

Kiss-1抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭的作用机制

宋欧诣, 王 丽, 江 速, 周金红, 杨步琴

广东省深圳市宝安区人民医院, 广东 深圳

收稿日期: 2022年4月27日; 录用日期: 2022年5月21日; 发布日期: 2022年5月30日

摘 要

目的: 研究kiss-1基因在宫颈癌SiHa细胞增殖活力和侵袭迁徙能力中发挥的作用机制, 以便为宫颈癌的治疗提供新的靶点。方法: 选取kiss-1基因过表达后稳定转染SiHa宫颈癌细胞。本实验分为3组。1) 空白组为常规宫颈癌SiHa细胞; 2) 空载体组为转染空载体的宫颈癌SiHa细胞; 3) 过表达组为转染稳定kiss-1基因的宫颈癌SiHa细胞。Western blot法分析3组kiss-1基因蛋白的表达量差异, CCK-8测出3组细胞增殖活力, Transwell模型测3组细胞侵袭能力和转移能力。结果: 过表达组kiss-1基因蛋白表达量最高, 过表达组中Ecadherin的表达是明显上调($P < 0.05$), 相反Vimentin的表达明显下调($P < 0.05$)。转染kiss-1基因的过表达组细胞增殖活力明显低于其他两组($P < 0.05$), 尤其在12小时的穿膜细胞个数计数方面, 转染kiss-1基因过表达组的个数显著高于其他两组($P < 0.05$)。转染kiss-1基因的过表达组可明显的抑制宫颈癌SiHa细胞的侵袭能力和转移能力。结论: kiss-1基因过表达能显著抑制宫颈癌疾病侵袭转移。

关键词

Kiss-1基因, 宫颈癌, 侵袭, 转移

Mechanism of Kiss-1 Inhibiting Proliferation and Invasion of Cervical Cancer Cells

Ouyi Song, Li Wang, Su Jiang, Jinhong Zhou, Buqin Yang

Bao'an District People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen Guangdong

Received: Apr. 27th, 2022; accepted: May 21st, 2022; published: May 30th, 2022

Abstract

Objective: To study the mechanism of Kiss-1 in the proliferation and invasion of cervical cancer SiHa cell, and analyze the relative mechanism to supply effective therapy targets to cervical cancer.

Methods: Kiss-1 over expression plasmid was transfected into cervical cancer cell lines of SiHa. There were three groups. 1) SiHa control; 2) Treated with empty vector; 3) Treated with kiss-1 gene vector. Western blot analysis of three groups kiss-1 gene protein expression, cell proliferation viability was measured by CCK-8, and cell invasion ability and metastasis ability in the transwell model. **Results:** After transfection of pEGFPC1/Kiss-1 into cervical cancer cell lines of SiHa (over-express group), the protein of kiss-1 was highest, the expression of E-cadherin was significantly higher ($P < 0.05$); however, the expression of Vimentin was significantly lower than other groups ($P < 0.05$). Migration ability of the cells in over-expression group was decreased than SiHa control ($P < 0.05$). The migrating cells were obviously decreased than SiHa control at 12 h after transfection of pEGFPC1/Kiss-1 into SiHa cells ($P < 0.05$). Over-express group of Kiss-1 could decrease the invasion ability and metastasis ability of cervical cancer SiHa. **Conclusion:** Over-express of Kiss-1 gene could decrease the potential of invasion and metastasis of cervical cancer.

Keywords

Kiss-1, Cervical Cancer, Invasion, Migration

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

宫颈癌是女性恶性肿瘤的第二大杀手，近些年其发病率趋于年轻化，病死率也处于上升态势[1]，而晚期宫颈癌的预后差是死亡率高的最主要因素。所以宫颈癌疾病的发生发展，逐渐成为临床医生的研究目标，其中侵袭转移成了重中之重[2] [3]。目前，宫颈癌疫苗的广泛应用提供预防策略。但仍有宫颈癌晚期患者预后极差，生活质量低下等问题有待解决，宫颈癌侵袭转移与预后存在正相关，现阶段对于宫颈癌侵袭转移方面的研究尚无定论。1996年 Lee 找到 kiss-1 基因，它分离自黑色素瘤细胞，至此一个新的肿瘤抑制基因诞生，它分子量为 15.4 KD，且位于染色体 1q32，共有 771 个碱基单位组成，编码第 164 个氨基酸单位残基，也称作转移抑素(metastin) [4] [5] [6]。多篇国外文献中提及 KiSS-1 基因在恶性肿瘤中有显著抑制作用，尤其体现在肿瘤的侵袭转移过程中的抑制作用，kiss-1 最为一个新的肿瘤抑制基因在多个领域已被证实其抑制作用[7] [8] [9] [10] [11]。然而 Kiss-1 基因在宫颈癌中的抑制作用一直鲜有人探讨研究。本文旨在研究过表达 Kiss-1 基因对宫颈癌 SiHa 细胞侵袭和转移的影响，并进一步探讨其抑制肿瘤细胞的工作机制，为 kiss-1 成为新的靶向治疗提供理论依据。本次研究经医院伦理委员会批准。

2. 资料与方法

2.1. 细胞培养

使用购自于北京中国科学院细胞库的宫颈癌细胞 SiHa，用百分之十的胎牛血清和 100 U/ml 青霉素链霉素的培养基进行宫颈癌 SiHa 细胞培养，置于培养箱维持 37 摄氏度，每隔 1 天更换新鲜培养基。充分胰蛋白酶消化，并收集细胞进行传代。实验选取的细胞均保证为对数生长期的宫颈癌细胞。

2.2. 主要试剂

KISS-1、E-cadherin、Vimentin 及 β -actin 单克隆抗体均是美国 Santa Cruz 公司产品，碱性磷酸酶(AP)

标记鼠抗兔二抗 IgG 是美国 Jackson 公司产品。Transwell 6 孔板和 96 孔板均是美国 Corning 公司产品, PCR 试剂盒为美国 Qiagen 公司产品, 脂质体是美国 Invitrogen 公司产品, matrigel 胶是 BD 公司产品, PCR 引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。

2.3. 细胞分组

细胞分为 3 组: SiHa 细胞组(空白组)、转染空载体的 SiHa 细胞组(空载体组)及转染 Kiss-1 基因的 SiHa 细胞组(过表达组)。

2.4. 实验方法

1) 依据 kiss-1 (AY117143.1)基因序列, 引入上下游双酶切位点 *HinDIII* 和酶切位点 *BamH I*, 设计 kiss-1 基因全长, 并进行扩增引物 PCR。提取 SiHa 宫颈癌细胞系中总 RNA, 然后将 SiHa RNA 逆转录成 SiHa cDNA。PCR 反应条件为: 95 摄氏度维持 2 分钟, 94 摄氏度维持 30 秒, 63 度维持 30 秒, 82 度维持 1 分钟, 82 度维持 10 分钟, 总共为 30 个循环。使用 PCR 产物进行凝胶电泳, 使用 PCR 试剂盒纯化 PCR, 与 *HinDIII* 和 *BamH I* 酶切后的载体粘端先后进行连接, 然后转化并测序, 最终得到 pEGFPC1/kiss-1 过表达载体。kiss-1 全长表达引物序列如下: 上游: 5'-ggcagctactgcttttct-3', 下游: 5'-agtagcagctggcttctc-3'。将 pEGFPC1 (空载体组)、pEGFPC1/kiss-1 (过表达组)转入宫颈癌细胞 SiHa。以常规宫颈癌细胞 SiHa 作为空白组。

2) Western blot 方法检测 kiss-1 基因蛋白表达, 并提取 3 组 SiHa 细胞蛋白质。分别用 3 组 SiHa 细胞 50 μg 蛋白样品, 用百分之十的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 转移相应的蛋白到 PVDF 膜上, 用百分之五的脱脂奶维持 37 度封闭 1 至 1.5 小时, 3 组分别加相应的一抗维持 4 摄氏度进行孵育过一整夜。取百分之 0.05 Tween20 的缓冲液一共充分漂洗 3 次, 每次维持 5 分钟, 用碱性磷酸酶(AP)来标记二抗(浓度 1:1000 稀释)维持 37 摄氏度情况下共孵育 1 小时, TBST 洗膜 3 次, 每次维持 10 分钟, 然后加入底物, 采用(NBT 或者 BCIP)显色, 使用化学发光法和 ChemiImager 5500 软件进行结果分析, 每组别需要重复 3 次。

3) 将 3 组宫颈癌 SiHa 细胞用胰酶消化后分别计数, 细胞需要维持在 1×10^5 个每毫升的密度, 在 96 孔板中加入 100 μl 宫颈癌 SiHa 细胞悬液, 保证每孔至少有 1×10^4 个宫颈癌 SiHa 细胞, 切记每组需要设计平行副孔, 并且至少需要设计 5 个孔, 分别在不同的时间点(24 h、36 h、48 h、60 h、72 h)进行检测, 置于避光的条件, 然后加 10 μl 的 CCK-8 检测液, 再次置于避光条件孵育时间维持在 2 h, 用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度 A 值, A 值的大小为细胞增殖活力。

4) Transwell 模型细胞: 采用稀释的 matrigel 胶平铺于 Transwell 上室, 待风干, 然后加无血清培养液于 Transwell 下室, 避免有气泡生成, Transwell 上室每孔加 200 μl , 密度要求含 10,000 个细胞, 各组再设 3 个复孔, 持续培养细胞 24 h, 取出滤膜后用多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗膜 2 次, 待风干后采用结晶紫染色再持续培养细胞 15 min, PBS 再次彻底洗涤 2 次, 待滤膜完全干后用棉签轻拭上室宫颈癌 SiHa 细胞, 随机选取 200 倍显微镜下中心 5 个视野, 计穿过滤膜的宫颈癌 SiHa 细胞数, 细胞个数为侵袭和迁移能力。每组设置为 3 个平行样本, 每组均需要重复 3 次, 最后取宫颈癌 SiHa 细胞数的平均值。

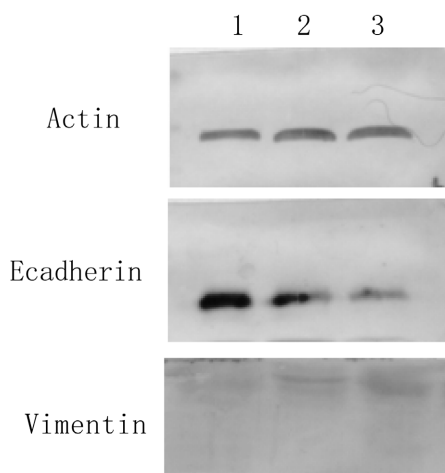
2.5. 统计学处理

使用 spss21.0 统计软件分析, 各组样本均数比较均采用单因素方差分析, 所有实验结果均表示为均值 \pm 标准差, 组间两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 转染 kiss-1 后相关基因蛋白的改变

选取 β -actin 为内参, 转染 kiss-1 基因过表达 kiss-1 后宫颈癌 SiHa 细胞中 Ecadherin 的表达较空载体组有明显上调, 同时 Vimentin 的表达则明显显著下调。(P < 0.05) 见图 1, 表 1。



1 为过表达组, 2 为空载体组, 3 为 SiHa 空白组。

Figure 1. Western blot was used to detect the protein expression of Kiss-1, e-cadherin and Vimentin in transfected Kiss-1 overexpression group

图 1. Western blot 法检测转染 kiss-1 过表达组对 kiss-1、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

Table 1. Protein expression of Kiss-1, E-cadherin and vimentin in different treatment groups of SiHa cells ($\bar{x} \pm s$)

表 1. SiHa 细胞不同处理组 kiss-1、E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	kiss-1	Ecadherin	Vimentin
空白组	0.743 \pm 0.080	1.280 \pm 0.102	1.250 \pm 0.087
空载体组	0.762 \pm 0.074	1.236 \pm 0.097	1.292 \pm 0.102
过表达组	1.491 \pm 0.102	1.518 \pm 0.088	0.466 \pm 0.093

3.2. Kiss-1 对 SiHa 细胞的增殖能力的影响

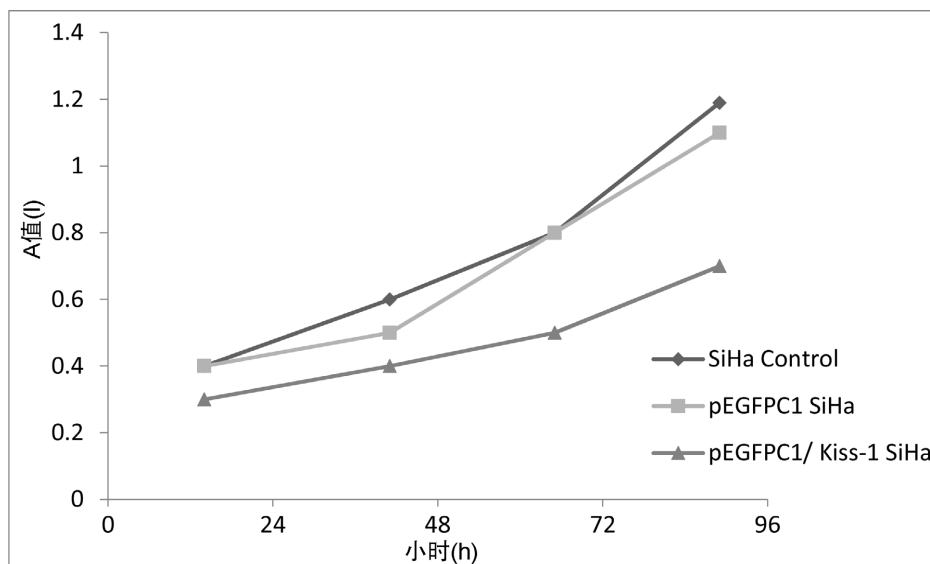
转染 kiss-1 后过表达组细胞增殖活力低于空载体组和 SiHa 空白组(P < 0.05), 而空载体组和 SiHa 空白组细胞增殖活力比较差异无统计学意义(P > 0.05), 见图 2。

3.3. 肿瘤细胞迁移能力

以穿过 Matrigel 侵袭膜的细胞平均数表示肿瘤细胞的体外侵袭能力。图 3 示 SiHa 细胞中转染 kiss-1 过表达组与空载体组相比, 穿膜细胞数明显减少。SiHa 细胞空白组、空载组及过表达组, 12 h 穿膜细胞数分别为 275 \pm 11、269 \pm 15、115 \pm 7, 前两组细胞数无显著性差异, 转染 kiss-1 过表达组与前两组相比有显著性差异(P < 0.05), 见图 3。

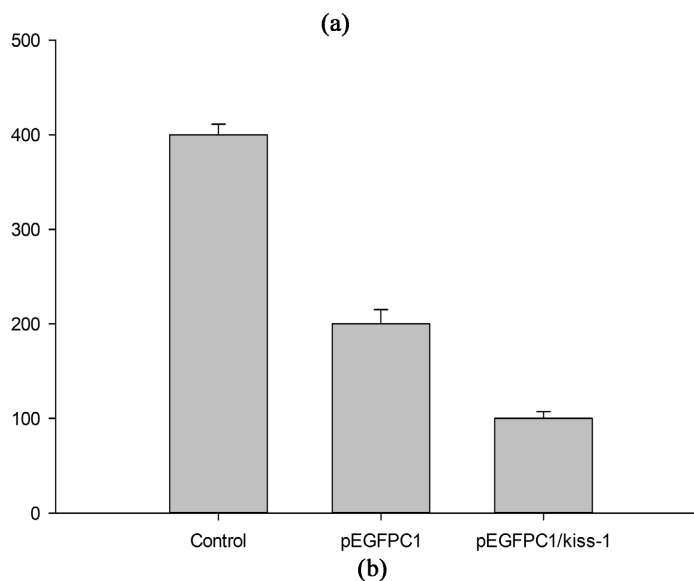
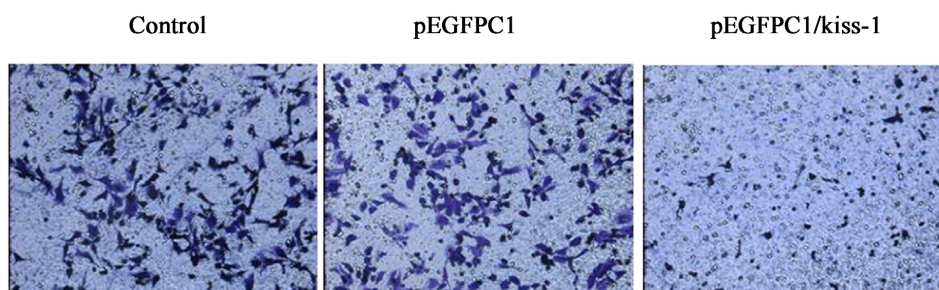
4. 讨论

上皮细胞向间质细胞的转化过程称为 EMT, 整个过程中随着细胞极性消失和黏附性减弱, 而且其丝



pEGFPC1 (空载体组)、pEGFPC1/ kiss-1 (过表达组)、SiHa 细胞 Control (空白组)。

Figure 2. The proliferation activity of cells in each group at different times was detected by CCK-8 method
图 2. CCK-8 法检测各组细胞不同时间的增殖活力



pEGFPC1 (空载体组)、pEGFPC1/kiss-1 (过表达组)、SiHa 细胞 Control (空白组)。

Figure 3. Transwell model reflects the invasion and metastasis ability of SiHa cervical cancer cells in each group
图 3. Transwell 模型反映各组宫颈癌细胞 SiHa 侵袭转移能力

状肌动蛋白重新排列, 丝状和片状伪足形成从而获得迁移与侵袭的能力, 进而最终称为间质细胞。肿瘤细胞的侵袭和转移已经在多项研究中证明与细胞间 EMT 相关[12] [13] [14] [15]。EMT 过程中关键性因素的 E-cadherin 与 Vimentin 呈负相关。因此, 本研究着重讨论 kiss-1 与宫颈癌侵袭转移之间的关系。我们成功构建了 kiss-1 过表达载体, 并成功转染宫颈癌细胞系 SiHa, E-cadherin 表达明显上调, Vimentin 是间质细胞的运动能力强弱。因此 Vimentin 表达明显下调, Transwell 模型是评估侵袭与转移较为经典的方法。通过实验证明: 过表达 kiss-1 可以抑制宫颈癌细胞的运动侵袭能力, 从而抑制宫颈癌转移的作用, 这与其在大肠癌组织及前列腺癌等多种癌细胞中的作用一致。这为 kiss-1 基因成为防治宫颈癌转移的治疗的新靶点提供了理论基础, 它天然的无毒性或将成为新的抗癌药物[16] [17] [18] [19]。

未来在裸鼠模型上可以进一步验证 kiss-1 基因在哺乳动物的宫颈癌转移的过程, 选用更接近人类的裸鼠敲基因模型更直观, 更能验证试验的有效性。Kiss-1 基因未来或可成为真正防治宫颈癌转移的靶基因。

基金项目

深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2019JD030)。

参考文献

- [1] Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., *et al.* (2016) Cancer Statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 115-132. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [2] Dyer, B.A., Zamarin, D., Eskandar, R.N. and Mayadev, J.M. (2019) Role of Immunotherapy in the Management of Locally Advanced and Recurrent/Metastatic Cervical Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, **17**, 91-97. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.7108>
- [3] Park, K.J., Braschi-Amirfarzan, M., DiPiro, P.J., *et al.* (2016) Multimodality Imaging of Locally Recurrent and Metastatic Cervical Cancer: Emphasis on Histology, Prognosis, and Management. *Abdominal Radiology (New York)*, **41**, 2496-2508. <https://doi.org/10.1007/s00261-016-0825-5>
- [4] 乔友林. 中国宫颈癌防治任重而道远[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(10): 721-723.
- [5] 陈春林, 黎志强. 加强子宫颈癌患者诊治的全程管理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(1): 18-24.
- [6] Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., *et al.* (1996) KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **88**, 1731-1737. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.23.1731>
- [7] Lee, J.H. and Welch, D. (1997) Suppression of Metastasis in Human Breast Carcinoma MDA-MB-435 Cells after Transfection with the Metastasis Suppressor Gene, Kiss-1. *Cancer Research*, **57**, 2384-2387.
- [8] 姜海斌, 王景广, 杨明, 韩双双, 刘德华, 于卫芳. Kiss-1、Kiss-1R 蛋白在胃腺癌中的表达及临床意义[J]. 河北医科大学学报, 2018(5): 514-518.
- [9] 胡潇滨. Kiss-1 基因抑制胃癌脏器转移的机制研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [10] 徐唯嘉, 王家宏. KISS-1 基因相关研究进展[J]. 系统医学, 2019(1): 192-195.
- [11] 李颖, 王瑚. KiSS1 蛋白和 MMP-2 在宫颈癌组织中的表达及诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2018(3): 460-461.
- [12] Cao, R.L., Shao, J.L., Hu, Y.B., *et al.* (2021) Correction to: MicroRNA-338-3p Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and EMT in Osteosarcoma Cells by Targeting Activator of 90 kDa Heat Shock Protein ATPase Homolog. *Cancer Cell International*, **21**, 560. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02283-2>
- [13] Saitoh, M. (2018) Involvement of Partial EMT in Cancer Progression. *Journal of Biochemistry*, **164**, 257-264. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>
- [14] Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D. and Gilles, C. (2017) EMT and Inflammation: Inseparable Actors of Cancer Progression. *Molecular Oncology*, **11**, 805-823. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12095>
- [15] Pastushenko, I. and Blanpain, C. (2019) EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, **29**, 212-226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- [16] Huo, X., Zhang, L. and Li, T. (2018) Analysis of the Association of the Expression of KiSS-1 in Colorectal Cancer Tissues with the Pathology and Prognosis. *Oncology Letters*, **15**, 3056-3060. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7630>
- [17] Song, W.W., Gui, A.P., Li, W., Chen, H. and Li, J.M. (2017) Expressions of HIF-1 α and KISS-1 in Patients with Liver

-
- Cancer and Correlation Analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **21**, 4058-4063.
- [18] Shin, W.J., Cho, Y.A., Kang, K.R., Kim, J.H., Hong, S.D., Lee, J.I., Hong, S.P. and Yoon, H.J. (2016) KiSS-1 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Prognostic Significance. *APMIS*, **124**, 291-298.
<https://doi.org/10.1111/apm.12507>
- [19] Fratangelo, F., Carriero, M.V. and Motti, M.L. (2018) Controversial Role of Kisspeptins/KiSS-1R Signaling System in Tumor Development. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, **9**, Article No. 192.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00192>