



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.04.10

文章编号: 2095-1264(2024)04-0448-09

## KIF2C 在乳腺癌中的表达及其对肿瘤生长的影响\*

麦孜悦, 曾 健\*

(广西医科大学第一附属医院 胃肠腺体外科, 广西南宁, 530021)

**摘要:** **目的** 探讨驱动蛋白家族成员 2C(KIF2C)在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 收集 TCGA 数据库及 GEO 数据库的 GSE1456、GSE9195、GSE4922 和 GSE96058 数据集中乳腺癌患者的数据,采用生物信息学方法进行分析,鉴定关键基因 KIF2C,预测 KIF2C 在乳腺癌中的表达及其预后价值。收集 39 例乳腺癌患者的癌组织及癌旁组织样本,采用免疫组织化学法检测 KIF2C 蛋白的表达。采用 qPCR 和 JESS 全自动蛋白分析仪检测正常乳腺细胞 MCF10A 和乳腺癌细胞系 MCF7、T47D、SK-BR-3、MDA-MB-231、BT474 中 KIF2C 的 mRNA 和蛋白表达。选取 mRNA 及蛋白均呈高表达的细胞株进行慢病毒感染沉默 KIF2C,采用免疫荧光检测 Ki-67 表达水平,Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力,流式细胞术检测细胞周期。**结果** 在 TCGA-BRCA 数据库中收集到 661 个乳腺癌差异表达基因(DEG),与 GSE1456、GSE9195、GSE4922 和 GSE96058 数据集取交集后,得到 37 个表达有显著差异的乳腺癌复发相关预后基因。运用 RAA 算法鉴定出 5 个关键基因,并对其中的 KIF2C 进行初步生物信息学分析。免疫组织化学检测结果显示,KIF2C 在乳腺癌组织中高表达。qRT-PCR 和 JESS 全自动蛋白分析仪检测结果显示,与正常乳腺细胞 MCF10A 相比,乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 KIF2C 表达水平显著升高。沉默 KIF2C 可抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,使细胞周期 S 期受到阻滞。**结论** KIF2C 在乳腺癌组织和细胞中高表达,沉默 KIF2C 可抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

**关键词:** 乳腺癌; KIF2C; 增殖; 侵袭; 迁移

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A

## Expression of KIF2C in breast cancer and its effect on tumor growth\*

MAI Ziyue, ZENG Jian\*

(Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, Guangxi, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of kinesin family member 2C (KIF2C) in breast cancer and its effects on the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. **Methods** The data of breast cancer patients in GSE1456, GSE9195, GSE4922 and GSE96058 datasets of the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) database were collected and analyzed by bioinformatics methods to identify the key gene KIF2C and to predict the expression and prognostic value of KIF2C in breast cancer. The expression of KIF2C protein in 39 cases of breast cancer tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. qPCR and JESS automatic protein analyzer were used to detect the mRNA and protein expression of KIF2C in normal breast cells MCF10A and breast cancer cell lines MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-231 and BT474. The cell lines with high mRNA and protein expression were selected for lentivirus infection to silence KIF2C. Immunofluorescence was used to detect the expression of Ki-67. Transwell method was used to detect the migration and invasion ability of cells, and flow cytometry was used to detect the cell cycle. **Results** A total of 661 differentially-expressed genes (DEGs) in breast cancer were collected from the TCGA-BRCA database.

\*基金项目:广西科技计划项目(桂科 AB18126054)。

作者简介:麦孜悦,女,硕士研究生,研究方向:乳腺癌基础与临床研究。

\*通信作者:曾健,男,硕士,主任医师,研究方向:乳腺癌基础与临床研究。

After intersected with GSE1456, GSE9195, GSE4922 and GSE96058 datasets, 37 breast cancer recurrence-related prognostic DEGs were obtained. Five key genes were identified by RAA algorithm, and KIF2C was preliminarily analyzed by bioinformatics. Immunohistochemistry results showed that KIF2C was highly expressed in breast cancer tissues. The results of qRT-PCR and JESS automatic protein analyzer showed that the expression level of KIF2C in breast cancer cells MDA-MB-231 was significantly higher than that in normal breast cells MCF10A. Silencing KIF2C could inhibit the proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells, and block the S phase of cell cycle. **Conclusion** KIF2C is highly expressed in breast cancer tissues and cells, and silencing KIF2C can inhibit the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells.

**Keywords:** Breast cancer; KIF2C; Proliferation; Invasion; Migration

## 0 前言

乳腺癌(breast cancer, BRCA)是我国女性最常见的恶性肿瘤之一,居女性恶性肿瘤死亡率首位。在过去十年里,随着生育率的下降和肥胖率的上升,乳腺癌的发病率持续增加<sup>[1]</sup>。乳腺癌是一种异质性疾病,其发生、发展过程中存在激素紊乱、致癌信号通路改变、蛋白表达失调和基因组改变等问题<sup>[2]</sup>。因此,相关基因的研究对乳腺癌的诊断、治疗及预后具有重要意义。

驱动蛋白超家族(kinesin superfamily protein, KIF)可利用ATP酶水解释放的能量驱动与其相结合的分子沿着微管细丝做定向运动,运输细胞内的囊泡、细胞器、信息分子、染色体和信使RNA等,参与信号通路的调节<sup>[3]</sup>。哺乳动物细胞中包含45个KIF家族成员,以及14个亚家族,命名为Kinesin1~14<sup>[4]</sup>。根据运动结构域在分子中的位置可将KIF大致分为三类:(1)N型驱动蛋白,运动结构域位于氨基末端;(2)M型驱动蛋白,运动结构域位于中间;(3)C型驱动蛋白,运动结构域位于羧基末端<sup>[5]</sup>。M型驱动蛋白中的Kinesin13家族包括KIF2A、KIF2B、KIF2C和KIF24,其中,KIF2C作为一种有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白(mitotic centromere-associated kinesin, MCAK),是Kinesin13家族最具特征的成员,其氨基酸序列的中间包含一个保守的运动蛋白结构域,具有从微管聚合物末端去除微管蛋白亚基的能力,从而解聚微管<sup>[6]</sup>。研究表明,KIF2C主要分布在中心体、中心粒、星状微管和微管的正端<sup>[7]</sup>,主要参与有丝分裂过程中的纺锤体组装、染色体聚合、着丝粒-微管连接和染色体分离等过程,并在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。最新研究表明,KIF2C参与胃癌、肺癌和肝癌细胞的增殖和迁移<sup>[9-11]</sup>。然而,KIF2C在乳腺癌中的表达、作用及其分子机制尚不清楚。本研究拟运用生物信

息学方法筛选和识别与乳腺癌相关的基因KIF2C,分析其与乳腺癌预后的关系,并探讨沉默该基因对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据集(<https://portal.gdc.com>)中获取1104个乳腺癌患者的癌组织和113个癌旁组织的RNA-seq数据及相应临床信息。使用R包“limma”按照 $|\text{Log}_2\text{FC}| > 3$ 、 $P < 0.05$ 的筛选条件鉴定TCGA-BRCA差异基因。将筛选出的TCGA-BRCA差异表达基因(differentially-expressed gene, DEG)与基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中包含生存数据的乳腺癌数据集GSE4922、GSE9195、GSE1456、GSE96058用Venn图取交集,得出表达有显著差异的预后基因。根据 $P < 0.01$ 、 $HR > \text{Mean} + \text{SD}$ 的筛选条件,对每个GEO数据集的结果进行单因素Cox分析。再使用R包“RobustRankAggreg”根据频次 $\geq 4$ 、 $P < 0.05$ 的筛选条件进行RAA算法计算,进一步筛选出5个与预后相关的基因。查询相关文献,选择其中的KIF2C进行进一步分析。对TCGA数据库中的KIF2C高表达组和低表达组进行差异分析,使用R软件“ClusterProfiler”包进行GO和KEGG通路富集分析。利用肿瘤数据库GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)和Kaplan-Meier Plotter(<https://km-plot.com/analysis/>)分析KIF2C在乳腺癌组织与癌旁组织中的表达及其预后价值。利用肿瘤数据库UALCAN(<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>)进行KIF2C与乳腺癌临床病理特征的相关性分析。使用生物信息学数据库TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)分析乳腺癌中KIF2C高表达与常见免疫细胞浸润的关系。

## 1.2 材料与仪器

**1.2.1 材料** 正常乳腺细胞 MCF10A 及乳腺癌细胞系 MCF7、MDA-MB-231 购于中国科学院干细胞库, 乳腺癌细胞系 BT474、SK-BR-3 及 T47D 购于武汉普诺赛生命科技有限公司, 均符合中华人民共和国细胞无菌检测通则国家标准, 并附有 STR 鉴定报告。KIF2C 敲低慢病毒由上海吉凯基因科技有限公司设计合成; DMEM、RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司; MCF10A、MCF7 细胞专用培养基及 L-15 细胞培养基购于武汉普诺赛公司; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 qRT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司; KIF2C 抗体 (2488C3a) 购于 Santa Cruz 公司; Ki-67 多克隆抗体购于武汉三鹰公司; MCAK 单克隆抗体 (OTI1C5) 购于赛默飞公司; Matrigel 基质胶购于康宁公司; 全自动蛋白分析仪试剂盒购于 Protein Simple 公司。

**1.2.2 主要仪器** BX53 型正置荧光显微镜、CX-23 型倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); JESS 型多功能全自动蛋白分析仪 (Protein Simple 公司); 7500FAST 型实时荧光 PCR 系统 (Applied Biosystems 公司)。

### 1.3 qRT-PCR 法检测乳腺癌细胞系中 KIF2C 的表达

MCF10A 和 MCF7 细胞分别培养于各自专用培养基中, SK-BR-3 细胞培养于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, BT474、T47D 细胞培养于含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, MDA-MB-231 细胞采用 L-15 完全培养基。所有细胞均置于 37 °C 恒温培养箱中, 除 MDA-MB-231 细胞在非 CO<sub>2</sub> 环境下培养外, 其他细胞均在 5% CO<sub>2</sub> 环境下培养。采用过柱法提取各细胞的 RNA, 逆转录试剂盒反转录 cDNA, 以 GAPDH 作为内参进行 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 引物序列: F 5'-AGCTGACACAGGTGCTGAGG-3', R 5'-TGTCTGCATATCTCAGGGTGTTA-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 KIF2C 表达量。

### 1.4 JESS 全自动蛋白分析系统检测乳腺癌细胞系中 KIF2C 蛋白的表达

采用 RIPA 裂解液提取各乳腺癌细胞系的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。按照 JESS 全自动蛋白分析系统说明书调整蛋白浓度, 加样后上机检测, 以 GAPDH 作为内参, 测定各细胞中 KIF2C 蛋白表达水平。实验重复 3 次。

### 1.5 慢病毒感染稳定细胞株的构建

培养 MDA-MB-231 细胞, 取生长状态良好的细

胞进行计数, 制备浓度为 3×10<sup>4</sup>~5×10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 以每孔 2 mL 接种到 6 孔细胞培养板, 分别设置 shKIF2C-NC 组、sh-KIF2C-9 组、sh-KIF2C-10 组和 sh-KIF2C-11 组。待细胞生长至 60%~70% 融合时, 根据预实验所确定的 MOI=10 及病毒滴度进行慢病毒感染, 构建稳定细胞株。对获得的稳定转染细胞株继续进行筛选和扩增, 收集细胞进行 qRT-PCR 和自动蛋白定量分析, 以验证 shKIF2C 慢病毒感染效率。将检测结果符合预期的细胞进行冻存, 供后续实验使用。

### 1.6 细胞免疫荧光检测 Ki-67 的表达

培养 shKIF2C-NC、shKIF2C-10、shKIF2C-11 稳定转染细胞株。在 6 孔板中的玻片上培养细胞, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗玻片 3 min×3 次, 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min; 再次用 PBS 浸洗玻片 3 min×3 次, 然后用吸水纸吸干 PBS。在玻片上滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min。吸掉封闭液后, 滴加 100 μL 稀释好的一抗, 放入湿盒中 4 °C 孵育过夜。用 PBS 清洗玻片 3 次后, 用吸水纸吸干周围多余液体, 于暗室中滴加稀释好的荧光二抗, 置于湿盒中室温孵育 1 h。PBS 浸洗玻片 3 min×3 次, 然后滴加 DAPI 避光孵育 5 min 染核, PBS 再次浸洗玻片 5 min×3 次, 洗去多余的 DAPI。用吸水纸吸干玻片周围的多余液体, 滴加 1~2 滴含抗荧光淬灭剂的封片液进行封片。在荧光显微镜下观察结果并采集图像保存。

### 1.7 细胞迁移与侵袭实验

用无血清 L-15 培养基提前 24 h 饥饿处理已培养的 shKIF2C-NC、shKIF2C-10、shKIF2C-11 稳定转染的 MDA-MB-231 细胞。将 Matrigel 胶用无血清细胞培养基按 1:8 稀释, 吸取 100 μL 稀释后的基质胶均匀铺在上室的聚碳酸酯膜表面, 置于 37 °C 培养箱 1 h, 弃去上层液态培养基。制备终浓度为 50×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞悬液, 取 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 上室, 24 孔板下室加入 600 μL 含 20% FBS 的培养基, 37 °C 培养 24 h。取出小室, 用湿润棉签擦除上层小室内侧未迁移的细胞, PBS 清洗小室 3 次。在下层小室中加入 600 μL 4% 多聚甲醛固定 30 min。再次用 PBS 清洗小室 3 次, 然后在下室中加入 600 μL 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗小室 3 次, 通风橱中风干。在 200 倍显微镜下随机选取 3~5 个视野进行观察、计数, 并拍照记录。

## 1.8 流式细胞术检测细胞周期

用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化已培养的 shKIF2C-NC、shKIF2C-10、shKIF2C-11 稳定转染的 MDA-MB-231 细胞,将细胞收集至 15 mL 离心管中,1 000×g 离心 5 min,弃上清液,加入冰上预冷的 PBS 缓冲液 1 mL 重悬细胞,并再次离心。加入冰上预冷的 70% 乙醇 500  $\mu$ L,轻轻吹打混匀成细胞悬液,4  $^{\circ}$ C 固定 4 h 以上。1 000×g 离心 5 min 沉淀细胞,弃上清液,加入冰上预冷 PBS 缓冲液 1 mL 重悬细胞,并再次离心,重复操作一次。轻弹离心管底部使细胞分散避免成团。每管细胞样品中加入碘化丙啶染色液 500  $\mu$ L,轻柔重悬细胞使其充分混匀,室温下避光孵育 30 min。使用 5 mL 圆底细胞筛管过滤并收集滤液,设置流式细胞仪参数,激发波长 535 nm,检测红色荧光信号并记录光散射数据,使用 ModFit 软件进行细胞周期分析。

## 1.9 免疫组织化学法检测 KIF2C 在乳腺癌患者组织中的表达

从广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科获取 39 例乳腺癌患者的癌组织及配对的癌旁组织样本(取样时间为 2020 年 5 月至 2021 年 3 月),所有患者手术前均未接受放化疗。本研究已通过广西医科大学第一附属医院伦理委员会批准,患者享有知情同意权。样本用 4% 福尔马林溶液固定 12 h,石蜡包埋后切成厚度为 3  $\mu$ m 的切片。依次用二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III 脱蜡,各 6 min,梯度乙醇脱水。将组织放入含 EDTA 抗原修复液的电磁锅里,煮沸后继续加热 20 min 进行热修复。冷却至室温后取出切片,用 pH 7.2~7.6 的蒸馏水进行水化,3% 过氧化氢浸泡 10 min 灭活,37  $^{\circ}$ C 温箱内用 10% 山羊血清封闭 15 min,孵育完毕后用吸水纸擦干组织周围的血清。将 MCAK 单克隆抗体滴加至组织上,放入湿盒中,4  $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜。切片复温 30 min,与二抗在 37  $^{\circ}$ C 温箱内孵育 15 min,DAB 显色 5 min,苏木素染色 25 s,放入 EDTA 返蓝液中浸润 1 min。梯度乙醇脱水后,将切片分别在二甲苯 I 和二甲苯 II 中各放置 10 min,风干后用中性树胶湿封。使用荧光显微镜拍照并分析结果。

## 1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,数据以“均数 $\pm$ 标准差”( $\bar{x}\pm s$ )表示,两独立样本间比较采用  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。采用 Graph Pad Prism 8.0 软件绘图。

## 2 结果

### 2.1 TCGA 及 GSE 数据库筛选 DEGs

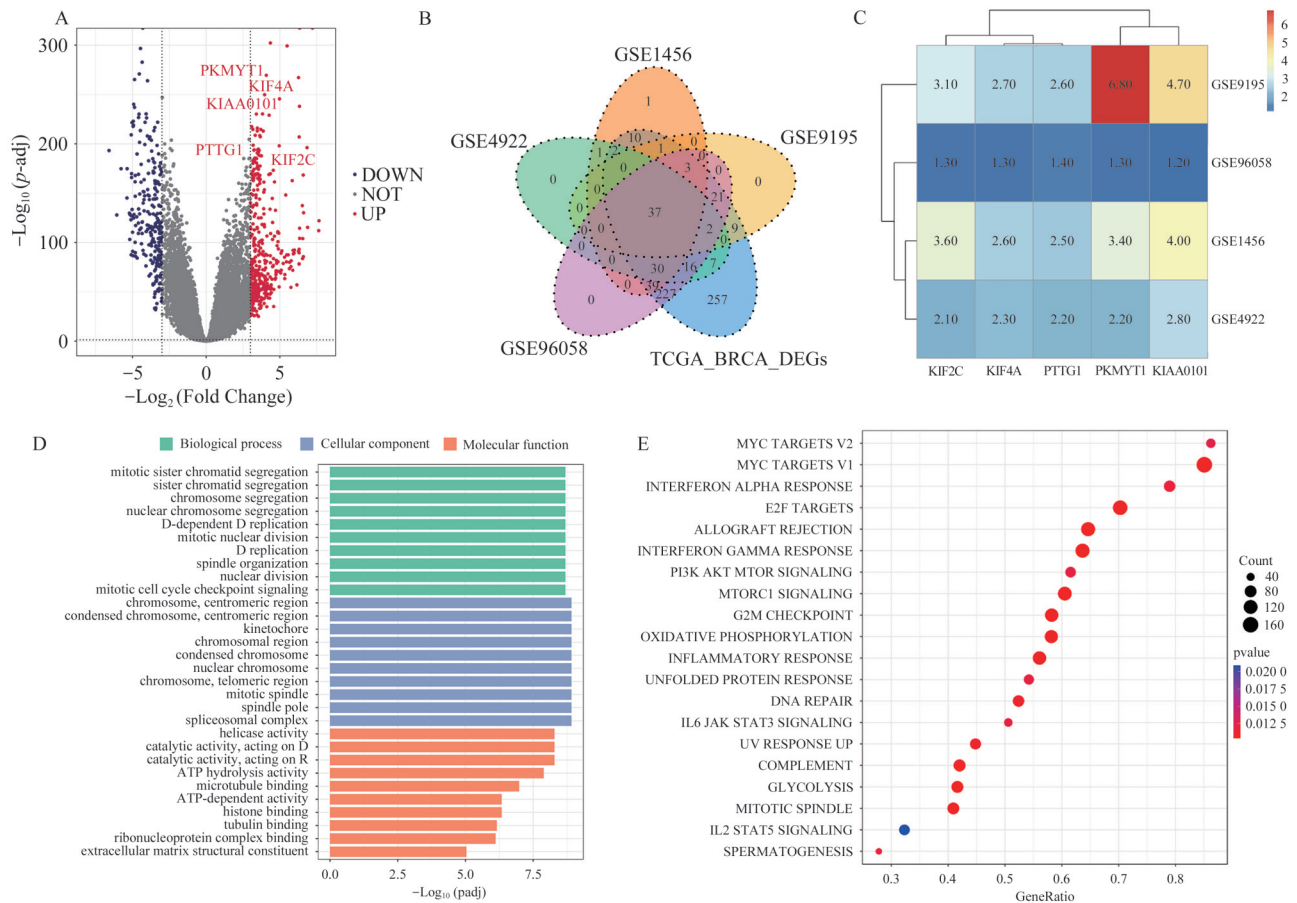
在 TCGA-BRCA 中筛选出 661 个 DEGs,包括显著上调基因 415 个,显著下调基因 216 个(图 1A)。采用韦恩图将 661 个 DEGs 与 GEO 数据库的 GSE1456、GSE9195、GSE4922 和 GSE96058 数据集进行基因交集,得到 37 个表达有显著差异的复发相关预后基因(图 1B),采用 RRA 算法鉴定出 5 个与预后显著相关的基因,即 KIF2C、KIF4A、PTTG1、PKMYT1、KIAA0101(图 1C)。选用驱动蛋白超家族中的 KIF2C 进行后续研究。对 TCGA 数据库中的 KIF2C 高表达组和低表达组进行差异分析,使用 R 软件“ClusterProfiler”包进行 GO 和 KEGG 通路富集。

### 2.2 KIF2C 在乳腺癌组织中的表达、预后及免疫浸润的关系

与癌旁组织相比,乳腺癌组织中 KIF2C mRNA 和蛋白均呈高表达( $P<0.05$ )(图 2A、图 2B)。KIF2C 高表达乳腺癌患者( $n=1\ 082$ )总生存期短于 KIF2C 低表达乳腺癌患者( $n=797$ )( $P=1.8\times 10^{-10}$ )(图 2C),表明 KIF2C 高表达可能与乳腺癌患者预后不良有关。TP53 突变型乳腺癌中 KIF2C 呈高表达,不同分子分型乳腺癌中 KIF2C 的表达存在差异,其中三阴性乳腺癌中 KIF2C 表达水平较高;KIF2C 的表达在不同种族之间也存在差异,黄种人和非裔美国人乳腺癌患者的 KIF2C 表达水平高于白种人;不同分期乳腺癌组织中 KIF2C 表达也有显著差异,晚期患者 KIF2C 表达水平高于早期患者,提示 KIF2C 可能是乳腺癌发生、发展的潜在驱动因素( $P<0.05$ )(图 2D)。乳腺癌组织中 KIF2C 的表达与肿瘤纯度呈正相关( $P=8.21\times 10^{-7}$ ),并与 B 细胞( $P=1.59\times 10^{-10}$ )、中性粒细胞( $P=1.22\times 10^{-8}$ )、树突细胞( $P=1.77\times 10^{-9}$ )的浸润水平显著正相关(图 2E)。

### 2.3 KIF2C 在乳腺癌患者组织中的表达

采用免疫组织化学法对 39 例乳腺癌患者的 KIF2C 蛋白表达量进行检测,结果显示,KIF2C 蛋白呈棕黄色颗粒状,主要分布在乳腺癌组织及癌旁组织的细胞质及细胞膜。KIF2C 蛋白在乳腺癌组织中的阳性率为 69.23%(27/39),癌旁组织中阳性率为 10.26%(4/39);KIF2C 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织,差异有统计学意义( $\chi^2=28.320$ ,  $P<0.01$ )(图 3)。



注:(A) TCGA 数据库中 661 个乳腺癌 DEGs 的火山图;(B)韦恩图筛选 TCGA 和 GEO 数据库中的 DEGs;(C) RRA 算法筛选显著相关基因;(D) TCGA 数据库中 KIF2C 的 GO 富集分析;(E) TCGA 数据库中 KIF2C 的 KEGG 通路分析。

Note: (A) Volcano map of 661 DEGs in breast cancer in the TCGA database; (B) Venn diagram of DEGs overlapped among the TCGA and four GEO datasets (GSE1456, GSE4922, GSE9195 and GSE96058); (C) Significantly related genes via the RRA algorithm; (D) GO analysis of KIF2C in the TCGA database. (E) KEGG pathway analysis of KIF2C in the TCGA database.

图 1 乳腺癌中 KIF2C 的预测及生物信息学分析

Fig. 1 Prediction and bioinformatics analysis of KIF2C in breast cancer

## 2.4 KIF2C 在乳腺癌细胞中的表达

qRT-PCR 检测结果显示,与正常乳腺细胞 MCF10A 相比, KIF2C mRNA 在 MDA-MB-231、T47D 细胞中呈高表达 ( $P < 0.01$ ),而在 SK-BR-3、MCF7 细胞中的表达无明显变化(图 4A)。JESS 全自动蛋白分析系统检测结果显示,与正常乳腺细胞 MCF10A 相比,MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞中 KIF2C 蛋白表达量均显著升高(图 4A)。这些结果提示, KIF2C 在 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞中高表达,可能参与乳腺癌的发生、发展。鉴于 KIF2C 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,本研究选择 MDA-MB-231 细胞进行后续实验。

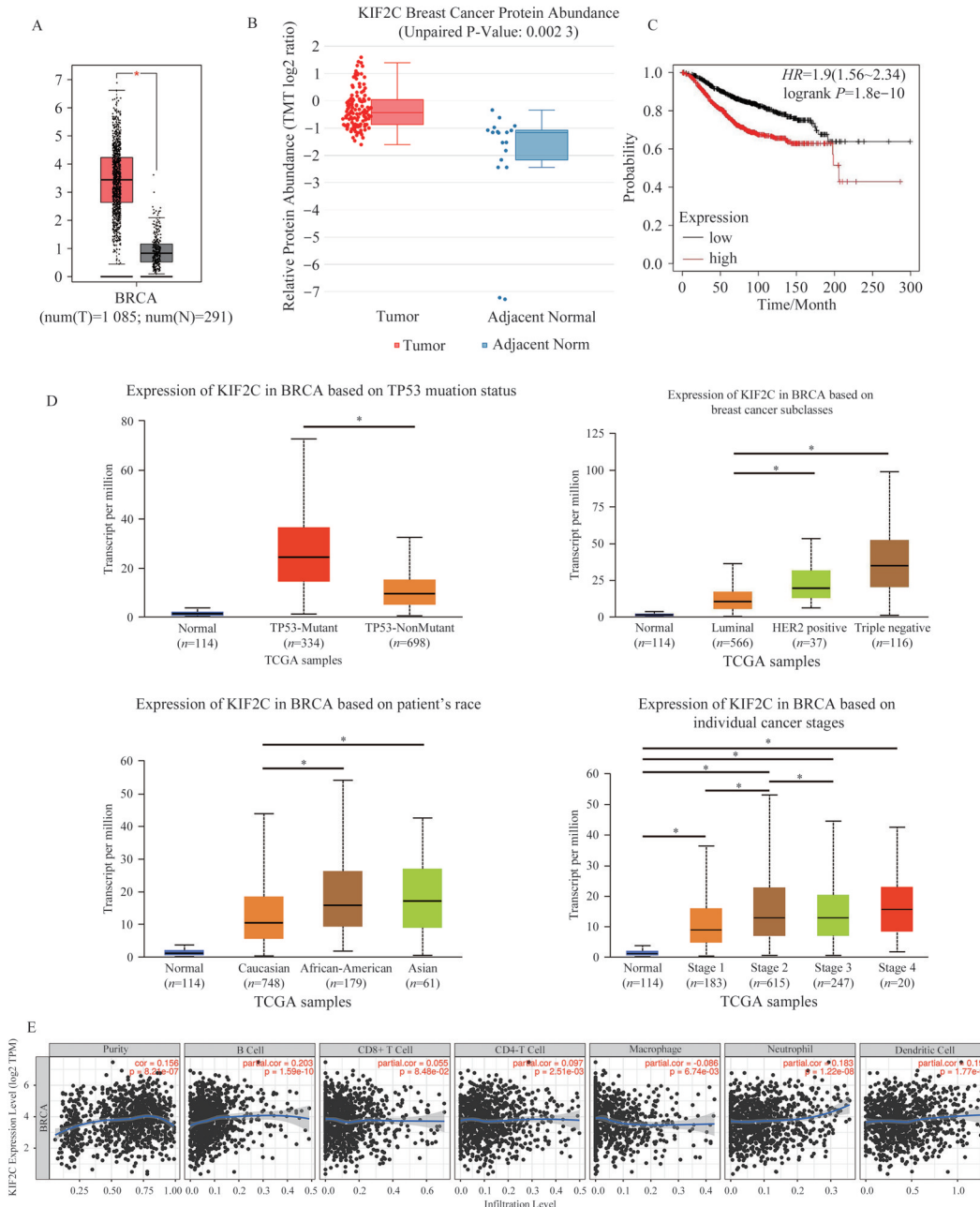
## 2.5 KIF2C 对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵

## 袭的影响

免疫荧光检测结果显示, shKIF2C-10 组、shKIF2C-11 组细胞中 Ki-67 表达水平均显著低于 shKIF2C-NC 组,提示沉默 KIF2C 基因后,MDA-MB-231 细胞增殖能力显著下降。Transwell 结果显示,与 Sh-KIF2C-NC 组相比, shKIF2C-10 组、shKIF2C-11 组迁移和侵袭细胞数量均显著减少 ( $P < 0.01$ )(图 4B、图 4C)。

## 2.6 KIF2C 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

沉默 KIF2C 导致 MDA-MB-231 细胞出现明显的 S 期阻滞, shKIF2C-10 感染的 MDA-MB-231 细胞中约 31.79% 处于 S 期, shKIF2C-11 感染的细胞中约 34.51% 处于 S 期,而 shKIF2C-NC 组细胞只有约 23.04% 处于 S 期 ( $P < 0.05$ )(图 4D)。



注：(A) KIF2C 在乳腺癌中的表达水平；(B) 乳腺癌样本 KIF2C 高表达与低表达的 Kaplan-Meier 生存分析；(C) KIF2C 蛋白在乳腺癌中的表达差异；(D) KIF2C 在乳腺癌组织中高表达与患者 TP53 突变、种族、癌症的分子分型和临床的病理分期的相关分析；(E) KIF2C 与 BRCA 肿瘤浸润免疫细胞的相关性。

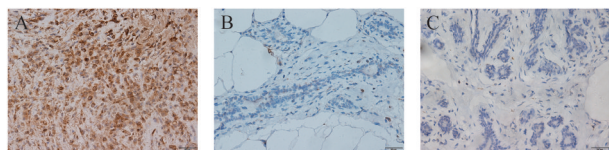
Note: (A) The expression of KIF2C in BRCA patients; (B) Kaplan-Meier curves of OS of BRCA patients based on KIF2C expression in the Kaplan-Meier plotter database ( $n=1\ 880$ ). (C) The differential expressions of KIF2C protein in BRCA. (D) Analysis of KIF2C expression based on clinical parameters using the UALCAN database. Box plot shows the KIF2C mRNA expression of BRCA patients in the subgroups of different TP53 mutation status, races, cancer subclass and stages. (E) Correlation of KIF2C expression with immune infiltration level in breast cancer using TIMER2.0. KIF2C is significantly associated with tumor purity and highly correlated with B cell, Neutrophil, Dendritic cell.

图 2 KIF2C 的生信综合分析  
 Fig. 2 KIF2C bioinformatic analysis

### 3 讨论

本研究通过生物信息学综合分析筛选出与乳

腺癌预后不良显著相关的 5 个基因：KIF2C、KIF4A、PTTG1、PKMYT1 和 KIAA0101。经查询文献，选择 KIF2C 进行后续研究。结合数据库进行临床病理指



注：(A) KIF2C 蛋白在乳腺癌组织呈阳性表达( $\times 400$ )；(B) KIF2C 蛋白在乳腺癌旁组织呈阴性表达( $\times 400$ )；(C) KIF2C 蛋白在正常乳腺组织呈阴性表达( $\times 400$ )。

Note: (A) KIF2C protein was positively expressed in breast cancer tissues ( $\times 400$ ); (B) KIF2C protein was negatively expressed in breast cancer adjacent tissues ( $\times 400$ ); (C) KIF2C protein was negatively expressed in normal breast tissues ( $\times 400$ ).

图 3 乳腺癌患者中 KIF2C 的表达情况 (bar=20  $\mu\text{m}$ )

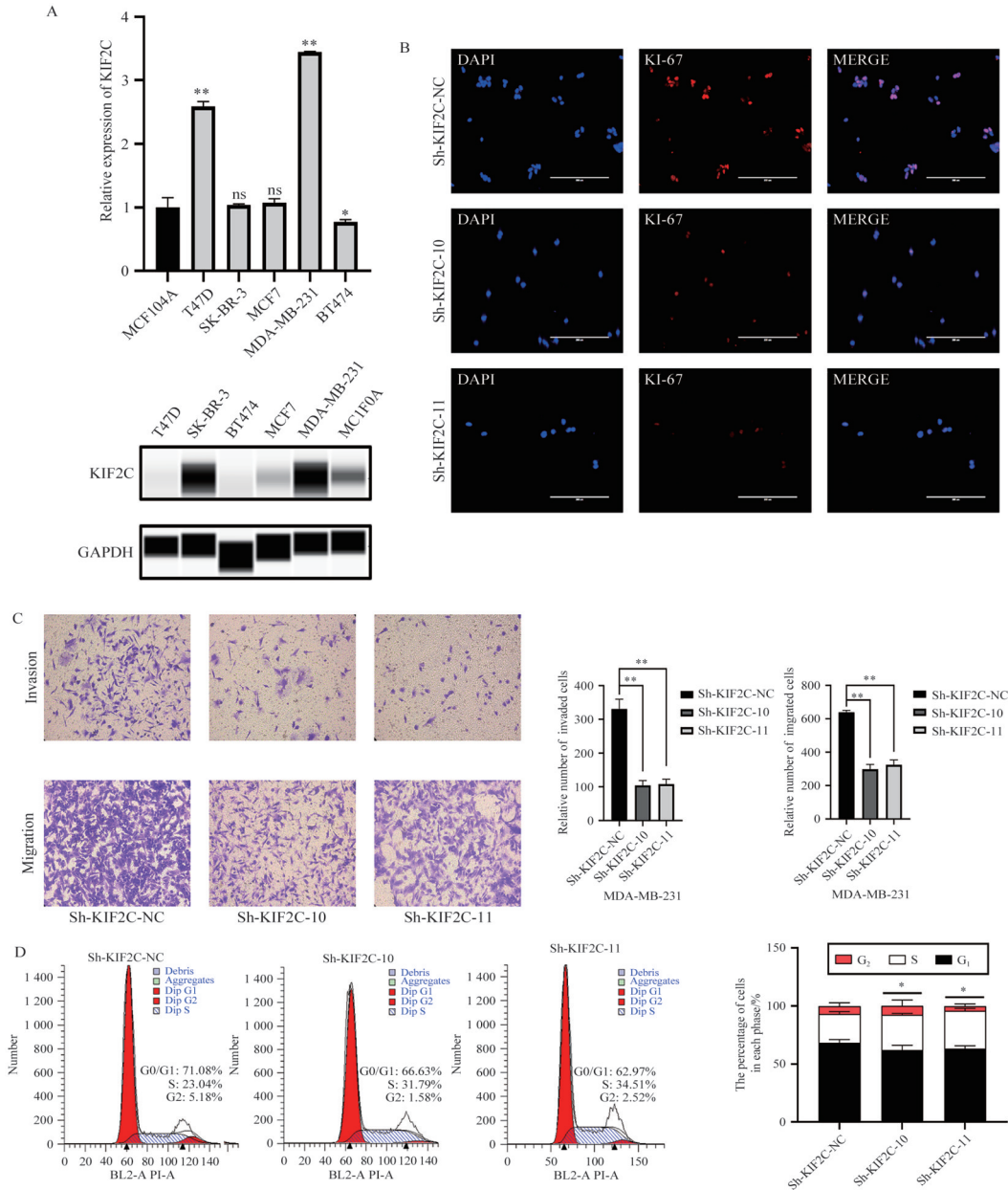
Fig. 3 expression of KIF2C in patients with invasive breast cancer (bar=20  $\mu\text{m}$ )

标分析,发现 KIF2C 在乳腺癌中高表达,其表达水平与种族、TP53 突变、病理分型及分期等显著相关。免疫浸润预测显示,乳腺癌中高表达 KIF2C 与 B 细胞、中性粒细胞、树突细胞的免疫浸润呈正相关。研究发现,KIF2C 与胶质瘤、肝细胞癌和子宫内膜癌免疫细胞浸润有关<sup>[12-14]</sup>。在前列腺癌中,KIF2C 高表达与患者年龄、病理分期、淋巴结转移相关。因此,KIF2C 可能是评估免疫浸润与前列腺癌患者预后的生物标志物<sup>[15]</sup>。在肝细胞癌中,KIF2C 高表达与组织学分级、病理分期、预后不佳有关,并可促进肿瘤进展,具有作为肝细胞癌诊断、预后和靶向治疗生物标志物的潜力<sup>[15]</sup>。在胰腺癌中,KIF2C 高表达与患者预后呈负相关<sup>[16]</sup>。本研究发现,KIF2C 高表达乳腺癌患者总生存期短于低表达患者,表明 KIF2C 高表达可能与乳腺癌患者预后不良有关,KIF2C 可作为乳腺癌预后的潜在生物标志物。

本研究通过免疫组织化学法检测 KIF2C 在 39 例乳腺癌组织与癌旁组织中的表达发现,与癌旁组织相比,乳腺癌组织中 KIF2C 表达量显著升高,与生物信息学分析结果一致。通过 qPCR 和 JESS 全自动蛋白分析仪检测正常乳腺细胞 MCF10A 和乳腺癌细胞系 MCF7、T47D、SK-BR-3、MDA-MB-231、BT474 中 KIF2C 的 mRNA 和蛋白表达发现,与 MCF10A 细胞相比,MDA-MB-231 细胞中 KIF2C mRNA 和蛋白表达水平最高。因此,本研究在后续实验中以 shKIF2C 慢病毒载体感染 MDA-MB-231 细胞,构建稳定转导 shKIF2C 慢病毒 MDA-MB-231 细胞系,选取沉默效率最高的 shKIF2C-10 组和 shKIF2C-11 组进行功能实验。肿瘤的标志包括在人类肿瘤多步发展过程中获得的 6 种生物学能力,包括持续增殖、

逃避生长抑制因子、抵抗细胞死亡、实现复制永生、诱导血管生成及激活肿瘤侵袭性和转移性,这些标志构成了一种系统化规律,使得肿瘤的复杂性变得合理化<sup>[17]</sup>。本研究选择 Ki-67 为增殖指标,采用细胞免疫荧光法检测发现,沉默 KIF2C 后,MDA-MB-231 细胞中 Ki-67 表达量显著降低,表明沉默 KIF2C 可抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖能力。肿瘤细胞的迁移和侵袭、DNA 修复、衰老诱导及免疫调节等被认为是恶性肿瘤发展的关键因素之一<sup>[17]</sup>。侵袭与转移是恶性肿瘤的主要生物特征之一,也是其难以治愈和复发的原因。KIF2C 作为微管动力学调节中最具特征的成员,已被证明参与了多种关键细胞过程,如影响细胞骨架上肌动蛋白-微管动力学和细胞活动中黏着斑的组装和拆卸速率,调节细胞运动和迁移,从而促进肿瘤恶性进展及转移<sup>[18]</sup>。本研究采用 Transwell 实验观察细胞侵袭和迁移能力,发现在 MDA-MB-231 细胞中沉默 KIF2C 后,侵袭和迁移细胞数量均显著减少 ( $P < 0.01$ ),提示 KIF2C 可降低 MDA-MB-231 细胞的侵袭和转移能力。肿瘤是一组细胞持续过度分裂的疾病。细胞分裂受到多种进化上保守的细胞周期调控机制的严格调控,以确保产生两个基因相同的细胞。本研究发现,KIF2C 的沉默导致 S 期乳腺癌细胞显著增加 ( $P < 0.05$ ),提示抑制 KIF2C 表达可诱导 S 期阻滞。

肿瘤细胞通常存在某些关键分子的异常表达或突变,这些分子可能参与肿瘤的发生和发展。通过开发靶向药物阻断这些异常基因的功能,可以有效抑制肿瘤生长。目前,临床对侵袭性乳腺癌主要采用传统放化疗和分子靶向治疗,但存在治疗无效或耐药性等难题,因此,寻找新的治疗靶点或药物是解决这些问题的关键。有研究报道,在肝癌中,沉默 KIF2C 可调节 PI3K/AKT/MAPK 信号通路,增强肝癌细胞对顺铂的敏感性<sup>[19]</sup>;在胃癌中,萝卜硫素可靶向 TBX/KIF2C 轴,抑制糖酵解和细胞增殖,发挥抗肿瘤作用<sup>[20]</sup>。mRNA 疫苗和治疗药物是一种革命性生物技术,利用人体细胞的自然生物过程预防或治疗疾病,具有个性化、不受 HLA 单倍体影响、稳定性等优点,在肿瘤治疗方面有很大的潜力<sup>[21]</sup>,KIF2C 已被鉴定为 mRNA 疫苗开发的候选肝癌抗原<sup>[22]</sup>。本研究探讨了 KIF2C 在乳腺癌增殖、侵袭和迁移中的作用,为乳腺癌的靶向药物提供了一种新思路。



注：(A)乳腺癌细胞中KIF2C的mRNA及蛋白表达水平；(B)沉默KIF2C后Ki-67在MDA-MB-231中的表达；(C)沉默KIF2C对MDA-MB-231侵袭和迁移能力的影响；(D)KIF2C基因沉默促进MDA-MB-231细胞周期阻滞。与shKIF2C-NC组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: (A) The mRNA and protein expression levels of KIF2C in breast cancer cells; (B) Expression levels of Ki-67 after silencing KIF2C in MDA-MB-231 cells; (C) Effects of silencing KIF2C on the invasion and migration ability of MDA-MB-231 cells; (D) Silencing KIF2C promotes cell cycle arrest in MDA-MB-231. Compared with the shKIF2C-NC group, \*\* $P < 0.01$ .

图4 沉默KIF2C对乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移及细胞周期的影响

Fig. 4 Effects of KIF2C silencing on the proliferation, invasion, migration and cell cycle of breast cancer cells

### 参考文献

- [1] SIEGEL R, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74: 12-49. DOI: 10.3322/caac.21820.
- [2] KABIR S, AHAD M A. Parametric study of malignant female breast tumor size, position and orientation on EIM parameters [C]//2020 SoutheastCon. Raleigh, NC, USA. New York: IEEE Press, 2020: 1-5. DOI: 10.1109/SoutheastCon44009.2020.9368286.
- [3] SCHLIWA M, WOEHLEKE G. Molecular motors [J]. *Nature*, 2003, 422(6933): 759-765. DOI: 10.1038/nature01601.
- [4] NIWA S. Kinesin superfamily proteins and the regulation of microtubule dynamics in morphogenesis [J]. *Anat Sci Int*, 2015, 90(1): 1-6. DOI: 10.1007/s12565-014-0259-5.
- [5] HIROKAWA N, NODA Y, OKADA Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division



- [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(1): 60–73. DOI: 10.1016/s0955-0674(98)80087-2.
- [6] RITTER A, KREIS N N, LOUWEN F, et al. Molecular insight into the regulation and function of MCAK [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015, 51(4): 228–245. DOI: 10.1080/10409238.2016.1178705.
- [7] 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. DOI: 10.1016/j.tcb.2005.07.006.
- [8] EICHENLAUB-RITTER U. Microtubule dynamics and tumor invasion involving MCAK [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(21): 3353. DOI: 10.1080/15384101.2015.1093813.
- [9] NAKAMURA Y, TANAKA F, HARAGUCHI N, et al. Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(4): 543–549. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603905.
- [10] GAN H Z, LIN L, HU N J, et al. KIF2C exerts an oncogenic role in nonsmall cell lung cancer and is negatively regulated by miR-325-3p [J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(6): 424–431. DOI: 10.1002/cbf.3420.
- [11] WEI S, DAI M M, ZHANG C, et al. KIF2C: a novel link between Wnt/β-catenin and mTORC1 signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(10): 788–809. DOI: 10.1007/s13238-020-00766-y.
- [12] TU B F, XIANG H L, LI M, et al. In silico analysis of the correlation of KIF2C with prognosis and immune infiltration in glioma [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 6320828. DOI: 10.1155/2022/6320828.
- [13] HUANG R, LIU J Y, LI H, et al. Identification of hub genes and their correlation with immune infiltration cells in hepatocellular carcinoma based on GEO and TCGA databases [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 647353. DOI: 10.3389/fgene.2021.647353.
- [14] LI J G, ZHOU J, KAI S S, et al. Functional and clinical characterization of tumor-infiltrating T cell subpopulations in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 586415. DOI: 10.3389/fgene.2020.586415.
- [15] ZHANG P X, GAO H, YE C W, et al. Large-scale transcriptome data analysis identifies KIF2C as a potential therapeutic target associated with immune infiltration in prostate cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 905259. DOI: 10.3389/fimmu.2022.905259.
- [16] XIONG J H, WU R S, HE A X, et al. Comprehensive analysis of the effects of KIF2C on prognosis, biological functions and immune infiltration in PAAD [J]. *Tissue Cell*, 2022, 78: 101900. DOI: 10.1016/j.tice.2022.101900.
- [17] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [18] MOON H H, KREIS N N, FRIEMEL A, et al. Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK/KIF2C) regulates cell migration and invasion by modulating microtubule dynamics and focal adhesion turnover [J]. *Cancers*, 2021, 13(22): 5673. DOI: 10.3390/cancers13225673.
- [19] WEI S X, LU C M, MO S T, et al. Silencing of KIF2C enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to cisplatin through regulating the PI3K/AKT/MAPK signaling pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2024, 35(3): 237–250. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001563.
- [20] GU P, WU L N. Sulforaphane targets the TBX15/KIF2C pathway to repress glycolysis and cell proliferation in gastric carcinoma cells [J]. *Nutr Cancer*, 2023, 75(4): 1263–1270. DOI: 10.1080/01635581.2023.2178923.
- [21] SAYOUR E J, BOCZKOWSKI D, MITCHELL D A, et al. Cancer mRNA vaccines: clinical advances and future opportunities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(7): 489–500. DOI: 10.1038/s41571-024-00902-1.
- [22] LU T L, LI C L, GONG Y Q, et al. Identification of tumor antigens and immune subtypes of hepatocellular carcinoma for mRNA vaccine development [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2023, 15(10): 1717–1738. DOI: 10.4251/wjgo.v15.i10.1717.

校稿:刘颖 李征

**本文引用格式:** 麦孜悦, 曾健. KIF2C在乳腺癌中的表达及其对肿瘤生长的影响[J]. 肿瘤药理学, 2024, 14(4): 448–456. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.04.10.

**Cite this article as:** MAI Ziyue, ZENG Jian. Expression of KIF2C in breast cancer and its effect on tumor growth[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2024, 14(4): 448–456. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.04.10.