

能造成腹膜透析患者的感染,针对这些因素应制订预防措施,纠正患者营养不良、贫血等症状从而增强免疫力,同时,重视实时评估和培训,重视基础疾病的治疗,缩短住院日,建立卧床腹膜透析患者专用病房,从而降低腹膜透析患者腹腔感染率^[11-12]。

综上所述,造成腹膜透析院内腹腔感染的主要病原菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、屎肠球菌、粪肠球菌和金黄色葡萄球菌,临床上可根据药敏试验结果选择相应的抗菌药物。患者年龄、透析时长、原发病与腹膜透析患者发生腹腔感染有关。

参考文献

- [1] 陈萍丽,彭红霞.腹膜透析患者院内腹腔感染危险因素分析与护理对策[J/CD].世界最新医学信息文摘(电子版),2014,34(14):528-529.
- [2] 陈娟娟,石国霞,张晓萍.腹膜透析患者并发腹腔感染的原因分析及护理对策[J].解放军护理杂志,2013,30(10):28-31.
- [3] 周紫娟,崔盈,杨薇,等.腹膜透析患者多次腹腔感染临床分析[J].中国血液净化,2014,13(2):100-102.
- [4] 姚淑琴,张红娟,胡中华,等.慢性肾功能衰竭患者腹膜透析期间腹腔感染的影响因素分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(5):684-686.
- [5] 杨文,沈建伟,钱宝鑫,等.不同腹膜透析置管术对腹部手

术或感染史慢性肾衰竭患者的疗效分析[J].重庆医学,2019,48(22):3866-3869.

- [6] 赵婷婷,苟昊林,湛卫,等.治疗腹膜透析相关性腹膜炎抗生素腹腔给药的研究进展[J].药学服务与研究,2019,19(5):373-376.
- [7] 夏琼,任伟.单中心腹膜透析相关腹膜炎反复发作的临床特点及危险因素[J].安徽医药,2020,24(7):1395-1398.
- [8] 陈海燕,张瑞城,陈沾,等.腹膜透析相关性腹膜感染的病原学特征及影响因素分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(17):2598-2602.
- [9] 徐燕琳,朱虹,吴玮,等.慢性肾衰竭行腹膜透析患者导管感染的相关因素及病原学分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(1):149-152.
- [10] 吴小漫,邓丽萍,麦美芳,等.腹膜透析相关性腹膜炎患者病原菌及相关因素分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(19):2944-2947.
- [11] 张灵灵,郭利芹,陶瑾,等.肠道感染所致腹膜透析患者相关性腹膜炎致病菌及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(24):3767-3770.
- [12] 陈静,李莉,潘巧虹,等.血液透析与腹膜透析肾功能衰竭患者的感染特征及影响因素分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(15):2298-2301.

(收稿日期:2020-09-12 修回日期:2020-12-22)

• 短篇论著 •

circPRMT5 在结肠癌患者中的表达及其对结肠癌细胞生物学性质的影响

朱晓燕¹,姚冬颖²,郭军¹,郭治¹,杨华¹,靳毅¹

河北省邢台市人民医院:1.肿瘤内二科;2.病理科,河北邢台 054000

摘要:目的 探讨环状蛋白精氨酸甲基转移酶 5(circPRMT5)在结肠癌患者中的表达及其对结肠癌细胞生物学性质的影响。方法 选择 2018 年 10 月至 2019 年 10 月该院收治的 93 例结肠癌患者为研究对象,收集手术切除的结肠癌组织及癌旁正常组织,采用免疫印迹法(Western blot)检测结肠癌组织及癌旁正常组织中 circPRMT5 蛋白表达量。将人结肠癌 SW480 细胞分为空白对照组、阴性对照组、试验组,空白对照组不作任何处理,阴性对照组转染 10 μg pEGFP-N1 质粒,试验组转染 10 μg pEGFP-N1-circPRMT5 质粒,采用 CCK-8 法检测各组 SW480 细胞增殖率,采用 Transwell 小室侵袭试验检测各组 SW480 细胞侵袭能力,采用流式细胞术检测各组 SW480 细胞凋亡率,采用 Western blot 检测各组 SW480 细胞中 circPRMT5 蛋白表达量。结果 结肠癌组织中 circPRMT5 蛋白表达量显著高于癌旁正常组织($P < 0.05$);试验组 SW480 细胞增殖率、侵袭能力、circPRMT5 蛋白表达量显著高于空白对照组、阴性对照组($P < 0.05$);试验组 SW480 细胞凋亡率显著低于空白对照组、阴性对照组($P < 0.05$);阴性对照组 SW480 细胞增殖率、凋亡率、侵袭能力、circPRMT5 蛋白表达量与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 circPRMT5 在结肠癌患者中呈高表达,circPRMT5 高表达能够促进结肠癌细胞增殖、侵袭,抑制结肠癌细胞凋亡。

关键词:环状蛋白精氨酸甲基转移酶 5; 结肠癌; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.029

中图法分类号:R735.3

文章编号:1673-4130(2021)08-1012-04

文献标志码:A

结肠癌是消化道常见恶性肿瘤,好发于乙状结肠与直肠交界处。据统计,我国每年新增结直肠癌患者

约 29.44 万例,发病率居所有恶性肿瘤的第 3 位,高发群体为 40~50 岁人群,男女发病率之比为 2:1~3:1,全球每年新增结直肠癌死亡病例约 14.23 万例,病死率居所有恶性肿瘤的第 5 位,且近年来结肠癌发病率和病死率呈现上升趋势^[1-2]。早发现、早治疗是提升结肠癌预后的关键,因此探索结肠癌发病机制对早期诊治、延长生存期具有重要价值。蛋白精氨酸甲基转移酶 5(PRMT5)是一种染色质修饰酶,在细胞增殖、分化、凋亡等细胞生物学行为及信号转导方面具有重要作用^[3]。环状蛋白精氨酸甲基转移酶 5(circPRMT5)具有稳定的闭环结构,能够调控表观遗传和细胞生物学行为^[4]。既往研究显示,膀胱尿路上皮癌、前列腺癌等恶性肿瘤发生及发展与 circPRMT5 异常表达有关^[5],但 circPRMT5 与结肠癌的关系仍处于探索阶段。因此本研究就 circPRMT5 在结肠癌患者中的表达及其对生物学性质的影响进行了分析,以期临床防治结肠癌提供依据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 10 月至 2019 年 10 月本院收治的 93 例结肠癌患者为研究对象,收集其手术切除的结肠癌组织及癌旁正常组织,其中男 58 例,女 35 例;年龄 20~80 岁,平均(52.26±5.34)岁。纳入标准:(1)结肠癌经病理活检确诊^[1];(2)入院前未接受任何抗结肠癌治疗;(3)依从性好,能配合完成本研究;(4)签订知情同意书。排除标准:(1)病历资料不齐全;(2)心、肝、肾、肺、脑等重要脏器功能不全;(3)合并其他胃肠道疾病、其他恶性肿瘤、过敏性疾病、自身免疫系统疾病、感染性疾病、传染性疾病、精神系统疾病、血液系统疾病;(4)哺乳期或妊娠期女性。本研究上报本院医学伦理委员会并获得批准。

1.2 方法 (1)采用免疫印迹法(Western blot)检测结肠癌组织及癌旁正常组织中 circPRMT5 蛋白表达量。取结肠癌患者癌组织及癌旁正常组织,剪碎后置于玻璃匀浆器(北京凯瑞基生物科技有限公司),加入 RIPA 裂解液(北京百泰克生物科技有限公司),匀浆,采用细胞离心机(北京鼎昊源科技有限公司,型号:CellSmart),以 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液,使用 BCA 试剂盒(上海榕柏生物科技有限公司)测定蛋白浓度,对蛋白定量,取总蛋白上样于 10%的 SDS-PAGE 凝胶(北京绿源伯德生物科技有限公司)中,进行电泳、切胶、转膜,5%脱脂奶粉封闭液(上海联硕宝为生物科技有限公司)封闭,加入 1:200 稀释的兔抗 circPRMT5 单克隆抗体(上海晖科生物科技有限公司)、1:500 稀释的兔抗 GAPDH 单克隆抗体(北京博尔西科技有限公司),4℃孵育过夜, TBST 溶液(武汉爱博泰克生物科技有限公司)洗膜,加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(北京泰泽嘉业

科技发展有限公司),37℃孵育 60 min, TBST 溶液洗膜,采用 ECL 发光试剂盒(上海锐赛生物技术有限公司)显色,洗片后显影、定影,应用 Image Quant TL 软件(北京碧橙蓝生物科技有限责任公司)进行分析, GAPDH 为内参蛋白,以 circPRMT5 灰度值与 GAPDH 灰度值之比表示 circPRMT5 蛋白表达量。(2)细胞培养、分组及干预。将人结肠癌 SW480 细胞(上海圻明生物科技有限公司)分为空白对照组、阴性对照组、试验组,进行原代培养,待细胞融合度达 80%时,消化、传代,取对数生长期的 SW480 细胞接种于 6 孔细胞培养板,细胞接种密度为 5×10^6 个/孔,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(上海信裕生物科技有限公司),于 37℃、5%的 CO₂ 培养箱(北京博励行仪器有限公司)中培养,待细胞融合度达 90%时,空白对照组不作任何处理,阴性对照组转染 10 μg pEGFP-N1 质粒(武汉森灵生物科技有限公司),试验组转染 10 μg pEGFP-N1-circPRMT5 质粒(上海汉恒生物公司),转染结束继续培养 48 h。所有转染操作按照北京嘉美臻元生物技术有限公司的 Lipofectamine™2000 转染说明书进行。(3)采用 Western blot 检测各组 SW480 细胞中 circPRMT5 蛋白表达量,操作同上。(4)采用 CCK-8 法检测各组 SW480 细胞增殖能力。取转染后的各组 SW480 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,细胞接种密度为 2×10^3 个/孔,每孔加入 100 μL 细胞悬液和 10 μL CCK-8 溶液(上海富衡生物科技有限公司),于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 2 h,采用酶标仪(苏州亚凡生物技术有限公司,型号:M2e)测定 550 nm 波长下各孔吸光度值,计算 SW480 细胞增殖率=(处理组吸光度值/空白对照组吸光度值)×100%。(5)采用 Transwell 小室侵袭试验检测各组 SW480 细胞侵袭能力:取转染后的各组 SW480 细胞制成细胞悬液,在 Transwell 小室的上室铺入基质胶(上海惠研生物科技有限公司),每孔 60 μL,然后加入细胞悬液,每孔 200 μL,在 Transwell 小室的下室加入 600 μL DMEM 培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,24 h 后弃上室液体,4%多聚甲醛溶液(北京索莱宝科技有限公司)固定细胞,风干,0.1%结晶紫(青岛达斐生物科技有限公司)染色,PBS 溶液(苏州瑞诺德生物科技有限公司)漂洗,于荧光显微镜(南京新惠通生物科技有限公司,型号:Revole)下观察并计算穿过小室膜的平均细胞数,以此判定 SW480 细胞侵袭能力。(6)采用流式细胞术检测各组 SW480 细胞凋亡率。取转染后的各组 SW480 细胞制成细胞悬液,用 1 mol/L×Tris Buffer 缓冲液(上海高创化学科技有限公司)洗涤,经 0.25%胰蛋白酶(上海北诺生物科技有限公司)消化,制备细胞悬液,结合 1 mol/L×Tris Buffer 缓冲液重悬细胞,于流式管中依次加入 300 μL 细胞悬液、5 μL 异硫氰酸荧光素

(Annexin V-FITC, 武汉益普生物科技有限公司) 避光反应 15 min, 再加入 200 μ L 1 mol/L \times Tris Buffer 缓冲液及 5 μ L 碘化丙啶 (PI) 染液 (上海继锦化学科技有限公司), 混匀, 1 h 内使用流式细胞仪 (深圳市达科为生物技术股份有限公司, 型号: EXFLOW-206) 检测 SW480 细胞凋亡率。所有试验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

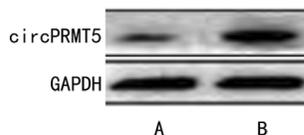
2 结 果

2.1 结肠癌组织及癌旁正常组织中 circPRMT5 蛋白表达量 结肠癌组织中 circPRMT5 蛋白表达量 (2.79 ± 1.23) 显著高于癌旁正常组织 (0.58 ± 0.12), 差异有统计学意义 ($t = 12.197, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 各组 SW480 细胞增殖率的比较 试验组 SW480 细胞增殖率 ($88.83\% \pm 5.19\%$) 显著高于空白

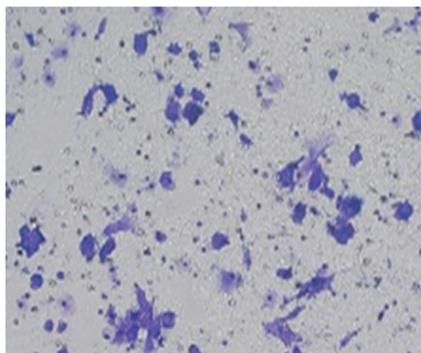
对照组 ($53.48\% \pm 3.77\%$)、阴性对照组 ($53.32\% \pm 3.90\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阴性对照组 SW480 细胞增殖率与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组 SW480 细胞侵袭能力 试验组 SW480 细胞穿过小室膜的细胞数 [(37.24 ± 5.92) 个] 显著高于空白对照组 [(13.38 ± 2.64) 个]、阴性对照组 [(13.52 ± 2.53) 个], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阴性对照组 SW480 细胞穿过小室膜的细胞数与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

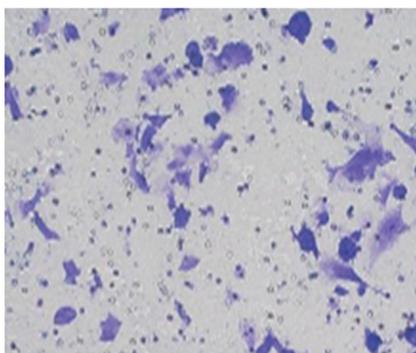


注: A 为癌旁正常组织, B 为结肠癌组织; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

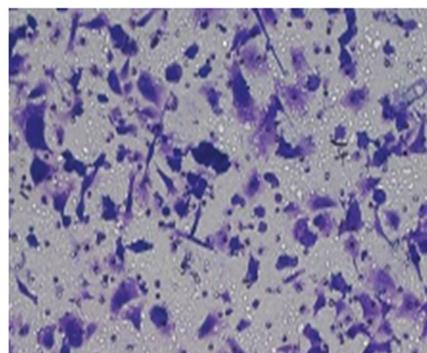
图 1 结肠癌组织及癌旁正常组织中 circPRMT5 蛋白表达量



空白对照组



阴性对照组

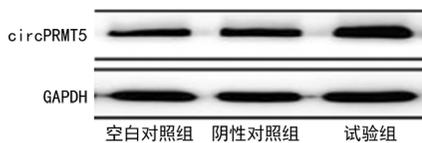


试验组

图 2 各组 SW480 细胞侵袭能力

2.4 各组 SW480 细胞凋亡率的比较 试验组 SW480 细胞凋亡率 ($7.77\% \pm 2.25\%$) 显著低于空白对照组 ($15.51\% \pm 3.83\%$)、阴性对照组 ($15.28\% \pm 3.87\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阴性对照组 SW480 细胞凋亡率与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组 SW480 细胞中 circPRMT5 蛋白表达量 试验组 SW480 细胞中 circPRMT5 蛋白表达量 (2.95 ± 1.18) 显著高于空白对照组 (1.78 ± 0.53)、阴性对照组 (1.81 ± 0.49), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阴性对照组 SW480 细胞凋亡率与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。



注: GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 3 各组 SW480 细胞中 circPRMT5 蛋白表达量

3 讨 论

结肠癌是指结肠黏膜上皮在多种致癌因素作用下导致的恶性病变, 早期通常表现为腹胀、消化不良、排便习惯异常变化、腹泻与便秘交替等不具备特异性的症状, 随着疾病不断发展, 癌细胞可转移至淋巴结、肺、骨、肝、脑等组织脏器, 出现淋巴结肿大、肺水肿、肠梗阻、腹部肿块、腹腔积液等转移表现, 危害极大^[6]。随着人们生活水平提高, 饮食结构变化, 生活习惯改变, 结肠癌发病率逐年增加, 对人类生命安全造成严重威胁^[7]。临床目前治疗结肠癌主要采用手术、放射性治疗、化学药物治疗等相结合的综合治疗方案, 能够缓解临床症状, 缩小原发癌灶, 减缓肿瘤发展速度, 降低复发率, 但手术无法彻底切除癌组织, 癌细胞易扩散转移, 患者往往预后不良^[8]。因此探索结肠癌发病机制成为临床的研究热点。

结肠癌发病是一个多因素、多步骤、多途径的复杂过程, 除家族史、溃疡性结肠炎、高脂饮食、结肠息肉、低纤维素饮食等因素外, 也涉及分子遗传学改

变^[9]。随着分子生物学理论不断完善、实验技术的迅速发展、基因学的深入研究,分子生物标志物成为恶性肿瘤研究的热点,且被应用于恶性肿瘤早期诊断、疗效监测、预后判断。PRMT5 是一种 II 型蛋白质精氨酸甲基转移酶,广泛表达于哺乳动物细胞中,能催化甲基从 S-腺苷甲硫氨酸转移到精氨酸蛋白的残基上,并在细胞增殖、分化、凋亡等细胞生物学行为以及信号转导方面具有重要作用^[10]。PRMT5 在结肠癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、肝癌、皮肤癌、乳腺癌、子宫颈癌、膀胱癌等恶性肿瘤中过表达,过表达的 PRMT5 可通过调节细胞周期蛋白、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路等调控肿瘤基因表达,影响肿瘤细胞生物学行为,进而影响肿瘤发生及发展^[11]。circPRMT5 具有稳定的闭环结构,能够参与染色质重塑、基因转录、RNA 代谢、高尔基体结构维持、调控细胞增殖及分化等,是具有一定前景的临床分子标志物。有研究发现,circPRMT5 在前列腺癌患者外周血中呈高表达状态,能够促进前列腺癌细胞上皮间质转化(EMT)^[12]。另有研究发现,circPRMT5 在结直肠癌患者癌组织中亦呈高表达^[13],本研究结果与此报道结果一致,提示 circPRMT5 高表达可能与结肠癌发病有关。本研究显示,试验组 SW480 细胞增殖率、侵袭能力、circPRMT5 蛋白表达量显著高于空白对照组、阴性对照组($P < 0.05$),试验组 SW480 细胞凋亡率显著低于空白对照组、阴性对照组($P < 0.05$),提示 circPRMT5 高表达能够促进结肠癌细胞增殖、侵袭,抑制结肠癌细胞凋亡,这与 JING 等^[14]和 ZHU 等^[15]的研究结果相符。JING 等^[14]研究显示 circPRMT5 表达水平与结肠癌患者肿瘤最大径、临床分期、淋巴结转移、浸润程度呈正相关;ZHU 等^[15]研究显示沉默 circPRMT5 表达能够促进结肠癌细胞凋亡并诱导线粒体膜电位(MMP)下降。分析其原因,circPRMT5 高表达可能通过激活锌指转录因子介导的 EMT,从而促进结肠癌细胞增殖、侵袭,抑制结肠癌细胞凋亡,使结肠癌恶性程度更高。

综上所述,circPRMT5 在结肠癌患者中呈高表达,circPRMT5 高表达能够促进结肠癌细胞增殖、侵袭,抑制结肠癌细胞凋亡。但由于本研究受到试验条件、仪器精度、研究时间、纳入病例数等因素限制,故此结论仍有待进一步证实。

参考文献

[1] 陈功. 2017 版美国国立综合癌症网络结肠癌指南更新解读[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(1): 28-33.
 [2] 戴静, 钱群. 2017. V1 版《NCCN 直肠癌诊治指南》更新解读[J]. 临床外科杂志, 2017, 11(4): 448-450.

[3] WEBB L M, AMICI S A, JABLONSKI K A, et al. PRMT5-Selective Inhibitors Suppress Inflammatory T Cell Responses and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2017, 198(4): 3004-3006.
 [4] ZHANG W, CHEN J, WU M, et al. PRMT5 Restricts Hepatitis B Virus Replication via Epigenetic Repression of cccDNA Transcription and Interference with pgRNA Encapsidation: PRMT5 Inhibits HBV cccDNA Transcription and pgRNA Encapsidation[J]. Hepatology, 2017, 66(2): 398-400.
 [5] CHEN X, CHEN R X, WEI W S, et al. PRMT5 Circular RNA Promotes Metastasis of Urothelial Carcinoma of the Bladder through Sponging miR-30c to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(24): 6319-6330.
 [6] 周小戈, 周思君, 杨克戈. 慢性肾脏病患者维生素 D 水平与结肠癌的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2019, 4(1): 789-792.
 [7] 王进, 董晓强, 朱新国, 等. IL-9 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2018, 10(8): 245-247.
 [8] 高显华, 于冠宇, 刘鹏, 等. 左半结肠癌与右半结肠癌临床病理特征及预后的比较[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(6): 647-653.
 [9] 喻伟, 陈双, 刘敏灵, 等. 左右半结肠癌差异的分子生物学基础[J]. 广东医学, 2018, 17(1): 2014-2018.
 [10] BREHMER D, WU T, MANNENS G, et al. Abstract DDT02-04: A novel PRMT5 inhibitor with potent in vitro and in vivo activity in preclinical lung cancer models [J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 4526-4530.
 [11] GAO G, DHAR S, BEDFORD M T. PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(8): 4359-4369.
 [12] 郭萍, 任晨霞, 麻丽霞, 等. 人 PRMT5 基因的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 2(5): 2259-2264.
 [13] 谢津璧, 郭润生, 王善娟, 等. 环状蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 在结直肠癌细胞增殖、迁移中的作用和机制[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(3): 173-180.
 [14] JING P, ZHAO N, YE M, et al. Protein arginine methyltransferase 5 promotes lung cancer metastasis via the epigenetic regulation of miR-99 family/FGFR3 signaling [J]. Cancer Lett, 2018, 12(8): 427-431.
 [15] ZHU K, SHAO J, TAO H, et al. Rational Design, synthesis and biological evaluation of novel triazole derivatives as potent and selective PRMT5 inhibitors with antitumor activity[J]. J Comput Aided Mol Des, 2019, 33(8): 775-785.