

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.11.006

LMTK2 基因沉默抑制人上皮性卵巢癌细胞生长和转移的作用机制*

李胜男¹ 陈必良¹ 朱媛媛² 武雁¹ 赵丽莎^{1Δ}

(1 空军军医大学第一附属医院妇产科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学基础医学院神经生物学实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨狐猴酪氨酸激酶 2(LMTK2)基因沉默对人上皮性卵巢癌(EOC)细胞生长和转移的抑制作用及其可能的机制。**方法:**通过 RT-qPCR 和 Western-blot 检测了人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 和人上皮性卵巢癌细胞系 (SKOV3、ES2、OVCAR-3 和 HEY) 中 LMTK2 的表达,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 LMTK2 的短发夹 RNA(shRNA)、阴性对照 shRNA、LMTK2 过表达重组 pcDNA3.1 质粒或阴性对照质粒转染到 SKOV3 细胞中,并分为 LMTK2-shRNA 组、NC-shRNA 组、LMTK2-pcDNA3.1 组或 NC-pcDNA3.1 组。另外,使用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 处理 SKOV3 细胞 1 h。通过 CCK-8 法测定细胞增殖,Annexin V-FITC/PI 染色法测定细胞凋亡,划痕实验评价细胞迁移,Transwell 实验评价细胞侵袭。对 BALB/c 雌性裸鼠皮下注射转染 NC-shRNA 或 LMTK2-shRNA 的 SKOV3 细胞建立体内移植瘤模型,并记录接种 28 d 内的肿瘤体积。**结果:**与人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 相比,卵巢癌细胞系(SKOV3、ES2、OVCAR-3 和 HEY)中 LMTK2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,其中 SKOV3 的 LMTK2 mRNA 和蛋白表达水平最高($P<0.05$)。与 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞活力、相对迁移面积、侵袭细胞数均显著降低,而细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。此外,与 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞中 Bax 的蛋白表达水平显著升高,而 Bcl-2、MMP2、MMP9、p-Akt 的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。LY294002 处理逆转了上调 LMTK2 对 SKOV3 细胞生长和转移的影响($P<0.05$)。在接种第 21 天和 28 天时,与 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组裸鼠的肿瘤体积显著降低($P<0.05$)。**结论:**LMTK2 基因沉默通过抑制 PI3K/Akt 信号通路降低了人上皮性卵巢癌细胞的生长和转移能力。

关键词:上皮性卵巢癌(EOC);狐猴酪氨酸激酶 2(LMTK2);细胞增殖;转移;PI3K/Akt 信号通路

中图分类号:R-33;R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)11-2034-08

The Mechanism of Silencing LMTK2 Gene on the Growth and Metastasis of Ovarian Cancer Cells*

LI Sheng-nan¹, CHEN Bi-liang¹, ZHU Yuan-yuan², WU Yan¹, ZHAO Li-sha^{1Δ}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Neurobiology, College of Basic Medicine, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study is to reveal the role of lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) in the growth and metastasis of ovarian cancer cells. **Methods:** The expression of LMTK2 in human normal ovarian epithelial cells IOSE80 and ovarian cancer cell lines (SKOV3, ES2, OVCAR-3 and HEY) were detected by RT-qPCR and Western blot. Short hairpin RNA (shRNA), negative control shRNA, LMTK2 overexpression recombinant pcDNA3.1 plasmid or negative control plasmid were transfected into SKOV3 cells by Lipofectamine 3000 transfection reagent, and were divided into LMTK2 shRNA group, NC-shRNA group, LMTK2-pcDNA3.1 group or NC-pcDNA3.1 group. In addition, SKOV3 cells were treated with PI3K/Akt inhibitor LY294002 for 1 h. Cell proliferation was measured by CCK-8 method, cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC/PI staining method, cell migration was evaluated by wound healing experiment, and cell invasion was evaluated by Transwell experiment. SKOV3 cells transfected with NC-shRNA or LMTK2-shRNA were subcutaneously injected into female BALB/c nude mice to establish an in vivo transplantation tumor model, and the tumor volume within 28 days of inoculation was recorded. **Results:** Compared with human normal ovarian epithelial cells IOSE80, the mRNA and protein expression levels of LMTK2 in ovarian cancer cell lines (SKOV3, ES2, OVCAR-3 and HEY) were significantly increased, of which the LMTK2 mRNA and protein expression levels in SKOV3 were the highest ($P<0.05$). Compared with NC-shRNA group, the SKOV3 cell viability, relative migration area and number of invaded cells in LMTK2-shRNA group were significantly reduced, while the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). In addition, compared with NC-shRNA group, the protein expression level of Bax in SKOV3 cells in LMTK2-shRNA group was significantly increased, while the protein expression levels of Bcl-2, MMP2, MMP9, and p-Akt were

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81672583)

作者简介:李胜男,女,硕士,主治医师,E-mail: lishengnan1029@126.com,电话:13572143404

Δ 通讯作者:赵丽莎,E-mail: zhaolisha123456@126.com

(收稿日期:2021-12-05 接受日期:2021-12-28)

significantly reduced ($P<0.05$). LY294002 treatment reversed the effect of up-regulation of LMTK2 on the growth and metastasis of SKOV3 cells($P<0.05$). On the 21st and 28th day of inoculation, compared with the NC-shRNA group, the tumor volume of nude mice in the LMTK2-shRNA group was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** Silencing LMTK2 reduces the growth and metastasis ability of ovarian cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Ovarian cancer; Lemur tyrosine kinase 2; Cell proliferation; Metastasis; PI3K/Akt signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)11-2034-08

前言

卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,其死亡率占据妇科恶性肿瘤首位,严重威胁妇女的身体健康^[1]。目前对其缺乏有效的预防和早期检测手段,特别是上皮性卵巢癌(Epithelial ovarian cancer, EOC),70%-80%的患者被发现时已处于中晚期,五年存活率仅仅只有20%-40%,造成这种结果的主要原因是其分子机制尚不明确^[2]。卵巢癌发生过程中的癌细胞生长和运动性失控受到多种基因的调节,因此,癌/抗癌基因的筛选和鉴定对于卵巢癌的分子靶向治疗具有重要意义^[3-5]。猴酪氨酸激酶2(Lemur tyrosine kinase 2, LMTK2),也称为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 KPI-2,属于蛋白激酶和酪氨酸激酶家族^[6]。已发表的数据显示, LMTK2 调控多种关键的细胞事件,包括细胞内转运、神经生长因子信号转导、细胞凋亡等, LMTK2 的表达和功能异常与神经退行性变、癌症和不孕不育等人类疾病有关^[6-10]。最近的研究显示, LMTK2 在卵巢癌组织中高表达,并且可能是预测患者生存期的潜在生物标志物^[11]。然而,尚不清楚 LMTK2 是否参与人 EOC 的发生发展。因此,本研究旨在揭示 LMTK2 基因对人 EOC 细胞生物学功能的调控作用和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 和人上皮性卵巢癌细胞(SKOV3、ES2、OVCAR-3 和 HEY)均购自美国 ATCC。McCoy's 5A 培养基购自美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司;Lipofectamine 3000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;裂解缓冲液、CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Matrigel 购自美国 BD Biosciences 公司;Transwell 小室购自美国 Minipore 公司;RNeasy Mini kit 购自美国 Qiagen 公司;High-Capacity RNA-to-cDNA Kit、PowerUp SYBR Green Master Mix 购自美国 Applied Biosystems 公司;BCA 蛋白质测定试剂盒购自美国 Pierce 公司;PVDF 膜、Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;PI3K/Akt 抑制剂 LY294002、LMTK2、Bax、Bcl-2、MMP2、MMP9、Akt、p-Akt、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3 和 ES2 细胞在添加 10%胎牛血清(FBS)和 2.2 g/L NaHCO₃ 的 McCoy's 5A 培养基中培养, OVCAR-3 和 HEY 细胞在添加有 10% FBS 和 2 mM 的 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中培养, IOSE80 细胞在添加 10% FBS 的高

糖 DMEM 培养基中培养,培养条件均为 37℃和 5% CO₂。

1.2.2 细胞转染 将 LMTK2 的短发夹 RNA(shRNA)序列插入 pLKO.1 质粒中生成 LMTK2-shRNA 重组质粒。携带乱序 shRNA 的 pLKO.1 质粒用作 shRNA 阴性对照(NC-shRNA 组)。将 LMTK2 的 cDNA 亚克隆到 pcDNA3.1 质粒中,构建成 LMTK2 过表达重组质粒(LMTK2-pcDNA3.1 组)。携带乱序 cDNA 的 pcDNA3.1 质粒用作阴性对照(NC-pcDNA3.1 组)。LMTK2-shRNA 和 NC-shRNA 以及 LMTK2-pcDNA3.1 和 NC-pcDNA3.1 均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。按照说明书使用 Lipofectamine 3000 转染试剂对 SKOV3 细胞进行转染。转染 48 h 后,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测转染细胞中 LMTK2 的表达。

1.2.3 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 处理 使用 0.5%二甲基亚砜(DMSO)将 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 进行稀释。细胞转染 48 h 后,分别使用 50 μM 的 LY294002 或 0.5% DMSO 孵育细胞 1 h,然后进行后续实验。

1.2.4 细胞分组 本研究中细胞实验分为两部分内容,第一部分为 LMTK2 功能验证,细胞共分为对照组(Control,未转染的细胞)、NC-shRNA 组和 LMTK2-shRNA 组,探讨沉默 LMTK2 对 SKOV3 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。第二部分为 PI3K/Akt 信号通路验证,细胞共分为 NC-pcDNA3.1+DMSO 组、NC-pcDNA3.1+LY294002 组、LMTK2-pcDNA3.1+DMSO 组和 LMTK2-pcDNA3.1+LY294002 组,然后验证 LMTK2 是否通过 PI3K/Akt 信号通路调节 SKOV3 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。细胞实验中,裸鼠分为 NC-shRNA 组和 LMTK2-shRNA 组,两组裸鼠分别皮下接种相应的 SKOV3 细胞。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 SKOV3 细胞接种到 96 孔板中,并在转染前过夜培养。转染 48 h 及 LY294002 孵育 1 h 后,向细胞中加入 10 mL/孔的 CCK-8 试剂,并在 37℃下孵育 2 h。通过 Bio-Tek 过酶标仪检测 450 nm 处的光密度值(OD)。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 使用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测细胞凋亡。转染 48 h 及 LY294002 孵育 1 h 后,用 PBS 清洗细胞,然后将 1×10⁵ SKOV3 细胞重悬在 500 μL 结合缓冲液中,缓冲液中添加 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶(PI),在黑暗中孵育 20 min 后,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移 转染 48 h 及 LY294002 孵育 1 h 后,将 SKOV3 细胞接种在 6 孔板中,细胞达到 90%汇合后,使用 20 μL 移液器尖头将细胞划出伤口,然后继续培养 48 h,使用培养液洗去未粘附的细胞,拍照并计算伤口愈合程度。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭 转染 48 h 及 LY294002 孵育 1 h 后,将 SKOV3 细胞(5×10⁴ 个细胞/孔)再悬浮到 200 mL

无胎牛血清的培养基中,然后接种到预涂有 Matrigel 的 Transwell 上室中。同时,下室内加入含 15%胎牛血清的培养基。细胞在 37℃ 孵育 24 h,用棉签拭除未侵袭的细胞。用甲醇固定侵袭细胞,0.1%结晶紫染色。倒置显微镜计数染色的侵袭细胞数。

1.2.9 体内移植瘤实验 采用 SPF 级 6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠进行体内移植瘤实验,裸鼠体重 20-25 g,饲养条件为 25℃、55%相对湿度、12 h 光暗循环照明,不限制饮食。将裸鼠随机分为 NC-shRNA 组和 LMTK2-shRNA 组,每组 6 只。转染 48 h 后,将 1×10^7 个转染 NC-shRNA 和 LMTK2-shRNA 的 SKOV3 细胞用 100 μ L 无菌 PBS 稀释,分别皮下注射于每只小鼠右侧背部。每 7 d 用卡尺测量肿瘤大小。肿瘤体积计算公式: $0.5 \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 。

1.2.10 RNA 提取和 RT-qPCR 使用 RNeasy Mini kit 分离总 RNA,并使用 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit 按照制造商的方案转化为互补 DNA (cDNA)。通过使用 PowerUp SYBR Green Master Mix 和 ABI 7500 型定量 PCR 仪进行 RT-qPCR。基因扩增程序如下: 50℃ 2 min, 95℃ 2 min, 95℃ 15 s 和 60℃ 1 min, 40 个循环。序列如下: LMTK2: 5'-CCGAACACAAAC-AGCAGAGA-3' (F), 5'-GCCTCCCAGACATACTCGAA-3' (R); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH): 5'-CCATCTTCCAGGAGC GAGATC3'(F), 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'(R)。GAPDH 用作内部对照。

1.2.11 Western blot 检测蛋白表达水平 通过用蛋白酶抑制剂混合物在放射免疫沉淀测定裂解缓冲液中裂解细胞或组织来提取总蛋白。通过离心收集上清液,并使用 Pierce BCA 蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度。将等量的蛋白质加载到 SDS-PAGE 上并通过电泳分离。将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜上,并将膜在室温下用 5%脱脂乳孵育 1 h 以阻断非特异性结合。然后,将膜与 LMTK2 (1:2000)、Bax (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、MMP2 (1:3000)、MMP9 (1:3000)、Akt (1:500)、p-Akt (1:500)和 GAPDH (1:1000)一抗在 4℃ 孵育过夜,然后将膜在室温下用辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (1:1000)孵育 1 h。使用 Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate 通过增强的化学发光方法显影。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件计算目标条带的灰度值。GAPDH 作为内部对照。

1.3 统计分析

使用 SPSS21.0 软件包进行数据分析。本研究中所有数据均符合正态分布,数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,组间差异通过 t 检验或单因素方差分析确定。 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 LMTK2 抑制了卵巢癌细胞增殖

与人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 相比,卵巢癌细胞系 (SKOV3、ES2、OVCAR-3 和 HEY) 中 LMTK2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,其中 SKOV3 的 LMTK2 mRNA 和蛋白表达水平最高 ($P < 0.05$)。因此,后续实验选用了 SKOV3 细胞。与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞中 LMTK2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。CCK-8 法检测结果显示,培养 48 h 和 72 h 后,与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 沉默 LMTK2 促进了卵巢癌细胞凋亡

Annexin V-FITC/PI 染色及流式细胞术检测结果显示,与 Control 组、NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。Western-blot 检测结果显示,与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 Bax 的蛋白表达水平显著升高,而 Bcl-2 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 沉默 LMTK2 抑制了卵巢癌细胞迁移和侵袭

划痕实验检测结果显示,与 Control 组、NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞的相对迁移面积显著降低 ($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 SKOV3 细胞的侵袭细胞数量显著减少 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 沉默 LMTK2 抑制了卵巢癌细胞中 PI3K/Akt 信号通路

Western blot 检测结果显示,与 Control 组和 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组 p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),而 Akt 蛋白表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 LMTK2 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路调控卵巢癌细胞生长和转移能力

RT-qPCR 和 Western-blot 检测结果显示,与 Control 组和 NC-pcDNA3.1 组相比,LMTK2-pcDNA3.1 组 LMTK2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),见图 5。

与 NC-pcDN A3.1+DMSO 组相比,LMTK2-pcDNA3.1+DMSO 组的细胞活力、相对迁移面积、侵袭细胞数显著升高,而细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。与 LMTK2-pcDNA3.1+DMSO 组相比,LMTK2-pcDNA3.1+LY294002 组的细胞活力、相对迁移面积、侵袭细胞数显著降低,而细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。与 NC-pcDNA3.1+DMSO 组相比,LMTK2-pcDNA3.1+DMSO 组的 p-Akt 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 LMTK2-pcDNA3.1+DMSO 组相比,LMTK2-pcDNA3.1+LY294002 组的 p-Akt 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 沉默 LMTK2 抑制了体内移植瘤的生长

对裸鼠接种转染 NC-shRNA 或 LMTK2-shRNA 的 SKOV3 细胞后,在接种第 21 天和 28 天时,与 NC-shRNA 组相比,LMTK2-shRNA 组裸鼠的肿瘤体积显著降低 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

LMTK2 具有多种生物学功能。据报道,LMTK2 可通过与蛋白磷酸酶 1 催化亚基 α (PP1A) 结合,并在 Thr320 磷酸化 PP1A,导致 PP1A 失活^[12]。LMTK2 通过调节 PP1A 和糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)来控制 Smad2 信号传导^[13]。LMTK2 是神经生长因子 (NGF) 诱导的神经元分化的负调节因子,并在 NGF-TrkA 信号传导中起作用^[14]。LMTK2 在体内跨膜运输中起关键作用^[15]。LMTK2 基因敲除可导致小鼠生殖细胞成熟缺陷^[16]。另外,多项研究显示,LMTK2 在某些癌症中发生突变^[17]。LMTK2 在前列腺癌中上调,并作为雄激素受体活性的负调节因子^[18]。最近有学者报道 LMTK2 在卵巢癌组织中高表达,并且

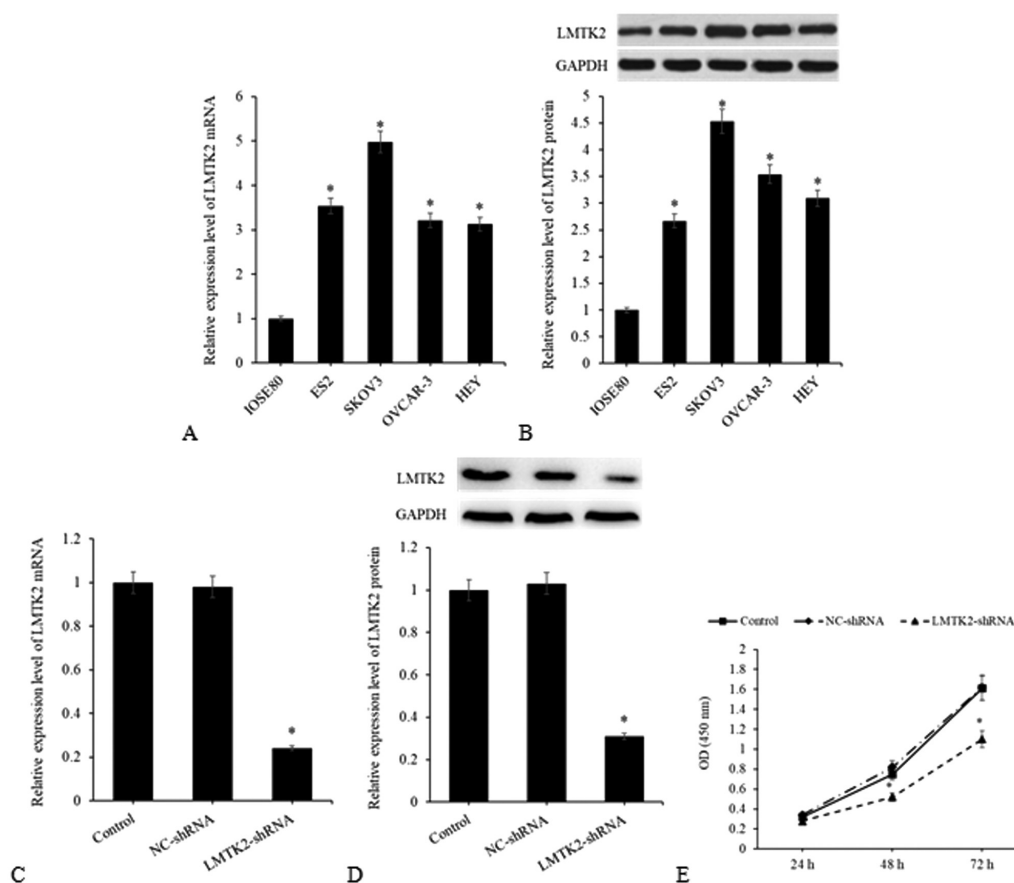


图 1 沉默 LMTK2 对 SKOV3 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effect of silencing LMTK2 on the proliferation of SKOV3 cells

Note: A and B: mRNA and protein expression levels of LMTK2 in different cell lines, compared with IOSE80, $*P < 0.05$; C and D: transfection of LMTK2-shRNA down-regulated the mRNA and protein expression of LMTK2, compared with Control group and NC-shRNA group, $*P < 0.05$; E: CCK-8 method to detect cell proliferation, compared with Control group and NC-shRNA group, $*P < 0.05$.

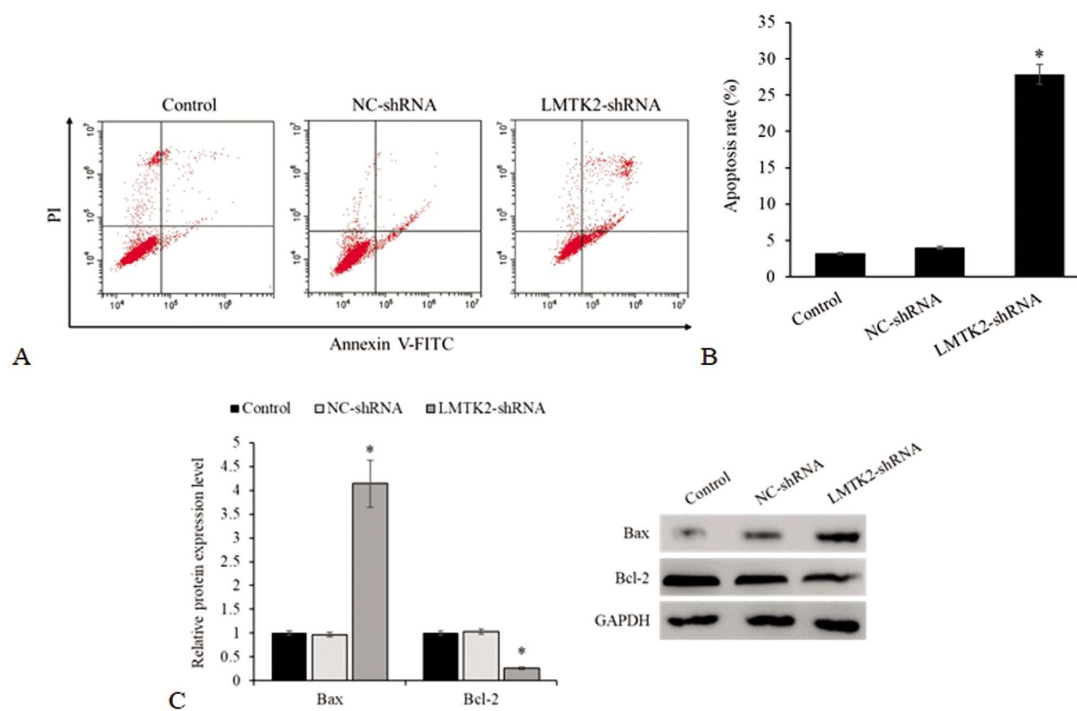


图 2 沉默 LMTK2 对 SKOV3 细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effect of silencing LMTK2 on SKOV3 cell apoptosis

Note: A and B: Annexin V-FITC/PI staining to detect cell apoptosis; C: Western blot to detect the protein expression level of Bax and Bcl-2; compared with Control group and NC-shRNA group, $*P < 0.05$.

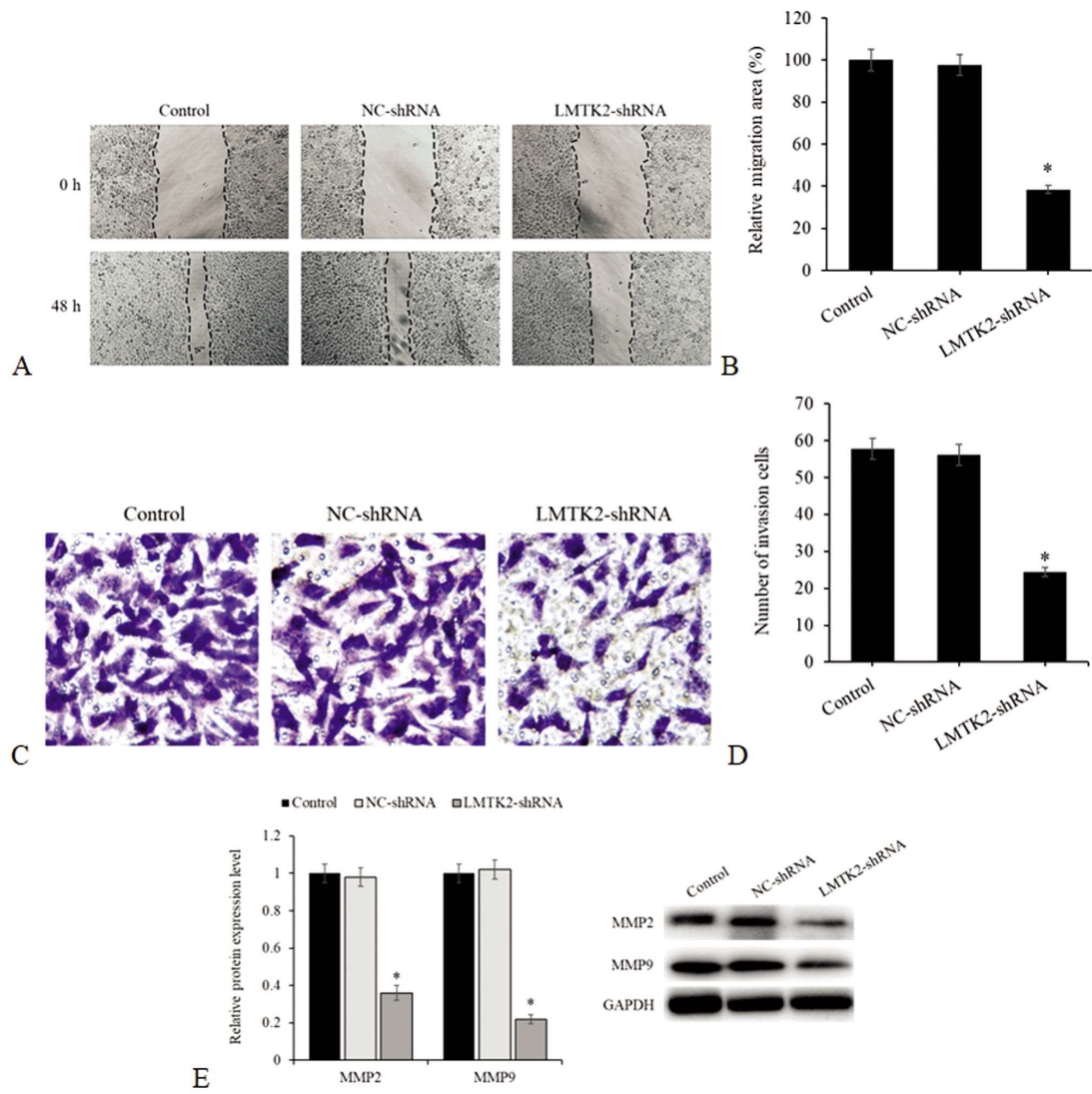


图3 沉默 LMTK2 对 SKOV3 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 3 The effect of silencing LMTK2 on the migration and invasion of SKOV3 cells

Note: A and B: Wound healing test to detect cell migration ability ($\times 50$); C and D: Transwell test to detect cell invasion ability ($\times 400$); E: Western blot to detect the protein expression level of MMP2 and MMP9; compared with Control group and NC-shRNA group, $*P < 0.05$.

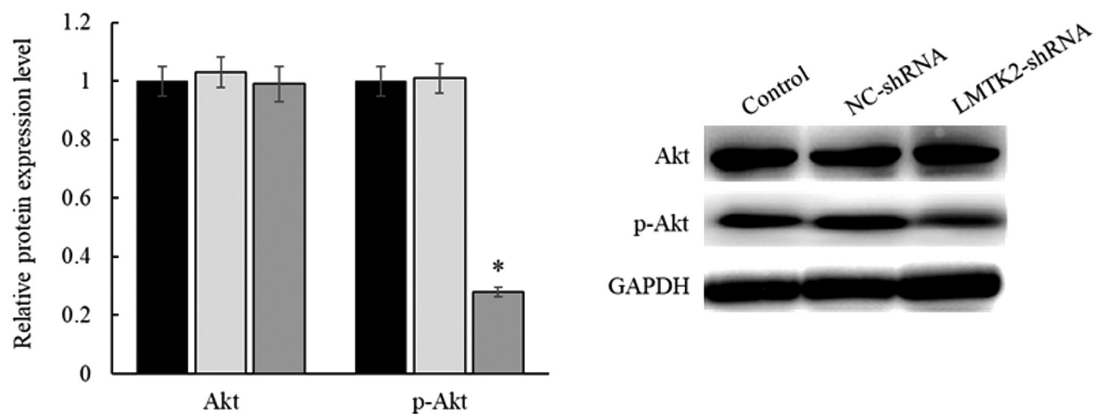


图4 Western blot 检测沉默 LMTK2 对 SKOV3 细胞中 Akt 磷酸化的影响

Fig. 4 The effect of silencing LMTK2 on Akt phosphorylation in SKOV3 cells detected by Western blot

Note: compared with Control group and NC-shRNA group, $*P < 0.05$.

可能是预测患者生存期的潜在生物标志物^[11]。在本研究中,与人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 相比,人上皮性卵巢癌细胞系 (SKOV3、ES2、OVCAR-3 和 HEY) 中 LMTK2 的 mRNA 和蛋

白表达水平均升高,与该研究结果一致。提示 LMTK2 可能参与卵巢癌的发生发展,然而,LMTK2 在卵巢癌中确切的功能尚不清楚。

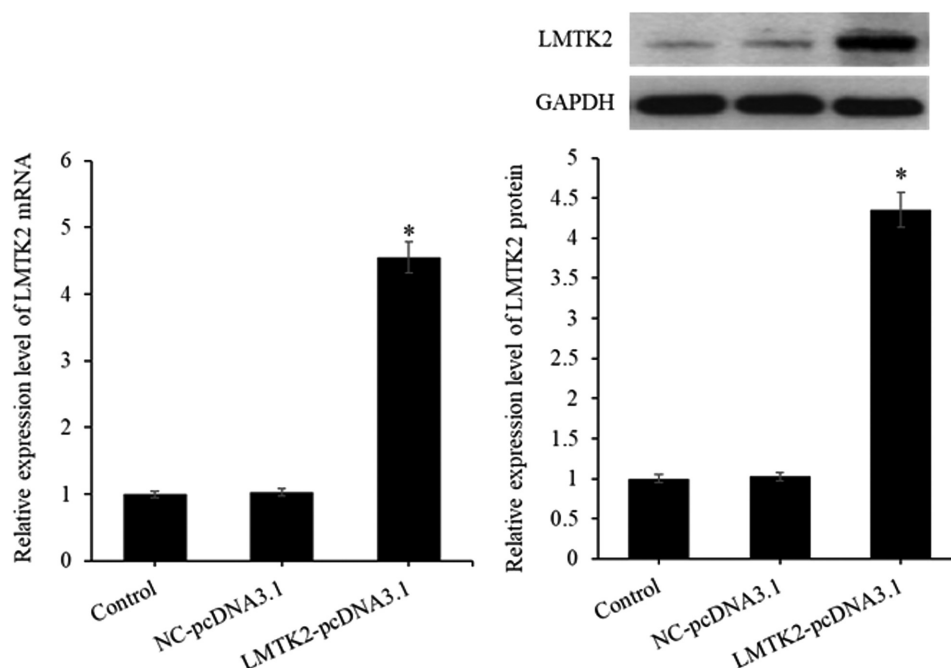


图5 转染 LMTK2-pcDNA3.1 上调了 SKOV3 细胞中 LMTK2 的表达

Fig. 5 Transfection of LMTK2-pcDNA3.1 up-regulated the expression of LMTK2 in SKOV3 cells

Note: A: Relative expression of LMTK2 mRNA; B: Relative expression of LMTK2 protein; compared with Control group and NC-pcDNA3.1 group, * $P < 0.05$.

为了考察 LMTK2 是否影响卵巢癌的恶性行为,本研究对高表达 LMTK2 的 SKOV3 细胞系转染了 LMTK2-shRNA,并验证了 LMTK2 的敲低效率。结果显示,沉默 LMTK2 后,SKOV3 细胞的增殖能力降低,而凋亡水平增加,并且 Bax 的蛋白表达水平升高,而 Bcl-2 的蛋白表达水平降低。已知 Bcl-2 家族成员调节细胞凋亡,Bcl-2 具有抗凋亡作用,Bax 具有促凋亡作用^[19]。Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体,并抑制 Bcl-2 的功能,因此,Bax/Bcl-2 的比例是决定细胞凋亡的关键因素^[20,21]。其他文献报道,LMTK2 通过调节 BCL2 家族成员的表达从而调节细胞对凋亡的敏感性,在人乳腺癌上皮细胞和大肠癌细胞中,沉默 LMTK2 以 GSK-3 β 和 PP1A 依赖的方式降低抗凋亡蛋白 BCL2 的表达^[22]。因此,本研究结果说明 LMTK2 可能通过影响 Bax/Bcl-2 的比例从而调控卵巢癌细胞的生长。

另外,本研究结果也显示,沉默 LMTK2 后,SKOV3 细胞的迁移能力和侵袭能力也显著降低,并且降低了细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达。MMP-2 和 MMP-9 是基质金属蛋白酶(MMPs)家族的成员,是调节肿瘤转移的细胞外基质降解酶^[23]。此外,MMP-2 和 MMP-9 可通过促进血管内皮生长因子的表达来促进血管生成,从而增加肿瘤细胞的转移性^[24,25]。因此,这些研究表明,LMTK2 的异常高表达可能通过上调 MMP-2 和 MMP-9 来促进卵巢癌细胞的转移能力。

目前,少量文献报道了 LMTK2 调节癌症发生发展的相关机制。Zhang 等人报道,沉默 LMTK2 通过抑制 NF- κ B 的活化来抑制结肠癌细胞的增殖。在未受刺激的条件下,LMTK2 通过抑制 p65 在 Ser468 处的磷酸化来调节 NF- κ B。从机制上讲,LMTK2 磷酸化 PP1A 可以阻止 PP1A 去磷酸化 p-GSK-3 β (Ser9),p-GSK-3 β (Ser9) 不能在 Ser468 位磷酸化 p65,从而维持了 NF- κ B 的基础活性。LMTK2 还可调节 TNF- α 激活的 NF- κ B。沉默 LMTK2 抑制 TNF- α 诱导的 IKK β 磷酸化、I κ B α

降解和 NF- κ B 活化。动物实验中,沉默 LMTK2 抑制结肠癌细胞异种移植瘤生长^[12]。Zhao 等人报道,LMTK2 在肝细胞癌(HCC)组织和细胞系中高表达,LMTK2 高表达的患者生存时间较短。沉默 LMTK2 抑制了 HCC 细胞的增殖和侵袭,而 LMTK2 过表达对 HCC 细胞增殖和侵袭具有促进作用。沉默 LMTK2 会降低 GSK-3 β 的磷酸化和活性 β -catenin 的表达,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导。在体内异种移植肿瘤模型中,沉默 LMTK2 延缓了 HCC 细胞的肿瘤生长,这与 Wnt/ β -catenin 信号传导的下调有关^[26]。为了进一步揭示 LMTK2 在卵巢癌发生发展中的作用,本研究考察了磷脂酰肌醇 3-激酶(P13K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路。本研究发现,沉默 LMTK2 抑制了上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞中 PI3K/Akt 信号通路的活化,上调 LMTK2 的表达则激活了 PI3K/Akt 信号通路。然而,使用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 处理细胞后,逆转了 LMTK2 对 SKOV3 细胞生长和转移能力的影响。已知 PI3K/Akt 信号通路是一条参与调节细胞增殖、转移等多种功能的信号通路。Akt 是 PI3K 的下游靶蛋白,Akt 的磷酸化与肿瘤发生密切相关。Akt 磷酸化后,通过激活其下游靶点如 GSK-3 β 和 NF- κ B 等转录因子来调节肿瘤细胞的恶性行为^[27,28]。BCL2 家族成员受到 PI3K/Akt 信号通路的调控,从而调节细胞凋亡^[29]。另外,PI3K/Akt 信号通路的活化可促进 MMP2 和 MMP9 的蛋白表达,从而降解多种细胞外基质成分并促进癌细胞的迁移和侵袭^[30,31]。结合本研究结果及前人文献可知,LMTK2 对上皮性卵巢癌细胞生长和转移的影响部分是通过调节 PI3K/Akt 信号通路及其下游靶点来实现的。

综上所述,本研究表明,沉默 LMTK2 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路降低了上皮性卵巢癌细胞的生长和转移能力,LMTK2 可能是一种新型上皮性卵巢癌诊断和治疗分子靶标。

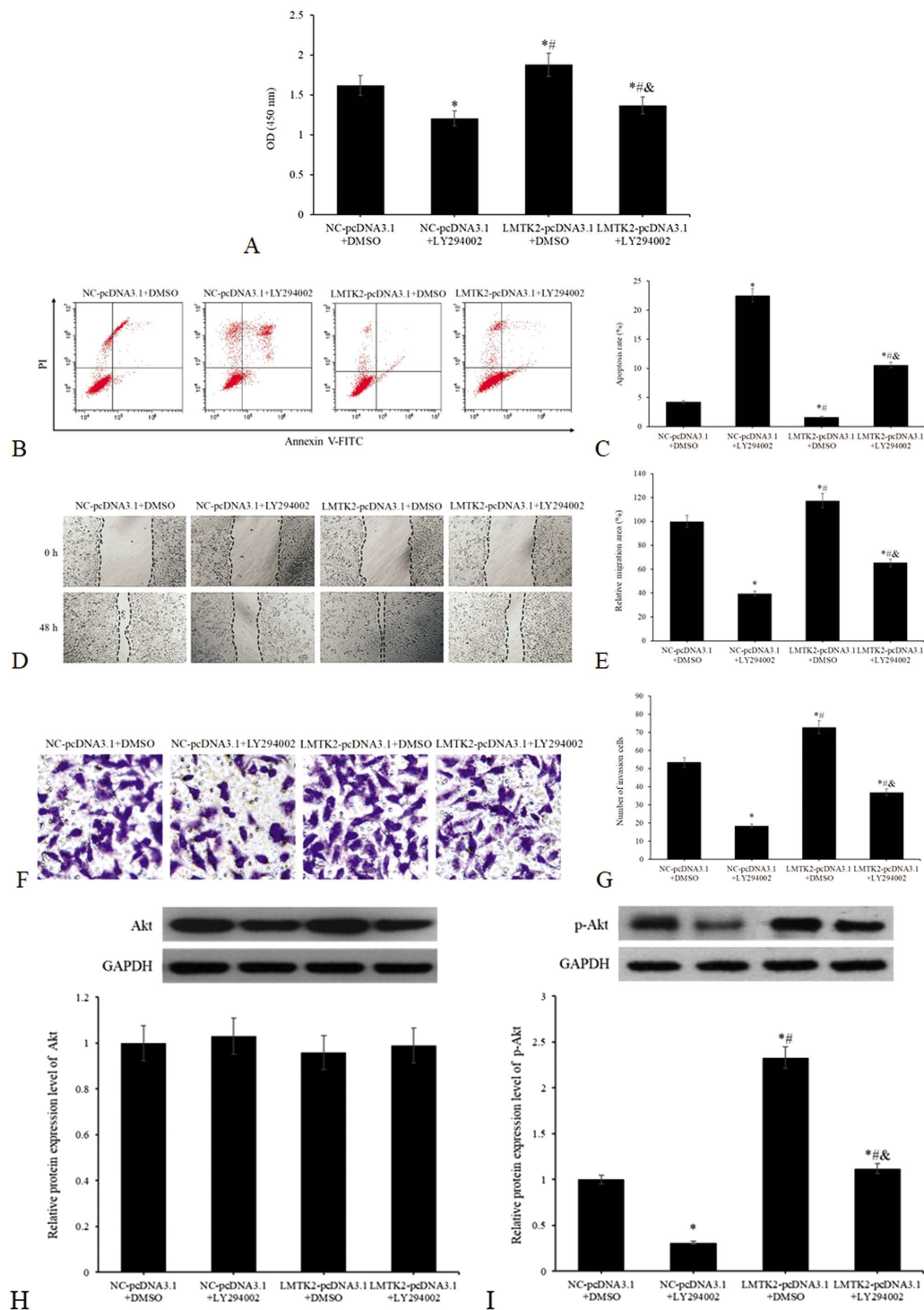


图 6 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 逆转了上调 LMTK2 对卵巢癌细胞生长和转移能力的影响

Fig. 6 PI3K/Akt inhibitor LY294002 reversed the effect of up-regulation of LMTK2 on the growth and metastasis of ovarian cancer cells

Note: A: CCK-8 method to detect cell proliferation; B and C: Annexin V-FITC/PI staining to detect cell apoptosis; D and E: wound healing test to detect cell migration ability ($\times 50$); F and G: Transwell experiment to detect cell invasion ability ($\times 400$); H and I: Western blot to detect the protein expression of Akt and p-Akt; compared with NC-pcDNA3.1+DMSO group, * $P<0.05$; compared with NC-pcDNA3.1+LY294002 group, # $P<0.05$; compared LMTK2-pcDNA3.1+DMSO group, & $P<0.05$.

参考文献 (References)

- [1] Doherty JA, Peres LC, Wang C, et al. Challenges and opportunities in studying the epidemiology of ovarian cancer subtypes [J]. Curr Epidemiol Rep, 2017, 4(3): 211-220
- [2] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240-1253
- [3] Alenezi WM, Fierheller CT, Recio N, et al. Literature review of BARD1 as a cancer predisposing gene with a focus on breast and ovarian cancers[J]. Genes (Basel), 2020, 11(8): 856-879
- [4] Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer[J]. Bmj, 2020, 371: 3773-3792
- [5] Shen S, Wang G, Zhang R, et al. Development and validation of an immune gene-set based Prognostic signature in ovarian cancer [J]. EBioMedicine, 2019, 40: 318-326

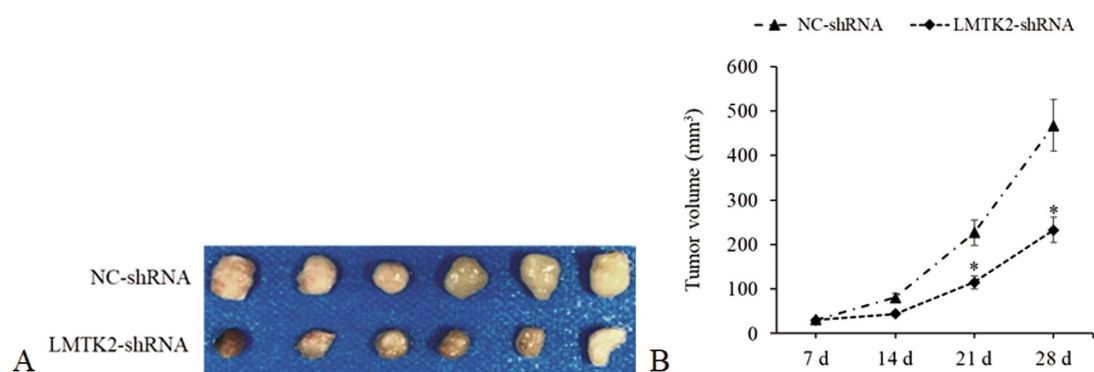


图7 沉默LMTK2抑制了体内移植瘤的生长

Fig. 7 Silencing LMTK2 inhibited the growth of transplanted tumors in vivo

Note: A: tumor images of nude mice on day 28 (6 replicates); B: tumor volume; compared with NC-shRNA group, * $P < 0.05$.

- [6] Cruz DF, Farinha CM, Swiatecka-Urban A. Unraveling the function of lemur tyrosine kinase 2 network[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 24-33
- [7] Bencze J, Mórotz GM, Seo W, et al. Biological function of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2): implications in neurodegeneration[J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 20-28
- [8] Bencze J, Szarka M, Bencs V, et al. Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) level inversely correlates with phospho-tau in neuropathological stages of alzheimer's disease[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(2): 68-82
- [9] Rui Q, Cao S, Wang X, et al. LMTK2 regulates inflammation in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 219-225
- [10] Vezelis A, Simiene J, Dabkeviciene D, et al. LMTK2 as potential biomarker for stratification between clinically insignificant and clinically significant prostate cancer[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 8820366-8820371
- [11] Lalremmawia H, Tiwary BK. Identification of molecular biomarkers for ovarian cancer using computational approaches[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(6): 742-748
- [12] Zhang R, Li X, Wei L, et al. Lemur tyrosine kinase 2 acts as a positive regulator of NF- κ B activation and colon cancer cell proliferation[J]. *Cancer Lett*, 2019, 454: 70-77
- [13] Manser C, Guillot F, Vagnoni A, et al. Lemur tyrosine kinase-2 signalling regulates kinesin-1 light chain-2 phosphorylation and binding of Smad2 cargo[J]. *Oncogene*, 2012, 31(22): 2773-2782
- [14] Kawa S, Fujimoto J, Tezuka T, et al. Involvement of BREK, a serine/threonine kinase enriched in brain, in NGF signalling[J]. *Genes Cells*, 2004, 9(3): 219-232
- [15] Inoue T, Kon T, Ohkura R, et al. BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking[J]. *Genes Cells*, 2008, 13(5): 483-495
- [16] Kawa S, Ito C, Toyama Y, et al. Azoospermia in mice with targeted disruption of the Brek/Lmtk2 (brain-enriched kinase/lemur tyrosine kinase 2) gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(51): 19344-19349
- [17] Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(8): 794-802
- [18] Shah K, Bradbury NA. Lemur Tyrosine Kinase 2, a novel target in prostate cancer therapy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16): 14233-14246
- [19] Azimian H, Dayyani M, Toossi MTB, et al. Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3): 325-332
- [20] Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, et al. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy?[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 403-416
- [21] Zhao T, Fu Y, Sun H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(1): 60-70
- [22] Conti A, Majorini MT, Fontanella E, et al. Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) is a determinant of cell sensitivity to apoptosis by regulating the levels of the BCL2 family members [J]. *Cancer Lett*, 2017, 389: 59-69
- [23] Kunz P, Sähr H, Lehner B, et al. Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 223-232
- [24] Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, et al. MMP-2 alters VEGF expression via α V β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(5): 1081-1095
- [25] Feng Y, Zu LL, Zhang L. MicroRNA-26b inhibits the tumor growth of human liver cancer through the PI3K/Akt and NF- κ B/MMP-9/VEGF pathways[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2288-2296
- [26] Zhao G, Song Y, Dong L, et al. Silencing of lemur tyrosine kinase 2 restricts the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma through modulation of GSK-3 β /Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517(4): 722-728
- [27] Cho TM, Kim WJ, Moon SK. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64: 344-352
- [28] Zhao H, Yuan X, Jiang J, et al. Antimetastatic effects of licochalcone B on human bladder carcinoma T24 by inhibition of matrix metalloproteinases-9 and NF- κ B activity [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 115(6): 527-533
- [29] Zhao M, Zhang J, Huang W, et al. CFTR promotes malignant glioma development via up-regulation of Akt/Bcl2-mediated anti-apoptosis pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7301-7312
- [30] Liao AC, Kuo CC, Huang YC, et al. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP-2[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3): 1531-1536
- [31] Zahradka P, Harding G, Litchie B, et al. Activation of MMP-2 in response to vascular injury is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of MT1-MMP[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(6): 2861-2870