

GPX2 在肝内胆管癌中的表达及其进展的影响

贺建波¹ 孙倍成^{1,2}

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.007

摘要 目的 探究谷胱甘肽过氧化物酶 2 (GPX2) 在肝内胆管癌 (ICC) 发生发展中的作用。方法 利用 Omicshare 网站分析 GPX2 在 ICC 中的表达水平,通过实时定量反转录聚合酶链式反应 (RT-qPCR)、Western blot 及免疫组化染色验证其在 ICC 中的表达水平。构建稳定敲低和过表达 GPX2 的 HuCCT1 细胞系并进行体外实验。通过平板克隆实验、细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法、细胞划痕实验、Transwell 实验、流式细胞术等探究 GPX2 对 ICC 细胞增殖、迁移、凋亡和上皮间充质转化 (EMT) 的影响。最后构建小鼠胆管癌模型,检测 GPX2 在小鼠胆管癌中的表达水平。结果 Omicshare 网站分析结果显示 GPX2 在 ICC 中普遍上调 ($P < 0.001$)。Western blot、RT-qPCR 和免疫组化实验显示,与癌旁组织相比,GPX2 在 ICC 中表达升高 ($P < 0.0001$)。平板克隆、CCK-8 实验结果显示 GPX2 敲低后,细胞克隆形成率下降 ($P < 0.01$),增殖能力降低 ($P < 0.001$); GPX2 过表达后,细胞克隆形成率升高 ($P < 0.01$),增殖能力增强 ($P < 0.01$)。细胞划痕、Transwell 和 Western blot 实验结果显示 GPX2 敲低后,划痕愈合速度减慢、迁移能力降低、E-cadherin 升高 ($P < 0.01$),N-cadherin ($P < 0.01$)、Vimentin ($P < 0.05$) 降低; GPX2 过表达后,划痕愈合速度增快、迁移能力增强、E-cadherin 降低 ($P < 0.05$),N-cadherin ($P < 0.01$)、Vimentin ($P < 0.001$) 升高; 凋亡流式细胞术和 Western blot 实验结果显示 GPX2 敲低后,细胞凋亡率增多、Bcl-2 降低 ($P < 0.001$),BAX 升高 ($P < 0.01$); GPX2 过表达后,细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$),Bcl-2 升高 ($P < 0.0001$),BAX 降低 ($P < 0.001$)。最后在小鼠胆管癌模型中观察到 GPX2 升高。结论 GPX2 在人和小鼠的胆管癌组织中高表达,并可能增强胆管癌细胞的增殖和迁移能力,促进肿瘤细胞 EMT,抑制肿瘤细胞凋亡。

关键词 肝内胆管癌; GPX2; 增殖; 凋亡; 上皮间充质转化

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1330-09

2024-05-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81930086、82120108012); 安徽省高校科研项目(编号: 2022AH010070); 安徽省临床医学研究转化专项(编号: 202204295107020008)

作者单位: ¹南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科, 南京 210008²安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科, 合肥 230022

作者简介: 贺建波, 男, 博士研究生;

孙倍成, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunbc@ahmu.edu.cn

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一种高度侵袭性的恶性肿瘤, 约占所有肝脏恶性肿瘤的 20% [1]。在过去的 40 年里, ICC 的发病率呈上升趋势 [2]。ICC 通常在慢性炎症的背景下发展, 慢性炎症引起胆汁淤积并由此引起胆管细胞损伤 [3-4]。由于起病隐匿, 缺乏早期的临床表现, 大多数患者在发病时病情已进展到晚期, 5 年总生存率仅为 9% 左右。完全手术切除仍然是 ICC 唯一可能的治疗方法, 但只有 20% ~ 30% 的患者存在可切除的机会 [5]。因此, 探究 ICC 发生发展的具体机制, 对于寻找 ICC 早期诊断和治疗的靶点具有重要的意义。

谷胱甘肽过氧化物酶 2 (glutathione peroxidase 2, GPX2) 蛋白是一种谷胱甘肽过氧化物酶, 主要负责清除细胞内的过氧化物, 从而保护细胞免受氧化应激的损伤 [6]。越来越多的证据 [7-8] 表明, GPX2 在肿瘤可能发挥着双重作用。如在乳腺癌中, GPX2 参与清除细胞内的过氧化物, 减少了氧化应激的程度, 进而抑制了肿瘤进展; 而在肝细胞性肝癌 [9-10] 中, GPX2 可能通过抑制细胞凋亡或调节信号传导等机制, 促进肿瘤细胞的存活和抗药性。然而, GPX2 在 ICC 中的表达水平及其作用尚不清楚。该研究比较了 GPX2 在 ICC 与癌旁组织中的表达差异, 探究了 GPX2 对 ICC 细胞的增殖、迁移、凋亡和上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响, 对于更好地理解 ICC 的发生发展机制、探索临床诊断治疗的新靶点有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌细胞系 HuCCT1、HCCC9810、RBE、SSP-25 购买于上海中乔新舟生物科技公司。细胞培养所用 DMEM 培养基、PBS、青链霉素双抗、胰酶、胎牛血清均购买于南京维森特生物技术公司; jetPRIME 购自法国 Polyplus 公司; 总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒购买于美国 OMEGA 公司; 逆转录试剂盒、凋亡检测试剂盒、ChamQ SYBR qPCR

Master Mix 购自南京诺唯赞公司; GPX2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Tubulin 一抗及相应二抗购买于武汉爱博泰克公司; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 Associated X protein, BAX) 抗体购自英国 Abcam 公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、RIPA 裂解液、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 免疫组化试剂盒购买于福州迈新生物公司。

1.2 方法

1.2.1 临床样本收集 该课题所用的 ICC 组织均收集于南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 2022 年 9 月—2023 年 6 月收治的 20 例 ICC 患者的手术切除标本, 术后病理诊断确诊为 ICC。组织离体后立刻对肿瘤组织、癌旁组织 (距肿瘤边缘 > 2 cm) 取材, 一份放入 4% 甲醛溶液, 用于制备石蜡切片; 一份立刻放入液氮冻存, 用于 RNA 和蛋白的提取。所用样本的患者及家属已签署知情同意书, 并同意使用其组织和病理信息进行实验研究。

1.2.2 组织/细胞蛋白提取及 Western blot 实验 从液氮中取出冰冻的肿瘤及癌旁组织, 剪取 50 mg 组织, 剪碎后加入按比例添加蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液, 利用赛维尔生物公司匀浆仪进行组织匀浆, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 后收集上清液; 细胞样本弃培养基后用 PBS 洗涤 3 遍, 加入 RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解 5 min, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 后收集上清液。利用碧云天 BCA 试剂盒检测蛋白浓度后调平, 加入 5 × loading buffer, 100 °C 金属浴 5 min。将蛋白加入聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 结束后转至醋酸纤维素薄膜进行转膜, 转膜结束使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后孵育目的一抗, 4 °C 摇床过夜。洗去一抗后常温孵育相应二抗 2 h, TBST 洗脱后显影。

1.2.3 组织/细胞 RNA 提取及实时定量反转录聚合酶链式反应 (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 从液氮中取出冰冻的肿瘤及癌旁组织, 剪取 50 mg 组织, 加入 Omega 公司总 RNA 提取试剂盒的 TRK 裂解液 700 μl, 眼科剪剪碎, 使用赛维尔生物公司的匀浆仪进行组织匀浆, 以上操作均在冰上进行; 细胞样本弃培养基后, 用 PBS 液洗涤 3 次, 加入 TRK 裂解液 350 μl。后续根据试剂盒说明书的指导提取组织和细胞的 RNA。提取的 RNA 测定浓度后, 使用诺

唯赞公司的反转录试剂盒进行反转录, 使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 进行实时荧光定量 PCR。所使用的引物序列如下: GPX2 (正义链) 5'-GG-TAGATTTCAATACGTTCCGGG-3', (反义链) 5'-TGACAGTTCTCTGATGTCCAAA-3'; β-actin (正义链) 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', (反义链) 5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'。

1.2.4 质粒构建和细胞转染 由南京金斯瑞生物公司合成 GPX2 shRNA 序列: 5'-AGCATTCCCTT-GATATCAGTC-3'; 对照组: 5'-TTCTCCGAACGTGT-CACGT-3'。利用 AgeI/EcoRI 双酶切载体 pLKO.1-puro, 通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 随后进行质粒转化, 挑选单克隆菌落测序, 序列无误后抽提质粒进行后续实验。GPX2 基因序列模版购买于武汉森灵生物科技公司, 设计引物 PCR 扩增, 利用 EcoRI/BamHI 双酶 pLVX-IRES-Puro 载体, 通过同源重组酶进行连接, 随后进行质粒转化, 挑选单克隆菌落测序, 序列无误后抽提质粒进行后续实验。使用 Lipofectamine 3000 对目的质粒和辅助质粒在 293T 细胞中进行转染, 包装慢病毒, 48 h 后收集上清液转染 HuCCT1, 72 h 后使用嘌呤霉素 (1 μg/ml) 筛选转染成功的细胞。

1.2.5 免疫组织化学染色 石蜡切片放入 60 °C 烤箱烤片 1 h, 然后依次放入二甲苯 2 次各 10 min, 无水乙醇 2 次各 5 min, 95% 乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 80% 乙醇 5 min, 75% 乙醇 5 min 完成水化, PBS 冲洗浸泡 5 min。根据抗体特性使用不同的修复液进行修复, 高压 5 min, 室温自然冷却。根据迈新免疫组化试剂盒说明书的指导进行后续实验, GPX2 一抗 4 °C 孵育过夜。第 2 日洗去一抗后使用 HRP 标记的二抗孵育, 随后 DAB 显色, 苏木精染核, 反蓝, 脱水、透明、中性快干胶封片。

1.2.6 CCK-8 实验检测细胞增殖 取对数生长的细胞, PBS 清洗后使用胰酶消化并吹打至单个细胞, 加入等量培养基终止消化, 转移细胞悬液至离心管中, 以 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加入完全培养基重悬, 细胞计数板计数, 将细胞悬液稀释为 2×10^4 /ml, 取 96 空板每孔接种 100 μl 细胞悬液, 每个孔加入 10 μl CCK-8 溶液后放入培养箱孵育。1 h 后使用酶标仪在 450 nm 测定吸光度。

1.2.7 平板克隆实验 取对数生长的细胞, PBS 清洗后使用胰酶消化并吹打至单个细胞, 加入等量培养基终止消化, 转移细胞悬液至离心管中, 以 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加入完全培养基重悬,

细胞计数板计数,将细胞悬液稀释为 500 个/ml,吸取 2 ml 至 6 孔板,培养箱孵育。2 周后,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫染色后拍照、计数。

1.2.8 Transwell 实验 取对数生长的细胞,PBS 清洗后使用胰酶消化并吹打至单个细胞,加入等量培养基终止消化,转移细胞悬液至离心管中,以 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入 PBS 重悬,计数后使用无血清培养基重悬至 5×10^4 /ml,取 200 μ l 加入 Transwell 上室,下室中加入 600 μ l 完全培养基。培养 24 h 后,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫染色,用棉签将上室中的细胞轻轻擦去,使用显微镜观察并拍照统计。

1.2.9 细胞划痕实验 取对数生长的细胞,PBS 清洗后使用胰酶消化并吹打至单个细胞,加入等量培养基终止消化,转移细胞悬液至离心管中,以 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入完全培养基重悬,接种至 6 孔板中(2×10^5 /孔),待细胞长满后,使用 200 μ l 枪头划痕,PBS 冲洗掉落的细胞,加入无血清培养基培养。24 h 后对相同部位进行拍照,分析划痕宽度变化。

1.2.10 凋亡实验 取对数生长的细胞,PBS 清洗后使用无 EDTA 胰酶消化并吹打至单个细胞,加入等量培养基终止消化,转移细胞悬液至离心管中,以 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,PBS 洗涤细胞 3 次,按照凋亡流式检测试剂盒说明书,添加 Annexin

V-FITC/PI 染料,染色结束后上机检测。

1.2.11 动物模型 本实验中涉及的 C57BL/6 小鼠购买于南京大学模式动物研究所。6 周龄雄性 WT 小鼠用于构建 ICC 模型:高压尾静脉注射质粒蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) / Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) / 睡美人转座子 (sleep beauty, SB) 或 AKT/ Notch1shou ti4 胞内结合域 (Notch1 intracellular domain, NICD1) / SB,5 周后即有胆内胆管癌的发生^[11]。所有的小鼠饲养在无特定病原体、温度恒定(22 ~ 24 $^{\circ}$ C)、模拟 12 h 昼夜交替、饮食自由并且独立通风的饲养笼位中。

1.3 统计学处理 所有实验独立重复 3 次后,使用 Prism 10 软件统计分析,统计结果使用均数 \pm 标准差表示。使用 Student's *t* 检验和单因素方差分析 (ANOVA) 对两组或多组数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPX2 在 ICC 中的表达水平 Omicshare 生信分析数据显示,GPX2 在 ICC 组织中较癌旁组织呈现普遍上调($t = 8.357, P < 0.001$; 图 1A)。与对应的癌旁组织相比,20 例 ICC 组织中的 GPX2 的蛋白($t = 5.224, P < 0.0001$; 图 1B)和 mRNA($F = 3.840, P < 0.001$; 图 1C)表达水平明显上调。免疫组织化学染色(图 1D)的结果也显示在 ICC 组织中

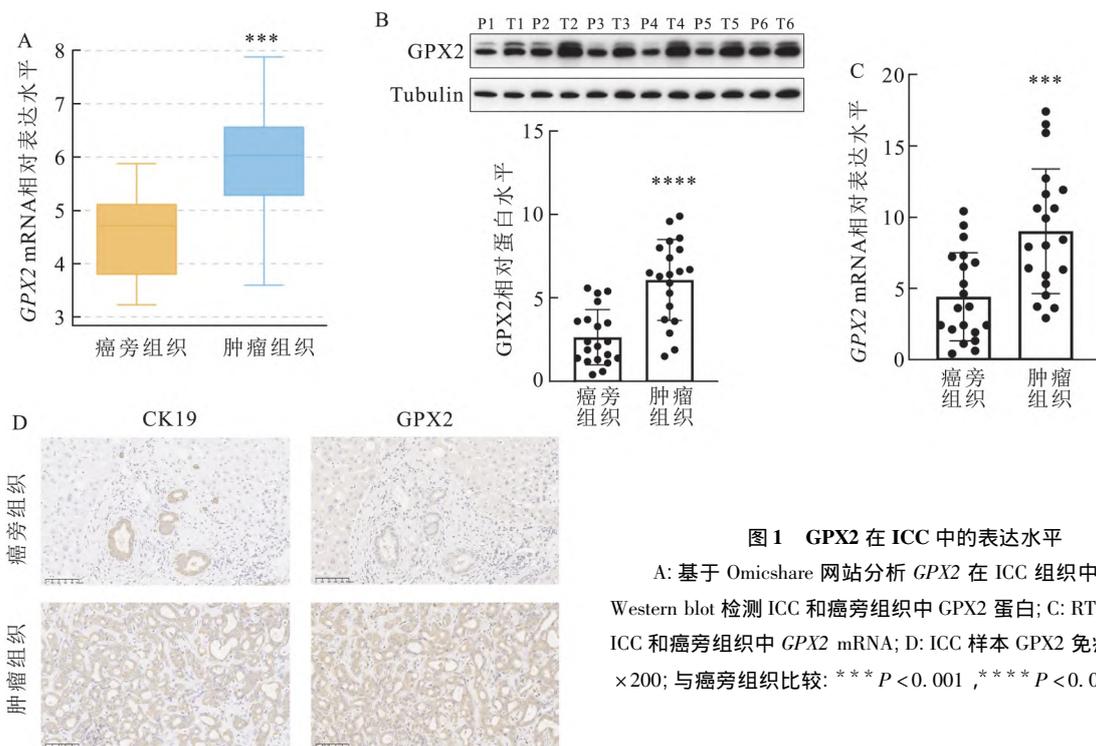


图 1 GPX2 在 ICC 中的表达水平

A: 基于 Omicshare 网站分析 GPX2 在 ICC 组织中的表达; B: Western blot 检测 ICC 和癌旁组织中 GPX2 蛋白; C: RT-qPCR 检测 ICC 和癌旁组织中 GPX2 mRNA; D: ICC 样本 GPX2 免疫组化染色 $\times 200$; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

GPX2 的表达水平较癌旁组织升高。

2.2 GPX2 对 ICC 细胞增殖能力的影响 Western blot 验证 4 种胆管癌细胞系中 GPX2 的表达水平 (图 2A), 选取 GPX2 高表达的 HuCCT1 细胞构建 GPX2 敲低和过表达的胆管癌细胞系 (图 2B), 并验证其敲低 ($t = 16.630, P < 0.0001$) 和过表达效率 ($t = 20.650, P < 0.0001$)。平板克隆实验 (图 2C) 结

果显示 GPX2 敲低后细胞克隆形成率降低 ($t = 5.159, P < 0.01$), 而过表达 GPX2 后细胞克隆形成率增强 ($t = 5.307, P < 0.01$)。CCK-8 实验 (图 2D) 结果显示, GPX2 敲低后细胞增殖能力降低 ($t = 10.050, P < 0.001$), 而过表达 GPX2 后细胞增殖能力增强 ($t = 5.439, P < 0.01$)。以上结果证明 GPX2 促进了 ICC 细胞的增殖能力。

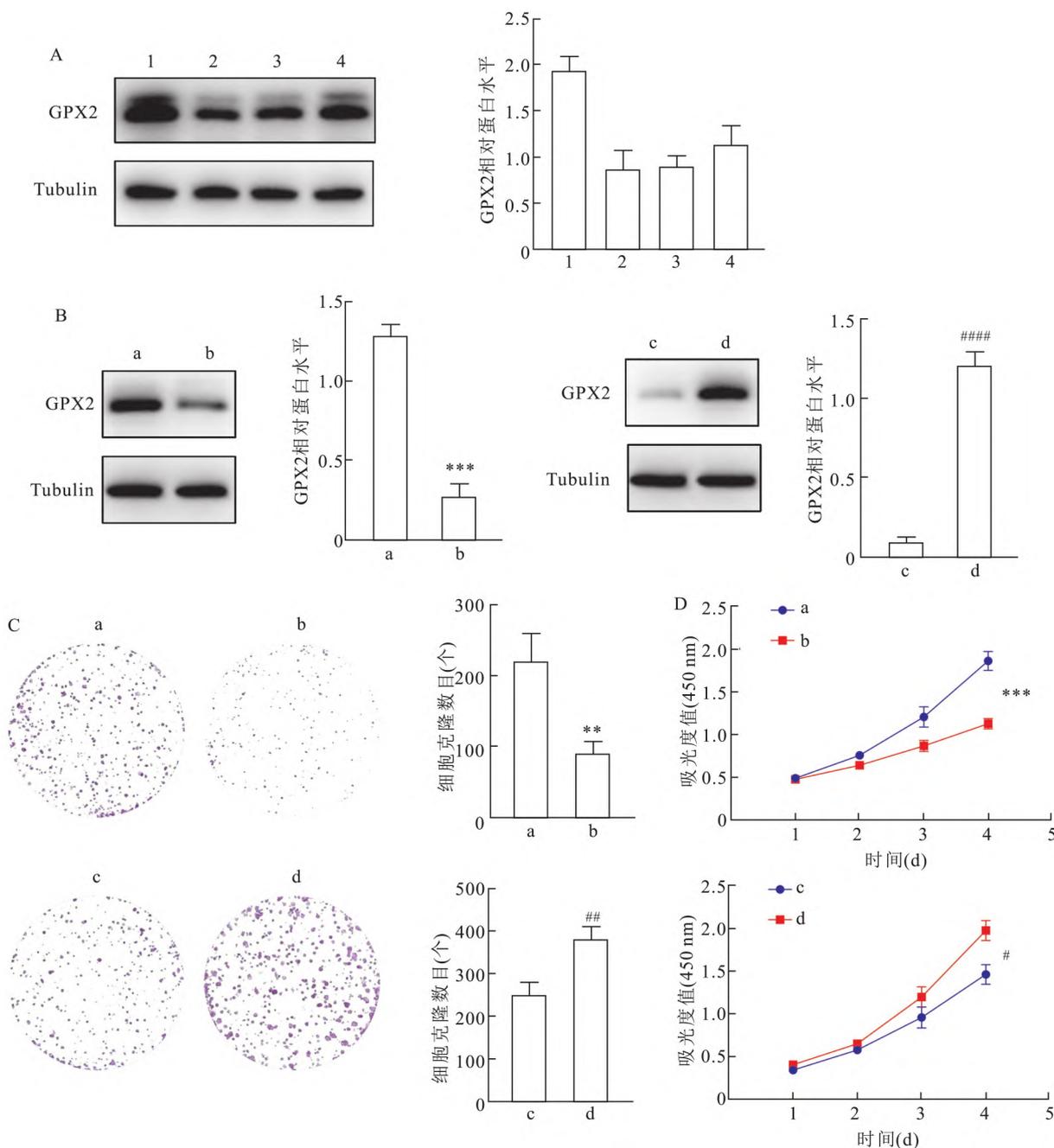


图2 Western blot、CCK-8 等实验检测 GPX2 对 ICC 细胞增殖能力的影响

A: Western blot 筛选 GPX2 高表达的人源 ICC 细胞系; 1: HuCCT1; 2: HCCC9810; 3: RBE; 4: SSP-25; B: Western blot 验证细胞转染效率; C、D: 平板克隆实验 (结晶紫染色 $\times 100$) 和 CCK-8 实验检测细胞增殖能力; a: HuCCT1-NC; b: HuCCT1-KD; c: HuCCT1-Vector; d: HuCCT1-OE; 与 HuCCT1-NC 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HuCCT1-Vector 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$

2.3 GPX2 对 ICC 细胞迁移和 EMT 的影响 细胞划痕实验显示(图 3A), 敲低 GPX2 后, 划痕愈合速度明显慢于对照组 ($t = 4.773, P < 0.01$), 过表达 GPX2 后, 划痕愈合速度则比对照组愈合更快 ($t = 4.308, P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示(图 3B), GPX2 敲低的 HuCCT1 细胞穿过 Transwell 小室的数目减少 ($t = 6.448, P < 0.01$), 而过表达 GPX2 的细胞穿过小室的数目则增加 ($t = 3.014, P < 0.05$)。Western blot 结果显示(图 3C), GPX2 敲低后 EMT 标志物 E-cadherin 表达升高 ($t = 6.464, P < 0.01$), N-cadherin ($t = 5.528, P < 0.01$) 和 Vimentin ($t = 3.433, P < 0.05$) 表达降低, GPX2 过表达后 E-cadherin 表达降低 ($t = 3.503, P < 0.05$), N-cadherin

($t = 8.804, P < 0.01$) 和 Vimentin ($t = 9.289, P < 0.001$) 表达升高。以上结果证明 GPX2 促进了 ICC 细胞的迁移和 EMT。

2.4 GPX2 对 ICC 细胞凋亡的影响 过氧化氢处理 HuCCT1 细胞后, 使用流式细胞仪检测凋亡情况, 结果显示(图 4A) GPX2 敲低后, 细胞凋亡比例增加 ($t = 12.48, P < 0.001$), 而 GPX2 过表达后, 细胞凋亡比例降低 ($t = 8.556, P < 0.01$)。Western blot 结果显示(图 4B), GPX2 敲低后 Bcl-2 表达降低 ($t = 8.763, P < 0.001$), BAX 表达升高 ($t = 7.872, P < 0.01$), GPX2 过表达后 Bcl-2 表达升高 ($t = 16.320, P < 0.0001$), BAX 表达降低 ($t = 13.680, P < 0.001$)。以上结果表明 GPX2 抑制 ICC 细胞凋亡。

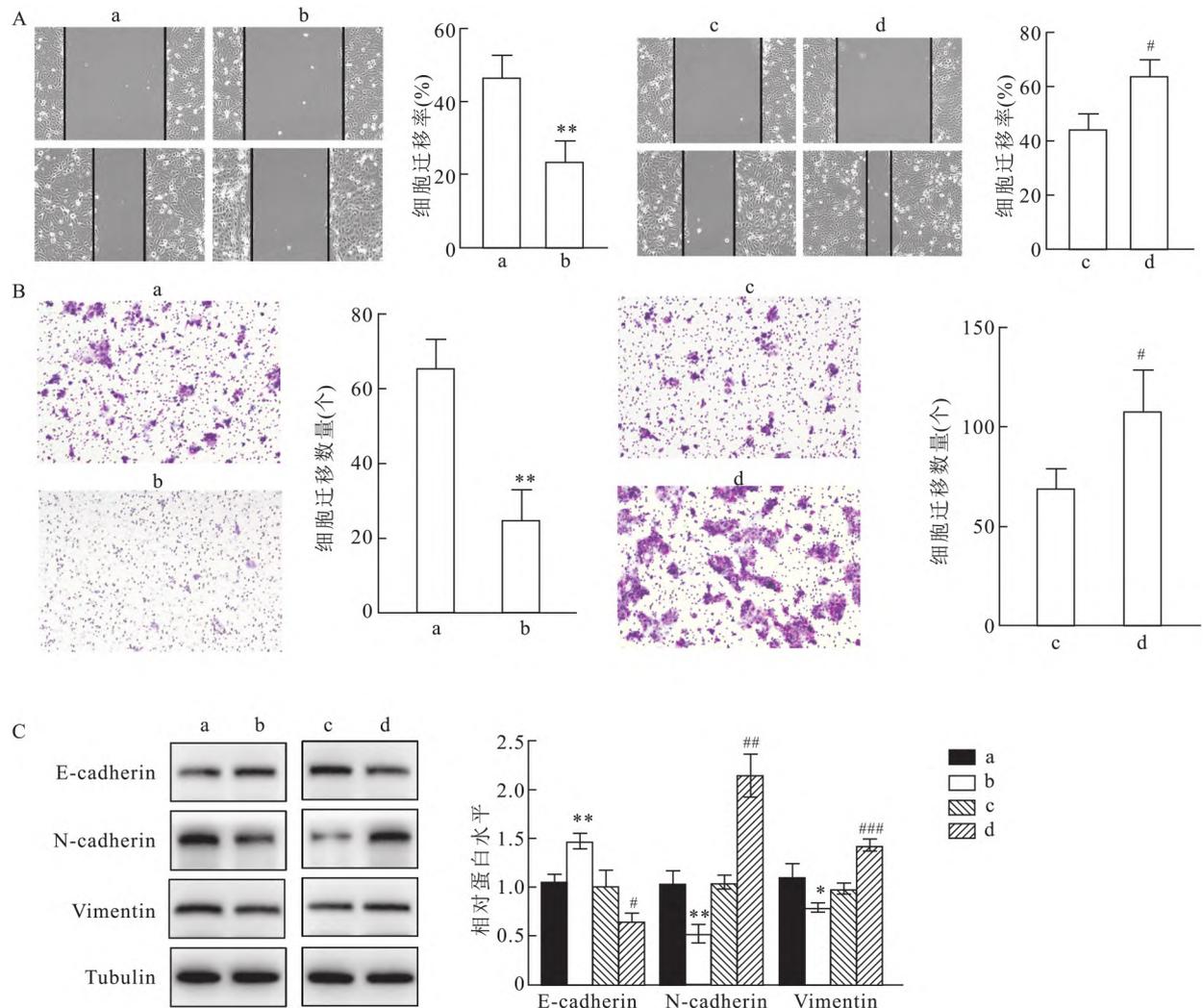


图3 GPX2 对 ICC 细胞迁移和 EMT 的影响

A: 划痕实验验证细胞迁移能力 $\times 100$; B: Transwell 实验验证细胞迁移能力 结晶紫染色 $\times 100$; C: Western blot 验证细胞 EMT 相关蛋白的变化; a: HuCCT1-NC; b: HuCCT1-KD; c: HuCCT1-Vector; d: HuCCT1-OE; 与 HuCCT1-NC 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HuCCT1-Vector 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

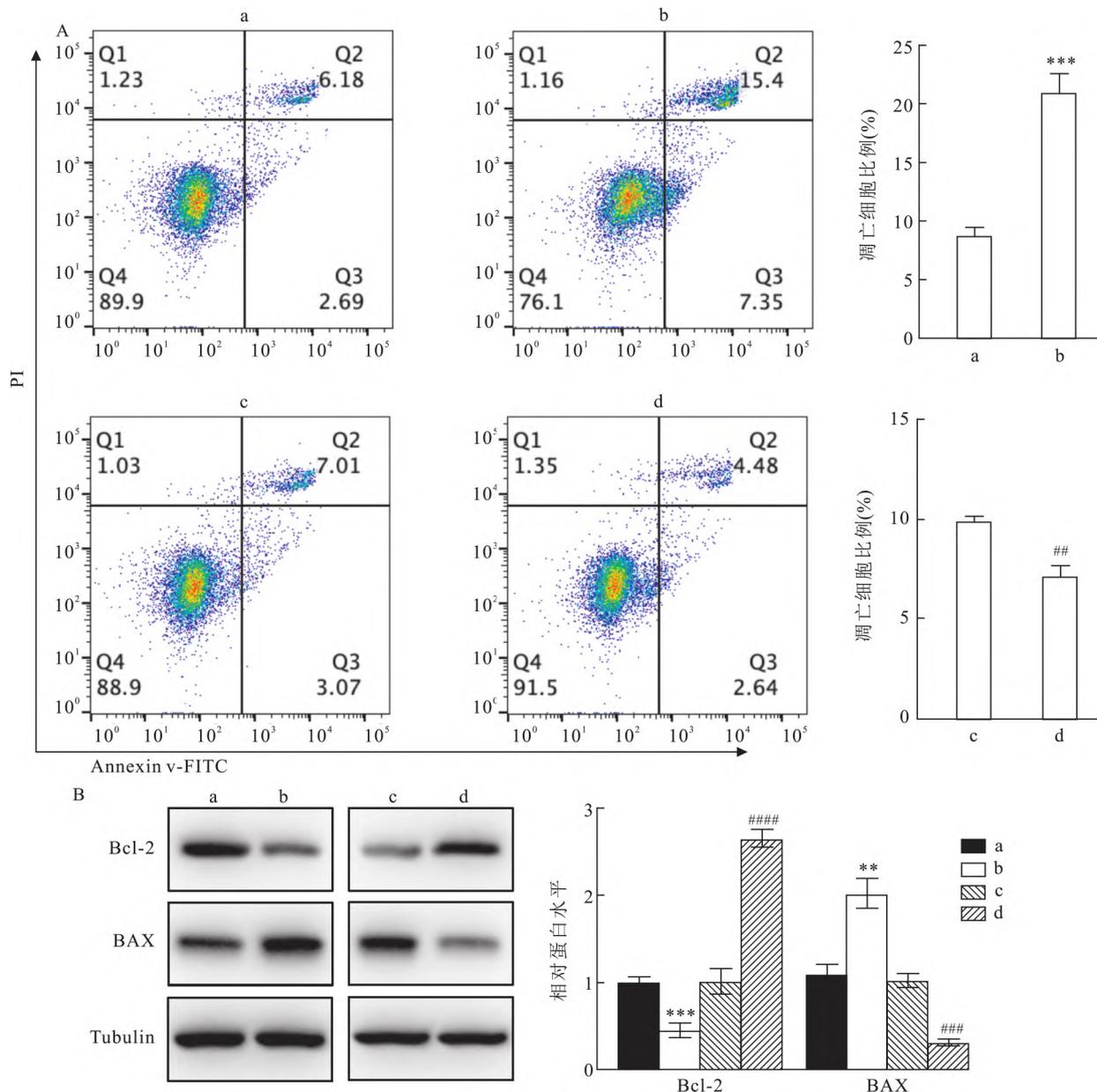


图4 GPX2对ICC细胞凋亡的影响

A: 流式细胞术验证 GPX2 对细胞凋亡的影响; B: Western blot 验证 GPX2 对凋亡蛋白的影响; a: HuCCT1-NC; b: HuCCT1-KD; c: HuCCT1-Vector; d: HuCCT1-OE; 与 HuCCT1-NC 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HuCCT1-Vector 比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$, ### $P < 0.0001$

2.5 GPX2 在小鼠胆管癌模型中的表达水平 6 周龄小鼠高压尾静脉注射质粒 20 μg YAP + 30 μg AKT + 2.5 μg SB(溶解在 2 ml 的生理盐水中) 或 20 μg NICD1 + 4 μg AKT + 21 μg SB(溶解在 2 ml 的生理盐水中), 对照组小鼠高压尾静脉注射等量的生理盐水 5 周后诱导出小鼠 ICC 模型(图 5A), 取肝脏后拍照(图 5B) 组织包埋切片 HE 染色(图 5C), 切片 GPX2 免疫组化染色结果显示, 在小鼠胆管癌模型中, 肿瘤细胞中的 GPX2 较正常细胞表达上调(图 5D)。

3 讨论

ICC 是一种高度恶性和异质性的肿瘤, 其发病率具有明显的地域差异, 中国和东南亚地区的肿瘤发病率一直处于较高水平^[12]。由于疾病早期缺乏相应临床表现, 引起肿瘤发生的病因和肿瘤进展的病理生理学机制仍未知, 因此早期预防、诊断和治疗的难度很大。除手术切除外, 吉西他滨和顺铂的双重化疗被认为是最有效的一线方案^[13]。近数十年来, ICC 的发病率在全球范围内呈现上升趋势, 然而

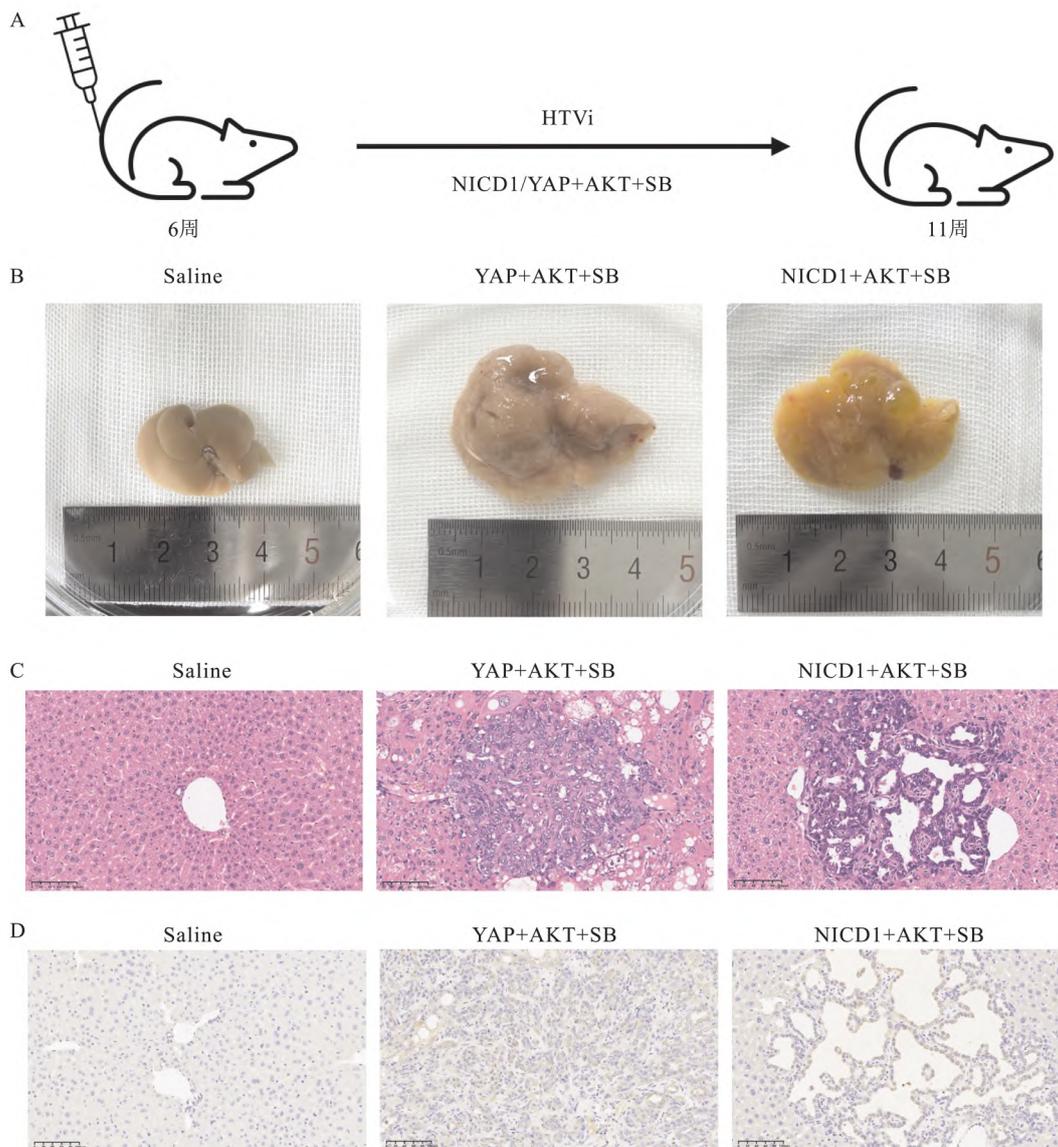


图5 GPX2 在小鼠胆管癌模型中的表达水平

A: 小鼠 ICC 造模模式图; B: 小鼠肝脏图片; C: 小鼠肝脏 HE 染色 ×200; D: 小鼠肝脏切片 GPX2 免疫组化染色 ×200

ICC 的早期诊断和治疗依然是个巨大的难题。

GPX2 是一种谷胱甘肽过氧化物酶,主要分布在食管、肝脏以及胃肠道中,通过调节细胞内活性氧水平,抑制肠黏膜炎症反应,保护消化道上皮细胞免受摄入脂质过氧化物的损害^[14]。GPX2 敲除小鼠表现出结肠黏膜过氧化物表达增多,气道炎症反应显著增强的现象,表明 GPX2 在炎症反应过程中的保护作用,同时抑制了相关肿瘤的发生。然而当上皮细胞转变为肿瘤细胞后,GPX2 的生理功能可能发生了相反的变化。近年来已有研究报道 GPX2 参与了乳腺癌的发生及细胞增殖,同时高表达 GPX2 参与了去势抵抗性前列腺癌的增殖。然而尽管 GPX2

在泛癌组织中具有普遍上调的现象,但在胆管癌中的作用和机制目前尚未报道。

因此,本研究首先基于 TCGA 数据生信分析发现 GPX2 在 ICC 中的表达上调,通过利用本中心收集的 ICC 病理标本验证了与癌旁组织相比,GPX2 在 ICC 中的表达升高。随后,为进一步研究 GPX2 对 ICC 细胞恶性表型的影响以及其潜在机制,构建了稳定敲低和过表达 GPX2 的 HucCCT1 细胞进行了体外实验。平板克隆、CCK-8 实验结果显示 GPX2 敲低后,细胞克隆形成率下降,增殖能力降低,GPX2 过表达后,细胞克隆形成率升高,增殖能力增强,提示 GPX2 促进了 ICC 细胞的增殖能力,这与先前在

胰腺癌中的报道^[15]一致。划痕、Transwell 和 Western blot 实验结果显示 GPX2 敲低后细胞迁移能力下降, E-cadherin 升高, N-cadherin、Vimentin 降低, GPX2 过表达后细胞迁移能力增强, E-cadherin 降低, N-cadherin、Vimentin 升高, 提示 GPX2 促进了 ICC 细胞的迁移和 EMT; 先前已有报道^[15] GPX2 通过 WNT 信号通路促进胰腺癌的迁移和 EMT, 推测 GPX2 也可能通过 WNT 通路调控 ICC 的进展。凋亡流式细胞术和 Western blot 实验结果显示 GPX2 敲低后, 凋亡细胞率增多, Bcl-2 降低, BAX 升高; GPX2 过表达后, 凋亡细胞率降低, Bcl-2 升高, BAX 降低; 这与 GPX2 基因敲除鼠中小凹基底部细胞凋亡数量增多的现象一致, 提示 GPX2 抑制了 ICC 细胞的凋亡。

综上所述, ICC 中 GPX2 表达的上调, 通过增强胆管癌细胞的增殖和迁移能力, 促进肿瘤细胞 EMT, 抑制肿瘤细胞凋亡, 进而影响肿瘤的发生发展。因此, 靶向 GPX2 可能为 ICC 患者提供新的治疗策略。但是 GPX2 调控 ICC 的具体机制目前仍需要进一步探索, 以充分验证 GPX2 作为 ICC 治疗靶点的可能性。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Beal E W, Tumin D, Moris D, et al. Cohort contributions to trends in the incidence and mortality of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2018, 7(4): 270-6.
- [3] Labib P L, Goodchild G, Pereira S P. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 185.
- [4] Khan S A, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: epidemiology and risk factors [J]. Liver Int, 2019, 39 Suppl 1: 19-31.
- [5] Banales J M, Marin J J G, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(9): 557-88.
- [6] Esworthy R S, Doroshov J H, Chu F F. The beginning of GPX2 and 30 years later [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 188: 419-33.
- [7] Ren Z, Dharmaratne M, Liang H, et al. Redox signalling regulates breast cancer metastasis via phenotypic and metabolic reprogramming due to p63 activation by HIF1alpha [J]. Br J Cancer, 2024, 130(6): 908-24.
- [8] Ren Z, Liang H, Galbo P M Jr, et al. Redox signaling by glutathione peroxidase 2 links vascular modulation to metabolic plasticity of breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(8): e2107266119.
- [9] Tan W, Zhang K, Chen X, et al. GPX2 is a potential therapeutic target to induce cell apoptosis in lenvatinib against hepatocellular carcinoma [J]. J Adv Res, 2023, 44: 173-83.
- [10] Vishnoi K, Ke R, Viswakarma N, et al. Ets1 mediates sorafenib resistance by regulating mitochondrial ROS pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 581.
- [11] Affo S, Nair A, Brundu F, et al. Promotion of cholangiocarcinoma growth by diverse cancer-associated fibroblast subpopulations [J]. Cancer Cell, 2021, 39(6): 883.
- [12] Valle J W, Kelley R K, Nervi B, et al. Biliary tract cancer [J]. Lancet, 2021, 397(10272): 428-44.
- [13] Rizvi S, Khan S A, Hallemeier C L, et al. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 95-111.
- [14] Brigelius-Flohe R, Flohe L. Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily [J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 33(7): 498-516.
- [15] Li F, Dai L, Niu J. GPX2 silencing relieves epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7780-90.

Expression of GPX2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its effect on progression

He Jianbo¹, Sun Beicheng^{1,2}

(¹Dept of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; ²Dept of Hepatobiliary Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the role of Glutathione peroxidase 2 (GPX2) in the occurrence and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** The Omicshare website was used to analyze GPX2 expression levels in ICC. The expression levels in ICC were validated using quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR), Western blot, and immunohistochemistry. Stable GPX2 knockdown and overexpression HuC-CT1 cell lines were constructed. The effects of GPX2 on ICC cell proliferation, migration, apoptosis, and epithelial-

mesenchymal transition (EMT) were investigated using colony formation assays, cell counting kit-8 (CCK-8) assays, wound healing assays, Transwell assays, and flow cytometry. A mouse model of cholangiocarcinoma was constructed to assess GPX2 expression in mouse cholangiocarcinoma tissues. **Results** Based on the analysis results from the Omicshare website, *GPX2* was generally upregulated in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) ($P < 0.001$). Western blot ($P < 0.0001$), RT-qPCR ($P < 0.001$), and immunohistochemistry experiments showed that, compared to adjacent non-cancerous tissues, the expression of GPX2 was significantly elevated in ICC. When GPX2 was knocked down, the colony formation rate of cells decreased significantly ($P < 0.01$), and the proliferation capacity was reduced ($P < 0.001$). Conversely, overexpression of GPX2 led to a significant increase in colony formation rate ($P < 0.01$) and enhanced proliferation capacity ($P < 0.01$). Results from wound healing and Transwell assays demonstrated that GPX2 knockdown slowed down cell wound healing ($P < 0.01$) and reduced migration ability ($P < 0.01$). Additionally, GPX2 knockdown resulted in an increase in E-cadherin ($P < 0.01$) and a decrease in N-cadherin ($P < 0.01$) and Vimentin ($P < 0.05$). On the other hand, overexpression of GPX2 accelerated wound healing ($P < 0.05$) and enhanced migration ability ($P < 0.05$), while E-cadherin expression decreased ($P < 0.05$) and N-cadherin ($P < 0.01$) and Vimentin ($P < 0.001$) expression increased. Flow cytometry for apoptosis and Western blot experiments indicated that GPX2 knockdown increased the apoptosis rate ($P < 0.001$), decreased the expression of Bcl-2 ($P < 0.001$), and increased the expression of BAX ($P < 0.01$). But overexpression of GPX2 reduced the apoptosis rate ($P < 0.01$), increased Bcl-2 expression ($P < 0.0001$), and decreased BAX expression ($P < 0.001$). Finally, elevated levels of GPX2 were observed in a mouse model of cholangiocarcinoma. **Conclusion** GPX2 is highly expressed in human and mouse cholangiocarcinoma tissues, and it may enhance cholangiocarcinoma cell proliferation and migration, promote tumor cell EMT, and inhibit tumor cell apoptosis.

Key words intrahepatic cholangiocarcinoma; GPX2; proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

(上接第 1329 页)

regression. The expression levels of characteristic genes in HCC were predicted by GEPIA and Ualcan databases, and their expression was verified by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), Western blot (WB) and Immunohistochemistry (IHC). 3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1 (*BDHI*) overexpressed cell line was constructed, followed by cell counting kit-8 (CCK-8), EdU, cell scratches and Transwell experiment to investigate the effects of *BDHI* on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. **Results** Total of 118 common differentially expressed genes were identified in two datasets by WGCNA and differential analysis. The characteristic genes associated with PD-1 immunotherapy sensitivity screened through Lasso regression including Flavin containing dimethylaniline monooxygenase 3 (*FMO3*), Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase (*PECR*), *BDHI*, Solute carrier family 7 member 1 (*SLC7A1*), Cytochrome b5 type A (*CYB5A*) and Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*PCK1*). Survival analysis showed that *BDHI* was most associated with HCC (Overall survival: $P < 0.001$, Recurrence: $P = 0.007$). GEPIA and Ualcan databases showed low expression of *BDHI* in HCC tissues, while RT-qPCR, WB, and IHC further confirmed this. CCK-8, plate cloning assay, EdU staining, cell scratch, and Transwell experiments showed that compared with the Hep3B pCDH group, overexpression of *BDHI* resulted in a decrease in the absorbance of HCC cells ($t = 4.766$, $P < 0.01$), a decrease in the number of clone formation ($t = 16.02$, $P < 0.0001$), a decrease in the proportion of proliferating cells ($t = 23.13$, $P < 0.0001$), a decrease in cell migration rate ($t = 25.28$, $P < 0.0001$), and a decrease in the number of small compartments ($t = 10.78$, $P = 0.004$). **Conclusion** *BDHI* is a characteristic gene for observing the sensitivity of PD-1 immunotherapy in HCC patients. *BDHI* could inhibit the proliferation, migration, and invasion ability of HCC cells *in vitro*.

Key words hepatocellular carcinoma; PD-1 immunotherapy; *BDHI*; tumor function experiment