

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.005

文章编号: 1005-8982(2017)17-0025-04

PTPN14 对食管癌的抑制作用及其机制研究*

刘华松¹, 徐兰兰², 张军¹, 郭家龙¹, 林称意¹, 原野¹, 曾敏¹, 程栋梁¹

[1.湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)胸心大血管外科,湖北 十堰 442099;
2.湖北医药学院 护理学院,湖北 十堰 442000]

摘要:目的 探讨蛋白酪氨酸磷酸酶 14(PTPN14)对食管癌的抑癌作用及其机制。**方法** 通过转染 PTPN14 质粒过表达食管癌细胞 EC9706 中 PTPN14 的表达,实时荧光定量聚合酶链反应及 Western blot 检测其过表达效果;四甲基偶氮唑盐比色法检测过表达 PTPN14 对 EC9706 细胞增殖的影响;流式细胞术检测过表达 PTPN14 对 EC9706 细胞周期的影响;Western blot 检测过表达 PTPN14 对 YAP 蛋白表达的影响。**结果** 转染 PTPN14 质粒可上调食管癌细胞系 EC9706 中 PTPN14 的表达;过表达 EC9706 细胞中 PTPN14 可以抑制食管癌细胞的增殖,使细胞周期阻滞在 G₁ 期;过表达 EC9706 中 PTPN14 可下调细胞中 YAP 的表达水平。**结论** PTPN14 可通过下调 YAP,阻滞食管癌细胞周期,抑制细胞增殖。

关键词: 蛋白酪氨酸磷酸酶 14;YAP;增殖;食管癌

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

PTPN14 inhibits proliferative ability of esophageal cancer cells via hippo/YAP pathway*

Hua-song Liu¹, Lan-lan Xu², Jun Zhang¹, Jia-long Guo¹, Chen-yi Lin¹,
Ye Yuan¹, Min Zeng¹, Dong-liang Cheng¹

(1. Department of Thoraco-cardio-macrovascular Surgery, the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442099, China; 2. School of Nursing, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the tumor-suppressing role of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14 (PTPN14) in esophageal carcinoma and the mechanism. **Methods** EC9706 cells were transfected with PTPN14 over-expression vector, and then PTPN14 expression in the EC9706 cells was detected by qRT-QPCR and Western blot. The proliferation of the EC9706 cells was analyzed by MTT. The cell cycle of the EC9706 cells was analyzed by flow cytometry. The expression of YAP was detected by Western blot. **Results** The expression level of PTPN14 was significantly upregulated in the EC9706 cells transfected with PTPN14 over-expression vector. After transfection, the proliferation of EC9706 cells was inhibited, the cell cycle was blocked at G₁, and YAP expression was decreased. **Conclusions** PTPN14 may block cell cycle and inhibit proliferation of esophageal cancer cells by down-regulation of YAP.

Keywords: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14; YAP; proliferation; esophageal cancer

食管癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,是我国主要的恶性肿瘤之一,在肿瘤死因中食管癌的死亡率占 11.19%,位居第 4 位,严重影响患者的健康和生命^[1]。

随着医学及生物科学的逐步发展,食管癌的研究逐渐深入。食管癌发生、发展的致病基因不断被发现,其发病机制的研究已成为目前医学研究领域的热点。

收稿日期:2016-04-06

* 基金项目:湖北省教育厅项目(No: B2016497)

[通信作者] 张军, E-mail: zhjun159@sina.com; Tel: 13508684276

蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 14 (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14, PTPN14) 是由 PTPN14 基因编码的酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTPs) 家族的成员之一。PTPs 可参与调控多种细胞过程, 包括细胞增殖、分化及有丝分裂, 甚至恶性转变^[2]。然而 PTPN14 在食管癌细胞中的作用及机制, 目前尚未有研究报道。本研究阐明过表达食管癌细胞系 EC9706 中 PTPN14 的表达, 发现 PTPN14 可抑制食管癌细胞的增殖, 阻滞食管癌细胞的周期, 下调细胞中 YAP 的表达, 为寻找食管癌的致病分子及进一步阐明食管癌的发病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RNA 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Trizol 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, PTPN14 质粒及对照载体购自北京普如汀生物技术有限公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购于美国 Invitrogen 公司, 小鼠抗人单克隆 PTPN14、YAP、 β -actin 的一抗购自英国 Abcam 公司, 羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥科技有限公司, 四甲基偶氮唑盐比色法 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 试剂盒购自美国 Promega 公司, 食管癌细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 食管癌细胞系 EC9706 用含 100 ml/L 胎牛血清的改良伊格尔培养基培养, 37℃、50 ml/L 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱中培养。当细胞达 70%~80% 融合度后, 将 PTPN14 质粒及对照载体经 Lipofectamine™ 2000 转入 EC9706 细胞中, 具体操作步骤参见脂质体试剂说明书。将转染后食管癌细胞分别为 PTPN14-vector 组和 PTPN14-NC 组。

1.2.2 PTPN14 基因表达水平检测 待食管癌细胞转染 48 h 后, 收集细胞, 用 Trizol 裂解细胞, 分别提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA 作为模板。根据 PTPN14 (NM_005401) 序列设计引物, 正向引物: 5'-TCTAGGATGTGTGCCAGGGA-3'; 反向引物: 5'-TGTGGTCTCCGAAATGTRT-3'。产物长度为 123 bp, 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 的反应条件为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 15 s, 59℃ 退火 35 s, 共 39 个循环, 实验重复 3 次。

1.2.3 PTPN14 和 YAP 蛋白表达水平检测 收集转染后 48 h 细胞, 胰酶消化后, 离心, 弃上清液, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 45 min, 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 取部分上清行蛋白质定量, 其余加入上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min 变性, 取上述变性蛋白 30 μ g, 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 半干转方式将蛋白质电转移至硝酸纤维素 (nitrocellulose filter membrane, NC) 膜上。室温封闭 2 h。分别加入 PTPN14、YAP、 β -actin 的一抗, 4℃ 过夜, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 6 min/次, 加入二抗, 室温孵育 1.5 h, PBS 洗涤 3 次, 6 min/次; 加入显色剂显色、成像。

1.2.4 MTT 法检测细胞的增殖 细胞转染 48 h 后, 取对数生长期的细胞, 制备单细胞悬液, 以 4.0×10^3 个/孔细胞密度接种于 96 孔板, 每组 7 个复孔, 分别培养 1~5 d, 每 24 h 取出 96 孔板, 向每孔中加入浓度为 1.5 g/L MTT 20 μ l, 培养 4 h 后, 再向每孔加入二甲基亚砷 150 μ l, 读值并绘制生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 取转染 48 h 后的 PTPN14-vector 组和 PTPN14-NC 组细胞, 制备细胞悬液, 用 5 ml PBS, 1 000 r/min 离心 5 min, 反复洗涤 3 次后, 弃上清液; 加入 1 ml 70% 预冷乙醇中, 吹打均匀, 4℃ 固定 12 h, PBS 洗涤, 去乙醇, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗 3 遍。PBS 重悬细胞, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 和核糖核酸酶 A 至终浓度 50 μ g/ml, 37℃ 温浴 30 min。利用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 PTPN14 质粒上调 EC9706 细胞中 PTPN14 基因表达水平

转染空载体及 PTPN14 质粒于食管癌 EC9706 细胞 48 h, 分别提取各组细胞总 RNA, 各自逆转录为 cDNA, qRT-PCR 检测各组 PTPN14 的表达, PTPN14-vector 组与 PTPN14-NC 组的 PTPN14 表达水平比较, 经两独立样本 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=13.714, P=0.007$), PTPN14-vector 组高于 PTPN14-NC 组。见图 1。

2.2 转染 PTPN14 质粒增强 EC9706 细胞中 PTPN14 蛋白表达水平

转染空载体及 PTPN14 质粒于食管癌 EC9706 细胞 48h, 分别提取各组细胞总蛋白,Western blot 检测各组 PTPN14 的表达,发现 PTPN14-vector 组的 PTPN14 表达较 PTPN14-NC 组上升。见图 2。

2.3 转染 PTPN14 质粒抑制 EC9706 细胞的增殖

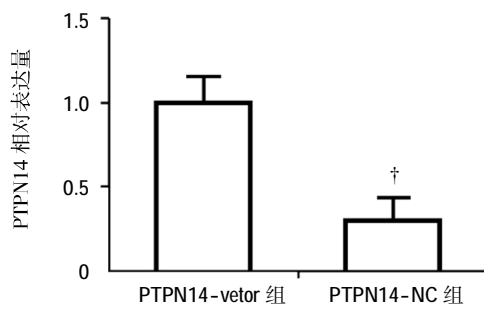
MTT 检测转染空载体与 PTPN14 质粒的 EC9706 细胞增殖情况。结果显示,从检测后第 3 天开始,PTPN14-vector 组的细胞增殖与 PTPN14-NC 组比较,经两独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义($t=8.265, P=0.014$)。见图 3。

2.4 转染 PTPN14 质粒阻滞 EC9706 细胞周期

流式细胞术检测转染空载体与 PTPN14 质粒的 EC9706 细胞周期情况。结果显示,PTPN14-NC 组 G_1 期比例为(48.45 ± 7.24),PTPN14-vector 组 G_1 期比例为(62.79 ± 5.87),经两独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义($t=10.586, P=0.011$),转染 PTPN14-vector 组的 EC9706 细胞周期被阻滞在 G_1 期。见图 4。

2.5 转染 PTPN14 质粒下调 EC9706 细胞中 YAP 的表达

Western blot 检测转染空载体与 PTPN14 质粒的 EC9706 细胞中 YAP 的表达。结果显示,与 PTPN14-NC 组比较,转染 PTPN14-vector 组 EC9706 细胞中 YAP 的表达降低。见图 5。



† 与 PTPN14-vector 组比较, $P < 0.05$

图 1 转染 PTPN14 质粒上调 EC9706 细胞中的 PTPN14 基因的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

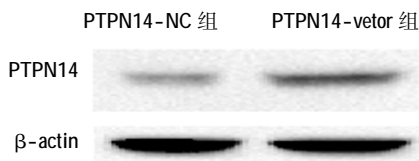
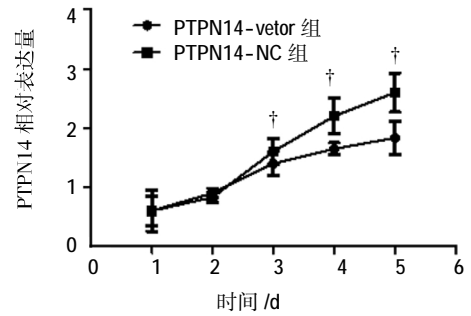
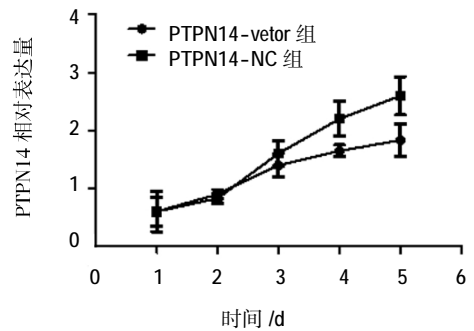


图 2 转染 PTPN14 质粒增强 EC9706 细胞中 PTPN14 的蛋白表达水平

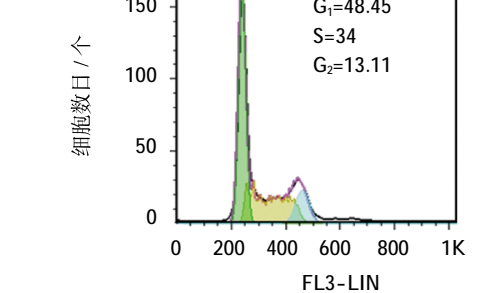


† 与 PTPN14-vector 组比较, $P < 0.05$

图 3 转染 PTPN14 质粒与空载体的 EC9706 细胞增殖情况



† 与 PTPN14-vector 组比较, $P < 0.05$



† 与 PTPN14-vector 组比较, $P < 0.05$

图 4 转染 PTPN14 质粒与 PTPN14 空载体的 EC9706 细胞周期

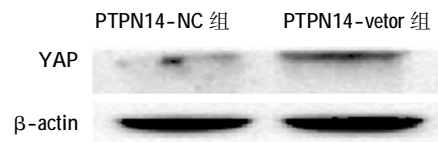


图 5 转染 PTPN14 质粒与空载体的 EC9706 细胞中 YAP 的表达

3 讨论

1995年,科学家在寻找正常乳腺组织中表达的酪氨酸磷酸酶时,PTPN14 首次被克隆发现^[3]。其是非受体酪氨酸磷酸酶家族的蛋白成员之一。研究显示,PTPN14 在乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤中存在突变^[4-6]。在小鼠胰腺肿瘤的基因分析研究中发现,PTPN14 表达明显下调($P < 10 \sim 10.8$)^[7]。浸润性乳腺癌组织中

PTPN14 表达明显降低,敲低 PTPN14 可以促进乳腺癌细胞发生侵袭、转移^[9]。此外,PTPN14 一直被认为参与细胞的增殖调控。有研究显示,PTPN14 为 micro RNA-21(miR-21)的直接靶基因,在肝内胆管癌中 miR-21 过表达,并靶向作用于 PTPN14 使其下调,从而促进肝内胆管癌细胞的增殖,抑制细胞的凋亡^[9]。本研究探索 PTPN14 对食管癌细胞增殖的影响,发现过表达食管癌细胞中 PTPN14 可以明显阻滞细胞周期,抑制细胞增殖,证实在食管癌中 PTPN14 对细胞增殖有重要调控作用。

Hippo 信号通路是目前研究热点之一,在进化过程中高度保守。在哺乳动物中,Hippo 信号通路上游的膜蛋白受体感受到细胞外的生长抑制信号后,经过一系列激酶的磷酸化反应,最终作用于下游效应分子 YAP/TAZ 使其滞留于胞质内,不能入核行使功能。然而,未被抑制的 YAP/TAZ 将会进入细胞核,作为共激活因子或转录因子调节下游基因的表达,调控细胞的生长、增殖及凋亡^[10]。YAP/TAZ 作为 Hippo 信号通路的主要效应分子,是一种致癌蛋白,在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,可作为肿瘤诊断及预后判断的独立标志物^[11]。有研究显示,PTPN14 可以通过 Hippo 信号通路参与癌症的形成和发展。WILSON 等^[12]研究显示,PTPN14 可以通过 PPXY 结构域与 Kibra 蛋白质的 WW 结构域相互作用,PTPN14 与 Kibra 结合可以诱导 LATS1 的激活;此外,PTPN14 还可以增加 LAST1 蛋白质的稳定性,而 LATS1 的激活可以抑制 YAP 的致癌功能。有研究发现,在乳腺上皮细胞中 PTPN14 通过与 YAP 结合从而负调控 YAP,下调 PTPN14,可以导致 YAP 的异常表达,从而引起细胞发生恶变^[13];PTPN14 也可以通过 PPXY 结构域与 YAP 蛋白质的 WW 结构域相互作用形成复合物,并抑制 YAP 介导的转录功能^[14]。本研究探索食管癌中 PTPN14 对 YAP 的影响,发现过表达 PTPN14 可以明显抑制 YAP 的表达,提示在食管癌中 PTPN14 很可能通过抑制 YAP 参与调控细胞的增殖。

综上所述,本研究通过转染 PTPN14 质粒过表达食管癌细胞中 PTPN14 的表达,检测 PTPN14 对食管癌细胞系增殖周期的作用,以及对 YAP 表达的影响。研究发现,过表达 PTPN14 可以抑制食管癌细胞增殖,阻滞食管癌细胞周期,抑制 YAP 的表达。研究结果表明,PTPN14 在食管癌增殖周期中发挥重要作用。本实验结果为进一步研究 PTPN14 在食管癌发生、

发展中的作用提供理论基础,为食管癌的治疗提供新的分子靶标。

参 考 文 献:

- [1] MEVES V, BEHRENS A, POHL J. Diagnostics and early diagnosis of esophageal cancer[J]. *Viszeralmedizin*, 2015, 31(5): 315-318.
- [2] KIM S Y, OH M, LEE K S, et al. Profiling analysis of protein tyrosine phosphatases during neuronal differentiation[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 612: 219-224.
- [3] SMITH A L, MITCHELL P J, SHIPLEY J, et al. Pez: a novel human cDNA encoding protein tyrosine phosphatase and ezrin-like domains[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209(3): 959-965.
- [4] SJOBLUM T, JONES S, WOOD L D, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers[J]. *Science*, 2006, 314(5797): 268-274.
- [5] WANG Z, SHEN D, PARSONS D W, et al. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers[J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1164-1166.
- [6] LACZMANSKA I, SASIADEK M M. Tyrosine phosphatases as a superfamily of tumor suppressors in colorectal cancer [J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(4): 467-470.
- [7] NIEDERGETHMANN M, ALVES F, NEFF J K, et al. Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(10): 1432-1440.
- [8] BELLE L, ALI N, LONIC A, et al. The tyrosine phosphatase PTPN14 (Pez) inhibits metastasis by altering protein trafficking[J]. *Sci Signal*, 2015, 8(364), DOI: 10.1126/scisignal.2005547.
- [9] WANG L J, HE C C, SUI X, et al. MiR-21 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma proliferation and growth in vitro and in vivo by targeting PTPN14 and PTEN[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5932-5946.
- [10] MENG Z, MOROISHI T, GUAN K L. Mechanisms of Hippo pathway regulation[J]. *Genes Dev*, 2016, 30 (1): 1-17.
- [11] XU M Z, YAO T J, LEE N P, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2009, 115(19): 4576-4585.
- [12] WILSON K E, LI Y W, YANG N, et al. PTPN14 forms a complex with Kibra and LATS1 proteins and negatively regulates the YAP oncogenic function[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (34): 23693-23700.
- [13] MICHALOGLU C, LEHMANN W, MARTIN T, et al. The tyrosine phosphatase PTPN14 is a negative regulator of YAP activity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0061916.
- [14] HUANG J M, NAGATOMO I, SUZUKI E, et al. YAP modifies cancer cell sensitivity to EGFR and survivin inhibitors and is negatively regulated by the non-receptor type protein tyrosine phosphatase 14[J]. *Oncogene*, 2013, 32(17): 2220-2229.