本文引用:郜培琼,贺国洋,冯思佳,等. 磷脂酸磷酸酶 2 域 1A 在不同结直肠癌细胞中的表达[J]. 新乡医学院学报,2018,35(3):163-166. DOI:10.7683/xxyxyxb.2018.03.001.

【基础研究】

磷脂酸磷酸酶 2 域 1A 在不同结直肠癌细胞中的表达

郜培琼[1], 贺国洋[1], 冯思佳[2], 张翠翠[1], 王志慧[1], 范　蕊[1], 王阳林[1], 张向楠[2], 赵　飞[2], 王贝玺[2], 千新来[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)在人结直肠癌细胞中的表达及意义。**方法**　取结直肠癌细胞系高转移潜能细胞 LOVO、SW620 和低转移潜能细胞 SW480、RKO、HCT116、DLD-1 进行常规培养,待细胞生长至对数生长期时,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测不同结直肠癌细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达,Western blot 检测不同结直肠癌细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达。**结果**　6 种人结直肠癌细胞中 PPAPDC1A mRNA 和蛋白表达比较差异均有统计学意义($F=41.213$、344.116,$P<0.05$)。高转移潜能细胞 LOVO、SW620 中 PPAPDC1A mRNA 和蛋白表达显著高于 DLD-1、HCT116、RKO、SW480 细胞($P<0.05$);高转移潜能细胞 LOVO 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 SW620 细胞($P<0.05$);DLD-1 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 HCT116、RKO、SW480 细胞($P<0.05$);低转移潜能细胞 HCT116 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 RKO、SW480 细胞($P<0.05$);RKO 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 SW480 细胞($P<0.05$)。高转移潜能细胞 LOVO 与 SW620 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);SW480、RKO、HCT116、DLD-1 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　PPAPDC1A 在结直肠癌细胞系中存在差异性表达,其可能与结直肠癌的侵袭和转移有关。

关键词:　结直肠癌;磷脂酸磷酸酶 2 域 1A 基因;mRNA;蛋白

中图分类号: R735.3　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1004-7239(2018)03-0163-04

Expression of phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A in different human colorectal cancer cells

GAO Pei-qiong[1], HE Guo-yang[1], FENG Si-jia[2], ZHANG Cui-cui[1], WANG Zhi-hui[1], FAN Rui[1], WANG Yang-lin[1], ZHANG Xiang-nan[2], ZHAO Fei[1], WANG Bei-xi[2], QIAN Xin-lai[1], YUAN Zhi-qing[1]

(1. *Department of Pathology*, *School of Basic Medical Sciences*, *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 significance of the expression of phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A(PPAPDC1A) in human colorectal cancer cell lines. **Methods**　The high metastatic potential cells LOVO, SW620 and low metastatic potential cells SW480, RKO, HCT116 and DLD-1 were cultured, the expression of PPAPDC1A mRNA and protein in different colorectal cancer cells in logarithmic growth period was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot. **Results**　There were significant differences in the expressions of PPAPDC1A mRNA and protein among the six human colorectal cancer cells ($F=41.213$, 344.116; $P<0.05$). The expression of PPAPDC1A mRNA and protein in highly metastatic potential cells LOVO and SW620 was significantly higher than that in DLD-1, HCT116, RKO and SW480 cells ($P<0.05$). The expression of PPAPDC1A protein in LOVO cells with high metastatic potential was significantly higher than that in SW620 cells ($P<0.05$). The expression of PPAPDC1A protein in DLD-1 cells was significantly higher than that in HCT116, RKO and SW480 cells ($P<0.05$). The expression of PPAPDC1A protein in HCT116 cells with low metastatic potential was significantly higher than that in RKO and SW480 cells ($P<0.05$). The expression of PPAPDC1A protein in RKO cells was significantly higher than that in SW480 cells ($P<0.05$). There was no significant difference in the

DOI: 10.7683/xxyxyxb.2018.03.001
收稿日期: 2017-12-11
基金项目: 河南省科技创新杰出青年基金资助项目(编号:ZD200955);河南省基础与前言技术研究计划项目(编号:122300410121);河南高校科技创新团队项目(编号:2012IRTSTHNO15)。
作者简介: 郜培琼(1989-),女,河南郑州人,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。千新来(1966-),男,河南武陟人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤分子病理及肿瘤生物治疗;E-mail:qxlfssws@163.com。

expression of PPAPDC1A mRNA between LOVO and SW620 cells ($P > 0.05$). There was no significant difference in the expression of PPAPDC1A mRNA between SW480, RKO, HCT116 and DLD-1 cells ($P > 0.05$). **Conclusion** PPAPDC1A expresses differentially in colorectal cancer cell lines, which may be involved in the invasion and metastasis of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A; mRNA

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一[1],随着饮食结构的改变以及环境、遗传等因素的影响,结直肠癌的发病率呈逐年上升趋势[2-4]。全球肿瘤流行病学统计数据显示,CRC 发病率居全球恶性肿瘤的第 3 位[5]。转移是导致 CRC 患者死亡的主要原因,约 25% 的患者在初次诊断时已发生远处转移[6-7]。磷脂酸磷酸酶 2 域 1A (phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A, PPAPDC1A)是磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP)家族成员之一,可以催化多种磷酸酯的去磷酸化,从而调控细胞的分化、运动和增殖等重要过程[8],其与细胞信号传导有密切关系。研究发现,PPAPDC1A mRNA 在脑、肾和睾丸等组织中表达,并在内皮细胞中优先表达[9]。也有研究发现,PPAPDC1A mRNA 在人乳腺癌组织中表达上调[10],同时在高转移乳腺癌细胞中高表达[11]。然而,PPAPDC1A 在 CRC 中的作用机制尚不清楚。本研究采用 Western blot 和实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 PPAPDC1A 在人 CRC 细胞系中的表达,为深入研究 PPAPDC1A 与 CRC 发生、发展的关系提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人 CRC 高转移潜能细胞系 LOVO、SW620 和低转移潜能细胞系 SW480、RKO、HCT116、DLD-1 均购自美国 American Type Culture Collection 公司。

1.2 主要试剂及仪器 高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自德国 Sera Pro 公司,PPAPDC1A 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,Tubulin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxide, HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自美国 Proteintech 公司,聚偏(二)氟乙烯膜购自美国 Millipore 公司,Western blot 一抗稀释液、Western blot 一抗和二抗去除液、聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒、放射免疫沉淀(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)蛋白提取裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、焦碳酸二乙酯(diethypyrocarbonate, DEPC)、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究所,总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus、RNA 反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq Ⅱ、Rox Reference Dye)购自大连 TaKaRa 公司,qRT-PCR 实验所需引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。细胞超净台、Nanodrop 2000 超微量核酸蛋白测定仪购自美国 Thermo 公司,qRT-PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 细胞培养 6 种人 CRC 细胞株 SW480、SW620、RKO、HCT116、DLD-1、LOVO 均用含体积分数 10% FBS、100×10^3 U · L^{-1} 青霉素和 100 mg · L^{-1} 链霉素的高糖 DMEM 于 37 ℃含体积分数 5% CO_2 的恒温箱中培养。

1.4 总 RNA 提取和核酸定量检测 按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,步骤如下:收集适量对数生长期细胞并用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗细胞 3 次,用 1 mL RNAiso Plus 裂解细胞后加入 200 μL 氯仿,振荡混匀,室温静置 2 min。12 000 × g 4 ℃离心 15 min,取上清液移至新的 1.5 mL 离心管中。加入 500 μL 异丙醇沉淀 RNA,室温静置 20 min,12 000 × g,4 ℃ 离心 15 min。用 1 mL 体积分数 75% 乙醇清洗沉淀,12 000 × g 4 ℃离心 5 min,弃上清液。空气干燥 RNA,并将其溶解于适量的 DEPC 水中,用核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度。总 RNA 于 −80 ℃冰箱保存备用。

1.5 qRT-PCR 检测 CRC 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达 使用反转录试剂盒合成单链 cDNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书,使用 20 μL 反应体系:灭菌水 6 μL,上游引物 0.8 μL,下游引物 0.8 μL,2 × SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL,Rox Reference Dye 0.4 μL,cDNA 2 μL,将其置入荧光定量 PCR 仪中进行 qRT-PCR。PPAPDC1A 上游引物序列为 5′-TAATAGTGGGAAGACCTCGC-3′,下游引物序列为 5′-GGTCACCTGTGCAATGCATT-3′;内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶上游引物序列为 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,下游引物序列为 5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因在不同细胞内的相对表达量,实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 CRC 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达 取对数生长期细胞,胰蛋白酶消化后收

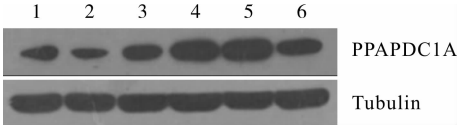
集细胞沉淀,PBS 清洗沉淀 3 次,加入 RIPA 裂解液及适量 PMSF,按照试剂盒说明书提取细胞总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度:根据标准品和样品数量,按试剂 A∶试剂 B(体积比)为 50∶1 配制适量 BCA 工作液,充分混匀。将蛋白标准品按 0、1、2、4、6、8、10 μL 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中,加 PBS 至 10 μL;取 10 μL 待测样品加入 96 孔板,每个样品设 2 个复孔。37 ℃温浴 30 min,冷却至室温,562 nm 波长下测定吸光度值,通过标准曲线计算样品的浓度。蛋白变性后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,一抗 4 ℃ 摇床孵育过夜,二抗室温孵育 2 h。按照 ECL 试剂盒操作步骤进行自显影。以兔抗人单克隆抗体 Tubulin 为内参照,Tubulin、兔抗人 PPAPDC1A 多克隆抗体和 HRP 标记的山羊抗兔二抗的稀释倍数分别为 1∶1 000、1∶500 和 1∶5 000。使用 Image J 1.49 软件分析 Western blot 内参照条带与目的条带的灰度比值。

1.7　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性差异法检验,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　6 种人 CRC 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达比较　人 CRC 细胞系 SW480、RKO、HCT116、DLD-1、LOVO、SW620 中 PPAPDC1A mRNA 相对表达量分别为 0.275 ± 0.085、0.170 ± 0.018、0.527 ± 0.119、0.380 ± 0.219、1.172 ± 0.117、1.058 ± 0.451,6 种人 CRC 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异有统计学意义($F = 41.213$,$P < 0.05$)。高转移潜能细胞 LOVO、SW620 中 PPAPDC1A mRNA 表达显著高于 DLD-1、HCT116、RKO、SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);高转移潜能细胞 LOVO 与 SW620 中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。DLD-1 细胞与 HCT116、SW480、RKO 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$);低转移潜能细胞系 HCT116、SW480、RKO 中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2　6 株人 CRC 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达比较　结果见图 1。人 CRC 细胞系 SW480、RKO、HCT116、DLD-1、LOVO、SW620 中 PPAPDC1A 蛋白表达量分别为 0.379 ± 0.040、0.512 ± 0.005、0.608 ± 0.027、0.682 ± 0.034、1.315 ± 0.046、1.005 ± 0.023,6 种人 CRC 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达比较差异有统计学意义($F = 344.116$,$P < 0.05$)。高转移潜能细胞 LOVO 中 PPAPDC1A 蛋白的表达显著高于 SW620、DLD-1、HCT116、RKO、SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);高转移潜能细胞 SW620 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 DLD-1、HCT116、RKO、SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);DLD-1 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 HCT116、RKO、SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);低转移潜能细胞系 HCT116 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 RKO、SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);RKO 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 SW480 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1:RKO 细胞;2:SW480 细胞;3:HCT116 细胞;4:SW620 细胞;5:LOVO 细胞;6:DLD-1 细胞。

图 1　6 种人 CRC 细胞中 PPAPDC1A 蛋白的表达(Western blot)

Fig. 1　Expression of PPAPDC1A protein in the six CRC cell lines of human(Western blot)

3　讨论

CRC 是我国高发恶性肿瘤,近年来 CRC 发病率逐渐升高[12],尽管医疗水平不断提高,但 CRC 患者的病死率并未显著下降[13]。CRC 的治疗以手术为主,辅以放射治疗和化学治疗,但疗效欠佳,且中晚期 CRC 治疗效果更差。转移是引起 CRC 患者复发和死亡的主要原因,其中主要的转移部位为肝、肺、腹膜、脑、骨等[1]。因此,探索 CRC 发生、发展机制对提高 CRC 患者的治疗效果有重要意义。

PAP 可以催化磷酸酯的去磷酸化,产生二酰基甘油(diacylglycerol,DAG)和无机磷酸盐,DAG 可以通过激活酪氨酸蛋白激酶及蛋白激酶 C 等途径参与细胞信号传导[14]。PPAPDC1A 是 PAP 家族的重要成员之一,属 PAP2 亚型[15],其主要生物学功能是催化多种生物活性脂质介质的去磷酸化,如溶血磷脂酸、1-磷酸鞘氨醇和磷脂酸等,从而参与调控细胞的增殖、分化、运动等过程[16]。研究发现,PPAPDC1A mRNA 在人脑、肾和睾丸组织中高表达,在骨髓、胸腺、前列腺、肝和子宫组织中低表达,PPAPDC1A mRNA 在人类血管内皮细胞中优先表达,如人脐静脉内皮细胞、皮肤微血管内皮细胞、肺微血管内皮细胞、主动脉内皮细胞、肺动脉内皮细胞等[15]。DAHL 等[10]通过基因表达谱芯片技术发现,PPAPDC1A 是正常乳腺组织和乳腺癌组织间的一个差异表达基因。MANZANO 等[17]研究发现,PPAPDC1A

仅在乳腺癌雌激素受体阴性亚型中表达上调,而在其他亚型中不表达。研究发现,PPAPDC1A mRNA 在子宫颈癌细胞[18]和肝癌细胞[8]中存在差异性表达,在肺癌组织中高表达,并可以促进肺癌细胞的增殖及肿瘤的发生[19]。而对于 PPAPDC1A 在 CRC 发生、发展中的作用及机制尚未见报道。

CRC 的发生是一个多步骤、多基因参与的过程,CRC 的转移也涉及多方面的相互作用。鉴于此,本研究以 6 种人 CRC 细胞系 SW480、RKO、HCT116、DLD-1、LOVO、SW620 为研究对象,分别从 mRNA 和蛋白水平检测 PPAPDC1A 的表达情况。结果显示,6 系人 CRC 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达及 PPAPDC1A 蛋白表达比较差异均有统计学意义,其中高转移潜能细胞 LOVO、SW620 中 PPAPDC1A mRNA 及 PPAPDC1A 蛋白表达均显著高于 SW480、RKO、HCT116、DLD-1 细胞;高转移潜能细胞 LOVO 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 SW620 细胞;DLD-1 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 HCT116、RKO、SW480 细胞;低转移潜能细胞系 HCT116 中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 RKO、SW480 细胞;RKO 细胞中 PPAPDC1A 蛋白表达显著高于 SW480 细胞;而高转移潜能细胞 LOVO 与 SW620 中 PPAPDC1A mRNA 表达比较差异无统计学意义,SW480、RKO、HCT116、DLD-1 细胞中 PPAPDC1A mRNA 表达两两比较差异均无统计学意义。以上研究结果提示,PPAPDC1A 在人 CRC 细胞系中存在差异性表达,其可能与 CRC 的侵袭和转移有关,为进一步研究 PPAPDC1A 在 CRC 细胞侵袭、转移中的作用及相关机制提供了基础。

参考文献:

[1] HOU J, ZHANG Y, ZHU Z. Gene heterogeneity in metastasis of colorectal cancer to the lung[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 64: 58-64.

[2] O'KEEFE S J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(12): 691-706.

[3] COLANGELO T, POLCARO G, MUCCILLO L, *et al*. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1867(1): 1-18.

[4] WENG M, DI W, CHAO Y, *et al*. Noncoding RNAs in the development, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer[J]. *Transl Res*, 2017, 181: 108-120.

[5] 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): E359-E386.

[6] JEMAL A, CENTER M M, DESANTIS C, *et al*. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(8): 1893-1907.

[7] VATANDOUST S, PRICE T J, KARAPETIS C S. Colorectal cancer: metastases to a single organ[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(41): 11767-11776.

[8] 柴婕,冯思佳,崔静,等. 磷脂酸磷酸酶 2 域 1A 在不同转移能力肝癌细胞系中的表达[J]. 新乡医学院学报,2017,34(8):678-681,686.

[9] KOK B P, VENKATRAMAN G, CAPATOS D, *et al*. Unlike two peas in a pod: lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases[J]. *Chem Rev*, 2012, 112(10): 5121-5146.

[10] DAHL E, KRISTIANSEN G, GOTTLOB K, *et al*. Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin α_2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3950-3960.

[11] 赵二趁,崔静,冯思佳,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.

[12] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[13] 沈琳. 精准医疗快速发展时期结直肠癌治疗沉淀与突破[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(3):261-263.

[14] CARMAN G M, HAN G S. Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 2593-2597.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

[19] ZHANG X, ZHANG L, LIN B, *et al*. Phospholipid Phosphatase 4 promotes proliferation and tumorigenesis, and activates Ca^{2+}-permeable cationic channel in lung carcinoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 147.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)