

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00864

· 论 著 ·

钙激活性中电导钾离子通道在子宫内膜癌细胞周期中的调控作用

王朕华¹, 丰有吉^{2*}, 张菊新¹, 王悦¹

1. 河南省人民医院妇产科, 郑州 450003

2. 上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院妇产科, 上海 200080

[摘要] **目的** 探讨子宫内膜癌组织中钙激活性中电导钾离子通道(KCa3.1)的表达变化及其在子宫内膜癌细胞周期中的调控作用。**方法** 应用蛋白质印迹法、Real-time PCR技术检测25例正常子宫内膜、26例非典型增生的子宫内膜和25例子宫内膜癌组织中KCa3.1蛋白和mRNA的表达;用克霉唑阻断剂和siRNA干扰两种方法,阻断KCa3.1的作用后,观察子宫内膜癌细胞HEC-1A细胞周期的变化。**结果** 子宫内膜癌组织中KCa3.1 mRNA和蛋白的表达水平明显高于非典型增生的子宫内膜和正常子宫内膜组织($P<0.01$);克霉唑呈剂量依赖性方式将细胞阻滞于 $G_0\sim G_1$ 期,使S期细胞减少;转染siRNA细胞KCa3.1蛋白表达量为转染阴性对照siRNA细胞的 $(40.27\pm 6.09)\%$,与转染阴性对照siRNA的HEC-1A细胞比较,转染KCa3.1 siRNA可将细胞阻滞于 $G_0\sim G_1$ 期,使S期细胞减少;同时降低cyclin D1蛋白的表达。**结论** 子宫内膜癌组织中KCa3.1的表达增高,KCa3.1可能通过影响cyclin D1蛋白表达参与子宫内膜癌细胞周期调控。

[关键词] 子宫内膜肿瘤;钙激活钾通道;小分子干扰RNA;细胞周期**[中图分类号]** R 737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0864-05

Intermediate-conductance- Ca^{2+} activated K^+ channels are involved in regulating cell cycle of endometrial cancer cells

WANG Zhen-hua¹, FENG You-ji^{2*}, ZHANG Ju-xin¹, WANG Yue¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Henan Provincial Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of intermediate-conductance- Ca^{2+} -activated K^+ (KCa3.1) channels in endometrial cancer tissues and their role in regulating cell cycle of endometrial cancer cells. **Methods** Real-time PCR and Western blotting analysis were used to examine the expression of KCa3.1 channels in 25 normal endometrial specimens, 26 atypical hyperplasia specimens and 25 endometrial cancer specimens. Clotrimazole (an inhibitor of KCa3.1 channel) and RNA interference(RNAi) targeting KCa3.1 channel were used to block KCa3.1, so as to explore the role of KCa3.1 channels in regulating the cell cycle of endometrial cancer cells. **Results** The expression levels of KCa3.1 mRNA and protein in endometrial carcinoma were significantly higher than those in the typical hyperplasia endometria and normal endometrial tissues ($P<0.01$). Clotrimazole retarded cell cycle at $G_0\sim G_1$ phase in a dose-dependent manner and reduced HEC-1-A cells of S phase. KCa3.1 protein level in cells transfected with target-KCa3.1 siRNA was only $(40.27\pm 6.09)\%$ that of cells transfected with negative control. Transfection with target-KCa3.1 siRNA also retarded cell cycle of HEC-1A cells at $G_0\sim G_1$ phase, and reduced cells of S phase compared with negative control siRNA. Meanwhile, transfection with target-KCa3.1 siRNA also reduced cyclinD1 protein expression in HEC-1A cells. **Conclusion** The expressions of KCa3.1 channels are elevated in endometrial cancer tissues, and KCa3.1 channels may influence cell cycle through regulating cyclinD1.

[Key words] endometrial neoplasms; calcium-activated potassium channels; small interfering RNA; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8):864-868]

子宫内膜癌是妇科常见的恶性肿瘤,严重威胁着妇女的身心健康^[1]。随着全球妇女人均寿命的延

长,加上雌激素替代疗法的日益增多等因素,子宫内膜癌的发生率呈上升趋势^[2-3],但其发病机制不

[收稿日期] 2011-03-14 **[接受日期]** 2011-05-23**[基金项目]** 高等学校博士学科点专项科研基金(20050246028),上海市卫生局科研课题计划(054003)。Supported by Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China(20050246028) and Research Program of Shanghai Municipal Health Bureau(054003)。**[作者简介]** 王朕华,博士,主治医师。E-mail: wzh0371@sohu.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: fengyj4806@sohu.com

详。近年的研究发现包括钾离子通道在内的离子通道参与细胞周期的调控^[4-6]。本研究应用蛋白质印迹法和 Real-time PCR 方法检测了子宫内膜癌组织中钙激活性中电导钾离子通道 (intermediate-conductance-Ca²⁺-activated K⁺ channels, KCa3.1) 的表达变化,并使用药物阻滞和 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术阻断 KCa3.1 的作用,观察子宫内膜癌细胞 HEC-1A 细胞周期的变化,探讨 KCa3.1 在细胞周期中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 组织标本 收集 2004 年 9 月至 2006 年 12 月复旦大学附属妇产科医院、河南省人民医院和上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院经手术治疗的子宫内膜癌患者组织标本 25 例和非典型增生子宫内膜患者组织标本 26 例,另取同期因良性疾病(子宫平滑肌瘤)手术的患者的正常子宫内膜组织标本 25 例作为对照,其中增殖期内膜 17 例,分泌期内膜 8 例。所有患者均经病理诊断证实。患者年龄为 40~55 岁,中位数年龄 49 岁。施术前未经放疗和化疗及孕激素治疗。应用蛋白质印迹法和 Real-time PCR 方法检测组织标本中 KCa3.1 的表达。

1.2 细胞株 子宫内膜癌细胞株 HEC-1A 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中。

1.3 HEC-1A 细胞的药物干预实验 将 HEC-1A 细胞分为两组:研究组与对照组。为观察不同浓度的 KCa3.1 通道阻断剂克霉唑对 HEC-1A 细胞周期的影响,研究组细胞分别以不同浓度(5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)的克霉唑(美国 Sigma 公司产品)刺激 72 h,对照组则加入相同体积的二甲亚砷(克霉唑的溶剂)。把细胞充分消化后过滤,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 KCa3.1 siRNA 的合成及转染 KCa3.1 siRNA 的序列为 5'-GCC GUG CGU GCA GGA UUU A-3'(正义链)、5'-UAA AUC CUG CAC GCA CGG C-3'(反义链),阴性对照 siRNA 的序列为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3'(正义链)、5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-3'(反义链),均由上海吉凯生物公司合成。分别将 KCa3.1 siRNA 和阴性对照 siRNA,用脂质体 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司产品)转染 HEC-1A 细胞,转染步骤完全按照 Lipofectamine2000 提供的操作步骤进行。

采用蛋白质印迹法检测 KCa3.1 蛋白的表达,利用流式细胞仪检测细胞周期。

1.5 Real-Time PCR 技术检测 KCa3.1 mRNA 的表达 本实验应用 DNA 结合染色法,这种方法使用一种可与双链 DNA 结合的荧光染料 (SYBR Green)。(1)提取总 RNA:组织标本和子宫内膜癌细胞按 TRIzol 一步法提取总 RNA (TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司),然后用分光光度计测定总 RNA 的浓度,并经电泳证实其为有清晰的 18S 和 28S 电泳条带的 RNA。(2)合成 cDNA:按反转录试剂盒(大连宝生物工程公司产品)说明书操作合成 cDNA。KCa3.1 引物序列:上游为 5'-GCA GGA ACT GGC ATT GGA CT-3',下游为 5'-CTG ATC GTG CAT TTA ACC AGG A-3';内参照 GAPDH 引物序列:上游为 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3',下游为 5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3';引物均由上海吉凯生物公司合成。荧光染料:SYBR Green。(3)Real-time PCR 反应:DNA 模板溶液 1 μl ,10 \times PCR 缓冲液 5 μl ,上、下游引物各 0.5 μl ,荧光染料(SYBR Green) 1 μl ,dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μl ,MgCl₂(25 mmol/L) 4 μl ,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μl) 0.5 μl ,剩余用灭菌水补齐。PCR 反应采用两步法进行,反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后 92 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共进行 40 个循环。程序设定在每个循环的第 2 个步骤收集荧光信号,最后由软件自动生成荧光动力学曲线图和标准曲线图。

1.6 蛋白质印迹法检测 KCa3.1 和 Cyclin D1 蛋白的表达 参考 Harlow 等^[7]方法并加以改进。组织标本和 HEC-1A 细胞中加入细胞裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清液。用 12%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,在半干转膜仪中把蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,一抗为兔多克隆 KCa3.1 抗体(美国 Sigma 公司产品)或鼠抗人 cyclin D1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品),二抗采用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品),经增强化学荧光发光法(ECL,英国 Amersham 公司产品)显影。洗膜重新标记内参照抗体 GAPDH(美国 Sigma 公司产品),过程同上,二抗采用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品)。将放射自显影条带进行扫描,出现目的条带

即作为蛋白的阳性表达,用 Image Quat5.2 分析软件对显影条带进行光密度值(D)的分析,将目的条带与 GAPDH 的 D 值的比值作为蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。KCa3.1 mRNA 和蛋白表达水平的比较采用独立样本的非参数检验,阻断剂和 siRNA 对细胞增殖的影响的比较采用单因素方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 KCa3.1 在子宫内膜癌、不典型增生子宫内膜和正常子宫内膜组织中的表达 子宫内膜癌组织中 KCa3.1 mRNA 和蛋白的表达水平高于不典型增生子宫内膜组织和正常子宫内膜组织,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 1 和图 2。

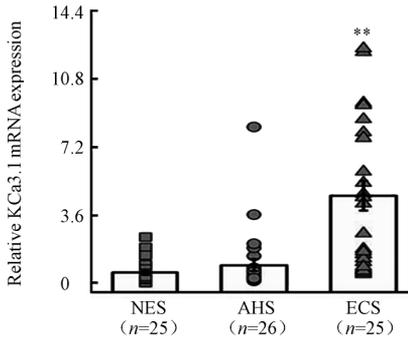


图 1 正常子宫内膜组织、不典型增生子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中 KCa3.1 mRNA 的表达

Fig 1 Examination of KCa3.1 mRNA levels in normal endometrial specimens, atypical hyperplasia specimens and endometrial cancer specimens by real-time PCR

The expression levels of KCa3.1 were determined by the Ct value of KCa3.1 normalized to that of GAPDH. NES; Normal endometrial specimens, $n = 25$; AHS; Atypical hyperplasia specimens, $n = 26$; ECS; Endometrial cancer specimens, $n = 25$. ** $P < 0.01$ vs AHS or NES

2.2 KCa 3.1 阻断剂对 HEC-1A 细胞周期的影响 不同浓度克霉唑作用 72 h,克霉唑呈剂量依赖的方式干扰 HEC-1A 细胞周期: $G_0 \sim G_1$ 期增加,S 期减少。5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用下的细胞周期的 $G_0 \sim G_1$ 明显高于对照组(即 0 浓度),S 期少于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

2.3 转染 KCa3.1 siRNA 后 HEC-1A 细胞 KCa3.1 蛋白的表达及对细胞周期的影响 与转染阴性对照 siRNA 的细胞比较,转染 KCa3.1 siRNA 的细胞 KCa3.1 蛋白为前者的 $(40.27 \pm 6.09)\%$;转染

KCa3.1 siRNA 与对照组相比,细胞周期的 $G_0 \sim G_1$ 期增加,S 期减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。

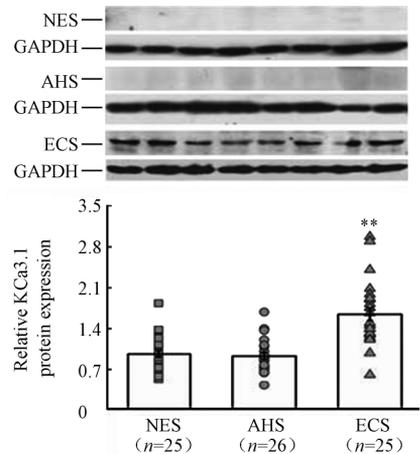


图 2 正常子宫内膜组织、不典型增生子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中 KCa3.1 蛋白的表达

Fig 2 Examination of KCa3.1 protein levels in normal endometrial specimens, atypical hyperplasia specimens and endometrial cancer specimens by Western blotting analysis

Quantitative analysis of the protein levels of KCa3.1 normalized to those of GAPDH. NES; Normal endometrial specimens, $n = 25$; AHS; Atypical hyperplasia specimens, $n = 26$; ECS; Endometrial cancer specimens, $n = 25$. ** $P < 0.01$ vs AHS or NES

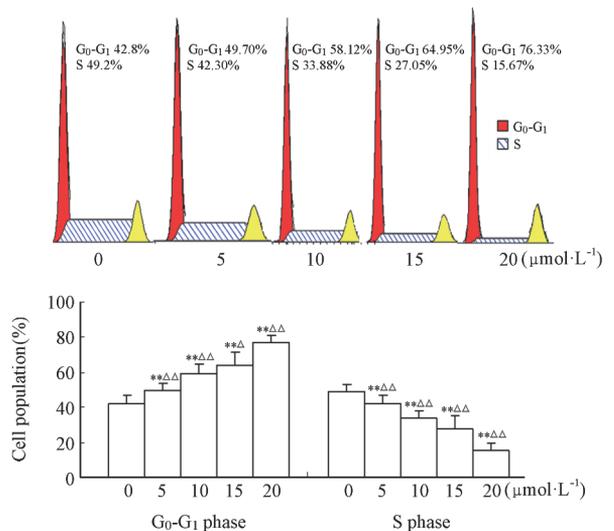


图 3 不同浓度阻断剂克霉唑对子宫内膜癌细胞周期的影响

Fig 3 Influence of different doses of clotrimazole on cell cycle of HEC-1-A cells

** $P < 0.01$ vs control($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs the previous group. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

2.4 转染 KCa3.1 siRNA 后 HEC-1A 细胞周期蛋白 cyclin D1 的表达 与转染阴性 siRNA 的细胞相

比, 转染 KCa3.1 siRNA 的细胞周期蛋白 cyclin D1 的表达水平降低, 为前者的 $(58.35 \pm 10.34)\%$, 见图 5。

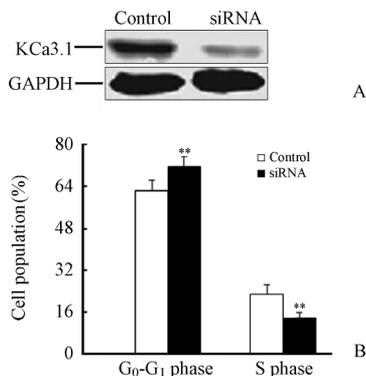


图 4 转染 KCa3.1 siRNA 后 HEC-1A 细胞 KCa3.1 蛋白的表达 (A) 及细胞周期的变化 (B)
Fig 4 Effect of KCa3.1 siRNA transfection on KCa3.1 protein expression (A) and on cell cycle (B)

* * $P < 0.01$ vs control. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

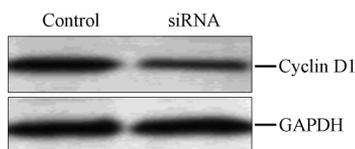


图 5 KCa3.1 siRNA 转染对子宫内膜癌细胞 HEC-1A 细胞周期蛋白 cyclin D1 的影响
Fig 5 Effect of KCa3.1 siRNA transfection on cyclin D1 protein expression in endometrial cancer cells

3 讨论

近年来, 在许多肿瘤组织以及来源于肿瘤的细胞系中均发现了钾离子通道基因的异常高表达, 而在正常组织或细胞中不表达或弱表达^[4-6,8]。从正常的子宫内膜细胞转化为子宫内膜癌细胞之间常伴随一系列的基因改变, 这个过程是否伴随细胞钾离子通道表达的改变或导致钾离子通道活性的改变, 目前尚不清楚。本研究应用蛋白质印迹法和 Real-time PCR 方法检测了正常子宫内膜组织、不典型增生子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中 KCa3.1 蛋白和 mRNA 的表达, 研究结果显示大部分正常子宫内膜和不典型增生子宫内膜组织中 KCa3.1 蛋白和 mRNA 不表达或弱表达, 而几乎所有的子宫内膜癌组织中 KCa3.1 蛋白和 mRNA 都表达且表达量明显高于正常子宫内膜组织和不典型增生子宫内膜组织。该结果与本课题的前一部分研究中 KCa3.1 蛋

白和 mRNA 表达基本一致, 前一部分研究同时发现 KCa3.1 与子宫内膜癌细胞的增殖有关; 阻断 KCa3.1 通道或抑制 KCa3.1 表达阻滞子宫内膜癌细胞的增殖^[9]; 本研究增加了不典型增生子宫内膜组织中 KCa3.1 的表达变化, 同时扩大了正常子宫内膜样本量, 结果显示正常子宫内膜组织和不典型增生子宫内膜组织中 KCa3.1 表达量远低于子宫内膜癌组织中 KCa3.1 的表达量。所有这些结果均提示子宫内膜癌组织中 KCa3.1 的高表达可能与子宫内膜癌的发生发展有关。

钾离子通道是细胞膜上最广泛最复杂的离子通道, 其存在于兴奋性细胞和非兴奋性细胞。在非兴奋性细胞上的钙、电压、ATP 依赖的钾离子通道参与细胞内的代谢生理活动^[10-11]。钙激活性钾通道根据分子生物学、单通道传导、门控的性质和药理特点分为大电导、中电导和小电导 3 种。中电导性钙激活钾通道的激活可导致细胞膜长期超极化, 形成细胞内外电位差, 这种电位差能促使对电位敏感的钙离子通过细胞膜进入细胞内^[4], 可能产生细胞内信号转导的级联反应, 对细胞的功能产生复杂的影响。钙激活性钾离子通道因其具有调节膜电位和细胞内钙离子浓度的功能, 故此类钾离子通道是细胞活动的重要调节者。在肌细胞的体外培养中, 加入转化生长因子 (TGF) 等因子, 通过有丝分裂原激活 Ras 蛋白/有丝分裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶 (Ras/mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase, Ras/MEK) 信号转导途径, 可使 KCa3.1 通道表达增加^[12]。结果提示 KCa3.1 通道可能是 TGF 介导的信号转导通路中的效应元件, 参与细胞有丝分裂的调控。而本研究发现: KCa3.1 的相对特异性阻断剂克霉唑呈剂量方式干扰子宫内膜癌细胞周期, 使 G₀~G₁ 期增加, S 期减少; KCa3.1 siRNA 可降低 KCa3.1 和 cyclin D1 蛋白的表达, 同时干扰子宫内膜癌细胞周期 (G₀~G₁ 期增加, S 期减少)。结果说明 KCa3.1 在子宫内膜癌细胞周期中具有重要的调节作用。

细胞周期的启动与进程受到 cyclin 和 CDK 基因的严格调控, cyclin D1 与 CDK4 的蛋白产物形成蛋白酶复合体, 主要参与细胞 G₁ 期限制点的调控, 决定着细胞是否能进入分裂周期, 所以 cyclin D1 是调节细胞周期的关键性蛋白^[12-13]。随着对正常细胞周期和肿瘤细胞周期的深入研究, 许多学者认为细胞周期的失控在肿瘤的发生中起着重要的作用。本

研究发现 KCa3.1 在子宫内膜癌的表达增高,且抑制 KCa3.1 表达的同时使 cyclin D1 表达降低,而 cyclin D1 是参与细胞周期 G₁/S 转换的重要正性调节因子,它过度表达使细胞周期 G₁/S 转换时间缩短,进而促进细胞周期的进程和细胞过度增殖,导致细胞癌变。说明在子宫内膜癌的发生中,KCa3.1 的高表达可能通过某种机制导致 cyclin D1 高表达,导致细胞周期紊乱。有学者采用分子生物学技术和膜片钳技术研究发现,处于 G 末期和 S 期的细胞 KCa3.1 通道表达量、KCa3.1 通道电流和细胞内钙离子比 G 早期的细胞多,而阻断 KCa3.1 通道,细胞处于去极化状态,细胞内钙离子浓度下调,细胞阻滞于 G₁ 早期^[5]。这些研究结果提示 KCa3.1 通道可能参与细胞周期及增殖的调控。本研究也初步证实了 KCa3.1 通道在子宫内膜癌细胞周期的调控中发挥重要作用。

子宫内膜癌组织中 KCa3.1 高表达,且其参与细胞周期的调控,其阻断剂作用于体外培养的肿瘤细胞,使肿瘤细胞周期受到很大程度干扰,这给临床治疗子宫内膜癌提供了新的思路。可以考虑把钾离子通道阻断剂作为一个辅助治疗^[14],使肿瘤细胞周期停滞于 G₀~G₁ 期,不再进行细胞分裂;同时随着基因技术的发展,可利用基因干扰技术抑制 KCa3.1 的表达,联合其他治疗方法达到治疗子宫内膜癌的目的。

[参考文献]

[1] Felix A S, Weissfeld J, Edwards R, Linkov F. Future directions in the field of endometrial cancer research: the need to investigate the tumor microenvironment[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2010, 31: 139-144.

[2] Wallace A E, Gibson D A, Saunders P T, Jabbour H N. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma[J]. J Endocrinol, 2010, 206: 141-157.

[3] Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 108 (3-5): 221-229.

[4] Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S. Blockage of intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro* [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65: 630-638.

[5] Chang K W, Yuan T C, Fang K P, Yang F S, Liu C J, Chang C S, et al. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2003, 32: 606-611.

[6] Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N. Functional and molecular identification of intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells; association with cell cycle progression[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287: C125-C134.

[7] Harlow E D, Lane D. Using antibodies: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Labour Perss, 1999: 233-345.

[8] Wang Z H, Shen B, Yao H L, Jia Y C, Ren J, Feng Y J, et al. Blockage of intermediate-conductance-Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits progression of human endometrial cancer[J]. Oncogene, 2007, 26: 5107-5114.

[9] 王朕华, 丰有吉, 苏敏, 易小芳. 钙激活性中电导钾离子通道在子宫内膜癌组织中的表达及其在细胞增殖中的作用[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42: 111-115.

[10] Faehling M, Koch E D, Raithel J, Trischler G, Waltenberger J. Vascular endothelial growth factor-a activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in human endothelial cells in culture[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33: 337-346.

[11] Roderick C, Reinach P S, Wang L, Lu L. Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K⁺ channel activity[J]. J Membr Biol, 2003, 196: 41-50.

[12] Peña T L, Chen S H, Konieczny S F, Rane S G. Ras/MEK/ERK up-regulation of the fibroblast KCa channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 13677-13682.

[13] Lange C, Huttner W B, Calegari F. Cdk4/cyclin D1 overexpression in neural stem cells shortens G₁, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5: 320-331.

[14] Chou C C, Lunn C A, Murgolo N J. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008, 8: 179-187.

[本文编辑] 孙岩