

论著·基础研究

蛋白精氨酸甲基转移酶5在肺癌中的表达及其促进肺癌的作用机制

周冰倩, 韩 丽, 陈哲逸, 陈诗宇, 郑英霞

上海交通大学医学院附属新华医院检验科, 上海 200082

[摘要] **目的**·探讨蛋白精氨酸甲基转移酶5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 在肺癌中的表达及其对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的作用。**方法**·采用免疫组织化学法检测73对肺癌及癌旁组织中PRMT5的表达, 并与患者的临床特征行相关性分析。在肺癌细胞NCI-H1299中下调PRMT5后, 通过CCK8法和Transwell小室观察PRMT5对细胞增殖、迁移和侵袭功能的影响, 并采用蛋白质印迹法检测上皮细胞-间充质转化相关蛋白(E钙黏蛋白、波形蛋白和转录因子SNAI1)的表达。利用公共数据库GEO (Gene Expression Omnibus, 基因表达综合) 和TCGA (The Cancer Genome Atlas, 癌症基因组图谱) 分别分析PRMT5在肿瘤细胞系、肺癌组织中的表达, 并进一步分析组织中PRMT5表达和肺癌患者预后的关系。**结果**·免疫组织化学法检测结果显示, PRMT5在肺癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P=0.000$), 且在肿瘤Ⅲ~Ⅳ期的表达高于Ⅰ~Ⅱ期 ($P=0.033$)。下调PRMT5后, NCI-H1299细胞的增殖、迁移和侵袭能力下降, E钙黏蛋白表达增加、波形蛋白及转录因子SNAI1表达减少。TCGA数据库的肺癌测序数据显示PRMT5在肺癌组织中表达显著高于正常肺组织; 且PRMT5高表达的肺腺癌患者总生存率较低 ($P=0.005$), PRMT5高表达的肺鳞癌患者无复发生存率较低 ($P=0.028$)。**结论**·PRMT5在肺癌组织中表达较高, 可促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, PRMT5高表达和肺癌的不良预后有关。

[关键词] 蛋白精氨酸甲基转移酶5; 肺癌; 增殖; 迁移; 上皮细胞-间充质转化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.08.003 **[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A

Expression of protein arginine methyltransferase 5 in lung cancer and its mechanism of promoting lung cancer

ZHOU Bing-qian, HAN Li, CHEN Zhe-yi, CHEN Shi-yu, ZHENG Ying-xia

Department of Laboratory Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200082, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the expression of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) in lung cancer and its effect on proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. **Methods**·Immunohistochemistry was used to detect the expression of PRMT5 in 73 pairs of lung cancer tissues and adjacent tissues, and its correlation with clinical characteristics of patients was analyzed. After PRMT5 was down-regulated in lung cancer cell line NCI-H1299, the effects of PRMT5 on cell proliferation, migration and invasion were observed by CCK8 assay and Transwell chamber, and the expressions of E-cadherin, vimentin and transcription factor SNAI1 were detected by Western blotting. The expression of PRMT5 in tumor cell lines and lung cancer tissues was analyzed by using the Gene Expression Omnibus (GEO) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, respectively, and the relationship between the expression of PRMT5 in tissues and the prognosis of lung cancer patients was further analyzed. **Results**·Immunohistochemistry showed that the expression of PRMT5 in lung cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P=0.000$), and the expression of PRMT5 in stage Ⅲ-Ⅳ was higher than that in stage Ⅰ-Ⅱ ($P=0.033$). After PRMT5 down-regulation, the proliferation, migration and invasion ability of NCI-H1299 cells decreased, the expression of E-cadherin increased and the expression of vimentin and SNAI1 decreased. The lung cancer sequencing data of TCGA database showed that the expression of PRMT5 in lung cancer tissues was significantly higher than that in normal lung tissues, and the lung adenocarcinoma patients and the lung squamous cell carcinoma patients with higher expression of PRMT5 had lower overall survival rate ($P=0.005$) and relapse-free survival rate ($P=0.028$), respectively. **Conclusion**·PRMT5 is highly expressed in lung cancer tissues, which can promote the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. High expression of PRMT5 is associated with poor prognosis of lung cancer.

[Key words] protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5); lung cancer; proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。在我国, 肺癌的发病率和死亡率均位居各类癌症之首, 且呈逐年上升趋势^[2]。近年来, 随着手术治疗、化学治疗、靶向和个体化治疗的全面开展, 肺癌患者短期生存率有

[基金项目] 国家自然科学基金 (81571525, 81873863, 82071753); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20161315)。

[作者简介] 周冰倩 (1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: bettyerzhou@163.com。

[通信作者] 郑英霞, 电子信箱: combi3230@163.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81571525, 81873863, 82071753); Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20161315)。

[Corresponding Author] ZHENG Ying-xia, E-mail: combi3230@163.com。



了明显改善,但其5年生存率仍不容乐观,即从早期的73%降至晚期的13%^[3];且相关研究^[4]显示,局部侵袭和远处转移仍然是晚期肺癌患者最主要的致死原因。因此,深入探究参与肺癌细胞生长、转移的相关分子及其信号转导通路已成为了当前的研究热点。

蛋白精氨酸甲基转移酶5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 是一种Ⅱ型甲基化转移酶,能够催化组蛋白3和组蛋白4的不同精氨酸发生对称性二甲基化修饰,如组蛋白4精氨酸3的对称性二甲基化 (symmetric di-methylation of histone4 arginine3, H4R3me2s)、组蛋白3精氨酸8的对称性二甲基化 (symmetric di-methylation of histone3 arginine8, H3R8me2s),以调控基因的转录激活/抑制^[5-7]。已有研究表明 PRMT5 在肺癌^[8-9]、肝癌^[10]、乳腺癌^[11]、黑色素瘤^[12]等多种癌症中有较高的表达,提示 PRMT5 可能在肿瘤的发生、发展中发挥关键作用。动物肺癌转移模型的相关研究^[8]显示,PRMT5 表达增加时肿瘤细胞生长速度较快。上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在肿瘤生长、侵袭和转移等过程中发挥着重要作用^[13]。有研究^[14]发现 PRMT5 是肿瘤 EMT 过程中的重要调控因子,如其可诱导胰腺癌细胞发生 EMT 进而增强细胞的迁移和侵袭能力。基于此,本研究结合生物信息学分析,检测 PRMT5 在肺癌组织中的表达,并通过体外功能实验验证 PRMT5 对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响,分析其与患者生存预后的关联,为 PRMT5 作为肺癌的治疗靶标提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 组织芯片获取及患者信息

73 对经石蜡包埋的肺癌及癌旁组织制成的芯片购于上海芯超生物科技有限公司。在上述患者中,男性 39 例、女性 34 例,年龄为 20~84 岁。

1.2 数据收集和分析

从基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 中下载癌细胞系百科全书 (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE) 数据集 GSE36139。该数据集包含 917 种癌细胞系的 DNA 突变、基因表达和染色体拷贝数等遗传信息。从 UCSC Xena 数据平台 (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 下载肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 和肺鳞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC) 的癌症基因组图谱

(The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库,并获得 RNA 测序 (RNA-seq) 数据;其中,LUAD 数据中包含了 517 例 LUAD 组织和 59 例正常组织的测序数据,LUSC 数据中包含了 502 例 LUSC 组织和 51 例正常组织的测序数据。采用 R4.0.3 分析 PRMT5 mRNA 在上述 2 种肺癌及正常肺组织中的表达。同时,获取 Kaplan-Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com/>) 中的肺癌数据,对 PRMT5 的表达与患者预后进行相关性分析。

1.3 细胞和主要试剂

肺癌细胞 NCI-H1299、NCI-H460、HCC827、PC-9 和人胚肺成纤维细胞 MRC-5 均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。293T 细胞为本实验室保存。

柠檬酸 (pH6.0) 抗原修复液、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、苏木精染液、苏木精返蓝液、中性树胶、免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色剂均购于武汉赛维尔生物科技有限公司,RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购于美国 Gibco 公司,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam* H I、RNA 反转录试剂盒购于日本 Takara 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司,PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,PRMT5 单克隆抗体、EMT 抗体盒购于美国 CST 公司,肌动蛋白 (β -actin) 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司,CCK8 试剂盒购于日本同仁化学研究所,Transwell 和 Invasion 小室购于美国 Corning 公司。PBST 缓冲液 [磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS): Tween-20=1 000:1] 为实验室自行配制。

1.4 方法

1.4.1 石蜡包埋组织芯片中 PRMT5 表达量检测 采用免疫组织化学法检测 73 对石蜡包埋组织芯片中 PRMT5 的表达,经脱水、封片后置于光学显微镜下观察,胞浆或胞核出现棕黄颗粒则视为 PRMT5 阳性细胞。PRMT5 表达评分标准见表 1,最终评分=强弱评分 \times 比例评分。后续,将根据其获得的最终评分与患者的临床特征行相关性分析。

1.4.2 细胞培养 MRC-5、PC-9、293T 细胞均采用含 10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基进行培养,NCI-H1299、NCI-H460、HCC827 细胞均采用含 10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基进行培养。所有细胞的培养条件均为 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂。

表 1 PRMT5 表达评分标准

Tab 1 PRMT5 expression scoring criteria

Intensity of PRMT5 expression	Proportion of PRMT5-positive cells	Score
Negative	0	0
Weakly positive	0–25%	1
Moderately positive	25%–50%	2
Strongly positive	50%–75%	3
No stronger intensity	75%–100%	4

表 2 shRNA 寡核苷酸序列

Tab 2 Oligonucleotide sequence of shRNA

shRNA	Sequence (5'→3')
NC-shRNA	F: GATCTGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTC R: AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAACA
PRMT5-shRNA1	F: GATCCGCCAGTTTGAGATGCCTTATTCAAGAGAATAAGGCATCTCAAACCTGGGCTTTTTTG R: AATTCAAAAAAGCCAGTTTGAGATGCCTTATTCTCTTGAATAAGGCATCTCAAACCTGGGCG
PRMT5-shRNA2	F: GATCCGGCTGACCTCCCATCTAATCATTCAGAGATGATTAGATGGGAGGTCAGCCTTTTTTG R: AATTCAAAAAAGGCTGACCTCCCATCTAATCATCTCTTGAATGATTAGATGGGAGGTCAGCCG
PRMT5-shRNA3	F: GATCCCCCATCTCTTCCCTATTAAGCTTCTGTGAGACTTAATAGGGAAGAGGATGGGTTTTTG R: AATTCAAAAAACCATCTCTTCCCTATTAAGTCTGACAGGAAGCTTAATAGGGAAGAGGATGGGG

Note: NC—negative control.

1.4.5 PRMT5-shRNA 慢病毒重组质粒构建 选用 PLenR-GPH 载体 [吉满生物科技 (上海) 有限公司] 作为慢病毒载体, 其自带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记, 便于后续观察转染效率。利用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶使载体线性化, 而后分别将表 2 中的寡聚核苷酸序列插入 PLenR-GPH 载体的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点之间, 构建 PRMT5-shRNA 慢病毒重组质粒。

1.4.6 慢病毒包装 使用促转染试剂将构建好的重组质粒及辅助包装质粒 [吉满生物科技 (上海) 有限公司] 与 293T 细胞共转染 10~12 h, 而后加入转染增强试剂促进转染 8 h, 更换新鲜培养基继续培养 48 h, 收集富含慢病

1.4.3 细胞中 PRMT5 表达量检测 采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 MRC-5、NCI-H1299、NCI-H460、HCC827、PC-9 细胞中 PRMT5 的表达。制备上述 5 种细胞的蛋白, 按照说明书进行电泳、转膜、封闭、一抗和二抗孵育, 最后用 Odyssey 红外成像系统进行检测。使用的一抗为 β -actin、PRMT5 抗体 (稀释比例均为 1: 1 000), 荧光二抗稀释比例为 1: 5 000。

1.4.4 PRMT5-shRNA 寡核苷酸合成 目的基因为 PRMT5, 物种来源为人。靶向 PRMT5 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 寡核苷酸序列见表 2。

毒颗粒的细胞上清液并进行浓缩, 获得慢病毒原液。
1.4.7 慢病毒感染、稳定敲除 PRMT5 细胞株建立及其敲除效果分析 将处于对数生长期的 H1299 细胞以 10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 按照慢病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) =20 加入病毒并添加 2.5 μ g/mL 聚凝胺进行感染, 以获取稳定敲除 PRMT5 的 H1299 细胞株。培养 48 h 后, 于荧光显微镜下观察慢病毒感染效率。更换培养液继续培养 24 h 后, 提取细胞总 RNA 并制备细胞裂解蛋白, 采用反转录及实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、Western blotting 检测 PRMT5 的敲除效果, 具体步骤参照说明书进行。引物序列见表 3。

表 3 qPCR 引物序列

Tab 3 Primer sequences for qPCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
PRMT5	CGATCAGACCTACTGCTGTCA	CTCGGAGTTCCTGCGAATCT
β -actin	CATGTACGTTGTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
VIM	GACGCCATCAACACCGAGTT	CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT
SNAIL	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
CDH1	ATTTTTCCTCGACACCCGAT	TCCCAGGCGTAGACCAAGA

Note: VIM—vimentin; SNAIL—snail family transcriptional repressor 1; CDH1—cadherin 1.

1.4.8 细胞增殖能力检测 将分别转染 PRMT5-shRNA 和 NC-shRNA 的 H1299 细胞以 5×10^4 个/mL 接种至 96 孔板

中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下分别培养 12、24、48、72 h, 而后向每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 继续培养 2 h 后用酶

标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度。

1.4.9 细胞迁移和侵袭能力检测 将分别转染 *PRMT5*-shRNA 和 NC-shRNA 的 H1299 细胞按 5×10^4 个/孔分别加入 Transwell 和 Invasion 小室中, 各设置 3 个复孔。将小室放入下层添加了 700 μ L 含 10%FBS 的 RPMI-1640 的 24 孔板中培养 48 h, 而后经 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 采用结晶紫染料染色 30 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 最终用平底的湿棉签轻轻擦去小室内未迁移至下层的细胞, 于显微镜下拍照并统计穿过 Transwell 和 Invasion 小室的细胞总数, 取 3 个复孔的平均值分别代表细胞的迁移、侵袭能力。

1.4.10 EMT 相关蛋白及其基因检测 选取生长状态良好的已分别转染 *PRMT5*-shRNA 和 NC-shRNA 的 NCI-H1299 细胞, 抽提总 RNA 并制备细胞裂解蛋白, 采用 Western blotting、qPCR 检测敲除 *PRMT5* 后的 EMT 相关蛋白 [E 钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin) 和转录因子 *SNAIL*] 及其基因的表达。qPCR 引物序列见表

3, 其中 *VIM* 和 *SNAIL* 是转移激活基因, *CDH1* 是转移抑制基因。使用的抗体包括 β -actin、*PRMT5*、E-cadherin、vimentin 和 *SNAIL* 抗体 (稀释比例均为 1 : 1 000)。

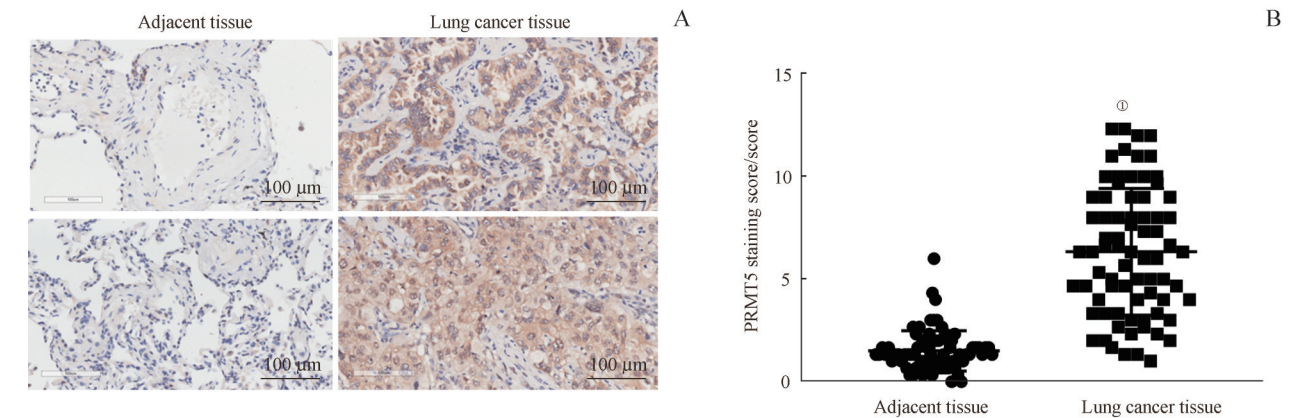
1.5 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8.0 软件对研究数据进行统计分析。定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Student's *t* 检验进行分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PRMT5在肺癌及癌旁组织中的表达

对 73 例患者的肺癌及癌旁组织芯片进行免疫组织化学分析, 结果 (图 1) 显示 *PRMT5* 在肺癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P=0.000$); 随后, 对 *PRMT5* 表达与患者的不同临床特征间的相关性进行分析, 结果 (表 4) 显示 *PRMT5* 在肿瘤 III~IV 期的表达高于 I~II 期 ($P=0.033$)。



Note: A. Staining results of *PRMT5* expression ($\times 40$). B. Statistical analysis of *PRMT5* expression. $^{\textcircled{1}}P=0.000$, compared with adjacent tissues.

图 1 免疫组织化学检测 *PRMT5* 在肺癌及癌旁组织中的表达

Fig 1 Expression of *PRMT5* in lung cancer tissues and adjacent tissues by immunohistochemistry

表 4 PRMT5 的表达水平与肺癌患者临床特征间的关系

Tab 4 Relationship between the expression of *PRMT5* and the clinical features of lung cancer patients

Clinical feature	Relative expression of <i>PRMT5</i> /score	<i>t</i> value	<i>P</i> value
Gender		0.191	0.849
Male ($n=39$)	6.21 \pm 3.00		
Female ($n=34$)	6.08 \pm 2.84		
Age		0.490	0.626
≥ 60 year ($n=36$)	5.93 \pm 2.84		
< 60 year ($n=37$)	6.32 \pm 2.99		
TNM stage		2.178	0.033
I – II ($n=51$)	5.65 \pm 2.75		
III – IV ($n=22$)	7.24 \pm 3.01		
Pathological grading		0.370	0.712
T1–T2 ($n=61$)	6.21 \pm 3.01		
T3–T4 ($n=12$)	5.86 \pm 2.45		

Continued Tab

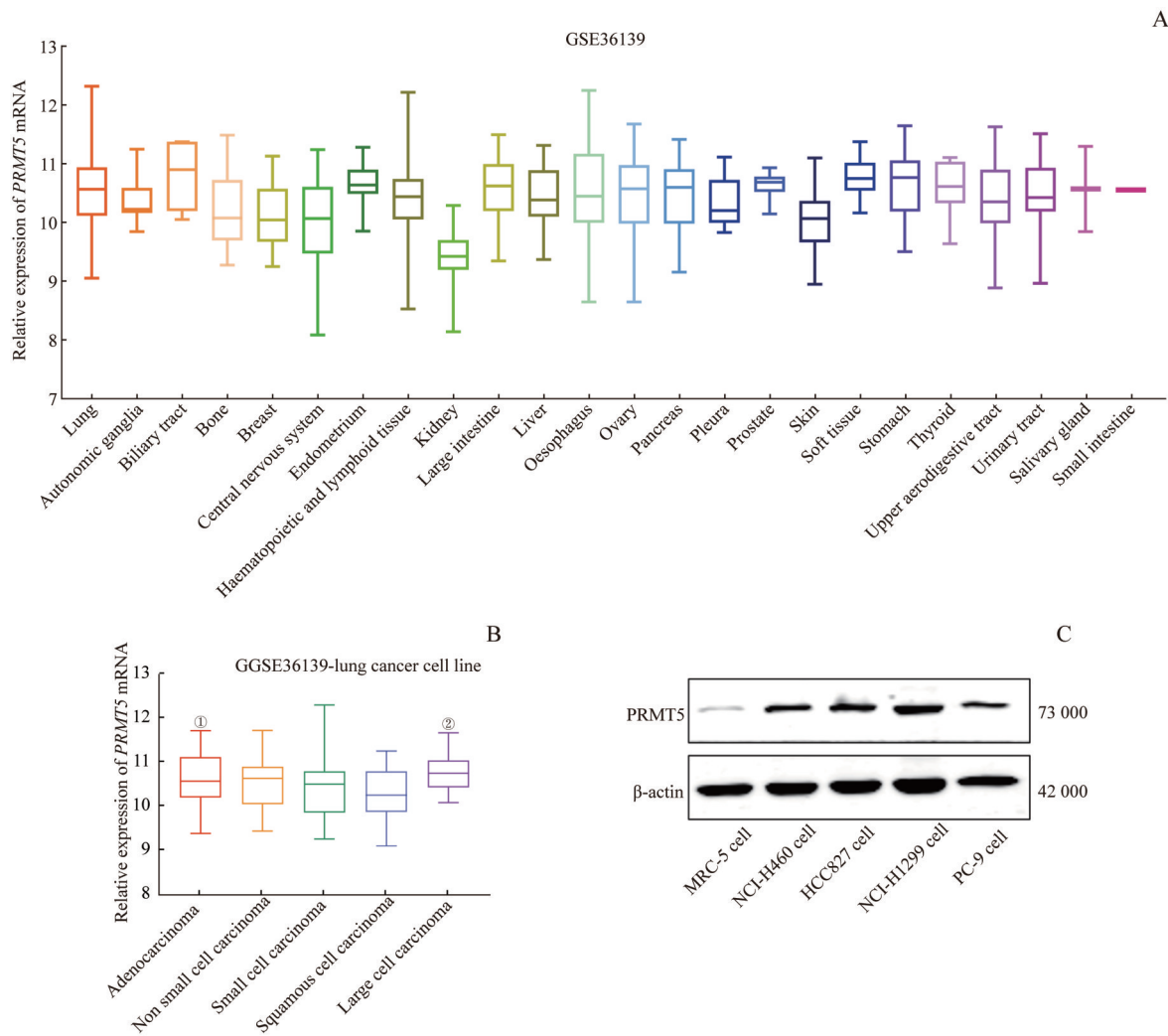
Clinical feature	Relative expression of PRMT5/score	<i>t</i> value	<i>P</i> value
Lymph node metastasis metastasis		0.884	0.379
Yes (<i>n</i> =35)	5.83±2.54		
No (<i>n</i> =38)	6.43±3.21		

Note: TNM—tumor node metastasis.

2.2 PRMT5在肺癌细胞系中的表达

CCLE 数据集 GSE36139 中共有来自 24 个原发部位的肿瘤,共 917 株不同的癌细胞系。对这 917 种癌细胞系进行分析,结果(图 2A、B)显示 PRMT5 mRNA 在肺癌等多个原发部位肿瘤中表达,且在 LUAD 和大细胞肺癌中的表

达水平均高于 LUSC ($P=0.034$, $P=0.028$)。随后,采用 Western blotting 检测 MRC-5、NCI-H1299、NCI-H460、HCC827、PC-9 细胞中 PRMT5 的表达,结果(图 2C)显示与 MRC-5 细胞相比,PRMT5 在肺癌细胞系中高表达。



Note: A. Expression of PRMT5 mRNA in the different primary cancer cell lines in GSE36139. B. Expression of PRMT5 mRNA in different pathological types of lung cancer cell lines in GSE36139. ① $P=0.034$, ② $P=0.028$, compared with the squamous cell carcinoma. C. Expression of PRMT5 in human embryonic lung fibroblasts and lung cancer cells detected by Western blotting.

图 2 PRMT5 在多种癌细胞中的表达

Fig 2 Expression of PRMT5 in various cancer cells

2.3 稳定敲除 PRMT5 细胞株的构建及 PRMT5 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

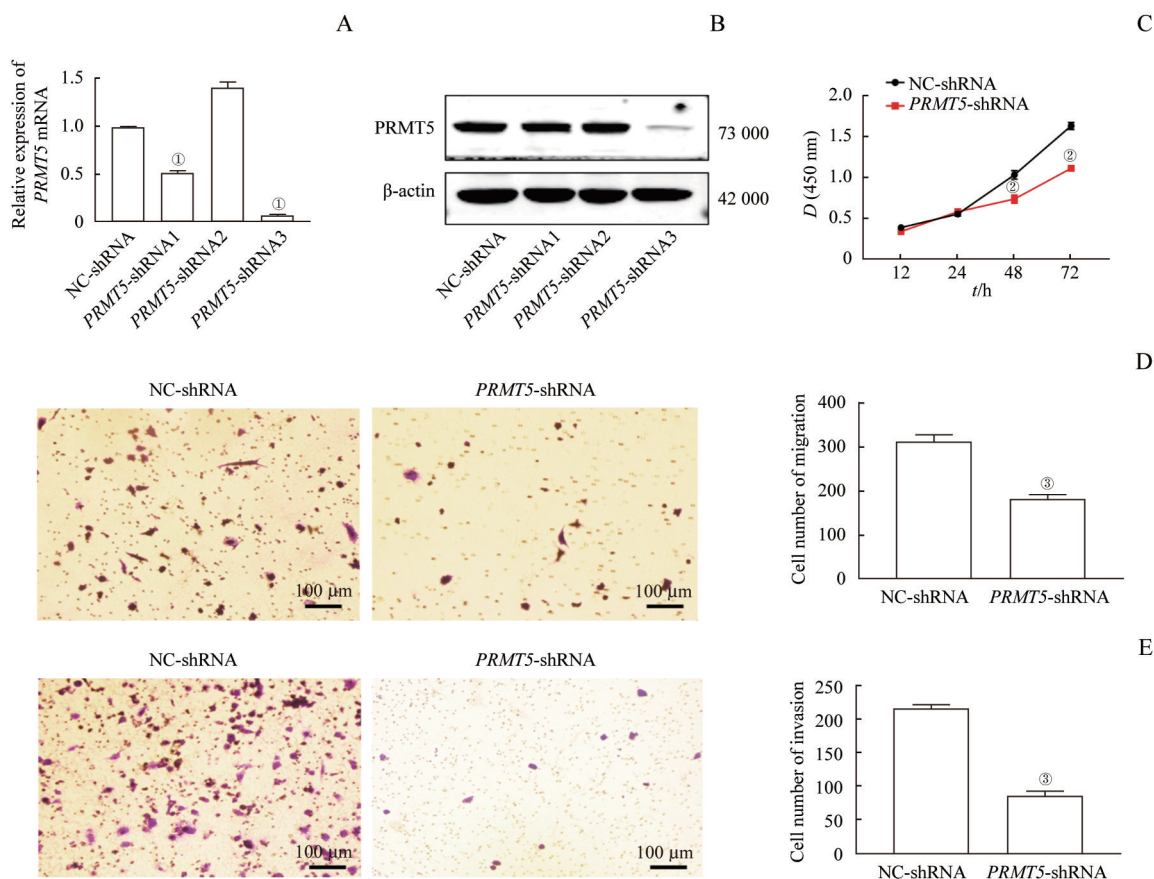
本研究通过转染 PRMT5-shRNA1、PRMT5-shRNA2、PRMT5-shRNA3 筛选稳定敲除 PRMT5 的细胞株,于荧光显

显微镜下观察转染效率,并采用反转录及 qPCR、Western blotting 检测 PRMT5 的 mRNA 和蛋白表达,结果(3A、B)显示,与转染 NC-shRNA 相比,转染 PRMT5-shRNA3 后的 NCI-H1299 细胞中 PRMT5 表达明显降低,因此该细胞株即为稳

定敲除 *PRMT5* 的 NCI-H1299 细胞株 (在后续实验中, 提及 *PRMT5*-shRNA 即为 *PRMT5*-shRNA3)。

采用 CCK8 法检测转染 *PRMT5*-shRNA 细胞和转染 NC-shRNA 细胞的增殖能力, 结果 (图 3C) 显示, 在培养 48、72 h 后, *PRMT5*-shRNA 组细胞的增殖能力显著低

于 NC-shRNA 组 (均 $P=0.000$)。采用 Transwell 小室和 Invasion 小室检测转染 *PRMT5*-shRNA 组和 NC-shRNA 组细胞的迁移和侵袭能力, 结果 (图 3D、E) 显示, *PRMT5*-shRNA 组细胞的迁移、侵袭能力均低于 NC-shRNA 组 (均 $P=0.000$)。



Note: A/B. Transfection efficiency of *PRMT5*-shRNAs in NCI-H1299 cells verified by qPCR (A) and Western blotting (B). ① $P=0.000$, compared with NC-shRNA. C. Effect of *PRMT5*-shRNA on the proliferation of NCI-H1299 cells detected by CCK8 assay. ② $P=0.000$, compared with NC-shRNA. D/E. Effects of *PRMT5*-shPRMT5 on the migration (D) and invasion (E) ability of NCI-H1299 cells (crystal violet staining, $\times 100$). ③ $P=0.000$, compared with NC-shRNA.

图 3 沉默 *PRMT5* 对肺癌细胞 NCI-H1299 的增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig 3 Effects of silencing *PRMT5* on proliferation, migration and invasion abilities of lung cancer cell NCI-H1299

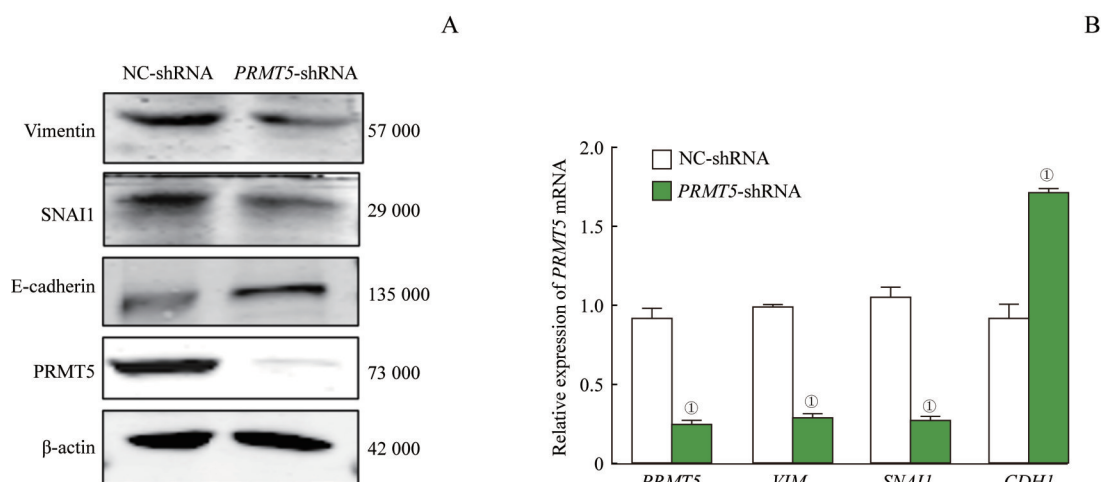
2.4 干扰肺癌细胞系 *PRMT5* 对 EMT 相关蛋白及其基因的影响

采用 Western blotting 检测稳定敲除 *PRMT5* 的细胞 NCI-H1299 中 EMT 相关蛋白的表达, 结果 (图 4A) 显示敲除 *PRMT5* 后 E-cadherin 的表达水平增加、vimentin 和 SNAIL 的表达水平下降; 同时, 采用反转录及 qPCR 检测上述蛋白的基因 (*CDH1*、*SNAIL*、*VIM*) 表达情况, 结果 (图 4B) 显示转移激活基因 *VIM* 和 *SNAIL* 的表达水平下降, 转移抑制基因 *CDH1* 的表达水平增加。

2.5 *PRMT5* mRNA 在肺癌及正常肺组织中的表达及其表达与患者预后的相关性

从 UCSC Xena 数据平台下载 TCGA 数据库, 获得

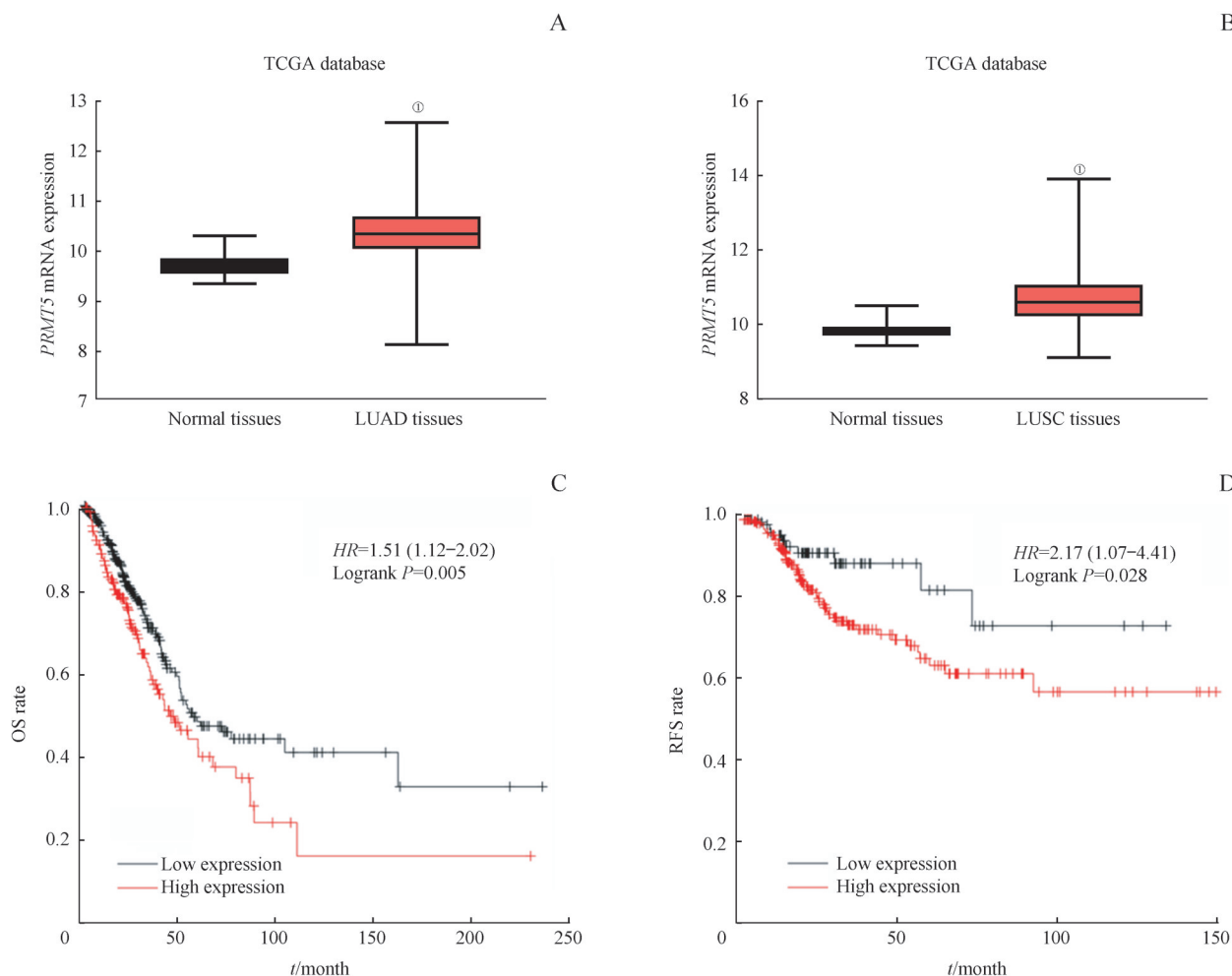
LUAD 和 LUSC 的 RNA-seq 数据, 并通过 R 语言分析 *PRMT5* mRNA 在该 2 种肺癌及正常肺组织中的表达。结果 (图 5A、B) 显示, *PRMT5* mRNA 在肺癌组织中的表达显著高于正常肺组织 (均 $P=0.000$)。随后, 通过 Kaplan-Meier plotter 数据库对肺癌组织中 *PRMT5* mRNA 的表达与肺癌患者总生存 (overall survival, OS) 率、无复发生存 (relapse-free survival, RFS) 率的相关性进行分析, 结果 (图 5C、D) 显示 *PRMT5* mRNA 高表达的 LUAD 患者的 OS 率低于 *PRMT5* mRNA 低表达患者 ($P=0.005$), 而 *PRMT5* mRNA 的表达水平与 LUSC 患者的 OS 率无相关性; 同时, 与 *PRMT5* mRNA 低表达的 LUSC 患者相比, *PRMT5* mRNA 高表达患者的 RFS 率较低 ($P=0.028$)。继而提示, *PRMT5* 表达的增加与肺癌的不良预后有关。



Note: A. Expression of EMT-associated proteins detected by Western blotting. B. Expression of EMT-associated genes detected by qPCR. ^① $P=0.000$, compared with NC-shRNA.

图4 敲除 *PRMT5* 后 EMT 相关蛋白及其基因的表达

Fig 4 Expression of EMT-associated proteins and the genes after *PRMT5* knockout



Note: A/B. Expression of *PRMT5* mRNA in the LUAD tissues (A), LUSC tissues (B) and normal tissues in TCGA database. ^① $P=0.000$, compared with normal tissues. C. Correlation between *PRMT5* mRNA expression and OS in patients with LUAD. D. Correlation between *PRMT5* mRNA expression and RFS in patients with LUSC.

图5 TCGA数据库中 *PRMT5* mRNA 在肺癌及正常肺组织中的表达及其表达与患者预后的关系

Fig 5 Expression of *PRMT5* mRNA in lung cancer tissues and normal lung tissues from TCGA database and the correlation with prognosis

3 讨论

在全球范围内,肺癌已成为癌症致死的首要原因,平均每年致死人数高达170多万^[15]。多项研究^[9,11,16]表明,PRMT5在肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用,即其可通过对H4R3me2s、H3R8me2s行甲基化修饰来调控肿瘤相关基因的转录抑制或激活,进而调控肿瘤的发生、发展。

本研究通过免疫组织化学染色发现PRMT5在肺癌组织中高表达,其表达水平与临床病理分级相关。随后,我们通过慢病毒干扰体外实验发现PRMT5能促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,且EMT相关上皮标记蛋白E-cadherin表达增加、间质性标记蛋白vimentin和SNAI1表达减少;继而提示,PRMT5可能通过调控EMT相关蛋白的表达来促进肺癌细胞的迁移和侵袭。但PRMT5究竟

是对EMT相关蛋白直接作用,还是通过组蛋白甲基化来影响该蛋白的表达,尚需进一步探讨。本研究进一步结合大数据对PRMT5 mRNA在LUAD和LUSC中的表达进行分析,结果显示其在2种肺癌组织中均表达增加,且随着PRMT5 mRNA表达的增加,LUAD患者OS、LUSC患者RFS缩短,表明PRMT5发挥着促进肺癌发展的作用。

相关文献^[9]报道,高浓度的特异性PRMT5抑制剂GSK591可阻断细胞中PRMT5的活性,对人胚肺成纤维细胞IMR-90和肺癌细胞A549有选择性杀伤活性。目前,已有多项针对PRMT5的临床试验处于安全性和有效性的测试阶段^[17]。综上所述,PRMT5在肺癌中高表达,可发挥促肿瘤的作用,并且其可能通过参与调节肺癌EMT信号通路促进肺癌细胞的侵袭转移。PRMT5表达与肺癌的不良预后有关,该结果或将为筛选肺癌的潜在治疗靶标提供参考。

参·考·文·献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 22.
- [3] Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. Lung cancer staging and prognosis[J]. Cancer Treat Res, 2016, 170: 47-75.
- [4] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(6): 449-458.
- [5] Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(11): 2041-2059.
- [6] Pal S, Baiocchi RA, Byrd JC, et al. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma [J]. EMBO J, 2007, 26(15): 3558-3569.
- [7] Migliori V, Müller J, Phalke S, et al. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(2): 136-144.
- [8] Jing PY, Zhao N, Ye MX, et al. Protein arginine methyltransferase 5 promotes lung cancer metastasis via the epigenetic regulation of miR-99 family/FGFR3 signaling[J]. Cancer Lett, 2018, 427: 38-48.
- [9] Chen H, Lorton B, Gupta V, et al. A TGF β -PRMT5-MEP50 axis regulates cancer cell invasion through histone H3 and H4 arginine methylation coupled transcriptional activation and repression[J]. Oncogene, 2017, 36(3): 373-386.
- [10] Jiang H, Zhu Y, Zhou ZY, et al. PRMT5 promotes cell proliferation by inhibiting BTG2 expression via the ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Med, 2018, 7(3): 869-882.
- [11] Chiang K, Zielinska AE, Shaaban AM, et al. PRMT5 is a critical regulator of breast cancer stem cell function via histone methylation and FOXP1 expression[J]. Cell Rep, 2017, 21(12): 3498-3513.
- [12] Nicholas C, Yang J, Peters SB, et al. PRMT5 is upregulated in malignant and metastatic melanoma and regulates expression of MITF and p27(Kip1.) [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74710.
- [13] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2): 128-134.
- [14] Ge L, Wang H, Xu X, et al. PRMT5 promotes epithelial-mesenchymal transition via EGFR- β -catenin axis in pancreatic cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 1969-1979.
- [15] 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.
- [16] Shailesh H, Zakaria ZZ, Baiocchi R, et al. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(94): 36705-36718.
- [17] Yuan YY, Nie H. Protein arginine methyltransferase 5: a potential cancer therapeutic target[J]. Cell Oncol (Dordr), 2021, 44(1): 33-44.

[收稿日期] 2020-12-31

[本文编辑] 邢宇洋

