



安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 宫颈癌中 COL1A2 的表达及其与肿瘤免疫浸润的关系
作者: 张瑜, 朱小雨, 徐殿琴, 陈晓伟, 钟明艳, 周鑫竹, 谭玉洁
网络首发日期: 2025-09-04
引用格式: 张瑜, 朱小雨, 徐殿琴, 陈晓伟, 钟明艳, 周鑫竹, 谭玉洁. 宫颈癌中 COL1A2 的表达及其与肿瘤免疫浸润的关系[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250903.1657.012>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

宫颈癌中 COL1A2 的表达及其与肿瘤免疫浸润的关系¹

张瑜^{1,2}, 朱小雨^{1,2}, 徐殿琴^{1,2}, 陈晓伟², 钟明艳², 周鑫竹^{1,2}, 谭玉洁^{1,2}
(¹贵州医科大学附属医院临床检验中心, 贵阳 550004; ²贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004)

摘要 **目的** 探讨 I 型胶原 $\alpha 2$ 链(COL1A2)在宫颈癌中的表达及与免疫浸润的相关性。**方法** 利用生物信息学技术分析宫颈癌中 COL1A2 的表达, Western blot 和 RT-qPCR 检测宫颈癌组织中 COL1A2 和细胞系的表达; 肿瘤免疫评估(TIMER2.0)分析 COL1A2 的表达与肿瘤免疫细胞浸润的相关性; 基因集富集分析(GSEA)分析 COL1A2 在宫颈癌中可能的作用机制, Jaspard 数据库预测 COL1A2 的转录因子, Western blot 和 RT-qPCR 检测宫颈癌组织和细胞系中转录因子的表达。**结果** COL1A2 在宫颈癌中表达下调 ($P < 0.05$); COL1A2 的表达与巨噬细胞和髓样树突细胞的水平呈正相关 ($P < 0.01$), 22 种免疫细胞在不同的宫颈癌患者中的占比不同, 此外, 与 COL1A2 高表达组相比, 低表达 COL1A2 组中 M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞和静息记忆 CD4⁺ T 细胞比例上升, 而 CD8⁺ T 细胞、活化记忆的 CD4⁺ T 细胞、滤泡辅助 T 细胞、活化 NK 细胞、活化髓样树突细胞减少 ($P < 0.05$); GSEA 分析显示, COL1A2 与免疫相关的信号通路有关, 包括 Notch 信号通路、白细胞介素 6/JAK 激酶/转录激活因子 3 (IL6/JAK/STAT3)、Wnt/ β -catenin 信号通路等 ($P < 0.01$), Jaspard 数据库预测 COL1A2 的转录因子配对盒蛋白 5(PAX5), PAX5 在宫颈癌中表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** COL1A2 有望成为宫颈癌潜在的诊断生物标志物及免疫治疗靶点。

关键词 宫颈癌; COL1A2; 肿瘤免疫; PAX5; 免疫浸润

中图分类号 R 737.3

文献标志码 A

Expression of COL1A2 in cervical cancer and its relationship with tumor immune infiltration

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82360588); 贵州医科大学附属医院国家自然科学基金培育计划项目 (编号: gyfynsfc[2023]-17); 贵州省科技计划项目 (编号: 黔科合基础-ZK[2024]一般 202); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (编号: gzwkj2024-204)

作者简介: 张瑜, 女, 硕士研究生;
谭玉洁, 女, 教授, 主任技师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: tanyujie5@qq.com

Zhang Yu^{1,2}, Zhu Xiaoyu^{1,2}, Xu Dianqin^{1,2}, Chen Xiaowei², Zhong Mingyan²,

Zhou Xinzhu^{1,2}, Tan Yujie^{1,2}

(¹Center for Clinical Laboratories, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University,

Guiyang 550004; ²School of Medical Laboratory Medicine, Guizhou Medical University,

Guiyang 550004)

Abstract Objective To explore the expression of collagen type 1 alpha 2 (COL1A2) in cervical cancer and its correlation with immune infiltration. **Methods** Bioinformatics techniques were used to analyze the expression of COL1A2 in cervical cancer. Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression of COL1A2 in cervical cancer tissues and cell lines. The correlation between the expression of COL1A2 and tumor immune cell infiltration was analyzed by tumor immune estimation resource (TIMER2.0). Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to analyze the possible mechanism of COL1A2 in cervical cancer. Jaspar database was used to predict the transcription factors of COL1A2. Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression of transcription factors in cervical cancer tissues and cell lines. **Results** The expression of COL1A2 was down-regulated in cervical cancer ($P < 0.05$). The expression of COL1A2 was positively correlated with the levels of macrophages and myeloid dendritic cells ($P < 0.01$). The proportions of 22 types of immune cells were different in different cervical cancer patients. In addition, compared with the high expression group of COL1A2, the proportion of M0 macrophages, M2 macrophages and resting memory CD4⁺ T cells increased in the low expression group of COL1A2, while the proportion of CD8⁺ T cells, activated memory CD4⁺ T cells, follicular helper T cells, activated NK cells and activated myeloid dendritic cells decreased ($P < 0.05$). GSEA analysis showed that COL1A2 was related to immune-related signaling pathways, including Notch signaling pathway, interleukin-6/janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (IL6/JAK/STAT3), Wnt/ β -catenin signaling pathway, etc. ($P < 0.01$). Jaspar database predicted that the transcription factor of COL1A2 was paired box protein 5 (PAX5), and the expression of PAX5 decreased in cervical cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** COL1A2 is expected to become a potential diagnostic biomarker and immunotherapy target for cervical cancer.

Key words cervical cancer; COL1A2; tumor immunity; PAX5; immune infiltration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82360588); National Natural Science Foundation Incubation Plan of the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University (No. gyfynsfc[2023]-17); Scientific and Technological Project of Guizhou Province (No. Qian Kehe Basic-ZK[2024] General 202); Scientific and Technological Project of Guizhou Health Commission (No. gzwkj2024-204)

Corresponding author Tan Yujie, E-mail: tanyujie5@qq.com

宫颈癌是全球女性中第三大常见癌症。宫颈癌每年新增病例超过 50 万例^[1]。持续的人乳头瘤病毒 (human papillomaviruses, HPV) 感染是导致宫颈癌的主要原因^[2]。宫颈癌患者发现时大多数已处于中晚期, 目前根除宫颈癌的常规方案主要是外科手术、化疗和放疗, 由于宫颈癌发生发展的机制复杂, 复发率高、易转移的特点, 导致其患者的生存率仍较低。因此, 探究宫颈癌的发病机制、寻找潜在的早期诊断标志物和治疗靶点的任务迫在眉睫。

I 型胶原 $\alpha 2$ 链(collagen type1 alpha2, COL1A2)是纤维胶原家族中的一种。COL1A2 基因编码的 1 型胶原是一种在大多数结缔组织中发现的原纤维形成胶原蛋白, 存在于大部分实体瘤的间质中。主要通过细胞外基质受体互作通路和局部黏附通路, 从而影响细胞的增殖、分化、黏附和转移, 与肿瘤的侵袭和转移相关^[3-4]。目前, COL1A2 在宫颈癌组织中的表达模式及其与肿瘤免疫浸润的关联尚不明确。深入研究 COL1A2 在宫颈癌中的表达及其与肿瘤免疫微环境的相互作用, 不仅有助于揭示宫颈癌的病理机制, 而且可能为开发新型诊断标志物与治疗靶标提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞为课题组保存细胞, SiHa 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞为 HPV 18 型, SiHa 细胞为 HPV 16 型。人正常宫颈上皮细胞 (human cervical epithelial cells, HUCEC) 购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司, 实验细胞传代不超过 10 代。人单核细胞白血病细胞(tohoku hospital pediatrics-1, THP-1) 细胞由韦四喜老师课题组赠予。THP-1 来源于急性髓细胞白血病的人单核细胞, 可在佛波酯 (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) (也称为 PMA) 诱导下分化成为巨噬细胞。

抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购自南京巴傲得生物科技有限公司, E6 购自上海 Santa Cruz 公司, COL1A2(购自英国 Abcam 公司, 配对盒蛋白 5(paired box protein 5, PAX5)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 锯齿

状蛋白 1(jagged canonical notch ligand 1, Jagged1)于 Selleck 公司申领；辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体及羊抗鼠 IgG 抗体均购自南京巴傲得生物科技有限公司；PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 材料来源 收集 2022—2023 年贵州医科大学附属医院妇科宫颈癌患者癌组织及其配对的癌旁组织样本 30 例，癌旁组织作为对照组，具体患者资料见表 1。立即保存于 -80°C 中待检测。本研究中所纳入全部病例均需通过临床病理诊断。本研究已获得贵州医科大学附属医院医学伦理委员会审核批准（批准号：2022 伦审第 720 号）。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析 从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.com>)获得了宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌(cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)的 RNAseq 数据(level3)和相应的临床信息。单个相关性图通过 R 软件包 ggstatsplot 进行实现，多基因相关性图通过 R 软件包 pheatmap 进行展示。

使用 Spearman 的相关分析来描述没有正态分布的定量变量之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。以上所有分析方法均由 R v4.0.3 实现。利用 Jaspar 数据库预测转录因子，使用肿瘤免疫评估(tumor immune estimation resource, TIMER2.0)、R 软件等工具分析 COL1A2 的表达与肿瘤免疫细胞浸润、免疫检查点、免疫/基质评分等的相关性。

1.3.2 细胞培养 HUVEC、HeLa、SiHa 细胞置于含有 1%青-链霉素及 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基内进行培养，THP-1 于含有 1%青-链霉素及 10%胎牛血清的 1640 完全培养基内进行培养，培养条件设为 37°C 和 5% CO_2 的环境，每隔 2 天进行培养液更换或细胞传代操作。

巨噬细胞极化实验：将 THP-1 铺于 6 孔板中，细胞密度约为诱导贴壁后 60%。于阴性对照组及共培养组中加入 100 ng/mL 的 PMA 将其诱导为 M0；阳性对照组中分别加入 20 ng/mL γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、100 ng/mL 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)，20 ng/mL 白介素(interleukin, IL)-4、20 ng/mL IL-13 将其分别诱导为 M1 和 M2；诱导贴壁后，共培养组中分别加入培养了 SiHa、HeLa 细胞 48 h 的培养基，共培养 48 h 后收集 RNA 进行 RT-qPCR 检测。

1.3.3 RNA 提取和 RT-qPCR 实验 按照说明书，使用 TRIzol 试剂提取临床宫颈癌组织样本和宫颈癌细胞系 RNA，Takara 反转录试剂进行反转录，使用 Genestar PCR 试剂进行 RT-qPCR 检测，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase, HPRT)

作为内参，目的基因相对表达水平依据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行计算。关于引物的具体序列信息见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab.1 PCR primer sequences

Gene name	Sequences (5'-3')
HPRT	F: ATGGCGACCCGCAGCCCT
	R: CCATGAGGAATAAACACCCT
COL1A2	F: GCAGGAGGTTTCGGCTAAGT
	R: GCAACAAAGTCCGCGTATCC
PAX5	F: CAGCAGGACAGGACATGGAG
	R: GTTCCACTATCCTCTGGCGG
CD80	F: TCGCCTCTCTGAAGATTACCC
	R: CCCAAGTAAGACCAGGGCAC
CD86	F: CTGCTCATCTATACACGGTTACC
	R: GGAAACGTCGTACAGTTCTGTG
CD206	F: ACCTGCGACAGTAAACGAGG
	R: TGTCTCCGCTTCATGCCATT
IL-10	F: AAAGAAGGCATGCACAGCTCA
	R: TCACTCTGCTGAAGGCATCTC

1.3.4 Western blot 检测蛋白的变化 宫颈癌细胞按照说明书步骤提取蛋白并用 BCA 试剂盒检测蛋白含量；组织蛋白称重并剪碎加入相应比例的 RIPA 裂解液，冰上裂解半小时后放入组织研磨破碎仪研磨，取蛋白上清液加入 loading buffer 放置金属浴 100 °C 煮 10 min。取蛋白上样电泳后转膜，脱脂牛奶室温封闭，一抗 4 °C 孵育过夜，稀释比例 GAPDH(1 : 8 000)、COL1A2(1 : 3 000)、PAX5(1 : 3 000)、Jagged1 (1: 1 000)。过夜后用 1×TBST 洗膜，放入二抗中室温孵育 1 h 后使用 1×TBST 洗膜，最后显影。用 Image J 软件分析蛋白条带。

1.3.5 免疫组织化学染色 获得宫颈组织样本后处理分装保存在 4%多聚甲醛中，石蜡包埋并切片，切片保存于-20 °C。挑选合适切片，置于 60 °C烤箱中烘烤 4 h。将烘烤过的切片依次放入二甲苯、无水乙醇、梯度酒精中进行脱蜡复水后。1 × Tris-EDTA 抗原修复液进行

抗原修复。滴加内源性过氧化物酶阻断剂，阻断内源性过氧化物酶。封闭用山羊血清于湿盒中 37 °C 封闭 30 min 后放入湿盒中 4 °C 过夜孵育一抗。第 2 天取出切片，1 × PBS 清洗后，滴加酶标山羊抗兔/鼠 IgG 聚合物，于 37 °C 孵育二抗。1 × PBS 清洗后 DAB 显色，镜下观察显色情况，放入 ddH₂O 终止反应。苏木精复染后，用盐酸酒精分化，饱和碳酸锂溶液中返蓝。放入梯度乙醇、二甲苯中脱水透明。完全干燥后封片。显微镜观察并拍照。

根据组织切片着色的阳性细胞数和着色面积进行评分，采用二级计分法进行结果判断：染色强度评分标准为：未着色，阴性，0 分；着色呈浅黄色，弱阳性，1 分；着色呈黄色或深黄色，中度阳性，2 分；着色较强呈黄褐色，强阳性，3 分；染色面积评分标准，0 分：阳性细胞占 0%；1 分：阳性细胞占 0%~25%；2 分：阳性细胞计数占 25%~50%；3 分：阳性细胞计数占 50%~75%；4 分：>75%，最终免疫组化着色评分=染色强度评分×染色面积评分，0~4 分为阴性，5~12 分为阳性。

1.4 统计学处理 以上数据均采用 GraphPad Prism 8 软件分析并绘图，数据均由 3 次独立生物学重复实验获得，两组样本比较采用独立样本 *t* 检验，多组样本比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COL1A2 在宫颈癌中表达降低 该实验通过 Western blot、RT-qPCR 检测宫颈癌组织中 COL1A2 的表达水平，结果显示，与癌旁组织相比，COL1A2 在宫颈癌组织中蛋白和 mRNA 表达降低（图 1A、1B），差异有统计学意义（*P*<0.01）。免疫组化检测结果显示，与正常宫颈组织相比，COL1A2 在宫颈癌组织中表达降低（图 1C）。宫颈癌组织蛋白及 mRNA 表达水平与 GEPIA 数据库中结果一致（图 1D）。此外，该实验借助 Western blot 检测宫颈癌细胞系中 COL1A2 的表达水平，结果显示，与正常宫颈上皮细胞 HUCEC 相比较，其变化趋势与宫颈癌组织中的观察结果一致，在宫颈癌细胞系 SiHa、HeLa 中表达减少（图 1E）。

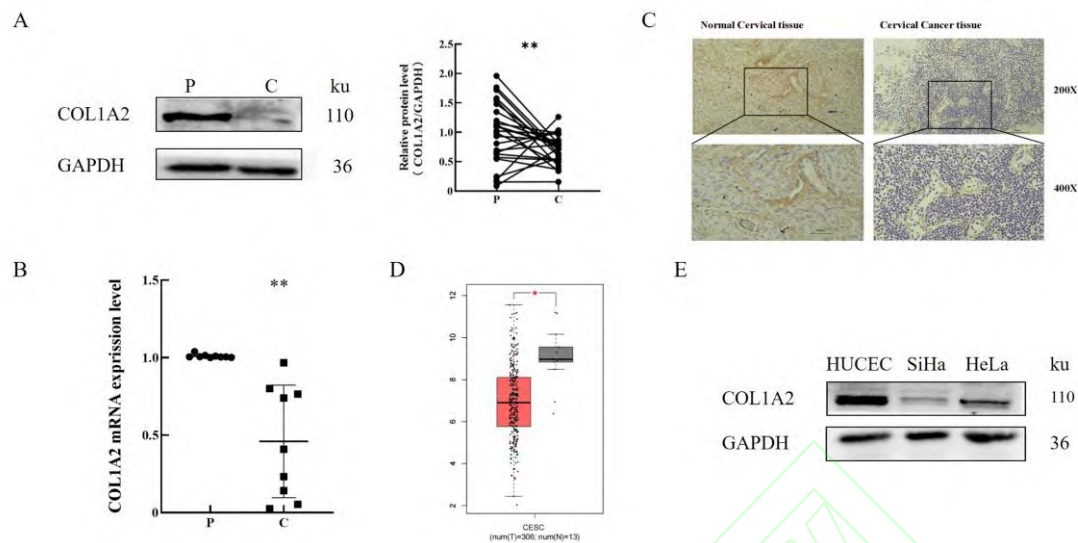


图 1 COL1A2 在宫颈癌中的表达情况

Fig.1 The expression of COL1A2 in cervical cancer

A, B, C: The expression of COL1A2 in cervical cancer tissues and paracancerous tissues was detected by Western blot, RT-qPCR and immunohistochemistry, P: paracancerous tissue, C: cancer tissue, N: normal cervical epithelial tissue; D: The expression of COL1A2 in cervical cancer from GEPIA data; E: The expression of COL1A2 in human normal cervical epithelial cells HUVEC and cervical cancer cell lines SiHa and HeLa was detected by Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs paracancerous group of cervical cancer.

2.2 COL1A2 表达与临床病理特征的相关性 选取临床组织 30 对，根据 COL1A2 蛋白表达水平分为高表达组和低表达组。分别对他们的年龄、组织学分型、临床病理分期、HPV 分型及有无转移等临床特征进行分析（表 2）。结果显示，COL1A2 的表达水平与年龄、有无转移无关。临床样本以宫颈鳞状细胞癌为主，其中低表达组 23（76.67%，23/30）例，高表达组 7（13.33%，7/30）例。宫颈腺癌、宫颈腺鳞癌呈现 COL1A2 高表达，而宫颈神经内分泌癌（小细胞型）COL1A2 呈低表达。根据临床病理分期，所纳入的 3 例 CIN 样本均呈现 COL1A2 低水平表达。COL1A2 蛋白表达在宫颈癌早期（I~II 期）与晚期（III~IV 期）中无差异。HPV 被认为是导致宫颈癌的主要原因，高危型 HPV 包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型。根据现有数据显示，COL1A2 低表达可能与高危型 HPV 有关。但其中 10 例患者未进行 HPV 分型检测，3 例患者仅描述 HPV 相关型，导致 COL1A2 表达与 HPV 具体分型的相关性分析不准确。

表 2 不同 COL1A2 蛋白表达组的临床特征

Tab.2 Clinical characteristics of different COL1A2 protein expression groups

Clinical features	Low expression group (n=23)	High expression group (n=7)	P value
Age (years)	50.52 (31~69)	50.86 (39~65)	
≥50	12	5	0.51
<50	11	2	0.29
Histological types			
Cervical squamous cell carcinoma	18	4	0.54
Cervical adenocarcinoma	0	2	-
Cervical adenosquamous carcinoma	0	1	-
Cervical neuroendocrine carcinoma (small cell type)	2	0	-
Clinicopathological stage			
CIN	3	0	-
I-II	14	6	0.40
III-IV	6	1	0.67
HPV Genotype			
16	3	3	0.56
18	0	1	-
33	1	0	-
16/18	1	1	-
16/33	1	0	-
16/52	1	0	-
16/68	1	0	-
Related type	3	0	-
High-risk type	3	0	-
Unclassified type	8	2	0.71
Lymph node metastasis			
Yes	9	4	0.45
No	13	3	0.31
Hematogenous metastasis	1	0	-

2.3 COL1A2 表达和免疫浸润细胞水平之间的相关性 该实验通过生信分析 COL1A2 表达和免疫浸润细胞水平之间的相关性，显示 COL1A2 的表达与巨噬细胞和髓样树突细胞的水平呈正相关（图 2），差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

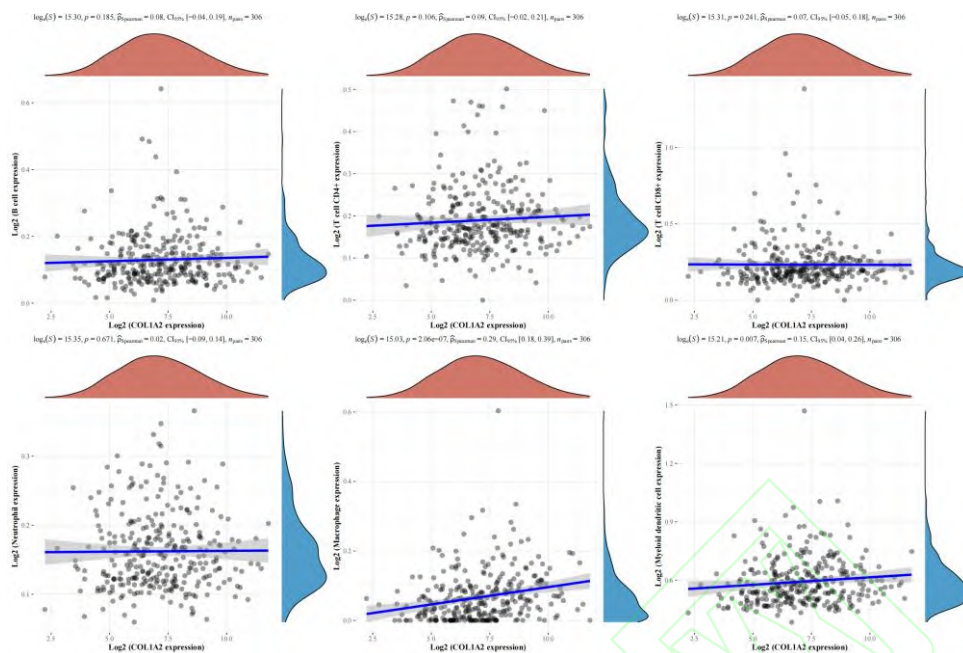


图 2 COL1A2 表达和免疫浸润细胞水平之间的相关性

Fig.2 Correlation between col1a2 expression and the level of immune infiltrating cells

2.4 22 种免疫细胞在不同的宫颈癌患者中的占比 该实验通过对 22 种免疫细胞在不同的宫颈癌患者中的占比分析显示，22 种免疫细胞在不同的宫颈癌患者中的占比不同，体现了宫颈癌的异质性（图 3A）。

2.5 COL1A2 表达水平与免疫细胞的关系 该实验将宫颈癌样本根据 COL1A2 表达分为高表达组和低表达组，利用估计 RNA 转录本相对亚群进行细胞类型鉴定(cell-type identification using estimating relative subsets of RNA transcripts, CIBERSORT)确定了 22 种免疫细胞在两组的水平，发现 CD8⁺ T 细胞、激活记忆的 CD4⁺ T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、的 NK 细胞、M0 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、激活的髓系树突状细胞及静息记忆 CD4⁺ T 细胞在两组间的构成差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对比高表达组，低表达组表现出 M0 型及 M2 型巨噬细胞和静息记忆 CD4⁺ T 淋巴细胞比例上升，而 CD8⁺ T 细胞、激活记忆的 CD4⁺ T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、活化的 NK 细胞及激活的髓系树突状细胞的比例减少 ($P < 0.05$)（图 3B）。

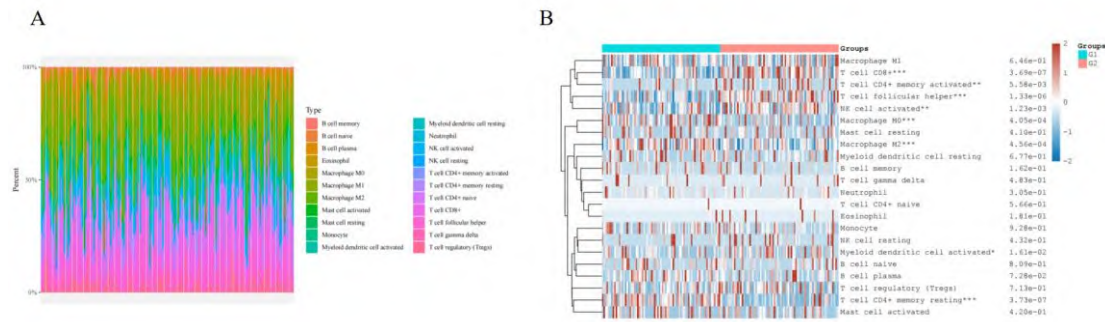


图3 COL1A2 表达水平与免疫细胞的关系

Fig.3 Relationship between COL1A2 expression level and immune cells

A: Proportions of 22 types of immune cells in different cervical cancer patients; B: Relationship between COL1A2 expression level and immune cells.

2.6 信息学分析 COL1A2 在宫颈癌中可能的作用机制 为了验证 COL1A2 在宫颈癌中可能的作用机制。该实验通过 TCGA 数据库中下载宫颈癌 COL1A2 表达的数据，利用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA) 进行基因富集分析。显示 COL1A2 和细胞周期及免疫相关的信号通路有关，包括 Notch 信号通路、白细胞介素 6/JAK 激酶/转录激活因子 3 (interleukin-6/janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 , IL6/JAK/STAT3)、MYC-V1 靶点、MYC-V2 靶点、Wnt/ β -catenin 信号通路等（图 4）。

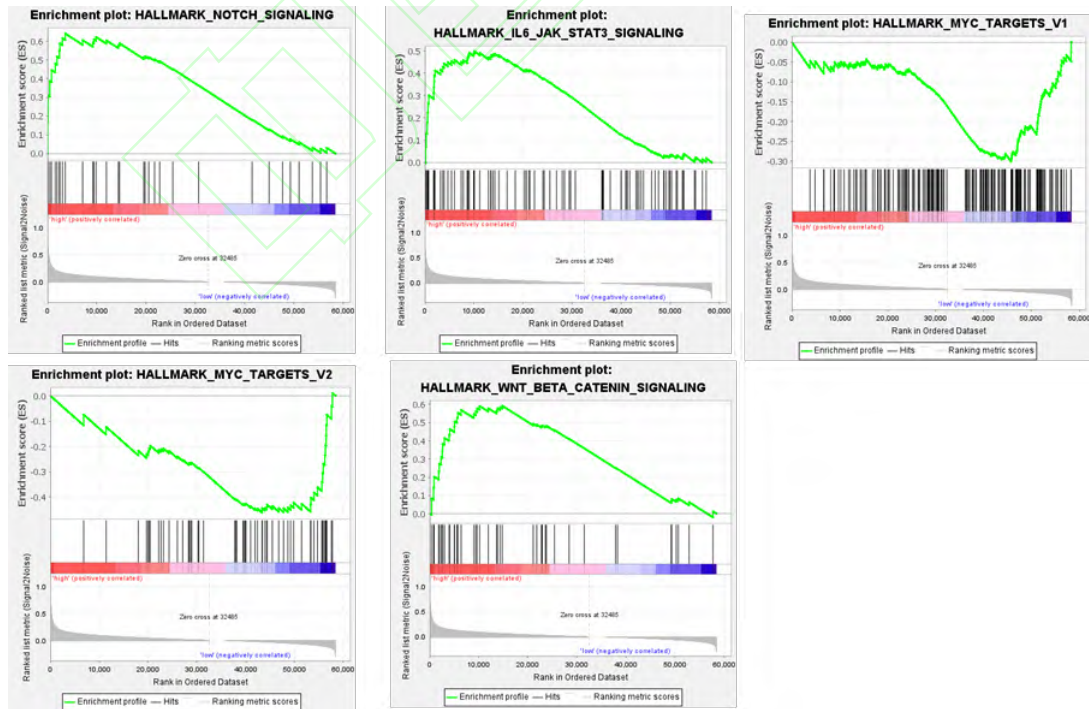


图4 COL1A2 在宫颈癌中可能的作用机制

Fig.4 Possible mechanism of COL1A2 in cervical cancer

2.7 JaspAr 数据库预测 PAX5 是 COL1A2 的转录因子 为了证明 COL1A2 在宫颈癌中是如何发挥作用的，上游是否存在调控基因，该实验利用 JaspAr 数据库预测出 PAX5 是 COL1A2 的转录因子（图 5）。

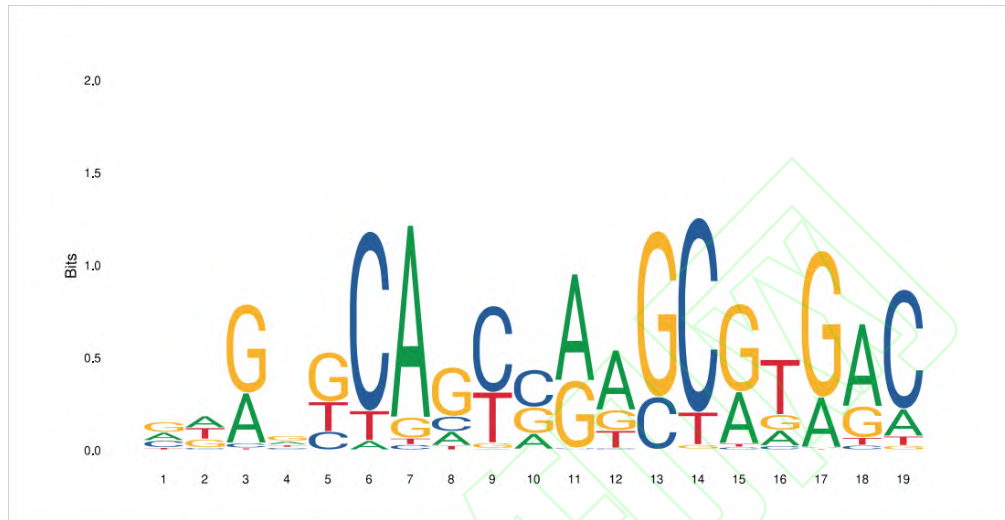


图 5 COL1A2 启动子结合区域 PAX5 结合位点

Fig.5 PAX5 binding site in the promoter binding region of COL1A2

2.8 PAX5 在宫颈癌中低表达 该实验通过 Western blot、RT-qPCR 检测宫颈癌组织中 PAX5 的表达情况，结果显示，PAX5 在宫颈癌组织中表达降低（图 6A、6B），差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。同时，该实验通过 Western blot 检测宫颈癌细胞中 PAX5 的表达情况，显示与正常宫颈上皮细胞 HUCEC 比较，与宫颈癌组织中的表达情况一致，在宫颈癌细胞系 SiHa、HeLa 中表达降低（图 6C）。

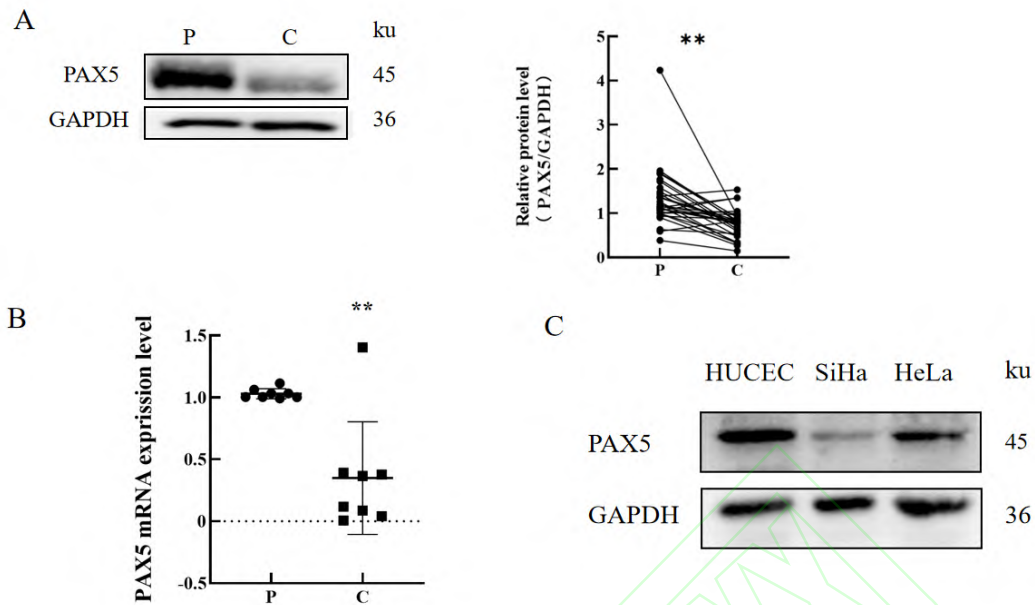


图 6 PAX5 在宫颈癌中的表达情况

Fig.6 The expression of PAX5 in cervical cancer

A, B: Protein expression of PAX5 in cervical cancer tissues and paracancerous tissues was detected by Western blot and RT-qPCR, P: paracancerous tissues, C: cancer tissues; C: The expression of PAX5 in human normal cervical epithelial cells HUVEC and cervical cancer cell lines SiHa and HeLa was detected by Western blot; ** $P < 0.01$ vs cervical cancer group.

2.9 PAX5 表达与临床病理特征的相关性 选取临床组织 30 对, 根据 PAX5 蛋白表达水平分为高表达组和低表达组。分别对他们的年龄、组织学分型、临床病理分期、HPV 分型及有无转移等临床特征进行分析 (表 3)。结果显示, PAX5 的表达水平与年龄、有无淋巴转移无关。临床样本以宫颈鳞状细胞癌为主, 宫颈腺鳞癌 PAX5 高表达, 而宫颈神经内分泌癌 (小细胞型) PAX5 呈低表达。根据临床病理分期, 3 例 CIN 样本 PAX5 均为低水平表达。PAX5 蛋白表达在宫颈癌早期 (I ~ II 期) 与晚期 (III ~ IV 期) 中无差异。根据 HPV 分型显示, PAX5 低表达组与 PAX5 高表达组相比, PAX5 低表达组中高危型例数高于高表达组 1 倍以上。因此, PAX5 低表达可能与高危型 HPV 有关。

表 3 不同 PAX5 蛋白表达组的临床特征

Tab.3 Clinical characteristics of different PAX5 protein expression groups

Clinical features	Low expression group (n=25)	High expression group (n=5)	P value
Age (year)	51.16 (31~69)	47.80 (39~61)	
≥50	15	2	0.87

<50	10	3	0.76
Histological types			
Cervical squamous cell carcinoma	19	3	0.91
Cervical adenocarcinoma	1	1	-
Cervical adenosquamous carcinoma	0	1	-
Cervical neuroendocrine carcinoma (small cell type)	2	0	-
Clinicopathological stage			
CIN	3	0	-
I-II	17	4	0.86
III-IV	5	1	0.26
HPV Genotype			
16	5	2	0.73
18	0	1	-
33	1	0	-
16/18	1	1	-
16/33	1	0	-
16/52	1	0	-
16/68	1	0	-
Related type	3	0	-
High-risk type	3	0	-
Unclassified type	9	1	0.53
Lymph node metastasis			
Yes	9	4	0.85
No	15	1	0.51
Hematogenous metastasis			
	1	0	-

2.10 Notch 信号通路在宫颈癌中被激活 该实验通过 Western blot 检测宫颈癌细胞中 Notch 信号通路指标 Jagged1 的表达。结果显示，与正常宫颈上皮细胞 HUCEC 比较，在宫颈癌细胞系 SiHa、HeLa 中 Jagged1 表达升高（图 7A）。

2.11 巨噬细胞的极化 将 THP-1 细胞铺于 6 孔板中，PMA 进行诱导后共培养，通过 RT-qPCR 检测巨噬细胞标记的表达情况。结果显示，CD80 在 M1 组中高表达，同时 SiHa 共培养组 CD80 表达降低（图 7B），差异有统计学意义（ $P<0.01$ ），HeLa 共培养组 CD80 也表达降低，差异有统计学意义（图 7C， $P<0.01$ ）。CD86 在 M1 组中高表达，SiHa 共培养组 CD86 表达降低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。M2 组中 CD206 高表达，SiHa 和 HeLa 共培养组中 CD206 表达降低（图 7D），差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。综上所述，共培养组中巨噬细胞向 M2 极化，发挥促肿瘤作用。

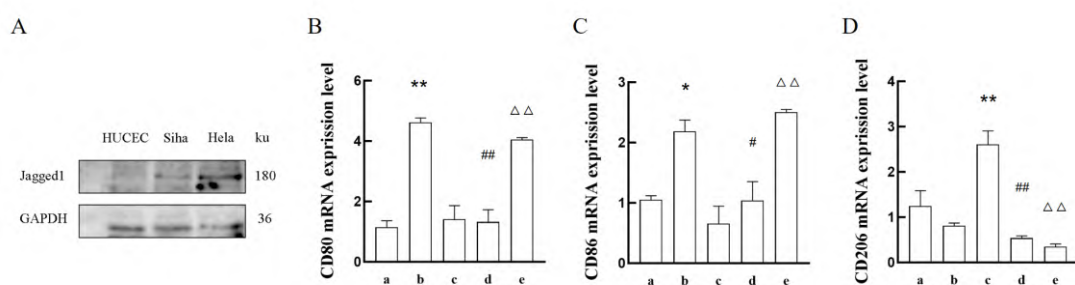


图 7 Jagged1 在宫颈癌中的表达情况及 THP-1 共培养后免疫因子的 mRNA 表达水平

Fig.7 The expression of Jagged1 in cervical cancer and the mRNA expression levels of immune factors after co-culture with THP-1

A: Protein expression levels of Jagged1 in cervical cancer cells SiHa, HeLa and normal human cervical epithelial cells HUVEC; B: mRNA expression levels of M1 surface markers CD80 and CD86 in the control group M1 and co-culture group; C: mRNA expression levels of M2 marker CD206 in the control group M2 and co-culture group; a: M0 group; b: M1 group; c: M2 group; d: SiHa-co-culture group; e: HeLa-co-culture group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs M0 group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs M1 group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs M2 group.

3 讨论

子宫颈癌作为全球女性健康的重大威胁之一，其发病率和病死率在发展中国家尤其高^[1]。宫颈癌的病理生理机制复杂，涉及多种分子和细胞信号通路的异常。因此，寻找潜在的早期诊断标志物迫在眉睫。

肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）由复杂的基质环境组成^[5]，可促进肿瘤进展^[6]。该研究通过 GEPIA 数据库分析显示，COL1A2 在宫颈癌中表达减少，使用 RT-qPCR 和 Western blot 检测进一步验证表明 COL1A2 在宫颈癌组织和细胞中也获得同样的结果。提示 COL1A2 可能与宫颈癌的发生发展相关。临床特征分析显示 COL1A2 表达与宫颈癌病理类型相关，临床样本以宫颈鳞状细胞癌为主。HPV 被认为是导致宫颈癌的主要原因，高危型 HPV 包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型。根据现有数据显示，COL1A2 低表达可能与高危型 HPV 有关。但其中 10 例患者未进行 HPV 分型检测，3 例患者仅描述 HPV 相关型，导致 COL1A2 表达与 HPV 具体分型的相关性分析不准确。有

文献^[7]报道 COL1A2 在头颈肿瘤中呈低表达, 并与肿瘤疾病患者的生存和预后相关。虽然大量文献^[8-10]报道, COL1A2 在多种癌症中呈现高表达, 并与癌症的不良预后相关。这与该实验的结果相悖, 但也更加证明 COL1A2 在不同癌症中的表达具有异质性。

按 COL1A2 表达将宫颈癌样本分为高、低表达组, 通过 CIBERSORT 分析发现两组免疫细胞分布差异显著。低表达组 M0/M2 巨噬细胞和静息记忆 CD4⁺T 细胞增多, CD8⁺T 细胞、活化记忆 CD4⁺T 细胞、滤泡辅助 T 细胞、活化 NK 细胞及活化髓样树突细胞减少。表明 COL1A2 可能通过调节免疫细胞浸润促进宫颈癌进展。

Notch 信号通路在癌症进展中发挥关键作用, 涉及癌症干细胞表型、血管生成、转移及免疫逃逸^[11-12]。该通路通过调控免疫细胞 (如 M2 巨噬细胞、CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞) 影响 TME, 与胃癌预后相关^[13]。该研究通过 COL1A2 基因功能富集分析显示其与细胞周期及免疫通路相关, 实验证实 Jagged1 在宫颈癌高表达, THP-1 共培养后诱导巨噬细胞向 M2 极化, 提示 COL1A2 可能通过抑制 Notch 通路促进 M2 极化从而驱动宫颈癌发展, 具体机制仍需深入研究。

PAX5 是一种蛋白质编码基因, 该基因参与调控组织细胞分化、迁移、增殖及器官发育等^[14]。PAX5 可以激活结直肠癌细胞中 SNHG25 的转录, 在结直肠癌中起促转移作用^[15]。生物信息学分析表明 PAX5 是 COL1A2 的转录因子。RT-qPCR 和 Western blot 显示 PAX5 在宫颈癌低表达。临床分析显示 PAX5 表达与年龄、淋巴转移无关, 且早晚期病例间无差异。HPV 分型显示 PAX5 低表达组高危型 HPV 比例较高表达组高 1 倍以上, 提示其与高危型 HPV 相关。

综上所述, 该研究表明 COL1A2 在宫颈癌中低表达, 并与肿瘤免疫浸润显著相关。低表达患者免疫细胞浸润水平降低, 可能通过 Notch 信号通路参与免疫逃逸。表明 COL1A2 可作为宫颈癌免疫治疗潜在靶点, 对开发新免疫疗法具有重要意义。该研究目前仅在宫颈癌细胞/组织中验证了 COL1A2 表达, 未阐明其影响 Notch 信号通路的具体机制。免疫浸润分析仅通过野生型组共培养和生物信息学完成。后续将深入验证 COL1A2 在宫颈癌中的生物学功能, 探究 PAX5 如何通过 COL1A2 调控信号通路, 拟通过构建过表达细胞株、免疫共培养及 IP 实验等完善研究。

参考文献

- [1] Avila J P, Carvalho B M, Coimbra E C. A comprehensive view of the cancer-immunity cycle (CIC) in HPV-mediated cervical cancer and prospects for emerging therapeutic

- opportunities[J]. *Cancers*, 2023, 15(4): 1333. doi:10.3390/cancers15041333.
- [2] Bedell S L, Goldstein L S, Goldstein A R, et al. Cervical cancer screening: past, present, and future[J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(1): 28-37. doi:10.1016/j.sxmr.2019.09.005.
- [3] Haq F, Ahmed N, Qasim M. Comparative genomic analysis of collagen gene diversity[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(3): 83. doi:10.1007/s13205-019-1616-9.
- [4] Salimian N, Peymani M, Ghaedi K, et al. Collagen 1A1 (COL1A1) and Collagen11A1(COL11A1) as diagnostic biomarkers in Breast, colorectal and gastric cancers[J]. *Gene*, 2024, 892: 147867. doi:10.1016/j.gene.2023.147867.
- [5] Gameiro S F, Flondra K M. Human papillomavirus-associated tumor extracellular vesicles in HPV(+) tumor microenvironments[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(17): 5668. doi:10.3390/jcm12175668.
- [6] Lee Y C, Kurtova A V, Xiao J, et al. Collagen-rich airway smooth muscle cells are a metastatic niche for tumor colonization in the lung[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2131. doi:10.1038/s41467-019-09878-4.
- [7] Misawa K, Kanazawa T, Misawa Y, et al. Hypermethylation of collagen $\alpha 2$ (I) gene (COL1A2) is an independent predictor of survival in head and neck cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2011, 10(3-4): 135-44. doi:10.3233/CBM-2012-0242.
- [8] Yuan X, He Y, Wang W. CeRNA network -regulated-regulated COL1A2 high expression correlates with poor prognosis and immune infiltration in colon adenocarcinoma[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 16932. doi:10.1038/s41598-023-43507-x.
- [9] Yao G, Deng L, Long X, et al. An integrated bioinformatic investigation of focal adhesion-related genes in glioma followed by preliminary validation of COL1A2 in tumorigenesis[J]. *Aging*, 2023, 15(13): 6225-54. doi:10.18632/aging.204834.
- [10] Treacy P J, Martini A, Falagario U G, et al. Association between expression of connective tissue genes and prostate cancer growth and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7520. doi:10.3390/ijms24087520.
- [11] Gallenstein N, Tichy L, Weigand M A, et al. Notch signaling in acute inflammation and sepsis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3458. doi:10.3390/ijms24043458.
- [12] Li X, Yan X, Wang Y, et al. The Notch signaling pathway: a potential target for cancer immunotherapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 45. doi:10.1186/s13045-023-01439-z.

- [13] Cui Y, Li Q, Li W, et al. NOTCH₃ is a prognostic factor and is correlated with immune tolerance in gastric cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 574937. doi:10.3389/fonc.2020.574937.
- [14] Ismail S, Elshimali Y, Daoud A, et al. Immunohistochemical expression of transcription factors PAX5, OCT2, BCL6 and transcription regulator P53 in Non-Hodgkin lymphomas: a diagnostic cross-sectional study[J]. *Ann Med Surg*, 2022, 78: 103786. doi:10.1016/j.amsu.2022.103786.
- [15] Gong T, Li Y, Feng L, et al. SNHG25 promotes colorectal cancer metastasis by regulating MMP2[J]. *Aging*, 2023, 15(19): 10105-16. doi:10.18632/aging.205060.