DOI:10.16016/j.2097-0927.202204176

CRIP1 参与子宫内膜癌细胞增殖、侵袭、迁移及 EMT 的作用

淳彩璞[1],崔晓宾[2],胡建明[2],贾 薇[2],吕新玲[3],李美峰[1],吴小双[1] 843000 新疆 阿克苏,新疆石河子大学医学院第四附属医院病理科[1];832000 新疆 石河子,新疆石河子大学医学院第一附属医院病理科[2];833200 新疆 奎屯,新疆伊犁州奎屯医院病理科[3]

[摘要] **目的** 探究半胱氨酸丰富蛋白 1(cysteine rich protein 1,CRIP1)通过与磷酸甘油酸激酶 1(phosphoglycerate kinase 1,PGK1)结合对子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)细胞体外增殖及转移的调控作用。**方法** 收集新疆石河子大学医学院第四附属医院(新疆生产建设兵团第一师医院)2019 年 2 月至 2020 年 12 月收治的 20 例 EC 患者的组织及癌旁组织标本,GEO2R 在线分析 CRIP1 在 EC 组织中的表达,RT-qPCR、Western blot 检测 CRIP1 及 PGK1 在 EC 细胞和组织中的表达。将 EC 细胞 Ishikawa 分为空白对照组、干扰对照组、CRIP1 干扰组-1、CRIP1 干扰组-2、CRIP1 干扰组+过表达对照组、CRIP1 干扰组+PGK1 过表达组。CCK-8 和 EdU 法分析细胞活性;划痕、transwell 实验、Western blot 和免疫荧光(immunofluorescence,IF)评估细胞转移;Biogrid 数据库和免疫共沉淀(Co-IP)实验分别预测并验证 CRIP1 与 PGK1 两者关系。**结果** 肿瘤组织和肿瘤细胞中的 CRIP1 表达水平较正常组织和细胞增加($P<0.05$)。CRIP1 敲低可明显削弱 EC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 能力($P<0.05$)。EC 细胞中的 PGK1 表达水平较正常细胞增加($P<0.05$)。CRIP1 与 PGK1 结合且干扰 CRIP1 可抑制 PGK1 表达($P<0.05$)。在 CRIP1 敲低的细胞中过表达 PGK1 可部分恢复 EC 细胞的恶性行为表型($P<0.05$)。**结论** 敲低 CRIP1 可显著减弱 EC 增殖、迁移、侵袭和 EMT 能力,其机制可能与结合 PGK1 有关。

[关键词] CRIP1;PGK1;子宫内膜癌;侵袭;EMT

[中图法分类号] R341; R73-37; R737.33 [文献标志码] A

Roles of cysteine rich protein 1 in proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of endometrial cancer cells

CHUN Caipu[1], CUI Xiaobin[2], HU Jianming[2], JIA Wei[2], LYU Xinling[3], LI Meifeng[1], WU Xiaoshuang[1]

[1]Department of Pathology, Fourth Hospital Affiliated to Medical College of Shihezi University, Aksu, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 843000; [2]Department of Pathology, First Hospital Affiliated to Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 832000; [3]Department of Pathology, Kuitun Hospital of Ili Prefecture, Kuitun, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 833200, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the regulatory roles of cysteine rich protein 1 (CRIP1) in the proliferation and metastasis of endometrial cancer (EC) cells *in vitro* through binding to phosphoglycerate kinase 1 (PGK1). **Methods** The EC tissue samples and adjacent normal tissues were collected from 20 patients admitted in the Fourth Hospital Affiliated to Medical College of Shihezi University (First Division Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps) between February 2019 and December 2020. NCBI online database was used to analyze CRIP1 expression in EC tissues. RT-qPCR and Western blotting were also performed to test the levels of CRIP1 and PGK1 in EC cells and tissues. Subsequently, EC Ishikawa cells were divided into control group, CRIP1 interference (shRNA-CRIP1-1 and shRNA-CRIP1-2) groups and

[通信作者] 淳彩璞,E-mail: Ccaipu09@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

control (shRNA-NC) group, CRIP1 interference+PGK1 overexpression (shRNA-CRIP1+Ov-PGK1) group and its control (shRNA-CRIP1+Ov-NC) group. Cell viability was detected by CCK-8 assay and EdU assay. Wound healing, transwell assay, Western blotting and immunofluorescence (IF) assay were conducted to detect the proliferation and metastasis of cells. The relationship between CRIP1 and PGK1 was predicted with Biogrid platform and then verified by co-immunoprecipitation (IP) assay. **Results** The expression level of CRIP1 was increased in the EC tissues and cells than the normal tissues and cells ($P<0.05$). CRIP1 knockdown distinctly hindered the proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of EC cells ($P<0.05$). PGK1 expression was also enhanced in EC cells as compared with normal cells ($P<0.05$), while CRIP1 binding to PGK1 as well as CRIP1 knockdown notably inhibited the expression of PGK1 ($P<0.05$). However, overexpression of PGK1 in CRIP1 knockdown cells partially restored the malignant phenotypes of EC cells ($P<0.05$). **Conclusion** CRIP1 deficiency significantly attenuates the proliferation, migration, invasion and EMT of EC cells, and its mechanism may be associated with its binding to PGK1.

[**Key words**] cysteine rich protein 1; phosphoglycerate kinase 1; endometrial cancer; invasion; epithelial-mesenchymal transition

Corresponding author: CHUN Caipu, E-mail: Ccaipu09@163.com

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)为多见于女性生殖系统的恶性肿瘤,处于绝经期前后的女性属于其高危人群[1]。据报道,2008-2018 年 EC 死亡率每年上升约 1.4%[2]。常见的致病因素包括肥胖、雌激素过多、高血压和糖尿病等[3]。目前,临床常用的主要治疗方法仍是手术[4]。尽管针对晚期 EC 患者的治疗已取得了重大突破和进步,但肿瘤的侵袭性和转移性仍易导致肿瘤复发,严重影响患者预后[5-6]。因此,探究 EC 细胞增殖和转移相关的分子基础及调控机制可为 EC 治疗提供重要的理论依据。

半胱氨酸丰富蛋白 1(cysteine rich protein 1, CRIP1)属于 LIM/双锌指蛋白家族,拥有独特的双锌指结构,并由此发挥其在多种疾病中的重要作用[7]。最早发现 CRIP1 主要在肠道中分布,除肠道外,CRIP1 同样广泛存在于结肠、肺、脾、胸腺和脑等其他器官中[8-9]。深入研究揭示,CRIP1 在锌离子吸收转运、维持管腔结构、炎症免疫应答方面发挥重要作用[10]。近年来,CRIP1 在几种癌症中的异常表达引起了越来越多的关注。研究发现,CRIP1 在多种恶性肿瘤中充当促癌基因,如卵巢癌[11]、宫颈癌[12]、甲状腺癌[13]、乳腺癌[14]、肝细胞癌[15]、结直肠癌[16]等。这些结果表明 CRIP1 可能是恶性肿瘤的潜在治疗靶点,尤其是癌症的侵袭和转移。现有研究表明,EC 组织中呈现出较高的 CRIP1 表达,且与患者的不良预后有紧密关联[17]。因此,我们猜测 CRIP1 的异常表达可能与 EC 进展有关并予以探讨。

糖酵解是指葡萄糖和糖原分解为丙酮酸并同时生成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的过程[18]。2020 年 NIE 等[19]研究发现,糖酵解激酶磷酸甘油酸激酶 1(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)通过直接或间接增强糖酵解活性从而推动癌细胞生长。研究表明,EC 组织中呈现出较高的 PGK1 表达,且与不良预后及肿瘤的生长浸润行为紧密相关[20-21]。但 PGK1 在 EC 中的具体作用尚不清楚。因此,本研究重点探讨 CRIP1 对 EC 细胞恶性行为表型的具体影响并阐明 CRIP1 与 PGK1 两者间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 临床样本

收集 2019 年 2 月至 2020 年 12 月于新疆石河子大学医学院第四附属医院(新疆生产建设兵团第一师医院)行手术治疗的 20 例 EC 患者的肿瘤组织标本作为肿瘤组,年龄 30~65(50.95±6.98)岁,所有患者手术前未进行放疗或化疗。肿瘤的分期根据国际妇产科联合会(FIGO)分期系统标准确定。另外选取距离肿瘤>5 cm 的癌旁组织标本作为正常组。患者及家属均签署知情同意书,本研究经新疆生产建设兵团第一师医院伦理委员会批准(2022 年 5 月)。

1.2 材料

人子宫内膜基质细胞系 SHT290 购自北京科瑞思搏生物科技有限公司;人 EC 细胞 Ishikawa 购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司;KLE、RL95-2、HEC-1-A 子宫内膜癌细胞均由美国菌种保藏中心(ATCC)提供;RPMI-1640、DMEM、EMEM 和 McCoy's 5A 培养基均

购自美国 GIBCO 公司;FBS 胎牛血清和 Trizol 提取试剂购自美国生命技术公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自日本 Takara 公司;shRNA-CRIP1-1/2 重组慢病毒和阴性对照 shRNA-NC 慢病毒由天根生化科技(北京)有限公司构建;Ov-PGK1 和 Ov-NC 质粒由上海吉玛公司提供; QuantiTect 逆转录试剂盒由德国凯杰生物公司提供;SYBR® Green PCR master mix 试剂盒和 BCA 试剂盒购自美国伯乐公司;实时荧光定量 PCR 系统购自美国 MJ Research 公司;CCK-8 试剂购自北京全式金生物技术有限公司;EdU 和 Protein A Agrose 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;基质胶和 transwell 小室购自美国 BD 公司;多聚甲醛、结晶紫和 RIPA 裂解液由美国 Sigma 公司提供;兔源 CRIP1、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、E-钙粘素(E-cadherin)、N-钙粘素(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、Snai、Slug、PGK1 抗体和山羊抗兔 IgG-FITC 均购自美国 Abcam;ECL 发光试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Image J 软件购自美国国立卫生研究院;荧光显微镜购自德国欧蒙医学诊断有限公司;倒置显微镜购自奥林巴斯;激光共聚焦显微镜购自德国徕卡公司;SPSS 22.0 软件购自美国 IBM 公司。

1.3 *方法*

1.3.1 生物信息学分析 利用 NCBI 在线数据库,选择 GSE63678 数据集(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi? acc=GSE63678)分析 CRIP1 在 7 例 EC 肿瘤组织和 5 例正常组织中的表达;利用 Biogrid(https://thebiogrid.org/)预测 CRIP1 和 PGK1 两者间的结合关系。

1.3.2 细胞培养 人子宫内膜基质细胞系 SHT290 常规培养于 RPMI 1640 培养基中;人 EC 细胞 KLE,RL95-2 均用 DMEM 培养基进行培养;Ishikawa 细胞用 EMEM 培养基进行培养;而 HEC-1-A 细胞常规培养于 McCoy's 5A Medium 培养基中。所有培养基含有 10% FBS,放置在 37℃、5%CO_2 的孵育箱中。

1.3.3 细胞转染 细胞于 6 孔板中(5×10^4/孔)接种培养,当细胞达到 60%~70%融合度时,严格按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明将 shRNA-CRIP1-1/2、shRNA-NC、Ov-PGK1 和 Ov-NC 瞬时转染至各组细胞中,48 h 后转染完成。

1.3.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 CRIP1 和 PGK1 在子宫内膜癌细胞内表达 首先,加入 Trizol 试剂对 RNA 进行分离,并按照 QuantiTect 逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。以 cDNA 为模板,加入 SYBR® Green PCR master mix 试剂盒和 7500 实时荧光定量 PCR 系统进行 PCR 扩增反应。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞活性 质粒转染后,细胞种植于 96 孔板中进行培养(5×10^3/孔),分别于 24、48、72 h 后,添加体积分数为 10%的 CCK-8 试剂,酶标仪于 2 h 后在 490 nm 处检测光密度值[D(490)],绘制增殖曲线。

1.3.6 EdU 染色检测细胞增殖 细胞转染处理同 1.3.5,每孔加入 20 μmol/L EdU 37℃下孵育 2 h。随后,使用 4%多聚甲醛和 0.5% Triton X-100 分别对细胞进行固定和透化处理。经 DAPI 染色后,于荧光显微镜下检测 EdU 阳性细胞。

1.3.7 划痕实验检测细胞迁移 在 6 孔板中加入处于生长对数期的 Ishikawa 细胞,细胞达到 90%融合度时,使用 200 μL 无菌枪头划一条线,PBS 洗涤 3 次后加入无血清培养基。在倒置显微镜下测量 0、48 h 的伤口宽度,计算细胞迁移数。

1.3.8 Transwell 实验检测细胞侵袭 将转染后的 Ishikawa 细胞接种于含有基质胶的 transwell 上室内,transwell 下室加入 500 μL 含 10% FBS 的 EMEM 培养基。24 h 后,表层细胞被棉签擦去,细胞经多聚甲醛和结晶紫分别固定和染色处理后,于显微镜下对细胞进行计数。

1.3.9 免疫印迹法(Western blot)检测 采用 BCA 试剂盒对 RIPA 裂解液提取的蛋白浓度进行检测。将行 10% SDS-PAGE 电泳的等量蛋白质转移至 PVDF 膜并在 5%脱脂牛奶中进行室温封闭,加入一抗和 HPR 标记的羊抗兔二抗,分别于 4 ℃和室温下孵育。加入 ECL 发光试剂盒对蛋白条带进行显影,利用 Image J 软件记录灰度值。

1.3.10 免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测 Vimentin 表达 用 4%多聚甲醛和 0.2% TritonX-100 分别对转染后的 Ishikawa 细胞进行固定和透化处理,并用 2% BSA 进行封闭,4 ℃下与稀释的兔源 Vimentin 抗体孵育过夜,并在 37 ℃下与山羊抗兔 IgG-FITC 孵育 1 h,50%甘油封片,最后利用激光共聚焦显微镜拍照和荧光定量分析。

1.3.11 免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP) 常规收集并裂解细胞后,加入 2 μg 兔抗 CRIP1 和 PGK1 单克隆抗体,4 ℃下孵育过夜,加入 Protein A Agrose,继续混合过夜,离心后收集沉淀物,经 SDS-PAGE 分离后,Western blot 对免疫沉淀物进行分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 时,差异具有统计学意义。

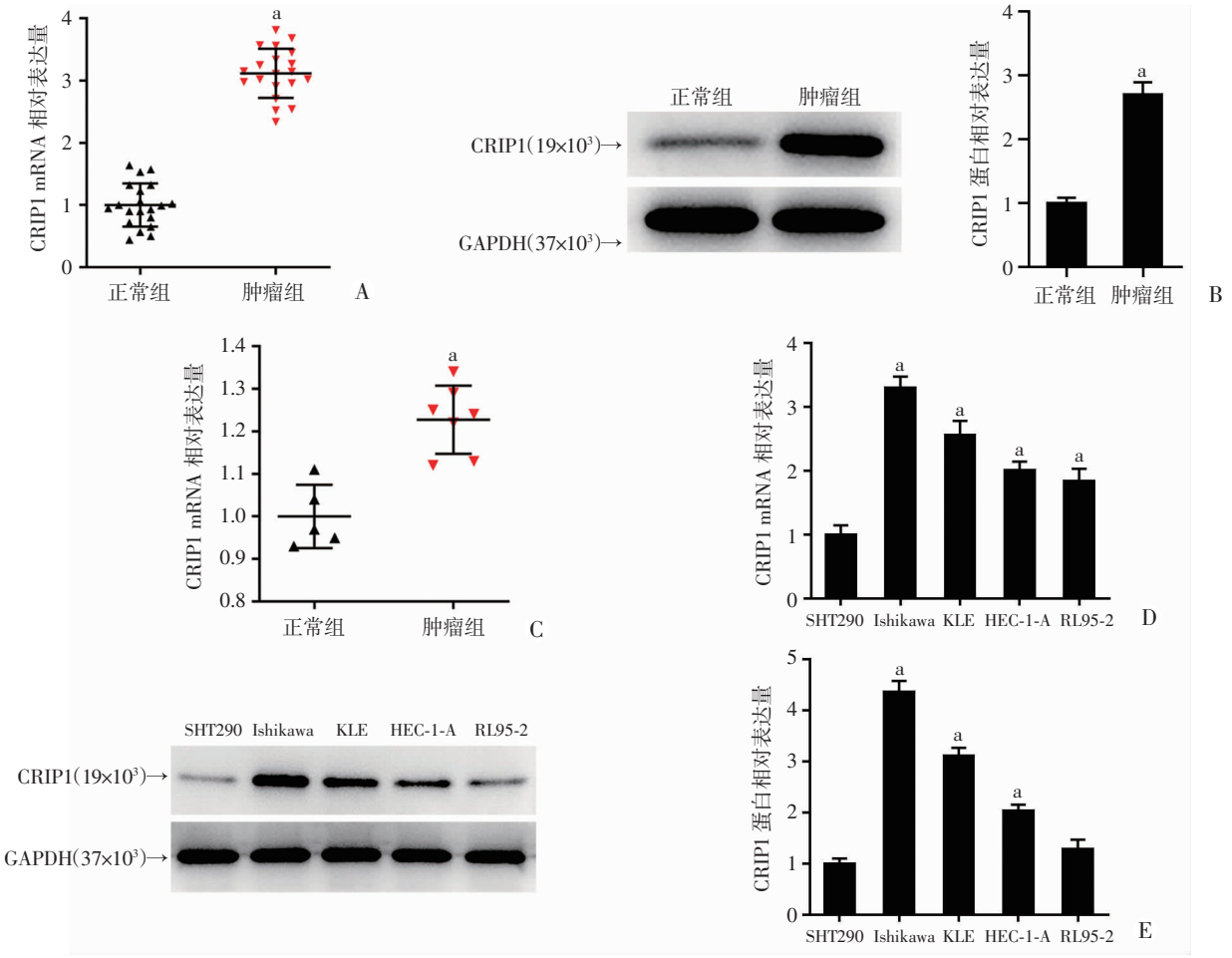
2 结果

2.1 CRIP1 在 EC 肿瘤组织和细胞中表达上调

RT-qPCR 和 Western blot 印迹结果表明,CRIP1 的表达在 EC 肿瘤组织中的表达较癌旁组织增加($P<0.01$,图 1A、B)。同样,生物信息学 NCBI 数据库(GSE63678 芯片)分析数据显示,与正常组织相较,EC 肿瘤组织中表现出较高的 CRIP1 表达($P<0.01$,图 1C)。此外,与人子宫内膜基质细胞系 SHT-290 相比,CRIP1 在人 EC 细胞(Ishikawa、KLE、RL95-2 和 HEC-1-A)中的表达水平明显增加,且 CRIP1 在 Ishikawa 细胞中呈现最高表达水平($P<0.01$),同时 CRIP1 在 RL95-2 细胞中的蛋白水平较 SHT-290 细胞相比无显著性差异($P>0.05$,图 1D、E),提示 CRIP1 在 EC 组织和细胞中广泛表达。因此,选择 CRIP1 相对表达量最高的 Ishikawa 细胞进行后续实验。

2.2 敲低 CRIP1 对 EC 细胞增殖的影响

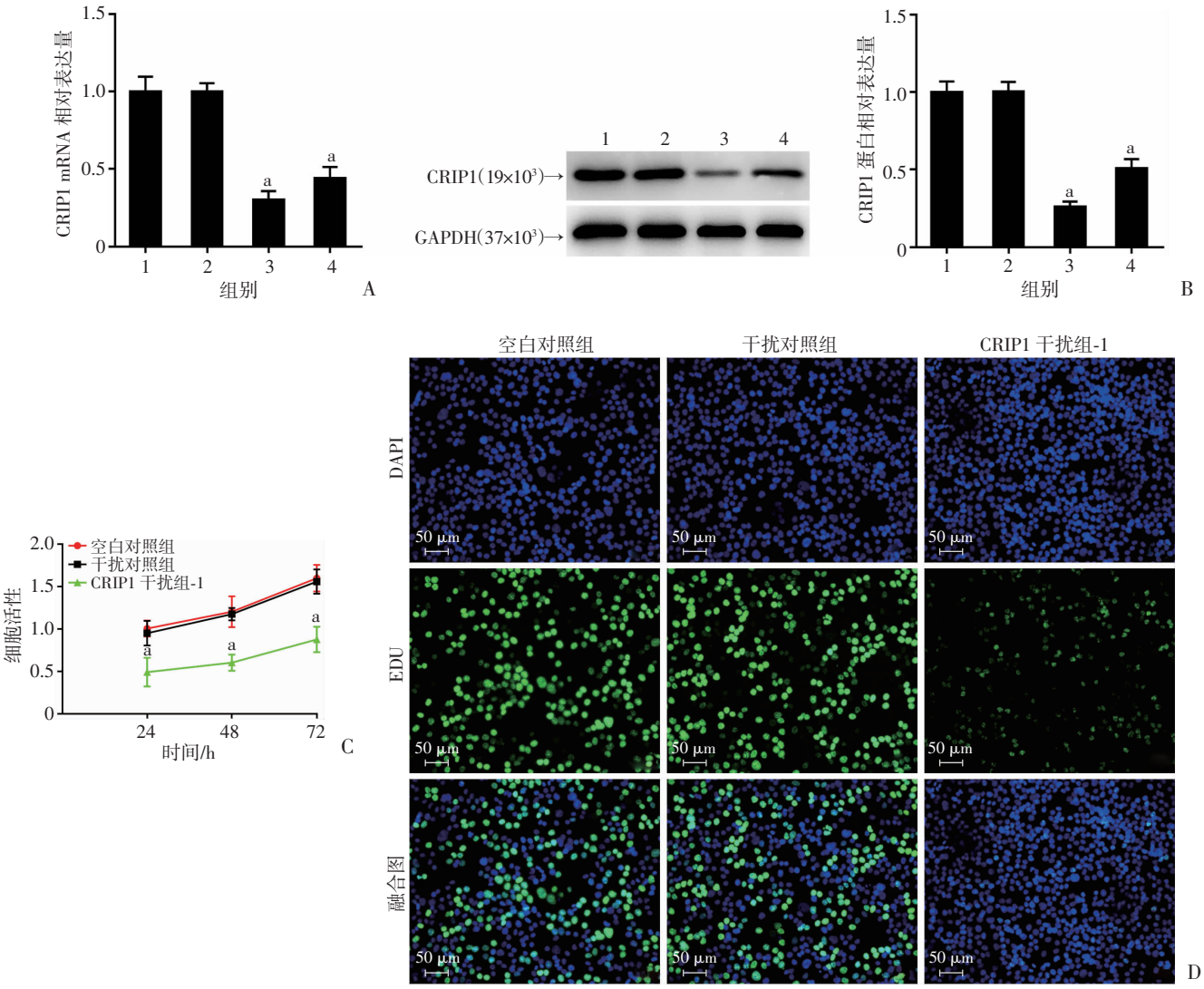
为进一步明确 CRIP1 在 EC 发展过程中的作用,首先利用 shRNA 慢病毒对 CRIP1 基因进行干扰。转染 shRNA-CRIP1-1 和 shRNA-CRIP1-2 后,CRIP1 表达水平显著降低,且 CRIP1 干扰组-1 中呈现较高的干扰效率,因此选择 CRIP1 干扰组-1 用于后续实验($P<0.01$,图 2A、B)。CCK-8 法表明,与干扰对照组比较,CRIP1 干扰组-1 中细胞在 24、48、72 h 时活性显著减弱($P<0.01$,图 2C)。EdU 染色同样表明,CRIP1 干扰组-1 较干扰对照组 EdU 阳性细胞比例明显下降($P<0.01$,图 2D)。



a:$P<0.01$,与正常组或 SHT290 比较

A、B:RT-qPCR 和 Western blot 检测 CRIP1 在 EC 肿瘤组织和癌旁组织中的表达;C:NCBI 数据库检测 CRIP1 在 EC 肿瘤组织和正常组织中的表达;D、E:RT-qPCR 和 Western blot 检测 CRIP1 在 EC 肿瘤细胞和正常细胞中的表达

图 1 CRIP1 在 EC 肿瘤组织和细胞中表达上调



1:空白对照组;2:干扰对照组;3:CRIP1 干扰组-1;4:CRIP1 干扰组-2;a: $P<0.01$,与干扰对照组比较

A、B:RT-qPCR 和 Western blot 检测 shRNA-CRIP1-1/2 干扰效率;C:CCK-8 检测 Ishikawa 细胞活力;D:EdU 染色检测 Ishikawa 细胞增殖

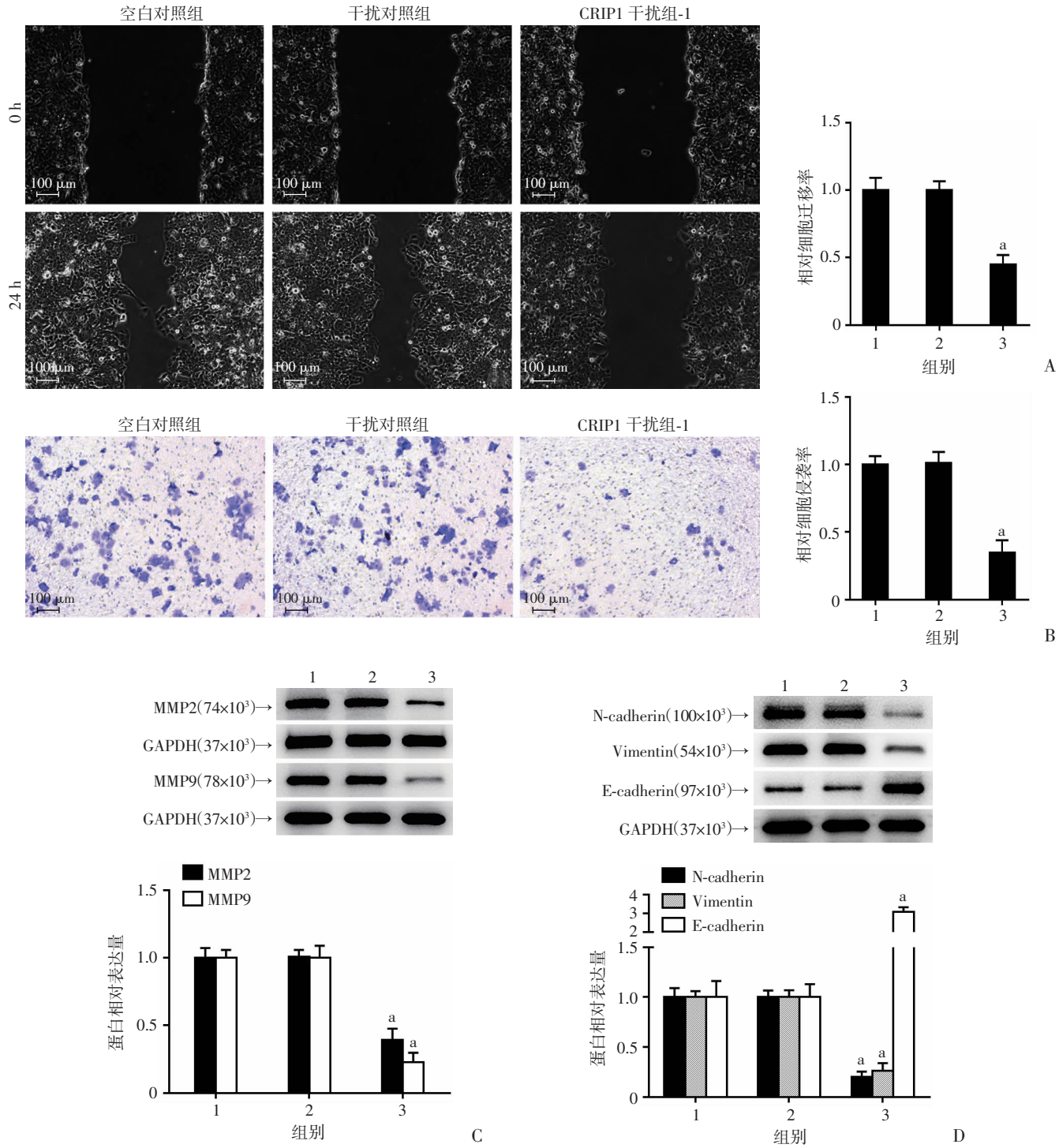
图 2 敲低 CRIP1 抑制 EC 细胞增殖

2.3 干扰 CRIP1 对 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT 的影响

划痕实验证实,CRIP1 干扰组-1 较干扰对照组划痕相对愈合率明显降低,迁移细胞明显下降($P<0.01$,图 3A)。Transwell 实验证明,与干扰对照组相比,CRIP1 干扰组-1 中侵袭细胞数目显著降低($P<0.01$,图 3B)。Western 印迹结果表明,CRIP1 干扰组-1 较干扰对照组 MMP2、MMP9、N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白水平明显下降,而 E-cadherin 蛋白水平明显增加($P<0.01$,图 3C-E)。IF 实验同样检测到,与干扰对照组相比,CRIP1 干扰组-1 中 Vimentin 表达降低($P<0.01$,图 3F)。

2.4 CRIP1 与 PGK1 蛋白在 EC 细胞中相结合

经 Biogrid 网站进行生物信息学预测后发现,CRIP1 可能与 PGK1 相结合。与人子宫内膜基质细胞系 SHT-290 相比,PGK1 在人 EC 细胞(Ishikawa、KLE、RL95-2 和 HEC-1-A)中的表达水平明显增加,且在 Ishikawa 细胞中呈现最高表达水平($P<0.01$)(图 4A-B)。Co-IP 实验结果发现,在 CRIP1 相互作用蛋白复合物中发现 CRIP1 和 PGK1 的存在;同时在 PGK1 相互作用蛋白复合物中也检测到 PGK1 和 CRIP1 的富集,表明 CRIP1 与 PGK1 两者间存在相互作用(图 4C、D)。此外,CRIP1 干扰组-1 较干扰对照组 PGK1 蛋白水平显著降低($P<0.01$,图 4E)。

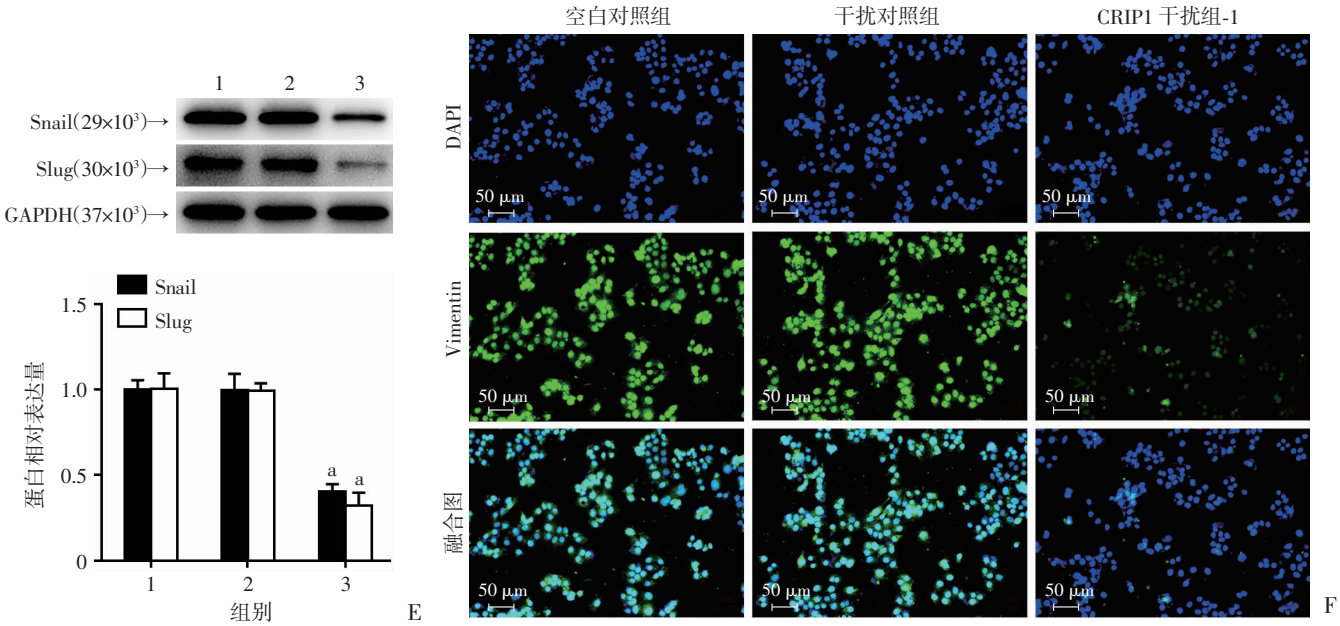


1:空白对照组;2:干扰对照组;3:CRIP1 干扰组-1;a: $P<0.01$,与干扰对照组比较

A:划痕实验检测 Ishikawa 细胞迁移;B: Transwell 实验检测 Ishikawa 细胞侵袭;C: Western blot 检测转移相关蛋白表达;D: Western blot 检测 EMT 相关蛋白表达;E: Western blot 检测转移和 EMT 相关 Snail、Slug 蛋白表达;F:IF 实验检测 Vimentin 表达

图 3 CRIP1 缺失阻碍 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT

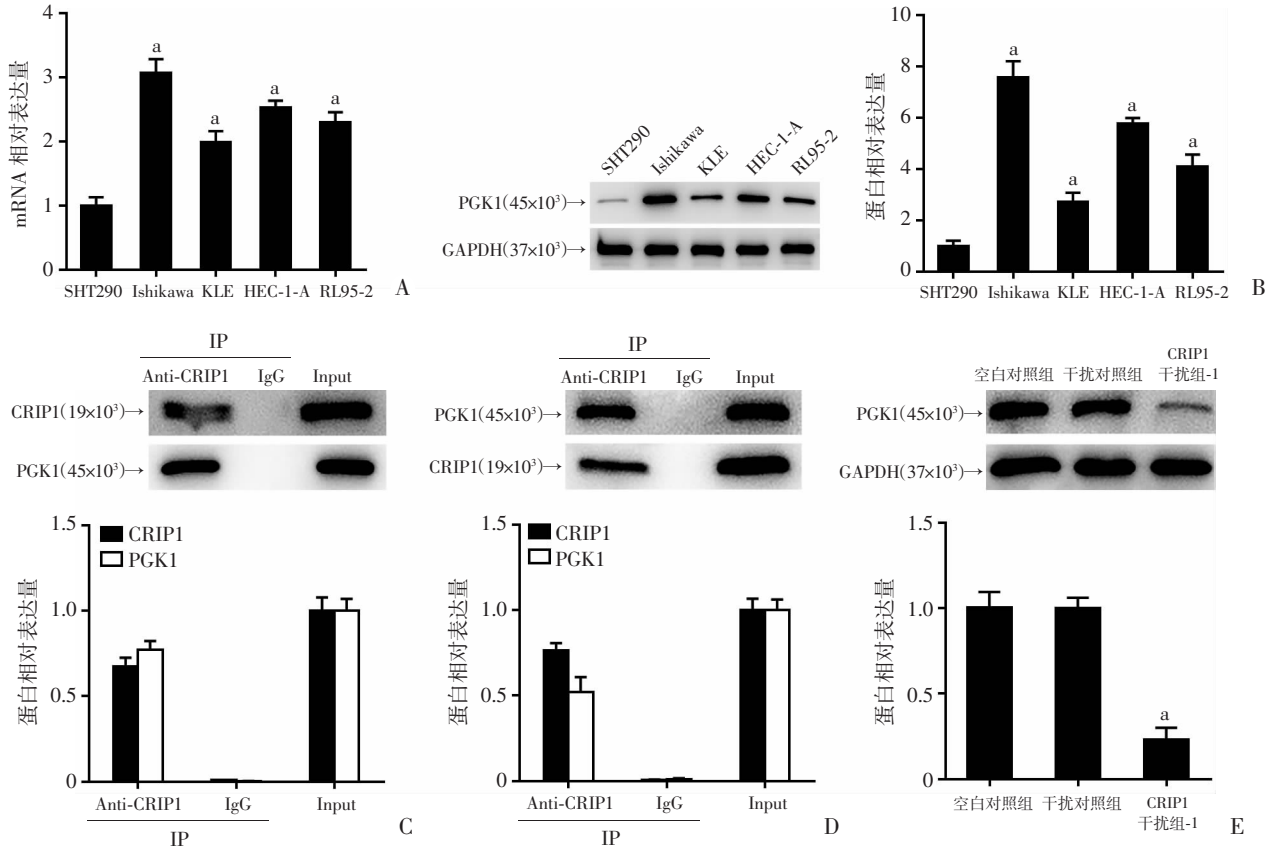
(图 3E、F 续下页)



1:空白对照组;2:干扰对照组;3:CRIP1 干扰组-1;a: $P<0.01$,与干扰对照组比较

E: Western blot 检测转移和 EMT 相关 Snail、Slug 蛋白表达;F:IF 实验检测 Vimentin 表达

续图 3 CRIP1 缺失阻碍 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT



a: $P<0.01$,与 SHT290 或干扰对照组比较

A、B:RT-qPCR 和 Western blot 检测 PGK1 在 EC 肿瘤细胞和正常细胞中的表达;C、D:Co-IP 实验验证 CRIP1 与 PGK1 两者的结合关系;E:Western blot 检测 CRIP1 耗竭后 PGK1 的表达

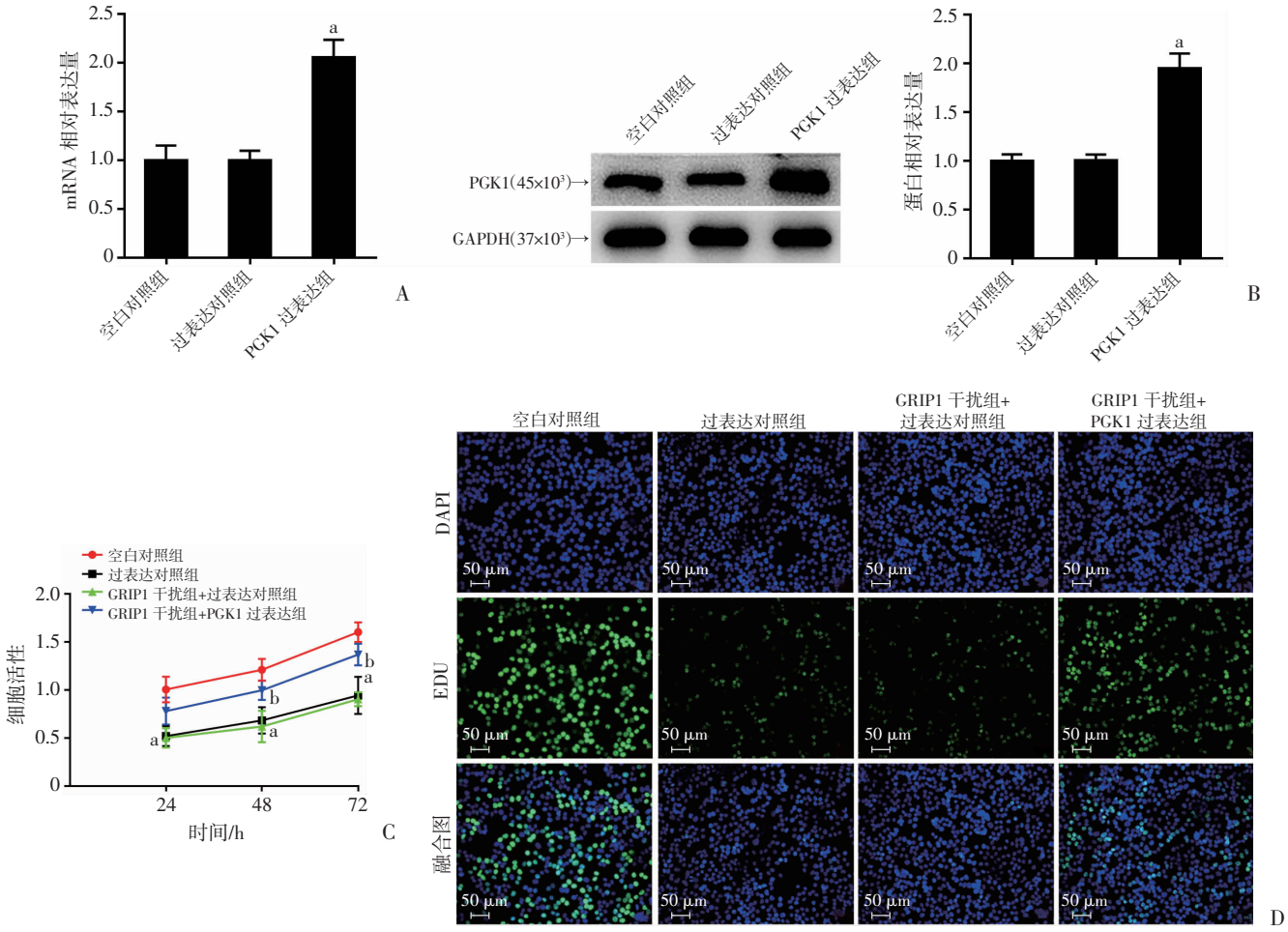
图 4 CRIP1 与 PGK1 蛋白在 EC 细胞中相结合

2.5　过表达 PGK1 对 CRIP1 敲低的 EC 细胞增殖能力的影响

为了进一步验证 CRIP1 是否通过与 PGK1 蛋白结合从而调控 EC 发展,我们首先利用 Ov-PGK1 质粒对 Ishikawa 细胞进行转染。PGK1 过表达组中 PGK1 表达水平显著升高($P<0.01$,图 5A、B)。CCK-8 和 EdU 实验结果显示,与空白对照组相比,CRIP1 沉默导致 Ishikawa 细胞增殖能力明显减弱;而与 CRIP1 干扰组+过表达对照组相比,CRIP1 干扰组+PGK1 过表达组中细胞增殖能力再次增强($P<0.01$,图 5C、D)。

2.6　过表达 PGK1 对 CRIP1 敲低的 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT 能力的影响

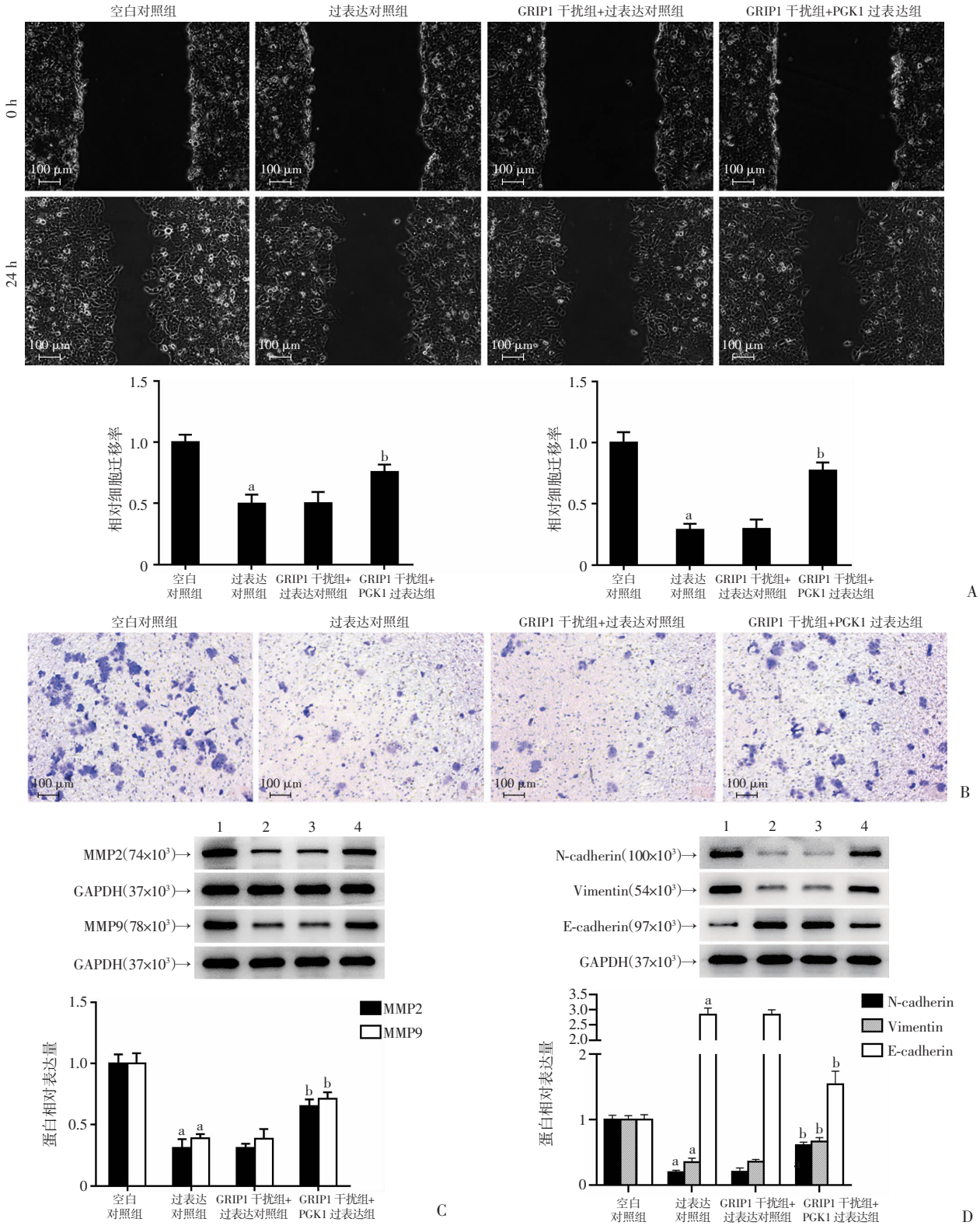
与空白对照组相比,CRIP1 干扰组中迁移细胞数和侵袭细胞数明显下降;而 CRIP1 干扰组+PGK1 过表达组较 CRIP1 干扰组+过表达对照组转移和侵袭细胞数再次上升($P<0.05$,$P<0.01$,图 6A、B)。此外,与空白对照组相比,CRIP1 干扰组中 MMP2、MMP9、N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白水平明显下降,而 E-cadherin 蛋白水平明显增加;而与 CRIP1 干扰组+过表达对照组相比,CRIP1 干扰组+PGK1 过表达组中 MMP2、MMP9、N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白水平升高,而 E-cadherin 蛋白水平下降($P<0.01$,图 6C-E)。IF 实验也表明,CRIP1 不足导致 Vimentin 表达下降;而转染 Ov-PGK1 过表达质粒后,Vimentin 水平再次上升(图 6F)。



a:$P<0.01$,与过表达对照组或空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 CRIP1 干扰组+过表达对照组比较

A、B:RT-qPCR 和 Western blot 检测 shRNA-CRIP1-1/2 干扰效率;C:CCK-8 检测 Ishikawa 细胞活力;D:EdU 染色检测 Ishikawa 细胞增殖

图 5　过表达 PGK1 对 CRIP1 敲低的 EC 细胞增殖能力的影响

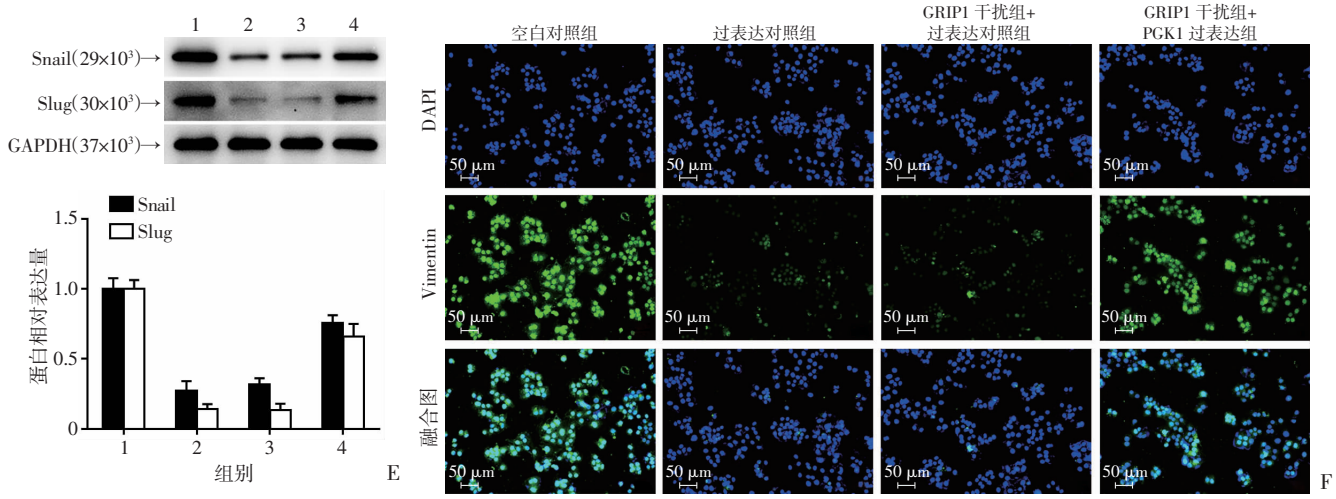


1:空白对照组;2:过表达对照组;3:GRIP1 干扰组+过表达对照组;4:GRIP1 干扰组+PGK1 过表达组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 CRIP1 干扰组+过表达对照组比较

A:划痕实验检测 Ishikawa 细胞迁移;B: Transwell 实验检测 Ishikawa 细胞侵袭;C: Western blot 检测转移相关蛋白表达;D: Western blot 检测 EMT 相关蛋白表达

图 6 过表达 PGK1 对 CRIP1 敲低的 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT 能力的影响

(图 6E、F 续下页)



1:空白对照组;2:过表达对照组;3:GRIP1 干扰组+过表达对照组;4:GRIP1 干扰组+PGK1 过表达组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 CRIP1 干扰组+过表达对照组比较

E:Western blot 检测转移和 EMT 相关 Snail、Slug 蛋白表达;F:IF 实验检测 Vimentin 表达

续图 6 过表达 PGK1 对 CRIP1 敲低的 EC 细胞迁移、侵袭及 EMT 能力的影响

3 讨论

EC 是常见的妇科恶性肿瘤,是导致全世界女性癌症死亡的常见因素[22]。尽管随着治疗手段的不断进步已有效提高了 EC 患者的治疗效果,但由于 EC 细胞增殖、迁移和侵袭能力较强,易发生远处转移,患者目前的生存率仍令人担忧[5-6]。当前证据表明,肿瘤侵袭及远处转移与 EMT 事件密切相关[23-24]。此外,多种证据表明,EC 的发生与发展是多种基因与通路相互调控的结果[25]。因此,本研究重点探讨 EC 细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT 能力,从而深入揭露 EC 的发病机制,并寻找潜在的干预分子靶标。

目前 LIM 蛋白家族成员 CRIP1 在肿瘤方面的作用日益成为人们关注的焦点。有研究发现,宫颈癌组织和细胞中 CRIP1 表达增加,且在细胞迁移、侵袭和 EMT 中起推动作用[12];LIU 等[26]研究证实,敲低 CRIP1 可有效抑制卵巢上皮癌细胞迁移、侵袭及 EMT。CRIP1 表达上调是 EC 患者不良预后的独立风险因素[17]。本研究通过 RT-qPCR、Western blot 及 NCBI 数据库分析发现,与正常组织和细胞比较,EC 组织和细胞中 CRIP1 表达升高。功能丧失实验结果表明,CRIP1 丢失可明显减弱 Ishikawa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。先前研究发现,蛋白水解酶家族成员 MMP2 和 MMP9 在 EC 发展过程中表达增加[27]。同样,敲低 CRIP1 可导致 MMP2 和 MMP9 蛋白表达降低。EMT 过程中,E-cadherin 蛋白表达缺失,而 N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白表达增多[28]。本研究结果表明,CRIP1 表达下调后,E-cadherin 表达增加,而 N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白表达减少。

对于肿瘤细胞而言,有氧糖酵解是肿瘤细胞为自身提供能量、实现快速迁移和侵袭的主要方式[18,29]。因此,糖代谢与肿瘤的发生与发展有紧密关联,是恶性肿瘤的重要特征。甲基化、乙酰化等翻译后修饰行为都可以激活糖酵解相关酶 PGK1,促使肿瘤细胞糖代谢的异常,从而影响癌细胞的恶性表型[30]。近年关于 PGK1 的研究强调了其在 EC 中的作用:EC 组织和细胞中 PGK1 呈高表达,PGK1 与 EC 进展和 EC 患者不良预后相关[20-21,31-32]。此外,有研究报道 HOXA9 与 CRIP 家族成员 CRIP2 互相作用抑制 HIF-1α 介导的糖酵解从而抑制皮肤鳞癌发生发展[33]。更重要的是,CRIP1 可通过与 GAL-3 蛋白相互作用从而在 EC 进展中发挥重要作用[17]。然而,CRIP1 对糖酵解的作用以及与糖酵解相关酶 PGK1 间的相互关系仍未可知。本研究通过 Biogrid 数据库和 Co-IP 实验分别预测并验证了 CRIP1 与 PGK1 在 EC 细胞中的结合关系。此外,EC 细胞中 PGK1 水平增加,且 CRIP1 沉默可抑制 PGK1 蛋白表达,揭示了 CRIP1 对 PGK1 的正向调控关系,表明 CRIP1 可通过与 PGK1 蛋白结合从而参与 EC 进展。共转染 CRIP1 干扰序列和 PGK1 过表达质粒至 Ishikawa 细胞后,拯救实验结果进一步表明,沉默 CRIP1 对 EC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 能力的抑制作用均被 PGK1 所拯救。以上实验结果表明,PGK1 过

表达可实现对 CRIP1 干扰抑制 EC 发展的拮抗作用。

综上所述,EC 组织和细胞中 CRIP1 表达升高,且与 EC 的发生发展有紧密关联。敲低 CRIP1 可减弱 EC 细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT 能力,其机制可能通过与 PGK1 蛋白结合有关。本研究初步明确了 CRIP1 在 EC 中的促癌作用,为深入探究 CRIP1 的作用以及挖掘 EC 的潜在治疗靶点提供了宝贵的实验依据和理论支持。但本研究仍具有一些缺陷:首先,未涉及 CRIP1 表达与 EC 患者生存率、预后等相关性分析;其次,缺乏体内动物实验以进一步验证 CRIP1 在 EC 发展过程中的作用;最后,近期研究表明 CRIP1 与 Ras、Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活有关[12, 15],然而本研究未探讨 CRIP1 相关的信号通路对 EC 发展的影响。

参考文献:

[1] BROOKS R A, FLEMING G F, LASTRA R R, *et al*. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 258-279. DOI:10.3322/caac.21561.

[2] AREND R C, JONES B A, MARTINEZ A, *et al*. Endometrial cancer: molecular markers and management of advanced stage disease[J]. Gynecol Oncol, 2018, 150(3): 569-580. DOI:10.1016/j.ygyno.2018.05.015.

[3] CONSTANTINE G D, KESSLER G, GRAHAM S, *et al*. Increased incidence of endometrial cancer following the women's health initiative: an assessment of risk factors[J]. J Womens Health (Larchmt), 2019, 28(2): 237-243. DOI:10.1089/jwh.2018.6956.

[4] VAN DEN HEERIK A S V M, HOREWEG N, DE BOER S M, *et al*. Adjuvant therapy for endometrial cancer in the era of molecular classification: radiotherapy, chemoradiation and novel targets for therapy[J]. Int J Gynecol Cancer, 2021, 31(4): 594-604. DOI:10.1136/ijgc-2020-001822.

[5] CONNOR E V, ROSE P G. Management strategies for recurrent endometrial cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(9): 873-885. DOI:10.1080/14737140.2018.1491311.

[6] NERI M, PEIRETTI M, MELIS G B, *et al*. Systemic therapy for the treatment of endometrial cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(16): 2019-2032. DOI:10.1080/14656566.2019.1654996.

[7] SUN H Y, ZHOU R, ZHENG Y N, *et al*. $CRIP_1$ cooperates with BRCA2 to drive the nuclear enrichment of RAD51 and to facilitate homologous repair upon DNA damage induced by chemotherapy[J]. Oncogene, 2021, 40(34): 5342-5355. DOI:10.1038/s41388-021-01932-0.

[8] HEMPE J M, COUSINS R J. Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9671-9674. DOI:10.1073/pnas.88.21.9671.

[9] DAVIS B A, BLANCHARD R K, LANNINGHAM-FOSTER L, *et al*. Structural characterization of the rat cysteine-rich intestinal protein gene and overexpression of this LIM-only protein in transgenic mice[J]. DNA Cell Biol, 1998, 17(12): 1057-1064. DOI:10.1089/dna.1998.17.1057.

[10] 李明月. CRIP1 与相关疾病关联性的研究进展[J]. 当代医药论丛, 2019, 17(23): 83-84.
LI M Y. Research progress of Crip1 and related diseases[J]. Contemp Med Symp, 2019, 17(23): 83-84.

[11] QI B L, LIU S K, LIU D T, *et al*. Comprehensive analysis of $CRIP_1$ in patients with ovarian cancer, including *CeRNA* network, immune-infiltration pattern, and clinical benefit[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 2687867. DOI:10.1155/2022/2687867.

[12] ZHANG L Z, HUANG L Y, HUANG A L, *et al*. $CRIP_1$ promotes cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer by activating the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Life Sci, 2018, 207: 420-427. DOI:10.1016/j.lfs.2018.05.054.

[13] LI H G, ZHAO L H, ZHANG Z H, *et al*. The impact of cysteine-rich intestinal protein 1 ($CRIP_1$) on thyroid carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(5): 2037-2046. DOI:10.1159/000484184.

[14] LUDYGA N, ENGLERT S, PFLIEGER K, *et al*. The impact of cysteine-rich intestinal protein 1 ($CRIP_1$) in human breast cancer[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 28. DOI:10.1186/1476-4598-12-28.

[15] HE H Y, HU L. Cysteine-rich intestinal protein 1 enhances the progression of hepatocellular carcinoma via Ras signaling[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(1): 49-58. DOI:10.1002/kjm2.12445.

[16] ZHANG L Z, ZHOU R, ZHANG W B, *et al*. Cysteine-rich intestinal protein 1 suppresses apoptosis and chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer through ubiquitin-mediated Fas degradation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 120. DOI:10.1186/s13046-019-1117-z.

[17] LAMBROPOULOU M,DEFTEREOU T E,KYNIGOPOULOS S, *et al*. Co-expression of galectin-3 and CRIP-1 in endometrial cancer: prognostic value and patient survival[J]. Med Oncol, 2016, 33(1): 8. DOI:10.1007/s12032-015-0723-7.

[18] GANAPATHY-KANNIAPPAN S, GESCHWIND J F H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 152. DOI:10.1186/1476-4598-12-152.

[19] NIE H, JU H X, FAN J Y, *et al*. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 36. DOI: 10.1038/s41467-019-13601-8.

[20] 郭静, 王雅莉, 李红娟, 等. MTA2、PGK1 在子宫内膜癌组织中的表达及其与肿瘤进展的关系[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(9): 1442-1444, 1452.
GUO J, WANG Y L, LI H J, *et al*. Relationship between expression of MTA2 and PGK1 in endometrial carcinoma and tumor progression[J]. Pract J Cancer, 2021, 36(9): 1442-1444, 1452.

[21] 林莉, 江庆萍, 林丹, 等. 子宫内膜癌组织中 PGK1 的表达及其与预后的关系[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(4): 471-476. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2018.04.17.
LIN L, JIANG Q P, LIN D, *et al*. Expression of phosphoglycerate kinase 1 in endometrial carcinoma and its association with patients' outcome[J]. J South Med Univ, 2018, 38(4): 471-476. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2018.04.17.

[22] URICK M E, BELL D W. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(9): 510-521. DOI: 10.1038/s41568-019-0177-x.

[23] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13: 395-412. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

[24] CHIU H C, LI C J, YIANG G T, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition and cell biology of molecular regulation in endometrial carcinogenesis[J]. J Clin Med, 2019, 8(4): 439. DOI: 10.3390/jcm8040439.

[25] CAI Y X, WANG B, XU W, *et al*. Endometrial cancer: genetic, metabolic characteristics, therapeutic strategies and nanomedicine[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(42): 8755-8781. DOI: 10.2174/0929867328666210705144456.

[26] LIU Y J, LI W Y, LUO J, *et al*. Cysteine-rich intestinal protein 1 served as an epithelial ovarian cancer marker via promoting Wnt/β-catenin-mediated EMT and tumour metastasis[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 3566749. DOI: 10.1155/2021/3566749.

[27] WANG X R, CHEN T Q. CUL4A regulates endometrial cancer cell proliferation, invasion and migration by interacting with CSN_6[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 23. DOI: 10.3892/mmr.2020.11661.

[28] ROUT-PITT N, FARROW N, PARSONS D, *et al*. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 136. DOI: 10.1186/s12931-018-0834-8.

[29] VAUPEL P, SCHMIDBERGER H, MAYER A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression[J]. Int J Radiat Biol, 2019, 95(7): 912-919. DOI: 10.1080/09553002.2019.1589653.

[30] DUNCAN L, SHAY C, TENG Y. PGK1: an essential player in modulating tumor metabolism[M]//. Phys Exerc Nat Synth Prod Heal Dis, 2022: 57-70. DOI: 10.1007/978-1-0716-1558-4_4.

[31] GUO S Q, XIAO Y Y, LI D Q, *et al*. PGK1 and GRP78 overexpression correlates with clinical significance and poor prognosis in Chinese endometrial cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 9(1): 680-690. DOI: 10.18632/oncotarget.23090.

[32] ZHOU J W, TANG J J, SUN W, *et al*. PGK1 facilities cisplatin chemoresistance by triggering HSP90/ERK pathway mediated DNA repair and methylation in endometrial endometrioid adenocarcinoma[J]. Mol Med, 2019, 25(1): 11. DOI: 10.1186/s10020-019-0079-0.

[33] 周良, 王颖慧, 周美娟, 等. HOXA9、CRIP2 互相作用抑制 HIF-1α 介导的糖酵解以阻遏皮肤鳞癌发生发展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2018, 38(8): 583. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2018.08.101.
ZHOU L, WANG Y H, ZHOU M J, *et al*. HOXA9 inhibits HIF-1α-mediated glycolysis through interacting with $CRIP_2$ to represscutaneous squamous cell carcinoma development[J]. Chin J Radiol Med Prot, 2018, 38(8): 583. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2018.08.101.

(**收稿**:2022-04-24;**修回**:2022-08-10)

(编辑 汪勤俭)