



文章

H2-钙调蛋白抗原在癌症转移中的作用：
肝癌患者体内存在自身抗体Xiaoyun Bin ^{1,2,†}, Yu Luo ^{1,†}, Zefeng Sun and ¹, Chaoqun Lin ¹, Peng Huang ¹, Zhenbo Tu ¹ , Ling Li ¹, Cong Qu ¹,
Jiamin Long ¹ Sufang Zhou ^{1,3,*}¹ 广西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 南宁 530021 右江民族医科大学基础医学院,
百色 533000 早期防治教育部重点实验室广西医科大学广西² 广西壮族自治区教育厅区域高危肿瘤研究所暨生物分子医学研究重点实验室, 中国南宁 530021 * 通讯作者:³ zsf200000@163.com † 这些作者对本工作有同等贡献。

摘要:为了探讨 H2-钙调蛋白 (CNN2) 作为肝细胞癌(HCC) 血清生物标志物的潜力,本研究采用重组表达 cDNA 克隆血清学分析(SEREX) 技术来鉴定 CNN2 抗体在肝细胞癌 (HCC) 血清中的存在。患有肝癌和其他肿瘤的患者。通过基因工程产生CNN2蛋白,并作为抗原,通过间接酶联免疫吸附试验 (ELISA)测定血清CNN2自身抗体的阳性率。此外,使用RT-PCR、原位RT-PCR和免疫组化方法评估细胞和组织中CNN2的mRNA和蛋白表达。 HCC组抗CNN2 抗体阳性率 (54.8%)显著高于胃癌 (6.5%)、肺癌 (3.2%)、直肠癌 (9.7%)、肝炎 (3.2%)、肝硬化 (3.2%) 和正常组织 (3.1%)。转移性肝癌、非转移性肝癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌、肝硬化、肝炎中CNN2 mRNA阳性率分别为 56.67%、41.67%、17.5%、10.0%、20.0%、53.13%、分别为41.67%。同时,CNN2蛋白阳性率分别为63.33%、37.5%、17.5%、27.5%、45%、31.25%和20.83%。 CNN2的下调可以抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。 CNN2是一种新发现的HCC相关抗原,与肝癌细胞的迁移和侵袭有关,使其成为肝癌治疗的有希望的靶点。



引文: Bin,X.;罗,Y.;孙Z.;林,C.;黄,P.;涂,Z.;李,L.;曲,C.;朗,J.; Zhou, S. H2-钙调蛋白抗原在癌症中的作用
转移:存在
肝癌中的自身抗体
患者,国际。 J.莫尔.科学。 2023 年24 日
9864。https://doi.org/10.3390/ijms24129864

学术编辑: Nam Deuk Kim,
史蒂文·费林和达里奥·马尔凯蒂

收稿日期: 2023 年 2 月 23 日
修订日期: 2023 年 5 月 24 日
接受日期: 2023 年 5 月 29 日
发布日期: 2023 年 6 月 7 日



版权所有: © 2023 作者。
被许可方 MDPI,瑞士巴塞尔。
本文是一篇开放获取文章
根据条款和
知识共享的条件
归属 (CC BY) 许可证(https://
creativecommons.org/licenses/by/
4.0/)。

关键词: CNN2;肝癌;塞雷克斯;血清标记物;肿瘤转移

一、简介

肝细胞癌(HCC)是一种在全世界尤其是亚洲地区发病率和死亡率都很高的恶性肿瘤[1]。尽管全球肿瘤死亡率下降,但肝癌的死亡率却在上升[2-4]。这是因为大多数肝癌病例确诊时已属晚期,手术切除的机会很少,导致化疗或放疗的疗效不佳。因此,有必要探索 HCC 的有效早期诊断标志物和治疗靶点。

甲胎蛋白(AFP)是目前诊断HCC最常用的血清学标志物[5]。然而,高达18-20%的原发性HCC患者,尤其是老年患者,血清AFP水平正常[6],使得AFP筛查HCC容易出现漏检或假阳性。因此有必要鉴定额外的HCC抗原并将其与AFP结合以提高检出率并降低假阳性率。

钙调蛋白是在平滑肌和非平滑肌细胞中表达的肌动蛋白运动相关蛋白家族。脊椎动物的钙调蛋白有 3 种亚型 H1-钙调蛋白 (CNN1)、

H2-钙调蛋白 (CNN2) 和 H3-钙调蛋白 (CNN3)。CNN2基因位于染色体19q13上,分子量为34 KDa。CNN2通过结合肌动蛋白或与钙结合蛋白和辅助肌动蛋白相互作用,发挥抑制平滑肌收缩、参与信号转导、维持骨骼稳定性的作用[7]。

最近的研究表明CNN2在肿瘤细胞的增殖、分化和迁移中发挥作用[8,9]。例如,CNN2的下调可以显著促进前列腺癌细胞的增殖和转移[10]。当实验小鼠体内CNN2基因被敲除后,巨噬细胞的运动性和吞噬能力显著增强,并且还表现出更高的增殖率和更快的移动性[8]。然而,相互矛盾的研究结果表明,内源性CNN2的敲除可以激活胃癌细胞中的caspase3和caspase7,从而抑制癌细胞的持续生长[11]。根据蛋白质组学分析, CNN2 被发现在人类乳腺癌组织中表达上调,但在健康和良性对照中表达不上调[12]。还发现10.5%的乳腺癌患者血清中CNN2表达升高,提示CNN2可以作为乳腺癌早期诊断的生物标志物[13]。在前期研究中,我们采用重组表达cDNA克隆血清学分析 (SEREX)技术,用HCC患者混合血清筛选人未分化胚胎干细胞cDNA文库,鉴定出30个与HCC血清抗体呈阳性反应的cDNA克隆。对30个阳性克隆进行DNA测序和生物信息学分析后,我们利用SEREX技术进行了额外的筛选,在HCC患者的血清中检测到高滴度的抗CNN2自身抗体,表明CNN2可能是一种新型的HCC相关抗原[14, 15]。然而,CNN2的表达水平和细胞分布仍不清楚,其表达升高或降低对肿瘤细胞的影响还有待研究。因此,研究肿瘤组织中CNN2的表达水平及其与肿瘤发生发展的相关性,将为HCC的靶向治疗提供新的理论基础。为了证实HCC患者血清中CNN2自身抗体的特异性以及HCC组织中CNN2表达与HCC细胞增殖、转移的相关性,我们采用SEREX技术检测HCC患者血清中CNN2自身抗体,肝炎患者和其他癌症患者。此外,我们利用 ELISA 来验证 HCC 患者血液中 CNN2 自身抗体的水平。我们还分析了肿瘤细胞系和组织中 CNN2 的表达水平,以探索其作为HCC 分子生物标志物的潜力。

2. 结果

2.1.部分 HCC 患者血清中存在 CNN2 自身抗体使用SEREX 技术分析HCC、

胃癌、肺癌、结直肠癌、肝炎或肝硬化患者 (各 31 例)和健康对照 (32 例)的血清样本。XL1 -Blue MRF 大肠杆菌分别转染CNN2- λ -ZAP和 λ -ZAP,并在LB固体培养基中培养以产生噬菌斑。对NC膜上的噬菌斑进行蛋白质印迹分析并进行比较。与空斑块相比,表达 CNN2 的斑块颜色较深,被鉴定为阳性 (图1A、B)。结果显示,肝癌患者中CNN2抗体阳性率为54.8%,显著高于胃癌 (6.5%)、肺癌 (3.2%)、直肠癌 (9.7%)、肝炎 (3.2%)。%)、肝硬化 (3.2%)和正常组织样本 (3.1%) ($p < 0.05$) (表1) (图1C)。此外,CNN2抗原阳性率与HCC患者的临床指标,如年龄、AFP值、肿瘤病理分级、 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 之间不存在统计学显著相关性 (补充表S1)。

HCC患者的CNN2抗原和临床指标,如年龄、AFP值、肿瘤病理分级和γ-谷氨酰转肽酶 (GGT) (补充表S1)。

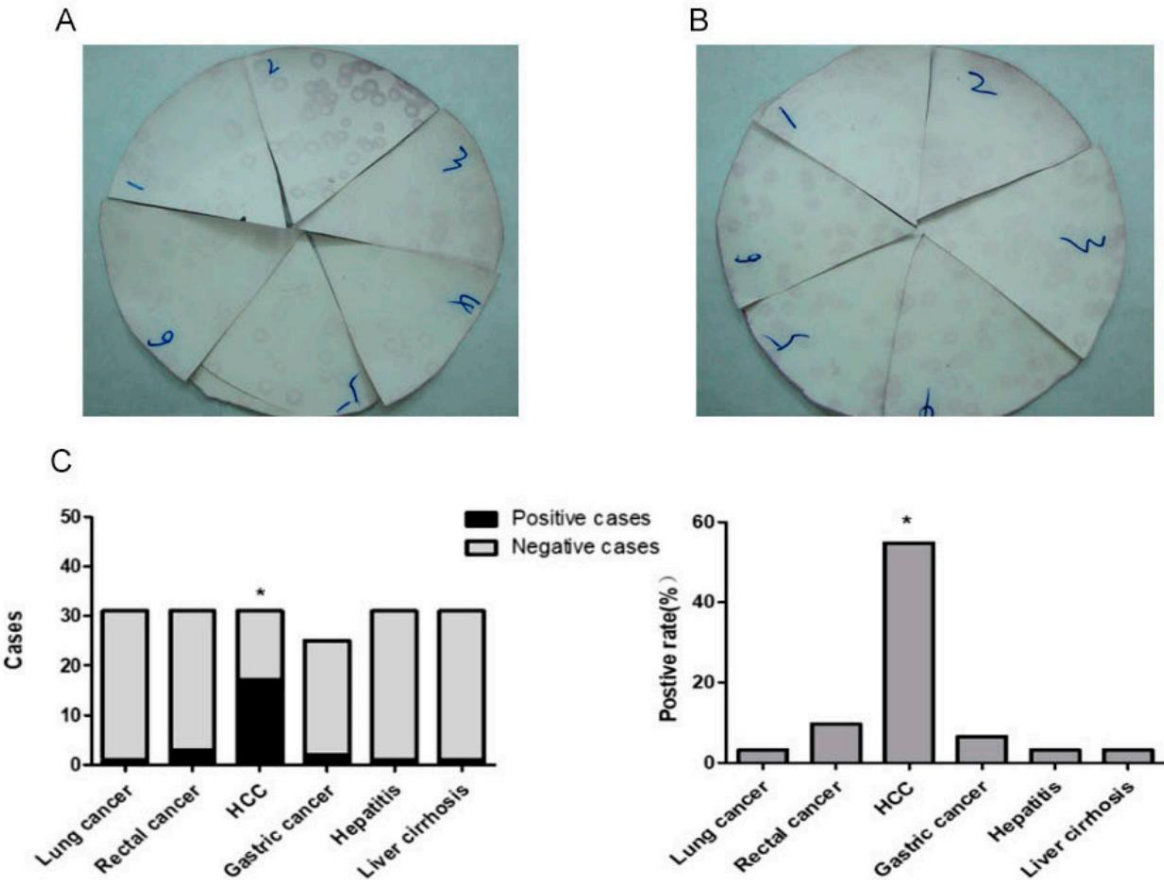


图1. SEREX技术检测不同患者血清中的抗CNN2抗体。
(A)用 CNN2-λ-ZAP 转染的斑点。(B)用 λ-ZAP 转染的斑点。1:胃癌; (A)用 CNN2-λ-ZAP 转染的斑点。(B)用 λ-ZAP 转染的斑点。
2:肝癌; 3:肝炎; 4:肺癌; 5:直肠癌; 6:肝硬化。 (C) 2:HCC的表达统计; 3:肝炎; 4:肺癌; 5:直肠癌; 6:肝硬化。 (C)表达统计。
不同患者血清中的抗CNN2抗体。不同患者血清中的抗 CNN2抗体。
p < 0.05。 p < 0.05。

表1各患者及正常人血清中CNN2抗体阳性率及χ2检验结果
2 各患者血清中CNN2抗体检测结果及

疾病	病例(n)	阳性病例(n)	阴性病例(n)	阳性率(%)	p值
肝癌*	31	17	14	54.8	<0.05
疾病	31	案例 (n)	积极的案例 (n)	消极的案例 (n)	阳性率 (6.5%)
肺癌	31	1	30	3.2	>0.05
肝癌HCC*直肠	31	1	30	3.2	>0.05
癌胃癌	31	3	28	9.7	>0.05
肝炎 31 31肝硬化 3肺	31	1	30	3.2	>0.05
癌 31正常 32直肠癌 31 *	31	1	30	3.2	>0.05
HCC 及其他疾病采用两x2检	31	1	30	3.2	>0.05
癌 31	31	3	28	9.7	>0.05
肝炎 肝脏	31	1	30	3.2	>0.05
肝硬化 正常	31	1	30	3.2	>0.05
	32	1	31	3.1	>0.05

* HCC和其他疾病通过配对χ检验

2 测试,p < 0.05。

2.2. CNN2重组蛋白纯化成功

使用CNN2基因重组噬菌体作为PCR扩增CNN2基因。模板。琼脂糖凝胶电泳显示产物大小约为 1000 bp,这与预期的 969 bp 基因片段大小一致 (图2A)。聚合酶链式反应回收产物并用 Nde I 和 Sal I 酶消化,然后与 pCold III 质粒。将重组质粒 pCold III-CNN2 转化至 DH5α并扩增。通过酶消化确认pCold III-CNN2质粒。发现片段大小与目标基因一致 (图2B)。

一个模板。琼脂糖凝胶电泳显示产物大小约为 1000,与预期的 969 bp 基因片段大小一致 (图 2 PCR 产物回收并用Nde I 和Sal I 酶切,然后用 pCold III 质粒消化。重组体将质粒pCold III-CNN2 转入DH5α并扩增,将pCold III-CNN2质粒经酶切确认,发现片段大小与目的一致 (图2B),测序后,pCold III-CNN2发现重组质粒与 NCBI 上的 CNN2 序列比对完全一致,经测序,发现 pCold III-CNN2 重组质粒完全一致。

质粒pCold III-CNN2转化至大肠杆菌BL21(DE3)pLysS,与NCBI上的CNN2序列比对一致。重组中,并进行基因工程改造。基因工程细菌通过抗生素筛选和PCR进行验证。 Th III-CNN2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS。结果表明,琼脂细菌观察到约1000 bp的目的基因片段,并通过抗生素筛选和PCR验证。 PCR结果电泳,如预期 (图 2C)。琼脂糖凝胶电泳观察目的基因片段约1000 bp处观察到目的蛋白,为PAGE 电泳约为 34 kDa,与预期一致 (图2C)。 SDS-PAGE电泳观察目的蛋白预期大小 (图2D)。在两种细菌 p 中检测到的目标蛋白约为 34 kDa,这与预期大小一致 (图2D)。和上清液 (图2E)。纯化的 His-CNN2 融合蛋白可在细菌蛋白和上清液中检测到目标蛋白 (图 2E)。用抗CNN2抗体进行Western blot检测,表明蛋白保留了纯化的His-CNN2融合蛋白,用抗CNN2进行Western blot检测,表明蛋白保留了纯化的His-CNN2融合蛋白,用抗CNN2进行Western blot检测,表明该蛋白质保留了其免疫原性 (图2F)。

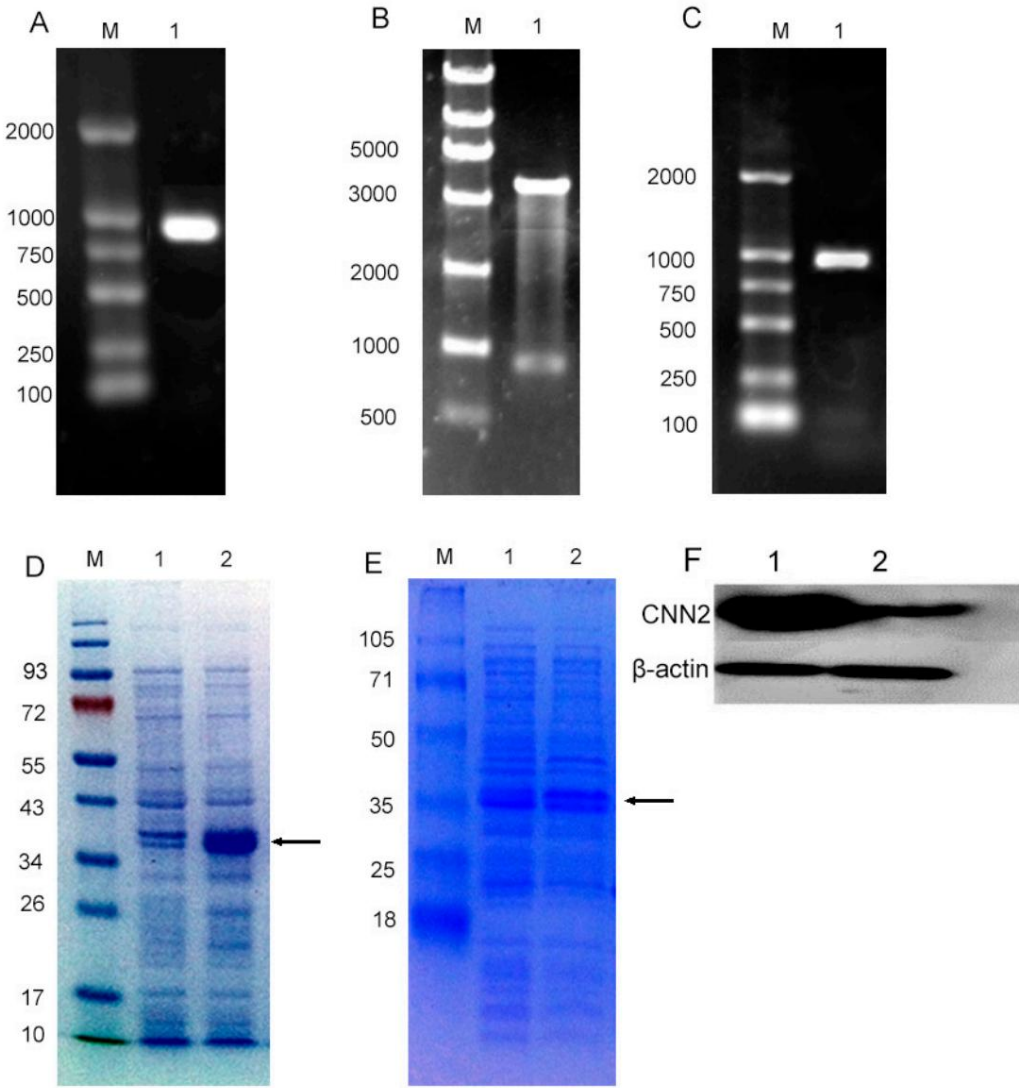


图2.重组H2-钙调蛋白的鉴定和H2-钙调蛋白免疫原性的检测。(A) CNN2 基因的 PCR 扩增。M 列:标记;第 1 列:CNN2 PCR 产物。(B)通过双酶消化鉴定质粒。M 列:标记;第1栏: Nde I和Sal I 酶切的pCold III CNN2。(C)基因工程中CNN2基因的 PCR 鉴定。M 列:标记;第 1 列:从 pCold III-CNN2 扩增的 PCR 产物。(D)基因工程细菌中 CNN2 蛋白的鉴定。(E)可溶性表达的鉴定。M 柱:蛋白质标记;第1栏:添加IPTG前;第 2 栏:归纳法含 0.6 mM IPTG;箭头表示CNN2蛋白。(F) WB 检测 CNN2 蛋白表达。第1栏:不溶片段;第 2 栏:可溶性片段。箭头代表目标蛋白。

2.3.间接ELISA检测血清CNN2抗体

我们将纯化的CNN2重组蛋白包被ELISA板,采用间接ELISA方法检测原发性HCC、肝炎肝硬化患者血清和正常组织中CNN2抗体的存在。按照正常组织 $\pm 3sd$ 定义的阳性值(截断值)标准,123份HCC血清标本中鉴定出26例阳性病例,阳性率为21.14%。此外,182例肝炎和肝硬化阳性病例中检测出18例。阳性率为9.9%,169份正常人血清中有2份呈阳性,阳性率为1.2%(图3A)。肝癌病例组CNN2阳性率与临床指标之间无统计学意义相关性。这意味着血清中抗CNN2抗体的阳性检测不能归因于年龄、性别、AFP值、病理分级、是否存在肝硬化、ALT值、AST值、HBsAg和肿瘤大小等因素(补充表S2)。使用受试者工作特征(ROC)曲线分析评估CNN2的诊断价值。ROC曲线下面积为0.73,表明CNN2对HCC组具有中等的诊断价值。CNN2的敏感性和特异性分别为21.14%和94.30%(图3B)。CNN2和AFP联合检测HCC的阳性率为71.43%,显著高于CNN2(21.85%)和AFP(59.66%)单独检测的阳性率($p < 0.05$)(图3C)。值得注意的是,CNN2和AFP检测方法的结合在检测小HCC方面表现出显著的优势。在16个小HCC样本中,CNN2检出率为18.75%,而AFP检出率为56.25%。然而,当CNN2和AFP检测方法结合时,阳性率增加至75.00%,显著高于任一单一检测方法($p < 0.05$)(图3D)。

2.4. CNN2 在 HCC 组织和细胞中高表达

原位RT-PCR检测显示CNN2 mRNA主要分布在细胞核周围。肺癌、肝癌、胃癌、鼻咽癌中CNN2 mRNA表达阳性率分别为17.5%(7/40例)、50.0%(27/54例)、10.0%(4/40例)、20.0%(8/40例),分别(图4A)。HCC中CNN2 mRNA的阳性率显著高于其他肿瘤组织($p < 0.05$)。

免疫组织化学分析显示CNN2蛋白主要分布在细胞质中,偶尔出现核染色。肺癌、肝癌、胃癌、鼻咽癌中CNN2蛋白表达阳性率分别为17.5%(7/40例)、51.8%(28/54例)、27.5%(11/40例)、45%(18/40例),分别。

HCC中CNN2蛋白表达的阳性率显著高于其他组($p < 0.05$)(图4B)。肺癌、胃癌、鼻咽癌组织中CNN2阳性率无显著性差异。

HCC患者根据年龄、性别、病理分级和转移进行分组。

χ^2 检验显示,无论肿瘤分级如何,CNN2在所有HCC患者中均有表达。然而,有转移的HCC组织中CNN2表达的阳性率(63.33%)显著高于无转移的HCC组织(33.33%)($p < 0.05$)(补充表S3)。

采用RT-PCR检测肿瘤细胞中CNN2 mRNA表达情况,在HCC、胃癌、肺癌细胞系中强表达扩增。然而,在乳腺癌细胞中出现了微弱的扩增带,而在正常人肝细胞中,没有发现CNN2 mRNA表达(图4C)。RT-PCR或Weston blot方法在正常肝细胞(L-02)中未检测到CNN2 mRNA或蛋白表达,而在肝癌细胞中则有强表达带(图4D,E)。原位RT-PCR检测CNN2 mRNA表达阳性率:非转移性肝癌为41.67%(10/24例),转移性肝癌为56.67%(17/30例),转移性肝癌为41.67%(10/24例)。肝炎占53.13%(17/32例),肝硬化占53.13%(17/32例)。具有转移组织的HCC的阳性率在所有组中最高($p < 0.05$)(图5A)。

免疫组化检测CNN2蛋白表达阳性率为

非转移性 HCC 为 37.5% (12/32),转移性 HCC 为 63.3% (19/30),20.8% (5/24) 肝炎和肝硬化分别为 31.3% (10/32)。有一个统计伴有转移的 HCC CNN2 蛋白阳性率差异有统计学意义和肝炎、肝硬化组织 ($p < 0.05$),但之间没有发现显著性差异非转移性 HCC、肝炎和肝硬化组织 ($p > 0.05$) (图5B)。

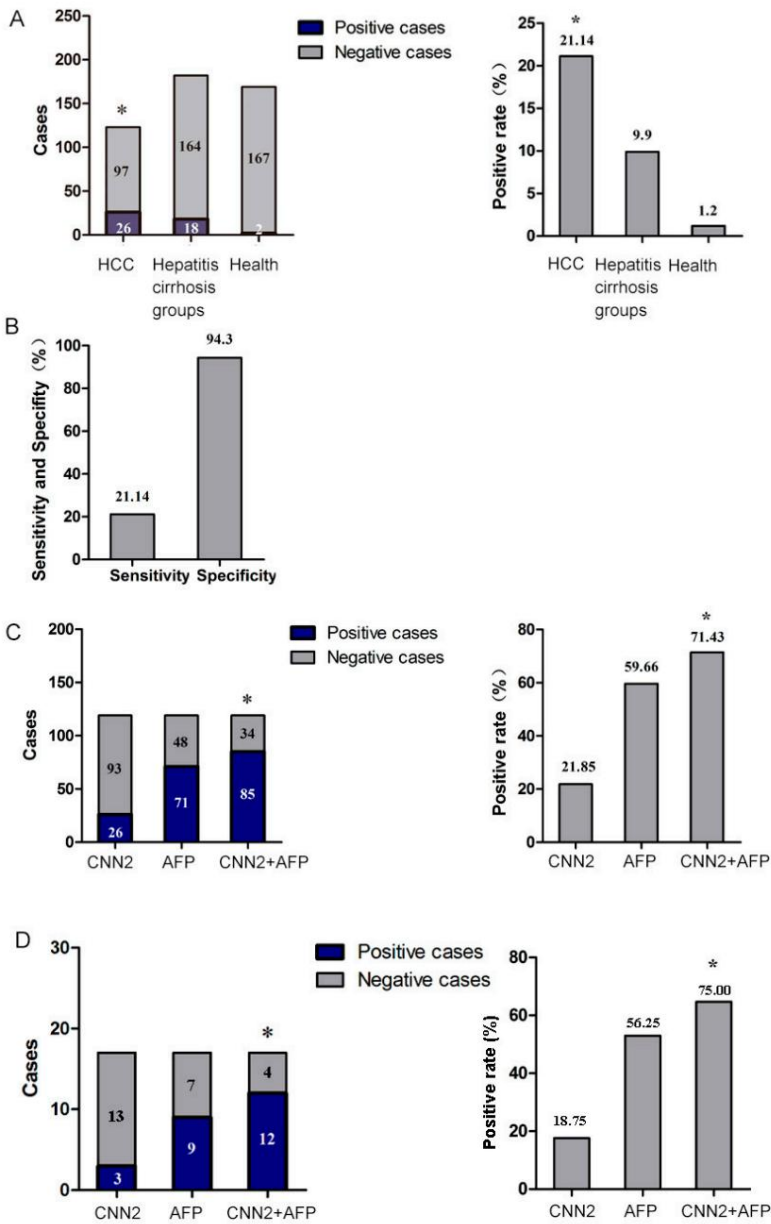


图3.间接ELISA检测血清CNN2抗体。(一)血清抗体阳性率

在 HCC、肝炎肝硬化和健康组中针对 CNN2。(B)敏感性和特异性

图3.间接ELISA检测血清CNN2抗体。(A)抗CNN2抗体血清抗体阳性率。(C) AFP 和 CNN2 组合检测 HCC 的阳性率在 HCC、肝炎肝硬化和健康组中针对 CNN2。(B)抗的敏感性和特异性(D) AFP与CNN2联合检测小肝癌的阳性率。* $p < 0.05$

2.5.通过 siRNA 构建 CNN2 沉默的肝癌细胞系

2.4. CNN2 在 HCC 组织和细胞中高表达我们采用荧光定量 RT-PCR 检测显示 CNN2 mRNA 主要分布在细胞核周围。肺癌、肝癌、胃癌中 CNN2 mRNA 表达阳性率均导致 CNN2 mRNA 表达减少, siRNA1 显示与对照组相比,鼻咽癌、胃癌的显著效果分别为 17.5% (7/40 例)、50.0% (27/54 例)、(4/40 例)和 20.0% (8/40 例) (图 4A)。HCC 中 CNN2 mRNA 的阳性率显著高于其他肿瘤组织 ($p < 0.05$)。

在肺癌、肝癌、胃癌和鼻咽癌中的表达率分别为17.5% (7/40例)、51.8% (28/54例)、27.5% (11/40例)和45% (18/40例) , 分别。HCC 中 CNN2 蛋白表达的阳性率显著高于其他组 ($p < 0.05$) (图 4B)。肺癌、胃癌、鼻咽癌组织中CNN2阳性率无显著性差异。HCC患者根据年龄、性别、病理分级和转移进行分组。 χ^2 检验显示,无论肿瘤分级如何,CNN2 在所有 HCC 患者中均有表达。然而,CNN2 Western blot分析的阳性率表明,siRNA1对细胞的抑制作用最为突出。

具有转移的 HCC 组织中的表达显著高于CNN2 蛋白表达 (63.33%) (图6B) ($p < 0.05$)。在无转移的 HCC 组织中 (33.33%) ($p < 0.05$) (补充表 S3) 。

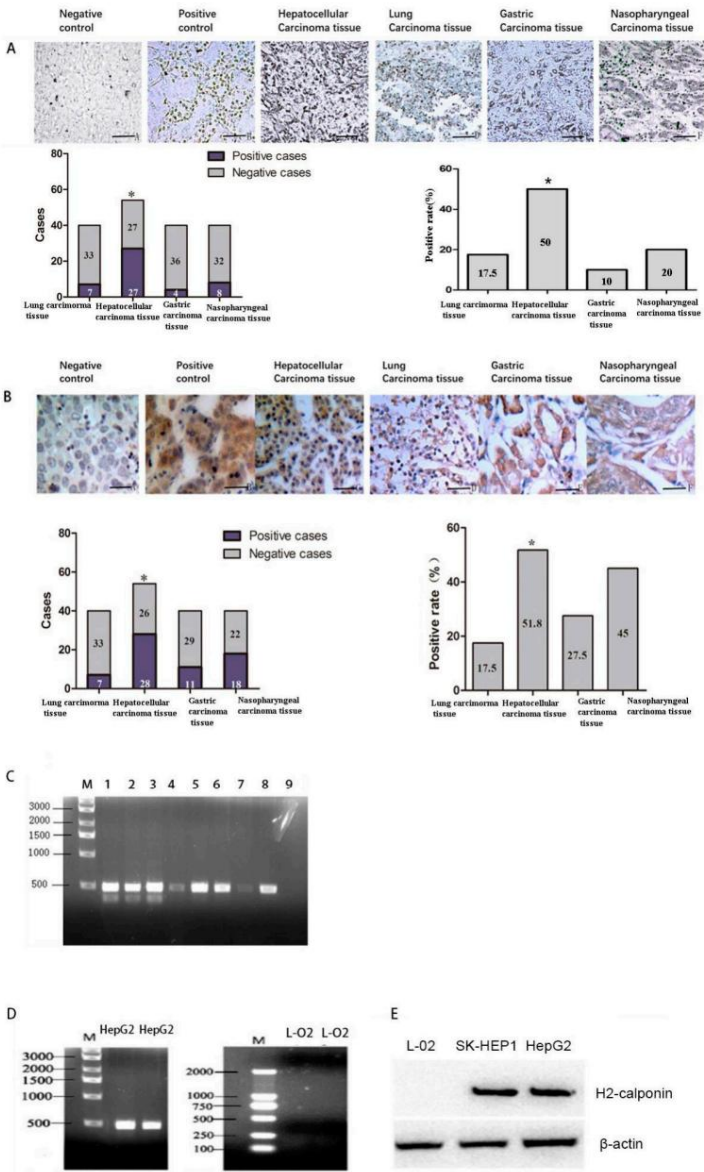


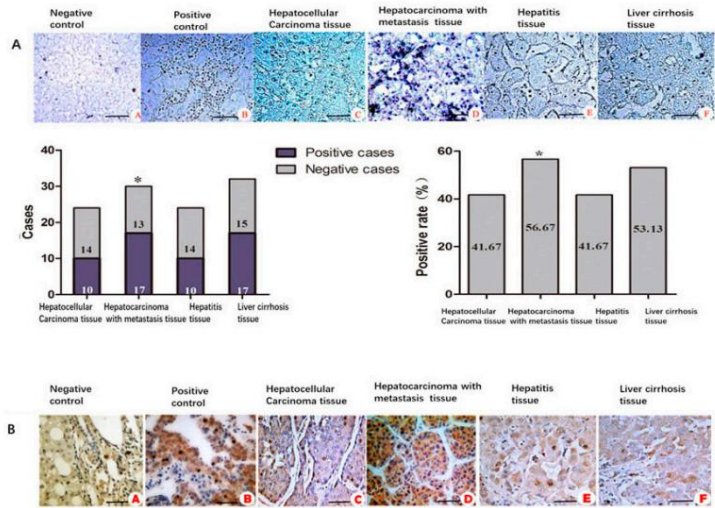
图 4. CNN2 在 HCC 组织和细胞中高表达。原 (A) CNN2 mRNA 的表达。 (B) CNN2 蛋白的表达。 (C) RT-PCR 检测到的肿瘤细胞系中。第 1、2 栏:胃癌;第 3、8 栏:肺癌;第 4、7 栏:乳腺癌;第 5、6 列:HCC;第 9 栏:正常肝细胞。 (四)表达 HCC 和正常肝细胞中 CNN2 mRNA 的变化。 (E) CNN2 蛋白在 HCC 中的表达和正常肝细胞。

2.6.抑制CNN2可减少体外肝癌细胞的侵袭和迁移

我们选择抑制效果最高的siRNA1干扰序列,构建 CNN2 敲低细胞模型。评估肝癌细胞的运动能力。通过使用 CNN2-siRNA1 沉默 CNN2 后的划痕修复实验。我们的结果表明对照组的 Sk-HEP-1/HepG2 细胞在划痕24小时,而CNN2-siRNA组的愈合能力显著减少 (图7A)。这两组之间的划痕宽度具有统计学意义。

正常人肝细胞,未发现 CNN2 mRNA 表达 (图 4C)。RT-PCR或Weston blot方法在正常肝细胞 (L-O2)中未检测到CNN2 mRNA或蛋白表达,而在肝癌细胞中则有强表达带 (图4D,E)。原位RT-PCR检测 CNN2 mRNA表达阳性率:非转移性肝癌为41.67% (10/24例),转移性肝癌为56.67% (17/30例),转移性肝癌为41.67% (10/24例)。肝炎占53.13% (17/32例),肝硬化占53.13% (17/32例)。具有转移组织的 HCC 的阳性率在所有组中最高 ($p < 0.05$) (图 5A)。免疫组化检测的 CNN2 蛋白表达阳性率在非转移性 HCC 中为 37.5% (12/32),在显著性 HCC 中为 63.3% (19/30) ($p < 0.05$),表明 CNN2-siRNA 能够抑制运动性

伴有转移、肝炎20.8% (5/24)、肝硬化31.3% (10/32)以及肝癌细胞迁移。细胞侵袭实验显示,分别。CNN2-siRNA组CNN2跨膜细胞阳性率明显低于对照组,差异有统计学意义。转移性肝癌与肝炎、肝硬化组织之间的蛋白质含量 ($p < 0.05$),而对照组 ($p < 0.05$)。这一发现表明抑制转移性的表达可以抑制肝硬化组织之间没有发现显著性 ($p > 0.05$) (图 5B)。减少 HepG2 和 SK-HEP1 细胞的侵袭 (图7B)。



2.5.通过 siRNA 沉默 CNN2 的肝癌细胞系

我们使用定量 PCR 来评估设计的四种 CNN2-siRNA 序列 (siRNA1, siRNA2, siRNA3, siRNA4) 的功效,并观察到它们都导致 CNN2 mRNA 表达减少,其中 siRNA1 如图 5 所示。CNN2 最明显。在有转移的 HCC 中高表达。(A)原位 RT-PCR 检测与对照组相比,效果最显著 ($p < 0.05$) (图 6A)。图 5 CNN2 在有转移的 HCC 中表达最高。(A)原位 RT-PCR 检测 CNN2 mRNA 在不同肝脏疾病中的表达量 ($\times 400$)。免疫组化结果显示 siRNA 在有转移肝癌中的 CNN2 mRNA 表达最为显著 ($\times 400$)。(B)免疫组化结果显示 siRNA 在有转移肝癌中的 CNN2 mRNA 表达最为显著 ($\times 400$) (图 6B, $p < 0.05$)。CNN2 蛋白在不同肝

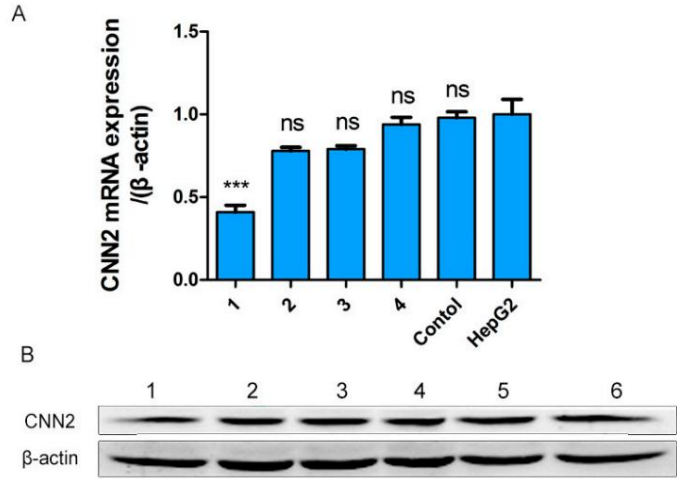


图 6. CNN2 siRNA 的荧光定量 PCR 和 Western blot 结果。(A)平均 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 结果。结果与 HepG2 相比, $p < 0.0001$, 与 HepG2 相比, $p < 0.05$ 。第 5 列: pGPU6-GFP-Neo; 第 6 列: HepG2 细胞。

结果与 HepG2 相比, $p < 0.0001$, 与 HepG2 相比, $p < 0.05$ 。第 5 列: pGPU6-GFP-Neo; 第 6 列: HepG2 细胞。第 1 列: siRNA1; 第 2 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA2; 第 3 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA3; 第 4 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA4; 第 5 列: pGPU6-GFP-Neo; 第 6 列: HepG2 细胞。第 1 列: siRNA1; 第 2 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA2; 第 3 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA3; 第 4 列: pGPU6-GFP-Neo-CNN2 siRNA4; 第 5 列: pGPU6-GFP-Neo; 第 6 列: HepG2 细胞。

2.6.抑制 CNN2 可减少体外肝癌细胞的侵袭和迁移

我们选择抑制效果最高的 siRNA1 干扰序列构建 CNN2 敲低细胞模型。使用 CNN2-沉默 CNN2 后,通过划痕愈合实验评估肝癌细胞的运动能力

siRNA1。我们的结果表明,对照组的 Sk-HEP-1/HepG2 细胞在划伤 24 小时后表现出愈合能力,而 CNN2-siRNA 的愈合能力

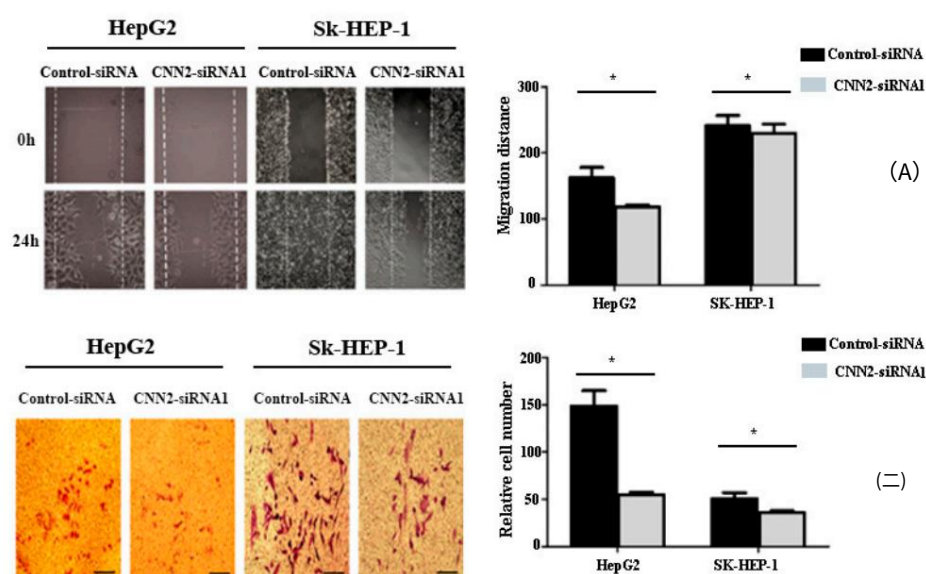


图7.下调CNN2抑制肝细胞癌的迁移和侵袭
图7. CNN2的下调抑制肝细胞癌细胞的迁移和侵袭。(A)划痕愈合实验的结果。(B) Transwell Matrigel 测定结果。
细胞。(A)划痕愈合实验的结果。(B) Transwell Matrigel 测定结果。p < 0.05 3. 讨论

三、讨论

钙调蛋白是与肌动蛋白运动相关的蛋白质家族,在平滑肌细胞中表达

钙调蛋白是与肌动蛋白运动相关的蛋白质家族,在平滑肌细胞和非平滑肌细胞中表达。在脊椎动物中,存在三个同源基因: CNN1、CNN2 和 CNN3,分别编码 3 个同种型。CNN1 主要表达于平滑肌细胞,参与平滑肌收缩。CNN2 主要在分化的平滑肌细胞中表达,参与平滑肌细胞的表达;另一方面, CNN2 不仅在肌肉细胞中表达,还在人类其他非肌肉细胞中表达,如上皮细胞、成纤维细胞和人类角质形成细胞、上皮细胞、成纤维细胞和其他非肌肉蛋白中也检测到,在肿瘤治疗中具有广阔的前景。例如,生物信息学分析表明 CNN1 可能是潜在的膀胱癌,表明 CNN1 可能是潜在的膀胱癌生物标志物和治疗靶点[16]。

生物标志物和治疗靶点[16]。CNN1 被发现抑制侵袭 CNN1 被发现抑制肺鳞癌的侵袭和迁移抑制肺鳞癌细胞的迁移并阻止上皮细胞的转化,并阻止上皮细胞向间质细胞的转化。反之,抑制间质充质。反之,抑制 CNN1 的表达可以促进乳腺癌的发生, CNN1 的表达可以促进乳腺癌的转移[17,18]。据推测,针对 CNN2 的肿瘤靶向治疗,针对 CNN2 表达的肿瘤靶向治疗可能是一种有前途的方法。表达可能是治疗人类肿瘤的一种有前途的方法,并且在治疗人类肿瘤时, CNN2 的敲除可抑制细胞增殖,阻断细胞增殖敲低 CNN2 抑制细胞增殖、阻断细胞周期 S 期、抑制 S 期周期、抑制细胞侵袭和迁移、抑制异种移植细胞侵袭和迁移,并抑制裸鼠异种移植肿瘤的生长[19,20]。我们之前的研究也证明 CNN2 在裸鼠肿瘤生长中发挥着关键作用[19,20]。我们之前的研究也表明 CNN2 肿瘤生长和转移,可能作为潜在靶点。分子在肿瘤生长和转移中起关键作用,可能作为潜在靶点肝癌的靶向治疗[21]。肝癌的分子

靶向治疗[21]。已知血清中可检测到针对肿瘤抗原的自身抗体已知血清中可检测到针对肿瘤抗原的自身抗体癌症患者,即使是在早期阶段[22]。例如,即使在早期阶段,也已在癌症患者中发现了 s-p53-Abs [22]。例如,已发现 s-p53-Abs 在多种癌症中具有较高的阳性率[11,23]。SEREX 是一种在多种癌症中具有高阳性率的技术[11,23]。SEREX 是一种用于发现和鉴定肿瘤相关抗原,已用于发现和鉴定肿瘤相关抗原,已用于筛查各种类型的肿瘤,如淋巴瘤、白血病、食管癌和胃癌[24-28]。在这项研究中,我们利用 SEREX 技术来检查各种类型肿瘤的筛查,例如淋巴瘤、白血病、食管癌、HCC、胃癌、肺癌和胃癌患者的血清中存在 CNN2 抗体[24-28]。在这项研究中,我们利用 SEREX 技术来检查 CNN2 抗体

CNN2 抗体 HCC 患者血清中 CNN2 表达显着升高,而癌症、结直肠癌、肝炎、肝硬化和健康个体的血清中 CNN2 表达显着升高。我们的研究结果表明 HCC 患者血清中 CNN2 表达显着升高,而无 CNN2 阳性率差异有统计学意义

其他肿瘤患者的血清和健康对照组的血清。此外,还有 CNN2 抗原阳性率与临床无显著相关性

HCC 患者的年龄、AFP 值、肿瘤病理分级、GGT 等指标。这些结果表明 SEREX 技术可以有效筛选 CNN2 作为 HCC 相关抗原,并且 CNN2 与 HCC 的发生和进展密切相关

HCC 的发生,但并没有恶化。在一项类似的研究中,使用了 SEREX 技术

筛查乳腺癌自身抗体,敏感性为 70%,特异性为 91% [29]。

小林等人。 [30]还报道,在诊断为消化器官癌症 (包括食管鳞状细胞癌、胃癌和结肠癌)的患者中,在鉴定的14种抗原中,10种是食管鳞状细胞癌的潜在诊断工具,8种是胃癌的潜在诊断工具,3 为结肠癌。他们的抗体水平明显高于SEREX检测到的健康捐献者的抗体水平。

筛选肿瘤患者血清中针对肿瘤相关抗原的自身抗体的主要方法是SEREX技术,但其复杂性使其难以用于大样本量。为了探讨CNN2在HCC诊断、治疗和预测预后方面的潜力,我们采用间接ELISA方法,使用重组CNN2蛋白包被的ELISA板来检测原发性肝癌、肝炎肝硬化患者血清中的抗CNN2抗体和正常对照。结果表明,HCC患者血清中抗CNN2抗体的阳性率显著高于肝硬化患者或正常对照者。

根据ROC分析,CNN2表现出诊断潜力,敏感性为21.14%,特异性为94.30%。然而,HCC血清CNN2抗体阳性率与年龄、性别、AFP值、BCLC分期、肝硬化、ALT值、AST值、HBsAg、肿瘤大小等临床指标无关。这些结果与我们的研究一致。SEREX研究成果。

AFP 是 HCC 检测的重要肿瘤标志物,但在识别早期和小 HCC 方面的敏感性有限[31-33]。因此,一些研究人员尝试将AFP与其他HCC相关因素结合起来以提高检测效率,并取得了可喜的结果。例如,AFP联合PIVKA-II [34]、AFP-L3和DCP [35]以及AFP联合GP73和DCP [36,37]都被发现可以增强AFP对HCC的诊断价值。根据该研究,一组针对肿瘤相关抗原的自身抗体,如 Sui1、p62、RaiA、p53、NY-ESO-1 和 c-myc,在检测 HCC 时与 AFP 具有相加效应[38]。我们的研究还表明,结合 AFP 和CNN2 提高了 HCC 和小 HCC 的检出率,阳性检出率分别为 71.43% 和 75.00%。因此,CNN2 有可能作为一种有用的临床诊断工具来协助检测 HCC。

我们发现CNN2在肝癌细胞系中高表达,但在正常肝细胞系中不表达。此外,我们的研究还发现, CNN2的mRNA和蛋白表达水平在HCC组织中显著高于其他肿瘤组织,但在非转移性HCC、肝炎和肝硬化中的表达水平无显著差异。但CNN2 mRNA和蛋白的阳性表达率在转移性HCC和非转移性HCC中差异有统计学意义。我们所有的研究都表明HCC患者的血清抗体滴度和组织mRNA和蛋白表达水平存在异常表达,尤其是在转移性HCC中。

当我们沉默HepG2细胞中CNN2的表达时,细胞划痕和细胞迁移实验表明,抑制CNN2的表达显著阻碍肝癌细胞的迁移和侵袭。同样,也有研究表明CNN2的表达与结肠癌的侵袭能力有关,并且在结肠癌组织中检测到了高水平的CNN2表达[22]。基于这些发现,我们推测CNN2可能是与HCC相关的抗原,其表达强度可能与转移程度相关。因此,CNN2可以作为HCC的生物标志物,而不是其他肝癌疾病的标志物。

CNN2 参与肿瘤转移的机制尚未完全清楚。肿瘤侵袭和转移最重要的方面之一是细胞外基质屏障的破坏[39]。人们普遍认为肿瘤细胞通过其表面受体粘附到基质的不同成分后激活并分泌各种蛋白水解酶[40]。然而,目前尚不清楚CNN2表达的下调是否通过蛋白质降解酶、内皮细胞迁移和肿瘤血管生成影响HCC细胞与细胞外基质的粘附,或

通过参与肿瘤转移的细胞骨架重塑和分子粘附。需要进一步的研究来探索和理解潜在的机制。

4. 材料和方法4.1.临床标本肝癌、肺癌、胃癌、直肠癌、肝炎、肝硬化

化患者和健康个体的血清样本采集于广西医科大学第一附属医院,保存于-80 °C。

肝癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌的肿瘤组织以及边缘大于5 cm的癌旁组织均采集于广西医科大学第一附属医院。在体外30分钟内总共获得了54个HCC和40个其他肿瘤组织,以及每组8个正常对照。然后将组织样本送往西安艾利纳生物科技有限公司(中国山西西安)进行组织芯片制备(TMA)和冷冻。所有标本均经过病理诊断,并收集相关临床资料。广西医科大学伦理委员会(20200035)批准了本研究,并获得了所有参与患者和健康捐赠者的知情同意。

4.2.细胞系和细胞培养

Sk-hep-1、HepG2 和 L-02 细胞系(中国科学院上海生命科学研究院,中国上海)保存在 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SH30243.01, Hyclone, Kentucky, UT, 美国)补充有10% 胎牛血清(16000-044, Gibco, 纽约, 纽约, 美国),并在5% CO₂气氛中于 37 °C下孵育。每两天更换一次培养基。

4.3. SEREX 检测肿瘤患者血液中的抗 CNN2 抗体

XL1-BlueMRF 大肠杆菌和CNN2-λ-ZAP噬菌体转染的 XL1-BlueMRF 大肠杆菌保存在我们的实验室[31]。

收获XL1-Blue MRF 大肠杆菌并进行反复冻融循环,然后超声裂解以获得细菌裂解物。为了避免患者血清中非特异性因素的干扰,将 200 μL 裂解液与 20 mL 稀释 260 倍的血清混合并孵育过夜。然后用 200 μL CNN2-λ-ZAP噬菌体和等体积的无噬菌体溶液转染XL1-Blue MRF 大肠杆菌,然后添加到 6 mL 含有四环素的预热顶层琼脂培养基中。将混合物涂在预热的 LB 固体培养基上,并在 37°C 下孵育,直至出现噬菌斑。用硝酸纤维素 (NC)膜印迹噬菌斑,然后在孵育6小时后除去膜。将NC膜用PBS浸泡,用5%脱脂牛奶封闭,缓慢振荡2 h,用PBST洗脱10 min,共3次。NC 膜被切成几部分并编号。将每张NC膜浸入HCC、胃癌、肺癌、直肠癌、肝炎、肝硬化患者的血清和正常组织中,然后用200μL裂解液稀释260倍2小时,用PBST洗脱10小时。分钟3次。清洗后,将NC膜浸入1:10,000碱性磷酸酶 (AP)连接的羊抗人IgG中,室温下轻轻摇动孵育2 h,用PBST洗脱10 min,共3次。洗膜后,用BCIP/NBT进行显色反应。

4.4. CNN2重组蛋白的构建与纯化

以课题组前期构建的CNN2-λ-ZAP噬菌体为模板,通过PCR扩增CNN2基因。引物序列如下:正向: 5'-ATACATATGCACCATCATCATCATCATTCCTCCCGACGGTGCGGCCGCT-3;反向: 5'-AGTGTCTGACTCAGGGACCTCCCCGGGTCCGGGCA-3(由中国上海生物工程有限公司合成)。PCR 扩增后,将DNA片段和pCold III质粒(3363, Takara Bio, 北京, 中国)用NdeI和SalI消化

限制性内切酶,琼脂糖凝胶电泳后,回收凝胶并纯化。连接酶将基因片段与质粒连接,转化感受态细胞DH5 α ,筛选阳性克隆。提取重组质粒,双酶切鉴定,送上海三工股份有限公司。

(中国上海)进行测序。选择正确构建的重组表达质粒(pColdIII-CNN2)并转化大肠杆菌。筛选BL21(DE3)pLysS(CD70102,全锦生物科技,中国北京)感受态细胞,并筛选阳性细菌克隆。收集菌液,破菌后取上清液和沉淀进行SDS-PAGE鉴定。经层析纯化并鉴定了基因工程蛋白His-CNN2。

4.5.间接ELISA

我们将10 μ g/mL纯化的CNN2重组蛋白以100 μ L/孔的浓度添加到ELISA板中,并在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。洗涤后,用0.5%牛血清白蛋白(BSA)(A8010,北京硕博生物工程有限公司)在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。将HCC、乙型肝炎病毒、肝硬化和正常组织的血清用PBST稀释1024倍,然后将100 μ L/孔加入到ELISA板中,37 $^{\circ}$ C孵育1h。将生物素-羊抗人IgG(H+L)抗体(K1218,APExBIO,上海,北京)稀释20,000倍,100 μ L/孔加入到ELISA板中,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。将链霉亲和素-HRP稀释9000倍,然后将100 μ L/孔添加到ELISA板中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后,将四甲基联苯胺显色液(TMB)(IT0250,索拉生物工程有限公司,北京,中国)加入ELISA板中,每孔100 μ L,避光孵育15分钟。通过添加2M浓硫酸终止反应。通过酶标仪测量450 nm处的吸光度。

4.6.原位 RT-PCR 分析

组织切片(4 μ m)脱蜡,胃蛋白酶消化45分钟,37 $^{\circ}$ C与H₂O₂-TBS孵育过夜,蛋白酶K消化45分钟,95 $^{\circ}$ C 2分钟灭活蛋白酶K,然后用DNase在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。RT-PCR反应系统(杭州博日科技有限公司,浙江杭州),添加1 mmol/L Digox-dUTP(100921,北京中山金桥生物技术有限公司,中国北京)。PCR反应预变性,95 $^{\circ}$ C 3min,然后进行25个循环(95 $^{\circ}$ C 30s,44 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 45s)扩增。

引物序列如下:正向:5-GTGGCTGAAGGATGGAAC-3;反向:5-TGTGTTCTTGAGGCTGATG-3(上海杰瑞生物工程有限公司,上海,中国)。加入小鼠抗地高辛IgG-AP(1:300)(DS0004,北京中三金桥生物技术有限公司,北京),与BCIP/NBT室温反应30min,观察拍摄的。

4.7.实时定量PCR

使用TRIzol(R0016,Beyotime,上海,中国)从培养的细胞中获得总RNA。使用PrimeScriptTM RT Kit和gDNA Eraser试剂(RR047Q,Takara Bio,北京,中国)合成cDNA。使用SYBR Primix EX TaqTMII实时PCR试剂盒(DRR041A,Takara Bio,北京,中国)进行qRT-PCR扩增。使用的引物如下:CNN2:5-GGTCAAGGCCATATCCCAATAC-3(有义)和5-GGCATAGAAACCACAACTGCTC-3(反义),GAPDH:5-TGCACCA CCAACTGCTTAGC-3(有义)和5-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3(反义)。

qRT-PCR在以下条件下进行:95 $^{\circ}$ C 2分钟,然后进行40个循环(95 $^{\circ}$ C 15秒,55 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 30秒)。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析各组样品中CNN2 mRNA的相对表达量。

4.8.免疫组织化学石蜡切片脱

蜡并水合。用柠檬酸盐缓冲液回收切片,并在室温下用 3% H₂O₂孵育15 分钟。使用山羊血清封闭非特异性结合位点 30 分钟,加入稀释的兔抗人 CNN2 多克隆抗体 (1:200) ,4 °C过夜,然后加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗,37 °C 40分钟载玻片用二氨基联苯胺 (DAB) (ZLI9018,ZSGB-BIO,北京,中国)和苏木精染色,然后用中性巴拉塔封片。

图片由200倍放大光学显微镜 (MSC-B203T,奥林巴斯,北京,中国)拍摄。以已知阳性的HCC组织切片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为空白对照。图像是用 200 倍放大倍数的光学显微镜拍摄的。通过 image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (6.0 版,Media Cybernetics,Rockville,MD,USA)计算平均光密度。

4.9.蛋白质印迹

收获细胞,用BCA试剂盒 (P0010S,Beyotime,上海,中国)提取总蛋白并定量。将每个样品与上样缓冲液混合并在 100°C 下浸泡5 分钟。然后,将 30 µg 样品上样并分离到12% SDS-PAGE 凝胶中 (P0053A, Beyotime,上海,中国) 。然后在 100 V 电压下将凝胶转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) (1620184,Bio-Rad, Hercules,CA,USA)膜上。用 5% 脱脂奶密封非特异性结合位点后,将 PVDF膜与一抗 (SC136987, Santa, CA, USA) 在 4 °C下孵育过夜。然后,孵育辣根过氧化物酶 (HRP)标记的二抗 (HS201, TransGen Biotech,北京,中国) 。 PVDF薄膜按照电化学发光 (ECL)试剂盒 (P1010,APPLYGEN,北京,中国)说明书进行显影。

通过Image J软件(Image J 1.8.0, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)分析蛋白质的灰度值。

4.10. CNN2沉默细胞系的构建

设计了四个 CNN2-siRNA 序列。将CNN2的siRNA基因克隆到含有GFP和Neo的pGPU6表达载体中, RNAi真核质粒表达载体pGPU6/GFP/Neo-CNN2-siRNA由上海格玛制药构建。将HepG2细胞 (3~4 × 10⁵/mL)接种于24孔板中培养 (不含青霉素和链霉素) 。细胞汇合度达到80%~90%后进行质粒转染,转染前4 h将细胞培养基改为无血清DMEM。将Lipofectamine 2000和siRNA质粒按适当比例混合,并将混合物添加至培养的HepG2细胞中。培养6小时后,更换含10%FBS的培养基。细胞在含有 600 µg/mL G418 的 DMEM 中连续培养。8天后,未转染组的细胞完全死亡,而转染组的少数细胞存活。将细胞更换为含300 µg/mL G418的DMEM ,待细胞充满24孔板后转移至6孔板,加入1.8 mL DMEM完全培养基。

当细胞达到100%汇合时,将其转移至25cm²细胞培养瓶中,通过实时荧光定量PCR检测其CNN2mRNA的表达。

4.11.细胞迁移和侵袭测定

将转染细胞及其对照细胞共1 × 10⁶个接种于6孔板中常规培养48h,用10µL移液器吸头在孔内垂直划划,每孔3列。洗涤后,拍摄并记录细胞的照片。刮擦后24 h和48 h观察刮擦区域细胞的迁移状态,并使用 Image J软件 (Image J 1.8.0, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)进行分析,重复3次。

Matrigel 凝胶 (356234,BD,Franklin Lakes,NJ,USA)用无血清DMEM (1:8)稀释,并均匀铺在培养箱底部的 Transwell (8 µm 孔径;Millipore)中,直至明胶变成固体。细胞用无血清DMEM稀释

至 1.5×10^5 个细胞/mL,并将 200 μ L 细胞悬液添加至上室。然后,将800 μ L含10%FBS的DMEM加入下室,并在37 °C、5%CO₂下培养24小时。弃去培养基,用棉签擦拭膜内表面的细胞。膜下表面的细胞用0.1%结晶紫染色10分钟,然后用ddH₂O洗涤两次。显微镜下随机选取5个视野 (200 \times)进行计数,取平均值。

4.12.统计分析使用IBM SPSS

软件 (22.0版, IBM公司,芝加哥,伊利诺斯州,美国)对实验数据进行统计分析,并通过GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism Software Inc.,圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)软件进行绘图。计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用t检验。符合正态分布和方差齐性的组间比较采用单因素方差分析(单因素方差分析),等级比较采用LSD-t检验。计数资料以频数表示,用 χ^2 分析

²。差异具有统计学显著性 ($p < 0.05$)。

5.结论

本研究表明,CNN2在HCC患者的血清、肝癌细胞和肿瘤组织中表现出高表达水平,并且在转移性HCC中水平显着升高。重组CNN2蛋白能够利用间接ELISA有效检测HCC,而CNN2表达下调显着减少HCC细胞的迁移和侵袭。因此,CNN2被认为是与HCC相关的重要蛋白,有可能作为HCC血清学诊断的生物标志物、HCC转移的早期风险预测、以及作为优化HCC治疗方案、提高患者生存率的参考。此外,CNN2是HCC治疗的潜在分子靶点,为肿瘤治疗提供了新途径。

补充材料:支持信息可在以下网址下载: <https://www.mdpi.com/xxx/s1>。

作者贡献:概念化,XB和SZ;数据管理,YL和ZS;形式分析,CL和PH;融资收购,SZ;调查,XB,YL,JL和ZT;方法论,LL和CQ;监督,深圳;写作—初稿,XB和SZ;写作—审查和编辑,XB,YL和SZ 所有作者均已阅读并同意稿件的出版版本。

基金资助:本工作得到国家自然科学基金项目(No. 82273103, 82100444, 81872491)资助;国家新药创制科技重大专项 (2018ZX09733001-004-002) ;国家科技基础资源调查专项项目 (2017FY101200-3) ;区域高危肿瘤早期防治教育部重点实验室/广西重点实验室 (GKE2019-09,GKE-ZZ202007,GKE-ZZ202127)。

机构审查委员会声明:本研究根据赫尔辛基宣言进行,广西医科大学伦理委员会 (20200035)批准了本研究。

知情同意声明:所有参与研究的受试者都获得了知情同意。

数据可用性声明:当前研究中使用或分析的数据集可根据合理要求从相应作者处获得。

致谢:每位参与者都获得了书面知情同意书。感谢广西医科大学第一附属医院协助采集样本。

利益冲突:作者确认他们与本手稿中描述的研究不存在利益冲突。

参考

1. 西格尔,RL;米勒,KD;瓦格尔,新斯科舍省; Jemal, A. 癌症统计数据,2023.CA Cancer J. Clin. 2023, 73, 17–48。[交叉参考] [考研]
2. 中山, J.; 龚, Z. 用于肝细胞癌建模的转基因斑马鱼。医学通讯2020, 1, 140–156。[交叉参考] [考研]
3. 克罗宁, K.; 莱克, A.; 斯科特, S. 谢尔曼, R.; 努恩, A.; 豪拉德, N.; 亨利, S. 安德森, R.; 弗斯, A.; Ma, J. 向国家提交的癌症状况年度报告, 第一部分: 国家癌症统计数据。癌症-Am. 癌症协会。2018, 124, 2785–2800。[交叉参考] [考研]
4. 萨曼特, H.; 阿米里, H. S.; 英国 Zibari 解决全球肝细胞癌: 流行病学、预防和管理。J. 胃肠测试。安科尔。2021 年12 月, S361–S373。[交叉参考]
5. 易, X. 于, S. Bao, Y. 肝细胞癌中的甲胎蛋白-L3: 一项荟萃分析。临床。奇姆。学报2013, 13, 212–220。[交叉参考]
6. 郑Y.; 朱, M. Li, M. 甲胎蛋白对肝细胞癌发生和进展的影响。J. 癌症资源。临床。安科尔。2020, 146, 2439–2446。[交叉参考]
7. 刘, R. Jin, JP 钙调蛋白亚型 CNN1、CNN2 和 CNN3: 平滑肌和非肌肉细胞中肌动蛋白细胞骨架功能的调节剂。基因2016, 585, 143–153。[交叉参考]
8. 黄Q.-Q.; 侯赛因, MM; 吴, K. 帕拉伊, K.; 教皇, RM; 金, J.-P. H2-钙调蛋白在调节巨噬细胞运动和吞噬作用中的作用。J. Biol. 化学。2008, 283, 25887–25899。[交叉参考]
9. 侯赛因, MM; 黄, D.-Y.; 黄Q.-Q.; 佐佐木, Y.; 金, J.-P. 钙调蛋白异构体的发育调节表达和h2-钙调蛋白对细胞增殖的影响。是。J. 生理学。生理学。2003, 284, C156–C167。[交叉参考]
10. 侯赛因, MM; 王X.; 伯格, RC; 金, J.-P. 前列腺癌细胞中 H2-钙调蛋白表达的减少可促进细胞增殖、迁移以及细胞粘附对基质硬度的依赖性。FEBS 开放生物2014, 4, 627–636。[交叉参考]
11. Hu, J.; Xie, W.; Shang, L.; Yang, X.; Li, Q.; Xu, M.; Dou, J.; Zhou, Y.; Niu, W.; Wu, Y. Knockdown of calponin 2 suppressed cell 胃癌细胞的生长。肿瘤生物学。2017, 39, 1010428317706455。[交叉引用] [考研]
12. 李T.; 马, F. 霍L.; 郭X. 陈, B.; Zhou, Q. Calponin-H2 在乳腺癌患者的组织和血浆中表达上调。癌症。摩尔。医学。报告, 2015 年, 12, 2886–2892。[交叉参考] [考研]
13. 德巴尔德, M.; 金太平绅士; 林克, A.; 瓦尔根巴赫, KJ.; 劳赫, P.; 泽尔默, A.; 菲默斯, R.; 库恩, W.; 哈特曼, G.; Walgenbach Brunagel, G. Calponin-H2: 早期检测人类乳腺癌的潜在血清标志物? 肿瘤生物学。2014, 35, 11121–11127。[交叉参考]
14. Chaoqun, L.; Peng, Z.; Feike, K.; Xiaolong, L.; Wenzhen, L.; Danzhao, C.; Sufang, Z. Serumimmune response of hepatocellular carcinoma related antigen calponin2 and its clinical significance. Chin. J. Cancer Biother. Jun 2010, 17, 336–338.
15. 孙Z.; 郭X. 李, Y. 程X.; Zhou, S. 利用肝癌和肝癌血清筛选人胚胎干细胞 cDNA 表达文库方法已修改。生物技术。公牛。2008 年, S1, 160–164。 (用中文 (表达))
16. 刘, Y.; 吴, X. 王, G. 胡, S. 张, Y. 赵, S. CALD1、CNN1 和 TAGLN 被确定为潜在的预后分子通过生物信息学分析膀胱癌标志物。医学2019, 98, e13847。[交叉参考] [考研]
17. 刘W.; 傅X. Li, R. CNN1通过激活TIMP2调节DKK1/Wnt/beta-catenin/c-myc信号通路抑制肺鳞癌细胞的侵袭、迁移和EMT。过期。赫尔。医学。2021, 22, 855。[交叉引用]
18. 王Z.; 李, T.-E.; 陈, M. 潘, J.-J.; 沉K.-W. miR-106b-5p通过靶向CNN1并调节Rho/ROCK1通路促进乳腺癌肺转移。老龄化2020, 12, 1867–1887。[交叉参考]
19. 卢宾, R.; 扎尔克曼, G.; 布谢特, L.; 特雷丹尼尔, J.; 莱格罗斯, Y.; 卡扎尔斯, D.; 赫希, A.; Soussi, T. 血清 p53 抗体作为肺癌的早期标志物。纳特。医学。1995, 1, 701–702。[交叉参考]
20. 岛田H.; 落合, T.; Nomura, F. 1085 例各种恶性肿瘤患者血清 p53 抗体的滴定: 日本 p53 抗体研究小组的多机构分析。癌症-Am. 癌症协会。2003, 97, 682–689。
21. 康X.; 王, F. 兰, X. 李, X. 郑S.; 吕, Z.; 庄, Y. 赵, Y. Zhou, S. 慢病毒介导的 shRNA 靶向 CNN2 在体外和体内抑制肝癌。国际。J. Med. 科学。2018, 15, 69–76。[交叉参考] [考研]
22. 郑L.; 赵, P. 刘, K.; Kong, DL 结肠癌 CNN2 的异位表达促进细胞迁移。译。癌症研究中心。2020, 9, 1063–1069。[交叉参考] [考研]
23. 星野, I.; 纳贝亚, Y.; 泷口, N.; Gunji, H.; 石毛, F.; 岩手, Y.; 白鸟, F.; 矢岛, S.; 冈田, R.; Shimada, H. p53 和/或 NY-ESO-1 自身抗体诱导对胃肠道癌症患者的预后影响。安。胃肠病。外科医生。2020 年, 4, 275–282。[交叉参考]
24. 科斯蒂亚内茨, O.; Shyyan, M.; 安东尼乌克, SV; 菲洛年科, V.; Kiyamova, R. 用于乳腺癌自身抗体谱检测的 SEREX 定义抗原组。生物标志物2017, 22, 149–156。[交叉参考] [考研]
25. 利金斯, 美联社; 吉恩, 文学学士; Banham, AH 使用 SEREX 鉴定淋巴瘤相关抗原。方法分子。医学。2005, 115, 109–128。[交叉参考]
26. 陈, G.; 张, W. 曹X. 李, F. 刘X. Yao, L. 急性单核细胞免疫原性抗原的血清学鉴定白血病。好的。资源。2005, 29, 503–509。[交叉参考]
27. Scanlan, MJ 通过重组 cDNA 表达文库 (SEREX) 的血清学分析鉴定人类肿瘤抗原。电流。协议。免疫学。2005 年, 20, 20–27。
28. 周S.; 易, T. 张, B. 黄, F. 黄, H. 唐, J. 赵 X. 绘制高通量 SEREX 技术筛选图新的肿瘤抗原。梳子。化学。高通量筛选。2012, 15, 202–215。[交叉参考]

29.李,Y.;海峰,J.;李,X.雷,T.白,F. H2-calponin在胃癌中的表达及意义。模组。安科尔。2007, 78, 1800–1803。 (用中文 (表达))

加贺谷,A.;石井,S.;岛田,H.;伊藤,M.;铃木,M.;卡诺,M.; .,等。

使用睾丸cDNA 噬菌体文库通过 SEREX 筛选鉴定胃肠癌的特异性和常见诊断抗体标记。Oncotarget 2018, 9, 18559–18569。 [交叉参考]

31.沙欣,美国 ;图雷西,O.;施密特,H.;科赫洛维乌斯,B.;约翰内斯,T.;施密茨,R.;斯坦纳,F.;罗,G.;肖伯特,I.; Pfreundschuh,M.人类肿瘤在自体宿主中引发多种特异性免疫反应。过程。国家。阿卡德。科学。美国1995, 92, 11810–11813。 [交叉参考] [考研]

[交叉引用] [PubMed] 32. Becker-Assmann,J.;法尔德-阿盖伊,MH;坎塔斯,A.;马克里迪斯,G.;里斯,T.;瓦格纳,KC;彼得森,J.;布吉施,P.;斯坦,A.;冯·哈恩,T.;等人。甲胎蛋白在肝细胞癌中的诊断和预后意义。外科手术2020, 91, 769–777。 [交叉参考] [考研]

33.土屋,N.;泽田,Y.;远藤,I.齐藤,K.;上村,Y.; Nakatsura, T. 肝细胞早期诊断的生物标志物。世界胃肠病学杂志。2015, 21, 10573–10583。 [交叉参考]

34.帕克,SJ;张,JY;郑西南,曹,YK;李,SH;金,SG;查,S.-W.;金,YS;金,HS;金,BS;等人。AFP/AFP-L3 和 PIVKA-II 及其组合在诊断肝细胞癌中的用途。医学2017, 96, e5811。 [交叉参考] [考研]

35.黄RJ;艾哈迈德,A.; Gish,RG 甲胎蛋白升高:鉴别诊断 肝细胞癌和其他失调。临床。肝脏疾病。2015, 19, 309–323。 [交叉参考] [考研]

36.哈尼夫,H.;阿里,MJ;苏希拉,AT;汗,IW;马萨诸塞州卢纳-夸德罗斯;汗,MM;刘,DT-Y.甲胎蛋白在肝细胞癌中的应用和局限性的最新进展。世界胃肠病学杂志。2022, 28, 216–229。 [交叉参考]

37.方,Y.-S.;吴,Q.赵H.-C.;周,Y.叶,L.刘,S.-S.;李,X.-X.;杜,W.-D.血清 AFP/AFP-L3、DCP、GP73 和 DKK-1 的联合检测能否有效提高生物标志物在肝细胞癌决策中的临床价值?荟萃分析。胃肠病专家牧师。肝醇。2021, 15, 1065–1076。 [交叉参考]

38.冈田,R.;大冢,Y.;若林,T.;筱田,M.;青木,T.;村上,M.;有泉,S.;山本,M.;荒牧,O.;高山, T.;等人。六种自身抗体作为肝细胞癌的潜在血清生物标志物:一项前瞻性多中心研究。国际。J。癌症2020, 147, 2578–2586。 [交叉参考]

39.纳杰菲,M.;法胡德,B.; Mortezaee, K. 细胞外基质 (ECM) 硬度和降解作为癌症驱动因素。J.细胞生物化学。2018, 120, 2782–2790。 [交叉参考]

40. Cox,TR 癌症中的基质。纳特。癌症杂志2021, 21, 217–238。 [交叉参考]

免责声明/出版商注:所有出版物中包含的声明、意见和数据仅代表个人作者和贡献者的观点,而非 MDPI 和/或编辑的观点。 MDPI 和/或编辑对内容中提及的任何想法、方法、说明或产品造成的任何人员或财产伤害不承担任何责任。