Modern Practical Medicine, February 2024, Vol.36, No.2

·临床研究·

CKMT2 对结直肠癌发生发展的影响

蔡莎莎，喻长法，段达荣，刘炳辉，廖南生，陈文晓

【摘要】目的　探讨肌酸激酶线粒体 2（CKMT2）对结直肠癌（CRC）发生发展的调控机制。方法　收集 2018 年 1 月至 2022 年 12 月间在台州市第一人民医院接受手术治疗的 149 例 CRC 患者的肿瘤组织及癌旁组织。采用 qRT-PCR 测量 CKMT2 基因的表达量；通过细胞转染法抑制 CKMT2 的表达，qRT-PCR 和 Western Blot 方法分析 CKMT2 与 Myc 基因在 CRC 中表达的相关性，采用免疫共沉淀方法检测 CKMT2 与 Myc 的结合情况。结果　肿瘤组织 CKMT2 基因表达量显著提升（$P < 0.05$），并且 CRC 细胞系中的 CKMT2 相较正常细胞系表现出更高的表达水平（$P < 0.05$）。CKMT2 基因表达情况影响患者预后，CKMT2 表达量较高的患者总存活率相对较低（$P < 0.05$）。肿瘤组织 CKMT2 表达水平与 Myc 表达水平呈正相关（r=0.478，$P < 0.05$），转染 CKMT2 siRNA 后，siCKMT2 组的 Myc mRNA 及蛋白水平均明显降低（均 $P < 0.05$）。CKMT2 的免疫沉淀物中含有 Myc 蛋白，而 Myc 的免疫沉淀物也包含了 CKMT2 蛋白。结论　CKMT2 可通过与 Myc 相互作用，调控 Myc 表达从而促进 CRC 的发生发展。

【关键词】 结直肠癌；肌酸激酶线粒体 2；Myc；预后

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.02.007

【中图分类号】 R735.3+5　【文献标志码】 A　【文章编号】 1671-0800(2024)02-0170-04

结直肠癌（colorectal cancer，CRC）是一种消化系统恶性肿瘤，它的发病率和死亡率在全世界恶性肿瘤中排名第三位，已成为困扰全球的主要健康问题之一[1-2]。十余年来，我国 CRC 的发病率与死亡率持续攀升[3-4]，给社会及医疗机构带来沉重的压力。随着肿瘤标志物、肠镜等筛查手段的进展以及 CRC 根治手术的不断改进，早期 CRC 患者的 5 年生存率得到大大改善，但是大多数患者诊断时已处于中晚期阶段，预后较差。肌酸激酶线粒体 2（creatine kinase mitochondrial 2，CKMT2），属于肌酸激酶（creatine kinase，CK）同工酶家族[5-6]。本研究旨在分析 CKMT2 在 CRC 组织中的表达，探讨其与 CRC 发生发展的关系及其可能调控机制，为 CRC 早期肿瘤标志物的筛选提供参考，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2018 年 1 月至 2022 年 12 月于台州市第一人民医院行手术治疗的 149 例 CRC 患者。收集其肿瘤组织和远端癌旁组织标本，各自放入冻存管，然后迅速置于液氮环境中，保存至－80℃。本研究获得台州市第一人民医院伦理委员会批准，所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养和细胞转染　对人 CRC 细胞株 SW480 及其对照细胞株 NCM460（上海富恒生物科技有限公司）进行培养，达到 80%左右细胞密度，使用 Lipo3000 和 Opti-MEM 培养基进行转染（赛默飞世尔科技公司）。转染分组：转染阴性对照 NC siRNA 的为 NC 组（对照组），转染 CKMT2 siRNA 的为 siCKMT2 组（上海吉玛公司）。转染 48 h 后，实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）方法验证转染效果。

1.2.2　qRT-PCR　组织标本研碎或者收集细胞，提取总 RNA；再进行逆转录反应合成 cDNA，最后以 cDNA 为模板，采用美国 Applied Biosystems 7300 plus 实时荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 表达水平（TaKaRa 公司）。CKMT2 引物序列为：上游 5’-ACGAGGCTGGGAGTTCAT-3’，下游 5’-CACGCTTCTGGAGTCTTAGGTT-3’；Myc 引物序列为：上游 5’-GGCTTTATCTAACTCGCTGTA-3’，下游 5’-TATGGGCAAAGTTTCGTG-3’。

基金项目：浙江省基础公益研究计划项目（LQ21H200003）；浙江省医药卫生科技计划项目（2020KY1045）；台州市科技计划项目（22ywa23、21ywb52）

作者单位：318020 浙江省台州，台州市第一人民医院

通信作者：喻长法，Email：yuchangfa123@163.com

1.2.3　Western Blot　收集处理后的细胞，并提取总蛋白，蛋白浓度调整至 1 μg/μl。再用上海碧云天生物技术有限公司的试剂盒检测。相关抗体购自 Abcam 公司。

1.2.4　免疫共沉淀　在细胞处理完毕后，使用含有 1 mmol/L 的 PMSF、1%蛋白磷酸酶抑制剂混合物的 Co-IP 细胞裂解缓冲液，并在冰上裂解细胞 30 min。再将裂解液离心，收集上清液，加入 30 μl 蛋白 A/G CoIP 磁珠，4 ℃缓慢摇晃 30 min。然后收集上清液，加入兔抗 CKMT2、小鼠抗 Myc 抗体孵育，4℃缓慢摇晃孵育过夜。之后加入 30 μl 蛋白 A/G CoIP 磁珠，4 ℃缓慢摇晃 4 h，收集磁珠并用裂解缓冲液清洗 3 次，1×SDS 上样缓冲液洗脱，100 ℃加热 5 min，然后进行 Western Blot 检测。

1.3　统计方法　采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。非正态分布的计量资料以中位数（四分位间距）表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验；计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 检验；借助 Kaplan-Meier 法生成生存曲线。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CKMT2 在结直肠癌中的表达　149 例结直肠癌组织中 CKMT2 mRNA 表达水平 [3.72（1.93，8.61）]明显高于癌旁组织[1.12（0.61，1.75）]，差异有统计学意义（Z=10.421，$P < 0.05$）；CRC 细胞株中 CKMT2 mRNA 的表达水平明显高于对照细胞株（t=17.69，$P < 0.05$），见图 1。

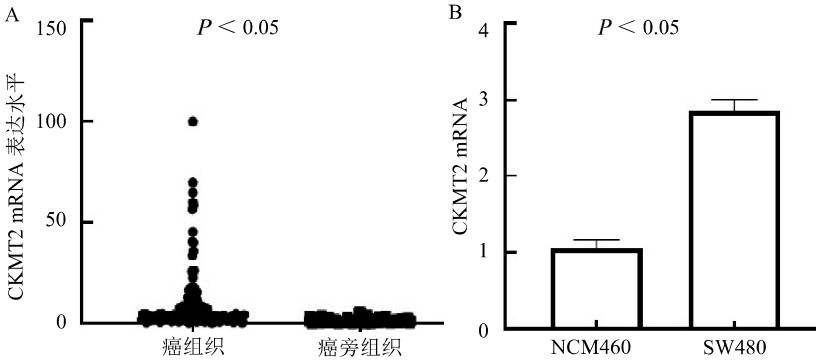
2.2　CKMT2 表达水平与 CRC 患者临床病理特征的关系　根据 CKMT2 表达水平是否高于表达中位数，分为≤中位数组和＞中位数组。两组年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度和 TNM 分期差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），见表 1。

2.3　CKMT2 与结直肠癌患者生存结局的关系　对纳入患者进行随访，随访截止时间为 2023 年 6 月 30 日，根据中位数将 CKMT2 分为＞中位数组和＜中位数组，用 Kaplan-Meier 方法生成生存曲线。结果显示 CKMT2 ＞中位数组与＜中位数组比较，总体生存率明显降低（$P < 0.05$），见图 2。

2.4　CKMT2 正向调控 Myc 的表达　通过使用 qRT-PCR 技术对来自 25 例 CRC 患者的临床组织样本进行研究，发现结直肠癌组织 Myc 基因表达量 [14.56（4.06，52.72）] 明显高于周围正常组织 [1.30（0.25，3.47）]，差异有统计学意义（Z=4.084，$P < 0.05$），见图 3A。Spearman 相关性分析揭示出，CRC 组织中 CKMT2 的表达水平与 Myc 表达水平呈正相关（r=0.478，$P < 0.05$），见图 3B。

2.5　细胞转染　结直肠癌细胞株 SW480 转染 siCKMT2 后，qRT-PCR 法检测 siCKMT2 转染效果，结果发现 siCKMT2 组的 CKMT2 mRNA 表达水平明显低于 NC 组（t=5.011，$P < 0.05$），表明 siCKMT2 转染有效。在此基础上检测 siCKMT2 组和对照组 Myc 的表达水平，结果发现 siCKMT2 组 Myc 的表达水平明显低于对照组，差异有统计学意义（t=4.520，$P < 0.05$），见图 4A。Western blot 显示，Myc 蛋白在转染 siCKMT2 后也显著下调，见图 4B。

2.6　免疫共沉淀结果　在 SW480 细胞内，可以从 CKMT2 的免疫沉淀产物中检测到 Myc 蛋白，同时也可以在 Myc 的免疫沉淀产物中发现 CKMT2 蛋



注：A 为肿瘤组织和癌旁组织中 CKMT2 mRNA 的表达；B 为 NCM460、SW480 细胞系的 CKMT2 mRNA 的表达

图 1　CKMT2 在 CRC 中的表达

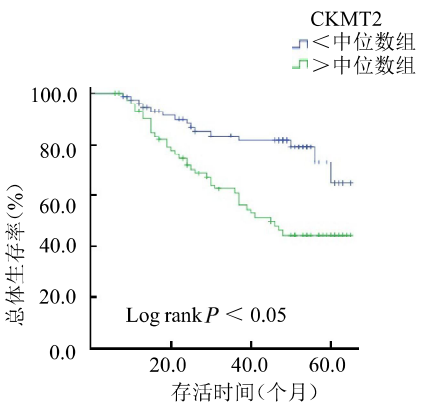


图 2　CKMT2 不同表达水平患者总体生存率比较

Modern Practical Medicine, February 2024, Vol. 36, No. 2

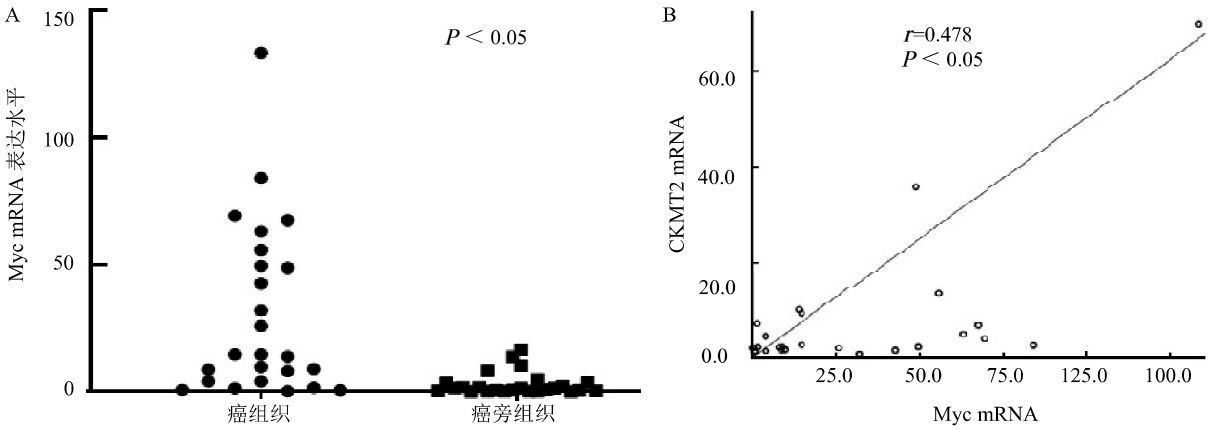
白。对于 IgG 的免疫沉淀产物，无论是 CKMT2 还是 Myc 都无法被检出，见图 5。

表 1　不同 CKMT2 水平患者的临床特征　例

指标	≤中位数组	＞中位数组	χ^2 值	P 值
年龄（岁）			3.119	＞ 0.05
＞ 65	53	42		
≤65	22	32		
性别			0.548	＞ 0.05
男	49	44		
女	26	30		
部位			0.829	＞ 0.05
左半结肠	14	17		
右半结肠	12	14		
直肠	49	43		
病理			0.927	＞ 0.05
腺癌	71	67		
黏液癌	4	7		
分化程度			4.173	＞ 0.05
高分化	6	5		
中分化	64	56		
低分化	5	13		
TNM 分期			3.720	＞ 0.05
I 期	44	34		
II 期	17	19		
III 期	13	17		
IV 期	1	4		

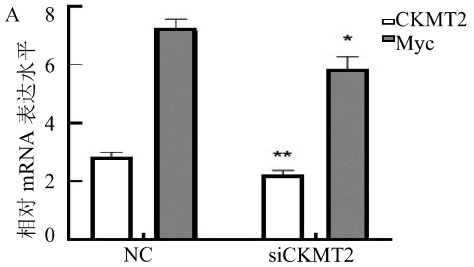
3　讨论

CKMT2 基因位于人类染色体 5q13.3，是一种线粒体肌酸激酶，广泛分布于细胞线粒体内膜和外膜间隙，主要参与细胞内能量转运、肌肉收缩、丙酮酸代谢、三磷酸腺苷合成等生物学过程[7]。Wang 等[8]鉴定了骨肉瘤中 3 856 个差异表达基因和 250 个显著表达的 microRNAs，发现 CKMT2 与抑癌基因 p53、表皮生长因子受体（EGFR）、基质金属蛋白酶（MMP）等相关，通过调控血管生成、迁移和侵袭参与骨肉瘤的生长发育。Ye 等[9]根据癌症基因组图谱（TCGA）407 个样本和（GEO）数据库 433 个样本的数据，构建了包含 CKMT2 在内的 13 个代谢相关基因的预后模型，用于胃腺癌（STAD）的预后预测。有学者研究了 CKMT2 在 18 例结直肠癌患者中的表达，通过二维液相色谱-质谱联用分析、Western Blot、免疫组化分析验证了 CKMT2 在结直肠癌中的高表达[10]。本研究通过使用 qRT-PCR 技术对来自 149 例 CRC 组织的标本进行数据分析，发现癌组织 CKMT2 mRNA 表达水平明显高于癌旁组织（P ＜ 0.05）；且



注：A 为结直肠癌患者癌组织及癌旁组织中 Myc 的差异表达；B 为结直肠癌组织中 CKMT2 的表达水平与 Myc 表达水平的相关性

图 3　结直肠癌患者 Myc 表达水平及其与 CKMT2 表达水平的相关性



注：A 为 siCKMT2 组、NC 组 CKMT2 mRNA 及 Myc mRNA 表达水平改变，*P ＜ 0.05，**P ＜ 0.01；B 为 siCKMT2 组和 NC 组 Myc 蛋白表达水平比较

图 4　SW480 细胞株转染 siCKMT2 后 Myc 表达水平

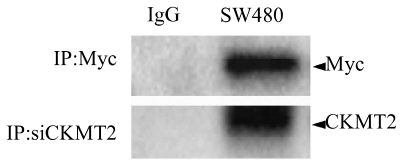


图 5　免疫共沉淀方法检测 CKMT2 与 Myc 的结合情况

研究发现CKMT2 高水平组的总体生存率明显降低（$P < 0.05$），说明 CKMT2 与患者生存结局有关，能提示 CRC 患者预后。

原癌基因 Myc 编码一个转录因子家族，是人类肿瘤中最常见的活化癌蛋白之一。在人类绝大多数癌症中都会发生 Myc 异常或者与 Myc 途径相关的上调机制。Myc 蛋白是细胞程序的主要调节因子，在肿瘤相关的多种生物学功能中发挥调控作用[11-12]。常琳[13]研究发现，LINC00941 通过影响 miR-205-5p 的表达，正向调控 Myc 的表达，从而促进结肠肿瘤的发生和进展。Jing 等[14]的研究发现，凝缩蛋白复合物 II 亚基 D3（NCAPD3）通过上调 c-Myc 的水平，并与 c-Myc 相互作用，增强了细胞的有氧糖酵解（Warburg 效应），从而影响结直肠癌的发生发展。本研究发现，CKMT2 表达水平与 Myc 表达水平呈正相关（r=0.478，$P < 0.05$）；转染 siCKMT2 后，qRT-PCR 和 Western blot 检测发现 CRC 细胞株中 Myc mRNA 和 Myc 蛋白水平均下降，提示 CKMT2 正向调控 Myc。本研究还采用免疫共沉淀方法验证了 CKMT2 与 Myc 之间的相互作用关系，进一步证实了 CKMT2 通过 Myc 调控结直肠癌的可能机制。

综上所述，本研究揭示了 CKMT2 在 CRC 组织和细胞系中的表达水平均升高，高水平的 CKMT2 可能预示患者的不良预后，CKMT2 可能通过促进 Myc 对结直肠癌的发生和进展起到调控作用。CKMT2 可能成为一个新的生物标志物和治疗靶点。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　刘炳辉：实验操作；蔡莎莎、喻长法：论文撰写、经费支持；段达荣、廖南生：数据整理、统计学分析；陈文晓：研究指导、论文修改

参　考　文　献

[1] 陈科全,叶展晖,许研,等. TPARM 对人结直肠癌细胞株 SW480 增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(6):1393-1399.

[2] SIEGEL R L, WAGLE N S, CERCEK A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023,73(3):233-254.

[3] 朱文鹏,余浩,程甜甜,等. 中国 2009-2019 年结直肠癌死亡趋势分析[J]. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）学报,2022,43(6):454-458.

[4] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021,134(7):783-791.

[5] 蓝瑞隆,黄菲,陈瑞庆,等. 线粒体肌酸激酶 1 对人鼻咽癌细胞株 CNE-1 顺铂敏感性的作用研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,53(7):524-529.

[6] PARK N, MARQUEZ J, GARCIA M V F, et al. Phosphorylation in Novel Mitochondrial Creatine Kinase Tyrosine Residues Render Cardioprotection against Hypoxia/Reoxygenation Injury[J]. J Lipid Atheroscler, 2021,10(2):223-239.

[7] 刘金华. 基于二维液相色谱-质谱技术的结直肠癌中 CKMT2 的表达及生物信息学分析[D]. 长春:吉林大学,2022.

[8] WANG H, TANG M, OU L, et al. Biological analysis of cancer specific microRNAs on function modeling in osteosarcoma[J]. Sci Rep, 2017,7(1):5382-5388.

[9] YE Z, ZHENG M, ZENG Y, et al. A 13-Gene Metabolic prognostic signature is associated with clinical and immune features in stomach adenocarcinoma[J]. Front Oncol, 2021,11:612952.

[10] 刘金华,于晟曼,薛菲,等. CKMT2 在结直肠癌中的表达及意义[J]. 中国实验诊断学,2022,26(12):1811-1813.

[11] 刘天玥,韩晨颖,胡尘辰,等. 干扰 IGF2BP2 下调 MYC 表达抑制结直肠癌细胞增殖、迁移并促进肿瘤免疫[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2023,39(4):303-310.

[12] DHANASEKARAN R, DEUTZMANN A, MAHAUAD-FERNANDEZ W D, et al. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion[J]. Nat Rev Clin Oncol,2022,19(1):23-36.

[13] 常琳. LncRNA LINC00941 对结肠癌细胞生物学行为的影响及分子机制的研究[D]. 郑州:郑州大学,2021.

[14] JING Z, LIU Q, HE X, et al. NCAPD3 enhances Warburg effect through c-myc and E2F1 and promotes the occurrence and progression of colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022,41(1):198.

收稿日期：2023-09-14

（本文编辑：吴迪汉）