

## PCBP2 在肠癌中的表达及功能意义

朱忠诚<sup>1</sup>, 余昌俊<sup>1</sup>, 陈昌裕<sup>2</sup>, 郑强<sup>1,3</sup>, 康伟彪<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 RNA 结合蛋白 PCBP2 在肠癌组织中的表达及其对肠癌细胞增殖和克隆形成的调节作用。方法 采用免疫组化法检测 50 对肠癌中 PCBP2 的表达水平及其与临床各病理资料的关系, 随访 4 年观察 PCBP2 的表达对生存时间的影响。将靶向 PCBP2 的特异性小干扰 RNA 运用脂质体介导转染法转染至肠癌细胞 HCT116 中, 用 CCK-8 增殖实验和克隆形成实验检测 PCBP2 对肠癌细胞增殖和克隆形成的影响。结果 相较于癌旁正常黏膜, 肠癌中 PCBP2 表达量明显增高 ( $P=0.001$ ), 且与淋巴结转移 ( $P=0.031$ ) 和肿瘤的分期有关 ( $P=0.045$ ), 与患者性别、肿瘤的大小和分化无关 ( $P>0.05$ ); 高表达 PCBP2 的肿瘤患者无论是无复发生存 ( $P=0.039$ ) 还是总生存时间 ( $P=0.037$ ) 均小于 PCBP2 低表达的患者。抑制 PCBP2 的表达后, 肠癌细胞的增殖 ( $P<0.05$ ) 和克隆形成能力 ( $P<0.05$ ) 明显减弱。结论 PCBP2 在肠癌组织中高表达, PCBP2 的高表达与临床分级密切相关, 下调 PCBP2 的表达可以抑制肠癌细胞的增殖和克隆形成, 为肠癌预后评估和有效治疗提供新靶点。

**关键词** 肠癌; RNA 结合蛋白; PCBP2; 增殖; 克隆形成

中图分类号 R 735.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0786-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.026

自 RNA 被转录形成以后并不是以独立的形式存在于细胞内并发挥作用。细胞内大量的蛋白质与这些 RNA 相结合形成核糖核蛋白, 在这一过程中, RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 发挥了重要作用。Poly (rC) 结合蛋白 2 [Poly (rC) binding protein 2, PCBP2] 是 Poly (rC) 结合家族的一种具有多功能适配蛋白, 先前的研究主要集中于其参与病毒的转录后调控和翻译水平。近年来的研究<sup>[1]</sup> 表明, PCBP2 在肿瘤中既能促进肿瘤的生长, 也可以

在某些肿瘤中低表达, 可能也扮演了抑癌基因的角色。但目前关于肠癌组织中 PCBP2 的表达水平及临床意义的研究尚未见报道, PCBP2 调控肠癌的发展和转移的机制仍然未知。该研究检测了肠癌组织及邻近的肠黏膜中 PCBP2 中的表达, 旨在探讨 PCBP2 对肠癌细胞增殖能力的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2014 年 2~6 月安徽医科大学第一附属医院胃肠外科三病区收治的肠癌患者 50 例, 并随访 4 年。年龄: 37~82 ( $58.33 \pm 13.64$ ) 岁, 男 36 例, 女 14 例; 直肠癌 19 例, 结肠癌 31 例 (右半结肠 17 例, 乙状结肠 12 例, 横结肠 2 例); 高分化 9 例, 中分化 27 例, 低分化 14 例; 所有患者术前均未接受抗肿瘤治疗, 术后病理经安徽医科大学第一附属医院病理科医师明确诊断。肿瘤学分型和分期均根据 WHO (2006 版) 标准, 本实验经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会审核通过。

**1.2 细胞与试剂** 肠癌细胞 HCT116 细胞由中国科学技术大学提供, DMEM 高糖培养液、胎牛血清、L-谷氨酰胺和无 EDTA 的胰蛋白酶均购自美国 Life Technology 公司; 苏木精染色液购自福州迈新生物技术有限公司, 三氯甲烷、EDTA、无水乙醇、二甲基亚砷和异丙醇购自上海国药集团化学试剂有限公司; 6 孔和 96 孔板购自上海圣纳堡生物科技开发有限公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司; 转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; HRP 标记的二抗和鼠来源的 Actin 一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔来源的 PCBP2 一抗购自美国 lifespanspan 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 免疫组化** 肠癌组织及其邻近的正常黏膜组织固定包埋后连续切片, 将连续切片 ( $5 \mu\text{m}$  厚) 置于涂有 10% 聚赖氨酸的载玻片上。这些切片在二甲苯中脱蜡, 然后通过梯度酒精重新水化。高温和高压可增强免疫反应性, 故将这些切片在高压灭菌器中的中煮沸 20 min 以回收抗原, 过氧化氢 (0.3%) 封闭内源性过氧化物酶活性。甩干多余的

2020-01-09 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2018ZD017)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院胃肠外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 南昌大学第一附属医院普外六科, 南昌 330006

<sup>3</sup> 安徽医科大学第一附属医院麻醉科, 合肥 230022

作者简介: 朱忠诚, 男, 硕士研究生;

余昌俊, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail:

yuchangjun321@163.com

血清,滴加抗PCBP2抗体(1:200)4℃孵育过夜,使用过氧化物酶-抗过氧化物酶方法对所有载玻片进行处理。最后,将玻片用苏木精复染色,脱水,然后固定在树脂支架上。在奥林巴斯显微镜下观察染色的切片。每张切片选取5个不同视野,由两名主治以上的病理科医师相互、独立地根据染色强度和阳性细胞百分率来进行评分。半定量染色强度分析PCBP2的表达水平0-4级分别为阴性、弱阳性(<30%),中等阳性(30%~60%),强阳性(>60%)。免疫组化结果评分定义为染色强度×染色阳性细胞百分率的评分所得;免疫组化评分≥3定义为表达,<3定义为不表达。

**1.3.2 细胞培养** 肠癌细胞HCT116用DMEM培养基进行培养,加入10%胎牛血清、链霉素100 μg/ml和青霉素100 U/ml,置于5% CO<sub>2</sub>的加湿细胞培养箱中进行孵育培养,温度控制在37℃。

**1.3.3 细胞转染** 用Lipofectamine 2000进行细胞瞬时转染(根据试剂商提供的说明进行),PCBP2 siRNA由上海生工合成,siRNA起始序列:CATCAC-TATTGCTGGCATT,空白对照组为:TTCTCCGAAT-GTCACGT。

**1.3.4 Western blot** 肠癌细胞HCT116转染72 h以后,用裂解液裂解细胞,提取细胞中的总蛋白并测出蛋白的浓度。取40 μg的蛋白样品在的SDS-PAGE中进行电泳后将蛋白转至PVDF膜,并置入的脱脂奶粉中常温封闭1 h,再根据说明书要求的比例稀释一抗4℃的条件下孵育蛋白条带过夜。至第2 d用TBST洗去多余的一抗,并加入稀释过的HRP(1:4 000)标记过的二抗在常温下进行孵育2 h,最后再用化学发光法(ECL)检测蛋白的表达量,验证PCBP2转染的有效性。本试验重复3次。

**1.3.5 克隆形成实验** HCT116细胞经过瞬时转染48 h以后用胰酶消化并计数,取6孔板细胞培养板一块,每个孔接种细胞约1 000个,加入培养液为2 ml,为了减少误差,每次设置3个平行孔,摇晃6孔板使细胞均匀分散,置于培养箱培养。每隔2天换1次培养基保证细胞生长所需营养并观察细胞,连续培养2周。PBS清洗两遍出去细胞残渣和培养液,多聚甲醛固定细胞并过夜。用结晶紫染色1 h,计数细胞克隆的数量并且拍照,每次设置3个重复孔,本试验重复3次。

**1.3.6 MTT实验** HCT116细胞经过瞬时转染48 h以后用胰酶消化并计数,取96孔细胞培养板5块,每个孔中加入转染并计数的HCT116细胞大约

1 000个,加入MTT试剂(MTT:含10%的胎牛血清为1:9)100 μl,为了减少误差设置6个平行孔,轻轻摇晃使细胞均匀铺于底部。周围加入PBS液减少水分蒸发对细胞生长造成的影响,置入培养箱进行培养。分别在培养后每隔24 h并且连续5 d检测每个孔中570 nm波长的吸光度(optical density, OD)值,作细胞增殖曲线,本实验重复3次。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。定量资料以K-S法进行正态性检验,符合正态分布的数据采用均值±标准差描述集中趋势,比较采用t检验,不符合正态分布的数据采用中位数(四分位数间距)描述集中趋势,比较采用Wilcoxon秩和检验。定性资料采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肠癌中PCBP2的表达及其与临床病理特征的关系** PCBP2在肠癌中的阳性率为72%,而在正常黏膜中的阳性率仅为40% ( $P = 0.001$ ),见表1;PCBP2的表达与肠癌的淋巴结转移情况 ( $P = 0.031$ )和病理分期相关 ( $P = 0.045$ ),与患者的年龄、肿瘤的大小以及肿瘤细胞的分化程度无明显相关性 ( $P > 0.05$ ),见表2。

表1 PCBP2在结直肠癌和正常癌旁组织中的表达 [ $n = 50$   $n(\%)$ ]

组别	阴性	阳性
结直肠癌	14 (28)	36 (72)*
癌旁组织	30 (60)	20 (40)

与癌旁组织比较: \*  $Z = 10.390$   $P < 0.05$

表2 PCBP2表达水平与结直肠癌患者临床病理特征相关性分析

临床特征	$n$	PCBP2 阳性表达 [ $n(\%)$ ]	$Z$ 值	$P$ 值
年龄(岁)				
≤55	15	9 (60.0)	1.531	0.216
>55	35	27 (77.1)		
肿瘤直径(cm)				
≤5	33	25 (75.8)	0.680	0.410
>5	17	11 (64.7)		
淋巴结转移				
无	31	19 (61.3)	4.641	0.031
有	19	17 (89.5)		
肿瘤分化				
高分化	9	5 (55.6)	1.657	0.437
中分化	27	21 (77.8)		
差分化	14	10 (71.4)		
肿瘤分期				
I+II	28	17 (60.7)	4.020	0.045
III+IV	22	19 (86.4)		

2.2 PCBP2 的表达与术后生存时间的关系 术后 4 年随访发现 ,PCBP2 表达阳性的患者 ,无论是无复发生存时间 ( $P = 0.039$ ) 还是总生存时间 ( $P = 0.037$ ) 均小于 PCBP2 表达阴性的患者 ,见图 1。

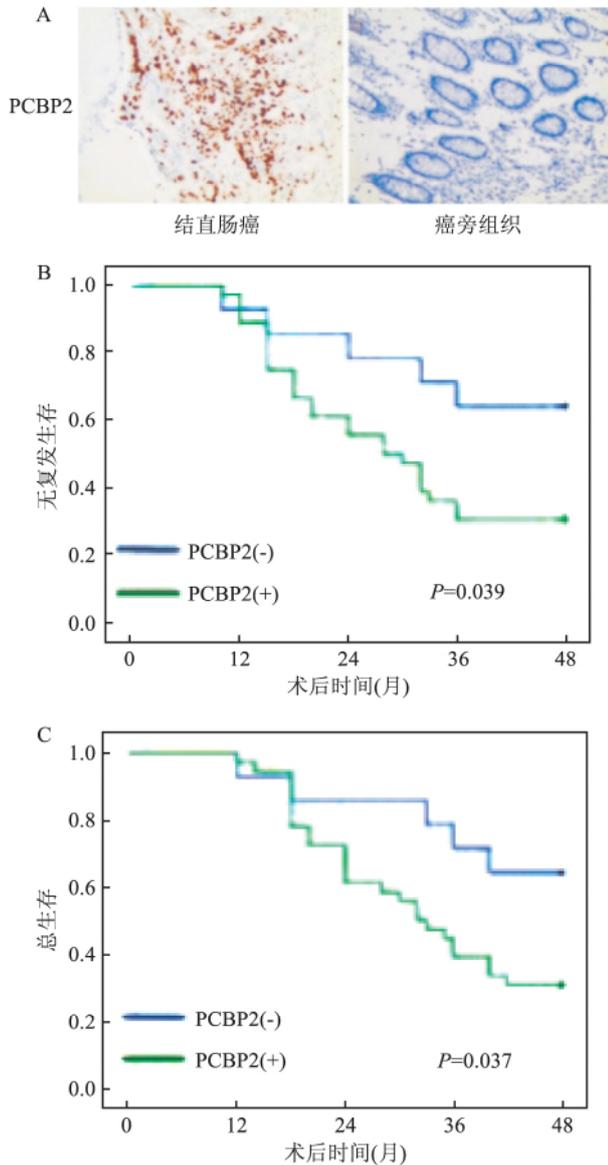


图 1 PCBP2 在肿瘤组织和对应癌旁正常黏膜中的表达及生存时间  $\times 200$

A: PCBP2 在肠癌中表达阳性; B: PCBP2 表达阳性的患者术后无复发生存时间小于 PCBP2 表达阴性的患者; C: PCBP2 表达阳性的患者术后总生存时间小于 PCBP2 表达阴性的患者

2.3 PCBP2-siRNA 的转染效率 转染了 siPCBP2 的肠癌细胞 HCT116 中的 PCBP2 的表达量明显下降 ( $P < 0.05$ ) ,见图 2A。

2.4 转染 siPCBP2 对肠癌细胞增殖的影响 肠癌细胞 HCT116 细胞中的 PCBP2 被抑制后第 1 至 5 天每天检测 OD 值 ,显示 PCBP2 的低表达抑制了

HCT116 细胞的增殖 ,对照组与实验组结果差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ,见图 2B。

2.5 转染 siPCBP2 对肠癌细胞克隆形成的影响 HCT116 细胞转染了 siPCBP2 后 ,细胞的克隆形成能力明显减低 ,细胞形成集落数明显少于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ) ,见图 2C。

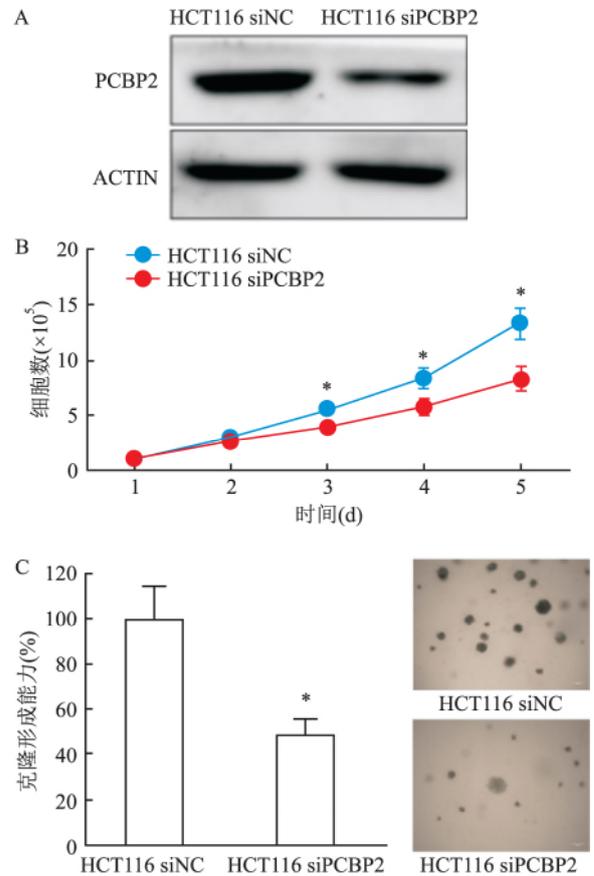


图 2 PCBP2 对肿瘤细胞增殖和克隆形成的影响

A: 干扰了 PCBP2 后其蛋白量下降; B: 干扰了 PCBP2 后细胞增殖能力受抑制; C: 干扰了 PCBP2 后细胞克隆形成能力受抑制

### 3 讨论

PCBP2 是 RNA 结合蛋白家族的一员 ,参与了 mRNA 的稳定、翻译的沉默和加强。以往对于 PCBP2 的研究主要集中在与病毒的相互作用上 ,近几年的研究发现 ,PCBP2 在肿瘤的发生和发展中也扮演了重要的角色。本研究显示 ,PCBP2 在肠癌中高表达 ,且高表达的患者无瘤生存和总生存时间均短于 PCBP2 不表达的患者 ,这表明 PCBP2 可以作为肠癌预后评估的因素。国内外的一些学者也发现 ,PCBP2 在大部分的实体瘤中高表达 ,且其高表达预示着不良的预后。他们发现 PCBP2 在胃癌<sup>[2-3]</sup>、肝

癌<sup>[4]</sup>、脑胶质瘤<sup>[5]</sup>、食道癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>等肿瘤中表达增加,可能扮演了癌基因的角色。但也有学者研究发现,PCBP2在口腔癌<sup>[8]</sup>中表达下调,这与我们的研究结果及大部分的在肿瘤中的研究结果相反,这可能是由于基因的多功能性导致其在不同的肿瘤的功能不同。

在PCBP2的功能研究中,课题组发现,抑制PCBP2的表达可以有效地抑制肠癌细胞的增殖和克隆形成能力,提示内源性的PCBP2对肠癌细胞的生长具有促进作用。在对其他肿瘤的研究中,Han et al<sup>[5]</sup>研究发现,PCBP2通过FHL3来促进胶质瘤细胞的生长。Chen et al<sup>[2]</sup>通过对胃癌细胞的研究发现,PCBP2通过作用于CDK2来增强胃癌细胞的生存能力;同样地在胃癌中,Hu et al<sup>[3]</sup>发现,同样地促进胃癌细胞的生长,PCBP2是通过作用于miR-34a来发挥其癌基因的活性。

#### 参考文献

- [1] Hong S. RNA Binding Protein as an emerging therapeutic target for cancer prevention and treatment [J]. *J Cancer Prev* 2017 22(4): 203-10.
- [2] Chen C, Lei J, Zheng Q, et al. Poly( rC) binding protein 2 (PCBP2) promotes the viability of human gastric cancer cells by regulating CDK2 [J]. *FEBS Open Bio* 2018 8(5): 764-73.
- [3] Hu C E, Liu Y C, Zhang H D, et al. The RNA-binding protein PCBP2 facilitates gastric carcinoma growth by targeting miR-34a [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014 448(4): 437-42.
- [4] Zhang X, Hua L, Yan D, et al. Overexpression of PCBP2 contributes to poor prognosis and enhanced cell growth in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep* 2016 36(6): 3456-64.
- [5] Han W, Xin Z, Zhao Z, et al. RNA-binding protein PCBP2 modulates glioma growth by regulating FHL3 [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 2103-18.
- [6] Ye J, Zhou G, Zhang Z, et al. Poly ( C) -binding protein 2 (PCBP2) promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) through regulating cellular proliferation and apoptosis [J]. *Pathol Res Pract* 2016 212(8): 717-25.
- [7] Li F, Bullough K Z, Vashisht A A, et al. Poly( rC) -binding protein 2 regulates hippo signaling to control growth in breast epithelial cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2016 36(16): 2121-31.
- [8] Roychoudhury P, Paul R R, Chowdhury R, et al. HnRNP E2 is downregulated in human oral cancer cells and the overexpression of hnRNP E2 induces apoptosis [J]. *Mol Carcinog* 2007 46(3): 198-207.

## Expression and the effect of PCBP2 in colorectal cancer

Zhu Zhongcheng<sup>1</sup>, Yu Changjun<sup>1</sup>, Chen Changyu<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University Nanchang 330006

**Abstract Objective** To investigate the expression of RNA binding protein Poly( rC) binding protein 2 (PCBP2) in colorectal cancer tissues and its regulatory effect on proliferation and clone formation of colorectal cancer cells. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of PCBP2 in 50 pairs of colorectal cancer and its relationship with clinical pathological data. The effect of PCBP2 expression on survival time was observed during four years of follow-up. Specific small interfering RNA targeting PCBP2 was transfected into HCT116 cells by liposome-mediated transfection and the effect of PCBP2 on proliferation and clone formation of colorectal cancer cells was detected by CCK-8 proliferation assay and clone formation assay. **Results** Compared with the normal adjacent mucosa to the cancer, the expression of PCBP2 in colorectal cancer was significantly increased ( $P = 0.001$ ), and was associated with lymph node metastasis ( $P = 0.031$ ) and tumor stage ( $P = 0.045$ ). But there was no significant correlation between the PCBP2 expression level and gender, size, cell differentiation ( $P > 0.05$ ). Patients with high expression of PCBP2 survived shorter time of recurrence-free survival ( $P = 0.039$ ) or overall survival ( $P = 0.037$ ) than patients with low PCBP2 expression. After inhibiting the expression of PCBP2, the proliferation ( $P < 0.05$ ) and clone forming ability ( $P < 0.05$ ) of colorectal cancer cells were significantly attenuated. **Conclusion** PCBP2 is highly expressed in colorectal cancer tissues. The high expression of PCBP2 is closely related to clinical grade. Down-regulation of PCBP2 expression can inhibit the proliferation and clone formation of colorectal cancer cells, providing a new target for prognosis evaluation and effective treatment for colorectal cancer.

**Key words** colorectal cancer; RNA binding protein; PCBP2; proliferation; clone formation