

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0727-13

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250317

KIAA1522对肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制

王艺慧¹, 张晴¹, 李英楠¹, 叶丽平^{1,2,3}

(1. 锦州医科大学基础医学院病理生理学教研室, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学生物人类学研究所, 辽宁 锦州 121001; 3. 锦州医科大学辽宁省人类表型组学研究重点实验室, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] **目的:** 探讨KIAA1522对肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 并阐明其信号机制。**方法:** 采用生物信息学方法分析75例人非小细胞肺癌(NSCLC)组织和癌旁正常肺组织中KIAA1522 mRNA及蛋白表达水平, 免疫组织化学染色法检测NSCLC组织及癌旁正常肺组织中KIAA1522蛋白表达情况, Western blotting法检测在多种肺癌细胞系中KIAA1522蛋白表达水平。分别将KIAA1522-小干扰RNA(siRNA)和过表达质粒转染至肺癌H1299及A549细胞。KIAA1522-siRNA实验分为空白组、阴性对照组(si-NC组)、KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组; KIAA1522过表达实验分为对照组、空载对照组(OE-NC组, 转染KIAA1522过表达空载质粒)、过表达KIAA1522组(OE-KIAA1522组, 转染KIAA1522过表达质粒)、过表达KIAA1522+MK2206组[OE-KIAA1522+MK2206组, 共转染KIAA1522过表达质粒和蛋白激酶B(AKT)信号通路抑制剂MK2206]和MK2206组(转染MK2206)。采用Western blotting法验证各组细胞转染效率, 噻唑蓝(MTT)法检测各组肺癌细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测各组肺癌细胞迁移率, Transwell小室实验检测各组肺癌细胞中侵袭细胞数, Western blotting法检测各组细胞中磷酸化AKT(p-AKT)、总AKT(t-AKT)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、血管内皮生长因子(VEGF)和上皮-间质转化(EMT)相关蛋白[波形蛋白(Vimentin)、N钙黏蛋白(N-cadherin)和E钙黏蛋白(E-cadherin)]蛋白表达水平。**结果:** 生物信息学方法分析, 与癌旁正常肺组织比较, NSCLC组织中KIAA1522 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。免疫组织化学染色法, 与癌旁正常肺组织比较, NSCLC组织中KIAA1522蛋白阳性表达率明显升高($P<0.05$), 且与TNM分期有关($P<0.01$)。Western blotting法, 与正常肺上皮细胞BEAS-2B比较, 肺癌细胞系PC9、H1299、H460、A549、H1975和H226细胞中KIAA1522蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与si-NC组比较, KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞中KIAA1522蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$); 与OE-NC组比较, OE-KIAA1522组A549细胞中KIAA1522蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。MTT法, 细胞培养24、48和72 h时, 与si-NC组比较, KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞增殖活性均明显降低($P<0.01$); 与OE-NC组比较, OE-KIAA1522组A549细胞增殖活性明显升高($P<0.05$); 与OE-KIAA1522组比较, OE-KIAA1522+MK2206组A549细胞增殖活性明显降低($P<0.01$); 与OE-KIAA1522+MK2206组比较, MK2206组A549细胞增殖活性明显降低($P<0.05$)。细胞划痕实验, 与si-NC组比较, KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞迁移率均明显降低($P<0.01$); 与OE-NC组比较, OE-KIAA1522组A549细胞迁移率明显升高($P<0.01$); 与OE-KIAA1522组比较, OE-KIAA1522+MK2206组A549细胞迁移率明显降低($P<0.05$); 与OE-KIAA1522+MK2206组比较, MK2206组A549细胞迁移率明显降低($P<0.05$)。Transwell小室实验, 与si-NC组比较, KIAA1522-

[收稿日期] 2024-06-12 [录用日期] 2024-08-06

[基金项目] 吴阶平医学基金会研究基金项目(320.6750.2020-06-68)

[作者简介] 王艺慧(1996—), 女, 山东省泰安市人, 医学硕士, 主要从事肿瘤侵袭转移和机制方面的研究。

[通信作者] 叶丽平, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: yeliping@jzmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞中侵袭细胞数明显减少($P<0.01$);与OE-NC组比较,OE-KIAA1522组A549细胞侵袭细胞数明显增多($P<0.01$);与OE-KIAA1522组比较,OE-KIAA1522+MK2206组A549细胞中侵袭细胞数明显减少($P<0.01$);与OE-KIAA1522+MK2206组比较,OE-KIAA1522组A549细胞中侵袭细胞数明显减少($P<0.01$)。Western blotting法,与si-NC组比较,KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞中p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin及VEGF蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.01$);与OE-NC组比较,OE-KIAA1522组A549细胞中p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E-cadherin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与OE-KIAA1522组比较,OE-KIAA1522+MK2206组A549细胞中p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与OE-KIAA1522+MK2206组比较,OE-KIAA1522组A549细胞中Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。结论:KIAA1522蛋白可上调肺癌细胞中Cyclin D1、EMT相关蛋白和VEGF蛋白表达,促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其作用机制与激活AKT信号通路有关。

[关键词] KIAA1522;癌,非小细胞肺;蛋白激酶B;细胞增殖;细胞侵袭

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A

Effect of KIAA1522 on proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells and its mechanism

WANG Yihui¹, ZHANG Qing¹, LI Yingnan¹, YE Liping^{1,2,3}

(1. Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Institute of Biological Anthropology, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 3. Liaoning Provincial Key Laboratory of Human Phenome Research, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of KIAA1522 on the proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells, and to clarify its signaling mechanism. **Methods:** Bioinformatics analysis was used to detect the expression levels of KIAA1522 mRNA and protein in 75 cases of human non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and adjacent normal lung tissues; immunohistochemical staining was used to detect the expression of KIAA1522 protein in NSCLC tissue and adjacent normal lung tissues; Western blotting method was used to detect the expression level of KIAA1522 protein in various lung cancer cell lines. KIAA1522-small interfering (siRNA) and over-expression plasmids were transfected into the lung cancer H1299 and A549 cells, respectively. The KIAA1522-siRNA experiment was divided into blank group, negative control group (si-NC group), KIAA1522-siRNA#1 group, and KIAA1522-siRNA#2 group. The KIAA1522 over-expression experiment was divided into control group, empty vector control group (OE-NC group, transfected with KIAA1522 over-expression empty vector plasmid), KIAA1522 overexpression group (OE-KIAA1522 group, transfected with KIAA1522 over-expression plasmid), KIAA1522 over-expression+MK2206 group [OE-KIAA1522+MK2206 group, co-transfected with KIAA1522 over-expression plasmid and protein kinase B (AKT) signaling pathway inhibitor MK2206], and MK2206 group (transfected with MK2206). Western blotting method was used to verify the transfection efficiencies of the cells in various groups; MTT assay was used to detect the proliferation activities of the lung cancer cells in various groups; cell scratch assay was used to detect the migration rates of lung cancer cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of invasion

lung cancer cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of phosphorylated AKT (p-AKT), total AKT (t-AKT), cyclin D1 (Cyclin D1), vascular endothelial growth factor (VEGF), and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins [vimentin (Vimentin), N-cadherin (N-cadherin), and E-cadherin (E-cadherin)] proteins in the cells in various groups.

Results: The bioinformatics analysis results showed that compared with adjacent normal lung tissue, the expression levels of KIAA1522 mRNA and protein in NSCLC tissue were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The immunohistochemistry staining results showed that compared with adjacent normal lung tissue, the positive expression rate of KIAA1522 protein in NSCLC tissue was significantly increased ($P < 0.05$) and was associated with TNM stage ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with normal lung epithelial cells BEAS-2B, the expression levels of KIAA1522 protein in lung cancer cell lines PC9, H1299, H460, A549, H1975, and H226 were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with si-NC group, the expression levels of KIAA1522 protein in the H1299 cells in KIAA1522-siRNA#1 group and KIAA1522-siRNA#2 group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-NC group, the expression level of KIAA1522 protein in the A549 cells in OE-KIAA1522 group was significantly increased ($P < 0.01$). The MTT results showed that at 24, 48, and 72 h of cell culture, compared with si-NC group, the proliferation activities of the H1299 cells in KIAA1522-siRNA#1 group and KIAA1522-siRNA#2 group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-NC group, the proliferation activity of the A549 cells in OE-KIAA1522 group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with OE-KIAA1522 group, the proliferation activity of the A549 cells in OE-KIAA1522+MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-KIAA1522+MK2206 group, the proliferation activity of the A549 cells in MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.05$). The cell scratch assay results showed that compared with si-NC group, the migration rates of the H1299 cells in KIAA1522-siRNA#1 group and KIAA1522-siRNA#2 group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-NC group, the migration rate of the A549 cells in OE-KIAA1522 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with OE-KIAA1522 group, the migration rate of the A549 cells in OE-KIAA1522+MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with OE-KIAA1522+MK2206 group, the migration rate of the A549 cells in MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.05$). The Transwell chamber assay results showed that compared with si-NC group, the numbers of invasion H1299 cells in KIAA1522-siRNA#1 group and KIAA1522-siRNA#2 group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-NC group, the number of invasion A549 cells in OE-KIAA1522 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with OE-KIAA1522 group, the number of invasion A549 cells in OE-KIAA1522+MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with OE-KIAA1522+MK2206 group, the number of invasion A549 cells in MK2206 group was significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with si-NC group, the expression levels of p-AKT, Cyclin D1, Vimentin, N-cadherin, and VEGF proteins in the H1299 cells in KIAA1522-siRNA#1 group and KIAA1522-siRNA#2 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly increased ($P < 0.01$); compared with OE-NC group, the expression levels of p-AKT, Cyclin D1, Vimentin, N-cadherin, and VEGF proteins in the A549 cells in OE-KIAA1522 group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with OE-KIAA1522 group, the expression levels of p-AKT, Cyclin D1, Vimentin, N-cadherin, and VEGF proteins in the A549 cells in OE-KIAA1522+MK2206 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly increased ($P < 0.05$); compared with OE-KIAA1522+MK2206 group, the expression levels of Cyclin D1, Vimentin, N-cadherin, and VEGF proteins in the A549 cells in MK2206 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P <$

0.01), while the expression level of E-cadherin protein was significantly increased ($P < 0.05$).

Conclusion: The KIAA1522 protein upregulates the expression of Cyclin D1, EMT-related proteins, and VEGF protein in lung cancer cells, promoting the proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells, and its mechanism is related to the activation of the AKT signaling pathway.

KEYWORDS KIAA1522; Carcinoma, non-small-cell lung; Protein kinase B; Cell proliferation; Cell invasion

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是一种起源于支气管黏膜或肺泡上皮的恶性肿瘤, 其复发率和转移率较高, 远期疗效较差^[1]。近年来, 肺癌的发病率和病死率均明显升高^[2]。探讨肺癌增殖、侵袭和转移的发生机制对肺癌的防治具有重要意义。

KIAA1522 是一种介导细胞黏附的肌动蛋白连接蛋白, 在多种人类肿瘤中高度表达^[3-7]。研究^[8-12]表明: KIAA1522 可能通过蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和 Notch 等信号通路, 促进肿瘤细胞增殖、诱导上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 参与肿瘤的生长、侵袭和转移等过程。过度表达细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 可促进肿瘤异常增殖^[13]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是促进血管新生的重要信号分子, 可协助 EMT 促进肿瘤细胞向远处转移^[14]。目前, 关于 KIAA1522 能否调控肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭尚未完全阐明。本研究探讨 KIAA1522 经 AKT 信号通路对肺癌细胞增殖、侵袭和迁移的调控作用及其对 Cyclin D1、VEGF 和 EMT 相关蛋白的影响, 旨在为肺癌的诊断和临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 肺癌组织芯片购于上海芯超科技有限公司 (产品批号: HLugA150CS04), 含 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织各 75 例。芯片包含患者年龄、性别、肿物最大径、分化程度、TNM 分期和淋巴结转移等临床病理特征。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞和人肺癌 H1299、A549 及 H226 细胞购自中国科学院上海细胞库, 人肺癌 PC9、H460 和 H1975 细胞由锦州医科大学生命科学研究院惠赠。RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清

购自美国 CLARK Bioscience 公司, KIAA1522-小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 购自苏州吉玛生物有限公司, KIAA1522 过表达质粒 (pcDNA3.1-3xFlag-KIAA1522) 购自湖南丰晖生物有限公司, Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司, KIAA1522、磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 和总 AKT (total AKT, t-AKT) 购自北京博奥森生物技术有限公司, 波形蛋白 (Vimentin)、N 钙黏蛋白 (N-cadherin)、E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 β -actin 抗体购自美国 SAB 公司, Cyclin D1 和 VEGF 购自沈阳万类生物技术有限公司, MK2206 购自美国 MCE 公司, Matrigel 基底胶购自美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国康宁生物技术有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 通用二步法试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。细胞 CO₂ 培养箱 (型号: 1501) 购自美国 Thermo 公司, 垂直电泳仪和转膜仪器 (型号: 1645050) 购自美国 Bio-Rad 公司, 显影仪 (型号: Amersham Imager 600) 购自日本 GE 公司, 数字切片扫描与应用系统 (型号: Easy scan NFC) 购自厦门麦克奥迪实业集团有限公司。

1.3 生物信息学方法分析 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织中 KIAA1522 mRNA 及蛋白表达水平 利用基因表达谱交互分析网站 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 分析 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织中 KIAA1522 mRNA 表达水平差异 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)。采用临床蛋白质组肿瘤分析协作组 (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC) 数据库分析 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织中 KIAA1522 蛋白表达水平差异 (<https://cptac-data-portal.georgetown.edu/studies/>)。

1.4 免疫组织化学染色法检测 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织中 KIAA1522 蛋白表达情况 NSCLC 组织芯片烘片后常规脱蜡至水, 于 pH 6.0 柠檬酸修复液中经高压抗原修复 5 min, 滴加内源性过氧

化物酶阻断剂室温孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗 3 次, 一抗 4 °C 冰箱过夜。次日 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 滴加反应增强液, 37 °C 孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 滴加酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, 37 °C 孵育 20 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次。新鲜配制的 DAB 溶液显色, 苏木素复染 3 min, 自来水返蓝 2 min, 脱水透明后树脂封片。免疫组织化学染色结果判定标准: 免疫组织化学染色评分=染色强度评分×阳性细胞数评分。染色强度计分标准: 0 分, 细胞无显色; 1 分, 细胞呈浅黄色 (弱染色); 2 分, 细胞呈棕黄色 (中等染色); 3 分, 细胞呈棕褐色 (强染色)。阳性细胞数计分标准: 0 分, 无阳性细胞; 1 分, 阳性细胞 < 25%; 2 分, 25% ≤ 阳性细胞 < 50%; 3 分, 阳性细胞 ≥ 50%。KIAA1522 免疫组织化学得分 < 3 分定义为阴性, 得分 ≥ 3 分定义为阳性。KIAA1522 蛋白阳性表达率 = KIAA1522 蛋白阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.5 细胞培养和分组 正常肺上皮 BEAS-2B 细胞, 肺癌 PC9、H1299、H460、A549、H1975 和 H226 细胞培养于 10% 胎牛血清及 1% 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养, 选取对数生长期细胞进行传代和后续实验, 实验至少重复 3 次, 采用 Western blotting 法检测不同细胞中 KIAA1522 蛋白表达水平。KIAA1522-siRNA 实验分为空白组、阴性对照组 (si-NC 组)、KIAA1522-siRNA#1 组和 KIAA1522-siRNA#2 组。siRNA 引物序列: KIAA1522-siRNA#1, 上游引物 5'-GCAGUCAGACCACAUCUATT-3', 下游引物 5'-UAGGAUGUGGUCUGACUGCTT-3'; KIAA1522-siRNA#2, 上游引物 5'-GCAUGUGCAGAAGGAGCUUTT-3', 下游引物 5'-AAGCUCUUCUGCACAUGCTT-3'; si-NC, 上游引物 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 下游引物 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。过表达 KIAA1522 实验分为对照组、空载对照组 (OE-NC 组, 转染 KIAA1522 过表达空载质粒)、过表达 KIAA1522 组 (OE-KIAA1522 组, 转染 KIAA1522 过表达质粒)、过表达 KIAA1522+MK2206 组 (OE-KIAA1522+MK2206 组, 共转染 KIAA1522 过表达质粒和 AKT 信号通路抑制剂 MK2206) 和 MK2206 组 (转染 MK2206)。MK2206 浓度为 10 μmol·L⁻¹。

1.6 细胞转染 si-RNA 转染: H1299 细胞接种于 6 孔细胞培养板, 待细胞密度为 40%~50% 时进行瞬时转染。取 125 μL RPMI-1640 无血清培养基与 5.9 μL Lipofectamine 3000 溶液充分混合。取 125 μL RPMI-1640 无血清培养基与 3.7 μL si-RNA 溶液充分混合。将稀释后的 Lipofectamine 3000 试剂中缓慢加入稀释后的 si-RNA, 室温静置 10~15 min 后均匀滴入细胞中。4~6 h 后, 吸弃旧培养基, 换为完全培养基继续培养。过表达质粒转染: 于 6 孔细胞培养板中接种 A549 细胞, 使其细胞密度为 70%~90% 时进行瞬时转染。取 125 μL RPMI-1640 无血清培养基与 3.75 μL Lipofectamine 3000 溶液充分混合。取 125 μL RPMI-1640 无血清培养基、2.5 μg 质粒与 5 μL Lipofectamine 3000 溶液充分混合。将稀释后的 Lipofectamine 3000 试剂中缓慢加入稀释后的质粒, 室温静置 10~15 min 后均匀滴加入细胞中。4~6 h 后, 吸弃旧培养基, 换为完全培养基继续培养, 采用 Western blotting 法验证各组细胞转染效率。

1.7 噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium, MTT) 法检测各组肺癌细胞增殖活性 细胞转染 24 h 后, 收集 H1299 和 A549 细胞, 按每孔 4 × 10³ 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板, 每组设置 5 个复孔, 继续培养 24、48 和 72 h。避光加入 20 μL 5 g·L⁻¹ MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 吸出 MTT 溶液, 加入 150 μL 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液, 室温溶解 15 min, 稍振荡。于波长 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值代表相应时间点的细胞增殖活性。

1.8 细胞划痕实验检测各组肺癌细胞迁移率 收集对数生长期 H1299 和 A549 细胞, 按每孔 4 × 10⁵ 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板。转染 24 h 后, 待细胞生长至 90% 左右, 用 200 μL 枪头划痕, PBS 缓冲液洗涤 3 次。0 h 时显微镜下拍照记录, 继续培养 24 h 后拍照, 观察细胞迁移情况。实验重复 3 次。细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 后划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。

1.9 Transwell 小室实验检测各组肺癌细胞侵袭细胞数 Matrigel 胶与 RPMI-1640 培养液按 1 : 9 混合, 上室加入 80 μL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 30 min 以上, 待其聚合成胶。转染 24 h 后, 无血清培养基重悬 H1299 和 A549 细胞至 5 × 10⁵ mL⁻¹, 上室每孔加入 200 μL 细胞悬液, 下室加入 600 μL

完全培养基。24 h后吸去上室培养基, PBS缓冲液洗涤2次, 75%甲醇固定30 min, PBS缓冲液洗涤2次, 0.1%结晶紫染色20 min, PBS缓冲液洗涤2次。用棉签擦去上室未透膜的细胞, 晾干小室。倒置显微镜下, 随机抽取5个视野拍照并计数。

1.10 Western blotting法检测各组细胞中AKT通路相关蛋白 转染48 h后加入细胞裂解液, 冰上充分裂解30 min, 离心分离上清液, BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白质通过SDS-PAGE电泳分离, 转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1~2 h后, 分别加入一抗KIAA1522、Cyclin D1、Vimentin、E-cadherin、VEGF、p-AKT、t-AKT(1:1 000)和N-cadherin(1:500), 4℃摇床过夜孵育。次日, TBST溶液洗去一抗, 室温孵育二抗(1:5 000)1 h。TBST溶液洗去二抗, 滴加ECL发光试剂, 显影曝光。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 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/ β -actin蛋白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。NSCLC患者临床病理特征(年龄、性别、肿物最大径、分化程度、TNM分期和淋巴结转移)及NSCLC组织和癌旁正常肺组织中KIAA1522蛋白表达情况均以例数(百分率)[(n(%))表示, 组间比较采用 χ^2 检验。各组肺癌细胞增殖活

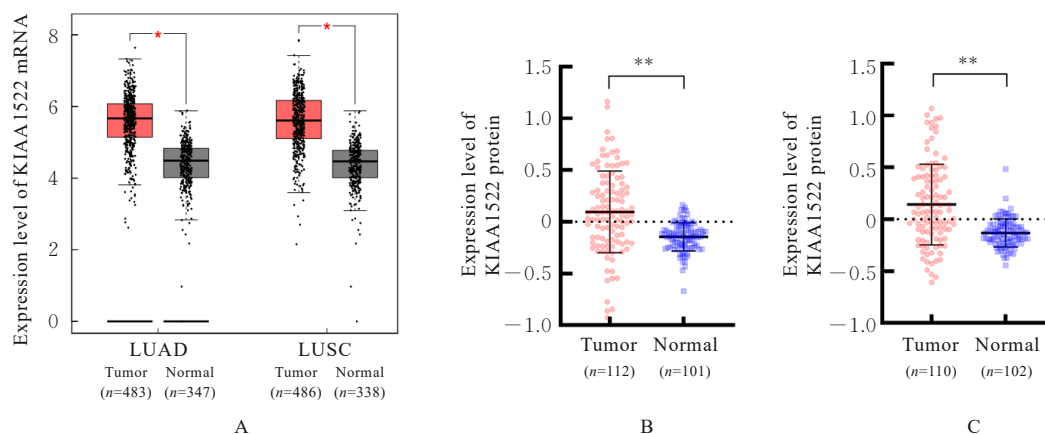
性、细胞迁移率、侵袭细胞数和细胞中KIAA1522、AKT、Cyclin D1、VEGF及EMT相关蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC组织和癌旁正常肺组织中KIAA1522 mRNA及蛋白表达水平 与癌旁正常肺组织比较, NSCLC组织中KIAA1522 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图1。

2.2 NSCLC组织和癌旁正常肺组织中KIAA1522蛋白阳性表达率 与癌旁正常肺组织(25.31%)比较, NSCLC组织中KIAA1522蛋白阳性表达率(64.24%)明显升高($P<0.05$)。NSCLC组织KIAA1522蛋白表达与TNM分期有关($P<0.01$)。见图2和表1。

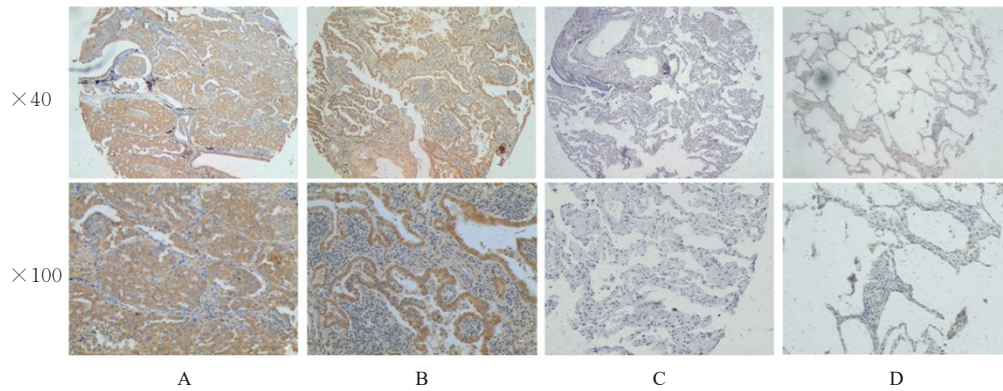
2.3 正常肺上皮细胞和不同肺癌细胞中KIAA1522蛋白表达水平 与正常肺上皮BEAS-2B细胞比较, 肺癌PC9、H1299、H460、A549、H1975和H226细胞中KIAA1522蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中, H1299细胞中KIAA1522蛋白表达水平最高, A549细胞中KIAA1522蛋白表达水平较低。见图3。



A: Expression of KIAA1522 mRNA in NSCLC and adjacent normal lung tissues; B: Expression of KIAA1522 protein in LUAD and adjacent normal lung tissues; C: Expression of KIAA1522 protein in LUSC and adjacent normal lung tissues. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs normal lung tissue.

图1 生物信息学方法分析肺癌组织和癌旁正常肺组织中KIAA1522 mRNA及蛋白表达水平

Fig. 1 Expression levels of KIAA1522 mRNA and protein in lung cancer and adjacent normal lung tissues analyzed by bioinformatics assay



A—B: High expression of KIAA1522 protein in lung cancer tissue; C—D: Low expression of KIAA1522 protein in adjacent normal lung tissue.

图2 免疫组织化学染色法观察 NSCLC 组织和癌旁正常肺组织中 KIAA1522 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of KIAA1522 protein in NSCLC tissue observed by immunohistochemistry staining method

表1 不同临床病理特征 NSCLC 患者癌组织中 KIAA1522 蛋白表达情况

Tab. 1 Expressions of KIAA1522 protein in cancer tissue of NSCLC patients with different clinicopathological characteristics

Clinicopathological characteristic	n	KIAA1522		χ^2	P
		+	-		
Age					
≤60	33	26	7	0.251	0.616
>60	42	31	11		
Gender					
Male	43	32	11	0.488	0.485
Female	32	26	6		
Maximum diameter of tumor(cm)					
≤3	34	24	10	1.614	0.204
>3	41	34	7		
Differentiation					
Well-moderate	51	42	9	2.291	0.130
Poor	24	16	8		
TNM stage					
I	31	18	13	11.192	0.001
II+III	44	40	4		
Lymphnode metastasis					
Yes	2	2	0	-	1.000
No	73	56	17		

“—”: No data.

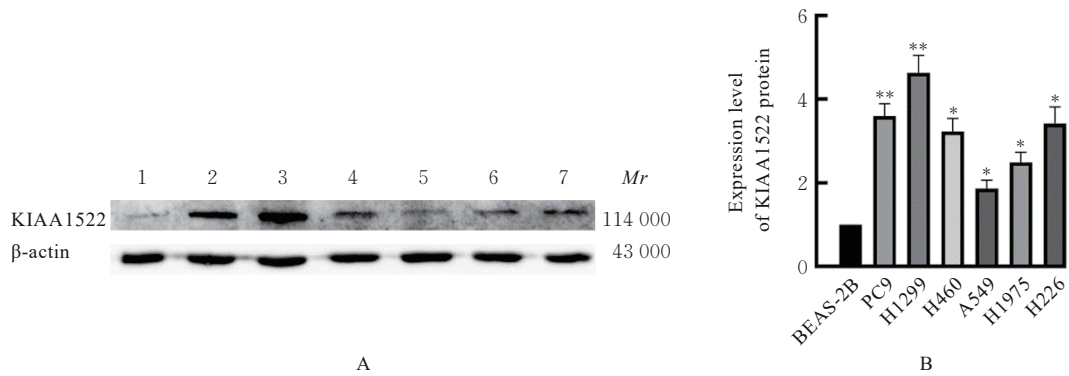
2.4 各组肺癌细胞中 KIAA1522 蛋白表达水平 与空白组比较, si-NC 组 H1299 细胞中 KIAA1522 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 si-NC 组比较, KIAA1522-siRNA#1 组和 KIAA1522-siRNA#2 组 H1299 细胞中 KIAA1522 蛋白表达水

平明显降低 ($P<0.01$)。见图 4。与对照组比较, OE-NC 组 A549 细胞中 KIAA1522 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 OE-NC 组比较, OE-KIAA1522 组 A549 细胞中 KIAA1522 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)。见图 5。

2.5 各组细胞增殖活性 细胞培养 24、48 和 72 h 时, 与 si-NC 比较, KIAA1522-siRNA#1 组和 KIAA1522-siRNA#2 组 H1299 细胞增殖活性均明显降低 ($P<0.01$)。见表 2。细胞培养 24、48 和 72 h 时, 与 OE-NC 组比较, OE-KIAA1522 组 A549 细胞增殖活性明显升高 ($P<0.01$); 与 OE-KIAA1522 组比较, OE-KIAA1522+MK2206 组 A549 细胞增殖活性明显降低 ($P<0.01$); 与 OE-KIAA1522+MK2206 组比较, MK2206 组 A549 细胞增殖活性明显降低 ($P<0.05$)。见表 3。

2.6 各组细胞迁移率 与 si-NC 组(38.18%±5.23%) 比较, KIAA1522-siRNA#1 组和 KIAA1522-siRNA#2 组 H1299 细胞迁移率(12.63%±3.02% 和 6.55%±1.04%) 均明显降低 ($P<0.01$)。见图 6。与 OE-NC 组 (13.07% ± 3.30%) 比较, OE-KIAA1522 组 A549 细胞迁移率 (31.55%±2.95%) 明显升高 ($P<0.01$); 与 OE-KIAA1522 组比较, OE-KIAA1522+MK2206 组 A549 细胞迁移率 (17.79%±7.15%) 明显降低 ($P<0.05$); 与 OE-KIAA1522+MK2206 组比较, MK2206 组 A549 细胞迁移率(3.27%±1.20%) 明显降低 ($P<0.05$)。见图 7。

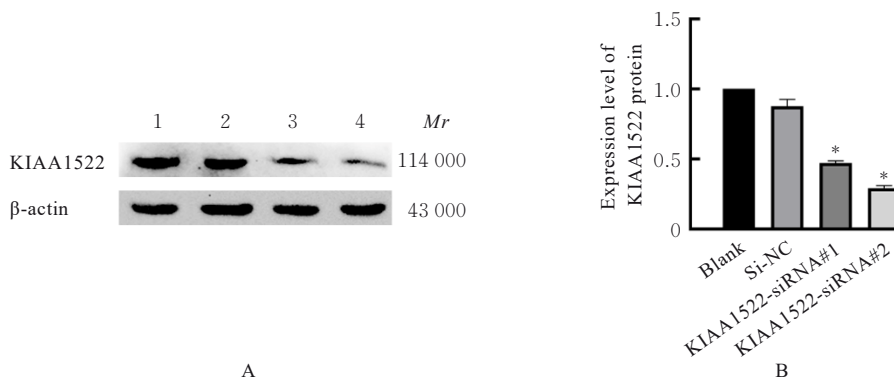
2.7 各组细胞中侵袭细胞数 与 si-NC 组(280.00个±14.11个) 比较, KIAA1522-siRNA#1 组和



Lane 1: BEAS-2B cells; Lane 2: PC9 cells; Lane 3: H1299 cells; Lane 4: H460 cells; Lane 5: A549 cells; Lane 6: H1975 cells; Lane 7: H226 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BEAS-2B cells.

图3 正常肺上皮细胞和不同肺癌细胞系中KIAA1522蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

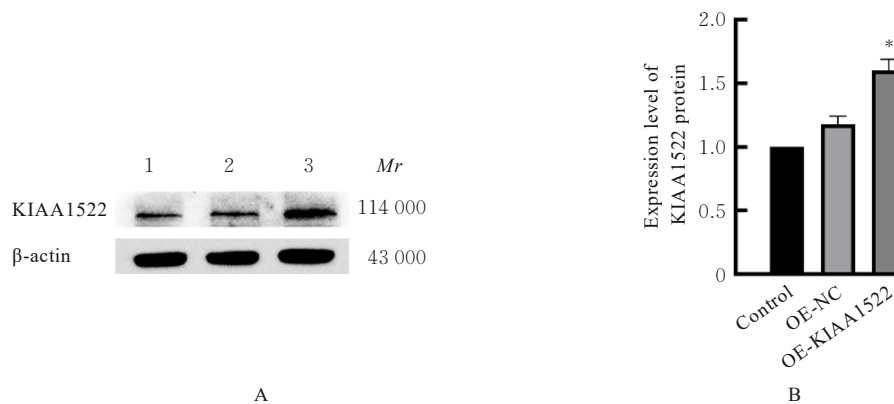
Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of KIAA1522 protein in normal lung epithelial cells and different lung cancer cell lines



Lane 1: Blank group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: KIAA1522-siRNA#1 group; Lane 4: KIAA1522-siRNA#2 group. * $P < 0.01$ vs si-NC group.

图4 沉默KIAA1522后各组H1299细胞中KIAA1522蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of KIAA1522 protein in H1299 cells in various groups after silencing KIAA1522



Lane 1: Control group; Lane 2: OE-NC group; Lane 3: OE-KIAA1522 group. * $P < 0.01$ vs OE-NC group.

图5 KIAA1522过表达后各组A549细胞中KIAA1522蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of KIAA1522 protein in A549 cells in various groups after over-expression of KIAA1522

表2 沉默KIAA1522-siRNA后各组H1299细胞增殖活性

Tab. 2 Proliferation activities of H1299 cells in various groups after silencing KIAA1522-siRNA (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Proliferation activity			
	(t/h)	24	48	72
Si-NC		0.146±0.008	0.200±0.009	0.278±0.010
KIAA1522-siRNA#1		0.095±0.010*	0.161±0.001*	0.224±0.007*
KIAA1522-siRNA#2		0.089±0.010*	0.156±0.011*	0.204±0.004*

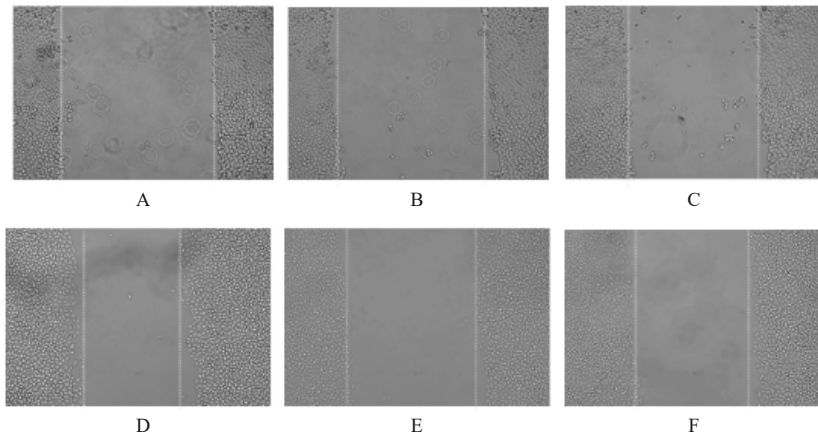
*P<0.01 vs si-NC group.

表3 KIAA1522过表达后各组A549细胞增殖活性

Tab. 3 Proliferation activities of A549 cells in various groups after over-expression of KIAA1522 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Proliferation activity			
	(t/h)	24	48	72
OE-NC		0.138±0.012	0.216±0.006	0.330±0.007
OE-KIAA1522		0.150±0.016*	0.255±0.014*	0.388±0.011*
OE-KIAA1522+MK2206		0.129±0.007 [△]	0.191±0.013 [△]	0.300±0.012 [△]
MK2206		0.118±0.011 [#]	0.158±0.007 [#]	0.261±0.004 [#]

*P<0.01 vs OE-NC group; [△]P<0.01 vs OE-KIAA1522 group; [#]P<0.05 vs OE-KIAA1522+MK2206 group.



A-C: 0 h; D-F: 24 h; A, D: Si-NC group; B, E: KIAA1522-siRNA#1 group; C, F: KIAA1522-siRNA#2 group.

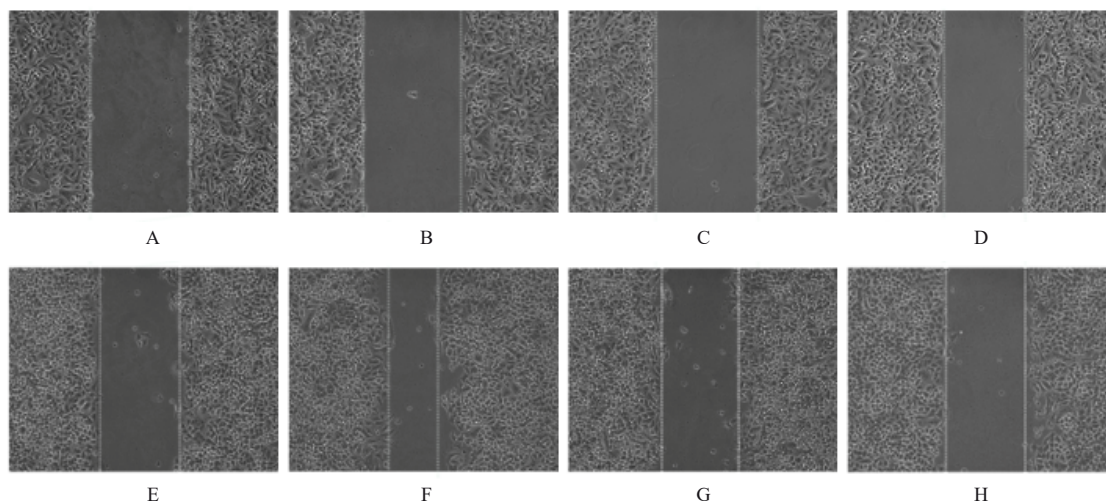
图6 沉默KIAA1522-siRNA后各组H1299细胞迁移情况(×10)

Fig. 6 Migration of H1299 cells in various groups after silencing KIAA1522-siRNA (×10)

KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞中侵袭细胞数(106.70个±17.47个和68.67个±12.01个)明显减少(P<0.01);与OE-NC组(185.70个±12.01个)比较,OE-KIAA1522组A549细胞中侵袭细胞数(404.70个±13.5个)明显增多(P<0.01);与OE-KIAA1522组比较,OE-KIAA1522+MK2206组A549细胞中侵袭细胞数(210.70个±20.31个)明显减少(P<0.01);与OE-KIAA1522+MK2206组比较,MK2206组A549细胞中侵袭细胞数(44.33个±5.13个)明显减少(P<0.01)。见图8。

2.8 各组细胞中AKT通路相关蛋白表达水平

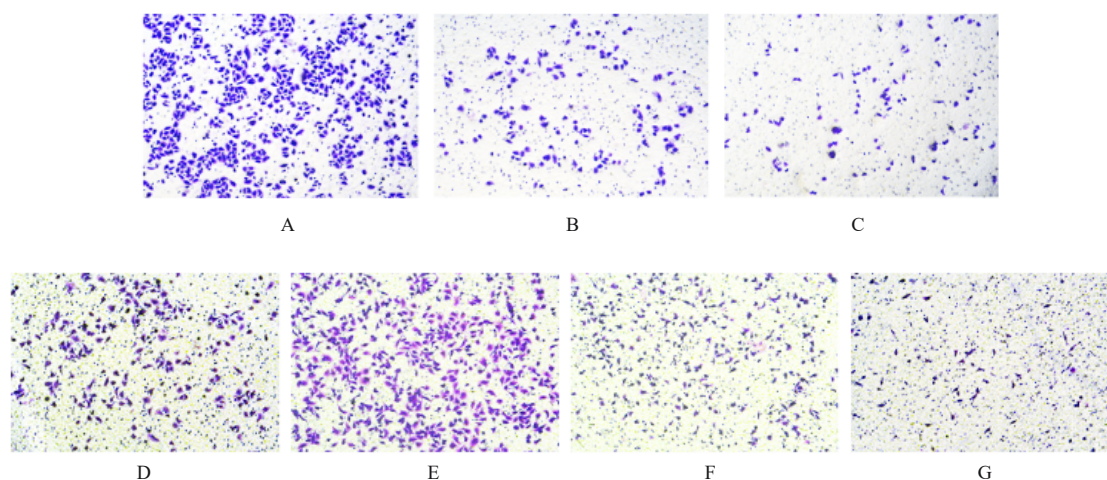
与si-NC组比较,KIAA1522-siRNA#1组和KIAA1522-siRNA#2组H1299细胞中p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin及VEGF蛋白表达水平均明显降低(P<0.05或P<0.01),E-cadherin蛋白表达水平明显升高(P<0.01);各组细胞中t-AKT蛋白表达水平比较差异均无统计学意义(P>0.05)。见图9。与OE-NC组比较,OE-KIAA1522组A549细胞中p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达水平升高(P<0.05或P<0.01),E-cadherin蛋白表达水平



A—D: 0 h; E—H: 24 h; A, E: OE-NC group; B, F: OE-KIAA1522 group; C, G: OE-KIAA1522+MK2206 group; D, H: MK2206 group.

图7 KIAA1522过表达后各组A549细胞迁移情况($\times 10$)

Fig. 7 Migration of A549 cells in various groups after over-expression of KIAA1522 ($\times 10$)



A: Si-NC group; B: KIAA1522-siRNA#1 group; C: KIAA1522-siRNA#2 group; D: OE-NC group; E: OE-KIAA1522 group; F: OE-KIAA1522+MK2206 group; G: MK2206 group.

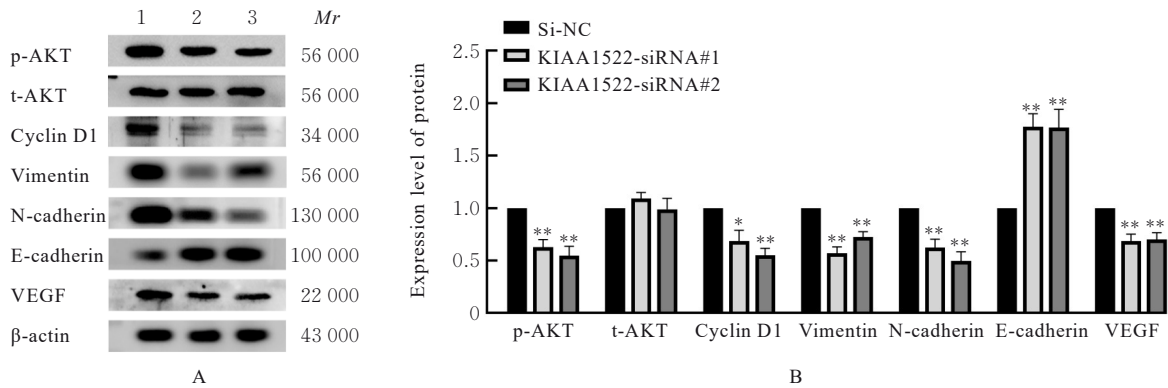
图8 各组细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 10$)

Fig. 8 Invasion of cells in various groups (Crystal violet, $\times 10$)

明显降低 ($P < 0.05$); 与 OE-KIAA1522 组比较, OE-KIAA1522+MK2206 组 A549 细胞中 p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin 和 VEGF 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 OE-KIAA1522+MK2206 组比较, MK2206 组 A549 细胞中 p-AKT、Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin 和 VEGF 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 各组细胞中 t-AKT 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 10。

3 讨论

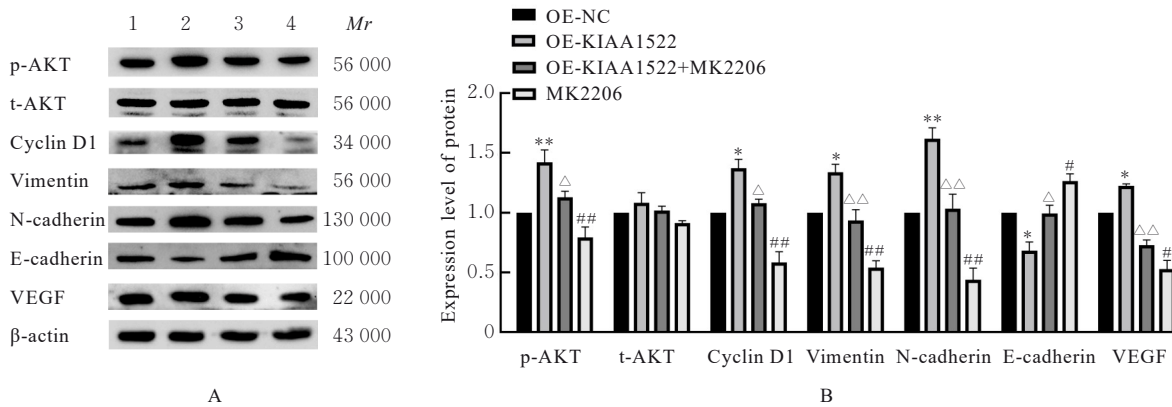
肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[15]。肺癌的发病机制十分复杂,恶性转移是肺癌患者死亡率较高的主要原因。阐明肺癌侵袭与转移的分子机制,确定有效的干扰靶点,对提高肺癌的诊断率和患者生存质量具有重要意义。KIAA1522 参与细胞微丝骨架的多聚化、重排和细胞间黏附等过程,通过重塑细胞骨架,调节细胞黏附,促进细胞的运动和转移^[3]。KIAA1522 在多种恶性肿瘤过度表达,如结直肠癌^[10]、肝癌^[4]、卵巢癌^[16]、食管癌^[11]和胰腺癌^[17]等,调节细胞增



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: KIAA1522-siRNA#1 group; Lane 3: KIAA1522-siRNA#2 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

图9 沉默KIAA1522-siRNA后各组细胞中AKT通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of AKT pathway-related proteins in cells in various groups after silencing KIAA1522-siRNA



Lane 1: OE-NC group; Lane 2: OE-KIAA1522 group; Lane 3: OE-KIAA1522+MK2206 group; Lane 4: MK2206 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OE-NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs OE-KIAA1522 group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OE-KIAA1522+MK2206 group.

图10 KIAA1522过表达后各组细胞中AKT通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of AKT pathway-related proteins in cells in various groups after over-expression of KIAA1522

殖、凋亡、侵袭、迁移及血管生成等病理过程，促进肿瘤的发生发展。

本研究中生物信息学数据分析结果显示：肺癌组织中KIAA1522 mRNA和蛋白表达水平明显升高。组织芯片染色结果证实：NSCLC组织中KIAA1522蛋白阳性表达率明显高于癌旁正常肺组织，与生物信息学数据库分析结果一致。KIAA1522蛋白表达水平与肺癌TNM分期有关，提示KIAA1522可能与肿瘤的恶性进展有关联。为明确KIAA1522对肺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响，本研究筛选了KIAA1522表达较高的肺癌H1299细胞和表达较低的A549细胞进行体外实验；沉默KIAA1522后，与对照组比较，肺癌H1299细胞增殖活性、细胞迁移率和侵袭细胞数及细胞中

AKT磷酸化水平明显降低；肺癌A549细胞过表达KIAA1522则促进了细胞增殖、迁移和侵袭及AKT磷酸化，且AKT信号通路特异性抑制剂MK2206可阻断上述作用。本研究结果提示：KIAA1522可能通过激活AKT信号通路，促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

EMT赋予了肿瘤细胞的高运动性和侵袭性^[18]。EMT启动过程的关键环节是上皮细胞间的紧密连接、黏附连接和桥粒间隙连接的破坏，细胞失去极性，上皮细胞的肌动蛋白重组，细胞获得运动性和侵袭能力^[19]。KIAA1522作为黏附连接蛋白，在很大程度上参与了EMT过程，导致肺癌细胞与邻近细胞及细胞外基质的黏附连接不甚紧密，易脱离细胞群，从而促进EMT发生，增加肿瘤的

转移能力。研究^[20]显示:结直肠癌细胞过表达 KIAA1522可能诱导EMT发生,促进细胞侵袭和迁移。

VEGF介导的血管形成在肿瘤侵袭和迁移中扮演重要角色。新生血管的形成给肿瘤细胞提供了营养支持,便于其局部侵袭和远处转移^[21]。研究^[22]表明:VEGF在癌症中高表达,并与肿瘤的迁移、侵袭和EMT有关。Cyclin D1是反映细胞增殖活性相关的主要标志物。JIANG等^[8]研究表明:过表达 KIAA1522通过Wnt/ β -catenin信号通路上调Cyclin D1,进而促进肝细胞癌增殖。Cyclin D1、VEGF和EMT相关蛋白是AKT信号通路的下游关键因子^[23]。本研究结果显示:沉默KIAA1522可导致肺癌H1299细胞中Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达抑制,E-cadherin表达上调;过表达KIAA1522则可促进肺癌A549细胞中Cyclin D1、Vimentin、N-cadherin和VEGF蛋白表达上调,抑制E-cadherin表达,AKT信号通路抑制剂MK2206可阻断上述作用。以上结果提示,KIAA1522可能通过激活AKT信号通路,上调Cyclin D1、VEGF和EMT蛋白表达,促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Cyclin D1和VEGF是肿瘤发生发展的重要分子。ZHAO等^[13]研究显示:AKT磷酸化可刺激Cyclin D1的表达,引起EMT发生,增加肺癌细胞的侵袭转移。ZHENG等^[24]研究证实:VEGF能调节EMT进程和肺癌细胞的转移。HAN等^[25]研究发现:胃癌组织中Cyclin D1水平与VEGF mRNA和蛋白表达水平呈正相关关系。由此可见,上述蛋白之间彼此作用,共同促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移。但Cyclin D1、VEGF和EMT相关蛋白之间的相互关系还需要进一步研究。

综上所述,KIAA1522可能通过AKT信号通路促进肺癌细胞的EMT进程,并调节Cyclin D1和VEGF蛋白,从而增强肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。靶向KIAA1522及其下游蛋白有望成为肺癌治疗的新靶点。

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:

王艺慧参与实验操作、数据收集和论文撰写,张晴和李英楠参与实验操作及数据收集,叶丽平参与实验设计、数据整理、统计学分析和论文审校。

[参考文献]

- [1] ZHANG X, ZHANG R, LIU P P, et al. ATP8B1 knockdown activated the choline metabolism pathway and induced high-level intracellular REDOX homeostasis in lung squamous cell carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(3): 835.
- [2] YANG D W, LIU Y, BAI C X, et al. Epidemiology of lung cancer and lung cancer screening programs in China and the United States[J]. *Cancer Lett*, 2020, 468: 82-87.
- [3] 解智慧. 一种新的介导细胞间粘附的肌动蛋白相关蛋白KIAA1522在食管癌中作用及其机制的研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2014.
- [4] XU Y Z, SUN C D, HAN B, et al. High KIAA1522 expression predicts a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 509-516.
- [5] SHI Y J, XIAO Q W, HUANG S C, et al. Poor prognostic biomarker KIAA1522 is associated with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma[J]. *J Oncol*, 2023, 2023: 3538928.
- [6] ÖZDEDE M, TABAN H K, AKMAN O, et al. The prognostic significance of KIAA1522 expression in non-small-cell lung cancer patients[J]. *Cureus*, 2023, 15(8): e44016.
- [7] HU B, YANG X B, YANG X, et al. LncRNA CYTOR affects the proliferation, cell cycle and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by regulating the miR-125b-5p/KIAA1522 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2626-2639.
- [8] JIANG S B, ZHANG Y G, LI Q, et al. KIAA1522 promotes the progression of hepatocellular carcinoma via the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5657-5668.
- [9] WANG B S, JING T T, JIN W L, et al. KIAA1522 potentiates TNF α -NF κ B signaling to antagonize platinum-based chemotherapy in lung adenocarcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 170.
- [10] YI X, HU C H, ZHANG C, et al. KIAA1522 is a new biomarker of promoting the tumorigenesis and distant metastasis of colorectal carcinoma [J]. *Cell Signal*, 2022, 90: 110202.
- [11] XIE Z H, YU J, SHANG L, et al. KIAA1522 overexpression promotes tumorigenicity and metastasis of esophageal cancer cells through potentiating the ERK activity[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3743-3754.

- [12] HUA H, ZHANG H Y, CHEN J Z, et al. Targeting Akt in cancer for precision therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 128.
- [13] ZHAO L M, LI J, LIU Y P, et al. Flotillin1 promotes EMT of human small cell lung cancer *via* TGF- β signaling pathway[J]. *Cancer Biol Med*, 2018, 15(4): 400-414.
- [14] KONG D G, ZHOU H B, NEELAKANTAN D, et al. VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk[J]. *Oncogene*, 2021, 40(5): 964-979.
- [15] FAN Y G, JIANG Y, GONG L, et al. Epidemiological and demographic drivers of lung cancer mortality from 1990 to 2019: results from the global burden of disease study 2019 [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1054200.
- [16] GUO B Q, YU L, SUN Y H, et al. Long non-coding RNA USP2-AS1 accelerates cell proliferation and migration in ovarian cancer by sponging miR-520d-3p and up-regulating KIAA1522 [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 10541-10550.
- [17] LIN J, LIAO S S, LIU Z W, et al. LncRNA FGD5-AS1 accelerates cell proliferation in pancreatic cancer by regulating miR-520a-3p/KIAA1522 axis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2021, 22(3): 257-266.
- [18] NOWAK E, BEDNAREK I. Aspects of the epigenetic regulation of EMT related to cancer metastasis [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3435.
- [19] HUANG Y H, HONG W Q, WEI X W. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 129.
- [20] 张 瑞, 陈进宏. 结直肠癌肝转移的非根治性切除手术治疗策略 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(7): 1295-1300.
- [21] RAVAGGI A, GAMBINO A, FERRARI F, et al. VEGF-D serum level as a potential predictor of lymph node metastasis and prognosis in vulvar squamous cell carcinoma patients [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 818613.
- [22] LI C, WANG H F, FANG H, et al. FOXP3 facilitates the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer cells through regulating VEGF, EMT and the Notch1/Hes1 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3): 958.
- [23] MAHARATI A, MOGHBELI M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 201.
- [24] ZHENG Y H, JI H X, YI W L, et al. PRMT5 facilitates angiogenesis and EMT *via* HIF-1 α /VEGFR/Akt signaling axis in lung cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(13): 6163-6178.
- [25] HAN P, WANG Q L, ZHANG X. Expression of TRAP1 in gastric cancer tissue and its correlation with malignant biology [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(1): 67-71.