

基于 NOD2 介导的 AMPK/mTOR 信号通路探讨 宫颈癌细胞恶性行为的机制

杜瑞亭,伍东月,郭清民,靳冬梅

摘要 **目的** 基于核苷酸结合寡聚化结构域受体 2 (NOD2) 介导的 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK)/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路探讨宫颈癌 (CC) 细胞恶性行为的机制。**方法** 生物信息学分析确定 NOD2 在 CC 组织中的表达。将靶向 NOD2 (shNOD2)、shRNAs 阴性对照 (shNC) 以及 NOD2 过表达 (NOD2) 质粒和载体 (Vec) 转染 CC 细胞。通过 CCK-8 测定、集落形成和 Transwell 细胞侵袭测定来确定 NOD2 对 CC 细胞生长的影响。通过高通量 RNA 测序 (RNA-Seq) 进行转录组分析。Western blot 试验检测细胞系中 NOD2、AMPK/mTOR 信号通路和自噬蛋白的表达。24 只雌性 BALB/c 裸鼠随机分为 4 组,每组 6 只:载体组 (Vec 组)、NOD2 过表达组 (NOD2 组)、shNC 组和 shNOD2 组。构建小鼠远处转移模型,监测肺转移的荧光强度,计数肺转移结节的数量。**结果** 在线数据库分析显示,NOD2 在 CC 组织中表达明显高于正常组织,并且不同分期的 CC 中 NOD2 的 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,NOD2 的高表达与较差的总生存期和无病生存期相关 ($P < 0.05$)。NOD2 过表达对 CC 细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭具有促进作用,而 NOD2 敲低则相反。与体外结果一致,在转移的小鼠尾静脉注射模型中,NOD2 组 CC 细胞的肺定殖、肺转移灶较 Vec 组增加 ($P < 0.05$),而 shNOD2 组 CC 细胞的肺定殖、肺转移灶较 shNC 组减少 ($P < 0.05$)。RNA-Seq 结果显示 NOD2 表达与 AMPK 信号激活、mTOR 信号抑制、自噬调节途径激活和自噬体形成显著相关。与 shNC 组相比,shNOD2 组磷酸化 AMPK、LC3 蛋白表达水平减少 ($P < 0.05$),磷酸化 mTOR、p62 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$);与 Vec 组相比,NOD2 组 LC3、AMPK 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$),磷酸化 mTOR、p62 蛋白表达水平减少 ($P < 0.05$)。与 shNC 组相比,shNOD2 组 GFP-mRFP-LC3 的点积累减少 ($P < 0.05$);与 Vec 组相比,GFP-mRFP-LC3 的点积累增加 ($P < 0.05$)。**结论** NOD2 可能通过 AMPK/mTOR 信号促进 CC 增殖、迁移和侵袭,其作用机制部分涉及自噬激活。

关键词 核苷酸结合寡聚化结构域受体 2;AMP 活化蛋白激酶;雷帕霉素靶蛋白;宫颈癌细胞;自噬

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0316-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.022

宫颈癌 (cervical cancer, CC) 是女性癌症相关死亡的主要原因,每年估计有 530 000 例新病例和 270 000 例死亡^[1]。由于转移和复发,CC 患者预后不良,生存率低^[2]。因此,寻找 CC 的分子标志物进行早期诊断和靶向治疗对于提高生存率至关重要。模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 是检测病原体特异性分子的宿主传感器,是抵御感染的第一道防线^[3]。核苷酸结合寡聚化结构域受体 2 (nucleotide-binding oligomerization domain receptor 2, NOD2) 是细胞上/细胞中表达的主要 PRRs,能识别入侵的病原体并介导致癌作用^[4-5]。研究^[6]证实 NOD2 上调通过正调节人类鳞状宫颈癌的致瘤性和转移促进癌症进展。然而,NOD2 在 CC 中的功能在很大程度上是未知的。自噬是一种溶酶体依赖的分解代谢途径,通过该途径清除受损或衰老的细胞器^[7]。证据^[7]表明,自噬可以增强化疗期间癌细胞的获得性耐药性。NOD2 作为自噬的诱导因子^[8],是否介导 CC 的病理机制仍不清楚。该研究探讨了 NOD2 对 CC 细胞生物行为和相关信号通路及自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 基因表达谱交互式分析 (GEPIA) 在线数据库分析 对 GEPIA 在线数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 的 CC 组织中 NOD2 的相对 mRNA 水平进行分析,包括 306 例 CC 患者和 13 例非癌患者。对 NOD2 的 mRNA 表达水平进行 Log2 转换,将 CESC 患者分为 NOD2 高表达和低表达两组,建立总体生存期的 Kaplan-Meier 生存曲线分析。

1.2 细胞系与培养 人 CC 细胞 (HeLa、SiHa、CaSki 和 ME-180) 和人宫颈上皮细胞系 Ect1/E6E7 来

2023-12-10 接收

基金项目:青海省 2021 年卫生健康系统重点课题 (编号:2021-wjzd-012)

作者单位:青海省人民医院妇科,西宁 810007

作者简介:杜瑞亭,女,主治医师;

靳冬梅,女,副主任医师,责任作者,E-mail:2608217@qq.com

自中国科学院细胞库。Ect1/E6E7 细胞在补充有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基(美国 Gibco 公司)中培养, HeLa、SiHa、CaSki 和 ME-180 细胞在 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)中培养。

1.3 细胞转染 由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成了靶向 NOD2(shNOD2)和 shRNAs 阴性对照(shNC)。细胞培养至 30%~50% 汇合,用 siLent-Fect 脂质试剂(美国 Bio-Rad 公司)转染 shRNAs。将 NOD2 的全长序列克隆到 pcDNA3.1 载体(美国 Invitrogen 公司)中,构建 NOD2 过表达(简称为: NOD2)质粒,同时将空载体用作阴性对照(Vec)。当细胞达到大约 90% 汇合时,用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)转染质粒。48 h 后收获转染的细胞用于随后的实验。

1.4 CCK-8 增殖试验 用 CCK-8 法(美国 APEX-BIO 公司)测定 CC 细胞的增殖能力。将对数生长期的细胞以 1 000 个/孔接种到 96 孔板中,并将 10 μ l 细胞 CCK-8 溶液添加到每个孔中,然后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。用分光光度计计算 450 nm 波长处的吸光度,共 3 次。

1.5 集落形成试验 收集 CC 细胞,将 1×10^3 个细胞接种到 6 孔板中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10 d。去除培养基后,用甲醇固定细胞,并用 0.1% 结晶紫染色。然后计数并记录集落数。

1.6 细胞迁移和侵袭分析 使用 Transwell 测定评估细胞迁移和侵袭。将转染后的 HeLa、SiHa 细胞重悬于不含 FBS 的培养基中并调整细胞密度至 2×10^5 个/200 μ l。然后,将 100 μ l 细胞悬浮液加入 Matrigel 基质胶包被或未包被的 Transwell 上室(美国 BD Biosciences 公司)中,并将含有 10% 血清的 500 μ l 培养基加入到下室中。在 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后,Transwell 小室用 PBS 洗涤 3 次,细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,然后用结晶紫染色 30 min,用棉签轻轻去除室上表面的基质胶和细胞。在显微镜下计数渗入 Transwell 室膜的肿瘤细胞数。

1.7 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)分析 将 HeLa 细胞或 SiHa 细胞接种到 6 孔板中,培养 24 h。加入 EdU 溶液(瑞士 Roche 公司),将细胞培养 2 h。用多聚甲醛固定细胞 30 min,加入甘氨酸溶液 5 min。加入 DAPI 对细胞核进行染色。将细胞固定在荧光显微镜下拍照。

1.8 Western blot 试验 用冷 PBS 洗涤细胞,然后在冰上用裂解缓冲液孵育 30 min,将细胞刮下并收获。离心后,收集含有裂解物的上清液并于 -80 $^{\circ}$ C

下储存。通过 BCA 检测试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)测定蛋白质浓度。将蛋白质样品变性,随后通过 SDS-PAGE 分离,并转移到 PVDF 膜(瑞士 Roche Life Sciences 公司)上。在脱脂牛奶中孵育 1 h 后,使用以下一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司)在 4 $^{\circ}$ C 下处理膜过夜: NOD2、AMPK、p-AMPK (Thr172)、mTOR、p-mTOR (Ser2448)、LC3、p62 和 GAPDH(均 1:1 000)。洗涤 3 次后,将膜与山羊抗小鼠或抗兔 HRP 偶联二抗(1:2 000,美国 Cell Signaling Technology 公司)一起孵育。通过 ECL 检测试剂盒(美国 Pierce Biotechnology 公司)检测信号。

1.9 RNA 测序(RNA sequence, RNA-Seq) 由上海其明信息技术有限公司进行 RNA-Seq 分析。提取来自用 shNC 和 shNOD2 转染的 HeLa 细胞的总 RNA($n=3$)。将高质量的 RNA 样品转化成 cDNA 文库。纯化后的产物经过 12~15 轮的 PCR 扩增,形成最终的 cDNA 文库。然后按照制造商的方案在 Illumina HiSeq X Ten 上对文库进行测序。倍数变化 >1.5 和 $P<0.05$ 代表差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。

1.10 GFP-mRFP-LC3 检测自噬体 使用 GFP-mRFP-LC3 慢病毒[和元生物技术(上海)股份有限公司]评估自噬体。然后在 LSM710 共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)下观察自噬体的定位和定量。自噬体被标记为红色和绿色(黄色荧光),而自噬溶酶体被标记为红色。

1.11 动物实验 24 只雌性 BALB/c 裸鼠(6~8 周龄,18~20 g)由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,并在无特定病原体条件下饲养。将小鼠随机分为 4 组,每组 6 只:载体组(Vec 组)、NOD2 过表达组(NOD2 组)、shNC 组和 shNOD2 组。Vec 组和 NOD2 组小鼠尾静脉注射转染 Vec 或 NOD2 的 SiHa 细胞(1×10^6 个细胞),shNC 组和 shNOD2 组小鼠尾静脉注射转染 shNC 和 shNOD2 的 HeLa 细胞(1×10^6 个细胞),以构建远处转移模型。通过 Xenogen IVIS 光谱体内成像系统(美国 PerkinElmer 公司)监测肺转移的荧光强度。8 周后,解剖裸鼠的肺,计数肉眼可见的转移结节的数量。

1.12 统计学处理 使用 SPSS 22.0 进行统计分析。实验测定的结果均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。两组间比较采用学生 t 检验。多组间的比较采用单向或双向方差分析(ANOVA),然后进行事后 Tukey 或 Dunnett 多重比较检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NOD2 与宫颈癌的不良结局相关 采用基因表达谱交互式分析 (GEPIA, <http://gepia.cancer-pku.cn/>) 结合了基因型-组织表达 (GTEX) 数据集, 包括 306 例宫颈癌患者和 13 例非癌患者, 用于检测 NOD2 的 mRNA 表达, 并证明 NOD2 在 CC 组织中表达明显高于正常组织, 并且不同分期的 CC 中 NOD2 的 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1A、B)。使用 TCGA 数据集对生存数据的分析揭示, 在宫颈鳞状细胞癌和宫颈腺癌 (cervical squamous cell carcinoma, CESC) 中, NOD2 的高表达与较差的总生存期和无病生存期相关 (图 1C、D)。为了确定 NOD2 的功能作用, 课题组检测了 NOD2 在 CC 细胞 (HeLa、SiHa、CaSki 和 ME-180) 和人宫颈上皮细胞系 Ect1/E6E7 中的表达, 结果显示 NOD2 在 CC 细胞中表达显著上调, 其中与 Ect1/E6E7 细胞相比, NOD2 在 HeLa 细胞中表达相对较高, 在 SiHa 细胞中表达相对较低 (图 1E)。

2.2 NOD2 正向调节 CC 细胞增殖 根据 NOD2 在 CC 细胞系中的表达谱, 将 NOD2 高表达的 HeLa

细胞用于沉默 NOD2, 和低 NOD2 表达的 SiHa 细胞中稳定过表达 NOD2 (图 2A)。增殖分析结果表明, 与 shNC 组相比, shNOD2 组 HeLa 细胞活力 ($F = 9.14, P < 0.01$)、集落数、EdU 阳性细胞率均显著降低 ($t = 8.77, 10.32$, 均 $P < 0.01$) (图 2B ~ D); 与 Vec 组相比, NOD2 组 SiHa 细胞活力 ($F = 11.29, P < 0.01$)、集落数、EdU 阳性细胞率均增加 ($t = 4.81, 4.61$, 均 $P < 0.01$) (图 2E ~ G)。

2.3 NOD2 对 CC 细胞体内转移的抑制作用

Transwell 侵袭试验显示, 与 shNC 组相比, shNOD2 组 HeLa 细胞迁移和侵袭数均降低 ($t = 4.70, 5.54, P = 0.003, < 0.01$) (图 3A); 与 Vec 组相比, NOD2 组 SiHa 细胞迁移和侵袭数均增加 ($t = 4.66, 4.73, P = 0.003, 0.003$) (图 3B)。为了评估 NOD2 在 CC 细胞体内转移中的功能作用, 通过尾静脉将稳定转染的 CC 细胞注射到裸鼠中以产生肺转移模型。8 周后, 与 shNC 组相比, shNOD2 组中 HeLa 细胞的肺定殖、肺转移灶减少 ($t = 4.36, 4.52, P = 0.009, 0.007$) (图 3C、D); 与 Vec 组相比, NOD2 组中 SiHa 细胞的肺定殖、肺转移灶增加 ($t = 4.38, 3.81, P = 0.009, 0.015$) (图 3E、F)。

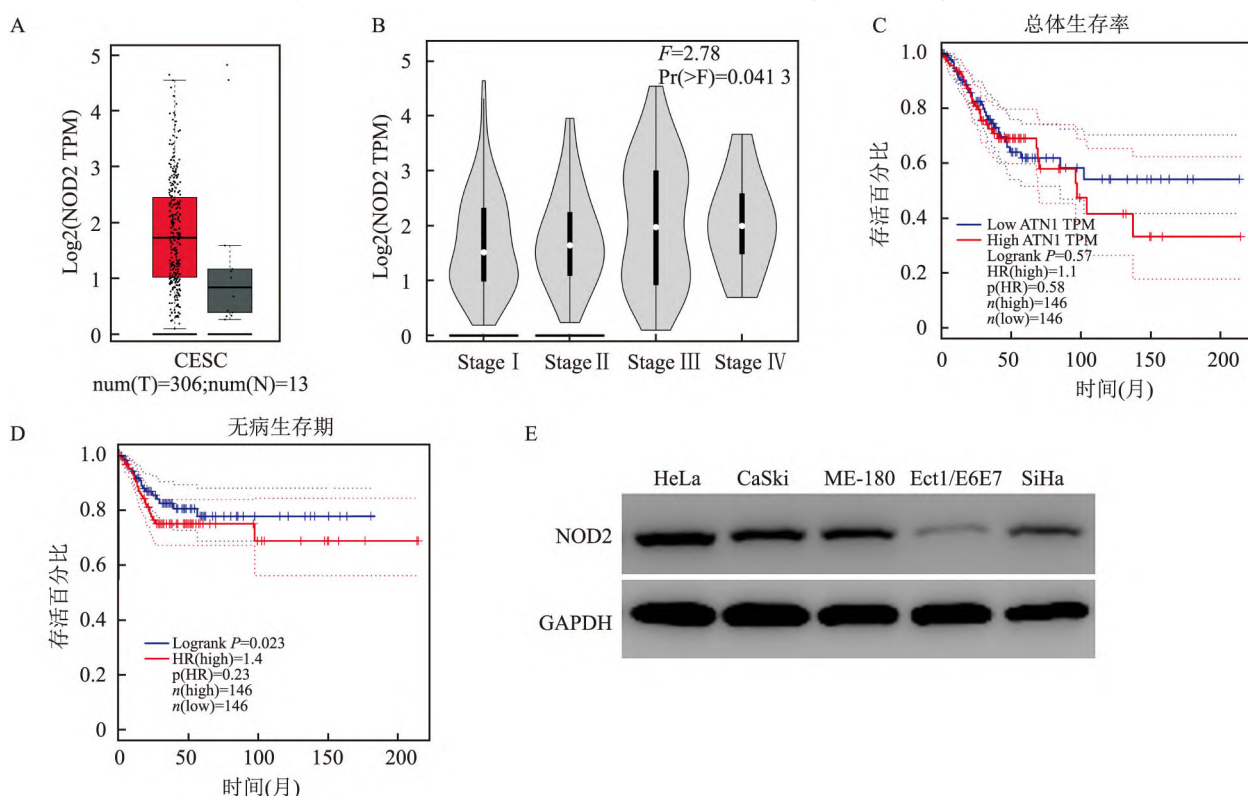


图1 NOD2 在 CC 中升高, 预示宫颈癌患者预后不良

A: 在线数据库的宫颈癌组织中的 NOD2 mRNA 水平; B: 在线数据库的不同分期宫颈癌组织中 NOD2 mRNA 水平; C: GEPIA 数据库中 NOD2 表达和总生存期的相关性; D: GEPIA 数据库中 NOD2 表达和无病生存期之间的相关性; E: Western blot 试验分析 CC 细胞 (HeLa、SiHa、CaSki 和 ME-180) 和人宫颈上皮细胞系 Ect1/E6E7 中 NOD2 表达水平

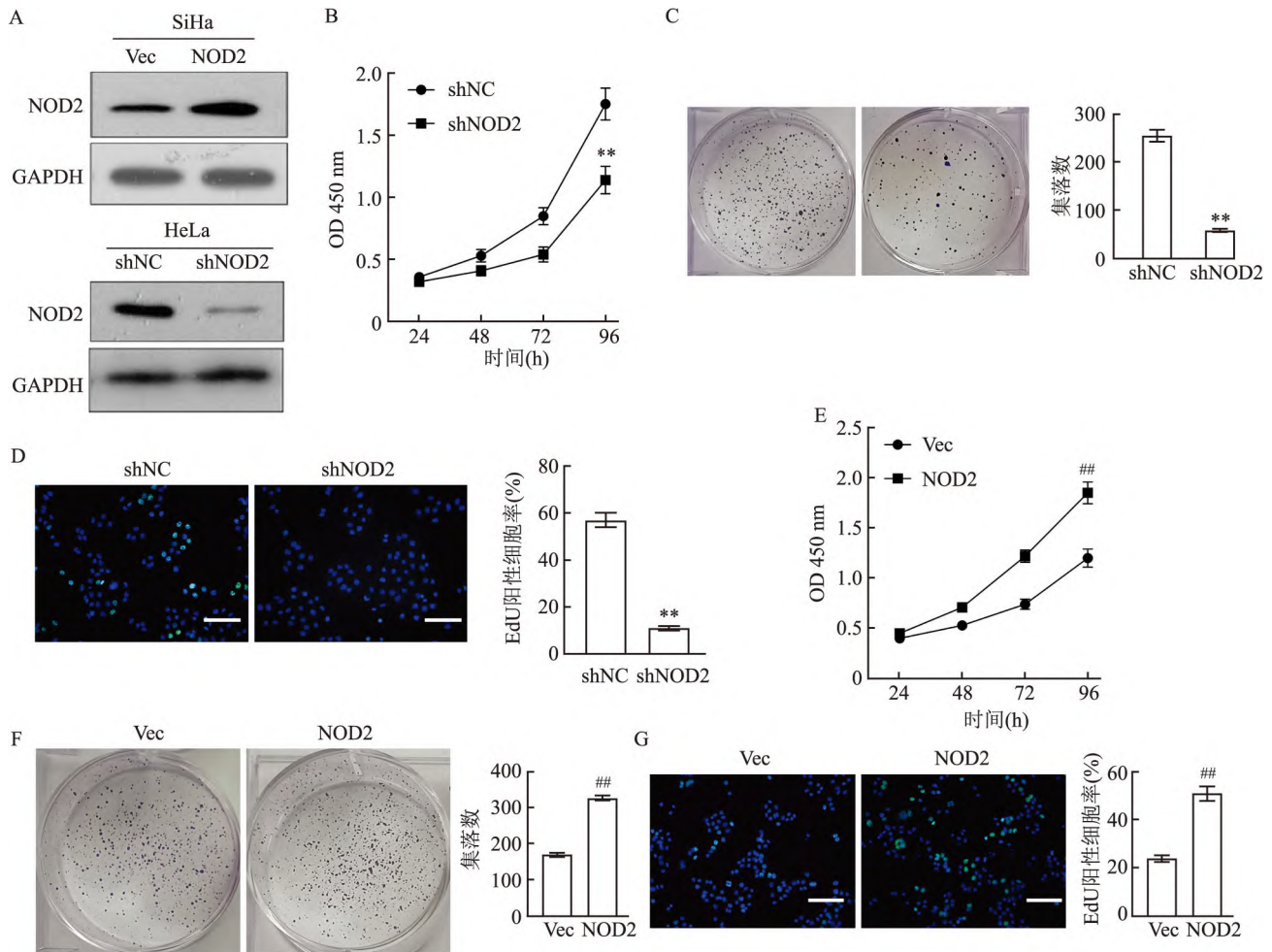


图2 NOD2 正向调节 CC 细胞增殖 ×50

A: Western blot 试验分析 HeLa 和 SiHa 细胞转染后 NOD2 表达; B: CCK-8 测定 HeLa 细胞的活力; C、D: 集落形成和 EdU 测定 HeLa 细胞的增殖能力; E: CCK-8 测定 SiHa 细胞的活力; F、G: 集落形成和 EdU 测定 SiHa 细胞的增殖能力; 与 shNC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Vec 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 NOD2 调控 AMPK/mTOR 信号通路 为进一步探索 NOD2 抑制 CC 进展的机制, 用 shNC 和 shNOD2 转染的 HeLa 细胞中, 通过高通量 RNA 测序 (RNA-Seq) 进行转录组分析。在 NOD2 下调的 HeLa 细胞中, 451 个差异表达的基因 (DEGs) 上调, 892 个 DEGs 下调。随后, 基因集合富集分析 (GSEA) 结果显示 NOD2 的表达与 AMPK 信号激活和 mTOR 信号抑制显著相关, 表明 NOD2 在 AMPK/mTOR 信号中的潜在调节作用 (图 4A、B)。Western blot 试验分析显示, 与 shNC 组相比, shNOD2 组磷酸化 AMPK 蛋白的表达水平降低 ($t = 9.05, P < 0.01$), 磷酸化 mTOR 蛋白的表达水平增加 ($t = 11.59, P < 0.01$); 与 Vec 组相比, NOD2 组磷酸化 AMPK 蛋白的表达水平增加 ($t = 4.70, P < 0.01$), 和磷酸化 mTOR 蛋白的表达水平降低 ($t = 9.36, P < 0.01$) (图 4C)。

2.5 NOD2 通过 AMPK/mTOR 信号介导 CC 细胞的自噬激活 此外, GSEA 结果显示, NOD2 的表达与自噬调节途径激活、自噬体形成显著相关, 表明 NOD2 在自噬调节中的潜在调节作用 (图 5A、B)。因此, 进一步评估 NOD2 在自噬调节中的功能作用。首先, 用 GFP-mRFP-LC3 转染 CC 细胞以评估自噬流的形成。与 shNC 组相比, shNOD2 组 GFP-mRFP-LC3 的点积累减少 ($t = 4.78, P < 0.01$); 与 Vec 组相比, NOD2 的 GFP-mRFP-LC3 的点积累增加 ($t = 4.52, P < 0.01$) (图 5C、D)。此外, Western blot 试验分析显示, 与 shNC 组相比, shNOD2 组 LC3 表达水平减少 ($t = 7.13, P < 0.01$), p62 表达水平增加 ($t = 6.61, P < 0.01$); 与 Vec 组相比, NOD2 组 LC3 表达水平显著增加 ($t = 8.43, P < 0.01$), p62 表达水平减少 ($t = 8.75, P < 0.01$) (图 5E)。

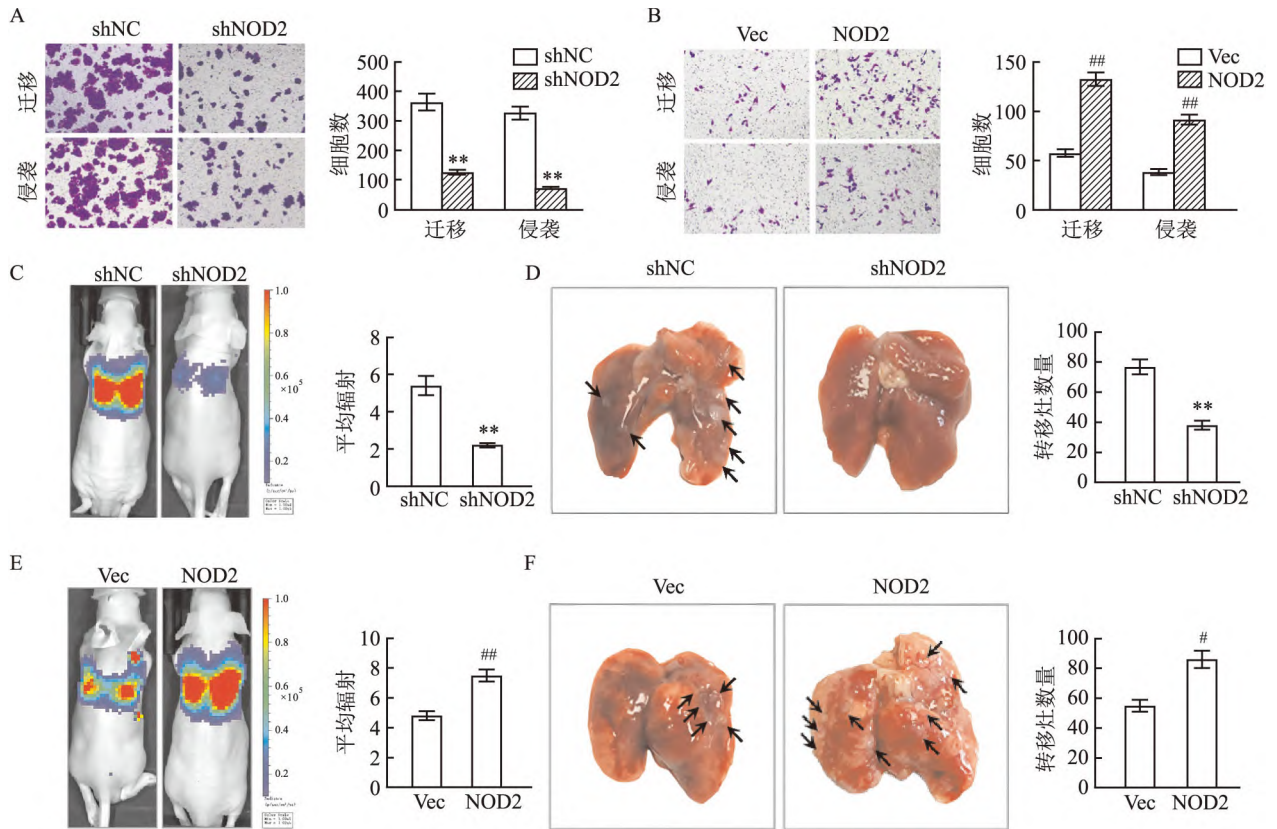


图3 NOD2对CC细胞体内外转移的抑制作用

A、B; Transwell 分析 HeLa 细胞和 SiHa 细胞迁移和侵袭能力; C、D; 注射经 shNC、shNOD2 转染的 HeLa 细胞后 8 周拍摄图像及肺转移灶定量分析; E、F; 注射经 Vec、NOD2 转染的 SiHa 细胞后 8 周拍摄图像及肺转移灶定量分析; 与 shNC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Vec 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

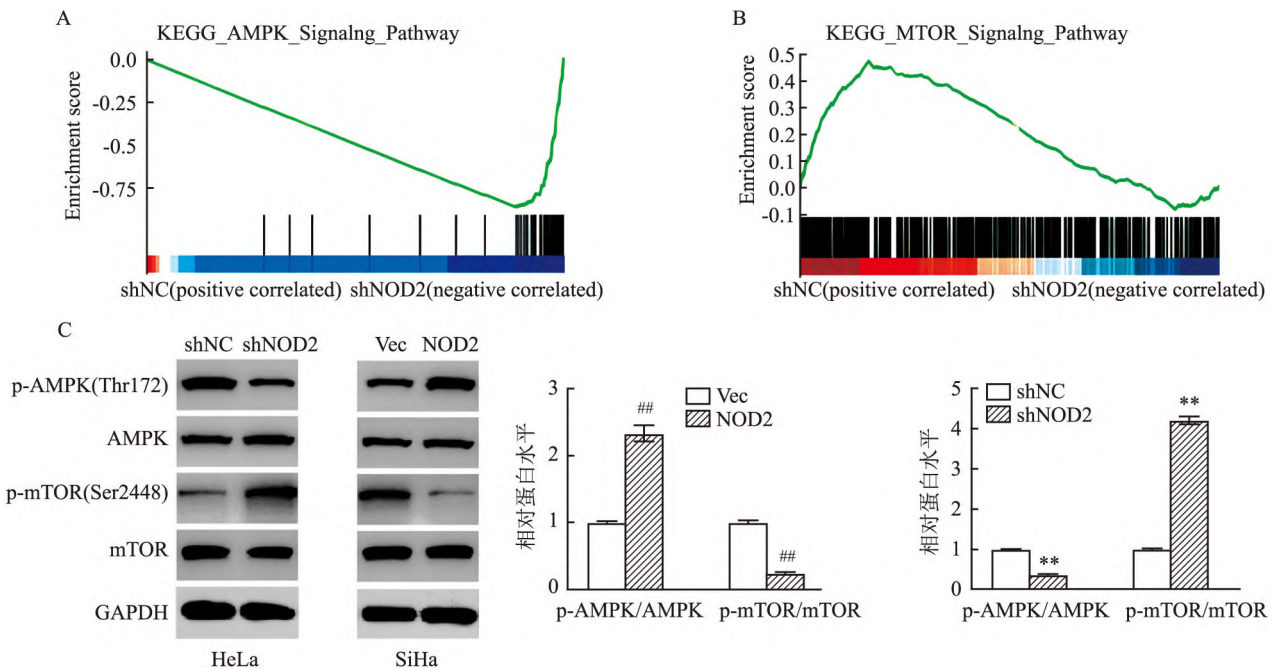


图4 NOD2对CC细胞AMPK/mTOR信号通路的影响

A、B; GSEA 用于鉴定用 shNC 和 shNOD2 转染的 HeLa 细胞的 AMPK 信号、mTOR 信号相关的基因分布; C; Western blot 试验分析 HeLa 和 SiHa 细胞中 AMPK/mTOR 信号表达; 与 shNC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Vec 组比较: ## $P < 0.01$

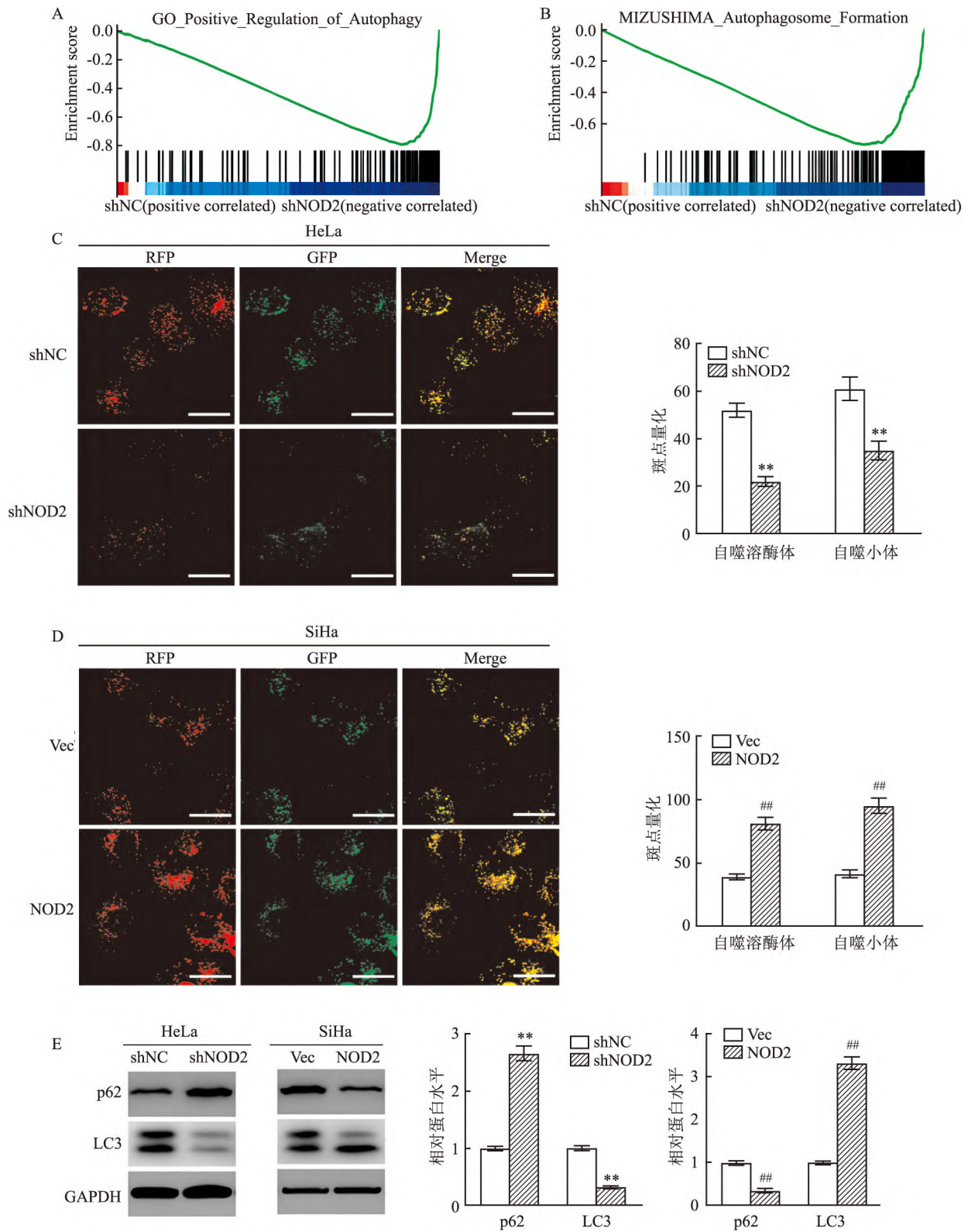


图5 NOD2 通过 AMPK/mTOR 信号介导 CC 细胞的自噬激活

A、B: GSEA 用于鉴定用 shNC 和 shNOD2 转染的 HeLa 细胞的自噬相关途径和自噬小体形成基因组中的基因分布; C、D: 监测用 GFP-mRFP-LC3 慢病毒转染的 HeLa 和 SiHa 细胞中自噬流的形成; E: Western blot 试验分析 HeLa 和 SiHa 细胞中 LC3 以及 p62 蛋白水平; 与 shNC 组比较: * $P < 0.01$; 与 Vec 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

近年来,尽管 CC 的临床治疗取得了进展,但预后仍不令人满意^[9]。因此,迫切需要确定更可靠的治疗靶点并阐明其对 CC 进展的影响。本研究使用一系列体外和体内功能丧失和获得实验验证了 NOD2 在抑制 CC 进展中的作用。首先,对在线数据库的分析显示 NOD2 在 CC 组织中上调,并且 NOD2 的表达水平与较差的预后相关。使用各种功能实验来评估 NOD2 在 CC 细胞的增殖、迁移和侵袭中的作用。NOD2 显示出恶性表型。一系列功能获得实验证实 NOD2 在促进 CC 进展中的作用,显示 NOD2 可以通过激活 AMPK/mTOR/自噬信号传导促进 CC 细胞进展。

转移性和复发性 CC 是高度难治的肿瘤,治疗具有挑战性。先前的研究^[10]表明,几种 PRRs 与 CC 的发展有关。PRRs 的 NLR 家族已在宿主免疫防御中得到鉴定,其成员 NOD2 广泛表达于女性生殖器官,包括子宫内膜、输卵管、子宫颈和外子宫颈^[8]。NOD2 在 CC 的发展中起重要作用,其失调推动宫颈上皮内瘤变发展为 CC^[11]。研究^[8]中,与正常子宫颈相比,CSCC 组织中检测到较高水平的 NOD2,尤其在 LVSI、淋巴结转移和低分化肿瘤中特别高表达,并与较差的生存率相关。本研究中,与 Ect1/E6E7 细胞相比,NOD2 在 CC 细胞中表达显著上调。这与在结肠癌转移和乳腺癌细胞系中观察到的 NOD2 表达增加一致^[12-13]。随后,体外功能获得和丧失实验强调了 NOD2 在促进 CC 细胞增殖、迁移和侵袭中的重要作用。尾静脉注射模型显示,NOD2 过表达导致 CC 细胞体内远端器官的转移率增加。这些体内和体外结果表明,特异性靶向 NOD2 的 shRNAs 可以有效抑制 CC 生长和转移。然而,NOD2 促进 CC 进展的潜在机制尚未完全研究。

为进一步探索 NOD2 促进 CC 进展的机制,在用 shNC 和 shNOD2 转染的 HeLa 细胞中,通过 RNA-Seq 进行转录组分析显示 NOD2 的表达与 AMPK 信号激活和 mTOR 信号抑制显著相关,表明 NOD2 在 AMPK/mTOR 信号中的潜在调节作用。研究^[14]显示,AMPK/mTOR 信号通路激活可诱导癌细胞自噬和自噬性死亡,从而促进肿瘤的发生和发展。例如,Liu et al^[15]报道 BDH2 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号传导抑制肿瘤进展。Tang et al^[16]表明沉默 AMPK/mTOR 信号通路抑制 GBM 的进展。另一项研究^[17]表明,盐霉素可以通过增加活性氧的产生,

从而激活 PI3K/AKT/mTOR 和 ERK/p38 MAPK 信号通路,促进细胞自噬。本研究中,NOD2 的表达与 AMPK 信号激活和 mTOR 信号抑制相关,表明 NOD2 在 AMPK/mTOR 信号中的潜在调节作用。因此,癌细胞利用 NOD2 的细胞保护能力来创造促进癌细胞存活的微环境。

自噬是一种溶酶体依赖的分解代谢途径,通过该途径清除受损或衰老的细胞器。自噬在调节癌症进展和确定肿瘤细胞对化疗诱导的应激的反应中起重要作用^[10]。然而,自噬在癌症治疗中的作用是多方面的,取决于细胞类型、微环境和肿瘤发展的阶段^[18]。迄今为止,已经描述了细胞保护性和细胞毒性功能形式的自噬,其中细胞保护性自噬在对化疗的反应中更为频繁^[7]。一系列证据表明,自噬通过促进癌细胞存活、细胞增殖、EMT 以及耐药性,在恶性肿瘤的发生发展中发挥细胞保护作用^[19]。AMPK/mTOR 信号的激活已被证明与自噬激活相关^[17]。本研究证实 NOD2 的表达与自噬调节途径、自噬体形成显著相关,表明 NOD2 在自噬中的潜在调节作用。

综上所述,这项研究表明,NOD2 可能通过 AMPK/mTOR 信号促进 CC 增殖、迁移和侵袭,其作用机制部分涉及自噬激活。因此,靶向 NOD2 可能是治疗 CC 的有前途的治疗靶点。

参考文献

- [1] Li X, Zhang Q, Chen G, et al. Multi-omics analysis showed the clinical value of gene signatures of C1QC + and SPP1 + TAMs in cervical cancer[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 694801.
- [2] Tan J, Yang L, Zhao H, et al. The role of NFATc1/c-myc/PKM2/IL-10 axis in activating cervical cancer tumor-associated M2 macrophage polarization to promote cervical cancer progression[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 413(2): 113052.
- [3] Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 291.
- [4] Wang Y, Miao Z, Qin X, et al. NOD2 deficiency confers a pro-tumorigenic macrophage phenotype to promote lung adenocarcinoma progression[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7545-58.
- [5] Groeger S, Wu F, Wagenlehner F, et al. PD-L1 up-regulation in prostate cancer cells by *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 935806.
- [6] Zhang Y, Li N, Yuan G, et al. Upregulation of NOD1 and NOD2 contribute to cancer progression through the positive regulation of tumorigenicity and metastasis in human squamous cervical cancer[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 55.
- [7] 王胤达, 张斌忠. 自噬抑制剂氯喹对 5-氟尿嘧啶化疗的结肠癌细胞株 SW480 的凋亡以及转移和侵袭能力的影响[J]. 中

- 华实验外科杂志, 2022, 39(5): 873–6.
- [8] 杨熙玥, 叶菜英, 朱 蕾. NOD2 介导的信号通路及其与自身炎症性疾病关系以及抑制剂研究进展[J]. 药学报, 2023, 58(4): 899–908.
- [9] 朱雨婷, 周曙光, 田 璐, 等. CD47 的表达与宫颈病变程度的相关性分析[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(1): 67–72.
- [10] Balasubramaniam S D, Balakrishnan V, Oon C E, et al. Key molecular events in cervical cancer development [J]. *Medicina*, 2019, 55(7): 384.
- [11] Jin B Y, Campbell T E, Draper L M, et al. Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model[J]. *JCI insight*, 2018, 3(8): e99488.
- [12] Ferrand A, Al Nabhani Z, Tapias N S, et al. NOD2 expression in intestinal epithelial cells protects toward the development of inflammation and associated carcinogenesis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(2): 357–69.
- [13] Huszno J, Kolosza Z, Nycz-Bochenek M, et al. Clinicopathological characteristics of breast cancer patients with NOD2 mutation according to age[J]. *Contemp Oncol*, 2020, 24(2): 79–86.
- [14] Yang Y, Wang Q, Song D, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 197.
- [15] Liu J Z, Hu Y L, Feng Y, et al. BDH2 triggers ROS-induced cell death and autophagy by promoting Nrf2 ubiquitination in gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 123.
- [16] Tang H, Li J, Liu X, et al. Down-regulation of HSP60 suppresses the proliferation of glioblastoma cells via the ROS/AMPK/mTOR pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28388.
- [17] Kim K Y, Park K I, Kim S H, et al. Inhibition of autophagy promotes salinomycin-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-dependent signaling in human prostate cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1088.
- [18] Yun C W, Jeon J, Go G, et al. The dual role of autophagy in cancer development and a therapeutic strategy for cancer by targeting autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 179.
- [19] Feng F, Zhang M, Yang C, et al. The dual roles of autophagy in gliomagenesis and clinical therapy strategies based on autophagic regulation mechanisms[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109441.

Mechanism of malignant behavior in cervical cancer cells based on NOD2-mediated AMPK/mTOR signaling pathway

Du Ruiting, Wu Dongyue, Guo Qingmin, Jin Dongmei

(Dept of Gynecology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007)

Abstract Objective To explore the mechanism of malignant behavior of cervical cancer (CC) cells based on AMP-activated protein kinase (AMPK)/rapamycin target protein (mTOR) signaling pathway mediated by nucleotide-binding oligomerization domain receptor 2 (NOD2). **Methods** Bioinformatics analysis was performed to determine the expression of NOD2 in CC tissue. Plasmids targeting NOD2 (shNOD2) and shRNAs negative control (shNC), NOD2 overexpression (NOD2) and vectors (Vec) were transfected into CC cells. The effect of NOD2 on the growth of CC cells was determined by cell counting kit-8 assay, colony formation and Transwell cell invasion assay. Transcriptome analysis was performed by high throughput RNA sequencing (RNA-Seq). Western blot was used to detect the expression of NOD2, AMPK/mTOR signaling pathway and autophagy protein in the cell line. 24 female BALB/c nude mice were randomly divided into four groups, with 6 mice in each group: vector group (Vec group), NOD2 overexpression group (NOD2 group), shNC group and shNOD2 group. The distant metastasis model was established in mice, and the fluorescence intensity of lung metastasis was monitored and the number of lung metastasis nodules was counted. **Results** On-line database analysis showed that the expression of NOD2 in CC tissues was significantly higher than that in normal tissues, and there were significant differences in the mRNA expression of NOD2 in different stages of CC ($P < 0.05$). In addition, the high expression of NOD2 was associated with poor overall survival and disease-free survival ($P < 0.05$). NOD2 overexpression promoted the proliferation, colony formation, migration and invasion of CC cells, while NOD2 knock-down was the opposite. Consistent with the results *in vitro*, the lung colonization and lung metastasis of CC cells in NOD2 group were significantly higher than those in Vec group ($P < 0.05$), while those in shNOD2 group were significantly lower than those in shNC group ($P < 0.05$). RNA-Seq results showed that the expression of NOD2 was significantly related to AMPK signal activa-

血红素加氧酶-1 通过诱导抗病毒蛋白的表达增强 IFN- α 抗 HBV 效应

笪蔚¹,王琴¹,魏安邦²,张浩¹,汪任冰¹,刘倩¹,周强¹

摘要 目的 探讨血红素加氧酶-1 (HO-1) 对 HBV 复制的作用及 HO-1 联合 α -干扰素 (IFN- α) 的抗病毒效应。方法 以 HepG2. 2. 15 细胞和 HBV 1. 3 质粒转染 HepG2 细胞即 HepG2-HBV1. 3 为 HBV 复制细胞模型;血红素 (Hemin) 分别处理 HepG2. 2. 15 和 HepG2-HBV1. 3 细胞,诱导 HO-1 表达;CCK-8 评估 Hemin 对 HepG2、HepG2. 2. 15 的毒性作用;化学发光法分析 Hemin 处理组及 si-HO-1 等实验组上清液中 HBsAg、HBeAg;RT-qPCR 分析 HO-1、IFN- β 、HBV-DNA;Western blot 分析 IRF-3、JAK/STAT 信号通路中相关分子的表达;Hemin 联合 IFN- α 处理 HepG2. 2. 15,监测 HO-1 是否具有协同 IFN- α 抗病毒效应。结果 Hemin 剂量依赖性诱导 HO-1, HO-1 被诱导后发挥显著的抗 HBV 效应,同时 IFN- β 、IRF-3 及 JAK/STAT 信号通路中 IRF-9、MxA 的表达均增加。沉默 HO-1 表达能逆转 Hemin 诱导组的抗病毒效应,同时 I 型干扰素 IFN- β 也呈现低表达,JAK/STAT 信号通路中的 IRF-9、MxA 的表达也被抑制。Hemin 联合 IFN- α 发挥更强的抗病毒作用。结论 HO-1 能够发挥抗 HBV 效应,这种效应可能是增加 IRF-3 的磷酸化诱导 I 型干扰素表达来激活 JAK/

STAT 信号通路发挥抗病毒效应;HO-1 可以协同 IFN- α 发挥抗病毒作用。

关键词 血红素;血红素加氧酶-1;JAK/STAT;IFN- β

中图分类号 R 512. 6 + 2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0324-07

doi:10. 19405/j. cnki. issn1000-1492. 2024. 02. 023

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是 DNA 病毒科中一种嗜肝的、带包膜的、部分双链的 DNA 病毒^[1]。HBV 感染是一个重要的全球性健康问题,据世卫组织估计,全球有 2. 57 亿人长期感染 HBV,每年约有 88. 7 万人死于与 HBV 相关的并发症^[2]。血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是血红素降解的关键酶,打开血红素的卟啉环,并释放等摩尔量的游离铁、绿胆素 (biliverdin, BV) 和一氧化碳 (carbon dioxide, CO)。HO-1 是一种重要的应激反应蛋白,它具有抗氧化、抗凋亡和抗炎的作用,在生理和病理条件下均对机体起保护作用,也被认为是一种细胞保护酶^[3];在过去的 10 年中,HO-1 已被成功探索出对多种病毒的抗病毒作用,并且对包膜病毒有选择性,能引起病毒包膜的破坏和解离;如 HIV、HCV、HBV、流感、登革热、埃博拉、呼吸道合胞病毒、人类单纯疱疹病毒等^[4];被认为是包膜病毒的通用杀病毒剂。在 HBV 感染中,Protzer et al^[5] 证明了 HO-1 可以通过降低 HBV 核心蛋白的稳定性,直接抑制 HBV 在肝细胞中的复制,从而抑制 HBV

2023-09-20 接收

基金项目:安徽省转化医学研究院科研基金项目 (编号:2021zhyc-C47);安徽省高校自然科学研究重点项目 (编号:2023AH053169)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院¹ 检验科、² 儿科,合肥 230601

作者简介:笪蔚,女,硕士研究生;

周强,男,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

zhouqiang1973@163. com

tion, mTOR signal inhibition, autophagy regulation pathway activation and autophagy formation. Compared with shNC group, the expression of phosphorylated AMPK and LC3 protein decreased significantly in shNOD2 group ($P < 0.05$), and the expression levels of phosphorylated mTOR and p62 protein increased significantly ($P < 0.05$). Compared with Vec group, the expression levels of LC3 and AMPK protein in NOD2 group increased significantly ($P < 0.05$), and the expression levels of phosphorylated mTOR and p62 protein decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with shNC group, the point accumulation of GFP-mRFP-LC3 in shNOD2 group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with Vec group, the point accumulation of GFP-mRFP-LC3 increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** NOD2 may promote the proliferation, migration and invasion of CC through AMPK/mTOR signal, and its mechanism partly involves autophagy activation.

Key words nucleotide binding oligomerization domain receptor 2; AMP activated protein kinase; rapamycin target protein; cervical cancer cells; autophagy