

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.003

ZEB1 EZH2 和 PTEN 在大肠癌自噬发生中的作用和意义*

任琳琳,洪洁,房静远[△](上海交通大学医学院附属仁济医院消化科/上海市消化疾病研究所/卫生部内科
消化重点实验室/癌基因及相关基因国家重点实验室 200001)

摘要:目的 明确多梳蛋白 EZH2 是否参与大肠癌自噬及其相关的调节机制。方法 使用 Western blot 及免疫组织化学的方法检测 ZEB1、EZH2 和 PTEN 表达水平;实时(real-time)PCR 检测 ZEB1、EZH2 和 PTEN 的 mRNA 水平;电镜观察细胞自噬的发生。结果 下调 EZH2 的表达可诱导大肠癌细胞自噬的发生;EZH2 通过调节 PTEN 的表达参与自噬的调控,同时 EZH2 及 PTEN 的表达受到 ZEB1 的调节;大肠癌组织中 ZEB1 和 EZH2 的表达明显高于正常肠黏膜组织,而正常肠黏膜组织 PTEN 的表达水平明显高于大肠癌组织。结论 大肠癌中 EZH2 的下调可以诱导大肠癌自噬的发生。ZEB1 正向调控 EZH2 的表达,进而影响 PTEN 参与肿瘤细胞自噬的调节。

关键词:结直肠肿瘤;自噬;EZH2;ZEB1;PTEN

中图分类号:R735.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)29-3855-03

ZEB1-mediated EZH2 overexpression promotes induction of autophagy via PTEN in colorectal cancer*

Ren Linlin, Hong Jie, Fang Jingyuan[△]

(Division of Gastroenterology and Hepatology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University/Shanghai Institution of Digestive Disease/Key Laboratory of Gastroenterology & Hepatology, Ministry of Health/State Key Laboratory of Oncogene and Related Genes, Shanghai 200001, China)

Abstract: Objective To investigate whether EZH2 participates in the process of autophagy and its regulatory mechanism in CRC (colorectal cancer). **Methods** ZEB1, EZH2 and PTEN expression were measured by Western blot and immunohistochemistry respectively. ZEB1, EZH2 and PTEN mRNA level were measured by real-time PCR. Electron microscopy was introduced to validate the existence of autophagy. **Results** Knockdown of EZH2 induced the formation of autophagosome in colorectal cancer cell lines, which was evident on electron microscopy. Furthermore, Western Blot and real-time PCR data showed that ZEB1 and EZH2 may regulate the expression of PTEN, which played a vital role in autophagy. Moreover, downregulation of ZEB1 significantly reduced the expression of EZH2. An inverse correlation between the expression of EZH2 and ZEB1, and the expression of PTEN was also revealed in CRC tissues, when compared with normal tissue in patients. **Conclusion** The impact of EZH2 on autophagy via PTEN during CRC carcinogenesis is revealed. At the same time, EZH2 expression may be regulated by ZEB1 in colorectal cancer.

Key words: colorectal neoplasms; autophagy; EZH2; ZEB1; PTEN

自噬是细胞在特定的情况下,通过双层膜包裹待降解物质形成自噬体,并利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质过程,这是真核细胞特有的生命现象。自噬现象最早是 Ashford 和 Porten 于 1962 年用电子显微镜在人的肝细胞中观察到。近年,随着酵母模型的建立和基因技术的发展,人们对自噬分子机制和形态特点的了解才逐渐深入。较早的研究将自噬分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬,最新的研究根据自噬的水平将其分为基础自噬及诱导自噬两大类。研究表明自噬与多种肿瘤的发生、发展存在密切的关系^[1-5]。越来越多的研究专注于肿瘤中自噬的调控机制研究,本研究拟通过机制探讨研究,了解大肠癌中自噬作用及调节机制,为完善肿瘤的治疗策略提供依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞、药物和试剂 人结肠癌细胞株 HCT116 和 SW1116 细胞购自美国 ATCC 公司,细胞使用含 10% 胎牛血清、100 μg/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液,置于 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的

细胞培养箱中培养。Trizol 试剂、RNA 逆转录及 real-time PCR 试剂盒购自大连宝生生物公司;所使用的 ZEB1、EZH2、PTEN 一抗购自 CST 公司,GAPDH 及二抗均购自康成生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒及 ECL 发光试剂盒购自美国 Pierce 公司;EZH2-siRNA、ZEB1-siRNA 及 control-siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成;PCR 引物由生工生物公司合成。

1.2 siRNA 转染及 RNA 提取 取对数生长期的细胞接种于 6 孔板内,细胞融合度为 30% 左右,以脂质体为载体分别转染相应的 siRNA(EZH2-siRNA 组、ZEB1-siRNA 组、control 组),培养 6~8 h 后将转染液吸出,加入完全培养基。24 h 后,收集细胞,PBS 洗 2 次,加入 Trizol,每孔 1 mL,每个样本加入 200 μL 氯仿后剧烈震荡 15 s,12 000 r/min 离心 15 min,离心后取上清液至新的离心管中,等体积异丙醇沉淀,70% 乙醇洗涤后干燥,使用适量的 DEPC 水溶解。

1.3 逆转录及实时(real-time)PCR 根据说明书逆转录 1 μg RNA,使用逆转录的 RNA 进行 real-time PCR 检测相应基因

mRNA 表达水平。以 GAPDH 为内参。

1.4 Western blot 检测相关蛋白表达 以不同的 siRNA 处理细胞 48 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液 50~100 μ L,冰上裂解 30 min,离心取上清,使用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量,100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,取 30 μ g 蛋白加入上样缓冲液,10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白后,电转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上,使用质量分数为 5% 的脱脂牛奶进行封闭 1 h,加入相应的一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。第 2 天取出 PVDF 膜, TBST 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween20) 洗 4 次,每次 5 min。加入二抗后孵育 1 h,洗 4 次,每次 5 min,ECL 发光试剂盒显影至胶片。

1.5 电镜标本的制备及观察 处理后的细胞收集至离心管内,使用预冷的 PBS 洗涤 2 次后吸干上清,加入 2.5% 戊二醛固定。样本送至上海交通大学医学院电镜室进行处理后制备成超薄切片染色,使用 TECANI10 透射电镜观察,高压 80 kV。

1.6 免疫组织化学染色及结果判断 应用链霉素抗生物素蛋白 2 过氧化物酶 (SP) 法,组织蜡块切片,烤片后脱蜡至水,微波抗原修复,余下步骤按照试剂说明书进行,抗体稀释度为 1:100,使用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。使用已知阳性切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。结果判断:细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。随机观察 5 个高倍视野或计数 500 个细胞。按照细胞核或细胞质内染色强度打分:无色记 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。按照阳性细胞百分比打分:阴性 0 分,<25% 阳性细胞 2 分,25%~<50% 阳性细胞 3 分,50%~<75% 阳性细胞 3 分, \geq 75% 阳性细胞 4 分。染色强度与阳性细胞百分比乘积为阳性评分。

1.7 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EZH2 对大肠癌细胞自噬的影响 在大肠癌细胞 HCT116 及 SW1116 细胞中电镜结果均可以发现,EZH2-siRNA 处理后细胞自噬明显增加,表现为透射电镜下自噬泡数量的增加,见图 1。

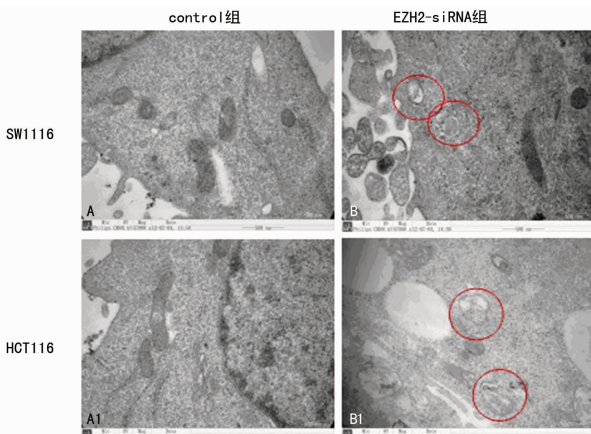
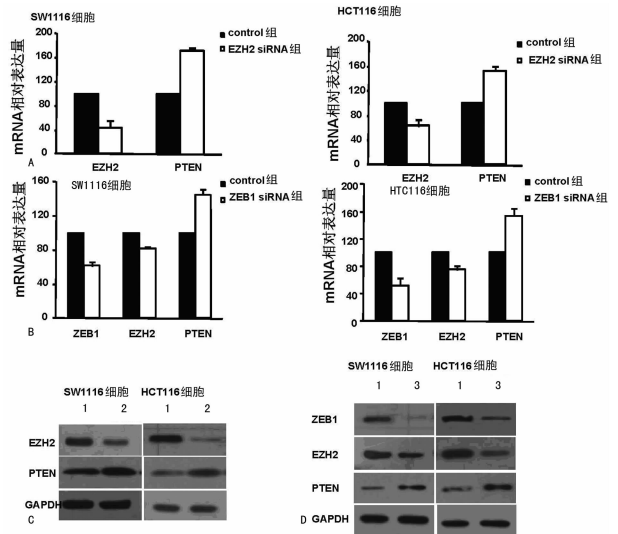


图 1 EZH2-siRNA 处理后电镜观察细胞自噬

2.2 EZH2 对自噬相关基因的调节 使用 EZH2-siRNA 处理细胞后可以发现 SW1116 细胞中 EZH2 表达量下调至 42%,同时相应的自噬关键基因 PTEN 表达量上调为原来的 1.8 倍,见图 2A,该结果在蛋白水平也得到相应的验证,见图 2C,

在 HCT116 细胞中也得到了良好的重复。

2.3 ZEB1 对 EZH2 及自噬相关基因的调控 使用 ZEB1-siRNA 处理细胞后可以发现 SW1116 细胞中 ZEB1 表达量出现明显下调,是原来表达量的 53% (图 2B),同时 ZEB1 的下调可以明显下调 EZH2,上调 PTEN 的表达量,蛋白水平验证也得到同样的结果 (图 2D)。HCT116 细胞中的实验也得出一致结果。



A: 下调 EZH2 表达后 PTEN mRNA 变化分析图; B: 下调 ZEB1 表达后 EZH2、PTEN mRNA 变化分析图; C: 下调 EZH2 表达后 PTEN 的蛋白变化; D: 下调 ZEB1 表达后 EZH2 及 PTEN 蛋白变化; 1. control 组; 2. EZH2-siRNA 组; 3. ZEB1-siRNA 组。

图 2 EZH2 的调控对自噬相关基因 PTEN 的调节

2.4 ZEB1、EZH2 及 PTEN 在大肠癌组织及正常肠黏膜组织的表达 收集 55 例健康者及 77 例大肠癌患者中相应标本行免疫组织化学检测相应指标的表达水平。其中 ZEB1 及 EZH2 表达主要定位于细胞核中,而 PTEN 的表达主要定位于细胞质中,见图 3。大肠癌组织中 ZEB1 高表达者 46 例 (58%),低表达者 31 例 (42%),而在正常肠黏膜组织中高表达者 18 例 (32%),低表达者 37 例 (68%),ZEB1 在大肠癌和正常肠黏膜组织中表达的差异有统计学意义 ($P=0.002$),见表 1。EZH2 在大肠癌组织中高表达者 52 例 (68%),正常肠黏膜组织中低表达者 33 例 (60%),也呈现肿瘤组织中表达明显高于正常肠黏膜组织的趋势 ($P=0.001$)。PTEN 的表达则呈现一个相反的趋势,在大肠癌组织中有 49 例 (64%) 是低表达,正常肠黏膜组织中的 39 例 (71%) 为高表达的,正常肠黏膜组织中的表达量明显高于大肠癌组织 ($P=0.001$)。

表 1 ZEB1、EZH2 和 PTEN 在正常及大肠癌组织中的表达 [n (%)]

蛋白	处理方式	正常肠黏膜组织	大肠癌组织	<i>P</i>
ZEB1	高表达	18(32)	46(58)	0.002
	低表达	37(68)	31(42)	
EZH2	高表达	22(40)	52(68)	0.001
	低表达	33(60)	25(32)	
PTEN	高表达	39(71)	28(36)	0.001
	低表达	16(29)	49(64)	

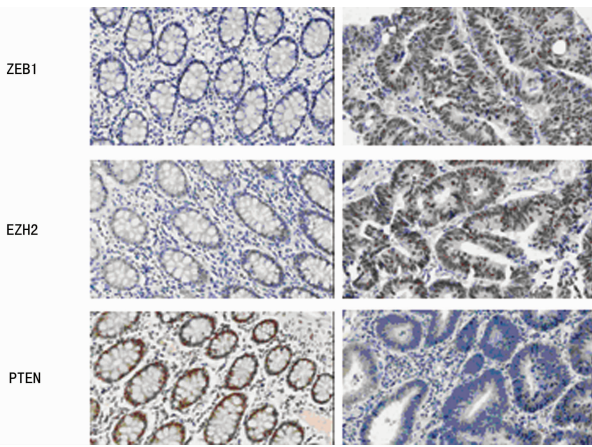


图 3 免疫组织化学检测大肠癌及正常肠黏膜组织中 ZEB1、EZH2 及 PTEN 的表达

3 讨 论

自噬是真核细胞特有的生命现象,它广泛存在于正常的生理过程。随着近年研究的开展,人们逐渐认识到自噬对蛋白质和细胞器的降解作用在生物体正常发育及应对环境威胁极为关键^[6]。尤其是伴随着越来越多的研究证明自噬与肿瘤的发生、发展存在密切的关系^[7-8],对于自噬过程中的信号传导及其对细胞生存的影响成为近年来的研究热门。

自噬对于肿瘤的影响较为复杂,既存在抑制作用,也有促进作用^[3]。在不同肿瘤中的研究表明大多数肿瘤细胞癌前存在自噬能力的升高,而癌变后自噬能力出现不同程度的减弱。癌前自噬能力升高可能是由于自噬对细胞的保护作用,减少 DNA 损伤及防止癌症的发生,而癌变后自噬能力的衰退可能利于肿瘤的发生、发展。这些结论提示,肿瘤细胞能够快速生长,很可能是由于打破了细胞内蛋白质合成速度与自噬体对蛋白质降解速率的平衡。另外,自噬除了抑制肿瘤外,还具有保护肿瘤细胞的作用。肿瘤发生后往往处于缺血缺氧的微环境中,此时肿瘤细胞的自噬作用可以通过及时清除有害的突变阻止其死亡,促进肿瘤细胞的存活,这就可以部分解释肿瘤化疗耐药性的发生机制^[8-9]。探讨不同阶段肿瘤细胞中自噬的作用及其调控机制对于进一步明确肿瘤的发病机制并开发特异性的靶向治疗药物具有重要的意义。

目前已有大量关于肿瘤自噬的机制研究开展,亦发现了多个肿瘤中自噬的调节通路及自噬调节的关键基因^[6-7,10-11]。但目前 EZH2 是否对肿瘤自噬存在调控及其调控机制在国际上没有相关的研究。本研究发现,组蛋白甲基转移酶 EZH2 在大肠癌中表达明显上调,可以明显抑制细胞自噬的发生。PTEN (10 号染色体缺失与张力蛋白同源的磷酸酶基因)是迄今第一个具有磷酸酶活性的较常发生突变的抑癌基因。PI3K/AKT (PKB)通路是自噬调节中的一个重要通路,PTEN 可以通过抑制该通路,上调细胞的自噬,在肿瘤的发生、发展中起重要的作用。本研究结果表明,EZH2 可以通过负调控 PTEN 的表达,调节细胞自噬。为了进一步明确 EZH2 的调节机制,我们进行了进一步的探索,结果显示 ZEB1 可以影响 EZH2 的表达,从而调控 PTEN 的表达,进而影响大肠肿瘤细胞的自噬。免疫组织化学的结果也进一步验证了该结果:在大肠癌中 ZEB1 和 EZH2 的表达明显上调,而 PTEN 的表达则呈现相反的趋势。

肿瘤的治疗是临床上的一个极其常见而又棘手的问题,它是如何发生的,其发生后又是如何在恶劣的微环境下维持生存并发生转移的,这些是亟待解决的问题,也是肿瘤治疗中的关键,肿瘤细胞的自噬可能是这些问题的答案。目前,自噬是肿瘤治疗中的新靶点^[12]。我们对于自噬调控机制的研究将为大肠癌的化疗提供新的策略,并为新药的研发提供理论依据。

参考文献:

- [1] Zhang MY, Gou WF, Zhao S, et al. Beclin 1 expression is closely linked to colorectal carcinogenesis and distant metastasis of colorectal carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (8):14372-14385.
- [2] Oliveira M, Reis FS, Sousa D, et al. A methanolic extract of *Ganoderma lucidum* fruiting body inhibits the growth of a gastric cancer cell line and affects cellular autophagy and cell cycle[J]. *Food Funct* 2014, 5(7):1389-1394.
- [3] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1):3-7.
- [4] Orfanelli T, Jeong JM, Doulaveris G, et al. Involvement of autophagy in cervical, endometrial and ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2014, 35(3):519-528.
- [5] Clarke R, Cook KL, Hu R, et al. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6):1321-1331.
- [6] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period[J]. *Nature*, 2004, 432(7020):1032-1036.
- [7] Shukla S, Patric IR, Patil V, et al. Methylation Silencing of ULK2, An Autophagy Gene, is Essential for Astrocyte Transformation and Tumor Growth[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(32):22306-22318.
- [8] Bracken A. Community nursing: let's integrate[J]. *Nurs Mirror*, 1978, 147(15):45.
- [9] Wei MF, Chen MW, Chen KC, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells[J]. *Autophagy*, 2014, 10(7):1179-1192.
- [10] Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344 (2):174-179.
- [11] Li F, Vierstra RD. Arabidopsis ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy[J]. *Autophagy*, 2014, 10 (8):1466-1467.
- [12] Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(3):647-651.