

# CHAF1A和ER $\alpha$ 在宫颈鳞状细胞癌中的表达和临床意义

文丽<sup>1</sup> 李鑫<sup>2</sup> 贾英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆市两江新区第一人民医院病理科, 重庆 400020)

**摘要** 该研究探讨染色质组装因子1亚基(CHAF1A)和雌激素受体1(ER $\alpha$ )在宫颈鳞状细胞癌(CSCC)组织中的表达, 探究CHAF1A和ER $\alpha$ 的关系及其对CSCC潜在的临床意义, 采用了免疫组织化学染色法检测CHAF1A和ER $\alpha$ 在CSCC组织及对应的癌旁组织中的表达情况; 从CSCC组织及对应癌旁组织中提取总RNA, RT-PCR检测其mRNA水平, 分析其相关性; 免疫印迹实验检测CHAF1A和ER $\alpha$ 在HeLa、C33a、CaSki、Siha和HaCat细胞中的表达差异; 慢病毒介导的ShRNA敲低CHAF1A mRNA的表达, RT-PCR检测CHAF1A基因敲低后对ER $\alpha$ 表达的影响。结果显示, CHAF1A的表达随着CSCC病变的进展升高, 在宫颈癌组织中的表达显著高于其对应的癌旁组织, 在宫颈癌细胞株中的表达亦高于人正常表皮细胞系; ER $\alpha$ 的表达随着CSCC病变的进展降低, 在宫颈癌组织及细胞系中的表达趋势则与CHAF1A相反。CHAF1A基因敲低后ER $\alpha$  mRNA表达升高; 另外, 统计分析利用 $\chi^2$ 检验、Spearman检验及Student's *t*检验, 探索CHAF1A和ER $\alpha$ 表达与CSCC临床病理特征的关系。得出结论, CHAF1A在宫颈癌中高表达并与CSCC恶性程度呈正相关性; ER $\alpha$ 在宫颈癌中低表达且与CSCC恶性程度呈负相关性; CHAF1A的表达与ER $\alpha$ 的表达呈负相关性; CHAF1A可能对ER $\alpha$ 的表达具有调控作用。

**关键词** 宫颈鳞状细胞癌; 染色质组装因子1亚基; 雌激素受体 $\alpha$ ; 相互调节

## Expression of CHAF1A and ER $\alpha$ in Cervical Squamous Carcinoma and the Clinical Significance

WEN Li<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, JIA Ying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology Department of the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Chongqing Liangjiang New District First People's Hospital, Chongqing 400020, China)

**Abstract** The study aims to investigate the expression and the relationship of CHAF1A (chromatin assembly factor 1 subunit) and ER $\alpha$  (estrogen receptor 1) in CSCC (cervical squamous cell carcinoma) tissues, as well as their clinical significance in the occurrence and development of CSCC. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CHAF1A and ER $\alpha$  in CSCC tissues and corresponding adjacent tissues. Total RNA was extracted from CSCC tissues and corresponding adjacent tissues, and mRNA levels were detected by RT-PCR to analyze their correlation. Western blot was used to detect the differences in the expression of CHAF1A and ER $\alpha$  in

收稿日期: 2020-11-27 接受日期: 2021-01-18

重庆市科委基础与前沿技术研究项目(批准号: estc2016jcyAX0022)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13996275739, E-mail: 617418550@qq.com

Received: November 27, 2020 Accepted: January 18, 2021

This work was supported by Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.estc2016jcyAX0022)

\*Corresponding author. Tel: +86-13996275739, E-mail: 617418550@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5485>

HeLa, C33a, CaSki, Siha and HaCat cells. Lentivirus-mediated ShRNA knocked down *CHAF1A* mRNA expression, and RT-PCR was used to detect the effect of *CHAF1A* knockdown on *ER $\alpha$*  expression. The results showed that the expression of *CHAF1A* increased with the development of CSCC lesions, and its expression in cervical cancer tissues was significantly higher than that in corresponding para-cancerous tissues, and its expression in cervical cancer cell lines was also higher than that in human normal epidermal cell lines. With the development of CSCC lesions, the expression of *ER $\alpha$*  was reduced, and the expression trend in cervical cancer tissues and cell lines was opposite to *CHAF1A*. The expression of *ER $\alpha$*  mRNA increased after *CHAF1A* gene knockdown. In addition, statistical analysis such as  $\chi^2$  test, Spearman test and Student's *t* test were used to explore the relationship between *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  expression and the clinicopathological characteristics of CSCC. *CHAF1A* was highly expressed in cervical cancer and was positively correlated with the degree of CSCC malignancy; *ER $\alpha$*  was low in cervical cancer and was negatively correlated with the degree of CSCC malignancy, while the relation of *ER $\alpha$*  with CSCC was opposite. *CHAF1A* may have a regulatory effect on the expression of *ER $\alpha$* .

**Keywords** cervical squamous carcinoma; chromatin assembly factor 1 subunit A; estrogen  $\alpha$ ; mutual regulation

宫颈癌严重危害全球妇女健康,其发病率位于女性肿瘤第四位<sup>[1]</sup>。宫颈癌发病率及死亡率在不同地区、不同经济状况的国家有显著差异,经济欠发达地区的发病率及死亡率较发达国家高<sup>[1]</sup>。虽然宫颈细胞学检查大大降低了发达国家宫颈癌的发病率和死亡率,宫颈癌仍然是发展中国家癌症导致相关死亡的主要原因。近年来,我国宫颈癌发病率呈现出明显升高趋势,发病年龄趋于年轻化<sup>[2]</sup>。宫颈癌的发病机制目前尚未研究的十分清楚,但现有的研究表明,宫颈癌的发生与高危型人乳头瘤病毒持续感染密切相关<sup>[3]</sup>,并且涉及癌基因的过度表达和抑癌基因的失活。

*CHAF1A*(chromatin assembly factor 1 subunit A)是染色质组装因子-1(chromatin assembly factor-1, *CAF-1*)的主要成分,*CAF-1*由p150、p60和p48亚基组成,其主要功能是促进核小体在新复制的DNA上的快速组装<sup>[4]</sup>。越来越多的证据表明,*CHAF1A*在癌症的发病机制中占有重要的作用,其过度表达与肿瘤进展<sup>[5]</sup>、癌症易感性<sup>[6]</sup>以及最近研究较热的表观遗传沉默<sup>[7]</sup>相关。*CHAF1A*参与多种肿瘤的发生、发展,包括乳腺癌、前列腺鳞状细胞癌、肝细胞癌、胶质瘤、神经母细胞瘤、胃癌、肺癌、结直肠癌等<sup>[8-16]</sup>。在癌症的治疗中,*CHAF1A*可能影响治疗效果。我们知道,化疗介导的细胞凋亡和肿瘤细胞消退,主要是通过*P53*介导的转录反应实现的。有研究报道,*P53*基因抑制后导致*CHAF1A*及其他四个基因的表达上调,上调的基因均预示了不良的生存结局,这对*P53*相关化

疗药物的具体作用机制进行了进一步的阐明<sup>[6]</sup>。同样在一项关于胃癌的研究中报道,*CHAF1A*可能通过调节胸苷酸合成酶表达影响胃癌的辅助化疗疗效<sup>[7]</sup>。

*ER*(estrogen)是一种类固醇受体,共有三种亚型,经典的核受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和最近发现的膜相关雌激素受体-G蛋白偶联的雌激素受体1(G protein-coupled estrogen receptor 1, *GPER*)<sup>[18]</sup>。通常情况下, $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 两种受体同时存在,但 $\alpha$ 类型一般在乳房、宫颈和阴道中占主导地位,而 $\beta$ 类型在卵巢、前列腺、睾丸和肺中普遍存在<sup>[19]</sup>。子宫是女性生殖道的一部分,对雌激素有很强的敏感性,每个月宫颈上皮都会随雌激素水平的变化发生周期性改变,而雌激素主要是通过雌激素受体发挥作用。既往研究提示,小鼠模型研究强烈支持雌激素和雌激素受体 $\alpha$ ( $ER\alpha$ )在所有致癌步骤中拥有持续重要的作用<sup>[20-22]</sup>, $ER\alpha$ 与宫颈癌的关系涉及到发病机制、治疗及生物标志物等<sup>[23-25]</sup>。但宫颈癌中 $ER\alpha$ 的研究仍然相当有限。因此,探索宫颈癌发生发展的分子生物学机制,发现更加有效的精准治疗靶点对于宫颈癌诊断和治疗具有十分重要的意义。为了进一步探索*CHAF1A*的下游靶基因,我们常规对*CHAF1A*基因沉默后的样本进行测序,测序结果显示, $ER\alpha$ 在*CHAF1A*基因沉默后具有较大的表达差异。为了进一步探索*CHAF1A*和 $ER\alpha$ 的相互调节关系,本研究通过免疫组织化学实验,检测*CHAF1A*及 $ER\alpha$ 在宫颈鳞状细胞癌(cervical squamous cell carcinoma, CSCC)中的表达,利用慢病毒敲低*CHAF1A*的表达,予以RT-PCR实验了解敲减

CHAF1A后ER $\alpha$ 的表达变化,以探索它们两者间的相互调节关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 一般资料 选取2013年1月至2018年12月重庆医科大学附属第一医院收治的宫颈鳞癌(CSCC)患者,本研究通过我院伦理审批委员会审批,所有患者均签署知情同意书。包含①宫颈癌I期及II期患者存档的病理标本63例,将患者对应的癌旁组织标本(距离肿瘤组织大于4 cm)作为对照组;②所有病例入院前及入院后均未行化疗、放疗及内分泌治疗;③患者有完整的临床病历及病理资料,随访资料亦完整。排除标准:①合并严重的内科疾病;②存在其他部位恶性肿瘤及合并其他重要脏器功能不全患者;③存在其他生殖系统疾病及内分泌紊乱疾病患者;④年龄小于30岁或者大于50岁;⑤合并妊娠及近期有过妊娠、流产史的患者,绝经后患者;⑥曾做过生殖器官摘除术的患者。入组的宫颈癌组平均年龄(42.6 $\pm$ 6.3)岁;临床分期根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)手术病理分期标准进行,I期患者16例,II期47例;淋巴结转移14例;高中分化46例,低分化17例。正常组平均年龄(41.9 $\pm$ 6.1)岁。两组年龄无显著差异( $P>0.05$ )。另选取2017年2月至2018年9月我院妇科门诊经病理确诊的原发性CSCC的组织标本,配对的癌和癌旁正常组织标本24对,患者年龄最小34岁,最大49岁,平均年龄43.53岁。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗人CHAF1A单克隆抗体(proteintech, #00018939)、兔抗人ER $\alpha$ 单克隆抗体(proteintech, #00087846)购自武汉三鹰生物有限公司;山羊抗兔IgG二抗购自北京中衫金桥生物有限公司;山羊抗兔二抗G1213购自赛维尔生物有限公司;免疫组织化学试剂盒购自北京中衫金桥生物科技有限公司;RNA提取、逆转录及PCR反应相关试剂盒购自TaKaRa公司;慢病毒产品购自上海吉凯基因化学有限公司;MEM、DMEM、RPMI1640均购自Gibco生物科技有限公司;胎牛血清购自德国PAN生物技术有限公司;Real-time PCR仪及Western blot电泳仪均购自伯乐生物医学产品(上海)有限公司;凝胶成像使用仪器为法国Vilber公司成像仪。

### 1.2 免疫组织方法检测宫颈癌组织中CHAF1A、ER $\alpha$ 的表达

严格按照试剂盒说明书进行SP法免疫组织化学检测,按照抗体使用说明书,按照CHAF1A 1:100、ER $\alpha$  1:200的比例,用PBS液稀释抗体。所有病例标本切自病理科封存的石蜡块中,脱蜡后,酒精梯度脱水,PBS冲洗。切片浸入柠檬酸缓冲液中,加热至98 $^{\circ}$ C,持续15 min,冷却,PBS冲洗。山羊血清工作液常温封闭15 min,一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS冲洗后,每张切片加入50~100  $\mu$ L二抗工作液,二抗原液与pH7.2~7.4的PBST以1:200的比例稀释,室温下孵育30~60 min,PBS冲洗。DAB溶液显微镜下显色,苏木素复染。用中性树胶封片。染色结果由两位高年资病理医师盲片阅片,CHAF1A主要表达于细胞核,ER $\alpha$ 则在细胞核、细胞质及细胞膜上均有表达。阳性染色为棕黄色。根据染色强度和阳性染色率的乘积对免疫组化结果进行半定量分析。染色强度分级:无染色计0分,淡黄色计1分,黄色计2分,棕黄色计3分。阳性染色率:<1%计0分,1%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,76%~100%计4分。总分为上述两个积分乘积,<4分定义为阴性, $\geq$ 4分定义为阳性。

### 1.3 细胞培养及蛋白提取

Siha细胞、C33A细胞培养于MEM培养基,HeLa细胞培养于DMEM培养基,HaCat细胞及CaSki细胞培养于RPMI 1640培养基,以上所有培养基使用时另按10%浓度添加胎牛血清。Siha、HeLa细胞购买于上海吉凯生物有限公司,其余细胞获赠于重庆医科大学中心实验室,所有细胞培养于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳孵箱中,待细胞密度长到90%左右时提取细胞蛋白,BCA测蛋白浓度,蛋白定量。

### 1.4 RT-PCR技术

CHAF1A及GAPDH引物由上海生工生物有限公司合成,ER $\alpha$ 引物由TaKaRa公司合成,具体序列见表1。宫颈癌、对应癌旁正常宫颈组织及细胞株总RNA的提取严格按照TaKaRa试剂盒说明书进行,组织RNA提取时使用磁珠充分研磨组织。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火、延伸,40个循环。数据结果使用Bio-Rad CFX Manager 3.0软件进行后续分析。

### 1.5 慢病毒转染

据PCR实验结果显示,HeLa细胞中ER $\alpha$  mRNA表达量较人正常永生化上皮细胞(HaCat)细胞株高,



取HeLa细胞行慢病毒转染。将携带有*CHAF1A*基因敲除的慢病毒转染进入培养的HeLa细胞中。使用的序列分别为Sh-*CHAF1A*: 5'-GGG AGT ACG TCA TGT CCA TTG-3'。Sh-EGFP: 5'-CCT AAG GTT AAG TCG CCC TCG-3'。病毒滴度 $2 \times 10^8$  TU/mL, 正式转染前予以摸索最适转染复数(multiplicity of infection, MOI)值, 转染时按照之前确定的MOI=10予以转染。正式转染时使用六孔板培养板, 每孔加入细胞数2万个, 铺板次日按照最适转染复数转染慢病毒, 转染前按照每个孔中细胞数量计算好需要添加的病毒量, 将需要的病毒量及促进转染的polybrene用细胞培养基稀释, 转染时直接按不同的分组加入孔板中。加入病毒后次日弃含病毒的培养基, 改为普通完全培养基培养。转染后48 h用嘌呤霉素筛选 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 染上病毒的细胞, 后续用低浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素维持培养两周, 筛选稳定转染细胞株。

### 1.6 Western blot检测*CHAF1A*和*ER $\alpha$* 的蛋白水平

待细胞密度长到90%左右时, 提取细胞蛋白, 测定蛋白浓度后进行蛋白定量, 经10%的SDS-PAGE分离, 电泳时电压取60~90 V, 然后在250 mA恒流下进行湿转, 将蛋白质转移到PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h后, TBST洗膜2次, 放入稀释的一抗中(*CHAF1A* 1:1 000, *ER $\alpha$*  1:800, 稀释液为碧云天专用抗体稀释液); 4 °C孵育过夜, 第2天用TBST洗膜3次, 加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(按1:7 500比例使用TBST稀释), 室温孵育1 h; TBST洗膜3次, 每次10 min, ECL发光液显色。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析, 计数资料用n%表示, 用 $\chi^2$ 检验; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用*t*检验; *CHAF1A*与*ER $\alpha$* 间相关性行Spearman检验。对于RT-PCR研究, 表达的统计学差异组间用Student's *t*检验计算, 所有结果均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *CHAF1A*及*ER $\alpha$* 在CSCC及对应癌旁组织中的mRNA表达

CSCC组织中, *CHAF1A*表达水平为 $1.142 \pm 0.586$ , 对应的癌旁正常宫颈组织表达水平为 $0.641 \pm 0.388$ , 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图1A)。ER $\alpha$ 在CSCC中表达水平为 $0.498 \pm 0.825$ , 在对应的癌旁正常宫颈组织中的表达水平为 $1.588 \pm 1.335$ , 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图1B)。

### 2.2 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 在不同宫颈病变组织中阳性率比较

*CHAF1A*在宫颈癌旁组织中不表达, 在CSCC中63例中有57例细胞核阳性, 占百分比为90.48%, 其中阳性率分别为I期68.80%(11/16)、II期97.9%(46/47), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表2)。

### 2.3 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 蛋白在宫颈病变组织中的表达情况

*CHAF1A*主要表达在细胞核, 细胞核外几乎没有表达。*CHAF1A*在宫颈病变中伴随着宫颈病变严重程度增加表达升高; 且*CHAF1A*在CSCC I期、II期中的表达较病灶旁的正常组织的表达明显升高(图2A和图2B)。ER $\alpha$ 则在细胞核及细胞质中均有表达, ER $\alpha$ 在宫颈病变中伴随着宫颈病变严重程度增加表达降低; 而且ER $\alpha$ 在CSCC I期、II期中的表达比病灶旁的正常组织的表达反而较低(图2C和图2D)。

### 2.4 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 免疫组织化学检测蛋白表达的相关性

*CHAF1A*和ER $\alpha$ 在宫颈病变组织中的蛋白表达呈负相关, 随着CSCC严重程度增加*CHAF1A*表达升高; 随着CSCC期别的进展ER $\alpha$ 的表达降低, 利用Spearman检验,  $r = -0.300$ ,  $P < 0.05$ 差异具有统计学意义(表3)。

### 2.5 *CHAF1A*、*ER $\alpha$* 在CSCC组织中蛋白表达的临床相关性分析

*CHAF1A*在FIGO分期II期、低分化组织的阳性表达率显著高于FIGO分期I期、高中度分化组织的阳性率( $P < 0.05$ ); ER $\alpha$ 在FIGO分期I期、高中分化组织、淋巴结转移CSCC组织中的表达高于FIGO分期II期、低分化、淋巴结未转移CSCC组织中的表达。( $P < 0.05$ )(表4)。

### 2.6 CSCC组织中*CHAF1A*和*ER $\alpha$* mRNA水平表达呈负相关

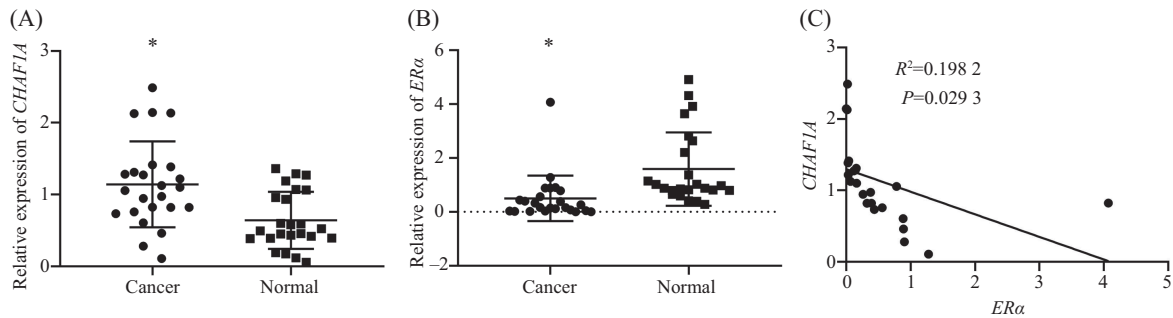
*CHAF1A*和ER $\alpha$ 在组织中mRNA水平Pearson相关分析, 显示CSCC组织中表达呈负相关( $r = -0.4451$ ,  $P < 0.5$ , 图1C)。

### 2.7 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 在宫颈癌各细胞株及HaCat细胞株中mRNA的表达

*CHAF1A*在宫颈癌各个细胞株中的表达较HaCat细胞株明显高( $P < 0.001$ ), 差异具有统计学意义。具体表达情况见图3A, ER $\alpha$ 在宫颈癌各个细胞

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列 Sequence
<i>CHAF1A</i>	Forward 5'-GGA GCA GGA CAG TTG GAG TG-3' Reverse 5'-GAC GAA TGG CTG AGT ACA GA-3'
<i>ER<math>\alpha</math></i>	Forward 5'-TGA AGT GCA AGA ACG TGG TG-3' Reverse 5'-GCA AGG AAT GCG ATG AAG TAG-3'
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3' Reverse 5'-ACC CTG TTG CTG TAG CCA-3'



A: *CHAF1A*在宫颈组织中的mRNA表达水平癌较癌旁明显升高; B: *ER $\alpha$* 在宫颈组织中的mRNA表达水平较癌旁明显降低; C: *CHAF1A*和*ER $\alpha$*  mRNA表达在CSCC组织中具有负相关性。\* $P$ <0.05。

A: *CHAF1A* mRNA levels were significantly higher in CSCC tissues compared with the adjacent non-cancerous tissues; B: *ER $\alpha$*  mRNA levels in cervical tissues were significantly lower than those in adjacent tissues; C: there was a negative correlation between the expression of *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  mRNA in CSCC. \* $P$ <0.05.

图1 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 在宫颈组织中的mRNA表达情况

Fig.1 The mRNA expression of *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  in cervical tissue

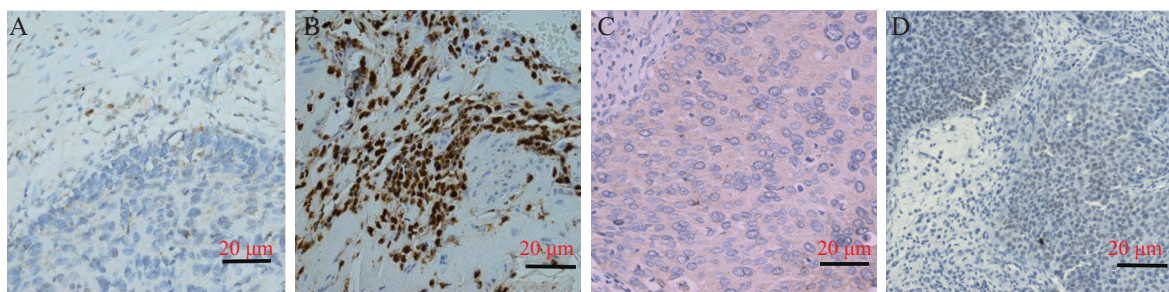
表2 CSCC及正常宫颈组织标本CHAF1A、ER $\alpha$ 阳性表达情况比较

Table 2 Comparison of positive expression of *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  in CSCC and normal cervical tissue samples

类别 Category	例数 Number	ER $\alpha$ 阳性 ER $\alpha$ positive	CHAF1A阳性 CHAF1A positive
Normal	30	25/83.33%	6/20.00%
Tumor	63	31/49.20%*	57/90.48%*
$\chi^2$	—	9.880	46.192
$P$	—	<0.05	<0.05

\* $P$ <0.05, 与癌旁正常宫颈组织比较。

\* $P$ <0.05 compared with adjacent normal tissues.



A: *CHAF1A*在癌旁正常组织中几乎无表达; B: 在CSCC中, *CHAF1A*呈阳性表达, 且全部表达于细胞核; C: *ER $\alpha$* 在癌旁正常组织中呈阳性表达; D: 在CSCC中未见*ER $\alpha$* 表达。

A: *CHAF1A* had almost no expression in normal tissues adjacent to cancer; B: in CSCC, *CHAF1A* as positively expressed, and was all expressed in the nucleus; C: *ER $\alpha$*  was positively expressed in normal tissues adjacent to cancer; D: *ER $\alpha$*  was not expressed in CSCC.

图2 *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 在CSCC及癌旁正常组织中的表达

Fig.2 Expression of *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  in CSCC and normal adjacent tissues

表3 ER $\alpha$ 和CHAF1A在宫颈鳞癌组织中的表达的相关性分析  
Table 3 Correlation analysis of expression of ER $\alpha$  and CHAF1A in CSCC

ER $\alpha$	CHAF1A		Total	<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-			
+	22	9	31	-0.300	0.018
-	30	2	32		
Total	52	11	63		

“+”表示ER $\alpha$ 或CHAF1A阳性表达;“-”表示ER $\alpha$ 或CHAF1A阴性表达。

“+” indicates ER $\alpha$  or CHAF1A positive expression;“-” indicates ER $\alpha$  or CHAF1A negative expression.

表4 宫颈鳞癌组织中ER $\alpha$ 、CHAF1A阳性表达与临床特征的相关性分析  
Table 4 Correlation analysis between positive expression of ER $\alpha$  and CHAF1A and clinical features in CSCC

参数	特征	数量	ER $\alpha$ 阳性(N=31)			CHAF1A阳性(N=57)		
			ER $\alpha$ positive (N=31)	$\chi^2$	<i>P</i>	CHAF1A positive (N=57)	$\chi^2$	<i>P</i>
Parameters	Characteristic	<i>N</i>	Positive	$\chi^2$	<i>P</i>	Positive	$\chi^2$	<i>P</i>
Age (years)	40-49	37	19	2.425	>0.05	31	2.968	>0.05
	30-39	26	12		26			
FIGO grade	I	16	15	17.026	<0.05 <sup>a</sup>	11	8.612	<0.05 <sup>a</sup>
	II	47	16		46			
Differentiation	High+Medium	46	18	6.924	<0.05 <sup>b</sup>	45	7.760	<0.05 <sup>b</sup>
	Low	17	13		12			
Lymphatic	Positive	14	12	9.599	<0.05 <sup>c</sup>	13	0.000	>0.05
Metastasis	Negative	49	19		44			
MuscuLar	$\geq 1/2$	8	3	0.109	>0.05	8	0.114	>0.05
Invasion	<1/2	55	28		49			

<sup>a</sup>*P*<0.05, 与II期相比; <sup>b</sup>*P*<0.05, 与低分化细胞癌相比; <sup>c</sup>*P*<0.05, 与淋巴结转移阴性相比。

<sup>a</sup>*P*<0.05 compared with stage II; <sup>b</sup>*P*<0.05 compared with poorly differentiated cancer; <sup>c</sup>*P*<0.05 compared with negative lymph node metastasis.

株中的表达较HaCat细胞株明显低(*P*<0.001), 差异具有统计学意义(图3B)。

## 2.8 CHAF1A和ER $\alpha$ 在宫颈癌各细胞株及HaCat细胞株蛋白的表达

CHAF1A在宫颈癌各个细胞株中的表达较HaCat细胞株明显高。ER $\alpha$ 在宫颈癌各个细胞株中的表达较HaCat细胞株明显低(图3C)。

## 2.9 病毒敲低CHAF1A后对ER $\alpha$ 表达的影响

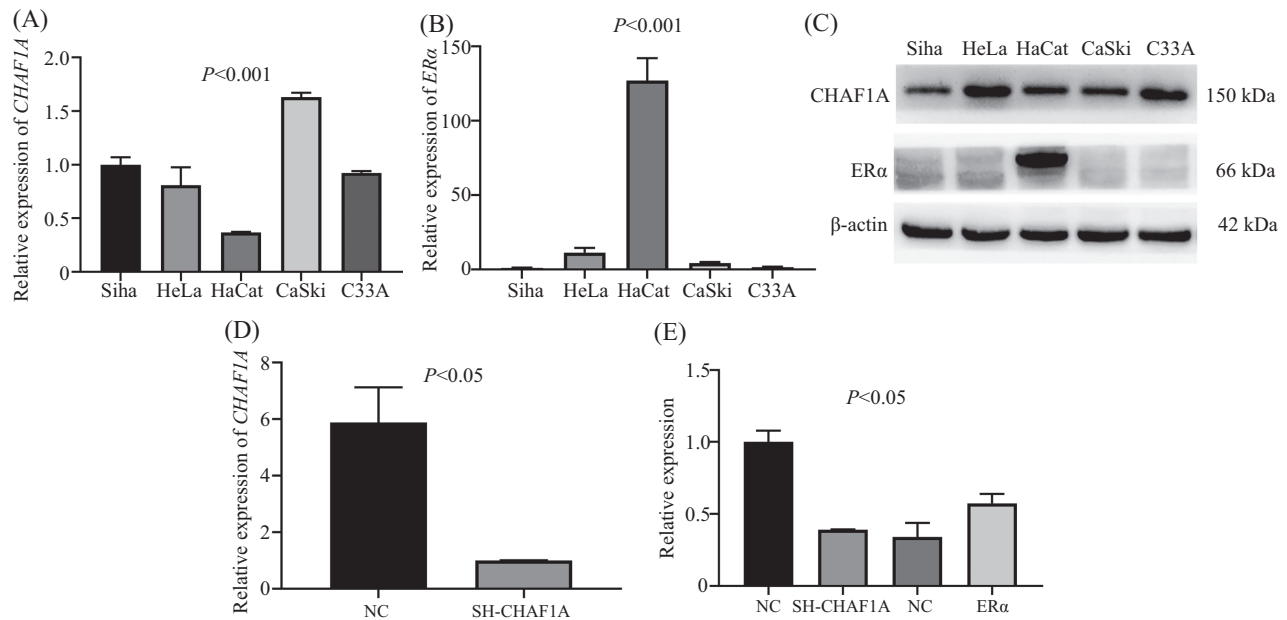
在宫颈癌细胞株中, 敲低CHAF1A的表达后, 我们可以看到ER $\alpha$ 的mRNA表达量会升高。病毒敲低基因后效果如图3D所示。CHAF1A敲低后对ER $\alpha$ 的表达的影响如图3E所示, 实验结果采用非配对*t*检验, *P*<0.05差异具有统计学意义。

## 3 讨论

宫颈癌是全球第二大常见的女性恶性肿瘤。它给妇女健康带来了严重的困扰, 其发病率和死亡率每年都在增加<sup>[26]</sup>。宫颈癌的发生与高危致癌性HPV

的感染有关, 最显著的是HPV-16和HPV-18<sup>[27-29]</sup>。但是HPV感染并不会全部都出现宫颈癌表型, 因此推测, HPV感染导致宫颈癌的发生必然还有其他影响因子的存在。ME等<sup>[30]</sup>曾利用小鼠HPV感染致宫颈癌的体内模型研究表明, HPV癌基因和雌激素显著改变宿主的宫颈基质基因表达, 包括一些炎症趋化因子的改变。

曾有研究表明, 在受体失控或者激素水平紊乱期间, 最常导致宫颈癌发生的HPV-16和HPV-18型的基因表达会增加<sup>[31-33]</sup>。ZHAI等<sup>[34]</sup>研究发现, ER $\alpha$ 在大多数侵袭性宫颈癌及癌源性细胞系中的表达较非侵入性低。在之前的研究中, 作者用PCR方法及免疫印迹法检测宫颈癌细胞中ER $\alpha$ 的表达, 发现在大多数癌细胞系中, ER $\alpha$ 的mRNA及蛋白质水平表达量较低或不可检测。对宫颈癌组织进行免疫组化染色, 证实ER $\alpha$ 在宫颈浸润癌中的表达较正常宫颈鳞状上皮和宫颈癌前病变下调, 此点与本次研究相符。但在另一个雌激素、雌激素受体及HPV相关作用的



A: *CHAF1A*在宫颈癌各细胞株中的表达明显高于HaCat细胞; B: *ER $\alpha$* 在宫颈癌各细胞株中的表达均较低,与HaCat细胞比较,差异具有统计学意义; C: *CHAF1A*和*ER $\alpha$* 在宫颈癌各细胞株和HaCat细胞株中的蛋白表达情况,*ER $\alpha$* 在宫颈癌细胞株中几乎不表达; D: 予以慢病毒有效敲减Siha细胞中*CHAF1A*的表达,敲低组表达较对照组明显降低; E: 减低*CHAF1A*的表达后,*ER $\alpha$* 的表达会升高。

A: the expression of *CHAF1A* in cervical cancer cell lines was significantly higher than that in HaCat cells; B: the expression of *ER $\alpha$*  in cervical cancer cell lines was lower, and there was statistical difference when compared with HaCat cell; C: the *CHAF1A* and *ER $\alpha$*  protein expression in cervical cancer cell lines and HaCat cell lines showed that *ER $\alpha$*  was almost not expressed in cervical cancer cells lines; D: lentivirus was used to effectively knock down the expression of *CHAF1A* in Siha cells, and it was found the expression of *CHAF1A* was notably decreased in the knockdown group in comparison to the control group; E: after decreasing the expression of *CHAF1A*, the expression of *ER $\alpha$*  was increased.

图3 CHAF1A和ER $\alpha$ 的表达情况

Fig.3 The expression of CHAF1A and ER $\alpha$

研究中<sup>[35]</sup>,提到17 $\beta$ -雌二醇主要通过雌激素受体 $\alpha$ 起作用,17 $\beta$ -雌二醇诱导HPV16/18型E6、E7蛋白的表达,E6、E7的表达升高增加ER $\alpha$ 蛋白的表达,这项研究与本次研究在某些方面具有相反的趋势,但同样提示ER $\alpha$ 在宫颈的发病中具有重要的作用。

在本研究中,我们通过PCR及免疫印迹实验证实,ER $\alpha$ 在宫颈癌细胞中的mRNA及蛋白的表达均普遍较低,免疫组织化学实验亦证实,ER $\alpha$ 随着宫颈病变的进展表达逐渐降低,ER $\alpha$ 阳性率分别I期93.8%(15/16)、II期34%(16/47)。结合免疫组织化学实验结果,在进行临床病理相关性分析中,ER $\alpha$ 与患者宫颈癌分期、分化程度和淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ),与患者年龄和浸润深度无明显相关性,统计无差异,这与之前报道的有差异,可能与此次标本例数太少且ER $\alpha$ 表达量较低,影响结果精确度有关。随着宫颈癌期别的增加,ER $\alpha$ 表达的阳性率明显减少,说明ER $\alpha$ 可能参与宫颈癌前病变到宫颈癌的进展过程,但具体是宫颈病变的发展影响了ER $\alpha$ 的表达抑或是某些基因的改变影响了ER $\alpha$ 的表达随后导

致宫颈癌的发生目前尚不明确,仍然需要进一步的探索研究。

近年来,组蛋白参与人类肿瘤的发生、发展的报告越来越多,CHAF1A(P150)是CAF-1的最大亚基,有报道证实,CAF-1特别是P150亚基/*CHAF1A*是负责调节细胞周期进展和激活DNA损伤检查点的关键基因,CAF-1/*CHAF1A*故障会导致持续的细胞增殖,抵抗细胞死亡,增加基因组的不稳定性,最终表现一个更具侵袭性的癌症表型<sup>[36]</sup>。*CHAF1A*对细胞周期、DNA损伤检查点(DNA damage checkpoints)的激活、DNA复制、调控相关基因的表达及氧化碱基的修复具有重要的作用<sup>[36-38]</sup>。*CHAF1A*在多种肿瘤疾病研究中<sup>[8-16]</sup>均提示表达升高,并与疾病的不良预后相关,高表达的*CHAF1A*影响肿瘤组织的分化、增殖、侵袭等多种表型。在结直肠癌及胃癌、肺非小细胞癌中的表达均升高,BARBIERI等<sup>[13-14]</sup>研究提示,*CHAF1A*为P53的下游基因,而HPV病毒产生的癌蛋白E6与P53结合并以其为靶点进行泛素介导的降解,从而导致P53功能缺失,进而导致宫颈癌



的发生<sup>[39]</sup>。由此我们推测, CHAF1A参与了宫颈癌的发生, 我们前期课题组也通过免疫组化实验证实, CHAF1A在宫颈癌组织中随着宫颈癌恶性程度的升高, 表达升高。在本研究中, CHAF1A在CSCC组织及宫颈癌细胞中的表达均较正常组织高。我们对CHAF1A基因进行有效敲低后, 用实时定量PCR技术检测CHAF1A及ER $\alpha$ 的表达情况, 发现CHAF1A敲低后ER $\alpha$ 的表达反而升高, 结合CHAF1A和ER $\alpha$ 在免疫组织化学中及组织mRNA表达的实验结果, 我们推测CHAF1A对ER $\alpha$ 的表达可能有一定的调节作用。但是ER $\alpha$ 蛋白在宫颈癌细胞株的表达较低, 利用免疫印迹法检测其蛋白表达调控的相关性未得到理想的结果, 需要在后续研究中改进实验方法。

综上所述, CHAF1A及ER $\alpha$ 在CSCC中均有差异表达, CHAF1A在CSCC中的表达趋势是: 随着宫颈癌恶性进展表达阳性率升高, 而ER $\alpha$ 随着宫颈癌进展表达阳性率明显下降, 利用Spearman检验,  $r$ 为-0.300两者的表达具有负相关性,  $P < 0.05$ 有统计学意义。我们进一步对CHAF1A基因予以慢病毒敲低后, 发现ER $\alpha$ 的表达会升高。鉴于既往文献报道并综合本研究实验结果, 我们推测CHAF1A和ER $\alpha$ 可能参与宫颈癌疾病的发生<sup>[20-25]</sup>。宫颈癌目前的预防措施是明确有效的, 但是针对晚期宫颈癌及复发性宫颈癌的治疗却没有有效措施, 宫颈癌现有的治疗措施主要是手术治疗, 化学药物治疗效果欠佳。众所周知, 雌激素受体在乳腺癌治疗中的具有非常重要的作用, 如果ER $\alpha$ 在宫颈癌的发生发展中具有重要的作用, 那么雌激素受体药物在宫颈癌的治疗中也可能同样具有作用, 而且或许也可以将ER $\alpha$ 作为监测宫颈癌发病及发展的生物标志物。CHAF1A对ER $\alpha$ 基因的调控势必可以为我们在宫颈癌的精准治疗方面提供新的思路。但是, 目前在这方面的研究数据还并不十分充分, 样本量需要进一步扩大, 且缺乏组织方面蛋白表达数据和血液样本数据, 本研究考虑可能药物治疗对ER $\alpha$ 受体的影响以及ER $\alpha$ 表达在宫颈癌组织及细胞中本身较低, 排除了宫颈癌III期以上病例, 后续研究需要进一步深入, 明确具体相关作用机制。

### 参考文献 (References)

[1] KOH W, GREER B, ABU-RUSTUM N, et al. Cervical Cancer, Version 2.2015 [J]. J Natl C ompr Canc Netw, 2015, 13(4): 395-404.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.

[3] BANNO K, IIDA M, YANOKURA M, et al. MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment [J]. The Scientific World Jo, 2014, doi: 10.1155/2014/178075.

[4] HOEK M, STILLMAN B. Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(21): 12183-8.

[5] GLINSKY G. Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway [J]. Cell Cycle, 2006, 5(11): 1208-16.

[6] JIAO R, BACHRATI C, PEDRAZZI G, et al. Physical and functional interaction between the B loom's syndrome gene product and the largest subunit of chromatin assembly factor 1 [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(11): 4710-9.

[7] POLESHKO A, EINARSON M, SHALGINSKIKH N, et al. Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors [J]. J Biol Chem, 2010, 285(1): 422-33.

[8] WU Z, CUI F, YU F, et al. Up-regulation of CHAF1A, a poor prognostic factor, facilitates cell proliferation of colon cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 449(2): 208-15.

[9] GLINSKY G V, GLINSKII A B, STEPHENSON A J, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer [J]. J Clin Invest, 2004, 113(6): 913-23.

[10] XU M, JIA Y, LIU Z, et al. Chromatin assembly factor 1, subunit A (P150) facilitates cell proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2016, doi: 10.2147/OTT.S107050.

[11] BETHKE L, WEBB E, MURRAY A, et al. Comprehensive analysis of the role of DNA repair gene polymorphisms on risk of glioma [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(6): 800-5.

[12] PENG H, DU B, JIANG H, et al. Over-expression of CHAF1A promotes cell proliferation and apoptosis resistance in glioblastoma cells via AKT/FOXO3a/Bim pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(4): 1111-6.

[13] BARBIERI E, DE PRETER K, CAPASSO M, et al. Histone chaperone CHAF1A inhibits differentiation and promotes aggressive neuroblastoma [J]. Cancer Res, 2014, 74(3): 765-74.

[14] BARBIERI E, DE PRETER K, CAPASSO M, et al. A p53 drug response signature identifies prognostic genes in high-risk neuroblastoma [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79843.

[15] ZHENG L, LIANG X, LI S, et al. CHAF1A interacts with TCF4 to promote gastric carcinogenesis via upregulation of c-MYC and CCND1 expression [J]. EBioMedicine, 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.009.

[16] XIA D, YANG X, LIU W, et al. Over-expression of CHAF1A in epithelial ovarian cancer can promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, doi: 10.1016/j.gene.2019.144034.

[17] WANG D, LI X, SHEN B, et al. Histone chaperone CHAF1A impacts the outcome of fluoropyrimidines-based adjuvant therapy in gastric cancer by regulating the expression of thymidylate synthetase [J]. Gene, 2019, doi: 10.1073/pnas.93.7.2930.

[18] PELEKANOU V, ANASTASIOU E, BAKOGEORGOU E, et al.



- Estrogen receptor-alpha isoforms are the main estrogen receptors expressed in nonsmall cell lung carcinoma [J]. *Steroids*, 2019, doi: 10.1016/j.steroids.2018.01.008.
- [19] CAVAILLÈS V. Estrogens and receptors: an evolving concept [J]. *Climacteric*, 2002, PMID: 12482107.
- [20] ARBEIT J, HOWLEY P, HANAHAN D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(7): 2930-5.
- [21] CHUNG S, WIEDMEYER K, SHAI A, et al. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9928-34.
- [22] CHUNG S, FRANCESCHI S, LAMBERT P. Estrogen and ER $\alpha$ : culprits in cervical cancer [J]? *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(8): 504-11.
- [23] RIERA-LEAL A, RAMÍREZ D E ARELLANO A, RAMÍREZ-LÓPEZ I G, et al. Effects of 60 kDa prolactin and estradiol on metabolism and cell survival in cervical cancer: Co-expression of their hormonal receptors during cancer progression [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6): 3781-93.
- [24] YU P, WANG Y, LI C, et al. Protective effects of downregulating estrogen receptor alpha expression in cervical cancer [J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2018, 18(14): 1975-82.
- [25] SON J, PARK Y, CHUNG S. Epithelial oestrogen receptor  $\alpha$  is dispensable for the development of oestrogen-induced cervical neoplastic diseases [J]. *J Pathol*, 2018, 245(2): 147-52.
- [26] WRIGHT J, CHEN L, TERGAS A, et al. Population-level trends in relative survival for cervical cancer [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(5): 670.e1-7.
- [27] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in the causation of human cancers a brief historical account [J]. *Virology*, 2009, 384(2): 260-5.
- [28] WALBOOMERS J, JACOBS M, MANOS M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-9.
- [29] STANLEY M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.024.
- [30] SPURGEON M, DEN BOON J, HORSWILL M, et al. Human papillomavirus oncogenes reprogram the cervical cancer microenvironment independently of and synergistically with estrogen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(43): E9076-85.
- [31] CHEN Y, HUANG L, CHEN T. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(3): 651-9.
- [32] KEDZIA W, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A, KWAŚNIEWSKA A, et al. Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre- and postmenopausal women [J]. *Eur J Gynecol Oncol*, 2000, 21(2): 177-9.
- [33] KIM C, UM S, KIM T, et al. Regulation of cell growth and HPV gene by exogenous estrogen in cervical cancer cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2000, 10(2): 157-64.
- [34] ZHAI Y, BOMMER G, FENG Y, et al. Loss of estrogen receptor 1 enhances cervical cancer invasion [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(2): 884-95.
- [35] LI C, LAN L, TADDA M, et al. Interaction between 17 $\beta$ -estradiol degradation and nitrification in mariculture wastewater by *Nitrosomonas europaea* and MBBR [J]. *Sci Total Environ*, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135846.
- [36] KADYROVA L, BLANKO E, KADYROV F. CAF-I-dependent control of degradation of the discontinuous strands during mismatch repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(7): 2753-8.
- [37] POLO S, THEOCHARIS S, KLJANIENKO J, et al. Chromatin assembly factor-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferating cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(7): 2371-81.
- [38] YANG C, SENGUPTA S, HEGDE P, et al. Regulation of oxidized base damage repair by chromatin assembly factor 1 subunit A [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(2): 739-48.
- [39] TAN S, DE VRIES E, VAN DER ZEE A, et al. Anticancer drugs aimed at E6 and E7 activity in HPV-positive cervical cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(2): 170-84.