doi:10.11659/jjssx.08E022172

·基础研究·

CDCA3在上皮性卵巢癌中的表达及意义

李 苗,金海红,付静静,韩 坤,龚 姗 (秦皇岛市第一医院妇科,河北 秦皇岛 066000)

[摘 要] **目的** 探讨细胞分裂周期相关蛋白3(CDCA3)在上皮性卵巢癌中的表达及其对癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法** 收集于本院进行手术切除的50例患者的卵巢癌组织和30例患者的正常卵巢组织,选取A2780、Hey、CAOV3、SKOV3细胞进行研究。RT-PCR检测组织和细胞中CDCA3 mRNA表达水平,Western blot检测组织和细胞中CDCA3蛋白表达水平。将CAOV3细胞分为沉默组和Control组,沉默组转染CDCA3 siRNA,Control组转染阴性对照序列;将Hey细胞分为过表达组和对照组,过表达组用CAOV3慢病毒感染,对照组用空载体慢病毒感染。CCK-8检测细胞活性;Transwell实验检测细胞侵袭和迁移。**结果** 与正常卵巢组织比较,上皮性卵巢癌组织中CDCA3 mRNA和蛋白表达水平较高($P<0.05$);在A2780、Hey、CAOV3、SKOV3上皮性卵巢癌细胞系中,CAOV3 mRNA和蛋白表达水平最高,而Hey最低。沉默CDCA3后CAOV3细胞CDCA3蛋白表达水平、细胞增殖活力、侵袭和迁移能力降低($P<0.05$),Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平降低($P<0.05$),而E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$)。过表达CDCA3后Hey细胞CDCA3蛋白表达水平、细胞增殖活力、侵袭和迁移能力升高($P<0.05$),Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平升高($P<0.05$),而E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** CDCA3在上皮性卵巢癌中高表达,能够促进上皮性卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

[关键词] 细胞分裂周期相关蛋白3;上皮性卵巢癌;增殖;侵袭;迁移
[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-08-31

Expression and significance of CDCA3 in epithelial ovarian cancer

LI Miao, JIN Hai-hong, FU Jing-jing, HAN Kun, GONG Shan (Department of Gynecology, Qinhuangdao First Hospital, Qinhuangdao Hebei 066000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of cell division cycle associated protein 3 (CDCA3) in epithelial ovarian cancer and its effect on the proliferation, invasion and migration of cancer cells. **Methods** The ovarian cancer tissue of 50 patients and the normal ovarian tissue of 30 patients who underwent surgical resection in our hospital were collected, and A2780, Hey, CAOV3, SKOV3 cells were selected for research. RT-PCR was used to detect the expression level of CDCA3 mRNA in tissues and cells, and Western blot was used to detect the expression level of CDCA3 protein in tissues and cells. CAOV3 cells were divided into the silence group and the Control group, the silence group was transfected with CDCA3 siRNA, while the Control group was transfected with negative control sequence. Hey cells were divided into the overexpression group and the control group, the overexpression group was infected with CAOV3 lentivirus, and the control group was infected with empty vector lentivirus. Cell viability was detected by CCK-8; and the cell invasion and migration were detected by Transwell assay. **Results** Compared with normal ovarian tissue, the expression levels of CDCA3 mRNA and CDCA3 protein in epithelial ovarian cancer tissue were higher ($P<0.05$). Among the epithelial ovarian cancer cell lines A2780, Hey, CAOV3, and SKOV3, the expression levels of CAOV3 mRNA and CDCA3 protein were the highest, while the expression levels of Hey were the lowest. After CDCA3 was silenced, the expression level of CDCA3 protein, cell proliferation activity, invasive and migration ability of CAOV3 cells decreased ($P<0.05$), the expression levels of Cyclin D1 and MMP-9 protein decreased ($P<0.05$), while the expression level of E-cadherin protein increased ($P<0.05$). After CDCA3 was overexpressed, the expression level of CDCA3 protein, cell proliferation activity, invasive and migration ability of Hey cells increased ($P<0.05$), the expression levels of Cyclin D1 and MMP-9 protein increased ($P<0.05$), while the expression level of E-cadherin protein decreased ($P<0.05$). **Conclusion** CDCA3 is highly expressed in epithelial ovarian cancer and can promote the proliferation, invasion and migration of epithelial ovarian cancer cells.

Keywords: cell division cycle associated protein 3; epithelial ovarian cancer; proliferation; invasion; migration

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,致死率高。临床上约有70%的卵巢癌患者就诊时已处晚期,5年生存率仅为30%[1-2]。目前卵巢癌的发病机制尚未完全明确,增殖、侵袭和迁移是影响病情进展的重要因素[3]。细胞分裂周期相关蛋白3(cell division cycle

[基金项目] 2022年度河北省医学科学研究课题计划(20221606);秦皇岛市科学技术局(202101A066)

[通信作者] 龚 姗,E-mail:gsmeimei201@163.com

associated protein 3,CDCA3)与细胞分裂密切相关,会影响肿瘤细胞增殖、侵袭及免疫浸润和肿瘤微环境[4]。CDCA3与肿瘤发生发展的关系日益受到重视,研究发现,CDCA3可能参与肝细胞癌[4]、膀胱癌[5]、胃癌[6]和肾癌[7]等肿瘤的发生。本研究通过检测上皮性卵巢癌组织中CDCA3的表达,在细胞水平上探讨CDCA3对卵巢癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响,以期寻找新的上皮性卵巢癌诊治靶点。

1 材料与方法

1.1 组织样本

选取2019年6月至2021年12月于本院进行手术切除的50例患者的卵巢癌组织,患者年龄42~62岁,平均(48.09±9.23)岁;浆液性癌31例,透明细胞癌10例,黏液性癌7例,其他2例;FIGO分期为Ⅰ~Ⅱ期22例,Ⅲ~Ⅳ期28例。纳入标准:①组织病理学检查证实为上皮性卵巢癌;②术前未接受过放化疗;③未合并其他类型肿瘤。排除标准:①合并感染性疾病;②代谢性疾病;③自身免疫性疾病;④严重的心、肝、肾功能障碍。另选取同期因子宫肌瘤或子宫腺肌病进行手术切除的30例患者的正常卵巢组织作为对照,患者年龄38~52岁,平均(47.03±8.45)岁。本研究已经我院伦理委员会批准(S2019-02-11)。

1.2 细胞及试剂

上皮性卵巢癌细胞系A2780、Hey、CAOV3、SKOV3购于中科院上海细胞库;胎牛血清和DMEM培养基购于北京伊诺凯科技有限公司;总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR试剂盒、BCA试剂盒、凝胶快速制备试剂盒购于上海尚宝生物科技有限公司;CDCA3、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloprotein 9,MMP-9)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、GAPDH抗体均购于美国Sigma公司;CDCA3 siRNA和pLenti6/V5-CDCA3质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并提供;Lipofectamine™2000转染试剂盒购于北京伊诺凯科技有限公司;CCK-8细胞检测试剂盒及Transwell小室购于上海语纯生物科技有限公司。

1.3 细胞培养

将A2780、Hey、CAOV3、SKOV3细胞培养于37 ℃、5%CO_2、含10%胎牛血清的DMEM培养基中。

1.4 RT-PCR检测组织和细胞中CDCA3 mRNA表达

采用RT-PCR检测组织和细胞中CDCA3 mRNA表达水平[8]。首先用总RNA提取试剂盒提取组织和细胞中总RNA,随后用逆转录试剂盒合成cDNA。用PCR试剂盒扩增引物,反应条件:95 ℃预变性15 min;95 ℃变性15 s,95 ℃退火30 s,70 ℃延伸30 s,共40个循环。用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算CDCA3相对表达水平。

1.5 Western blot检测组织和细胞中CDCA3蛋白表达水平

采用Western blot检测组织中CDCA3蛋白表达水平及细胞中CDCA3、Cyclin D1、MMP-9、E-cadherin表达水平[9]。用RAPI裂解液提取组织和细胞中的总蛋白,用BCA试剂盒检测蛋白浓度,10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至PVDF膜上。随后用5%脱脂奶粉封闭1 h,加入CDCA3抗体(稀释500倍)、Cyclin D1抗体(稀释500倍)、MMP-9抗体(稀释1 000倍)、E-cadherin抗体(稀释1 000倍)、GAPDH抗体(稀释1 000倍),4 ℃孵育过夜,次日除去一抗,用TBST缓冲液洗涤3次后加入二抗。用ECL发光仪成像,Image J软件分析灰度值。

1.6 siRNA转染CAOV3细胞

将处于对数生长期的CAOV3细胞接种于24孔板,分为沉默组和Control组。沉默组加入50 nmol/L的CDCA3 siRNA,Control组加入50 nmol/L的阴性对照序列。转染步骤严格按照Lipofectamine™2000转染试剂盒说明书进行。

1.7 慢病毒转染Hey细胞

将处于对数生长期的Hey细胞接种于24孔板,分为过表达组和对照组。过表达组用CAOV3慢病毒(1 mL含CDCA3基因的pLenti6/V5-CDCA3质粒)感染Hey细胞,对照组用空载体慢病毒感染。感染48 h后进行后续实验。

1.8 细胞增殖、侵袭和迁移能力检测

用CCK-8试剂盒检测细胞活性,细胞培养24 h后向每个培养孔中添加10 μL CCK-8试剂,最后用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度值[10]。用Transwell实验检测细胞侵袭和迁移[11]。迁移实验:在Transwell迁移板上室加入5×10^4个细胞,下室中加入600 μL完全培养基,于5%CO_2、37 ℃培养24 h。固定膜底细胞并进行0.1%结晶紫染色20 min,光学显微镜下对细胞进行定量。侵袭实验:使用预先加入Matrigel胶的小

室,上室中加入5×10⁴个细胞,于5%CO_2、37 ℃培养48 h,其余步骤同迁移实验。

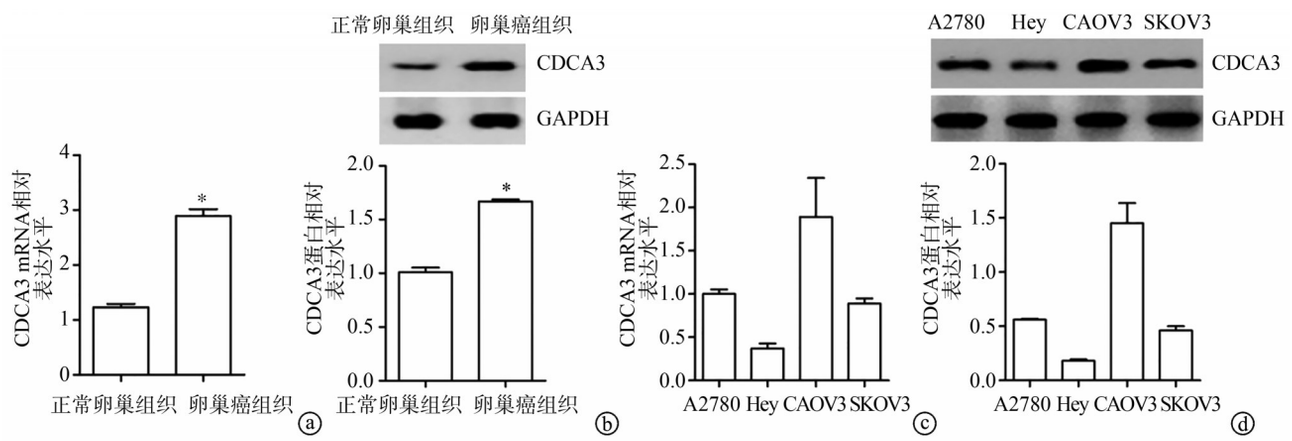
1.9 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件处理数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验;多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用*LSD*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDCA3在上皮性卵巢癌组织及细胞中的表达

与正常卵巢组织比较,上皮性卵巢癌组织中CDCA3 mRNA和蛋白表达水平均较高($P<0.05$)。在A2780、Hey、CAOV3、SKOV3上皮性卵巢癌细胞系中,CAOV3细胞中CDCA3的mRNA和蛋白表达水平最高,而Hey细胞最低,见图1。因此,我们选择CAOV3和Hey细胞进行后续机制验证。

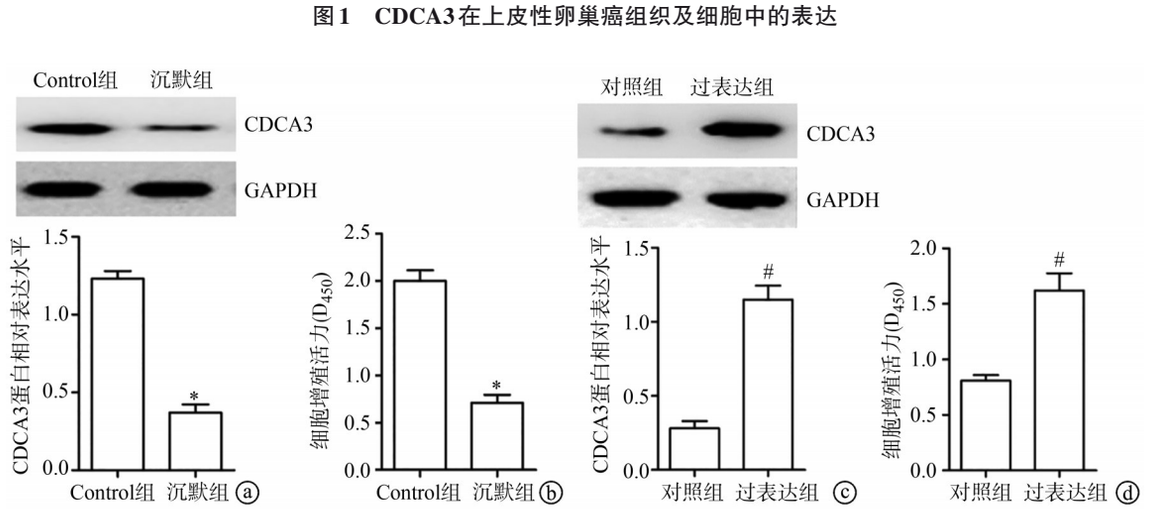


a、b:正常卵巢组织与上皮性卵巢癌组织中CDCA3 mRNA和蛋白相对表达水平;c、d:上皮性卵巢癌细胞系中CDCA3 mRNA和蛋白相对表达水平 *:与正常卵巢组织比较,$P<0.05$

图1 CDCA3在上皮性卵巢癌组织及细胞中的表达

2.2 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞增殖活力的影响

沉默CDCA3后CAOV3细胞CDCA3蛋白表达水平和细胞增殖活力降低($P<0.05$),过表达CDCA3后Hey细胞CDCA3蛋白表达水平和细胞增殖活力升高($P<0.05$),见图2。



a:沉默CDCA3对CAOV3细胞CDCA3蛋白表达的影响;b:沉默CDCA3对CAOV3细胞增殖活力的影响;c:过表达CDCA3对Hey细胞CDCA3蛋白表达的影响;d:过表达CDCA3对Hey细胞增殖活力的影响 *:与Control组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.05$

图2 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞CDCA3蛋白表达及增殖活力的影响

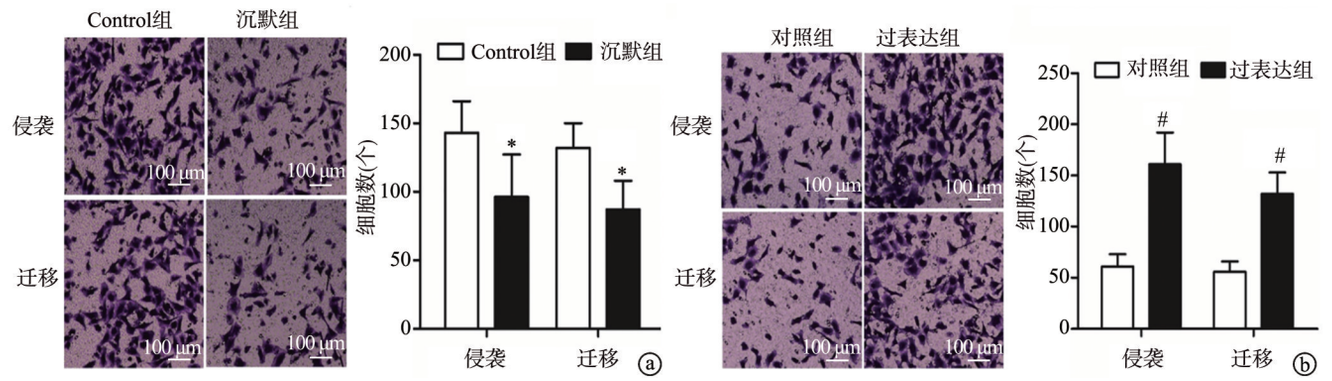
2.3 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响

沉默CDCA3后CAOV3细胞侵袭和迁移能力降低($P<0.05$),过表达CDCA3后Hey细胞侵袭和迁移能力升高($P<0.05$),见图3。

2.4 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞Cyclin D1、MMP-9、E-cadherin蛋白表达水平的影响

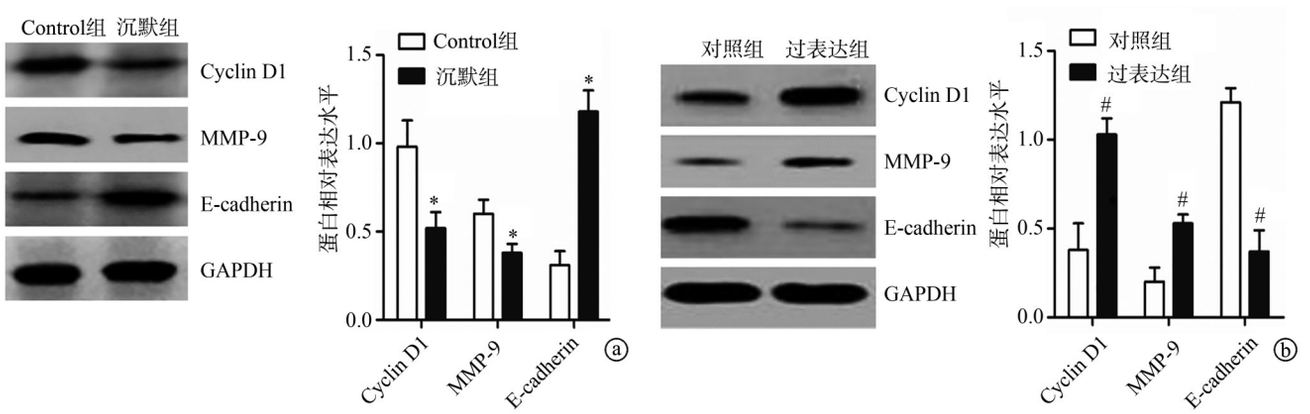
沉默CDCA3后,CAOV3细胞Cyclin D1、MMP-9蛋

白表达水平降低($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$)。过表达CDCA3后,Hey细胞Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平升高($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$),见图4。



a:沉默CDCA3对CAOV3细胞侵袭和迁移的影响;b:过表达CDCA3对Hey细胞侵袭和迁移的影响 *:与Control组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.05$

图3 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响



a:沉默CDCA3;b:过表达CDCA3 *:与Control组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.05$

图4 沉默或过表达CDCA3对卵巢癌细胞Cyclin D1、MMP-9、E-cadherin蛋白表达水平影响

3 讨论

CDCA基因家族由8个成员(CDCA1~CDCA8)组成,是细胞增殖的重要调控因子,在肿瘤进展中发挥重要作用[12]。CDCA3是CDCA家族的重要成员,是S期激酶相关蛋白1/淘汰素/F-boxE3泛素连接酶复合物的一部分,可以介导有丝分裂抑制激酶weel的降解,影响细胞周期[13]。另CDCA3可以和Skp1、cullin结合,通过多种信号通路参与病理生理过程[14]。CDCA3在肿瘤发生发展中的作用逐渐受到重视,其可通过调控E2F转录因子1(E2F1)、NF-κB/Cyclin D1信号通路促进结直肠癌细胞的增殖[14-15]。此外,CDCA3还参与非小细胞肺癌、乳腺癌、口腔癌等的增殖,其高表达与不良预后有关[16]。

CDCA3与上皮性卵巢癌的关系目前尚不清楚。本研究发现上皮性卵巢癌组织中CDCA3表达水平高于正常卵巢组织,提示CDCA3可能参与上皮性卵巢癌的发生。为进一步探讨CDCA3在上皮性卵巢癌中的作用机制,我们检测了上皮性卵巢癌细胞系中CDCA3的表达水平,结果显示,沉默CDCA3后CAOV3细胞中CDCA3蛋白表达水平、细胞增殖活力、侵袭能力、迁移能力降低,过表达CDCA3后Hey细胞CDCA3蛋白表达水平、细胞增殖活力、侵袭和迁移能力升高。说明CDCA3可能作为促癌基因在上皮性卵巢癌中发挥作用。Cyclin D1主要在肿瘤中促进细胞增殖,其还与肿瘤黏附和侵袭有关[17]。肿瘤细胞侵袭和迁移与细胞外基质的降解有关,肿瘤细胞分泌MMP可以破坏肿瘤周围组织的细胞外基质[18]。MMP-9在上皮性卵巢癌组织中高表达,并且能够促进肿瘤细胞的侵袭及迁移[19]。E-cadherin表达水平下降可影响细胞基质黏附受体的表达,进而使肿瘤细胞间黏附性下降,最终引起肿瘤细胞侵袭和转移[20]。本研究沉默CDCA3后,CAOV3细胞中Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平降低,E-cadherin

蛋白表达水平升高；过表达CDCA3后，Hey细胞中Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平升高，E-cadherin蛋白表达水平降低。以上结果提示，CDCA3可能参与上皮性卵巢癌的进展。

综上，CDCA3在上皮性卵巢癌中高表达，能够促进上皮性卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移。CDCA3可能成为上皮性卵巢癌的生物学标志物，对临床诊治有潜在价值。未来需要进一步开展临床和基础研究，探讨CDCA3在上皮性卵巢癌中的作用及机制。

［参考文献］

[1] Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. Semin Oncol Nurs, 2019, 35(2): 151-156. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.001.

[2] Oliveira L, Horvat N, Andrieu PIC, et al. Ovarian cancer staging: what the surgeon needs to know [J]. Br J Radiol, 2021, 94(1125): 20210091. doi: 10.1259/bjr.20210091.

[3] 金福军，龙行涛. 上皮性卵巢癌腹腔转移机制及治疗的研究进展[J]. 重庆医学, 2022, 51(12): 2140-2144. doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2022.12.034.

[4] Wang Z, Chen S, Wang G, et al. CDCA3 is a novel prognostic biomarker associated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6622437. doi: 10.1155/2021/6622437.

[5] Zheng P, Wu K, Gao Z, et al. KIF4A promotes the development of bladder cancer by transcriptionally activating the expression of CDCA3[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(6): 99. doi: 10.3892/ijmm.2021.4932.

[6] Yu J, Hua R, Zhang Y, et al. DNA hypomethylation promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by regulating the binding of SP1 to the CDCA3 promoter[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(1): 142-151. doi: 10.1002/jcb.28993.

[7] Liu Y, Cheng G, Huang Z, et al. Long noncoding RNA SNHG12 promotes tumour progression and sunitinib resistance by upregulating CDCA3 in renal cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 515. doi: 10.1038/s41419-020-2713-8.

[8] Li H, Li M, Yang C, et al. Prognostic value of CDCA3 in kidney renal papillary cell carcinoma [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(23): 25466-25483. doi: 10.18632/aging.203767.

[9] Shen D, Fang Y, Zhou F, et al. The inhibitory effect of silencing CDCA3 on migration and proliferation in bladder urothelial carcinoma [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 257. doi: 10.1186/s12935-021-01969-x.

[10] 彭志霞，贾 佳，于东坡，等. miR-30a对卵巢癌细胞PTEN/PI3K/AKT/mTOR自噬通路及顺铂耐药性的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(18): 3143-3148. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.18.003.

[11] 郭 莉，杨 媛. PAX9在卵巢癌中的表达及对卵巢癌细胞增殖，迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国性科学, 2021, 23(12): 87-91. doi: 10.3969/j.issn.1672-1993.2021.12.025.

[12] Chen C, Chen S, Luo M, et al. The role of the CDCA gene family in ovarian cancer[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(5): 190. doi: 10.21037/atm.2020.01.99.

[13] Sahin KB, Shah ET, Ferguson GP, et al. Elevating CDCA3 levels enhances tyrosine kinase inhibitor sensitivity in TKI-resistant EGFR mutant non-small-cell lung cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(18): 4651. doi: 10.3390/cancers13184651.

[14] Zhang W, Lu Y, Li X, et al. CDCA3 promotes cell proliferation by activating the NF-κB/cyclin D1 signaling pathway in colorectal cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(2): 196-203. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.034.

[15] Qian W, Zhang Z, Peng W, et al. CDCA3 mediates p21-dependent proliferation by regulating E2F1 expression in colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2018, 53(5): 2021-2033. doi: 10.3892/ijo.2018.4538.

[16] 王 芹，孙正魁. CDCA3在肿瘤领域的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(6): 1043-1044. doi: 10.3969/j.issn.1001-5930.2018.06.053.

[17] Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma [J]. Cells, 2020, 9(12): 2648. doi: 10.3390/cells9122648.

[18] Gobin E, Bagwell K, Wagner J, et al. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 581. doi: 10.1186/s12885-019-5768-0.

[19] Wang X, Yang B, She Y, et al. The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(9): 7790-7799. doi: 10.1002/jcb.27158.

[20] Shash LS, Ibrahim RA, Elgohary SA. E-cadherin and N-cadherin immunohistochemical expression in proliferating urothelial lesions: potential novel cancer predictive EMT profiles[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2021, 29(9): 657-666. doi: 10.1097/PAI.0000000000000940.

（编辑：贺绍梅）