

RNAi 沉默 N-cadherin 通过 MEK-ERK 信号通路抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭、迁移及上皮-间质转化过程

陈虹 潘琦文 李建湘 蓝燕 潘彩萍

(河池市人民医院, 广西 河池 547000)

【摘要】 目的 探讨沉默神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)对卵巢癌细胞增殖、侵袭、迁移与上皮-间质转化的影响及分子机制。**方法** 收集 2021 年 3 月~2021 年 12 月我院卵巢癌患者手术切除的卵巢癌组织与邻近癌旁正常组织,采用免疫组织化学染色检测 N-cadherin 蛋白表达。通过 RNAi 技术沉默卵巢癌细胞 SKOV3 细胞中 N-cadherin 的表达后分为空白对照组、空载体组、siRNA-N-cadherin 组。CCK-8 法、细胞克隆形成实验、流式细胞术分别检测各组细胞增殖活性、克隆形成能力以及细胞周期分布,Transwell 实验和细胞划痕实验分别检测各组细胞侵袭与迁移能力,实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 N-cadherin、上皮性钙粘分子(E-cadherin)mRNA 表达,免疫细胞化学染色检测各组细胞中 N-cadherin、E-cadherin、基质金属蛋白酶 2(MMP2)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)蛋白表达,Western blot 检测各组细胞中 MEK、ERK 蛋白表达。**结果** 与癌旁正常组织比较,卵巢癌组织中 N-cadherin 呈高表达($P<0.05$)。与空白对照组和空载体组比较,沉默 N-cadherin 能够抑制 SKOV3 细胞增殖活性($P<0.05$),细胞克隆形成数目下降($P<0.01$),并使细胞发生 S 期阻滞($P<0.01$),细胞侵袭数目和迁移数目均减少($P<0.01$);此外,沉默 N-cadherin 后 SKOV3 细胞中 N-cadherin mRNA 相对表达量下降,E-cadherin mRNA 相对表达量升高($P<0.05$),细胞内 N-cadherin、MMP2 和 MMP9 蛋白阳性染色减弱,E-cadherin 蛋白阳性染色增强,细胞中 MEK、ERK 的蛋白表达水平均下降($P<0.05$)。**结论** 沉默 N-cadherin 可抑制卵巢癌细胞活性、细胞克隆形成、侵袭、迁移与上皮-间质转化的能力,使细胞阻滞于 S 期,其机制可能与阻碍 MEK、ERK 信号通路有关。

【关键词】 N-cadherin; 卵巢癌; 增殖; 侵袭; 迁移; 上皮-间质转化

【中图分类号】 R329.2⁺5;R737.31 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.009

RNAi silencing N-cadherin inhibits the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells through the MEK-ERK signaling pathway

CHEN Hong, PAN Qiwen, LI Jianxiang, LAN Yan, PAN Caiping

(Hechi People's Hospital, Hechi 547000, Guangxi, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of silencing neuronal cadherin (N-cadherin) on the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of N-cadherin protein in ovarian cancer tissues and adjacent normal tissues adjacent to the cancer. The expression of N-cadherin in SKOV3 cells was silenced by RNAi technology. CCK-8 method, cell clone formation experiment and flow cytometry respectively detected the proliferation activity, colony forming ability and cell cycle distribution of each group of cells. Transwell experiment and cell scratch experiment respectively detected the invasion and migration ability of each group of cells. The real-time fluorescent quantitative PCR detected the mRNA expression levels of N-cadherin and E-cadherin in each group of cells. The immunocytochemical staining detected the protein expression levels of N-cadherin, E-cadherin, matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in each group of cells. Western blot detected the protein expression levels of MEK and ERK in each group of cells. **Results** Compared with normal tissues adjacent to cancer, N-cadherin was highly expressed in

ovarian cancer tissues ($P < 0.05$). Compared with the blank control group and the empty vector group, after SKOV3 cells silenced the expression of N-cadherin, the proliferation activity of SKOV3 cells was inhibited ($P < 0.05$), the number of cell clone formation decreased ($P < 0.01$), and the cells developed S Phase block ($P < 0.01$), the number of cell invasion and migration were reduced ($P < 0.01$). In addition, the relative mRNA expression of N-cadherin and E-cadherin in SKOV3 cells decreased after silencing N-cadherin, while the relative mRNA expression of E-cadherin increased ($P < 0.05$), the positive staining of N-cadherin, MMP2 and MMP9 in the cells was weakened, the positive staining of E-cadherin increased, and the protein expression levels of MEK and ERK in the cells decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing N-cadherin can inhibit ovarian cancer cell activity, cell clone formation, invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition, and block cells in S phase, the mechanism may be related to blocking the MEK/ERK signaling pathway.

【Key words】 N-cadherin; Ovarian cancer; Proliferation; Invasion; Migration; Epithelial-mesenchymal transition

卵巢癌是女性最常见和最致命的恶性肿瘤之一^[1],在妇科恶性肿瘤中其发病率仅次于宫颈癌和子宫内膜癌,死亡率最高,通常确诊时已为晚期并伴随转移^[2-3]。据报道,卵巢癌患者的五年总体生存率约为 30%^[4]。卵巢癌的治疗方式主要以手术为主,辅以化疗的手段,而目前尚无卵巢癌的有效疗法,其发生和发展的分子机制尚未完全阐明。因此,从分子水平阐明影响卵巢癌发生、侵袭和转移等关键机制,将为确定卵巢癌治疗的新靶标以及对改善卵巢癌患者预后至关重要。

钙粘蛋白家族是一类细胞间粘附分子,主要分布在各种上皮组织中并介导异型细胞间的粘附^[5]。N-cadherin 是典型的钙粘着蛋白之一,在神经系统中广泛表达,而在其他正常细胞中则以低水平表达^[6]。然而,近年来研究发现,N-cadherin 在各种人类恶性肿瘤中异常表达,例如乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌等,其在癌细胞中的表达与肿瘤发生和转移密切相关^[7-9]。另外,已有研究指出 N-cadherin 在多种卵巢癌细胞系如 COLO316、ES2、SKOV3 和 WME-099 EBV 中均异常高表达,通过靶向抑制 N-cadherin 使其功能丧失能够改善循环肿瘤细胞进而阻碍癌细胞的转移过程^[10],推测 N-cadherin 对于判断卵巢癌的生物行为具有重要的参考价值。然而,目前关于 N-cadherin 对卵巢癌发生发展的影响及其与病理机制的关系尚未完全明确。因此,本研究主要探讨沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞生物学行为的影响,初步探究其作用机制,以期对卵巢癌的治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂 卵巢癌细胞系 SKOV3 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,病毒包装细胞株 PT67 购自上海索研生物科技有限公司。3% 牛血清白蛋白、0.25% 胰蛋白酶、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素及 RPMI1640 培养液购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine 3000 试剂购自美国 Invitrogen 公司, Trizol 试剂、Primescript RT reagent kit

with gDNA Eraser 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒购自日本 Takara 公司, CCK-8 试剂盒、Transwell 小室及免疫组织/细胞染色试剂购自上海碧云天生物研究所, RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒及增强型化学发光液 ECL 购自北京索莱宝科技有限公司, Matrigel 胶购自美国 BD 公司, 兔抗 N-cadherin、E-cadherin、MMP2、MMP9、MEK、ERK 及鼠抗 β -Actin 购自美国 SantaCruz Biotech 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 或山羊抗鼠 IgG 抗体购自美国 Abcam 公司。其他试剂均为国产分析纯或生物试剂。pEGFP-MSCVneo 质粒和 pMSCVneo/N-cadherin 质粒由上海生工生物科技有限公司构建。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色检测 N-cadherin 在卵巢癌组织中的表达 收集 2021 年 3 月~2021 年 12 月在我院进行手术切除的卵巢癌患者的卵巢癌组织和癌旁正常组织(距肿瘤组织 ≥ 1 cm, 病例术前均有明确的病理诊断,且无化疗、放疗及免疫治疗史),所有组织均在手术切取后立即置于 10% 福尔马林溶液中固定。固定好后常规石蜡包埋,连续切片成 5 μ m,经脱蜡处理后,采用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液修复抗原,3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min,加入抗 N-cadherin(1:100)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日 PBS 冲洗,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:1000)室温孵育 30 min, PBS 冲洗,经显色、复染、脱水与透明后,中性树胶封片,光学显微镜采集图像并分析。

1.2.2 细胞培养 卵巢癌细胞系 SKOV3 复苏后,用含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素与 0.1 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每 3 d 换液 1 次,并传代 1 次。

1.2.3 RNAi 沉默 N-cadherin 基因的表达 将病毒包装细胞株 PT67 接种至 6 孔培养板中,待其融合达 90%~95% 时,参照 Lipofectamine 3000 说明书用脂

质体法将 pEGFP-MSCVneo 质粒和 pMSCVneo/N-cadherin 质粒分别进行转染,收集病毒上清液。转染分为空白对照组、空载体组、siRNA-N-cadherin 组。将对数生长期的 SKOV3 细胞以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中过夜孵育,将收集的 pEGFP-MSCVneo 病毒和 pMSCVneo/N-cadherin 病毒的上清分别感染空载体组和 siRNA-N-cadherin 组的细胞,然后用 G418 培养基进行维持培养。空白对照组不作任何处理,以 RPMI 1640 培养基继续培养。

1.2.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖能力 将转染后处于对数生长期的 SKOV3 细胞使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,并按照 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱内继续培养,分别于 12、24、48、72 h 时每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,在细胞培养箱内继续孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度值。

1.2.5 细胞克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力 将转染后处于对数生长期的 SKOV3 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打呈单细胞悬浮状态,以 5×10^3 个接种到培养皿中,轻轻晃动使细胞分散均匀,随后置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养 14 d,出现细胞集落并用 PBS 洗涤,加 4% 多聚甲醛固定菌落,用 0.5% 结晶紫染色 15 min,流水冲洗,自然条件下干燥,在光镜下观察并计数细胞集落数目(将 ≥ 50 个细胞聚集作为 1 个细胞集落)。

1.2.6 流式细胞术检测各组细胞周期分布 将转染后处于对数生长期的 SKOV3 细胞用 PBS 洗涤,预冷的 75% 乙醇重悬细胞,并在 -20°C 下固定 24 h, PBS 再次洗涤并重悬细胞,每组取 $450 \mu\text{L}$ 细胞悬液,加 $2 \mu\text{L}$ RNase 后, 37°C 下孵育 10 min,接着加 $500 \mu\text{L}$ 碘化丙啶(PI),置于 37°C 下避光孵育 30 min,过 300 目筛网,采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.7 Transwell 实验检测各组细胞的侵袭能力 在 Transwell 小室的上室加 $50 \mu\text{L}$ 稀释的 Matrigel 胶,在 37°C 培养箱放置 40 min,将转染后的各组 SKOV3 细胞调整为 2×10^5 个/mL, Transwell 小室的上室每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液,下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养至细胞贴壁,换无血清培养液培养 12 h,放入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 12 h,取出小室,弃培养液并轻轻擦去上室的细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤后封片,光学显微镜观察拍照,统计侵袭细胞数目。

1.2.8 细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力 在 6 孔培养板背后均匀画出横线,位置为每隔 0.5 cm 一

道,每孔中加入转染 24 h 后的各组 SKOV3 细胞(每孔 5×10^5 个),第 2 天用移液枪枪头沿直尺垂直于细胞培养孔背后的横线划痕, PBS 清洗细胞 3 次,洗去划痕下的细胞,然后加无血清 RPMI 1640 培养基,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中继续培养,分别于 0、24 h 观察划痕愈合情况并拍照。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 N-cadherin、E-cadherin mRNA 表达 使用 Trizol 法提取各组 SKOV3 细胞总 RNA, NanoDrop2000 分光光度计测定提取的 RNA 浓度与纯度。根据 Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒说明进行操作将总 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR Premix Ex Taq II 检测 N-cadherin、E-cadherin mRNA 表达水平,以 GAPDH 为内参。反应程序设置: 95°C 预变性 3 min, 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 15 s, 72°C 延伸 45 s, 40 个循环。实验重复 3 次。qRT-PCR 引物均由广州锐博生物公司合成,具体序列: N-cadherin 上游引物 $5'$ -GTGCCATTAGCCAAGGGAAT- $3'$, 下游引物 $5'$ -GCGTTCCTGTTCCACTCATAG- $3'$; E-cadherin 上游引物 $5'$ -GCTGGACCGAGAGAGTTTCC- $3'$, 下游引物 $5'$ -CTGCATCTTGCCAGGTCCTT- $3'$; GAPDH 上游引物 $5'$ -GTGAAGGTCGGAGTCAACG- $3'$, 下游引物 $5'$ -TGGTGAAGACGCCAGTGGA- $3'$ 。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 N-cadherin、E-cadherin mRNA 的相对表达量。

1.2.10 免疫细胞化学染色检测各组细胞中 N-cadherin、E-cadherin、MMP2、MMP9 蛋白表达 用 0.25% 的胰蛋白酶消化各组 SKOV3 细胞,将其制备为单细胞悬液,调整细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{mL}$,取 0.5 mL 接种在 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 盖玻片上,贴壁后用 PBS 洗涤 3 次,在 4% 多聚甲醛固定 20 min, 3% 过氧化氢孵育后,加入 3% BSA 封闭 30 min,然后加入抗 N-cadherin(1:100)、E-cadherin(1:100)、MMP2(1:200)和 MMP9(1:200) 4°C 孵育过夜,次日 PBS 冲洗,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:1000)室温孵育 30 min, PBS 冲洗后 DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后中性树胶封片,光学显微镜采集图像并分析。

1.2.11 Western blot 检测各组细胞中 MEK、ERK 蛋白表达 分别收集各组 SKOV3 细胞,加入预冷的 RIPA 细胞裂解液充分裂解细胞, 4°C 条件下 $12000 \times g$ 离心 10 min 取上清液,采用 BCA 法对蛋白质进行定量。分别取 $20 \mu\text{g}$ 每组蛋白样品,采用 10% SDS-PAGE 电泳分离,将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜,加 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,分别加入兔抗 MEK(1:2000)、兔抗 ERK(1:3000)及内参鼠抗 β -Actin(1:3000), 4°C 下孵育过夜,次日 TBST 洗涤 3 次,每

次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 或山羊抗鼠 IgG(1:5000), 室温下孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 滴加增强型化学发光液 ECL, 在 Image Quant LAS 4000 mini 下拍照并进行蛋白质条带灰度值的分析。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间数据比较采用单向方差 one-way ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N-cadherin 在卵巢癌组织中的表达 N-cadherin 阳性定位于细胞质, 呈黄色或棕黄色颗粒, 其在癌组织中的阳性率较癌旁正常组织中明显升高(71.85% vs 12.46%, $P < 0.01$), 见图 1。

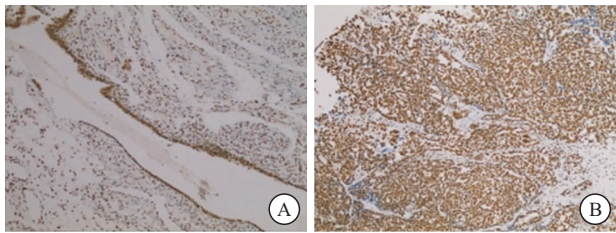


图 1 卵巢癌组织和癌旁正常组织中 N-cadherin 表达免疫组织化学染色(100×)

Figure 1 N-cadherin expression in ovarian cancer tissues and adjacent normal tissues by immunohistochemical staining

注: A. 癌旁正常组织; B. 卵巢癌组织

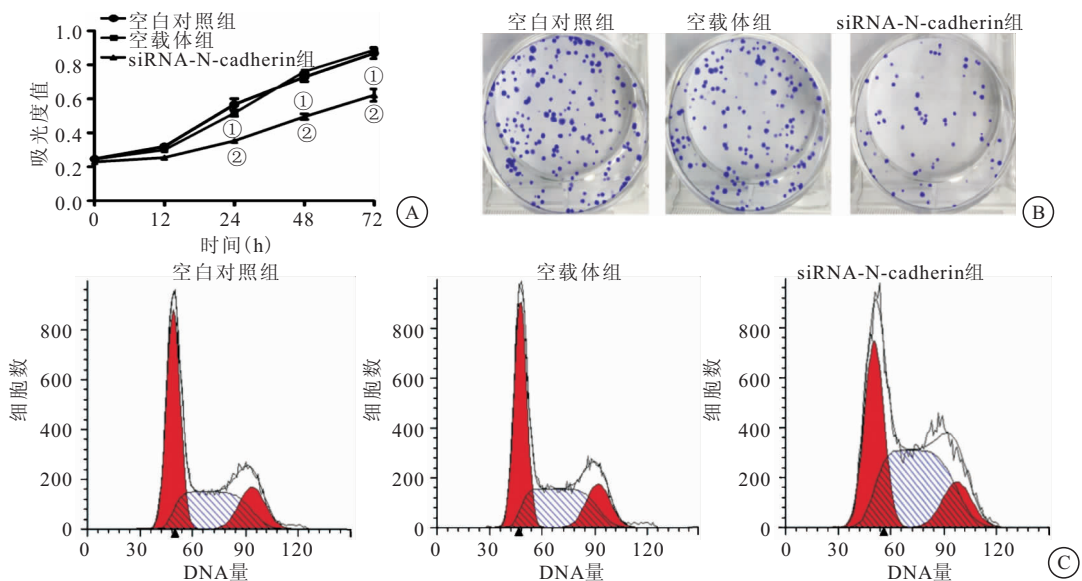


图 2 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞增殖的影响

Figure 2 The effect of silencing N-cadherin on the proliferation of ovarian cancer cells

注: A. CCK-8 法检测各组 SKOV3 细胞在转染不同时间点的增殖活力; B. 细胞克隆形成实验检测各组 SKOV3 细胞克隆形成能力; C. 流式细胞术各组 SKOV3 细胞周期分布情况。与空白对照组比较, ① $P < 0.05$; 与空载体组比较, ② $P < 0.05$

2.3 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞侵袭与迁移的影响 Transwell 实验结果显示, siRNA-N-cadherin 组

2.2 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示, 转染 24、48 和 72 h 后, siRNA-N-cadherin 组的 SKOV3 细胞活力分别为(0.32±0.02)、(0.46±0.05)和(0.57±0.05), 与空白对照组(0.53±0.05、0.73±0.13 和 0.85±0.24)和空载体组(0.51±0.07、0.74±0.11 和 0.85±0.30)比较显著下降(均 $P < 0.05$)(图 2A)。提示沉默 N-cadherin 表达可降低 SKOV3 细胞增殖活力。细胞克隆形成实验结果显示, siRNA-N-cadherin 组的 SKOV3 细胞克隆数目为(60.55±8.29)个, 与空白对照组和空载体组[分别为(146.67±14.57)个、(139.27±16.45)个]比较显著下降($P < 0.01$)(图 2B)。提示沉默 N-cadherin 表达可降低 SKOV3 细胞克隆形成能力。流式细胞术检测细胞分布情况, 结果显示, 空白对照组 SKOV3 细胞处于 G1 期、S 期、G2 期的细胞比例分别为(47.68±6.09)%、(35.29±5.76)%与(17.03±3.45)%, 空载体组 SKOV3 细胞处于 G1 期、S 期、G2 期的细胞比例分别为(45.11±8.18)%、(38.29±4.01)与(16.60±2.23)%, siRNA-N-cadherin 组 G1 期、S 期、G2 期的细胞比例分别为(34.01±3.89)%、(50.73±7.64)%与(15.26±2.03)%, siRNA-N-cadherin 组较空白对照组和空载体组 G1 期细胞比例显著下降而 S 期显著增加(均 $P < 0.01$)(图 2C)。提示沉默 N-cadherin 表达能够使 SKOV3 细胞发生 S 期阻滞。

SKOV3 细胞侵袭数目为(201.56±23.60)个, 较空白对照组和空载体组[分别为(522.78±52.58)个、

(514.49±48.26)个]显著下降(均 $P < 0.01$)(图 3A)。提示沉默 N-cadherin 表达可抑制 SKOV3 细胞的侵袭。细胞划痕实验结果显示,24 h 后 siRNA-N-cadherin 组 SKOV3 细胞迁移数目为(320.77±28.79)个,较空白对照组和空载体组[分别为(605.81±57.71)个、(611.50±59.43)个]显著下降(均 $P < 0.01$)(图 3B)。提示沉默 N-cadherin 表达可抑制 SKOV3 细胞的迁移。

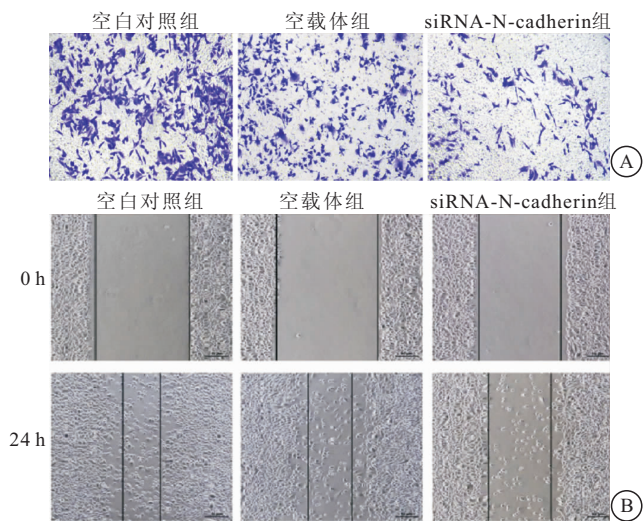


图 3 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞侵袭与迁移的影响

Figure 3 The effect of silencing N-cadherin on the invasion and migration of ovarian cancer cells

注:A. Transwell 检测各组 SKOV3 细胞侵袭;B. 细胞划痕实验检测各组 SKOV3 细胞迁移

2.4 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞上皮-间质转化的影响 qRT-PCR 检测结果显示,siRNA-N-cadherin 组 N-cadherin mRNA 与 E-cadherin mRNA 的相对表达量较空白对照组和空载体组 N-cadherin mRNA 相对表达量显著下降而 E-cadherin mRNA 相对表达量显著升高(均 $P < 0.05$),见表 1。免疫细胞化学染色结果显示,空白对照组和空载体组细胞中可见到 N-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白阳性染色较强,阳性信号定位于细胞质,而 siRNA-N-cadherin 组中 N-cadherin、MMP2 和 MMP9 蛋白的阳性染色较弱,与空白对照组和空载体组比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);而 siRNA-N-cadherin 组中 E-cadherin 蛋白的阳性染色较空白对照组和空载体组显著增强(均 $P < 0.05$),见图 4。提示沉默 N-cadherin 表达可抑制 SKOV3 细胞的上皮-间质转化。

表 1 各组 N-cadherin、E-cadherin mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The mRNA relative expression levels of N-Cadherin and e-cadherin in each group

组别	N-cadherin	E-cadherin
空白对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
空载体组	1.02±0.03	0.99±0.01
siRNA-N-cadherin 组	0.34±0.02	3.03±0.27

2.5 沉默 N-cadherin 对卵巢癌细胞 MEK、ERK 蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示,siRNA-N-cadherin 组 MEK、ERK 的蛋白表达量较空白对照组和空载体组显著下降(均 $P < 0.05$),见图 5、表 2。

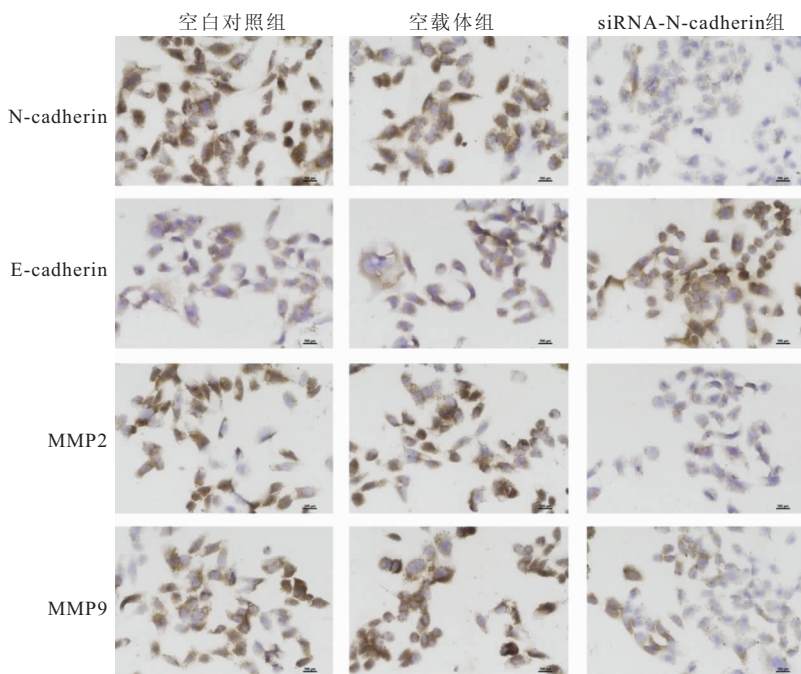


图 4 免疫细胞化学染色检测各组 SKOV3 细胞中 N-cadherin、E-cadherin、MMP2 和 MMP9 蛋白表达(100×)

Figure 4 Immunocytochemical staining to detect the protein expression of N-cadherin, E-cadherin, MMP2 and MMP9 in SKOV3 cells of each group

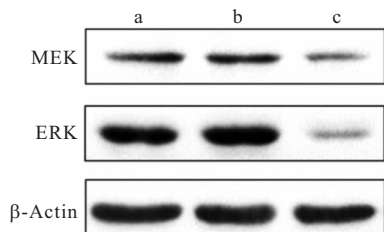


图 5 Western blot 检测各组 SKOV3 细胞中 MEK 与 ERK 的蛋白表达

Figure 5 Western blot detection of the protein expression of MEK and ERK in each group of SKOV3 cells

注: a. 空白对照组; b. 空载体组; c. siRNA-N-cadherin 组

表 2 各组 MEK、ERK 的蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Protein expression levels of MEK and ERK in each group

组别	MEK	ERK
空白对照组	0.46 ± 0.02	0.95 ± 0.05
空载体组	0.52 ± 0.03	1.02 ± 0.04
siRNA-N-cadherin 组	0.26 ± 0.01	0.17 ± 0.01

3 讨论

卵巢癌是全世界最常见的妇科恶性肿瘤,由于早期缺乏明显的临床症状和特定的肿瘤标志物,大多数患者被诊断时已处于晚期^[3,11]。目前,肿瘤标志物 CA125 的水平用于临床监测卵巢癌患者的预后,但其敏感性和特异性并不理想^[12-13]。因此,探究卵巢癌的发生原因并确定精准的标志物以进行早期诊断,对于患者的预后评估和靶向治疗至关重要。

卵巢癌的增殖与转移过程涉及到多个过程包括癌基因的激活和抑癌基因的失活^[14-15]。肿瘤的基因治疗较常规药物治疗具有特异性,目前,靶向基因治疗在卵巢癌的诊治中也备受瞩目。越来越多的证据表明,N-cadherin 是上皮-间质转化的间充质标志物,其在许多肿瘤中呈阳性表达,其表达升高与肿瘤的侵袭与转移密切相关^[16-18]。Abufaraj 等^[19]评估了 N-cadherin 作为 433 例根治性膀胱切除术和双侧淋巴结清扫术的浸润性膀胱癌患者的预后生物标志物的作用,研究发现,浸润性膀胱癌患者中 N-cadherin 的阳性表达率约为 40%。Kamikihara 等^[20]通过免疫组织化学抗生物素蛋白-生物素复合物法评估了 146 例术后胃癌患者肿瘤组织中 N-cadherin 的表达,发现 N-cadherin 的阳性表达与肿瘤的临床分期和恶性程度密切相关,实体瘤中 N-cadherin 表达明显上调。而关于 N-cadherin 在卵巢癌中的研究也已有报道,Po 等^[10]经检测卵巢癌细胞系中 N-cadherin 表达发现,其在多种癌细胞内呈现高表达,并影响循环肿瘤细胞捕获;于舒鸿等^[21]研究指出在进展期卵巢癌、高级别浆液性癌及高级别卵巢癌中 N-cadherin 高表达,这与患者 FIGO 分期、组织学类型、肿瘤分级均显著相关。在本

研究中,我们同样发现 N-cadherin 在卵巢癌组织中阳性表达明显升高。

为了进一步研究 N-cadherin 在卵巢癌中的作用,我们通过 RNAi 沉默卵巢癌 SKOV3 细胞中 N-cadherin 表达,观察卵巢癌细胞生物学行为变化。qRT-PCR 检测和免疫细胞化学染色结果均表明该干扰质粒能够有效抑制 N-cadherin 表达。在 SKOV3 细胞中沉默 N-cadherin 表达后,细胞增殖活力明显下降,细胞集落形成数目减少,并使细胞发生 S 期阻滞,抑制细胞的迁移和侵袭能力。上皮-间质转化被认为是肿瘤细胞从非活动性上皮表型转变为迁移性间充质表型的过程,其共同特征是 E-cadherin 表达的丧失,同时伴有 N-cadherin 表达的上调^[22]。MMP2 和 MMP9 是基质金属蛋白酶家族的主要成员,可通过降解细胞外基质,血管基底膜和 N-cadherin-catenin 复合物来促进肿瘤细胞的侵袭、粘附以及转移。有研究表明,N-cadherin 通过增加一些 MMPs 的表达来促进肿瘤转移^[23-24]。本研究联合运用 qRT-PCR 和免疫组织化学法比较了 3 组细胞中 E-cadherin 的表达情况,结果显示,沉默 N-cadherin 表达后 E-cadherin 的表达增加,MMP2 和 MMP9 蛋白表达明显下降,说明上皮-间质转化过程受到抑制。

丝裂原激活蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路是多种细胞因子调控细胞生物学行为的主要途径,ERK 被上游分子 MEK 的磷酸化激活后,可将信号从细胞膜传递至细胞核中,从而调节细胞的生命周期^[25]。目前,研究表明 MEK/ERK 信号通路异常与多种肿瘤的发生、转移及恶化密切相关,该信号级联对肿瘤细胞间和肿瘤细胞内通讯至关重要,能够调节肿瘤细胞功能,如生长、存活和分化等,因此,该途径可作为干预和治疗包括卵巢癌在内的多种恶性肿瘤的潜在靶点^[26]。本研究检测结果显示,在沉默 N-cadherin 表达的卵巢癌细胞中 MEK 与 ERK 的蛋白表达水平均明显下降,推测沉默 N-cadherin 可能抑制了 MEK/ERK 信号通路异常激活从而发挥了抑制卵巢癌生长与转移的作用。本研究进一步明确了 N-cadherin 在卵巢癌细胞恶性生物学行为的作用,为靶向 N-cadherin 治疗卵巢癌提供了新的科学资料。但本研究仅通过体外细胞实验研究了相关作用,而关于在体内沉默 N-cadherin 是否同样发挥积极作用及具体机制有待后续进行实验探究。

4 结论

本研究表明 N-cadherin 在卵巢癌组织中高表达,沉默卵巢癌细胞中 N-cadherin 表达可抑制细胞增殖、侵袭、迁移及上皮-间质转化,其机制可能与抑制

MEK/ERK 信号通路的异常激活有关。

【参考文献】

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 66(1):7-30.
- [2] 徐西岳,朱新群,刘小静. 妇科恶性肿瘤患者 TC 方案化疗后发生重度骨髓抑制的影响因素[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(5):657-660.
- [3] WEBB P M, JORDAN S J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 41:3-14.
- [4] LONGO DAN L. Personalized Medicine for Primary Treatment of Serous Ovarian Cancer [J]. The New Engl J Med, 2019, 381(25): 2471-2474.
- [5] DRIVALOS A, CHRISOFOU M, EFSTATHIOU E, *et al.* Expression of alpha5-integrin, a7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer [J]. Urol Oncol, 2016, 34(4): 165. e11-e18.
- [6] HUI L, ZHANG S, DONG X, *et al.* Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62171.
- [7] ABUFARAJ M, SHARIAT SF, HAITEL A, *et al.* Prognostic role of N-cadherin expression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Urol Oncol Semin Original, 2017, 35(5):264-271.
- [8] REVOLLO L, KADING J, JEONG S Y, *et al.* N-cadherin Restrains PTH Activation of Lrp6/ β -catenin Signaling and Osteoanabolic Action [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(11): 2163-2165.
- [9] DI DOMENICO M, PIERANTONI G M, FEOLA A, *et al.* Prognostic significance of N-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2011, 31:4211-4218.
- [10] PO J W, ROOHULLAH A, LYNCH D, *et al.* Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin[J]. J Circ Biomark, 2018, 7:1849454418782617.
- [11] 张靖,杨茹,白惠娟. 干扰 MDM4 基因对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(6):859-863.
- [12] KOZAR N, KRUUSMAA K, BITENC M, *et al.* Metabolomic profiling suggests long chain ceramides and sphingomyelins as a possible diagnostic biomarker of epithelial ovarian cancer [J]. Clin Chim Acta, 2018, 481:108-114.
- [13] 陈胜民,王国平,林志仁,等. 卵巢癌的二元论及其相关蛋白表达差异[J]. 西部医学, 2020, 32(11):1599-1603.
- [14] THOMSEN C B, ANDERSEN R F, STEFFENSEN K D, *et al.* Delta tocotrienol in recurrent ovarian cancer. A phase II trial [J]. Pharmacol Res, 2019, 141:392-396.
- [15] 郑汉朋,周海生,邱乾德. 卵泡膜细胞瘤 MRI 表现与病理特征 [J]. 医学影像学杂志, 2019, 29(9):1517-1520.
- [16] KLYMENKO Y, KIM O, LOUGHRAN E, *et al.* Cadherin-composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis[J]. Oncogene, 2017, 36(42):5840-5851.
- [17] TANAKA H, KONO E, TRAN C P, *et al.* Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance [J]. Nat Med, 2010, 16(12):1414-1420.
- [18] WALKER A, FREI R, LAWSON K. The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP-9 induction in oral squamous carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4):1699-1706.
- [19] ABUFARAJ M, SHARIAT S F, HAITEL A, *et al.* Prognostic role of N-cadherin expression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Urol Oncol Semin Original, 2017, 35(5): 264-271.
- [20] KAMIKIHARA T, ISHIGAMI S, ARIGAMI T, *et al.* Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer [J]. Pathol Int, 2012, 62:161-166.
- [21] 于舒鸿,杨桐,冯茜,等. N-cadherin 在卵巢癌中的表达及其临床病理意义[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(22):4361-4364.
- [22] CONANT K, DANIELE S, BOZZELLI P L, *et al.* Matrix metalloproteinase activity stimulates N-cadherin shedding and the soluble N-cadherin ectodomain promotes classical microglial activation [J]. J Neuroinflamm, 2017, 14(1):56.
- [23] HSU C C, HUANG S F, WANG J S, *et al.* Interplay of N-Cadherin and matrix metalloproteinase 9 enhances human nasopharyngeal carcinoma cell invasion [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):800.
- [24] MUSUMECI G, MAGRO G, CARDILE V, *et al.* Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9, ADAM-10 and N-cadherin expression in human glioblastoma multiforme [J]. 2015, 362(1):45-60.
- [25] GUO C X, LI Z Y, NIU J B, *et al.* Qishen capsule safely boosts cardiac function and angiogenesis via the MEK/ERK pathway in a rat myocardial infarction model [J]. J Geriatr Cardiol, 2019, 16(10):764-774.
- [26] DEGIRMENCI U, WANG M, HU J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy [J]. Cells, 2020, 9(1):198.

(收稿日期:2021-08-22;修回日期:2022-06-09;编辑:黎仕娟)