

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.02.026

ARID1A对结肠癌细胞迁移的调控作用

石慧, 彭锐, 邹方东

(四川大学生命科学学院, 成都 610065)

摘要: 为研究 ARID1A 对结肠癌细胞迁移的影响, 并进一步分析 ARID1A 调控细胞迁移的机制, 本文通过在结肠癌细胞系 HCT116 中过表达和干扰 ARID1A 基因, 观察细胞迁移率的变化, 通过比较 HCT116 与正常组织中的基因表达数据, 筛选出 ARID1A 共表达基因, 进行 GO 和 KEGG 分析. 结果显示, 过表达 ARID1A 后, 细胞迁移率降低, 而干扰 ARID1A 则与之相反. 在 1212 个相关系数大于 0.9 的 ARID1A 共表达基因中, 仅有 4 个基因参与细胞增殖, 29 个基因参与细胞迁移, 涉及趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用等多个信号通路. 以上结果说明 ARID1A 抑制细胞迁移, 并可能通过多个信号通路调控细胞迁移.

关键词: 结肠癌; ARID1A; 细胞迁移; 共表达基因

中图分类号: Q28 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)02-0371-05

Regulation of ARID1A on the migration of colon cancer cells

SHI Hui, PENG Rui, ZOU Fang-Dong

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to study the effect of ARID1A on the migration of colon cancer cells, and to further analyze the mechanism of ARID1A regulating cell migration, the change of cell migration rate was observed by overexpression and interference of ARID1A gene in HCT116 cell line, and ARID1A co-expressed genes were screened out for GO and KEGG analysis by comparing the gene expression data between HCT116 and normal tissues. The results showed that overexpression of ARID1A reduced cell mobility, while the interference of this gene would lead to the opposite result. Among 1212 ARID1A co-expressed genes with a correlation coefficient greater than 0.9, there are only 4 genes involved in cell proliferation and 29 genes involved in cell migration, which are associated with chemokine signaling pathway, cytokine receptor interaction and other signaling pathways. It is suggested that ARID1A can inhibit cell migration and regulate cell migration through multiple signaling pathways.

Keywords: Colon cancers; ARID1A; Cell migration; Co-expressed genes

1 引言

结直肠癌(Colorectal Carcinoma, CRC)包括结肠癌和直肠癌, 两者主要存在解剖学上的区别^[1]. 据 2018 年统计, 全球新增结直肠癌病例超

过 180 万, 其中 881 000 例死亡^[2-3]. 调查表明结直肠癌患者手术后 5 年内生存率在 40%~60%之间, 说明手术后癌症可能复发或转移^[4]. 另有很多患者在诊断时已经出现癌细胞向其他脏器转移的现象^[5]. 恶性程度较高的结直肠癌不仅会对化疗药物

收稿日期: 2019-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(81672942)

作者简介: 石慧(1993-), 女, 湖北咸宁人, 硕士生, 研究方向为细胞生物学. E-mail: 719426592@qq.com

通讯作者: 邹方东. E-mail: fundzou@scu.edu.cn

会产生耐药性,而且转移几率更高.因此研究结肠癌发生和转移机制、寻找新的治疗方式和治疗靶点显得尤为迫切.

SWI/SNF 染色质重塑复合物由多种亚基构成,根据核心催化亚基的不同可以分为 BAF (BRG1/BRM associated factors, BAF) 和 PBAF (Polybromo-associated BAF, PBAF) 两大类复合物. BAF 类复合物核心催化亚基包括具有 ATP 酶活性的 BRM (Brahma, BRM) 和 BRG1 (Brahma related gene1, BRG1), 该复合物可以利用 ATP 水解的能量改变核小体的结构和位置,调节转录因子与启动子之间的结合,从而激活或抑制转录^[6-7]. ARID1A (AT-rich interactive domain 1A, ARID1A) 是 SWI/SNF 复合物的一个非催化亚基,可以非特异性地与 DNA 结合,招募其他组分到复合物中.

对结肠癌样本中 ARID1A 蛋白水平的临床病理学分析结果显示,25.8% 的原发性肿瘤不表达 ARID1A, 51.2% 有低水平的 ARID1A 表达.

并且在 TNM (tumor-node-metastasis, TNM) 一期到四期的肿瘤中 ARID1A 的缺失率达到 7.4%~46.3%. 这些数据说明 ARID1A 在结肠癌中的缺失与肿瘤的发生和转移有着密切的关系^[8]. 本文通过干扰和过表达 ARID1A, 研究其对结肠癌细胞迁移的影响,并通过 GO 和 KEGG 分析参与细胞迁移的 ARID1A 共表达基因所涉及的生物学过程和信号通路,以期揭示 ARID1A 调控细胞迁移的分子机制.

2 材料与方法

2.1 材料

人结肠癌细胞系 HCT116, 人肾上皮细胞系 HEK293T 购于上海中科院细胞库;质粒 pLKO.1-TRC, pSPAX2, pMD2. G, pLenti-puro-ARID1A 和 pcDNA3.1(+) 购于 Addgene 公司;引物合成及测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成(引物序列见表 1).

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
shRNA-ARID1A-F	CCGGGCCTGATCTATCTGGTTCAATCTCGAGATTGAACCAGATAGATCAGGCTTTTTTG
shRNA-ARID1A-R	AATTCAAAAAGCCTGATCTATCTGGTTCAATCTCGAGATTGAACCAGATAGATCAGGC
shRNA-scramble-F	CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG
shRNA-scramble-R	AATTCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAA
ARID1A-qPCR-F	CAGTACCTGCCTCGCACATA
ARID1A-qPCR-R	GCCAGGAGACCAGACTTGAG

2.2 方法

2.2.1 ARID1A 基因干扰载体和过表达载体的构建 通过 *Xho* I 和 *Sca* I 双酶切,从 pLenti-puro-ARID1A 载体上得到 ARID1A 基因 CDS 区全长.同时用 *Xho* I 酶切 pcDNA3.1(+) 质粒,将 ARID1A 片段与酶切后的 pcDNA3.1(+) 质粒进行连接,转化感受态大肠杆菌,氨苄培养基筛选阳性菌落并测序,得到 ARID1A 基因过表达载体;将 shRNA-ARID1A-F 和 shRNA-ARID1A-R 引物序列混合后置于 98℃ 水浴变性 3min,自然冷却至室温(退火),与 *Age* I 和 *Eco*R I 酶切后回收的 pLKO.1-TRC 载体片段进行连接,测序鉴定得到 ARID1A 干扰载体,同时用 shRNA-scram-

ble 序列与 pLKO.1-TRC 载体片段连接作为对照,与慢病毒载体 pSPAX2、pMD2. G 共转染 HEK293T 细胞,得到病毒浓缩液,感染 HCT116 细胞.

2.2.2 RNA 提取、反转录与 Real-time PCR 反应

吸掉细胞培养皿/板中的培养基, PBS 缓冲液洗 1~2 遍,加入 RNAiso Plus,充分裂解细胞后转移至无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,加入 1/5 样品体积的氯仿,快速振荡混匀,冰上静置 2 min;静止后可以看到液体分层,然后 4℃ 12 000 g 离心 15 min;吸取上层水相至另一干净无 RNA 酶的新管中,加入与液体相等体积的异丙醇;4℃ 12 000 g 再次离心 15 min,除去上清,加入预冷的 75% 的

乙醇 1 mL 洗涤沉淀;4°C 7 500 g 离心 10 min, 吸掉上清, 室温晾干 5 min;加入 20 μ L DEPC 水溶解, 按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。

Real-time PCR 反应体系参照 Innovagen 2 \times Taq SYBR Green master mix 说明书。

2.2.3 细胞迁移实验 将划痕插件用酒精喷洗后, 自然晾干, 将有粘性的一面放入 12 孔板中。对数生长期的细胞消化稀释, 计数, 按照插件每室 50 000 个细胞铺板, 放入培养箱中生长 24 h 左右, 待细胞贴壁后, 用镊子轻轻拔去划痕插件, 吸掉培养基, PBS 洗两遍, 换新的培养基, 在显微镜下拍照记录;拔掉插件后 0 h、24 h 各记录一次;用 Image J 软件进行迁移率分析。

2.2.4 ARID1A 共表达基因的筛选、GO 分析和 KEGG 分析 从 Metabolic gEne RApid Visualizer1 在线数据库获取结肠癌细胞系 HCT116 与结肠正常组织中的基因表达数据, 筛选出与 ARID1A 相关系数大于 0.9 的共表达基因。通过在线数据库 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>)对这些共表达基因进行 GO (Gene Ontology) 分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway) 通路分析。

3 结 果

3.1 获得 ARID1A 基因过表达和稳定干扰细胞株

为了观察 ARID1A 基因过表达对 HCT116 细胞迁移的影响, 本研究首先从 pLenti-puro-ARID1A 载体上得到 ARID1A 基因 CDS 区全长, 构建了 ARID1A-pcDNA3.1(+)-真核表达载体。转染 HCT116 细胞后, 通过实时荧光定量 PCR 检测 ARID1A 基因的表达, 结果显示 ARID1A 在 HCT116 细胞中表达量显著增加 ($P < 0.01$), 说明成功过表达 (图 1A)。

将 ARID1A 基因干扰载体测序鉴定正确后 (图 1B), 进行慢病毒包装, 并感染 HCT116 细胞。实时荧光定量 PCR 检测结果显示 ARID1A 在 HCT116 细胞中表达量显著降低 ($P < 0.01$), 说明干扰成功 (图 1C)。

3.2 ARID1A 对 HCT116 细胞迁移的影响

为了探究 ARID1A 表达量升高或者下降是否会对 HCT116 细胞的迁移有影响, 用划痕插件制造细胞划痕, 观察 ARID1A 过表达和 ARID1A 干

扰后细胞迁移情况。实验发现, 与对照组细胞相比, ARID1A 过表达会降低细胞迁移率 (图 2A, $P < 0.05$), 而干扰 ARID1A 表达后, 细胞迁移率增加 (图 2B, $P < 0.01$)。

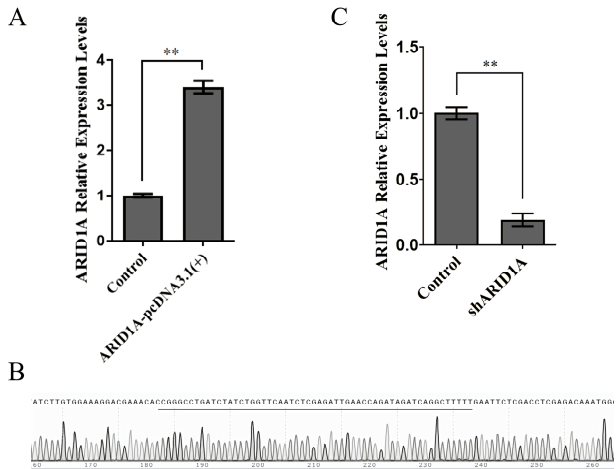


图 1 ARID1A 过表达载体与干扰载体的构建

Fig. 1 Construction of ARID1A overexpression and interference vectors

A. ARID1A 过表达检测结果, 对照组转染 pcDNA3.1(+)-空载体。B. ARID1A 干扰载体测序结果;下划线序列为干扰序列。C. ARID1A 干扰检测结果, 对照组用含 shRNA-scramble 序列的慢病毒感染。** $P < 0.01$ 。

A. The expression level of ARID1A after overexpression was detected by qPCR. Control group was transfected with pcDNA3.1(+)-empty vector. B. The sequencing result of ARID1A interference vector. ShRNA-ARID1A sequence are underlined. C. The expression level of ARID1A after interference was detected by qPCR. Control group was infected with lentivirus containing shRNA-scramble. ** $P < 0.01$.

3.3 ARID1A 共表达基因 GO 富集分析及 KEGG 通路分析

通过比较结肠癌细胞系 HCT116 与结肠正常组织中的基因表达数据, 从中筛选出 1 212 个相关系数大于 0.9 的 ARID1A 共表达基因。利用 DAVID 在线工具将这些基因富集到生物学过程和信号通路中。GO 分析发现, 参与细胞增殖过程的基因仅有 N4BP2L2, ACE, IF2AK2, PDCD2 等 4 个基因, 参与细胞迁移过程的有 PTEN, BRAF, IL23A, CCL21, NCKAP1L, LBP, JAM3, SLIT2, CD74, S100A8, PPBP, CCL13, NCKAP1L, WDR1, PTGER4, TMEFF2, SLURP1, COL3A1, DAG1, ARPIN, MIIP, PT-PRU, DACH1, ADIPOQ, TRIB1, APOE, NKX2-1, HRG, CNN2 等 29 个基因 (图 3)。KEGG 分析发现, 与细胞迁移相关的基因富集于趋化因子信号通路、粘着斑、细胞因子受体相互作用等信号通路。

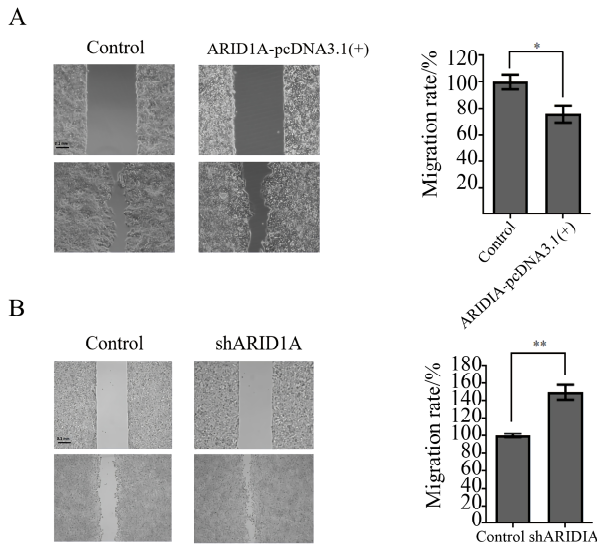


图 2 ARID1A 过表达和干扰后细胞的迁移

Fig. 2 Cell migration after ARID1A overexpression and interference

A. 左图: ARID1A 过表达后细胞迁移的变化, 对照组细胞转染 pcDNA3.1(+)空载体. 右图: 细胞迁移的统计分析. B. 左图: ARID1A 干扰后细胞迁移的变化, 对照组用 shRNA-scramble 的慢病毒感染. 右图: 细胞迁移的统计分析. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

A. Left: The cell migration change after ARID1A overexpression in HCT116. The control group was transfected with pcDNA3.1(+) empty vector. Right: The statistical analysis of cell migration. B. Left: The cell migration change after ARID1A interference. The control group was infected with the lentivirus containing shRNA-scramble sequence. Right: The statistical analysis of cell migration. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

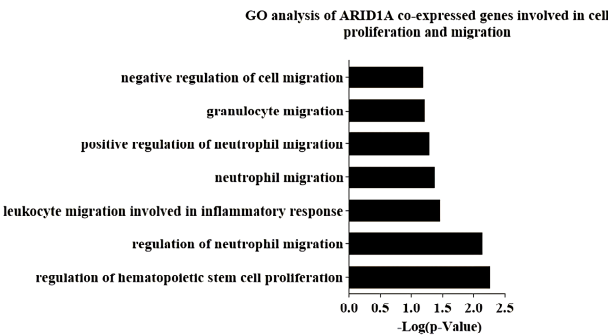


图 3 GO 分析参与细胞增殖和迁移的 ARID1A 共表达基因

Fig. 3 GO analysis of ARID1A co-expressed genes involved in cell proliferation and migration

4 讨论

染色质重塑对细胞核活动包括 DNA 复制、转录和 DNA 损伤修复等多方面有着至关重要的作用. 与染色质重塑相关研究已成为癌症发病机制研究的新方向^[9-10]. 随着近年来基因测序技术的迅速发展, 发现在多种人类癌症中存在 ARID1A 基因突变. 在卵巢透明细胞癌中 ARID1A 的突变率约

为 57%^[11], 子宫内膜癌中为 23%~42%^[12], 结直肠癌中约为 10%^[13]. 本文发现在结肠癌细胞 HCT116 中过表达 ARID1A 可以抑制细胞迁移, 而干扰其表达后, 细胞迁移率增加. 在 1212 个与 ARID1A 相关系数大于 0.9 的共表达基因中, 参与细胞迁移的基因有 29 个, 这些基因参与趋化因子信号通路、粘着斑、细胞因子受体相互作用等信号通路.

其中, PTEN 和 BRAF 是目前研究较多的与细胞迁移关系密切的基因. PTEN 可以负调控 AKT, 进而抑制肿瘤进程, 例如调控细胞生长、凋亡、粘附、迁移和侵袭等^[14-15]. BRAF 在小鼠胚胎形成过程中对肢体骨骼肌的形成起着至关重要的作用, 是诱导成肌细胞迁移的重要因子^[16]. 本研究发现在结肠癌细胞中 PTEN 与 ARID1A 的表达呈负相关, BRAF 与 ARID1A 的表达呈正相关, 但是 ARID1A, PTEN 和 BRAF 在细胞迁移中的调控关系还有待深入研究.

有文献报道, 在胶质瘤细胞中过表达 ARID1A, 发现磷酸化的 AKT 表达量降低^[17]. 在胃癌细胞中缺失内源性的 ARID1A, 可以加快细胞的增殖生长以及营养摄入, 并伴随着 PI3K/AKT 信号的激活, 上调磷酸化的 PDK1、AKT、GSK3 β 、70S6K 以及 PI3K、PDK1 水平. PIK3CA 和 PDK1 是 ARID1A 参与形成的 SWI/SNF 复合物的直接转录靶点, 使用分别靶向 AKT 和 PI3K 的变构抑制剂 MK2206 和 LY294002, 可以通过下调激活的 PI3K/AKT 信号, 有效抑制 ARID1A 缺失的胃癌细胞的生长和葡萄糖摄入^[18]. 这些数据说明, ARID1A 与 PI3K/AKT 信号通路在细胞的生长和增殖过程中存在密切的调控关系, 推测 ARID1A 可能也通过该信号通路调控细胞迁移, 但是具体机制还需进一步实验证实.

综上所述, 本文发现 ARID1A 可以抑制结肠癌细胞迁移, 并通过 GO 分析和 KEGG 分析, 得到参与细胞迁移过程的与 ARID1A 相关系数大于 0.9 的共表达基因及其涉及的信号通路, 为进一步探索 ARID1A 调控细胞迁移的机制提供了研究方向和理论基础.

参考文献:

- [1] Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. Nature, 2012, 487: 330.

- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394.
- [3] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69: 7.
- [4] Papanikolaou I G. Robotic surgery for colorectal cancer: systematic review of the literature [J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2014, 24: 478.
- [5] Idrees J J, Bagante F, Gani F, *et al.* Population level outcomes and costs of single stage colon and liver resection versus conventional two-stage approach for the resection of metastatic colorectal cancer [J]. *HPB(Oxford)*, 2018, 21: 456.
- [6] Sif S, Saurin A J, Imbalzano A N, *et al.* Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 603.
- [7] Wang W, Xue Y, Zhou S, *et al.* Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes [J]. *Genes Dev*, 1996, 10: 2117.
- [8] Wei X L, Wang D S, Xi S Y, *et al.* Clinicopathologic and prognostic relevance of ARID1A protein loss in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 18404.
- [9] Liu H, Mulholland N, Fu H, *et al.* Cooperative activity of BRG1 and Z-DNA formation in chromatin remodeling [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 2550.
- [10] Nie Z, Xue Y, Yang D, *et al.* A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 8879.
- [11] Jones S, Wang T L, Shih I M, *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Science*, 2010, 330: 228.
- [12] Liang H, Cheung L W T, Li J, *et al.* Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer [J]. *Genome Res*, 2012, 22: 2120.
- [13] Jones S, Li M, Parsons D W, *et al.* Somatic mutations in the chromatin remodeling gene ARID1A occur in several tumor types [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33: 100.
- [14] Vazquez F, Matsuoka S, Sellers W R, *et al.* Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 3633.
- [15] 王承恩, 罗玉, 贺正池, 等. 长非编码 RNA LINC00941 在结直肠癌中的表达及对细胞增殖的影响 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 1301.
- [16] Shin J, Watanabe S, Hoelper S, *et al.* BRAF activates PAX3 to control muscle precursor cell migration during forelimb muscle development [J]. *Elife*, 2016, 5: e18351.
- [17] Zeng Y, Liu Z, Yang J, *et al.* ARID1A is a tumour suppressor and inhibits glioma cell proliferation via the PI3K pathway [J]. *Head Neck Oncol*, 2013, 5: 6.
- [18] Zhang Q, Yan H B, Wang J, *et al.* Chromatin remodeling gene AT-rich interactive domain-containing protein 1A suppresses gastric cancer cell proliferation by targeting PIK3CA and PDK1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 46127.

引用本文格式:

中文: 石慧, 彭锐, 邹方东. ARID1A 对结肠癌细胞迁移的调控作用 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2020, 57: 371.

英文: Shi H, Peng R, Zou F D. Regulation of ARID1A on the migration of colon cancer cells [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 371.