

· 论 著 ·

## Eag1 钾离子通道在卵巢癌组织中的表达及意义

陈 慧<sup>1</sup>, 张 兰<sup>1</sup>, 郭以河<sup>2</sup>, 林月丽<sup>1</sup>, 洪丽玲<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 检测 Ether à go-go 1 (Eag1) 钾离子通道在人卵巢癌中的表达, 对人卵巢癌细胞株 SKOV3 的影响及与卵巢癌患者临床特征的关系。方法 用实时定量逆转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测卵巢癌细胞 SKOV3 中 Eag1 的表达; 用噻唑蓝比色法 (MTT) 检测 Eag1 钾离子通道抑制剂阿司咪唑 (Astemizole) 对 SKOV3 细胞增殖的影响; 用流式细胞仪检测阿司咪唑对 SKOV3 细胞周期的影响; 用蛋白印迹法 (Western blot) 和免疫组织化学的方法检测 36 例卵巢癌组织中 Eag1 蛋白的表达并结合临床病例资料进行分析。结果 阿司咪唑可明显抑制 SKOV3 细胞增殖, 阻滞细胞周期于 G0/G1 期。在卵巢癌标本中, Eag1 蛋白的阳性表达率明显高于正常卵巢组织。其在不同的临床分期方面差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 Eag1 钾离子通道异常表达于人卵巢癌组织中, 并可能成为卵巢癌诊断和治疗的靶点。

**[关键词]** Eag1; 阿司咪唑; 增殖; 免疫组织化学; 卵巢癌

**[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-271X.2016.01.005

**Expression and significance of ether à go-go 1 channels in human ovarian cancer**

CHEN Hui<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>1</sup>, GUO Yi-he<sup>2</sup>, LIN Yue-li<sup>1</sup>, HONG Li-lin<sup>1</sup>. 1. Department of Gynaecology and Obstetrics, 2. Department of Pathology, the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the expression of Eag1 potassium channel in human ovarian cancer, the effects of Eag1 on human ovarian cancer cell line SKOV3 and the relationship between Eag1 expression and clinicopathological characteristics of ovarian cancer patients. **Methods** The expression of Eag1 in human ovarian cancer cell line SKOV3 was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The effects of astemizole (a inhibitor of Eag1) on SKOV3 cells proliferation and cycle were measured by MTT and flow cytometry. Then the expressions of Eag1 at protein level were detected by Western blot and immunohistochemical staining in 36 cases of ovarian cancer. The relationship between the index and clinicopathological parameters was analyzed. **Results** Eag1 was overexpressed in SKOV3 cells. Cell proliferation and cycle can be significantly inhibited by astemizole. Eag1 was expressed higher in the ovarian cancer specimens than in normal ovaries tissues and was associated with clinical stage ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of Eag1 potassium channel was aberrant in human ovarian cancer tissues and Eag1 potassium channel may represent a potential target for ovarian cancer diagnosis and treatment.

**[Key words]** human ether à go-go1; astemizole; proliferation; cell cycle; immunohistochemistry; ovarian cancer

卵巢恶性肿瘤是妇产科常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。其发病率仅次于子宫体癌和子宫颈癌, 但其致死率却为妇科恶性肿瘤首位<sup>[3]</sup>, 因为卵巢解剖位置深, 且缺乏早期诊断和晚期治疗的方法。Eag1 是 EAG (ether à go-go) 钾离子通道家族的成员<sup>[4]</sup>, 近期研究发现 Eag1 在肿瘤组织和相应起源的正常组织中差异性表达, 不仅可能参与了肿瘤发生和发展的过程<sup>[5]</sup>, 还可能成为预测肿瘤发生、提示肿瘤预后的标志和治疗靶点<sup>[6-11]</sup>。本研究首先用 qRT-PCR 和 Western blot 检测了 Eag1 在卵巢中的表达,

之后用 MTT 和流式细胞仪检测了 Eag1 抑制剂对卵巢癌细胞增殖和周期的影响, 最后用免疫组化法检测 Eag1 在不同临床分期的卵巢癌组织中的表达情况, 以期探讨其表达水平与卵巢癌患者预后之间的关系。

**1 材料与方法**

**1.1 临床资料** 选取 2008 年 1 月-2010 年 12 月在厦门大学附属东南医院妇产科进行卵巢癌手术切除的卵巢恶性肿瘤标本 36 例。另取因子宫肌瘤行附件切除的正常卵巢组织标本 10 例及 1 例进行乳腺癌手术切除的乳腺癌标本。按 2006 年 FIGO 卵巢恶性肿瘤的手术病理分期进行临床分期<sup>[1]</sup>, I 期 6 例, II 期 8 例, III 期 20 例 (其中 III a 期 5 例, III b 期 7 例, III c 期 8 例), IV 期 2 例。研究前所有患者均已签署知情同意书, 并通过医院伦理委员会审核。

**基金项目:** 福建省漳州市自然科学计划项目 (ZZ2012J25)

**作者单位:** 363000 福建漳州, 厦门大学附属东南医院, 1. 妇产科, 2. 病理科

**引用格式:** 陈 慧, 张 兰, 郭以河, 等. Eag1 钾离子通道在卵巢癌组织中的表达及意义 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(1): 17-20.

**1.2 材料** 人卵巢癌细胞株 SKOV3、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人胚肾细胞株 HEK 293 购自中国科学院上海细胞库; RPMI 1640 培养基和小牛血清购自美国 Hyclone 公司; 反转录试剂盒、MTT、Marker-DL2000、琼脂糖、二甲基亚砷、二氨基联苯胺 (DAB) 染色剂购自西安舟鼎国公司; RIPA 裂解液购自上海碧云天公司; 兔抗  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; ECL 化学发光显色试剂盒购自美国 Millipore 公司; 兔抗人 EAG1 单克隆抗体购买自以色列 Alomone 公司, MaxVision 试剂盒购自福州迈新公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下, RPM-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素) 培养人卵巢癌细胞株 SKOV3、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人胚肾细胞株 HEK 293。

**1.3.2 RT-PCR** 用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书的步骤制备 cDNA, 引物序列如下: Eag 1, 上游: 5'-GCT TTT GAG AAC GTG GAT GAG-3', 下游: 5'-CGA AGA TGG TGG CAT AGA GAA-3', 475bp, 56 °C;  $\beta$ -actin, 上游: 5'-TCC ACC TTC CAG CAG ATG TG-3', 下游: 5'-GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3', 75 bp, 54 °C。反应体系: 0.5  $\mu$ L cDNA, 7.5  $\mu$ L 超纯水, 上下游引物各 1.0  $\mu$ L, SYBR Green 10.0  $\mu$ L, 共计 20  $\mu$ L。反应条件: ①预变性 94 °C, 4 min; ②变性: 94 °C, 45 s; ③退火: 54 °C, 45 s; ④延伸: 72 °C, 45 s, 循环 30 次。

**1.3.3 四氮唑蓝 (MTT) 比色实验** 100  $\mu$ L 细胞悬液 ( $1 \times 10^5$ /mL) 均匀分布于 96 孔培养板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后孔中加入 100  $\mu$ L 阿司咪唑溶液 (10  $\mu$ M)。继续培养 48 h 后, 加入 20  $\mu$ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续孵育 4 h 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 为防止药物与 MTT 反应, 小心用 PBS 清洗每孔 2 次。之后每孔加 150  $\mu$ L 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡 10 min。选择 490 nm 波长, 用酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司) 测定各孔吸光值。按照公式: 细胞存活率 = 实验组吸光值 / 阳性对照吸光值  $\times 100\%$ 。为提高实验结果的准确性, 每组设置 10 个复孔。与实验平行, 加细胞、培养基不加抑制剂的组为阳性对照组; 与实验平行, 只加培养基不加细胞的孔设置为空白对照组, 比色时空白对照组调零。

**1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期** 加入阿司咪唑溶液后细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 72 h。

$1 \times 10^6$  细胞中加入 1 mL 70% 冰甲醇, 30 min 后离心, 去上清。4 °C, PBS 清洗 3 次。加入 100  $\mu$ L PBS、100  $\mu$ L 核糖核酸酶, 加入碘化丙锭 (PI) 染色, 使其最终浓度达到 50  $\mu$ g/mL。染色后的细胞于 4 °C、避光处保存 2 h 后在流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司) 上检测, 结果用 CELLQUEST 软件分析。

**1.3.5 Western blot 检测 Eag1 的表达** 冷 PBS 洗涤不同组织, 各培养皿加入适量 4 °C 的 RIPA 裂解液, 冰上孵育 40 min。收集裂解物, 超声匀浆, 4 °C, 12 000 $\times$ g 离心 25 min, 取上清 -80 °C 保存。根据样品蛋白浓度, 按蛋白总量 30  $\mu$ g 计算体积。SDS-PAGE 垂直电泳, 转移至硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Blotting Membranes, NC)。使用 5% 脱脂奶粉 (溶于 TBS-T 缓冲液) 室温封闭 1 h, 兔抗 Eag1 一抗 (1:200), 兔抗  $\beta$ -actin 一抗 (1:2000), 4 °C 孵育过夜。TBS-T 振荡清洗 5 min  $\times$ 3 次。室温下相应加入山羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000) 或山羊抗兔 IgG 抗体 (1:8000) 孵育 1 h, 同前法洗膜 3 次, 用 ECL 化学发光法显色, X 光片曝光显影。

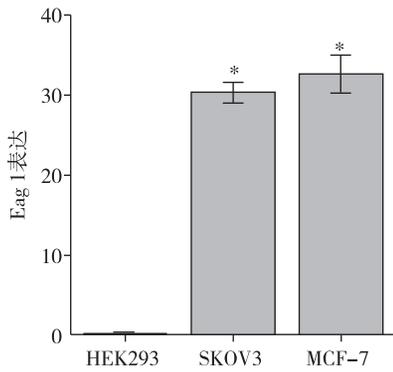
**1.3.6 免疫组化** 按试剂盒说明书进行免疫组化操作。染色结果判定以靠近细胞核的胞浆染色为主, 浅黄色、棕黄色、棕褐色均为阳性着色, 随机观察 4 个高倍视野 200 个细胞, 计数阳性细胞数, 阳性细胞所占比例大于 10% 即认定为阳性表达<sup>[6]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 软件对统计结果进行分析。Eag1 在不同组织中表达水平的比较、抑制剂对细胞增殖的影响采用 Mann-Whitney U 检验和 Kruskal-Wallis 检验。卵巢癌不同分期各组率之间的比较采用  $\chi^2$  检验和 Fisher's 精确概率法检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

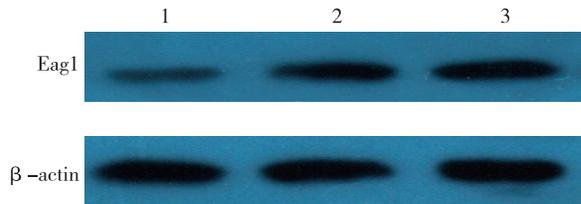
**2.1 Eag1 蛋白在卵巢癌组织中的表达** 研究已证实 Eag1 在人乳腺癌细胞和组织中高表达<sup>[7]</sup>, 因此将其作为阳性对照。人胚肾细胞株 HEK 293 和人正常卵巢组织作为正常对照。图 1 示 Eag1 mRNA 在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中的表达水平与其在人乳腺癌细胞株 MCF-7 表达水平相似 ( $P > 0.05$ ), 均明显高于其在人胚肾细胞株 HEK 293 的表达水平 ( $P < 0.05$ )。图 2 示 Western blot 分析 Eag1 蛋白在人卵巢癌组织中的表达水平与其在人乳腺癌组织的表达水平相似, 均明显高于在正常卵巢组织的表达。

**2.2 阿司咪唑对 SKOV3 细胞增殖的影响** 与对照组 ( $100.00 \pm 3.61$ )% 相比, 阿司咪唑可明显抑制



与阴性对照组 HEK 293 细胞相比, \*  $P < 0.05$

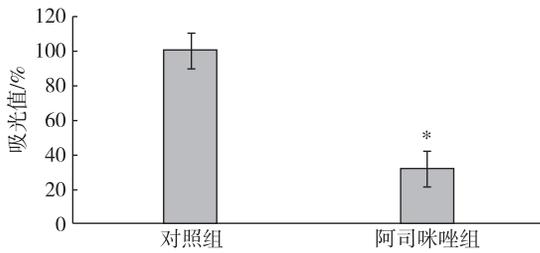
图 1 qRT-PCR 检测三株细胞中 Eag1 mRNA 的表达水平



1: 人正常卵巢组织; 2: 人卵巢癌组织; 3: 人乳腺癌组织

图 2 Western blot 检测 Eag1 在人卵巢癌组织中的表达

SKOV3 细胞增殖 ( $35.40 \pm 4.26$ )%, 两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3)。



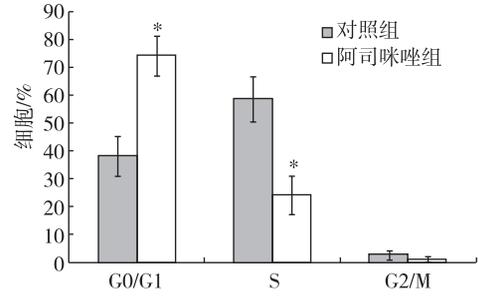
与对照组相比, \*  $P < 0.05$

图 3 阿司咪唑对 SKOV3 细胞增殖的影响

**2.3 阿司咪唑对 SKOV3 细胞周期的影响** 阿司咪唑处理后可阻滞细胞周期于 G0/G1 期 ( $P < 0.05$ ), 并导致 S 期 ( $P < 0.05$ )、G2/M 期比例的减少。与对照组相比, 阿司咪唑可明显阻滞 SKOV3 细胞周期于 G0/G1 期 (图 4)。

**2.4 Eag1 在卵巢癌组织中的表达与临床分期之间的关系** 在 36 例卵巢癌患者标本中, Eag1 蛋白的阳性表达率为 77.8%, 其中在正常卵巢组织中阳性表达率为 33.3% (3/10), 在 I 期卵巢癌组织中为 50% (3/6), II 期中为 66.7% (6/8), III 期中为 85% (17/20), IV 期中为 100% (2/2)。在卵巢癌标本中, Eag1 蛋白的阳性表达率在不同临床分期的组织

中 ( $P < 0.05$ ) 差异有统计学意义。图 5 显示典型的 Eag1 在卵巢癌组织中高表达的情况, 表现为胞核周围胞浆中分布的棕黄(褐)色颗粒。



与对照组相比, \*  $P < 0.05$

图 4 阿司咪唑对 SKOV3 细胞周期的影响

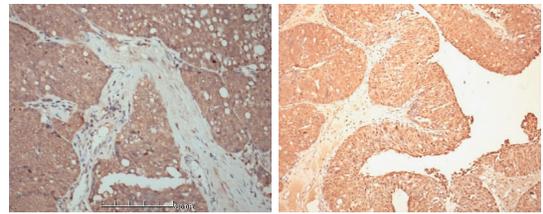


图 5 Eag1 蛋白在人卵巢组织中的表达 (SP  $\times 200$ )

### 3 讨论

钾离子通道是分布最广、家族规模最庞大的离子通道, 与细胞膜电位形成、激素分泌、兴奋性、基因表达及细胞增殖和凋亡有着密切的关系。近年来的研究表明, 钾离子通道与肿瘤的发生、发展有密切关系, 它参与肿瘤细胞的生理过程。Eag1 是 EAG 钾离子通道家族的成员, 研究表明, 在哺乳动物中 Eag1 定位于染色体 1q<sup>32</sup>.1-2 上, 是细胞膜上允许钾离子通过的一种跨膜蛋白<sup>[12-13]</sup>。进一步研究发现在人类正常组织中, Eag1 表达有限, 主要表达于脑组织, 少量表达于胎盘、子宫内膜上皮细胞中, 短暂性表达于肌原细胞<sup>[12]</sup>。而在多种人类肿瘤细胞系和肿瘤组织中异常高表达<sup>[9-11, 14-17]</sup>, Eag1 参与了肿瘤细胞增殖、细胞周期等过程。它可导致细胞骨架的重组及膜外结构的重排, 从而影响细胞的粘附、增殖与转移<sup>[18]</sup>, 并有利于恶性肿瘤细胞的生长以及癌前病变的恶变转化<sup>[19-21]</sup>。Eag1 的表达水平与肿瘤大小、转移、分期以及浸润深度等有关, 可提示恶性肿瘤患者的临床预后<sup>[8-11]</sup>。近来的研究显示, Eag1 调节肿瘤的增殖与生长可能与增加 IGF-1 的活性有关, 粘附蛋白 S100B 能抑制 Eag1 的功能, 从而抑制肿瘤的生长<sup>[22-24]</sup>。

本研究结果显示, *Eag1* 高表达于卵巢癌组织中, *Eag1* 阳性表达率和强度明显高于正常卵巢组织。利用 *Eag1* 抑制剂阿司咪唑能有效地抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 的细胞增殖, 阻滞细胞周期于有丝分裂前期。在病理分期中较晚、临床复发早、预后差的病例中, *Eag1* 的高表达及强表达进一步证实了 *Eag1* 在肿瘤的发生、发展及预后中的预示作用。说明卵巢癌组织中 *Eag1* 的表达水平与患者的临床预后有明显的相关性。能否将 *Eag1* 列为卵巢癌新的肿瘤标志物, 如何将其作为监测疾病进展和评估预后的指标, 及将 *Eag1* 抑制剂应用于肿瘤的靶向治疗有待进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] 朱饮源, 姚 军, 李 曼. 糖原合成酶激酶 3 $\beta$  对卵巢癌紫杉醇耐药性的影响及机制研究[J]. 东南国防医药, 2015, 17(1): 29-31.
- [2] 曹王丽, 宋佳希, 李芳秋. 单克隆抗体靶向治疗卵巢癌研究进展[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(5): 536-540.
- [3] Ozakpinar OB, Maurer AM, Ozsavci D. Ovarian stem cells: from basic to clinical applications[J]. World J Stem Cells, 2015, 26, 7(4): 757-768.
- [4] Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to *eag* in drosophila and mammals[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(8): 3438-3442.
- [5] Camacho J. Ether  $\alpha$  go-go potassium channels and cancer[J]. Cancer Lett, 2006, 233(1): 1-9.
- [6] 刘黎琼, 李慧玉, 黄士昂. *herg1* 基因与肿瘤[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 27(1): 15-18.
- [7] 翁占平, 王 波. TASK23 钾离子通道的研究现状[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(3): 225-231.
- [8] Farias LM, Ocaña DB, Díaz L, et al. Ether  $\alpha$  go-go potassium channels as human cervical cancer markers[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 6996-7001.
- [9] Ding XW, Wang XG, Luo HS, et al. Expression and prognostic roles of *Eag1* in resected esophageal squamous cell carcinomas[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(8): 2039-2044.
- [10] Ding XW, Yan JJ, An P, et al. Aberrant expression of ether a go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1257-1261.
- [11] Ding XW, Luo HS, Jin X, et al. Aberrant expression of EAG1 potassium channel in gastric cancer patients and cell lines[J]. Med Oncol, 2007, 24(3): 345-350.
- [12] Pardo LA, Del Camino D, Sañchez A, et al. Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels[J]. EMBO J, 1999, 18(20): 5540-5547.
- [13] Occhiodoro T, Bernherim L, Liu JH, et al. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion[J]. FEBS Lett, 1998, 434(1-2): 177-182.
- [14] Hemmerlein B, Weseloh RM, De Queiroz FM, et al. Overexpression of EAG1 potassium channels in clinical tumours[J]. Mol Cancer, 2006, 41(5): 1-13.
- [15] Mello de Queiroz F, Suarez-Kurtz G, Stühmer W, et al. Ether  $\alpha$  go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients[J]. Mol Cancer, 2006, 42(5): 1-10.
- [16] Agarwal JR, Griesinger F, Stühmer W, et al. The potassium channel ether  $\alpha$  go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia[J]. Mol Cancer, 2010, 9(18): 2-16.
- [17] Asher V, Khan R, Warren A, et al. The *Eag* potassium channel as a new prognostic marker in ovarian cancer[J]. Diagn Pathol, 2010, 5: 78.
- [18] Borowiec AS, Hague F, Harir N, et al. IGF-1 activates hEAG K<sup>+</sup> channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells; role in cell proliferation[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(3): 690-701.
- [19] Ortia CS, Montante-Montes D, Saqui-Salces M, et al. EAG1 potassium channels as markers of cervical dysplasia[J]. Oncol Rep, 2011, 26(6): 1377-1383.
- [20] Diaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, et al. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expressed[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3300-3307.
- [21] Restrepo-Angulo I, Sánchez-Torres C, Camacho J. Human EAG1 potassium channels in the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells[J]. Anti Cancer Res, 2011, 31(4): 1265-1270.
- [22] Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, et al. *Eag1* expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors[J]. J Biol Chem, 2008, 283(52): 36234-36240.
- [23] Sahoo N, Tröger J, Heinemann SH, et al. Current inhibition of human EAG1 potassium channels by the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100B[J]. FEBS Letters, 2010, 584(18): 3896-3900.
- [24] Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, et al. S100B protein in tissue development, repair and regeneration[J]. World J Biol Chem, 2013, 4(1): 1-12.

(收稿日期: 2015-06-24; 修回日期: 2015-08-07)

(本文编辑: 齐 名; 英文编辑: 王建东)