

• 临床研究 •

# KIF4A 在卵巢癌中的预后、生物学功能及富集分析\*

冯嵩崑, 罗山晖, 王露玉, 季晨晨, 朱维培<sup>△</sup>

215000 江苏 苏州, 苏州大学附属第二医院 妇产科(冯嵩崑、罗山晖、王露玉、朱维培); 215000 江苏 苏州, 苏州大学 骨科研究所(季晨晨)

[摘要] 目的: 探讨驱动蛋白超家族成员 4A(kinesin family member 4A, KIF4A)与卵巢癌患者预后的关系, 对卵巢癌细胞生物学功能的影响, 以及功能富集分析。方法: 利用 TCGA(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中 372 例卵巢癌患者数据进行 KIF4A 基因与相关共表达基因的富集分析及 Kaplan-Meier 法预后分析。采用实时荧光定量 PCR 法(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)及 Western blot 检测多种卵巢癌细胞系中 KIF4A 的表达量。将三组 KIF4A-shRNA 分别转染至 KIF4A 相对表达量最高的细胞系。采用 RT-qPCR 及 Western blot 检测转染效果, 选取沉默效率最高的建立稳定沉默细胞。采用 MTT 实验、克隆形成实验检测细胞增殖情况, 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞的迁移能力, 流式细胞仪检测细胞凋亡和周期分布。结果: KIF4A 基因在卵巢癌临床样本中显著高表达( $P < 0.05$ ), 且 KIF4A 高表达组总生存期显著低于低表达组( $P < 0.01$ )。不同卵巢癌细胞株中的表达水平均高于正常人卵巢上皮细胞株 IOSE80( $P < 0.05$ ), 其中在 SKOV3 中表达最高。沉默 KIF4A 的表达能有效抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移能力( $P < 0.05$ ), 并促进卵巢癌细胞凋亡( $P < 0.05$ ), 并主要影响 G0/G1 期。基因富集分析显示 KIF4A 与 MYH11、ACTG2、HSPB6 等基因成负相关, 与 BUB1、CCNA2、MELK 等基因呈正相关。同时, KIF4A 在卵巢癌中与有丝细胞核分裂等功能功能相关, 并且可影响细胞周期等相关通路。结论: 沉默 KIF4A 基因可抑制卵巢癌细胞的增殖, 迁移能力并促进其细胞凋亡, 影响其细胞周期, 该基因有望成为卵巢癌治疗的新靶点。

[关键词] 卵巢癌; 驱动蛋白超家族成员 4A; 生物学功能; 预后分析; 基因富集

[中图分类号] R730.7; R737.31 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.04.005

引文格式: Feng SW, Luo SH, Wang LY, et al. KIF4A in prognosis and biological function of ovarian cancer and its enrichment analysis[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(4): 313-321. [冯嵩崑, 罗山晖, 王露玉, 等. KIF4A 在卵巢癌中的预后、生物学功能及富集分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(4): 313-321.]

## KIF4A in Prognosis and Biological Function of Ovarian Cancer and its Enrichment Analysis

Feng Songwei, Luo Shanhui, Wang Luyu, Ji Chenchen, Zhu Weipei

Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China (Feng Songwei, Luo Shanhui, Wang Luyu, Zhu Weipei); Orthopedic Institute, Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China (Ji Chenchen)

Corresponding author: Zhu Weipei, E-mail: zwp3333333@163.com

This study was supported by grants from Health Commission of Jiangsu (No. F201709).

[Abstract] Objective: To investigate the role of kinesin family member 4A (KIF4A) in prognosis of ovarian cancer patients, and its effect on biological function of ovarian cancer cells, and conduct its enrichment analysis. Methods: 372 ovarian cancer patients from TCGA database were selected for enrichment analysis of KIF4A gene and related co-expressed genes.

The prognosis of ovarian cancer patients was further investigated by using Kaplan-Meier method. Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and western blot were used to detect the expression of KIF4A in different ovarian cancer cells. Lentiviral vectors containing

[收稿日期] 2020-08-28 [修回日期] 2021-01-20

[基金项目] \*江苏省妇幼健康重点人才项目(编号:F201709)

[通讯作者] <sup>△</sup>朱维培, E-mail: zwp3333333@163.com

*KIF4A* -shRNA (sh-*KIF4A* -1, sh-*KIF4A* -2, sh-*KIF4A* -3) and sh-NC (the negative control) were prepared, and *KIF4A* -shRNA was transfected into SKOV3 cells with the highest relative expression of *KIF4A*. RT-qPCR and western blot were used to detect the transfection effect, and the vector with the highest silencing efficiency was selected to establish stable silent cells; MTT assay and clonogenic assay were used to detect cell proliferation; scratch assay and transwell migration assay were used to detect cell migration ability; and flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cycle distribution. **Results:** *KIF4A* was significantly over-expressed in ovarian cancer clinical samples ( $P < 0.05$ ), and the overall survival of the *KIF4A* high expression group was significantly lower than that of the *KIF4A* low expression group ( $P < 0.01$ ). The expression level of *KIF4A* in ovarian cancer cells was higher than that in human normal ovarian epithelial cell line IOSE80 ( $P < 0.05$ ), among which the expression was the highest in SKOV3 cells. Silencing the expression of *KIF4A* could effectively inhibit the proliferation and migration ability of ovarian cancer cells ( $P < 0.05$ ), promote the apoptosis of ovarian cancer cells ( $P < 0.05$ ), and mainly influence cell cycle in G0/G1 phase. Gene set enrichment analysis showed that *KIF4A* was negatively correlated with *MYH11*, *ACTG2*, *HSPB6*, and positively correlated with *BUB1*, *CCNA2*, and *MELK*. *KIF4A* was associated with mitotic nuclear division and other functions in ovarian cancer. And it could affect cell cycle and other related pathways. **Conclusion:** Silencing *KIF4A* gene can inhibit the proliferation, migration ability and promote the apoptosis of ovarian cancer cells, which is expected to become a new target for ovarian cancer treatment.

[**Key words**] Ovarian cancer; Kinesin family member 4A; Biological function; Prognostic analysis; Gene enrichment

在女性生殖器恶性肿瘤当中,卵巢癌的总死亡率排在首位,并且5年生存率仅为25%~30%<sup>[1]</sup>。绝大多数患者在早期没有症状,在确诊时已经处于晚期并伴转移。因此,探索卵巢癌新的诊断和治疗方法,对卵巢癌的治疗具有重大意义。

*KIF4A* 为驱动蛋白超家族成员之一,这些蛋白在细胞内微管转运和细胞分裂中起关键作用<sup>[2]</sup>。*KIF4A* 位于细胞质和细胞核中,被认为是肿瘤发生发展的重要因素<sup>[3]</sup>。*KIF4A* 基因在肿瘤中有着不同的作用,它在大多数肿瘤中作为原癌基因,如胶质母细胞瘤<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>和胰腺癌<sup>[6]</sup>。有趣的是,*KIF4A* 在胃癌中起着抑癌基因的作用<sup>[7]</sup>。近来的生物信息学研究表明,*KIF4A* 的表达在正常卵巢和肿瘤样本中存在显著差异,提示 *KIF4A* 可能与卵巢癌的发生发展有关<sup>[8]</sup>。然而,*KIF4A* 在卵巢癌中的潜在分子机制及基因功能研究尚未见相关报道。

本研究通过生物信息学方法对 *KIF4A* 在卵巢癌中进行基因富集分析,并进一步在高表达 *KIF4A* 的卵巢癌细胞系中沉默 *KIF4A* 基因,观察其对于肿瘤细胞的增殖、迁移、凋亡、周期分布等生物学功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

细胞系 A2780、HO-8910PM、COCl、SKOV3 和 IOSE80 购自中国科学院上海细胞生物所细胞库;培养基 RPMI 1640、胎牛血清、PBS、胰酶购自 Hyclone 公司;慢病毒干扰载体 sh-NC、sh-*KIF4A*-1、sh-*KIF4A*-2、sh-*KIF4A*-3 购自 GenePharma 公司;实时荧

光定量 PCR 相关试剂盒购自 TaKaRa 公司;lipolectamine™ 2000、TRIzol 及相关引物购自 Invitrogen 公司;兔抗人 KIF4 (ab122227)及鼠抗人 GAPDH (ab8245)均购自 Abcam 公司;Transwell 小室购自 Corning 公司;MTT 试剂盒,BCA 试剂盒,二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO)购自 Sigma 公司;凋亡试剂及细胞周期试剂盒购自杭州联科。

### 1.2 生物信息学分析

下载 TCGA 数据库(<http://portal.gdc.cancer.gov>)中 327 例卵巢癌患者的转录组数据,以中 *KIF4A* 表达量的中位值,将样本分为 *KIF4A* 高表达和低表达两个亚组,设置筛选条件为  $\log_{2}FC > 0.5$ ,  $P < 0.05$ ,筛选出高低亚组中上调及下调最明显的前 20 个基因进行基因表达热图和基因相关性分析热图的绘制,然后将这些相关基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。使用 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn>)检测卵巢癌及正常卵巢上皮组织中 *KIF4A* 的表达水平及 FIGO 分期情况。使用 KM-plotter 数据库(<http://www.kmplot.com/>)检测 *KIF4A* 表达量与卵巢癌患者总生存期(overall survival, OS)的关系,并显示  $P$  值,HR (95% CI)和生存曲线。以上数据库所有临床数据及转录组数据均基于 TCGA 数据库中的卵巢癌数据。使用人类蛋白质图谱数据库(HPA, <http://www.proteinatlas.org>)检测 *KIF4A* 基因在正常卵巢上皮及卵巢癌上皮组织的免疫组化染色情况。

### 1.3 细胞培养及转染

将细胞株接种于含有 FBS (10%) 和青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 RPMI-1640

培养基中,均在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,当汇合度达 90% 时进行传代培养。转染前,用磷酸盐缓冲盐水冲洗,采用携带 sh-NC、sh-KIF4A-1、sh-KIF4A-2、sh-KIF4A-3 的慢病毒对 KIF4A 相对表达量最多的细胞株进行转染。

#### 1.4 RT-qPCR 及 Western Blot

在 RT-qPCR 实验中,应用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,应用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录,SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒用于 RT-qPCR,采用荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件为 95℃ 30 s;60℃ 30 s,72℃ 60 s 反复 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算结果并绘制直方图。使用的引物序列是:KIF4A-F: 5'-TGAAGTCCAGTCGTC-3'; KIF4A-R: 5'-GCACTGATTACATTTCCC-3'; GAPDH-F: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAT-3'; GAPDH-R: 5'-GGCTGTTGT-CATACTTCTCATGG-3'。在 Western Blot 实验中,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,在 SDS-PAGE 胶的孔空中上样,电泳后转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 小时。然后将兔抗人 KIF4A 抗体(稀释 1:1 000)和 GAPDH 鼠抗人抗体(1:2 500)加入,并在 4℃ 下孵育过夜。使用 PBST 缓冲液洗膜,随后将二抗加入并在室温下孵育 1 小时,用 PBST 缓冲液洗涤后曝光显影。

#### 1.5 细胞增殖实验(MTT 法)和克隆形成实验

在 MTT 实验中,细胞培养 24 h、48 h、72 h 后加入 10 μL MTT(5 mg/mL)试剂,在 37℃ 下孵育 4 小时,加入 150 μL DMSO 后震荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 的吸光度下进行测量,用于分析细胞增殖情况。在克隆形成实验中,胰蛋白酶消化细胞后接种于 6 孔板中培养 3 周,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛室温下固定细胞 0.5 h。弃去固定液后结晶紫染色液染色 10 min,最后得到集落数。

#### 1.6 细胞迁移实验(Transwell 及划痕实验)

在 Transwell 小室迁移实验中,下室加 600 μL 含 10% FBS 的培养基。取对数生长期得细胞,用无血清的培养基进行重悬后取 3 × 10<sup>5</sup>/mL 的悬液加入上室。培养 48 h,用棉签擦去上室中的细胞后,使用 4% 的多聚甲醛将小室底部细胞固定 15 min,结晶紫避光染色 15 min,最后在光学显微镜下观察计数,随机选取五个视野进行细胞计数。在划痕实验中,PBS 冲洗悬浮细胞并将细胞以 2 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,用 200 μL 无菌移液枪头笔直的产生划痕伤口。划痕后 0 小时和 24 小时使用显微镜拍

摄汇合情况。

#### 1.7 细胞凋亡及细胞周期检测

将转染后的卵巢癌细胞 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,37℃ 培养 3 天进行 PBS 洗涤,洗涤后用不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)的胰蛋白酶进行消化,重悬于 PBS 然后离心收集,重复 3 次。凋亡:每管细胞加入 5 μL FITC annexin V 和 Propidium Iodide Staining Solution 避光孵育 30 分钟,至流式细胞仪中检测。周期:酒精固定后,10 μL 破膜剂及 1 mL PI(50 μL/mL)加入每管细胞后混匀,避光孵育 60 分钟,至流式细胞仪中检测。

#### 1.8 统计学分析

所有数据用均数 ± 标准差表示。两组间数据比较采用 *t* 检验;多组间计量比较采用单因素方差分析。使用 Graphpad Prism 5.0 绘制所有直方图和线图。实验部分统计均在 Graphpad Prism 5.0 及 SPSS 16.0 软件中进行,转录组数据在 R 3.6.1 中进行统计分析及绘图。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KIF4A 在卵巢癌中的基因富集分析

为了解 KIF4A 在卵巢癌中的调控机制及相关基因,基于 TCGA 数据库中转录组数据,筛选出高低亚组中上调及下调最明显的前 20 个基因进行表达热图和相关性分析热图的绘制(图 1A)。其中基因富集分析显示 KIF4A 与 MYH11、ACTG2、HSPB6 等基因成负相关,与 BUB1、CCNA2、MELK 等基因呈正相关(图 1B)。接下来将这些共表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。结果表明,KIF4A 在卵巢癌中具有有丝细胞核分裂,有丝分裂姐妹染色单体分离,细胞器裂变的功能。KEGG 通路富集结果显示,KIF4A 可能影响细胞周期,细胞黏附分子,血管平滑肌收缩等通路(图 1C、D)。

### 2.2 KIF4A 在卵巢癌中的表达情况

在不同细胞系中分别检测 KIF4A 的表达。RT-qPCR 的结果表明,与正常卵巢上皮细胞 IOSE80 相比,卵巢癌细胞株 A2780(5.532 ± 0.263),SKOV3(6.565 ± 0.224),HO-8910PM(4.868 ± 0.311),COC1(5.486 ± 0.458)中 KIF4A 的表达量差异具有统计学意义(*P* < 0.01)(图 2A);western blot 结果显示,卵巢癌细胞与正常卵巢上皮细胞相比,KIF4A 的蛋白表达水平显著增加,其差异均具有统计学意义(*P* < 0.01)(图 2B);因此,本研究选取 KIF4A 表达

相对最高的 SKOV3 细胞进行后续试验。与此同时, GEPIA 数据库中分析 *KIF4A* 在卵巢癌患者中的表达情况, *KIF4A* 基因在肿瘤组中同样高表达 ( $P < 0.01$ ); HPA 数据库中检索 *KIF4A* 基因在卵巢癌上皮细胞及正常卵巢上皮细胞的免疫组织化学法染色

情况, 结果显示卵巢癌上皮细胞中染色程度更强。

研究结果表明, *KIF4A* 在卵巢癌细胞系及临床样本中较正常组织相比, mRNA 及蛋白质表达水平均明显升高。

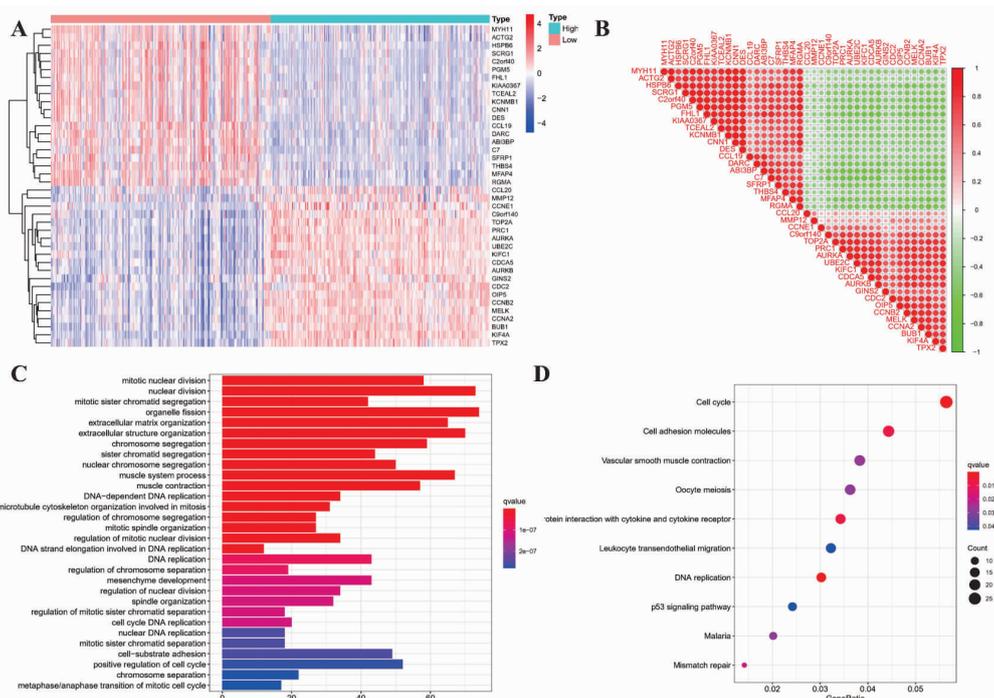


图 1 *KIF4A* 在卵巢癌中的基因富集分析

Figure 1. Gene Enrichment Analysis of *KIF4A* in Ovarian Cancer

A. Co-expressed genes among *KIF4A* high- and low- expression groups are shown in a heat map; B. Wound-healing assay for ovarian cancer cells transfected with sh-*KIF4A* and sh-NC control; C. Signaling pathways involved in co-expressed genes shown in KEGG results; D. Biological processes and molecular functions involved in co-expressed genes shown in GO analysis results. KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GO; Gene Ontology.

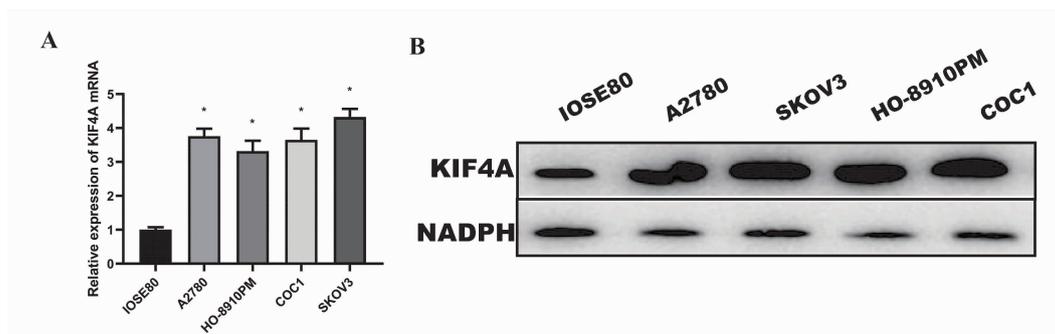


图 2 *KIF4A* 在卵巢癌中的表达情况

Figure 2. Expression of *KIF4A* in ovarian cancer

A. Expression of *KIF4A* mRNA in different ovarian epithelial cells; B. Expression of *KIF4A* proteins in different ovarian epithelial cells.

### 2.3 *KIF4A* 与卵巢癌患者预后的关系

在 Kaplan-Meier Plotter 数据库中查询 *KIF4A* 基

因表达情况与卵巢癌患者生存时间的关系, 发现 *KIF4A* 高表达组具有较短的总生存期 ( $HR = 1.570$ ,

$P < 0.01$ ), 见图 3A。在 GEPIA 数据库中查询 *KIF4A* 基因表达量与 FIGO 分期的关系, 结果显示 *KIF4A* 表达量在不同分期之间具有统计学差异 ( $F = 3.860, P < 0.05$ ), 见图 3B。

研究表明, 卵巢癌 *KIF4A* 高表达患者中与低表达患者相比, 具有更差的预后, 但卵巢癌患者中 *KIF4A* 的表达量随着临床分期的增高而减少。

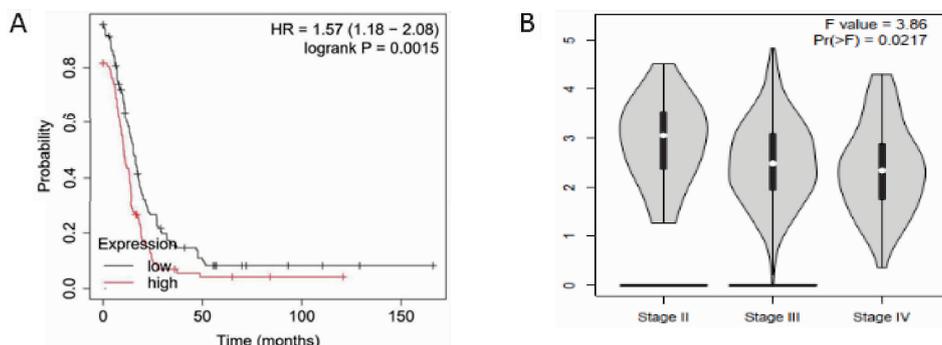


图 3 *KIF4A* 与卵巢癌患者预后的关系

Figure 3. Relationship between *KIF4A* and Prognosis of Ovarian Cancer Patients

A. Correlation between *KIF4A* expression and prognosis without distinguishing FIGO stage; B. Expression of *KIF4A* in different FIGO stages.

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

### 2.4 *KIF4A* 对卵巢癌细胞生长的影响

三组 sh-*KIF4A* 分别转染 SKOV3 细胞系, 结果显示 *KIF4A* 的 mRNA 和蛋白均表达明显下降 ( $P < 0.05$ ), 选择其中沉默效率最佳的 sh-*KIF4A*-3 进行后续实验, 见图 4。MTT 法测定结果显示, 转染 24 h、48 h 和 72 h 后, sh-*KIF4A* 组 OD 值 ( $0.239 \pm 0.020, 0.735 \pm 0.056, 1.611 \pm 0.001$ ) 显著低于 sh-

NC 组 ( $0.602 \pm 0.023, 1.632 \pm 0.025, 2.718 \pm 0.048$ ), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 5A)。克隆形成实验检测结果显示, sh-NC 组和 sh-*KIF4A* 组细胞克隆形成数分别为 ( $305 \pm 27$ ) 个和 ( $142 \pm 12$ ) 个, 差异有统计学意义 (图 5B)。

研究表明, sh-*KIF4A*-3 的沉默效果最好, 且沉默 *KIF4A* 可明显抑制卵巢癌细胞的生长。

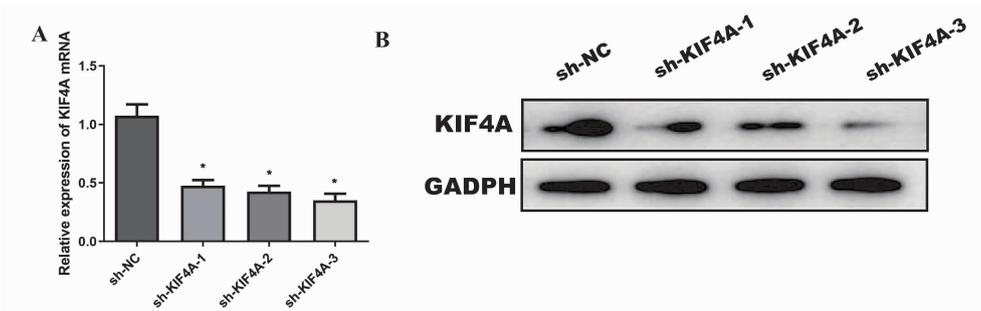


图 4 不同 sh-*KIF4A* 的转染效果

Figure 4. Transfection Effects of Different sh-*KIF4A*

A. Expression of *KIF4A* mRNA in different SKOV3 cell lines; B. Expression of *KIF4A* protein in different SKOV3 cell lines.

### 2.5 *KIF4A* 对卵巢癌细胞迁移的影响

Transwell 小室迁移实验研究 *KIF4A* 对迁移的影响, 结果显示沉默 *KIF4A* 的可以抑制卵巢癌细胞的迁移, sh-*KIF4A* ( $32.3 \pm 4.6$ ) 组中穿过小室滤过膜的细胞数明显少于 sh-NC 组 ( $56.3 \pm 3.8$ ), 差别有

统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 6A)。同时划痕实验同样证实了这一结论 (图 6B)。

研究表明, Transwell 及划痕试验均证明了沉默 *KIF4A* 可明显抑制卵巢癌细胞的迁移能力。

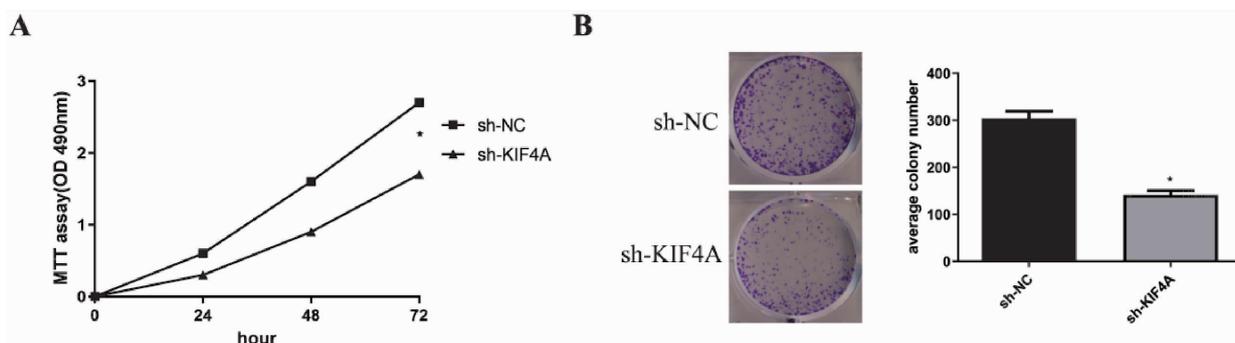


图 5 沉默 *KIF4A* 对卵巢癌细胞增殖的影响

Figure 5. Effect of *KIF4A* Silencing on the Proliferation of Ovarian Cancer Cells

A. Ovarian cancer cells were transfected with sh-*KIF4A* or sh-NC, and the absorption was detected at 0, 24, 48 and 72 h, respectively; B. Ovarian cancer cells transfected with sh-*KIF4A* and sh-NC control were assayed for clonogenicity in adherent cultures.

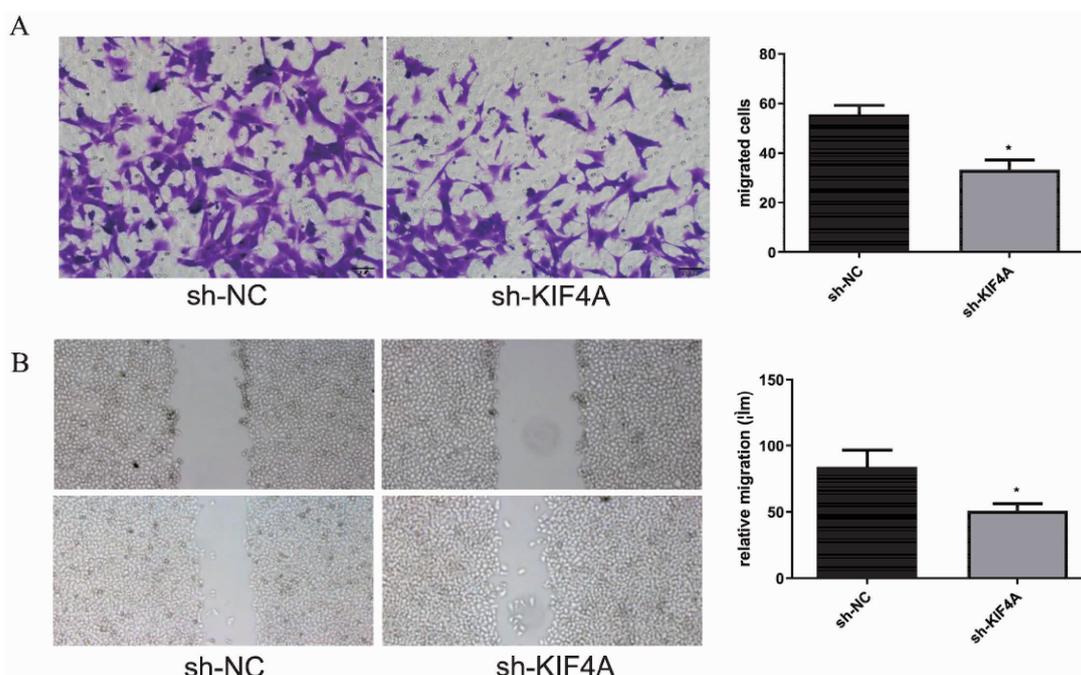


图 6 沉默 *KIF4A* 对卵巢癌细胞迁移的影响

Figure 6. Effect of *KIF4A* Silencing on the Migration of Ovarian Cancer Cells

A. Transwell migration assay for ovarian cancer cells transfected with sh-*KIF4A* and sh-NC control; B. Wound-healing assay for ovarian cancer cells transfected with sh-*KIF4A* and sh-NC control.

### 2.6 *KIF4A* 对卵巢癌细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, sh-*KIF4A* 组与 sh-NC 组的细胞凋亡率分别为  $5.832\% \pm 0.916\%$  和  $0.247\% \pm 0.017\%$ , sh-*KIF4A* 组凋亡率显著大于 sh-NC 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 7)。

研究表明, 沉默 *KIF4A* 可明显促进卵巢癌细胞的凋亡。

### 2.7 *KIF4A* 对卵巢癌细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示, sh-NC 组与 sh-*KIF4A* 组的细胞周期分布比例 G0/G1 期分别为

$68.124\% \pm 0.533\%$  和  $50.567\% \pm 0.753\%$ ; S 期分别为  $30.110\% \pm 1.235\%$  和  $38.443\% \pm 1.147\%$ ; G2/M 期分别为  $12.997\% \pm 0.012\%$  和  $12.843\% \pm 0.008\%$ 。除 G2/M 期外, 其余周期分布比例差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 8)。说明沉默 *KIF4A* 可影响卵巢癌细胞各周期分布比例, 主要影响 G0/G1 期。

研究表明, 沉默 *KIF4A* 可将卵巢癌细胞生长阻滞于 S 期并主要影响 G0/G1 期的分布。

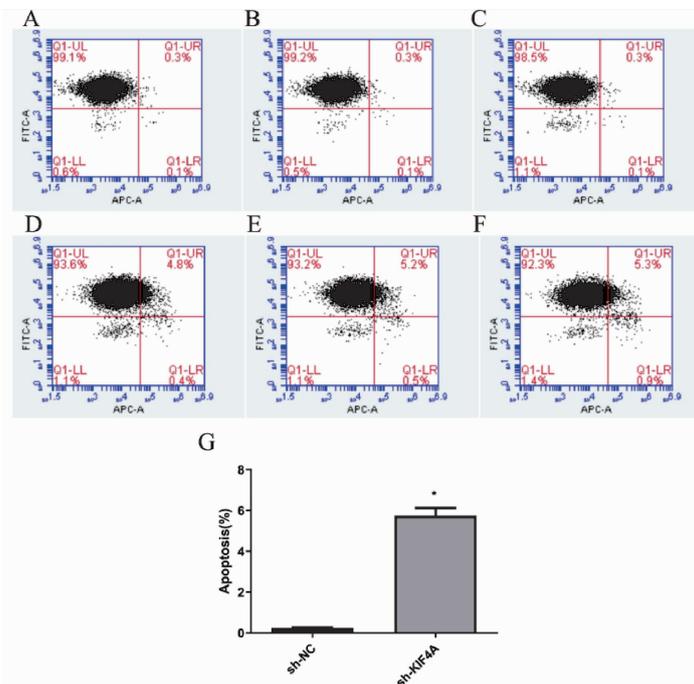


图 7 沉默 *KIF4A* 对卵巢癌细胞凋亡的影响

Figure 7. Effect of *KIF4A* Silencing on the Apoptosis of Ovarian Cancer Cells

The cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry (the control group as indicated by Panel A and D, the NC group as indicated by Panel B and E, the sh-*KIF4A* group as indicated by Panel C and F); Panel G shows the histogram of cell apoptosis rate.

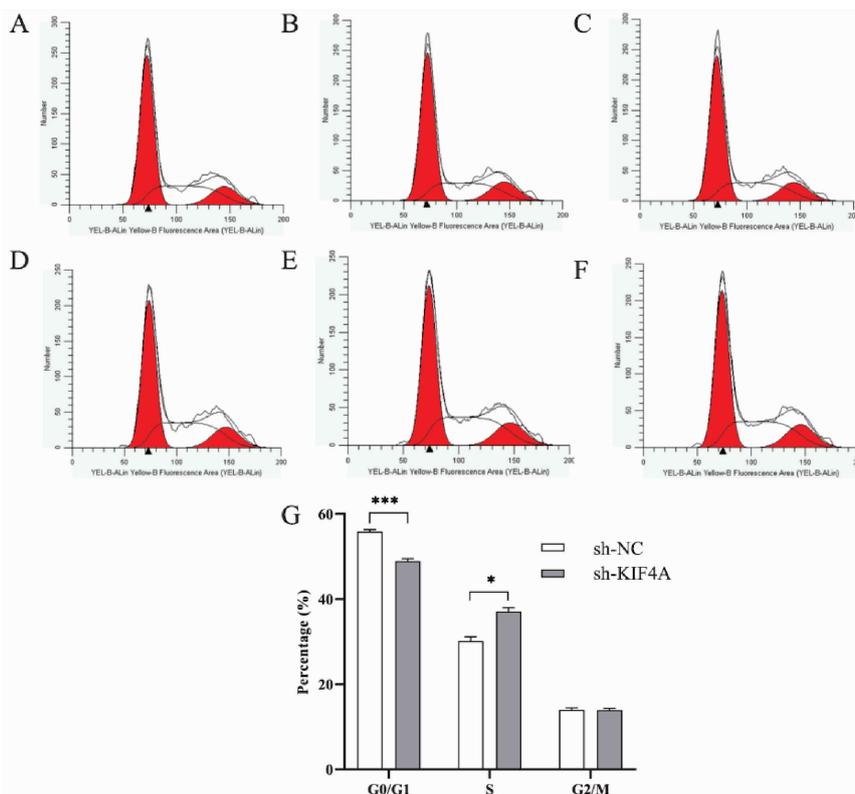


图 8 沉默 *KIF4A* 对卵巢癌细胞周期的影响

Figure 8. Effect of *KIF4A* Silencing on Cell Cycle of Ovarian Cancer

Cell cycle was assured by flow cytometry (the control group as indicated by Panel A and D, the NC group as indicated by Panel B and E, the sh-*KIF4A* group as indicated by Panel C and F); Panel G shows the histogram of cell cycle.

### 3 讨论

卵巢恶性肿瘤在女性生殖器官肿瘤中预后最差,且相应生物学功能是影响卵巢癌死亡率的重要原因。而靶向治疗开创了卵巢癌治疗的新领域,寻找作用于新靶点的药物是近年来研究的热点。故本研究着重探讨 KIF4A 对肿瘤细胞生物学功能的影响及相关基因富集分析,这将为卵巢癌的诊断和治疗提供重要指导。

KIF4A 是驱动蛋白家族的成员之一,该家族可利用 ATP 水解所释放的能量沿着微管进行包括囊泡、细胞器、染色体、蛋白质复合物和 mRNA 等的转运。目前该蛋白分子在多种肿瘤中被深入研究, Taniwaki 等<sup>[9]</sup>研究发现干扰 KIF4A 在肺癌细胞中的表达后,肺癌细胞的生长及侵袭会受到抑制,提示 KIF4A 与肺癌的发生、发展有关。Liu 等<sup>[10]</sup>通过体内体外实验同样证实 KIF4A 可促进肾透明细胞癌的转移及增殖。Gao 等<sup>[11]</sup>发现 KIF4A 可调节 p21 启动子促进胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭,但是对其细胞凋亡没有影响。虽然上述研究提示 KIF4A 异常表达与癌症发生、发展密切相关,相关生物信息学研究也表明 KIF4A 与卵巢癌患者的预后显著相关,但目前仍缺乏 KIF4A 与卵巢癌的生物学功能试验研究。因此,本研究进一步分析 KIF4A 在卵巢癌中的预后、生物学功能及相关基因富集分析,以期对卵巢癌的靶向治疗提供新思路。

本研究首先通过生物信息学方法,在卵巢癌患者公共数据库中检索 KIF4A 基因与卵巢癌患者总生存期及 FIGO 分期的关系,结果显示高表达 KIF4A 生存时间明显降低,这与陈柱等<sup>[12]</sup>和胡国辉等<sup>[13]</sup>在乳腺癌及肝癌患者的预后分析中结果相一致,这提示 KIF4A 可能在泛癌中均与预后有着明显联系。但卵巢癌患者中 KIF4A 的表达量却不随着肿瘤临床分期的严重程度所增加,这与之前其他肿瘤中的研究<sup>[14]</sup>结果不一致,这需要将来进一步研究。接下来 RT-qPCR 检测了人卵巢癌正常上皮细胞株 IOSE80 和多种卵巢癌细胞株和中 KIF4A mRNA 的相对表达水平,发现卵巢癌细胞 A2780, HO-8910PM, COC1, SKOV3 中 KIF4A mRNA 的表达水平显著高于正常卵巢上皮细胞。选取其中 KIF4A 表达水平最高的细胞株 SKOV3 进行了后续功能试验。

结果发现,沉默 KIF4A 的表达可抑制卵巢癌细胞的生长及迁移并促进其凋亡。此外,沉默 KIF4A 影响卵巢癌的周期分布,主要影响 G0/G1 期,并使细胞阻滞在 S 期,进而导致肿瘤的生长抑制。关于 KIF4A 在分子层面的深入机制已有相关报道。研究发现 KIF4A 调控肝癌细胞的生长可能是通过调节巨噬细胞血管生成相关因子<sup>[15]</sup>,但具体机制仍需进一步阐明。武岩<sup>[16]</sup>研究发现 NLP 蛋白可与 KIF4A 蛋白一起参与调控中间小体的生成参与正常及肿瘤细胞的有丝分裂。在乳腺癌中, KIF4A 可被多柔比星诱导低表达并影响 PARP-1 的上调<sup>[17]</sup>,且 miR-335 可对其进行调控,并通过荧光素酶试验进行了验证<sup>[18]</sup>。但是 KIF4A 在卵巢癌中的深层机制的研究还未有报道,这将来值得进一步的深入探讨。

KIF4A 作为驱动蛋白家族的成员之一,驱动蛋白抑制剂能够克服抗微管类药物的耐药,如有丝分裂驱动蛋白 KIF20B<sup>[19]</sup>及 Eg5<sup>[20]</sup>抑制剂具有抗增殖作用已被证实可用于肝癌及其他恶性肿瘤的治疗。根据 KIF4A 在有丝分裂过程中的作用,选择性地抑制 KIF4A 的活性,进而抑制肿瘤细胞的生长及分裂,这有可能成为新的卵巢癌患者的治疗策略。

综上所述,我们的研究结果表明, KIF4A 与卵巢癌患者的预后及细胞的生物学具有明显相关。但是, KIF4A 在卵巢癌中发生和发展的具体作用及相关机制并未完全阐明,以及相应的调节机制也需在动物模型进行进一步的研究,相信在完善相关基础及临床实验后, KIF4A 将有望成为卵巢癌治疗的新靶点,并改善卵巢癌患者的预后。

**作者声明:** 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:** 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:** 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:** 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

## [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 467-476.
- [3] Gul A, Rini BI. Adjuvant therapy in renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2019, 125(17): 2935-2944.
- [4] Haider S, Wang J, Nagano A, *et al.* A multi-gene signature predicts outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Genome Med, 2014, 6(12): 105.
- [5] HHuang Y, Wang H, Lian Y, *et al.* Upregulation of kinesin family member 4A enhanced cell proliferation via activation of Akt signaling and predicted a poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 141.
- [6] Zhou Y, Yang L, Zhang X, *et al.* Identification of potential biomarkers in glioblastoma through bioinformatic analysis and evaluating their prognostic value[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 6581576.
- [7] Gao J, Sai N, Wang C, *et al.* Overexpression of chromokinesin KIF4 inhibits proliferation of human gastric carcinoma cells both in vitro and in vivo[J]. Tumour Biol, 2011, 32(1): 53-61.
- [8] Yang D, He Y, Wu B, *et al.* Integrated bioinformatics analysis for the screening of hub genes and therapeutic drugs in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2020, 13(1): 10.
- [9] Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N. *et al.* Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(22): 6624-6631.
- [10] Liu G, Lu Y, Li L, *et al.* The kinesin motor protein KIF4A as a potential therapeutic target in renal cell carcinoma[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(6): 1730-1742.
- [11] Gao H, Chen X, Cai Q, *et al.* Increased KIF4A expression is a potential prognostic factor in prostate cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 7941-7947.
- [12] 陈柱, 宋晓薇, 曹稳琰, 等. KIF4A 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(11): 1733-1737.
- [13] 胡国辉. 转录因子 FOXM1 通过调控 KIF4A 表达促进肝癌细胞增殖和肿瘤生长的分子机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [14] Cho SY, Kim S, Kim G, *et al.* Integrative analysis of KIF4A, 9, 18A, and 23 and their clinical significance in low-grade glioma and glioblastoma[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4599.
- [15] Chen Yi-Yao. KIF4A 在巨噬细胞血管生成相关因子分泌中的作用及调节机制探讨[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [16] 武岩. 1、有丝分裂纺锤体及中间小体提取方法的研究 2、NLP 蛋白和 KIF4A 蛋白参与调控中间小体形成的初步研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [17] 王辉, 鲁常青, 田波, 等. 多柔比星诱导乳腺癌细胞 PARP-1 活性上调依赖于 Kif4A 蛋白低表达[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(10): 804-812.
- [18] 薛旦. 基于生信分析 KIF4A 在乳腺癌中的预后预测作用及上游 miR-335 对其调控的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [19] 张霞. 靶向驱动蛋白 KIF20B 的抗肝癌机制与治疗研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [20] 靳钦, 张曙. 驱动蛋白 Eg5 研究进展[J]. 交通医学, 2016, 30(3): 235-237.