

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.002
View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.002>

ZNF521 促进结肠癌的进展且受 miR-211-5p 靶向调控

杜静虎，陈满宇，王东华，陈钰

(襄阳市中心医院普外三科，湖北 襄阳 441021)

[摘要] 目的：探索锌指蛋白521(ZNF521)在结肠癌中的表达、功能和临床意义，并研究其机制。方法：采用免疫组织化学、蛋白质印迹法和qRT-PCR检测结肠癌组织或细胞系中ZNF521或miR-211-5p的表达；采用小干扰RNA(small interfering, siRNA)和miRNA模拟物分别构建ZNF521低表达和miR-211-5p高表达细胞模型；采用CCK-8实验和Transwell实验分别检测细胞的增殖、迁移和侵袭；采用蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达；通过CircInteractome生物信息学网站预测、双荧光素报告基因实验验证miR-211-5p与ZNF521的靶向关系。结果：与正常结肠组织相比，结肠癌患者标本中ZNF521表达显著增加，其高表达与患者TNM分期增加、分化程度低及局部淋巴结转移显著相关；体外实验证实，敲低ZNF521或过表达miR-211-5p抑制了结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭，并促进了结肠癌细胞凋亡；相关的机制研究证实，miR-211-5p可以靶向ZNF521并负调节后者的表达。结论：ZNF521可作为致癌基因调节结肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡并受到miR-211-5p的靶向调控。

[关键词] ZNF521；结肠癌；增殖；迁移；侵袭；凋亡；miR-211-5p

ZNF521 promotes the progression of colon cancer and is targetedly regulated by miRNA-211-5p

DU Jinghu, CHEN Manyu, WANG Donghua, CHEN Yu

(Third Department of General Surgery, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang Hubei 441021, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression, function, and clinical significance of ZNF521 in colon cancer and its mechanism. **Methods:** Immunohistochemistry, Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of ZNF521 and miR-211-5p in colon cancer tissues or cell lines; small interfering RNA (siRNA) and miRNA mimics were used to construct cell models with low expression of ZNF521 and high expression of miR-211-5p respectively; CCK-8 and Transwell experiments were used to detect cell proliferation, migration and invasion, respectively. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2, and the targeting relationship between miR-211-5p and ZNF521 was verified by the prediction of CircInteractome bioinformatics website and the double fluorescein reporter gene experiment. **Results:** Compared with normal

收稿日期 (Date of reception): 2019-09-19

通信作者 (Corresponding author): 陈钰, Email: d443029831@163.com

基金项目 (Foundation item): 襄阳市科技开发计划 (2017-37)。This work was supported by Xiangyang Science and Technology Development Plan, China (2017-37).

colon tissues, the expression of ZNF521 in colon cancer specimens significantly increased, and was correlated with TNM stage increase, the low degree of differentiation, and local lymph node metastasis. In vitro experiments showed that knocking down ZNF521 or overexpressing miR-211-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells, and promoted apoptosis of colon cancer cells. Related mechanism studies confirmed that miR-211-5p targeted ZNF521 and negatively regulate the expression of the latter. **Conclusion:** ZNF521 acts as a cancer-promoting molecule to regulate proliferation, migration, invasion and apoptosis of colon cancer cells and is targetedly regulated by miR-211-5p.

Keywords ZNF521; colon cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis; miR-211-5p

结肠癌是世界上第三大常见癌症，在癌症死亡中占主要原因^[1]。结肠癌在中国城市男性病死率为(4.13~9.51)/100 000；城市女性病死率为(3.16~6.89)/100 000^[2]。早期结肠癌患者有局限性病变，辅助放射治疗、化学治疗及手术治疗是首选治疗方法，通常预后良好。然而，由于我国区域发展的不平衡，许多结肠癌患者，特别是农村结肠癌患者多处于晚期，部分患者甚至以转移为首发表现^[3]。因此，探索治疗结肠癌的关键靶点和寻找新的结肠癌相关标志物有重要价值。

越来越多的研究^[4]表明：许多转录因子在结肠癌细胞中异常表达，在肿瘤的发生和发展进程中发挥重要作用，参与调控结肠癌细胞生物学行为，例如锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFPs)家族是一类重要的转录因子。ZNF521是这类转录因子中的一员，属于C2H2型锌指蛋白家族，由1 311个氨基酸序列组成，这些氨基酸共形成30个Kruppel样锌指结构域穿插在其整个氨基酸序列中，而且这些锌指结构共形成6个锌指结构簇，并调控下游靶基因^[5]。ZNF521对多种肿瘤细胞的生物学行为发挥促进作用，如通过调节前B细胞受体信号促进前B细胞淋巴瘤形成^[6]。然而ZNF521在结肠癌中的表达和功能尚不清楚。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的单链非编码RNA，可通过对靶基因的转录后调控参与生命过程中一系列重要过程^[7]。例如，miR-378在结肠癌中表达下调，在结肠癌细胞的具有抑制增殖、迁移和侵袭的作用^[8]。类似的miR-211同样具有抑制结肠癌肿瘤细胞生长的作用^[9]。

研究发现：miRNA通过靶向作用于编码基因mRNA的3'-UTR从而在转录后水平调节后者的表达。例如，miR-508-3p靶向RGS17抑制宫颈癌的发生发展^[10]；在非小细胞肺癌中，miR-605-5p靶向调控TNFAIP3促进肿瘤细胞的侵袭和扩散^[11]。但是miR-211-5p在结肠癌细胞中的表达和功能暂不明确。

生物信息学预测显示ZNF521是miR-211-5p的靶基因之一。但是miR-211-5p靶向调控ZNF521的机制以及对结肠癌细胞的影响尚不明确。本研究旨在探究ZNF521在结肠癌中的表达与患者临床病理特征和预后的关系，并明确其对结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响，为阐明结肠癌细胞生物学的分子机制和寻找新的肿瘤基因治疗靶点提供理论支持，为治疗结肠癌提供一种可能的靶向治疗方案。

1 材料与方法

1.1 组织标本与临床资料的收集

选取45例结肠癌患者癌组织样本和癌旁组织(距癌组织边缘>5 cm)样本为对照组。所有标本来源均为初诊患者，平均年龄58.6岁，男24例，女21例。所有患者未经化学治疗或放射治疗等辅助治疗。本实验获得所有患者知情同意，并获得襄阳市中心医院医学伦理审查委员会的批准。

1.2 细胞株与主要试剂

人类结肠癌细胞系(DLD-1、SW620)和人正常结肠细胞NCM460由中国医学科学院细胞中心提供。10%胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司，DMEM-F12购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司，lipofectamine 2000试剂盒购于中国Invitrogen公司。CCK-8溶液购于湖北百奥斯生物科技有限公司，Dual-Luciferase Reporter Assay System购于美国Promega公司，反转录试剂盒购于北京博凌科为生物科技有限公司，SYBR PremixEx Taq II试剂盒购于武汉优博生物技术有限公司。Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司。RIPA蛋白裂解液和TRIzol试剂购自北京百奥莱博科技公司，一抗抗ZNF521抗体(ab189956, 1:500)、抗Bax抗体(ab32503, 1:500)、Bcl-2抗体(ab185002, 1:500)及山羊抗兔二抗(ab6721,

1:5 000)购于英国Abcam公司。

1.3 细胞培养与转染

将NCM460、DLD-1和SW620细胞接种于DMEM-F12培养基中，并加入10%FBS和1%青霉素/链霉素，在37 °C、5%CO₂环境下培养。定期观察细胞生长情况，每隔2~3 d换液，细胞处于对数生长期时用于后续实验。采用脂质体转染法进行细胞转染。取对数生长期的SW620细胞，调整密度，使其转染融合度达60%~70%。接种于12孔板，用含10%胎牛血清不含抗生素的DMEM-F12培养，次日贴壁后弃去旧培养液待转染。使用lipofectamine 2000将si-ZNF521和si-con及miR-211-5p模拟物和阴性对照(con)转染到SW620细胞中。

1.4 免疫组织化学检测

采用标准SP染色法检测ZNF521在组织中的表达：取固定组织按常规方法脱水、包埋、切片，60 °C烘片1 h。利用二甲苯对标本组织脱蜡、水化。经抗ZNF521抗体孵育1 h和二抗孵育20 min后，用PBS缓冲液冲洗，行DAB显色后终止反应。免疫组织化学的评分由我院病理科的专业病理医生完成。

1.5 qRT-PCR分析

根据制造商的方案，用TRIzol试剂盒提取总RNA，使用反转录试剂盒反转录成cDNA，以此为模板进行PCR扩增，使用SYBR PremixEx Taq II试剂盒在7300实时荧光定量PCR分析系统上进行qRT-PCR。用GAPDH和U6作为miRNA和mRNA的内源性对照。用 $\Delta\Delta Ct$ 法测定miRNA和mRNA相对定量，并以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析，重复所有qRT-PCR反应3次。PCR反应条件为：95 °C预变性15 s，60 °C 20 s，45个循环。引物如下：miR-211-5p正向5'-ACACTCCAGCTGGCAAGTAGCATCA-
ACTA-3'，反向5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'；U6正向5'-CTCGCTTCGGCAGCACCA-3'，反向5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'；GAPDH正向5'-AACTTGCGATTGTGGAAGG-3'，反向5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'；ZNF521正向5'-TGACACCTCTGAGCCTAT-3'，反向5'-TTTCTT-TTTCACGATGGCACTTTCT-3'。

1.6 CCK-8实验

取对数生长期的SW620细胞，使用胰酶消化

并悬垂细胞，调整细胞密度至 2×10^3 个/mL后，接种于96孔板，每孔100 μL细胞悬液，每组设3个复孔。之后将96孔板置于培养箱中继续培养。24 h后每个孔加入CCK-8溶液10 μL，继续于培养箱中孵育1 h。终止培养后，将96孔板置于酶标仪中，测定450 nm波长各孔的吸光度(OD值)。此后在第12、24、48、72、96 h各测定一次细胞的吸光度，实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测

转染48 h后，用胰酶消化液消化细胞，通过离心(1 500 r/min，3 min)收集细胞。所得细胞按细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作：PBS洗细胞2次后，加入400 μL预冷PBS，然后分别加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI，4 °C避光孵育30 min后，立即用流式细胞仪测定，经计算机软件处理后，计算出凋亡细胞的百分率。

1.8 Transwell实验

细胞迁移与侵袭实验步骤基本相同，唯一区别在于细胞侵袭实验需要预先铺好含基质胶的Tranwell小室，而迁移实验不用，其余步骤同。侵袭实验如下，Matrigel基质胶用预冷的无血清的DMEM-F12培养基稀释后，取100 μL铺于Transwell小室，并加入100 μL的含 1×10^5 个细胞悬液加入上室，下室加入600 μL完全培养基，置于37 °C、5%CO₂恒温孵箱培养24 h。而后，弃去上室液体，小心取出小室，湿棉签去除未穿过膜的细胞。甲醇固定，结晶紫染色，PBS洗涤，切下小室膜，封片。

1.9 荧光素酶实验分析

所有荧光素酶报告载体(ZNF521-wt、ZNF521-mt)均由美国Promega公司构建。用胰蛋白酶消化SW620细胞，离心后重悬于含有10%胎牛血清的细胞培养基中并按 4×10^4 个细胞/孔的密度接种于48孔板上，培养24 h后(此时细胞密度为40%~50%)，然后用脂质体2000将ZNF521-wt或ZNF521-mt与miR-211-5p mimics或阴性对照物共转染SW620细胞。转染48 h后，按照制造商的说明测定荧光素酶活性。实验重复3次。

1.10 蛋白质印迹法检测

用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解SW620细胞，高速离心后收集上清，并将上清在水浴锅中于100 °C加热10 min使

蛋白变性。使用BCA法对蛋白质进行定量后，再利用SDS-PAGE凝胶对其进行电泳，然后将分离开的蛋白质通过电转法转移到PVDF膜上，经过5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h后，4 ℃条件下加入一抗孵育过夜，再以山羊抗兔二抗室温孵育1 h。使用超敏ECL化学发光显影，GAPDH作为内参。

1.11 统计学处理

使用GraphPad Prism 7统计软件分析数据。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组间比较采用t检验或秩检验；计数资料组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织及细胞中 ZNF521 显著高表达

通过免疫组织化学法检测45例结肠癌患者组织中ZNF521的表达，结肠癌组织(左)和癌旁正常组织(右)免疫组织化学的代表图如图1A。进一步统计结果表明结肠癌组织中ZNF521的阳性率显著增加(图1B)；而且通过蛋白质印迹法检测发现：与正常细胞相比，肠癌细胞中的ZNF521表达显著增加(图1C)。进一步分析ZNF521的高表达与患者临床病理指标关系，发现其高表达与患者淋巴结转移、肿瘤分化程度低和TNM分期增加显著相关(表1)。

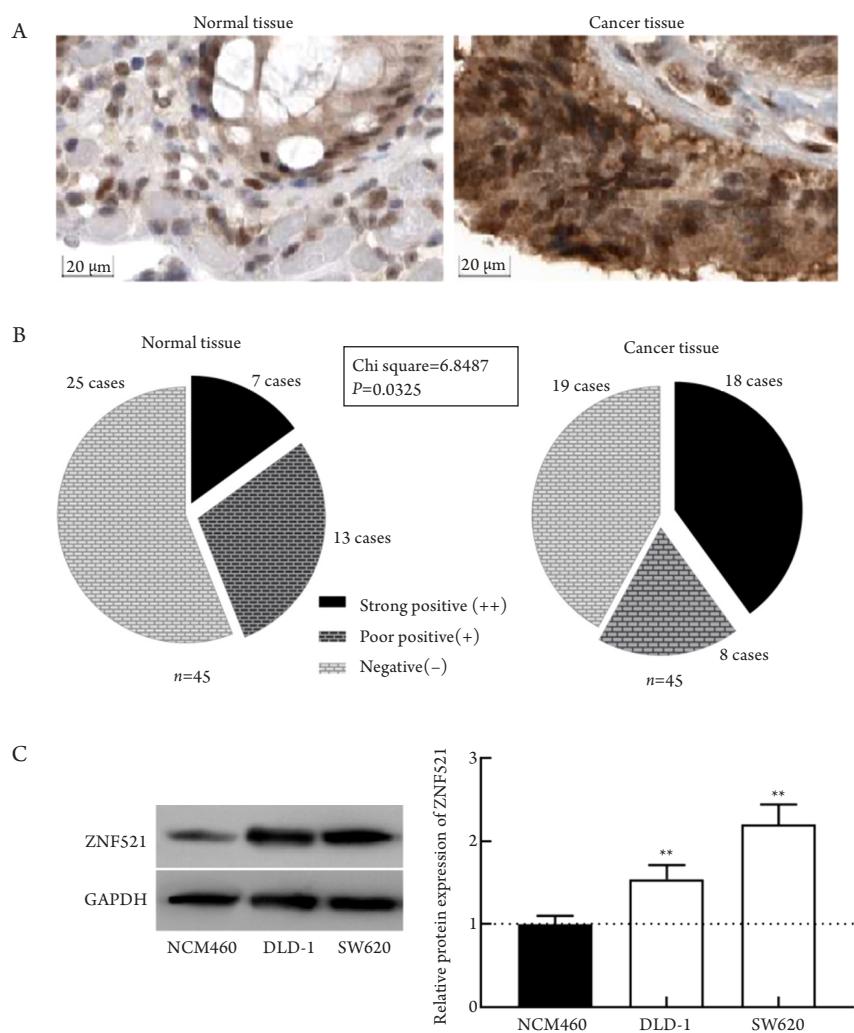


图1 ZNF521在结肠癌组织和细胞中表达上调

Figure 1 Expression of ZNF521 is up-regulated in colon cancer tissues and cells

(A)免疫组织化学显示结肠癌组织和正常组织(SP染色)；(B)结肠癌患者组织的强阳性、弱阳性与阴性表达分布情况；(C)结肠癌细胞中ZNF521的表达。与NCM460组相比，** $P<0.01$ 。

(A) Immunohistochemistry showed colon cancer tissue and corresponding normal tissue (SP staining); (B) Distribution of strong positive, weak positive, and negative expression in colon cancer patients; (C) Expression of ZNF521 in colon cancer cell lines. ** $P<0.01$ vs NCM460 group.

表1 ZNF521高表达水平与淋巴结转移、肿瘤分化和TNM分期显著相关**Table 1 High expression of ZNF521 is significantly correlated with lymph node metastasis, tumor differentiation and TNM stage**

临床指标	n	ZNF521表达/例		χ^2	P
		高表达(n=26)	低表达(n=19)		
年龄/岁				1.837 9	0.175 2
≥60	17	12	5		
<60	28	14	14		
性别				0.274 9	0.600 1
男	24	13	11		
女	21	13	8		
肿瘤大小/cm				2.679 5	0.101 6
≥5	23	16	7		
<5	22	10	12		
淋巴结转移				5.908 3	0.015 1
是	26	19	7		
否	19	7	12		
分化				5.661 6	0.017 3
高、中等	17	6	11		
低	28	20	8		
TNM分期				4.387 7	0.036 2
I+II	18	7	11		
III+IV	27	19	8		

2.2 敲低 ZNF521 抑制结肠癌细胞增殖，促进凋亡

采用si-RNA敲低ZNF521的表达探究ZNF521对结肠癌细胞的增殖、凋亡的作用，结果见图2A。CCK-8实验显示：与si-con相比，si-ZNF521组的细胞活力显著降低(图2B)。流式细胞术显示si-ZNF521组的凋亡率高于对照组，且凋亡相关蛋白Bax表达升高，Bcl-2表达降低(图2C，2D)。

2.3 敲低 ZNF521 抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭

Transwell迁移侵袭实验检测结肠癌细胞系中迁移和侵袭能力，结果发现：敲低ZNF521组的结肠癌细胞的迁移比对照组显著降低(图3A)，随后

Transwell侵袭实验结果提示：敲低ZNF521的结肠癌细胞系比对照组侵袭能力显著降低(图3B)。

2.4 MiR-211-5p 在结肠癌组织和细胞中显著低表达

通过qRT-PCR检测45例结肠癌患者癌组织及其癌旁组织中miR-211-5p的表达，结果表明：与癌旁组织相比，结肠癌组织中miR-211-5p表达显著降低(图4A)；与正常细胞相比，结肠癌细胞系中的miR-211-5p表达均显著降低(图4B)。进一步分析miR-211-5p的低表达与患者临床病理指标关系，发现miR-211-5p表达下调与患者淋巴结转移、肿瘤分化和TNM分期显著相关(表2)。

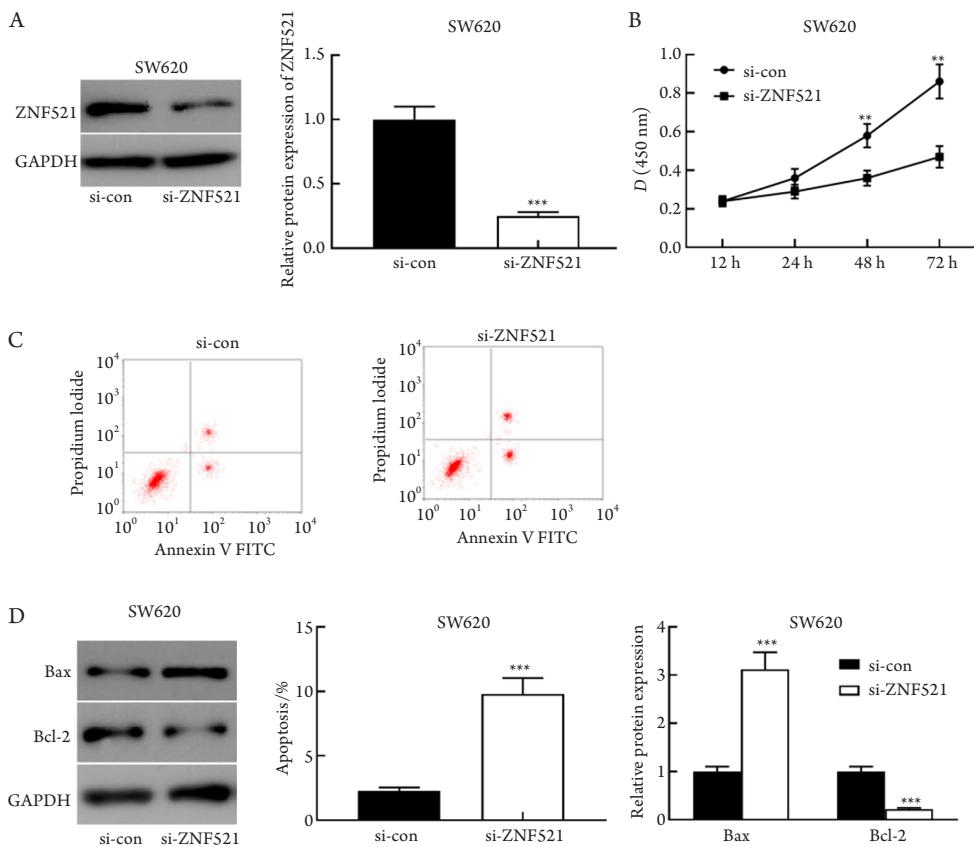


图2 敲低ZNF521可以抑制结肠癌细胞的增殖，促进凋亡

Figure 2 Knocking down ZNF521 can inhibit the proliferation and promote apoptosis of colon cancer cells

(A) 蛋白质印迹法显示成功将si-ZNF521转染结肠癌细胞系SW620。CCK-8实验(B)、流式细胞术(C)、Western印迹法(D)分别检测si-ZNF521对细胞增殖和凋亡以及凋亡相关蛋白的影响。与si-con组相比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

(A) Western blotting shows that si-ZNF521 was successfully transfected into SW620. CCK-8 test (B), flow cytometry (C) and apoptosis-related protein (D) were used to detect the effects of si-ZNF521 on proliferation and apoptosis of colon cancer cells, respectively. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs si-con group.

2.5 MiR-211-5p 显著抑制结肠癌细胞增殖，促进细胞凋亡

为进一步探究敲低miR-211-5p对结肠癌细胞的增殖、凋亡的作用，将结肠癌细胞系SW620转染miR-211-5p模拟物并成功建立miR-211-5p高表达模型(图5A)；CCK-8实验显示转染miR-211-5p模拟物后结肠癌细胞活力显著降低(图5B)；流式细胞术显示miR-211-5p组的凋亡率高于对照组(图5C)；凋亡相关蛋白显示：与对照组相比，miR-211-5p组的Bax表达增高，Bcl-2表达降低(图5D)。

2.6 MiR-211-5p 抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭

通过Transwell迁移侵袭实验检测结肠癌细胞系中迁移、侵袭能力，结果显示：miR-211-5p组的结肠癌细胞的迁移数量较对照组显著降低(图6A)，miR-211-5p组的结肠癌细胞系的侵袭数量较对照组

显著降低(图6B)。

2.7 双荧光素报告基因实验验证 miR-211-5p 和 ZNF521 的靶向关系

基于生物信息学数据库TargetScan，发现ZNF521是miR-211-5p的候选靶基因(图7A)。采用荧光素酶报告基因验证实验发现：miR-211-5p可显著抑制ZNF521野生型(ZNF521 wt)组的荧光素酶活性，而对ZNF521突变型(ZNF521 mt)组无影响(图7B)。用qRT-PCR检测45例患者，结果显示miR-211-5p与ZNF521表达呈负相关(图7C)。蛋白质印迹法结果显示：与对照组相比，miR-211-5p组显著抑制ZNF521蛋白的表达水平(图7D)。qRT-PCR检测敲低ZNF521对miR-211-5p的影响，结果显示：si-ZNF521对miR-211-5p表达无显著影响(图7E)。

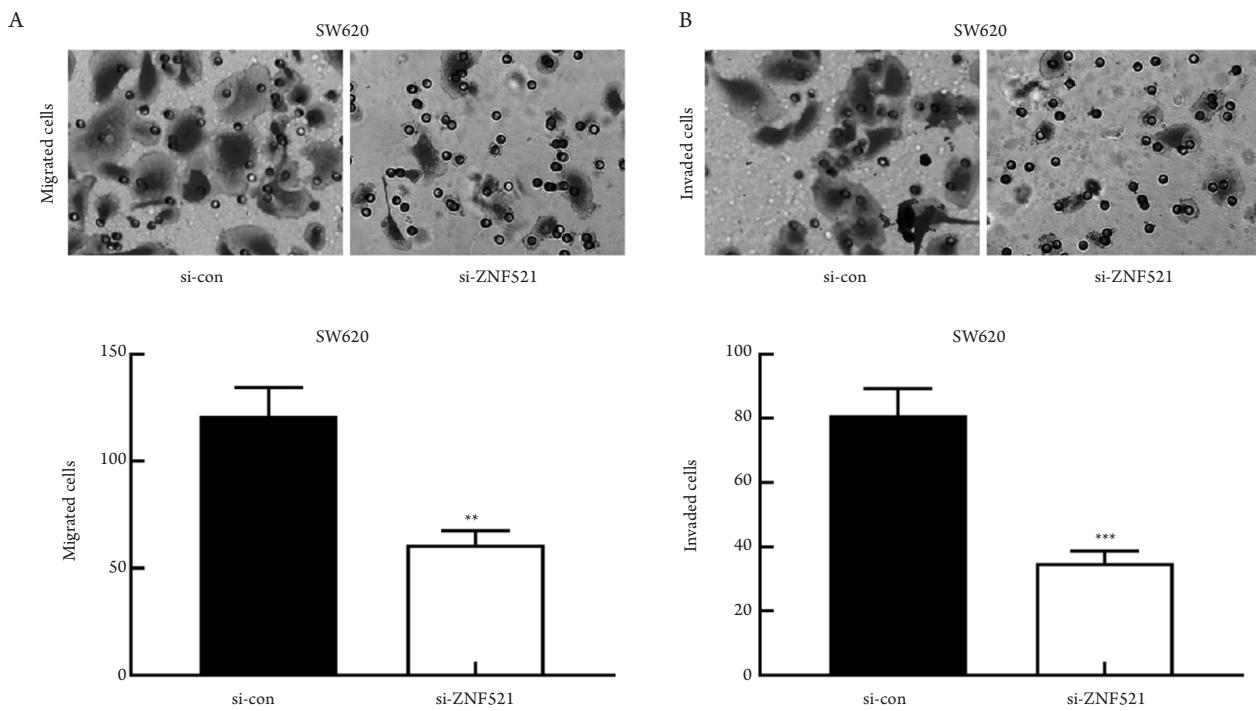


图3 敲低ZNF521可以抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭

Figure 3 Knocking down ZNF521 can inhibit the migration and invasion of colon cancer cells

Transwell实验分别检测si-ZNF521对结肠癌细胞迁移(A)和侵袭(B)的影响。与si-con组相比, **P<0.01, *** P<0.001。

Transwell experiment was used to detect the effects of si-ZNF521 on migration (A) and invasion (B) of colon cancer cells. **P<0.01, ***P<0.001 vs si-con group.

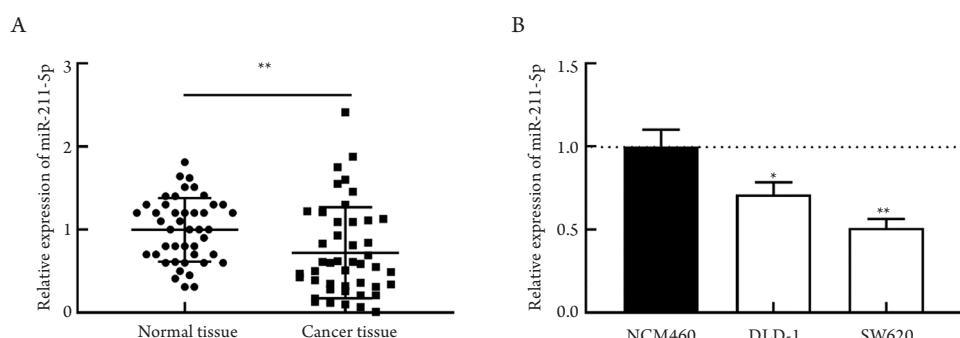


图4 MiR-211-5p在结肠癌组织和细胞中表达下调

Figure 4 MiR-211-5p was down-regulated in colon cancer tissues and cells

qRT-PCR检测结肠癌组织(A)和细胞中miR-211-5p的表达(B)。与NCM460组相比, *P<0.05, **P<0.01。

Expression of miR-211-5p in colon cancer tissues (A) and cell lines (B) was detected by qRT-PCR. *P<0.05, **P<0.01 vs NCM460 group.

表2 MiR-211-5p低表达水平与淋巴结转移、肿瘤分化和TNM分期显著相关

Table 2 Low expression of miR-211-5p is significantly correlated with lymph node metastasis, tumor differentiation and TNM stage

临床指标	总数	miR-211-5p表达		χ^2	P
		高表达	低表达		
年龄/岁				0.047 3	0.827 9
≥60	17	6	11		
<60	28	9	19		
性别				0.401 8	0.526 2
男	24	9	15		
女	21	6	15		
肿瘤大小/cm				0.177 9	0.673 2
≥5	23	7	16		
<5	22	8	14		
淋巴结转移				5.511 1	0.018 9
是	26	5	21		
否	19	10	9		
分化				7.988 4	0.004 7
高、中等	17	10	7		
低	28	5	23		
TNM分期				6.666 7	0.009 8
I+II	18	10	8		
III+IV	27	5	22		

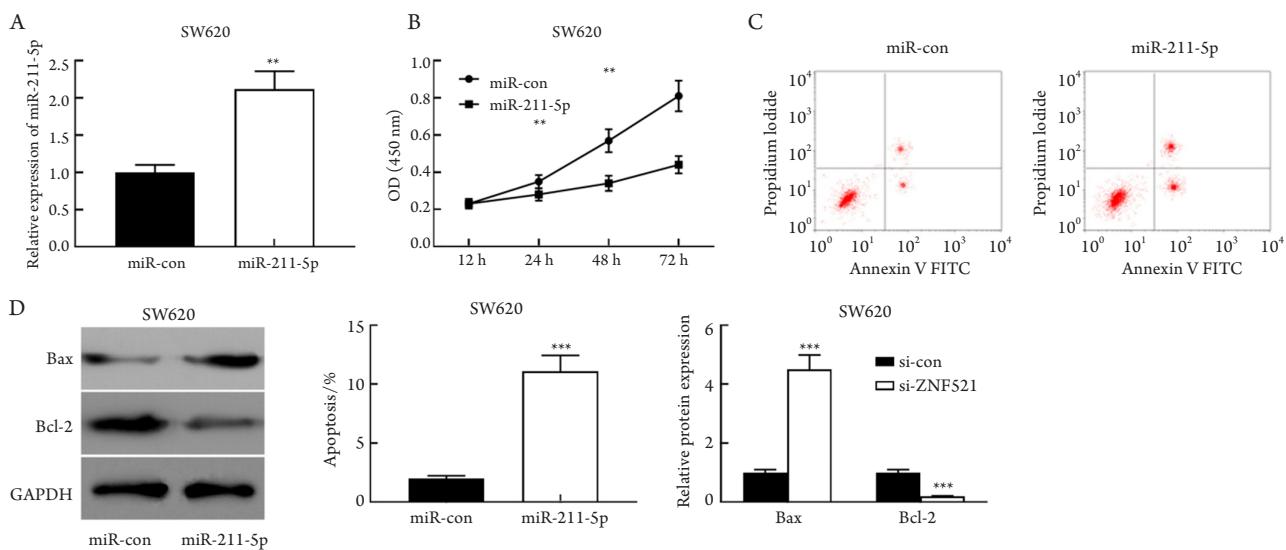
**图5 MiR-211-5p模拟物抑制结肠癌细胞的增殖**

Figure 5 MiR-211-5p mimics inhibit the proliferation and apoptosis of colon cancer cells

(A)在SW620细胞中转染miR-211-5p模拟物；(B)CCK-8实验检测miR-211-5p模拟物对细胞增殖的影响；(C)细胞凋亡实验显示miR-211-5p对细胞凋亡的影响；(D)蛋白质印迹法显示细胞中miR-211-5p对凋亡蛋白的影响。与miR-con组相比，**P<0.01，***P<0.001。

(A) MiR-211-5p mimics were successfully transfected into SW620 cells; (B) CCK-8 was used to detect the effect of miR-211-5p mimics on the proliferation of cells; (C) Apoptosis experiments showed that the effect of miR-211-5p mimics on cell apoptosis; (D) Western blotting showed the effect of miR-211-5p mimics on apoptotic protein in cells. **P<0.01, ***P<0.001 vs the miR-con group.

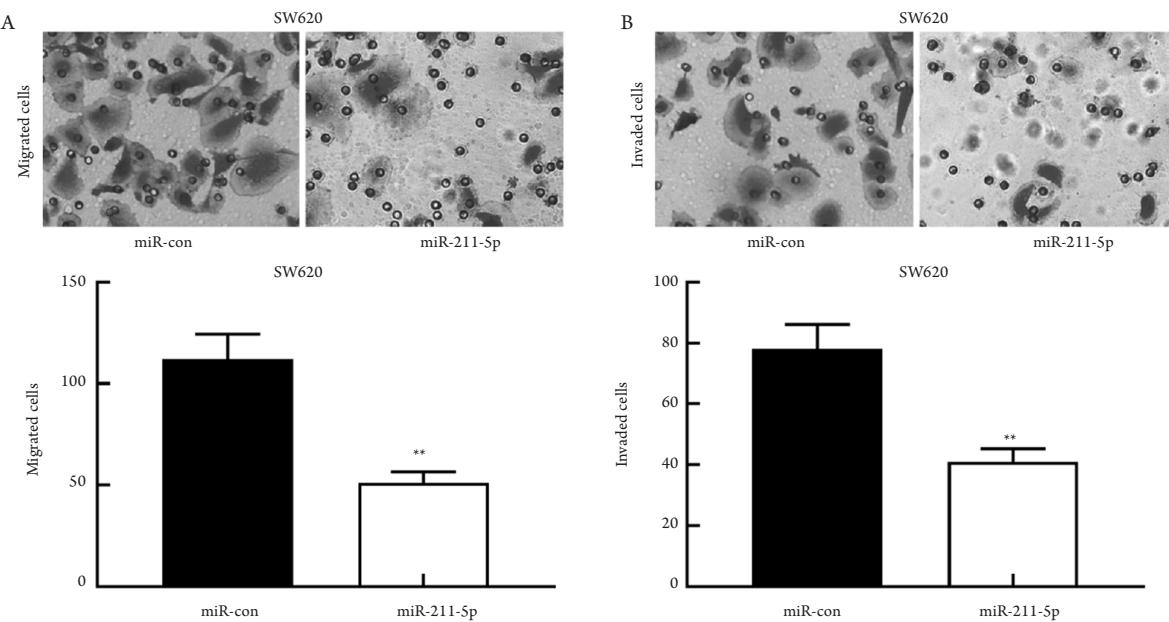


图6 MiR-211-5p可以抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭

Figure 6 MiR-211-5p can inhibit the migration and invasion of colon cancer cells

Transwell实验分别检测miR-211-5p对结肠癌细胞迁移(A)和侵袭(B)的影响。与miR-con组相比, ** $P<0.01$ 。

Transwell experiment was used to detect the effects of miR-211-5p on migration (A) and invasion (B) of colon cancer cells. ** $P<0.01$ vs the miR-con group.

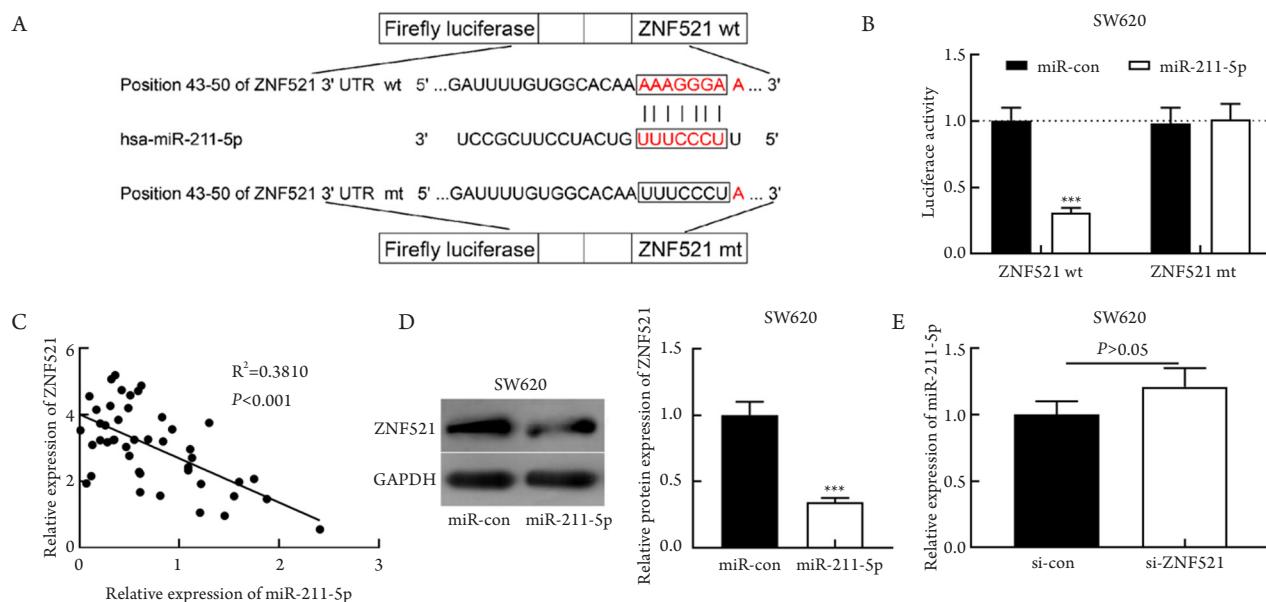


图7 MiR-211-5p靶向调控ZNF521

Figure 7 Targeted regulation of ZNF521 by miR-211-5p

(A)ZNF521的野生型和突变型与miR-211-5p结合位点的示意图; (B)荧光素酶报告基因法检测miR-211-5p对ZNF521-wt和ZNF521-mt的影响; (C)ZNF521与miR-211-5p表达的相关性; (D)蛋白质印迹法检测miR-211-5p对ZNF521蛋白的表达的影响; (E)qRT-PCR检测敲低ZNF521对miR-211-5p表达的影响。与miR-con组相比, *** $P<0.001$ 。

(A) Characterization of binding sites between wild or mutant ZNF521 and miR-211-5p; (B) Luciferase reporter gene assay was used to detect the effects of miR-211-5p on ZNF521-wt and ZNF521-mt; (C) Correlation between the expression of ZNF521 and miR-211-5p; (D) Western blotting was used to detect the effect of miR-211-5p on the expression of ZNF521 protein; (E) qRT-PCR detection of the effect of knock-down ZNF521 on miR-211-5p expression. *** $P<0.001$ vs the miR-con group.

3 讨论

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤。内镜和成像技术的进步，以及癌胚抗原检测的临床应用大大提高了结肠癌的早期诊断和治疗效果^[12]。然而，尽管有部分药物在某些结肠癌患者治疗中有效，但由于结肠癌病因的复杂性，通常仅针对一个或多个分子的分子靶向药物并不适用于所有患者^[13-14]。因此，迫切需要寻找新的治疗靶点。本研究选取并检测45例结肠癌患者结肠癌组织及癌旁组织标本中的ZNF521表达，发现结肠癌组织中的ZNF521表达增加，且高表达的ZNF521与TNM分期增加、分化程度降低及局部淋巴结转移等病理指标显著相关，因此推测ZNF521在结肠癌细胞生物学行为中发挥促癌作用，可能作为结肠癌诊断、治疗和预后评估的一项新的指标。

近年来研究^[15]表明：NF家族在调控肿瘤的发生和发展中发挥重要作用。ZNF521为造血干细胞生物功能的关键调节剂，促进了具有MLL-AF9易位的人白血病细胞系中的增殖^[16]。研究^[17]指出：ZNF521在急性髓系细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)发挥重要调控作用，其通过与GATA结合蛋白1(GATA binding protein 1)结合，抑制下游特异性红系分化基因的激活，从而抑制红系细胞分化，致使未成熟红细胞的分裂受到抑制。使用抗Vpreb抗体刺激前B细胞受体信号转导引起c-myc和c-jun及Ccnd3的异常上调，从而诱导前B细胞的生长；并且IL-7受体的添加对前B细胞生长发挥竞争作用。ZFP521通过调节前B细胞受体信号转导途径全面诱导了前B细胞淋巴瘤形成^[6]。由此进一步推测ZNF521在结肠癌发挥促癌作用。本研究通过体外研究发现ZNF521在结肠癌细胞中相较于结肠细胞显著高表达，敲低ZNF521后，结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭等生物学行为能力较对照组显著被抑制，而凋亡被促进。这些结果表明ZNF521作为一种促癌基因可以显著促进结肠癌的发生和发展。MiRNA广泛参与肿瘤的发生和发展，同时在肿瘤的诊断和治疗中发挥显著作用^[18]。MiR-96通过抑制肾细胞癌中的NPTX2而成为潜在的肿瘤抑制因子^[19]。MiR-940通过靶向CKS1抑制胶质瘤细胞增殖和细胞周期进程^[20]。MiR-211-5p是miRNA家族的重要成员，有研究^[21]发现：miR-211-5p在肿瘤细胞的生长调控中发挥抑制作用，miR-211-5p通过吸附SPARC抑制乳头状甲状腺癌的增殖和侵袭。MiR-211-5p可能通过抑制ZEB2在肝细胞癌转移中发挥抑制作用^[22]。本

研究证实miR-211-5p抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭，促进凋亡，进一步证实miR-211-5p在结肠癌中可以作为抑癌基因发挥作用。MiRNA可以通过靶向mRNA调节细胞的蛋白表达，从而发挥促癌或抑癌效应，例如miR-330-3p靶向CCBE1以促进乳腺癌细胞侵袭和转移^[23]。MiR-211-5p介导的SNAIL1表达抑制有助于抑制肾细胞癌进展^[24]。本研究通过Targetscan数据库分析发现：miR-211-5p可以结合ZNF521的3'-UTR，ZNF521是miR-211-5p调控的靶点之一。采用荧光素酶报告基因验证实验发现miR-211-5p可以结合ZNF521；qRT-PCR实验显示两者在表达上呈负相关。蛋白质印迹法结果显示miR-211-5p抑制ZNF521的表达，而ZNF521无法调控miR-211-5p的表达。MiR-211-5p通过吸附ZNF521对结肠癌细胞发挥抑癌效应。综上所述，本研究发现ZNF521能够影响结肠癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的生物学行为，且受到miR-211-5p靶向调控。敲低ZNF521可能用来评估结肠癌临床进展状况和作为评价预后的重要参考指标，对于未来新的靶向药物的选择、丰富其治疗手段也有积极意义。然而本研究需要在动物实验中进一步证实miR-211-5p靶向调控ZNF521调节结肠癌细胞的生物学行为，同时单中心研究样本来源也是本研究的局限之处，仍需要更大样本的临床病例进行进一步验证。

参考文献

- Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer[J]. J Mol Cell Biol, 2019, 11(4): 267-276.
- Zhou F, Shen F, Zheng Z, et al. The LncRNA XIRP2-AS1 predicts favorable prognosis in colon cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5767-5778.
- Luo ZF, Zhao D, Li XQ, et al. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(22): 5254-5259.
- Fan Y, Zhan Q, Xu H, et al. Epigenetic identification of ZNF545 as a functional tumor suppressor in multiple myeloma via activation of p53 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 474(4): 660-666.
- Fleenor CJ, Arends T, Lei H, et al. Zinc finger protein 521 regulates early hematopoiesis through cell-extrinsic mechanisms in the bone marrow microenvironment[J]. Mol Cell Biol, 2018, 38(17): e00603-17.
- Hiratsuka T, Takei Y, Ohmori R, et al. ZFP521 contributes to pre-B-

- cell lymphomagenesis through modulation of the pre-B-cell receptor signaling pathway[J]. *Oncogene*, 2016, 35(25): 3227-3238.
7. Wang R, Sun Y, Yu W, et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 20.
 8. Zeng M, Zhu L, Li L, et al. miR-378 suppresses the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells by inhibiting SDAD1[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2017, 22: 12.
 9. Zhu L, Wang R, Zhang L, et al. rs187960998 polymorphism in miR-211 prevents development of human colon cancer by deregulation of 3'UTR in CHD5[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 405-412.
 10. Hu P, Zhou G, Zhang X, et al. Long non-coding RNA Linc00483 accelerated tumorigenesis of cervical cancer by regulating miR-508-3p/RGS17 axis[J]. *Life Sci*, 2019, 234: 116789.
 11. Liao Y, Cao L, Wang F, et al. miR-605-5p promotes invasion and proliferation by targeting TNFAIP3 in non-small-cell lung cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 779-787.
 12. Zaenker P, Ziman MR. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers—a review[J]. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 2013, 22(12): 2161-2181.
 13. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines[J]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e71.
 14. Corso G, Pascale V, Flauti G, et al. Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict specific anatomical subsite in colorectal cancer patients[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(12): 1383-1388.
 15. Wei S, Wang L, Zhang L, et al. ZNF143 enhances metastasis of gastric cancer by promoting the process of EMT through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12813-12821.
 16. Garrison BS, Rybak AP, Beerman I, et al. ZFP521 regulates murine hematopoietic stem cell function and facilitates MLL-AF9 leukemogenesis in mouse and human cells[J]. *Blood*, 2017, 130(5): 619-624.
 17. Germano G, Morello G, Aveic S, et al. ZNF521 sustains the differentiation block in MLL-rearranged acute myeloid leukemia[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26129-26141.
 18. Fan S, Tian T, Chen W, et al. Mitochondrial miRNA determines chemoresistance by reprogramming metabolism and regulating mitochondrial transcription[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1069-1084.
 19. Xiang W, Han L, Mo G, et al. MicroRNA-96 is a potential tumor repressor by inhibiting NPTX2 in renal cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1504-1513.
 20. Luo H, Xu R, Chen B, et al. MicroRNA-940 inhibits glioma cells proliferation and cell cycle progression by targeting CKS1[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4851-4865.
 21. Liang M, Jia J, Chen L, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes proliferation and invasion through regulating miR-211-5p/SPARC axis in papillary thyroid cancer[J]. *Endocrine*, 2019, 65(2): 318-326.
 22. Jiang G, Wen L, Deng W, et al. Regulatory role of miR-211-5p in hepatocellular carcinoma metastasis by targeting ZEB2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 806-812.
 23. Mesci A, Huang X, Taeb S, et al. Targeting of CCBE1 by miR-330-3p in human breast cancer promotes metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(10): 1350-1357.
 24. Wang K, Jin W, Jin P, et al. miR-211-5p suppresses metastatic behavior by targeting SNAI1 in renal cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(4): 448-456.

本文引用: 杜静虎, 陈满宇, 王东华, 陈钰. ZNF521促进结肠癌的进展且受miR-211-5p靶向调控[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(6): 1237-1247. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.002

Cite this article as: DU Jinghu, CHEN Manyu, WANG Donghua, CHEN Yu. ZNF521 promotes the progression of colon cancer and is targetedly regulated by miRNA-211-5p[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(6): 1237-1247. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.002