

本文引用:杨丹丹,冯思佳,崔静,等. 磷脂酸磷酸酶2域1A在不同子宫颈癌细胞中的表达[J]. 新乡医学院学报,2017,34(8):674-677. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.003.

【基础研究】

磷脂酸磷酸酶2域1A在不同子宫颈癌细胞中的表达

杨丹丹¹, 冯思佳², 崔静¹, 柴婕¹, 张翠翠¹, 郜培琮¹, 王志慧¹,
范蕊¹, 张向楠², 王阳林¹, 原志庆¹

(1. 新乡医学院基础医学院病理学教研室,河南 新乡 453003;2. 新乡医学院第三附属医院病理科,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨磷脂酸磷酸酶2域1A(PPAPDC1A)在人4种子宫颈癌细胞中表达的差异。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链式反应和 Western blot 法分别检测 PPAPDC1A mRNA 和蛋白在人子宫颈癌 C33-A 细胞、Caski 细胞、HeLa 细胞和 SiHa 细胞中的表达。**结果** 子宫颈癌 SiHa、HeLa、Caski 和 C33-A 细胞中 PPAPDC1A mRNA 的表达量分别为 0.344 ± 0.027 、 0.593 ± 0.017 、 0.899 ± 0.030 和 2.920 ± 0.045 , PPAPDC1A 蛋白的表达分别为 0.514 ± 0.030 、 1.185 ± 0.096 、 1.379 ± 0.084 和 1.761 ± 0.072 ;子宫颈癌 SiHa、HeLa、Caski 和 C33-A 细胞中 PPAPDC1A mRNA 和蛋白的表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。PPAPDC1A mRNA 和蛋白在4种子宫颈癌细胞中表达的顺序为:C33-A 细胞 > Caski 细胞 > HeLa 细胞 > SiHa 细胞。**结论** PPAPDC1A 基因在不同子宫颈癌细胞中存在差异表达。

关键词: 子宫颈癌;磷脂酸磷酸酶2域1A基因;信使RNA

中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)08-0674-04

Expression of phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A in different human cervical carcinoma cells

YANG Dan-dan¹, FENG Si-jia², CUI jing¹, CHAI Jie¹, ZHANG Cui-cui¹, GAO Pei-qiong¹,
WANG Zhi-hui¹, FAN Rui¹, ZHANG Xiang-nan², WANG Yang-lin¹, YUAN Zhi-qing¹

(1. Department of Pathology, College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China;
2. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression difference of phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A (PPAPDC1A) in four kinds of human cervical carcinoma cells. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot methods were used to detect the expressions of PPAPDC1A mRNA and protein in cervical carcinoma C33-A cells, Caski cells, HeLa cells and SiHa cells. **Results** The expression of PPAPDC1A mRNA in SiHa cells, HeLa cells, Caski cells and C33-A cells was 0.344 ± 0.027 , 0.593 ± 0.017 , 0.899 ± 0.030 and 2.920 ± 0.045 , respectively; the expression of PPAPDC1A protein in SiHa cells, HeLa cells, Caski cells and C33-A cells was 0.514 ± 0.030 , 1.185 ± 0.096 , 1.379 ± 0.084 and 1.761 ± 0.072 , respectively. There were significant differences in the expressions of PPAPDC1A mRNA and protein in the four kinds of cervical carcinoma cells ($P < 0.05$). The order of PPAPDC1A mRNA and protein expressions in the four kinds of cervical carcinoma cells was as follows: C33-A cells > Caski cells > HeLa cells > SiHa cells. **Conclusion** PPAPDC1A gene is differentially expressed among C33-A cells, Caski cells, HeLa cells and SiHa cells.

Key words: cervical carcinoma; phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A gene; messenger RNA

近年来,随着子宫颈癌筛查的普及和子宫颈癌疫苗的问世,子宫颈鳞状细胞癌的发生率有所下降,

但子宫颈腺癌的发生率保持不变或有所上升^[1]。据2012年全球肿瘤流行病学统计显示,全球每年大约有52.8万人被诊断为宫颈癌^[2]。其中,复发或转移是导致中晚期宫颈癌患者治疗失败的原因之一^[3]。磷脂酸磷酸酶2域1A(phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A, PPAPDC1A)属于新型2型磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP)^[4],能够去磷酸化磷脂酸(phosphatidic acid, PA)生成甘油二酯(diacylglyc-

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.003

收稿日期:2017-03-27

基金项目:河南高校科技创新团队项目(编号:2012IRTSTHN015);河南省基础与前沿技术研究计划项目(编号:122300410121);河南省科技创新杰出青年基金资助项目(编号:ZD200955)。

作者简介:杨丹丹(1990-),女,河南洛阳人,硕士研究生在读,研究方向:肿瘤病理。

通信作者:原志庆(1957-),男,河南滑县人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤病理;E-mail:yuanzhiqing@xxmu.edu.cn。

erol,DAG)和无机磷酸盐,其中 DAG 是细胞内的第 2 信使,在细胞信号转导中起重要作用。此外,PPAPDC1A 可以通过去磷酸化不同底物来参与细胞的增殖和运动等过程^[5]。因此,该基因可能与肿瘤的发生、发展存在相关性^[6]。本研究拟通过 Western blot 和实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)等方法探讨 PPAPDC1A 在不同子宫颈癌细胞中的表达,为深入研究 PPAPDC1A 在子宫颈癌发生、发展中的作用及相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养条件 人子宫颈癌 C33-A 细胞购于武汉大学保藏中心,Caski 细胞、HeLa 细胞和 SiHa 细胞均购自中国科学院上海细胞库。4 种细胞均选用含体积分数 10% 胎牛血清、100 kU · L⁻¹ 青霉素和 100 mg · L⁻¹ 链霉素的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱培养。

1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清购自德国 Sera Pro 公司,高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay,RIPA)蛋白提取裂解液、二辛可酸法(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒、超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)试剂盒以及 Western blot 一抗稀释液均购自上海碧云天生物有限公司,二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)和十二烷基磺酸钠(twelve alkyl sulfonic acid sodium,SDS)均购自德国 Merk 公司,兔抗人 PPAPDC1A 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔和山羊抗鼠二抗购自美国 Proteintech Group 有限公司,英潍捷基(上海)贸易有限公司合成 qRT-PCR 引物,RNAiso Plus 试剂、RNA 反转录试剂盒和 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒均购自大连 TaKa-Ra 公司,ELx800TM 酶标仪购自美国 BioTek 公司,紫外分光光度计购自德国 Eppendorf 公司,TE-70XP 半干转膜购自美国 Hoefer 公司,StepOne qRT-PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 qRT-PCR 技术检测不同子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A mRNA 的表达 常规培养 4 种人子宫颈癌细胞,待细胞长至对数期约 80% 汇合度时,用

预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffersolution,PBS)清洗细胞 3 次,按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取总 RNA 并定量后,按照反转录试剂盒说明书,以提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第 1 条链,反转录反应体系为:5 × 反转录预混液 5 μL、RNA 0.5 μg、吸取适量无 RNA 酶水使总体积为 20 μL;反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 保存。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参照。所用引物采用 Primer Premier 5.0 自行设计,由上海英潍捷基贸易有限公司合成。GAPDH 上游引物:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',下游引物:5'-AGGGGCCATC-CACAGTCTTC-3';PPAPDC1A 上游引物:5'-TAAT-AGTGGGAAGACCTCGC-3',下游引物:5'-GGTCAC-CTGTGCAATGCATT-3',GAPDH 和 PPAPDC1A 的扩增长度分别是 258、87 bp。qRT-PCR 反应体系共 20.0 μL,含 10.0 μL 2 × SYBR 燃料预混的 Ex Taq 酶 II、0.8 μL 上游引物、0.8 μL 下游引物、6.0 μL 高压灭菌水、0.4 μL 荧光定量 PCR 参比染料和 2.0 μL cDNA 溶液。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 延伸 30 s,40 个循环,每组设 3 个复孔。采用 2^{-ΔΔCt} 分析法,计算样品的 2^{-ΔΔCt},即为 PPAPDC1A mRNA 相对表达量。ΔCt = Ct_{目的基因} - Ct_{内参},ΔΔCt = ΔCt_{实验组} - ΔCt_{对照组}。

1.4 Western blot 检测不同子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达 常规培养细胞,待细胞长至对数期约 80% 汇合度时,消化、离心后加入 RIPA 裂解液置于冰上裂解 30 min,超声波粉碎细胞后置于 4 ℃、15 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,吸取上清液于新的预冷微型离心管中,其中取 5 μL 蛋白按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行定量,剩余蛋白加入 1/5 蛋白体积的 DTT 和 4/5 蛋白体积的 SDS 混匀后煮沸变性并储存于 -80 ℃ 冰箱。变性后蛋白使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:浓缩胶质量分数为 5%、分离胶质量分数为 10%,浓缩胶采用 80 V 稳压电泳,分离胶用 120 V 稳压电泳。凝胶中的蛋白采用恒流半干转膜将其转移到聚偏二氟乙烯膜,转膜后用质量分数 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜,二抗室温摇育 1.5 h,按照 ECL 试剂盒操作步骤进行自显影。以 β-actin 作为内参照,鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、兔抗人 PPAPDC1A 多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗的稀释倍数

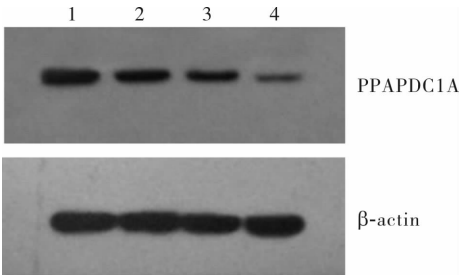
分别为 1 : 1 000、1 : 500、1 : 5 000 和 1 : 5 000。通过 Bandscan 5.0 软件分析 Western blot 内参照条带与目的条带的灰度比值。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差异法 (least-significant difference, LSD) 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A mRNA 的表达 qRT-PCR 结果显示,PPAPDC1A 扩增产物单一,融解曲线未见杂峰,无非特异性扩增。4 种子宫颈癌 SiHa、HeLa、Caski 和 C33-A 细胞 PPAPDC1A mRNA 的表达量分别为 0.344 ± 0.027 、 0.593 ± 0.017 、 0.899 ± 0.030 和 2.920 ± 0.045 ,4 种子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A mRNA 的表达量比较差异有统计学意义 ($F = 4\ 212.055, P < 0.000$),PPAPDC1A mRNA 在 4 种子宫颈癌细胞中表达的顺序为: C33-A 细胞 > Caski 细胞 > HeLa 细胞 > SiHa 细胞。

2.2 不同子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达 结果见图 1。Western blot 结果显示,子宫颈癌 SiHa、HeLa、Caski 和 C33-A 细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达分别为 0.514 ± 0.030 、 1.185 ± 0.096 、 1.379 ± 0.084 和 1.761 ± 0.072 ,4 种子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达比较差异有统计学意义 ($F = 145.196, P < 0.000$),PPAPDC1A 蛋白在 4 种子宫颈癌细胞中表达的顺序为: C33-A 细胞 > Caski 细胞 > HeLa 细胞 > SiHa 细胞。



1: C33-A 细胞; 2: Caski 细胞; 3: HeLa 细胞; 4: SiHa 细胞。

图 1 Western blot 检测不同子宫颈癌细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达

Fig.1 Results of PPAPDC1A protein expression in different cervical cancer cells detected by Western blot

3 讨论

哺乳动物的 PAP 可分为 PAP1 和 PAP2, PAP1 在催化反应中依赖 Mg^{2+} 并且对氮乙基马来酰亚胺 (N-ethylmaleimide, NEM) 的抑制作用敏感,而 PAP2 的催化作用不依赖 Mg^{2+} 且对 NEM 的抑制作用不敏感。但是 PPAPDC1A 在催化底物的反应中虽然不依赖 Mg^{2+} 却对 NEM 的抑制作用非常敏感,因此,它属于一种新型的 PAP2。PAP1 主要的作用与甘油磷脂和三酰甘油代谢有关^[7]。PAP2 能够催化不同的底物,如磷脂酸、1-磷酸神经酰胺、1-磷酸鞘氨醇等去磷酸化,从而参与调控细胞的增殖、分化等过程。其中, PAP2 催化 PA 的水解作用能够终止 PA 的信号通路,同时激活 Ca^{2+} 依赖和磷脂依赖的蛋白激酶 C,可能与肿瘤的发生有关^[8]。

PPAPDC1A 位于人 10q26.12, 编码含 271 个氨基酸的 6 跨膜整合磷酸酶^[9-10], KLIVGRPRP、PSGH 和 SRMCDYKHHWWQ 为其脂质磷酸酶活性的 3 个保守域^[4]。TAKEUCHI 等^[4] 通过 qRT-PCR 技术发现 PPAPDC1A 在人的脑、肾和睾丸等组织中表达较高,而在骨髓、胸腺以及肝脏组织中表达较低;此外,内皮细胞可以优先表达 PPAPDC1A,可能为血管再生术提供新的思路。PPAPDC1A 的生物学作用是通过去磷酸化不同的底物,从而参与调控细胞的增殖、分化过程,但是其具体的作用机制未见文献报道。目前,关于 PPAPDC1A 与肿瘤关系的研究仅仅局限于基因表达谱芯片的差异表达谱分析,而在肿瘤发生与演变中的作用及机制未见文献报道。子宫颈癌是危害女性身体健康的常见恶性肿瘤之一,其发病率有逐年上升的趋势且发病趋于年轻化^[11]。研究显示,子宫颈癌的发生可能与高危型人乳头病毒 (high-risk human papillomaviruses, HR-HPVs) 的持续感染、个体行为因素和遗传易感因素^[12-13] 有关,其具体的发生机制尚不明确,深入了解子宫颈癌发生机制,寻找新的治疗靶点成为提高患者生存率的迫切需要。本研究结果显示,PPAPDC1A 在 4 种人子宫颈癌细胞的表达顺序为: C33-A 细胞 > Caski 细胞 > HeLa 细胞 > SiHa 细胞,说明 PPAPDC1A 高表达细胞为 C33-A, PPAPDC1A 低表达细胞为 SiHa, 为下一步建立稳定过表达 PPAPDC1A 细胞系和稳定沉默 PPAPDC1A 细胞,进而研究该基因对宫颈癌细胞的增殖、侵袭和转移能力的作用奠定了基础。

参考文献:

[1]

TORRE L A,BRAY F,SIEGEL R L,*et al.* Global cancer statistics,2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.

[2]

FERLAY J,SOERJOMATARAM I,DIKSHIT R,*et al.* Cancer incidence and mortality worldwid:sources,methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*,2015,136(5):359-386.

[3]

王子毅,吴令英,姚洪文,等. 早期子宫颈神经内分泌癌 32 例临床分析[J]. *中华妇产科杂志*,2015,50(3):198-203.

[4]

TAKEUCHI M,HARIGAI M,MOMOHARA S,*et al.* Cloning and characterization of DPPL1 and DPPL2, representatives of a novel type of mammalian phosphatidate phosphatase[J]. *Gene*,2007,399(2):174-180.

[5]

MANZANO R G,MARTINEZ-NAVARRO E M,FORTEZA J,*et al.* Microarray phosphatome profiling of breast cancer patients unveils a complex phosphatase regulatory role of the MAPK and PI3K pathways inestrogen receptor-negative breast cancers[J]. *Int J Oncol*,2014,45(6):2250-2266.

[6]

SCIORRA V A,MORRIS A J. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*,2002,1582(1/2/3):45-51.

[7]

CHEN Y,RUI B B,TANG L Y,*et al.* Lipin family proteins-key regulators in lipid metabolism[J]. *Ann Nutr Metab*,2015,66(1):10-18.

[8]

BENJAMIN D I,LI D S,LOWE W,*et al.* Diacylglycerol metabolism and signaling is a driving force underlying FASN inhibitor sensitivity in cancer cells[J]. *ACS Chem Biol*,2015,10(7):1616-1623.

[9]

赵二趁,李娜,千新来,等. 磷脂酸磷酸酶 2 域 1A 基因在乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞中的表达[J]. *新乡医学院学报*,2016,33(5):356-358,361.

[10]

TANG X,BENESCHM G,BRINDLEY D N,*et al.* Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology[J]. *J Lipid Res*,2015,56(11):2048-2060.

[11]

冯思佳,崔静,千新来,等. 集聚蛋白基因在不同子宫颈癌细胞中的表达[J]. *新乡医学院学报*,2016,33(5):365-368.

[12]

CAO D,ZHANG S,ZHANG Q,*et al.* Prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women in Shaanxi province of China;a hospital-based investigation[J]. *J Med Virol*,2016,89(7):1281-1286.

[13]

MACHALEK D A,WARK J D,TABRIZI S N,*et al.* Genetic and environmental factors in invasive cervical cancer: design and methods of a classical twin wtudy[J]. *Twin Res Hum Genet*,2017,20(1):10-18.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 673 页)

[7]

WILSON M D. Ergonomics. The effect of occupational exposure to environmental tobacco smoke on the heart rate variability of bar and restaurant workers[J]. *J Occup Environ Hyg*,2010,7(7):44-49.

[8]

THAYER J F,ÅHS F,FREDRIKSON M,*et al.* A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health[J]. *Neurosci Biobehav Rev*,2012,36(2):747-756.

[9]

HUIKURI H V,MAKIKALLIO T H,AIRAKSINEN K E J,*et al.* Power-law relationship of heart rate variability as a predictor of mortality in the elderly [J]. *Circulation*,1998,97(20):2031-2036.

[10]

LIAO D,CAI J,ROSAMOND W D,*et al.* Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease;a population-based case-cohort study. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study[J]. *Am J Epidemiol*,1997,145(8):696-706.

[11]

ZHANG J,FANG S C,MITTLEMAN M A,*et al.* Secondhand tobacco smoke exposure and heart rate variability and inflammation among non-smoking construction workers: a repeated measures study[J]. *Envir Health*,2013,12(1):1-8.

[12]

BERNARDI L,WDOWCZYKSZULC J,VALENTI C,*et al.* Effects of controlled breathing,mental activity and mental stress with or without verbalization on heart rate variability[J]. *J Am Coll Cardiol*,2000,35(6):1462-1469.

[13]

孙瑞龙,吴宁,杨世豪,等. 心率变异性检测临床应用的建议[J]. *中华心血管病杂志*,1998,26(4):252-255.

[14]

晋乐飞,吴卫东,张巧,等. 吸入式气管滴注法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2015,50(1):75-78.

[15]

FAN H,SHAFFER M L,XIAN L,*et al.* Individual-level PM_{2.5} exposure and the time course of impaired heart rate variability:the APACR Study[J]. *J Exp Sci Envir Epidemiol*,2010,21(1):65-73.

[16]

陈鹏,陈宇,张城,等. 论述 PM_{2.5}与心血管疾病的关联[J]. *吉林医学*,2014,35(7):1493-1495.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)