

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<sup>1</sup>, 冯思佳<sup>2</sup>, 崔静<sup>1</sup>, 柴婕<sup>1</sup>, 张翠翠<sup>1</sup>, 郜培琮<sup>1</sup>, 王志慧<sup>1</sup>,  
范蕊<sup>1</sup>, 张向楠<sup>2</sup>, 王阳林<sup>1</sup>, 原志庆<sup>1</sup>

(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  $0.344 \pm 0.027$ 、 $0.593 \pm 0.017$ 、 $0.899 \pm 0.030$  和  $2.920 \pm 0.045$ , PPAPDC1A 蛋白的表达分别为  $0.514 \pm 0.030$ 、 $1.185 \pm 0.096$ 、 $1.379 \pm 0.084$  和  $1.761 \pm 0.072$ ;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-dan<sup>1</sup>, FENG Si-jia<sup>2</sup>, CUI jing<sup>1</sup>, CHAI Jie<sup>1</sup>, ZHANG Cui-cui<sup>1</sup>, GAO Pei-qiong<sup>1</sup>,  
WANG Zhi-hui<sup>1</sup>, FAN Rui<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-nan<sup>2</sup>, WANG Yang-lin<sup>1</sup>, YUAN Zhi-qing<sup>1</sup>

(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  $0.344 \pm 0.027$ ,  $0.593 \pm 0.017$ ,  $0.899 \pm 0.030$  and  $2.920 \pm 0.045$ , respectively; the expression of PPAPDC1A protein in SiHa cells, HeLa cells, Caski cells and C33-A cells was  $0.514 \pm 0.030$ ,  $1.185 \pm 0.096$ ,  $1.379 \pm 0.084$  and  $1.761 \pm 0.072$ , 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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)<sup>[4]</sup>,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);河南省基础与前言技术研究计划项目(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<sup>[5]</sup>。因此,该基因可能与肿瘤的发生、发展存在相关性<sup>[6]</sup>。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<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg · L<sup>-1</sup> 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 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 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 Merck 公司,兔抗人 PPAPDC1A 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,鼠抗人  $\beta$ -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<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒均购自大连 TaKaRa 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 Hoefler 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  $\mu$ L、RNA 0.5  $\mu$ g、吸取适量无 RNA 酶水使总体积为 20  $\mu$ L;反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 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'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3', 下游引物:5'-AGGGGCCATC-CACAGTCTTC-3'; PPAPDC1A 上游引物:5'-TAAT-AGTGGGAAGACCTCGG-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  $\mu$ L, 含 10.0  $\mu$ L 2 × SYBR 燃料预混的 Ex Taq 酶 II、0.8  $\mu$ L 上游引物、0.8  $\mu$ L 下游引物、6.0  $\mu$ L 高压灭菌水、0.4  $\mu$ L 荧光定量 PCR 参比染料和 2.0  $\mu$ L cDNA 溶液。反应条件:95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 延伸 30 s, 40 个循环,每组设 3 个复孔。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 分析法,计算样品的 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, 即为 PPAPDC1A mRNA 相对表达量。 $\Delta$ Ct = Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>内参</sub>,  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>实验组</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>对照组</sub>。

**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 °C、15 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,吸取上清液于新的预冷微型离心管中,其中取 5  $\mu$ L 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 °C 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 °C 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  $\beta$ -actin 作为内参照,鼠抗人  $\beta$ -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

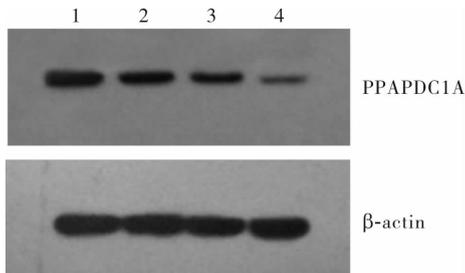
分别为1:1 000、1:500、1:5 000和1:5 000。通过 Bandscan 5.0 软件分析 Western blot 内参照条带与目的条带的灰度比值。

**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  $0.344 \pm 0.027$ 、 $0.593 \pm 0.017$ 、 $0.899 \pm 0.030$  和  $2.920 \pm 0.045$ , 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  $0.514 \pm 0.030$ 、 $1.185 \pm 0.096$ 、 $1.379 \pm 0.084$  和  $1.761 \pm 0.072$ , 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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。

PPAPDC1A 位于人 10q26.12, 编码含 271 个氨基酸的 6 跨膜整合磷酸酶<sup>[9-10]</sup>, KLIVGRPRP、PSGH 和 SRMCDYKHHWWQ 为其脂质磷酸酶活性的 3 个保守域<sup>[4]</sup>。TAKEUCHI 等<sup>[4]</sup>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<sup>[11]</sup>。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<sup>[12-13]</sup>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 worldwide: 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 in estrogen 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 study [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]. *Environ Health*, 2013, 12 (1) : 1-8.
- [12] BERNARDI L, WDOWCZYK SZULC 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<sub>2.5</sub> exposure and the time course of impaired heart rate variability: the APACR Study [J]. *J Exp Sci Environ Epidemiol*, 2010, 21 (1) : 65-73.
- [16] 陈鹏, 陈宇, 张城, 等. 论述 PM<sub>2.5</sub> 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)