

· 论 著 ·

ANK2 对卵巢癌 OVCAR5 细胞干性的体外作用研究

徐嘉曼, 承欧梅[△]

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 探究 ANK2 对卵巢癌 OVCAR5 细胞干性的体外作用。**方法** 采用 ANK2 过表达和空载体对照慢病毒感染 OVCAR5 卵巢癌细胞株, 将细胞分为 ANK2 过表达和空载体对照组, 利用成微球实验检测各组细胞成微球能力, 利用实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质免疫印迹实验检测各组细胞 CD133、SOX2、OCT4、NANOG 表达水平, 利用体外有限稀释法检测各组细胞成微球频率。**结果** 与空载体对照组细胞比较, ANK2 过表达组 OVCAR5 细胞成微球能力, 以及 CD133、SOX2、OCT4、NANOG mRNA 和蛋白表达水平均明显增强, 成微球频率明显提高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** ANK2 对 OVCAR5 细胞干性具有体外促进作用。

[关键词] ANK2; 卵巢肿瘤; OVCAR5 细胞; 干性; 体外作用

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.07.002

中图法分类号: R737.31

文章编号: 1009-5519(2025)07-1545-05

文献标识码: A

Effect of ANK2 on the stemness of ovarian cancer OVCAR5 cells in vitro

XU Jiaman, CHENG Oumei[△]

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ANK2 on the stemness of ovarian cancer OVCAR5 cells in vitro. **Methods** OVCAR5 cells were infected by ANK2-overexpressing and empty vector control lentivirus to establish an ANK2-overexpressing model. The cells were divided into the ANK2-overexpressing and empty vector control groups. The expression levels of CD133, SOX2, OCT4 and NANOG in each group were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. The frequency of microsphere formation in each group was detected by limiting dilution method in vitro. **Results** Compared with the empty vector control group, the microspherogenic ability of ANK2-overexpressing group OVCAR5 cells, as well as the mRNA and protein expression levels of CD133, SOX2, OCT4, and NANOG, were significantly enhanced, and the microspherogenic frequency was significantly increased. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** ANK2 has an in vitro promoting effect on the dryness of OVCAR5 cells.

[Key words] ANK2; Ovarian neoplasms; OVCAR5 cells; Dry; In vitro effect

肿瘤干细胞是肿瘤组织中一部分具有干细胞样特征的细胞, 对现有的治疗手段拥有先天和获得性抗性, 是癌症复发的主要原因^[1]。卵巢癌是研究肿瘤干细胞的理想模型之一, 原发卵巢癌细胞易转移至腹腔形成腹膜转移, 腹腔中腹腔积液的微环境极易使卵巢癌干细胞富集^[2]。常用的卵巢癌细胞系 OVCAR5 则分离于高级别浆液性卵巢癌的腹腔积液中。虽然肿瘤干细胞在肿瘤进展中如此重要, 但肿瘤干细胞的驱动基因仍然未完全鉴定。

ANK2 基因编码蛋白细胞膜锚蛋白 B, 属于锚蛋

白家族成员, 其结构组成与其他锚蛋白家族成员一样, 包含 3 个区域, 即 N 端、中心区域和 C 端^[3]。有研究表明, ANK2 在锚定钠-钾 ATP 酶和肌醇-1,4,5-三磷酸受体、延长 InsP3R 半衰期方面具有重要作用^[3]。ANK2 的突变导致多个临床表型, 如长 QT 综合征、心房颤动、室性心律失常等^[4-7]。最新研究表明, ANK2 的异常表达与多种癌症相关, 如乳腺癌^[8]、胃癌^[9]、结直肠癌^[10]和小细胞肺癌^[11]。但 ANK2 与肿瘤干性的关系仍不明确。本研究通过比较 ANK2 过表达和空载体对照 OVCAR5 细胞的干性指标, 探究了 ANK2 对肿

作者简介: 徐嘉曼(1992—), 硕士研究生, 医师, 主要从事疾病分子机制方面的研究。 [△] **通信作者,** E-mail: chengoumei01@aliyun.com。

网络首发 <https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250702.0914.004>

瘤细胞干性的体外作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超净工作台、二氧化碳培养箱、微量紫外-可见分光光度计(Nanodrop)、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国赛默飞公司)、离心机、移液器(德国艾本德公司)、倒置显微镜(奥林巴斯)、Roswell Park Memorial Institute medium 培养基、胎牛血清、重组人生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、糖皮质激素、B27 无血清培养添加剂、Super-Script™ III Platinum™ One-Step 实时荧光定量 PCR Kit、胰酶、青/链霉素、Lipofectamine 3000(美国赛默飞公司)、RNA 提取试剂盒(德国凯捷公司)、超低吸附细胞培养板(美国康宁公司)、OVCAR5 人卵巢癌细胞系(美国 Sigma-Aldrich 公司)、ANK2 过表达和空载体对照慢病毒悬液(北京擎科生物科技有限公司)、ANK2 抗体(美国赛默飞公司),以及 CD133、SOX2、OCT4、NANOG 抗体(美国 CST 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 OVCAR5 细胞从-80℃冰箱尽快取出,在 37℃恒温水浴锅轻轻摇晃,将细胞悬液用移液器移至培养皿,培养在含 1%青/链霉素、10%新鲜胎牛血清的培养基中,将培养皿移至细胞培养箱,设置条件为 37℃、5%二氧化碳、95%相对饱和度,待细胞汇合度达 80%后进行后续实验。

1.2.2 模型构建 OVCAR5 细胞于 24 孔板中,密度为 5×10⁴/孔,第 2 天将 ANK2 过表达和空载体对

照病毒分别取出根据滴度用新鲜培养基稀释,吸出原有培养基,更换为含病毒的培养基,感染 24 h 后吸除含病毒的培养基,更换为新鲜的培养基,再继续培养 24 h 后加入嘌呤霉素使终质量浓度为 2.5 μg/mL,再培养 48 h 更换新鲜培养基,待细胞生长至 80%汇合度时传代并进行实验,采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹试验鉴定感染效率。

1.2.3 微球形成实验 首先在培养皿中培养细胞,待细胞达到 80%汇合度时消化并搜集细胞,将细胞以 3 000 个细胞/6 孔板孔的密度接种于超低吸附的 6 孔板中,利用含 20 ng/mL 重组人表皮生长因子(rh-EGF)、20 ng/mL rh-碱性成纤维细胞生长因子、0.5 μg/mL 糖皮质激素、2% B27 的无血清培养基培养,培养 15 d 后观察微球数量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 培养 ANK2 过表达和对照 OVCAR5 细胞,待 80%汇合度时收集细胞,依次加入 Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇,提取细胞总 RNA。采用 Nanodrop 检测 RNA 纯度和浓度,吸光度值为 1.8~2.0 为合格。根据试剂盒说明书构建反应体系:含镁离子的 Reaction Mix 终浓度为 3 mmol/L,引物终浓度为 200 nmol/L,探针终浓度为 100 nmol/L。PCR 反应条件设置为 50℃、15 min 1 个循环,95℃、2 min 1 个循环,95℃、15 s,60℃、30 s 40 个循环,均采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参进行标准化,每个样本设置 3 复孔,应用 2^{-ΔΔCt} 计算每个基因的 RNA 相对表达量。引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

基因	引物	序列
ANK2	正向引物	5'-ACCTGCAATCAGAATGGACTCA-3'
	反向引物	5'-TGCAATGTGAAGAGCGGTATT-3'
PROM1(CD133)	正向引物	5'-AGTCGGAAGTGGCAGATAGC-3'
	反向引物	5'-GGTAGTGTGTACTGGGCCAAT-3'
SOX2	正向引物	5'-GCCGAGTGGAACTTTTGTCTG-3'
	反向引物	5'-GGCAGCGTGTACTIONTATCCTTCT-3'
OCT4(POU5F1)	正向引物	5'-CTTGAATCCCGAATGGAAAGGG-3'
	反向引物	5'-CCTTCCCAAATAGAACCCCA-3'
NANOG	正向引物	5'-CCCCAGCCTTTACTCTTCCTA-3'
	反向引物	5'-CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC-3'
GAPDH	正向引物	5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3'
	反向引物	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

1.2.5 蛋白质免疫印迹试验 培养 ANK2 过表达和空载体对照 OVCAR5 细胞,待 80%汇合度时收集细胞,用蛋白裂解液裂解细胞,离心取上清液,采用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度检测,各取 20 μg 蛋白利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺进行分离,转至聚偏氟乙烯膜后,利用 2%脱脂牛奶封闭,封

闭结束后加入一抗并在 4℃下孵育过夜,洗膜后加入二抗并在室温孵育 1 h,洗膜后显影。首先以 GAPDH 为内参蛋白进行标准化,然后计算目的蛋白相对表达水平。

1.2.6 有限稀释法 培养 ANK2 过表达和空载体对照 OVCAR5 细胞,待细胞达 80%汇合度时收集细胞,

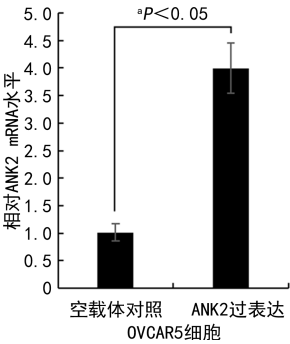
制备单细胞悬液,将细胞接种于超低吸附 96 孔板中,接种细胞浓度分别为 1/孔、5/孔、10/孔,每个细胞浓度设置 50 个重复,进一步在超低吸附培养板中培养,培养 15 d 后观察并记录生长有微球的孔,用 [https://bioinf. wehi. edu. au/software/elda/](https://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/)在线软件计算与统计成微球频率。

1.3 统计学处理 应用 Excel2021 软件进行数据分析并绘图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's *t* 检验;计数资料以率或构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

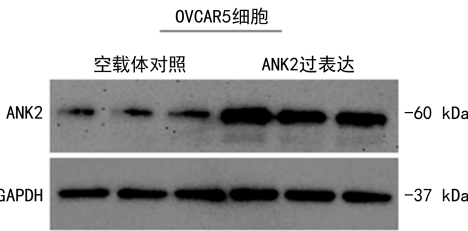
2.1 ANK2 过表达和空载体对照 OVCAR5 细胞的验证 与空载体对照细胞比较,ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 ANK2 mRNA 和蛋白表达水平均明

显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、2。



注:与空载体对照细胞比较,* $P < 0.05$ 。

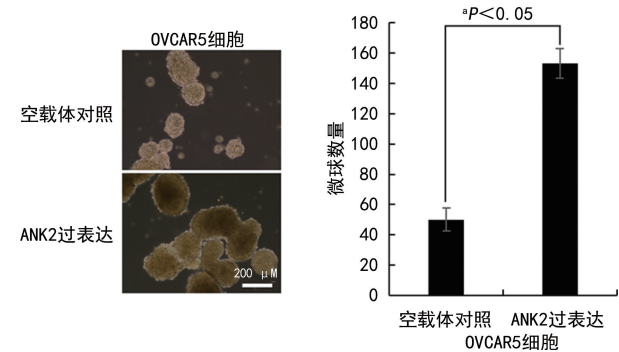
图 1 空载体对照与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 ANK2 mRNA 表达水平比较



注:与空载体对照细胞比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 空载体对照与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 ANK2 蛋白表达水平比较

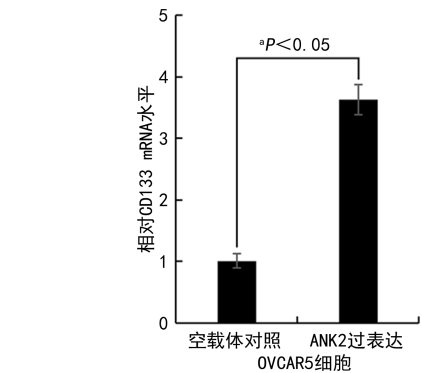
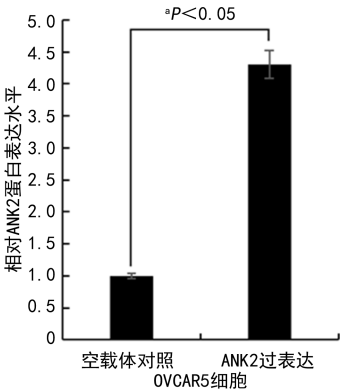
2.2 ANK2 过表达提升了 OVCAR5 细胞的成微球能力 与空载体对照细胞比较,ANK2 过表达 OVCAR5 细胞成微球数量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



注:与空载体对照细胞比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 空载体对照与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞成微球能力比较

2.3 ANK2 过表达提升了 OVCAR5 细胞 CD133 mRNA 和蛋白表达水平 与空载体对照细胞比较,ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 CD133 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、5。

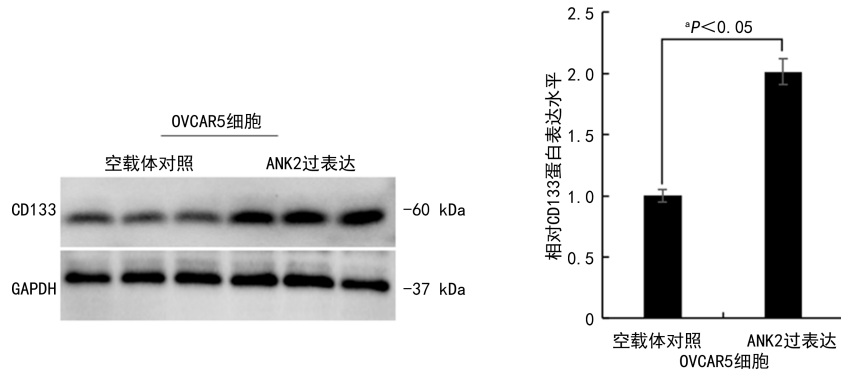


注:与空载体对照细胞比较,* $P < 0.05$ 。

图 4 空载体对照于 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 CD133 mRNA 表达水平比较

2.4 ANK2 过表达提升了 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANO mRNA 和蛋白表达水平 与空载体对照细胞比较,ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANOG mRNA 和蛋白表达水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6、7。

2.5 ANK2 过表达提升了 OVCAR5 细胞成微球频率 与空载体对照细胞比较,ANK2 过表达 OVCAR5 细胞成微球频率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 8。

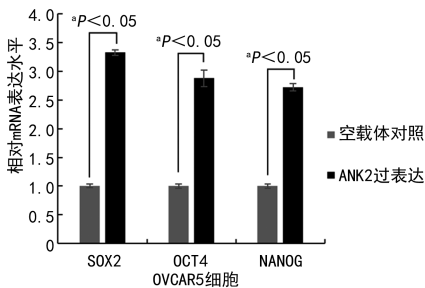


注:与空载体对照细胞比较,^a $P < 0.05$ 。

图 5 空载体对照与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 CD133 蛋白表达水平比较

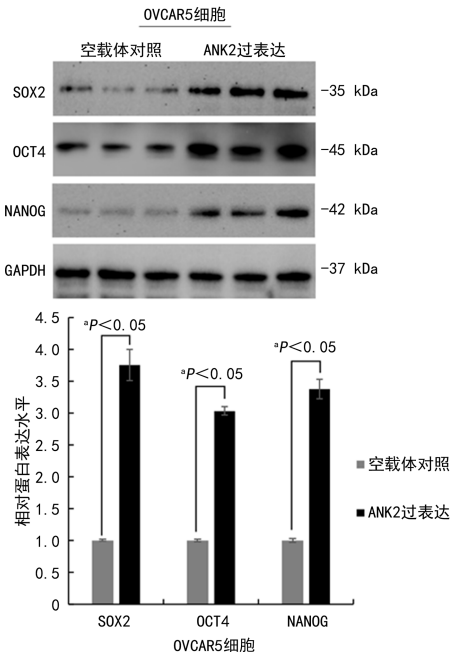
表 2 有限稀释法实验结果

组别	孔数 (<i>n</i>)	出现微球(孔数)			微球形成频率	95%可信区间	差异倍数
		每孔接种细胞数(<i>n</i>)					
		10	5	1			
空载体对照细胞	50	17	8	2	1/25.98	1/37.3~1/17.95	<0.05
ANK2 过表达细胞	50	38	21	7	1/8.21	1/10.3~1/6.44	3.16



注:与空载体对照细胞比较,^a $P < 0.05$ 。

图 6 空载体对照与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANOG mRNA 表达水平比较



注:与空载体对照细胞比较,^a $P < 0.05$ 。

图 7 空载体对照细胞与 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANOG 蛋白表达水平比较

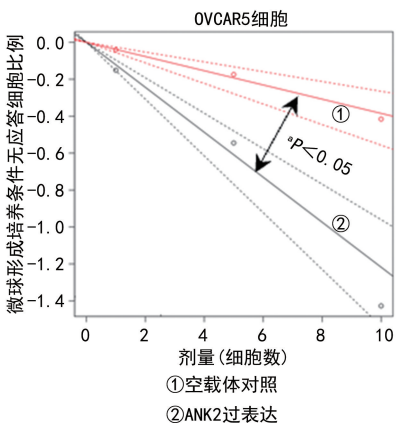


图 8 有限稀释法实验结果

3 讨 论

肿瘤干细胞是肿瘤进展的主要原因,肿瘤干细胞具有干细胞样特征。因此,对现有的治疗手段具有先天和获得性抗性^[1]。但肿瘤干细胞干性的驱动基因至今未完全鉴定,鉴定新的肿瘤干细胞干性驱动基因有助于发展肿瘤干细胞靶向治疗手段。卵巢癌是研究肿瘤干细胞的理想模型,其原因可能是卵巢癌易发生腹膜转移,在腹腔积液的微环境下,卵巢癌干细胞易发生富集^[2]。本研究采用的 OVCAR5 细胞来源于高级别浆液性卵巢癌患者的腹腔积液,故以 OVCAR5 细胞作为研究对象,探讨了 ANK2 与肿瘤干性的关系。

肿瘤干细胞具有自我更新能力,在悬浮培养的环境中可形成微球^[12]。因此,形成微球的能力可反映细胞的干性水平。本研究采用微球形成实验,对比了空载体对照细胞和 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞微球形成能力,结果显示,与空载体对照细胞比较,ANK2

过表达 OVCAR5 细胞能形成更多数量的微球, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 ANK2 具有增强 OVCAR5 细胞干性的体外作用。

CD133 是卵巢癌干细胞的标志物之一, CD133 表达水平可一定程度上反映卵巢癌细胞的干性^[13]。本研究采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹试验检测方法比对了空载体对照细胞和 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 CD133 标志物表达水平, 结果显示, 与空载体对照细胞比较, ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 CD133 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 再次提示 ANK2 具有增强 OVCAR5 细胞干性的体外作用。

SOX2、OCT4、NANOG 是与干性密切相关的转录因子, 在肿瘤干细胞中广泛表达^[14]。本研究通过比较空载体对照细胞和 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANOG 的表达水平探讨了 ANK2 是否具有增强 OVCAR5 细胞干性的作用, 结果显示, 与空载体对照细胞比较, ANK2 过表达 OVCAR5 细胞 SOX2、OCT4、NANOG mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 再次提示 ANK2 具有增强 OVCAR5 细胞干性的体外作用。

肿瘤干细胞具有更强的成微球能力, 能以少量的细胞在悬浮环境下形成微球并存活^[15]。因此, 本研究采用有限稀释法比较了空载体对照细胞和 ANK2 过表达 OVCAR5 细胞的微球形成频率以研究 ANK2 对 OVCAR5 细胞干性的作用, 结果显示, 与空载体对照细胞比较, ANK2 过表达 OVCAR5 细胞在各细胞浓度接种下均表现出更强的成微球频率, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 再次提示 ANK2 具有增强 OVCAR5 细胞干性的体外作用。

参考文献

[1] LEE T K W, GUAN X Y, MA S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(1): 26-44.

[2] XUAN Y, WANG H G, YUNG M M, et al. SCD1/FADS2 fatty acid desaturases equipose lipid metabolic activity and redox-driven ferroptosis in ascites-derived ovarian cancer cells[J]. *Theranostics*, 2022, 12(7): 3534-3552.

[3] SUCHARSKI H C, DUDLEY E K, KEITH C B R, et al. Mechanisms and alterations of cardiac ion channels leading to disease: role of Ankyrin-B in cardiac function[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 211.

[4] ROBERTS J D, MURPHY N P, HAMILTON R M, et al. Ankyrin-B dysfunction predisposes to arrhythmogenic cardiomyopathy and is amenable to therapy[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3171-3184.

[5] ADLER A, NOVELLI V, AMIN A S, et al. An international, multicentered, evidence-based reappraisal of genes reported to cause congenital long QT syndrome[J]. *Circulation*, 2020, 141(6): 418-428.

[6] WALSH R, ADLER A, AMIN A S, et al. Evaluation of gene validity for CPVT and short QT syndrome in sudden arrhythmic death[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(15): 1500-1510.

[7] ZHU W G, WANG C, HU J Z, et al. Ankyrin-B Q1283H variant linked to arrhythmias via loss of local protein phosphatase 2a activity causes ryanodine receptor hyperphosphorylation[J]. *Circulation*, 2018, 138(23): 2682-2697.

[8] SCHABORT J J, NAM A R, LEE K H, et al. ANK2 hypermethylation in canine mammary tumors and human breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8697.

[9] CAO W L, WEI W Y, ZHAN Z X, et al. Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1958-1966.

[10] HECZKO L, LIŠKA V, VYČÍTAL O, et al. Targeted panel sequencing of pharmacogenes and oncodrivers in colorectal cancer patients reveals genes with prognostic significance[J]. *Hum Genomics*, 2024, 18(1): 83.

[11] IWAKAWA R, KOHNO T, TOTOKI Y, et al. Expression and clinical significance of genes frequently mutated in small cell lung cancers defined by whole exome/RNA sequencing[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(6): 616-621.

[12] LOH J J, MA S. Hallmarks of cancer stemness[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(5): 617-639.

[13] LIU C L, CHEN Y J, FAN M H, et al. Characteristics of CD133-Sustained chemoresistant cancer stem-like cells in human ovarian carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6467.

[14] ROBINSON M, GILBERT S F, WATERS J A, et al. Characterization of SOX2, OCT4 and NANOG in ovarian cancer Tumor-Initiating cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(2): 262.

[15] FANG Y M, XIAO X, WANG J, et al. Cancer associated fibroblasts serve as an ovarian cancer stem cell niche through noncanonical Wnt5a signaling [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2024, 8(1): 7.