

ZEB2 和 PTEN 在先天性巨结肠发生中的意义分析



谢 华 李红星 张 杰 陈 煥 耿其明 徐小群 唐维兵

【摘要】 目的 研究 ZEB2 和 PTEN 在先天性巨结肠中的表达情况,探讨两者在先天性巨结肠发生中可能的调控关系。 **方法** 采用实时定量 PCR 和蛋白电泳技术检测 64 例先天性巨结肠狭窄段和扩张段中 ZEB2 和 PTEN mRNA 及蛋白表达情况。采用 Pearson 相关性检验分析 ZEB2 和 PTEN 在先天性巨结肠狭窄段和扩张段中表达的相关性。在体外细胞 SH-SY5Y 中应用 ZEB2 siRNA 干扰技术降低 ZEB2 表达,检测其对 PTEN 表达的影响,利用 Transwell 实验、CCK-8 实验和流式细胞仪技术检测 ZEB2 对细胞迁移、增殖、周期和凋亡功能。 **结果** ZEB2 和 PTEN mRNA 在先天性巨结肠狭窄段的表达均比扩张段显著增高(ZEB2: 1.2823 ± 0.1323 vs 0.9877 ± 0.1249 , $P=0.0073$; PTEN: 0.1132 ± 0.0109 vs 0.0459 ± 0.0058 , $P<0.001$)。ZEB2 和 PTEN 在先天性巨结肠狭窄段和扩张段组织中蛋白表达与 mRNA 表达一致(ZEB2: 0.709 ± 0.035 vs 0.531 ± 0.027 , $P=0.0166$; PTEN: 0.466 ± 0.047 vs 0.234 ± 0.052 , $P=0.0293$)。ZEB2 与 PTEN mRNA 表达在巨结肠狭窄段($r=0.48$, $P<0.001$)和扩张段($r=0.54$, $P<0.001$)中均呈显著正相关。干扰 ZEB2 mRNA 表达后,体外细胞 SH-SY5Y 的 PTEN mRNA 和蛋白表达显著下降,细胞增殖和迁移能力受到显著抑制。 **结论** ZEB2 和 PTEN 在先天性巨结肠狭窄段中表达显著增加;ZEB2 表达增加可能是 PTEN 通过竞争性内源性 RNA 机制调控后的继发性的改变。

【关键词】 ZEB2; PTEN; ceRNA; Hirschsprung 病

Functions of ZEB2 and PTEN in Hirschsprung disease. XIE Hua, LI Hong-xing, ZHANG Jie, et al. Department of Pediatric Surgery, Nanjing Children Hospital Affiliated Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China. Corresponding author: TANG Wei-bing, E-mail: twbcn@163.com

【Abstract】 Objective To explore the expressions and regulations of ZEB2 and PTEN in Hirschsprung disease (HSCR). **Methods** The relative expression levels of mRNAs and proteins of ZEB2 and PTEN were measured in stenotic and expanded segments of 64 HSCR patients by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot. The correlation of ZEB2 and PTEN mRNAs levels was measured by Pearson's test. Small RNA interference transfection was used for examining the functions and regulations of ZEB2 and PTEN in SH-SY5Y cell line. Cell migration, cell proliferation, cell cycle and cell apoptosis of ZEB2 in SH-SY5Y cells were detected by Transwell assay, CCK8 assay and flow cytometry. **Results** ZEB2 and PTEN mRNA (ZEB2: 1.2823 ± 0.1323 vs 0.9877 ± 0.1249 , $P=0.0073$; PTEN: 0.1132 ± 0.0109 vs 0.0459 ± 0.0058 , $P<0.001$) and protein expression levels (ZEB2: 0.709 ± 0.035 vs 0.531 ± 0.027 , $P=0.0166$; PTEN: 0.466 ± 0.047 vs 0.234 ± 0.052 , $P=0.0293$) were significantly elevated in HSCR stenotic segments, and small interfering RNA (siRNA)-mediated knock-down of ZEB2 inhibited cell migration and proliferation without affecting cell apoptosis or cell cycle. Both mRNA and protein of PTEN decreased after a knockdown of ZEB2. **Conclusions** ZEB2 and PTEN are overexpressed in HSCR. And an up-regulation of ZEB2 may occur through a competitive mechanism of endogenous RNA regulation of PTEN.

【Key words】 ZEB2; PTEN; ceRNA; Hirschsprung Disease

先天性巨结肠(Hirschsprung Disease, HSCR)是一种复杂、与多基因表达异常有关的肠神经系统发育异常性疾病^[1]。胚胎学研究认为肠神经嵴细胞

(enteric neural crest-derived cells (ENCCs)迁移和增殖障碍,导致消化道远端神经节细胞缺如是先天性巨结肠发病的主要原因。遗传学研究发现多种基因如 RET (ret proto-oncogene)、ENDRB (endothelin receptor type B)、ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2)、NRG1 (neuregulin 1)等与 HSCR 发病相关^[2,3]。Van de PutteT 通过 ZEB2(又称为 Smad-in-

teracting protein 1, SIP1) 敲除鼠发现 ZEB2 缺失可以导致肠神经嵴细胞发育障碍,提示其在 HSCR 发生中发挥重要作用^[4]。但在 HSCR 组织研究中发现 ZEB2 的表达却呈显著升高,说明 ZEB2 与先天性巨结肠发生的关系仍需进一步探索。近年来研究发现 ZEB2 与 PTEN(phosphatase and tensin homolog)可共受微小 RNA (microRNA, miRNA) 200 家族间接调控,形成竞争性内源性 RNA 关系(competitive endogenous RNA, ceRNA),参与多种肿瘤的发生^[5, 6]。但 ZEB2 与 PTEN 之间竞争性内源性调控机制是否参与 HSCR 的发生尚未见报道。本研究将通过人群标本检测、细胞生物学功能实验,探讨 ZEB2 与 PTEN 在先天性巨结肠发生中可能的调控关系。

材料和方法

一、标本采集

64 例 HSCR 狭窄段和扩张段标本采自 2012 年 1 月至 2013 年 1 月于南京儿童医院行手术治疗、病理确诊为先天性巨结肠的患儿。标本一经离体,立即收集,液氮冻存。本研究经南京医科大学附属南京儿童医院伦理委员会批准,标本收集得到患儿监护人知情同意。

二、qRT-PCR 检测

将组织及细胞碾碎,按 TRIzol 使用说明提取组织和细胞总 RNA。目的基因引物如下表所示,采用进行 PCR 扩增,每个样本重复 3 次,采用相对定量方式计算各基因的表达,ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 - 内参 Ct 值,计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,即目的基因相对表达量。

GAPDH	Forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse 5'-GGATCTCGCTCTGGAAGATG-3'
ZEB2	Forward 5'-CAAGAGGCGCAAACAAGCC-3' Reverse 5'-GGTTGGCAATACCGTCATCC-3'
PTEN	Forward 5'-TGGATTGCACTTAGACTTGACCT-3' Reverse 5'-GGTGGTTATGCTCTTCAAAAGG-3'

三、蛋白检测

组织及细胞蛋白样品加入 RIPA 后,经 12% SDS - PAGE 电泳后,转膜,一抗溶液中 4℃ 过夜(兔抗人 ZEB2 抗体、兔抗人 PTEN 抗体和 GAPDH 抗体),采用辣根酶标记的兔抗山羊 IgG 为二抗,染色完成后,采用凝胶图像分析系统扫描分析结果,以相对灰度值代表蛋白表达量。相对 OD 值 = ZEB2 OD/GAP-

DH OD。

四、siRNA 转染

SH-SY5Y 细胞株购自上海细胞生物研究所,采用 DMEM 高糖完全培养基,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。采用化学合成法构建 ZEB2 siRNA,将 siRNA-lipo2000 混合液加入含有细胞以及培养液的培养孔中,轻轻混匀,24 h 及 48 h 后分别对培养好的细胞进行 RNA 及总蛋白提取。

五、Transwell 检测

6 孔培养的 SH-SY5Y 细胞转染 ZEB2 siRNA 及 siRNA 阴性对照后培养 48 h 后消化。消化后用无血清培养基调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。将上述细胞按每孔 100 uL 的体积接种于含有 8 μm 膜 (Millipore, MASS, USA) 的上层小室,取 24 孔细胞培养板,每孔加入 600 μL 含有 10% 胎牛血清的培养基,上层小室置于 24 孔板的孔中。5% CO₂, 37 °C 培养 24 h 将 24 孔板中细胞用结晶紫染色 15 min。光镜拍照,放大率 40 倍,每孔拍 5 个视野。实验重复三遍。

六、CCK8 检测

96 孔板培养密度为 5 000 ~ 10 000/孔的转染过 ZEB2 siRNA 与 negative control 的 SH-SY5Y 细胞,37 °C 孵育 48 h。用 PBS 洗 2 ~ 3 遍,再加入 10 μL CCK8 溶液,继续培养 4 h。终止培养,于在酶联免疫检测仪 OD 450 nm 处测量各孔的吸光值。其中空白对照作为调零孔。

七、细胞周期和凋亡检测

① 细胞周期检测: SH-SY5Y 细胞转染 ZEB2 siRNA 及 siRNA 阴性对照后, PBS、乙醇各洗两遍,加入 PI 和 RNaseA,用流式细胞仪测定周期。② 细胞凋亡检测: SH-SY5Y 细胞转染 ZEB2 siRNA 及 siRNA 阴性对照后, PBS 洗两遍,去上清,加入 FITC-Annein V 及 PI 混匀, PBS 洗 2 遍,上机分析。

八、统计学处理

数据处理采用 Stata 9.2 统计软件进行处理,实时定量 RT-PCR 结果相对表达量采用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示,统计分析采用 Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) 检验,蛋白表达测定值和体外实验部分采用配对 Student's *t* 检验,利用 Pearson 相关分析研究 ZEB2 与 PTEN mRNA 间的相关性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、ZEB2 和 PTEN 在 HSCR 狭窄段和扩张段

中的表达

实时定量 PCR 检测显示,ZEB2 mRNA 相对表达量在 HSCR 狭窄段中为 $1.282\,3 \pm 0.132\,3$,显著高于扩张段中的表达 ($0.987\,7 \pm 0.124\,9$), $u = 1\,772, P = 0.007\,3$, (图 1A 所示)。ZEB2 蛋白在狭窄段和扩张段的表达量分别是 (0.709 ± 0.035 和 0.531 ± 0.027), $t = 4.026\,8, P = 0.016\,6$, 这与其 mRNA 水平的表达一致(图 1B)。

PTEN mRNA 在 HSCR 狭窄段和扩张段的表达量分别是 ($0.113\,2 \pm 0.010\,9$ 和 $0.045\,9 \pm 0.005$), $u = 442, P < 0.001$ (图 1D)。PTEN 蛋白在狭窄段和扩张段的表达量分别是 (0.466 ± 0.047 和 0.234 ± 0.052), $t = 3.300\,9, P = 0.029\,3$, 这与其 mRNA 水

平的表达一致(图 1E)。

分别对 ZEB2 和 PTEN 在 HSCR 狭窄段和扩张段中的 mRNA 表达结果进行 Person 相关性分析,发现 ZEB2mRNA 表达与 PTEN 表达均呈正相关关系 ($r = 0.48, P < 0.001$ vs $r = 0.48, P < 0.001$), 如图 1C 和 F。

二、ZEB2 对神经细胞的细胞生物学功能影响
选用 SH-SY5Y 细胞株,分别转染 ZEB2 siRNA 和 inhibitor NC 后,采用 Transwell、CCK-8 和流式细胞仪等方法检测两组细胞的迁移、增殖、周期和凋亡变化。发现转染 ZEB2 siRNA 的细胞迁移和增殖能力均受到了显著抑制(图 2A、B);而细胞周期和凋亡没有显著变化(图 2C、D)。

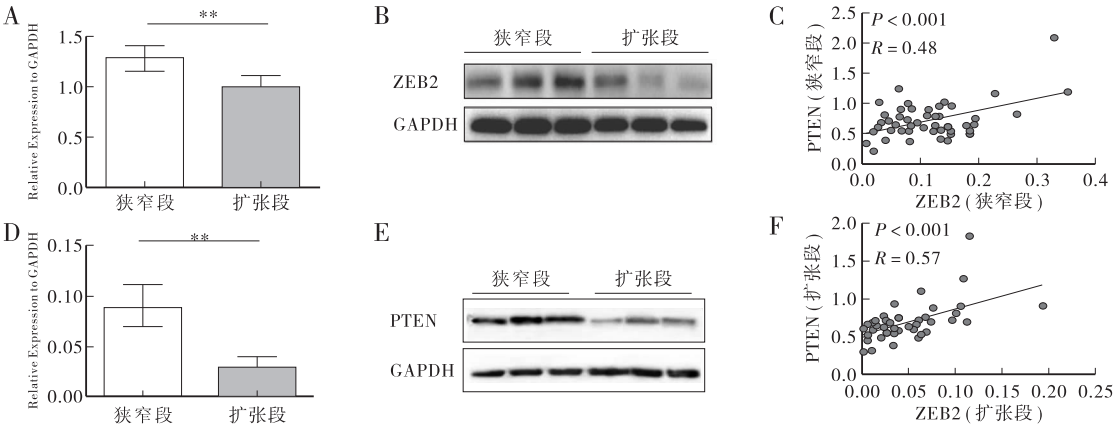


图 1 ZEB2 与 PTEN 的人群表达及两者的相关性分析结果。A:ZEB2mRNA 在 HSCR 狭窄段的表达比扩张段显著增加。B: ZEB2 蛋白在 HSCR 狭窄段的表达比扩张段显著增加。D:PTENmRNA 在 HSCR 狭窄段的表达比扩张段显著增加。E:PTEN 蛋白在 HSCR 狭窄段的表达比扩张段显著增加。C、F:分别对 ZEB2 和 PTEN 在 HSCR 狭窄段和扩张段中的 mRNA 表达结果进行 Person 相关性分析,发现 ZEB2mRNA 表达与 PTEN 表达均呈正相关关系。

Fig. 1 Population expressions of ZEB2 and PTEN and their correlations

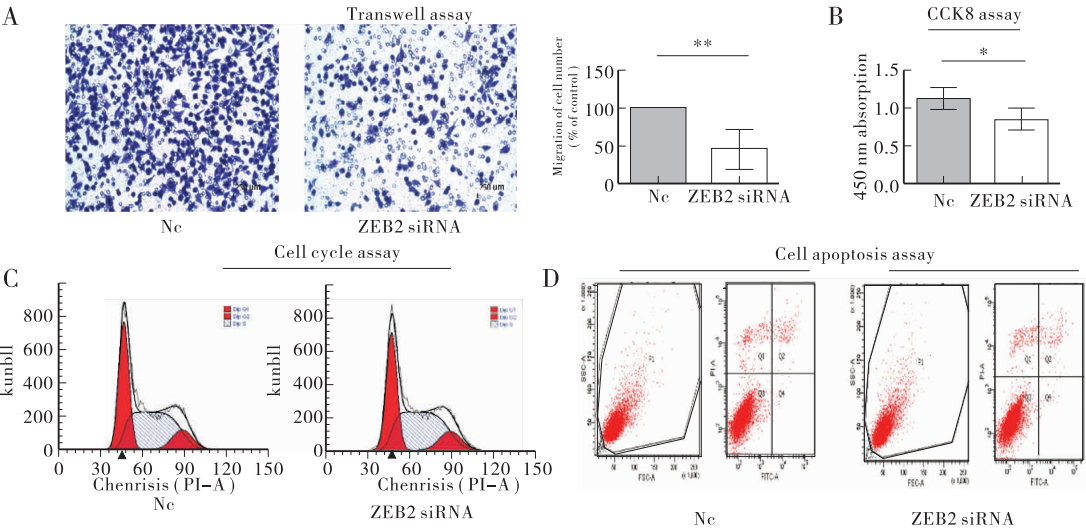


图 2 ZEB2 对体外细胞 SH-SY5Y 生物学功能影响的研究结果。A、B:转染 ZEB2 siRNA 与转染 Negative Control 相比,细胞迁移和增殖功能显著受到抑制。C、D:转染 ZEB2 siRNA 与转染 Negative Control 相比,细胞周期和凋亡检测没有显著差异。

Fig. 2 Effects of ZEB2 upon biological functions in SH-SY5Y cell in vitro

三、ZEB2 与 PTEN 之间表达调控

选用 SH-SY5Y 细胞,分别转染 ZEB2 siRNA 和 inhibitor NC 后,发现细胞 PTEN mRNA 和蛋白表达都显著下降(图 3A 和 B)。

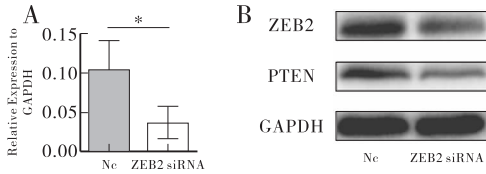


图 3 ZEB2 与 PTEN 之间的表达调控研究结果。A: ZEB2 干扰 SH-SY5Y 细胞后 PTEN mRNA 表达显著下降。B: ZEB2 干扰 SH-SY5Y 细胞后 PTEN 蛋白表达显著下降。

Fig. 3 Mutual regulations of ZEB2 and PTEN expressions

讨论

ZEB2 是由 Wakamatsu N^[7] 等首次报道其突变能够导致 HSCR。Higashi Y^[8] 等发现 ZEB2 敲除鼠缺失肠神经嵴细胞的前体细胞——听泡后方的迷走神经嵴细胞,从而使小鼠呈现出 HSCR 的表型。这些研究均提示缺失 ZEB2 将导致消化道神经节细胞缺失,引起 HSCR 的发生。然而, Wu Mei^[9] 等报道 HSCR 狭窄段中 ZEB2 基因呈高表达状态。这与 ZEB2 缺失导致 HSCR 的现象不符,提示 ZEB2 的表达异常与 HSCR 发病仍有未知的原因。本研究通过人群样本研究发现 ZEB2 mRNA 和蛋白在先天性巨结肠狭窄段中表达较对照组中显著增加,也证明 ZEB2 的异常高表达与 ZEB2 基因敲除鼠能够呈现出先天性巨结肠表型相矛盾。神经细胞生物学功能研究证实低 ZEB2 表达能够导致神经细胞迁移和增殖功能下降,这与 ZEB2 基因敲除鼠模型结果一致。

基因表达受到转录水平和转录后水平多环节调控。竞争性内源性 RNA 概念(competitive endogenous RNA, ceRNA)是新近提出的基因转录后调控的一种方式^[10]。CeRNA 是在研究 lncRNA 作用机制时被发现,即 lncRNA 可行使“海绵”作用,吸附 miRNA,而这些 miRNA 不能使本应该受到调控的 mRNA 降解,从而 lncRNA 在转录后水平调控 mRNA 的表达^[11]。研究证实, mRNA-mRNA 间也可形成竞争性内源性 RNA 关系,即两个 mRNA 都受同一 miRNA 的调控,那么其中一条 mRNA 可以行使“海绵”作用,吸附 miRNA,而这些 miRNA 不能使得本应该受到调控的另一条 mRNA 降解,从而形成两条 mRNA 之间相互调控关系^[12]。其中研究明确的有 ZEB1-ZEB2、PTEN-ZEB2 等^[13, 14]。对肝癌、胃癌等

多种肿瘤的研究发现, PTEN 可以通过 miR-200 家族调控 ZEB2 的表达,在肿瘤发生转移的过程中起着重要作用^[5, 6]。本课题组在前期研究中发现 miR-200 家族中 miR-200a 可以调控 PTEN 表达,参与先天性巨结肠的发生^[15]。因此在发现 ZEB2 在 HSCR 中的表达和 ZEB2 对神经细胞的生物学功能不一致后, ZEB2 与 PTEN 之间的 ceRNA 调控,即 ZEB2 与 PTEN 之间以 miR-200 家族媒介形成相互调控关系,可能为 ZEB2 在人群中呈高表达的状态提供了解释。

对体外神经细胞转染 ZEB2 siRNA,结果显示 ZEB2 低表达能够使得细胞迁移和增殖功能下降,同时引起 PTEN 的表达下降。PTEN 在多种肿瘤中被证实为抑癌基因,它的表达下降可以促进提示了肿瘤细胞迁移和增殖功能^[16-18]。本课题组前期研究也证实了 PTEN 表达下降可以促进神经细胞迁移和增殖能力^[15]。本研究中低 ZEB2 表达能够导致神经细胞迁移和增殖功能下降与 ZEB2 基因敲除鼠模型一致,因此 PTEN 在神经细胞转染 ZEB2 siRNA 后也呈现出的低表达状态,可能是 PTEN 与 ZEB2 之间可能存在竞争性内源性 RNA 的关系所致。人群中 PTEN 与 ZEB2 mRNA 的表达呈现出显著正相关关系,进一步提示了上述可能性,即 PTEN 通过 ceRNA 的方式,使得 ZEB2 继发性地呈现高表达状态。然而基因的异常表达受到多环节的调控,是否有其他机制如在 ZEB2 转录和翻译层面上的调控尚不清楚,仍需进一步研究。

综上所述,我们发现了 ZEB2 在 HSCR 人群中呈高表达状态,且其与神经细胞生物学功能的影响之间的矛盾可能是其受 PTEN 转录后调节的缘故,为 ZEB2 在巨结肠狭窄段中的表达异常提供了新的解释。

参考文献

- 1 戴康临,陶强. 先天性巨结肠病因学研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2005; 4(3): 200-202.
- 2 McKeown SJ, Stamp L, Hao M M, et al. Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system [J]. Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology, 2013, 2(1): 113-129.
- 3 熊晓峰,钟麟. 先天性巨结肠致病基因的研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2003; 2(3): 204-206.
- 4 Van de putte T, Maruhashi M, Ffancis A, et al. Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiol-

- ogy of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome [J]. American journal of human genetics, 2003, 72(2): 465-470.
- 5 Gao XH, Fu CG, Lao XY, et al. [Competing endogenous RNA regulation mechanism and its role in the development and progression of colorectal cancer] [J]. Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery, 2012, 15(12): 1318-1321.
 - 6 Ding W, You H, Dang H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion [J]. Hepatology, 2010, 52(3): 945-953.
 - 7 Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, et al. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease [J]. Nature genetics, 2001, 27(4): 369-370.
 - 8 Higashi Y, Wakamatsu N. [Function of zfhx1 family and molecular genetic analysis of its deficiency][J]. Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society, 2003, 75(1): 27-36.
 - 9 Chen Z, Yang L, Liu Y, et al. LY294002 and Rapamycin promote coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Molecular and cellular biochemistry, 2014, 385(1-2): 169-177.
 - 10 Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. Nature, 2014, 505(7483): 344-352.
 - 11 Kovalenko TF, Sorokina AV, Ozolinia LA, et al. [Pseudogene PTENP1 5'-region methylation in endometrial cancer and hyperplasias] [J]. Bioorganicheskaya khimiya, 2013, 39(4): 445-453.
 - 12 Karreth FA, Pandolfi PP. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry [J]. Cancer discovery, 2013, 3(10): 1113-1121.
 - 13 Denecker G, Vandamme N, Akay O, et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression [J]. Cell death and differentiation, 2014, 21(8): 1250-1261.
 - 14 Karreth FA, Tay Y, Perna D, et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma [J]. Cell, 2011, 147(2): 382-395.
 - 15 Li H, Tang J, Lei H, et al. Decreased MiR-200a/141 suppress cell migration and proliferation by targeting PTEN in Hirschsprung's disease [J]. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2014, 34(2): 543-553.
 - 16 Bahena-Ocampo I, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, et al. miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation [J]. EMBO reports, 2016, 17(5): 648-658.
 - 17 Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU, et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(11): 3030-3035.
 - 18 Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2016, 108(2): djv346.

(收稿日期: 2015-09-13)

(本文编辑: 尹强 王爱莲)

(上接第 569 页)

参考文献

- 1 Petersen C, Ure BM. What's new in biliary atresia? [J]. European Journal of Pediatric Surgery, 2003, 13(1): 1-6.
- 2 郑珊. 胆道闭锁的治疗现状 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007(23): 1767-1769.
- 3 Lien TH, Chang MH, Wu JF, et al. Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 202-208.
- 4 McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland [J]. Lancet, 2000, 355(9197): 25-29.
- 5 Serinet MO, Wildhaber BE, Broue P, et al. Impact of age at Kasai operation on its results in late childhood and adolescence: a rational basis for biliary atresia screening [J]. Pediatrics, 2009, 123(5): 1280-1286.
- 6 沈淳, 郑珊, 王玮, 等. 手术年龄对胆道闭锁 Kasai 手术后预后影响的研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2007(03): 10-12.
- 7 Kasai M, Mochizuki I, Ohkohchi N, et al. Surgical limitation for biliary atresia: indication for liver transplantation [J]. Journal of Pediatric Surgery, 1989, 24(9): 851-854.
- 8 沈淳, 郑珊, 陈莲, 等. 围生期巨细胞病毒感染与胆道闭锁的相关研究 [J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2005(02): 107-109.
- 9 Nio M, Ohi R, Miyano T, et al. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry [J]. Journal of Pediatric Surgery, 2003, 38(7): 997-1000.
- 10 Shneider BL, Brown MB, Haber B, et al. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000 [J]. J Pediatr, 2006, 148(4): 467-474.

(收稿日期: 2016-07-28)

(本文编辑: 王爱莲)