

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.008

PRMT5 在结直肠癌中的表达及其对 结直肠癌细胞增殖能力的影响

吴晓斌, 王双双, 唐福婷

(南京中医药大学附属医院病理科, 南京 210029)

[摘要] 目的: 检测结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中蛋白质精氨酸甲基转移酶-5(protein arginine methyltransferase 5, PRMT5)的表达, 探讨其表达与临床病理参数的关系, 并观察PRMT5表达敲低后对CRC细胞增殖能力的影响。方法: 采用免疫组织化学的方法检测53例CRC肿瘤组织及18例癌旁正常组织中PRMT5的表达情况; 利用特异siRNA分别敲低CRC细胞系HCT116和SW620细胞中PRMT5表达后, 采用CCK-8试验检测PRMT5敲低后HCT116和SW620细胞增殖能力的改变; 利用流式细胞术检测PRMT5敲低后HCT116和SW620细胞的周期变化情况。结果: PRMT5在CRC中的表达阳性率为88.68%, 显著高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。PRMT5在CRC组织中的表达与患者性别、年龄、淋巴结转移、远端转移等无关($P > 0.05$), 但与肿瘤分化程度密切相关($P < 0.05$); 敲低PRMT5表达后, HCT116和SW620细胞的增殖能力显著降低($P < 0.01$)。并且, 敲低PRMT5表达会导致HCT116和SW620细胞被阻滞在 G_0/G_1 期($P < 0.01$)。结论: 与癌旁正常组织相比, PRMT5在CRC肿瘤组织中表达显著上升, 敲低PRMT5表达会抑制CRC细胞增殖, 表明PRMT5可能在促进CRC细胞生长和癌症演变进程中发挥重要作用。

[关键词] 结直肠癌; 蛋白质精氨酸甲基转移酶-5; 增殖

Expression of PRMT5 in colorectal cancer and its effect on colorectal cancer cells proliferation

WU Xiaobin, WANG Shuangshuang, TANG Futing

(Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) in colorectal cancer and normal tissues and the relationship between the clinical characteristics and the expression of PRMT5, and to investigate the proliferation of colorectal cancer cells when PRMT5 was knocked down. **Methods:** Expression of PRMT5 in colorectal cancer and normal tissues was detected by immunohistochemical staining. PRMT5 were knocked down by small interfering RNA (siRNA). The proliferation of HCT116 and SW620 cells was evaluated

收稿日期 (Date of reception): 2018-08-28

通信作者 (Corresponding author): 吴晓斌, Email: wuxbin2000@163.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省高校优势学科建设工程 (012062003010)。This work was supported by the Jiangsu Provincial Colleges and Universities Advantage Subject Construction Project, China (012062003010).

by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The changes of cell cycle of HCT116 and SW620 cells were detected by flow cytometry when PRMT5 was knocked down. **Results:** The positive expression rate of PRMT5 in colorectal cancer tissues was 88.68%, which was higher than that in normal colorectal tissues ($P < 0.01$). The expression of PRMT5 was associated with differentiation ($P < 0.05$), but not with the gender, age, lymph node metastasis and distant metastasis etc. ($P > 0.05$). The proliferation of HCT116 and SW620 cells were significantly inhibited when PRMT5 was knocked down by siRNA ($P < 0.01$). The HCT116 and SW620 cells were arrested in G_0/G_1 phase when PRMT5 was knocked down ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of PRMT5 in colorectal cancer was significantly increased in comparison with normal tissues, and it may play important roles in promoting cell proliferation and the evolution of colorectal cancer.

Keywords colorectal cancer; protein arginine methyltransferase 5; proliferation

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率居全球第3位,病死率居全球第5位^[1]。随着经济发展和生活方式及饮食习惯的改变,我国CRC的发病率和病死率呈逐年上升的趋势,上升速度远远超过国际水平,严重危害国民身体健康,也给患者家庭和社会造成了沉重的经济负担^[2]。且大多数CRC患者在确诊时通常已处在疾病晚期。癌胚抗原(CEA)和糖类抗原(CA19-9)是当前CRC的临床诊断中常用的肿瘤标志物,但这些标志物的敏感性和特异性不理想,因此有必要继续寻找新的肿瘤标志物。蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferase, PRMT)是一类具有甲基转移酶活性的酶,有着非常广泛的生物学功能。PRMT5是PRMT家族中的重要成员之一,主要负责催化蛋白质底物精氨酸残基进行对称性双甲基化。PRMT5在不同的细胞中发挥着广泛的生物学功能,如转录调控、干细胞分化、翻译调控、染色质重塑、信号传递、肿瘤演化、生殖细胞发育等^[3-5]。本研究通过检测CRC标本中PRMT5蛋白的表达,探讨其与CRC临床病理参数的关系及临床意义,并在细胞水平观察PRMT5敲低后对CRC细胞增殖和细胞周期的影响,旨在为CRC的临床治疗提供新的肿瘤标志物和理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

收集江苏省中医院2017年1月至2018年6月CRC手术切除并经HE染色明确诊断的标本53例,其男33例,女20例;高分化肿瘤15例,中分化肿瘤24例,低分化肿瘤14例。本研究已获得江苏

省中医院医学伦理委员会批准。收集的标本均有完整的病理资料,且术前未经放、化疗及药物治疗。所有手术切除标本均经过标准处理程序,经过4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片后进行免疫组织化学染色分析。

1.2 试剂

McCOY's 5A和L-15培养基以及胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;PRMT5的siRNA(包括阴性对照)购自上海吉玛制药技术有限公司;转染试剂脂质体2000购自美国Invitrogen公司;cDNA反转录及RT-PCR检测试剂盒购自瑞士Roche公司;CCK-8增殖检测试剂盒购自南京诺维赞公司;免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PRMT5和GAPDH抗体购自于美国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色及结果判定

根据试剂盒说明书进行免疫组织化学染色,步骤如下:将组织切片依次进行二甲苯脱蜡和乙醇梯度脱水(100%, 80%, 60%);将切片放入0.1%枸橼酸溶液中煮沸15 min进行抗原修复;使用山羊血清稀释液室温封闭20 min;一抗孵育1~2 h, PBS洗涤4次,每次10 min;二抗孵育30 min, PBS洗涤4次,每次10 min;然后进行DAB显色和苏木精复染;乙醇梯度入水,二甲苯透明,滴加中性树脂封片。

免疫组织化学结果判定采用染色强度和着色百分比相结合的评估方法。染色强度:0代表阴性,1代表染色弱,2代表染色中,3代表染色强;染色百分比:0%~20%为0分,21%~40%为1分,41%~60%为2分,61%~80%为3分,81%~100%为

4分。二者相乘为最终评定结果, 阴性(0~1分)、弱阳(2~4分)、中阳(6~8分), 强阳(9~12分)。每张切片由2位经验丰富的病理科专家核实。

1.3.2 siRNA 转染

根据说明书建议, 将合成的siRNA及阴性对照冻干粉使用无RNA酶水进行稀释, 母液浓度为25 $\mu\text{mol/L}$ 。转染前1 d, 将生长状态良好的细胞接种到6孔板中, 待细胞覆盖率为40%~60%时, 行siRNA转染。准备2个无菌1.5 mL的EP管, 分别加入100 μL 无血清培养基, 其中1个EP管加入5 μL 脂质体2000转染试剂, 轻轻混匀, 另一个EP管中加入10 μL 的siRNA母液, 然后将2个EP管混合在一起, 室温静置15 min后将转染混合液轻轻滴加到6孔板中, 转染终浓度为100 nmol/L。转染4~6 h后换液并置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中正常培养。

1.3.3 CCK-8 试验

将CRC细胞分为阴性对照组(siRNA control)和PRMT5表达敲低组(siRNA PRMT5, 序列为: GCACCAGUCUGUUCUGCUA)。将转染siRNA PRMT5和siRNA control的CRC细胞分别接种于96孔板中, 接种密度为2 000个/孔, 每组设置3个复孔。置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中正常培养。检测前, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 继续培养2 h后在酶标仪上测定450 nm吸光度值(OD_{450})。

1.3.4 mRNA 的检测分析

根据RNA反转录试剂盒说明书的指导建议进行RNA的反转录, 将RNA反转录成cDNA。随后, 以此cDNA作为模板进行RT-PCR扩增, PRMT5的扩增上游引物为5'-CAAGTGTCCAGAGCCTTGGAAG-3', 下游引物为5'-AGTGCCTAGCTTCAAATC-CAGC-3'; Actin作为内参, 上游引物为5'-AGCAC-AGAGCCTCGCCTT-3', 下游引物为5'-CTCGTC-GCCCACATAGGAAT-3'。反应体系为: 2 \times SYBR Green Master mix 10 μL , cDNA模板2 μL , 上下游引物各1 μL (引物母液浓度为10 $\mu\text{mol/L}$), 加去离子水至总体积为20 μL 。RT-PCR反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min(预变性); 95 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共35个循环, 每个样品设置3个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法进行结果分析。

1.3.5 Western 印迹检测 PRMT5 蛋白表达

离心收集细胞, PBS洗涤细胞2次。加入RIPA蛋白裂解液冰上裂解30 min, 14 000 r/min离心15 min, 收集蛋白上清, 并测定蛋白浓度。配制10%SDS聚丙烯酰胺凝胶, 每孔上样40~60 μg 总蛋白进行电泳分离; 电泳结束后经半干转膜仪将

SDS聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1~2 h; 加入PRMT5一抗(1:1 000), GAPDH作为内参(1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST室温洗涤4次, 每次10 min, 加二抗(1:2 000)室温孵育1 h, PBST室温洗涤4次, 进行ECL显色。

1.3.6 流式检测分析

转染siRNA control和siRNA PRMT5 48 h后, 离心收集细胞至1.5 mL的EP管中, 用预冷的PBS洗涤细胞2次。加入75%乙醇, 温和混匀细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光固定过夜。离心收集细胞, PBS洗涤细胞2次, 加入PI染料(溴化乙锭, 50 $\mu\text{g/mL}$)及RNase A(100 $\mu\text{g/mL}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min。在1 h内进行流式细胞检测, 结果用FlowJo软件进行分析。

1.4 统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行数据分析。数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 中 PRMT5 的表达情况

在53例CRC标本中, PRMT5阳性主要定位于肿瘤细胞的细胞质和细胞核中, 在癌旁正常组织中表达很低, 表达呈阴性(图1)。PRMT5在CRC组织中的阳性表达率为88.68%(47/53), 显著高于正常对照组织中的阳性表达16.67%(3/18), 差异非常显著($\chi^2=33.453$, $P<0.01$)。

2.2 PRMT5 在 CRC 中的表达与各临床病理参数的关系

PRMT5在CRC中的表达与肿瘤的分化程度密切相关($P<0.05$), 而与患者的性别、年龄、淋巴结转移、远端转移等临床病理参数的差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.3 转染 siRNA 对 PRMT5 mRNA 表达的影响

在CRC HCT116和SW620细胞中转染siRNA PRMT5以及阴性对照siRNA control后, 利用RT-PCR和Western印迹分别检测PRMT5 mRNA和蛋白的表达, 结果显示: 与阴性对照相比, 转染siRNA后, PRMT5 mRNA表达和蛋白表达明显降低($P<0.01$)。表明siRNA对PRMT5具有良好的敲低效果(图2)。

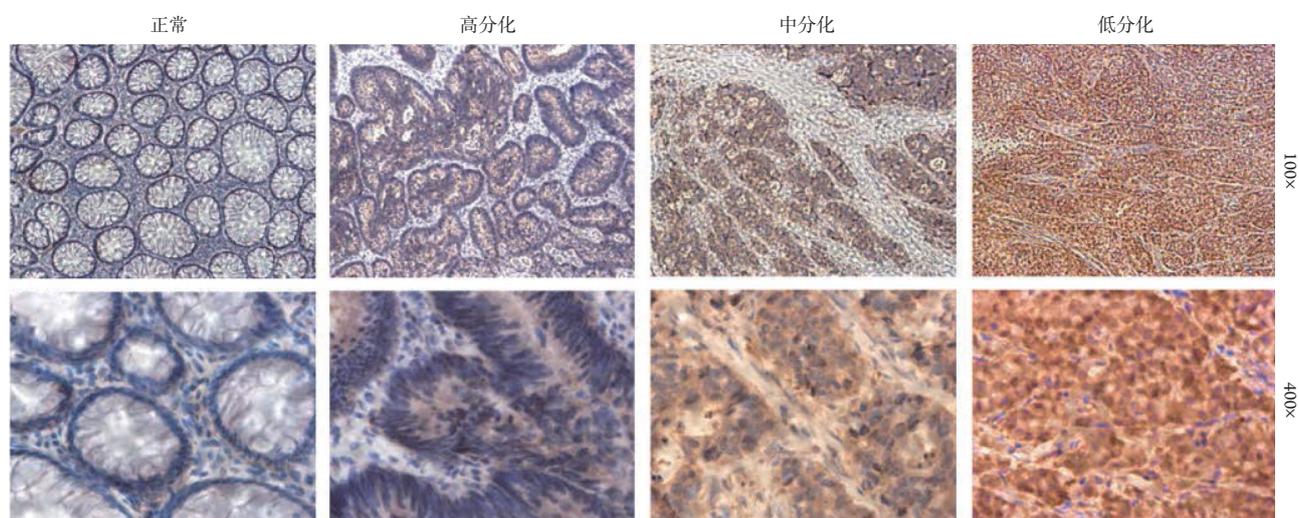


图1 PRMT5在CRC和癌旁正常组织中的表达(IHC染色)

Figure 1 Expression of PRMT5 in colorectal cancer tissues and normal tissues (IHC staining)

表1 PRMT5蛋白的表达与临床病理参数之间的关系

Table 1 Relationship between the expression of PRMT5 and the clinicopathological parameters in colorectal cancer

临床病理参数	<i>n</i>	PRMT5 阳性 / [例 (%)]	χ^2	<i>P</i>
性别			0.789	0.3744
男	33	28 (84.85)		
女	20	15 (75.00)		
年龄 / 岁			0.814	0.3669
<60	25	19 (76.00)		
≥ 60	28	24 (85.71)		
淋巴结转移			0.672	0.4121
无	31	24 (77.42)		
有	22	19 (86.36)		
远端转移			1.573	0.2097
无	47	37 (78.72)		
有	6	6 (100.00)		
浸润深度			0.355	0.5511
T1+T2	17	13 (76.47)		
T3+T4	36	30 (83.33)		
分化程度			4.425	0.035
高 / 中分化	39	29 (74.36)		
低分化	14	14 (100.00)		
临床分期			1.458	0.2272
I+II	28	21 (75.00)		
III+IV	25	22 (88.00)		

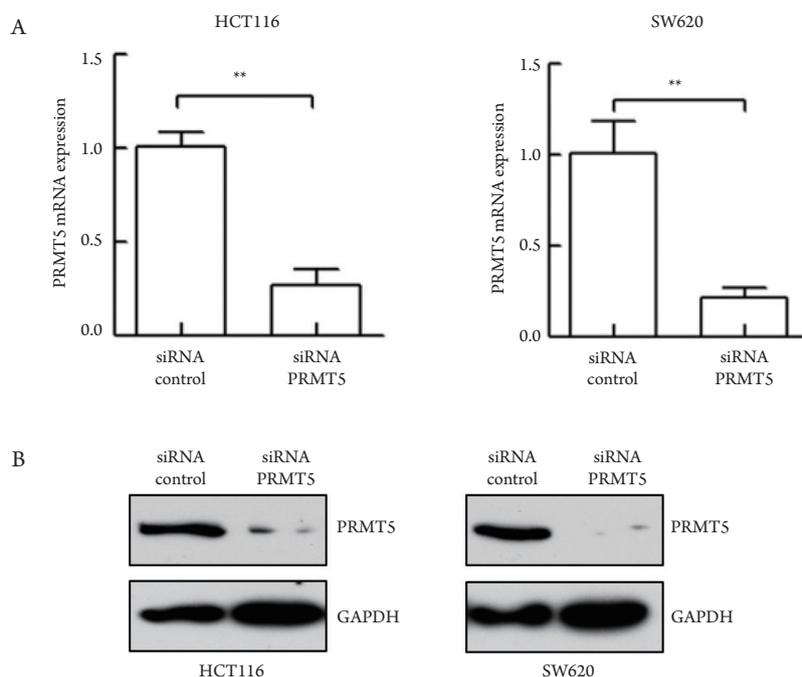


图2 siRNA对PRMT5 mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响

Figure 2 Effect of siRNA on PRMT5 mRNA (A) and protein (B) expression in HCT116 and SW620 cells after siRNA transfection

与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Compared with the siRNA control group, ** $P < 0.01$.

2.4 敲低 PRMT5 表达对 HCT116 和 SW620 细胞增殖能力的影响

CCK-8检测结果显示: 敲低PRMT5表达48, 72 h后, 细胞增殖能力与阴性对照组相比显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图3)。

2.5 敲低 PRMT5 表达对 CRC 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示: 利用siRNA敲低

PRMT5表达后, HCT116和SW620细胞周期明显受到影响(图4); 与阴性对照组(siRNA control)相比, 敲低PRMT5表达后(siRNA PRMT5), G_0/G_1 期细胞比例显著增多($P < 0.01$), S期($P < 0.05$)和 G_2/M 期($P < 0.01$)细胞比例显著减少, 差异有统计学意义。因此, 敲低PRMT5表达会导致HCT116和SW620细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期。

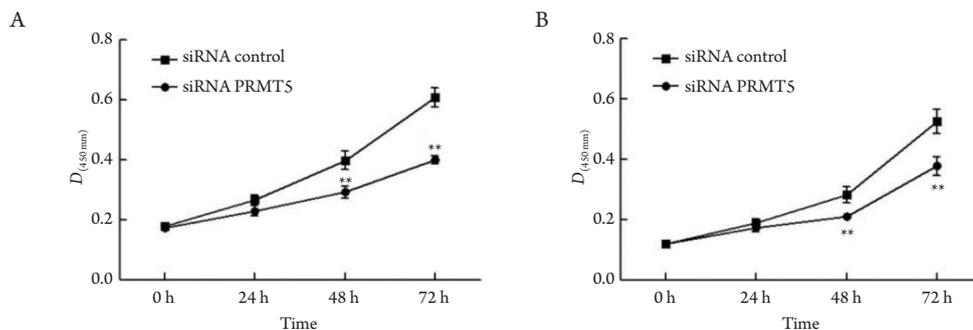


图3 敲低PRMT5表达后对(A)HCT116和(B)SW620细胞增殖能力的影响

Figure 3 Knockdown of PRMT5 inhibited (A) HCT116 and (B) SW620 cells proliferation

与siRNA对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Compared with the siRNA control group, ** $P < 0.01$.

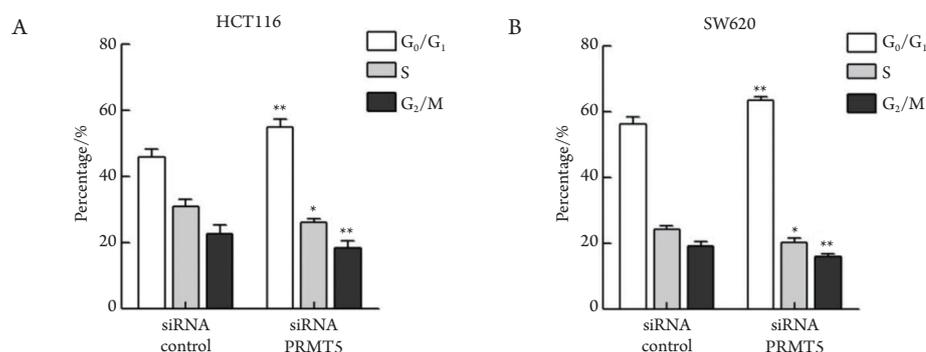


图4 敲低PRMT5表达后对HCT116(A)和SW620(B)细胞周期的影响

Figure 4 Effect of PRMT5 knockdown on the cell cycle of HCT116 (A) and SW620 (B)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

PRMT5与肿瘤的发生、发展密切相关,在肺癌、肝癌、前列腺癌、胶质瘤、淋巴瘤中,PRMT5存在表达异常的现象^[6]。在消化系统肿瘤中,Kanda等^[7]分析了179例人类胃癌组织中PRMT5 mRNA的表达情况,结果显示:与对照非肿瘤组织相比,PRMT5 mRNA的表达显著升高,并与患者术后生存时间呈负相关。Liu等^[8]研究发现:在602例人类胃癌肿瘤标本中,433例胃癌标本中PRMT5蛋白表达显著增高(71.93%),并与胃癌转移和肿瘤发生发展密切相关。然而,关于PRMT5蛋白在CRC中的表达情况和作用研究未见其他的文献报道。本研究利用免疫组织化学方法检测了53例CRC肿瘤及18例癌旁正常组织中PRMT5的蛋白表达情况,结果发现PRMT5在CRC中的表达阳性为88.68%,显著高于癌旁正常组织。此外,PRMT5在CRC组织中的表达与患者性别、年龄、淋巴结转移、远端转移等无关,但与分化程度密切相关。但本研究中使用的肿瘤标本量偏小,无法得出更加准确和客观的研究结果。因此,亟需在更大规模的临床肿瘤标本中研究PRMT5的表达情况。

为进一步研究PRMT5对CRC细胞生物学行为的影响,本研究利用siRNA敲低CRC细胞系HCT116和SW620细胞中PRMT5的表达,利用CCK-8试验检测PRMT5表达敲低对HCT116和SW620细胞增殖能力的影响,结果表明:在敲低PRMT5表达48,72 h后,HCT116和SW620细胞的增殖能力较阴性对照组相比明显降低,进而说明敲低PRMT5表达后会抑制HCT116和SW620细胞的增殖能力;进一步的研究发现:敲低PRMT5表达会导致HCT116和SW620细胞周期被阻滞在

G₀/G₁期。该结果与PRMT5在其他肿瘤细胞中的研究结论类似,进一步证实不同肿瘤中PRMT5扮演着癌基因的角色。关于PRMT5的作用机制,有观点^[9-10]认为PRMT5的精氨酸甲基转移酶活性可以直接对肿瘤发生发展中的关键信号通路中的重要蛋白因子进行甲基化修饰,进而激活大量致癌通路,为肿瘤细胞的生长和转移提供一个有利的肿瘤微环境,从而促进肿瘤演化进程。也有学者^[10]认为:PRMT5主要是在转录水平调控肿瘤细胞增殖和转移相关的关键基因转录,从而影响肿瘤的发生发展过程,主要证据是发现PRMT5有多个组蛋白精氨酸(Arg,R)残基催化位点,如H4R3,H3R8等。总体来看,PRMT5与肿瘤的发生发展密切相关,但具体的分子机制仍需大量的研究来阐明。

综上,PRMT5在CRC组织中高表达,其高表达与肿瘤分化程度密切相关。敲低PRMT5表达后会抑制CRC细胞的增殖能力,原因可能是CRC细胞周期被阻滞在G₀/G₁期。检测PRMT5的表达,可应用于CRC的早期诊断以及作为判断肿瘤恶性程度的依据之一。此外,也可作为临床判断CRC的生物学行为的重要指标,从而为CRC的临床诊断和治疗提供有力的实验证据。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
3. Karkhanis V, Hu YJ, Baiocchi RA, et al. Versatility of PRMT5-induced

- methylation in growth control and development[J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(12): 633-641.
4. Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(11): 2041-2059.
 5. Blanc RS, Richard S. Arginine methylation: the coming of age[J]. Mol Cell, 2017, 65(1): 8-24.
 6. Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 37-50.
 7. Kanda M, Shimizu D, Fujii T, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is associated with malignant phenotype and peritoneal metastasis in gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2016, 49(3): 1195-1202.
 8. Liu X, Zhang J, Liu L, et al. Protein arginine methyltransferase 5-mediated epigenetic silencing of IRX1 contributes to tumorigenicity and metastasis of gastric cancer[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(9 Pt B): 2835-2844.
 9. 许婷, 曹仁贤. 蛋白质精氨酸甲基转移酶家族与肿瘤的关系[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(1): 67-70.
 10. 文君, 闵雪洁, 赵丽, 等. 蛋白质精氨酸甲基转移酶在肿瘤中的作用及机制研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(6): 842-846.
- XU Ting, CAO Renxian. Protein arginine methyltransferases and cancer[J]. Modern Medicine Health, 2015, 31(1): 67-70.
- WEN Jun, MIN Xuejie, ZHAO Li, et al. Research progress of effect and mechanism of protein arginine methyltransferase in tumors[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University. Medical Science, 2017, 37(6): 842-846.

本文引用: 吴晓斌, 王双双, 唐福婷. PRMT5在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞增殖能力的影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 44-50. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.008

Cite this article as: WU Xiaobin, WANG Shuangshuang, TANG Futing. Expression of PRMT5 in colorectal cancer and its effect on colorectal cancer cells proliferation[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(1): 44-50. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.008