

· 基础研究 ·

# ANKRD1 通过介导上皮细胞间充质转化促进肝细胞肝癌增殖与转移

朱德明,孔连宝,贾文博,夏金国\*

南京医科大学第一附属医院肝胆中心,中国医学科学院肝移植重点实验室,国家卫生健康委员会活体供肝移植重点实验室,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探究 ANKRD1 在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达情况,研究 ANKRD1 促进 HCC 细胞增殖和转移的功能及其机制。方法:通过实时定量 RT-PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)与 Western blot 检测 ANKRD1 在肝细胞肝癌及癌旁组织中的相对表达量,临床病理学分析 ANKRD1 表达与 HCC 患者临床特征的相关性。利用慢病毒感染将肝癌细胞系中的 ANKRD1 敲低或过表达,通过 CCK-8、划痕、Transwell、EdU 以及裸鼠皮下成瘤实验在体内体外检测 ANKRD1 对肝癌细胞增殖与迁移功能的影响。Western blot 技术检测 ANKRD1 对 HCC 细胞上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的调控作用。结果:ANKRD1 在肝癌细胞中表达明显上调,过表达 ANKRD1 可以促进肝癌细胞增殖、迁移、侵袭,而 ANKRD1 敲低则会抑制肝癌细胞的增殖与迁移,Western blot 与皮下瘤免疫组化实验表明 ANKRD1 可以促进 HCC 细胞 EMT 通路激活。结论:ANKRD1 在肝癌细胞中表达上调并通过调控 EMT 通路促进 HCC 细胞增殖与迁移,有望成为肝癌治疗的新靶点。

**[关键词]** ANKRD1;肝细胞肝癌;上皮细胞-间充质转化**[中图分类号]** R735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)04-484-08**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230406

## ANKRD1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating epithelial mesenchymal transition pathway

ZHU Deming, KONG Lianbao, JIA Wenbo, XIA Jinguo\*

*Hepatobiliary Centre, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Key Laboratory of Liver Transplantation, Chinese Academy of Medical Sciences, National Health Commission (NHC) Key Laboratory of Living Donor Liver Transplantation, Nanjing 210029, China*

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to explore the expression of ANKRD1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and investigate the function and mechanism of ANKRD1 in promoting the proliferation and metastasis of HCC. **Methods:** The relative expression of ANKRD1 in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues was detected by RT-qPCR and Western blot. Clinicopathological analysis was used to assess the association of ANKRD1 with the clinical feature of HCC patients. ANKRD1 was knocked down or overexpressed in HCC cell lines by lentiviral infection. The effects of ANKRD1 on the proliferation and migration of HCC cells were detected by CCK-8 assay, wound healing assay, transwell assay, EdU assay *in vitro* and subcutaneous tumor model *in vivo*. The activity of epithelial-mesenchymal transition (EMT) pathway was examined by Western blot. **Results:** ANKRD1 was upregulated in HCC. Overexpression of ANKRD1 promoted the proliferation, migration and invasion of HCC cells, while knockdown of ANKRD1 inhibited the proliferation and migration of HCC cells. Western blot and immunohistochemical assay of subcutaneous tumor showed that ANKRD1 could activate EMT pathway. **Conclusion:** ANKRD1 is upregulated in HCC and promotes the proliferation and migration of HCC cells by regulating the EMT pathway, providing a potential therapeutic target for HCC.

**[Key words]** ANKRD1; hepatocellular carcinoma; EMT

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(04):484-491]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81871260)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: Kinglexia@163.com

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要组织学亚型,占世界范围内原发性肝癌病例数的80%。在全球癌症统计中,肝癌新发病率排名第七,死亡率排名第二<sup>[1]</sup>。肝细胞肝癌发展的诱因包括慢性改变的肝脏微环境或由肝硬化引起的遗传和表观遗传改变<sup>[2-3]</sup>。尽管肝癌的预防、诊断和干预已得到改善,但由于HCC患者缺乏早期症状,以及HCC高增殖及高转移的特性,HCC患者的总体诊疗结果仍不乐观。因此,需要进一步研究HCC发病的分子机制。

ANKRD1,也被称为心脏锚蛋白重复蛋白或心脏阿霉素应答蛋白,是人类ANKRD1基因(10q23.31)编码的蛋白。它主要表达于心脏和骨骼肌,在特发性扩张型心肌病或心力衰竭时表达增加<sup>[4-5]</sup>。对于癌症的进展,ANKRD1被证明是肿瘤抑制因子p53的共激活因子<sup>[6]</sup>,ANKRD1的过表达也与顺铂耐药和卵巢癌预后恶化相关<sup>[7]</sup>。此外,ANKRD1在非小细胞肺癌中与上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)通路和抗凋亡有关<sup>[8]</sup>。但目前ANKRD1在肝癌中的作用尚未见报道。

本研究通过实时定量PCR技术发现ANKRD1在肝癌组织中高表达。ANKRD1可以促进肝癌细胞系增殖、迁移与侵袭,同时,进一步发现ANKRD1可以介导HCC细胞EMT通路激活。综上所述,ANKRD1是一个促癌基因,并可能成为肝细胞肝癌治疗的潜在靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞系(Huh7、SMMC7721、HepG2、Hep3B、HCCLM3、Focus和YY8103)以及永生化人肝细胞LO2从中国科学院上海细胞生物研究所获得。

肝癌组织和癌旁组织标本来自南京医科大学第一附属医院肝胆中心肝切除术患者。病理检查证实为肝细胞癌组织,取出后利用液氮立即保存。本研究经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准,所有患者均签订知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养和转染

所有细胞均在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下,在含有10%胎牛血清(Gibco公司,美国)、50 U/mL青霉素链霉素(Invitrogen公司,美国)的DMEM培养基中培养。过表达ANKRD1的慢病毒、包埋针对

ANKRD1的干扰RNA(siRNA)的慢病毒均购自上海GenePharma公司。按照试剂盒说明书将慢病毒感染细胞,并使用嘌呤霉素孵育2周以建立稳定的细胞克隆。

#### 1.2.2 RT-qPCR

采用TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国)提取肝癌组织和细胞株总RNA。这些总RNA用分光光度计法(NanoDrop technologies公司,美国)进行定量。逆转录采用Prime Script RT试剂盒(大连宝生物公司)。在ABI 7900 PCR系统(ABI公司,美国)中使用SYBR Premix ExTaq II(大连宝生物公司)进行实时定量PCR。根据2<sup>-ΔΔCT</sup>方法计算相对表达量<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.3 细胞增殖实验(CCK-8法)

将细胞置于96孔板(1×10<sup>3</sup>个/孔)中培养,待测细胞中每孔加入10 μL CCK-8溶液,培养2 h,用酶标仪(Thermo Scientific公司,美国)测定450 nm处的吸光度。每天检测1次,连续检测5 d。

#### 1.2.4 平板克隆实验

500个细胞均匀铺在6孔板中孵育2周,然后用4%多聚甲醛固定细胞,用结晶紫染色液染色,计数细胞团并统计。

#### 1.2.5 划痕实验

细胞置于6孔板中培养。当细胞密度达90%时,用200 μL塑料吸管头在细胞表面划线。用倒置显微镜(Olympus公司,日本)在不同时间点(0 h和48 h)拍摄划痕,并记录细胞迁移情况。

#### 1.2.6 Transwell实验

使用Transwell小室(8 μm孔径,Corning公司,美国)检测迁移和入侵能力。在细胞迁移实验中,将2×10<sup>4</sup>个细胞重悬于200 μL无血清DMEM中并放入上室,将600 μL含10%胎牛血清DMEM放入下室。细胞侵袭实验用50 μL Matrigel胶(BD Biosciences公司,美国)铺板,细胞在5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养48 h,用棉签擦去上室细胞。下室细胞用中性福尔马林固定30 min,1%结晶紫染色。用显微镜在小室左上、左下、右上、右下以及中间5个视野进行拍照。实验独立重复3次以上。

#### 1.2.7 细胞增殖实验(Edu法)

采用Edu(广州RiboBio公司)检测ANKRD1对细胞增殖的作用。细胞均匀铺在24孔板中,Edu孵育2 h,PBS洗涤5 min后中性福尔马林固定细胞,用2 mg/mL甘氨酸中和甲醛,加入0.5% Triton X-100在摇床上摇动20 min。然后按照实验室规程进行

DAPI染色和Apollo染色。使用荧光显微镜观察并拍照。

### 1.2.8 Western blot

使用RIPA裂解组织和细胞,4℃高速离心获取蛋白原液,加入上样缓冲液并煮沸10 min,-20℃保存备用。采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质。然后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上(Bio-Rad公司,美国)。PVDF膜与特异性一抗在4℃孵育过夜。PVDF膜洗涤3次后,37℃二抗孵育2 h,用Super ECL检测试剂(上海翌圣生物科技有限公司)使蛋白条带显影。

### 1.2.9 小鼠皮下成瘤实验

所有动物实验均经南京医科大学动物管理和伦理委员会批准,40只雄性BALB/c裸鼠购自南京医科大学动物研究中心。5×10<sup>6</sup>个转染后的肝癌细胞系被注射到裸鼠的侧腹。每3 d记录1次肿瘤大小,4周后处死小鼠。肿瘤体积按长×宽<sup>2</sup>/2计算。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0和GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析。定量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用方差分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ANKRD1在肝癌组织及肝癌细胞系中表达均上调

TCGA上的数据显示,ANKRD1在肝癌组织中表达上调(图1A)。对50对肝癌/癌旁组织进行实时定量PCR,分析ANKRD1的相对表达情况,结果显示,ANKRD1在肝癌组织中表达量较癌旁组织中上调(图1B)。Western blot实验进一步证实了ANKRD1在肝癌组织中表达上调(图1C)。进一步在肝癌细胞系以及永生化肝细胞系LO2中检测ANKRD1的mRNA以及蛋白表达差异,结果发现与LO2相比,肝癌细胞系中ANKRD1的表达也普遍上调(图1D、E)。临床病理数据分析显示,ANKRD1与HCC肿瘤大小、数量、微血管浸润呈正相关(表1)。生存分析显示ANKRD1高表达患者总生存期较低表达患者缩短(图1F)。

### 2.2 过表达ANKRD1促进肝癌细胞增殖、迁移与侵袭能力

通过向Hep3B细胞系感染携带ANKRD1过表达质粒的慢病毒来构建ANKRD1稳定过表达细胞

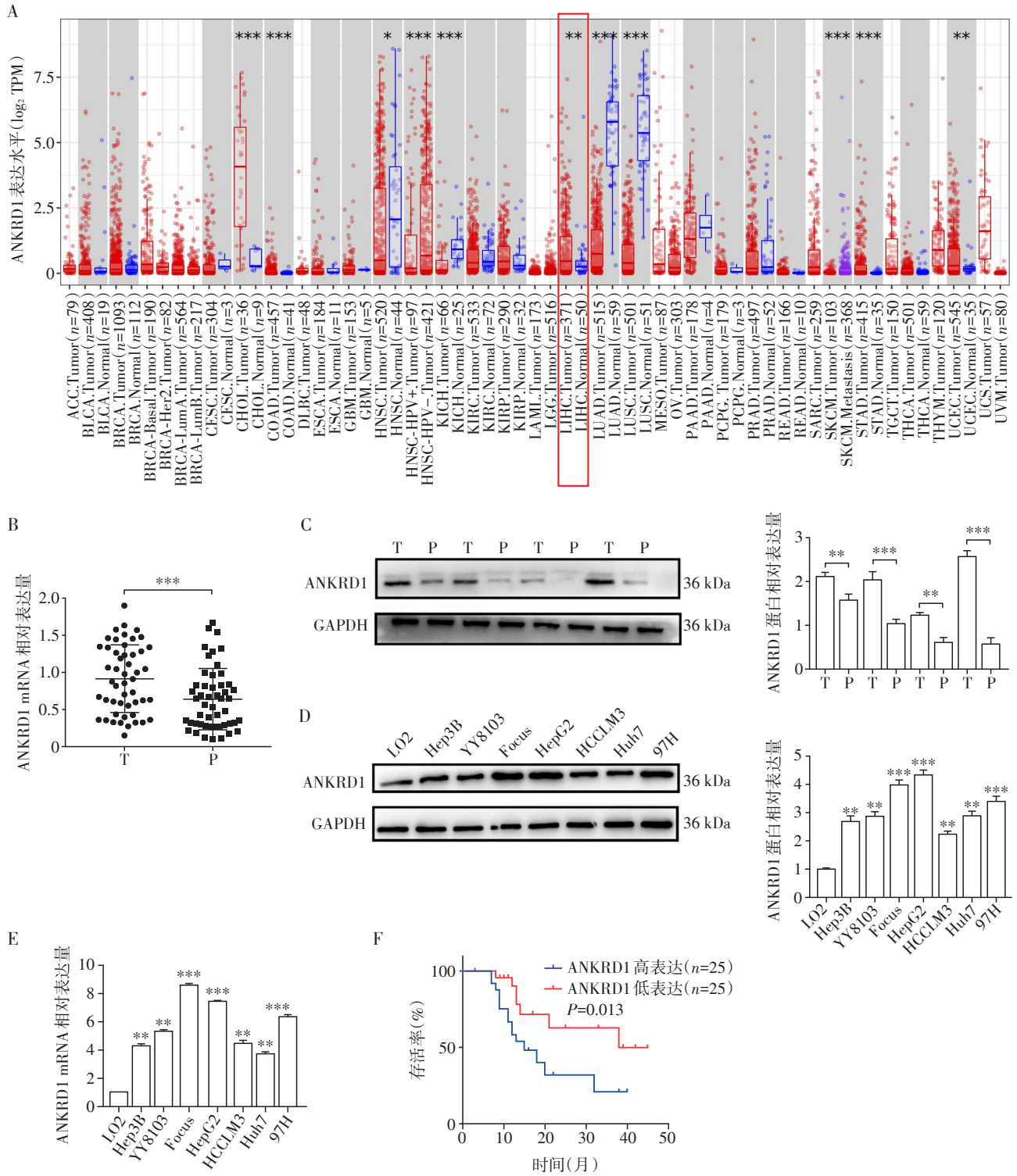
表1 ANKRD1表达与肝癌临床病理特征的关系  
Table 1 Association between ANKRD1 expression and clinical features of HCC (n)

临床参数	例数	ANKRD1表达		P值
		高表达 (n=25)	低表达 (n=25)	
年龄				0.232
>60岁	33	14	19	
≤60岁	17	11	6	
性别				0.393
女	22	13	9	
男	28	12	16	
HBV				0.377
阴性	32	18	14	
阳性	18	7	11	
肿瘤数量				0.019
单发	31	11	20	
多发	19	14	5	
肿瘤大小				0.032
≤5 cm	34	13	21	
>5 cm	16	12	4	
AFP				0.567
≤200 ng/mL	29	13	16	
>200 ng/mL	21	12	9	
TNM分期				0.377
I	32	14	18	
II~III	18	11	7	
微血管浸润				<0.001
是	19	3	16	
否	31	22	9	

系,Western blot实验验证了过表达效率(图2A)。CCK-8和EdU实验结果表明,过表达ANKRD1的细胞增殖能力明显增强(图2B、D),平板克隆实验也表明过表达ANKRD1的细胞生成的细胞团数量更多(图2C)。划痕实验表明,与对照组相比,过表达ANKRD1细胞的移动能力更强(图2E),同时,Transwell实验也表明过表达ANKRD1可以增强肝癌细胞的迁移及侵袭能力(图2F)。

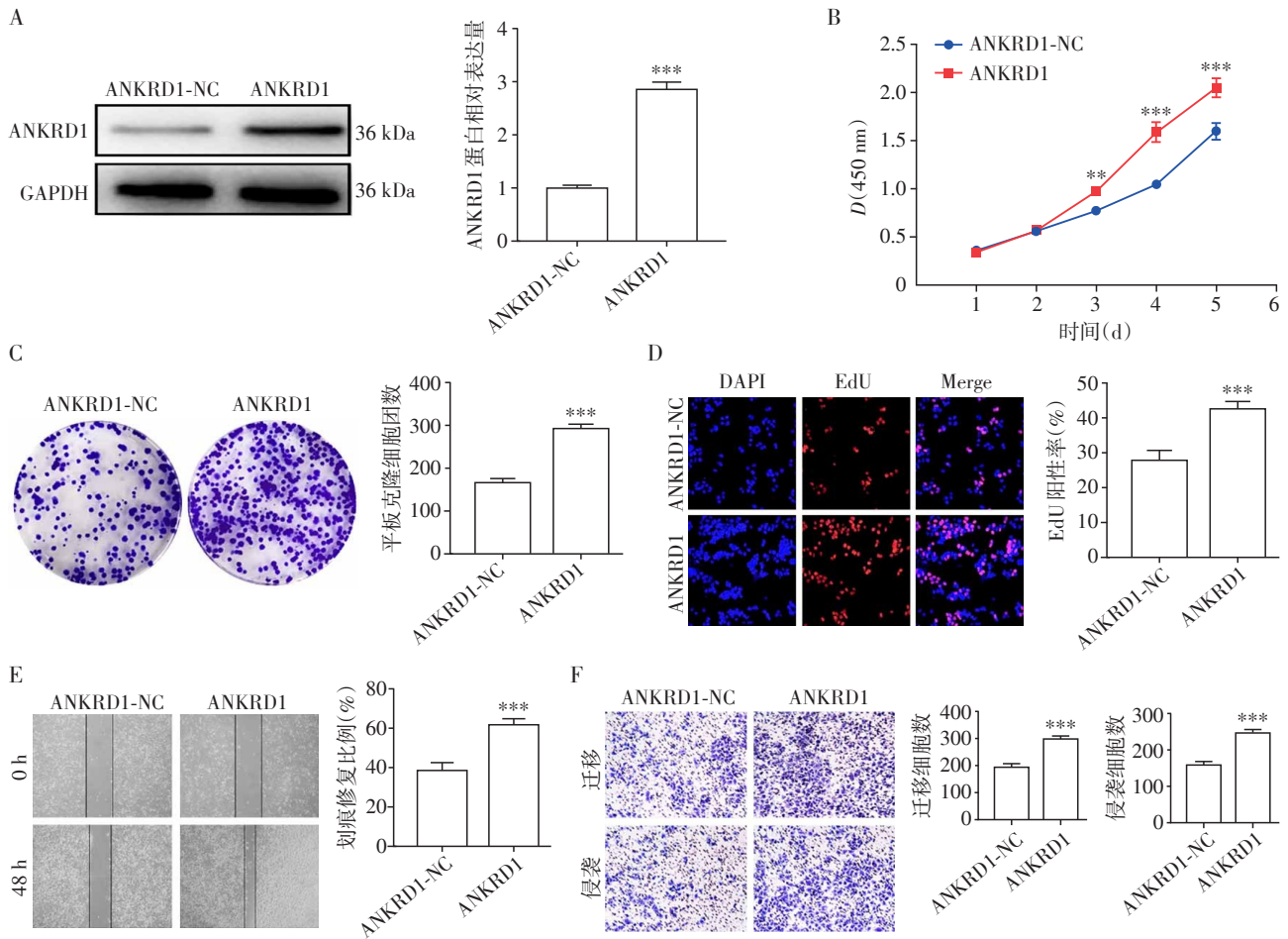
### 2.3 敲低ANKRD1可以抑制肝癌细胞的增殖与迁移能力

使用基于慢病毒的小干扰RNA来敲低肝癌细胞系Focus的ANKRD1表达量,其敲低效率通过Western blot实验来验证(图3A),结果表明si-2的敲低效率最显著并用于后续的实验研究。细胞功能实验结果表明,与对照组相比,敲低ANKRD1后,肝癌细胞的增殖能力明显减弱(图3B~D),肝癌细胞



A:TCGA数据库中ANKRD1在不同肿瘤组织与正常组织中表达情况(肝癌组织与正常肝组织用红框标记);B:PCR检测50对肝癌/癌旁组织中ANKRD1的相对表达情况(T:肝癌组织,P:癌旁组织,两组比较,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=50$ );C:Western blot检测ANKRD1在肝癌以及癌旁组织中的表达量(T:肝癌组织,P:癌旁组织,两组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=3$ );D:Western blot检测ANKRD1在肝癌细胞系中的表达情况(与LO2组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=3$ );E:PCR检测ANKRD1 mRNA在肝癌细胞系以及永生化的肝细胞系LO2中的相对表达情况(与LO2组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=3$ );F:ANKRD1相对高表达与低表达HCC患者总生存曲线( $n=25$ )。

图1 ANKRD1在肝癌组织中表达上调  
Figure 1 ANKRD1 was upregulated in HCC tissues



A: HCCLM3细胞过表达ANKRD1后Western blot检测过表达效率;B:CCK-8实验检测过表达ANKRD1后细胞增殖能力的变化;C:平板克隆实验表明,过表达ANKRD1后的肝癌细胞系形成了更多的克隆细胞团数;D:EdU实验用来探究过表达ANKRD1对肿瘤细胞增殖能力的影响;E:划痕实验表明过表达ANKRD1后肝癌细胞具有更强的迁移能力;F:Transwell实验表明,过表达ANKRD1促进肝癌细胞的迁移与侵袭能力。与ANKRD1-NC组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=3$ 。

图2 过表达ANKRD1可以促进肝癌细胞增殖、迁移与侵袭

Figure 2 ANKRD1 overexpression promoted the proliferation, migration and invasion of HCC cells

的迁移与侵袭能力也明显下降(图3E、F)。

#### 2.4 ANKRD1介导HCC细胞EMT通路激活并促进肝癌细胞在体内的生长

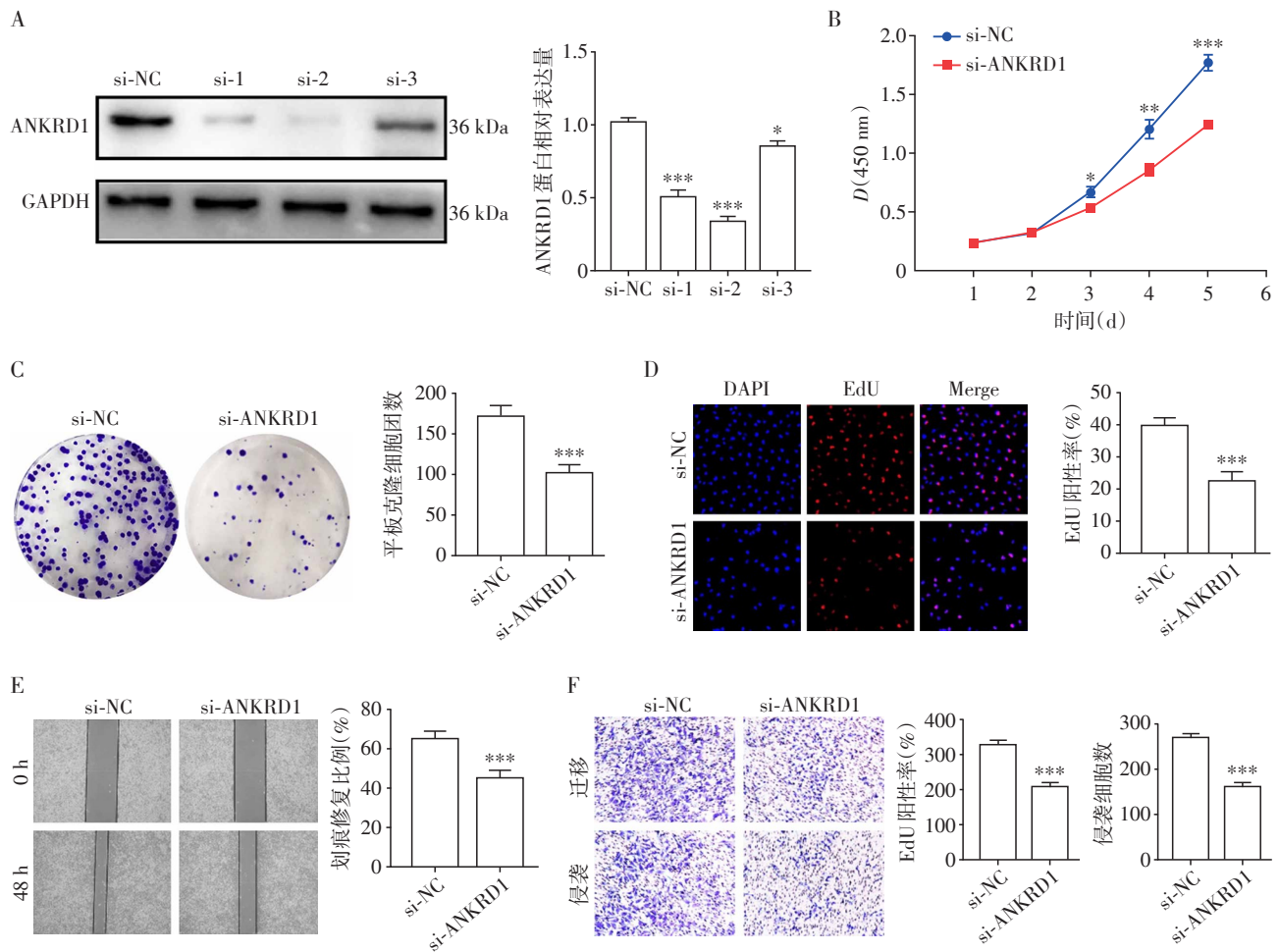
既往研究表明,EMT通路可以促进肿瘤细胞的迁移与侵袭能力<sup>[10]</sup>,本研究发现ANKRD1可以促进肝癌细胞的迁移与侵袭能力,为了进一步探究ANKRD1对肝癌细胞迁移能力影响的机制,我们通过Western blot实验检测了ANKRD1过表达与敲低后EMT相关蛋白的表达情况,发现过表达ANKRD1后,Vimentin蛋白与N-cadherin蛋白表达上调,而E-cadherin蛋白则表达下调,敲低ANKRD1后结果相反(图4A),这表明,ANKRD1可以介导EMT通路激活。

进一步通过皮下成瘤实验探究ANKRD1对肝癌细胞在体内生长的影响,发现与对照组相比,过

表达ANKRD1可以促进皮下瘤的生长,ANKRD1敲低则会抑制皮下瘤的生长(图4B~E)。同时,免疫组化实验也表明过表达ANKRD1后Ki-67阳性率升高,而敲低ANKRD1后结果相反,过表达ANKRD1会抑制HCC细胞E-cadherin的表达,促进Vimentin的表达,ANKRD1敲低则结果相反(图4C)。以上表明,ANKRD1可以促进肝癌细胞在体内的生长并促进EMT通路的蛋白表达。

### 3 讨论

虽然目前医疗发展迅速,但HCC的生存率仍然较低。因此,探究HCC的发生发展的病理机制,寻找肝癌治疗的新靶点一直是研究的重点。ANKRD1是一种公认的转录因子,在肌肉发育、信号转导、损伤、炎症和细胞应激反应中发挥作用<sup>[11]</sup>。近年来



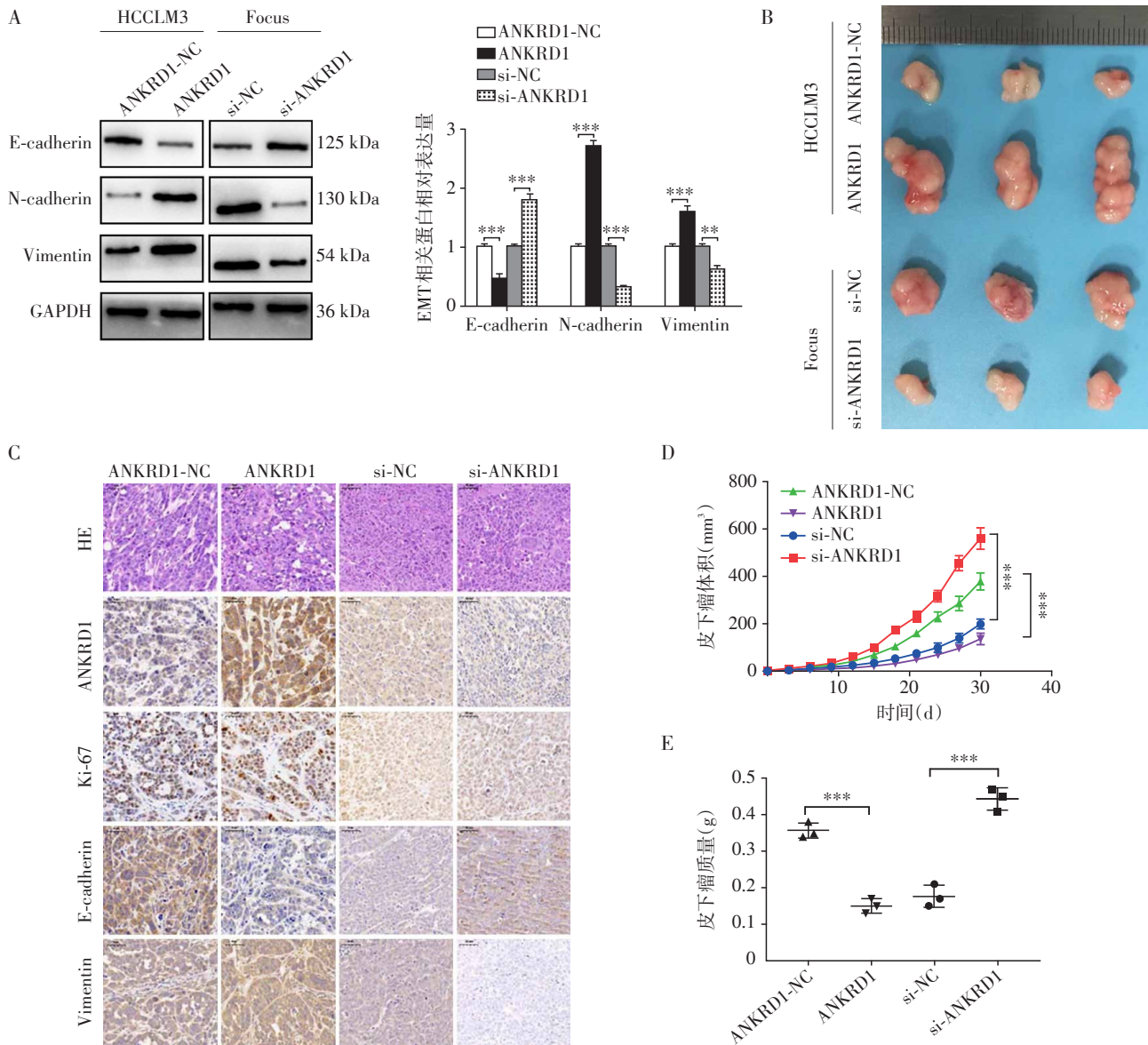
A: Western blot 检测 ANKRD1 在 3 个干扰 RNA 转染下的敲低效率; B: CCK-8 实验证明敲低 ANKRD1 可以抑制肝癌细胞增殖; C: 平板克隆实验表明敲低 ANKRD1 后细胞团数明显减少; D: EdU 实验表明, 敲低 ANKRD1 后, 处于增殖期的细胞比例明显降低; E: 划痕实验表明敲低 ANKRD1 后细胞移动能力降低; F: Transwell 实验表明, 敲低 ANKRD1 后抑制了肝癌细胞的迁移与侵袭能力。与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图3 敲低 ANKRD1 可以抑制肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭

Figure 3 ANKRD1 knockdown inhibited the proliferation, migration and invasion of HCC cells

ANKRD1在肿瘤中的作用越来越受到重视,Kojic等<sup>[6]</sup>发现 ANKRD1 是肿瘤抑制因子 p53 的共激活因子, ANKRD1 的过表达也与顺铂耐药和卵巢癌预后恶化相关<sup>[7]</sup>。Lei 等<sup>[12]</sup>发现了 ANKRD1 在卵巢细胞中作为顺铂敏感性调节因子的新作用,改变 ANKRD1 的表达可调节培养细胞对顺铂的敏感性,并发现 ANKRD1 高表达与浆液性卵巢癌患者的生存期较差相关。ANKRD1 是 TGF- $\beta$ /Wnt 信号通路作用的靶标<sup>[13]</sup>,并上调 p21<sup>WAF1/cip1</sup><sup>[14]</sup>。它也是基于肌联蛋白的信号转导复合物的组成部分<sup>[15]</sup>,肌联蛋白已被确定为携带癌症相关“驱动”突变的候选基因<sup>[16]</sup>。Takahashi 等<sup>[8]</sup>在对肺腺癌的研究中发现过表达的 ANKRD1 与 EMT 通路和抗凋亡有关,并且在第二代和第三代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑

制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)耐药细胞的 mRNA 和蛋白表达水平上过度表达。在 EGFR-TKI 耐药细胞株中沉默 ANKRD1 后,阿法替尼和奥西替尼可诱导细胞株凋亡。伊马替尼可抑制 ANKRD1 的表达,使 EGFR-TKI 耐药细胞对阿法替尼和奥西替尼的敏感性恢复。在 EGFR 突变型非小细胞肺癌患者中,在 EGFR-TKI 治疗失败后,特别是长期 EGFR-TKI 治疗后,ANKRD1 在肿瘤中过度表达。这表明 ANKRD1 抑制对 EGFR 突变型非小细胞肺癌患者可能是一种有前途的治疗策略。Obara 等<sup>[17]</sup>发现 ANKRD1 是一个依赖 ERK5 和 ERK1/2 的独立基因,它在 ERK 的调控下,通过抑制酪氨酸激酶的泛素化参与调控嗜铬细胞瘤的增殖、分化和基因表达。但目前其在 HCC



A: Western blot 检测敲低与过表达 ANKRD1 后 EMT 通路相关蛋白的表达情况; B: 敲低与过表达 ANKRD1 后细胞的皮下成瘤照片; C: 4 组皮下瘤 HE、ANKRD1、Ki-67、E-cadherin 和 Vimentin 免疫组化染色; D: 裸鼠皮下瘤生长曲线; E: 4 组皮下瘤质量。两组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图 4 ANKRD1 可以调控 EMT 通路并促进肝癌细胞在体内的生长

Figure 4 ANKRD1 regulated EMT pathway and promoted the proliferation of HCC cells *in vivo*

中的作用尚未被研究。

本研究通过数据库比对以及 RT-qPCR 检测 50 对临床肝癌/癌旁样本发现, ANKRD1 在肝癌组织中高表达, 且与肝癌的不良预后相关。本研究通过慢病毒转染技术将 ANKRD1 在肝癌细胞系中过表达以及敲低, 通过一系列体内体外实验, 发现 ANKRD1 可以促进肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭。考虑到 ANKRD1 在细胞迁移中的作用, 进一步检测了其 EMT 通路的关系, EMT 是上皮细胞向间充质表型细胞的形态转化, 在肿瘤细胞转移中起重

要作用<sup>[18-20]</sup>, Western blot 实验以及皮下瘤免疫组化表明过表达 ANKRD1 可以促进 Vimentin 蛋白与 N-cadherin 蛋白的表达, 但会抑制 E-cadherin 蛋白的表达, 敲低 ANKRD1 后结果相反, 这表明, ANKRD1 可能是通过调控 EMT 通路来促进肝癌细胞的增殖与迁移能力。

本研究结合临床数据、基础实验以及数据库挖掘, 从多方面揭示了 ANKRD1 与 HCC 患者预后及临床数据的相关性, 首次证明了 ANKRD1 可以促进肝癌细胞的增殖与转移, 结合既往研究, 初步探究了

ANKRD1在肝癌细胞中对EMT通路的调控作用。但是,本研究仍存在样本量小的局限性,需要在更大的样本量中进行验证。此外,还需要进一步研究ANKRD1如何激活EMT通路,以及ANKRD1在肝癌耐药性中的调节作用。总之,本研究初步证明了ANKRD1是肝细胞肝癌的一个促癌基因,为肝细胞肝癌的诊断和治疗提供了一个潜在的新靶点。

[参考文献]

- [1] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2018, 156(2):477-491
- [2] GARRIDO A, DJOUDER N. Cirrhosis: a questioned risk factor for hepatocellular carcinoma [J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(1):29-36
- [3] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN S L, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):745-761
- [4] ISHIGURO N, MOTOI T, ARAKI N, et al. Expression of cardiac ankyrin repeat protein, CARP, in malignant tumors: diagnostic use of CARP protein immunostaining in rhabdomyosarcoma [J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(11):1673-1679
- [5] BOGOMOLOVAS J, BROHM K, ČELUTKIENĖ J, et al. Induction of Ankrd1 in dilated cardiomyopathy correlates with the heart failure progression [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:273936
- [6] KOJIC S, NESTOROVIC A, RAKICEVIC L, et al. A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 502(1):60-67
- [7] SCURR L L, GUMINSKI A D, CHIEW Y E, et al. Ankyrin repeat domain 1, ANKRD1, a novel determinant of cisplatin sensitivity expressed in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):6924-6932
- [8] TAKAHASHI A, SEIKE M, CHIBA M K, et al. Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to afatinib and osimertinib in EGFR-mutant lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):14896
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method [J]. *Methods San Diego Calif*, 2001, 25(4):402-408
- [10] ZHANG Y, WEINBERG R A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities [J]. *Front Med*, 2018, 12(4):361-373
- [11] HUI B Q, JI H, XU Y T, et al. RREB1-induced upregulation of the lncRNA AGAP2-AS1 regulates the proliferation and migration of pancreatic cancer partly through suppressing ANKRD1 and ANGPTL4 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3):207
- [12] LEI Y, HENDERSON B R, EMMANUEL C, et al. Inhibition of ANKRD1 sensitizes human ovarian cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(4):485-495
- [13] ETIENNE L, LISA L, AINHOA L, et al. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1):75-84
- [14] LAURE L, SUEL L, ROUDAUT C, et al. Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling [J]. *FEBS J*, 2009, 276(3):669-684
- [15] MILLER M K, BANG M L, WITT C C, et al. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ANKRD2/ARPP and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules [J]. *J Mol Biol*, 2003, 333(5):951-964
- [16] NG P K, LI J, JEONG K J, et al. Systematic functional annotation of somatic mutations in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):450-462
- [17] OBARA Y, NAGASAWA R, NEMOTO W, et al. ERK5 induces ankrd1 for catecholamine biosynthesis and homeostasis in adrenal medullary cells [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(3):177-189
- [18] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3):212-226
- [19] ANUSHKA D, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2):69-84
- [20] 顾俊杰,朱彩强,朱作佳,等. DJ-1通过促进EMT进程增强辐照诱导下食管鳞癌细胞的侵袭性 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(8):1085-1090

[收稿日期] 2022-07-28

(责任编辑:蒋莉)