

论著·基础研究

腺病毒介导的 siRNA 沉默 *PNUTS* 基因对喉癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭的影响

刘霞, 余维, 余丹, 陈娟, 骆小华, 李兵

重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉头颈外科, 重庆 400016

[摘要] **目的**·探讨腺病毒介导小 RNA 干扰 (small interfering RNA, siRNA) 下调蛋白磷酸酶 1 核目标亚基 (phosphatase nuclear targeting subunit, *PNUTS*) 的表达对喉癌细胞 Hep-2 增殖、侵袭、迁移和上皮细胞间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响及机制。**方法**·用携带表达 *PNUTS* siRNA 序列的重组腺病毒感染喉癌 Hep-2 细胞。实验分为空白对照 (PBS) 组、腺病毒空载 (Ad-GFP) 组和实验 (Ad-si*PNUTS*) 组。实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测细胞中 *PNUTS* 的表达。MTT 法检测细胞增殖情况。Transwell 法检测细胞侵袭、迁移能力。Western blotting 检测细胞中总 Rb、磷酸化 Rb (p-Rb)、PI3K、磷酸化 AKT (p-AKT)、E2F1、E-cadherin、N-cadherin 和 ZEB1 蛋白的表达。**结果**·与 Ad-GFP 组比较, Ad-si*PNUTS* 组 Hep-2 细胞中 *PNUTS* mRNA 和蛋白 (均 $P=0.000$) 表达水平降低; 细胞增殖在第 2 日 ($P=0.004$)、第 3 日 ($P=0.001$)、第 4 日 ($P=0.000$) 受到抑制; 细胞侵袭及迁移 (均 $P=0.000$) 能力降低; 总 Rb ($P=0.000$)、p-Rb ($P=0.000$)、PI3K ($P=0.023$)、p-AKT ($P=0.000$)、E2F1 ($P=0.000$)、N-cadherin ($P=0.005$)、ZEB1 ($P=0.000$) 蛋白表达水平降低, E-cadherin ($P=0.003$) 蛋白表达水平增加。**结论**·Ad-si*PNUTS* 抑制喉癌细胞 Hep-2 的增殖、侵袭及转移能力, 并逆转 EMT, 其可能与 PI3K/AKT 信号通路、Rb 信号通路有关。

[关键词] 喉癌; 磷酸酶 1 核目标亚基; 磷酸化 Rb; 侵袭; 上皮细胞间质化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.02.009 **[中图分类号]** R739.65 **[文献标志码]** A

Effects of adenoviral-mediated siRNA targeting *PNUTS* on proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinomas Hep-2 cells

LIU Xia, YU Wei, YU Dan, CHEN Juan, LUO Xiao-hua, LI Bing

Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective**·To explore the effects of adenovirus vector-mediated small interfering RNA (siRNA) targeting phosphatase nuclear targeting subunit (*PNUTS*) on proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of laryngeal squamous cell carcinomas Hep-2 cells and its mechanism. **Methods**·Recombinant adenovirus vector expressing *PNUTS* siRNA was infected into laryngeal squamous cell carcinomas Hep-2 cells and the experiment was designed into PBS group, Ad-GFP group and Ad-si*PNUTS* group. Levels of *PNUTS* mRNA and protein were detected by real-time PCR and Western blotting respectively. MTT assay was used to detect proliferation abilities of Hep-2 cells. Transwell assays were used to detect invasion and migration abilities of Hep-2 cells. The expression levels of total Rb, phosphorylated Rb (p-Rb), PI3K, phosphorylated AKT (p-AKT), E2F1, E-cadherin, N-cadherin and ZEB1 protein were detected by Western blotting. **Results**·Compared with Ad-GFP group, in Ad-si*PNUTS* group, the *PNUTS* mRNA and protein (both $P=0.000$) levels were dramatically decreased. The proliferation of Ad-si*PNUTS* infected Hep-2 cells were inhibited on the second day ($P=0.004$), the third day ($P=0.001$) and the fourth day ($P=0.000$). Meanwhile, the invasion and migration abilities of Ad-si*PNUTS* infected Hep-2 cells were decreased (both $P=0.000$). The expression levels of total Rb ($P=0.000$), p-Rb ($P=0.000$), PI3K ($P=0.023$), p-AKT ($P=0.000$), E2F1 ($P=0.000$), N-cadherin ($P=0.005$) and ZEB1 ($P=0.000$) were decreased while the E-cadherin ($P=0.003$) was increased. **Conclusion**·Ad-si*PNUTS* could inhibit the proliferation, invasion and migration abilities of Hep-2 cells and reverse the development of EMT, which may be related to PI3K/AKT signaling pathway and Rb signaling pathway.

[Key words] laryngeal squamous cell carcinomas; phosphatase nuclear targeting subunit; phosphorylated Rb; invasion; epithelial-mesenchymal transition

侵袭和转移是恶性肿瘤致死的主要原因, 而上皮细胞间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 被认为是肿瘤细胞侵袭、转移的触发机制^[1-2]。EMT 是上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程, 其典型

特征为上皮细胞的标志物 E-cadherin 表达降低, 间质细胞的标志物 N-cadherin 表达增加。发生 EMT 的上皮细胞失去了细胞极性, 在肿瘤细胞的侵袭和转移中起重要作用^[3-4]。因此, 对喉癌 EMT 发生机制的研究, 有助于揭示喉癌侵袭、

[基金项目] 重庆市自然科学基金 (cstc2013jcyj A10059) (Chongqing Natural Science Foundation, cstc2013jcyj A10059)。

[作者简介] 刘霞 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: 18161133423@163.com。

[通信作者] 李兵, 电子信箱: dclibing@sina.com。

转移的调控机制, 并为寻找喉癌治疗靶点提供理论基础。

磷酸酶 1 核目标亚基 (phosphatase nuclear targeting subunit, PNUTS) 是在细胞核内广泛表达的蛋白质。因其可以通过调节蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 的活性进而参与细胞基因表达、糖原分解等生理过程, 故有关 PNUTS 的研究已成为生命科学领域研究的热点。Kavela 等^[5]研究发现 PNUTS 可通过调控 PTEN/P13K/Akt 信号通路在肿瘤细胞增殖及凋亡中发挥重要作用。鉴于 PNUTS 基因可调控与肿瘤增殖、凋亡、侵袭及转移相关的 PTEN/P13K/Akt 通路^[6-7], 而目前关于 PNUTS 基因在肿瘤侵袭及转移中作用的研究较少, 故本实验初步探讨沉默 PNUTS 基因对喉癌 Hep-2 细胞侵袭、转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

人喉鳞状细胞癌细胞株 Hep-2 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、MTT 购自 Gibco 公司; Matrigel 购自 Solarbio 公司; Transwell 小室购自 BD 公司; 携带 PNUTS siRNA 的重组腺病毒 (Ad-siPNUTS) 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建; RNA 提取试剂盒, 各基因上、下游引物购自重庆盘点生物科技有限公司; SuperRT One Step 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自重庆葆光生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (ab150077, 1:5 000 稀释) 购自 Abcam 公司; 磷酸化 Rb (p-Rb) 抗体 (9301T, 1:800 稀释) 购自 Cell Signaling Technology 公司; PNUTS 抗体 (sc-271681, 1:100 稀释)、总 Rb 抗体 (sc-102, 1:100 稀释)、PI3K 抗体 (sc-1637, 1:100 稀释)、磷酸化 AKT (p-Akt) 抗体 (sc-5298, 1:80 稀释)、E-cadherin 抗体 (sc-8426, 1:100 稀释)、N-cadherin 抗体 (sc-8424, 1:100 稀释)、ZEB1 抗体 (sc-515797, 1:100 稀释)、E2F1 抗体 (sc-251, 1:100 稀释) 购自 Santa Cruze 公司; GAPDH 抗体 (60004-1-Ig, 1:5 000 稀释)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (10285-1-AP, 1:5 000 稀释) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

Hep-2 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养。待细胞融合至 80% 左右时, 弃培养基, PBS 洗 2 次, 胰酶消化细胞, 按 1:3 传代培养。

1.3 腺病毒的构建、感染及鉴定

1.3.1 构建腺病毒载体 设计靶向人 PNUTS mRNA 的特

异性 siRNA 序列 (5'-GCAGACCCGUUCACCAGAA-3'), 合成相应的双链 DNA, 构建于腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 然后与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组。酶切鉴定结果证实重组腺病毒 Ad-siPNUTS 构建成功, 并进一步在 293 细胞中包装、扩增。纯化重组腺病毒, 获得高滴度 (3×10^9 PFU/mL) 的重组腺病毒 Ad-siPNUTS。用同样方法构建阴性对照腺病毒 (Ad-GFP), 其中插入与任何编码序列无同源性的无关序列 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.3.2 重组腺病毒感染效率的检测 利用穿梭质粒中所携带的 GFP 报告基因, 进行腺病毒感染效率的检测。取生长状态良好的对数期 Hep-2 细胞, 按每孔 5 000 个细胞 (100 μL) 接种于 96 孔板中, 共 3 个复孔, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后根据预实验结果, 用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100 的腺病毒感染 Hep-2 细胞, 12 h 后观察细胞形态无明显改变, 未予换液。24 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞数, 计算感染效率。

1.3.3 重组腺病毒感染 Hep-2 细胞 实验设置为 3 组: 空白对照 (PBS) 组、腺病毒空载 (Ad-GFP) 组、实验 (Ad-siPNUTS) 组。取生长状态良好的对数期细胞, 消化后重悬, 以 2×10^5 个细胞 (2 mL) 接种于 6 孔板, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后弃培养基, PBS 洗 2 次, 分别加入 PBS、转入 MOI 为 100 的 Ad-GFP 或 Ad-siPNUTS。继续培养 48 h 后用于后续实验。

1.3.4 Ad-siPNUTS 感染 Hep-2 细胞的鉴定 用实时荧光定量 PCR 检测 PNUTS 在 mRNA 水平的表达。提取感染 48 h 后各组细胞总 RNA, 测总 RNA 浓度。按照 SuperRT One Step 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作, 反转录及扩增在同一个反应体系中进行。反应体系含 12.5 μL 2×SuperRT One Step Buffer, 上游引物、下游引物各 1 μL, 0.5 μL SuperRT One Step Enzyme Mix, 1 μg RNA, 最终加无酶水补足至 25 μL。反应条件: 45℃ 反转录 30 min, 95℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 35 次; 72℃ 终延伸 5 min。PNUTS 基因上游引物 5'-CCCATAGACCCCAAAGAACTTC-3', 下游引物 5'-ATCGACTCACCATCTTTCGTG-3'; GAPDH 基因上游引物 5'-CGGATTTGGTCGTATTGGGC-3', 下游引物 5'-AGCATCGCCCCACTTGATTT-3'。目的基因 mRNA 的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算。实验重复 3 次。

用 Western blotting 检测 PNUTS 在蛋白水平的表达。用细胞裂解液 RIPA 提取感染 48 h 后的 Hep-2 细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。总蛋白按照每孔 40 μg 上样, 10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白转印到 PVDF 膜, 用含 5%

脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 4 h, 分别加入 *PNUTS* 抗体、*GAPDH* 抗体, 4 ℃ 孵育过夜。回收一抗, TBST 洗 4 次, 每次 5 min, 加入二抗 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗 4 次, 每次 10 min。化学发光法显影, Quantity one 软件进行灰度值分析。实验重复 3 次。

1.4 Ad-si*PNUTS* 对 Hep-2 细胞增殖的影响

收集感染 24 h 后各组细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞 (100 μ L) 接种于 96 孔板, 每组 5 个复孔。在感染后 1、2、3、4 d 分别加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h。弃上清后, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 震荡 10 min, 酶标仪检测吸光度值 [D (490 nm)]。以不含细胞的等体积培养基作调零孔。以时间为横坐标, 以 D (490 nm) 为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.5 Ad-si*PNUTS* 对 Hep-2 细胞侵袭、迁移的影响

1.5.1 细胞迁移实验 取感染 48 h 后各组细胞, 消化后以无血清 RPMI-1640 稀释重悬, 以每孔 1×10^5 个细胞 (200 μ L) 接种于 Transwell 上室, 同时下室中加入 500 μ L 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 继续培养 24 h。取出小室, 用棉签轻轻擦去上室中未迁移的细胞, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 流水缓缓冲去染液, 自然晾干后, 于光学显微镜下选择上下左右及中间 5 个视野进行细胞计数, 计算平均数。

1.5.2 细胞侵袭实验 将 7 mg/mL Matrigel 按 1:1 稀释后以每孔 50 μ L 轻轻加入 Transwell 上室, 置于 37 ℃ 孵育箱 4 h, 使胶凝固。取出小室, 上层加入 100 μ L 无血清 RPMI-1640, 水化 30 min。其他步骤同 1.5.1。

1.6 感染后细胞增殖、侵袭相关蛋白检测

按 1.3.2 方法提取感染 48 h 后各组细胞总蛋白, Western

blotting 检测 PI3K、p-AKT、E-cadherin、N-cadherin、ZEB1、E2F1、p-Rb、总 Rb 蛋白的表达。

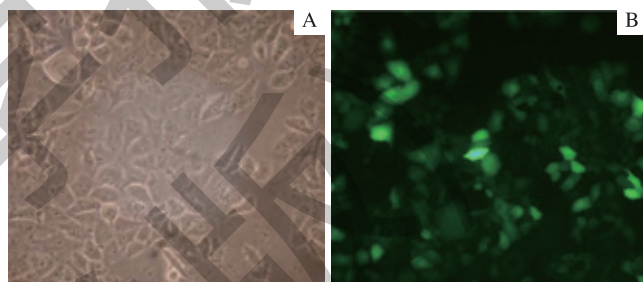
1.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采取独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒感染效率的检测

用 MOI 为 100 的腺病毒感染 Hep-2 细胞, 24 h 后约 80% 的细胞出现荧光 (图 1)。结果表明构建的腺病毒对 Hep-2 细胞具有较高的感染效率。



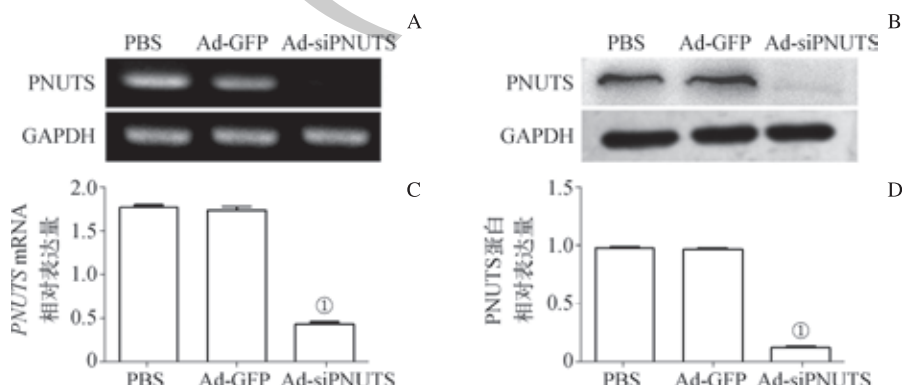
注: 用 MOI 值为 100 的 Ad-GFP 感染 Hep-2 细胞后, 在普通显微镜 (A) 及荧光显微镜 (B) 下的细胞形态。

图 1 重组腺病毒感染 Hep-2 细胞效率的检测

Fig 1 Detection of the efficiency of Hep-2 cells infected by recombinant adenovirus

2.2 感染后 Hep-2 细胞内 *PNUTS* 的表达

实时荧光定量 PCR 结果 (图 2A) 及 Western blotting 结果 (图 2B) 显示: 与 Ad-GFP 组比较, Ad-si*PNUTS* 组 *PNUTS* mRNA 及蛋白 (均 $P=0.000$) 表达水平降低, 差异有统计学意义; 与 Ad-GFP 组比较, PBS 组 *PNUTS* mRNA ($P=0.339$) 及蛋白 ($P=0.297$) 表达水平差异无统计学意义。



注: 实时荧光定量 PCR (A) 及 Western blotting (B) 检测结果; 实时荧光定量 PCR (C) 及 Western blotting (D) 半定量分析结果; ① $P=0.000$, 与 Ad-GFP 组比较。

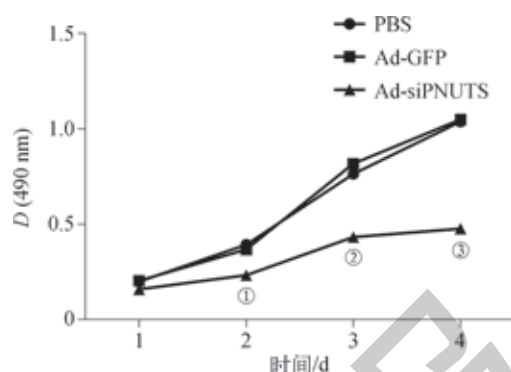
图 2 Ad-si*PNUTS* 感染后 Hep-2 细胞中 *PNUTS* mRNA 和蛋白的表达

Fig 2 Expressions of *PNUTS* mRNA and protein in Hep-2 cells after Ad-si*PNUTS* transfection

2.3 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞增殖的影响

Hep-2 细胞生长曲线 (图 3) 显示: 与 Ad-GFP 组比较, Ad-siPNUTS 组中 Hep-2 细胞生长速度在第 2 日 ($P=0.004$)、

第 3 日 ($P=0.001$)、第 4 日 ($P=0.000$) 明显减慢, 差异具有统计学意义; Ad-GFP 组与 PBS 组比较差异无统计学意义。



注: ^① $P=0.004$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.000$, 与 Ad-GFP 组比较。

图 3 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of Ad-siPNUTS on proliferation of Hep-2 cells

2.4 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果 (图 4) 显示: PBS 组、Ad-GFP 组及 Ad-siPNUTS 组的穿膜细胞数分别为 (325.67 ± 4.16)、

(322.33 ± 3.21)、(88.01 ± 6.25) 个; 与 PBS 组、Ad-GFP 组比较, Ad-siPNUTS 组的穿膜细胞数明显下降, 差异有统计学意义 (均 $P=0.000$); Ad-GFP 组与 PBS 组差异无统计学意义 ($P=0.420$)。

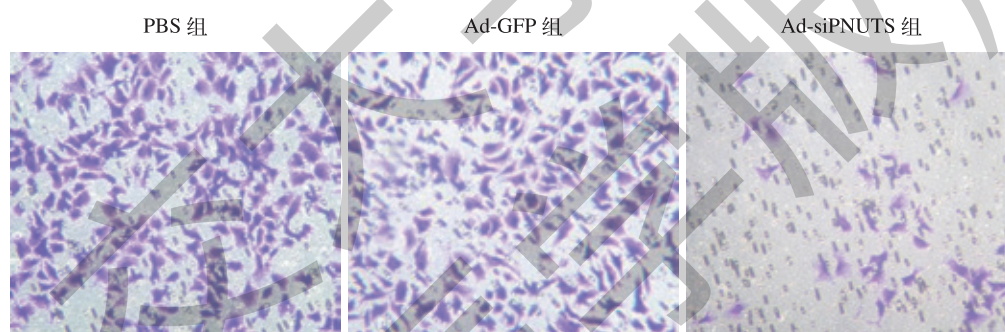


图 4 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫染色 $\times 200$)

Fig 4 Effect of Ad-siPNUTS on invasion of Hep-2 cells (crystal violet staining $\times 200$)

2.5 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验结果 (图 5) 显示: PBS 组、Ad-GFP 组及 Ad-siPNUTS 组的穿膜细胞数分别为 (343.00 ± 4.01)、

(339.00 ± 7.55)、(125.33 ± 2.08) 个; 与 Ad-GFP 组比较, Ad-siPNUTS 组的穿膜细胞数明显下降, 差异有统计学意义 (均 $P=0.000$); Ad-GFP 组与 PBS 组差异无统计学意义 ($P=0.372$)。

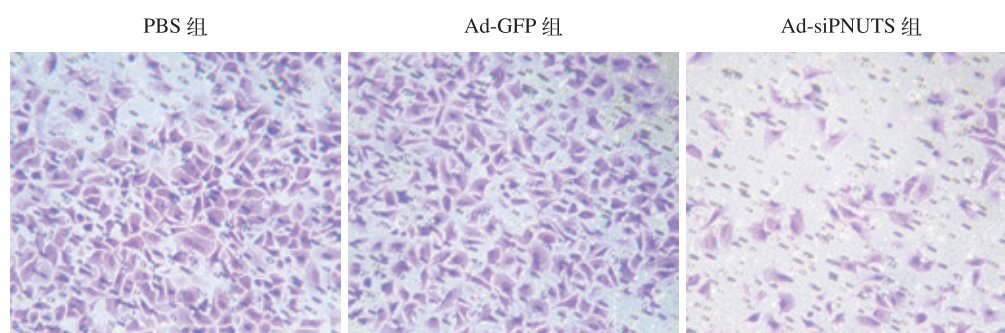


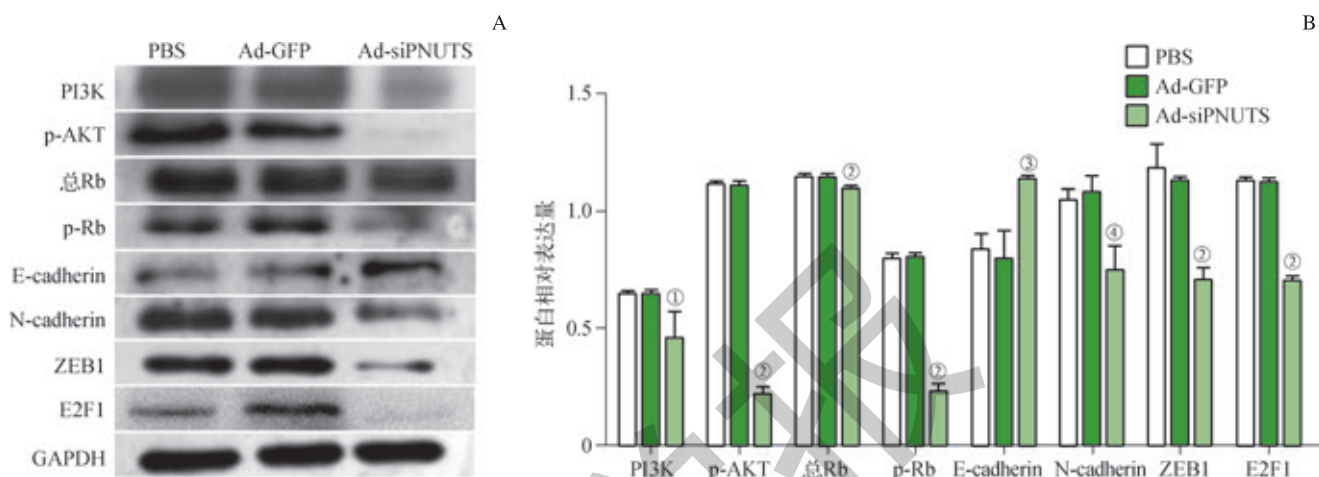
图 5 Ad-siPNUTS 对 Hep-2 细胞迁移能力的影响 (结晶紫染色 $\times 200$)

Fig 5 Effect of Ad-siPNUTS on migration of Hep-2 cells (crystal violet staining $\times 200$)

2.6 感染后细胞增殖、侵袭相关蛋白的表达

Western blotting 结果 (图 6) 显示: 与 Ad-GFP 组比较, Ad-siPNUTS 组 E-cadherin ($P=0.003$) 表达水平升高, 总 Rb ($P=0.000$)、p-Rb ($P=0.000$)、PI3K ($P=0.023$)、p-AKT

($P=0.000$)、N-cadherin ($P=0.005$)、ZEB1 ($P=0.000$)、E2F1 ($P=0.000$) 表达水平降低, 差异具有统计学意义; PBS 组与 Ad-GFP 组差异无统计学意义。



注: A. Western blotting 检测结果; B. Western blotting 半定量分析结果; ① $P=0.023$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.003$, ④ $P=0.005$, 与 Ad-GFP 组比较。

图 6 Ad-siPNUTS 感染后 Hep-2 细胞中增殖、侵袭相关蛋白的表达

Fig 6 Expressions of proliferation- and invasion-related proteins in Hep-2 cells after Ad-siPNUTS transfection

3 讨论

PP1 是丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶家族中的一员, 是细胞内主要的蛋白磷酸酶, 通过调节蛋白激酶的活性在许多细胞进程中发挥重要作用^[8-9]。PNUTS 可与 PP1 稳定结合并调节其催化活性, 在细胞有丝分裂的不同时期与染色体共定位, 通过调控多种靶分子参与细胞的增殖与凋亡过程^[10]。目前, 该基因在喉癌细胞增殖、侵袭中的作用及相关分子机制尚不清楚。为此我们构建了沉默 *PNUTS* 基因的重组腺病毒 Ad-siPNUTS, 并感染喉癌 Hep-2 细胞, 感染 48 h 后分别从基因和蛋白水平检测了 *PNUTS* 的表达情况。结果表明, 在感染 Ad-siPNUTS 后, *PNUTS* mRNA 及蛋白表达明显降低。这表明 Ad-siPNUTS 可作为研究 *PNUTS* 基因在喉癌发生、发展中作用的有效工具。

增殖和侵袭是恶性肿瘤的基本特征, 也是其复发和致死的主要原因。本研究利用 MTT 法、Transwell 法检测了感染 Ad-siPNUTS 后 Hep-2 细胞增殖、侵袭能力的改变。结果表明, 感染了 Ad-siPNUTS 的细胞与未感染组比较, 增殖、侵袭能力明显下降。这说明 *PNUTS* 基因在喉癌的增殖及侵袭转移中具有重要作用。

EMT 被认为是肿瘤恶变的关键事件, 参与肿瘤细胞的侵袭和远处转移^[1-2], 其重要的分子生物学基础为钙黏蛋白 (cadherin)。E-cadherin 可维持细胞间的稳定连接, 其

表达降低可导致细胞间连接破坏, 并诱导上皮细胞向间质细胞表型转化; N-cadherin 具有促进肿瘤细胞运动和转移的作用, 在 EMT 发生时表达增加^[11]。本研究发现, 在感染 Ad-siPNUTS 后, Hep-2 细胞中 E-cadherin 表达增加, N-cadherin 表达降低, 这说明 *PNUTS* 基因与 EMT 的发生、发展密切相关。

为探讨 *PNUTS* 参与喉癌细胞增殖、侵袭及 EMT 的相关分子机制, 本研究检测了感染 Ad-siPNUTS 后总 Rb、p-Rb、E2F1、ZEB1、PI3K、p-AKT 蛋白表达水平的变化, 结果表明感染 Ad-siPNUTS 后, 总 Rb、p-Rb、E2F1、ZEB1、PI3K、p-AKT 的表达水平明显下降。Rb 基因具有磷酸化和非磷酸化 2 种形式, 在肿瘤细胞中因 cyclin/CDK 过表达而呈现为高度磷酸化的失活形式^[12-14]。研究^[15-16]发现, 非磷酸化 Rb 可与 E2F1 结合, 并限制其功能; 而磷酸化的 Rb 可释放 E2F1, 使其结合到基因组上, 发挥转录调控功能并激活下游基因, 进而使细胞周期从 G1 期转换到 S 期, 促进细胞增殖。Sánchez-Tilló 等^[17]研究发现, ZEB1 可与 E-cadherin 基因启动子结合, 抑制 E-cadherin 基因的转录, 从而促进 EMT 的发生。Egger 等^[18]研究发现, 非磷酸化 Rb 可与 ZEB1 形成复合体, 抑制其对 E-cadherin 的转录抑制作用, 而磷酸化 Rb 可促进 Rb/ZEB1 复合体的分离。Arima 等^[19]研究也发现 Rb 的失活可导致 E-cadherin 的表达降低及 EMT 的发生。由此推测, 通过沉默 *PNUTS* 的表达可影响 Rb 的磷酸化, 从而经由

Rb/E2F1 途径抑制细胞的增殖, 经由 Rb/ZEB1 途径抑制细胞 EMT 的发生。此外, 本研究还发现通过沉默 *PNUTS* 的表达, PI3K/AKT 途径受到抑制; 而该途径在肿瘤细胞增殖^[5], 侵袭^[6-7], EMT^[20] 发生、发展中的作用也已被研究证实, 这说明 Ad-siPNUTS 可通过 PI3K/AKT 途径抑制细胞的增殖和侵袭。

综上所述, *PNUTS* 可通过 PI3K/AKT、Rb/E2F1、Rb/ZEB1 信号通路参与调节喉癌的增殖、侵袭、转移及 EMT 的发生、发展。但 *PNUTS* 如何改变总 Rb 的表达及 Rb 磷酸化状态, 目前尚不明确, 其可能与 cyclin/CDK 途径有关。此外, 对 *PNUTS* 基因的进一步研究, 可能为临床监测喉癌进展和预后评估提供实验依据。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
- [2] Lamouille S, Subramanyam D, Billelo R, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(2): 200-207.
- [3] Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells[J]. Mol Oncol, 2015, 9(8): 1612-1625.
- [4] Zeng T, Peng L, Chao C, et al. miR-451 inhibits invasion and proliferation of bladder cancer by regulating EMT[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(11): 7653-7662.
- [5] Kavela S, Shinde SR, Ratheesh R, et al. *PNUTS* functions as a proto-oncogene by sequestering PTEN[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 205-214.
- [6] Niu H, Wu B, Peng Y, et al. RNA interference-mediated knockdown of RhoGDI2 induces the migration and invasion of human lung cancer A549 cells via activating the PI3K/Akt pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(1): 409-419.
- [7] Tian T, Nan KJ, Guo H, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1593-1600.
- [8] Berndt N. Roles and regulation of serine/threonine-specific protein phosphatases in the cell cycle[J]. Prog Cell Cycle Res, 2003, 5(51): 497-510.
- [9] Garcia A, Cayla X, Guernon J, et al. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis[J]. Biochimie, 2003, 85(8): 721-726.
- [10] Lim YM, Watanabe T, Allen PB, et al. *PNUTS*, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(16): 13819-13828.
- [11] Bex G, Becker K, Höfler H, et al. Mutations of the human E-cadherin (*CDH1*) gene[J]. Hum Mutat, 1998, 12(4): 226-237.
- [12] Narasimha AM, Kaulich M, Shapiro GS, et al. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation[J]. eLife, 2014, 3(3): e02872.
- [13] Sherr CJ, McCormick. The RB and p53 pathways in cancer[J]. Cancer Cell, 2002, 2(2): 103-112.
- [14] Mittnacht S. The retinoblastoma protein-from bench to bedside[J]. Eur J Cell Biol, 2005, 84(2/3): 97-107.
- [15] Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle[J]. Cell Div, 2012, 7(1): 10.
- [16] Madan E, Gogna R, Kuppusamy P. TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex[J]. Br J Cancer, 2012, 107(3): 516-526.
- [17] Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression[J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(7): 897-912.
- [18] Egger JV, Lane MV, Antonucci LA, et al. Dephosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb) inhibits cancer cell EMT via Zeb[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(11): 1197-1205.
- [19] Arima Y, Inoue Y, Shibata T, et al. Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5104-5112.
- [20] Ha GH, Park JS, Breuer EK. TACC3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. Cancer Lett, 2013, 332(1): 63-73.

[收稿日期] 2017-09-19

[本文编辑] 崔黎明