

ANP32A 沉默体外抑制结直肠癌的生长、侵袭和迁移 基于 AKT 信号通路活性的下降

丁虹芳¹, 李肖娟², 周璐炜², 崔智¹, 蒙海德³, 王娟¹

桂林医学院¹基础医学院,²药学院,³生物技术学院, 广西 桂林 541199

摘要:目的 探讨 ANP32A 基因下调对结直肠癌细胞侵袭迁移的作用与 AKT 信号通路活性的相关性。方法 采用慢病毒转染技术构建结直肠癌细胞 HCT116 和 SW480 sh-NC 和 sh-ANP32A 的稳定细胞株, MTT 检测 24、48 及 72 h 时 ANP32A 敲低对细胞增殖的影响, Western blot 检测 ANP32A 敲低对 AKT 的活性的影响; 应用 AKT 的激活剂(SC79)和抑制剂(MK2206)干预 HCT116 及 SW480 细胞, MTT 检测 24、48、72 及 96 h 时 SC79 和 MK2206 对结直肠癌细胞增殖的影响, Transwell 小室观察 SC79 和 MK2206 对结直肠癌细胞侵袭迁移的作用; 然后用 SC79 和 MK2206 干预上述两种结直肠癌细胞的 sh-NC 和 sh-ANP32A 稳定细胞株, 将每种细胞分为 sh-NC 对照组, sh-NC SC79, sh-NC MK2206, sh-ANP32A 对照组, sh-ANP32A SC79, sh-ANP32A MK2206 六个组, 细胞划痕分析细胞迁移能力, Transwell 小室分析细胞侵袭能力, WB 检测 SC79 和 MK2206 对 shANP32A 细胞侵袭迁移相关因子 metadherin (MTDH) 的影响。结果 与对照组(sh-NC)相比, 24、48 及 72 h 检测的 sh-ANP32A 组结直肠癌细胞的增殖活力均被明显抑制($P < 0.01$), 同时 ANP32A 的下调能抑制 HCT116 和 SW480 细胞内 AKT 的活性($P < 0.01$); AKT 抑制剂 MK2206 能抑制大肠癌细胞的增殖及侵袭迁移($P < 0.05$), 而 AKT 激活剂 SC79 虽然对细胞增殖影响较小, 但是能显著促进大肠癌的侵袭转移($P < 0.01$); 在 ANP32A 下调的细胞中, 与 sh-ANP32A 对照组相比, AKT 抑制剂 MK2206 能加强 ANP32A 下调对结直肠癌细胞增殖和侵袭的抑制作用($P < 0.05$), 同时增强 ANP32A 表达下调对 MTDH 表达的抑制作用, AKT 激活剂 SC79 能部分恢复大肠癌细胞因 ANP32A 下调导致的侵袭迁移抑制($P < 0.01$), 且减弱 ANP32A 表达下调对 MTDH 表达的抑制作用。结论 ANP32A 表达下调抑制结直肠癌细胞的侵袭迁移作用可能与 AKT 信号通路活性抑制有关。

关键词: ANP32A; AKT; 侵袭; 迁移; 结直肠癌

Silenced ANP32A inhibits the growth, invasion and migration of colorectal cancer *in vitro* via the inactivation of AKT pathway

DING Hongfang¹, LI Xiaojuan², ZHOU Luwei², CUI Zhi¹, MENG Haide³, WANG Juan¹

¹Faculty of Basic Medical Sciences, ²School of Pharmacy, ³School of Intelligent Medicine and Biotechnology, of Guilin Medical College, Guilin 541199, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ANP32A silencing on invasion and migration of colon cancer cells and the influence of the activity of AKT signaling pathway on this effect. **Methods** Colorectal cancer HCT116 and SW480 were transfected with a small interfering RNA targeting ANP32A via a lentiviral vector. At 24, 48 and 72 h after the transfection, the changes in cell proliferation and AKT activity in the cells were detected using MTT assay and Western blotting, respectively. HCT116 and SW480 cells were treated with the AKT agonist SC79 or its inhibitor MK2206 for 24, 48, 72 and 96 h, and the changes in cell migration and invasion ability were analyzed using Transwell chamber assay and cell proliferation was assessed using MTT assay. The effects of SC79 and MK2206 on migration and invasion abilities of HCT116 and SW480 cells with or without ANP32A silencing were examined using wound healing and Transwell chamber assays, and the changes in the expression of metadherin (MTDH), a factor associated with cells invasion and migration, was detected with Western blotting. **Results** Lentivirus-mediated ANP32A silencing significantly down-regulated the activity of AKT and inhibited the proliferation of both HCT116 and SW480 cells ($P < 0.01$). The application of AKT inhibitor MK2206 obviously inhibited the proliferation, invasion and migration of the colorectal cancer cells ($P < 0.05$), while the AKT agonist SC79 significantly promoted the invasion and migration of the cells ($P < 0.01$). In HCT116 and SW480 cells with ANP32A silencing, treatment with MK2206 strongly enhanced the inhibitory effects of ANP32A silencing on cell invasion and migration ($P < 0.05$) and the expression of MTDH, while SC79 partially reversed these inhibitory effects ($P < 0.01$). **Conclusion** ANP32A silencing inhibits invasion and migration of colorectal cancer cells possibly by inhibiting the activation of the AKT signaling pathway.

Keywords: ANP32A; AKT; invasion; migration; colon cancer

结直肠癌(CRC)是最常见的恶性肿瘤之一^[1],也是癌症相关死亡的主要原因^[2]。尽管近年来手术技术、化疗和分子靶向药物的进展改善了CRC患者

收稿日期:2022-05-23

基金项目:国家自然科学基金(81760443);大学生创新创业训练计划项目(202010601109,202110601003)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81760443).

作者简介:丁虹芳,在读硕士研究生,E-mail: 2674924931@qq.com

通信作者:王娟,博士,副研究员,E-mail: 407271431@qq.com

的预后,但它在全球所有癌症相关死亡中排名第4^[3],约有一半的CRC患者死于肿瘤转移^[4]。虽然已有报道称抑癌基因和癌基因的异常改变驱动结直肠癌的发生和发展^[5],但结直肠癌发病机制的确切分子机制,特别是远处转移,尚不明确^[6]。因此,寻找结直肠癌转移的潜在治疗靶点和分子机制对临床治疗具有重要意义。

富含酸性亮氨酸的核磷酸化蛋白-32a(ANP32A)也称为假定的HLA相关蛋白I(IPHAPI)或PP32^[5],是属

于酸性核酸家族,在进化上相对保守的一种蛋白^[7],调节细胞信号传导和基因表达,主要参与调节细胞骨架、细胞黏附、神经元发育或小脑形态发生等。早期认为 ANP32A 是一种肿瘤抑制因子^[7,8],近来有文献表明 ANP32A 能促进白血病细胞及口腔鳞癌的增殖^[9,10],靶向 ANP32A 的小肽 TAT-H3BP 可能是急性髓细胞白血病治疗的一种新策略^[11]。我们前期也发现 ANP32A 在结直肠癌中高表达,抑制其表达能抑制结直肠癌的增殖^[12],且与肿瘤分化程度密切相关。有研究发现敲除 ANP32A 显著降低了口腔鳞状细胞癌迁移和侵袭能力,可能是评估口腔癌患者预后的潜在生物标志物^[10]。Tian 等^[13]发现 ANP32A 能促进肝癌的增殖与侵袭迁移。虽然我们的数据和别人的报道都显示 ANP32A 在结直肠癌组织中高表达,下调 ANP32A 能抑制结直肠癌细胞增殖,但是 ANP32A 对结直肠癌侵袭迁移能力是否有影响尚无报道。

AKT,也被称为蛋白激酶B(PKB),是丝氨酸/苏氨酸激酶,是生长因子诱导细胞存活的关键介质^[14],参与调节细胞代谢、增殖、生存、凋亡、血管生成等^[15]。AKT 的活化参与肿瘤的侵袭迁移,是预防和治疗转移性肿瘤的潜在靶点^[16]。有研究证明 AKT 活化参与结直肠癌侵袭与迁移能力的调控^[17,18]。我们前期实验发现下调 ANP32A 能抑制结直肠癌细胞的增殖与 AKT 活性相关^[12],但是目前关于 ANP32A 是否调节结直肠癌侵袭迁移,以及该作用是否与 AKT 的活性有关尚无报道。本研究拟探讨 ANP32A 对结直肠癌细胞系侵袭迁移的影响及其与 AKT 活性的关系,以期寻找到治疗转移性结直肠癌的潜在新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 本实验所用人结直肠癌 HCT116 和 SW480 细胞为本课题组传代保存。

1.1.2 试剂与仪器 胎牛血清(CLRK);DMEM 培养基(Gibco);Transwell 小室(广州 JET BIOFIL);基质胶(corning);噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,广东西陇化工有限公司);SC79(GLP BIO);MK2206(Selleckchem);RIPA 强裂解液(上海碧云天生物科技有限公司); β -actin(北京中杉金桥生物技术有限公司);AKT、MTDH 单克隆抗体(Abcam);辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(北京依玛博科技有限公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(Thermo Fisher Scientific);ECL 化学发光试剂(合肥 Bio sharp);二氧化碳细胞培养箱(Eppendorf);生物安全柜(ESCO);酶标仪(TECAN);蛋白电泳系统、蛋白转印系统(Bio-Rad);台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);小型高速离心机(Eppendorf);高

速冷冻离心机、细胞计数仪(Thermo Fisher Scientific);凝胶成像系统(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制及干预 AKT 激活剂 SC79 用 DMSO 配制成浓度为 50 mmol/L 母液,AKT 抑制剂 MK2206 用 DMSO 配制成浓度为 20 mmol/L 母液,实验时根据实验所需浓度用培养基稀释,现配现用。进行细胞增殖实验分析时,SC79 和 MK2206 的处理时间为 24、48 和 72 h;进行侵袭迁移以及收集细胞沉淀进行 Western blotting 分析时二者的处理时间均为 48 h。

1.2.2 细胞培养 HCT116 结直肠癌细胞用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 g/L)在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。在细胞融合度为 80% 以上时使用含 EDTA 胰蛋白酶消化传代,2 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 细胞转染 由公司设计 ANP32A shRNA (sh-ANP32A) 及其空载体质粒 (sh-NC),利用 ANP32A 沉默质粒和慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,在转染 24 h 与 48 h 收集上清,获得慢病毒。使用收集的上清感染 HCT116 和 SW480 细胞,从而构建 ANP32A 沉默 (sh-ANP32A) 和空载体质粒 (sh-NC) 的稳定细胞系。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 将对数生长期的 sh-ANP32A、sh-NC 及 Control 的 HCT116 和 SW480 细胞,按 2000 细胞/孔接种至 96 孔板中,在给予药物处理 24、48 及 72 h 用酶标仪检测光密度值(A 值)。用酶标仪检测前每孔加入 20 μ L MTT,放入培养箱孵育 4 h 后,吸去孔内全部溶液,加入二甲基亚砜溶液(DMSO),待甲臞完全溶解后,用酶标仪检测 A₄₉₀。

将对数生长期的 HCT116 和 SW480 细胞分为对照组,SC79 组与 MK2206 组,其中 SC79 的给药浓度为 2 μ mol/L, MK2206 的给药浓度为 5 μ mol/L,按每孔 2000 个细胞接种至 96 孔板中,在给予药物处理 24、48、72 及 96 h。用酶标仪检测前每孔加入 20 μ L MTT,放入培养箱孵育 4 h 后,吸去孔内全部溶液,加入二甲基亚砜溶液(DMSO),待甲臞完全溶解后,用酶标仪检测 A₄₉₀。

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移能力 将对数生长期已转染成功的 sh-NC 与 sh-ANP32A 细胞,胰酶消化离心,然后按照细胞汇合度为 70% 接种于六孔板中,放置培养箱中培养,待细胞贴壁达到 95% 以上,用 200 μ L 枪头进行划痕,用 PBS 清洗脱落的细胞,加入新的培养基,于倒置显微镜下观察拍照,拍照时间记为 0 h,随后在划痕成功的 sh-NC 与 sh-ANP32A 细胞中分别给予 SC79 和 MK2206,将六孔板放入培养箱中继续培养,48 h 后继续进行拍照,利用 Image J 软件计算划痕面积。此实验分组为 sh-NC、sh-NC+SC79、sh-ANP32A、sh-ANP32A+SC79、sh-NC、sh-NC + MK2206、sh-ANP32A、sh-ANP32A+MK2206。

1.2.6 Transwell检测细胞侵袭能力 提前将基质胶放置4 °C解冻,用DMEM(不含胎牛血清)按1:8稀释基质胶,每孔加入30 μL稀释好的基质胶,37 °C培养箱中放置4 h后进行实验。收集饥饿24 h后的实验组细胞,1000 r/min,5 min离心后,进行细胞计数,按每孔3×10⁵个细胞接种在Transwell小室上室体积为200 μL,下室依照不同实验添加600 μL DMEM(含10%胎牛血清)或600 μL加药培养基(含10%胎牛血清)。6 h后加入SC79和MK2206,然后在37 °C,5% CO₂条件下继续培养48 h后,用4%多聚甲醛固定30 min,用0.1%结晶紫37 °C染色20 min,用PBS清洗3次。利用倒置显微镜进行拍照,用Image J软件进行细胞计数。

1.2.7 Western blot检测细胞蛋白表达 收集细胞沉淀,加入RIPA裂解液提取细胞总蛋白,用BCA法进行细胞总蛋白定量,并将样品进行煮沸变性。随后进行电泳分离与转膜,之后用5%脱脂牛奶封闭2 h,用PBST洗膜3次后加入相应的ANP32A、AKT、p-AKT、MTDH与β-actin抗体,4 °C过夜,次日用PBST洗膜3次,室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗1 h,用PBST洗膜3次,加入ECL化学发光试剂,用发光凝胶成像系统检测目的蛋

白。利用Image J软件进行目的蛋白的灰度分析。

1.3 统计学分析

采用GraphPad 8.0与SPSS 21.0统计软件进行数据统计分析。计量资料以均数±标准差表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 ANP32A的下调抑制细胞增殖

在结直肠癌细胞HCT116和SW480中,利用慢病毒载体构建ANP32A沉默的细胞(sh ANP32A)和阴性对照细胞(sh-NC)。Western blot结果显示sh-ANP32A组的ANP32A表达与sh-NC相比显著下降($P<0.01$,图1C、D)。ANP32A下调后,HCT116细胞和SW480细胞形态发生变化,触角消失,细胞变圆,且更易聚集成团(图1A、B)。细胞增殖实验结果显示阴性组(sh-NC)与空白对照组细胞增殖没有显著性差异($P>0.05$),但是ANP32A下调则能显著抑制HCT116和SW480细胞的增殖($P<0.01$),其中ANP32A沉默对HCT116细胞的增殖抑制作用更强,达到50%以上(图1E)。

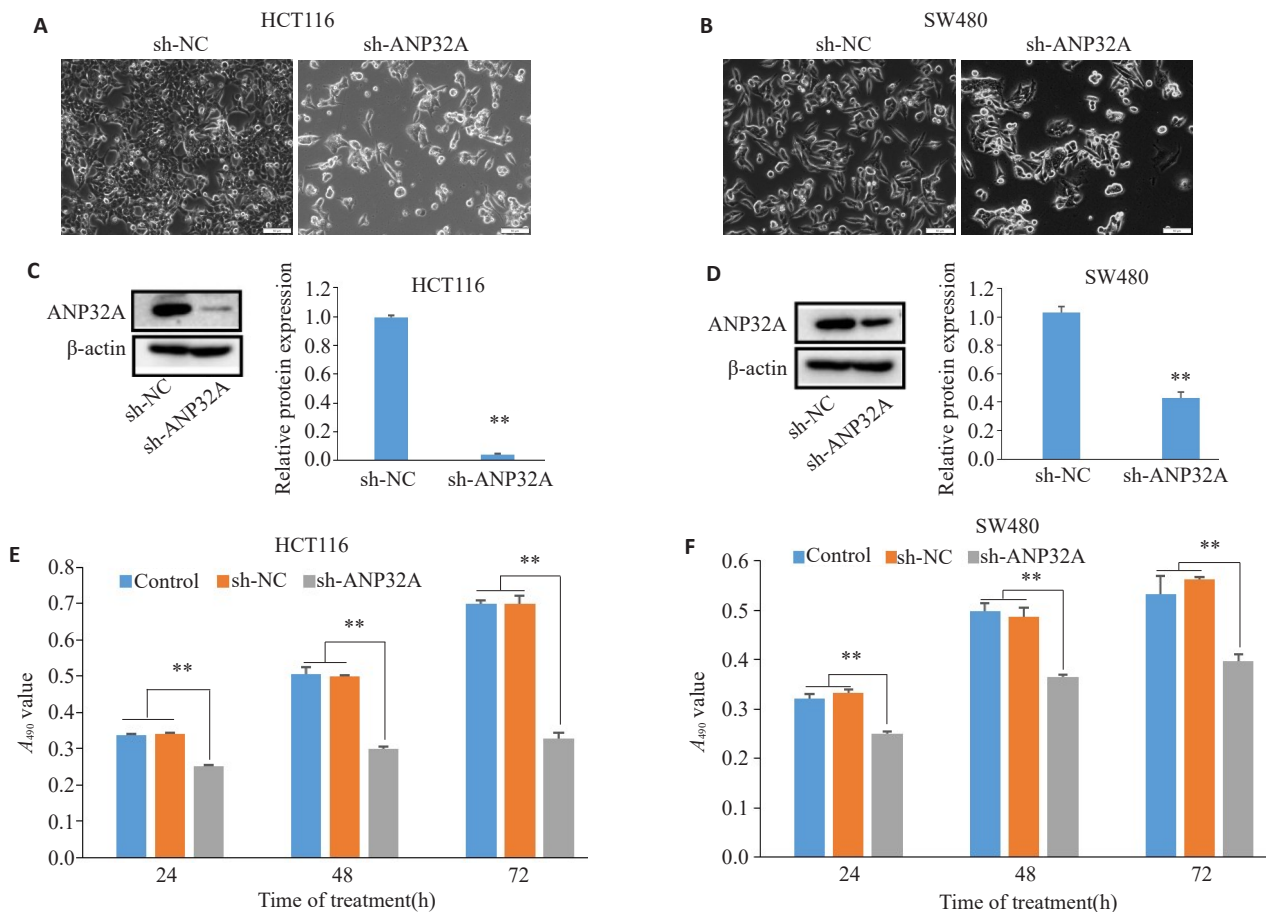


图1 ANP32A的下调抑制细胞增殖

Fig.1 ANP32A silencing inhibits proliferation of HCT116 and SW480 cells. A, B: Changes in morphology of HCT116 and SW480 cells after ANP32A silencing (Original magnification: ×100). C, D: Expression level of ANP32A in HCT116 and SW480 cells after ANP32A silencing detected by Western blotting. E, F: Changes in proliferation of HCT116 and SW480 cells after ANP32A silencing. ** $P<0.01$ vs sh-NC group.

2.2 AKT的活性对HCT116和SW480增殖及侵袭的影响

HCT116细胞和SW480细胞敲低ANP32A的表达后,细胞内p-AKT的表达下降(图2)。倒置显微镜下观察发现,AKT抑制剂MK2206能明显抑制HCT116细胞增殖,使细胞变圆,触角消失,失去其正常的梭形形状,而其对SW480细胞,能抑制其增殖,甚至诱导其发生死

亡(图2B)。细胞增殖实验结果显示2 $\mu\text{mol/L}$ AKT激活剂SC79对大肠癌HCT116和SW480细胞的增殖作用较弱,而5 $\mu\text{mol/L}$ MK2206能显著地抑制结直肠癌细胞的增殖能力($P<0.05$,图2C)。Transwell实验结果显示2 $\mu\text{mol/L}$ SC79能显著促进大肠癌细胞的侵袭迁移能力($P<0.01$),而5 $\mu\text{mol/L}$ MK2206能显著地抑制结直肠癌细胞的侵袭迁移能力($P<0.01$,图2D、E)。

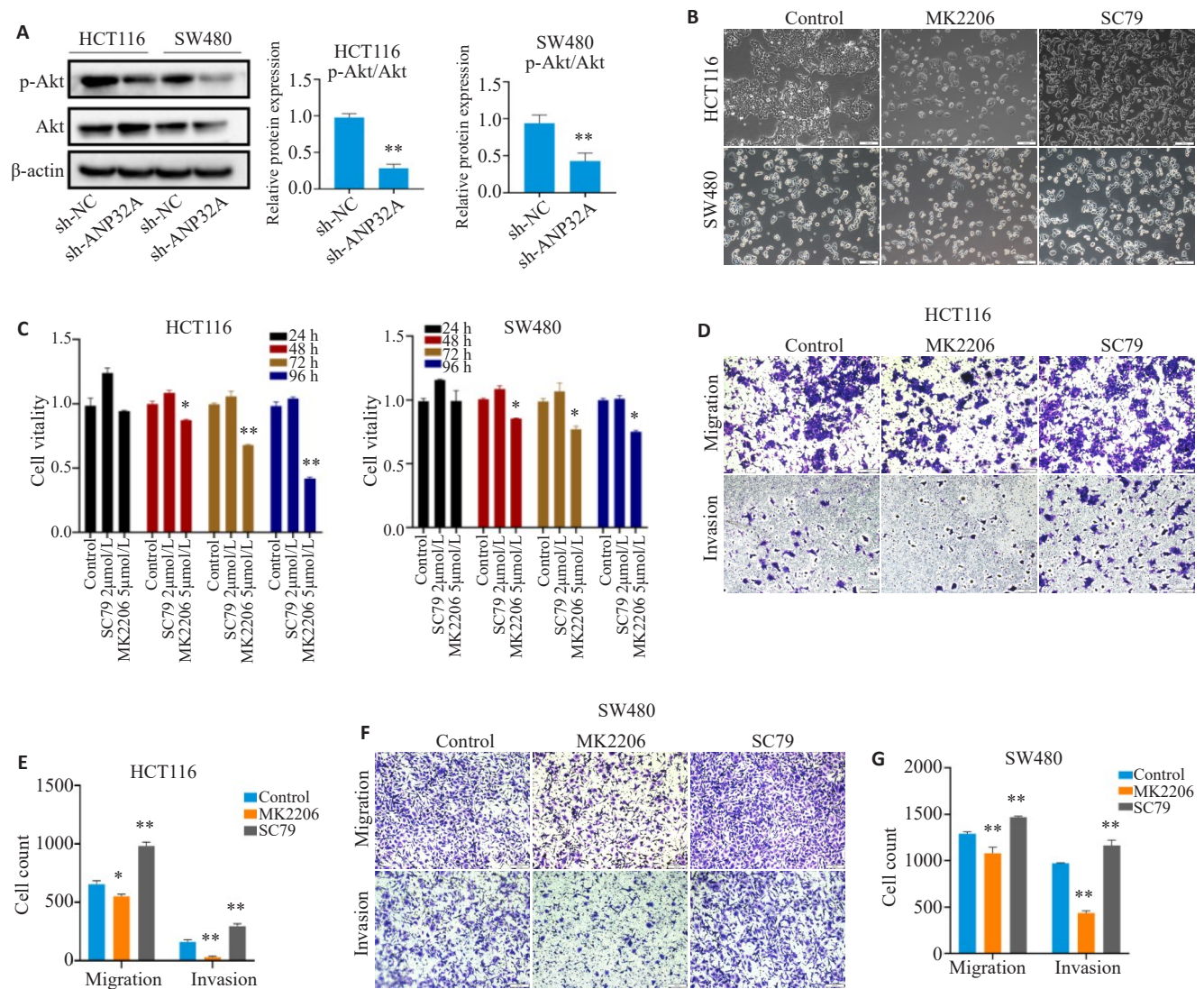


图2 AKT的活性影响结直肠癌细胞的增殖及侵袭迁移

Fig.2 Effects of AKT agonist and inhibitor on proliferation, invasion and migration of HCT116 and SW480 cells. A: Changes in AKT activity in HCT116 and SW480 cells with ANP32A silencing. B: Effects of AKT agonist and inhibitor on morphology of HCT116 and SW480 cells ($\times 200$). C: Effect of treatments with AKT agonist and inhibitor on viability of HCT116 and SW480 cells. D-G: Effects of treatments with AKT agonist and inhibitor on invasion and migration ability of HCT116 and SW480 cells (Crystal violet staining, $\times 200$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs sh-NC group.

2.3 ANP32A下调抑制结直肠癌细胞的侵袭迁移与AKT的活性有关

细胞划痕实验结果显示,SC79不仅能增强对照组细胞的迁移能力($P<0.01$),且能恢复由ANP32A沉默导致的结直肠癌细胞迁移能力减弱($P<0.01$),而

MK2206则不仅能抑制对照组细胞的迁移能力($P<0.01$),同时增强ANP32A沉默引起的结直肠癌细胞迁移抑制作用(HCT116细胞中 $P<0.01$,SW480细胞中 $P<0.05$)(图3A~E)。Transwell实验结果也显示SC79不仅能增强对照组细胞的侵袭能力($P<0.01$),且能回撤

ANP32A 沉默导致的结直肠癌细胞侵袭能力减弱 ($P < 0.01$), 而MK2206则不仅能抑制对照组细胞的侵袭能力

($P < 0.01$), 同时增强ANP32A沉默引起的侵袭抑制作用 ($P < 0.01$, 图3F)。

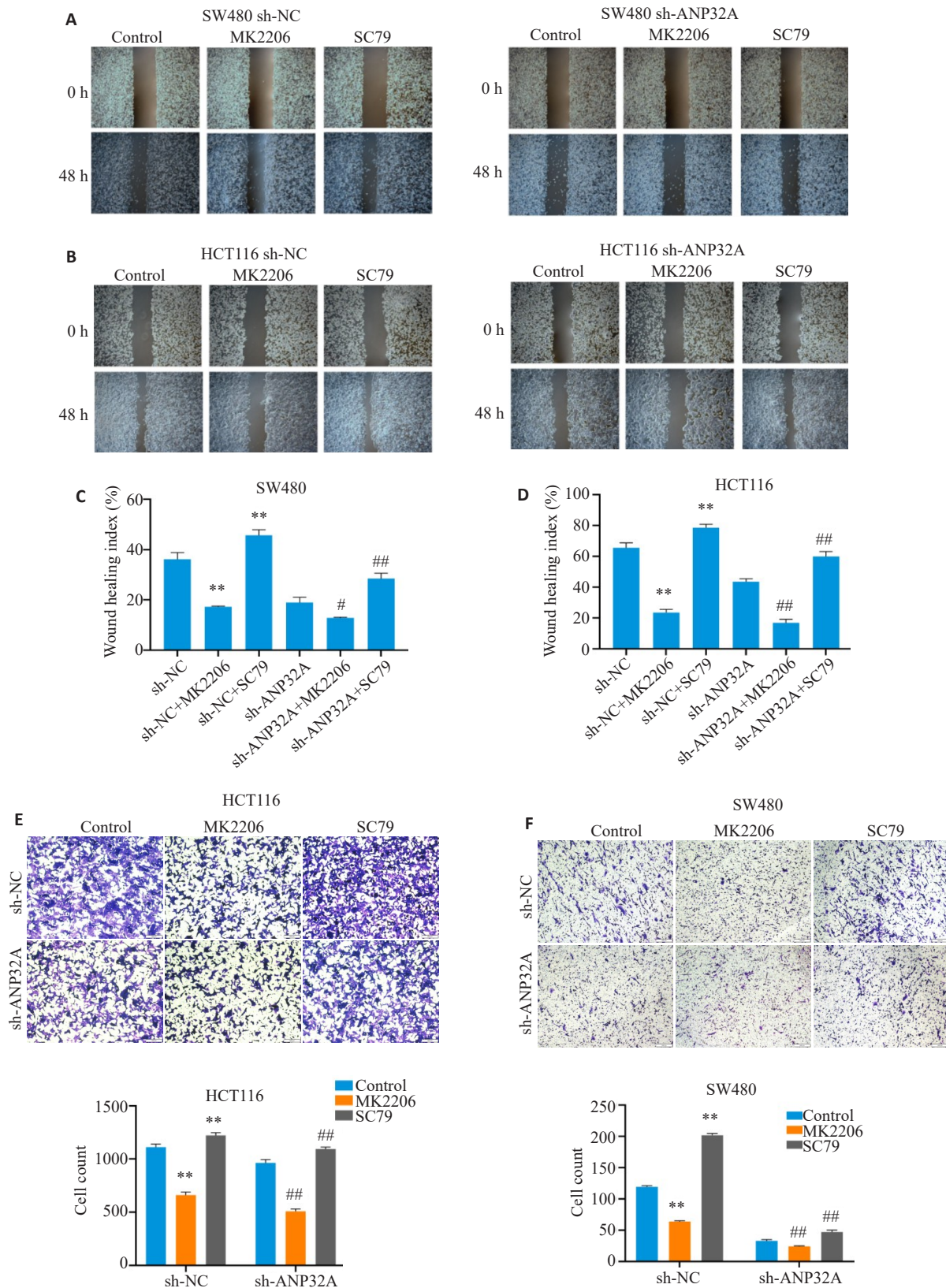


图3 AKT的活性对ANP32A沉默结直肠癌细胞侵袭迁移的影响

Fig.3 Effects of AKT agonist and inhibitor on invasion and migration ability of HCT116 and SW480 cells with ANP32A silencing. A-D: AKT activity affects the inhibitory effects of ANP32A silencing on colon cancer cell migration ($\times 40$). E, F: AKT activity affects the inhibitory effect of ANP32A silencing on colon cancer cell invasion (Crystal violet staining, $\times 200$). ** $P < 0.01$ vs sh-NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs sh-ANP32A group.

2.4 AKT的活性对shANP32A大肠癌细胞内ANP32A表达及AKT活性的影响

如图4A和5A所示,SC79能逆转ANP32A沉默细胞内ANP32A的表达;而MK2206则能进一步抑制由shANP32A导致的结直肠癌细胞内ANP32A水平的降低(图4B和5B)。同时我们发现结直肠癌细胞中MTDH的蛋白水平能被AKT抑制剂MK2206所抑制($P<0.01$);被AKT激活剂SC79所上调($P<0.05$),但是

在HCT116细胞中,与对照组相比没有显著性差异($P>0.05$)。ANP32A沉默后,MTDH的表达下调,同时MK2206能加强ANP32A沉默对MTDH的抑制作用(HCT116细胞中 $P<0.01$,SW480细胞中 $P<0.05$),在SW480细胞中SC79则能逆转ANP32A沉默对MTDH的抑制作用($P<0.05$,图5A),但是在HCT116细胞中,SC79的逆转作用不显著($P>0.05$,图4A)。

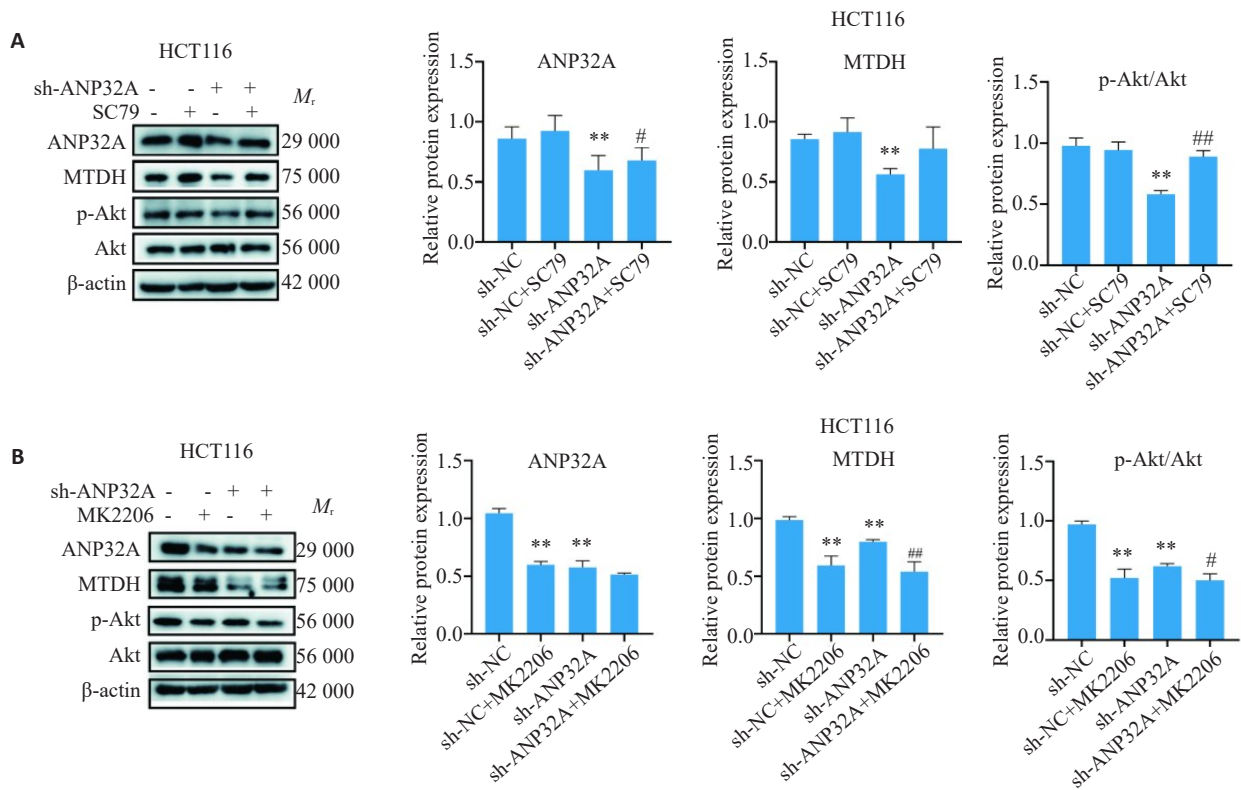


图4 HCT116细胞western blot和灰度分析

Fig.4 Western blotting and gray scale analysis of ANP32A expression and AKT activity in HCT116 cells with ANP32A silencing treated with AKT agonist or inhibitor. **A:** Effects of Akt agonist on ANP32A expression and AKT activity in HCT116 cells with ANP32A silencing. **B:** Effects of AKTt inhibitor on ANP32A expression and AKT activity in HCT116 cells with ANP32A silencing. ** $P<0.01$ vs sh-NC; $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ vs sh-ANP32A.

3 讨论

越来越多的证据表明许多基因变化与癌细胞的侵袭和转移有关^[19,20]。因此,在结直肠癌中特异性上调或者下调的基因中寻找关键调控因子,对于结直肠癌的防治意义重大。早期研究表明,ANP32A被认为是一种肿瘤抑制因子^[8,21],在正常组织、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌中表达的核磷酸蛋白^[7,10],具有调节细胞分化、转录、凋亡和细胞周期进程多种细胞功能^[22]。近些年来,越来越多的人发现,ANP32A在肿瘤组织中高表达,并参与了肿瘤的侵袭和转移^[10]。我们前期也发现ANP32A在结直肠癌中高表达,利用siRNA干扰技术我们发现ANP32A的沉默确实可以抑制结直肠癌细胞的增殖^[12]。在本研究中,我们发现利用慢病毒构建的

ANP32A沉默的稳定细胞株确实能够抑制结直肠癌细胞的增殖,同时倒置显微镜镜下发现ANP32A的沉默能够改变细胞的形态,尤其是在HCT116细胞中细胞形态改变更明显,我们发现ANP32A沉默可以导致细胞变圆,细胞更易成团,原来的形态消失,细胞接触增加,这个与以前报道的恶性侵袭表型相反^[23,24],因此我们推测ANP32A可能参与了结直肠癌细胞的侵袭转移。

我们的早前研究表明利用siRNA干扰ANP32A表达后,AKT的活性下降^[12],AKT除了参与肿瘤的增殖以后,它的异常激活更是参与了包括结直肠癌细胞在内的多种肿瘤细胞的侵袭迁移^[25,26]。研究表明INTS6通过激活AKT和ERK促进结直肠癌细胞的侵袭迁移,结直肠癌细胞新的治疗靶点^[27]。GATA1,一种在红细胞和乳

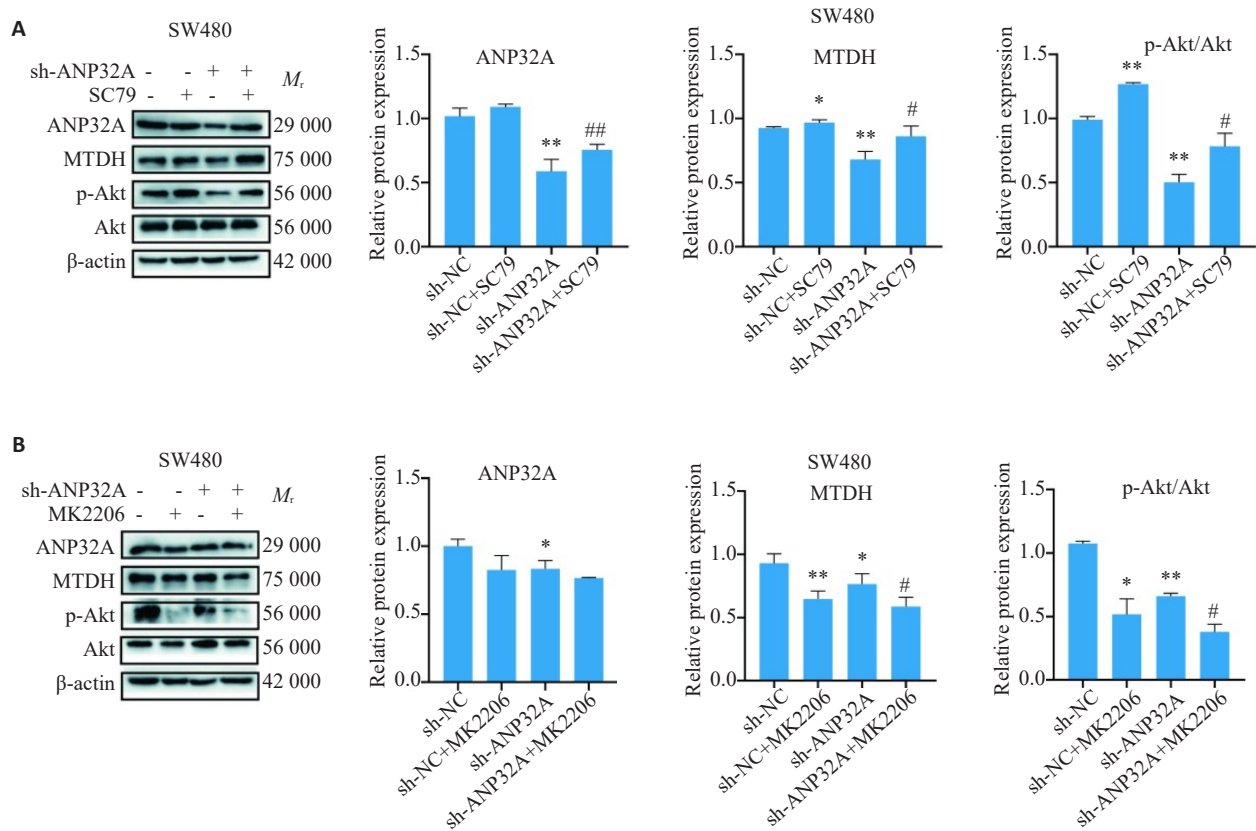


图5 SW480细胞western blot和灰度分析

Fig.5 Western blotting and gray scale analysis of SW480 cells. **A:** Effects of AKT agonists on ANP32A expression and AKT activity in SW480 cells with ANP32A silencing; **B:** Effects of AKT inhibitor on ANP32A expression and AKT activity in SW480 cells with ANP32A silencing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sh-NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs sh-ANP32A group.

腺癌细胞的发育和进展发挥作用的转录因子,被发现能促进增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化(EMT),其机制主要是与其激活结直肠癌细胞中PI3K/AKT信号通路的活性有关^[28],INTS6,SPNS2等因子促进结直肠癌的恶性进展均与AKT的异常活化有关^[27,29]。且在结直肠癌肝转移的机制中,AKT信号活化参与HGF促进结直肠癌的侵袭与迁移^[30],说明AKT的活性在结直肠癌的转移中起重要作用。本研究中,我们利用了AKT的激活剂SC79和抑制剂MK2206去探究其活性对结直肠癌细胞侵袭迁移的影响,确实发现AKT的活性参与调节结直肠癌的侵袭迁移。在结直肠癌细胞HCT116与SW480细胞中,AKT的活性抑制后,ANP32A表达下调;而AKT活性的活化,ANP32A的表达上调,并且在ANP32A沉默的细胞中,AKT活性的抑制能加强ANP32A沉默导致的结直肠癌细胞侵袭迁移能力的减弱,AKT活性的活化则能逆转ANP32A沉默导致的结直肠癌细胞侵袭迁移能力的减弱,这表明ANP32A的表达调节结直肠癌的侵袭迁移作用与AKT的活性有关,这在一定程度上解释了ANP32A在AKT介导的细胞转移和侵袭促进作用。

近年来寻找新的肿瘤转移因子是研究的热点,金属粘连蛋白(MTDH)已被发现参与多种癌症的发展,包

括乳腺癌^[31]、前列腺癌、肝癌、胃癌^[32]、肺癌和结肠直肠癌^[33,34]。MTDH已在多种肿瘤中证实了其在促进肿瘤起始、进展、转移和治疗耐药性方面的关键作用^[35],MTDH被确定为参与各种类型肿瘤转移进展的重要转移驱动因子^[36]。此外,在小鼠模型中敲除MTDH后没有观察到明显的生理缺陷,这使得其成为癌症治疗的一个具有吸引力的治疗靶点。在小鼠结直肠癌模型中,使用MTDH反义寡核苷酸(ASOs)可治疗显著减轻结直肠癌的进展和转移^[35]。本研究中,我们发现结直肠癌细胞中ANP32A的下调能抑制MTDH的表达,表明ANP32A的沉默能影响AKT的活性,也能抑制转移相关因子MTDH的表达来抑制结直肠癌的侵袭迁移。此外,我们还发现结直肠癌细胞抑制AKT的活性后,MTDH表达下调,而AKT活性活化后,MTDH的表达上调,此结果与前人研究一致即AKT活化参与了结直肠癌的侵袭迁移能力调控。

综上所述,本研究通过慢病毒转染技术成功构建了ANP32A沉默的稳定细胞株,并证明ANP32A的下调可以抑制结直肠癌细胞增殖,侵袭和迁移,并且抑制结直肠癌细胞PI3K/AKT信号通路活性,为结直肠癌的治疗提供了一定的理论支撑。

参考文献:

- [1] 马金珠, 朱益平, 王 箴, 等. miR-593通过调控PLK1基因的表达抑制结肠癌细胞的增殖[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(2): 144-9.
- [2] Huang RQ, Li JX, Fu Y, et al. Downregulation of FEM1C enhances metastasis and proliferation in colorectal cancer[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(17): 1391.
- [3] Tanio A, Saito H, Amisaki M, et al. AMIGO2 as a novel indicator of liver metastasis in patients with colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4): 278.
- [4] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [5] Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, et al. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2017, 56(11): 769-87.
- [6] 黎文华, 冯 赟, 马振增, 等. miR-454-3p在结肠癌中的表达及其对结肠癌增殖、侵袭及肝转移能力的影响[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(12): 1421-6.
- [7] Huyton T, Wolberger C. The crystal structure of the tumor suppressor protein pp32 (Anp32a): structural insights into Anp32 family of proteins[J]. *Protein Sci*, 2007, 16(7): 1308-15.
- [8] Williams TK, Costantino CL, Bildzukewicz NA, et al. pp32 (ANP32A) expression inhibits pancreatic cancer cell growth and induces gemcitabine resistance by disrupting HuR binding to mRNAs[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15455.
- [9] Yang XJ, Lu B, Sun XQ, et al. ANP32A regulates histone H3 acetylation and promotes leukemogenesis[J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1587-97.
- [10] Velmurugan BK, Yeh KT, Lee CH, et al. Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein-32A (ANP32A) association with lymph node metastasis predicts poor survival in oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10879-90.
- [11] Wang MM, Guo H, Zhang XC, et al. Small peptide targeting ANP32A as a novel strategy for acute myeloid leukemia therapy[J]. *Transl Oncol*, 2022, 15(1): 101245.
- [12] Yan W, Bai Z, Wang J, et al. ANP32A modulates cell growth by regulating p38 and Akt activity in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1605-12.
- [13] Tian ZL, Liu ZY, Fang XK, et al. ANP32A promotes the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma by modulating the HMGA1/STAT3 pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(3): 493-506.
- [14] Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, et al. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process[J]. *Biochimie*, 2019, 165: 229-34.
- [15] Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: mediator and more[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 80-91.
- [16] Xu WT, Yang Z, Lu NH. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9(4): 317-24.
- [17] Wei R, Xiao YH, Song Y, et al. FAT4 regulates the EMT and autophagy in colorectal cancer cells in part via the PI3K-AKT signaling axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 112.
- [18] Ma Z, Lou SP, Jiang Z. PHLDA2 regulates EMT and autophagy in colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(9): 7985-8000.
- [19] Zhang MJ, Wang S, Yi AW, et al. microRNA-665 is down-regulated in gastric cancer and inhibits proliferation, invasion, and EMT by targeting PPP2R2A[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(4): 409-18.
- [20] Chen YB, Pan C, Wang XT, et al. Silencing of METTL3 effectively hinders invasion and metastasis of prostate cancer cells [J]. *Theranostics*, 2021, 11(16): 7640-57.
- [21] Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, et al. microRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4[J]. *Oncogene*, 2011, 30(26): 2975-85.
- [22] Adegbola O, Pasternack GR. Phosphorylated retinoblastoma protein complexes with pp32 and inhibits pp32-mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15497-502.
- [23] Mi L, Zhu F, Yang X, et al. The metastatic suppressor NDRG1 inhibits EMT, migration and invasion through interaction and promotion of caveolin-1 ubiquitylation in human colorectal cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(30): 4323-35.
- [24] Ha GH, Park JS, Breuer EKY. TACC3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(1): 63-73.
- [25] Zhang X, Han J, Feng L, et al. DUOX2 promotes the progression of colorectal cancer cells by regulating the AKT pathway and interacting with RPL3[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(1): 105-17.
- [26] Wang ZX, Jia LZ, Sun YS, et al. CORO1C is associated with poor prognosis and promotes metastasis through PI3K/AKT pathway in colorectal cancer[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 682594.
- [27] Ding XF, Chen TW, Shi Q, et al. INTS6 promotes colorectal cancer progression by activating of AKT and ERK signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 407(2): 112826.
- [28] Yu JH, Liu M, Liu H, et al. GATA1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via activating AKT signaling pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 457(1/2): 191-9.
- [29] Gu XY, Jiang Y, Xue WN, et al. SPNS2 promotes the malignancy of colorectal cancer cells via regulating Akt and ERK pathway[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(9): 861-71.
- [30] Zhou H, Liu ZT, Wang YX, et al. Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 70.
- [31] Shen MH, Wei Y, Kim H, et al. Small-molecule inhibitors that disrupt the MTDH-SND1 complex suppress breast cancer progression and metastasis[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(1): 43-59.
- [32] Wu P, Ye DM, Li JY, et al. circALPL sponges miR-127 to promote gastric cancer progression by enhancing MTDH expression [J]. *J Cancer*, 2021, 12(16): 4924-32.
- [33] Khan M, Sarkar D. The scope of astrocyte elevated gene-1/metadherin (AEG-1/MTDH) in cancer clinicopathology: a review [J]. *Genes*, 2021, 12(2): 308.
- [34] Sultan A, Sahar NE, Riaz SK, et al. Metadherin (MTDH) overexpression significantly correlates with advanced tumor grade and stages among colorectal cancer patients[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(12): 7999-8007.
- [35] Shen MH, Xie SS, Rowicki M, et al. Therapeutic targeting of metadherin suppresses colorectal and lung cancer progression and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(4): 1014-25.
- [36] He AB, He SM, Huang C, et al. MTDH promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma by activating SND1-mediated ERK signaling and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Aging*, 2020, 12(2): 1465-87.