

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.07.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250508.1146.004\(2025-05-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250508.1146.004(2025-05-08))

SYNJ2BP 在上皮性卵巢癌中的表达、作用及调控机制探索^{*}

邹美林¹, 马宗丽^{1△}, 秦智娟¹, 殷美琴¹, 薛卫红¹, 奚庆华²

(1. 如皋市人民医院妇产科, 江苏南通 226500; 2. 南通大学附属医院妇产科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 分析突触小泡磷酸酶 2 结合蛋白(SYNJ2BP)在上皮性卵巢癌中的表达、生物学功能和可能的分子调控机制。**方法** 收集 2018 年 9 月至 2022 年 9 月在如皋市人民医院及南通大学附属医院就诊患者的临床标本 73 份, 其中上皮性卵巢癌组织 53 份, 正常卵巢组织 20 份。回顾性分析临床标本中 SYNJ2BP 基因和蛋白的表达, 以及与临床病理特征的关系; 通过 CCK-8 实验、克隆形成实验、细胞周期实验、凋亡实验、Transwell 迁移实验和划痕实验分析过表达 SYNJ2BP 对上皮性卵巢癌 A2780 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等能力的影响; Western blot 检测在 A2780 细胞中过表达 SYNJ2BP 对 ERK1/2 蛋白磷酸化及 c-Myc 蛋白表达的影响。**结果** SYNJ2BP 在上皮性卵巢癌组织中的表达明显下调, 其表达水平与患者国际妇产科联盟(FIGO)分期、肿瘤分级、肿瘤组织学类型明显相关($P<0.05$), 而与其他临床病理特征无关。CCK-8 实验与克隆形成实验发现 pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞增殖水平明显低于 pcDNA3.1-NC 组($P<0.01$); 碘化丙啶(PI)单染流式细胞仪分析发现, pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞的细胞周期分布改变, pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞被阻滞于 S 期, 且凋亡比例较 pcDNA3.1-NC 组明显上升($P<0.05$)。Transwell 迁移试验发现, pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞穿过人工基质膜的侵袭细胞数量约为 pcDNA3.1-NC 组的 1/2($P<0.01$)。Western blot 结果显示, pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞中 ERK1/2、c-Myc 表达较 pcDNA3.1-NC 组下调。pcDNA3.1-SYNJ2BP 组裸鼠肿瘤 SYNJ2BP 表达较 pcDNA3.1-NC 组上调, ERK1/2 及 c-Myc 表达较 pcDNA3.1-NC 组下调, 与细胞水平中表达结果一致。**结论** SYNJ2BP 在上皮性卵巢癌组织中的低表达, 过表达 SYNJ2BP 可以抑制上皮性卵巢癌细胞的增殖、侵袭能力, 提示 SYNJ2BP 可能是上皮性卵巢癌的潜在抑制因子, 可考虑作为卵巢癌预后分型标志物或潜在的治疗靶点。

[关键词] 上皮性卵巢癌; 突触小泡磷酸酶 2 结合蛋白; 免疫组化; 作用机制

[中图分类号] R737.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2025)07-1541-11

SYNJ2BP expression, role and regulatory mechanism in epithelial ovarian cancer^{*}

ZOU Meilin¹, MA Zongli^{1△}, QIN Zhijuan¹, YIN Meiqin¹, XUE Weihong¹, XI Qinghua²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Rugao People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226500, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression, biological functions, and potential molecular regulatory mechanisms of synaptojanin-2 binding protein (SYNJ2BP) in epithelial ovarian cancer. **Methods** Clinical specimens from 73 patients treated at Rugao People's Hospital and Affiliated Hospital of Nantong University between September 2018 and September 2022 were collected, including 53 epithelial ovarian cancer tissues and 20 normal ovarian tissues. A retrospective analysis was performed to examine SYNJ2BP gene and protein expression and its correlation with clinicopathological features. The effects of SYNJ2BP overexpression on proliferation, apoptosis, migration, and invasion abilities of epithelial ovarian cancer A2780 cells were assessed via CCK-8 assays, colony formation assays, cell cycle analysis, apoptosis assays, Transwell migration assays, and wound healing assays. Western blot was used to detect the impact of SYNJ2BP overexpression on ERK1/2 protein phosphorylation and c-Myc protein expression in A2780 cells. **Results** The expression of SYNJ2BP was significantly downregulated in epithelial ovarian cancer tissues, and its expression level was significantly correlated with FIGO stage, tumor grade, and histological type ($P<0.05$), but not with other clinicopatholog-

^{*} 基金项目: 江苏省南通市科技局指导性项目(JCZ2022023)。 [△] 通信作者, E-mail: jsrgmzl@126.com。

ical features, CCK-8 and colony formation assays demonstrated that the proliferation level of A2780 cells in the pcDNA3.1-SYNJ2BP group was significantly lower than that in the pcDNA3.1-NC group ($P < 0.01$). Flow cytometry with PI single staining revealed altered cell cycle distribution in A2780 cells of the pcDNA3.1-SYNJ2BP group, with cells arrested in the S phase and a significantly increased apoptosis ratio compared to the pcDNA3.1-NC group ($P < 0.05$). Transwell assays showed that the number of A2780 cells invading through the artificial matrix membrane in the pcDNA3.1-SYNJ2BP group was approximately half that in the pcDNA3.1-NC group ($P < 0.01$). Western blot results indicated downregulated expression of ERK1/2 and c-Myc in A2780 cells of the pcDNA3.1-SYNJ2BP group compared to the pcDNA3.1-NC group. In nude mouse tumors of the pcDNA3.1-SYNJ2BP group, compared to the pcDNA3.1-NC group, SYNJ2BP expression was upregulated while ERK1/2 and c-Myc expression was downregulated, consistent with the cellular-level expression results. **Conclusion** Low expression of SYNJ2BP is observed in epithelial ovarian cancer tissues, and overexpression of SYNJ2BP inhibits the proliferation and invasion abilities of epithelial ovarian cancer cells. This suggests that SYNJ2BP may serve as a potential tumor suppressor in epithelial ovarian cancer and could be considered as a prognostic typing marker or potential therapeutic target for ovarian cancer.

[Key words] epithelial ovarian cancer; synaptojanin-2 binding protein; immunohistochemistry; mechanism of action

卵巢癌在女性中为恶性程度较高的妇科肿瘤之一,其中上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)占总数的 90%以上^[1]。EOC 的生存率低、预后差,且大多数患者在晚期才被发现,导致 5 年生存率低于 45%^[2]。早期发现和治疗对提高生存率至关重要。因此,深入了解 EOC 的发病机制,寻找有效的生物标志物和治疗靶点对于改善患者预后至关重要。

突触小泡磷酸酶 2 结合蛋白(synaptojanin-2 binding protein, SYNJ2BP),也称为激活素受体相互作用蛋白 2(activin receptor-interacting protein 2, ARIP2)或外膜蛋白质 25(outer membrane protein 25, OMP25),是线粒体外膜中的一种完整蛋白^[3-4]。近年来,国内外陆续报道了关于 SYNJ2BP 分子作用机制及其在肿瘤中的调节机制。首先,SYNJ2BP 与相关蛋白相互作用,如:突触小泡磷酸酶 2(synaptojanin-2, SYNJ2)、激活素受体 II 型(activin receptor type II, ActR II)、含跨膜和免疫球蛋白域(transmembrane and immunoglobulin domain-containing protein 1, TMIGD1)等,促进其内吞^[5]、募集^[6-7]、定位等^[8-10]。再有,SYNJ2BP 还可以与多个分子发生相互作用,在激活之后会发生一系列磷酸化级联反应,参与多个信号通道的传导^[11-15]。

本研究分析 SYNJ2BP 在 EOC 中的表达、作用及调控机制,旨在深入了解 EOC 的发病机制,并为制订新的治疗策略提供有价值的线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2018 年 9 月至 2022 年 9 月在本院就诊患者的临床标本 73 例,其中 EOC 组织 53 例(EOC 组),正常卵巢组织 20 例(对照组),均有保存完整的石蜡标

本和病理诊断资料。患者均未接受术前放疗和化疗。所有第一次手术以达到肿瘤最大切除为目标。选取 4 周龄 BALB/c-Nude 雌性裸鼠 12 只,随机分为两组,每组 6 只,分别接种转染 pcDNA3.1-NC 的 A2780 细胞和转染 pcDNA3.1-SYNJ2BP 的 A2780 细胞。本研究已通过如皋市人民医院伦理委员会批准(审批号:KY2022-02-02)。

1.2 仪器与试剂

SYNJ2BP9(美国 Proteintech 公司),CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、流式 Annexin-V 凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库查询人 SYNJ2BP 基因序列(Accession Number: NM_018373.3),根据 CDS 区设计过表达引物序列。SYNJ2BP 过表达载体(pcDNA3.1-SYNJ2BP)及对应阴性对照载体(pcDNA3.1-NC)的合成委托苏州吉玛基因股份有限公司。根据 SYNJ2BP 基因 mRNA 设计 RT-qPCR 的反应引物。人正常卵巢上皮 IOSE-80 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞购自上海沪震实业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-qPCR 检测组织及细胞中 SYNJ2BP 基因表达水平

取液氮保存的组织剪碎提取 RNA,并进行 RNA 电泳,再对 RNA 进行逆转录,根据 SYNJ2BP mRNA 设计 RT-qPCR 的反应引物,SYNJ2BP 引物:正向 5'-ACC CAA GTA GGA AGC CAG ACG AG-3';反向 5'-CTG TCC CAC CGA CGA TGT TGA AG-3'; GAPDH 引物:正向 5'-ACC CAG AAG ACT GTG

GAT GG-3'; 反向 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'。将连接反应总体积 10 μ L、上游引物与下游引物各 1 μ L、灭菌水 7 μ L、模板 cDNA 1 μ L 加入 0.1 mL PCR 八连管中;充分混匀后进行离心,并置于 PCR 仪进行检测;以 GAPDH 校正,对 3 批标本进行重复实验,每个标本设置 3 个复孔,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。IOSE-80、A2780 细胞培养后,同法检测 IOSE-80、A2780 细胞中的 SYNJ2BP 基因表达水平。

1.3.2 Western blot

剪碎所取组织提取总蛋白,BCA 试剂盒测蛋白浓度,配胶后置入电泳槽进行电泳,先采用 80 V 进行电泳,再采用 120 V 进行电泳;切胶;裁剪聚偏二氟乙烯膜,组装转膜装置;300 mA,90 min 转膜,将膜于室温封闭 2 h;TBST 洗膜 5 min;一抗 1:500 稀释后孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜;洗膜 3 次,再次 10 min;再将二抗按照 1:1 000 比例稀释,并在室温下孵育 1 h;洗膜 6 次,每次 10 min;将配置好的 ECL 试剂与膜共同孵育 1 min;显影;灰度分析,以 β -actin 为内参,分析 SYNJ2BP 表达水平。此外,在 A2780 细胞中过表达 SYNJ2BP,Western blot 检测细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases1/2, ERK1/2)磷酸化(p-ERK1/2)及 c-Myc 蛋白表达变化;并进一步检测在裸鼠肿瘤中过表达 SYNJ2BP 后,ERK1/2 蛋白磷酸化及 c-Myc 基因水平的变化及 BALB/c-Nude 裸鼠成瘤能力变化。Western blot 条带灰度值应用 Image J 软件分析。

1.3.3 过表达质粒的构建、转染及分组

SYNJ2BP 过表达质粒测序结果与数据库一致,质粒构建成功。分组如下:转染 pcDNA3.1-NC 质粒的为 pcDNA3.1-NC 组,转染 pcDNA3.1-SYNJ2BP 质粒的为后期体内实验裸鼠接种各组细胞后也按相应分组命名。将 pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-SYNJ2BP 组质粒分别溶于 Opti-MEMTM 基础培养基中,加入 P3000TM 试剂;将 Lipofectamin 3000 溶于 Opti-MEMTM 基础培养基中;两种培养基混匀、孵育;A2780 细胞换液加入 Opti-MEMTM 基础培养基 1 250 μ L,置于孔板;再将混匀、孵育好的质粒加入 6 孔板中,培养 6 h 后换成完全培养基;转染后 48 h 提取总 RNA,72 h 提取总蛋白测过表达效率。

1.3.4 CCK-8 试验

取对数生长期细胞培养于 96 孔板中,每孔接种 2 000 个细胞;生长至 80%融合后做转染,pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-SYNJ2BP 组每组 6 个复孔,培养 1、2、3 d 后,CCK-8 法测细胞活力;采用酶标仪在 450 nm 处测吸光度(A_{450})值。

1.3.5 集落克隆形成试验

取转染 48 h 的细胞培养于 6 孔板中,每孔 300 个细胞;加 2 mL 完全培养基,培养箱常规培养;培养 12 d 后结晶紫染色拍照。

1.3.6 细胞周期试验

细胞培养后分为 pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-SYNJ2BP 组;胰酶消化、离心后加入碘化丙啶(propidium iodide,PI)染液染色,最后利用流式细胞仪进行检测,每组细胞设置 3 个复孔,重复 3 次试验。

1.3.7 凋亡试验

pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-SYNJ2BP 组细胞培养后胰酶消化、离心后加入 5 μ L Annexin V 及 5 μ L PI;设置 3 个对照组,为全空白组、空白单染 PI、空白单染 Annexin V;在室温下避光反应 20 min 后上机检测;以右上象限为晚期凋亡细胞,右下象限为早期凋亡细胞。

1.3.8 Transwell 迁移试验

选用孔径为 8 μ m,直径为 6.5 mm 的 Transwell 小室,并使用 Matrigel 基质胶来模拟构建人工基质膜;在上室中加入 100 μ L 的基础培养基培养的细胞;下室加入 500 μ L 培养基(含 5%胎牛血清);培养 24 h 后取出小室,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗、固定、染色;擦去上室的表面细胞,于显微镜下,随机选择 5 个视野进行拍照计数,统计分析评估 A2780 的侵袭能力。

1.3.9 划痕试验

pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-SYNJ2BP 组细胞培养后第 2 天用 10 μ L 枪头划痕,PBS 后加 RPMI-1640 基础培养基,再培养 24 h;再用 PBS 洗 2 遍;固定后置于显微镜下进行观察、并拍照。

1.3.10 免疫组化

对切片进行脱蜡、洗涤、孵育、再洗涤,然后置于枸橼酸盐抗原中加热修复,自然冷却后加入 PBS 洗涤,再加入 5% BSA 在室温下存放 0.5 h。将一抗按照 1:20 的比例进行稀释、孵育;使用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;进一步加入二抗,室温孵育,时间约 0.5 h;再用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,再与现配的 DAB 显色液共同孵育;避光显色完成后用蒸馏水终止;然后加入苏木素染色;接着蓝化、脱水,最后用二甲苯进行透明化处理,中性树脂封片,晾干后拍照。免疫组化结果应用 Image.pro plus 6.0 软件分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行数据分析。计数资料采用例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。应用 GraphPad Prism5 软件绘制柱状图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SYNJ2BP 在 EOC 中的表达水平

分析 SYNJ2BP 在 EOC 组织中的表达分布情况,通过免疫组化染色发现 SYNJ2BP 特异性表达于细胞质中,且在 EOC 中低表达。RT-qPCR 结果显示:与对照组比较,SYNJ2BP mRNA 表达水平在 EOC 组中明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1A。Western blot 结果显示 SYNJ2BP 在 EOC 组中的表达水平明显下降,仅为对照组表达水平的 37%左右($P<0.05$),见图 1B、C。

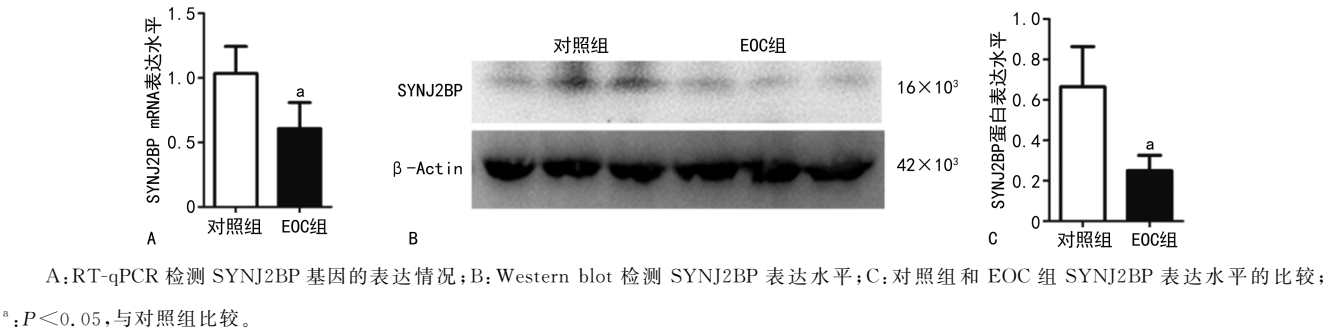


图 1 SYNJ2BP 在 EOC 组和对照组的表达水平

表 1 EOC 患者临床病理特征与 SYNJ2BP 表达水平之间的关系 (n)

项目	n	低或无表达 (n=34)	高表达 (n=19)	χ^2	P
年龄				0.151	0.697
<55 岁	27	18	9		
≥55 岁	26	16	10		
FIGO 分期					
I ~ II 期	32	17	15	4.269	0.039
III ~ IV 期	21	17	4		
肿瘤分级					
低级别	13	5	8	5.486	0.019
高级别	40	31	9		
肿瘤组织学类型				9.453	0.024
浆液性腺癌	34	22	12		
黏液性腺癌	4	3	1		
透明细胞癌	7	7	0		
子宫内膜样腺癌	8	2	6		
肿瘤最大径				0.183	0.669
≤5 cm	10	7	3		
>5 cm	43	27	16		
位置				0.743	0.389
单侧	32	22	10		
双侧	21	12	9		
腹水癌细胞				0.009	0.925
有	3	2	1		
无	50	32	18		

续表 1 EOC 患者临床病理特征与 SYNJ2BP 表达水平之间的关系(*n*)

项目	<i>n</i>	低或无表达(<i>n</i> =34)	高表达(<i>n</i> =19)	χ^2	<i>P</i>
淋巴转移 ^a				0.163	0.686
无	20	12	8		
有	15	10	5		
远处转移				0.603	0.437
M0	48	30	18		
M1	5	4	1		

^a:部分患者没有进行淋巴结切除术。

2.3 SYNJ2BP 在 A2780 细胞中的表达水平

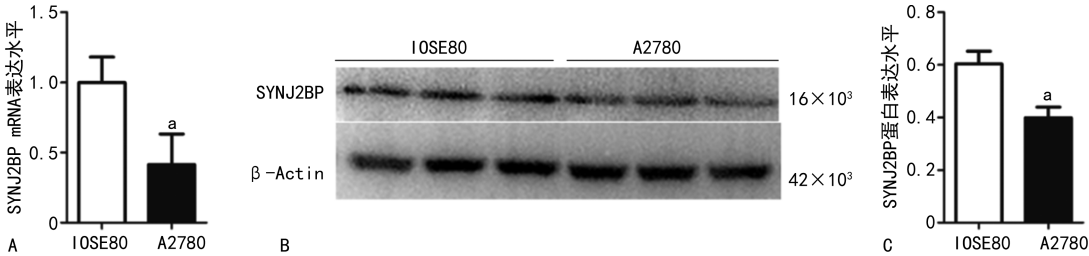
RT-qPCR 结果显示,相比于 IOSE80 细胞,SYNJ2BP mRNA 在 A2780 细胞中表达水平明显下降,仅为在 IOSE80 细胞中表达水平的 45.68%,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2A。Western blot 结果显示,相较于 IOSE80 细胞,SYNJ2BP 在 A2780 细胞中表达水平下降,仅为 IOSE80 细胞表达水平的 66.05%($P<0.01$),见图 2B、C。

2.4 SYNJ2BP 过表达质粒对 SYNJ2BP 基因的过表达效率

在 mRNA 水平,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组的 SYNJ2BP mRNA 表达水平是 pcDNA3.1-NC 组的 2.28 倍($P<0.01$),见图 3A;在蛋白水平,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组的 SYNJ2BP 表达水平是 pcDNA3.1-NC 组的 2.47 倍($P<0.01$),见图 3B、C。

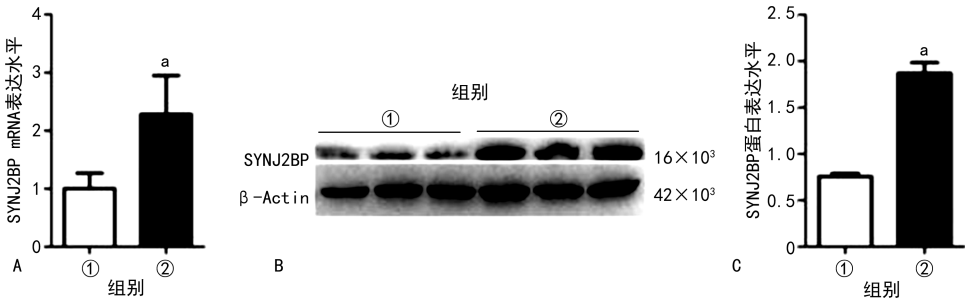
2.5 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 增殖的影响

CCK-8 试验分别检测 pcDNA3.1-NC 组和 pcDNA3.1-SYNJ2BP 组不同时间细胞增殖水平。pcDNA3.1-SYNJ2BP 组在转染 1、2、3 d 后细胞增殖水平明显低于 pcDNA3.1-NC 组($P<0.01$),见表 2。



A:RT-qPCR 检测 SYNJ2BP 基因表达水平。B:Western blot 检测两种细胞中 SYNJ2BP 表达水平;C:IOSE80 和 A2780 细胞中 SYNJ2BP 表达水平的比较;^a: $P<0.01$,与 IOSE80 细胞比较。

图 2 SYNJ2BP 在 A2780 细胞中的表达水平



A:RT-qPCR 检测 A2780 细胞在过表达 SYNJ2BP 后两组 SYNJ2BP mRNA 相对表达水平;B:Western blot 检测两组 SYNJ2BP 表达水平;C:两组 SYNJ2BP 表达水平的比较;①:pcDNA3.1-NC 组;②:pcDNA3.1-SYNJ2BP 组;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3.1-NC 组比较。

图 3 A2780 细胞中 SYNJ2BP 基因的过表达效率的分析

表 2 CCK-8 试验检测 A2780 细胞增殖情况($\bar{x}\pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
pcDNA3.1-NC 组	0.098±0.063	0.633±0.185	1.376±0.159	2.378±0.099
pcDNA3.1-SYNJ2BP 组	0.061±0.050	0.167±0.044 ^a	0.285±0.072 ^a	0.453±0.075 ^a

^a: $P<0.01$,与 pcDNA3.1-NC 组比较。

2.6 SYNJ2BP 过表达对 A2780 细胞克隆形成能力的影响

克隆形成试验结果显示 pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组形成的细胞数明显低于 pcDNA3. 1-NC 组 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.7 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞周期的影响

PI 单染细胞仪分析 pcDNA3. 1-NC 组、pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞周期中各时期的细胞比例, 结果显示, 与 pcDNA3. 1-NC 组比较, pcDNA3. 1-

SYNJ2BP 组 G_1 期细胞比例明显下降 ($P < 0.05$), S 期细胞比例明显上升 ($P < 0.05$); 两组 G_2 期细胞比例比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

2.8 SYNJ2BP 过表达对 A2780 凋亡能力的影响

分析 pcDNA3. 1-NC 组、pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞的凋亡情况, 根据细胞所占比例计算凋亡率, 结果显示, 与 pcDNA3. 1-NC 组比较, pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞的在早期、晚期凋亡中的凋亡细胞比例呈现出明显增加 ($P < 0.05$), 见图 6。

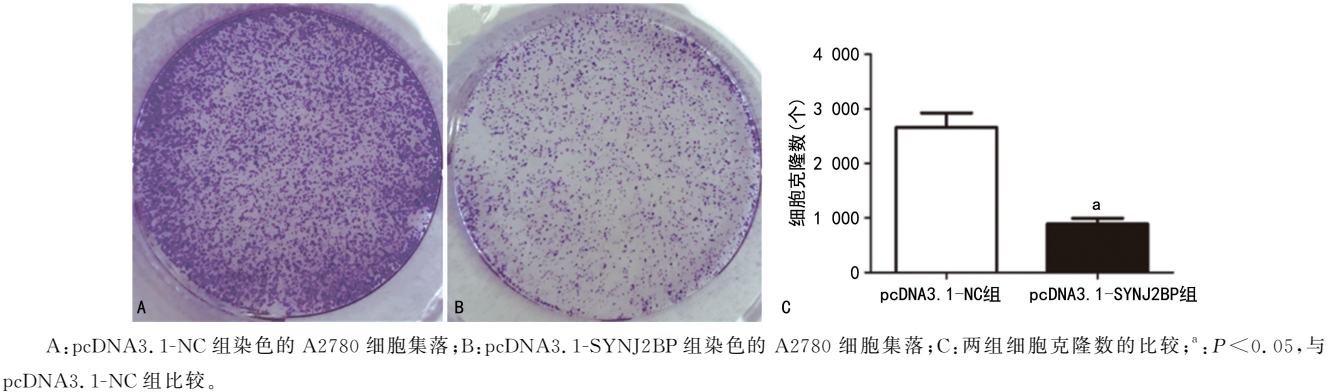


图 4 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞集落形成能力的影响

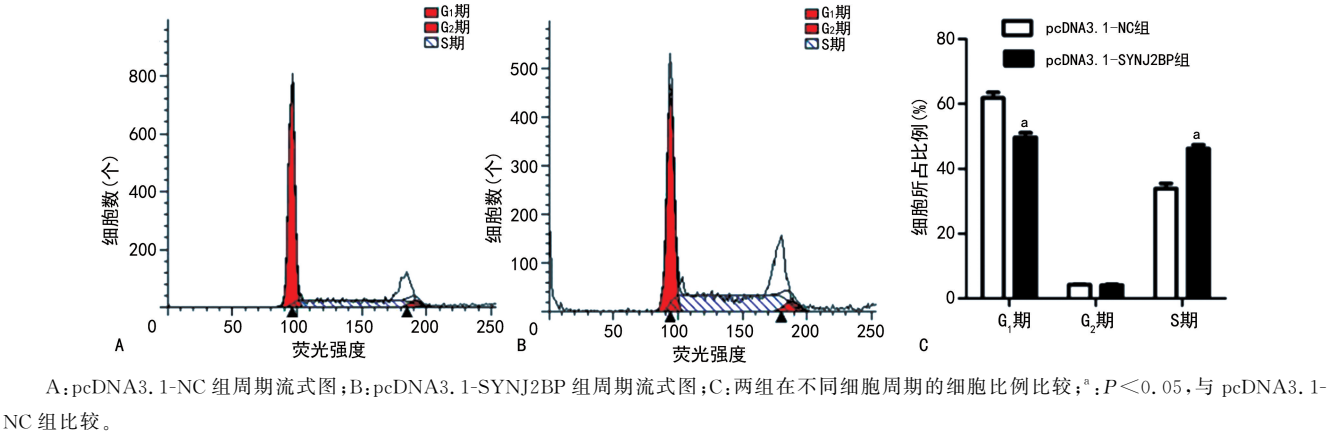


图 5 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞周期的影响

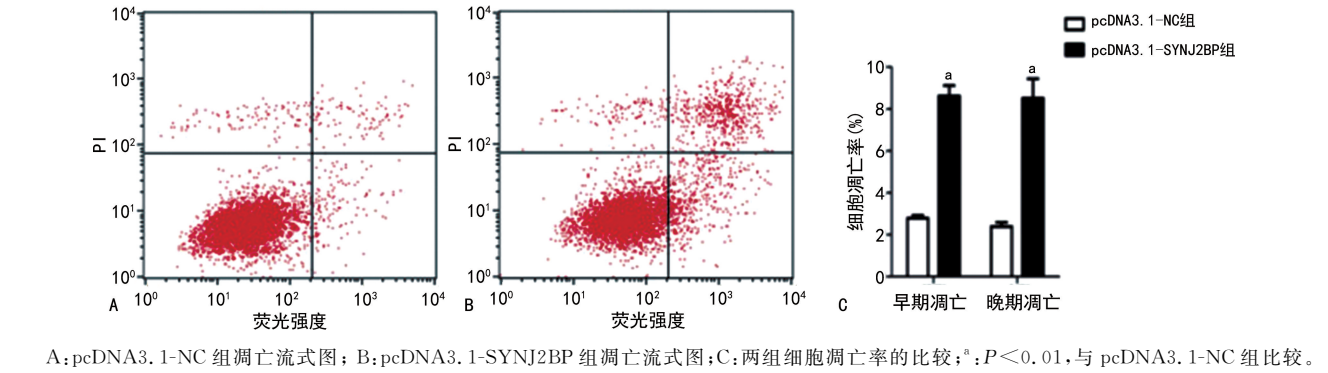


图 6 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 凋亡能力的影响

2.9 SYNJ2BP 过表达对 A2780 迁移能力的影响

pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞, 在划痕

24 h 后, 其穿过划痕区的细胞数量明显少于 pcDNA3. 1-NC 组, pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞

通过划痕区域的相对距离短于 pcDNA3. 1-NC 组 ($P<0.01$),见图 7、8。

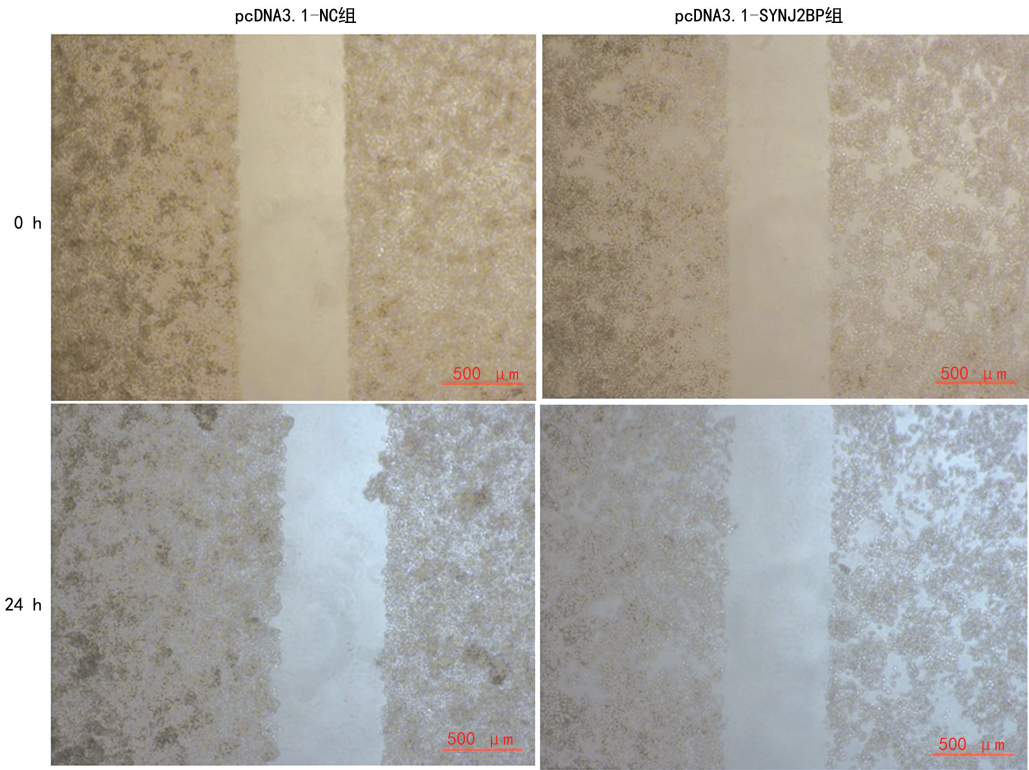
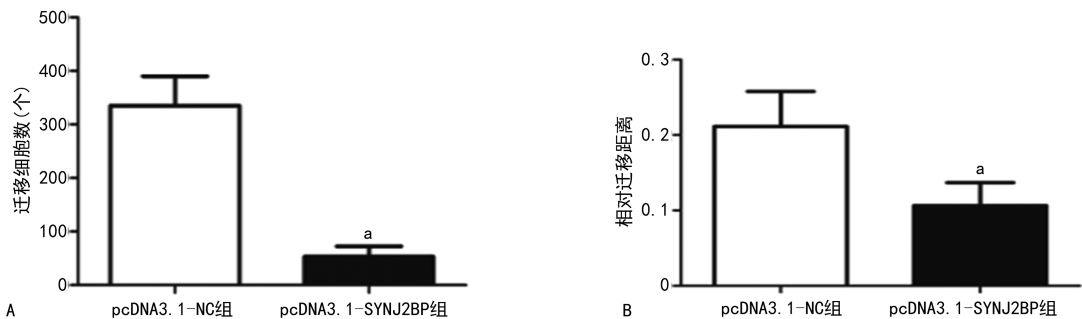


图 7 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞迁移能力的影响



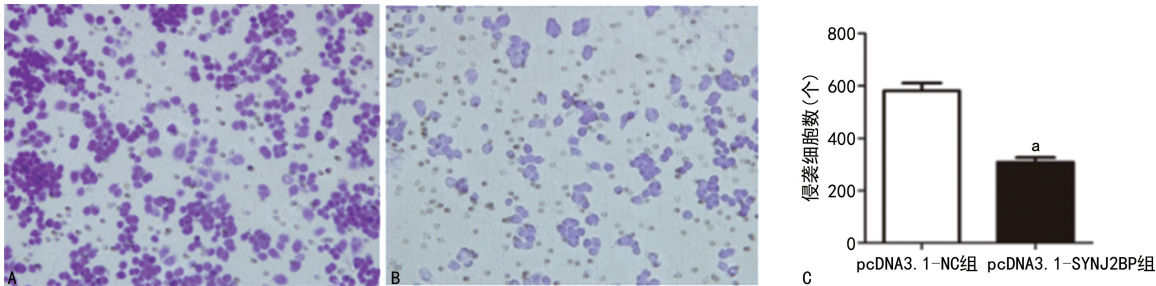
A: 两组迁移进入划痕区 A2780 细胞数量的比较;B: 两组 A2780 细胞进入划痕区相对迁移距离的比较;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3. 1-NC 组比较。

图 8 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 迁移能力的影响统计图

2.10 SYNJ2BP 过表达对 A2780 细胞侵袭能力的影响

在 Transwell 小室接种 pcDNA3. 1-NC 组、pcD-

NA3. 1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞并培养 24 h 后,pcD-NA3. 1-SYNJ2BP 组穿过人工基质膜的侵袭细胞数量约为 pcDNA3. 1-NC 组的 1/2($P<0.01$),见图 9。



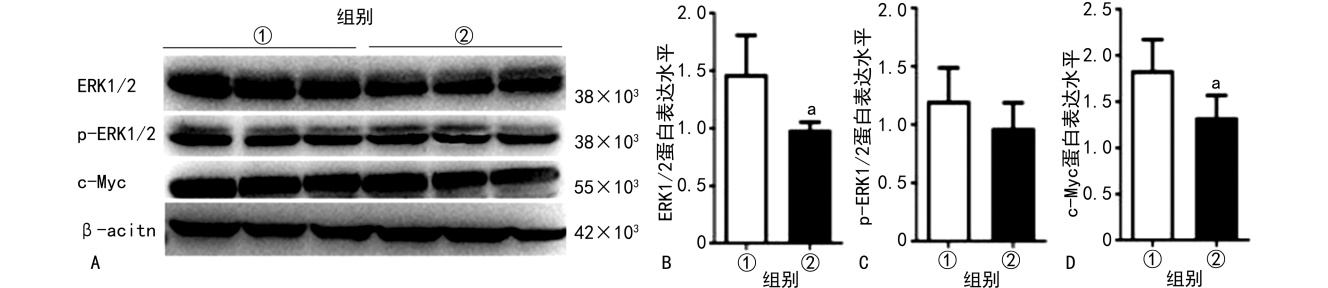
A: pcDNA3. 1-NC 组侵袭细胞;B: pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组侵袭细胞;C: 两组穿过人工基质膜的侵袭细胞数量的比较;① pcDNA3. 1-NC 组;② pcDNA3. 1-SYNJ2BP 组;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3. 1-NC 组比较。

图 9 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞侵袭能力的影响

2.11 SYNJ2BP 过表达对 A2780 细胞中 ERK1/2/c-Myc 信号通路的影响

在 A2780 细胞中检测过表达 SYNJ2BP 后,观察对 ERK1/2/c-Myc 通路的影响。结果发现,与 pcD-

NA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 ERK1/2 表达下调($P<0.01$),c-Myc 表达下调($P<0.05$);p-ERK1/2 表达在两组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 10。



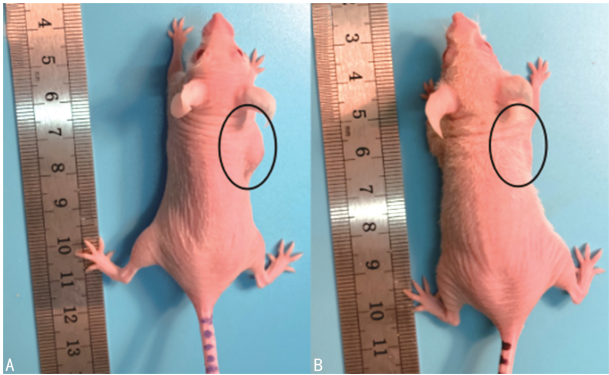
A:Western blot 检测 ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 蛋白的水平;B、C、D 分别为 ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 蛋白表达水平在两组间的比较;① pcDNA3.1-NC 组;②pcDNA3.1-SYNJ2BP 组;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3.1-NC 组比较。

图 10 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 细胞中 ERK1/2/c-Myc 信号通路的影响

2.12 SYNJ2BP 过表达对 A2780 裸鼠成瘤能力的影响

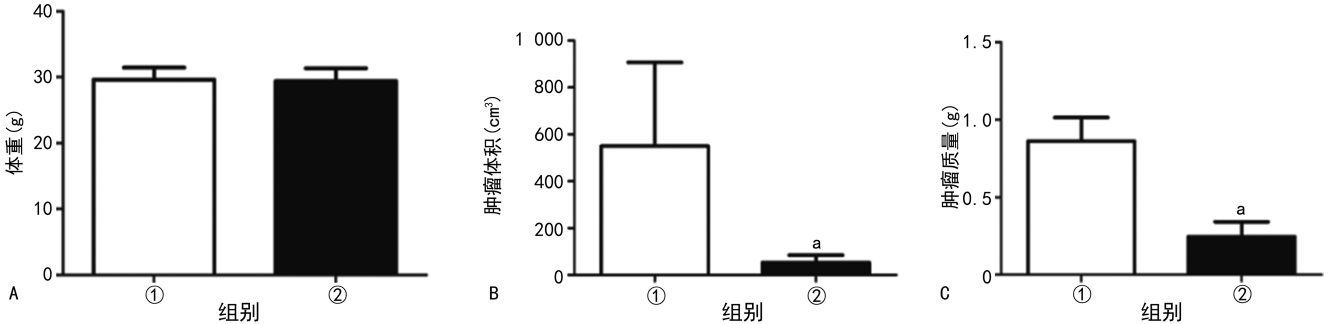
pcDNA3.1-SYNJ2BP 组裸鼠在接种相应 A2780 细胞后,约 7 d 于有裸鼠接种部位皮下发现有肿瘤形成,14 d 时全部裸鼠长出肿瘤,生长较慢;而 pcDNA3.1-NC 组约 4 d 即有裸鼠形成肿瘤,第 7 天时全部裸鼠长出肿瘤,生长迅速。各组裸鼠及其形成的肿瘤见图 11。在肿瘤生长 30 d 后,对裸鼠进行称重,后将裸鼠处死,处死后,将完整的肿瘤组织剪下,并对肿瘤进行称重,并测量其大小。结果显示,裸鼠体重相似,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组裸鼠肿瘤生长速度慢于 pcDNA3.1-NC 组,pcDNA3.1-NC 组中裸鼠形成肿瘤的体积为(0.551 ± 0.325)cm³,质量为(0.863 ± 0.138)g,均明显大于 pcDNA3.1-SYNJ2BP 组的(0.053 ± 0.029)cm³和(0.247 ± 0.087)g,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 12。

在裸鼠肿瘤中,检测过表达 SYNJ2BP 对 ERK1/2、c-Myc 信号通路的影响。结果显示,与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 SYNJ2BP 蛋白表达水平上调;ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 表达水平均下调,差异均有统计学意义($P<0.01$),与在 A2780 细胞系中 SYNJ2BP 过表达后 ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 的表达结果一致,见图 13。



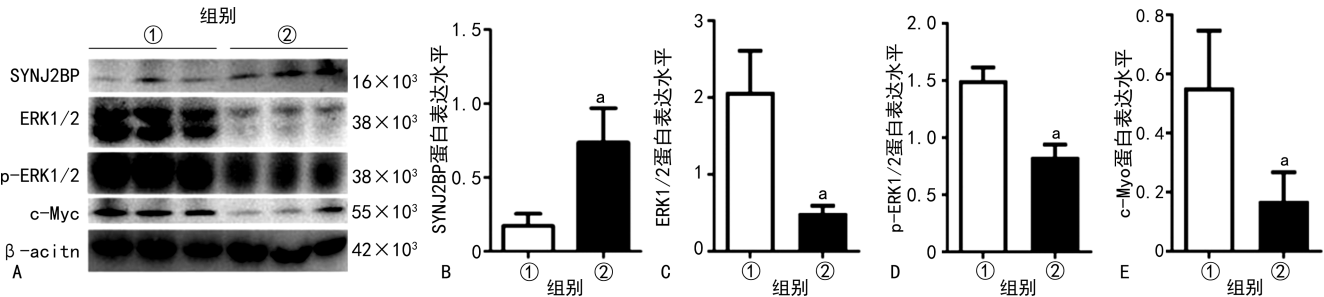
A:pcDNA3.1-NC 组;B:pcDNA3.1-SYNJ2BP 组。

图 11 两组裸鼠形成的肿瘤



A:两组裸鼠体重的比较;B:两组裸鼠肿瘤体积的比较;C:两组裸鼠肿瘤重量的比较;①pcDNA3.1-NC 组;②pcDNA3.1-SYNJ2BP 组;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3.1-NC 组比较。

图 12 过表达 SYNJ2BP 对 A2780 裸鼠成瘤能力的影响



A: Western blot 检测 SYNJ2BP、ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 蛋白表达水平;B、C、D、E 分别为两组 SYNJ2BP、ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 蛋白表达水平的比较;①pcDNA3.1-NC 组;②pcDNA3.1-SYNJ2BP 组;^a: $P<0.01$,与 pcDNA3.1-NC 组比较。

图 13 过表达 SYNJ2BP 对裸鼠中 ERK1/2/c-Myc 通路的影响

3 讨 论

EOC 是恶性程度较高的肿瘤之一,严重威胁女性生命健康。当前,依托高通量分子技术、基因表达谱芯片和临床前模型的应用,已系统揭示了 EOC 的分子特征。基于多组学研究证据,EOC 高致命性的特征可归因于 3 种机制:(1)延迟诊断,导致临床漏诊率较高;(2)化疗耐药导致治疗失效;(3)非异质的基因组^[1-3]。分子标志物已成为 EOC 管理的有力工具,包括预测侵袭性、预后和复发,以及识别新的治疗靶点^[3]。因此,研究鉴定新型标志物对于监测 EOC 的发展和治理具有重要意义。已有的研究发现 SYNJ2BP 系线粒体外膜中的一种完整蛋白^[4]。SYNJ2BP 参与调节多种肿瘤的增殖、凋亡、侵袭及转移过程^[5-10],并且与多种恶性肿瘤相关,包括肝癌^[16]、肾癌^[18]、食管癌^[19]、乳腺癌^[20-21]等。LIU 等^[16]发现肝癌组织中 SYNJ2BP mRNA 和蛋白表达均降低。且 SYNJ2BP 低表达水平与肿瘤大小、多发肿瘤结节、血管侵犯、高 TNM 分期明显相关。BRITO 等^[18]研究结果显示,与非肿瘤组织比较,肿瘤中 SYNJ2BP 的外显子转录本水平明显降低($P<0.01$),SYNJ2BP 在肾透明细胞癌中的表达水平明显下降($P<0.05$)。由此可见 SYNJ2BP 在正常肾细胞的恶性转化中起重要作用。这些发现提示,SYNJ2BP 与肿瘤的恶性形成密切相关。

本研究中通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测了临床标本中 SYNJ2BP 的表达,发现 EOC 组织中 SYNJ2BP mRNA 和蛋白的表达水平明显低于正常卵巢组织中的表达水平,体外试验结果也表明,相比于 IOSE80 细胞,SYNJ2BP 在 A2780 细胞中表达明显下降。

本研究结果显示,SYNJ2BP 表达水平与 FIGO 分期、肿瘤分级、肿瘤组织学类型有关,与患者年龄、肿瘤最大径等无关。CCK-8 试验结果显示,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组细胞增殖水平明显低于 pcDNA3.1-NC 组($P<0.01$)。在集落克隆形成试验中,pcD-

NA3.1-SYNJ2BP 组形成的细胞克隆数明显低于 pcDNA3.1-NC 组。PI 单染流式细胞仪分析发现,过表达 SYNJ2BP 可以明显影响 A2780 细胞的细胞周期分布,将细胞阻滞于 S 期,增加 A2780 细胞的凋亡。划痕试验结果显示,在划痕 24 h 后,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞穿过划痕区的细胞数量明显少于 pcDNA3.1-NC 组,其通过划痕区域的相对距离也小于 pcDNA3.1-NC 组($P<0.01$)。Transwell 试验中 pcDNA3.1-SYNJ2BP 组 A2780 细胞穿过人工基质膜的侵袭细胞数量约是 pcDNA3.1-NC 组的 1/2。以上结果说明,SYNJ2BP 过表达可以明显抑制 A2780 细胞的体外迁移及侵袭能力。动物模型显示,pcDNA3.1-SYNJ2BP 组裸鼠肿瘤的生长速度、体积、重量均明显小于 pcDNA3.1-NC 组。以上结果均说明,SYNJ2BP 抑制了卵巢肿瘤细胞的增殖。

CARR 等^[14]观察到 SYNJ2BP 与 G 蛋白偶联受体激酶 2 (G-protein-coupled receptor kinase 2, GRK2)的相互作用,增加 GRK2 的募集,并在生长抑素刺激后促进 GRK2 磷酸化生长抑素受体 2A (somatostatin receptor 2A, SST2),SST2 磷酸化后再进一步激活 ERK1/2 通路。而 ADAM 等^[15]研究发现 SYNJ2BP 腺病毒感染人脐静脉内皮细胞 48 h 后 ERK1/2 磷酸化水平降低至 35%。结果提示 SYNJ2BP 过表达后明显抑制 ERK1/2 的磷酸化水平。而由此推测 SYNJ2BP 对 ERK1/2 调控具有双向性,调控的方向可能取决于组织类型。ERK1/2 通路作为 MAPK 家族主要成员,在细胞周期进程和细胞存活中发挥重要作用^[23-24]。迄今多个研究亦已证实 ERK1/2 参与了卵巢癌的增殖、侵袭、迁移的调控^[25-26]。

多项研究表明,c-Myc 在 EOC 中表达,并参与了卵巢癌增殖和转移。DAI 等^[27]发现在 EOC 中抑制 ERK1/2 通路后明显抑制了 c-Myc 的表达。据报道,激活的 ERK 在丝氨酸 62 上的磷酸化,可稳定 c-Myc 并促进其活化,是卵巢癌进展的关键介质^[28]。因此

推测 SYNJ2BP 通过调节 ERK1/2/c-Myc 通路的表达来调节卵巢癌细胞的增殖、迁移及侵袭的能力。

本研究首先在 A2780 细胞中检测 SYNJ2BP 过表达后对 ERK1/2、c-Myc 通路的影响。结果表明, ERK1/2 蛋白表达下调($P < 0.01$), c-Myc 蛋白表达下调($P < 0.05$)。其次,用 Western blot 检测裸鼠成瘤后肿瘤组织中 SYNJ2BP、ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc 蛋白的表达情况。结果表明,SYNJ2BP 表达上调,ERK1/2 蛋白表达下调,p-ERK1/2 蛋白表达下调,c-Myc 表达下调,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。以上结果说明,SYNJ2BP 的过表达抑制 ERK1/2/c-Myc 信号通路,ERK1/2/c-Myc 通路可能参与 SYNJ2BP 对 A2780 细胞生物学效应影响的调控过程。

综上所述,SYNJ2BP 在 EOC 中表达明显降低。SYNJ2BP 的表达水平与 FIGO 分期、肿瘤分级、组织学类型明显相关,过表达 SYNJ2BP 可以抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力;SYNJ2BP 通过抑制 ERK1/2/c-Myc 通路参与了 EOC 的生物学行为调控过程。提示 SYNJ2BP 可能作为抑癌因子参与了 EOC 的发生及进展过程,与 EOC 的预后密切相关。SYNJ2BP 可能在 EOC 评估预后方面具有一定价值。通过调控 SYNJ2BP 表达有可能降低 EOC 的复发,SYNJ2BP 有望成为 EOC 的潜在治疗靶标。由于条件有限,SYNJ2BP 与 EOC 患者生存预后的关系有待进一步完善,对其是否能成为 EOC 的独立预后因素有待进一步研究分析。SYNJ2BP 调节 ERK1/2/c-Myc 信号通路的作用蛋白有待进一步的实验来探索。

参考文献

- [1] ZHENG L, CUI C, SHI O, et al. Incidence and mortality of ovarian cancer at the global, regional, and national levels, 1990—2017[J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 159(1): 239-247.
- [2] MERRITT M A, RICE M S, BARNARD M E, et al. Pre-diagnosis and post-diagnosis use of common analgesics and ovarian cancer prognosis (NHS/NHS II): a cohort study[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(8): 1107-1116.
- [3] JI K, WANG X, ZHANG A, et al. Prognostic value of microRNA-21 in epithelial ovarian carcinoma: a protocol for systematic review and meta analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(52): e23849.
- [4] HUNG V, LAM S S, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation[J]. *Elife*, 2017, 6: e24463.
- [5] WANG Y, SERRICCHIO M, JAUREGUI M, et al. Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(4): 595-606.
- [6] SHOJI H, TSUCHIDA K, KISHI H, et al. Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5485-5492.
- [7] MA S, STROMGAARD K, CLEMMENSEN L S. Site-specific phosphorylation of PDZ domains[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2133: 235-261.
- [8] LIU H Y, CHEN F F, GE J Y, et al. Expression and localization of activin receptor-interacting protein 2 in mouse tissues[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 161(2): 276-282.
- [9] HORIE C, SUZUKI H, SAKAGUCHI M, et al. Characterization of signal that directs C-tail-anchored proteins to mammalian mitochondrial outer membrane[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(5): 1615-1625.
- [10] NEMOTO Y, DE CAMILLI P. Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein[J]. *EMBO J*, 1999, 18(11): 2991-3006.
- [11] MATSUZAKI T, HANAI S, KISHI H, et al. Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Ral/Ral-binding protein 1-dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 19008-19018.
- [12] HARTMANN C, SCHWIETZER Y A, KUMMER D, et al. The mitochondrial outer membrane protein SYNJ2BP interacts with the cell adhesion molecule TMIGD1 and can recruit it to mitochondria[J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 30.
- [13] COURT N W, INGLE Y E, KLINKEN S P, et al. Outer membrane protein 25-a mitochondrial anchor and inhibitor of stress-activated protein

- kinase-3[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744 (1): 68-75.
- [14] CARR H S, CHANG J T, FROST J A. The PDZ domain protein SYNJ2BP regulates GRK-Dependent SST2A phosphorylation and downstream MAPK signaling[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(2): bqaa229.
- [15] ADAM M G, BERGER C, FELDNER A, et al. Synaptojanin-2 binding protein stabilizes the Notch ligands DLL1 and DLL4 and inhibits sprouting angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2013, 113 (11): 1206-1218.
- [16] LIU X, ZHOU J, ZHOU N, et al. SYNJ2BP inhibits tumor growth and metastasis by activating DLL4 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 115.
- [17] MLEYNEK T M, LI D. Maintaining the plexus: SYNJ2BP as a novel regulator of angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2013, 113(11): 1186-1188.
- [18] BRITO G C, FACHEL A A, VETTORE A L, et al. Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47 (10): 757-767.
- [19] PENG L, GUO J C, LONG L, et al. A novel clinical six-flavoprotein-gene signature predicts prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3869825.
- [20] WANG M, WU H, LI S, et al. SYNJ2BP promotes the degradation of PTEN through the lysosome-pathway and enhances breast tumor metastasis via PI3K/AKT/SNAI1 signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52): 89692-89706.
- [21] LI Z D, WU Y, BAO Y L, et al. Identification and characterization of human ARIP2 and its relation to breast cancer[J]. *Cytokine*, 2009, 46 (2): 251-259.
- [22] BEN-CHETRIT N, CHETRIT D, RUSSELL R, et al. Synaptojanin 2 is a druggable mediator of metastasis and the gene is overexpressed and amplified in breast cancer[J]. *Sci Signal*, 2015, 8(360): ra7.
- [23] LIU S B, LIN X P, XU Y, et al. DAXX promotes ovarian cancer ascites cell proliferation and migration by activating the ERK signaling pathway[J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 90.
- [24] BINJU M, AMAYA-PADILLA M A, WAN G, et al. Therapeutic inducers of apoptosis in ovarian cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1786.
- [25] MA H, HAN F, YAN X, et al. PBK promotes aggressive phenotypes of cervical cancer through ERK/c-Myc signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(4): 2767-2781.
- [26] PAPP E, HALLBERG D, KONECNY G E, et al. Integrated genomic, epigenomic, and expression analyses of ovarian cancer cell lines[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(9): 2617-2633.
- [27] DAI L, WANG W, LIU Y, et al. Inhibition of sphingosine kinase 2 down-regulates ERK/c-Myc pathway and reduces cell proliferation in human epithelial ovarian cancer[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 645.
- [28] REYES-GONZALEZ J M, VIVAS-MEJIA P E. c-Myc and epithelial ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 601512.

(收稿日期: 2024-12-25 修回日期: 2025-04-11)

(编辑: 管佩钰)