Modern Practical Medicine, December 2025, Vol. 37, No. 12

·论 著·

PNN 通过调控奥沙利铂敏感性促进结直肠癌进展的机制研究

陈雪，张菡霞，金铭，郑真，叶爽，刘开泰

【摘要】目的 探讨桥粒相关蛋白 Pinin（PNN）通过调控奥沙利铂敏感性促进结直肠癌（CRC）进展的机制。**方法** 运用 TCGA 数据库分析 CRC 组织中 PNN 的表达情况以及患者的生存情况，并通过 Western blot 验证 CRC 细胞中 PNN 的表达；构建 PNN 敲减与过表达的 CRC 细胞，采用 qRT-PCR 验证表达改变情况；通过克隆形成实验、划痕实验及 Transwell 实验评估 PNN 对 CRC 进展的影响；采用 MTT 法检测细胞增殖及对奥沙利铂的敏感性；利用 TIMER 数据库分析 PNN 表达与肿瘤免疫细胞浸润（TIICs）的关联。**结果** PNN 在 CRC 组织中显著高表达，且与患者不良预后相关；功能实验表明，PNN 可显著增加 CRC 细胞增殖、迁移及侵袭能力，同时降低对奥沙利铂的敏感性（均 $P < 0.05$）；TIMER 分析提示 PNN 表达与多种 TIICs 呈正相关。**结论** PNN 在 CRC 中呈高表达，可促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭并降低化疗敏感性，且与免疫浸润密切相关。

【关键词】 结肠肿瘤；直肠肿瘤；癌；桥粒相关蛋白 Pinin；奥沙利铂

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.12.004

【中图分类号】 R735.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)12-1224-06

Mechanism study of PNN in promoting colorectal cancer progression through regulating oxaliplatin sensitivity

CHEN Xue, ZHANG Hanxia, JIN Ming, ZHENG Zhen, YE Shuang, LIU Kaitai (Ningbo Medical Center Lihuili Hospital, 315040 Ningbo, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the mechanism of desmoon-associated protein Pinin (PNN) in prometing colorectal cancer (CRC) progression through regulating oxaliplatin sensitivity. **Methods** The expression of PNN in CRC tissues and the survival status of patients were analyzed by Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and was verified by Western blot. CRC cells with PNN knockdown and overexpression were constructed, and the expression changes were verified by qRT-PCR. The effect of PNN on the progression of CRC was evaluated by clone formation assay, scratch assay and transwell assay. Cell proliferation and sensitivity of oxaliplatin were evaluated by MTT assay. The Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) was used to analyse the correlations between PNN expression and tumor-infiltrating immune cells (TIICs). **Results** The expression of PNN markedly elevated in CRC and was associated with poor survival outcomes. PNN could significantly increase the proliferation, migration and invasion abilities of CRC cells, while reduce their sensitivity to oxaliplatin (all $P < 0.05$). TIMER analysis indicated that PNN expression was significantly positively correlated with multiple TIICs. **Conclusions** PNN is significantly overexpressed in CRC and promotes tumor cell proliferation, migration and invasion, while reducing chemosensitivity to oxaliplatin.

【Key words】 Colon neoplasm; Rectal neoplasm; Carcinoma; Desmoon-associated protein Pinin; Oxaliplatin

[Modern Practical Medicine,2025,37(12):1224-1229]

结直肠癌（colon and rectal cancer，CRC）是临床常见的恶性肿瘤之一，发病率位居全球恶性肿瘤第四，死亡率排名第三[1]。尽管治疗手段不断进步，转移性 CRC 的总体预后仍不理想，亟需新的疗效评价标志物并改进治疗策略。Pinin（PNN）最初被鉴定为桥粒相关蛋白[2]，参与细胞间连接[3]。后续研究发现 PNN 亦定位于细胞核，参与 RNA 选择性剪接、转录调控等[4]。近年来，PNN 已在多种恶性肿瘤中被发现呈高表达，包括 CRC[5-8]、肝细胞癌[9]、肾癌[10]、卵巢

基金项目： 宁波市科技计划项目（2021J291）

作者单位： 315040 宁波，宁波市医疗中心李惠利医院（陈雪、金铭、郑真、叶爽、刘开泰）；宁波大学医学部（张菡霞）

通信作者： 刘开泰，Email：lkt1982@126.com

癌[11]及前列腺癌[12]，且与肿瘤进展、转移及不良预后相关。已有研究提示，PNN 与 KCNQ1OT1 共表达可预测 CRC 患者对氟嘧啶类化疗的疗效[6-7]；在卵巢癌中，敲减 PNN 可提高紫杉醇化疗敏感性[11]；此外，circ-PNN 亦被报道通过 miR-1225-5p/FGF13 轴促进 CRC 进展[8]。然而，PNN 在 CRC 耐药及进展中的具体机制仍不清楚。本研究旨在系统阐明 PNN 在 CRC 中的作用，并重点探讨其对化疗耐药及肿瘤进展的影响，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　资料来源　从 The Cancer Genome Atlas（TCGA）数据库（https://xena.ucsc.edu）下载获得 CRC 患者的 PNN mRNA 表达数据，包括 32 例癌旁组织和 379 例癌组织样本，其中癌组织中仅有 348 例样本有预后数据。

1.2　细胞培养　人结直肠癌细胞系 RKO 和 HCT116，来源于浙江如耀生物科技有限公司。使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养，并将细胞置于 37 ℃含 5% CO_2 的恒温环境中。

1.3　PNN 过表达与敲低　过表达：将 PNN 编码序列克隆到慢病毒载体中进行过表达。用重组质粒和标准包装质粒共转染 HEK293T 细胞生成慢病毒颗粒，转染 48 h 后收集上清。敲低：构建 3 对针对 PNN 的 shRNA 寡核苷酸。PNN 特异性 shRNA 序列设计为：sh-PNN-1 为 5’-GAAGGTAGACGCATCGAATTT-3’，sh-PNN-2 为 5’-GGTAGAGGACGTGGTAGTTTA-3’，sh-PNN-3 为 5’-GCAGCAGAAGATTTCTTGATA-3’。

1.4　细胞转染　为实现 PNN 敲低或过表达，抑制剂和合成模拟物在无血清培养基中重组至 50 nmol/L。每种混合物与 5 μl Lipofectamine 2000 混合，将所得复合物加入 RKO 和 HCT116 细胞株。培养 4 h 后将培养基替换为完全生长培养基，并在标准条件下保持培养。

1.5　克隆形成实验　将 1.2%琼脂糖与 2XDMEM 等体积混合，倒入六孔板中固化，制备基础琼脂层（0.6%）。0.6%琼脂糖与 2XDMEM 以 1∶1 的比例混合，制成上层琼脂层（0.3%），并与细胞悬液混合。将六孔板置于 37 ℃、5% CO_2 环境中培养 2 ～ 3 周。培养结束后依次用 PBS 冲洗，4%多聚甲醛固定细胞 15 min，0.5%结晶紫染色 30 min。最后，对图像进行采集和分析。

1.6　划痕实验与 Transwell 侵袭实验　在划痕实验中，用无菌的 20 μl 移液管形成线性创面。用 PBS 冲洗离体细胞，加入无血清培养基以减少增殖影响。使用倒置相差显微镜捕获图像，记录细胞在 0 及 48 h 向中心迁移的情况。最后采用 Image-Pro Plus 软件量化。

在 Transwell 侵袭实验中，Matrigel 用无血清培养基 1∶8 稀释，包被 Transwell 小室上室面。上室加入 100 μl 浓度为 2×10^4 细胞/ml 的细胞悬液，下室加入 600 μl 含有 10% FBS 的 DMEM，以形成趋化梯度。24 h 后，去除未入侵细胞，将入侵细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min，再用 0.1%结晶紫染色 20 min。

1.7　MTT 实验　采用 MTT 实验评价 CRC 细胞对奥沙利铂的敏感性。在药物暴露前 24 h，将 100 μl 浓度为 2×10^4 细胞/ml 的细胞悬液接种到 96 孔板中。细胞附着后，加入不同浓度的奥沙利铂并孵育 48 h。接着，每孔加入 20 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液，37 ℃下孵育 4 h。抽吸上清，加入 150 μl DMSO 充分溶解。最后记录 570 nm 波长下吸光度。

1.8　实时荧光定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）　使用 TRIzol 试剂分离提取总 RNA，并反转录为 cDNA。采用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR 检测。设置反应条件为：95 ℃加热 2 min，95 ℃变性 20 s，60 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 30 s；反应持续 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对基因表达量。PCR 引物列表如下：PNN-shRNA1-F 为 5’-CCGGGAAGGTAGACGCATCGAATTTTTCAAGAGAAAATTCGATGCGTCTACCTTCTTTTTGGTACC-3’，PNN-shRNA1-R 为 5’-AATTGGTACCAAAAAGAAGGTAGACGCATCGAATTTTCTCTTGAAAAATTCGATGCGTCTACCTTC-3’，PNN-shRNA2-F 为 5’-CCGGGGTAGAGGACGTGGTAGTTTATTCAAGAGATAAACTACCACGTCCTCTACCTTTTTGGTACC-3’，PNN-shRNA2-R 为 5’-AATTGGTACCAAAAAGGTAGAGGACGTGGTAGTTTATCTCTTGAATAAACTACCACGTCCTCTACC-3’，PNN-shRNA3-F 为 5’-CCGGGCAGCAGAAGATTTCTTGATATTCAAGAGATATCAGAAATCTTCTGCTGCTTTTTGGTACC-3’，PNN-shRNA3-R 为 5’-AATTGGTA-

CCAAAAAGCAGCAGAAGATTTCTTGATATCT-CTTGAATATCAAGAAATCTTCTGCTGC-3'。

1.9　免疫印迹试验（Western blot，WB）　应用 SDS 裂解缓冲液洗涤和裂解 RKO 和 HCT116 细胞株，提取总蛋白。使用 BCA 蛋白检测试剂盒，定量测定总蛋白浓度。将蛋白添加到每个通道进行电泳，接着进行转膜。固定蛋白后用 5%脱脂牛奶在 25 ℃下封闭 1 h，然后添加 1∶1 000 一抗（抗 PNN 和抗β-actin）孵育，4 ℃下过夜。一抗孵育后，用 TBST 洗涤 3 次，去除未结合的抗体，再将膜与 1∶5 000 二抗置于 25 ℃孵育 1 h。二抗孵育后，再次用 TBST 洗涤膜以消除残留抗体。最后，显像及保存数据。

1.10　肿瘤免疫浸润分析　利用 TIMER 数据库（https://cistrome.shinyapps.io/timer/）评估 PNN 表达与 CRC 免疫细胞浸润（TIICs）的相关性。包括 B 细胞、$CD8^+$T 细胞、$CD4^+$T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞。

1.11　统计方法　采用 SPSS 22.0 与 GraphPad Prism 8.0 分析数据，实验数据采用均值±标准差表示，采用 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PNN 在 CRC 组织及细胞系中表达　TCGA 数据库分析显示，379 例 CRC 组织中 PNN mRNA 水平高于 32 例配对的癌旁组织，见图 1A；在配对样本中也证实了 PNN 的高表达趋势，见图 1B。在大多数 CRC 细胞株中，PNN 蛋白均呈现高表达，而在 HCT116 细胞中 PNN 表达水平降低，见图 1C ～ D。

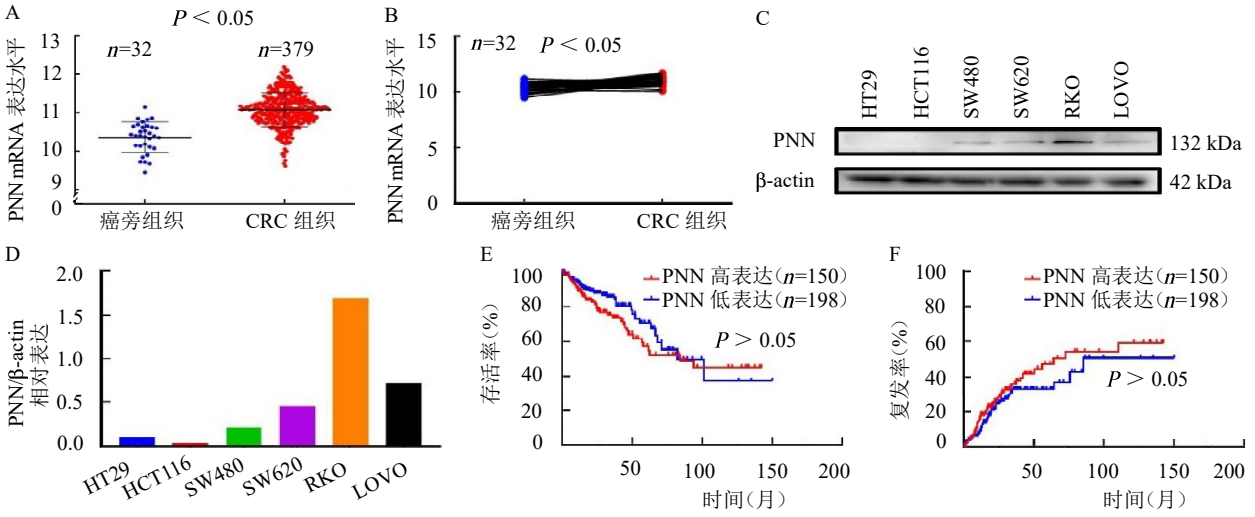
基于最佳截断值，根据 PNN 表达情况将患者分为高表达组和低表达组，两组生存和复发分析差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），见图 1E ～ F。

2.2　PNN 过表达增强 CRC 细胞增殖　与对照组相比，PNN 过表达组的细胞克隆形成能力显著增强，而敲低组的细胞克隆形成能力显著降低（均 $P < 0.05$），见图 2A。

2.3　PNN 过表达促进 CRC 细胞迁移与侵袭　在 RKO 细胞中，PNN 敲低导致细胞迁移明显减少（$P < 0.05$），而在 HCT116 细胞中，PNN 过表达明显加速了细胞迁移（$P < 0.05$）；此外，Transwell 侵袭实验结果表明，PNN 过表达显著增加 CRC 细胞的侵袭能力（均 $P < 0.05$），见图 2B。

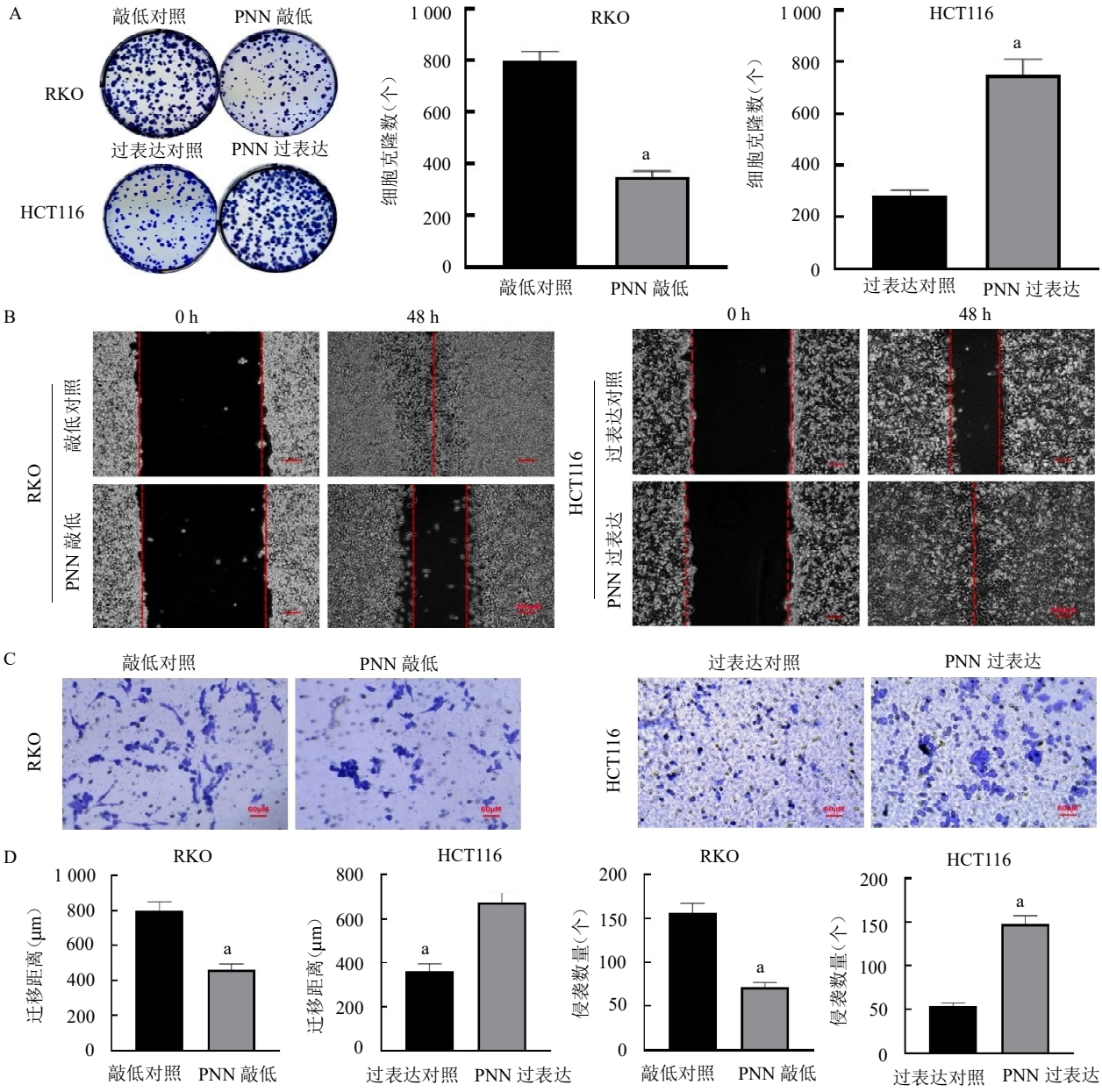
2.4　PNN 过表达降低 CRC 细胞对奥沙利铂敏感性　将 RKO 和 HCT116 细胞株暴露于不同浓度的奥沙利铂中，随着奥沙利铂浓度升高，CRC 细胞活性呈剂量依赖性下降（均 $P < 0.05$），与对照组细胞相比，PNN 敲减组的细胞抑制率显著升高，而 PNN 过表达组的细胞抑制率显著降低（均 $P < 0.05$），见图 3A。

2.5　PNN 表达与肿瘤 TIICs 关联　TIMER 数据库分析显示，PNN 表达与结肠癌中巨噬细胞、中性粒细胞、$CD4^+$和 $CD8^+$T 细胞、树突状细胞和 B 细胞的浸润呈正相关。同时在直肠癌中也观察到类似的趋势，除树突状细胞和 B 细胞外，PNN 的表达与上述其他



注：A ～ B 为 TCGA 数据库分析结直肠癌（CRC）组织及癌旁组织中桥粒相关蛋白 Pinin（PNN）mRNA 的表达水平，C ～ D 为 Western blot 检测 CRC 细胞中 PNN 蛋白的表达水平，E ～ F 为 PNN 高低表达与 CRC 患者预后的关系

图 1　PNN 在 CRC 组织和细胞中的表达水平



注：A 为克隆形成试验，B 为划痕实验，C 为 Transwell 侵袭实验，D 为两种实验统计分析，a$P < 0.05$

图 2　PNN 异常表达对 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

细胞均呈正相关（均 $P < 0.05$），见图 3B。

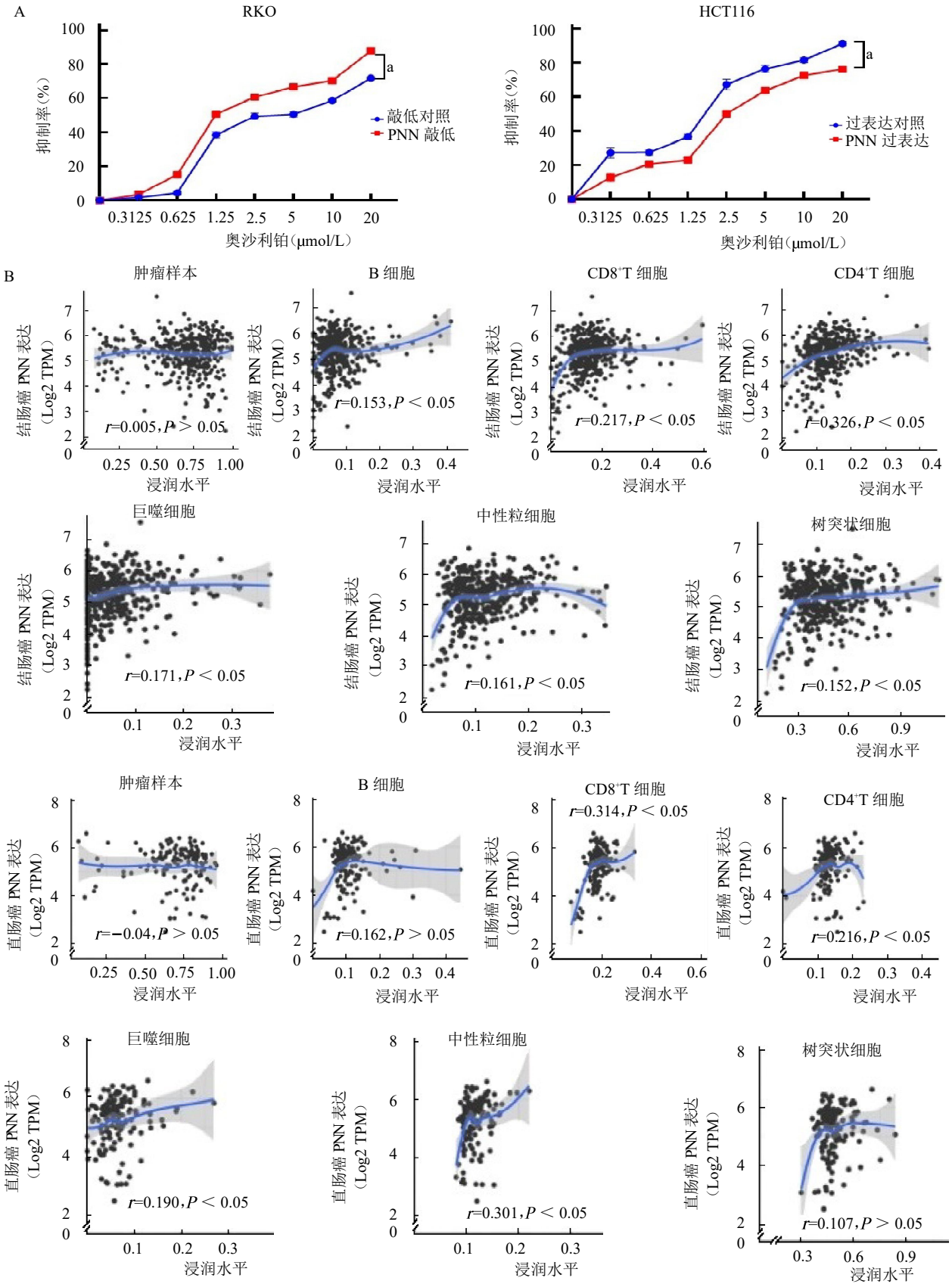
3　讨论

PNN 存在两种主要亚型，分别定位于桥粒与细胞核，其功能具有环境依赖性[13]。桥粒相关的 PNN 介导中间丝与桥粒斑块的附着，从而增加细胞间黏附并维持上皮的完整性[14-16]。另一方面，核 PNN 作为 pre-mRNA 加工复合体的结构组成部分，在替代 RNA 剪接调节和基因表达控制中发挥关键作用[12,17]。

越来越多研究证实，PNN 在多种肿瘤中高表达并发挥促癌作用，与肿瘤增殖、转移及不良预后相关[5,9-11,18]。Tang 等[18]发现 AATBC/miR-1237-3p/PNN 轴是鼻咽癌促进转移的关键调控通路。Wei 等[5]也证明了 PNN 过表达可以促进 CRC 细胞增殖和转移能力。另有研究将 PNN 表达与 miR-195-5p 调控网络联系起来，表明可能存在影响 CRC 细胞行为的复杂转录后调控机制[19]。此外，外泌体 circ-PNN 也被证明通过 miR-1225-5p/FGF13 轴促进 CRC 的进展[8]。

基于这些发现，本研究进一步证实，PNN 在 CRC 细胞系和组织样本中的表达显著升高，与增殖、迁移和侵袭增强相关，进一步支持其促癌作用。此外，PNN 高表达患者的预后相对更差。

尽管 PNN 的促癌作用日益明确，其下游分子机制尚未完全阐明。已有研究表明 PNN 参与 ERK 的



注：A 为 RKO 和 HCT116 细胞株暴露于不同浓度的奥沙利铂中 CRC 细胞活性情况，B 为根据 TIMER 数据库，PNN 表达与肿瘤免疫细胞浸润关联性，a$P < 0.05$

图 3　PNN 与化疗耐药和免疫微环境关联

磷酸化，从而调节 CRC 和肝细胞癌的进展[5, 9]。此外，PNN 通过促进 NEAT1 核输出调节肿瘤糖酵解代谢[20]。最近的研究也表明，PNN 在化疗耐药中起作用，如 PNN 高表达可以促进卵巢癌患者对紫杉醇耐药[11]以及 CRC 患者对氟嘧啶耐药[6]。本研究结果表明，PNN 过表达降低了 CRC 对奥沙利铂的化疗敏感性，表明 PNN 过表达与 CRC 化疗敏感性降低之间存在潜在关联。然而，介导这种耐药性的具体机制有待进一步阐明。

此外，PNN 与免疫浸润的相关性逐渐受到关注。生物信息学研究提示 PNN 与免疫功能障碍、排除评分及免疫表型评分显著相关，这表明 PNN 对评估免疫治疗反应方面起着关键作用[21]。本研究通过 TIMER 数据库证实 PNN 表达与多种 TIICs 正相关，提示其通过重塑免疫微环境促进 CRC 进展。

综上所述，PNN 在 CRC 组织及细胞系中显著高表达，可以促进 CRC 细胞增殖、迁移、侵袭并降低奥沙利铂化疗敏感性，同时，PNN 表达水平与多种 TIICs 程度呈正相关。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈雪：研究设计、实验操作、论文撰写与修改、数据整理、统计学分析；张菡霞：实验操作、数据整理；金铭：论文撰写、数据整理、统计学分析；郑真：统计学分析；叶爽：实验操作、统计学分析；刘开泰：研究设计、研究指导、经费支持

参 考 文 献

[1] SIEGEL R L, KRATZER T B, GIAQUINTO A N, et al. Cancer statistics, 2025[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2025, 75(1): 10-45.

[2] OUYANG P, SUGRUE S P. Identification of an epithelial protein related to the desmosome and intermediate filament network[J]. J Cell Biol, 1992, 118(6): 1477-1488.

[3] GARROD D, CHIDGEY M, NORTH A. Desmosomes: Differentiation, development, dynamics and disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(5): 670-678.

[4] LEU S. The role and regulation of Pnn in proliferative and non-dividing cells: Form embryogenesis to pathogenesis[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 192: 114672.

[5] WEI Z G, MA W H, QI X L, et al. Pinin facilitated proliferation and metastasis of colorectal cancer through activating EGFR/ERK signaling pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 29429-29439.

[6] LAPUCCI A, PERRONE G, DI PAOLO A, et al. PNN and KCNQ1OT1 can predict the efficacy of adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy in colorectal cancer patients[J]. Oncol Res, 2021, 28(6): 631-644.

[7] MINI E, LAPUCCI A, PERRONE G, et al. RNA sequencing reveals PNN and KCNQ1OT1 as predictive biomarkers of clinical outcome in stage III colorectal cancer patients treated with adjuvant chemotherapy[J]. Int J Cancer, 2019, 145(9): 2580-2593.

[8] LIAO X H, LI T H, YANG L, et al. Tumor-derived exosomal circular RNA pinin induces FGF13 expression to promote colorectal cancer progression through miR-1225-5p[J]. Gut Liver, 2024, 18(6): 1014-1025.

[9] YANG X J, SUN D G, DONG C Y, et al. Pinin associates with prognosis of hepatocellular carcinoma through promoting cell proliferation and suppressing glucose deprivation-induced apoptosis[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 39694-39704.

[10] JIN M, LI D, LIU W H, et al. Pinin acts as a poor prognostic indicator for renal cell carcinoma by reducing apoptosis and promoting cell migration and invasion[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(9):4340-4348.

[11] ZHANG Y L, KWOK J S, CHOI P W, et al. Pinin interacts with C-terminal binding proteins for RNA alternative splicing and epithelial cell identity of human ovarian cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(10): 11397-11411.

[12] WANG R S, QIN Z Y, LUO H L, et al. Prognostic value of PNN in prostate cancer and its correlation with therapeutic significance[J]. Front Genet, 2022, 13: 1056224.

[13] OUYANG P. Antibodies differentiate desmosome-form and nucleus-form pinin: Evidence that pinin is a moonlighting protein with dual location at the desmosome and within the nucleus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263(1): 192-200.

[14] BRANDNER J M, REIDENBACH S, FRANKE W W. Evidence that “pinin”, reportedly a differentiation-specific desmosomal protein, is actually a widespread nuclear protein[J]. Differentiation, 1997, 62(3): 119-127.

[15] JOO J H, ALPATOV R, MUNGUBA G C, et al. Reduction of Pnn by RNAi induces loss of cell-cell adhesion between human corneal epithelial cells[J]. Mol Vis, 2005, 11: 133-142.

[16] SHI Y, TABESH M, SUGRUE S P. Role of cell adhesion-associated protein, pinin (DRS/memA), in corneal epithelial migration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(6): 1337-1345.

[17] JOO J H, RYU D, PENG Q, et al. Role of Pnn in alternative splicing of a specific subset of lncRNAs of the corneal epithelium[J]. Mol Vis, 2014, 20: 1629-1642.

[18] TANG T, YANG L T, CAO Y J, et al. LncRNA AATBC regulates Pinin to promote metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Oncol, 2020, 14(9): 2251-2270.

[19] PICCINNO E, SCALAVINO V, LABARILE N, et al. Identification of a novel miR-195-5p/PNN axis in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5980.

[20] PARK M K, ZHANG L, MIN K W, et al. NEAT1 is essential for metabolic changes that promote breast cancer growth and metastasis[J]. Cell Metab, 2021, 33(12): 2380-2397.

[21] ZHANG H, JIN M, YE M, et al. The prognostic effect of PNN in digestive tract cancers and its correlation with the tumor immune landscape in colon adenocarcinoma[J]. J Clin Lab Anal, 2022, 36(4): e24327.

收稿日期：2025-11-04

（本文编辑：钟美春）