

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.08.007  
文章编号: 1005-8982 (2021) 08-0036-08

实验研究·论著

## 氯离子通道蛋白-3对宫颈癌细胞生长、转移的影响

刘晓英, 沈鑫, 张静, 荣晷, 邓卓

(陕西省人民医院 妇科, 陕西 西安 710068)

**摘要:** **目的** 探讨氯离子通道蛋白-3 (CIC-3) 对宫颈癌细胞生长和转移的影响。**方法** 通过免疫组织化学、qRT-PCR 和 Western blotting 检测 60 例宫颈鳞癌组织和相应癌旁组织中 CIC-3 的表达。使用靶向 CIC-3 的 siRNA 转染 SiHa 细胞, 并通过 CCK-8、流式细胞术、伤口愈合实验和 Transwell 实验考察 CIC-3 对细胞生长和转移的影响。使用 Western blotting 检测细胞中 PI3K、p-AKT、Bcl-2 和 p21 的表达。此外, 通过将转染 CIC-3 siRNA 的 SiHa 细胞接种到 BALB/c-nu/nu 裸鼠背部复制体内肿瘤异种移植模型。**结果** 免疫组织化学染色结果显示, CIC-3 蛋白主要表达于宫颈鳞状上皮细胞胞质区。癌组织 CIC-3 的阳性染色评分、CIC-3 mRNA 相对表达量、CIC-3/ $\beta$ -actin 相对表达量较癌旁组织高 ( $P < 0.05$ )。SiHa 细胞 CIC-3 mRNA 相对表达量、CIC-3/ $\beta$ -actin 相对表达量较 H8 细胞高 ( $P < 0.05$ )。不同肿瘤直径、TNM 分期和是否有淋巴结转移患者 CIC-3 高表达率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。下调 CIC-3 能抑制 SiHa 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡 ( $P < 0.05$ )。在接种 si-CIC-3 转染的细胞后, 裸鼠的肿瘤体积变小 ( $P < 0.05$ )。下调 CIC-3 能抑制 PI3K、p-AKT 和 Bcl-2 的蛋白表达, 但促进 p21 的表达。**结论** CIC-3 在宫颈鳞癌中高表达, 下调 CIC-3 可抑制宫颈鳞癌的生长和转移。CIC-3 对宫颈鳞癌细胞凋亡的调控作用部分通过 PI3K-AKT 信号通路介导。

**关键词:** 宫颈肿瘤; 肿瘤转移; 癌, 鳞状细胞

**中图分类号:** R737.33

**文献标识码:** A

## Effects of chloride channel-3 (CIC-3) on the growth and metastasis of cervical cancer cells

Xiao-ying Liu, Xin Shen, Jing Zhang, Xuan Rong, Zhuo Deng

(Department of Gynecology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of chloride channel-3 (CIC-3) on the growth and metastasis of cervical cancer cells. **Methods** The expression of CIC-3 in 60 cases of cervical squamous cell carcinoma tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. SiHa cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting CIC-3, and the effects of CIC-3 on cell growth and metastasis were investigated by cell counting kit-8, flow cytometry, wound healing assay, and transwell migration assay. Western blotting was used to detect the expression of phosphoinositide-3-kinase (PI3K), p-AKT, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and p21. In addition, the in vivo xenograft tumor model was established by injecting SiHa cells transfected with CIC-3 siRNA into the backs of BALB/c-nu/nu nude mice. **Results** The CIC-3 was mainly expressed in cytoplasm of cervical squamous epithelial cells. The positive staining scores of CIC-3, relative expression of CIC-3 mRNA, and relative expression of CIC-3 to  $\beta$ -actin were higher in cervical squamous cell carcinoma tissues than those in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). The relative expression of CIC-3

收稿日期: 2020-06-18

mRNA and that of CIC-3 to  $\beta$ -actin were higher in SiHa cells than in H8 cells ( $P < 0.05$ ). The expression of CIC-3 differed in cervical squamous cell carcinoma tissues derived from patients with different tumor diameter, TNM stage and those with or without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). Down-regulation of CIC-3 inhibited the proliferation, migration, and invasion of SiHa cells, but promoted apoptosis ( $P < 0.05$ ). After injection of cells transfected with CIC-3 siRNA, the tumor volume in nude mice was reduced ( $P < 0.05$ ). Besides, down-regulation of CIC-3 inhibited the protein expression of PI3K, p-AKT and Bcl-2, but promoted the expression of p21 ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** CIC-3 is highly expressed in cervical squamous cell carcinoma. Down-regulating CIC-3 can inhibit the growth and metastasis of cervical squamous cell carcinoma. The regulation of CIC-3 on cell apoptosis in cervical squamous cell carcinoma is mediated in part by the PI3K-AKT signaling pathway.

**Keywords:** chloride channel-3 (CIC-3); cervical squamous cell carcinoma; tumor growth; metastasis; PI3K-AKT signaling pathway

最常见的宫颈癌类型是鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC), 其由低级别鳞状上皮内病变和高级别鳞状上皮内病变形成的。宫颈癌的主要危险因素是乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染<sup>[1]</sup>。有研究发现, 膜离子通道在恶性肿瘤的进展和转移中起着重要作用, 例如, 氯离子通道可促进肿瘤细胞的侵袭, 以及原发性脑肿瘤和神经胶质瘤的脑转移<sup>[2]</sup>。氯离子通道蛋白-3 (CIC-3) 是电压门控性氯离子通道家族的成员, 与恶性肿瘤细胞行为的调控有关, 如增殖、迁移、侵袭和凋亡<sup>[3-5]</sup>, 提示 CIC-3 可能是肿瘤转移的关键启动子。有研究报道, CIC-3 在异位子宫内膜细胞的迁移和侵袭中起着关键作用<sup>[3]</sup>, 并且可能是肿瘤扩散的预后生物标志物<sup>[6]</sup>。CIC-3 的异常表达可能导致各种病理状况, 最近一些研究表明, CIC-3 基因表达的变化可能会增加子宫内膜癌、鼻咽癌、乳腺癌和神经胶质瘤等癌症的发生风险<sup>[7-9]</sup>。并且, CIC-3 通过调控多种分子信号途径来促进恶性肿瘤的侵袭和转移<sup>[9]</sup>。然而, 目前 CIC-3 在宫颈鳞癌中的表达模式仍有待进一步揭示, 并且尚不清楚靶向调控 CIC-3 的表达是否可以调控肿瘤生长和转移。因此, 本研究检测 CIC-3 在宫颈鳞癌中的表达及其与预后的相关性, 并且通过上调或下调 CIC-3 的表达进一步研究对宫颈鳞癌细胞生长和转移的影响, 旨在为宫颈癌的治疗提供新的分子靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取体重为 20~25 g、7 周龄左右的雄性 BALB/c-nu/nu 裸小鼠[动物许可证号: SYXK (陕) 2016-006], 由陕西省人民医院提供。人宫颈鳞癌

细胞系 SiHa 和人宫颈上皮永生化细胞系 H8 购自美国 ATCC 公司, 胎牛血清购自美国 HyClone 公司, DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, Trizol 试剂购自日本 TaKaRa 公司, M-MLV 逆转录酶购自美国 Life Technologies 公司, AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, CIC-3、PI3K、total-AKT 和 p-AKT 抗体购自英国 Abcam 公司, 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 购自北京索莱宝科技有限公司, RIPA 裂解液购自德国 Roche 公司, BCA 分析试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 聚偏二氟乙烯膜、Transwells 美国 Millipore 公司, Bcl-2、p21 和  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, HRP 标记的二抗、ECL 化学发光系统、CCK-8、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究, Matrigel 购自美国 BD Biosciences 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本收集和细胞培养** 选取 2016 年 9 月—2018 年 9 月在陕西省人民医院就诊的宫颈鳞癌患者 60 例。收集患者宫颈癌组织、配对癌旁组织及临床基线资料。组织收集前, 患者未接受任何新辅助化疗或放疗。将 SiHa 和 H8 细胞加入含有 10% 胎牛血清 (FBS)、100 u/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 在含 5% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。本研究经医学伦理委员会批准, 患者签署知情同意书后再收集病理标本进行收集。

**1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应** 使用 Trizol 试剂提取组织和细胞中的总 RNA, 并使用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录。使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 在 CFX96Touch 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 系统进行, 引物如下: CIC-3 正向引

物：5'-TTGCCTCTCACAAACAGCAGCAAATCAATC-3'，长度 27 bp；反向引物：5'-ATTCTCTCCAGCTAAACTTATTTCAAGAA-3'，长度 29 bp；GAPDH 作为内部参考，正向引物：5'-GAGTCTAAGTCGGCATCGGGTCCAAAGATT-3'，长度 30 bp；反向引物：5'-GATTCTCAGCTGGCCAAGAGTAGTCCTTAG-3'，长度 30 bp。反应条件：95℃预变性 5 min，95℃变性 10 s，60℃退火 10 s，72℃拉伸 30 s，共 40 个循环。通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

**1.2.3 免疫组织化学法** 对石蜡包埋的宫颈组织样品进行常规的脱蜡和再水化。在 92 ~ 98℃、10 mmol 柠檬酸钠缓冲液 (pH=6.0) 中进行 10 min 的抗原回收。然后将样品经 0.3%  $H_2O_2$  处理 15 min。正常山羊血清孵育 20 min，PBS 洗涤后，将样品在小鼠抗 CIC-3 抗体 (1 : 500 稀释) 中 4℃ 过夜孵育。将切片用 PBS 洗涤，并在生物素化的二抗中孵育 60 min (1 : 1 000 稀释)。然后经 DAB 处理 5 min，用苏木精复染。阳性染色为细胞膜或细胞质中的棕色染色。将切片在倒置显微镜下观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析。根据染色强度和阳性细胞百分比计算 CIC-3 的染色评分。染色强度分为 4 个等级：0 ~ 3 分依次代表无染色、弱染色、中等染色和强染色。阳性细胞百分比评分分为 4 个等级：0 ~ 3 分依次代表 <10%、10% ~ 25%、25% ~ 50% 和 >50%。

**1.2.4 Western blotting** 将宫颈组织样本和细胞在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解，使用 BCA 试剂盒评估蛋白相对表达量。按照试剂盒说明书，在 8% SDS-PAGE 凝胶中分离蛋白质，并将其转移至聚偏二氟乙烯膜。在室温下用 5% 脱脂奶将膜封闭 2 h。随后，将膜与 CIC-3 (1 : 1 000 稀释)、PI3K (1 : 1 000 稀释)、total-AKT (1 : 3 000 稀释)、p-AKT (1 : 3 000 稀释)、Bcl-2 (1 : 500 稀释)、p21 (1 : 2 000 稀释) 和  $\beta$ -actin 一抗 (1 : 1 000 稀释) 在 4℃ 环境下孵育过夜。然后将膜在 HRP 标记的二抗 (1 : 500 稀释) 中室温孵育 2 h。通过使用 ECL 系统进行显影，以  $\beta$ -actin 作为内参蛋白。

**1.2.5 siRNA 转染** 靶向 CIC-3 的 siRNA (si-CIC-3) 和对照 siRNA (si-NC) 由上海吉玛制药技术有

限公司设计合成，si-CIC-3 正向序列：U AUGCGCAUUUUAACUCAGAG，长度 22 bp；反向序列：CUACGGAAGUUGAGAAUGACCAUU，长度 24 bp；si-NC 正向序列：UCGACCAGGGGUGUACGACGAUUA，长度 24 bp；反向序列：UUUCACGAAGUGAGCAGCGGCUCU，长度 24 bp。将 SiHa 细胞分为对照组、si-NC 组和 si-CIC-3 组。对照组不进行转染；使用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 si-CIC-3 (si-CIC-3 组) 或 si-NC (si-NC 组) SiHa 细胞。

**1.2.6 CCK-8 法** 使用 CCK-8 对细胞增殖进行评估。将  $5 \times 10^3$  个 SiHa 细胞接种到 96 孔板中，每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液，分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后使用 BIO-TEK 酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度值 (OD)。

**1.2.7 流式细胞术** 使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒通过流式细胞术评估细胞凋亡。将  $1 \times 10^5$  个 SiHa 细胞用 PBS 洗涤 3 次后，将细胞加入含 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶 (PI) 的 500  $\mu$ l 结合缓冲液，在黑暗环境中孵育 20 min。通过 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.2.8 伤口愈合实验** 将按  $1 \times 10^5$  个/孔 SiHa 细胞接种到 6 孔板中，达到 90% 融合时，用移液枪在细胞表面划 1 个划痕。用 PBS 洗涤细胞 3 次，将细胞在新鲜培养基中孵育 24 h，在显微镜下以 100 倍放大倍数观察并拍照伤口愈合情况。

**1.2.9 细胞迁移和侵袭测定** 在孔径为 8  $\mu$ m 的 24 个孔 Transwell 中进行迁移实验。将  $2 \times 10^5$  个 SiHa 细胞加入含有 1% FBS 的 200  $\mu$ l DMEM 中，并添加到上室，将含有 10% FBS 的 600  $\mu$ l DMEM 添加到下室。孵育 24 h 后，除去上室中的未迁移细胞，用 4% 多聚甲醛固定并用 Giemsa 染色，然后计数迁移细胞。将上室中细胞预先用 Matrigel 涂覆后用于考察细胞的侵袭能力。

**1.2.10 体内肿瘤异种移植模型** 将小鼠饲养在 25℃、55% 相对湿度的环境中，自由进食。分别将  $5 \times 10^6$  个 si-CIC-3 或 si-NC 转染的 SiHa 细胞注入裸鼠背部，复制 10 个肿瘤异种移植模型。每隔 1 周监测 1 次肿瘤生长，共 4 周，肿瘤体积 =  $0.5 \times \text{短径}^2 \times \text{长径}$ 。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验、方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步的两两比较用 LSD- $t$  检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CIC-3 在宫颈鳞癌组织和细胞系中高表达

免疫组织化学染色结果显示, CIC-3 蛋白主要表达于子宫颈鳞状上皮细胞胞质区。宫颈鳞癌组织和癌旁组织中 CIC-3 的阳性染色评分分别为  $(7.05 \pm 0.56)$  分和  $(1.13 \pm 0.08)$  分, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=8.004, P=0.001$ ), 癌组织较癌旁组织高。宫颈鳞癌组织和癌旁组织中 CIC-3 mRNA 相对表达量分别为  $(5.45 \pm 0.42)$  和  $(1.00 \pm 0.03)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=11.853, P=0.000$ ), 癌组织较癌旁组织高。宫颈鳞癌组织和癌旁组织中 CIC-3/ $\beta$ -actin 相对表达量分别为  $(0.89 \pm 0.07)$  和  $(0.24 \pm 0.03)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=9.986, P=0.001$ ), 癌组织较癌旁组织高 (见图 1、2)。

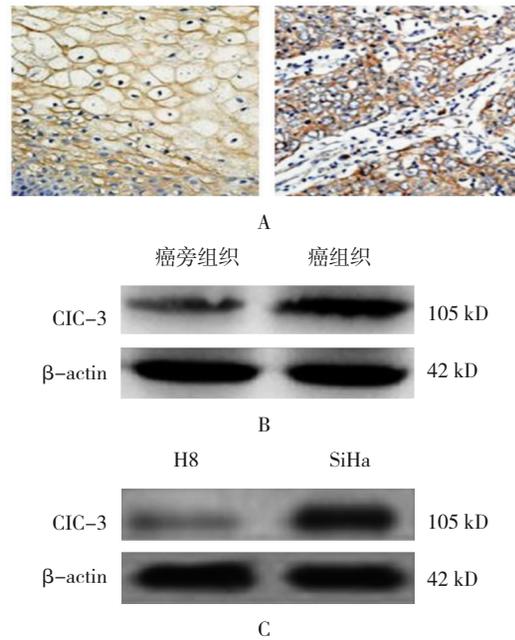
人宫颈鳞癌细胞系 SiHa 细胞的 CIC-3 mRNA 相对表达量为  $(3.27 \pm 0.39)$ , 人正常宫颈上皮 H8 细胞为  $(1.00 \pm 0.07)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=10.537, P=0.001$ ), SiHa 细胞较 H8 细胞高。人宫颈鳞癌细胞系 SiHa 细胞的 CIC-3 蛋白相对表达量为  $(0.56 \pm 0.05)$ , 人正常宫颈上皮 H8 细胞为  $(0.31 \pm 0.02)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=13.245, P=0.000$ ), SiHa 细胞较 H8 细胞高 (见图 3)。

### 2.2 不同因素宫颈鳞癌患者的 CIC-3 高表达率比较

不同年龄患者 CIC-3 高表达率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 不同肿瘤直径、TNM 分期和是否有淋巴结转移患者 CIC-3 高表达率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 下调 CIC-3 可抑制宫颈鳞癌细胞的生长和转移

对照组 SiHa 细胞中 CIC-3 mRNA 相对表达量为



A: 癌组织和癌旁组织中 CIC-3 的表达 ( $\times 200$ ); B: 癌组织和癌旁组织中 CIC-3 的蛋白表达; C: H8 和 SiHa 癌细胞中 CIC-3 的蛋白表达。

图 1 CIC-3 在宫颈鳞癌组织和细胞系中的表达

表 1 不同因素的宫颈鳞癌患者 CIC-3 高表达率比较例 (%)

因素	n	CIC-3 高表达	$\chi^2$ 值	P 值
<b>年龄</b>				
≤50 岁	36	25(69.44)	0.696	0.404
>50 岁	24	19(79.17)		
<b>肿瘤直径</b>				
≤4 cm	32	17(53.13)	14.32	0.000
>4 cm	28	27(96.43)		
<b>TNM 分期</b>				
I、II 期	29	15(51.72)	13.403	0.000
III、IV 期	31	29(93.55)		
<b>淋巴结转移</b>				
是	33	31(93.94)	15.923	0.000
否	27	13(48.15)		

$(1.00 \pm 0.05)$ , si-NC 组为  $(0.97 \pm 0.05)$ , si-CIC-3 组为  $(0.17 \pm 0.01)$ , 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=335.630, P=0.000$ )。对照组 SiHa 细胞中 CIC-3 蛋白相对表达量为  $(0.87 \pm 0.04)$ , si-NC 组为  $(0.91 \pm 0.05)$ , si-CIC-3 组为  $(0.21 \pm 0.01)$ , 经方差

分析, 差异有统计学意义 ( $F=274.740, P=0.000$ ), 转染靶向 CIC-3 的 siRNA 可下调 SiHa 细胞中 CIC-3 mRNA 和 CIC-3 蛋白相对表达量 (见图 4)。对不同时间的 CCK-8 实验数据进行重复测量数据的方差分析, 球形检验的  $P$  值为 0.154, 满足球形分布假设, 说明重复测量数据间无相关性。对照组 SiHa 细胞在培养 48 h 后 OD 值为  $(0.31 \pm 0.02)$ , si-NC 组为  $(0.32 \pm 0.03)$ , si-CIC-3 组为  $(0.22 \pm 0.01)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=98.540, P=0.000$ ); 对照组 SiHa 细胞在培养 72 h 后 OD 值为  $(0.61 \pm 0.04)$ , si-NC 组为  $(0.64 \pm 0.05)$ , si-CIC-3 组为  $(0.41 \pm 0.03)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=142.700, P=0.000$ ), 下调 CIC-3 能抑制 SiHa 细胞的增殖 (见图 5)。

流式细胞术结果显示, 对照组 SiHa 细胞的凋亡率为  $(2.31 \pm 0.12) \%$ , si-NC 组为  $(2.47 \pm 0.13) \%$ , si-CIC-3 组为  $(13.25 \pm 0.70) \%$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=255.650, P=0.000$ ), 下调 CIC-3 可促进 SiHa 细胞的凋亡 (见图 6)。伤口愈合实验和 Transwell 实验显示, 对照组 SiHa 细胞的伤口愈合率为  $(42.43 \pm 2.23) \%$ , si-NC 组为  $(44.21 \pm 2.33) \%$ , si-CIC-3 组为  $(21.08 \pm 1.11) \%$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=61.220, P=0.000$ ); 对照组迁移细胞数为  $(104.2 \pm 5.48)$  个, si-NC 组为  $(110.5 \pm 5.82)$  个, si-CIC-3 组为  $(56.4 \pm 2.97)$  个, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=315.580, P=0.000$ ), 对照组侵袭细胞数为  $(92.3 \pm 4.86)$ , si-NC 组为  $(90.4 \pm 4.76)$ , si-CIC-3 组为  $(44.5 \pm 2.34)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=178.430, P=0.000$ ), 下调 CIC-3

可抑制 SiHa 细胞的迁移和侵袭能力 (见图 7)。

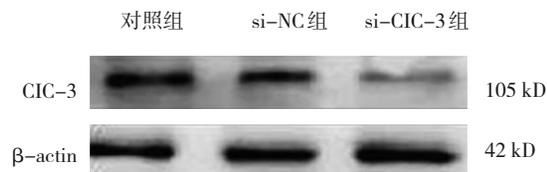
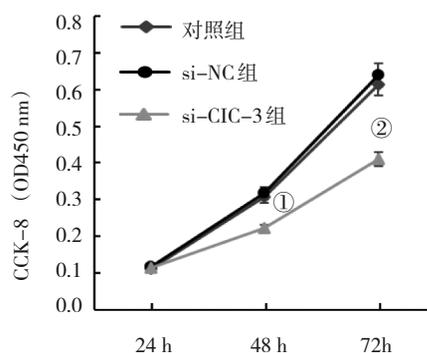


图 4 转染 CIC-3 siRNA 下调 SIHA 细胞中 CIC-3 的蛋白表达



① 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ② 与 si-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 5 下调 CIC-3 对 SIHA 细胞增殖的影响

### 2.4 下调 CIC-3 抑制肿瘤异种移植模型裸鼠的肿瘤生长

在体外肿瘤异种移植实验中, 对不同时间的肿瘤体积进行重复测量数据的分析, 球形检验的  $P$  值为 0.334, 满足球形分布假设, 说明重复测量数据间不存在相关性。si-NC 组在 14 d、21 d 及 28 d 的肿瘤体积分别为  $(49.12 \pm 3.12) \text{ mm}^3$ 、 $(71.88 \pm 5.32) \text{ mm}^3$  和  $(102.79 \pm 7.64) \text{ mm}^3$ , si-CIC-3 组分别为  $(33.26 \pm 1.73) \text{ mm}^3$ 、 $(45.04 \pm 3.28) \text{ mm}^3$  和  $(63.96 \pm 4.85) \text{ mm}^3$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=5.914, 10.001$  和  $12.737, P=0.004, 0.001$  和  $0.000$ ), si-CIC-3 组较 si-NC 组低。

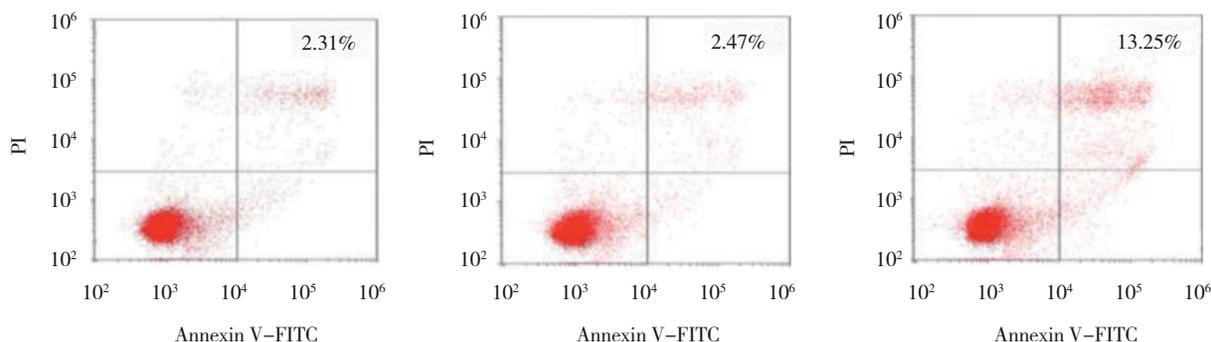


图 6 SIHA 细胞的流式细胞图

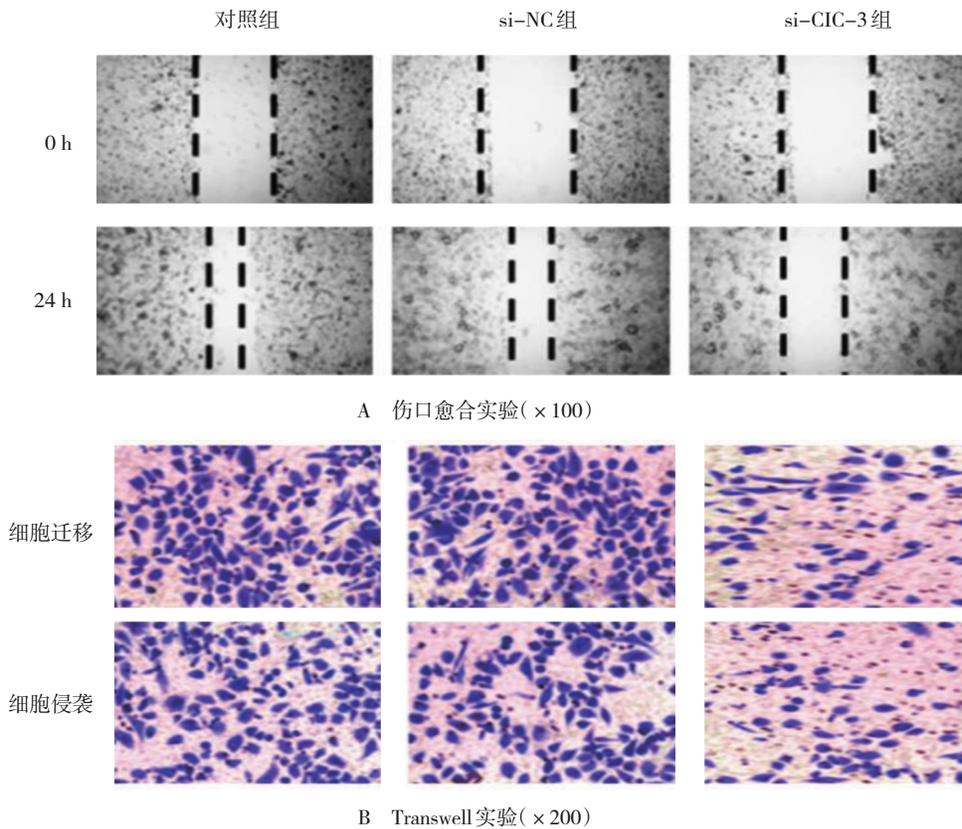


图 7 下调 CIC-3 对 SIHA 细胞迁移和侵袭的影响

2.5 CIC-3 对 PI3K-AKT 信号通路的调控作用

各组 SIHA 细胞中的 PI3K、p-AKT、Bcl-2 和 p21 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $F=173.02$ 、

166.20、141.39 和 159.91, 均  $P=0.000$ ), si-NC 组和 si-CIC-3 组下调 CIC-3 可抑制 PI3K、p-AKT 和 Bcl-2 的蛋白表达, 但促进 p21 的表达 (见表 2 和图 8)。

表 2 下调 CIC-3 对 SIHA 细胞中 PI3K-AKT 信号通路及下游分子的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PI3K	p-AKT	total-AKT	Bcl-2	p21
对照组	0.56 ± 0.03 <sup>①</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>①</sup>	0.98 ± 0.05	0.72 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>①</sup>
si-NC 组	0.54 ± 0.03 <sup>①</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.97 ± 0.06	0.71 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>①</sup>
si-CIC-3 组	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.01	1.03 ± 0.07	0.31 ± 0.02	0.64 ± 0.04

注: ①与 si-CIC-3 组比较,  $P < 0.05$ 。

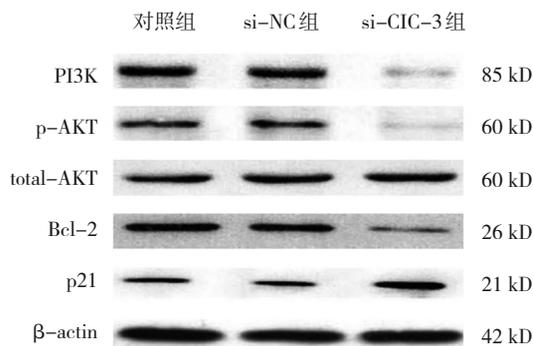


图 8 SIHA 细胞中 PI3K-AKT 信号通路及下游分子的蛋白表达

3 讨论

CIC-3 在多种细胞功能中起着重要作用, 并且与多种肿瘤进展有关。WANG 等<sup>[4]</sup>发现 CIC-3 在神经胶质瘤组织中高表达, 与组织学分级呈正相关<sup>[4]</sup>。CIC-3 表达较低的脑胶质瘤患者生存时间较长, 而 CIC-3 表达较高的脑胶质瘤患者的生存时间较短<sup>[9]</sup>。XU 等<sup>[6]</sup>还报道细胞质 CIC-3 过表达与宫颈癌的转移呈正相关, 在细胞质中 CIC-3 表达水平较高的患者生存率较差。然而, 目前尚缺乏 CIC-3 在宫颈癌进展中的作用研究。本研究分析 CIC-3 在人

宫颈鳞癌中的表达水平及其与预后的关系,发现 CIC-3 在人宫颈鳞癌组织和 SiHa 细胞系中被上调,并且与患者的肿瘤大小、TNM 分期和淋巴结转移有关,在肿瘤直径 >4 cm、TNM 分期为 III 期、IV 期和淋巴结转移的患者中, CIC-3 主要表现为高表达。因此, CIC-3 高表达是宫颈鳞癌恶化的生物标志物。

为进一步揭示 CIC-3 在宫颈鳞癌发生、进展中的作用,本研究通过转染靶向 CIC-3 的 siRNA 来敲除 SiHa 细胞系中 CIC-3 的表达。结果显示,下调 CIC-3 可抑制宫颈鳞癌细胞的生长,促进细胞凋亡。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白<sup>[10-11]</sup>, p21 是一种促凋亡蛋白<sup>[12]</sup>。本研究也显示,下调 CIC-3 可抑制 Bcl-2 的表达,促进 p21 的表达,说明 CIC-3 对宫颈鳞癌细胞凋亡的调控作用部分通过 Bcl-2 和 p21 介导。此外,在体内实验中,本研究发现下调 CIC-3 可抑制肿瘤异种移植模型裸鼠的肿瘤生长。因此,上述结果提示靶向调控 CIC-3 的表达可通过影响宫颈鳞癌的细胞生长来干预肿瘤进展。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是肿瘤转移的主要过程<sup>[13-15]</sup>。有研究表明, CIC-3 参与细胞体积变化和氯离子电流的调节,该电流与癌细胞的细胞迁移和侵袭呈正相关<sup>[16-17]</sup>。另外,神经胶质瘤细胞通过改变 CIC-3 离子通道的活性来改变侵袭性。CIC-3 在人类神经胶质瘤细胞血浆膜上高表达,其活性受 Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 磷酸化的调控<sup>[18]</sup>。在本研究中,下调可 CIC-3 抑制宫颈鳞癌细胞的迁移和侵袭。因此, CIC-3 在宫颈鳞癌发生、发展中参与肿瘤的转移。

PI3K-Akt 信号通路是一种经典的细胞存活通路, PI3K-Akt 的激活可抑制细胞凋亡,促进增殖<sup>[19-20]</sup>。有研究报道, PI3K-Akt 信号通路及其下游信号分子在乳腺癌、肝癌、胃癌、结肠癌等多种癌症中异常激活,并且直接调控细胞的生长和侵袭<sup>[21-22]</sup>。虽然 PI3K-AKT 信号通路也调节宫颈癌细胞功能<sup>[23]</sup>,但是目前尚不清楚 CIC-3 基因是否在宫颈鳞癌中调节 PI3K-AKT 信号通路。本研究发现,下调 CIC-3 可抑制宫颈鳞癌细胞中 PI3K-AKT 信号通路的活性。另外, Bcl2 和 p21 均是 PI3K-AKT 信号通路的下游分子<sup>[24]</sup>。因此,本研究表明通过抑制 PI3K-AKT 信号通路可抑制 CIC-3 对宫颈鳞癌细胞

的促凋亡作用。

综上所述,本研究表明 CIC-3 在宫颈鳞癌中高表达,下调 CIC-3 可抑制宫颈鳞癌的生长和转移。CIC-3 对宫颈鳞癌细胞凋亡的调控作用部分通过 PI3K-AKT 信号通路介导。因此,靶向 CIC-3 可能是诊断和治疗宫颈鳞癌的新策略。

#### 参 考 文 献 :

- [1] PIROOZMAND A, MOSTAFAVI ZADEH S M, MADANI A, et al. The association of high risk human papillomaviruses in patients with cervical cancer: an evidence based study on patients with squamous cell dysplasia or carcinoma for evaluation of 23 human papilloma virus genotypes[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2016, 9(4): e32728.
- [2] SONTHEIMER H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis[J]. Experimental Biology and Medicine, 2008, 233(7): 779-791.
- [3] GUAN Y T, HUANG Y Q, WU J B, et al. Overexpression of chloride channel-3 is associated with the increased migration and invasion ability of ectopic endometrial cells from patients with endometriosis[J]. Human Reproduction, 2016, 31(5): 986-998.
- [4] WANG B, XIE J, HE H Y, et al. Suppression of CLC-3 chloride channel reduces the aggressiveness of glioma through inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 63788-63798.
- [5] FEIYAN F, TAO L, XIN W, et al. CIC-3 Expression and its association with hyperglycemia induced HT22 hippocampal neuronal cell apoptosis[J]. Journal of Diabetes Research, 2016: DOI: 10.1155/2016/2984380.
- [6] XU B, JIN X, MIN L, et al. Chloride channel-3 promotes tumor metastasis by regulating membrane ruffling and is associated with poor survival[J]. Oncotarget, 2015, 6(4): 2434-2450.
- [7] YE D, LUO H, LAI Z, et al. CIC-3 chloride channel proteins regulate the cell cycle by up-regulating cyclin D1-CDK4/6 through suppressing p21/p27 expression in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30276.
- [8] ZHOU F M, HUANG Y Y, TIAN T, et al. Knockdown of chloride channel-3 inhibits breast cancer growth in vitro and in vivo[J]. Journal of Breast Cancer, 2018, 21(2): 103-111.
- [9] QIN C, HE B, DAI W, et al. The impact of a chlorotoxin-modified liposome system on receptor MMP-2 and the receptor-associated protein CLC-3[J]. Biomaterials, 2014, 35(22): 5908-5920.
- [10] BOSCH M, AKHTER A, CHEN B E, et al. A bioclinical prognostic model using MYC and BCL2 predicts outcome in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2018, 103(2): 288-296.
- [11] MINOCHA M, ZENG J, MEDEMA J K, et al. Pharmacokinetics of the b-cell lymphoma 2 (Bcl-2) inhibitor venetoclax in female

- subjects with systemic lupus erythematosus[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2018, 57(10): 1-14.
- [12] CHEN P Y, TIEN H J, CHEN S F, et al. Response of myeloid leukemia cells to luteolin is modulated by differentially expressed pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) oncoprotein[J]. 2018, 19(4): 1173.
- [13] SHIN H R, KIM D, HELFMAN D M. Tropomyosin isoform Tpm2.1 regulates collective and amoeboid cell migration and cell aggregation in breast epithelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95192-95205.
- [14] RONG X, GAO W, YANG X, et al. Downregulation of hsa\_circ\_0007534 restricts the proliferation and invasion of cervical cancer through regulating miR-498/BMI-1 signaling[J]. *Life Sciences*, 2019, 235: DOI: org/10.1016/j.lfs.2019.116785.
- [15] SHI X, RAN L, LIU Y, et al. Knockdown of hnRNP A2/B1 inhibits cell proliferation, invasion and cell cycle triggering apoptosis in cervical cancer via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(3): 939-950.
- [16] CHENG W, ZHENG S, LI L, et al. Chloride channel 3 (CIC-3) predicts the tumor size in hepatocarcinoma[J]. *Acta Histochemica*, 2019, 121(3): 284-288.
- [17] HABELA C W, OLSEN M L, SONTHEIMER H. CIC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells[J]. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28(37): 9205-9217.
- [18] CUDDAPAH V A, SONTHEIMER H. Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase ii (camkii) in human malignant glioma[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(15): 11188-11196.
- [19] 李建立, 庞鑫鑫, 郭洪霞, 等. 17β-雌二醇通过PI3K-Akt信号通路抑制丙泊酚诱导皮层神经元凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(1): 58-63.
- [20] 赵广超, 刘洪, 董海龙, 等. 海马PI3K/Akt信号通路在外源性食欲素A改善异氟醚致小鼠记忆功能减退中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(3): 300-303.
- [21] 彭榆翀, 彭宁福, 谢志波, 等. PI3K/AKT信号通路对肝癌细胞MHCC-97H中CD90+干样细胞的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(4): 285-290.
- [22] 胡丽娜, 彭兴春, 郭显智, 等. 抑制Notch和PI3K/Akt信号通路对食管腺癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2016, 43(8): 653-658.
- [23] 潘纪红, 王海滨, 杜晓飞, 等. 虎杖苷通过PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导人宫颈癌细胞凋亡的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12): 2345-2349.
- [24] 邹志坚, 高增光, 王晓敏, 等. 姜黄素对肺腺癌A549细胞PI3K/Akt/Bcl-2信号通路的作用[J]. *江西中医药大学学报*, 2013, 25(5): 15-17.

(李科 编辑)

**本文引用格式:** 刘晓英, 沈鑫, 张静, 等. 氯离子通道蛋白-3对宫颈癌细胞生长、转移的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(8): 36-43.

**Cite this article as:** LIU X Y, SHEN X, ZHANG J, et al. Effects of chloride channel-3 (CIC-3) on the growth and metastasis of cervical cancer cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(8): 36-43.