

文章编号:1000-5404(2013)13-1379-05

论著

## siRNA 沉默 PTP4A1 表达对人舌鳞癌细胞系 TCA8113 体内外生物学行为的影响

漆小娟,季平,潘丽,时恩来,徐望 (400016 重庆,重庆医科大学附属口腔医院颌面外科,重庆市口腔疾病与生物医学研究中心)

**[摘要]** 目的 探讨特异性沉默人舌鳞癌细胞系 TCA8113 中 PTP4A1 基因的表达,并研究沉默该基因表达后对 TCA8113 细胞体内外生物学行为的影响。方法 采用 siRNA 的慢病毒载体 siRNA-PTP4A1 作为阳性干扰组(KD),空病毒载体作为阴性对照组(NC),未作任何处理的 TCA8113 细胞作为空白对照组(CON)。Real-time PCR 和 Western blot 检测 PTP4A1 基因的干扰效果,MTT 法检测 3 组细胞的增殖能力,流式细胞技术分析 3 组细胞凋亡和细胞周期情况,平板克隆形成实验检测体外克隆形成能力,Western blot 分别检测 3 组细胞抑制凋亡蛋白 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 的表达情况,3 组细胞分别裸鼠成瘤后观察移植瘤的生长情况。结果 siRNA-PTP4A1 转染 TCA8113 细胞成功,Real-time PCR 和 Western blot 检测 PTP4A1 基因的抑制率达到 55% 和 60% 以上( $P < 0.05$ );MTT 结果显示 KD 组细胞增殖能力小于 NC、CON 组;细胞凋亡率也明显增加,KD 组早期凋亡为  $(17.48 \pm 0.70)\%$ ,而 NC、CON 组的早期细胞凋亡率为  $(7.34 \pm 0.70)\%$  和  $(4.86 \pm 0.25)\%$  ( $P < 0.01$ );KD 组细胞周期阻滞在  $G_1/G_0$  和 S 期 ( $P < 0.05$ );Western blot 结果显示 Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ),Bax 蛋白表达增高 ( $P < 0.01$ );KD 组体外克隆形成数小于 NC、CON 组 ( $P < 0.01$ );KD 组裸鼠移植瘤的生长速度缓慢,质量和体积均小于 NC、CON 组 ( $P < 0.01$ )。结论 siRNA PTP4A1 在体内外均能有效抑制舌鳞癌 TCA8113 细胞的恶性生物学行为,PTP4A1 基因可能与舌鳞癌的发生、发展相关。

**[关键词]** TCA8113;PTP4A1;siRNA;生物学行为

**[中图分类号]** R394.3;R730.23;R739.86

**[文献标志码]** A

## Effect of silencing PTP4A1 gene by lentiviral vector-mediated siRNA on biological behavior of TCA8113 cells *in vivo* and *in vitro*

Qi Xiaojuan, Ji Ping, Pan Li, Shi Enlai, Xu Wang (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Chongqing Oral Disease and Biomedical Research Center, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the PTP4A1 gene expression silenced by lentiviral vector-mediated siRNA and the effect on biological behavior in human tongue squamous cancer cell line TCA8113. **Methods** The cells were divided into three groups including a KD group (TCA8113 cells treated with siRNA-PTP4A1), a NC group (TCA8113 cells treated with empty lentivirus), and a CON group (TCA8113 cells without treatment). Real-time PCR and Western blotting were applied to detect the expression of PTP4A1. MTT assay was used to detect the inhibition of cell proliferation. Flow cytometry was performed to detect the cell apoptosis and cell cycle. Bcl-2 and Bax protein expression levels were detected by Western blotting. Clone formation was measured by plate clone forming test. Cells were subcutaneously injected into nude mice to induce tumors. **Results** In the KD group, the inhibitory rates of mRNA and protein of PTP4A1 were above 55% and 60% ( $P < 0.05$ ). The cell proliferation was significantly suppressed in the KD group compared with the NC group and CON group. The cell apoptotic rate in the KD group [ $(17.48 \pm 0.70)\%$ ] was significantly higher than that in the NC group [ $(7.34 \pm 0.70)\%$ ] and CON group [ $(4.86 \pm 0.25)\%$ ] ( $P < 0.01$ ), and the cells in the KD group were arrested at  $G_1/G_0$  phase and S phase ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that Bcl-2 protein expression level decreased ( $P < 0.01$ ), but Bax protein expression level increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the NC group and CON group, the clone formation ability of the cells *in vitro* ( $P < 0.01$ ) and the tumor growth in nude mice *in vivo* decreased significantly in the KD group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Silencing

**[通信作者]** 季平, E-mail: jiping\_62@hotmail.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130312.1339.007.html>(2013-03-12)

PTP4A1 expression is effective in inhibiting tumor biological behavior in human tongue squamous cancer cell line TCA8113 *in vivo* and *in vitro*. PTP4A1 may play an important role in the development of human tongue squamous cell carcinoma.

[Key words] TCA8113; PTP4A1; siRNA; biological behavior

Corresponding author: Ji Ping, E-mail: jiping\_62@hotmail.com

口咽癌是世界上第6位好发的癌症,近年来口腔癌的发病率逐渐增高<sup>[1]</sup>。Ahmedin Jemal教授在2008年全球癌症调查报告中指出,2008年全球新发的口腔癌(包括唇癌)病例数达到263 900例,死于口腔癌的128 000例<sup>[2]</sup>。舌鳞癌是口腔癌中的一种常见癌症。

PTP4A1是促肝细胞再生因子(phosphatase of regenerating liver, PRLs)家族中的一员。该家族蛋白有3个成员:PRL-1(PTP4A1)、PRL-2(PTP4A2)、RPL-3(PTP4A3)。近年来,该家族蛋白在肿瘤的发生和转移中的作用受到广泛关注<sup>[3]</sup>。Wang等<sup>[4]</sup>研究发现在76种不同的细胞系中,肿瘤细胞系中PTP4A1 mRNA表达水平比未癌变的细胞中高表达。在6种恶性黑色素瘤细胞系中,5种都高表达PTP4A1。但是PTP4A1并没有在结肠癌和脑癌的肿瘤细胞系中高表达<sup>[4]</sup>。这可能是PTP4A1的表达与组织类型和个体差异有关。有报道PTP4A1、PTP4A3 mRNA在食管鳞癌中表达均较与邻近的正常组织高表达,且PTP4A1的高表达也较PTP4A3的表达更常见<sup>[5]</sup>。这是因为PTP4A1和PTP4A3的表达模式不同,PTP4A1会优先在多种消化上皮细胞包括食管上皮的发育中表达。因而,我们假设PTP4A1基因在人舌鳞癌中有可能起着重要作用。

我们的预实验发现PTP4A1基因的蛋白和mRNA水平在人舌鳞癌组织中以及TCA8113细胞中的表达水平比癌旁组织和临近的正常舌黏膜组织中高。本实验进一步采用慢病毒载体LV-PTP4A1-RNAi干扰PTP4A1基因在舌鳞癌细胞系TCA8113中的表达,研究沉默该基因后,检测舌鳞癌TCA8113细胞增殖和凋亡的变化,以及抑凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax在蛋白表达水平的变化,体外克隆形成能力和裸鼠体内成瘤情况的观察等,探讨PTP4A1基因对舌鳞癌细胞TCA8113体内外生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞、动物及分组 TCA8113细胞购于重庆医科大学生命科学研究院。4周龄裸鼠10只,雌雄各半,购于第三军医大学实验动物中心。采用siRNA的慢病毒载体siRNA-PTP4A1作为阳性干扰组(KD),空病毒载体作为阴性对照组

(NC),未作任何处理的TCA8113细胞作为空白对照组(CON)。  
1.1.2 试剂 0.25%胰酶和PBS液购于重庆医科大学生命科学院。RPMI1640、胎牛血清购于Gibco公司。Polybrene、Enhanced infection Solution、空病毒载体CON077、LV-PTP4A1-RNAi购于上海吉凯基因技术有效公司。RNA裂解液(TaKaRa),一步法逆转录试剂盒(TaKaRa),SBGreen一步法荧光定量试剂盒(TaKaRa)。PTP4A1一抗购于Abgent公司,Bcl-2一抗、Bax一抗购于Santa Cruz公司。MTT细胞增殖检测试剂盒,ECL化学发光试剂盒,蛋白提取试剂盒购自凯基。SDS-PAGE配胶试剂盒购自碧云天。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人舌鳞癌细胞系TCA8113培养于含有10%胎牛血清的RPMI1640完全培养基内,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空气饱和湿度的恒温孵箱中。

1.2.2 病毒转染 将对数期的TCA8113细胞胰酶消化后重悬,以 $5 \times 10^4$ /孔种于6孔板中过夜培养,待细胞贴壁融合度达到30%~50%时转染病毒。按1 mL体系和感染复数(MOI)值为100计算分别加入阳性病毒和空病毒、polybrene、Enhanced infection Solution混匀后放入恒温孵箱中培养,6~8 h后更换为2 mL 10%血清完全培养基继续培养96 h后观察荧光。更换为含有2.5 μg/mL嘌呤霉素培养基筛选稳定转染的细胞株,每2天更换1次培养基,14 d左右可见单细胞克隆群形成,挑取克隆球进行扩增培养。

1.2.3 Real-time PCR 约 $5 \times 10^6$ 对数生长期细胞加入1 mL Trizol充分裂解15 min,余步骤按TaKaRa提取RNA说明书进行。所得RNA溶液,采用TaKaRa逆转录试剂盒,用25 μL体系每1 μg RNA各逆转录为cDNA备用。实时荧光定量时采用TaKaRa SYBR green一步法,95℃预温5 min,95℃ 5 s和52℃ 30 s共39个循环,延伸65℃ 5 s。上下游引物序列:PTP4A1上游引物5'-GGGTGCCTAATGCTACTG-3',PTP4A1下游引物5'-GAGGTTGCCAAATCTGTG-3'; GAPDH上游引物5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',GAPDH下游引物5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。结果以Ct值形式表示,以GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot 对数生长期约 $5 \times 10^6$ 细胞加入1 000 μL蛋白裂解液、10 μL蛋白酶抑制剂、5 μL PMSF,吹打均匀,超声破碎40 W,超4 s,停3 s,共反复5次。室温静置30 min。4℃ 14 000 r/min,30 min,取上清,变性,定量。即得蛋白放在-20℃保存备用。根据蛋白相对分子质量来配制12%的SDS-PAGE分离胶和5%的浓缩胶,电泳分离。每孔加样量为50 μg。电泳60 U 60 min,90 U 100 min,250 mA湿转120 min到0.22 μm的PVDF膜上,封闭60 min,一抗4℃孵育过夜,洗膜,二抗孵育60 min,洗膜,ECL发光显影。以β-actin作为内参。

**1.2.5 细胞增殖 MTT 实验** 胰酶消化,重悬细胞。以  $3 \times 10^3$  细胞每孔接种到 96 孔板内,每孔加完全培养基 200  $\mu\text{L}$ ,同时设立只加培养基的空白调零孔,37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养。检测 1、2、3、4、5 d 细胞的增殖能力。按说明书操作,在 24 h 时,将  $5 \times \text{MTT}$  用 Dilution buffer 稀释成  $1 \times \text{MTT}$ ,每孔加 50  $\mu\text{L}$   $1 \times \text{MTT}$ ,在 37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵育 4 h,使 MTT 还原为甲瓚,吸尽上清液,每孔加 150  $\mu\text{L}$  DMSO 室温在摇床上摇 10 min 使甲瓚完全溶解,酶标仪在 490 nm 波长处检测每孔的光密度值。在 2、3、4、5 d 重复操作同 24 h。记录结果绘制细胞生长曲线。每检测孔设置 7 个副孔。

**1.2.6 流式细胞仪技术** 取对数成长期的细胞,胰酶消化,重悬,加 70% 酒精 4  $^\circ\text{C}$  过夜固定。流式细胞仪检测细胞周期。具体操作按流式细胞周期分析试剂盒说明书进行。流式细胞仪测细胞凋亡时,收集对数生长期的细胞,重悬于 Binding Buffer 中,加荧光标记的 Annexin V 和 PI,室温避光孵育 5 min,流式细胞仪检测结果。

**1.2.7 平板克隆形成实验** 将对数生长期的细胞胰酶消化后重悬,调整细胞密度,以 500 细胞每孔接种于 6 孔板中,加 2 mL 培养基吹匀,置于细胞培养箱内培养,每 3 天换 1 次培养基。当单个细胞克隆数达到 50 细胞后中止培养。拿出 6 孔板后,吸净孔板内培养基,每孔加 1 mL 多聚甲醛室温固定 20 min,快速吉姆萨染色,晾干照相采图。

**1.2.8 裸鼠成瘤实验** 取对数生长期的 3 组细胞,胰酶消化,PBS 重悬。每只裸鼠以  $1 \times 10^7$  细胞/100  $\mu\text{L}$  成瘤。共 9 只裸鼠,每组分别 3 只。观察记录裸鼠的成瘤情况。待 5 周后处死裸鼠,称量和测量裸鼠移植瘤的质量和体积。其中体积  $(V) = ab^2/2$ , a 为最短径, b 为最长径。

### 1.3 数据分析

所有数据用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和两因素重复测量资料方差分析。

## 2 结果

### 2.1 siRNA-PTP4A1 慢病毒载体转染 TCA8113 细胞

在慢病毒载体上携带上绿色的荧光蛋白 GFP 及嘌呤霉素。转染 72 h 后,在荧光显微镜下根据细胞的荧光蛋白 GFP 的表达强弱来初步判断转染效率。如图 1 所示,几乎 90% 以上的细胞均转染进慢病毒载体,在荧光显微镜下显示绿色的荧光。继续培养至 96 h 后更换培养基为含有 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的完全培

养基,未成功转染慢病毒的细胞因为不含有抗嘌呤霉素基因而被杀死掉,保证存活下来的细胞完全为转染成功的细胞。培养 2 周后,更换为含有 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的完全培养基继续培养,6 孔板内形成单细胞克隆群(图 1),挑取单细胞克隆群扩大培养。

### 2.2 抑制人舌鳞癌细胞 TCA8113 中 PTP4A1 基因的表达

病毒转染 5 d 后,收集细胞提 RNA 和蛋白质。实时荧光定量 PCR 技术检测基因 PTP4A1 在 mRNA 的表达情况。在 TCA8113 细胞中,siRNA-PTP4A1 对基因 PTP4A1 mRNA 有显著的敲减效果,siRNA-PTP4A1 慢病毒组 PTP4A1 mRNA 为  $(0.35 \pm 0.00)$ ,空病毒组 PTP4A1 mRNA 为  $(0.90 \pm 0.01)$ ,与空病毒干扰组 PTP4A1 基因在 mRNA 水平的抑制作用达到 55%,差异有统计学意义  $(P < 0.05)$ 。Western blot 检测基因 PTP4A1 在蛋白质水平的表达情况,结果如图 2 所示:siRNA-PTP4A1 对基因 PTP4A1 蛋白质的表达有显著的敲减作用,siRNA-PTP4A1 干扰组 PTP4A1 蛋白的表达为  $(0.32 \pm 0.01)$ ,空病毒组 PTP4A1 蛋白的表达为  $(0.92 \pm 0.20)$ ,与空病毒干扰组比表达降低约 60%,差异有统计学意义  $(P < 0.05)$ 。

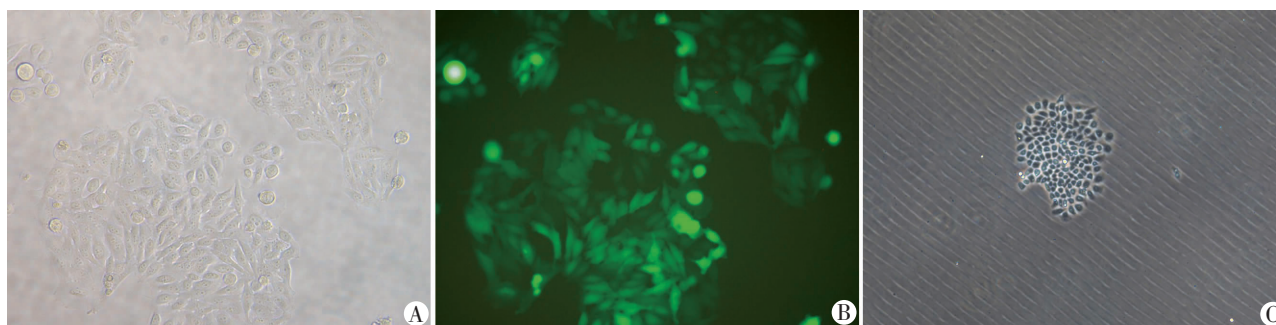
### 2.3 抑制 PTP4A1 基因的表达增加了 TCA8113 细胞的早期凋亡

采用流式细胞仪技术检测 TCA8113 细胞的早期凋亡率,结果发现 KD 组细胞早期凋亡  $(17.48 \pm 0.70)\%$ ,NC 组和 CON 组细胞早期凋亡率为  $(7.34 \pm 0.70)\%$  和  $(4.86 \pm 0.25)\%$   $(P < 0.01)$ ,沉默 PTP4A1 基因,有效的增加了 TCA8113 细胞的早期凋亡率。流式细胞仪分析 TCA8113 细胞周期结果,发现 KD 组细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  和 S 期  $(P < 0.05)$ ,结果见表 1。进一步收集对数期生长的细胞提取蛋白,检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的表达情况。结果如图 2 所示:KD 组细胞 Bcl-2 蛋白的表达  $(0.66 \pm 0.02)$  较 NC 组的表达  $(1.00 \pm 0.02)$  降低约 34%,差异有统计学意义  $(P < 0.01)$ 。而促凋亡蛋白 Bax 在 KD 组表达  $(2.63 \pm 0.05)$  高于 NC 组  $(1.00 \pm 0.05)$  表达 163%,差异有统计学意义  $(P < 0.01)$ 。

表 1 流式细胞仪检测各组细胞周期分布  $(\%, \bar{x} \pm s)$

组别	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
KD 组	$67.93 \pm 0.34^a$	$27.8 \pm 0.60^a$	$4.27 \pm 0.31$
NC 组	$65.97 \pm 0.40^a$	$20.03 \pm 0.13^a$	$13.99 \pm 0.53$
CON 组	$63.95 \pm 0.11$	$20.17 \pm 0.28$	$15.88 \pm 0.39$

a:  $P < 0.05$ , 与 CON 组比较



A:慢病毒载体转染 TCA8113 细胞 72h 后白光观察;B:慢病毒载体转染 TCA8113 细胞 72h 后荧光观察;C:慢病毒转染后添加嘌呤霉素筛选后继续培养 14d 后形成的单细胞克隆群

图 1 荧光显微镜观察 siRNA-PTP4A1 慢病毒载体转染 TCA8113 细胞变化 ( $\times 200$ )

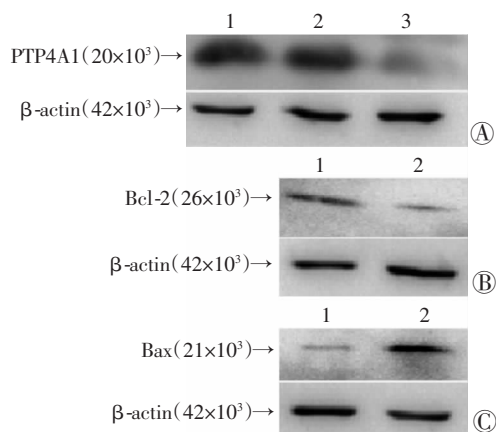


图2 Western blot 检测各组 PTP4A1、Bcl-2、Bax 蛋白的表达  
A: siRNA-PTP4A1 慢病毒在蛋白水平上抑制 TCA8113 细胞中 PTP4A1 基因的表达 1: CON 组; 2: NC 组; 3: KD 组; B: TCA8113 细胞中抑制 PTP4A1 表达后抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低 1: NC 组; 2: KD 组; C: TCA8113 细胞中抑制 PTP4A1 表达后促凋亡蛋白 Bax 表达增高 1: NC 组; 2: KD 组

图2 Western blot 检测各组 PTP4A1、Bcl-2、Bax 蛋白的表达

## 2.4 抑制 PTP4A1 基因的表达降低 TCA8113 细胞的增殖能力

MTT 结果显示, KD 组与 CON 组及 NC 组相比, 反映细胞增殖的  $D(490)$  值明显降低。不同处理方式, 细胞的增殖能力不同,  $D(490)$  光密度值存在显著差异 ( $P < 0.01$ )。同组内随着作用时间的增加, 细胞增殖能力增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。各组随着作用时间的增加, 细胞的增殖能力增加, 但 KD 组细胞增殖能力较 CON 组和 NC 组低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表2 MTT 检测各组不同处理时间的 TCA8113 体外增殖能力  
[ $D(490)$ ,  $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ ]

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
CON 组	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.67 ± 0.03
NC 组	0.24 ± 0.02	0.33 ± 0.01 <sup>ac</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>ad</sup>	0.50 ± 0.03 <sup>ac</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>af</sup>
KD 组	0.23 ± 0.01	0.32 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>bd</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>bf</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与 CON 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 1 d 比较; d:  $P < 0.01$ , 与 2 d 比较; e:  $P < 0.01$ , 与 3 d 比较; f:  $P < 0.01$ , 与 4 d 比较

## 2.5 抑制舌鳞癌 TCA8113 细胞 PTP4A1 基因的表达降低了 TCA8113 细胞的体外克隆形成能力

KD 组细胞形成的克隆数 ( $60.00 \pm 10.41$ ) 小于 CON 组 ( $396.00 \pm 10.69$ ) 和 NC 组 ( $380.00 \pm 13.05$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。抑制舌鳞癌 TCA8113 细胞中 PTP4A1 基因的表达后, TCA8113 细胞的体外克隆形成能力降低。

## 2.6 抑制舌鳞癌 TCA8113 细胞 PTP4A1 基因的表达降低了 TCA8113 细胞裸鼠体内的成瘤能力

接种细胞 14 d 后, CON 和 NC 组肉眼可见肿瘤小结节形成。KD 组在 20 d 可见肿瘤结节形成。当肿瘤长到 0.5 cm 时开始测量移植瘤的生长速度。KD 组肿瘤生长较 NC、CON 组缓慢。接种 5 周后处死小鼠, 测量肿瘤体积和质量。KD 组体积 ( $0.45 \pm 0.07$ )  $\text{cm}^3$ 、质量 ( $0.67 \pm 0.06$ ) g 均小于 CON 组体积 ( $2.82 \pm 0.40$ )  $\text{cm}^3$ 、质量 ( $4.50 \pm 0.20$ ) g 和 NC 组体积 ( $2.09 \pm$

$0.36$ )  $\text{cm}^3$ 、质量 ( $3.30 \pm 0.44$ ) g, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

促肝细胞再生因子家族蛋白, 是一类相对分子质量为  $20 \times 10^3$  左右的小分子蛋白, 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族的一亚类<sup>[6]</sup>。蛋白酪氨酸磷酸酶在许多生理和病理过程起着重要的作用。它控制着磷酸化和去磷酸化的平衡, 这一平衡维持着机体的正常生理行为。当这一平衡被打破时, 会导致一些炎症性疾病或者肿瘤疾病的发生<sup>[7]</sup>。

近年来, 促肝细胞再生因子磷酸酶蛋白家族因它的致癌性而受到广泛的关注。已经发现 PRLs 通过促进细胞增殖、移行、侵袭和转移等来促进肿瘤的发生、发展<sup>[8]</sup>。PTP4A1 是最先发现的 PRLs 家族成员, 最先作为小鼠肝脏再生生长的早期刺激应答因子而发现<sup>[9]</sup>。随后发现了 PTP4A2、PTP4A3。尽管三者之间的同源性在 75% ~ 85%, 但是三者在不同肿瘤中的表达意义却不同。PTP4A3 最先报道在结肠癌的转移淋巴结比临近的结肠癌组织和正常的结肠黏膜高表达<sup>[10]</sup>, 之后也在肝癌和卵巢癌中相继报道<sup>[11]</sup>。在食管鳞癌和乳腺癌中, PTP4A1 和 PTP4A2 的表达情况与癌症的分期分级相关性高于 PTP4A3<sup>[5]</sup>。而 PTP4A1 基因在舌鳞癌的发生、发展的影响尚不明确。本实验采用慢病毒载体干扰 TCA8113 细胞中 PTP4A1 基因的表达, 观察 PTP4A1 基因对舌鳞癌细胞 TCA8113 的生物学行为的影响。

我们的实验结果发现下调 PTP4A1 基因的表达, 会降低 TCA8113 细胞的体外增殖能力, 同文献[12-13]报道一致。采用流式细胞仪技术检测细胞的凋亡, 发现沉默 PTP4A1 基因后, 细胞的早期凋亡比例增加。

为了明确 PTP4A1 基因降低会抑制舌鳞癌细胞 TCA8113 的增殖能力及诱导凋亡, 我们采用 Western blot 检测了 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。我们发现沉默 PTP4A1 基因后, Bcl-2 蛋白表达下降, 而 Bax 蛋白表达升高。Bcl-2 家族是在细胞凋亡中起着重要作用的一类蛋白质, Bcl-2 和 Bax 蛋白分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促凋亡基因<sup>[14]</sup>。p53 是一种抑癌基因, 参与细胞的凋亡、周期调控等多种过程<sup>[15]</sup>。研究发现 PTP4A1 受 p53 的调控, 当 PTP4A1 过表达时, 会通过 p53 泛素化和降解来降低体内 p53 的蛋白水平, 由此来抑制 p53 导致的细胞凋亡<sup>[16]</sup>。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白受 P53 的负性调控<sup>[17]</sup>。推测有可能, 沉默 PTP4A1 基因后, p53 表达增加, 负反馈调节 Bcl-2 的降低, Bax 的表达增加因而促进细胞的早期

凋亡,尚待进一步的证实。

PTP4A1 基因最早是作为一种早期刺激应答因子而发现的<sup>[9]</sup>,它参与调控细胞周期蛋白的磷酸化,在细胞生长过程中起着重要作用。研究发现早期刺激应答基因的 mRNA 和蛋白水平在细胞生长的整个周期中都处于高表达状态,并且会一直持续到 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期以后<sup>[18-19]</sup>。在细胞水平上,早期应答因子编码的蛋白调控整个 G<sub>1</sub> 期以及随后的细胞周期。有研究表明 PTP4A1 基因的过表达会促进细胞进入 S 期,促进细胞的有丝分裂<sup>[7]</sup>。当细胞过表达 PTP4A1 时,会增加 3.3 倍 DNA 的合成和 S 期细胞的比例;PTP4A1 抑制周期依赖蛋白 P21Cip1/Waf1,延迟 G<sub>1</sub> 期,增加 CDK2 的活性,使细胞直接跨入 S 期<sup>[20]</sup>。我们的研究也发现,在舌鳞癌细胞 TCA8113 中降低 PTP4A1 的表达会阻滞细胞周期处于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期和 S 期,但具体机制有待进一步研究。

Guo 等<sup>[21]</sup> 的研究报道抗-PTP4A1 单克隆抗体有效的抑制表达 PTP4A1 基因的肿瘤细胞在裸鼠的肿瘤形成能力。也有研究报道称在上皮细胞中过表达 PTP4A1 会诱导其在裸鼠体内形成肿瘤<sup>[22]</sup>。我们的实验研究也发现,降低舌鳞癌细胞 TCA8113 中 PTP4A1 基因的表达后,会降低细胞的克隆形成能力和裸鼠体内成瘤能力。

综上所述,我们探讨了 PTP4A1 基因在舌鳞癌中表达情况及可能的机制。沉默 PTP4A1 基因的表达会影响 TCA8113 细胞的增殖能力、凋亡能力、克隆形成能力、裸鼠成瘤能力以及细胞周期的分布。表明 PTP4A1 基因,有可能作为一种新的舌鳞癌生物学标志,有待进一步的研究它在舌鳞癌的诊断或者靶向治疗中意义。

#### 参考文献:

[1] Kamangar F, Dores G M, Anderson W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents; defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14): 2137-2150.  
[2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global Cancer Statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.  
[3] Bardelli A, Saha S, Sager J A, et al. PRL-3 expression in metastatic cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(15): 5607-5615.  
[4] Wang J, Kirby C E, Herbst R. The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 46659-46668.  
[5] Liu Y Q, Li H X, Lou X, et al. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(8): 1307-1312.

[6] Reid T S, Terry K L, Casey P J, et al. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity[J]. *J Mol Biol*, 2004, 343(2): 417-433.  
[7] Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome[J]. *Cell*, 2004, 117(6): 699-711.  
[8] Zeng Q, Dong J M, Guo K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2716-2722.  
[9] Mohn K L, Laz T M, Hsu J C, et al. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells; comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(1): 381-390.  
[10] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer[J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1343-1346.  
[11] Polato F, Codegani A, Fruscio R, et al. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1): 6835-6839.  
[12] Achiwa H, Lazo J S. PRL-1 tyrosine phosphatase regulates c-Src levels, adherence, and invasion in human lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 643-650.  
[13] Lu J W, Chang J G, Yeh K T, et al. Increased expression of PRL-1 protein correlates with shortened patient survival in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14(4): 287-293.  
[14] Dirsch V M, Stuppner H, Vollmar A M. Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-x(L) or Bcl-2[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5817-5823.  
[15] Sanding B V, Brand K, Herwig S, et al. p16 and p53 genes transferred with the help of adenovirus to induce apoptotic tumor cell death[J]. *Ugeskr Laeger*, 1997, 159(46): 6825-6830.  
[16] Min S H, Kim D M, Heo Y S, et al. New p53 target, phosphatase of regenerating liver 1 (PRL-1) downregulates p53[J]. *Oncogene*, 2009, 28(4): 545-554.  
[17] Ravi D, Ramadas K, Mathew B S, et al. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation[J]. *Oral Oncol*, 1998, 34(6): 543-548.  
[18] Herschman H R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters[J]. *Annu Rev Biochem*, 1991, 60: 281-319.  
[19] Lau L F, Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition of cultured mouse cells[J]. *EMBO J*, 1985, 4(12): 3145-3151.  
[20] Werner S R, Lee P A, DeCamp M W, et al. Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21 (Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases[J]. *Cancer Lett*, 2003, 202(2): 201-211.  
[21] Guo K, Tang J P, Tan C P. Monoclonal antibodies target intracellular PRL phosphatases to inhibit cancer metastases in mice[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(5): 750-757.  
[22] Cates C A, Michael R L, Staybrook K R, et al. Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases[J]. *Cancer Lett*, 1996, 110(1/2): 49-55.

(收稿:2012-12-19;修回:2013-01-20)

(编辑 张 维)