

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1305-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240514

沉默 CDC20 基因通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白信号通路对子宫内膜癌细胞增殖和细胞周期的影响

刘春静, 杨钰杰, 赵薇, 刘丽晶, 王娜

(齐齐哈尔医学院附属第三医院妇一科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

[摘要] **目的:** 探讨细胞分裂周期蛋白 20 (CDC20) 对子宫内膜癌 (EC) 细胞增殖和细胞周期的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 法检测人子宫内膜基质 T-HESC 细胞和人 EC 细胞 (KLE、RL95-2、ZJB-ENC1 和 ECC-1 细胞) 中 CDC20 mRNA 及蛋白表达水平, 选择 RL95-2 细胞用于后续实验。将 CDC20 shRNA 干扰慢病毒转染至 RL95-2 细胞中, 分为对照组、sh-NC 组 (感染阴性对照慢病毒)、sh-CDC20 组 (感染 CDC20 shRNA 干扰慢病毒)、sh-NC+SM04690 组 (感染阴性对照慢病毒后, 加入 $64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Wnt/ β -连环蛋白信号通路抑制剂 SM04690 干预 48 h) 和 sh-CDC20+SM04690 组 (感染 CDC20 shRNA 干扰慢病毒后, 加入 $64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SM04690 干预 48 h)。RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测不同细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平, CCK-8 法检测各组细胞增殖活性, BrdU 法检测各组细胞中 BrdU 阳性细胞百分率, 流式细胞术检测各组 G_2/M 期细胞百分率, Western blotting 法检测各组细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平。**结果:** 与 T-HESC 细胞比较, KLE、RL95-2、ZJB-ENC1 和 ECC-1 细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), 其中 RL95-2 细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平最高。与 sh-NC 组比较, sh-CDC20 组和 sh-NC+SM04690 组细胞增殖活性和 BrdU 阳性细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。与 sh-CDC20 组比较, sh-CDC20+SM04690 组细胞增殖活性和 BrdU 阳性细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** EC 细胞中 CDC20 呈高表达, 沉默 CDC20 可能通过调控 Wnt/ β -连环蛋白信号转导诱导 RL95-2 细胞 G_2/M 期阻滞, 抑制细胞增殖。

[关键词] 子宫内膜癌; 细胞分裂周期蛋白 20; 细胞周期; 细胞增殖; Wnt/ β -连环蛋白信号通路

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A

Effect of silencing CDC20 on proliferation and cell cycle of endometrial cancer cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway

LIU Chunjing, YANG Yujie, ZHAO Wei, LIU Lijing, WANG Na

(Department of Gynecology, Third Affiliated Hospital, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of cell division cycle protein 20 (CDC20) on the proliferation

[收稿日期] 2023-11-13

[基金项目] 黑龙江省卫健委科研项目 (20210505010385)

[作者简介] 刘春静 (1979-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 主治医师, 主要从事妇科疾病诊治方面的研究。

[通信作者] 王娜, 副主任医师 (E-mail: liuchunjing126@126.com)

and cell cycle of endometrial carcinoma (EC) cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of CDC20 mRNA and protein in human endometrial stromal T-HESC cell and EC cells (KLE, RL95-2, ZJB-ENC1, and ECC-1 cells). The RL95-2 cells were selected for the subsequent experiments. CDC20 shRNA interference lentivirus was transfected into the RL95-2 cells and the cells were divided into control group, sh-NC group (infected with negative control lentivirus), sh-CDC20 group (infected with CDC20 shRNA interference lentivirus), sh-NC+SM04690 group (infected with negative control lentivirus followed by treatment with $64 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor SM04690 for 48 h), and sh-CDC20+SM04690 group (infected with CDC20 shRNA interference lentivirus followed by treatment with $64 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SM04690 for 48 h). RT-qPCR and Western blotting methods were used to detect the expression levels of CDC20 mRNA and proteins in the cells in various groups; CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the RL95-2 cells in various groups; BrdU assay was used to detect the percentages of BrdU positive cells in various groups; flow cytometry was used to detect the percentages of the cells at G_2/M stage in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of β -catenin, oncogene c-Myc, and cyclin D1 proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with T-HESC cells, the expression levels of CDC20 mRNA and protein in the KLE, RL95-2, ZJB-ENC1, and ECC-1 cells were significantly increased ($P<0.05$), and the highest expression levels of CDC20 mRNA and protein were observed in RL95-2 cells. Compared with sh-NC group, the proliferation activities and percentages of the BrdU positive cells in sh-CDC20 group and sh-NC+SM04690 group were significantly decreased ($P<0.05$), the percentages of the cells at G_2/M phase were significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of β -catenin, c-Myc, and cyclin D1 proteins were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with sh-CDC20 group, the proliferation activity and percentage of BrdU positive cells in sh-CDC20+SM04690 group were significantly decreased ($P<0.05$), the percentage of the cells at G_2/M phase was significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of β -catenin, c-Myc, and cyclin D1 proteins in the cells were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** CDC20 is highly expressed in the EC cells. Silencing CDC20 may inhibit the cell proliferation by inducing G_2/M phase arrest in the RL95-2 cells through the regulation of Wnt/ β -catenin signal transduction.

KEYWORDS Endometrial cancer; Cell division cycle protein 20; Cell cycle; Cell proliferation; Wnt/ β -catenin signaling pathway

子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 是全球范围内最常见的妇科癌症之一, 其发病率逐年呈上升趋势^[1]。早期 EC 的治疗以手术切除为主, 对于有妊娠意愿的育龄患者, 如果是不典型增生或子宫内膜腺癌, 通常更倾向于保守治疗^[2]。目前, 针对 EC 的保守治疗方法有化疗、放疗、激素治疗和靶向治疗等^[3-4], 但上述方法并不能很好地满足年轻 EC 患者的需求。因此, 探讨提高生存率并保留生育能力的治疗方案对于年轻 EC 患者具有重大意义。细胞分裂周期蛋白 20 (cell division cycle protein 20, CDC20) 是细胞周期蛋白家族的一员, 在有丝分裂的早期阶段激活后期促进复合物, 形成 E3 泛素连接酶复合物, 破坏细胞周期的关键调控因子, 促

进有丝分裂^[5]。CDC20 作为一种癌蛋白, 在多种恶性肿瘤中均呈异常高表达, 且与肿瘤的不良预后相关, 是新兴的癌症治疗靶点^[5-6]。研究^[7-8]显示: CDC20 可通过调控 Wnt/ β -连环蛋白信号转导影响细胞增殖和周期。研究^[9]显示: CDC20 在 EC 组织中呈高表达, 与 EC 患者预后不良有关联, 可作为 EC 诊断和预后的标志物。CDC20 在 EC 中的具体作用及其机制尚未完全阐明。本研究探讨沉默 CDC20 基因对 EC 细胞增殖和周期的影响及其作用机制, 为 EC 靶向治疗方案的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器 人子宫内膜基质 T-HESC 细胞 (美国 ATCC 公司), 人 EC 细胞 KLE 和 ECC-1

细胞 (中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心), 人 EC 细胞 RL95-2 和 ZJB-ENC1 细胞 (中国典型培养物保藏中心细胞库)。RPMI-1640 培养基、杜氏改良 Eagle 培养基/F12 营养混合液 (Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F12, DMEM/F12) 和胎牛血清 (美国 Gibco 公司), Wnt/ β -连环蛋白信号通路抑制剂 SM04690 (美国 MCE 公司), 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), CDC20 shRNA 干扰慢病毒和阴性对照慢病毒 (上海吉玛基因公司), 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、二喹啉甲酸 (2-quinolinecarboxylic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒和超敏增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), BrdU 检测试剂 (北京索莱宝科技有限公司), 细胞周期检测试剂盒 (沈阳万类生物科技有限公司), CDC20 抗体、 β -连环蛋白抗体、c-Myc 抗体、细胞周期素 D1 抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (英国 Abcam 公司)。倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), RT-qPCR 仪 (美国应用生物系统公司), 酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司)。

1.2 细胞培养、慢病毒感染和实验分组 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 RL95-2、ZJB-ENC1 和 ECC-1 细胞, 采用含 10% 胎牛血清的 DEME/F12 培养基培养 T-HESC 和 KLE 细胞, 待细胞贴壁后继续培养 1~2 d, 采用胰酶消化后进行传代培养。收集对数生长期的 RL95-2 细胞, 调整细胞密度并接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔约 5×10^4 个细胞。待细胞生长至约 90% 融合度时, 将原细胞培养基更换为含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 凝聚胺的新鲜培养基, 按照感染复数为 50 加入阴性对照慢病毒或 CDC20 shRNA 干扰慢病毒。病毒感染 48 h 后, 收集细胞, 采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测各种细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白质表达水平。将 RL95-2 细胞分为对照组、sh-NC 组 (感染阴性对照慢病毒)、sh-CDC20 组 (感染 CDC20 shRNA 干扰慢病毒)、sh-NC+SM04690 组 (感染阴性对照慢病毒后, 加入 $64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Wnt/ β -连环蛋白信号通路抑制剂 SM04690 干预 48 h^[10]) 和 sh-CDC20+SM04690 组 (感染 CDC20 shRNA 干扰慢

病毒后, 加入 $64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SM04690 干预 48 h)。

1.3 RT-qPCR 法检测 EC 细胞中 CDC20 mRNA 表达水平 收集细胞, 加入 TRIzol 试剂提取细胞中总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书步骤合成 cDNA, 采用 RT-qPCR 试剂盒进行扩增反应。反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s (共 40 个循环)。引物序列: CDC20 上游引物 5'-GACCACTCCTAGCAAACCTGG-3', CDC20 下游引物 5'-GGGCGTCTGGCTGTTTTCA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', GAPDH 下游引物 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达水平。

1.4 CCK-8 法检测各组 RL95-2 细胞增殖活性

取对数生长期转染后的 RL95-2 细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔约 3×10^3 个细胞, 每组设置 3 复孔, 细胞贴壁后分别培养 24、48 和 72 h。每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 继续培养 2 h。酶标仪上机检测 450 nm 波长处吸光度 (A) 值, 以 A (450) 值表示细胞增殖活性。

1.5 BrdU 法检测各组 RL95-2 细胞中 BrdU 阳性细胞百分率

取对数生长期转染后的 RL95-2 细胞, 接种于内置无菌盖玻片的 24 孔细胞培养板中, 每孔约 2×10^5 个细胞, 每组设置 3 复孔, 分组处理。每孔加入 BrdU 铺满细胞培养板孔面, 继续培养 24 h。加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 0.2% Triton X-100 通透细胞 10 min, 加入 3% BSA 室温封闭 1 h。加入 BrdU 一抗 (1:200), 4°C 孵育过夜, 洗涤后, 加入二抗室温避光孵育 1 h。加入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染液, 室温避光孵育 10 min。中性树脂封片, 荧光显微镜下观察细胞染色情况, 计算 BrdU 阳性细胞百分率, 以 BrdU 标记的阳性细胞占总细胞数百分率表示细胞中 BrdU 阳性细胞百分率。

1.6 流式细胞术检测各组 G₂/M 期 RL95-2 细胞百分率

取对数生长期转染后的 RL95-2 细胞, 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔约 2×10^6 个细胞, 每组设置 3 复孔, 分组处理。800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 加入预冷 75% 乙醇, 4°C 固定过夜。加入 $100 \mu\text{L}$ 核糖核酸酶 A 试剂, 37°C 孵育 30 min。加入 $500 \mu\text{L}$ 碘化丙啶溶液, 室温避光孵育 30 min。流式细胞术检测各组 G₂/M 期 RL95-2 细胞百分率。

1.7 Western blotting 法检测各组 EC 细胞中 CDC20、 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平

收集细胞,加入放射免疫沉淀法裂解缓冲液裂解细胞,提取总蛋白。BCA 法蛋白定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别加入 CDC20 (1:2 000)、 β -连环蛋白 (1:5 000)、c-Myc (1:1 000)、细胞周期素 D1 (1:200) 和 GAPDH (1:2 500) 抗体,室温孵育 2 h。加入二抗,室温孵育 1 h。加入超敏 ECL 化学发光试剂,曝光。采用 Bio-Rad 成像系统计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

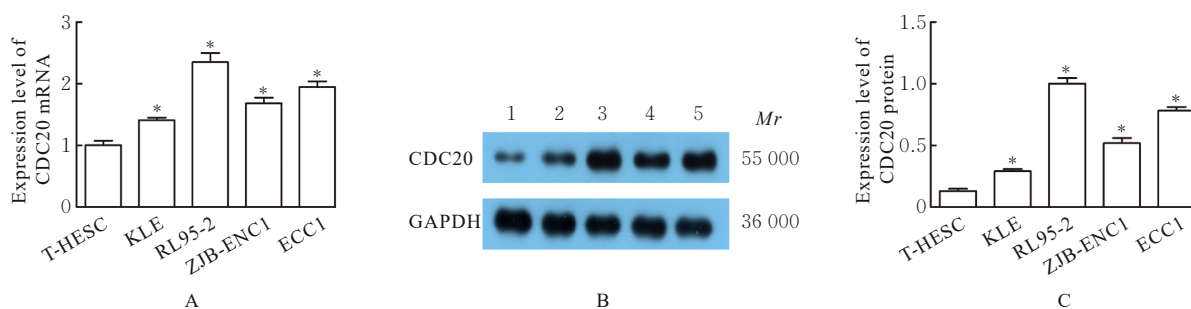
1.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行

统计学分析。各组细胞中 CDC20 mRNA 表达水平,细胞增殖活性,细胞中 BrdU 阳性细胞百分率,不同细胞周期细胞百分率,细胞中 CDC20、 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各种细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平

与 T-HESC 细胞比较, KLE、RL95-2、ZJB-ENC1 和 ECC-1 细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$), 见图 1。RL95-2 细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平较其他 EC 细胞更高, 故选择 RL95-2 细胞作为后续实验研究对象。



Lane 1: T-HESC cells; Lane 2: KLE cells; Lane 3: RL95-2 cells; Lane 4: ZJB-ENC1 cells; Lane 5: ECC1 cells. * $P<0.05$ vs T-HESC cells.

图1 各种细胞中 CDC20 mRNA 表达直条图(A)、CDC20 蛋白表达电泳图(B)和直条图(C)

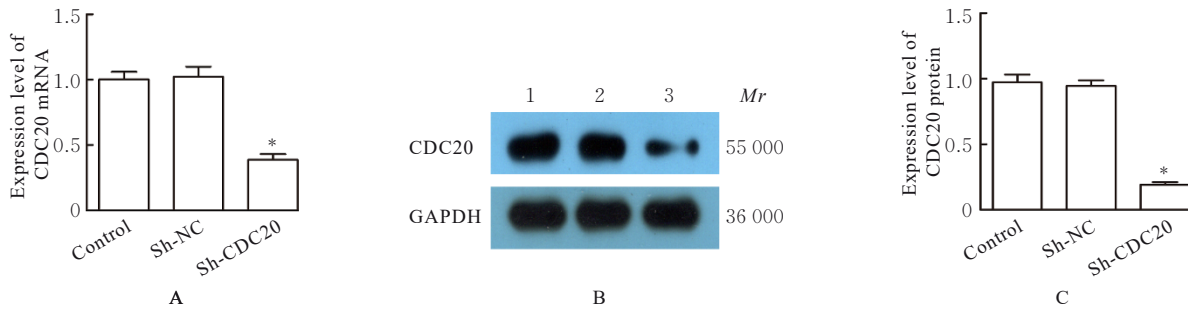
Fig. 1 Histogram (A) of expressions of CDC20 mRNA, electrophoretogram (B) and histogram (C) of expressions of CDC20 protein in different kinds of cells

2.2 各组 RL95-2 细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平 与对照组比较, sh-NC 组细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), sh-CDC20 组细胞中 CDC20 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), 表明 CDC20 沉默表达的 RL95-2 细胞构建成功。见图 2。

2.3 各组 RL95-2 细胞增殖活性、BrdU 阳性细胞百分率和 G_2/M 期细胞百分率 与对照组比较, sh-NC 组 RL95-2 细胞增殖活性、BrdU 阳性细胞百分率及 G_2/M 期细胞百分率无明显差异 ($P>0.05$); 与 sh-NC 组比较, sh-CDC20 组 RL95-2 细胞增殖活性和 BrdU 阳性细胞百分率明显降低 ($P<0.05$), G_2/M 期细胞百分率明显升高 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 各组 RL95-2 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平 与对照组比较, sh-NC 组 RL95-2 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 sh-NC 组比较, sh-CDC20 组细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见图 4。

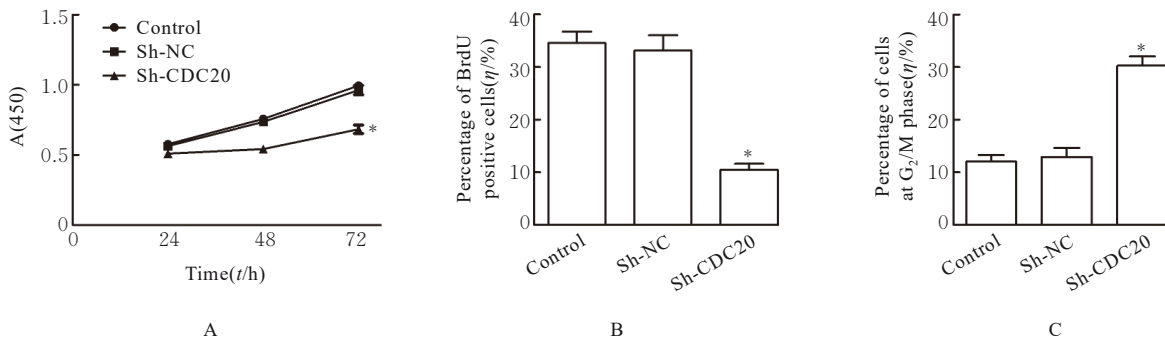
2.5 SM04690 作用后各组 RL95-2 细胞增殖活性、BrdU 阳性细胞百分率和 G_2/M 期细胞百分率 与 sh-NC 组比较, sh-CDC20 组及 sh-NC+SM04690 组细胞增殖活性和 BrdU 阳性细胞百分率明显降低 ($P<0.05$), G_2/M 期细胞百分率明显升高 ($P<0.05$), 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与 sh-CDC20 组比较, sh-CDC20+SM04690 组细胞



Lane 1: Control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-CDC20 group. * $P < 0.05$ vs control group.

图2 各组RL95-2细胞中 CDC20 mRNA 表达直条图(A)、CDC20 蛋白表达电泳图(B)和直条图(C)

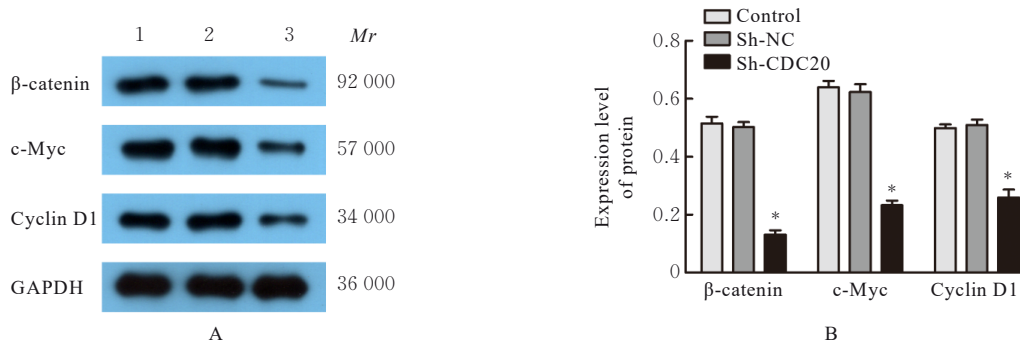
Fig. 2 Histogram (A) of expressions of CDC20 mRNA, and electrophoregram (B) and histogram (C) of expressions of CDC20 protein in RL95-2 cells in various groups



* $P < 0.05$ vs control group.

图3 各组RL95-2细胞增殖活性(A)、BrdU 阳性细胞百分率(B)和 G₂/M 期细胞百分率(C)

Fig. 3 Proliferation activities (A), percentages of BrdU positive cells (B), and percentages of cells at G₂/M phase of RL95-2 cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-CDC20 group. * $P < 0.05$ vs control group.

图4 各组RL95-2细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of β -catenin, c-Myc, and Cyclin D1 proteins in RL95-2 cells in various groups

增殖活性和 BrdU 阳性细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$), G₂/M 期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期素 D1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5 和 6。

3 讨论

细胞周期失调是细胞异常增殖导致肿瘤进展的主要原因之一, 无节制的增殖是恶性肿瘤的共同特征, 以细胞周期为靶点是防止细胞无限分裂的治疗

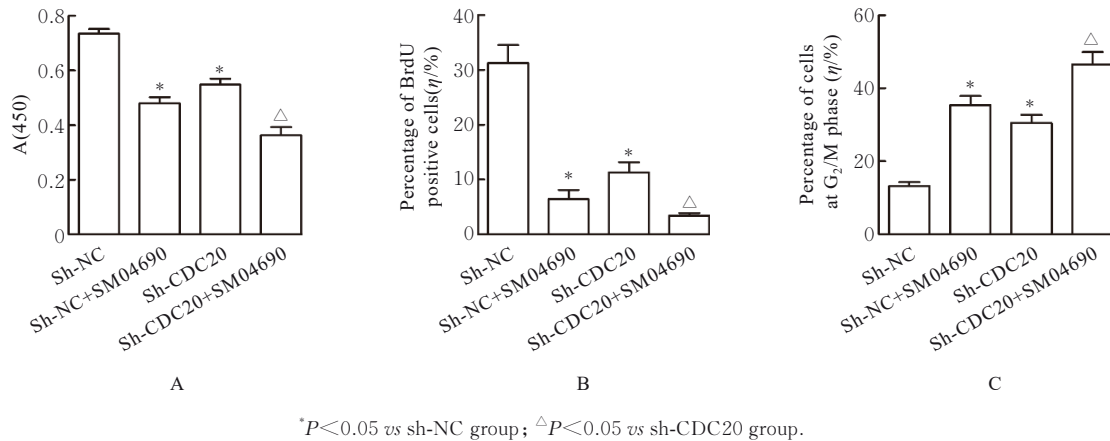
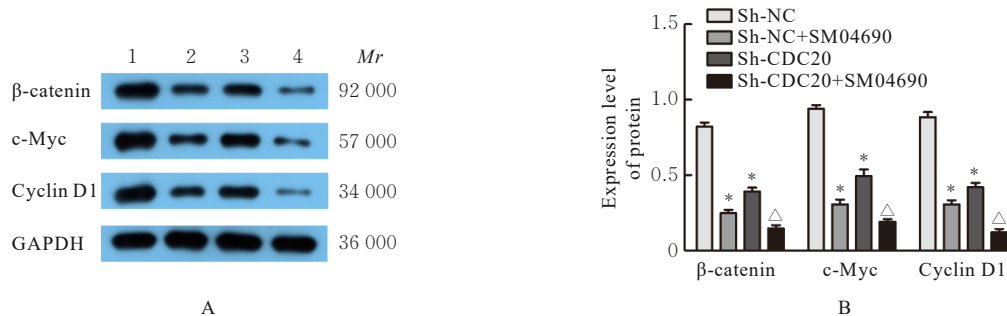


图5 SM04690作用后各组RL95-2细胞增殖活性(A)、BrdU阳性细胞百分率(B)和G₂/M期细胞百分率

Fig. 5 Proliferation activities (A), percentages of BrdU positive cells (B) and percentages of RL95-2 cells at G₂/M phase in various groups after treated with SM04690



Lane 1: Sh-NC group; Lane 2: Sh-NC+SM04690 group; Lane 3: Sh-CDC20 group; Lane 4: Sh-CDC20+SM04690 group. *P < 0.05 vs sh-NC group; Δ P < 0.05 vs sh-CDC20 group.

图6 SM04690作用后各组RL95-2细胞中β-连环蛋白、c-Myc和细胞周期素D1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of β-catenin, c-Myc, and Cyclin D1 proteins in RL95-2 cells in various groups after treated with SM04690

策略之一^[11]。细胞周期蛋白CDC20在多种女性生殖系统肿瘤,如EC、宫颈癌、卵巢癌和乳腺癌等组织中高表达,导致细胞周期失调,并与患者不良预后相关,是潜在肿瘤治疗靶点^[12-13]。本研究结果显示: CDC20基因在KLE、RL95-2、ZJB-ENC1和ECC-1细胞中均呈高表达;干扰RL95-2细胞中CDC20表达后,细胞增殖活性降低, G₂/M期细胞百分率升高,提示沉默CDC20可抑制RL95-2细胞增殖,并诱导G₂/M期细胞周期阻滞。

Wnt/β-连环蛋白信号通路是一种极其保守的通路,参与女性生殖系统细胞增殖、存活、细胞周期和黏附等各种细胞过程,异常Wnt/β-连环蛋白信号转导可调节子宫内膜增生,可能导致EC^[14]。研究^[15-17]显示: Wnt/β-连环蛋白信号通路在调控癌细胞增殖和细胞周期方面发挥重要作用。抑制Wnt/β-连环蛋白信号转导可导致细胞发生G₂/M期

阻滞^[18]。β-连环蛋白是Wnt/β-连环蛋白信号通路中的重要组成部分,当通路被激活后,酪蛋白酶和糖原合成激酶失活,β-连环蛋白无法被降解,使其活化并大量聚集于细胞质中,从而激活下游靶基因,包括c-Myc和细胞周期素D1等,进而影响细胞增殖和细胞周期^[16, 19]。促进细胞周期进程加快是致癌基因c-Myc的主要致癌机制, c-Myc不仅可以通过激活或诱导细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶诱导细胞周期阻滞,还可以通过下调细胞周期“制动器”的相关蛋白活性来诱导细胞周期阻滞^[20]。细胞周期素D1是调控细胞周期的关键因子,当细胞周期素D1过表达时,细胞周期进程加速,细胞增殖调节机制失控,最终导致肿瘤的发生发展^[21-22]。当β-连环蛋白表达受到干扰后,其下游靶基因c-Myc和细胞周期素D1表达均下调^[16]。研究^[23]显示: 沉默CDC20基因可抑制Wnt/β-连环

蛋白信号转导, 进而导致癌细胞增殖活性降低, 化疗敏感性增强。下调 CDC20 通过调控 Wnt/ β -连环蛋白信号转导诱导细胞周期阻滞^[7]。本研究结果显示: 沉默 CDC20 基因后, RL95-2 细胞中 β -连环蛋白、c-Myc 和细胞周期 D1 蛋白表达水平均明显降低, 而 Wnt/ β -连环蛋白信号通路抑制剂 SM04690 可促进 CDC20 下调对 RL95-2 细胞增殖的抑制作用, 加剧 G₂/M 期细胞周期阻滞情况, 提示沉默 CDC20 基因可能对 RL95-2 细胞中 Wnt/ β -连环蛋白信号转导具有调控作用。

综上所述, CDC20 在 EC 细胞系中呈高表达, 沉默 CDC20 基因可诱导 RL95-2 细胞 G₂/M 期阻滞, 抑制细胞增殖, 其作用机制可能与抑制 Wnt/ β -连环蛋白信号转导有关。鉴于沉默 CDC20 基因所发挥的抗 EC 作用, CDC20 基因可能成为治疗 EC 的新靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘春静负责实验方案设计和论文撰写, 王娜负责实验方案设计和论文修改, 杨钰杰和赵薇负责实验过程, 刘丽晶负责实验数据统计学分析。

[参考文献]

- [1] CROSBIE E J, KITSON S J, MCALPINE J N, et al. Endometrial cancer[J]. *Lancet*, 2022, 399(10333): 1412-1428.
- [2] EID M, GONTHIER C, BUCAU M, et al. Conservative treatments for endometrial cancer[J]. *Rev Prat*, 2022, 72(7): 747-749.
- [3] GARG V, JAYARAJ A, KUMAR L. Novel approaches for treatment of endometrial carcinoma[J]. *Curr Probl Cancer*, 2022, 46(5):100895.
- [4] MARKOWSKA A, CHUDECKA-GŁAZ A, PITYŃSKI K, et al. Endometrial cancer management in young women[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(8): 1922.
- [5] HE W N, MENG J. CDC20: a novel therapeutic target in cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(2): 678-693.
- [6] JEONG S M, BUI Q T, KWAK M, et al. Targeting Cdc20 for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(6):188824.
- [7] CHU Z W, ZHANG X Y, LI Q Y, et al. CDC20 contributes to the development of human cutaneous squamous cell carcinoma through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1534-1544.
- [8] HADJIHANNAS M V, BERNKOPF D B, BRÜCKNER M, et al. Cell cycle control of Wnt/ β -catenin signalling by conductin/axin2 through CDC20 [J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(4):347-354.
- [9] ZHANG Q L, WANG Y M, XUE F X. ASPM, CDC20, DLGAP5, BUB1B, CDCA8, and NCAPG may serve as diagnostic and prognostic biomarkers in endometrial carcinoma [J]. *Genet Res (Camb)*, 2022, 2022: 3217248.
- [10] MORONEY M R, WOODRUFF E, QAMAR L, et al. Inhibiting wnt/beta-catenin in CTNNB1-mutated endometrial cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2021, 60(8): 511-523.
- [11] ANDO K, NAKAGAWARA A. Acceleration or brakes: which is rational for cell cycle-targeting neuroblastoma therapy?[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 750.
- [12] NI K, HONG L. Current progress and perspectives of CDC20 in female reproductive cancers [J]. *Curr Mol Med*, 2023, 23(3):193-188.
- [13] BHUNIYA R, YUAN X R, BAI L C, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of apcin-based CDC20 inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2022, 13(2):188-195.
- [14] FATIMA I, BARMAN S, RAI R, et al. Targeting wnt signaling in endometrial cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(10): 2351.
- [15] XIONG J, XING S G, DONG Z, et al. STK31 regulates the proliferation and cell cycle of lung cancer cells via the Wnt/ β -catenin pathway and feedback regulation by c-myc[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 395-404.
- [16] ZHAO Z Q, WU X J, CHENG Y H, et al. TROAP regulates cell cycle and promotes tumor progression through Wnt/ β -catenin signaling pathway in glioma cells[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(9): 1064-1076.
- [17] YE R Y, KUANG X Y, SHAO N, et al. Downregulation of NPTX1 induces cell cycle progression through Wnt/ β -catenin signaling in breast cancer[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(3): 1177-1183.
- [18] KAPOOR S, PADWAD Y. Phloretin induces G2/M arrest and apoptosis by suppressing the β -catenin signaling pathway in colorectal carcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(5/6):810-829.
- [19] 李大众, 黄敏敏, 刘慧玲. 富含半胱氨酸蛋白61对子宫内膜癌细胞增殖及细胞周期的影响及其机制研究[J].

- 中国现代医学杂志, 2022, 32(21):13-17.
- [20] GARCÍA-GUTIÉRREZ L, DELGADO M D, LEÓN J. MYC oncogene contributions to release of cell cycle brakes[J]. *Genes*, 2019, 10(3):244.
- [21] 黄莹莹, 陈 誉, 费召东, 等. 细胞周期蛋白D1的研究现状及展望[J]. *中华转移性肿瘤杂志*, 2021, 4(1): 70-75.
- [22] 陆 芳, 周健红, 陈宇航, 等. 绝经后期子宫内膜增厚与子宫内膜癌的风险因素分析及列线图预测模型构建[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2023, 44(1): 24-31.
- [23] LI K, MAO Y H, LU L, et al. Silencing of CDC20 suppresses metastatic castration-resistant prostate cancer growth and enhances chemosensitivity to docetaxel[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4):1679-1685.