

ERBIN 调控 PDZD2 蛋白表达 对结直肠癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响

盛仁明¹ 蔡为民¹ 段鸿梅¹ 孙丽娜² 涂健²

摘要 目的 探讨结直肠癌组织中表皮生长因子受体 2 相互作用蛋白(ERBIN)和包含盘状同源区域蛋白 2(PDZD2)蛋白的表达及临床意义,以及 ERBIN 和 PDZD2 对结直肠癌进展的影响及相应机制。方法 采用免疫印迹法检测来自 86 对结直肠癌组织样本(癌组织组)和对应距肿瘤边缘 5 cm 的癌旁正常组织(癌旁组织组)、正常人结肠成纤维细胞系(CCD-48Co)和人结直肠癌细胞系(SW480、HCT116、SW620 和 HT29)中 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的表达;结直肠癌细胞 SW620 和 HCT116 转染 ERBIN 或 PDZD2 过表达载体后,MTT 法检测细胞增殖,Transwell 法检测细胞侵袭,流式细胞术检测细胞凋亡,免疫荧光化学观察 ERBIN 或 PDZD2 蛋白在 SW620 细胞中的表达,蛋白质免疫共沉淀实验检测 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的相互作用。结果 结直肠癌组织中 ERBIN 和 PDZD2 的表达水平低于癌旁组织($P < 0.01$),结直肠癌细胞中 ERBIN 和 PDZD2 的表达水平低于 CCD-48Co 细胞($P < 0.01$);ERBIN 蛋白的表达水平与结直肠癌 TNM 分期和淋巴结转移相关联($P < 0.001$),PDZD2 蛋白的表达水平与结直肠癌的浸润深度和分化程度显著相关($P < 0.001$);ERBIN 或 PDZD2 过表达后,结直肠癌 SW620 和 HCT116 细胞增殖和侵袭能力降低($P < 0.01$),细胞凋亡升高($P < 0.01$);ERBIN 和 PDZD2 蛋白可直接结合,ERBIN 过表达可提高 PDZD2 蛋白的表达水平。结论 ERBIN 通过调控 PDZD2 蛋白的表达,抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭,促进凋亡。

关键词 结直肠癌;ERBIN;PDZD2;临床病理学;细胞增殖和侵袭

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1933-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.015

据报道 2018 年世界约有 185 万新确诊结直肠癌病例和 88 万死亡病例,约占癌症病例总数的十分

之一^[1]。目前,常规结直肠癌治疗方法具有强烈副作用,患者 5 年生存率仍然很低^[2]。因此,检测结直肠癌特异性生物标志物对于癌症的诊断和治疗非常重要。有研究^[3]表明表皮生长因子受体 2 相互作用蛋白(erbB2 interacting protein,ERBIN)在结直肠癌患者组织和细胞系表达下调,ERBIN 干扰可促进 HT29 细胞增殖和侵袭。包含盘状同源区域蛋白 2(PDZ domain containing 2,PDZD2)是一种普遍表达的多 PDZ 域蛋白^[4]。PDZD2 表达上调与胰腺癌患者更好的生存预后相关^[5]。而 PDZD2 在结直肠癌中的作用尚无明确报道。有研究^[6]表明 PDZD2 和 ERBIN 蛋白在 293T 细胞中形成复合物,并且 ERBIN 蛋白在上皮细胞侧膜上与 PDZD2 共定位。由此推测 ERBIN 可能与 PDZD2 蛋白存在相互作用。该研究采用免疫印迹法检测 ERBIN 和 PDZD2 在结直肠癌中的表达,探讨二者的相互作用对结直肠癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,为结直肠癌药物干预靶点的发现提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选取 2017 年 10 月—2020 年 2 月常熟市第一人民医院符合标准的结直肠癌患者共计 86 例作为研究对象,患者均行结直肠癌根治术,术中留取癌组织样本(癌组织组),并选取距离肿瘤边缘 5 cm 的癌旁正常组织作为对照(癌旁组织组)。将组织保存至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱用于提取蛋白。本研究经常熟市第一人民医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则。

1.1.2 纳入与排除标准 纳入标准:① 患者首发肿瘤;② 临床病理资料完整;③ 患者经临床、病理学检查确诊为结直肠癌;④ 患者术前未进行化疗、靶向治疗及生物治疗等其他治疗;⑤ 无严重心脏、肝、肾功能障碍。排除标准:① 患者临床病理资料不完整;② 有肿瘤远处转移,且预计生存期 < 3 个月者;③ 近期有抗菌药物或免疫制剂应用史;④

2022-09-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82072690)

作者单位:¹苏州大学附属常熟医院(常熟市第一人民医院)病理科,常熟 215500

²苏州大学附属第二医院病理科,苏州 215004

作者简介:盛仁明,男,本科,主治医师;

涂健,男,硕士,副主任医师,责任作者,E-mail: tu-jian654321@126.com

有免疫系统疾病、糖尿病、高血压等慢性疾病史。

1.1.3 主要仪器与试剂 兔多克隆 ERBIN 抗体(货号: ab247081)和兔单克隆 PDZD2 抗体(货号: ab79405)购自英国 Abcam 公司;兔多克隆 α -Tubulin 抗体(货号: P10006)购自北京百奥莱博科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔酶标二抗(货号: CST. 5151p)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG(货号: A32731)购自美国 Thermo 公司;lipofectamine 2000 试剂购自美国 Merck 公司;pcDNA3.1-ERBIN 过表达载体、pcDNA3.1-PDZD2 过表达载体和对应空载体 Vector 购自美国 Invitrogen 公司;pRK5 质粒和 Flag、HA 和 Myc 标签抗体购自美国 Millipore 公司;24 孔 Transwell 培养板购自美国 Millipore 公司;基底胶购自美国 BD 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;pRK5-Myc-ERBIN 和 pRK5-Flag-PDZD2 质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司构建;正常人结肠组织细胞 CCD-48Co 和人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 购自武汉普诺赛细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 HEK293T 细胞购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;噻唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]染色液购自上海炎熙生物科技有限公司;ECL 发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。凝胶成像分析仪购自美国 Thermo 公司;共聚焦激光扫描显微镜 FV-3000 购自日本 OLYMPUS 公司;光学倒置显微镜购自日本尼康公司;酶标仪购自美国 ELX800 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 正常人结肠组织细胞 CCD-48Co 和人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 均培养在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 细胞培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中。待细胞贴壁后,将细胞培养基更换为无血清培养基,向细胞培养液中加入混合均匀的 lipofectamine 2000 试剂和 pcDNA3.1-ERBIN 过表达载体或 pcDNA3.1-PDZD2 过表达载体,将细胞培养基置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 4~6 h,随后更换细胞培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基,继续培养 24 h 后进行后续检测。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞,用胰蛋白酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基配置成适合浓度的细胞悬液。将细胞接种到 96 孔细胞培养板中,每孔接种 1 000 个细胞,设置 6 个平行孔,放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。在细胞培养的第 0、24、48 和 72 h 时分别加入 20 μ l MTT 溶液(5 mg/ml),于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,吸出培养液并加入 150 μ l DMSO,待结晶全部溶解后,使用酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值,以 A 值表示各组细胞增殖活性。

1.2.3 细胞侵袭实验 使用 24 孔 Transwell 培养板评估 SW620 和 HCT116 细胞的侵袭能力。将细胞铺在涂有基底胶的上室进行细胞侵袭测定。用胰蛋白酶消化细胞后,以 1×10^6 /ml 密度将细胞接种到含 1% 胎牛血清的上室中,每孔加入 200 μ l 细胞悬液,并将含有 5% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基置于下室中。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h。取出小室并弃去孔中培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)轻柔清洗小室,随后用甲醛固定 30 min,用 0.1% 结晶紫染色 20 min,用棉签擦拭去除上室上表面的细胞,用光学倒置显微镜计算 8 个随机视野迁移到过滤器下侧的细胞来量化趋化性。

1.2.4 流式细胞术 使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒根据说明书上的操作步骤检测 SW620 和 HCT116 细胞凋亡。细胞处理后收集所有细胞,1 000 r/min 离心 5 min,使用 PBS 洗涤后 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,洗涤 2 次。将 1×10^6 个细胞重悬于含有 200 μ l Binding Buffer 的无菌 EP 管中,向每管加入 10 μ l Annexin V-FITC,盖紧瓶盖并漩涡混匀,在室温条件下将 EP 管置于暗盒中避光反应 15~30 min,再向每管中加入 5 μ l PI,在 30 min 内进行上机检测,使用流式细胞仪分析检测结果。

1.2.5 Western blot 实验 使用 RIPA 蛋白提取试剂盒提取患者组织及各处理组细胞总蛋白,并使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将提取的蛋白置于 98 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸 8 min 使蛋白完全变性,用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳 2 h。电泳结束后用蛋白转膜仪将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 1 h, TBST 洗膜完成后,用一抗 ERBIN(1:2 500 稀释)、PDZD2(1:500 稀释)和 α -Tubulin(1:2 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔酶标二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h,洗膜完成后在 ECL 中显色。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度

值/内参 β -actin 条带灰度值。

1.2.6 蛋白免疫共沉淀实验 运用生物信息学工具 HitPredict (<http://www.hitpredict.org/index.html>) 预测与 ERBIN 相互作用的蛋白。HEK293T 细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,待细胞长至 80%,分别加入浓度为 1 mg/ml 质粒(pRK5-Myc-ERBIN、pRK5-Flag-PDZD2 和空载体)在饥饿条件下进行转染 24 h 后吸取培养液,加入 1 ml PBS 并刮取细胞转移至 1.5 ml EP 管中,吸取 100 μ l 细胞悬液作为 input。将剩余的细胞悬液以 6 000 r/min、室温离心 2 min,去上清液,加入 1 ml 细胞裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L β 甘油磷酸酯, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 μ g/ml 亮抑酶肽, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟)充分混匀,以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 1 min,去上清液,加入预冷 PBS 重悬,重复 3 次后加入等体积 PBS 充分混匀,取预混液加入 ERBIN 抗体(5 μ g/mg)或 PDZD2 抗体(1:50)和阴性对照 IgG 抗体(10 μ l/200 μ l)进行反应,然后用免疫印迹法分析。

1.2.7 免疫荧光实验 将 SW620 细胞接种在培养皿上,使用 4% 多聚甲醛固定 20 min,加入含 0.5%

Triton X-100 的 PBS 渗透 5 min,加入含 3% BSA 的 PBS 液在室温下封闭 1 h。将细胞与 ERBIN (1 μ g/ml) 或 PDZD2 (1:500) 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。然后加入硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG (2 μ g/ml) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与细胞孵育 1 h,然后用 4',6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)与细胞室温孵育 5 min。使用 FV-10 ASW 1.7 Viewer 图像分析软件处理图片和共聚焦激光扫描显微镜 FV-3000 分析荧光。

1.3 统计学处理 用 SPSS 25.0 进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 Student's *t* 检验,多组间比较采用方差分析,相关性分析采用 Pearson χ^2 检验。每个实验至少重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERBIN 和 PDZD2 蛋白在结直肠癌患者组织和细胞系中的表达变化 与癌旁组织组比较,患者癌组织组中 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CCD-48Co 细胞比较,人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 中 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

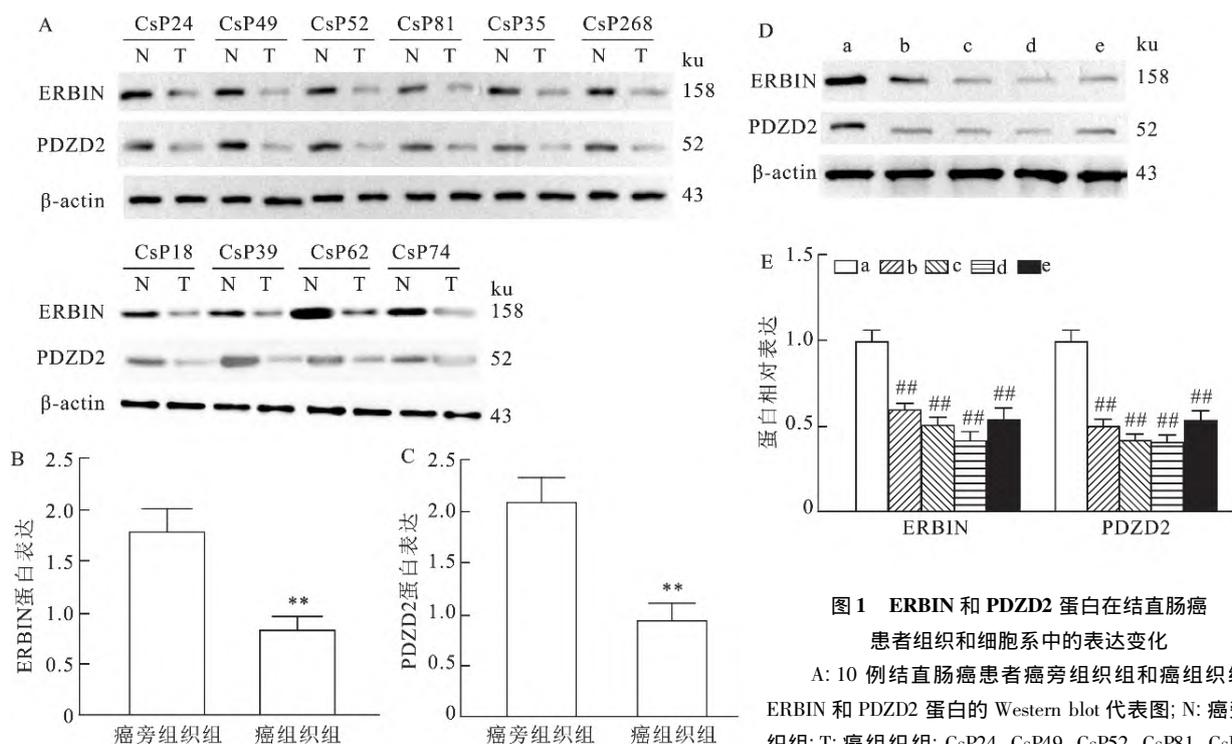


图1 ERBIN 和 PDZD2 蛋白在结直肠癌患者组织和细胞系中的表达变化

A: 10 例结直肠癌患者癌旁组织组和癌组织组中 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的 Western blot 代表图; N: 癌旁组织组; T: 癌组织组; CsP24、CsP49、CsP52、CsP81、CsP35、

CsP68、CsP18、CsP39、CsP62 和 CsP74: 10 例患者依次编号; B、C: 同一患者癌组织组与癌旁组织组的相对 ERBIN、PDZD2 蛋白的 Western blot 定量结果; D: CCD-48Co 细胞和人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 中 ERBIN、PDZD2 蛋白的 Western blot 代表图; E: CCD-48Co 细胞和人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 中 ERBIN、PDZD2 蛋白的 Western blot 定量结果; a: CCD-48Co 细胞; b: SW480 细胞; c: HCT116 细胞; d: SW620 细胞; e: HT29 细胞; 与癌旁组织组比较: ** $P < 0.01$; 与 CCD-48Co 细胞组比较: ## $P < 0.01$

2.2 ERBIN 和 PDZD2 蛋白在结直肠癌患者组织中表达相关 采用 Pearson 法对结直肠癌患者癌组织与癌旁组织中 ERBIN 及 PDZD2 蛋白的表达水平进行相关性分析,结果显示结直肠癌患者癌组织与癌旁组织中 ERBIN 及 PDZD2 蛋白的表达水平呈正相关($r=0.807, P<0.01$)。见图 2。

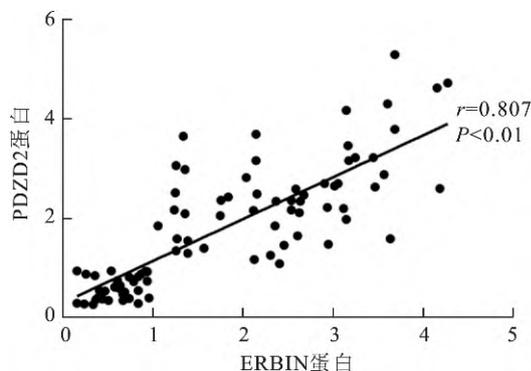


图 2 ERBIN 和 PDZD2 蛋白在结直肠癌患者组织中表达的相关性散点图

2.3 ERBIN 和 PDZD2 蛋白表达与结直肠癌临床

表 1 各临床病理特性患者 ERBIN 和 PDZD2 表达水平比较($n=86$)

临床病理参数	ERBIN 蛋白		χ^2 值	P 值	PDZD2 蛋白		χ^2 值	P 值
	低表达	高表达			低表达	高表达		
性别			0.38	0.540			2.26	0.130
男性	25	17			23	19		
女性	29	15			31	13		
年龄(岁)			0.40	0.530			0.53	0.470
<60	24	12			21	15		
≥60	30	20			33	17		
肿瘤直径(cm)			1.76	0.190			0.41	0.520
<5	41	20			37	24		
≥5	13	12			17	8		
浸润深度			7.54	0.020			16.51	<0.001
黏膜及黏膜下层	23	7			27	3		
肌层	19	9			16	12		
外膜	12	16			11	17		
分化程度			13.40	0.001			15.77	<0.001
高	25	5			27	3		
中	17	8			14	11		
低	12	19			13	18		
TNM 分期			13.60	<0.001			7.81	<0.010
I/II	34	7			32	9		
III/IV	20	25			22	23		
组织学类型			0.31	0.580			0.05	0.820
管状腺癌	32	13			25	14		
黏液腺癌	22	19			29	18		
淋巴结转移			11.96	<0.001			6.58	0.010
有	36	9			34	11		
无	18	23			20	21		

病理特征的关系 肿瘤浸润深度、分化程度、TNM 分期和有无淋巴结转移等临床指标与患者 ERBIN 和 PDZD2 表达水平比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($P<0.05$);而性别、年龄、肿瘤直径和组织学类型等指标与 ERBIN 和 PDZD2 无相关性。见表 1。

2.4 ERBIN 过表达对结直肠癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 为了探究 ERBIN 在结直肠癌细胞中的作用,本研究在 SW620 和 HCT116 细胞系中过表达 ERBIN,结果显示,与空载体组比较,ERBIN 过表达组 ERBIN 蛋白表达升高,且过表达 SW620 和 HCT116 细胞凋亡升高,差异有统计学意义($P<0.01$),而细胞增殖和侵袭降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 3。

2.5 PDZD2 过表达对结直肠癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 根据 Western blot 和免疫荧光结果,均显示在 SW620 和 HCT116 细胞中成功构建 PDZD2 过表达细胞系,PDZD2 过表达诱导细胞凋亡增加,而细胞增殖和侵袭降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 4。

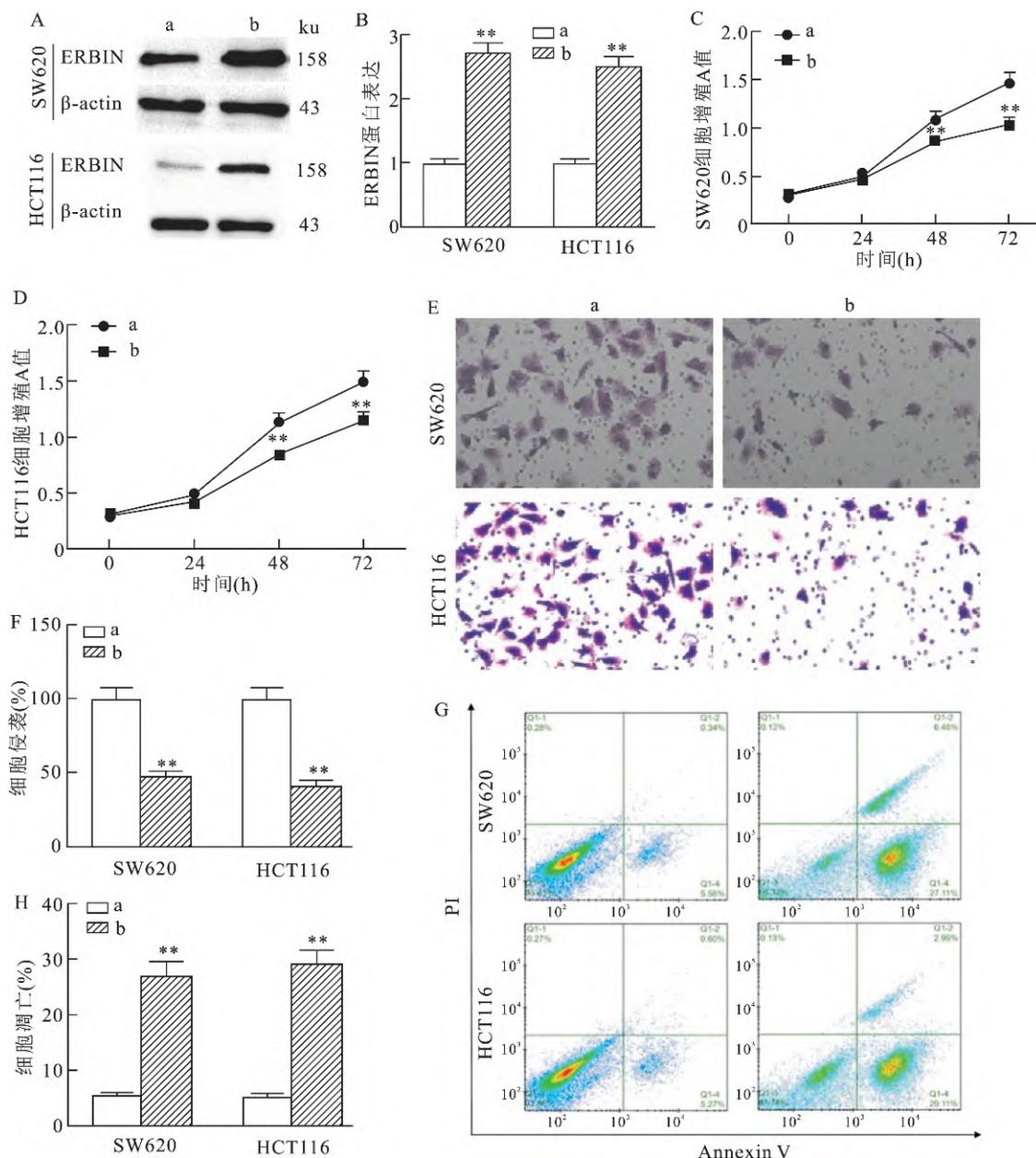


图3 ERBIN 过表达对结直肠癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

A: SW620、HCT116 细胞中 ERBIN 蛋白的 Western blot 代表图; B: SW620、HCT116 细胞中 ERBIN 蛋白的 Western blot 定量结果; C、D: MTT 法检测 SW620、HCT116 细胞增殖; E、F: Transwell 检测 SW620、HCT116 细胞侵袭 ×500; G、H: 流式细胞术检测 SW620 和 HCT116 细胞凋亡; a: 空载体组; b: ERBIN 过表达组; 与空载体组比较: ** $P < 0.01$

2.6 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的相互作用分析 使用生物信息学工具 HitPredict 预测提示, ERBIN 和 PDZD2 蛋白之间存在直接相互作用。Western blot 检测结果显示, 使用 Myc 标签抗体和 Flag 标签抗体均检测到 ERBIN 和 PDZD2 蛋白的表达, 进一步证实 ERBIN 和 PDZD2 蛋白相互作用。此外, 与空载体组比较, ERBIN 过表达组 ERBIN 和 PDZD2 蛋白

的表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 ERBIN 过表达 + 杂乱干扰组比较, ERBIN 过表达 + PDZD2 干扰组 ERBIN 蛋白的表达水平无明显变化, 而 PDZD2 蛋白的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。免疫荧光化学观察显示, 与空载体组比较, ERBIN 过表达组 ERBIN 和 PDZD2 的表达升高。见图 5。

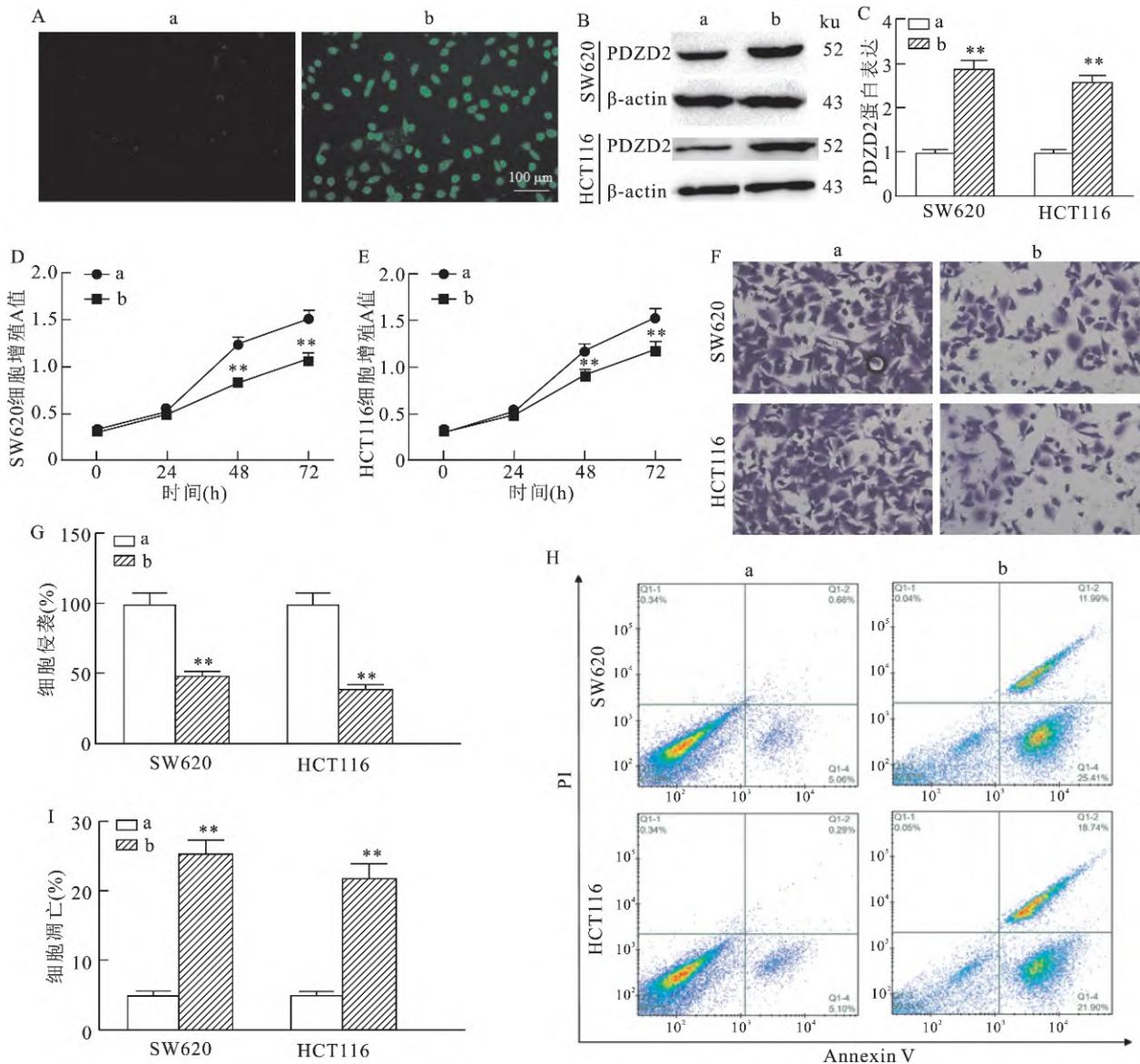


图 4 PDZD2 过表达对结直肠癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

A: 免疫荧光化学观察 SW620 细胞中 PDZD2 蛋白的表达变化 ×100; B: SW620 和 HCT116 细胞中 PDZD2 蛋白的 Western blot 代表图; C: SW620 和 HCT116 细胞中 PDZD2 蛋白的 Western blot 定量结果; D、E: MTT 法检测 SW620、HCT116 细胞增殖; F、G: Transwell 检测 SW620 和 HCT116 细胞侵袭 ×500; H、I: 流式细胞术检测 SW620 和 HCT116 细胞凋亡; a: 空载体组; b: PDZD2 过表达组; 与空载体组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

遗传和环境因素是诱发结直肠癌的最主要因素。近年来, 尽管药物有所改进, 但由于晚期诊断和有效药物数量少, 结直肠癌仍然是癌症死亡的主要原因^[7]。越来越多的研究^[8-9]表明特征性基因的表达失调与结直肠癌肿瘤的发生和转移有关。ERBIN 被报道参与多种癌症的进展, 但其在癌症中的作用还存在争议。有研究^[10]对人类结直肠癌样本的微

阵列数据进行了生物信息学分析, 结果显示, 与正常对照组相比, 肿瘤样本中 ERBIN mRNA 表达降低。本研究的结果与之一致。本研究采用免疫印迹实验检测 86 对结直肠癌组织样本和对应距肿瘤边缘 5 cm 的癌旁组织样本, 结果显示 ERBIN 蛋白的表达水平在癌旁组织样本中明显低于肿瘤组织。有研究^[3]表明 ERBIN 在患者肿瘤组织中下调, 且在结直肠癌细胞系 SW480 中, ERBIN 表达降低对癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化有促进作用。ERBIN 作为

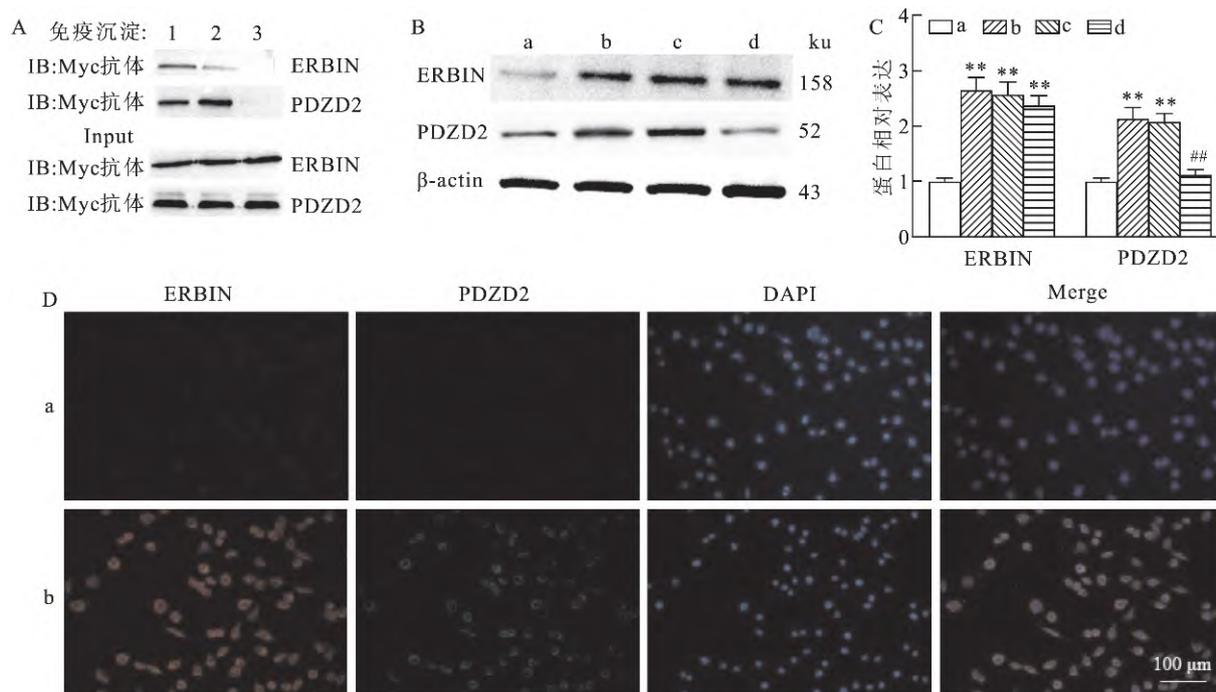


图5 ERBIN和PDZD2蛋白的相互作用分析

A: Co-IP实验检测ERBIN和PDZD2直接结合情况; B: SW620细胞中ERBIN和PDZD2蛋白的Western blot代表图; C: SW620细胞中ERBIN和PDZD2蛋白的Western blot定量结果; D: 免疫荧光化学观察SW620细胞中ERBIN过表达后ERBIN和PDZD2蛋白的表达变化 $\times 100$; 1: Myc抗体; 2: Flag抗体; 3: IgG; IB: 检测结合蛋白的抗体; Input: 免疫沉淀所得的蛋白样品; a: 空载体组; b: ERBIN过表达组; c: ERBIN过表达+杂乱干扰组; d: ERBIN过表达+PDZD2干扰组; 与空载体组比较: ** $P < 0.01$; 与ERBIN过表达+杂乱干扰组比较: ## $P < 0.01$

抑癌基因参与结直肠癌进展已有大量报道,而其对患者临床表征的影响还不清楚。本研究表明ERBIN蛋白的表达与肿瘤TNM分期和淋巴结转移显著相关,ERBIN过表达可抑制SW620细胞增殖和侵袭,促进细胞凋亡。

据报道,PDZD2作为抑癌基因在多种癌症中表达下调,包括小肠神经内分泌肿瘤^[11]、前列腺癌^[12]和肾细胞癌^[13]。目前关于PDZD2在结直肠癌中的研究较少。Qu et al^[14]发现木犀草素可促进SW480细胞对化疗药物奥沙利铂的摄取,这一作用可能与木犀草素促进PDZD2蛋白的表达有关,而PDZD2对结直肠癌细胞的作用尚无明确报道。因此研究PDZD2在结直肠癌中的作用对癌症早期诊断具有重要价值。本研究表明PDZD2蛋白在结直肠癌肿瘤组织中低表达,且临床资料显示PDZD2蛋白的表达与肿瘤浸润深度和分化程度显著相关。这一发现可为结直肠癌的临床治疗提供新方向。同时,本研究使用生物信息学工具预测ERBIN和PDZD2存在相互作用,并通过蛋白免疫共沉淀实验验证了二者的结合,且ERBIN过表达可促进PDZD2蛋白的表达。以上结果进一步表明,ERBIN通过调控PDZD2

蛋白表达对结直肠癌进展发挥抑制作用。此外,本研究中免疫荧光实验结果显示,ERBIN和PDZD2蛋白在SW620细胞的细胞质中共定位,ERBIN过表达可明显增加PDZD2蛋白的表达,PDZD2过表达也抑制SW620和HCT116细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。

综上所述,ERBIN和PDZD2蛋白在结直肠癌中表达下调,ERBIN和PDZD2蛋白的表达具有相关性,且二者的表达水平与结直肠癌的临床病理学特征相关,ERBIN和PDZD2蛋白的低表达预示结直肠癌患者的不良预后。ERBIN可通过与PDZD2结合促进PDZD2蛋白的表达,PDZD2过表达可抑制结直肠癌进展。因此,检测ERBIN和PDZD2的表达可能为结直肠癌的诊断和预后评估提供重要参考。

参考文献

- [1] Yang Y, Wang H Y, Chen Y K, et al. Current status of surgical treatment of rectal cancer in China [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(22): 2703-11.
- [2] Johdi N A, Sukor N F. Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1624.

- [3] Stevens P D , Wen Y A , Xiong X , et al. Erbin suppresses KSR1-mediated RAS/RAF signaling and tumorigenesis in colorectal cancer[J]. *Cancer Res* , 2018 , 78(17) : 4839 – 52.
- [4] Yeung M , Tam T , Tsang A , et al. Proteolytic cleavage of PDZD2 generates a secreted peptide containing two PDZ domains[J]. *Embo Rep* , 2003 , 4(4) : 412 – 8.
- [5] Cui S , Lou S , Guo W , et al. Prediction of miR-21-5p in promoting the development of lung adenocarcinoma *via* PDZD2 regulation [J]. *Med Sci Monit* , 2020 , 26: e923366.
- [6] Ohno H , Hirabayashi S , Iizuka T , et al. Localization of p0071-interacting proteins , plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting protein (PAPIN) and ERBIN , in epithelial cells [J]. *Oncogene* , 2002 , 21(46) : 7042 – 9.
- [7] Bray F , Ferlay J , Soerjomataram I , et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin* , 2018 , 68(6) : 394 – 424.
- [8] Li D , Zhang L , Fu J , et al. SCTR hypermethylation is a diagnostic biomarker in colorectal cancer [J]. *Cancer Sci* , 2020 , 111(12) : 4558 – 66.
- [9] Wang L , Zhang M X , Zhang M F , et al. ZBTB7A functioned as an oncogene in colorectal cancer [J]. *BMC Gastroenterol* , 2020 , 20(1) : 370.
- [10] Skrzypczak M , Goryca K , Rubel T , et al. Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability [J]. *Plos One* , 2010 , 5(10) : e13091.
- [11] Rehfeld A , Plass M , Døssing K , et al. Alternative polyadenylation of tumor suppressor genes in small intestinal neuroendocrine tumors [J]. *Front Endocrinol(Lausanne)* , 2014 , 5: 46.
- [12] Tam C , Cheng A , Ma R , et al. Inhibition of prostate cancer cell growth by human secreted PDZ domain-containing protein 2 , a potential autocrine prostate tumor suppressor [J]. *Endocrinology* , 2006 , 147(11) : 5023 – 33.
- [13] Zhang N , Wu Y , Gong J , et al. Germline genetic variations in PDZD2 and ITPR2 genes are associated with clear cell renal cell carcinoma in Chinese population [J]. *Oncotarget* , 2016 , 8(15) : 24196 – 201.
- [14] Qu Q , Qu J , Guo Y , et al. Luteolin potentiates the sensitivity of colorectal cancer cell lines to oxaliplatin through the PPAR γ /OC-TN2 pathway [J]. *Anticancer Drugs* , 2014 , 25(9) : 1016 – 27.

Effect of PDZD2 protein regulated by ERBIN expression on proliferation , invasion and apoptosis of colorectal cancer cells

Sheng Renming¹ , Cai Weimin¹ , Duan Hongmei¹ , Sun Lina² , Tu Jian²

(¹Dept of Pathology , Changshu Hospital Affiliated to Soochow University , Changshu No. 1 People's Hospital , Changshu 215500; ²Dept of Pathology , The Second Affiliated Hospital of Soochow University , Suzhou 215004)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of erbb2 interacting protein (ERBIN) and PDZ domain containing 2 protein (PDZD2) in colorectal cancer tissues , as well as the effects of ERBIN and PDZD2 on the progression of colorectal cancer and the corresponding mechanisms. **Methods** Western blot was used to detect the expression of ERBIN and PDZD2 proteins in tumor tissues and corresponding adjacent tissues from 86 colorectal cancer patients , as well as normal human colon fibroblasts (CCD-18Co) and human colorectal cancer cell lines (SW480 , HCT116 , SW620 and HT29) ; SW620 and HCT116 cells were transfected with ERBIN or PDZD2 overexpression vector , and then cell proliferation , cell invasion and apoptosis were detected. The expression of ERBIN or PDZD2 protein in SW620 cell was observed by immunofluorescence chemistry. Co-immunoprecipitation assay was used to detect the interaction between ERBIN and PDZD2 proteins. **Results** The expression levels of ERBIN and PDZD2 proteins in colorectal cancer tissues were lower than those in adjacent tissues ($P < 0.01$) , and the expression levels of ERBIN and PDZD2 in colorectal cancer cells were lower than those in CCD-18Co cells ($P < 0.01$) . The expression levels of ERBIN and PDZD2 proteins were correlated with the depth of invasion , differentiation , TNM staging and lymph node metastasis of colorectal cancer ($P < 0.001$) ; ERBIN or PDZD2 overexpression reduced the proliferation and invasion of SW620 and HCT116 cells ($P < 0.01$) , increased cell apoptosis ($P < 0.01$) ; ERBIN directly bound to PDZD2 , and overexpression of ERBIN increased the expression level of PDZD2 protein. **Conclusion** ERBIN can inhibit the proliferation and invasion of colorectal cancer cells and promote apoptosis by promoting the expression of PDZD2 protein.

Key words colorectal cancer; ERBIN; PDZD2; clinicopathology; cell proliferation and invasion