

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.006>

TRIM14 在子宫内膜癌中的表达及其对子宫内膜癌细胞侵袭和转移的影响

贺敏¹, 陈勇伟², 曾康康¹, 郑蓉¹

[十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院) 1. 妇产科; 2. 泌尿外科, 湖北 十堰 442700]

[摘要] 目的: 研究三结构域蛋白14(tripartite motif-containing 14, TRIM14)在子宫内膜癌组织中的表达与子宫内膜癌患者临床病理特征及预后的关系, 并探讨TRIM14对子宫内膜癌细胞侵袭和转移的影响及作用机制。方法: 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和免疫组织化学检测TRIM14在80例子宫内膜癌组织和30例正常子宫内膜组织中的表达水平, χ^2 检验分析其表达与临床病理特征的关系, Kaplan-Meier生存曲线分析其表达对患者预后的影响。qRT-PCR检测TRIM14 mRNA在子宫内膜癌细胞系和人正常子宫内膜细胞系ESC中的表达; Ishikawa经脂质体分别转染TRIM14 siRNA(si-TRIM14)与对照(si-NC)48 h后, 采用Boyden实验检测各组细胞侵袭能力, Transwell实验检测各组细胞转移能力, 蛋白质印迹法检测各组细胞中波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)的影响。结果: qRT-PCR和免疫组织化学结果显示, TRIM14在子宫内膜癌组织中的表达显著高于正常子宫内膜组织, 其高表达与肌层浸润程度、组织学分级、淋巴结转移显著相关(均 $P < 0.05$), 子宫内膜癌组织中TRIM14高表达患者生存期较短。TRIM14 mRNA在子宫内膜癌细胞系Ishikawa, ECC-1, RL95-2中的表达均显著高于人正常子宫内膜细胞系ESC, 且在Ishikawa细胞中的表达最高($P < 0.05$); 转染TRIM14 siRNA后, Ishikawa细胞侵袭和转移能力下降, Vimentin, N-cadherin蛋白的表达减少, E-cadherin蛋白的表达增加(均 $P < 0.05$)。结论: TRIM14在子宫内膜癌组织和细胞系中均高表达, 且其高表达与肌层浸润程度、组织学分级、淋巴结转移及不良预后相关; 同时, TRIM14可能通过上皮-间充质转化促进子宫内膜癌细胞侵袭和转移, TRIM14可以作为侵袭和转移子宫内膜癌患者的不良预后分子及治疗子宫内膜癌的潜在靶点。

[关键词] 子宫内膜癌; 三结构域蛋白14; 免疫组织化学; 侵袭; 转移

Expression of TRIM14 in endometrial cancer and its effect on invasion and metastasis of endometrial cancer cells

HE Min¹, CHEN Yongwei², ZENG Kangkang¹, ZHENG Rong¹

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics; 2. Department of Urology, Shiyan Taihe Hospital & Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442700, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship between the expression of tripartite motif-containing 14 (TRIM14) in

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-15

通信作者 (Corresponding author): 贺敏, Email: 3036420578@qq.com

endometrial cancer and the clinical features and prognosis of patients with endometrial cancer, and to investigate its effect on invasion and metastasis of endometrial cancer. **Methods:** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the expression of TRIM14 in 80 cases of endometrial carcinoma and 30 cases of normal endometrium. The relationship between expression and clinical case characteristics was analyzed by χ^2 test. Kaplan-Meier survival curve analysis was performed on prognosis. qRT-PCR was used to detect the expression of TRIM14 mRNA in endometrial cancer cell lines and human normal endometrial cell line ESC; Ishikawa was transfected with TRIM14 siRNA (si-TRIM14) and control (si-NC) for 48 h. The Boyden assay was used to detect the invasive ability of each group cells. Transwell assay was used to detect the metastatic ability of each group cells. Western blot was used to detect the effects of Vimentin, N-cadherin and E-cadherin proteins. **Results:** qRT-PCR and immunohistochemistry showed that the expression of TRIM14 in endometrial cancer tissues was significantly higher than that in normal endometrial tissues. The high expression was significantly correlated with the degree of myometrial invasion, histological grade, and lymph node metastasis ($P < 0.05$), Patients with high expression of TRIM14 have a shorter survival period. The expression of TRIM14 mRNA in endometrial cancer cell lines Ishikawa, ECC-1, RL95-2 was significantly higher than that in human normal endometrial cell line ESC, and the expression of TRIM14 was the highest in Ishikawa cells ($P < 0.05$). the invasiveness and metastasis ability of Ishikawa cells and the expression of Vimentin, N-cadherin protein was decreased after transfected with TRIM14 siRNA, and the expression of E-cadherin protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** TRIM14 is highly expressed in endometrial cancer tissues and cell lines, and high expression is associated with myometrial invasion, histological grade, lymph node metastasis and poor prognosis. TRIM14 may promote cell invasion and metastasis by acting on epithelial-mesenchymal transition. TRIM14 can be used as a poor prognostic molecule for patients with invasive endometrial cancer and a potential target for the treatment of endometrial cancer.

Keywords endometrial cancer; tripartite motif-containing 14; immunohistochemistry; invasion; metastasis

子宫内膜癌是我国常见的女性生殖系统三大恶性肿瘤之一^[1],也是发达国家最常见的恶性妇科肿瘤^[2]。全球每年约有20万新发病例,且发病率仍然具有上升趋势^[3]。子宫内膜癌根据发病是否依赖雌激素分为I型子宫内膜样癌和II型非子宫内膜样癌^[4-5]。I型子宫内膜样癌的治疗主要是手术切除、放化疗辅助治疗等传统治疗,预后相对较好;II型非子宫内膜样癌属于侵袭性肿瘤,对这些传统治疗不敏感。研究^[6-7]指出:晚期和复发的子宫内膜癌由于侵袭和转移对传统治疗同样不敏感,导致子宫内膜癌患者预后不良,其5年生存率不到35%。子宫内膜癌的发生发展是一个多步骤的复杂过程,具体的分子机制尚未明确。随着基因靶向治疗研究的不断进步,越来越多的与子宫内膜癌有关的基因靶点被发现,相应的基因靶向药物也被证实对延缓子宫内膜癌的进展有效,为子宫内膜癌的治疗提供了新的研究方向。寻找与子宫内膜癌进展有关的分子靶标对子宫内膜癌的治疗及预后的改善有重要意义^[8-9]。三结构域蛋白14(tripartite motif-containing 14, TRIM14)参与

免疫调节和免疫感染,其在肿瘤中表达异常,并在侵袭和转移、血管生成等肿瘤生物学行为中发挥重要作用^[10-11]。而TRIM14在子宫内膜癌中的研究尚未见有报道,因此本研究首先检测了TRIM14在子宫内膜癌组织的表达,并分析其表达水平与患者临床病理特征及预后的关系,进一步在体外研究TRIM14表达对子宫内膜癌细胞侵袭和转移的影响及作用机制,为发掘子宫内膜癌候选促癌分子,研究其靶向治疗提供实验数据。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2012年12月至2017年12月入住十堰市太和医院,术前未接受放化疗、分子免疫治疗及靶向治疗等任何形式的抗肿瘤治疗,未合并其他肿瘤或威胁生命健康的重大疾病,证实为子宫内膜癌进行首次手术的子宫内膜癌标本,并具备完整的病例资料和随访资料,共纳入标本80例,患者年龄41~72(56.24±11.06)岁, <50岁者35例, ≥50

岁者45例。另取30例同时间段由于子宫肌瘤等其他疾病中取得的正常子宫内膜作为对照, 年龄39~67(51.06±13.75)岁。两组资料具有可比性。本研究经十堰市太和医院医学伦理委员会审核通过, 患者均签署知情同意书。

1.2 试剂及仪器

反转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒等购自日本TaKaRa公司; 兔抗人TRIM14多克隆抗体(ab185349)、兔抗人波形蛋白(Vimentin)多克隆抗体(ab8978)、兔抗人N-钙黏蛋白(N-cadherin)多克隆抗体(ab76057)、兔抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体(ab15148)购自美国Abcam公司; 动物非免疫羊血清、SP试剂盒、DAB显色试剂盒均购于碧云天有限公司; 加拿大中性树胶、蛋白裂解试剂购于北京Solarbio公司; 子宫内膜癌细胞系Ishikawa, ECC-1, RL95-2和人正常子宫内膜上皮细胞系ESC均购自美国ATCC细胞库; DMEM高糖培养基、DMEM-F12及FBS购自美国Gibco公司; TRIM14、内参GAPDH引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; TRIM14 siRNA由上海吉凯公司合成; Transwell购于美国Thermo公司。

1.3 qRT-PCR

子宫内膜癌组织样本及正常子宫内膜组织经液氮冷冻后研磨, 细胞收集后采用TRIzol裂解氯仿提取法获得总RNA, Nondrop 2000测得RNA浓度, 反转录成cDNA。设计并合成TRIM14正向引物为5'-TGAAGGGGAAATTCCTGAACTC-3', 反向引物为5'-AGCCTCTGGACAGGATCGG-3'。内参GAPDH正向引物为5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 反向引物为5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。以cDNA作为模板, 每个样品设置3个反应复孔, 按两步法进行荧光定量PCR反应, 分析各样品的循环阈值(cycle threshold, Ct), 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组实验数据。

1.4 免疫组织化学

采用SP法进行免疫组织化学检测, 组织样本均经4%中性甲醛固定48 h以上, 经石蜡包埋切片机切成厚度为4 μm 的切片; 石蜡切片70 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤2 h后, 二甲苯脱蜡30 min, 梯度乙醇及双蒸水逐级水化, 枸橼酸钠溶液中高温高压3 min进行抗原修复, 在3%过氧化氢甲醇溶液中室温避光30 min以灭活内源性过氧化物酶, 滴加非免疫羊血清室温封闭1 h, 滴加一抗工作液(TRIM14稀释比为

1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗涤3次后滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, PBS洗涤3次后DAB试剂显色, 冲洗后苏木精复染, 常规梯度乙醇脱水, 透明干燥后封片。

在低倍显微镜下随机选取5个视野, 每个视野计数100个细胞。细胞内出现棕黄色或者褐色颗粒为阳性细胞, 无阳性着色为0分, 浅棕黄色为1分, 棕黄色为2分, 深棕黄色为3分。根据阳性细胞所占比例计分, 无阳性细胞为0分, 1%~25%为1分; 26%~50%为2分; 51%~75%为3分; 76%~100%为4分。按阳性染色程度和细胞所占比例综合判定, 二者之和>3分为阳性表达, ≤ 3 分为阴性表达。专业随访人员采用电话及门诊的方式进行随访, 随访时间为手术后1~60个月, 直至患者死亡或者随访时间截止。

1.5 细胞培养及转染

ECC-1, RL95-2和ESC细胞的培养基为DMEM-F12+10%FBS, Ishikawa细胞的培养基为高糖培养基+10%FBS, 培养在37 $^{\circ}\text{C}$, 5%CO₂培养箱中。将呈对数生长期的Ishikawa细胞胰酶消化后铺至6孔板中, 细胞完全贴壁后将各组转染试剂与脂质体2000按说明书转染至细胞中, 分为TRIM14 siRNA(si-TRIM14)和对照组(si-NC), 放至培养箱中培养。

1.6 Boyden 实验检测细胞侵袭能力

Boyden实验需提前在Transwell小室聚碳酸酯微孔膜上铺45 μL (液态基质胶与无血清培养基比例为1:20), 放置37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中处理6 h。将收集转染各组的细胞, 用无血清培养基洗3次, 重悬于无血清培养基中, 细胞浓度为 1×10^6 个/mL、以每孔100 μL 细胞悬液接种于Transwell小室的上室预处理的基质胶上, 下室加500 μL 含10% FBS的培养基作为趋化因子, 放至细胞培养箱中培养, 显微镜下观察下室细胞数目, 掉入下室细胞10个左右时终止培养, PBS洗3次后甲醇固定10 min, 苏木精染色, 取出聚碳酸酯微孔膜, 显微镜下随机计数3个视野聚碳酸酯微孔膜下室面上的细胞, 取其均值代表细胞侵袭能力。

1.7 Transwell 实验检测细胞转移能力

收集转染各组细胞, 无血清培养基洗3次, 重悬于无血清培养基中, 细胞浓度为 1×10^6 个/mL、以每孔100 μL 细胞悬液直接接种于Transwell小室聚碳酸酯微孔膜上, 下室加500 μL 含10%FBS的培养

基作为趋化因子, 放至细胞培养箱中培养, 显微镜下观察下室细胞数目, 掉入下室细胞10个左右时终止培养, PBS洗3次后甲醇固定10 min, 苏木精染色, 取出聚碳酸酯微孔膜, 显微镜下随机计数3个视野聚碳酸酯微孔膜下室面上的细胞, 取其均值代表细胞转移能力。

1.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达

将各组细胞用PBS洗3次后加入蛋白裂解液(含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂), 刮刀将细胞刮下, 转移至EP管中, 超声裂解30 min, 4 ℃, 14 000 r/min离心20 min, 吸取上清液, BCA法测蛋白浓度, 加入上样缓冲液煮沸变性冷却后, 进行SDS-PAGE电泳, 蛋白湿转移至PVDF膜上, 8%脱脂牛奶室温封闭2 h, 加入一抗4 ℃孵育过夜, TBST洗3次后, 二抗室温孵育1 h, ELC化学发光法曝光条带。

1.9 统计学处理

用统计软件SPSS 17.0进行数据分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间的差异比较采用配对 t 检验, 采用 χ^2 检验比较TRIM14在子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织中的表达阳性率及与临床病理特征的关系。Kaplan-Meier生存曲线法分析子宫内膜癌患者5年总生存率, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR检测TRIM14 mRNA在子宫内膜组织中的表达

qRT-PCR结果显示: TRIM14 mRNA在子宫内膜癌组织中的表达(1.21 ± 0.56)显著高于正常子宫内膜组织(0.90 ± 0.33 , $t = 2.909$, $P = 0.0044$; 图1A), TRIM14 mRNA在肿瘤肌层浸润 $\geq 1/2$ 组织中的表达(1.58 ± 0.51)显著高于 $< 1/2$ 组织中(0.97 ± 0.45 , $t = 5.549$, $P < 0.0011$; 图1B), TRIM14 mRNA在有淋巴结转移的组织中表达水平(1.53 ± 0.51)显著高于无淋巴结转移的组织(0.94 ± 0.45 , $t = 5.552$, $P < 0.0011$; 图1C)。

2.2 免疫组织化学检测TRIM14蛋白在子宫内膜癌组织中的表达及与患者临床病理特征的关系

TRIM14蛋白在子宫内膜癌和正常子宫内膜组织中的表达阳性率分别为62.50%, 36.67% (图2), 子宫内膜癌组织中TRIM14蛋白阳性表达率显著高于正常子宫内膜组织($\chi^2 = 12.12$, $P < 0.001$)。TRIM14蛋白在子宫内膜癌组织中的表达水平与患者的年龄、组织病理分型和手术病理分期均无关, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。TRIM14蛋白与子宫内膜癌肌层浸润程度和组织分级及淋巴结转移显著相关(均 $P < 0.05$, 表1)。

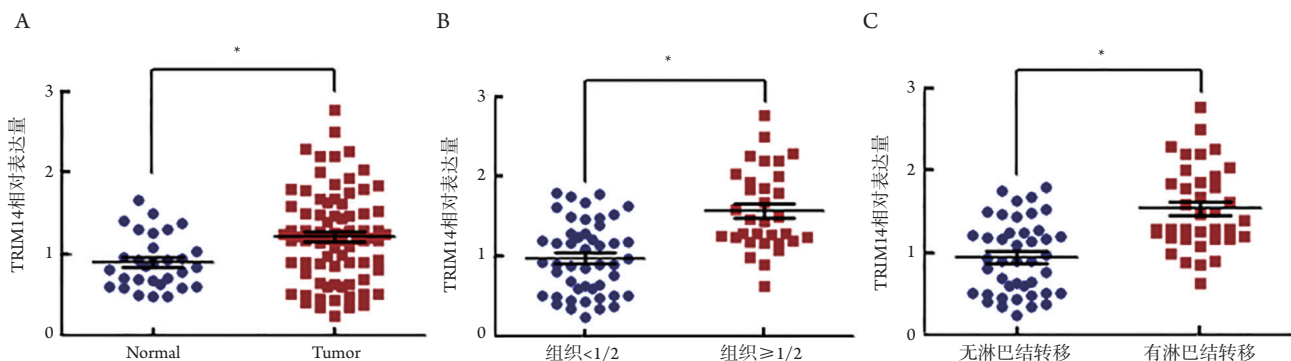


图1 qRT-PCR检测TRIM14 mRNA在子宫内膜癌组织中的表达

Figure 1 qRT-PCR showing the expression of TRIM14 mRNA in endometrial cancer tissues

(A) TRIM14 mRNA在子宫内膜癌组织中的表达显著高于正常子宫内膜组织; (B) TRIM14 mRNA在肿瘤肌层浸润 $\geq 1/2$ 组织中的表达显著高于 $< 1/2$ 组织中; (C) TRIM14 mRNA在有淋巴结转移的组织中表达水平显著高于无淋巴结转移的组织。 $*P < 0.05$ 。

(A) The expression of TRIM14 mRNA in endometrial carcinoma tissues was significantly higher than that in normal endometrial tissues; (B) The expression of TRIM14 mRNA in tumor myometrial invasion $\geq 1/2$ tissues was significantly higher than that in $< 1/2$ tissues; (C) TRIM14 mRNA expression levels in tissues with lymph node metastasis were significantly higher than those without lymph node metastasis. $*P < 0.05$.

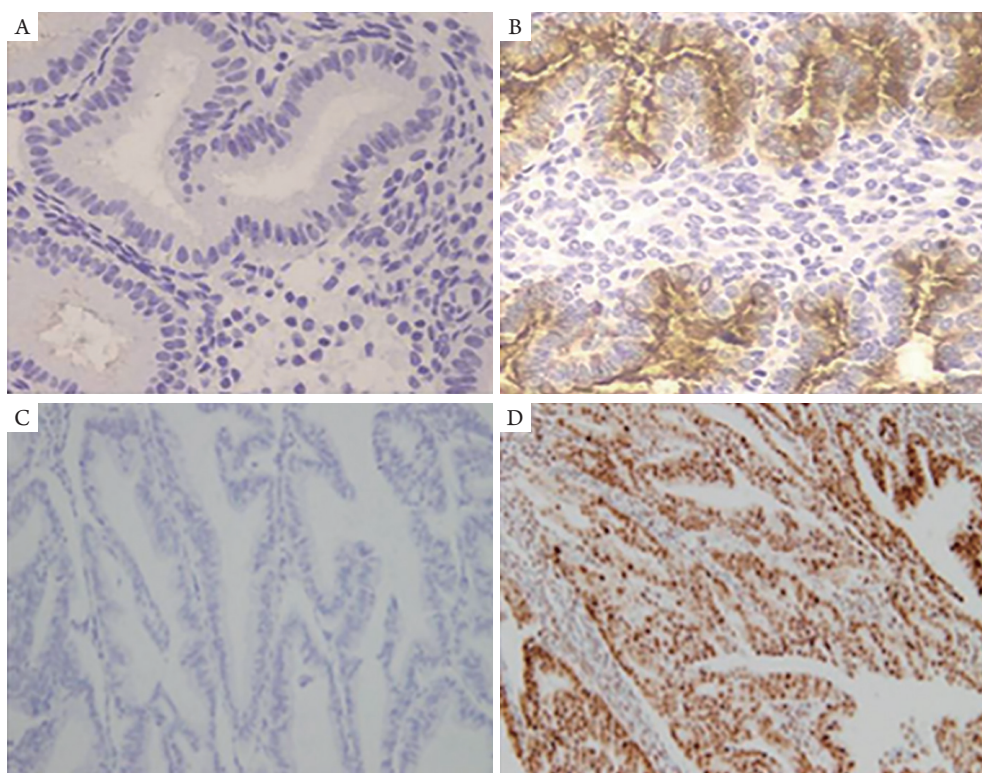


图2 免疫组织化学SP法检测TRIM14蛋白的表达($\times 400$)

Figure 2 Immunohistochemical SP method showing the expression of TRIM14 protein ($\times 400$)

(A)TRIM14蛋白在正常子宫内膜组织中阴性表达; (B)TRIM14蛋白在正常子宫内膜组织中阳性表达; (C)TRIM14蛋白在子宫内膜癌组织中的阴性表达; (D)TRIM14蛋白在子宫内膜癌组织中的阳性表达。

(A) TRIM14 protein is negatively expressed in normal endometrial tissues; (B) TRIM14 protein is positively expressed in normal endometrial tissues; (C) TRIM14 protein is negatively expressed in endometrial cancer tissues; (D) TRIM14 protein is positively expressed in endometrial cancer tissues.

表1 TRIM14在子宫内膜癌组织中的表达水平与临床病理特征之间的关系

Table 1 Relationship between the expression of TRIM14 in endometrial cancer tissues and clinical characteristics

临床病理特征	<i>n</i>	TRIM14蛋白表达阳性/[例(%)]	χ^2	<i>P</i>
年龄/岁			0.068	0.795
<50	35	22 (62.86)		
≥ 50	45	27 (60.00)		
组织病理类型			3.484	0.062
子宫内膜样	60	41 (68.33)		
非子宫内膜样	20	9 (45.00)		
肌层浸润深度			5.895	0.015
<1/2	42	21 (50.00)		
$\geq 1/2$	38	29 (76.32)		
组织学分级			4.566	0.033
G1	41	21 (51.22)		
G2~G3	39	29 (74.36)		

续表1

临床病理特征	n	TRIM14蛋白表达阳性/[例(%)]	χ^2	P
病理分期			3.200	0.074
I~II	50	35 (70.00)		
III~IV	30	15 (50.00)		
淋巴结转移			6.519	0.011
无	44	22 (50.00)		
有	36	28 (77.78)		

2.3 子宫内膜癌组织中 TRIM14 的蛋白表达水平对患者预后的影响

为研究TRIM14蛋白表达对子宫内膜癌患者术后生存时间的影响,对80例子宫内膜癌患者术后随访,并按TRIM14蛋白在子宫内膜癌组织中的表达情况分为TRIM14高表达组与TRIM14低表达组,根据TRIM14蛋白在子宫内膜癌中的染色程度和阳性细胞所占比例综合评分分为TRIM14高表达组(>4)和TRIM14低表达组(≤ 4)。Kaplan-Meier生存分析结果显示:TRIM14高表达组子宫内膜癌患者的5年生存期明显短于TRIM14低表达组($\chi^2=9.82$, $P=0.002$; 图3)。

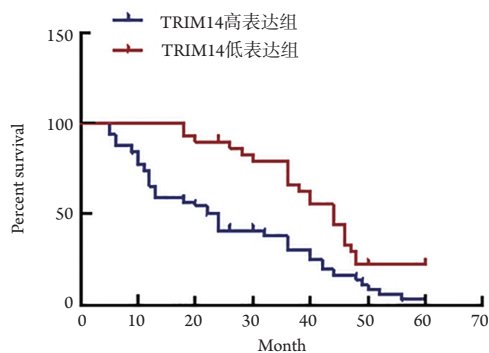


图3 子宫内膜癌组织中TRIM14的表达水平与患者术后生存时间的关系: TRIM14高表达的患者5年生存时间较短

Figure 3 Relationship between the expression level of TRIM14 in endometrial cancer tissues and the survival time of patients: the patients with high expression of TRIM14 have a shorter 5-year survival time

2.4 TRIM14 在子宫内膜癌细胞系中的表达

qRT-PCR结果显示:TRIM14在子宫内膜癌细胞系Ishikawa, ECC-1和RL95-2中的表达显

著高于人正常子宫内膜细胞系ESC,且在Ishikawa中的表达最高($P<0.05$,图4)。选择TRIM14表达最高的Ishikawa细胞系进行TRIM14 siRNA的转染, qRT-PCR检测显示: si-TRIM14组中TRIM14 mRNA的表达为 0.39 ± 0.14 ,显著低于si-NC组(1.05 ± 0.05)。

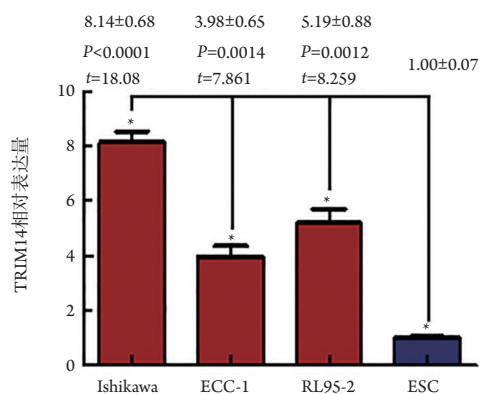


图4 qRT-PCR检测TRIM14在子宫内膜癌细胞系中的表达
Figure 4 qRT-PCR showing the expression of TRIM14 in human endometrial cancer cell lines

TRIM14在子宫内膜癌细胞系Ishikawa, ECC-1和RL95-2中的表达水平显著升高,且在Ishikawa中表达最高。 $*P<0.05$ vs 人正常子宫内膜细胞系ESC。

The expression levels of TRIM14 in human endometrial cancer cell lines Ishikawa, ECC-1 and RL95-2 were significantly increased, and the expression was highest in Ishikawa. $*P<0.05$ vs human normal endometrial cell line ESC.

2.5 TRIM14 对子宫内膜癌细胞侵袭能力的影响

Boyden实验结果显示: si-NC和si-TRIM14组细胞穿膜数分别为 46.34 ± 10.78 , 13.74 ± 7.54 。si-TRIM14组细胞侵袭能力明显低于si-NC组($P<0.05$,图5)。

2.6 检测 TRIM14 对子宫内膜癌细胞转移能力的影响

TRIM14 siRNA转染Ishikawa细胞抑制TRIM14的表达后, Transwell实验结果显示: si-NC和si-TRIM14组细胞穿膜数分别为 107.37 ± 14.68 , 25.41 ± 10.36 。si-TRIM14组细胞转移能力明显低于si-NC组($P < 0.05$, 图6)。

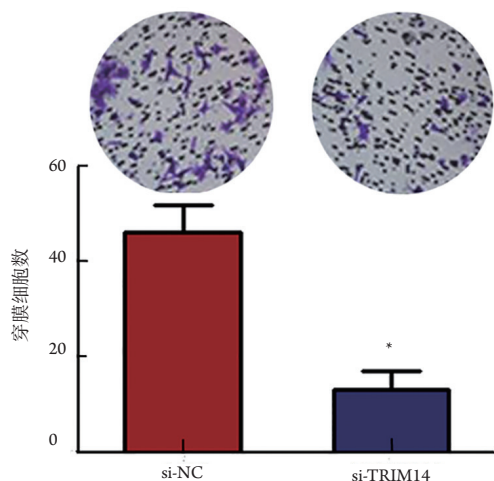


图5 Boyden实验检测TRIM14对细胞侵袭能力的影响: TRIM14 siRNA转染Ishikawa细胞后细胞的侵袭能力显著降低(* $P < 0.05$)

Figure 5 Boyden assay showing the effect of TRIM14 on cell invasion: the invasive ability of Ishikawa cells transfected with TRIM14 siRNA was significantly reduced (* $P < 0.05$)

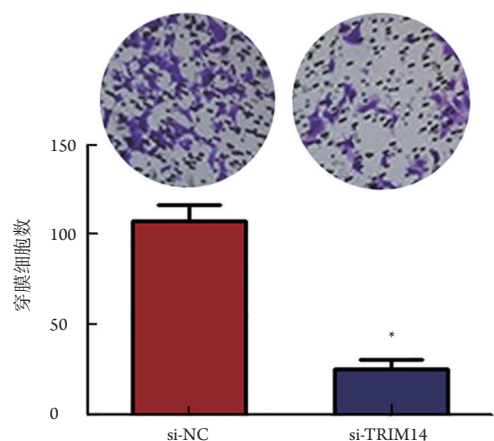


图6 Transwell实验检测TRIM14对细胞转移能力的影响: TRIM14 siRNA转染Ishikawa细胞后细胞的转移能力显著降低(* $P < 0.05$)

Figure 6 Transwell assay showing the effect of TRIM14 on cell metastasis: the metastasis ability of Ishikawa cells transfected with TRIM14 siRNA was significantly reduced (* $P < 0.05$)

2.7 蛋白质印迹法检测蛋白表达

与si-NC组相比, si-TRIM14组细胞中Vimentin, N-cadherin蛋白的表达减少, E-cadherin蛋白的表达增加(图7)。

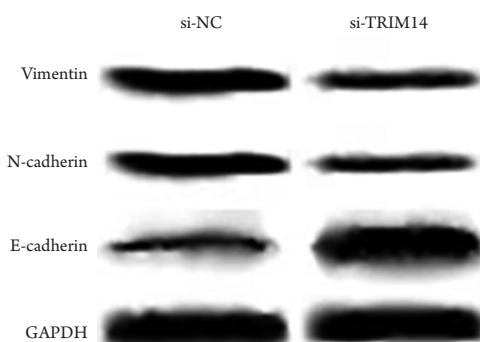


图7 蛋白质印迹法检测TRIM14 siRNA转染Ishikawa细胞干扰TRIM14的表达: Vimentin, N-cadherin蛋白的表达减少, E-cadherin蛋白的表达增加

Figure 7 Proteins in Ishikawa cells transfected with TRIM14 siRNA were detected by Western blot: expressions of Vimentin, N-cadherin protein were decreased and the expression of E-cadherin protein was increased

3 讨论

子宫内膜癌是女性生殖道常见恶性肿瘤, 严重威胁女性生命健康, 由于生活的压力增大、雌激素的乱用及肥胖的增加等因素使得子宫内膜癌的发病率以每年1%~2%的速度增加, 且越来越年轻化^[12-13]。虽然子宫内膜癌的治疗手术不断改进, 但是其预后仍然不尽如人意, 与子宫内膜癌治疗和预后有关的新靶点仍然是医学迫切需要研究的。研究^[14]表明: TRIM14位于染色体9q22, 属于三结构域蛋白家族(TRIM)中的一员, TRIM蛋白含有一系列保守结构域, 包括RING(R)指结构域, 1个或2个B盒基序(B1和B2)和卷曲螺旋(CC)区域。另有研究^[10-11,15-16]指出: TRIM14含有B1-CC结构域但是缺少R结构域, TRIM14蛋白超家族是细胞增殖、凋亡、炎症、免疫和转移等细胞生理和病理过程中的重要调节因子。TRIM14在多种肿瘤中表达异常, TRIM14在脑胶质瘤组织中高表达, 在体内和体外均可激活经典Wnt信号通路, 促进替莫唑胺的化学抗性^[17]; TRIM14在乳腺癌组织

和细胞系中均高表达, 下调TRIM14的表达抑制乳腺癌细胞的增殖, 促进细胞的凋亡^[17-18]。Hai等^[19]指出: TRIM14在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中低表达, 其沉默显著增强了NSCLC异种移植小鼠模型中的肿瘤生长, 而过表达TRIM14减弱了肿瘤的发生, 其抑制肿瘤活性可能依赖于细胞死亡信号转导途径。TRIM14在不同肿瘤中的表达不一致, 既可以充当癌因子和抑癌因子, 但是在子宫内膜癌中的表达水平及发挥的生物学功能尚未明确, 因此TRIM14是否在子宫内膜癌的恶性进展发挥重要作用引起了关注。

本研究首先采用qRT-PCR和免疫组织化学方法发现与正常子宫内膜组织相比, TRIM14在mRNA和蛋白水平的表达均显著高表达于子宫内膜癌组织, 且进一步进行 χ^2 检验分析发现, TRIM14高表达与子宫内膜癌肌层浸润程度、组织学分级及淋巴结转移相关, 且具有统计学意义。Wang等^[20]同样采用qRT-PCR和蛋白质印迹法分析TRIM14 mRNA和蛋白质在胃癌组织和细胞系中显著上调, 临床数据表明: TRIM14高表达与晚期TNM分期、淋巴结转移和预后特征显著相关。而本文同时采用Kaplan-Meier生存曲线对患者随访资料进行分析, 结果同样显示TRIM14高表达与子宫内膜癌患者预后显著相关, TRIM14高表达患者5年总生存期较短, 提示TRIM14可能为子宫内膜癌患者预后不良分子。研究^[21]显示: TRIM14在人骨肉瘤组织和细胞系中上调, 并与骨肉瘤进展和患者较短存活时间相关, TRIM14的过表达促进骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭, 并促进体内肿瘤生长。本研究发现TRIM14与高表达与子宫内膜癌肌层浸润程度、组织学分级、淋巴结转移及预后差相关, 提示其可能发挥子宫内膜癌侵袭和转移相关生物学功能。而qRT-PCR检测发现: TRIM14 mRNA在子宫内膜癌细胞系Ishikawa, ECC-1和RL95-2中的表达显著高于人正常子宫内膜细胞系ESC, 与其在子宫内膜癌组织水平表达具有一致性。选用TRIM14 mRNA表达最高的细胞系Ishikawa进行后续功能研究, 采用小干扰RNA技术干扰Ishikawa细胞中目的基因TRIM14的表达, Boyden和Transwell实验结果显示: 抑制Ishikawa细胞中TRIM14基因的表达后细胞侵袭和转移能力均下降。表明TRIM14基因可能为子宫内膜癌侵袭和转移恶性行为进展的促癌因子。

子宫内膜癌侵袭和转移是导致患者预后不良的主要原因, 是恶性肿瘤的重要生物学特征^[22]。深入研究TRIM14促进子宫内膜癌侵袭和转移的

具体分子机制具有重要意义。有研究^[23-24]认为: 上皮-间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)参与多种肿瘤的侵袭和转移, 它是一种由上皮细胞表型转化为间质细胞表型的生物学过程, 这个过程发生时上皮细胞的极性会丧失, 即上皮细胞间的紧密连接缺失、黏附力下降, 一方面使得细胞具有游走的能力, 增加肿瘤细胞的侵袭, 另一方面是上皮细胞转变为具有高迁移和侵袭特征的间质细胞。EMT发生的重要改变是上皮标志物E-cadherin表达下降, 间质细胞标志物Vimentin表达上调, 而E-cadherin转换为N-cadherin是EMT最关键的标志^[25]。Kim等^[26]研究报道香烟烟雾可通过增加细胞增殖和ROS介导的EMT过程促进子宫内膜癌的进展。而Li等^[27]认为: 在子宫内膜癌中, 甲基转移酶抑制剂通过EMT在增强肿瘤细胞转移中发挥重要作用。TRIM14是否通过EMT促进子宫内膜癌的侵袭和转移引起我们的关注, 因此本研究采用蛋白质印迹法检测EMT关键蛋白Vimentin, N-cadherin, E-cadherin蛋白的表达, 结果显示: 抑制TRIM14的表达后, Ishikawa细胞中Vimentin, N-cadherin蛋白表达减少, E-cadherin蛋白表达增加; 表明TRIM14可能通过EMT促进子宫内膜癌细胞的侵袭和转移。

综上, TRIM14高表达于子宫内膜癌组织和细胞中, 与患者的肌层浸润程度、组织学分级、淋巴结转移及不良预后相关, 在子宫内膜癌细胞中干扰TRIM14的表达可能通过抑制EMT降低肿瘤细胞的侵袭和转移能力, TRIM14可能是抑制子宫内膜癌细胞侵袭和转移的潜在靶点。

参考文献

1. Renaud MC, Le T. Epidemiology and investigations for suspected endometrial cancer[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2018, 40(9): e703-e711.
2. Jayaraman M, Radhakrishnan R, Mathews CA, et al. Identification of novel diagnostic and prognostic miRNA signatures in endometrial cancer[J]. Genes Cancer, 2017, 8(5/6): 566-576.
3. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.
4. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses[J]. J Pathol, 2018, 244(5): 538-549.
5. Suarez AA, Felix AS, Cohn DE. Bokhman Redux: endometrial cancer "types" in the 21st century[J]. Gynecol Oncol, 2017, 144(2): 243-249.

6. Alvarez T, Miller E, Duska L, et al. Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma?[J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36(5): 753-761.
7. 经叶花, 尹香花. 分子靶向药物在子宫内膜癌中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(20): 3993-3998.
JING Yehua, YIN Xianghua. Research progress of molecular targeted drugs in endometrial carcinoma[J]. *Medical Recapitulate*, 2018, 24(20): 3993-3998.
8. MacKay HJ, Levine DA, Bae-Jump VL, et al. Moving forward with actionable therapeutic targets and opportunities in endometrial cancer: NCI clinical trials planning meeting report on identifying key genes and molecular pathways for targeted endometrial cancer trials[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 84579-84594.
9. Alldredge JK, Eskander RN. EZH2 inhibition in mutated clear cell and endometrioid ovarian and endometrioid endometrial cancers[J]. *Gynecol Oncol Res Pract*, 2017, 4: 17.
10. Perelman SS, Abrams ME, Eitson JL, et al. Cell-based screen identifies human interferon-stimulated regulators of listeria monocytogenes infection[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1006102.
11. Chen M, Meng Q, Qin Y, et al. TRIM14 inhibits cGAS degradation mediated by selective autophagy receptor p62 to promote innate immune responses[J]. *Mol Cell*, 2016, 64(1): 105-119.
12. Von Behren J, Abrahão R, Goldberg D, et al. The influence of neighborhood socioeconomic status and ethnic enclave on endometrial cancer mortality among Hispanics and Asian Americans/Pacific Islanders in California[J]. *Cancer Causes Control*, 2018, 29(9): 875-881.
13. Tran AQ, Gehrig P. Recent advances in endometrial cancer[J]. *F1000Res*, 2017, 6: 81.
14. 杜天明, 严群, 冯艳坤, 等. 三结构域蛋白14在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(2): 222-226.
DU Tianming, YAN Qun, FANG Yankun, et al. Expression of TRIM14 in gastric carcinoma tissues and its association with clinicopathological features and prognosis[J]. *Acta Mediciniae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong*, 2018, 47(2): 222-226.
15. Wang X, Guo H, Yao B, et al. miR-15b inhibits cancer-initiating cell phenotypes and chemoresistance of cisplatin by targeting TRIM14 in oral tongue squamous cell cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5): 2720-2726.
16. Su X, Wang J, Chen W, et al. Overexpression of TRIM14 promotes tongue squamous cell carcinoma aggressiveness by activating the NF- κ B signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 9939-9950.
17. Tan Z, Song L, Wu W, et al. TRIM14 promotes chemoresistance in gliomas by activating Wnt/ β -catenin signaling via stabilizing Dvl2[J]. *Oncogene*, 2018, 37(40): 5403-5415.
18. Hu G, Pen W, Wang M. TRIM14 promotes breast cancer cell proliferation by inhibiting apoptosis[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(4): 439-447.
19. Hai J, Zhu CQ, Wang T, et al. TRIM14 is a putative tumor suppressor and regulator of innate immune response in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39692.
20. Wang F, Ruan L, Yang J, et al. TRIM14 promotes the migration and invasion of gastric cancer by regulating epithelial-to-mesenchymal transition via activation of AKT signaling regulated by miR-195-5p[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6): 3273-3284.
21. Xu G, Guo Y, Xu D, et al. TRIM14 regulates cell proliferation and invasion in osteosarcoma via promotion of the AKT signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42411.
22. Makker A, Goel MM. Tumor progression, metastasis, and modulators of epithelial-mesenchymal transition in endometrioid endometrial carcinoma: an update[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(2): R85-R111.
23. Kurioka K, Wato M, Iseki T, et al. Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF- β , and E-cadherin in ameloblastoma[J]. *Med Mol Morphol*, 2017, 50(2): 68-75.
24. Marei H, Malliri A. GEFs: dual regulation of rac1 signaling[J]. *Small GTPases*, 2017, 8(2): 90-99.
25. 李蒙, 吴玖斌, 张培彤. E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白及波形蛋白在肿瘤转移中应用的研究进展[J]. *肿瘤研究与临床*, 2016, 28(2): 132-136.
LI Meng, WU Jiubin, ZHANG Peitong. Research progress of application of E-cadherin, N-cadherin and vimentin in tumor metastasis[J]. *Cancer Research and Clinic*, 2016, 28(2): 132-136.
26. Kim SM, Hwang KA, Choi DW, et al. The cigarette smoke components induced the cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition via production of reactive oxygen species in endometrial adenocarcinoma cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121(1): 657-665.
27. Li BL, Lu W, Qu JJ, et al. Loss of exosomal miR-148b from cancer-associated fibroblasts promotes endometrial cancer cell invasion and cancer metastasis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2943-2953.

本文引用: 贺敏, 陈勇伟, 曾康康, 郑蓉. TRIM14在子宫内膜癌中的表达及其对子宫内膜癌细胞侵袭和转移的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(10): 2133-2141. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.006

Cite this article as: HE Min, CHEN Yongwei, ZENG Kangkang, ZHENG Rong. Expression of TRIM14 in endometrial cancer and its effect on invasion and metastasis of endometrial cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(10): 2133-2141. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.006