

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.06.001

• 基础研究 •

KANK1 对子宫内膜癌细胞增殖及迁移的影响*

吕牧 楼利群 余娟娟 罗伊凡 黄宝珠 覃祚树 张箴波[△]

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 201620)

摘要 目的:研究 KANK1 在子宫内膜癌中的表达以及对子宫内膜癌细胞增殖及迁移的影响。**方法:**(1)TCGA 数据库分析 KANK1 在子宫内膜癌中的表达和生存期分析。(2)采用实时荧光定量聚合酶链反应验证转染 KANK1 质粒的效果。采用 Ishikawa 和 ECC1 这两种子宫内膜癌细胞来探讨 KANK1 对子宫内膜癌的细胞周期和凋亡的影响。通过 Western blot 检测细胞周期相关蛋白的表达,以及流式细胞术检测细胞周期和凋亡水平。(3)通过 Transwell 小室实验和划痕实验检测细胞的侵袭和转移能力。**结果:**TCGA 数据库分析发现 KANK1 在子宫内膜癌中低表达且与患者预后良好相关。过表达 KANK1 下调了 Cyclin D1 和 Cyclin D2 的蛋白水平,并将细胞周期阻滞在 G1 期。流式细胞术检测发现过表达 KANK1 组的细胞凋亡水平 (Ishikawa:22.7%;ECC1:19.0%)比对照组 (Ishikawa:18.1%;ECC1:15.3%)高,差异具有统计学意义。Transwell 迁移和侵袭实验结果表明过表达 KANK1 组的子宫内膜癌细胞侵袭和转移能力减弱。**结论:**本研究证明了 KANK1 在子宫内膜癌中发挥抑癌作用。KANK1 高表达与子宫内膜癌的预后良好成正相关。KANK1 通过抑制癌细胞周期和促进肿瘤细胞凋亡发挥抑制子宫内膜癌增殖的作用。此外,KANK1 抑制了子宫内膜癌的侵袭和转移。

关键词:KANK1;子宫内膜癌;细胞周期;凋亡;细胞迁移**中图分类号:**R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)06-1001-05

Effect of KANK1 on Proliferation and Migration of Endometrial Cancer Cells*

LÜ Mu, LOU Li-qun, YU Juan-juan, LUO Yi-fan, HUANG Bao-zhu, QIN Zuo-shu, ZHANG Zhen-bo[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of KANK1 in endometrial cancer and its effect on the proliferation and migration of endometrial cancer. **Methods:** (1) TCGA database was used to analyze the expression of KANK1 and its survival analysis in endometrial cancer. (2) Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to verify the effect of transfection of KANK1 plasmid. Ishikawa and ECC1 cells were used to investigate the effect of KANK1 on cell cycle and apoptosis of endometrial cancer cells. The expression of cell cycle-related proteins was detected by Western blot, and the cell cycle and apoptosis levels were detected by flow cytometry. (3) Cell invasion and metastasis ability were detected by transwell assay and wound healing assay. **Results:** TCGA database analysis showed that KANK1 was low expressed in endometrial cancer and correlated with good prognosis. Overexpression of KANK1 downregulated the protein levels of Cyclin D1 and Cyclin D2 and blocked the cell cycle in G1 phase. Flow cytometry showed that the apoptosis level of KANK1-overexpression group (Ishikawa: 22.7%; ECC1: 19.0%) was higher than that of the control group (Ishikawa: 18.1%; ECC1: 15.3%), and the difference was statistically significant. Transwell assay and wound healing assay showed that the invasion and metastasis ability of endometrial cancer cells overexpressing KANK1 was diminished. **Conclusion:** This study demonstrates that KANK1 plays an anti-tumor role in endometrial cancer. The high expression of KANK1 is positively related to the good prognosis of endometrial cancer. KANK1 inhibits the proliferation of endometrial cancer by inhibiting cancer cell cycle progression and promoting tumor cell apoptosis. In addition, KANK1 inhibits the invasion and metastasis of endometrial cancer.

Key words: KANK1; Endometrial cancer; Cell cycle; Apoptosis; Cell migration**Chinese Library Classification (CLC):** R737.33 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2023)06-1001-05

前言

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是发生在子宫内膜上皮的恶性肿瘤,是全球妇女中最常见的妇科癌症之一^[1,2]。经典

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81872111;81672562);国家重点研发计划项目(2019YFC1005201)

作者简介:吕牧(1997-),女,硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤和 IVF 保育治疗, E-mail: 15651738713@163.com

[△] 通讯作者:张箴波(1979-),男,博士,教授,主要研究方向:妇科肿瘤和 IVF 保育治疗, E-mail: zhangzhenbozzb@shsmu.edu.cn

(收稿日期:2022-09-23 接受日期:2022-10-18)

的子宫内膜癌分型分为 I 型和 II 型^[3]。I 型子宫内膜癌主要为子宫内膜样腺癌,与持续的雌激素刺激相关,预后良好。II 型子宫内膜癌主要包括浆液性癌、透明细胞癌、未分化癌等,预后较差,发生机制尚不完全清楚。据统计,女性一生患子宫内膜癌的风险约为 3%,诊断时的中位年龄为 61 岁。在过去的 30 年中,总体发病率上升了 132%,特别是肥胖人群和老龄人群^[4]。目前,人们对子宫内膜癌的分子机制尚未有很好地了解,因此进一步探索子宫内膜癌的发生发展的分子机制将为子宫内膜癌患者提供更有有效的治疗方法。KANK1 是 KANK 蛋白家族的成员,位于 9p24.3,其功能包括通过调节肌动蛋白聚合来控制细胞骨架的形成^[5]。据报道,该基因在肾细胞癌、鼻咽癌、胃癌等癌症中表达下调,起到肿瘤抑制基因的作用^[5-7]。KANK1 可以通过 PI3K/Akt 信号调节 RhoA 活性,从而调节肌动蛋白聚合,抑制细胞迁移^[8]。在恶性外周神经鞘瘤中,KANK1 作为肿瘤抑制因子,影响细胞增殖和凋亡,在恶性外周神经鞘瘤的靶向治疗中发挥作用^[9]。然而,KANK1 是否影响子宫内膜癌的发生发展仍不清楚,本研究旨在探索 KANK1 对子宫内膜癌细胞的增殖及迁移的影响,为治疗子宫内膜癌提供新的思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染

Ishikawa 细胞用 DMEM 培养基培养,ECC1 细胞用 1640 培养基培养。1640 和 DMEM 培养基内均加入 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素。细胞均置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。当细胞密度达到 40%~50%时,用 Lipofectamine 3000 转染试剂 (Invitrogen, 中国)按照说明书进行转染,转染 48 小时后,收集细胞进行实验分析。

1.2 蛋白提取及 Western blot

细胞经过转染处理 48 小时后,用裂解液(RIPA: PMSF=100: 1)提取总蛋白,并通过 BCA 法检测蛋白浓度。经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,在 400 mA 恒电流下,将蛋白转至甲醇激活的 PVDF 膜上,再用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 小时,在 4℃摇床上一抗孵育过夜。第二天加入二抗在常温下孵育 1 小时。最后对条带进行成像并扫描。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

Trizol 试剂用于提取 RNA,然后根据制造商的说明,用逆转录酶试剂盒(TAKARA, 日本)进行逆转录。ABI QuantStudio6 系统被用来进行 qRT-PCR。引物序列如下:GAPDH 正向引物 5'- AACGGATTTGGTCGTATTG -3', 反向引物 5'- GGAA-GATGGTGATGGGATT-3';KANK1 正向引物 5'-CACTGAA-GAGCTGAGGAACCCCT-3', 反向引物 5'- TCTTGCT CAGGC TGGGATGTCT -3'。

1.4 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

细胞周期检测使用细胞周期检测试剂盒 (Beyotime Biotechnology, 中国)。将细胞用预冷的 PBS 洗两遍,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,放入培养箱消化 3 分钟,收集细胞,离心 5 分钟。用预冷的 PBS 洗两遍,最后一遍小心吸去上清,最后用 70%乙醇重悬细胞沉淀,放入 4℃冰箱固定 12-24h,择期送检。

凋亡检测使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(Bey-

otime Biotechnology, 中国)。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,并用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶双染色,吹打混匀,置于冰上避光保存。在染色后 4 h 内进行流式上机分析。

1.5 Transwell 小室实验

将子宫内膜癌细胞培养在上层小室中,加入 200 μ L 无血清培养基。将 Matrigel 胶铺在小室上进行侵袭试验,但不用于迁移研究。小室底部的培养基中包含有 10%胎牛血清。在培养箱中培养 48h,然后用 4%多聚甲醛固定 30 分钟,再用结晶紫染色 15 分钟。最后对小室下层细胞进行计数,并在五个独立的区域内进行拍照。

1.6 划痕实验

在六孔板中培养 Ishikawa 和 ECC1 细胞,然后用 200 μ L 吸头刮除细胞单层形成划痕。通过在划痕后 0 h 和 24 h 拍摄 10 个高倍镜视野下的照片,获得细胞迁移的代表性图片。将划痕实验的结果量化为迁移率,迁移率 = 24 h 迁移面积(0 h 的划痕面积 - 24 h 的划痕面积)/0 h 面积。

1.7 临床样本数据挖掘

从 UALCAN 网站(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)中的 TCGA 数据库中通过数据挖掘得到 KANK1 在子宫内膜癌中的表达水平。从 GEPIA 网站(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)中分析下载得到 KANK1 表达在子宫内膜癌患者中的生存分析。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用 t 检验,* 代表 $P < 0.05$,有统计学意义。

2 结果

2.1 KANK1 表达水平与子宫内膜癌患者预后的相关性

TCGA 数据库显示 KANK1 在子宫内膜癌中的表达水平显著低于正常组织($P < 0.001$,图 1A)。生存分析显示,KANK1 高表达患者的总体生存率高于 KANK1 低表达患者($P = 0.055$,图 1B)。

2.2 KANK1 在子宫内膜癌中调控细胞周期和凋亡

我们采用 Ishikawa 和 ECC1 这两种子宫内膜癌细胞来探讨 KANK1 对子宫内膜癌的细胞周期和凋亡的影响。当 KANK1 在 Ishikawa 和 ECC1 细胞中过表达时,Western blot 检测细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 Cyclin D2 的表达,结果显示当 KANK1 过表达时,Cyclin D1 和 Cyclin D2 水平均下降(图 2A)。流式细胞检测显示,在 Ishikawa 细胞系中,过表达 KANK1 组的 G1 期比例为 55.24%,对照组的 G1 期比例为 48.77%。在 ECC1 细胞系中,过表达 KANK1 组的 G1 期比例为 56.14%,对照组的 G1 期比例为 50.66%。当 KANK1 过表达时,Ishikawa 和 ECC1 细胞周期主要阻滞在 G1 期(图 2B)。此外,在 Ishikawa 细胞系中,过表达 KANK1 组的凋亡比例为 22.7%,对照组的凋亡比例为 18.1%。ECC1 细胞系中,过表达 KANK1 组的凋亡比例为 19.0%,对照组的凋亡比例为 15.3%(图 2C)。两种细胞系中过表达 KANK1 组的凋亡水平均高于对照组,且具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 KANK1 对子宫内膜癌细胞迁移和侵袭能力的影响

为了研究 KANK1 是否能影响子宫内膜癌细胞迁移及侵

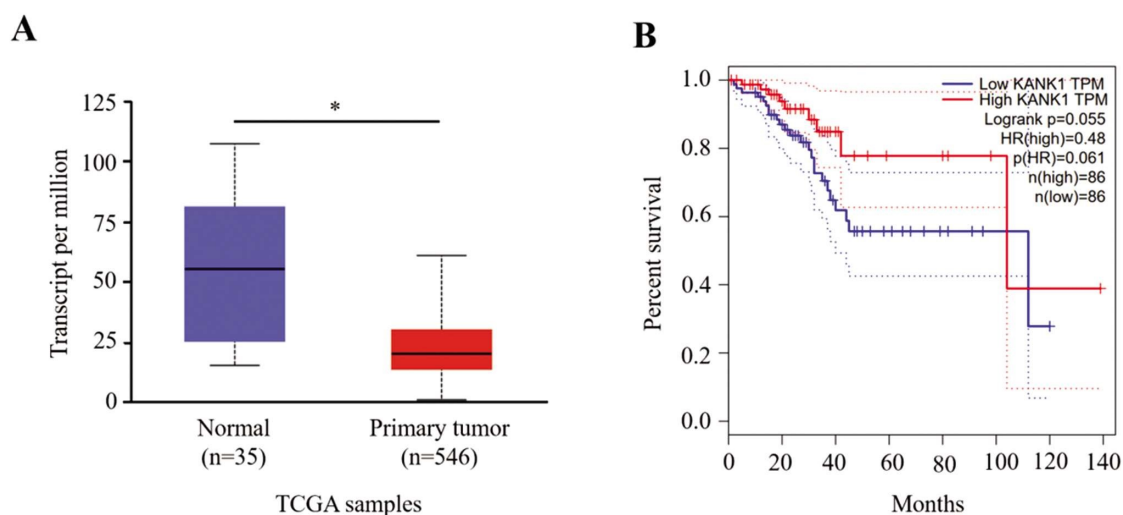


图1 子宫内膜癌中 KANK1 基因表达以及生存分析

Fig.1 KANK1 gene expression and survival analysis in endometrial cancer

Note: A. The gene expression of KANK1 in tumor ($n=546$) and normal ($n=35$) tissues of EC.

B. Overall survival of EC patients with high KANK1 expression ($n=86$) and low KANK1 expression ($n=86$).

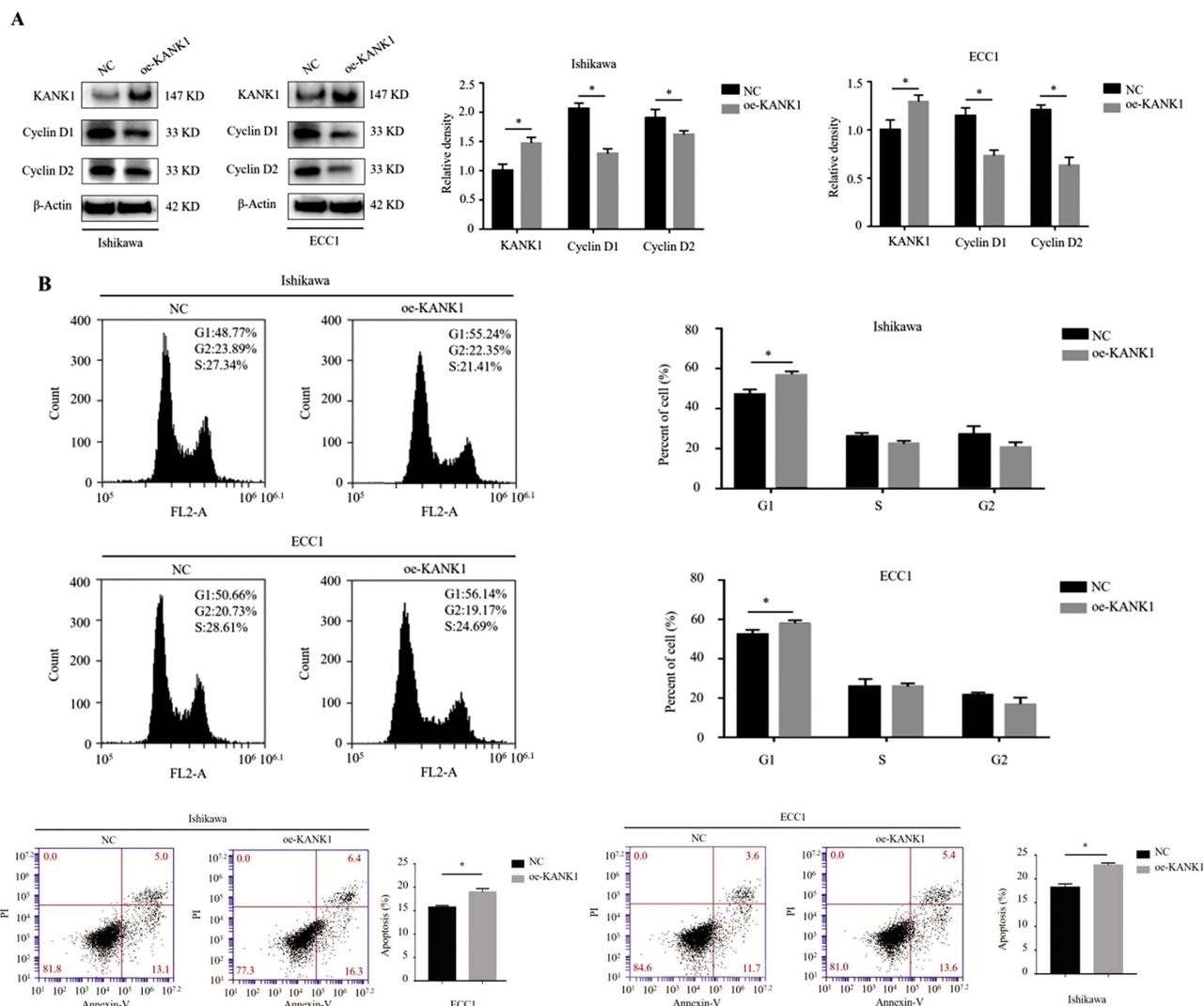


图2 KANK1 对子宫内膜癌细胞细胞周期和凋亡的影响

Fig.2 Effect of KANK1 on the cell cycle of endometrial cancer cells

Note: A. Western blot was used to detect expression of Cyclin D1 and Cyclin D2 in both control and oe-KANK1 group;

B-C. Cell cycle and cell apoptosis were detected by flow cytometry in both control and oe-KANK1 group.

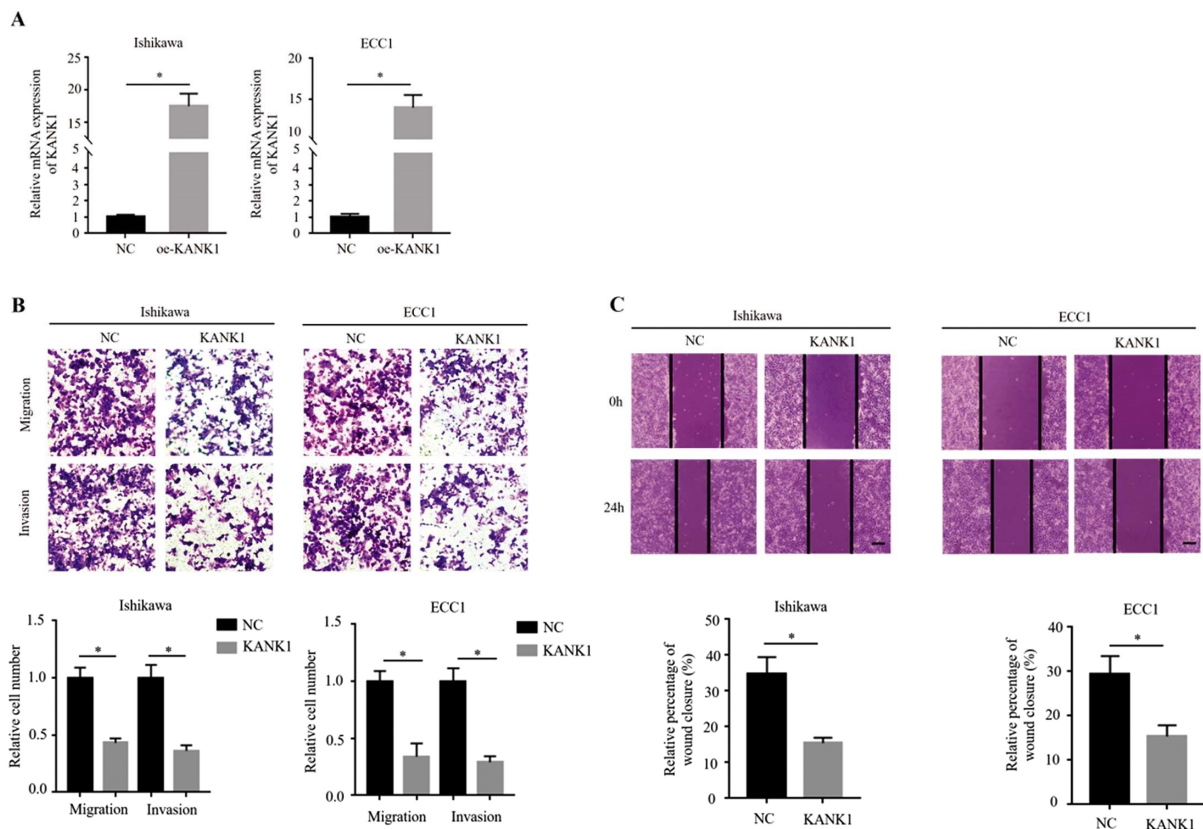


图3 KANK1 对 Ishikawa 和 ECC1 迁移和侵袭能力的影响

Fig.3 Effect of KANK1 on the ability of cell migration and invasion

Note: A. The mRNA levels of KANK1 were confirmed by qRT-PCR in EC cells after KANK1 overexpression; B. Transwell assays were performed to assess the migration and invasion ability; C. Cell migration ability of KANK1 was determined by wound healing assay.

袭, 首先将过表达 KANK1 的质粒瞬转入两个细胞株, qRT-PCR 结果显示, oe-KANK1 组中的 KANK1 表达量明显上调 ($P < 0.05$, 图 3A)。通过 Transwell 小室实验和划痕实验分别检测 KANK1 对迁移和侵袭能力的影响。Transwell 迁移和侵袭实验结果显示, 过表达 KANK1 的 Ishikawa 和 ECC1 细胞在实验终点穿出小室膜的细胞数量均低于对照组(图 3B)。过表达 KANK1 组的相对划痕面积高于对照组(图 3C)。因此, 过表达 KANK1 可显著抑制子宫内膜癌细胞迁移和侵袭的水平。

3 讨论

KANK1 是 KANK 家族成员之一, 也被称为 ANKRD15 或 KIAA0172^[10]。2002 年, KANK1 作为一种抑癌基因首次在肾细胞癌中被克隆出来^[11]。KANK1 在各种正常组织中广泛表达, 而在多种癌组织中低表达或不表达。研究表明 KANK1 在胰腺癌^[12]、肝癌^[13]、宫颈癌^[14]和膀胱癌^[15]中呈低表达水平。然而, KANK1 在子宫内膜癌中的作用尚无报道。我们通过检索 TC-GA 数据库发现, 子宫内膜癌中的 KANK1 水平显著低于正常子宫内膜组织(图 1A), 并且生存分析显示, 高表达 KANK1 患者的总体生存率高于低表达患者。这些数据表明 KANK1 在子宫内膜癌中可能发挥抑癌作用并且高表达 KANK1 的子宫内膜癌患者具有良好的预后。

KANK1 在肿瘤中的作用机制主要包括影响肿瘤细胞凋亡和细胞周期。文献报道了 KANK1 通过调节 Bcl-2/Bax 信号通路发挥促肿瘤细胞凋亡作用的分子机制, 从而促进肺癌细胞的

凋亡^[16]。此外, Bax 和 Bcl-2 上调 KANK1 可促进胶质瘤细胞中线粒体细胞色素 C 的释放, 从而激活半胱天冬酶 9 和半胱天冬酶 3, 最终诱导胶质瘤细胞中的线粒体凋亡^[17], 发挥抑癌作用。KANK1 还可以增强肿瘤对化疗的敏感性。有文献报道称过表达 KANK1 通过增强细胞凋亡, 使肿瘤细胞对顺铂治疗更敏感^[18,19], 提高化疗有效率。另外, KANK1 通过调控细胞周期抑制肿瘤生长。在肺癌中, KANK1 的表达上调使得细胞停滞在 G0/G1 期, 显著抑制了人肺癌细胞的增殖^[16]。据报道, KANK1 通过抑制 PI3K/Akt 信号传导, 从而抑制胃癌细胞的增殖^[20]。有研究报道, 敲低 KANK1 基因导致双核/多核细胞的产生, 进一步诱发肿瘤的产生^[21]。这与我们的研究结果相一致, 我们发现了 KANK1 在子宫内膜癌中促进了细胞凋亡并抑制细胞周期进展(图 2B-C), 从而发挥抑制子宫内膜癌增殖的作用。

KANK1 还可以通过影响肿瘤的侵袭和转移来调控肿瘤的发生发展。有文献报道称 KANK1 蛋白不仅位于细胞质中, 而且还充当核质穿梭分子, 负责将 β -catenin 重新定位到细胞核以激活 β -catenin 依赖性转录^[22]。此外, KANK1 通过 PI3K/Akt/14-3-3 和 Rac1 信号通路抑制了 RhoA 的激活, 从而抑制肌动蛋白聚合和细胞迁移^[23]。过表达 KANK1 还可以显著抑制胃癌细胞的上皮间充质转化、迁移和侵袭^[24]。在本次研究中, 我们通过 Transwell 小室实验和划痕实验证实了 KANK1 在子宫内膜癌中抑制肿瘤细胞侵袭和转移的能力(图 3B-C)。

综上所述, 本次研究中, 我们首次表明在子宫内膜癌细胞中, KANK1 发挥抑癌基因的作用。与正常子宫内膜相比,

KANK1 在子宫内膜癌组织中呈低表达水平。KANK1 通过下调细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 Cyclin D2 的表达, 将细胞周期阻滞在 G1 期。同时, KANK1 能增强子宫内膜癌细胞的凋亡水平, 因此, KANK1 能够抑制子宫内膜癌细胞的增殖。此外, 过表达 KANK1 可抑制子宫内膜癌细胞的迁移和侵袭水平。所以, KANK1 可能代表了一种新的子宫内膜癌的诊断标志物, 检测 KANK1 表达水平有助于子宫内膜癌患者的临床诊治, 进一步更深的机制研究有待于未来开展。

参考文献(References)

- [1] Amant F, Moerman P, Neven P, et al. Endometrial cancer [J]. *Lancet*, 2005, 366(9484): 491-505
- [2] Yang S, Thiel K W, Leslie K K. Progesterone: the ultimate endometrial tumor suppressor[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(4): 145-52
- [3] Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland L V, et al. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(2): 393-420
- [4] Gu B, Shang X, Yan M, et al. Variations in incidence and mortality rates of endometrial cancer at the global, regional, and national levels, 1990-2019[J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 161(2): 573-580
- [5] Catic A, Kurtovic-Kozaric A, Johnson S H, et al. A novel cytogenetic and molecular characterization of renal metanephric adenoma: Identification of partner genes involved in translocation t (9;15)(p24; q24)[J]. *Cancer Genet*, 2017, 214-215: 9-15
- [6] Luo F Y, Xiao S, Liu Z H, et al. Kank1 reexpression induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and promotes apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1658-65
- [7] Chen T, Wang K, Tong X. In vivo and in vitro inhibition of human gastric cancer progress by upregulating Kank1 gene [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1663-1669
- [8] Kakinuma N, Roy B C, Zhu Y, et al. Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling[J]. *J Cell Biol*, 2008, 181(3): 537-49
- [9] Cui Z, Shen Y, Chen K H, et al. KANK1 inhibits cell growth by inducing apoptosis through regulating CXXC5 in human malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40325
- [10] Zhu Y, Kakinuma N, Wang Y, et al. Kank proteins: a new family of ankyrin-repeat domain-containing proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(2): 128-33
- [11] Sarkar S, Roy B C, Hatano N, et al. A novel ankyrin repeat-containing gene (Kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36585-91
- [12] Heidenblad M, Schoenmakers E F, Jonson T, et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 3052-9
- [13] Shao J, Li Y, Li H, et al. Deletion of chromosomes 9p and 17 associated with abnormal expression of p53, p16/MTS1 and p15/MTS2 gene protein in hepatocellular carcinomas [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(9): 817-22
- [14] Zimonjic D B, Simpson S, Popescu N C, et al. Molecular cytogenetics of human papillomavirus-negative cervical carcinoma cell lines[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995, 82(1): 1-8
- [15] Simon R, Burger H, Semjonow A, et al. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(5): 1025-9
- [16] Gu Y, Zhang M. Upregulation of the Kank1 gene inhibits human lung cancer progression in vitro and in vivo [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1243-1250
- [17] Guo X, Fan W, Bian X, et al. Upregulation of the Kank1 gene-induced brain glioma apoptosis and blockade of the cell cycle in G0/G1 phase[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(3): 797-804
- [18] Wang J, Jia J, Zhou L. Long non-coding RNA CASC2 enhances cisplatin sensitivity in oral squamous cell cancer cells by the miR-31-5p/KANK1 axis[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(6): 1279-1292
- [19] Pu J, Shen J, Zhong Z, et al. KANK1 regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 639-647
- [20] Roy B C, Kakinuma N, Kiyama R. Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1 [J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(2): 253-67
- [21] Suzuki J I, Roy B C, Ogaeri T, et al. Depletion of tumor suppressor Kank1 induces centrosomal amplification via hyperactivation of RhoA[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 353(2): 79-87
- [22] Wang Y, Kakinuma N, Zhu Y, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of human Kank protein accompanies intracellular translocation of beta-catenin[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 19): 4002-10
- [23] Li C C, Kuo J C, Waterman C M, et al. Effects of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange (BIG) 1 and KANK1 proteins on cell polarity and directed migration during wound healing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19228-33
- [24] Chen X, Wang X, Yi L, et al. The KN Motif and Ankyrin Repeat Domains 1/CXXC Finger Protein 5 Axis Regulates Epithelial-Mesenchymal Transformation, Metastasis and Apoptosis of Gastric Cancer via Wnt Signaling[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 7343-7352