

• 论 著 •

β -防御素在子宫内膜癌及孕激素调控下癌细胞中的表达及意义*

王福生¹, 吴思楠², 陈雪晶², 苏佳佳², 李媛², 李晶晶², 李晓丹^{1△}

(内蒙古医科大学: 1. 基础医学院; 2. 第一临床医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

[摘要] **目的** 探究 β -防御素(DEFB)1、DEFB4A 差异表达在子宫内膜癌(EC)发展预测中的价值, 以及是否参与孕激素对 EC 的抑制。**方法** 利用 TIMER、GEPIA2 平台 172 例 EC 患者转录组测序数据进行 DEFB1、DEFB4A 差异表达及生存分析。EC *Ishikawa* 细胞采用不同浓度孕酮进行处理, 比较分析各浓度组 DEFB1、DEFB4A 表达情况。**结果** EC 组织 DEFB1、DEFB4A 表达水平均显著高于正常组织, 约 40 个月后, DEFB1、DEFB4A 高、低表达组患者的生存率差异均加大。孕酮处理后, 10^{-6} mol/L 组 DEFB1 mRNA 和蛋白水平在 24、48 h 后均较对照组显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 10^{-6} mol/L 组 DEFB1 表达在 48 h 后较 24 h 无显著变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。各浓度组 DEFB4A 变化不显著, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。孕酮作用下 EC *Ishikawa* 细胞活性与 DEFB1 表达呈显著负相关($P < 0.05$)。**结论** DEFB1 可能是预测 EC 发展的关键因子, 可提示孕激素治疗的复发风险或将成为 EC 的抑制靶点。

[关键词] 子宫内膜癌; 孕激素; β -防御素; 调控; 预测; 抑制

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.18.001

中图法分类号: R737.33; R392.12

文章编号: 1009-5519(2024)18-3061-06

文献标识码: A

Expression and significance of β -defensins in endometrial cancer and cancer cells regulated by progesterone*

WANG Fusheng¹, WU Sinan², CHEN Xuejing², SU Jiajia², LI Yuan², LI Jingjing², LI Xiaodan^{1△}

(Inner Mongolia Medical University: 1. School of Basic Medicine; 2. First Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010110, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the value of differential expression of β -defensins (DEFB) 1 and DEFB4A in predicting the development of endometrial cancer (EC) and whether they are involved in progesterone-mediated inhibition of EC. **Methods** Transcriptome sequencing data from 172 EC patients were utilized from the TIMER and GEPIA2 platforms to analyze the differential expression of DEFB1 and DEFB4A and survival. EC *Ishikawa* cells were treated with different concentrations of progesterone, and the expression of DEFB1 and DEFB4A in each concentration group was compared and analyzed. **Results** The expression levels of DEFB1 and DEFB4A in EC tissues were significantly higher than those in normal tissues. After approximately 40 months, the survival rates between high and low expression groups of DEFB1 and DEFB4A were further differentiated. After progesterone treatment, the mRNA and protein levels of DEFB1 in the 10^{-6} mol/L group were significantly increased compared to the control group at 24 and 48 hours, with statistically significant differences ($P < 0.05$). However, there was no significant change in DEFB1 expression between 24 and 48 hours in the 10^{-6} mol/L group, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). No significant changes were observed in DEFB4A levels across all concentration groups, and the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The activity of EC *Ishikawa* cells under progesterone treatment was significantly negatively correlated with DEFB1 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** DEFB1 may serve as a critical factor in predicting the development of EC, indicating the risk of recurrence with progesterone therapy and potentially becoming a therapeutic target for EC inhibition.

[Key words] Endometrial cancer; Progesterone; β -Defensins; Regulation; Prediction; Inhibition

子宫内膜癌(EC)是女性生殖道常见的恶性肿瘤, 治疗手段, 但对不适宜手术、不能耐受放化疗或者是其发病率呈上升趋势^[1]。手术联合放化疗为 EC 主要 有生育需求的患者而言, 保守的孕激素内分泌疗法的

* 基金项目: 内蒙古自治区高校科研项目自然科学一般项目(NJZY22667); 内蒙古医科大学大学生创新创业项目(202210132044); 内蒙古医科大学内蒙古自治区重点实验室开放项目(NYFZSW202104); 内蒙古医科大学面上项目(YKD2023MS039)。

作者简介: 王福生(1999—), 硕士研究生在读, 主要从事子宫内膜癌基础研究。△ 通信作者, E-mail: lixiaodan148@126.com。

效果令人鼓舞^[1-3]。然而,虽使用孕激素治疗完全缓解率约为 80%,但复发率仍可达 25%^[4]。β-防御素(DEFB)是机体天然免疫的重要组成,在多种肿瘤(如胃癌、肺癌)的发生或抑制中发挥关键作用^[5-6]。DEFB 在妊娠期绵羊和产后牛子宫内膜中高表达并可受孕激素调控^[7-9]。以上研究提示 DEFB 在 EC 中可能发挥重要作用并受到孕激素治疗的影响。本研究通过转录组测序分析 DEFB1 和 DEFB4A 在 EC 临床患者中的表达情况,并使用孕激素作用 EC *Ishikawa* 细胞株,检测 DEFB1 和 DEFB4A 的表达差异,同时检测癌细胞活性。本研究可能为 EC 的发展找到有效检测指标或治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 一般材料 EC *Ishikawa* 细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司。倒置相差显微镜(Olympus,日本),二氧化碳培养箱(Thermo,美国),水平离心机(Hitachi,日本),立式高压灭菌锅(TOMY,日本);定量聚合酶链反应(q-PCR)仪(CFX96 System,美国)、水平电泳仪(Bio-Rad,美国),20、1 000、5 000 μL 移液器,酶标仪,低温离心机(Eppendorf,德国),超净工作台、称量天平、恒温水浴锅均为国产。T25 细胞培养瓶,96、6 孔细胞培养板(Corning,美国)。RNA 提取试剂盒(No. 220011,上海飞捷,中国),青链霉素、DMEM-F12 培养基、0. 25% 胰蛋白酶-EDTA (No. 15140、No. C11330500BT、No. 25300, Gibico, 中国),孕酮(57-83-0, Sigma, 美国),MTT 试剂盒(C0009S, 碧云天,中国),RNA 反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒、DL2000 DNA Marker (No. RR047A、No. R011、No. 3427Q, Takara, 中国),q-PCR 试剂盒(No. QPS-201, Toyobo, 日本),人 β 防御素 1(HBD-1)/人 β 防御素 4(HBD-4)酶联免疫分析试剂盒(酶免试剂盒商城,中国),β-actin 及 DEFB1、DEFB4A 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 数据处理及分析 本研究用于差异表达分析的 EC 临床病例转录组测序数据来源于 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>),运用 TIMER 数据平台(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) Diff Exp 分析 DEFB1 和 DEFB4A 在不同肿瘤的正常和癌组织中的表达差异,使用 Wilcoxon 检验评估差异表达的统计显著性,运用 GEPIA2 数据平台([tp://gepia2.cancer-pku.cn](http://gepia2.cancer-pku.cn))验证分析 EC 正常、癌组织

中 DEFB1 和 DEFB4A 的表达差异^[10]。运用 GEPIA2 数据平台以 172 例 EC 患者 DEFB1 和 DEFB4A 表达的中位数为分界,将患者分为高表达组和低表达组,运用 Kaplan-Meier 法绘制曲线,并采用 Log-rank 检验比较 2 组生存差异,根据 Cox PH 模型计算风险比。

荧光定量检测 DEFB1 和 DEFB4A 的 Cq 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 计算相对表达量。检测光密度(OD)值并通过标准曲线计算 DEFB1 和 DEFB4A 的蛋白表达量,对在孕激素作用下的 EC *Ishikawa* 细胞活性与 DEFB1 和 DEFB4A 的表达进行相关性分析并作图。

1.2.2 细胞培养及传代 将冻存的 EC *Ishikawa* 细胞复苏后,置于完全培养基(DMEM+10%血清+1%双抗)、37℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞长满 T25 培养瓶,消化分散传代至 6 孔板或 96 孔板,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养待细胞长至 80%进行药物处理和检测。

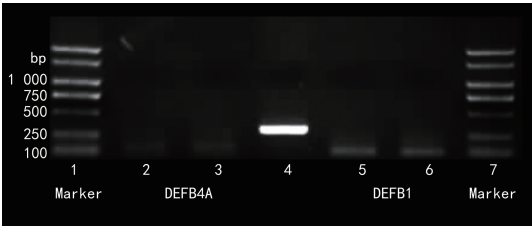
1.2.3 细胞分组与处理 将 96 孔板和 6 孔板培养的细胞分为孕酮 3 个不同浓度处理组,各组孕酮终浓度分别为 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ mol/L,并设对照组,每组 3 个重复。上述细胞于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中分别培养 24、48 h。检测以上 8 个不同时间和浓度作用组的 mRNA、蛋白和细胞活性。

1.2.4 细胞提取 RNA、反转录 将不同浓度孕酮处理 24、48 h 后的各组细胞,按照飞捷 RNA 提取试剂盒步骤提取 RNA。提取后的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 OD 值测定,质量合格后进行反转录。根据测定各样品总 RNA 浓度确定加样量,按照反转录试剂盒操作步骤对提取的 RNA 进行反转录。得到的 cDNA 于-80℃保存,用于 q-PCR 测定。

1.2.5 q-PCR 引物设计与 DEFB1 和 DEFB4A mRNA 检测 从 NCBI 数据中心获取 β-actin、DEFB1 和 DEFB4A 的 cDNA 序列,BLAST 设计扩增引物,引物序列见表 1。引物交由 Invitrogen 公司合成。合成的引物进行 PCR 后,采用琼脂糖凝胶电泳验证,PCR 产物条带的长度与引物设计时理论长度一致,见图 1。按照荧光定量试剂盒 25 μL 反应体系,以反转录 cDNA 为模板,利用特定引物扩增目的基因 DEFB1 和 DEFB4A 并定量,β-actin 为内参,用于计算相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 q-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	温度(℃)	结果(bp)
DEFB1	上游引物:GAG AAC TTC CTA CCT TCT GCT GT	60	149
	下游引物:TCG GGC AGG CAG AAT AGA GA		
DEFB4A	上游引物:GGG TCT TGT ATC TCC TCT TCT CG	60	105
	下游引物:TGG CTC CAC TCT TAA GGC AG		
β-actin	上游引物:TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	58	245
	下游引物:GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG		



注:1,7 泳道为 DL 2000 DNA Marker;2,3 泳道为 DEFB4A 引物;4 泳道为 β -actin 引物;5,6 泳道为 DEFB1 引物。

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

1.2.6 EC 细胞 DEFB1 和 DEFB4A 蛋白检测 分别提取不同浓度孕酮处理不同时间后的各组细胞总蛋白,根据 DEFB1 和 DEFB4A ELISA 试剂盒操作步骤,酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔 OD 值并计算实际含量。实验重复 3 次。

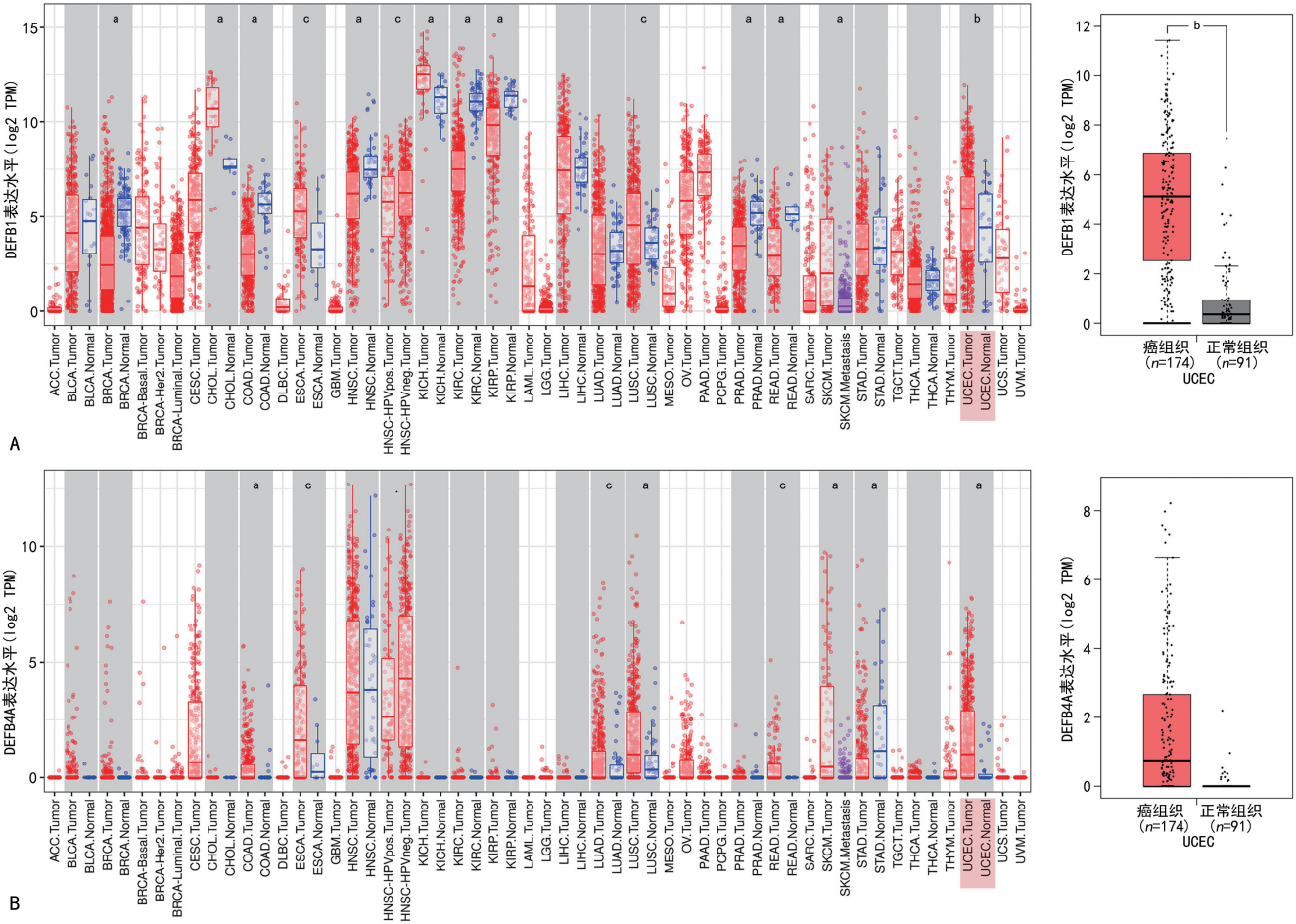
1.2.7 EC 细胞活性检测 按照 MTT 检测试剂盒操作步骤,酶标仪在 490 nm 波长下测定不同浓度孕酮处理不同时间后的 96 孔板细胞每孔 OD。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 软件(8.0 版)绘图并对组间显著差异数据进行统计学分析,采用单因素方差分析检验组间差异的显著性, $P<0.05$

为差异有统计学意义。

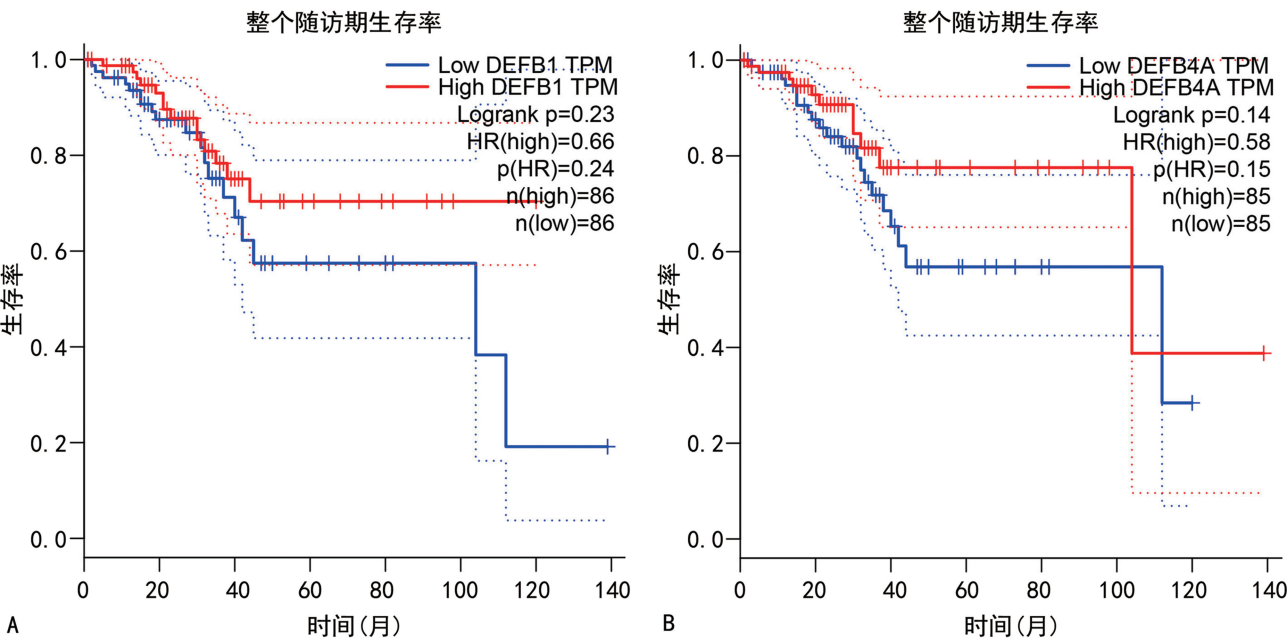
2 结 果

2.1 防御素在 EC 中的表达及生存差异 运用 TIMER 数据平台 Diff Exp 分析 DEFB1 和 DEFB4A 在不同肿瘤的正常和癌组织中的表达差异,结果显示 DEFB1 和 DEFB4A 分别在多种不同肿瘤的癌组织和正常组织中存在显著性差异表达(如皮肤黑色素瘤等)。在 EC 组织中,DEFB1 和 DEFB4A 的表达均显著高于正常组织,差异均有统计学意义($P<0.05$),GEPIA2 数据平台验证了 EC 癌组织和正常组织中 DEFB1 和 DEFB4A 的差异表达,见图 2A、B。GEPIA2 数据平台进一步分析,DEFB1 高表达与低表达组 EC 患者整个随访期生存率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3A。虽然在确诊后较短时间 2 组的生存率非常相近,但随着患病时间的延长(约 40 个月),2 组的生存率差异加大,DEFB1 高表达组在约 40 个月后生存率约为 0.7,而 DEFB1 低表达组生存率约为 0.5,见图 3A。DEFB4A 高表达与低表达组患者整个随访期生存率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3B。



注:A. DEFB1;B. DEFB4A;与正常组织比较, ^a $P<0.001$; ^b $P<0.01$; ^c $P<0.05$ 。

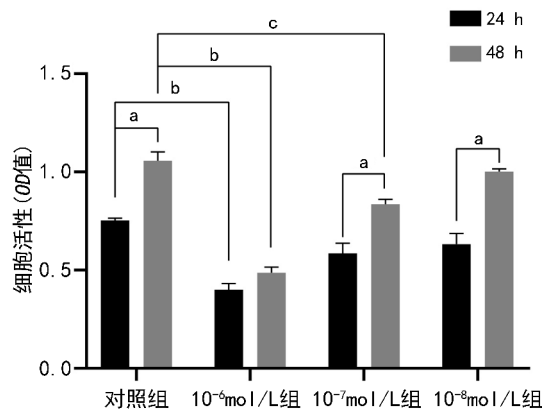
图 2 DEFB1 和 DEFB4A 在不同肿瘤和 EC 的正常组织及癌组织中的表达差异



注：A. DEFB1；B. DEFB4A。

图3 DEFB1 与 DEFB4A 表达与 EC 患者生存关系

2.2 孕激素对 EC *Ishikawa* 细胞活性的影响 对比各浓度孕酮处理后细胞活性, 10^{-6} mol/L 浓度组细胞活性在处理不同时间后均显著低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 浓度组作用 48 h 后较 24 h 细胞活性均显著增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)；而 10^{-6} mol/L 浓度组 48 h 后较 24 h 细胞活性无显著变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 见图 4。



注：与同组 24 h 比较, ^a $P < 0.01$ ；与对照组同时间比较, ^b $P < 0.01$ ；^c $P < 0.05$ 。

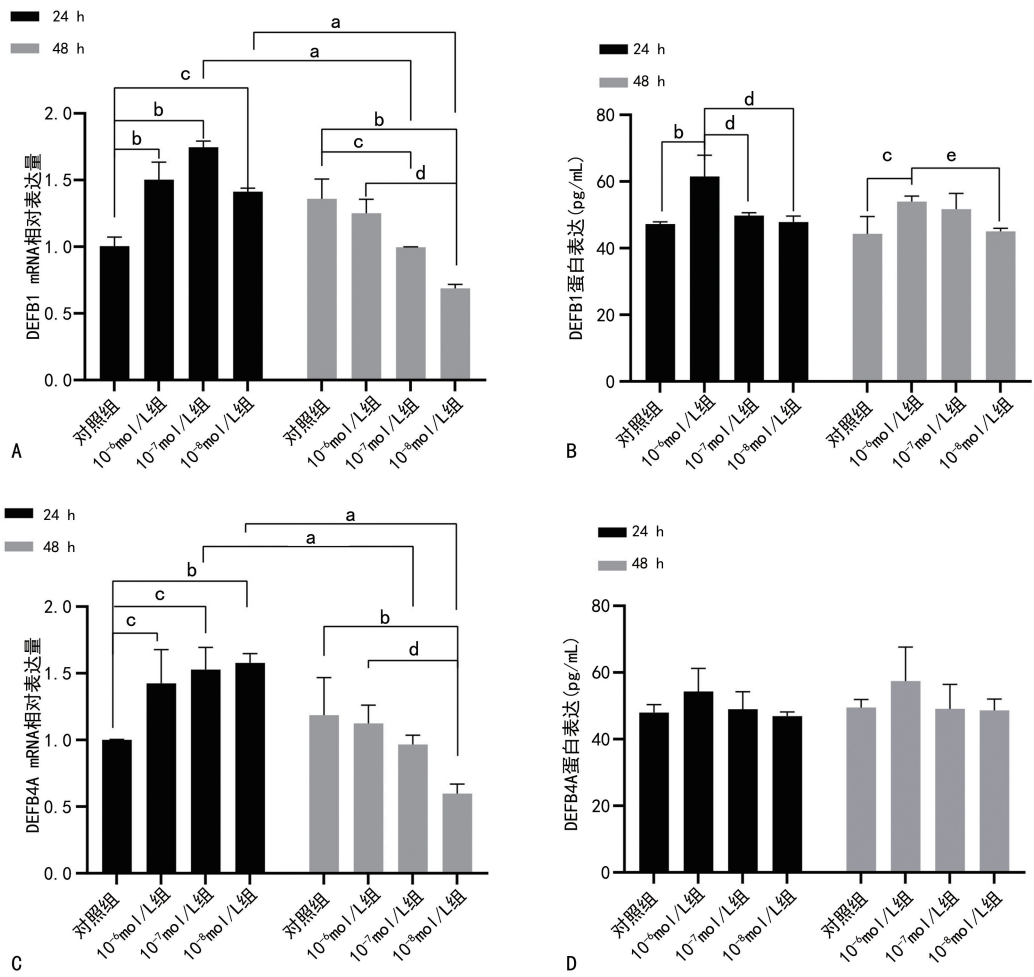
图4 不同浓度(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L)孕酮作用 EC *Ishikawa* 细胞不同时间(24、48h)对细胞活性影响

2.3 不同浓度孕酮作用不同时间后对防御素的表达影响 不同浓度的孕酮(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L)处理 EC *Ishikawa* 细胞株后, 各浓度组 DEFB1 mRNA 的表达量在处理 24 h 后较对照组均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 5A；48 h 后各浓度组

DEFB1 mRNA 的表达量较对照组均不同程度降低；DEFB1 mRNA 表达量在 10^{-6} mol/L 孕酮作用 48 h 后较 24 h, 无显著差异, 维持稳定表达, 10^{-7} mol/L 组与 10^{-8} mol/L 组 48 h 后较 24 h 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 5A；DEFB1 蛋白水平在处理 24、48 h 后, 10^{-6} mol/L 组较对照组均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，但其他浓度组在作用 24、48 h 后较对照组变化均不显著, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 5B；DEFB1 蛋白水平在孕酮作用 48 h 后较 24 h 各浓度组无显著变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 5B。

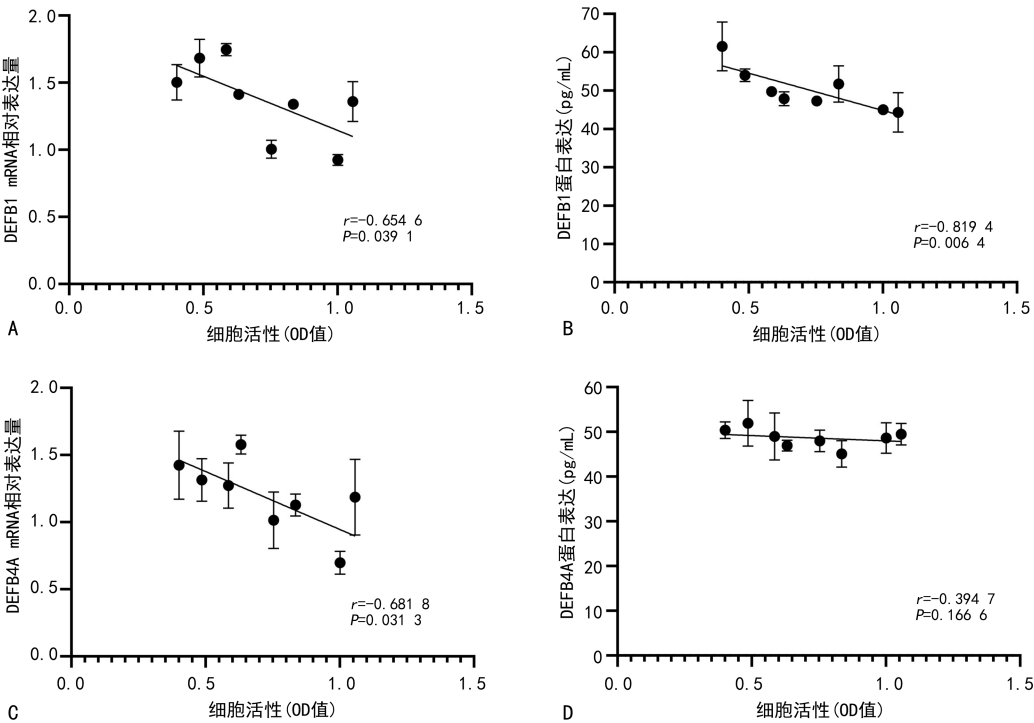
不同浓度孕酮(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L)处理 EC *Ishikawa* 细胞株 24 h 后, DEFB4A mRNA 的表达在各组中显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 5C；而 DEFB4 蛋白水平在分别处理 24、48 h 后, 10^{-6} mol/L 组较对照组有所升高但不显著, 其他各组变化也不显著, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 5D。 10^{-6} mol/L 组 DEFB4A mRNA 表达量在孕酮作用 48 h 后较 24 h 无显著性差异, 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 组 48 h 后较 24 h 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 5C；DEFB4 蛋白水平在孕酮作用 48 h 后较 24 h 各组无显著变化, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 5D。

2.4 孕激素作用下细胞活性与防御素表达的相关性 EC *Ishikawa* 细胞活性与 DEFB1 mRNA 和蛋白表达均呈线性显著负相关 ($P < 0.05$)，而与 DEFB4 蛋白表达无显著相关性 ($P > 0.05$)。 见图 6。



注：A. DEFB1 mRNA；B. DEFB1 蛋白；C. DEFB4A mRNA；D. DEFB4A 蛋白；与同组 24 h 比较，^a $P < 0.01$ ；与对照组同时间比较，^b $P < 0.01$ ；^c $P < 0.05$ ；与不同浓度组同时间比较，^d $P < 0.01$ ；^e $P < 0.05$ 。

图 5 不同浓度 (10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L) 孕酮作用不同时间 (24、48 h) 后对 EC *Ishikawa* 细胞 DEFB1 和 DEFB4A 表达的影响



注：A. DEFB1 mRNA；B. DEFB1 蛋白；C. DEFB4A mRNA；D. DEFB4A 蛋白。

图 6 细胞活性与 DEFB1、DEFB4A 表达的相关性

3 讨 论

β-防御素是机体天然免疫的重要组成,在不同类型的肿瘤中,DEFB 呈现不同的失调趋势(上调或下调),DEFB1 抑制肝癌、口腔鳞癌的发展,但在这些肿瘤中却往往表达不足^[10-12]。本研究通过转录组分析 EC 患者 DEFB1、DEFB4A 的差异表达发现,它们均在 EC 组织中显著高于正常组织表达,如果 DEFB1、DEFB4A 升高是 EC 患者的保护机制,这可能是 EC 5 年生存率较高的主要原因^[13]。本研究还发现 DEFB1 的高表达在确诊较长时间后(约 40 个月)更有利于提高患者的生存率,DEFB1 可能成为预测 EC 复发的关键因素。

β-防御素在正常子宫内膜中受到孕激素调控^[7-9]。本研究结果显示,高浓度的孕酮能有效抑制 EC *Ishikawa* 细胞的活性,且能在较长时间内(48 h)持续抑制作用,低浓度孕酮较难抑制 EC *Ishikawa* 细胞活性。证实 EC 细胞中 β-防御素表达受孕激素影响,DEFB1 的表达量受高浓度(10^{-6} mol/L)孕激素显著上调,并在较长时间内(48 h)维持 DEFB1 的高表达。因孕激素公认的 EC 抑制作用及防御素的抗肿瘤活性^[1-6],所以孕酮对 DEFB1 的上调作用可能是孕激素抑制 EC 的关键。

本研究结果显示,高浓度孕酮(10^{-6} mol/L)能显著促进 EC *Ishikawa* 细胞 DEFB1 mRNA 和蛋白表达同时升高,且高浓度(10^{-6} mol/L)孕酮在一定时间内可维持 DEFB1 高表达。证实在高浓度孕酮的作用下(此时 DEFB1 表达升高)EC *Ishikawa* 细胞活性降低并在一定时间内维持在低水平,而较低浓度孕酮下(此时 DEFB1 无显著变化)细胞活性随时间显著升高。相关性分析结果显示,EC 细胞活性与 DEFB1 表达呈显著负相关($P<0.05$),说明孕激素对 EC 的抑制作用与 DEFB1 高表达有关。

综上所述,DEFB1 的高表达在确诊较长时间(约 40 个月)后更有利于提高患者的生存率,其可能成为预测 EC 复发的关键因素,且 DEFB1 可能参与了孕激素对 EC 的抑制作用,可提示孕激素治疗的复发风险,或将成为抑制 EC 的有效靶点。

参考文献

[1] TROJANO G, OLIVIERI C, TINELLI R, et al. Conservative treatment in early stage endometrial cancer: A review[J]. Acta Biomed, 2019, 90(4):405-410.

[2] 汪志辉,刘艳,周冬梅,等.大剂量孕激素治疗子宫内膜不典型增生及早期子宫内膜癌的疗效及妊娠结局分析[J].实用妇产科杂志,2020,36(2):124-127.

[3] 刘桂凤.醋酸甲羟孕酮对子宫内膜癌患者术后康复质量的影响[J].中国处方药,2022,20(3):112-114.

[4] QIN Y, YU Z Z, YANG J X, et al. Oral progestin treatment for early-stage endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(6):1081-1091.

[5] AL ZEYADI M, DIMOVA I, RANCHICH V, et al. Whole genome microarray analysis in non-small cell lung cancer[J]. Biotechnol Equip, 2015, 29(1):111-118.

[6] TANIKAWA C, KAMATANI Y, TOYOSHIMA O, et al. Genome-wide association study identifies gastric cancer susceptibility loci at 12q24. 11-12 and 20q11. 21 [J]. Cancer Sci, 2018, 109(12):4015-4024.

[7] IBRAHIM M, PETER S, GÄRTNER M A, et al. Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum [J]. Theriogenology, 2016, 86(8):2040-2053.

[8] 包图雅,杨燕燕,白萨日娜,等.孕酮对绵羊输卵管上皮细胞 β-防御素 2 表达的影响[J].动物医学进展,2019,40(6):42-47.

[9] 王东阳,杨燕燕,白萨日娜,等.孕酮对绵羊输卵管上皮细胞 β-防御素-1 mRNA 表达的影响[J].西北农业学报,2020,29(3):334-340.

[10] GHOSH S K, MCCORMICK T S, WEINBERG A. Human beta defensins and cancer: Contradictions and common ground[J]. Front Oncol, 2019, 9:341.

[11] HAN Q, WANG R N, SUN C K, et al. Human beta-defensin-1 suppresses tumor migration and invasion and is an Independent predictor for survival of oral squamous cell carcinoma patients[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e91867.

[12] LING Y M, CHEN J Y, GUO L B, et al. β-defensin 1 expression in HCV infected liver/liver cancer: an important role in protecting HCV progression and liver cancer development[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):13404.

[13] AMANT F, MOERMAN P, NEVEN P, et al. Endometrial cancer [J]. Lancet, 2005, 366(9484):491-505.

(收稿日期:2024-05-26 修回日期:2024-07-20)