

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.009

· 基础研究 ·

ZNF148 可变剪切在结直肠癌发生发展中的作用

何平¹, 高显华², 许硕贵², 丁杰², 况飞²(1. 南昌大学第三附属医院 普外科 江西 南昌 330008; 2. 上海长海医院 急诊科 上海 200433)

[摘要] **目的:** 探讨锌指结构蛋白148(zinc finger protein 148, *ZNF 148*)基因的两种可变剪接体对结肠癌细胞侵袭转移能力的影响及相关作用机制。**方法:** RT-PCR检测人结肠癌细胞SW480中的ZNF148两种剪接体, 构建ZNF148干扰载体和过表达载体, 将构建成功的ZNF148干扰载体及过表达载体转染至人结肠癌细胞SW480中, 分为ZNF148^{FL}-siRNA组、ZNF148^{FL}-Over express组、ZNF148^{AN}-siRNA组、ZNF148^{AN}-Over express组、Control siRNA组、Control Over express组以及Normal control组。RT-PCR检测各组细胞mRNA表达水平, MTT、Transwell、划痕实验和流式细胞术检测人结肠癌细胞SW480的增殖、体外细胞侵袭、迁移和凋亡情况。**结果:** RT-PCR扩增获得全长分别为2 385 bp以及2 004 bp的ZNF148^{FL}与ZNF148^{AN}两种不同剪接体产物。ZNF148^{FL}-siRNA组ZNF148^{FL}的表达量明显下降, 但ZNF148^{AN}的表达水平上升; ZNF148^{FL}-Over express组ZNF148^{FL}的表达量明显上升, 而ZNF148^{AN}的表达水平下降(均 $P<0.05$)。ZNF148^{AN}-siRNA组ZNF148^{AN}的明显下降, 但ZNF148^{FL}的表达水平上升; ZNF148^{AN}-Over express组ZNF148^{AN}表达水平升高, 而ZNF148^{FL}的表达水平下降(均 $P<0.05$)。ZNF148^{FL}-Over express组及ZNF148^{AN}-siRNA组SW480细胞增殖能力增强, 而ZNF148^{FL}-siRNA组和ZNF148^{AN}-Over express组SW480细胞增殖能力下降(均 $P<0.05$)。ZNF148^{FL}-siRNA组、ZNF148^{AN}-Over express组穿膜SW480细胞数量及迁移活性显著下降, 而凋亡率显著上调; ZNF148^{FL}-Over express组和ZNF148^{AN}-siRNA组穿膜细胞数及迁移活性显著上调, 而凋亡率显著下调(均 $P<0.05$)。**结论:** ZNF148^{FL}表现为增加结直肠癌细胞的增殖、侵袭和转移活力, 而ZNF148^{AN}作用与之相反, ZNF148的ZNF148^{FL}与ZNF148^{AN}两种剪接体对于结直肠癌的恶性生物活性可能表现出了抑制作用。

[关键词] 锌指结构蛋白148; 可变剪接体; 结直肠癌; SW480细胞; 侵袭; 转移; 凋亡

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)012-1392-07

Roles of ZNF148 alternative splicing isoforms in occurrence and development of colorectal cancer

HE Ping¹, Gao Xianhua², XU Shuogui², DING Jie², KUANG Fei²(1. The 3rd Affiliated Hospital of Nanchang University Department of General Surgery, Nanchang 330008, Jiangxi, China; 2. Changhai Hospital, Emergency Department, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of two alternative splicing isoforms of zinc finger protein 148 (ZNF148) on the invasion and metastasis of colon cancer cells and the related mechanism. **Methods:** RT-PCR was used to determine the expression of two ZNF148 alternative splicing isoforms in human colorectal SW480 cells. ZNF148 interference vector and ZNF148 over-expression vector were constructed and transfected into SW480 cells; the groups are divided into ZNF148^{FL}- siRNA group, ZNF148^{FL}- Over express group, ZNF148^{AN}- siRNA group, ZNF148^{AN}-Over express group, Control siRNA group, Control Over express group and Normal control group. The mRNA expressions in each group were examined by RT-PCR; the proliferation, invasion, migration and apoptosis of SW480 cells were detected by MTT, Transwell, scratch assay and flow cytometry, respectively. **Results:** Two splicing isoforms (ZNF148^{FL} of 2 385 bp and ZNF148^{AN} of 2 004 bp) were obtained by RT-PCR. Compared with control group, the expression level of ZNF148^{FL} was significantly decreased while the expression of ZNF148^{AN} was increased in ZNF148^{FL}-siRNA group; The expression of ZNF148^{FL} was significantly increased while the expression of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81572332)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81572332)

[作者简介] 何平(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事结直肠癌基础和临床方面的研究, E-mail:jgshp2008@163.com

[通信作者] 况飞(KUANG FEI, corresponding author),博士生,主治医师,主要从事结直肠癌方面的研究, E-mail:15000789545@163.com

ZNF148^{AN} was significantly decreased in ZNF148^{FL}-Over express group. The expression of ZNF148^{AN} was significantly decreased while the expression of ZNF148^{FL} was increased in ZNF148^{AN}-siRNA group; the expression of ZNF148^{AN} was significantly increased while the expression of ZNF148^{FL} was decreased in ZNF148^{AN}-over express group. The proliferation of SW480 cells was increased in ZNF148^{FL}-over express group and ZNF148^{AN}-siRNA group, while the proliferation of SW480 cells was decreased in ZNF148^{FL}-siRNA group and ZNF148^{AN}-Over express group. The transmembrane cell number and migration ability of SW480 cells in the ZNF148^{FL}-siRNA group and ZNF148^{AN}-Over express group were significantly decreased, but the apoptotic rate was significantly increased; However, ZNF148^{FL}-Over Express group and ZNF148^{AN}-siRNA group showed the significantly increased transmembrane cell number and migration ability but decreased apoptosis rate (all $P < 0.05$). **Conclusion:** ZNF148FL could increase proliferation, invasion and metastasis of colorectal cancer cells, while ZNF148^{AN} showed opposite effect; the two splicing isoforms of ZNF148 may exert mutual antagonistic effect to each other on the malignant biological activities.

[Key words] zinc finger protein 148; variable splicing; colorectal cancer; SW480 cell; invasion; metastasis; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1392-1398. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.009]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是胃肠道中常见的恶性肿瘤疾病^[1-2],其发病率呈现逐年上升的趋势,在消化系统恶性肿瘤中仅次于胃癌、食管癌和原发性肝癌^[3]。细胞中Wnt信号通路的激活是小肠早期恶性病变的主要分子特征^[5]。上皮细胞分泌SFRP活性丧失,Wnt信号通路激活,可促进肿瘤转移^[6]。锌指结构蛋白(zinc finger protein,ZNF)广泛存在于真核及原核生物中,作为转录调控因子,选择性结合特异靶基因启动子序列中的双螺旋大沟锌指结构域^[7]。通过锌指结构直接作用于癌症抑制因子p53,通过其氨基末端间接作用于组蛋白乙酰转移酶和转录共激活因子P300^[8]。ZNF促进转录因子与同源DNA识别位点的结合或染色质的蛋白修饰^[9]。多数ZNF基因已经鉴定出了特异的靶基因序列。ZNF在细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生命活动中发挥着重要的作用^[10-11]。ZNF148参与细胞的增殖与死亡过程,在哺乳动物正常体细胞中表达量较低,在肿瘤细胞中表达水平较高^[12]。本课题前期研究显示,ZNF148对结直肠肿瘤的侵袭转移具有显著相关性。ZNF148具有两种不同的剪接体,分别是ZNF148^{FL}与ZNF148^{AN},ZNF148^{FL}包含有完整的794个氨基酸,ZNF148^{AN}缺失氨基端127个氨基酸,并且不同剪接体的作用机制尚未明确^[13-14]。本研究探讨体外ZNF148的两种不同可变剪接体对结直肠癌肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭转移的作用及其相应的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

人结肠癌SW480细胞购自上海诺百生物科技有限公司。脂质体2000购自美国Invigrogen公司,DMEM细胞培养基购自美国Sigma公司,噻唑蓝购自美国Promega公司,聚合酶链式反应(PCR)预混

料、pMD18-T克隆载体购自大连TaKaRa生物公司,胎牛血清(BB008)购自上海生工生物工程股份有限公司,DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国Promega公司,细胞裂解液、反转录试剂盒、DH5 α 大肠杆菌感受态购自北京鼎国生物有限公司,鼠抗人ZNF148^{FL}、ZNF148^{AN}抗体、羊抗鼠HRP抗体购自美国Abcam公司,各引物及重组干扰载体由上海吉玛生物公司合成,Annexin凋亡试剂盒购自杭州联科生物有限公司,生物安全柜、低温台式离心机购自德国Thermo公司。

1.2 细胞培养

复苏人结肠癌细胞SW480,以含有10%的胎牛血清的培养液进行重悬,转入培养箱中于37℃,5%CO₂条件下进行培养至对数生长期时消化,进行细胞传代、冻存。

1.3 RT-PCR和Western blotting检测ZNF148两种剪接体及其相应蛋白

提取人结肠癌细胞SW480总RNA,按照反转录试剂盒说明合成cDNA。根据NCBI中ZNF148基因(登录号NM_001348424.1)的mRNA序列进行RT-PCR引物设计,ZNF148^{FL}上游引物序列为ATGAACATTGACGACAACTGGA,ZNF148^{AN}上游引物序列为ATGAGAGACAAAAACAAATCAGAGA,ZNF148^{FL}与ZNF148^{AN}剪接体下游引物为TTAGCCAAAAGTCTGGCCAGTTGT。引物交由上海生工合成。按照RT-PCR试剂盒说明进行PCR引物扩增。

裂解细胞,提取总蛋白,进行SDS-PAGE。电泳完毕后切下含有目的条带的凝胶,放入电转仪后放入PVDF膜进行转膜,转膜后加入鼠抗人ZNF148^{FL}及ZNF148^{AN}抗体,加入羊抗鼠抗体,DAB显色试剂盒进行显色,观察目的蛋白条带颜色深浅初步判断蛋白量的高低。

1.4 ZNF148 干扰及过表达载体的构建

根据 NCBI 中 *ZNF148* 基因序列, 交由上海吉玛公司合成构建特异性干扰质粒 (ZNF148^{FL}-siRNA 和 ZNF148^{ΔN}-siRNA), 并构建阴性对照 (Control-siRNA)。根据 NCBI 中 *ZNF148* 基因序列, 使用 Primer5.0 软件设计引物, PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外成像仪下确定目的条带大小后切下目的条带, 使用凝胶回收试剂盒对 ZNF148^{FL} 和 ZNF148^{ΔN} 片段进行回收, 与 pMD18-T 克隆载体连接后转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态中, 扩增后使用质粒提取试剂盒提取重组质粒, 酶切鉴定后, 在紫外成像仪下切下目的条带, 使用凝胶回收试剂盒对 ZNF148^{FL} 和 ZNF148^{ΔN} 片段进行回收, 然后与过表达载体连接, 转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态中, 扩增后使用质粒提取试剂盒提取重组质粒, 酶切鉴定后, 大量提取重组过表达质粒 ZNF148^{FL}-Over express 和 ZNF148^{ΔN}-Over express。

1.5 重组载体转染 SW480 细胞

使用脂质体 2000 将 ZNF148^{FL}-siRNA、ZNF148^{ΔN}-siRNA 干扰质粒和 siRNA 阴性对照质粒、ZNF148^{FL}-Over express、ZNF148^{ΔN}-Over express 过表达质粒和 Over express 过表达载体对照组质粒转染至 SW480 细胞。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 mRNA 表达水平

干扰载体及过表达载体分别转染至 SW480 细胞后, 提取各组 SW480 细胞的总 RNA, 包括 ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{FL}-Over express 组、ZNF148^{ΔN}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组、Control siRNA 组、Control Over express 组以及 Normal control 组。使用逆转录试剂盒获得 cDNA 后行实时荧光定量 PCR 检测, 对各组 mRNA 表达水平进行检测。

1.7 MTT 法检测两种可变剪接体对结肠癌细胞增殖的影响

各组细胞制成细胞悬液, 以 2×10^3 /孔的数量接种于 96 孔板中, 接种剂量为 100 μ l, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度条件下进行培养。分别在培养 24、48 和 72 h 时收集各组细胞, 按照试剂盒说明进行 MTT 检测, 记录各组细胞在 492 nm 处光密度 (*D*) 值, 并计算细胞增殖水平。

1.8 Transwell 侵袭实验检测两种可变剪接体对结肠癌细胞侵袭的影响

将 Matrigel 在无菌操作台中进行冰浴融化, 使用 DMEM 培养基稀释, 以 50 ml/孔的剂量铺在 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 使 Matrigel 聚合成凝胶, 向孔中加入 DMEM 培养基 200 μ l 使胶重构。Transwell 下室中加入完全培养基 600

μ l, 向上室中加入细胞含有 1×10^5 个细胞的悬液 200 μ l, 培养 48 h 后取出上室弃去上室液体并擦去未穿过膜细胞, 固定染色后观察并计数细胞。

1.9 划痕实验检测检测两种可变剪接体对结肠癌细胞迁移的影响

取 6 孔细胞培养板, 在背部均匀的划直线, 每条直线间隔 1 cm 宽, 横穿过孔。每孔至少穿过 3 条直线。将各组细胞消化后使用配培养液制成细胞悬液, 以 1×10^5 /孔的数量接种于 6 孔板中, 过夜培养后细胞汇合率达到 100%, 采用 10 μ l 移液器头在培养皿用力均匀地划痕, 使用 PBS 洗涤, 清洗掉划下细胞, 加入无血清培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 12、24、48、72 h 后观察细胞运动距离。以时间为横轴, 迁移距离为纵轴作图 (单位 mm)。

1.10 流式细胞术检测两种可变剪接体对结肠癌细胞凋亡的影响

将细胞用胰酶消化后, 用 PBS 重悬, 稀释至 1×10^6 /ml 细胞, 取重悬细胞液, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明进行操作, 扩大培养后使用 BD 流式细胞仪检测各组凋亡细胞的数量。

1.12 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件统计资料, 进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时表示差异显著且具有统计学意义。

2 结果

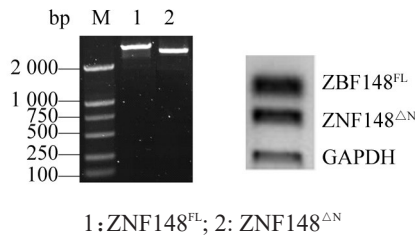
2.1 ZNF148 两种剪接体的检测

本研究针对于 ZNF148^{FL} 与 ZNF148^{ΔN} 两种不同剪接体, 设计扩增引物, 获得全长分别为 2 385 bp 以及 2 004 bp。PCR 产物经琼脂糖电泳检测, 可清晰分辨出两条长度不同的片段。Western blotting 实验结果显示人结肠癌细胞 SW480 中 ZNF148^{FL} 蛋白水平高于 ZNF148^{ΔN} (图 1)。

2.2 ZNF148 两种剪接体的干扰及过表达效果检测

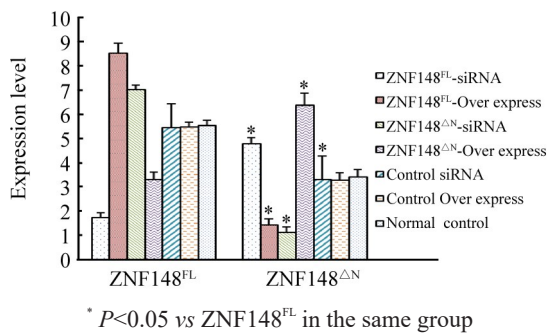
ZNF148^{FL}-siRNA 组 ZNF148^{FL} 的表达量明显下降, 但 ZNF148^{ΔN} 的表达水平却较正常对照组水平有所上升; ZNF148^{FL}-Over express 组 ZNF148^{FL} 的表达量明显上升, 而 ZNF148^{ΔN} 的表达水平却下降; ZNF148^{ΔN}-siRNA 组 ZNF148^{ΔN} 的明显下降, 但 ZNF148^{FL} 的表达水平有所上升; ZNF148^{ΔN}-Over express 组 ZNF148^{ΔN} 表达水平升高, 而 ZNF148^{FL} 的表达水平降低。ZNF148^{FL}-Over express 组、ZNF148^{ΔN}-siRNA 组的 ZNF148^{FL}、ZNF148^{ΔN} 的表达量与 ZNF148^{FL}-siRNA 组及 ZNF148^{ΔN}-Over express 组相比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), ZNF148^{FL}-Over express 组的 ZNF148^{FL}、ZNF148^{ΔN} 的表达量与 Normal control

组、Control Over express 组、Control siRNA 组相比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组的 ZNF148^{FL}、ZNF148^{ΔN} 的表达量与 Normal control 组、Control Over express 组、Control siRNA 组相比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。



1: ZNF148^{FL}; 2: ZNF148^{ΔN}
图 1 结肠癌细胞中 ZNF148 两种剪接体 PCR 扩增和蛋白表达水平

Fig.1 The PCR amplification and protein expressions of two ZNF148 splicing isoforms in colorectal cancer SW480 cells



* $P < 0.05$ vs ZNF148^{FL} in the same group
图 2 结肠癌细胞中 ZNF148 两种剪接体的干扰及过表达效果
Fig.2 Interference and over-expression of two ZNF148 splicing isoforms in colorectal cancer cells

2.3 ZNF148 两种剪接体对细胞增殖的影响

对各组人结肠癌细胞 SW480 进行干扰质粒转染后培养 24、48、72 h 的各时间检测细胞增殖活性, 其中 ZNF148^{FL}-Over express 组及 ZNF148^{ΔN}-siRNA 组人结肠癌细胞 SW480 细胞增殖明显升高, 而 ZNF148^{FL}-siRNA 组和 ZNF148^{ΔN}-Over express 组人结肠癌细胞 SW480 细胞增殖下降, ZNF148^{FL}-Over express 组及 ZNF148^{ΔN}-siRNA 组人结肠癌细胞 SW480 细胞增殖与 ZNF148^{FL}-siRNA 组和 ZNF148^{ΔN}-Over express 组相比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 显示 ZNF148^{FL} 对人结肠癌 SW480 细胞的增殖具有促进作用, 而 ZNF148^{ΔN} 却对人结肠癌 SW480 细胞的增殖发挥限制作用 (图 3)。

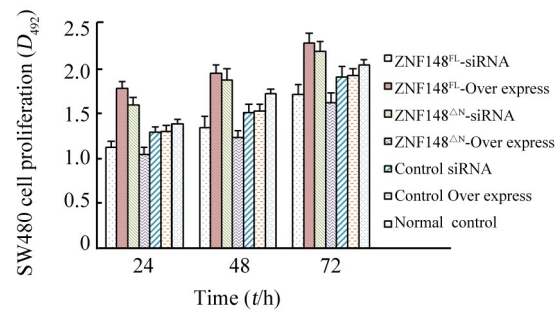


图 3 ZNF148 两种剪接体对结肠癌细胞增殖的影响
Fig.3 Effect of two ZNF148 splicing isoforms on proliferation of colorectal cancer cells

2.4 ZNF148 两种剪接体对细胞侵袭性的影响

ZNF148^{FL}-siRNA 组、Control-siRNA SW480 组与 SW480 组细胞在 Transwell 小室培养 48 h 后, 用结晶紫溶液染色并统计穿过膜的细胞数量。ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组平均每个视野穿过膜的细胞数量显著低于正常对照组, 而 ZNF148^{FL}-Over express 组和 ZNF148^{ΔN}-siRNA 组平均每个视野穿过膜的细胞数量明显高于正常对照组, 显示 ZNF148^{FL} 可以增加 SW480 细胞的侵袭性, 而 ZNF148^{ΔN} 则会降低 SW480 细胞的侵袭性 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 ZNF148 两种剪接体对细胞迁移活性的影响

通过对各组人结肠癌 SW480 细胞的迁移距离进行观察比较后显示, ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组人结肠癌 SW480 细胞的迁移活性低于正常对照组, 而 ZNF148^{FL}-Over express 组和 ZNF148^{ΔN}-siRNA 组 SW480 细胞的迁移活性高于正常对照组, 显示 ZNF148^{FL} 可以提高 SW480 细胞的迁移活性, 而 ZNF148^{ΔN} 则会降低 SW480 细胞的迁移活性 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.6 ZNF148 两种剪接体对细胞凋亡的影响

ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡率明显高于正常对照组, 而 ZNF148^{FL}-Over express 组和 ZNF148^{ΔN}-siRNA 组 SW480 细胞的凋亡率低于正常对照组, ZNF148^{FL}-siRNA 组、ZNF148^{ΔN}-Over express 组 24、48、72 h 的 SW480 细胞凋亡率与 ZNF148^{FL}-Over express 组、ZNF148^{ΔN}-siRNA 组、Normal control 组、Control Over express 组、Control siRNA 组相比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 显示 ZNF148^{ΔN} 具有促进 SW480 细胞凋亡的作用, 而 ZNF148^{FL} 则具有抑制 SW480 细胞凋亡的效果 (图 6)。

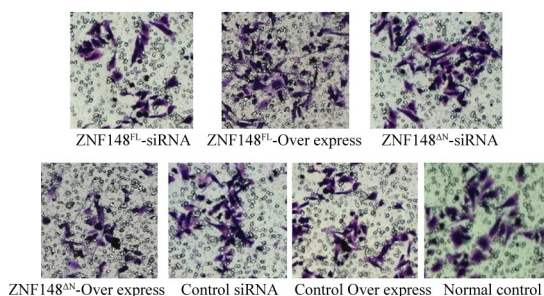


图4 ZNF148两种剪接体对结肠癌细胞侵袭的影响

Fig.4 Effect of two ZNF148 splicing isoforms on invasion of colorectal cancer cells

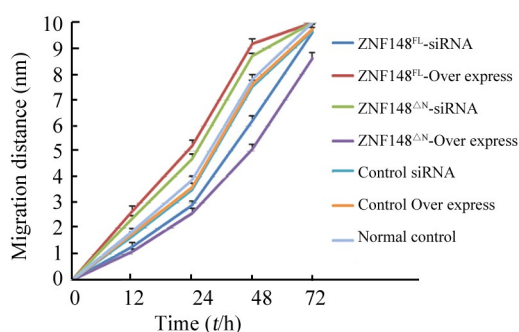
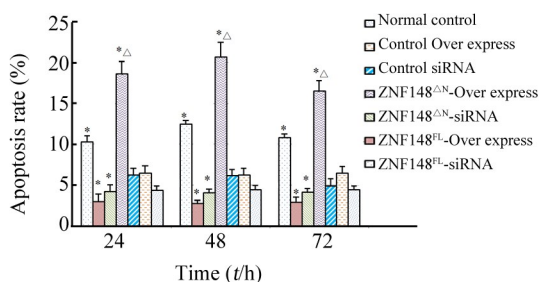


图5 ZNF148两种剪接体对结肠癌细胞迁移的影响

Fig.5 Effect of two ZNF148 splicing isoforms on metastasis of colorectal cancer cells



* $P < 0.05$ vs normal control; $\Delta P < 0.05$ vs ZNF148^{FL}-Over express, ZNF148^{ΔN}-siRNA, Normal control, Control Over express or Control siRNA group

图6 ZNF148两种剪接体对结肠癌细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of two ZNF148 splicing isoforms on apoptosis of colorectal cancer cells

3 讨论

ZNF148是一个锌指转录因子,在几乎所有哺乳动物的细胞中表达水平普遍较低,包括结直肠黏膜上皮细胞。有研究^[8]表明ZNF148参与调节细胞生长和死亡。ZNF148具有两种不同的剪切异构体,并且这两种剪接体的作用机制不同^[14]。本研究将主要通过体外实验验证ZNF148两个剪切异构体对结直肠癌细胞的不同作用及具体的分子机制。ZNF148的

两种不同剪接体ZNF148^{FL}与ZNF148^{ΔN}的全长分别为2 385 bp以及2 004 bp。在人结肠癌细胞中ZNF148^{FL}蛋白水平高于ZNF148^{ΔN}。ZNF148^{ΔN}缺失氮端127个氨基酸,因此其基因和蛋白都小于ZNF148^{FL}剪接体。通过结构分析,本课题确定了人类特有的ZNF148剪接异构体。David等^[7]研究结果证实,ZNF148^{ΔN}是对第四外显子上游启动子区域的不同剪切产生的。因此,相比较ZNF148的全长结构,ZNF148^{ΔN}缺失了部分蛋白转录结构域。

本研究结果表明,ZNF148^{FL}在人结肠癌SW480细胞中表达量较高,对人结肠癌细胞的增殖、迁移以及侵袭等生物过程都具有促进作用。当在人结肠癌细胞SW480中转染ZNF148^{FL}干扰质粒,沉默ZNF148^{FL}作用之后,细胞的增殖能力以及迁移、侵袭活性显著降低。而ZNF148的另外一种剪接异构体ZNF148^{ΔN}在人结肠癌SW480细胞中表达量较低,ZNF148的两种剪接体在结直肠癌发生发展中起着不同的作用机制。ZNF148两种剪接异构体ZNF148^{FL}和ZNF148^{ΔN}在人结肠癌SW480细胞中具有相互拮抗的作用,ZNF148^{FL}的表达量升高则降低了ZNF148^{ΔN}的表达量,促进人结肠癌SW480细胞增殖、迁移和侵袭;而ZNF148^{ΔN}的表达量升高则会降低ZNF148^{FL}的表达量,从而发挥促进人结肠癌SW480细胞凋亡的作用,抑制人结肠癌SW480细胞增殖、迁移和侵袭。

本研究中Control over express组和Control siRNA组人结肠癌SW480细胞的增殖、迁移和侵袭效果低于Normal control组,且凋亡率高于Normal control组,本研究认为是转染试剂脂质体2000对细胞产生了一定程度的毒性作用导致的。本研究中ZNF148^{ΔN}-Over express组人结肠癌SW480细胞转染后72 h的凋亡率低于转染后24和48 h,而转染后48 h的凋亡率高于24 h,可能是采用脂质体2000转染为瞬时转染,72 h后已经过了瞬时转染的表达高峰期,所以细胞内因过表达而明显升高的ZNF148^{ΔN}蛋白表达量72 h后低于24和48 h的表达量。

ZNF148的两种不同剪接体增加了遗传的多样性,不仅参与癌症的发生发展,对其他组织功能也具有调节作用。ZNF148直接或间接依赖p53诱导细胞生长停滞和细胞凋亡^[15]。人结肠癌细胞株在丁酸盐诱导培养过程中,ZNF148与p300形成结构复合体,在ZNF148末端氨基酸残基中还有一个p300发挥介导作用时的必须氨基酸残基^[9]。而ZNF148的剪接体中缺失这段氨基酸残基,因此失去了与p300结合的结构域,致使胃肠道内环境的稳定遭到破坏^[17]。小鼠体内实验结果证明^[10],p300结合结构域缺失的小鼠,

表现出生长延缓和寿命缩短。除此之外,小鼠的结肠炎症的发生率显著高于野生型小鼠。因此,ZNF148^{FL}还能够在一定程度上防止结肠炎症的发生^[9]。在ZNF148^{ΔN}基因敲除小鼠模型的雄性生殖细胞发育出现缺陷和功能障碍。雄性生殖细胞发育依赖于p53的介导作用,ZNF148^{ΔN}具有与p53相互作用的DNA结合域结构。因此ZNF148^{FL}的氮端p300结合结构对于对机体的生长发育不重要,但是在维持肠道功能中具有重要作用^[11]。

对于人结直肠癌的侵袭转移过程中,ZNF148^{ΔN}与ZNF148^{FL}存在着功能的拮抗性。其中全长的异构体ZNF148^{FL}通过与转录因子p300的结合,通过调节Wnt信号通路从而促进EMT的转变,而N端缺失的异构体ZNF148^{ΔN}则抑制ZNF148对Wnt信号通路的正调节功能,从而抑制结直肠癌的侵袭转移。

[参 考 文 献]

- [1] LAO V V, GRADY W M. Epigenetics and colorectal cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(12): 686-700. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.173.
- [2] LIDDLE R A, JIRTLE R L. Epigenetic silencing of genes in human colon cancer[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3): 960-962. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.07.028
- [3] FEARON E R. Molecular genetics of colorectal cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:479-507.
- [4] 马冬华, 龙腾, 王亚旭, 等. 磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶信号通路对结肠癌SW480细胞株的影响及其机制[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(8): 623-626. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2013.08.017
- [5] CLEVERS H, LOH K M, NUSSE R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control[J/OL]. *Science*, 2014, 346(6205): 1248012 [2017-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278615>. DOI: 10.1126/science.1248012
- [6] VERMEULEN L, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(5): 468-476. DOI: 10.1038/ncb2048
- [7] LAW D J, LABUT E M, ADAMS R D, et al. An isoform of ZBP-89 predisposes the colon to colitis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(5): 1342-1350. DOI: 10.1093/nar/gkl022
- [8] VAIPOULOS A G, ATHANASOULA K C, PAPAVALASSIIOU A G. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(7): 971-980. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.02.006.
- [9] BAI L, MERCHANT J L. Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39): 30725-30733. DOI: 10.1074/jbc.M004249200
- [10] SCHEPERS A G, SNIPPERT H J, STANGE D E, et al. Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas [J]. *Science*, 2012, 337(6095): 730-735. DOI: 10.1126/science.1224676.
- [11] SHEN S, PARK J W, LU Z X, et al. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(51): E5593-E5601 [2017-10-10]. <http://www.pnas.org/content/111/51/E5593.long>. DOI: 10.1073/pnas.1419161111.
- [12] SERVI J C S, ANTHONIE J, CONNY M A, et al. Truncating de novo mutations in the Krüppel-type zinc-finger gene ZNF148 in patients with corpus callosum defects, developmental delay, short stature, and dysmorphism[J/OL]. *Genome Medicine*, 2016, 8: 131 [2017-10-10]. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13073-016-0386-9>.
- [13] YE C G, LIU L, CHEN G G, et al. ZBP-89 reduces histone deacetylase 3 by degrading IkappaB in the presence of Pin1[J/OL]. *J Transl Med*, 2015, 13: 23 [2017-10-10]. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-015-0382-7>. DOI: 10.1186/s12967-015-0382-7.
- [14] HAHN S, HERMEKING H. ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial-mesenchymal transition, stemness, and cancer [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(6): 571-581. DOI: 10.1007/s00109-014-1160-3
- [15] MILLER J A, DING S L, SUNKIN S M, et al. Transcriptional landscape of the prenatal human brain[J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 199-206. DOI: 10.1038/nature13185.
- [16] GAO X H, LI J, LIU Y, et al. ZNF148 modulates TOP2A expression and cell proliferation via ceRNA regulatory mechanism in colorectal cancer[J/OL]. *Medicine*, 2017, 6(1): e5845 [2017-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5228706/>. DOI: 10.1097/MD.0000000000005845.
- [17] SOBREIRA N, SCHIETTECATTE F, VALLE D, et al. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(10): 928-930. DOI: 10.1002/humu.22844.
- [18] LELIEVELD S H, REIJNDERS M R, PFUNDT R, et al. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(9): 1194-1196. DOI: 10.1038/nn.4352.
- [19] GAO X H, LIU Q Z, CHANG W, et al. Expression of ZNF148 in different developing stages of colorectal cancer and its prognostic value: a large Chinese study based on tissue microarray[J]. *Cancer*, 2013, 119(12): 2212-2222. DOI: 10.1002/cncr.28052.
- [20] LAW D J, LABUT E M, MERCHANT J L. Intestinal overexpression of ZNF148 suppresses ApcMin/+ neoplasia[J]. *Mamm Genome*, 2006, 17(10): 999-1004. DOI: 10.1007/s00335-006-0052-4.

[收稿日期] 2017-10-11

[修回日期] 2017-12-01

[本文编辑] 韩丹