JHT-SDC
过滤系统	Millipore 公司	Elix 10
高压灭菌锅	德国 Syte 公司	Syte VX-75
高速冷冻台式离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra 64R

二氧化碳培养箱	ThermoFisher 集团	3111
多功能台式冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司	Allegra X-25R
多功能电融合和电穿孔系统	美国 BTX 公司	ECM201
定量 PCR 仪	美国 ABI 公司	7500 型
电子天平	瑞士梅特勒-托利多中国地区	AB204-L
电子天平	赛多利斯（上海）贸易有限公司	Quintix5102-1CN
电动辅助吸液器	法国吉尔森公司(GisonS.A.S)	MAXROMAN1000P
倒置显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CKX-31(双目)
倒置显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CKX41
磁力搅拌器	IKA 艾卡（广州）仪器设备有限	RH BASIC2
程序冷冻仪	赛默飞世尔集团	7453
超低温冰箱	美国 Forma 公司	8694
超纯水系统	Millipore 公司	Mill-QB

1.2 主要试剂和材料

耗材名称	厂家名称	货号
Enhanced Cell Counting Kit-8	白鲨	BL1055B
青霉素-链霉素溶液(100X 双抗)	Gibco	15140-122
胰酶细胞消化液(0.25%胰酶，含 EDTA)	Gibco	25200-072
0.2mL 平盖薄壁管	LABSELECT	PT-02-C
1.5mL 微量离心管	科进	KG2211
100 mm 细胞培养皿，TC	耐思	704001
100-1000uL 吸嘴，蓝色，带刻度	科进	KG1313
100mm 细胞培养皿	LABSELECT	12310

10uL 吸头盒	白鲨	BS-10-TB96
1250uL 吸头盒	爱必胜	ABC01250
12 孔细胞培养板	康宁	3513
15 mL 离心管, 医疗级	耐思	601002
150mm 细胞培养皿(易握型)	LABSELECT	12411
1640 培养基	Gibco	C11875500BT
1xPBS 缓冲液(细胞培养)	白鲨	BL302A
2.0 mL 可立外旋冻存管	甄选	CV-002-200-EX
200 uL 吸头盒	白鲨	BS-200-TB96
3 mL 巴氏吸管/独立灭菌包装 155mm	白鲨	BS-XG-03-L
50 mL 离心管, 医疗级, 袋装	耐思	602002
5 mL 巴氏吸管/独立灭菌包装 211mm	白鲨	BS-XG-05
6 孔细胞培养板	康宁	3516
75%酒精消毒液	天亘	002010-500ML
96 孔细胞培养板	CORNING/康	3599
AKT Rabbit pAb	正能生物	382804-20
alpha TubuLin (4C9) Mouse mAb	正能生物	250009-100uL
Anti-BAX 抗体	protientech	50599-2-Ig
Anti-BCL-2 抗体	protientech	26593-1-AP
Anti-cleaved caspase3 抗体	protientech	19677-1-AP
Anti-cleaved PARP 抗体	protientech	13371-1-AP
Anti-CXCL3 抗体	赛默飞	500-P105-1MG
Anti-ERK1/2 抗体	cell signaling	# 4696S
Anti-GAPDH	cell signaling	# 2118S

Anti-p-ERK1/2 抗体	cell sigaling	# 9102S
BCA Protein ConcentrationAssay	Elabscience/伊	E-BC-K318-M-500Assays
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	索莱宝	PC0020
DMEM/F12 培养基	Gibco	C11330500BT
DMEM 培养基	Gibco	C11995500BT
Enhanced Cell Counting Kit-8	白鲨	BL1055A
Hypersensitive ECL Western HRP Substrate [Low-pg Level]	正能生物	17046
OriCell®标准级胎牛血清	赛业	FBSST-01033
Premix Ex Taqm(ProbegPCR), ROX plus	takara	RR39LR
QwickBlock" Western 二抗稀释液	碧云天	P0258-100mL
RPMI1640 培养基	Gibco	C11875500BT
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)	森贝伽	BI-WB001-15mL
SDS-PAGE 电泳液(Tris-Gly,Powder)	碧云天	P0014B
S-TRANS 高效转膜垫片	ACE	B22082503
S-TRANS 阳极缓冲液	ACE	B22100901
S-TRANS 阴极缓冲液	ACE	B22082502
T25 细胞培养瓶, 透气盖, TC	耐思	707003
T75 细胞培养瓶, 透气盖, TC 处理	爱必胜	ABC708008
TB Green@ Premix Ex TaqMII (Tli RNaseH Plus)	takara	RR820A
TBST 缓冲液(10x, pH7.4)	白鲨	BL315B
Trypsin EDTA Solution A 胰蛋白酶溶液	BI	03530-0500
Western 转膜液	碧云天	P0021B

冻存管盖色标,绿色	LABSELECT	CVI-001-G
封口膜		
高效 RIPA(组织细胞快速裂解液)	索莱宝	R0010-20mL
丽春红染色液	白鲨	BL519A
山羊抗兔 IgG 二抗, 橙红色 DyLight 594 荧光标记	亚科因	A23420-100uL
山羊抗小鼠 IgG 二抗, 绿色 DyLight 488 荧光标记	亚科因	A23210-100uL
双色预染蛋白 Marker 10kDa~250kDa	EpiZyme/雅	WJ102
无蛋白快速封闭液(1X)	PS108P	雅酶
无血清细胞冻存液 (CELLSAVING)	新赛美	C40100
细胞小室染色试剂盒	白鲨	BL710A
细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	碧云天	C1052
胰蛋白酶洛夜	BI	C3530-0500

2. 转录组测序及生物信息学方法预测筛选 TRERF1 靶基因

从基因水平探究转录调节因子 TRERF1 影响肺腺癌的作用机制, 首先, 选取生长状态良好的过表达 TRERF1 的 H1975 细胞过表达对照组 (Lv-NC) 和过表达组 (Lv-TRERF1)。

2.1 提取细胞总 RNA 与质检

- (1) 用构建成功的过表达 H1975 细胞 (H1975-Lv-TRERF1、H1975-Lv-TRERF1-NC)。细胞复苏、培养、传代、计数、冻存 (方法同第一部分);
- (2) 用天根 RNA 提取试剂盒提取总 RNA;
- (3) 用分光光度计 NanoDrop 检测质控总 RNA 的量与纯度;
- (4) 用琼脂糖电泳检测 RNA 完整性: ①浓度>50ng/μL, ②RIN 值>7.0, ③OD_{260/280}>1.8, ④total RNA>50μg。

2.2 转录组测序和 qPCR 验证

- (1) 利用 II Illumina NovaseqTM6000 对 H1975-Lv-TRERF1、H1975-Lv-TRERF1-NC 细胞进行转录组测序，每组 3 个重复细胞样本；
- (2) 通过生信分析对 TRERF1 的差异表达基因进行 GO 基因功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，探索潜在的信号通路和生物学功能；
- (3) 比较 H1975-Lv-TRERF1、H1975-Lv-TRERF1-NC 细胞之间差异基因，分析阈值设定为： $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ ，且 $p \text{ value} < 0.05$ ，绘制火山图，再根据差异表达基因在每个样品里的表达量，取以 2 为底的对数后，利用系统聚类法(Hierarchical Cluster)对差异基因进行聚类，通过韦恩分析和 Upset 分析筛选出 TRERF1 高度相关的基因 G-CSF3、CXCL1、CXCL3、CXCL5；
- (4) qPCR 检测 G-CSF3 mRNA、CXCL1 mRNA、CXCL3 mRNA、CXCL5 mRNA 表达水平（方法同第一部分），引物序列见表 2-1。

表 2-1 设计合成的引物序列

Table 2-1 Designed and synthesized primer sequences		
引物名称		引物序列(5'to3')
TRERF1	Forward Primer	GGGCTCTTCAGCAATGTCCT
	Reverse Primer	GCCAATGTTGATGCGTGTT
β-actin	Forward Primer	AATCGTGCGTGACATTAAGGAG
	Reverse Primer	ACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT
CXCL3	Forward Primer	CATCGAAAAGATACTGAACAAGGGG
	Reverse Primer	CATTAAGTCCTTTCCAGCTGTCC
CXCL1	Forward Primer	AGCTTGCCTCAATCCTGCAT
	Reverse Primer	TTTCTGACCAACGGCTCCAG
CXCL5	Forward Primer	TGAACTCCTTGCGTGGTCTG
	Reverse Primer	GGGTGTCTCTCTTTCTTCCCC
G-CSF3	Forward Primer	CTGTCACCCCCAGCATTTCC
	Reverse Primer	GGCCATTCCCAGTTCTTCCA

2.3 Person 相关性分析筛选与 TRERF1 表达相关的靶基因

基于肺腺癌组织，从组织水平检测 TRERF1、CXCL3、G-CSF3 的蛋白表达，并分别做 TRERF1 与 CXCL3 和 G-CSF3 的相关性分析。

- (1) 肺腺癌组织中蛋白提取和 western blot 检测（同第一部分）；
- (2) Person 相关性分析筛选蛋白表达与 TRERF1 表达相关具有统计学意义的靶基因，进行后续实验。

3. 验证 TRERF1 调控 CXCL3 的表达

选取第一部分构建成功的肺腺癌细胞系 H1975 细胞（H1975-sh-TRERF1，H1975-sh-TRERF1-NC，H1975-Lv-TRERF1，H1975-Lv-NC），H1734 细胞（H1734-sh-TRERF1，H1734-sh-TRERF1-NC，H1734-Lv-TRERF1，H1734-Lv-NC）。

- (1) Western blot 验证在肺腺癌细胞中 TRERF1 调控 CXCL3 的表达（方法同第一部分）；
- (2) Western blot 验证在裸鼠移植瘤中 TRERF1 调控 CXCL3 的表达（方法同第一部分）。

4. TRERF1 调控 CXCL3 的表达的机制

4.1 CHIP 实验检测 TRERF1 与 CXCL3 的启动子调控关系

选取 H1975-sh-TRERF1，H1975-sh-TRERF1-NC，H1975-Lv-TRERF1，H1975-Lv-NC），H1734 细胞（H1734-sh-TRERF1，H1734-sh-TRERF1-NC，H1734-Lv-TRERF1，H1734-Lv-NC）。

- (1) 向培养基中加入适量的甲醛，使甲醛配制终浓度为 1%，置于 37℃ 孵育 10min。向培养基中加入适量的 0.125 M 甘氨酸，终止交联，室温静置 5min；
- (2) 倒弃培养基，用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次，移液枪吹打，将细胞收集到 15mL 离心管中，4℃ 2000 rpm 离心 5 min 收集细胞，计数。调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/200 \text{ uL}$ ；
- (3) 弃上清，加入蛋白酶抑制剂复合物加入 SDS 裂解液，充分吹打裂解。
- (4) 超声破碎，冲击时间 4.5s，间隔 9s，共 14 次；
- (5) 4℃ 10000 g 离心 10 min 取 300 uL 上清，剩余保存于 -80℃。标记实验组，对照组，input 组，分别取 100 uL 加入各组，65℃ 水浴 3 h；
- (6) 向上述每组中分别加入 900 uL ChIP Dilution Buffer、20 uL 50×PIC 和 60

uL Protein A Agarose/SalmonSperm DNA。4℃颠转混匀 1h。静置 10min，700 rpm 离心 1min；

(7) 取上清。每组各留取 20uL 做为 input。一管中加入 1 uL 抗体，另一管中不加抗体，4℃过夜；

(8) 4℃孵育过夜后，每管中加入 60uL Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4℃摇匀 2 h，静置 10min，700 rpm 离心 1min 后弃上清；

(9) 按照程序 low salt wash buffer 1 次，high salt wash buffer 1 次，LiCl wash buffer 1 次，TE buffer 2 次依次清洗沉淀复合物。注：每次清洗需在 4℃颠转 10min，静置 10min，700 rpm 离心 1min，弃上清；

(10) 取 100 uL 10%SDS，100 uL 1 M NaHCO₃，800 uL ddH₂O 配制 1 mL 洗脱液。每组中加入 250 uL 洗脱液，上下摇匀 15min，离心后收集上清。重复一次。每管中加入 20uL 5 M NaCl 混匀，65℃解交联过夜；

(11) 向每组中加入 1uL RNaseA，37℃孵育 1 h；

(12) 向每组中加入 10uL EDTA，20 uL Tris.HCl，2 uL 蛋白酶 K，静置于 45℃，2 h；

(13) 加入 100 uL ddH₂O，收集 DNA 片段；

(14) qPCR 检测（同上述 qPCR 方法）。

4.2 细胞 mRNA 稳定性的实验方法

(1) 将稳定过表达 TRERF1 的 H1975、H1734 细胞分为 4 组，分别为 H1975-Lv-NC，H1975-Lv，H1734-Lv-NC，H17344-Lv，按照 0h、0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 分组均匀接种于六孔板中；

(2) 待细胞生长密度大于 80%，加入放线菌素 D（5pg/mL）。每组加药后分别于 0h、0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 后收集各组细胞；

(4) 分别提取每组中的总 RNA，利用 qPCR（方法同第一部分）检测各组细胞内 CXCL3 mRNA 的含量；

(5) 计算各个时间点 CXCL3 mRNA 与 0h 的百分比，绘制 CXCL3 mRNA 含量曲线，分别比较 TRERF1 过表达组与其各自对应的对照组细胞中 CXCL3 mRNA 的降解速率。

5. TRERF1 调控 CXCL3 对细胞增殖和凋亡的作用的影响

5.1 采用过表达质粒经慢病毒包装后构建 CXCL3 过表达的 H1734、H1975 细胞

使用苏州君脐生物公司构建的 CXCL3 过表达质粒（图 2-1）

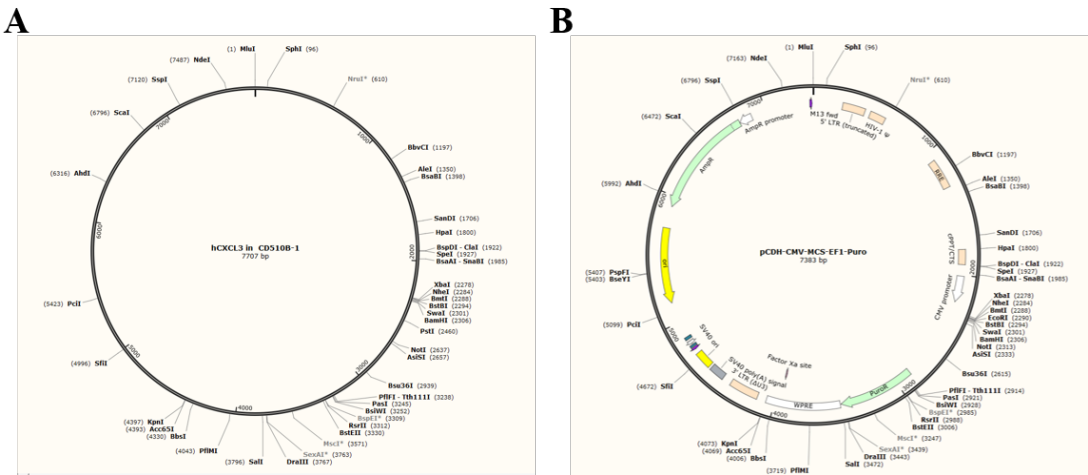


图 2-1 过表达 CXCL3 的质粒和质粒+载体图谱

A.过表达 CXCL3 的质粒图谱；B.过表达 CXCL3 质粒与载体链接图谱。

Figure 2-1 Plasmid and plasmid+vector profiles overexpressing CXCL3.

A. Plasmid map overexpressing CXCL3; B. Overexpression of CXCL3 plasmid vector linkage map.

实验分为阴性对照组（H1734-oe-CXCL3-NC、H1975-oe-CXCL3-NC）和过表达组（H1734-oe-CXCL3、H1975-oe-CXCL3），按实验分组对进行细胞铺板。将上述细胞接种在 6 孔板，待细胞密度约 90%-95%后按进行转染。

依据 MOI 值计算病毒量，H1734-oe-CXCL3-NC、H1975-oe-CXCL3-NC 组滴入空载质粒液，H1734-oe-CXCL3、H1975-oe-CXCL3 组滴入过表达病毒液。在敲除组中，每个孔加入 1 mL 含 10%胎牛血清+1%双抗的完全培养液、5uL 病毒液，其中对照组为空载质粒病毒液，混匀后在继续进行细胞培养。

5.2 回复实验研究 TRERF1 对细胞增殖和凋亡的作用能否被 CXCL3 回复

实验分组为 H1734-LvNC+oeNC（阴性对照）、H1734-Lv-TRERF1+ oeNC（TRERF1 过表达）、H1734-Lv-TRERF1+oe-CXCL3（TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3）、H1734-LvNC+oe-CXCL3 (仅 CXCL3 过表达), H1975-

LvNC+oeNC（阴性对照）、H1975-Lv-TRERF1+ oeNC（TRERF1 过表达）、H1975-Lv-TRERF1+oe-CXCL3（TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3）、H1975-LvNC+oe-CXCL3 (仅 CXCL3 过表达)。过表达 CXCL3 转染方法参考第二部分，按照实验分组进行细胞增殖和凋亡功能实验（方法同前）。

6. 统计分析方法

本研究使用统计软件包括 GraphPad Prism8 和 IBM SPSS 23.0 软件，当数据满足正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述，满足正态分布的两组间比较时采用独立样本 t 检验，三组及以上的样本时使用单因素方差分析，计数资料是用频数和百分比来描述，非正态分布用时使用非参数秩和检验分析各组之间的差异，当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 筛选 TRERF1 相互调控基因

1.1 RNA-seq 筛选 TRERF1 的下游靶基因

1.1.1 差异基因分析和筛选

过表达 TRERF1 稳转细胞经转录组测序后发现, TRERF1 过表达组与 NC 组比较, 一共筛选出 256 个显著差异表达基因, 其中上调基因 144 个, 下调基因 112 个。(图 2-2)。

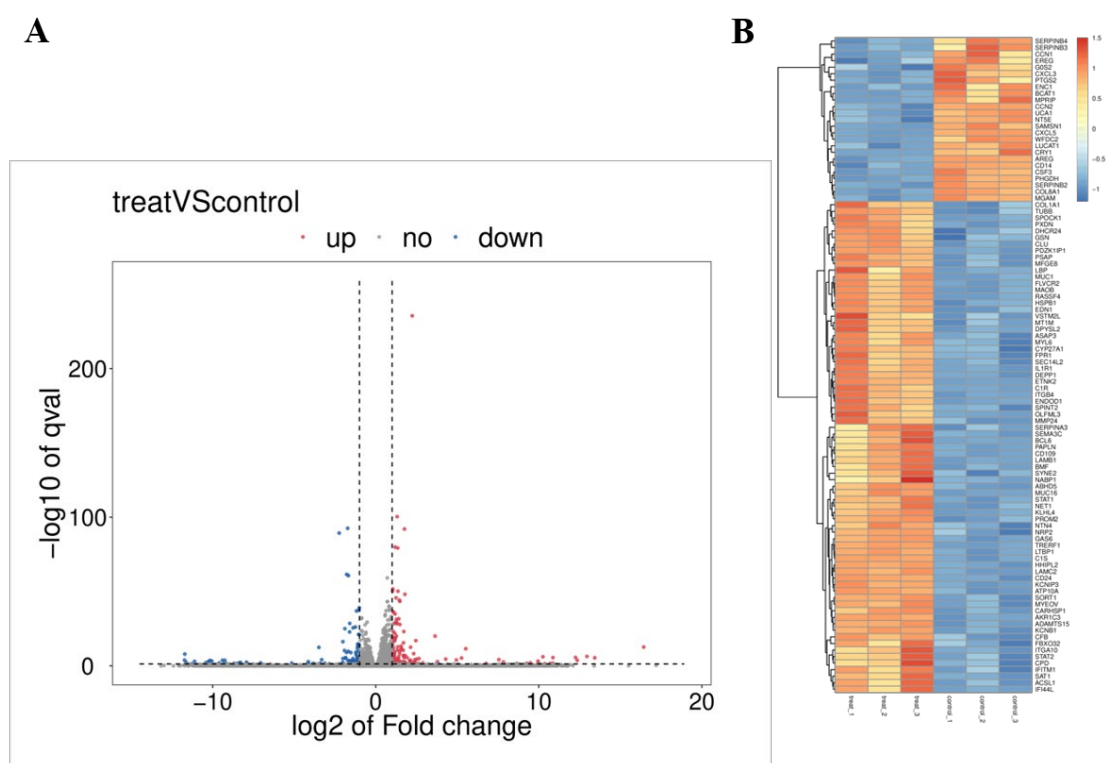


图 2-2 过表达 TRERF1 转录组测序差异基因分析

A.火山图提示一共筛选出 256 个显著差异表达基因, 其中上调基因 144 个, 下调基因 112 个。B. 热图, 红色表示高表达基因, 蓝色表示低表达基因, 横坐标为样本, 纵坐标为筛选出来的差异表达基因

Figure 2-2 Analysis of differential genes in transcriptome sequencing in TRERF1 overexpressing stable transgenic cells.

A. Compared with the NC group, a total of 256 significantly differentially expressed genes were screened out in the overexpression group, including 144 upregulated genes and 112 downregulated genes. B. Heat map, red represents high expression genes, blue represents low expression genes, horizontal axis represents samples, vertical axis represents screened differentially expressed genes

GO 功能富集结果提示，与 TRERF1 差异基因影响可以肿瘤细胞的生物学功能包括肿瘤细胞增殖、粘附、蛋白结合、细胞因子活性等。KEGG 通路富集分析结果表明，过表达 TRERF1 组的显著差异基因富集在 179 条信号通路上，其中差异具有统计学意义的有 26 条信号通路 ($p<0.05$)，其中与肿瘤发生发展相关主要包括影响肿瘤增殖、凋亡 (MAPK、PI3K-Akt、NF- κ B) 等信号通路 (图 2-3)，MAPK 信号通路差异显著性最强 ($p<0.01$)。

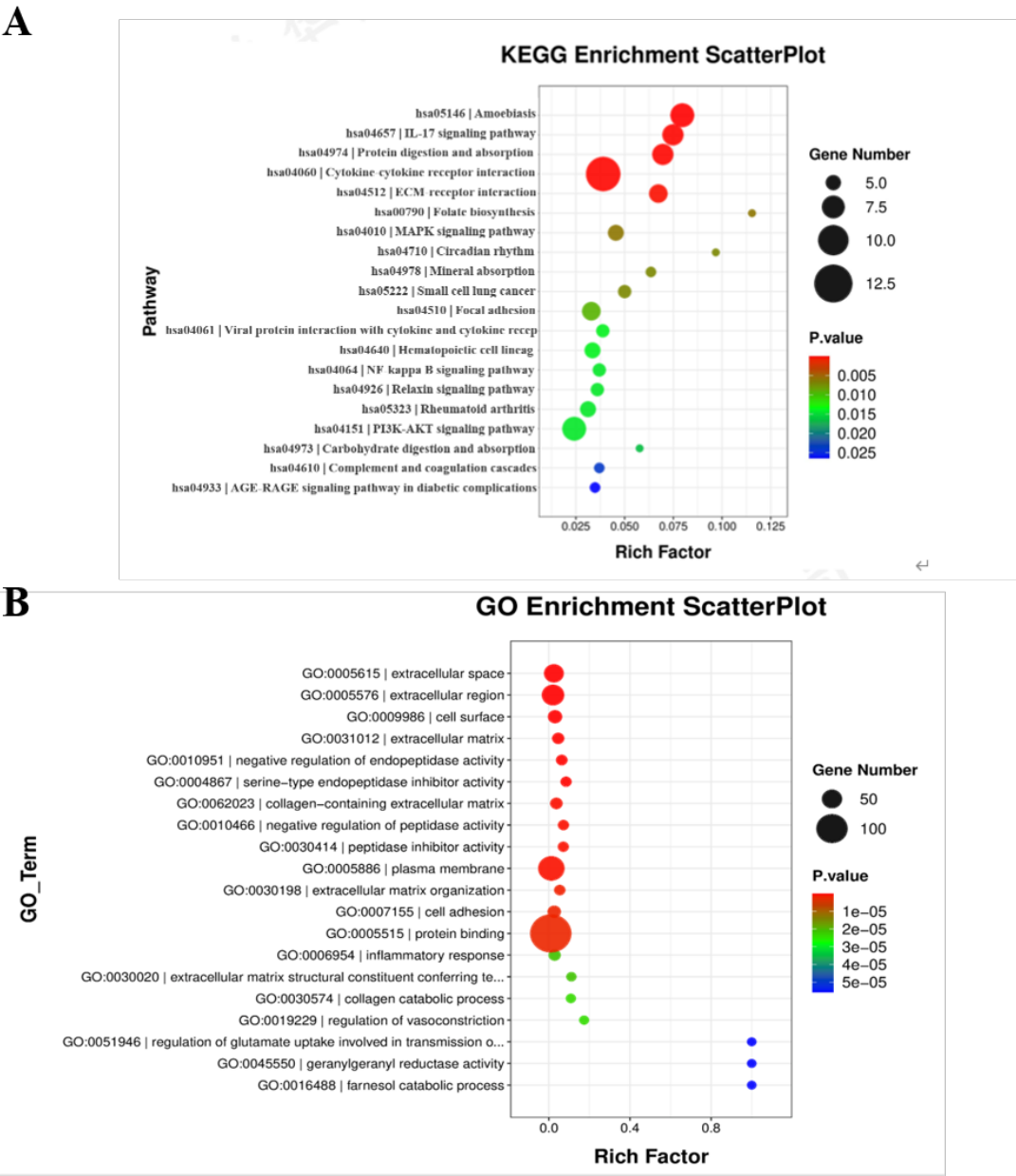


图 2-3 TRERF1 的 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集

Figure 2-3 Display of GO and KEGG enriched signaling pathways.

将差异基因与癌症相关通路通过韦恩分析，发现：

CXCL3 和 CXCL1 是 NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路、IL-17 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用的共有基因。

PTGS2 是 NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路、IL-17 信号通路 3 条通路共有基因。

CXCL5 是 MAPK 信号通路、IL-17 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用共有基因。

CSF3 是 IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用共有基因。

通过对上述结果的分析，筛选出 TRERF1 调控的共有基因 CXCL3、CXCL1、CXCL5、G-CSF3 作为候选靶基因进一步的研究验证。(图 2-4)。

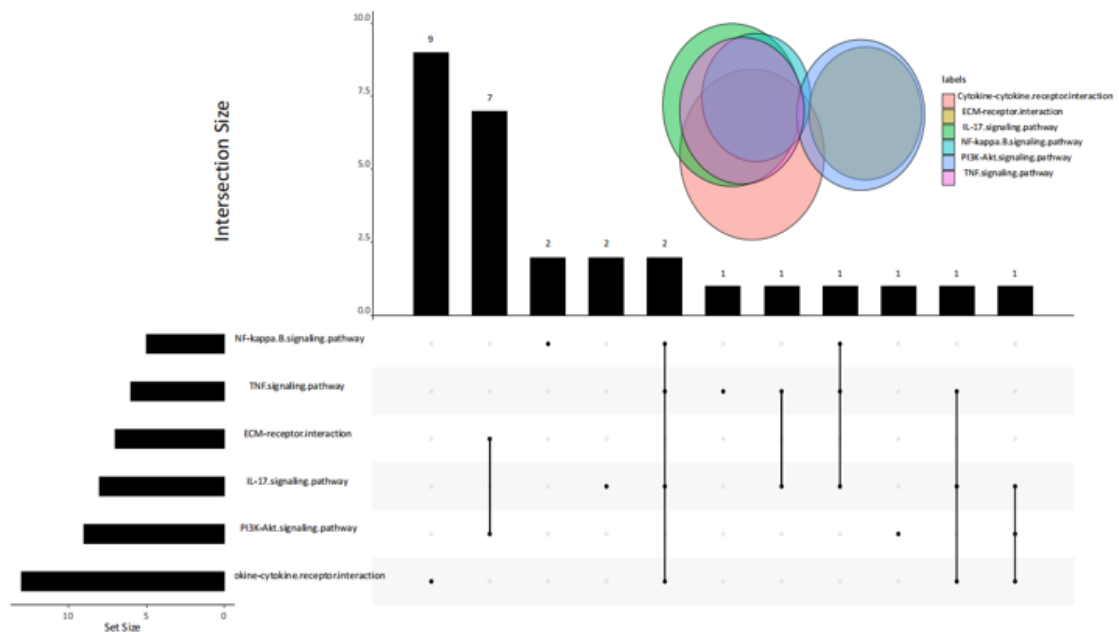


图 2-4 TRERF1 相互作用靶基因筛选

将与癌症相关 6 条通路中差异基因通过韦恩分析筛选出共有基因 CXCL3、CXCL1、CXCL5、G-CSF3。

Figures 2-4 Target genes for TRERF1 interaction Screening.

The differentially expressed genes in the six pathways related to cancer were screened for common genes CXCL3, CXCL1, CXCL5, and G-CSF3 through Wayne analysis.

1.2 qPCR 验证 TRERF1 对候选靶基因的调控关系

使用 H1734-Lv-TRERF1、H1734-sh-TRERF1-NC、H1975-Lv-TRERF1、H1975-Lv-TRERF1-NC 细胞,通过 qPCR 对验证 TRERF1 与 CXCL3、CXCL1、CXCL5、G-CSF3 的调控关系,结果发现 CXCL3 和 G-CSF3 与 TRERF1 mRNA 的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$),筛选出 CXCL3、G-CSF3 基因进一步的研究。(图 2-5)。

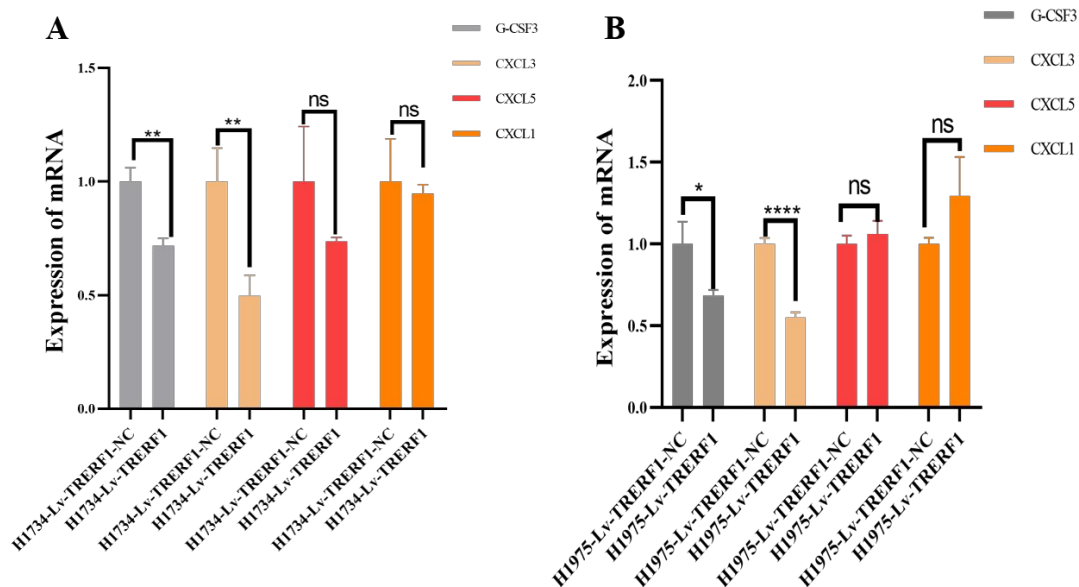


图 2-5 筛选与 TRERF1 mRNA 过表达后差异表达的基因

A. qPCR 检测过表达 TRERF1 后 H1734 肺腺癌细胞中 G-CSF3 mRNA、CXCL3 mRNA、CXCL5 mRNA、CXCL1 mRNA 表达水平的 WB 条带分析统计图; B. qPCR 检测过表达 TRERF1 后 H1975 肺腺癌细胞中 G-CSF3 mRNA、CXCL3 mRNA、CXCL5 mRNA、CXCL1 mRNA 表达水平的 WB 条带分析统计图;。t 检验, $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 、 $****P<0.0001$ 。

Figure 2-5 Screening for differentially expressed genes after overexpression of TRERF1 mRNA

A. Quantitative analysis of the expression of G-CSF3 mRNA, CXCL3 mRNA, CXCL5 mRNA, and CXCL1 mRNA in H1734 lung adenocarcinoma cells after qPCR detection of TRERF1 expression; B. Quantitative analysis Results of G-CSF3 mRNA, CXCL3 mRNA, CXCL5 mRNA, and CXCL1 mRNA expression levels in H1975 lung adenocarcinoma cells after qPCR detection of TRERF1 expression. t-test, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$.

1.3 筛选与 TRERF1 表达相关的靶基因

Western blot 检测 TRERF1 与 G-CSF3、CXCL3 在人肺腺癌和配对癌旁组织中的表达结果，Pearson 相关性分析结果提示，在肺腺癌组织中 G-CSF3 与 TRERF1 的相关性无统计学意义 ($P>0.05$)，CXCL3 的表达与 TRERF1 成负相关($r=-0.810$, $y=-0.519X+0.5434$)，差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2-6)，因此，筛选出 CXCL3 作为 TRERF1 靶基因进一步研究。

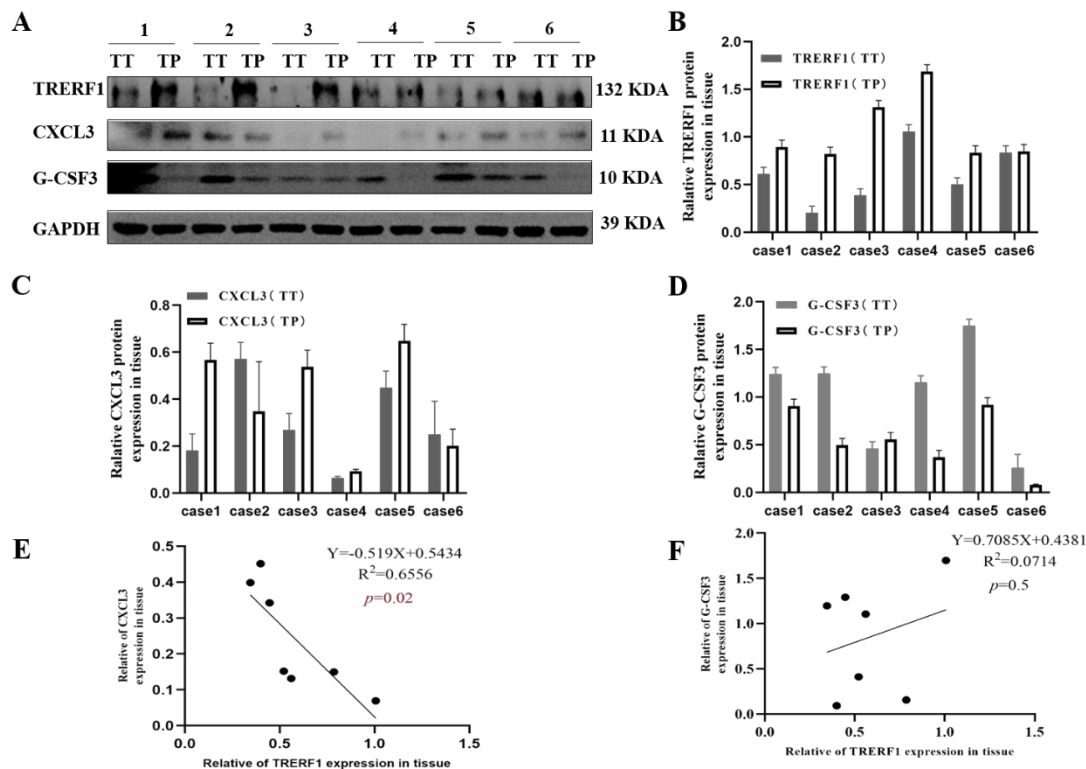


图 2-6 肺腺癌组织中 TRERF1、CXCL3、G-CSF3 的蛋白表达情况以及 TRERF1 与 G-CSF3、CXCL3 的表达相关性分析

A. TRERF1、G-CSF3 蛋白在肺腺癌和配对癌旁组织中 Western Blot 条带的图片；B. TRERF1 在癌和癌旁蛋白表达水平的 WB 条带分析统计图；C. CXCL3 在癌和癌旁蛋白表达水平的 WB 条带分析统计图；D. G-CSF3 在癌和癌旁蛋白表达水平的 WB 条带分析统计图；E 肺腺组织中 TRERF1 和 CXCL3 蛋白表达呈负向关， $P<0.05$ ；D. 肺腺组织中 TRERF1 和 G-CSF3 蛋白表达呈负向关比较无相关性 ($P=0.5$)。

Figure 2-6. Analysis of protein expression of TRERF1, CXCL3, and G-CSF3 in lung adenocarcinoma tissue, as well as the correlation between TRERF1 and G-CSF3 and CXCL3 expression.

A. Representative images of Western Blot bands of TRERF1 and G-CSF3 proteins in lung adenocarcinoma and paired adjacent tissues; B. Quantitative analysis Results of TRERF1 protein expression levels in cancer and adjacent tissues; C. Quantitative analysis Results of CXCL3 expression levels in cancer and adjacent proteins; D.

Quantitative analysis Results of G-CSF3 protein expression levels in cancer and adjacent tissues; The expression of TRERF1 and CXCL3 proteins in E lung gland tissue showed a negative correlation, $P<0.05$; D. The expression of TRERF1 and G-CSF3 proteins in lung gland tissue showed a negative correlation and no correlation ($P=0.5$).

2. TREFR1 对 CXCL3 表达调控的影响

2.1 在肺腺癌细胞中 TREFR1 对 CXCL3 表达调控的影响

Western blot 检测敲除和过表达 TRERF1 的 H1975 和 H1734 稳转株细胞中 CXCL3 的蛋白表达，结果提示，敲除 TRERF1 提高了 CXCL3 蛋白表达水平，差异具有显著性 ($P<0.01$) 过表达 TRERF1 抑制了 CXCL3 的表达水平，提示 TRERF1 可以负向调控 CXCL3 的表达，差异具有显著性 ($P<0.01$) (图 2-7)。

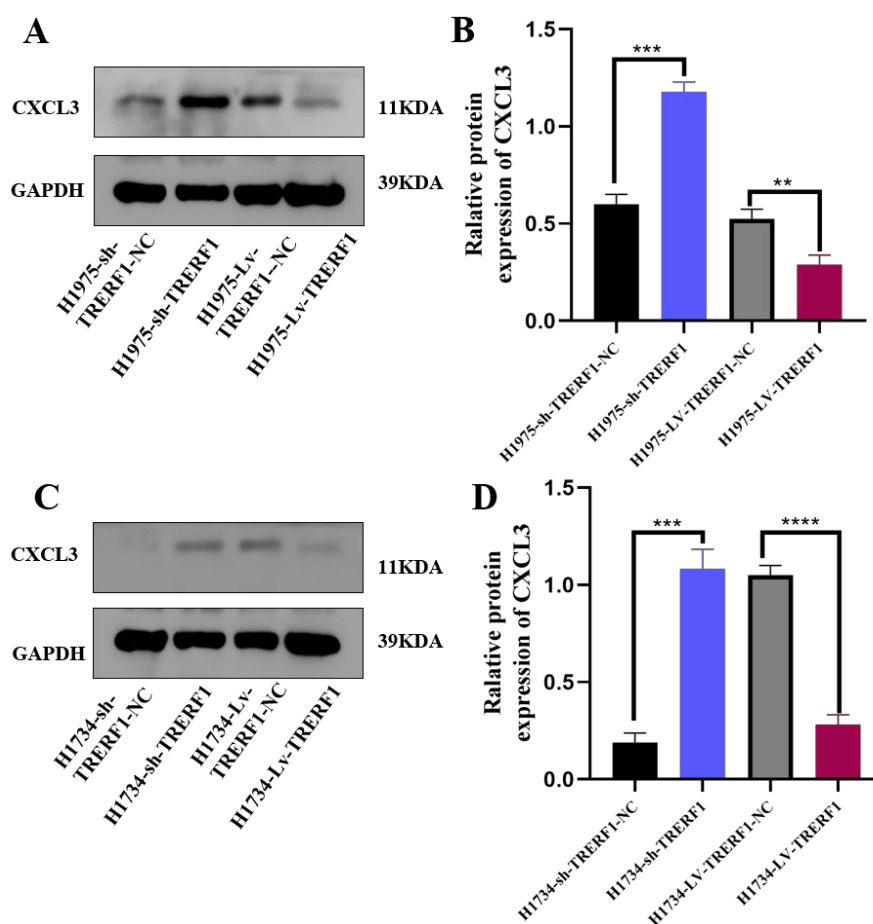


图 2-7 TRERF1 抑制 CXCL3 蛋白水平的表达

A. CXCL3 在 TRERF1 敲除和过表达 H1975 细胞中 Western Blot 条带的图片；B CXCL3 在 TRERF1 敲除和过表达 H1975 细胞中的 WB 条带分析统计图；C. CXCL3 在 TRERF1 敲除和过表达 H1734 细胞中 Western Blot 条带的图片 D. CXCL3 在 TRERF1 敲除和过表达 H1734 细胞中的 WB 条带分析统计图，t 检验，

** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

Figure 2-7 TRERF1 can inhibit the expression of CXCL3 protein level.

A. Representative images of Western Blot bands of CXCL3 in TRERF1 knockout and overexpression of H1975 cells; Quantitative analysis Results of B CXCL3 in TRERF1 knockout and overexpression H1975 cells; C. image of Western Blot bands of CXCL3 in TRERF1 knockout and overexpression of H1734 cells Quantitative analysis Results of CXCL3 in TRERF1 knockout and overexpression H1734 cells, t-test, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$.

2.2 TRERF1 在裸鼠皮下移植瘤组织中对 CXCL3 蛋白表达水平的影响

裸鼠皮下移植瘤组织的免疫组化IHC结果显示，CXCL3蛋白在TRERF1过表达组裸鼠皮下移植瘤组织中的表达水平降低，结果表明，TRERF1能抑制CXCL3蛋白表达，差异具有显著性（ $P < 0.01$ ）（图2-8）。

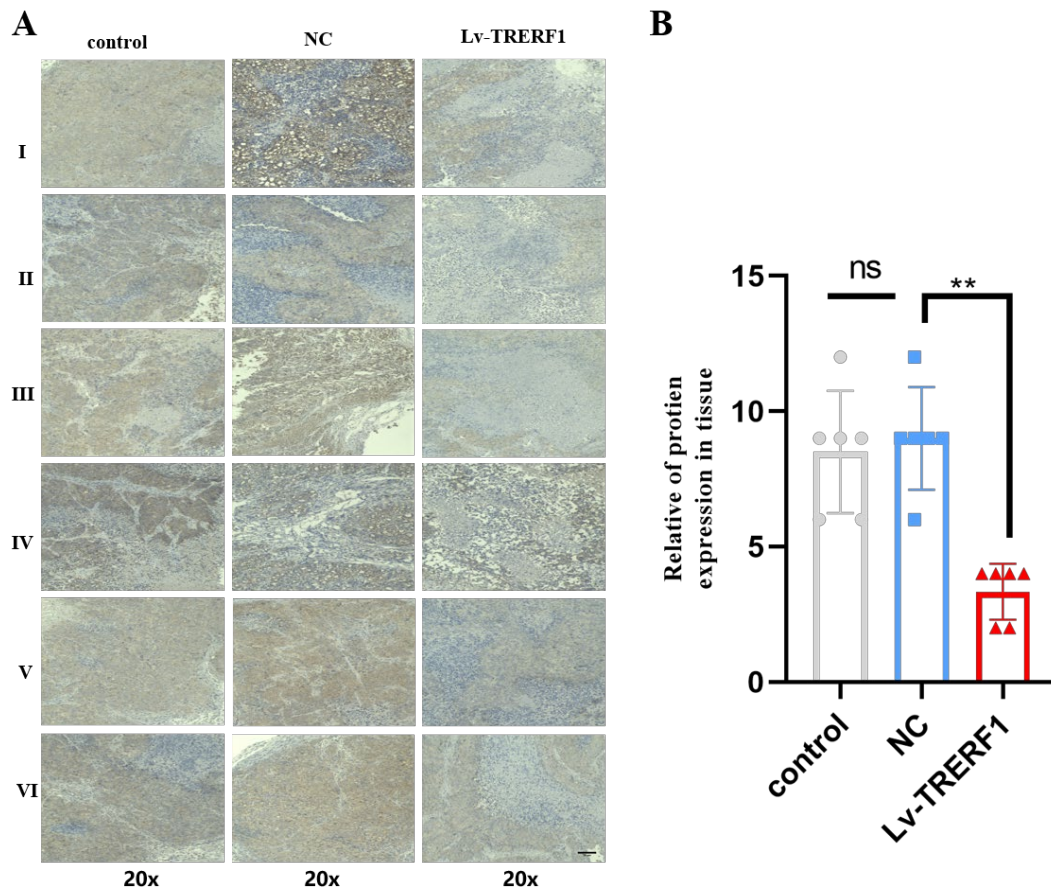


图 2-8 CXCL3 在过表达 TRERF1 的裸鼠皮下移植瘤组织中的蛋白表达水平

A. CXCL3 蛋白在空白对照组、空载体对照组、实验组中 IHC 染色的图片。B. TRERF1 过表达组皮下移植瘤组织中 CXCL3 蛋白表达水平低于对照组，非参数秩和检验，** $P < 0.01$

Figure 2-8 The protein expression level of CXCL3 in subcutaneous transplanted tumor tissue of nude mice overexpressing TRERF1.

A. Images of CXCL3 protein stained with IHC in blank control group, empty vector control group, and experimental group. B. CXCL3 protein expression in TRERF1 overexpression subcutaneous transplant tumor tissue was lower than that of the control group, non parametric rank sum test, * * $P<0.01$

3. TRERF1 对 CXCL3 的调控机制

3.1TRER1 对 CXCL3 启动子的影响

通过 qPCR 检测 CHIP 实验结果提示：在 TRERF1 抗体中检测到的 CXCL3 启动子富集水平与对照组相比无统计学差异 ($p>0.05$)，说明 TRERF 1 抗体不能富集到 CXCL3 的启动子，提示 TRERF1 与 CXCL3 的启动子没有结合作用。（图 2-9）

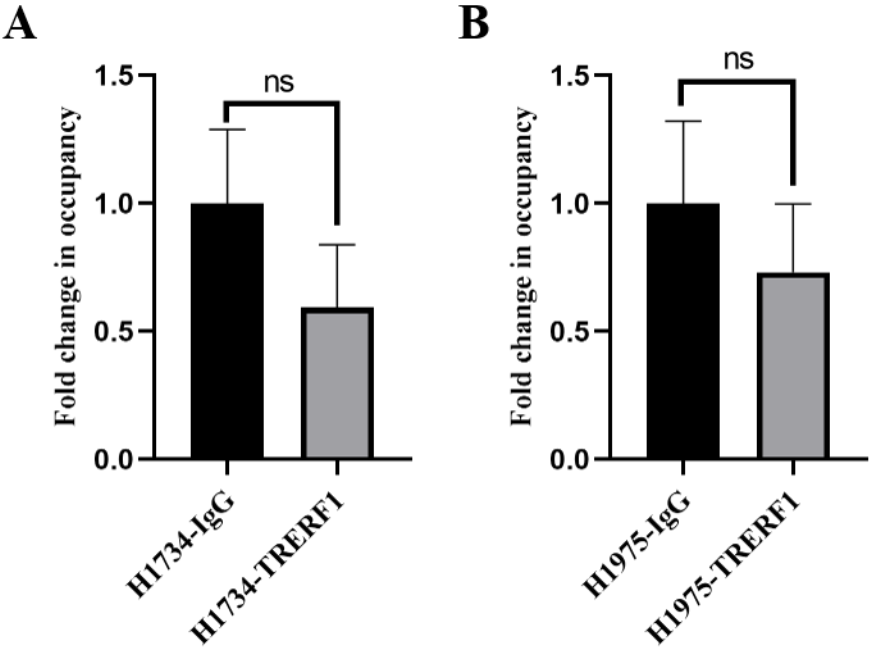


图 2-9 CHIP 检测 TRERF1 抗体的 qPCR 结果图

A.在 H1975 细胞中 TRERF1 抗体在 CXCL3 启动子富集水平柱状图；B. 在 H1734 细胞中 TRERF1 抗体在 CXCL3 启动子富集水平柱状图。t 检验, ns 表示 $p>0.05$ 。

Figure 2-9 qPCR Results of CHIP detection of TRERF1 antibody.

A. Histogram of TRERF1 antibody enrichment levels in CXCL3 promoter in H1975 cells; B. Bar chart of TRERF1 antibody enrichment in CXCL3 promoter in H1734 cells. T-test, ns represents $p>0.05$.

3.2 TRERF1 对 CXCL3 mRNA 稳定性的影响

放线菌素 D（Actinomycin D）实验结果提示，放线菌素 D 处理 TRERF1 过

表达的 H1734 细胞后，在 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 各时间点，CXCL3 mRNA 的残余百分比显著低于对照组 ($p<0.01$)，放线菌素 D 处理 TRERF1 过表达的 H1975 细胞后，在 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 各时间点，CXCL3 mRNA 的残余百分比显著低于对照组，提示 TRERF1 影响了 CXCL3 mRNA 的稳定性，加速了 CXCL3 mRNA 的降解 ($p<0.01$)。(图 2-10)

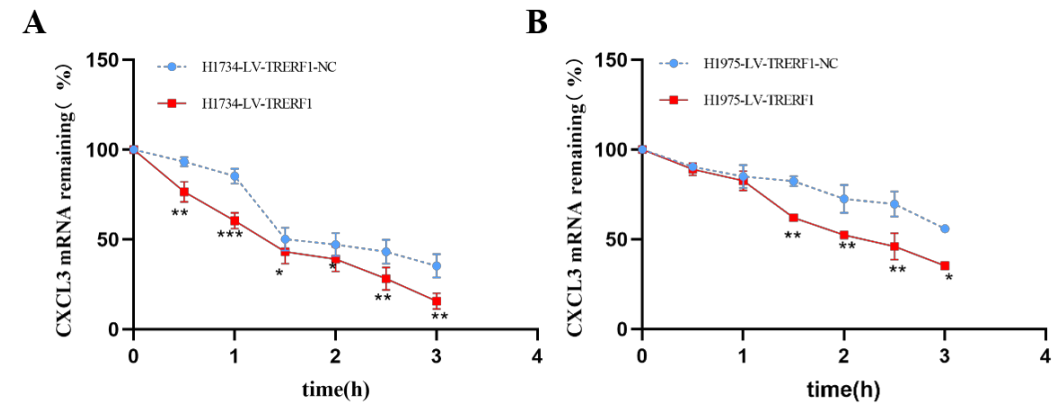


图 2-10 TRERF1 加速 CXCL3mRNA 的降解

A. qPCR 检测在 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 时间点，经放线菌素 D 处理的 TRERF1 过表达的 H1734 细胞中 CXCL3mRNA 表达水平。B. qPCR 检测在 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 时间点，经放线菌素 D 处理的 TRERF1 过表达的 H1734 细胞中 CXCL3mRNA 表达水平，多因素方差分析，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

Figure 2-10 TRERF1 accelerates the degradation of CXCL3mRNA.

A. QPCR was used to detect the expression level of CXCL3mRNA in H1734 cells overexpressing TRERF1 treated with actinomycin D at time points of 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, and 3h. B. QPCR was used to detect the expression level of CXCL3mRNA in H1734 cells overexpressing TRERF1 treated with actinomycin D at time points of 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, and 3h. Multivariate analysis of variance showed * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

4. 构建 CXCL3 过表达质粒

Western blot 结果提示，与对照组相比，转染 CXCL3 过表达质粒后，成功过表达 H1975 和 H1734 中的 CXCL3，差异具有显著性 ($P<0.01$)。以上结果提示 CXCL3 过表达质粒构建成功。(图 2-11)

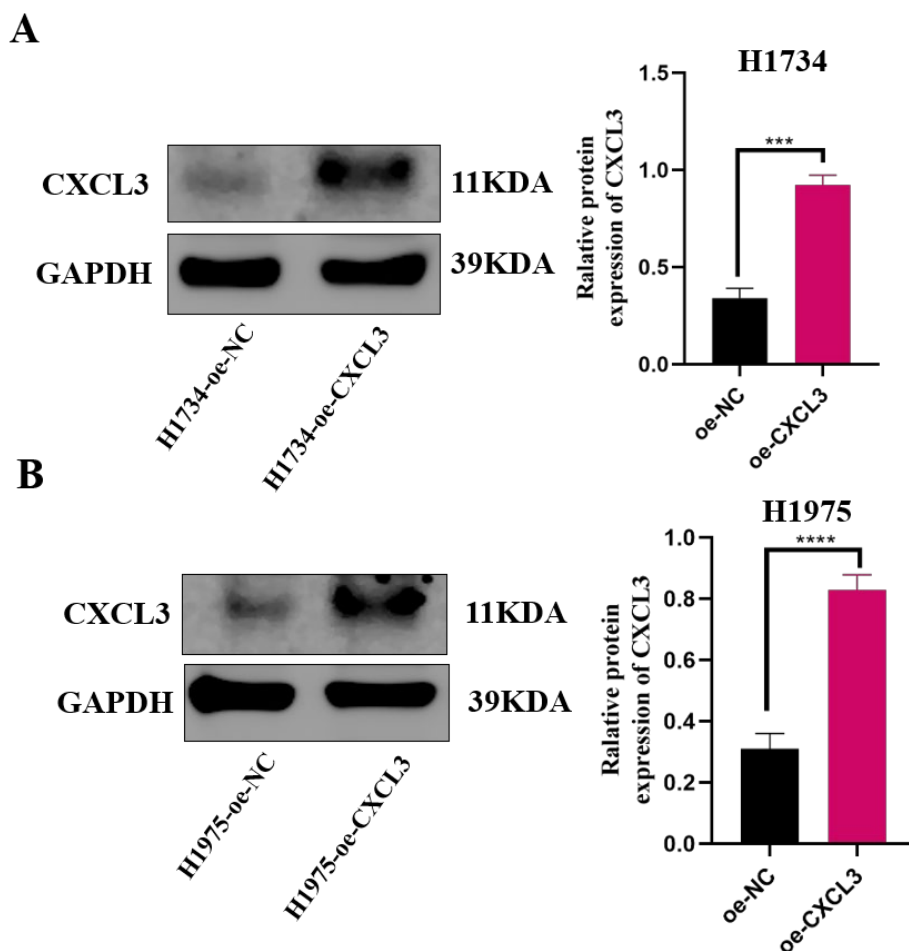


图 2-11 在 H1734 和 H1975 中成功过表达 CXCL3

A. CXCL3 在 H1734 细胞中的图片和 WB 条带分析统计图, t 检验** $P<0.001$; B CXCL3 在 H1975 细胞中的图片和 WB 条带分析统计图, t 检验 **** $P<0.0001$ 。

Figure 2-11 successfully overexpressed CXCL3 in H1734 and H1975.

A. Representative images and quantitative analysis Results of CXCL3 in H1734 cells, t-test ** $P<0.001$;

Representative images and quantitative analysis Results of B CXCL3 in H1975 cells, t-test **** $P<0.001$.

5. TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞增殖的影响

5.1 CCK8 检测 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞增殖的影响

CCK8 细胞增殖实验结果可见, 在 H1975、H1734 细胞中, 过表达 TRERF1 细胞增殖数量显著降低, 在 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与仅过表达 TRERF1 相比, 减弱了抑制细胞增殖数量 (图 2-12)。CCK8 细胞增殖实验回复实验结果提示 CXCL3 可以部分回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用。

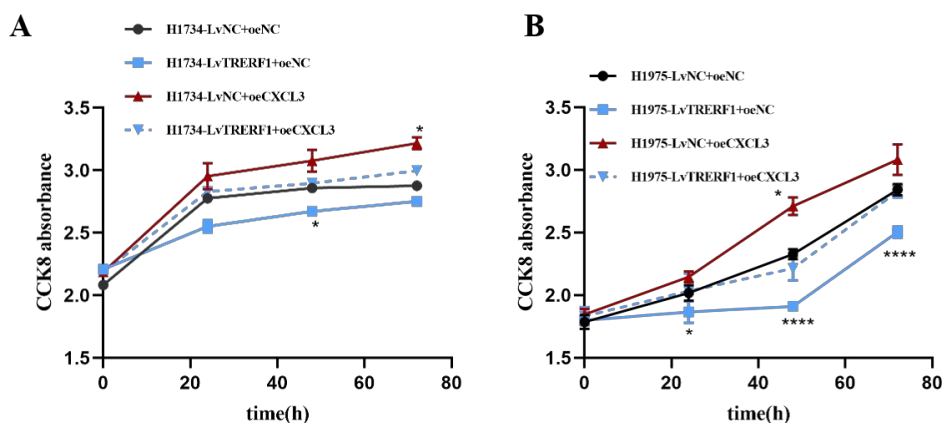


图 2-12 CXCL3 可以回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用

A.同时过表达 TRERF1 和 CXCL3，减弱了 TRERF1 对 H1975 细胞增殖的抑制作用；B. 在 H1975 细胞中，通过 CCK8 实验检测同时过表达 TRERF1 和 CXCL3，减弱了 TRERF1 对细胞增殖的抑制作用. t 检验， $*P<0.05$, $****P<0.0001$ 。

Figure 2-12 CXCL3 can partially rescued the inhibitory effect of TRERF1 on the proliferation in H1975 and H1734 cells.

A. In H1975 cells, overexpression of TRERF1 and CXCL3 was detected through CCK8 assay, which weakened the inhibitory effect of TRERF1 on cell proliferation; B. In H1975 cells, simultaneous overexpression of TRERF1 and CXCL3 was detected through CCK8 assay, which weakened the inhibitory effect of TRERF1 on cell proliferation; T-test, $*P<0.05$, $***P<0.001$.

5.2 平板克隆形成实验检测 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞增殖的影响

平板克隆形成实验结果可见，在 H1975、H1734 细胞中，过表达 TRERF1 细胞增殖数量显著降低，在 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与仅过表达 TRERF1 相比，减弱了 TRERF1 对细胞增殖抑制的能力（图 2-13）。说明 CXCL3 可以部分回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用。

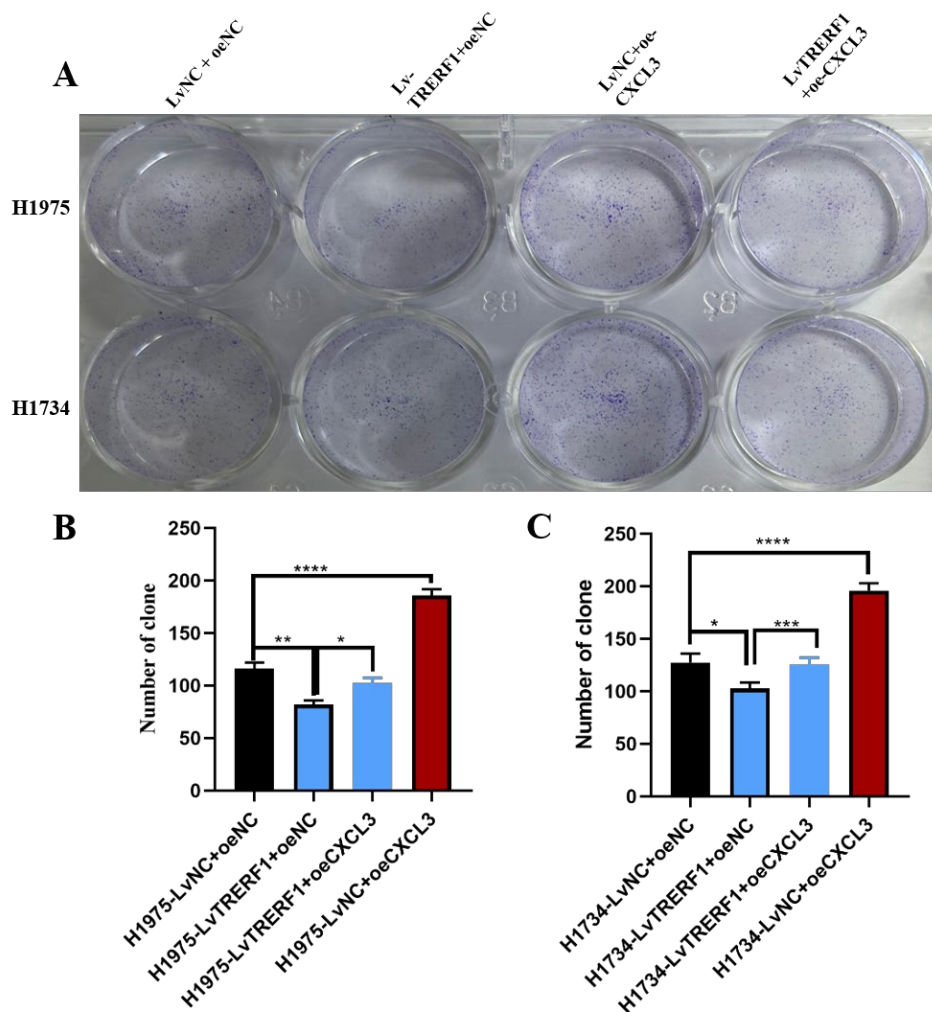


图 2-13 CXCL3 可以回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用

A. CXCL3 可以回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用的平板克隆形成结果图；B. 在 H1975 细胞中，通过 CCK8 实验检测，CXCL3 可以回复 TRERF1 对细胞增殖的抑制作用；t 检验，* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.0001$ 。

Figure 2-13 CXCL3 can partially rescued the inhibitory effect of TRERF1 on the proliferation in H1975 and H1734 cells.

A. The plate clone formation results of CXCL3 restore the inhibitory effect of TRERF1 on the proliferation of H1975 and H1734 cells; B. In H1975 cells, CXCL3 can restore the inhibitory effect of TRERF1 on cell proliferation as detected by CCK8 assay; T-test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

5.3 EDU 实验检测 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞增殖的影响

EDU 实验结果可见，在 H1975、H1734 细胞中，过表达 TRERF1 细胞增殖数量显著降低，在 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与仅过表达

TRERF1 相比，TRERF1 对细胞的增殖抑制作用减弱（图 2-14）。提示 CXCL3 可以部分回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用。

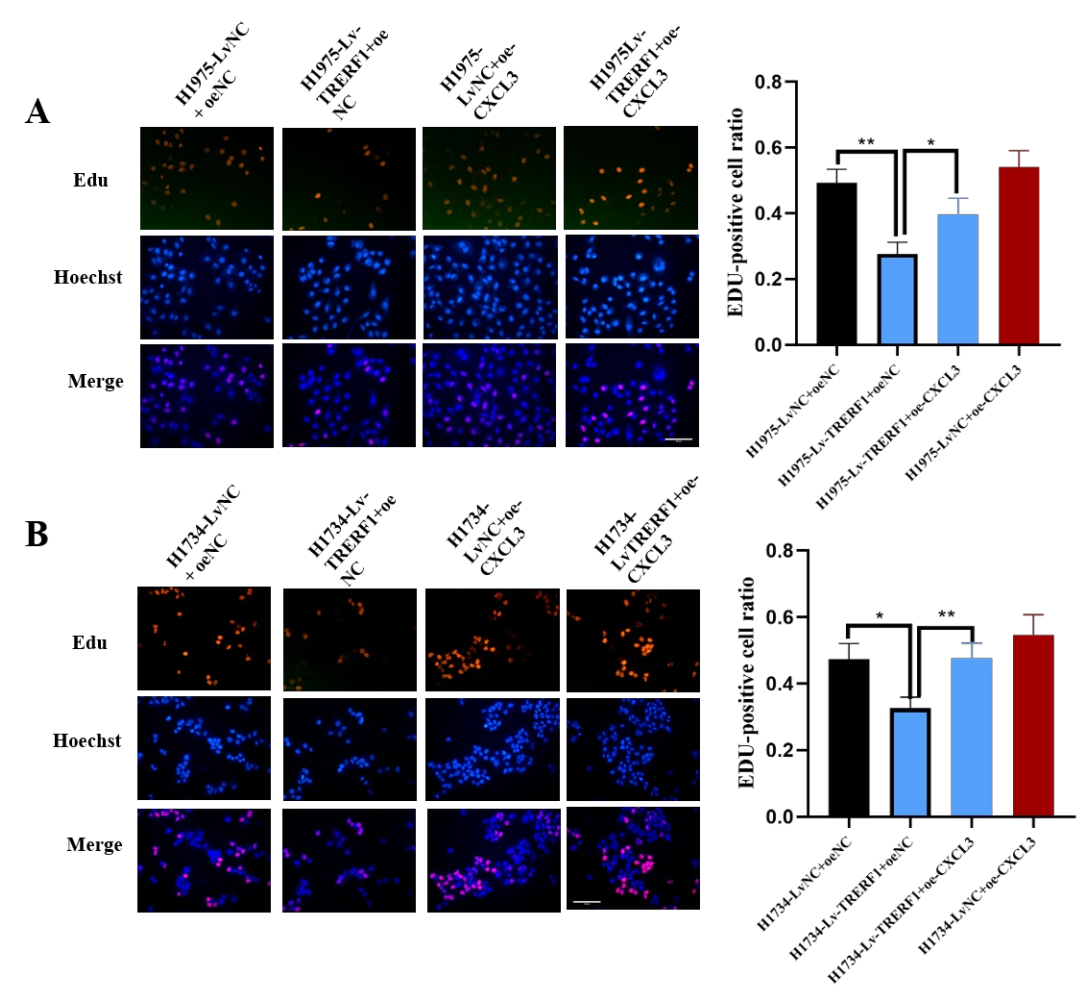


图 2-14 CXCL3 可以回复 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用

A.在 H1975 细胞中,通过 EDU 实验检测在实验组和对照组中的细胞增殖数量；B. 在 H1734 细胞中,通过 EDU 实验检测在实验组和对照组中细胞增殖数量。

Figure 2-14 CXCL3 can partially rescued the inhibitory effect of TRERF1 on the proliferation in H1975 and H1734 cells.

A. In H1975 cells, the number of cell proliferation in the experimental group and control group was detected through EDU assay; B. In H1734 cells, the number of cell proliferation in the experimental group and control group was detected through EDU assay.

6. TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞凋亡的影响

6.1 TUNNEL 实验检测 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞凋亡的影响

TUNEL 凋亡检测实验结果可见，在 H1975、H1734 细胞中，过表达 TRERF1 可以促进肺腺癌细胞的凋亡，在 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与仅过表达 TRERF1 相比，减弱了细胞的凋亡数量（图 2-15）。以上结果表明 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞凋亡的促进作用能部分被 CXCL3 回复。

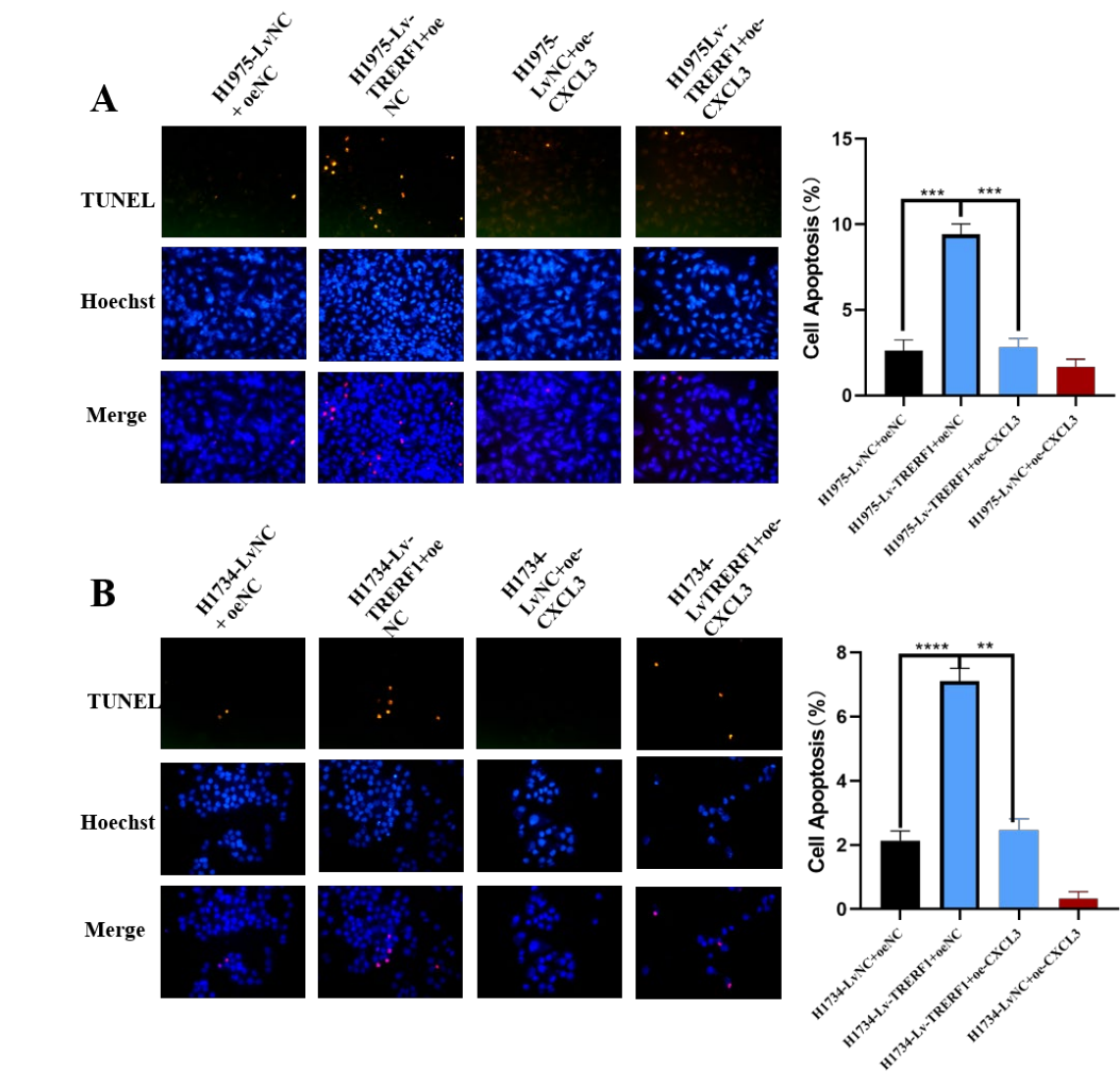


图 2-15 CXCL3 对 H1975、H1734 细胞凋亡的促进作用能部分被 CXCL3 回复

A.在 H1975 细胞中,通过 TUNEL 凋亡检测在实验组和对照组中细胞凋亡数量; B. 在 H1975 细胞中,通过 CCK8 实验检测在在实验组和对照组中细胞凋亡数量; t 检验, * $P<0.05$ 、* $P<0.01$ 、**** $P<0.0001$ 。

Figure 2-15 The promoting effect of CXCL3 on apoptosis of H1975 and H1734 cells can be partially rescued by CXCL3.

A. In H1975 cells, the number of apoptotic cells in the experimental group and control group was detected by

TUNEL apoptosis detection; B. In H1975 cells, the number of apoptotic cells in the experimental group and control group was detected through CCK8 assay; T-test, * $P < 0.05$, * $P < 0.01$, * * * * $P < 0.001$.

6.2 检测 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞凋亡相关蛋白的影响

Western blot 检测与凋亡相关的关键蛋白 BAX、BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 结果可见，在 H1975、H1734 细胞中，过表达 TRERF1 可以促进促凋亡相关蛋白的表达，在 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与仅过表达 TRERF1 相比，减弱了促凋亡相关蛋白的表达（图 2-16）。以上结果表明 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞凋亡的促进作用能部分被 CXCL3 回复。

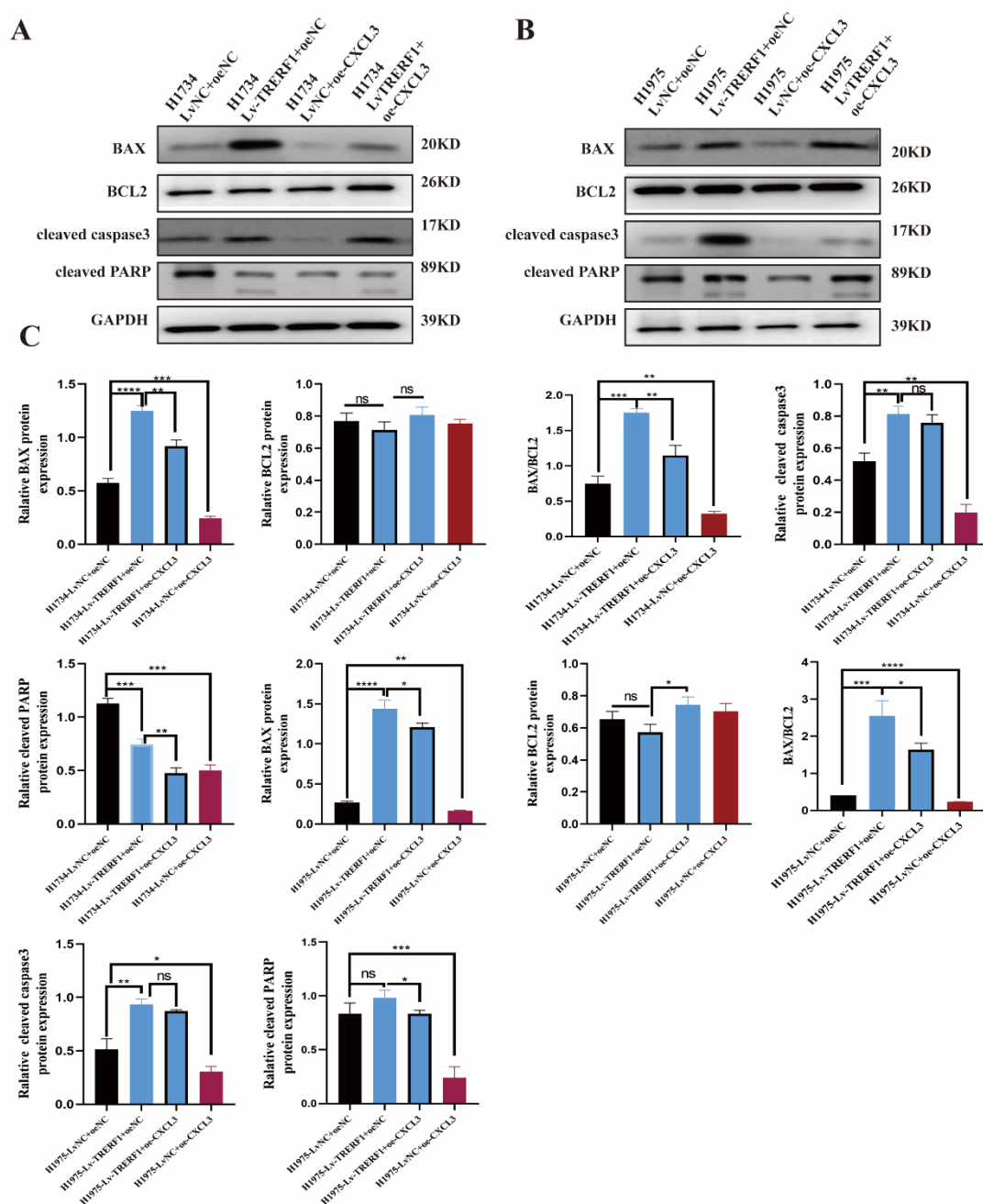


图 2-16 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞凋亡的促进作用能部分被 CXCL3 回复

A. BAX、BCL2、BAX/BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 在 H1734 对照组和不同实验组细胞中 Western Blot 条带的图片及 WB 条带分析统计图; B. BAX、BCL2、BAX/BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 在 H1975 对照组和不同实验组细胞中 Western Blot 条带的图片及 WB 条带分析统计图; C. BAX、BCL2、BAX/BCL2、cleaved caspase3、cleaved PARP 在 H1734、H1975 对照组和不同实验组细胞中 Western Blot 条带分析统计图, t 检验, $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 、 $****P<0.0001$ 。

Figure 2-16 The promoting effect of TRERF1 on apoptosis of H1975 and H1734 cells can be partially rescued by CXCL3.

A. Western Blot bands Images of BAX, BCL2, BAX/BCL2, cleaved caspase3, cleaved PARP in H1734 control group and different experimental groups of cells; B. Western Blot bands Images of BAX, BCL2, BAX/BCL2, cleaved caspase3, cleaved PARP in H1975 control group and different experimental groups of cells, C. quantitative analysis Results of Western Blot bands on BAX, BCL2, BAX/BCL2, cleaved caspase3, cleaved PARP in H1734 and H1975 control group and different experimental groups of cells $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 、 $****P<0.0001$.

7. TRERF1 调控 CXCL3 对 ERK 信号通路的影响

过表达 TRERF1 后, H1975 和 H1734 细胞中 pERK1/2 蛋白水平表达降低, 当 TRERF1 过表达基础上再过表达 CXCL3 与过表达 TRERF1 相比, pERK1/2 蛋白表达增加, (图 2-17)。提示 TRERF1 抑制 pERK1/2 蛋白水平的表达, CXCL3 部分回复了 TRERF1 对 pERK1/2 的抑制作用。

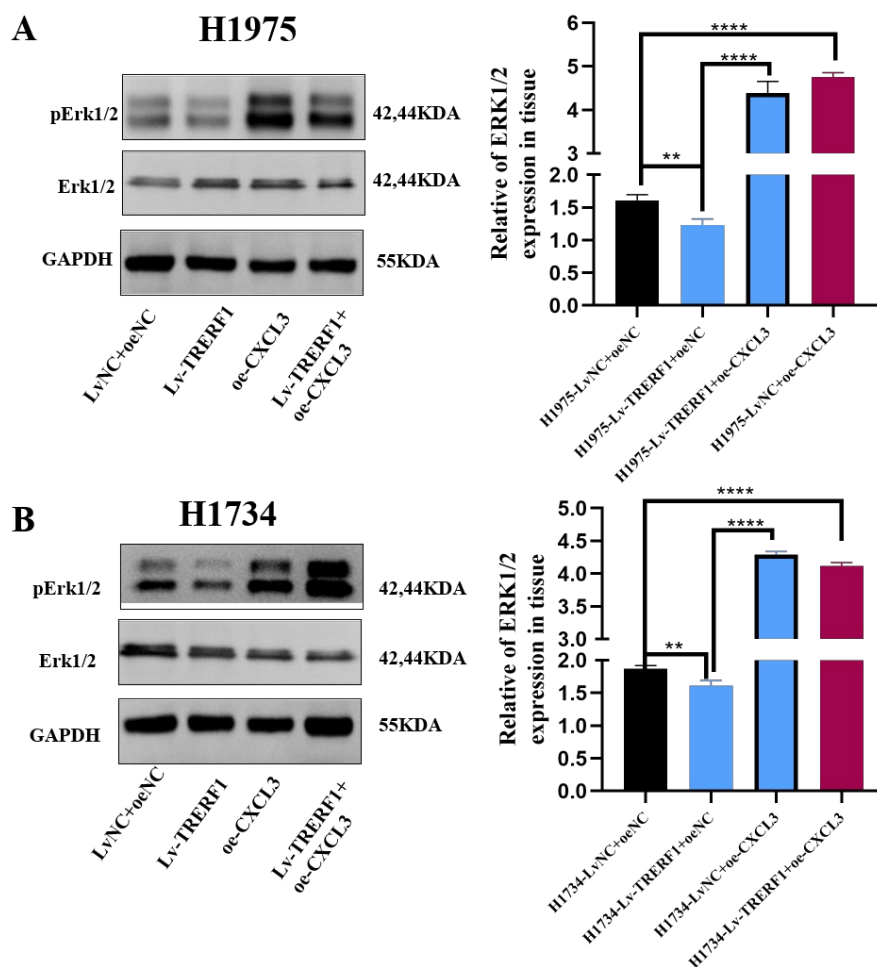


图 2-17 TRERF1 对 ERK1/2 的抑制作用能部分被 CXCL3 回复

A. pERK/2 在 H1975 对照组和不同实验组细胞中 Western Blot 条带的图片及 WB 条带分析统计图; B.

pERK/2 在 H1734 对照组和不同实验组的细胞中过 Western Blot 条带的图片及 WB 条带分析统计图。t 检验, ** $P<0.01$ 、**** $P<0.0001$ 。

Figure 2-17 the inhibitory effect of TRERF1 on ERK1/2 can be partially rescued by CXCL3.

A. Representative images and quantitative analysis Results of Western Blot bands of pERK/2 in cells of H1975

control group and different experimental groups; B. Representative images and quantitative analysis Results of

Western blot bands of pERK/2 in H1734 cells of the control group and different experimental groups. T-test, **

$P<0.01$, *** $P<0.001$.

讨 论

TRERF1通过影响细胞周期抑制乳腺癌细胞的增殖能力既往已经被研究报道,提示其可能在恶性肿瘤中具有一定作用,但其在肺癌生物学功能的机制还未见报道。在上一部分研究中,我们通过体外和体内实验发现,TRERF1可以抑制肺腺癌细胞的生物学功能,为了从基因调控水平进一步探究TRERF1影响肺腺癌的作用机制,本部分选取生长状态更优的过表达TRERF1的H1975细胞株,将实验组和对照组每组3个重复细胞样本进行转录组测序及生信分析,将富集在癌症相关通路上的基因,通过韦恩分析筛选出TRERF1负向调控的候选靶基因,分别为: CXCL3、CXCL1、CXCL5、G-CSF3。相关研究提示^[44-47],趋化因子家族的CXCL3、CXCL1、CXCL5均可以促进肿瘤的进展,这与我们在表型实验中TRERF1可以抑制肺腺癌细胞恶性生物学行为的结论一致。此外,GO功能富集和KEGG通路富集提示TRERF1可以影响细胞的增殖和凋亡作用,在与肿瘤增殖和凋亡相关的通路MAPK、PI3K-Akt、NF- κ B中,MAPK信号通路在KEGG通路富集中差异显著性最大,提示MAPK可能是TRERF1调控CXCL3潜在的信号通路。通过qPCR从mRNA层面进一步研究TRERF1与靶基因的表达差异性,并检测7对肺腺癌组织和癌旁癌旁组织中TRERF1和候选靶基因的表达,基于Person相关性分析,最终筛选出在肺腺癌细胞中与TRERF1的表达水平有负相关趋势的分子CXCL3。

CXCL3 是一种单链蛋白,由位于 4q21 染色体区域的人类生长相关癌基因(GRO)编码^[48],GRO 具有趋化 CXC 趋化因子的亚家族的功能,包括三种趋化因子 GRO α (CXCL1)、GRO β (CXCL2) 和 GRO γ (CXCL3) 组成^[49]。CXCL3 可以在白细胞、内皮细胞和上皮细胞中表达,既往研究发现,绝大多数趋化因子,包括 CXCL3 可以作为感染和炎症的介质,触发免疫细胞类型从外周血向组织的定向迁移^[50]。趋化因子在氨基末端区域附近的结构半胱氨酸残基方面包含四个同源亚家族(即 CXC、CC、CX3C 和 C)。CXCL3 是一种中性粒细胞活化趋化因子。CXCL3 主要在巨噬细胞、中性粒细胞中表达,参与机体炎症反应和血管生成^[51,52]。但近年许多研究也发现 CXCL3 也可以参与恶性肿瘤的进展^[53],可能是恶性肿瘤中的促癌因子。本研究通过转录组测序,筛选了 CXCL3 可能是 TRERF1 靶基因,为进一步探讨 TRERF1 调控 CXCL3 对肺腺癌细胞生物学功能

的影响,我们率先在 TRERF1 敲除和过表达的 H1975、H1734 细胞中,利用 western blot 正反验证了 TRERF1 的确可以负向调控 CXCL3。从组织水平,利用动物实验中移植瘤组织,通过对过表达 TRERF1 细胞的成瘤组织行免疫组织化学染色结果发现, CXCL3 在过表达 TRERF1 的裸鼠皮下移植瘤组织中蛋白水平的表达降低。结果显示 TRERF1 抑制 CXCL3 蛋白水平的表达,与细胞水平结果一致,进一步说明了 TRERF1 可能抑制 CXCL3 蛋白表达。考虑到 TRERF1 对肺腺癌细胞恶性生物学功能的抑制作用,在接下来的回复实验中构建了过表达 CXCL3 的质粒,并成功构建过表达 CXCL3 的 H1975、H1734 细胞,旨在通过回复实验研究 TRERF1 通过靶向 CXCL3 影响了肺腺癌细胞的增殖、和凋亡的肺腺癌的生物行为。

既往研究显示, CXCL3 与 G 蛋白偶联受体的相互作用,触发细胞中引发一系列信号转导^[54, 55], 并通过刺激生存信号通路来参与了癌症的发生和发展^[56]。研究发现^[52], 外源性给予 CXCL3 或过表达 CXCL3 可能促进前列腺癌细胞的恶性表型^[57, 58], 为进一步探索 TRERF1 抑制 CXCL3 蛋白表达水平参与肺腺癌增殖、凋亡的分子调控机制,我们设计了回复实验,在过表达 TRERF1 的基础上再过表达 CXCL3,观察 TRERF1 对细胞增殖、凋亡的影响是否可以被挽救,CCK8、EDU、平板克隆形成实验结果显示, TRERF1 对 H1975、H1734 细胞增殖的抑制作用可以部分被 CXCL3 回复, TUNNEL、凋亡相关蛋白检测结果提示 TRERF1 对 H1975、H1734 细胞凋亡的促进作用可以部分被 CXCL3 回复。在本研究中, TRERF1 的蛋白表达上调,抑制了 CXCL3 的蛋白表达,从而抑制了肺腺癌细胞的增殖,促进了肺腺癌细胞的凋亡,当加入 CXCL3 过表达质粒,提升 CXCL3 的蛋白表达后,挽救了 TRERF1 的肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响,说明 TRERF1 确实可以通过 CXCL3 影响肺腺癌的增殖和凋亡。MURPHY PM 等学者的研究提示, CXCL3 与配体结合,激活 ERK1/2 通路来调节趋化性和血管生成^[59]。齐^[52]等人在 CXCL3 过表达的 HeLa 细胞的研究中发现 ERK1/2、p-ERK1/2 和 Bcl-2 明显上调,而 Bax 明显下调,说明 CXCL3 的促癌作用可以由 ERK 信号通路抑制细胞的凋亡,而我们在 TRERF1 的生物学表型功能实验中也发现 TRERF1 过表达促进了肺腺癌细胞的凋亡,在回复实验中,结果提示, TRERF1 对 H1975、H1734 细胞凋亡的抑制作用可以部分被 CXCL3 回复,这与先前其他学者发现

CXCL3 可以抑制癌细胞凋亡的研究结果一致,说明 TRERF1 可以通过抑制 CXCL3 促进肺腺癌细胞的凋亡。基于 CXCL3 通过 ERK 信号通路调控肿瘤细胞恶性生物学行为的相关性报道以及本研究 KEGG 富集分析 MAPK 是潜在的信号通路以,推测 ERK 信号通路可能是 TRERF1 抑制 CXCL3 影响肺腺癌凋亡的潜在信号通路。

ERK 是细胞外信号调节激酶,其与 c-Jun N-末端激酶(JNK)和 p38MAP 激酶同属丝裂原活化蛋白(MAP)激酶,常因磷酸化激活后调节基因的转录参与控制各种细胞的增殖、分化和凋亡^[60, 61]。MAP 激酶途径在诱导细胞死亡和维持细胞存活中起着重要作用。ERK 可以作为细胞保护机制,对抗氧化应激、TNF- α 、生长因子和促凋亡药物引发的细胞凋亡^[62]。但现在越来越多的研究发现,ERK 作为一种关键的肿瘤相关基因在细胞凋亡诱导激酶发挥作用^[63-66]。细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种方式,其过程受细胞凋亡相关基因家族的严格调控,其中 Bcl-2 家族是机体调控凋亡的内在途径,其活性可以控制线粒体膜完整性,并在细胞凋亡中发挥着关键作用。BCL2 家族包括促凋亡基因和抗凋亡基因,促凋亡基因/抗凋亡基因的相对比例,特别是 BAX/BCL2,是细胞存活和死亡平衡的主要决定因素^[67]。此外,细胞凋亡还依赖于 caspases 和 nucleases 的通路控制激活,当促凋亡因子细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中, caspases-9 被激活,进而激活效应的 caspases。细胞凋亡外源途径依赖于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的激活,并通过衔接蛋白如 Fas 相关死亡结构域(FADD)或相关死亡结构区 TNFRSF1A (TRADD)促进启动子 caspases-8 的募集。相关研究发现,当 ERK 可以被外源的 DNA 损伤剂诱导激活参与细胞凋亡,如依托泊苷^[68-70]、阿霉素^[71, 72]、紫外线^[69]和伽马辐射^[73]。ERK 活性与顺铂介导的肾细胞凋亡特别相关^[74]。ERK 活性也参与了各种抗肿瘤化合物诱导的细胞死亡,如槲皮素^[75]、紫杉醇^[76]。Boucher 等人发现^[77], ERK 信号在肿瘤发展中可以控制 BCL2 基因及其家族基因 BAX 的功能和表达^[78, 79]。ERK1/2 活性的抑制可能导致人类胰腺癌症细胞中抗凋亡 BCL2 的下调和 BAX 的上调^[67, 80]。Cheng 等^[81]结果表明, CXCL3 过表达影响调节 BCL2、BAX/BCL2 和 Cyclin D1 表达的作用来影响增殖、存活和转移。本研究中,当过表达 TRERF1 后,我们观察到 pERK1/2 蛋白水平表达降低, BAX 蛋白水平表达升高, BAX/BCL2 比例升高。通过回复实验,在过表达 TRERF1 的

细胞中,再次过表达的CXCL3发现 TRERF1对 pERK1/2的抑制作用,以及BAX、casepase-3的促进作用均可以部分被CXCL3回复。同时,TRERF1对H1975、H1734凋亡的促进作用以及TRERF1对H1975、H1734细胞增殖的抑制作用也可以部分被CXCL3回复。由此可见,TRERF1可能通过抑制CXCL3蛋白表达水平并调节pERK1/2信号通路影响细胞凋亡。

综上所述, TRERF1在肺腺癌细胞凋亡中发挥重要作用,其机制可能是TRERF1靶向调控CXCL3蛋白表达水平,影响ERK信号通路,调节了细胞的凋亡。

结 论

TRERF1 可能通过影响 CXCL3 mRNA 的稳定性,抑制了 CXCL3 蛋白表达,并负向调控 ERK 信号通路中关键蛋白 ERK1/2 的表达,影响肺腺癌细胞的增殖和凋亡,提示 TRERF1 调控 CXCL3 作用与 ERK 信号通路可能是肺腺癌细胞增殖和凋亡的作用机制。

第三部分 TRERF1在肺腺癌中表达水平及与临床病理特征的关系和对预后的影响

肺癌作为全球癌症相关死亡率第一的恶性肿瘤，严重威胁人民生命健康。我国非吸烟女性肺腺癌发病率明显高于欧美地区，其中云南宣威是我国肺癌非吸烟女性肺腺癌发病率较高的地区，肺癌的流行态势最为严峻。该地区包括周边的云南省东北部、贵州西南部乌蒙山区，给当地居民造成了极大负担，严重影响了宣威以及周边地区的经济和社会发展。云南宣威非吸烟女性肺腺癌的基因谱不仅与燃煤暴露密切相关，对吸烟诱发肺癌引起的基因突变也具有相似性。以其基因组学特点为研究模型，寻找新的诊断和预后生物标志物，对治疗该类人群肺腺癌的潜在靶点有重要的意义。

在第一、二部分的研究结果发现 TRERF1 调控 CXCL3 的表达，作用于 ERK 信号通路，促进了肺腺癌细胞的凋亡，抑制了肺腺癌细胞的增殖。本部分基于 TRERF1 可能在肺腺癌中扮演抑癌因子作用，进一步通过收集 110 对宣肺非吸烟女性肺腺癌组织和癌旁组织和临床病例资料，利用免疫组化检测 TRERF1 蛋白在肺腺癌中的表达情况，统计分析 TRERF1 蛋白水平的表达与肺腺癌患者临床病理特征和预后的相关性，进一步探究其与肺腺癌临床病理特征以及与预后的关系，为寻找燃煤相关肺癌人群新生物标志物奠定研究基础。

材料和方法

1.实验材料

1.1 主要仪器

仪器名称	厂家	型号
石蜡切片机	德国莱卡仪器有限公司	RM2235
净化工作台	济南康宝净化设备有限公司	JHT-SDC
高压灭菌锅	德国 Syte 公司	Syste VX-75
倒置显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CKX41
移液器	吉尔森	吉尔森

显微镜	日本奥林巴斯株式会社	CX31(双目)
免疫组化全自动脱水机	德国 Sartorius 公司	HS366

1.2 主要试剂和材料

试剂和材料名称	厂家	货号
苏木素-伊红染色盒	大连美仑生物技术有限公司	MB9898
石蜡	索莱宝	YA0011
TRERF1 Rabbit polyAb	赛默飞	A301-631A
盖玻片、载玻片	上海华壹生物科技有限公司	12-545-80
Anti-rabbit IgG 二抗	美国 CST 公司	#7074
BSA 封闭液	碧云天生物技术有限公司	P0252-100mL
QuickBlock™ Western 一抗稀释液	碧云天生物技术有限公司	P0256-100mL
柠檬酸钠缓冲液	大连美仑生物技术有限公司	MA0180
DAB 显色试剂盒	美国 CST 公司	# 8059S

2. 实验方法

2.1 收集肺腺癌患者石蜡切片以及临床资料

2.1.1 研究对象

收集昆明医科大学第三附属医院胸外科 2016 年至 2020 年间行肺癌根治术的宣威非吸烟女性肺腺癌患者手术石蜡组织标本研究 110 例。癌组织标本的取材以肿瘤中靠近边缘部分的组织为主(该部分肿瘤增殖较快), 避开坏死组织, 达到以下标准, 肿瘤细胞>80%, 炎症<10%, 坏死<10%, 纤维化<10%, 所有组织性质均经 HE 染色证实。本部分研究申请获得了昆明医科大学第三附属医院伦理委员会的批准 (NO. KYCS202230)。

2.1.2 纳入和排除标准

纳入标准: (1) 宣威地区 (当地出生并居住生活 3 代及以上) 无吸烟史的女性肺腺癌患者; (2) 患者病理标本保存完整, 经病理科医师确定可行免疫组织化学染色实验; (3) 临床病历资料完整。

排除标准：（1）术前因肺癌或其他恶性肿瘤接受过放、化疗等抗肿瘤治疗的病例；（2）合并有肺癌以外的其他恶性肿瘤；（3）合并免疫系统疾病、慢性消耗性疾病及传染病；（4）合并妊娠。

2.1.3 患者临床资料的收集

通过 His 病例系统、联众病例系统查阅收集患者临床病历，记录患者肿瘤大小、肿瘤位置、年龄、T 分期、N 分期、TNM 分期（由于入组最早患者为 2016 年，本研究参照第 8 版国际肺癌 TNM 分期对部分按第 7 版肺癌 TNM 分期进行重新分期）。预后指标：无进展生存期（progression-free survival, PFS），总生存期（overall survival, OS）。

通过病历系统查询、电话随访、短信等方式对患者进行术后随访,截止时间为 2023 年 12 月 31 日。无病生存期（PFS）随访观察终点为疾病复发或进展，总生存期（OS）结局指标是死亡时间。截止末次随访时间为死亡时间。截止末次随访时间仍未复发或未因疾病进展致死，其生存数据为截尾数据。

2.2 免疫组化（IHC）检测肺腺癌组织中 TRERF1 蛋白水平的表达

2.2.1 肺腺癌组织蜡块的选取

选取符合纳入标准的肺腺癌组织，切片由病理学专家复核确定，在显微镜下由病理学专家观察无癌组织的切片作为镜下癌旁组织。

2.2.2 免疫组织化学染色

（1）取出冻存的裸鼠移植瘤组织置于冰上，每管组织中加入用 ddH₂O 清洗浸泡 50 min 后，按照脱水流程：70%乙醇 3h，80%乙醇 12h，30min，90%乙醇 1h，100%乙醇溶 1h,依次浸泡脱水。乙醇脱水后，在按顺序依次将组织放入二甲苯 I、二甲苯 II 中浸泡 30 min 使组织透明。

（2）准备石蜡模具，底部滴入液态石蜡，组织放入中心，补充石蜡液后盖上模具盖，-20℃冷冻固化石蜡后，包埋组织完成。

（3）按上述步骤依次完成组织石蜡包埋后，制作石蜡切片，预先设置号石蜡切片机切片厚度，本实验设置为 5um，将切下的石蜡切片平铺于载玻片上，按照该步骤依次完成石蜡切片制作，将切片放于 70℃干燥箱中持续烘烤 2h。

（4）将烤好的石蜡切片按照二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 II 依次浸泡 15min，无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、85%乙醇、80%乙醇、70%乙醇依次浸泡 5min

脱水。最后用 ddH₂O 水化浸泡 0.5h。

(5) 配制 1X 的组织抗原修复液, 将切片放入抗原修复液中, 高压高温 1.5h, 后水浴 30min, 待水浴结束后, 用 ddH₂O 和 PBS 清洗切片数次。将切片放入用 3%过氧化氢甲醇孵育 20min, 目的灭活切片的过氧化物。

(6) PBS 清洗切片 3 次, 每次 5min, 用羊血清封闭非特异性位点

(7) 用 0.5%的 BSA 溶液按说明书稀释目标分子的一抗原液, 切片上滴加按比例稀释好的一抗溶液, 室温孵育 3h。

(8) PBS 清洗切片 3 次, 每次 5min, 吸尽 PBS 溶液, 滴加二抗, 室温孵育 30min。

(9) 按说明书比例 (50: 1) 配制 DAB 显色液, 切片上滴加适量 DAB 显色液, 显色 2min 后, 用清水冲洗终止显色。用苏木素染核 1min, 立即用 PBS 冲洗擦干后在 1%乙醇分化液浸泡 3s 后再次冲洗。

(10) 按照顺序在 70%乙醇、80%乙醇、85%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇中依次进行脱水, 各 5min。

(11) 再将切片置于二甲苯中浸泡 5min, 透明切片。

(12) 将透明好的晾干, 用中性树脂处理封片, 在显微镜下观察记录。

2.3 统计学分析 TRERF1 蛋白水平表达的临床意义

2.3.1 统计描述

使用 IBM SPSS 21.0 及 GraphPad Prism8 软件对得到的数据进行统计和分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 计数资料是用频数和百分比来描述。检验标准为 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3.2 半定量免疫反应评分 (Immunoreactivity Scoring, IRS)

用半定量免疫反应评分 IRS 评分评估肺腺癌组织中 TRERF1 蛋白表达水平。根据公式 $IRS = SI(\text{staining intensity 染色强度}) \times PP(\text{percentage of positive 阳性细胞百分比})$ 计算患者组织中 TRERF1 的 IRS 评分

免疫染色强度 (SI): 0 分: 无免疫染色、1 分: 免疫染色弱、2 分: 免疫染色中等、3 分: 免疫染色强。免疫反应细胞百分比 (PP): 0 分: 无阳性细胞、1 分: 阳性细胞占比 $< 10\%$ 、2 分: 阳性细胞占比 $10\% - 50\%$ 、3 分: 阳性细胞 $51\% - 80\%$ 、4 分: 阳性细胞 $> 80\%$ 。SI 和 PP 乘积为 0 到 12: 阴性: $IRS = 0$ 、弱阳性: $0 < IRS \leq 4$ 、

中等阳性： $4 < \text{IRS} \leq 8$ 、强阳性： $8 < \text{IRS} \leq 12$ 。染色强度和阳性细胞百分比请两位病理医师评估，取两位病理医师评分结果的平均值。

2.3.3 TRERF1 蛋白表达与患者临床特征及预后的相关性分析

以 TRERF1 免疫反应评分的弱阳性 4 分作为 cut-off 截断值，将患者分为 TRERF1 高表达组、低表达组，IRS 评分大于 4 分为 TRERF1 高表达。比较患者癌与癌旁 TRERF1 表达差异，若数列满足正态分布使用 t 检验，若不满足正态分布用非参数秩和检验。比较 TRERF1 蛋白高表达与低表达组患者临床特征差异用卡方检验。用 Log-rank test Cox 单因素分析评估年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、T 分期、N 分期、TNM 分期、TRERF1 分组（低表达）对肺腺癌患者 PFS、OS 的影响，将单因素分析中所有的变量一起纳入进行多因素 Multivariate Cox regression test 回归模型分析，以复发为结局变量，用 Kaplan-Meier 法计算生存率。

结 果

1. TRERF1 在肺腺癌组织和癌旁组织的表达情况

比较 110 对肺腺癌患者的癌组织及配对癌旁组织，经免疫组织化学检测后的 IRS 评分差异比较，结果 TRERF1 在癌组织中的表达水平低于癌旁组织（图 3-1，图 3-2）。

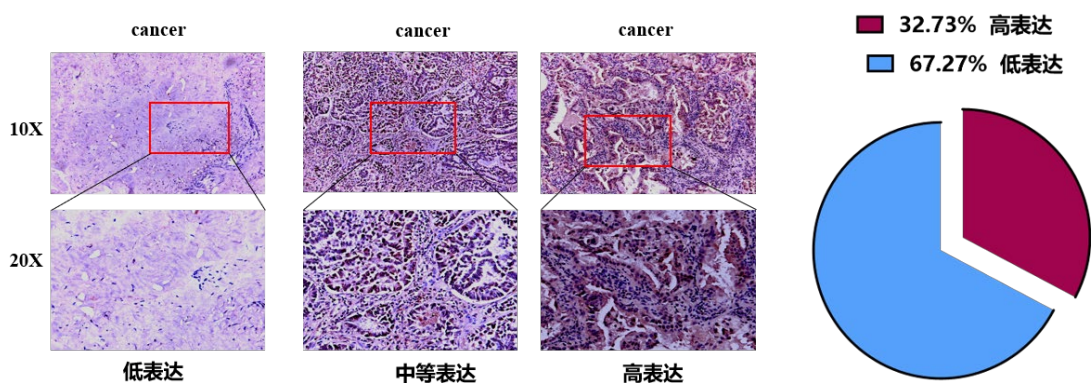


图 3-1 TRERF1 在肺腺癌组织中表达水平

Figure 3-1 TRERF1 protein expression in lung adenocarcinoma tissue.

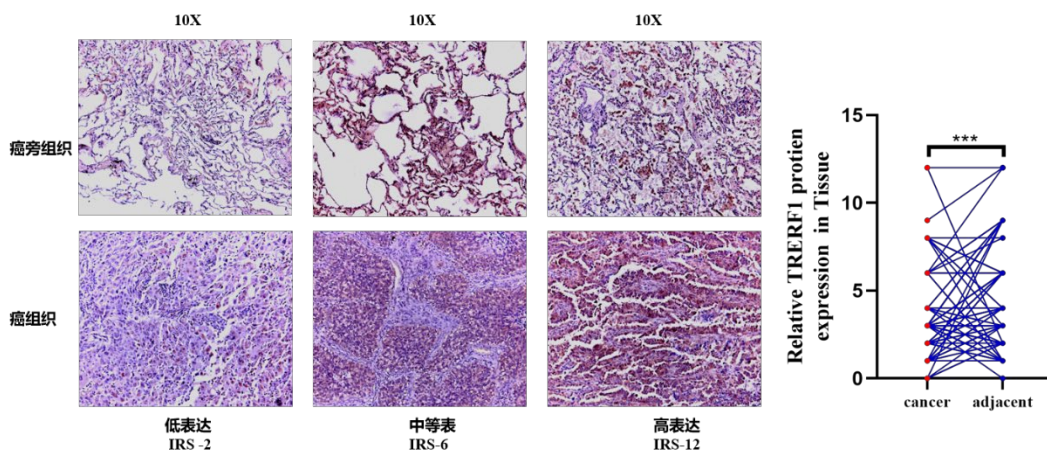


图 3-2 TRERF1 蛋白在肺腺癌组织中表达水平降低 (***) $P < 0.001$.)

Figure 3-2 shows a decrease in the expression level of TRERF1 protein in lung adenocarcinoma tissue (***) $P < 0.001$.)

2. TRERF1蛋白表达与肺腺癌患者临床特征的相关性分析

以 IRS 评分将 TRERF1 在肺腺癌组织中分为高表达组和低表达组，组间比较的结果提示在低表达和高表达两组间 TNM 分期 ($p=0.027$) 以及是否复发 ($p=0.021$) 存在统计学差异（表 3-1），提示 TRERF1 与肺腺癌 TNM 分期和是否复发相关。

表 3-1 TRERF1蛋白表达与肺腺癌患者的临床特征的相关性

Table 3-1. Correlation between TRERF1 protein expression and clinical characteristics of lung adenocarcinoma patients

	高表达(n=36)	低表达(n=74)	<i>p</i> 值
初诊年龄 (year,mean,SD)	57.33 (8.46)	55.59 (8.20)	0.080
T 分期 (n, %)			
1	28 (77.28)	66 (89.19)	0.192
2	8 (22.22)	8 (10.81)	
N 分期 (n, %)			
0	26 (72.22)	63 (85.14)	0.174
1	10 (27.78)	11 (14.86)	
TNM (n, %)			0.027
I 期	19 (52.78)	57 (77.03)	
II 期	10 (27.78)	8 (10.81)	
III 期	7 (19.44)	9 (12.16)	
复发 (n, %)			0.021
未复发	25 (69.44)	66 (59.19)	
复发	11 (30.56)	8 (10.81)	

3. TRERF1在肺腺癌患者预后的单因素和多因素分析结果

单因素 Cox 比例风险模型的结果提示: TRERF1 与是否复发, 不存在统计学关联 ($P>0.05$)。疾病分期为 III 期的患者其复发的风险是 I 期的 3.908 倍 (HR=3.908, 95%CI: 1.608-9.498); T 分期为 T3 和 T4 期的患者复发的风险是 T1 和 T2 患者的 4.248 倍 (HR=4.248, 95%CI: 1.936-9.319)。将 TRERF1 和单因素 Cox 比例风险模型中存在统计学关联的变量纳入多因素分析, 由于 T 分期和疾病分期两个变量存在高度的相关性, 一起纳入模型可能存在共线性问题, 因此拟合 2 个多因素 Cox 比例风险模型分别进行分析。

表 3-2 单因素 Cox 比例风险模型

Table 3-2. Single factor Cox proportional risk model

自变量	单因素 Cox 比例风险模型		
	HR 点估计值	90% 置信区间	<i>p</i> 值
分组（低表达）	1.846	0.709, 4.810	0.292
初诊年龄（每增长 5 岁）	1.139	0.914, 1.419	0.331
疾病分期			
II 期	1.865	0.661, 5.264	0.323
III 期	3.908	1.608, 9.498	0.012
T 分期（T3-T4 期）	4.248	1.936, 9.319	0.002
N 分期（有淋巴结转移）	1.922	0.857, 4.312.	0.183
肿瘤位置（右肺）	0.962	0.434, 2.134	0.936

多因素 Cox 比例风险模型的结果提示疾病分期为 III 期的患者其复发的风险是 I 期的 5.165 倍（HR=5.165, 95%CI: 1.699-15.695）。（表 3-2）

多因素 Cox 比例风险模型的结果提示 T 分期为 T3 和 T4 期的患者复发的风险是 T1 和 T2 患者的 5.553 倍（HR=5.553, 95%CI: 2.058-14.98）。（表 3-3）

表 3-2 多因素 Cox 比例风险模型

Table 3-2 Multi factor Cox proportional risk model

自变量	多因素 Cox 比例风险模型		
	HR 点估计值	95% 置信区间	<i>p</i> 值
分组（低表达）	3.042	0.865, 10.70	0.08
疾病分期			
II 期	2.403	0.676, 8.539	0.175
III 期	5.165	1.699, 15.695	0.003

表 3-3 多因素 Cox 比例风险模型

Table 3-2 Multi factor Cox proportional risk model

自变量	多因素 Cox 比例风险模型		
	HR 点估计值	95% 置信区间	p 值
分组（低表达）	3.033	0.889, 10.35	0.07
T 分期（T3-T4 期）	5.553	2.058, 14.98	<0.01

4. TRERF1对患者预后的影响

4.1 TRERF1对患者无病生存期（PFS）的影响

根据高低表达进行分组，绘制其与复发的生存曲线，并经 Log-rank 检验结果提示两组间的生存没有统计学差异（ $p=0.29$ ）（图 3-3）。

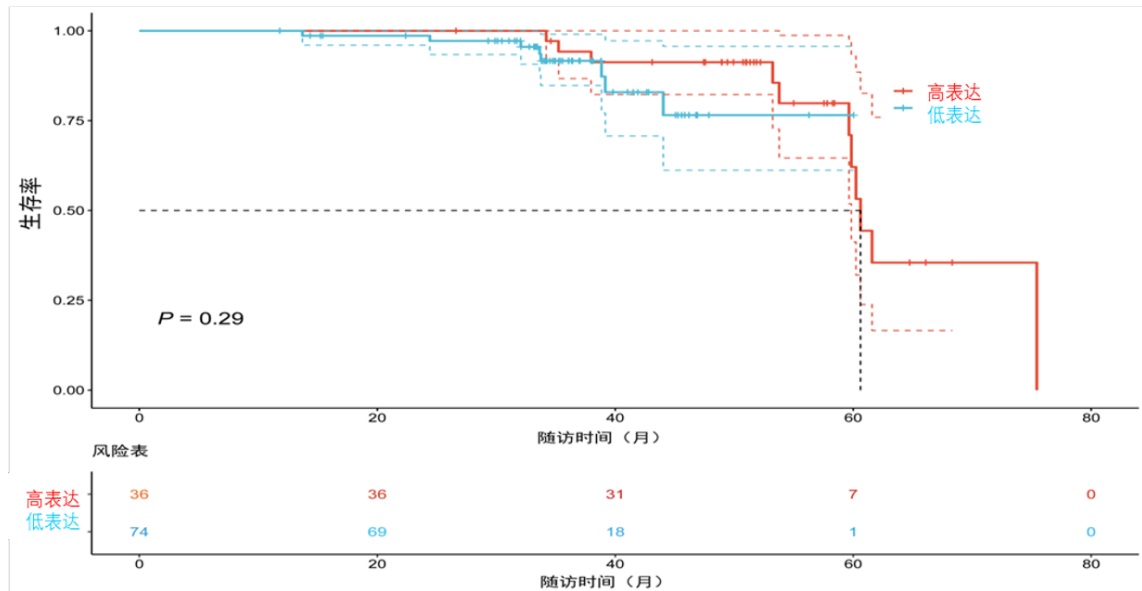


图 3-3 TRERF1 表达与肺腺癌患者 PFS 的关系

Figure 3-3 Relationship between TRERF1 expression and PFS in lung adenocarcinoma patients.

4.2 TRERF1对患者总生存期（OS）的影响

根据高低表达进行分组，分析 TRERF1 的表达与患者总生存期的影响，并经 Log-rank 检验结果提示两组间的生存没有统计学差异（ $p=0.64$ ）（图 3-4）。

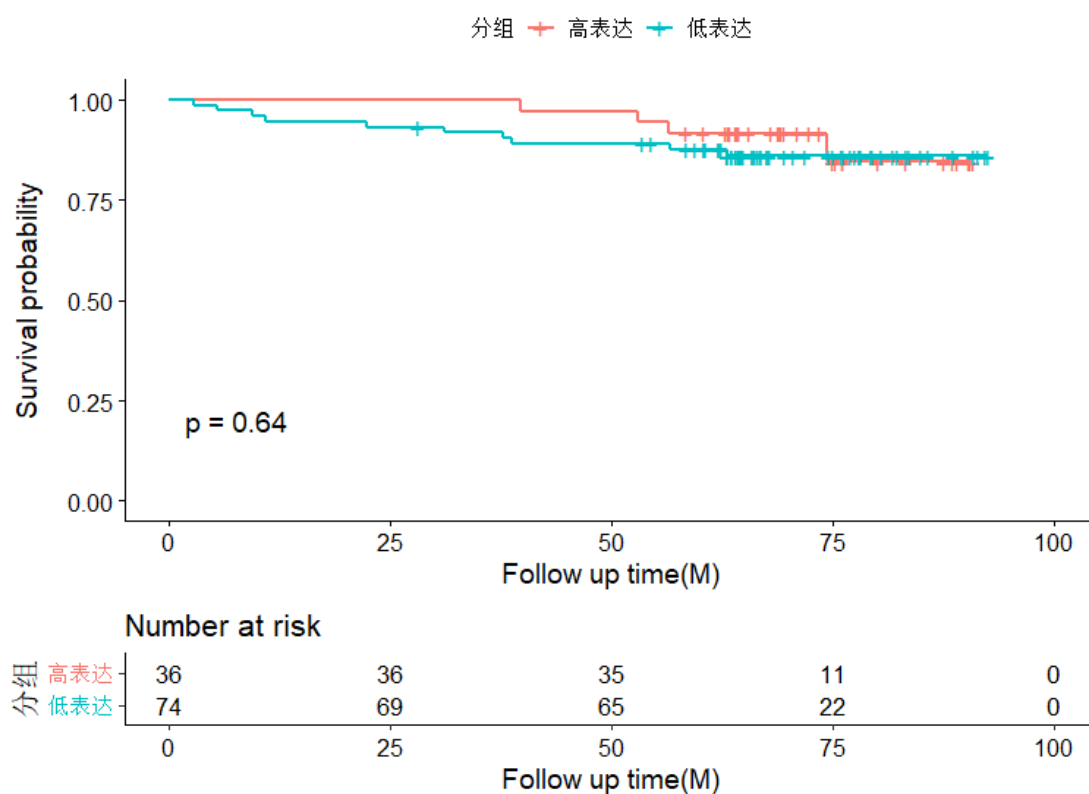


图 3-4 TRERF1 表达与肺腺癌患者 OS 的关系

Figure 3-4 Relationship between TRERF1 expression and OS in lung adenocarcinoma patients.

讨 论

肺癌是全球死亡率第一的恶性肿瘤，近年来，肺腺癌已经超过肺鳞癌成为肺癌中最常见的病理类型，并且女性肺腺癌的发病率也逐年上升。云南省宣威地区是世界农村非吸烟女性肺腺癌高发地区之一，宣威地区患者的基因谱特征与燃煤和吸烟相关肺癌的基因特点相似，进一步探索这些基因的临床意义，可为该疾病的综合防治提供依据。

TRERF1 最先因在类固醇形成中，作为 P450_{scc} 的转录因子被研究报道，后面发现，TRERF1 不仅在类固醇受体中有表达，在非类固醇受体组织中有一定水平的表达。Florence Gizard 等人通过在乳腺癌研究表明，TRERF1 的表达与代表不良预后的乳腺癌病理分级呈负相关，与代表良好预后的 progesterone receptor (PR)、Estrogen receptor (ER) 和 p27 的表达状态呈正相关，TRERF1 基因在人类肿瘤中的表达与 c-erb-3 和 c-erb-4 水平呈正相关，提示 TRERF1 是肿瘤良好预后的标志物^[82]。

我们通过上述两部分研究，首次发现在宣威非吸烟女性肺腺癌组织中特异性突变基因 TRERF1 可以抑制肺腺癌细胞恶性生物学行为的能力，在此基础上，我们在本部分进一步分析 TRERF1 蛋白表达水平与肺腺癌临床特征及预后的关系。考虑到宣威非吸烟女性肺腺癌基因谱对燃煤相关性肺癌的基因特点更具有代表性，本部分研究从宣威非吸烟女性肺腺癌人群，最终共选取 110 进行配对的癌和癌旁组织进行免疫组化验证，免疫组化结果提示：TRERF1 在肺癌和癌旁组织中阳性表达的亚细胞定位主要位于细胞核，其次为细胞质和细胞膜。根据免疫反应评分计算 TRERF1 的蛋白表达情况。参照以往文献报道^[83, 84]，研究以 TRERF1 蛋白在病灶表达的 IRS 的中位值 4 为 cut-off 值将患者分为 TRERF1 蛋白高、低表达两组，进而分析 TRERF1 蛋白表达肺腺癌患者中的临床价值。通过免疫组化染色发现，TRERF1 在肺腺癌和癌旁组织中呈现不同阳性率表达，于是基于癌和癌旁组织 IRS 评分，通过非参数秩和检验，比较 TRERF1 在癌组织与癌旁组织中的表达差异比较中，提示癌组织中表达低于癌旁组织，统计显示差异均具有显著性。结果与本研究前两部分通过 qPCR 和 Western blot 检测 TRERF1 在癌和癌旁表达结果一致。

在本部分研究中由于入组人群限制为非吸烟女性患者，所以在临床相关性研

究变量未纳入吸烟和性别。我们将分析重点集中在患者临床特征相关指标，肺癌的预后与肿瘤的 TNM 分期，病理亚型，人体微环境相关^[85-87]。依照国际肺癌分期标准，基于肿瘤大小 (Tumor, T)、淋巴结是否转移(lymph Node, N)、远处器官是否转移(Metastasis, M) 系统的评估患者病情，是评估患者疾病阶段和预后的重要手段^[88]。由于纳入患者涵盖 2016 年至 2020 年，在本研究中，参照国际肺癌分期标准 TNM 分期第八版，对入组患者统一校准分期。针对肺腺癌病理亚型，国际胸外科研究学会、美国胸外科协和欧洲呼吸学会 2011 年用原位肺腺癌 (AIS) 和微浸润性肺腺癌 (MIS) 进一步完善了肺腺癌的病理亚型^[89]，结合 CT 影像学特征也发现肺癌的大小以及淋巴结转移与其浸润性密切相关^[90]。在本研究中，我们发现 TRERF1 与发现 TNM 分期和是否复发相关，推测 TRERF1 的表达可能与肺腺癌的进展有关，分别进行单因素和多因素 Cox 比例风险模型进一步分析 TRERF1 与肺腺癌临床病理特征的相关性，并将单因素 Cox 比例风险模型中存在统计学关联的变量纳入多因素分析，考虑到肺癌 TNM 分期和与肿瘤大小、淋巴结是否转移、远处转移存在高度的相关性，一起纳入模型可能存在共线性问题，因此拟合 2 个多因素 Cox 比例风险模型分别进行分析，但在 Cox 比例风险模型分析中，TRERF1 与单独的 T 分期、N 分期未得到有统计学意义的结果。因为本次研究纳入的人群均为可以接受手术的非吸烟女性肺腺癌患者，病理分期绝大多数为 I 期患者，所以样本存在一定的偏移，上述的结果在接下来的研究中，有待进一步扩大临床样本量分析。在预后分析中，对患者以是否复发为结局的无病生存期(PFS)以及以死亡为结局的总生存期(OS)都进行生存分析，但结果 TRERF1 表达水平与腺癌患者的 PFS 和 OS 均不显著相关。

本部分研究存在一定的局限性：绝大多数来源于I期非吸烟女性肺腺癌患者导致临床样本偏倚。免疫组化为半定量分析并由两位病理医师相互独立地评估了IHC染色的结果，结果可能受主观因素的影响，除此之外，本研究仅分析了TRERF1的蛋白表达水平与临床预后的相关性，在今后研究中，在扩大样本量的同时，也将进一步分析其mRNA水平与对预后的影响。TRERF1蛋白表达水平高低的cut-off值是根据TRERF1蛋白表达的IRS评分界定，以cut-off值IRS<4分判定为TRERF1低表达，但是这并非是该cutoff值判定的唯一标准，今后的研究中还需要更多更大样本的研究进一步证实。综上所述，作为肺腺癌细胞恶性生

物学行为的抑制因子，TRERF1蛋白表达水平可能影响肺腺癌的TNM分期，是肺腺癌发展中的保护因素。

结 论

TRERF1 在肺腺癌组织中表达降低，其蛋白表达水平对肺腺癌患者的 TNM 分期和复发风险呈负相关，提示 TRERF1 高表达可能是肺腺癌发展中的保护因素。

全文总结

本研究探索宣威非吸烟女性肺腺癌基因谱中显著突变基因 TRERF1 在肺腺癌的恶性生物学功能及作用机制。旨在为燃煤和吸烟诱发肺癌的发生发展机制，寻找该类人群治疗新靶点奠定研究基础。

该项研究分为三部分：第一部分- TRERF1 在肺腺癌生物学功能的研究；第二部分- TRERF1 对肺腺癌生物学功能调控的分子机制研究；第三部分-TRERF1 与肺腺癌的临床相关性研究。

本研究第一部分利用基因编辑技术 *crisper/cas9* 和过表达慢病毒质粒载体，构建 TRERF1 敲除和过表达的 H1975、H1734 肺腺癌细胞，通过体外和体内实验，初步探究 TRERF1 的表达情况对肺腺癌增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响。结果提示 TRERF1 可能是抑制肺腺癌细胞增殖、侵袭、迁移并促进肺腺癌细胞凋亡的抑癌因子。

本研究第二部分在细胞水平，利用已成功构建的过表达 H1975 稳转细胞株，通过转录组测序筛选和鉴定筛选出了 TRERF1 相互作用的靶基因-CXCL3，通过免疫组化和 *western blot* 在分别在裸鼠移植瘤组织水平和肺腺癌细胞水平证实 TRERF1 可以抑制与 CXCL3 蛋白表达，放线菌素 D 实验结果显示 TRERF1 可以加速 CXCL3 mRNA 的降解。回复实验结果提示 TRERF1 抑制 CXCL3 降低了肺腺癌细胞的增殖能力、促进了肺腺癌细胞的凋亡能力，促进了肺腺癌细胞的凋亡能力，并发现可以引起 ERK 信号通路中关键蛋白 pERK1/2 的表达，提示 TRERF1 调控 CXCL3 影响 ERK 信号通路可能是其发挥抑癌因子作用的机制。

本研究第三部分利用肺腺癌和癌旁组织，用免疫组化检测 TRERF1 在癌和癌旁的表达水平，通过组间相关性比较和预后分析，结果提示 TRERF1 在肺腺癌组织中表达降低，其蛋白表达水平对肺腺癌患者的 TNM 分期和复发风险呈负相关，提示 TRERF1 高表达可能是肺腺癌发展中的保护因素。

后续研究方向将从表观遗传学角度，如进一步探索 TRERF1 通过影响 CXCL3 mRNA 的稳定性，抑制 CXCL3 蛋白表达的作用具体分子修饰机制。为寻找肺腺癌的治疗靶点提供理论基础。

参考文献

- [1] Global, regional, and national burden of respiratory tract cancers and associated risk factors from 1990 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. The Lancet Respiratory medicine, 2021, 9(9): 1030-49.
- [2] ZHENG R, ZHANG S, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. Journal of the National Cancer Center, 2022, 2(1): 1-9.
- [3] 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: a cancer journal for clinicians, 2021, 71(3): 209-49.
- [4] 王泽洲, 郑莹. 1990 年至 2020 年间全球及我国肺癌的发病流行趋势及防控措施 诊断学理论与实践 [J]. 2023, 22(01): 1-7.
- [5] 梁铨, 刘梦雯, 张丽等. 全球部分地区肺癌发病趋势及年龄变化情况分析 中国肿瘤 [J]. 2022, 31(09): 683-92.
- [6] LI J, GUO W, RAN J, et al. Five-year lung cancer mortality risk analysis and topography in Xuan Wei: a spatiotemporal correlation analysis [J]. BMC public health, 2019, 19(1): 173.
- [7] LI J, ZHANG Y, LI Y, et al. [Descriptive study on the epidemiology of lung cancer in coal-producing area in eastern Yunnan, China] [J]. Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer, 2011, 14(2): 107-19.
- [8] ZHOU Y, YANG Y, YANG C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) of Yunnan in southwestern China [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15023-33.
- [9] 陈小波, 黄云超, 赵杰等. 宣威地区与非宣威地区肺癌患者临床流行病学特征及病理类型特点分析 现代肿瘤医学 [J]. 2020, 28(15): 2617-21.
- [10] HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, et al. p53 mutations in human cancers [J]. Science (New York, NY), 1991, 253(5015): 49-53.
- [11] ZHANG D L, QU L W, MA L, et al. Genome-wide identification of transcription factors that are critical to non-small cell lung cancer [J]. Cancer letters, 2018, 434:132-43.
- [12] HUANG Y, ZHU M, JI M, et al. Air Pollution, Genetic Factors, and the Risk of Lung Cancer: A Prospective Study in the UK Biobank [J]. American journal of respiratory and critical care

medicine, 2021, 204(7): 817-25.

- [13] 金永堂, 周晓铁, 何兴舟. 宣威肺癌的遗传流行病学研究 中国公共卫生 [J]. 1996, (12): 537-9.
- [14] DEMARINI D M, LANDI S, TIAN D, et al. Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions [J]. Cancer research, 2001, 61(18): 6679-81.
- [15] GRANVILLE C A, HANLEY N M, MUMFORD J L, et al. Mutation spectra of smoky coal combustion emissions in Salmonella reflect the TP53 and KRAS mutations in lung tumors from smoky coal-exposed individuals [J]. Mutation research, 2003, 525(1-2): 77-83.
- [16] HOSGOOD H D, 3RD, PAO W, ROTHMAN N, et al. Driver mutations among never smoking female lung cancer tissues in China identify unique EGFR and KRAS mutation pattern associated with household coal burning [J]. Respiratory medicine, 2013, 107(11): 1755-62.
- [17] CHEN Y, YE L, STANFORD R R, et al. Distinct epithelial growth factor receptor mutation profile in non-small-cell lung cancer patients from the Xuanwei area of China [J]. Molecular and clinical oncology, 2016, 4(5): 749-55.
- [18] ZHANG H, LIU C, LI L, et al. Genomic evidence of lung carcinogenesis associated with coal smoke in Xuanwei area, China [J]. National science review, 2021, 8(12): nwab152.
- [19] ZHOU Y, GE F, DU Y, et al. Unique Profile of Driver Gene Mutations in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer in Qujing City, Yunnan Province, Southwest China [J]. Frontiers in oncology, 2021, 11:644895.
- [20] LAN Q, CHAPMAN R S, SCHREINEMACHERS D M, et al. Household stove improvement and risk of lung cancer in Xuanwei, China [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2002, 94(11): 826-35.
- [21] UNGER T, NAU M M, SEGAL S, et al. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer [J]. The EMBO journal, 1992, 11(4): 1383-90.
- [22] GIZARD F, EL-ALFY M, DUGUAY Y, et al. Function of the transcriptional regulating protein of 132 kDa (TRp-132) on human P450scc gene expression [J]. Endocrine research, 2002, 28(4): 559-74.

- [23] GIZARD F, LAVALLÉE B, DEWITTE F, et al. A novel zinc finger protein TRP-132 interacts with CBP/p300 to regulate human CYP11A1 gene expression [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276(36): 33881-92.
- [24] WEINBERG R A. The retinoblastoma protein and cell cycle control [J]. *Cell*, 1995, 81(3): 323-30.
- [25] HUME S, GROU C P, LASCAUX P, et al. The NUCKS1-SKP2-p21/p27 axis controls S phase entry [J]. *Nature communications*, 2021, 12(1): 6959.
- [26] GIZARD F, ROBILLARD R, BARBIER O, et al. TRP-132 controls cell proliferation by regulating the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/Cip1 and p27Kip1 [J]. *Molecular and cellular biology*, 2005, 25(11): 4335-48.
- [27] LI M, DU M, CONG H, et al. Characterization of hepatitis B virus DNA integration patterns in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2021, 51(1): 102-15.
- [28] BAKARDJIEVA-MIHAYLOVA V, SKVAROVA KRAMARZOVA K, SLAMOVA M, et al. Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors [J]. *Cancers*, 2019, 11(9):
- [29] HE Z X, WEI B F, ZHANG X, et al. Current development of CBP/p300 inhibitors in the last decade [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2021, 209:112861.
- [30] VERMEULEN R, DOWNWARD G S, ZHANG J, et al. Constituents of Household Air Pollution and Risk of Lung Cancer among Never-Smoking Women in Xuanwei and Fuyuan, China [J]. *Environmental health perspectives*, 2019, 127(9): 97001.
- [31] TIAN L, DAI S, WANG J, et al. Nanoquartz in Late Permian C1 coal and the high incidence of female lung cancer in the Pearl River Origin area: a retrospective cohort study [J]. *BMC public health*, 2008, 8:398.
- [32] YANG J, CAO Y, HUANG Y, et al. [Study on the Relationship between the Inhalable Fine Particulate Matter of Xuanwei Coal Combustion and Lung Cancer] [J]. *Zhongguo fei ai za zhi* = Chinese journal of lung cancer, 2015, 18(7): 403-8.
- [33] ZHAO G, WANG Z, HUANG Y, et al. Effects of Benzoapyrene on migration and invasion of lung cancer cells functioning by TNF- α [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2018, 119(8):

6492-500.

- [34] WANG F, TAN F, SHEN S, et al. Risk-stratified Approach for Never- and Ever-Smokers in Lung Cancer Screening: A Prospective Cohort Study in China [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2023, 207(1): 77-88.
- [35] GIZARD F, LAVALLEE B, DEWITTE F, et al. The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450scc gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells [J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277(42): 39144-55.
- [36] GOTTESMAN M M. Mechanisms of cancer drug resistance [J]. Annual review of medicine, 2002, 53:615-27.
- [37] CAO B, ZENG Y, WU F, et al. Novel TRERF1 mutations in Chinese patients with ovarian endometriosis [J]. Molecular medicine reports, 2018, 17(4): 5435-9.
- [38] XIE K, YANG Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system [J]. Molecular plant, 2013, 6(6): 1975-83.
- [39] HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions [J]. Cancer discovery, 2022, 12(1): 31-46.
- [40] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-74.
- [41] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. Nature reviews Clinical oncology, 2020, 17(7): 395-417.
- [42] SUN M, JU J, DING Y, et al. The signaling pathways regulated by KRAB zinc-finger proteins in cancer [J]. Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer, 2022, 1877(3): 188731.
- [43] MACKEH R, MARR A K, FADDA A, et al. C2H2-Type Zinc Finger Proteins: Evolutionarily Old and New Partners of the Nuclear Hormone Receptors [J]. Nuclear receptor signaling, 2018, 15:1550762918801071.
- [44] GAO J, GAO J, QIAN L, et al. Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 axis contributes to p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil [J]. Cancer biology & therapy, 2014, 15(8): 982-91.
- [45] LEE C W, CHIANG Y C, YU P A, et al. A Role of CXCL1 Drives Osteosarcoma Lung

- Metastasis via VCAM-1 Production [J]. *Frontiers in oncology*, 2021, 11:735277.
- [46] WU K, YU S, LIU Q, et al. The clinical significance of CXCL5 in non-small cell lung cancer [J]. *OncoTargets and therapy*, 2017, 10:5561-73.
- [47] PEI X, CHEN S W, LONG X, et al. circMET promotes NSCLC cell proliferation, metastasis, and immune evasion by regulating the miR-145-5p/CXCL3 axis [J]. *Aging*, 2020, 12(13): 13038-58.
- [48] SMITH D F, GALKINA E, LEY K, et al. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow [J]. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2005, 289(5): H1976-84.
- [49] GULATI K, GANGELE K, AGARWAL N, et al. Molecular cloning and biophysical characterization of CXCL3 chemokine [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2018, 107(Pt A): 575-84.
- [50] BALKWILL F, CHARLES K A, MANTOVANI A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease [J]. *Cancer cell*, 2005, 7(3): 211-7.
- [51] DELAHANTY R J, XIANG Y B, SPURDLE A, et al. Polymorphisms in inflammation pathway genes and endometrial cancer risk [J]. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2013, 22(2): 216-23.
- [52] QI Y L, LI Y, MAN X X, et al. CXCL3 overexpression promotes the tumorigenic potential of uterine cervical cancer cells via the MAPK/ERK pathway [J]. *Journal of cellular physiology*, 2020, 235(5): 4756-65.
- [53] WENG J, REN Q, LI Z, et al. CXCL3 overexpression affects the malignant behavior of oral squamous cell carcinoma cells via the MAPK signaling pathway [J]. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 2021, 50(9): 902-10.
- [54] BOLITHO C, HAHN M A, BAXTER R C, et al. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor [J]. *Endocrine-related cancer*, 2010, 17(4): 929-40.
- [55] WANI N, NASSER M W, AHIRWAR D K, et al. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C

- chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment [J]. *Breast cancer research : BCR*, 2014, 16(3): R54.
- [56] CHOW M T, LUSTER A D. Chemokines in cancer [J]. *Cancer immunology research*, 2014, 2(12): 1125-31.
- [57] GUI S L, TENG L C, WANG S Q, et al. Overexpression of CXCL3 can enhance the oncogenic potential of prostate cancer [J]. *International urology and nephrology*, 2016, 48(5): 701-9.
- [58] XIN H, CAO Y, SHAO M L, et al. Chemokine CXCL3 mediates prostate cancer cells proliferation, migration and gene expression changes in an autocrine/paracrine fashion [J]. *International urology and nephrology*, 2018, 50(5): 861-8.
- [59] MURPHY P M, BAGGIOLINI M, CHARO I F, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors [J]. *Pharmacological reviews*, 2000, 52(1): 145-76.
- [60] YUE J, LÓPEZ J M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(7):
- [61] ISHIKAWA Y, KITAMURA M. Dual potential of extracellular signal-regulated kinase for the control of cell survival [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999, 264(3): 696-701.
- [62] XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. *Science (New York, NY)*, 1995, 270(5240): 1326-31.
- [63] KANDA Y, MIZUNO A, TAKASAKI T, et al. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 6, a negative regulator of oncogenic ERK signaling, by ACA-28 induces apoptosis in NIH/3T3 cells overexpressing HER2/ErbB2 [J]. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2021, 26(2): 109-16.
- [64] KHANDAKAR G I, MIYAMOTO Y, SATOH R, et al. ACAGT-007a, an anti-cancer compound that modulates ERK MAPK signaling, induces nuclear enrichment of phosphorylated ERK in T3M4 pancreatic cancer cells [J]. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2023, 28(6): 457-65.
- [65] BIAN Y, YU Y, WANG S, et al. Up-regulation of fatty acid synthase induced by EGFR/ERK activation promotes tumor growth in pancreatic cancer [J]. *Biochemical and biophysical*

- research communications, 2015, 463(4): 612-7.
- [66] HAMAOKA Y, NEGISHI M, KATOH H. EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation [J]. Cellular signalling, 2016, 28(8): 937-45.
- [67] LEIBOWITZ B, YU J. Mitochondrial signaling in cell death via the BCL2 family [J]. Cancer biology & therapy, 2010, 9(6): 417-22.
- [68] STEFANELLI C, TANTINI B, FATTORI M, et al. Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion [J]. FEBS letters, 2002, 527(1-3): 223-28.
- [69] TANG D, WU D, HIRAO A, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53 [J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277(15): 12710-7.
- [70] FEHRENBACHER N, BASTHOLM L, KIRKEGAARD-SØRENSEN T, et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 [J]. Cancer research, 2008, 68(16): 6623-33.
- [71] LEE E R, KIM J Y, KANG Y J, et al. Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis [J]. Biochimica et biophysica acta, 2006, 1763(9): 958-68.
- [72] LIU J, MAO W, DING B, et al. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes [J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2008, 295(5): H1956-65.
- [73] LEE Y J, SOH J W, JEOUNG D I, et al. PKC epsilon -mediated ERK1/2 activation involved in radiation-induced cell death in NIH3T3 cells [J]. Biochimica et biophysica acta, 2003, 1593(2-3): 219-29.
- [74] BROZOVIC A, OSMAC M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance [J]. Cancer letters, 2007, 251(1): 1-16.
- [75] KIM Y H, LEE D H, JEONG J H, et al. Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway [J]. Biochemical pharmacology, 2008, 75(10): 1946-58.
- [76] BACUS S S, GUDKOV A V, LOWE M, et al. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase

- pathways (ERK and p38) and is independent of p53 [J]. *Oncogene*, 2001, 20(2): 147-55.
- [77] BOUCHER M J, MORISSET J, VACHON P H, et al. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of BCL2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2000, 79(3): 355-69.
- [78] GUO D, GUO C, FANG L, et al. Qizhen capsule inhibits colorectal cancer by inducing NAG-1/GDF15 expression that mediated via MAPK/ERK activation [J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2021, 273:113964.
- [79] SUN Y, WANG C, MENG Q, et al. Targeting P-glycoprotein and SORCIN: Dihydromyricetin strengthens anti-proliferative efficiency of adriamycin via MAPK/ERK and Ca(2+) -mediated apoptosis pathways in MCF-7/ADR and K562/ADR [J]. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233(4): 3066-79.
- [80] KHODAPASAND E, JAFARZADEH N, FARROKHI F, et al. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? [J]. *Iranian biomedical journal*, 2015, 19(2): 69-75.
- [81] CHENG Y, YANG X, LIANG L, et al. Elevated expression of CXCL3 in colon cancer promotes malignant behaviors of tumor cells in an ERK-dependent manner [J]. *BMC cancer*, 2023, 23(1): 1162.
- [82] PAWLOWSKI V, RéVILLION F, HEBBAR M, et al. Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2000, 6(11): 4217-25.
- [83] YANG N, LI C, HAN X, et al. Associations of MTA1 expression with CT features, pathology and prognosis of elderly patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncology letters*, 2020, 20(5): 172.
- [84] SHEN J, JIN Z, LV H, et al. PFKP is highly expressed in lung cancer and regulates glucose metabolism [J]. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 2020, 43(4): 617-29.
- [85] SUCCONY L, RASSL D M, BARKER A P, et al. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies [J]. *Cancer treatment reviews*, 2021, 99:102237.

- [86] SIKKEMA L, RAMÍREZ-SUÁSTEGUI C, STROBL D C, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease [J]. *Nature medicine*, 2023, 29(6): 1563-77.
- [87] OKAMI J, SHINTANI Y, OKUMURA M, et al. Demographics, Safety and Quality, and Prognostic Information in Both the Seventh and Eighth Editions of the TNM Classification in 18,973 Surgical Cases of the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry Database in 2010 [J]. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2019, 14(2): 212-22.
- [88] FALCOZ P E. The prognostic value of lymph node ratio in patients with surgically resected stage I-III small-cell lung cancer: a propensity score matching analysis of the SEER database [J]. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 2021, 60(5): 1221-2.
- [89] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NOGUCHI M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma [J]. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2011, 6(2): 244-85.
- [90] 杨延涛, 黄云超, 赵光强等. 早期肺腺癌影像学特点与病理侵袭程度相关性的研究进展 *中国胸心血管外科临床杂志* [J]. 2023, 30(09): 1337-43.

综 述

转录调节因子 TRERF1 的研究现状

黄秋博 综述, 叶联华 审校

摘要: 转录调节因子 1 (transcriptional-regulating factor 1, TRERF1) 是类固醇生成中更关键酶胆固醇侧链裂解酶 (P450_{scc}) 的转录因子, 除此之外, TRERF1 还与恶性肿瘤密切相关, 如:抑制乳腺癌细胞的增殖, 促进他莫昔芬的耐药机制, 体细胞突变等。本文从 TRERF1 国内外研究等方面综述其研究进展。

关键词: 转录调节因子 1, 类固醇生成, 恶性肿瘤

Abstract: Transcriptional regulatory factor 1 (TRERF1) is a transcription factor of cholesterol side chain lyase (P450_{scc}), a more critical enzyme in steroid production. In addition, TRERF1 is also closely related to malignant tumors, such as inhibiting the proliferation of breast cancer cells, promoting the drug resistance mechanism of tamoxifen, somatic mutation, etc. This article reviews the research progress of TRERF1 from domestic and international perspectives.

Keywords: Transcription regulatory factor 1, steroid production, malignant tumors

肺癌是全球癌症相关死亡率高居第一的恶性肿瘤^[1], 吸烟、环境污染、高危职业暴露是导致肺癌发病风险因素^[2]。越来越多的研究表明, 肺癌的发病率和病理分子特征与区域环境密切相关。我国云南省宣威地区 (包括宣威、富源、麒麟和沾益等区县, 东经 103°35'30"—104°49'48", 北纬 25°02'38"—26°44'50") 在 20 世纪 70 年代以前, 居民以燃煤作为主要生活能源, 长期持久的煤烟影响, 导致该地区肺癌整体发病率呈高发态势^[3, 4]。在第一次全国肿瘤死因普查发现宣威部分地区女性肺癌发病率高达全国发病率的 20 倍, 是全球农村女性肺癌发病率最高的地区^[5, 6]。烟煤不完全燃烧释放物中的苯并 (a) 芘、纳米二氧化硅、金属粒子、PM_{2.5} 颗粒等环境致癌物, 是导致宣威地区人群肺癌高发主要原因^[7, 8]。云南省政府在 1976 年后的改炉改灶工作, 在一定程度上降低了宣威部分区域肺癌的发病率, 但整个宣威地区肺癌的发病率和死亡率仍处于较高水平, 说明除了外界环境因素, 人基因遗传易感性的内在因素同样扮演重要角色^[9, 10]。宣威地区肺癌是世界非吸烟女性肺癌的典型代表, 因此, 以该地区高发肺癌为模型, 对这一独特

发病人群和区域的肺癌流行病学特征的研究开展多组学研究,有助于为世界相似地区肺癌诊治工作提供参考。

通过对宣威非吸烟女性肺腺癌的 117 例样本做了全基因组 (whole exome sequencing, WES) 和转录组测序 (RNA-sequencing) 发现宣威地区家族患者与西方吸烟和非吸烟的女性肺癌人群相比,具有更高的基因突变负荷和基因拷贝数变异 (CNVs), 并首次发现了 SLC39A5、SPTLC3、SLC2A3、TRERF1、LONRF3 等高频突变基因^[8, 11], 转录调节因子 1 (transcriptional regulating factor 1, TRERF1) 是其中突变频率较高基因, 进一步研究有助于深入了解宣威肺癌的分子病理机制, 和开发针对性的诊疗方案打下基础。

转录调节因子 1 (transcriptional regulating factor 1, TRERF1), 又名: RAPA、BCAR2、TRERF1, 分子量为 132kDa, 位于染色体 6p21.2, 由 17 个外显子组成。最初通过筛选人胎盘 cDNA 表达文库, 基于其与-155/-131 DNA 片段相互作用的能力被分离发现^[12, 13]。TRERF1 的羧基端有富含酸性和脯氨酸残基的结构域, 类似于 p53 中鉴定的功能结构域^[14]。其在许多类固醇生成组织中表达, 如肾上腺皮质、前列腺和睾丸, 其功能与调节类固醇合成有关。TRERF1 可以作为转录因子影响胆固醇向孕烯醇酮的转化, 在类固醇激素的产生中起着至关重要的作用。除此之外, 其在一些非类固醇生成组织, 如肺、皮肤、肾脏、子宫和胸腺中表达, 这表明了 TRERF1 除了调节类固醇合成, 可能还有其他作用。

1. TRERF1 的生物学结构

TRERF1 一级结构包含两个转录调控中的多功能结合序列-LXXLL 基序, 其可以参与许多与转录调控的蛋白质-蛋白质相互作用, 可与其他核受体结合介导激活或抑制转录的相互作用。TRERF1 拥有三个 Cys2His2 (C2H2) 锌指结构, 该结构可由两个或三个 β 层和一个 α 螺旋组成, 是真核转录因子^[15, 16], 如 Sp1^[17]、WT1^[18]、NGFI-A^[19]、MBP-1^[20]、MBP-2^[21]和 Krox-20^[22]中广泛存在的 DNA 结合基序。锌指结构可以与两个半胱氨酸和两个组氨酸残基结合形成稳定结构。位于 α 螺旋 N-末端区域的氨基酸残基可以与通过与暴露在 DNA 主槽中的氢供体和受体相互作用而参与 DNA 结合。

单个蛋白质中锌指的数量差异加大, 从而使靶 DNA 序列具有可变性。除了与 DNA 相互结合, 锌指还可以连接促使蛋白质-蛋白质和 RNA-蛋白质的相互作

用。一般情况下, 含有 C2H2 型锌指的蛋白质充当基因表达的反式调节因子, 可以在细胞过程中发挥重要作用, 如发育、分化和抑制恶性细胞转化(肿瘤抑制)。与 DNA 相互作用参与基因的转录调控^[23, 24]。TRERF1 在蛋白质的中心区域和两个羧基末端分别含有一个和两个锌指基序。除了 DNA 结合外, 锌指结构域 C2H2 还参与核定位^[25]、蛋白质-蛋白质相互作用^[26, 27]和 DNA 弯曲^[28]。TRERF1 还包含与其他蛋白质的转录激活有关的基序, 比如在氨基酸 252 和 343 之间的大区域富含谷氨酰胺残基, 谷氨酰胺残基已在包括 Sp1 和 Oct-1 在内的几种蛋白质中检测到了存在转录激活。而残基 553 和 574 之间的区域富含脯氨酸, 它已经被证明形成了一个重要的激活 CTF^[29]和 Oct-2^[30]中的结构域; 以及介于残基 956 和 1003 含有酸性残基并且富含脯氨酸, 其中这样的结构域被证明在 p53 中有重要的作用^[14]。

2. TRERF1 类固醇合成中的作用

TRERF1 常定位于细胞核中, 一级结构的特征表明了其可能具有转录因子特征^[31]。研究发现, 类固醇生物合成所需的许多基因的表达依赖于核受体类固醇生成因子-1 (steroidogenic factor-1, SF-1) 的协调表达。Ramayya 等^[32]发现 SF-1 和 TRERF1 转录物共定位在睾丸和肾上腺皮质, 通过将 TRERF1 在人胎盘 JEG-3 和肾上腺 NCI-H295 中过表达发现, TRERF1 与 SF-1 协同诱导 P450_{scc} 启动子活性, 提高了细胞色素 P450_{scc} 的表达, 最终导致孕酮的产生增加。Florence Gizard 等通过双荧光素酶报告实验, 不仅发现 TRERF1 可以单独增加 P450_{scc} 转录启动子的表达, 还可以通过形成 TRERF1、CBP/p300 和 SF-1 的三元复合物调节人类 P450_{scc} 的基因表达。在肾上腺组织中, TRERF1 特异性参与束层和网织层中的 cAMP 响应基因表达^[33, 34], 特定的调节, 如 P450_{scc}、P450_{c17} 和 P450_{aro} 基因的表达, 说明 TRERF1 的表达可以影响不同途径的类固醇合成, 推测 TRERF1 可能在每个区域特异性甾体生成途径的相对调节中发挥作用。

除此之外, TRERF1 转录物不仅存在于类固醇生成细胞系和组织中, 在表达非常低水平或不表达 P450_{scc} 的细胞和组织, 比如 MCF-7、LNCaP 细胞系, 以及子宫、前列腺、睾丸和大脑中也发现其表达^[35], TRERF1 可通过增加 P450_{c17}、P450_{aro} 的表达影响类固醇的合成。Gizard 等发现 TRERF1 增加 Preg 向糖皮质激素(皮质醇和 11-脱氧皮质醇)、C19 类固醇(4-二酮和 DHEA) 和雌激素(雌

二醇和雌酮)的转化,同时减少 Prog 和盐皮质激素(11-脱氧皮质酮和皮质酮),表明 TRERF1 对 P450c17 依赖性途径有特定的积极作用,荧光素酶报告基因测定证明了 TRERF1 增加由 P450c17 基因的 5'-侧翼区驱动的报告质粒的表达的能力。

TRERF1 还可以与 SF-1 相互作用还可以调节 CYP11A1 基因表达^[36],但是选择性甾体生成基因的 TRERF1 依赖性激活可能涉及其他机制目前还未阐释清楚。已有几种蛋白质与 SF-1 相互作用如: Sp1^[37]、c-Jun^[38]、DAX-1^[39]和 CBP/p300^[40], TRERF1 可能与含有或不含有 SF-1 的转录复合物中的不同蛋白质相互作用,参与类固醇的形成,TRERF1 在肾上腺类固醇生成的激活和调节中起着重要作用。

3. TRERF1 在恶性肿瘤中的作用

3.1 TRERF1 作为转录因子增强 p21、p27 的表达抑制了乳腺癌细胞周期进程

癌细胞增殖受细胞周期分裂、分化和程序性细胞死亡之间的平衡调节。一次细胞周期代表了细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程。包括 G1 期(DNA 合成前期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(DNA 合成后期)、M 期(有丝分裂期),当 M 期结束,形成 2 个子代细胞,标志着一轮细胞周期的结束。

TRERF1 可以作为转录因子与 CBP/p300 和 Wilms 肿瘤抑制蛋白 1(WT-1)相结合,最近研究表明^[41,42], CBP/p300 和 Wilms 肿瘤抑制蛋白 1(WT-1)不仅影响类固醇形成,还可以影响非类固醇生成组织中的细胞增殖和癌症发生。

TRERF1 参与了控制细胞增殖。加拿大学者^[43]以 HeLa 细胞和几种乳腺癌症细胞系为模型,通过过表达和沉默 TRERF1,发现 TRERF1 转染的细胞的选择表达载体导致细胞集落显著减少抑制了 HeLa 细胞和乳腺癌细胞的增殖。进一步研究发现 TRERF1 转录调控破坏了 p21 和 p27 基因启动子的转录因子 Sp1 结合位点,降低 pRB 磷酸化水平,降低 G1 细胞周期蛋白/CDK 复合物的激酶活性^[44]。TRERF1 细胞阻滞在 G1 期抑制细胞周期进程阶段。并停止癌细胞 G1 期到 S 的进展。说明了 TRERF1 的表达与人类乳腺肿瘤的形成和发展呈负相关。表明 TRERF1 作为一种基础细胞生长抑制蛋白发挥作用。

TRERF1 在所有表达雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的细胞系中都表达升高,提示患者有良好疾病预后^[45-47]和对激素治疗的反应的预测标志物^[48]。

TRERF1 基因表达也与肿瘤侵袭性的关键标志物相关。尽管 TRERF1 基因在人类肿瘤中的表达与 c-erb-3 和 c-erb-4 水平呈正相关, c-erb-3 和 c-erb-4 是肿瘤良好预后的标志物^[49]。因此, 需要进一步研究以确定 TRERF1 在原发性乳腺癌症中的表达对患者生存率或无复发生存率的预后价值。

3.2 TRERF1 与乳腺癌治疗中他莫昔芬的耐药性相关

他莫昔芬的内分泌治疗在癌症患者的治疗中起着重要作用^[50]。在晚期疾病中, 只有 50% 的雌激素受体(ER)阳性原发性疾病患者对他莫昔芬有反应, Anieta M 等学者通过培养他莫昔芬耐药细胞株, 应用各种分子策略鉴定了大量可能是他莫昔芬抗性表型基础的逆转录病毒靶基因。发现包括 TRERF1 在内的 7 个基因直接导致他莫昔芬耐药性和雌激素依赖性乳腺癌细胞体外增殖^[51, 52]。并且 TRERF1 与乳腺癌患者无转移生存率 (metastasis-free survival, MFS) 相关, 但预后因素无关。TRERF1 mRNA 水平可能与其作为肿瘤抑制基因的假定功能有关^[43, 44]。说明 TRERF1 基因可能与乳腺癌患者他莫昔芬耐药具有临床相关性。但其是否直接参与细胞进程的具体机制有待进一步研究, 因此不能用作治疗的靶点, 除此之外还发现 TRERF1 也与肿瘤的侵袭性有关, 进一步的深入研究, 有助于实现更好个性化的治疗方法。

3.2 TdIF1 和 TRERF1 可相互作用影响了肺癌细胞的迁移侵袭能力

近期还有学者发现, TRERF1 参与肺癌细胞恶性生物学能力, 其通过与末端脱氧核苷酸转移酶 (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 相互作用, 参与末端脱氧核苷酸转移酶相互作用因子 1 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-Interacting Factor 1, TdIF1) 和 TdT 在胸腺细胞中的 V (D) J 重组^[53], 进而降低了 TdT 活性。TdIF1 是一种与 p65/NF- κ B 高度同源的 DNA 结合蛋白。直接与末端结合脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 聚合酶。TdIF1 在恶性肿瘤细胞中表达增加与患者预后不良有关。可以参与肿瘤生长信号通路, 包括细胞周期, p53 和 HDAC1/2 通路, 被认为是肿瘤潜在的治疗靶点^[54]。TRERF1 与 TdIF1 的亚基相结合, 参与形成一种新型促有丝分裂去乙酰化酶复合物, 调控多种基因表达。而 TdIF1 被刘^[55]等学者在 2022 年证实了可与赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (Lysine-Specific Demethylase 1, LSD1) 可相互作用, 催化 E-cadherin 启动子 H3K4me2 的去甲基化, 从而抑制 E-cadherin 转录, 最终促进 EMT。尽管这些研究发现了 TRERF1

参与肿瘤相关基因的转录调控的机制，但其在肿瘤中的作用机制以及其作为肿瘤新型治疗分子的潜力尚未明确。

3.3 TRERF1 在肿瘤组织中的突变

TRERF1 在染色体上的位置 6p21.1-p12.1^[56]，6 号染色体是人类肿瘤中第四常见的重排染色体^[57]，6p21 基因座是几种癌症中与永生事件相关的突变的热点。导致 TRERF1 表达减少或失活的突变的表达可能与肿瘤的发展有关，乳腺癌患者中 6p21.1 等位基因缺失显示伴随 MCF-7 细胞获得他莫昔芬耐药性^[58]。Ye^[11]等学者，检测了云南省肺癌高发区宣威的非吸烟女性初治肺腺癌患者肿瘤组织和正常肺组织样本，运用 MutSig2CV 和 oncodriveCLUST 算法来识别宣威非吸烟女性肺腺癌中的显著突变基因，发现 TRERF1 突变频率为 11%，较欧美人群高出 1 倍，说明 TRERF1 的突变还可能受到地域、环境以及基因表观遗传的影响。此外，有人认为，编码推定的植物糖基磷脂酰肌醇（GPIM）蛋白的基因可能参与肿瘤抑制^[59]，TRERF1 在一个区域中的映射 TRERF1 在人类肿瘤中的重排及其在细胞增殖调节中的作用，可能是肿瘤抑制基因的候选者。TRERF1 突变与癌症家族易感性和肿瘤发展之间潜在相关性的分析将有待进一步研究。

总结与展望

综上所述，TRERF1 不仅可以转录调控修饰调控胆固醇侧链裂解酶(P450_{scc})的表达，影响胆固醇向孕烯醇酮的转化，在类固醇激素的产生中起着至关重要的作用。此外，在恶性肿瘤细胞中，TRERF1 在转录水平上，通过上调细胞周期依赖性激酶抑制剂 p21 和 p27，降低了 G1 细胞周期蛋白/CDK 复合物的激酶活性和 RB 磷酸化水平，影响了细胞周期 G1 向 S 期的发展，抑制细胞周期进程。TRERF1 转录调控不仅是类固醇生长信号因子的主要靶点，还与肿瘤形成有关，一些研究表明，TRERF1 可能通过与其他与肿瘤相关的基因相互作用包括调控转录因子、生长因子和细胞信号传导途径等影响肿瘤的发展。。近期研究已发现 TRERF1 在乳腺癌、宫颈癌、肺癌中存在突变进一步对 TRERF1 在恶性肿瘤中的作用和机制以及其突变价值有助于认识肿瘤的进展机制，恶性肿瘤中存在较为庞大的分子相互作用网络，针对区域性差异需要更多的研究，进一步探索不同基因之间的相互关联。相信随着对 TRERF1 在肿瘤中进一步研究，其在各类肿瘤中的重要临床意义将受到更多关注，深入研究其在肿瘤发生发展中的作用和机制，为

寻找新的肿瘤诊断标志物、预后指标以及肿瘤基因治疗靶点提供基础。

参考文献

- [1] OLIVER A L. Lung Cancer: Epidemiology and Screening [J]. The Surgical clinics of North America, 2022, 102(3): 335-44.
- [2] MALHOTRA J, MALVEZZI M, NEGRI E, et al. Risk factors for lung cancer worldwide [J]. The European respiratory journal, 2016, 48(3): 889-902.
- [3] ZHANG D L, QU L W, MA L, et al. Genome-wide identification of transcription factors that are critical to non-small cell lung cancer [J]. Cancer letters, 2018, 434(132-43).
- [4] 陈小波, 黄云超, 赵杰等. 宣威地区与非宣威地区肺癌患者临床流行病学特征及病理类型特点分析 现代肿瘤医学 [J]. 2020, 28(15): 2617-21.
- [5] LI J, GUO W, RAN J, et al. Five-year lung cancer mortality risk analysis and topography in Xuan Wei: a spatiotemporal correlation analysis [J]. BMC public health, 2019, 19(1): 173.
- [6] LI J, RAN J, CHEN L C, et al. Bituminous coal combustion and Xuan Wei Lung cancer: a review of the epidemiology, intervention, carcinogens, and carcinogenesis [J]. Archives of toxicology, 2019, 93(3): 573-83.
- [7] LIN H, NING B, LI J, et al. Temporal trend of mortality from major cancers in Xuanwei, China [J]. Frontiers of medicine, 2015, 9(4): 487-95.
- [8] KANWAL M, DING X J, MA Z H, et al. Characterization of germline mutations in familial lung cancer from the Chinese population [J]. Gene, 2018, 641(94-104).
- [9] CHEN Y, HUANG Y, KANWAL M, et al. MUC16 in non-small cell lung cancer patients affected by familial lung cancer and indoor air pollution: clinical characteristics and cell behaviors [J]. Translational lung cancer research, 2019, 8(4): 476-88.
- [10] CHEN Y, LI G, LEI Y, et al. Lung cancer family history and exposure to occupational/domestic coal combustion contribute to variations in clinicopathologic features and gene fusion patterns in non-small cell lung cancer [J]. Thoracic cancer, 2019, 10(4): 695-707.
- [11] ZHANG H, LIU C, LI L, et al. Genomic evidence of lung carcinogenesis associated with coal smoke in Xuanwei area, China [J]. National science review, 2021, 8(12): nwab152.
- [12] GIZARD F, LAVALLÉE B, DEWITTE F, et al. A novel zinc finger protein TRP-132 interacts with CBP/p300 to regulate human CYP11A1 gene expression [J]. The Journal of biological chemistry,

- 2001, 276(36): 33881-92.
- [13] JAMIESON A, FRASER R. Developments in the molecular biology of corticosteroid synthesis and action: implications for an understanding of essential hypertension [J]. *Journal of hypertension*, 1994, 12(5): 503-9.
 - [14] UNGER T, NAU M M, SEGAL S, et al. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer [J]. *The EMBO journal*, 1992, 11(4): 1383-90.
 - [15] KLUG A, SCHWABE J W. Protein motifs 5. Zinc fingers [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1995, 9(8): 597-604.
 - [16] RAZIN S V, BORUNOVA V V, MAKSIMENKO O G, et al. Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members [J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2012, 77(3): 217-26.
 - [17] MITCHELL P J, TJIAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins [J]. *Science (New York, NY)*, 1989, 245(4916): 371-8.
 - [18] MORRIS J F, MADDEN S L, TOURNAY O E, et al. Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus [J]. *Oncogene*, 1991, 6(12): 2339-48.
 - [19] LEMAIRE P, VESQUE C, SCHMITT J, et al. The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator [J]. *Molecular and cellular biology*, 1990, 10(7): 3456-67.
 - [20] FAN C M, MANIATIS T. A DNA-binding protein containing two widely separated zinc finger motifs that recognize the same DNA sequence [J]. *Genes & development*, 1990, 4(1): 29-42.
 - [21] VAN 'T VEER L J, LUTZ P M, ISSELBACHER K J, et al. Structure and expression of major histocompatibility complex-binding protein 2, a 275-kDa zinc finger protein that binds to an enhancer of major histocompatibility complex class I genes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(19): 8971-5.
 - [22] RADTKE F, HUG M, GEORGIEV O, et al. Differential sensitivity of zinc finger transcription factors MTF-1, Sp1 and Krox-20 to CpG methylation of their binding sites [J]. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 1996, 377(1): 47-56.
 - [23] HOFFMANN A, BARZ T, SPENGLER D. Multitasking C2H2 zinc fingers link Zac DNA binding to coordinated regulation of p300-histone acetyltransferase activity [J]. *Molecular and cellular*

- biology, 2006, 26(14): 5544-57.
- [24] HOFFMANN A, SPENGLER D. A new coactivator function for Zacl's C2H2 zinc finger DNA-binding domain in selectively controlling PCAF activity [J]. Molecular and cellular biology, 2008, 28(19): 6078-93.
- [25] MATHENY C, DAY M L, MILBRANDT J. The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain [J]. The Journal of biological chemistry, 1994, 269(11): 8176-81.
- [26] MERIKA M, ORKIN S H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF [J]. Molecular and cellular biology, 1995, 15(5): 2437-47.
- [27] KOBAYASHI A, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene [J]. The Journal of biological chemistry, 1996, 271(21): 12310-6.
- [28] SJØTTEM E, ANDERSEN C, JOHANSEN T. Structural and functional analyses of DNA bending induced by Sp1 family transcription factors [J]. Journal of molecular biology, 1997, 267(3): 490-504.
- [29] MERMOD N, O'NEILL E A, KELLY T J, et al. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain [J]. Cell, 1989, 58(4): 741-53.
- [30] TANAKA M, CLOUSTON W M, HERR W. The Oct-2 glutamine-rich and proline-rich activation domains can synergize with each other or duplicates of themselves to activate transcription [J]. Molecular and cellular biology, 1994, 14(9): 6046-55.
- [31] HEERY D M, KALKHOVEN E, HOARE S, et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors [J]. Nature, 1997, 387(6634): 733-6.
- [32] RAMAYYA M S, ZHOU J, KINO T, et al. Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies [J]. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1997, 82(6): 1799-806.
- [33] BIRD I M, HANLEY N A, WORD R A, et al. Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion [J]. Endocrinology, 1993, 133(4): 1555-

- [34] DENNER K, RAINEY W E, PEZZI V, et al. Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 1996, 121(1): 87-91.
- [35] DUGUAY Y, LAPOINTE A, LAVALLÉE B, et al. Cloning of murine TReP-132, a novel transcription factor expressed in brain regions involved in behavioral and psychiatric disorders [J]. *Molecular psychiatry*, 2003, 8(1): 39-49.
- [36] GIZARD F, LAVALLEE B, DEWITTE F, et al. The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450scc gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277(42): 39144-55.
- [37] LIU Z, SIMPSON E R. Molecular mechanism for cooperation between Sp1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) to regulate bovine CYP11A gene expression [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 1999, 153(1-2): 183-96.
- [38] HUANG Y, HU M, HSU N, et al. Action of hormone responsive sequence in 2.3 kb promoter of CYP11A1 [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2001, 175(1-2): 205-10.
- [39] LALLI E, MELNER M H, STOCCO D M, et al. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(10): 4237-43.
- [40] MONTÉ D, DEWITTE F, HUM D W. Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300 [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(8): 4585-91.
- [41] CHEN Q, YANG B, LIU X, et al. Histone acetyltransferases CBP/p300 in tumorigenesis and CBP/p300 inhibitors as promising novel anticancer agents [J]. *Theranostics*, 2022, 12(11): 4935-48.
- [42] PORCEL J M. Biomarkers in the diagnosis of pleural diseases: a 2018 update [J]. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 2018, 12.
- [43] GIZARD F, ROBILLARD R, BARBIER O, et al. TReP-132 controls cell proliferation by regulating the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/Cip1 and p27Kip1 [J]. *Molecular and cellular biology*, 2005, 25(11): 4335-48.
- [44] GIZARD F, ROBILLARD R, GROSS B, et al. TReP-132 is a novel progesterone receptor coactivator required for the inhibition of breast cancer cell growth and enhancement of differentiation by progesterone [J]. *Molecular and cellular biology*, 2006, 26(20): 7632-44.

- [45] CLARK G M, MCGUIRE W L, HUBAY C A, et al. Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer [J]. The New England journal of medicine, 1983, 309(22): 1343-7.
- [46] WAKS A G, WINER E P. Breast Cancer Treatment [J]. Jama, 2019, 321(3): 316.
- [47] SHEN Y T, HUANG X, ZHANG G, et al. Pan-Cancer Prognostic Role and Targeting Potential of the Estrogen-Progesterone Axis [J]. Frontiers in oncology, 2021, 11(636365).
- [48] YIN L, DUAN J J, BIAN X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. Breast cancer research : BCR, 2020, 22(1): 61.
- [49] VAIDYA P, KAWARADA Y, HIGASHIGUCHI T, et al. Overexpression of different members of the type 1 growth factor receptor family and their association with cell proliferation in periampullary carcinoma [J]. The Journal of pathology, 1996, 178(2): 140-5.
- [50] OSBORNE C K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer [J]. The New England journal of medicine, 1998, 339(22): 1609-18.
- [51] VAN AGTHOVEN T, VAN AGTHOVEN T L, DEKKER A, et al. Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells [J]. The EMBO journal, 1998, 17(10): 2799-808.
- [52] BRINKMAN A, VAN DER FLIER S, KOK E M, et al. BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92(2): 112-20.
- [53] FUJISAKI S, SATO A, TOYOMOTO T, et al. Direct binding of TReP-132 with TdT results in reduction of TdT activity [J]. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 2006, 11(1): 47-57.
- [54] ZHANG Y, WANG Z, HUANG Y, et al. TdIF1: a putative oncogene in NSCLC tumor progression [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2018, 3:28.
- [55] LIU Q, XIONG J, XU D, et al. TdIF1-LSD1 Axis Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis via Histone Demethylation of E-Cadherin Promoter in Lung Cancer [J]. International journal of molecular sciences, 2021, 23(1):
- [56] GIZARD F, EL-ALFY M, DUGUAY Y, et al. Function of the transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) on human P450scc gene expression [J]. Endocrine research, 2002, 28(4): 559-74.

- [57] TEYSSIER J R, FERRE D. Identification of a clustering of chromosomal breakpoints in the analysis of 203 human primary solid tumor non specific karyotypic rearrangements [J]. Anticancer research, 1992, 12(3): 997-1004.
- [58] VAN AGTHOVEN T, SIEUWERTS A M, MEIJER-VAN GELDER M E, et al. Relevance of breast cancer antiestrogen resistance genes in human breast cancer progression and tamoxifen resistance [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009, 27(4): 542-9.
- [59] ANGLESIO M S, PAPADOPOULOS N, AYHAN A, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer [J]. The New England journal of medicine, 2017, 376(19): 1835-48.