

PRL-3 调节 PI3K 信号通路在促进结肠癌细胞增殖侵袭中的作用

张建龙, 张萦斐, 张育超, 毛 凯, 陈 双*

(中山大学孙逸仙纪念医院普外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究肝再生磷酸酶-3 (PRL-3)的过表达与 PI3K 信号通路的调节及其与结肠癌细胞增殖侵袭的关系。【方法】构建稳定转染 PRL-3 基因和空白对照质粒的结肠癌细胞株 LoVo-PRL-3 和 LoVo-VC,用 qRT-PCR 和 Western blot 的方法对 miR-21 及其靶蛋白 PTEN 的表达进行检测,在稳转细胞株中转染 miR-21 或对其进行敲除,用 CCK-8、Tanswell 实验对细胞的增殖侵袭能力的变化进行研究。【结果】LoVo-PRL-3 细胞的增殖侵袭能力要强于对照组 LoVo-VC 细胞。在结肠癌细胞株 LoVo-PRL-3 中 miR-21 的表达上调而 PTEN 的表达被下调,在 LoVo-VC 细胞中过表达 miR-21 促进了细胞的增殖侵袭并降低 PTEN 的表达,而在 LoVo-PRL-3 细胞中敲除 miR-21 抑制了细胞的增殖侵袭并能部分恢复 PTEN 的表达。【结论】PRL-3 通过上调 miR-21 抑制 PTEN 的表达,调节了 PI3K 信号通路,从而促进了结肠癌细胞的增殖侵袭。

关键词: 肝再生磷酸酶-3; miR-21; PTEN

中图分类号: R735.35; R73-37

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)01-0016-06

PRL-3 Promotes Proliferation and Invasion of Colon Cancer Cells by Modulating PI3K Signal Pathway

ZHANG Jian-long, ZHANG Ying-fei, ZHANG Yu-chao, MAO Kai, CHEN Shuang*

(Department of General Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】 To explore the effect of PRL-3 on proliferation and invasion of colon cancer cells through PI3K signal pathway.【Methods】 We stably transfected PRL-3 expressing plasmid and empty plasmid into LoVo colon cancer cells and established two cell lines: LoVo-PRL-3 and LoVo-VC. We used qRT-PCR and Western blot to detect the expression of miR-21 and PTEN protein in these colon cancer cell lines. Transient transfection of miR-21mimic into LoVo-VC cells or transient transfection of miR-21 inhibitor into LoVo-PRL-3 cells were performed to evaluate the proliferation and invasive ability of these cells by CCK8 proliferating assay and transwell chamber assay.【Results】 PRL-3 promoted proliferation and invasion of LoVo-PRL-3 cells compared with LoVo-VC cells. In LoVo-PRL-3 cells, miR-21 was up-regulated and PTEN was down-regulated. Over-expression of miR-21 promoted proliferation and invasion of LoVo-VC cells and down-regulated PTEN, while knocking down of miR-21 or over-expression of PTEN inhibited proliferation and invasion of LoVo-PRL-3 cells and restore the expression of PTEN.【Conclusions】 Down-regulation of PTEN through up-regulating of miR-21 by PRL-3, which cumulating in enhancing signal of PI3K pathway, promoted proliferation and invasion of colon cancer cells.

Key words: PRL-3; miR-21; PTEN

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1): 16-21]

肝再生磷酸酶-3 (phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3) 是目前发现的与结肠癌转移相关

的一个重要基因。它通过促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭而加速了肿瘤的进展^[1-2]。这一现象可能

收稿日期:2012-05-27

基金项目:国家自然科学基金(81071761);广东省自然科学基金(10151008901000044);广东省医学科研基金(A2011171)

作者简介:张建龙,外科学博士,主治医师,研究方向:消化肿瘤,E-mail: fjohnkl@163.com; * 通信作者:陈双,教授,博士生导师,胃肠外科主任,E-mail: chensh2@mail.sysu.edu.cn

与 PI3K 通路的激活密不可分,PI3K 通路在调节细胞增殖、凋亡及细胞运动粘附方面具有广泛的作用,而 PTEN 是 PI3K 通路的一个重要上游抑制分子。microRNAs 属于非编码小 RNA,其在调节细胞生理和病理过程的各个方面都起着重要的作用。近期研究发现肿瘤细胞中激活的信号通路可直接引起某些 miRNAs 异常表达,故它们有可能是这些通路的下游靶点或效应分子。这些关键通路由许多异常表达的基因所激活,这些基因异常很难由小分子化合物靶向治疗且多数为低表达异常。基于此,如果这些通路异常调控的只是少数 miRNAs,就可以针对它们进行靶向治疗。经化学修饰或载体表达的 miRNAs mimic/inhibitor 在动物试验中已取得了不错的治疗效果。miR-21 是一种具有促癌作用的 microRNA,在许多肿瘤当中都存在异常表达的情况,它的下游靶蛋白之一即是 PTEN^[3-4]。目前尚未有 PRL-3 对促癌 microRNA 表达调节的报道,本实验通过检测 PRL-3 稳转细胞中 miR-21 及 PTEN 的表达探讨 PRL-3 促进结肠癌细胞转移的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

①质粒构建:pAcGFP-C3-PRL-3 质粒由上海生工公司构建。②细胞培养及转染试剂:细胞培养基 RIM1640,转染试剂 Lipofectamine 2000,转染混合液 Opti-MEM[®] I 均来自美国 Invitrogen 公司。胎牛血清来自美国 Hyclone 公司。③抗体:兔抗人 PRL-3 和兔抗人 PTEN 来自美国 CST 公司,GAPDH 兔抗人一抗和羊抗兔二抗来自武汉 Boster 公司。④RNA 提取及 PCR 试剂:Trizol 试剂来自美国 Invitrogen 公司,MicroRNA 检测试剂盒、miR-21 mimic 及 miR-21 inhibitor 来自上海吉玛公司。⑤其他耗材:G418 来自美国 Invitrogen 公司,CCK-8 来自武汉博士德公司,Transwell 小室来自美国 Corning 公司。

1.2 PRL-3 稳定表达的 LoVo 细胞系构建

取对数期生长的 LoVo 细胞,按照以 1×10^5 个/孔铺于 24 孔细胞培养板内,细胞贴壁后,在转染前 6~8 h 更换成无血清培养基。分别用 OPTI-MEM 培养基稀释目的质粒及 Lipofectamine2000,稀释后的 Lipofectamine2000 在室温下孵育 5 min,

与稀释好的目的质粒轻轻混合,室温再孵育 20 min。将上述混合液轻轻加入到培养板内,轻摇混匀,转染后 8 h 换成完全培养基。实验组转染 pAcGFP-C3-PRL-3 质粒,对照组转染空质粒 pAcGFP-C3。24 h 后行 G418 筛选,形成阳性单细胞克隆群落后,在显微镜下观察挑取阳性单细胞克隆培养,用于下一步鉴定。

1.3 提取细胞总 RNA

参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂说明书。

1.4 逆转录反应及 Real-time PCR 反应

采用上海吉玛公司提供的试剂盒,总反应体积 20 μ L,反应液配制在冰上进行,反应体系如下: Total RNA+ RNase Free dH₂O 13.85 μ L;dNTP (10 mmol/L)0.75 μ L;5 \times RT buffer 4 μ L;MiR-RT primer (1 μ mol/L 0.5 μ L;MMLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) 0.2 μ L。逆转录程序:16 $^{\circ}$ C 30 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 10 min。Real-time PCR 采用上海吉玛公司提供的 real-time PCR 试剂盒 (Hairpin-it miRNAs qPCR Quantitation Kit),反应体积 20 μ L,反应液配制在冰上进行,反应体系如下:2 \times Real-time PCR buffer 10 μ L;miR specific Primes set (5 μ mol/L)0.4 μ L;Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L;miRNA RT product 2 μ L;ddH₂O To 20 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,40 cycles of 95 $^{\circ}$ C 12 s,62 $^{\circ}$ C 40 s。

1.5 免疫印迹法检测 PRL-3 和 PTEN 蛋白的表达

PRL-3 和 PTEN 兔抗人一抗工作浓度为 1:1 000,GAPDH 兔抗人一抗工作浓度为 1:2 000 羊抗兔二抗工作浓度为 1:3 000。RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min,裂解产物(4 $^{\circ}$ C,12 000 \times g)离心 30 min,取上清,煮沸 5 min,在酶标仪上检测蛋白浓度,加入 loading buffer 上样至 SDS-PAGE 胶电泳分离后,PVDF 膜恒电流转 1 h,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,洗膜后(TBST 液,3 min \times 5 次)加入一抗 4 $^{\circ}$ C 下过夜,洗膜后(TBST 液,3 min \times 5 次)加入二抗室温孵育 1 h,洗膜后(TBST 液,3 min \times 5 次)加入 ECL 发光液,暗室曝光。

1.6 细胞瞬时转染

取对数期生长的细胞,按照以 1×10^5 个/孔铺于 6 孔细胞培养板内,细胞贴壁后,在转染前 6~8 h 更换成无血清培养基。分别用 OPTI-MEM 培养基稀释 microRNA 及 Lipofectamine2000,稀释后的 Lipofectamine2000 在室温下孵育 5 min,与稀释

好的目的质粒轻轻混合,室温再孵育 20 min。将上述混合液轻轻加入到培养板内,轻摇混匀,转染后 8 h 换成完全培养基。

1.7 平板克隆实验

细胞按照 50 个/皿接种于 60 mm 培养皿中,置于 37 °C 含体积分数为 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱培养 2 周,弃去培养液,PBS 洗 2 次,加入多聚甲醛固定 15 min,用结晶紫染色,观察克隆形成数目。

1.8 CCK-8 增殖实验

96 孔板加入每孔 100 μL,2 000 个细胞,设 3 个复孔,检测时点设为 24、48、72、96 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,空白对照为加入相应细胞培养液和 CCK-8 溶液的孔,在细胞培养箱中继续孵育 1 h,用 450 nm 波长酶标仪测定吸光度。

1.9 Transwell 小室侵袭实验

Transwell 上室底部预先包被 Matrigel 胶,每孔加入 1×10^5 个细胞,常规培养 24 h 后,小心擦去上室的 Matrigel 胶,置入 75% 酒精固定 15 min,结晶紫染色 15 min,PBS 反复漂洗,洗去多余的结晶紫。200 倍显微镜下观察,随机计数 5 个视野,取均值。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学软件分析。均值检验采用 Student's *t* test,以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 构建稳定表达 PRL-3 的 LoVo 细胞

实验组转染 pAcGFP-C3-PRL-3 质粒,对照

组转染空质粒 pAcGFP-C3。24 h 后行 G418 筛选,形成阳性单细胞克隆群落后,挑取克隆培养,最后得到稳定表达 PRL-3 mRNA 及蛋白的细胞株 LoVo-PRL-3 以及空载体对照细胞株 LoVo-VC (图 1)。

2.2 PRL-3 促进了 LoVo 细胞的增殖和侵袭

平板克隆实验显示 2 周后,VC 细胞中几乎无肉眼可见克隆形成,而 LoVo-PRL-3 细胞中可见数目不等的阳性克隆产生,这说明表达 PRL-3 的细胞其单细胞增殖能力强于 VC 细胞 (图 2 A); CCK-8 实验显示,在 72、96 h,PRL-3 及 PRL-3-2.2 细胞的吸光度明显高于 VC 细胞,具有统计学意义 ($P < 0.01$),说明表达 PRL-3 的细胞其群体细胞增殖能力强于 VC 细胞 (图 2 B); 在 transwell 小室侵袭实验中,穿过 Matrigel 胶进入下室面的 PRL-3 的细胞数量显著多于 VC 细胞,具有统计学意义 ($P < 0.01$),说明表达 PRL-3 的细胞相比 VC 细胞有着更强的侵袭能力 (图 2 C)。

2.3 LoVo-PRL-3 细胞中 miR-21 的表达上调而 PTEN 的表达被抑制

用 qRT-PCR 和 western blot 的方法对 miR-21 及其靶蛋白 PTEN 的表达进行检测,在 LoVo-PRL-3 细胞中 miR-21 的表达上调而 PTEN 的表达被抑制 (图 3)。

2.4 PRL-3 诱导 miR-21 的异常表达促进了 LoVo 细胞的增殖侵袭,并且抑制了 PTEN 的表达

我们在空载体对照细胞 LoVo-VC 中瞬时转染 miR-21 的拟似物 (miR-21 mimic),结果显示,在 CCK-8 细胞增殖实验中,过表达 miR-21 相比

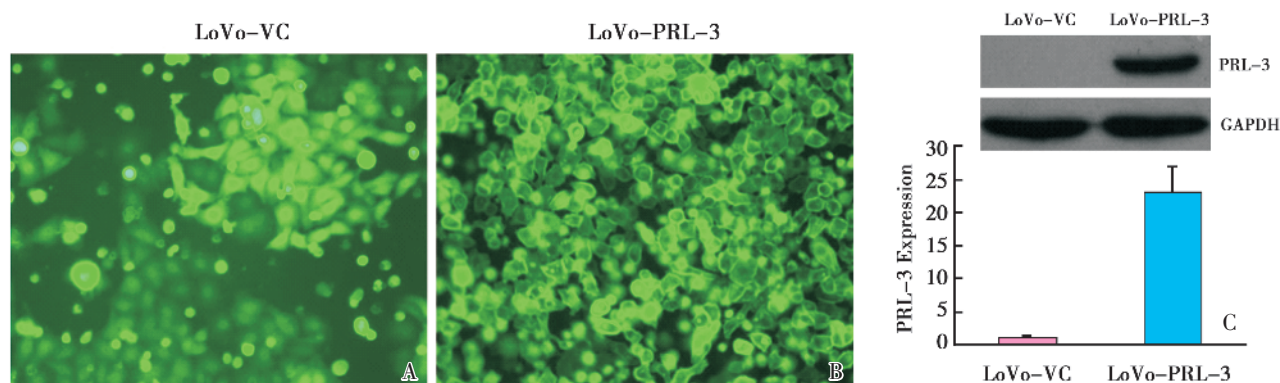


图 1 稳定表达 PRL-3 的 LoVo 细胞株的构建

Fig.1 Establishment of PRL-3 stably expressing LoVo cells

A: GFP expression of pAcGFP-C3 and pAcGFP-C3-PRL-3 (200×); B: mRNA expression of PRL-3; C: protein expression of PRL-3

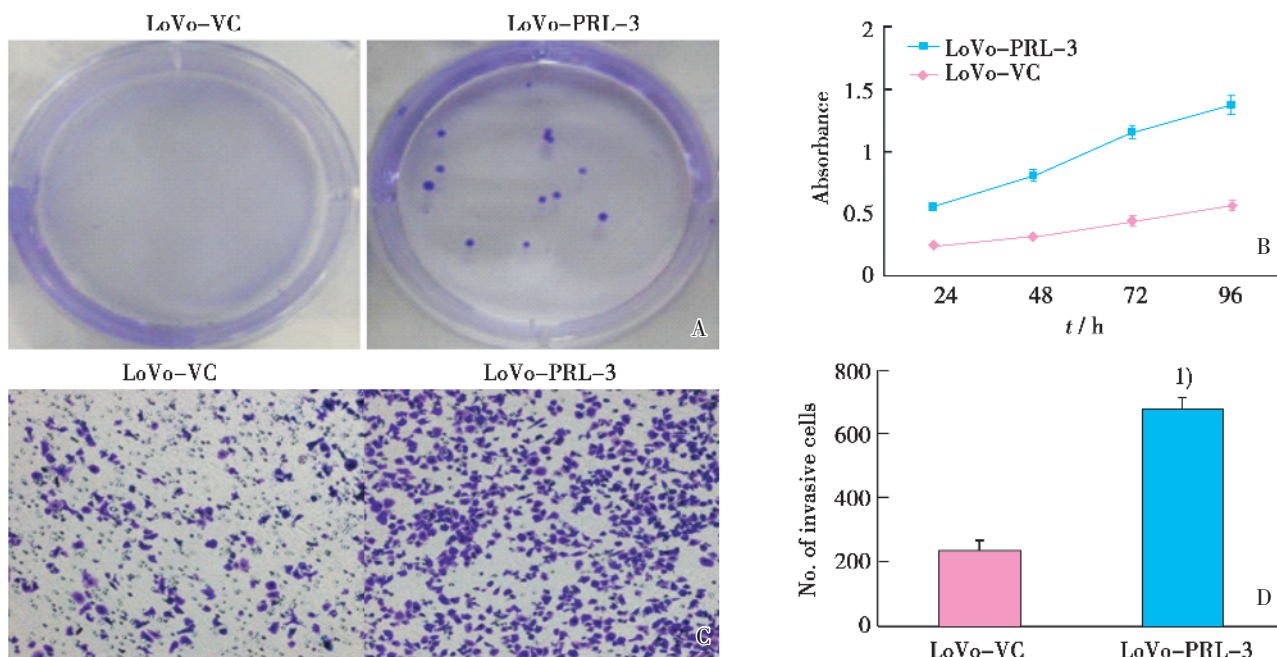


图 2 LoVo-PRL-3 和 LoVo-VC 细胞的增殖和侵袭实验结果

Fig.2 Proliferation and invasive assays of LoVo-PRL-3 and LoVo-VC cells

A: PRL-3 promoted proliferation of LoVo cells in colony formation assay; B: PRL-3 promoted proliferation of LoVo cells in CCK-8 proliferation assay on 72 h and 96 h ($P < 0.01$); C, D: PRL-3 promoted invasion of LoVo cells in transwell chambers invasion assay, 200 \times , 1) $P < 0.01$.

转染阴性对照 nc 的 LoVo-VC 细胞, 其增殖能力明显提高, 有统计学意义(图 4A, $P < 0.01$)。同样的, 在 transwell 小室侵袭实验中, 过表达 miR-21 相比转染阴性对照 nc 的 LoVo-VC 细胞, 其侵袭能力明显提高, 有统计学意义(图 4B, $P < 0.01$)。

相反地, 我们在 LoVo-PRL-3 细胞中, 转入

miR-21 的 inhibitor, 其增殖侵袭能力明显下降(图 5, $P < 0.05$)。

我们在空载体对照细胞 LoVo-VC 中瞬时转染 miR-21 的 mimic, 明显下调 PTEN 蛋白的表达。相反地, 我们在 LoVo-PRL-3 细胞中, 转入 miR-21 的 inhibitor, 部分恢复了 PTEN 的表达(图 6)。

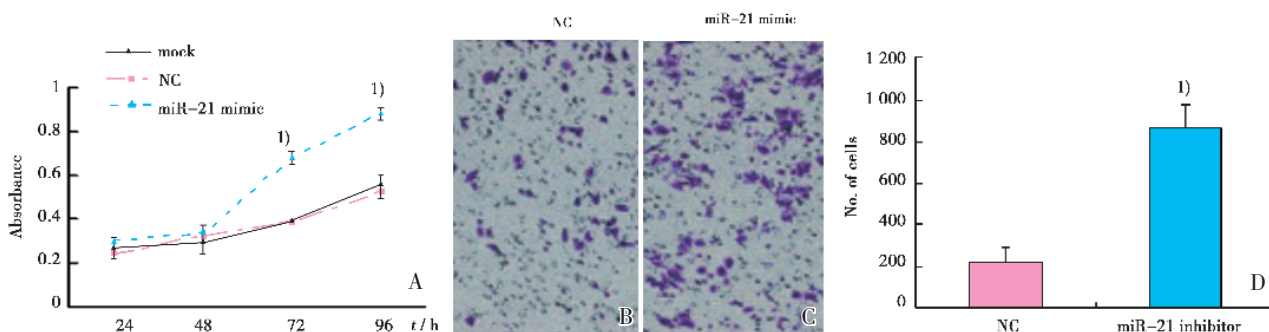


图 4 LoVo-VC 细胞中瞬时转染 miR-21 后的增殖和侵袭实验结果

Fig.4 Proliferation and invasive assays of LoVo-VC cells after transient transfected with miR-21mimic

A: miR-21 mimic promoted proliferation of LoVo-VC cells in CCK-8 proliferation assay on 72 h and 96 h (mock: lipofectamine only; nc: negative control of miR-21 mimic; $P < 0.01$); B, C: miR-21 mimic promoted invasion of LoVo-VC cells in transwell chambers invasion assay (200 \times , $P < 0.01$)

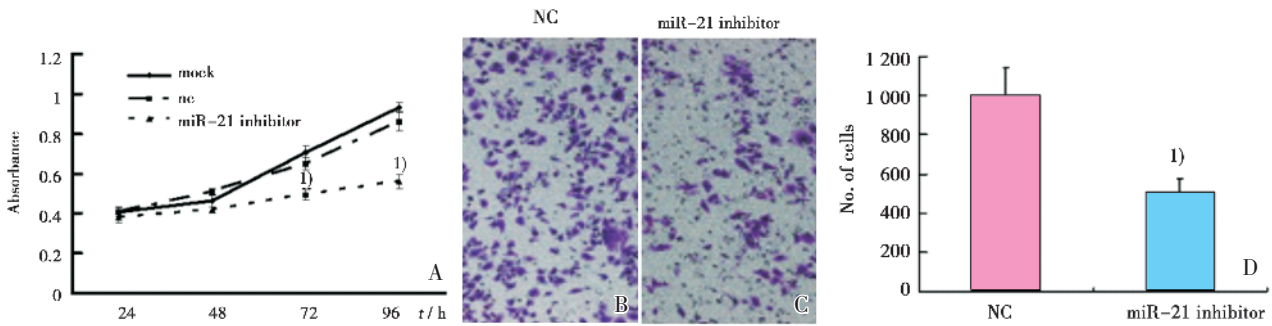


图 5 LoVo-PRL-3 细胞中瞬时转染 miR-21 inhibitor 后的增殖和侵袭实验结果

Fig.5 Proliferation and invasive assays of LoVo-PRL-3 cells after transient transfected with miR-21 inhibitor

A: miR-21 inhibitor antagonized proliferation of LoVo-PRL-3 cells in CCK-8 proliferation assay on 72 h and 96 h(mock; lipofectamine only; nc: negative control of miR-21 inhibitor; 1) $P < 0.05$); B, C: miR-21 inhibitor antagonized invasion of LoVo-PRL-3 cells in transwell chambers invasion assay, 200 ×, 1) $P < 0.05$.

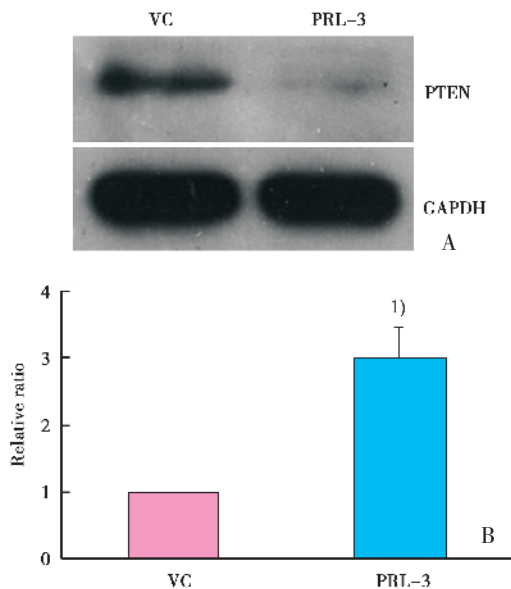


图 3 miR-21 及 PTEN 在 LoVo 稳转细胞株中的表达

Fig.3 Expression of miR-21 and PTEN in LoVo cells

A: PRL-3 inhibit the protein expressions of PTEN; B: PRL-3 elevated the miR-21 expressions level, 1) $P < 0.05$.

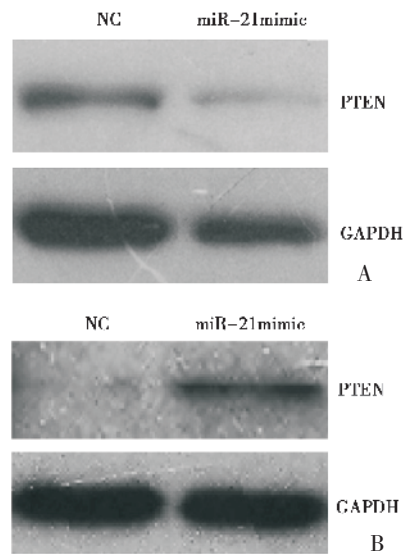


图 6 miR-21 对 PTEN 蛋白表达的影响

Fig.6 The effect of miR-21 on protein expression of PTEN

A: miR-21 mimic down-regulated the expression of PTEN protein in LoVo-VC cells; B: miR-21 inhibitor partly restored the expression of PTEN protein in LoVo-PRL-3 cells.

3 讨论

PRL-3 与肿瘤的生长和转移有着密切的关系^[1-2,5],但目前对其的内在机制仍不清楚。有学者发现在结直肠癌的几乎所有转移灶(肝、肺、脑、卵巢)中 PRL-3 表达明显升高^[6],而且,与原发肿瘤、良性病变、正常结肠上皮的基因表达谱比较, PRL-3 是唯一高表达的基因^[7]。有学者对 236 例

结肠癌手术标本行免疫组化检测癌旁组织 PRL-3 的表达,并与随访结果行统计学分析,发现在早期结肠癌患者中,PRL-3 作为独立的预后指标,与无瘤生存呈负相关^[8]。由此可见,PRL-3 在消化道肿瘤转移中扮演着重要的角色。我们的实验结果也显示,在 LoVo 结肠癌细胞中过表达 PRL-3 促进了癌细胞的增殖和侵袭。

PTEN 是经典的抑癌基因之一,其突变或缺失

与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关。PTEN 的作用机制在于它对 PI3K 通路的调控。而 PI3K 通路在调节细胞凋亡、增殖方面发挥着广泛的作用。PTEN 能使 PIP3 去磷酸化,从而负调控 PI3K 细胞通路,促进细胞凋亡,抑制细胞分裂增殖,诱导细胞分化,抑制了肿瘤细胞生长^[9]。此外,PTEN 通过调节 PI3K 通路还能抑制肿瘤的侵袭和转移^[10]。我们的结果表明,PRL-3 的异常表达对 PTEN 的抑制作用明显,这说明 PI3K 通路参与了 PRL-3 所介导的促癌效应。

MicroRNAs 通过对信使 RNA 的直接抑制或降解,从而在转录后水平调控了细胞内基因的表达。miR-21 是结肠癌中表达上调最常见的 miRNA,PDCD4、PTEN、SPRY2 等都是受其调控的靶基因^[3-4, 11]。目前,尚未有 MicroRNAs 在 PRL-3 的促癌进程中发挥作用的研究报道。我们的实验结果揭示,在 LoVo 结肠癌细胞中过表达的 PRL-3 通过上调 miR-21 的表达促进了癌细胞的增殖、迁移和侵袭。而这一效应是通过 miR-21 对 PTEN 的抑制来实现的,其结果是促进了 PI3K 通路的信号传导。

参考文献:

- [1] Wu X, Zeng H, Zhang X, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164 (9): 2039-2054.
- [2] Zeng Q, Dong JM, Guo K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(6): 2716-2722.
- [3] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA -21 (miR -21) post -transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(8): 2128-2136.
- [4] Kong L, Li Q, Wang L, et al. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas [J]. *Neuropathology*, 2007, 27(9): 516-521.
- [5] Li Z, Zhan W, Wang Z, et al. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(9): 229-237.
- [6] Bardelli A, Saha S, Sager JA, et al. PRL-3 expression in metastatic cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (7): 5607-5615.
- [7] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer [J]. *Science (New York)*, 2001, 294(8): 1343-1346.
- [8] Xing X, Peng L, Qu L, et al. Prognostic value of PRL-3 overexpression in early stages of colonic cancer [J]. *Histopathology*, 2009, 54(8): 309-318.
- [9] van Duijn PW, Ziel-van der Made AC, van der Korput JA, et al. PTEN-mediated G1 cell-cycle arrest in LNCaP prostate cancer cells is associated with altered expression of cell-cycle regulators[J]. *Prostate*, 2010, 70(2): 135-146.
- [10] Dasari VR, Kaur K, Velpula KK, et al. Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway[J]. *PloS one*, 2010, 5: e10350.
- [11] Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 3153-3161.

(编辑 徐杰)