

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0529

靶向沉默 *PPP1R16A* 基因可抑制肝癌细胞的增殖

毕峰瑞, 周传传, 袁继行, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察和比较在人肝癌与癌旁组织中蛋白磷酸酶 1 调节亚基 16A (protein phosphatase 1 regulatory subunit 16A, *PPP1R16A*) 基因在基因组和转录水平的差异, 探讨靶向沉默 *PPP1R16A* 基因对肝癌细胞 HCC LM3 增殖能力的影响。**方法** 收集 106 例肝癌患者的肿瘤组织及癌旁组织, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *PPP1R16A* 基因的基因组和转录水平。体外合成 *PPP1R16A* 序列特异性小干扰 RNA (siRNA), 使用脂质体法转染肝癌细胞株 HCC LM3。实验分 si-16A 组 (针对 *PPP1R16A* 的特异性 siRNA 转染的 HCC LM3 细胞)、NC 组 (非特异性 siRNA 转染的 HCC LM3 细胞)、空白组 (未转染 siRNA 的 HCC LM3 细胞), 用实时荧光定量 PCR 检测 *PPP1R16A* 基因拷贝数和转录水平, 用蛋白质印迹法检测 *PPP1R16A* 蛋白表达, 用 CCK-8 实验、克隆形成实验检测细胞增殖和克隆形成能力, 用流式细胞术检测细胞周期。**结果** 人肝癌组织中 *PPP1R16A* 基因的拷贝数和转录表达水平均高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 且两者具有相关性 ($P = 0.015$)。CCK-8 实验和克隆形成实验显示, 转染 siRNA 后, si-16A 组细胞增殖低于 NC 组和空白组 ($P < 0.001$)。流式细胞术结果显示, si-16A 组较 NC 组和空白组细胞周期被抑制。**结论** 肝癌组织中 *PPP1R16A* 的拷贝数发生扩增, 基因转录上调。靶向沉默 *PPP1R16A* 能抑制肝癌细胞 HCC LM3 的增殖能力。提示 *PPP1R16A* 基因在肝癌中发挥癌基因的作用。

[关键词] 肝肿瘤; 肝细胞癌; *PPP1R16A*; 细胞增殖; 拷贝数变异

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0529-07

RNAi-mediated *PPP1R16A* gene silencing suppresses proliferation of hepatocellular carcinoma cells

BI Feng-rui, ZHOU Chuan-chuan, YUAN Ji-hang, SUN Shu-han*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe and compare the genomic and transcription level of protein phosphatase 1 regulatory subunit 16A (*PPP1R16A*) gene in human hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and adjacent tissues, and to explore the effect of specific silencing of *PPP1R16A* on the proliferation of HCC LM3 cells. **Methods** Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used to assess genomic and transcription level of *PPP1R16A* gene. The specific small interfering RNA (siRNA) of *PPP1R16A* was synthesized *in vitro*, and was transfected into HCC LM3 cells with liposome. The experiment was divided into the following three groups, namely, *PPP1R16A*-siRNA (si-16A) transfected group, non-specific siRNA (NC) transfected group and blank control group. The genomic and transcription level of *PPP1R16A* gene was detected by qRT-PCR. The expression of *PPP1R16A* protein was detected by Western blotting analysis. CCK-8 and clone formation assay were used to investigate the proliferation ability of transfected cells. Cell cycle was investigated by flow cytometry. **Results** The genomic level ($P < 0.001$) and transcription level ($P < 0.001$) of *PPP1R16A* gene in human HCC tissues were significantly increased compared with those in the adjacent liver tissues; and the genomic level was found significantly correlated with transcription level of *PPP1R16A* gene ($P = 0.015$). The results of CCK-8 and clone formation experiment *in vitro* showed that the cell proliferation of si-16A group was significantly inhibited compared with NC group and blank control group ($P < 0.001$). Flow cytometry showed that cell cycle was suppressed in si-16A group. **Conclusion** The genomic and transcription levels of *PPP1R16A* gene are increased in HCC tissues. The proliferation of HCC LM3 cells is suppressed by inhibiting the *PPP1R16A* gene transcription, which suggests that *PPP1R16A* gene functions as an oncogene in HCC.

[Key words] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; *PPP1R16A*; cell proliferation; copy number variation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 529-535]

[收稿日期] 2016-01-11 **[接受日期]** 2016-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81330037). Supported by National Natural Science Foundation of China (81330037).

[作者简介] 毕峰瑞, 硕士生. E-mail: bifengrui@msn.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871055, E-mail: shsun@vip.sina.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发病机制复杂,涉及到不同信号通路的基因组变异和表观遗传的改变^[1-2]。基因组变异包括基因突变、拷贝数变异和染色体易位。拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 是基因组在结构上发生变异的一种形式,指染色体上 ≥ 1 kb DNA 片段上的复制、插入、缺失和复杂变异。拷贝数变异主要来源于 DNA 重组,包括非等位同源重组 (non-allelic homologous recombination, NAHR) 和非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ)^[3]。在肿瘤发生过程中,凋亡相关基因的拷贝数通常发生减少,而增殖相关基因的拷贝数则发生扩增^[4]。在 HCC 中,乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 通过将病毒 DNA 整合进入宿主基因组中,可以导致 CNV 的发生,造成染色体的不稳定,并最终导致肝癌发生^[5]。因而,从 CNV 角度入手研究肝癌,可以加深对肝癌发病机制的精确认识。同时,由于 CNV 的发生是一个长期累积效应,也为运用基因靶技术进行及早诊断和治疗肝癌提供了新的思路^[6]。

目前,已知在 HCC 中 CNV 发生扩增的高频片段位于染色体 1q、6p、8q、17q 和 20p,而发生缺失的高频片段位于染色体 4q、6q、8p、9p、13q、14q、16q 和 17p^[7-8]。这些 CNV 高频片段上是否存在与 HCC 发生相关的基因、发挥何种作用目前还不清楚。通过前期工作,我们从芯片中筛选得到了在肝癌与癌旁组织中存在差异表达的基因。将这些基因与 CNV 高频片段进行整合分析,发现其中位于 CNV 扩增高频区段 8q24.3 上的蛋白编码基因 *PPP1R16A* 在肝癌组织的表达高于癌旁组织 (上调倍数 1.76, $P=0.03$)^[9],提示其在肝癌发生中具有重要作用,可能发挥促癌的功能。本研究拟通过实时荧光定量 PCR 技术,验证 106 对肝癌组织和癌旁组织 *PPP1R16A* 的拷贝数和转录表达情况及两者的相关性;并通过 siRNA 技术体外靶向沉默肝癌细胞株 HCC LM3 中 *PPP1R16A* 的表达,探索对 HCC LM3 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞和组织标本 人肝癌细胞株 HCC LM3 购自中国科学院细胞库,由本实验室保存。细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。106 例肝癌患者的肿瘤组织和癌旁组织、41 例正常肝组织、22 例肝炎

组织以及患者资料由第二军医大学东方肝胆外科医院提供,并取得患者或其家属知情同意。所有组织标本取得后立即放入液氮中保存备用。

1.2 主要材料和试剂 DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司, LipofectamineTM 3000 试剂购自 Invitrogen 公司,基因组 DNA 抽提试剂盒购自 Axygen 公司, RNA 抽提试剂 TRIzol RNAiso 购自 TaKaRa 公司,反转录试剂购自 Invitrogen 公司, CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司,细胞周期检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,蛋白酶抑制剂 (Cocktail) 购自 Sigma 公司,硝酸纤维素 (NC) 膜购自 Millipore 公司, Anti-PPP1R16A 抗体购自 Sigma 公司。

1.3 基因组 DNA 抽提 对于组织样本,取 20 mg 肝癌或肝组织,移入冰水浴预冷的研钵中,快速研磨成匀浆。加入 350 μ L PBS 和 0.9 μ L RNase A 后温和地研磨 30 s。收集 350 μ L 研磨好的组织匀浆并转入 2 mL 离心管。如匀浆体积不足 350 μ L,补充 PBS 至 350 μ L。加入 150 μ L Buffer C-L 和 20 μ L Proteinase K。立即涡旋振荡 1 min 混合均匀。短暂离心后,将离心管置于 56°C 水浴 10 min。加入 350 μ L Buffer P-D, 涡旋振荡 30 s 混合均匀, 12 000 $\times g$ 离心 10 min。将 DNA 制备管置于 2 mL 离心管中,将上一步的混合液移至制备管中, 12 000 $\times g$ 离心 1 min。弃滤液,将制备管置回到原来的 2 mL 离心管中,加入 500 μ L Buffer W1, 12 000 $\times g$ 离心 1 min。再用 700 μ L Buffer W2 洗涤 2 次。最后用 150 μ L 去离子水洗脱 DNA。

1.4 细胞转染 *PPP1R16A* siRNA 序列:正义链 5'-GCG GCA UCU AUA CUC CAA GTT-3',反义链 5'-CUU GGA GUA UAG AUG CCG CTT-3',由上海吉玛公司合成。非特异性 siRNA 由吉玛公司提供。利用 LipofectamineTM 3000 试剂将 *PPP1R16A* siRNA 和非特异性 siRNA 转染 HCC LM3 细胞,即 si-16A 组和 NC 组;未转染 siRNA 的 HCC LM3 为空白对照组。在 125 μ L DEPC 水中加入 2.5 nmol siRNA,溶解后为 20 μ mol/L 的母液。转染前 1 d,细胞传代培养于 6 孔板中,培养 24 h 至细胞铺满孔底的 60%~70%。将 5 μ L 20 μ mol/L 的 siRNA 与 125 μ L 的 opti-MEM 混合于无菌的 Eppendorf 管中。取 3.75 μ L 的 LipofectamineTM 3000 试剂与 125 μ L 的 opti-MEM 混合于另一无菌

的 Eppendorf 管中。将上述两管液体混合均匀,室温静置至少 5 min,形成 siRNA-脂质体复合物,随后逐滴加入细胞培养基中。将细胞瞬时转染 48 h 后,收集细胞用于所需实验。

1.5 总 RNA 的抽提 对于组织样本,每 50~100 mg 肝癌组织或肝组织标本在液氮中研磨粉碎,待液氮挥发后迅速加入 1 mL TRIzol;对于细胞样本,按照 6 孔板每个培养孔添加 1 mL TRIzol 的比例加入 TRIzol 试剂直接裂解细胞。1 mL TRIzol 试剂中加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡 15 s 混匀,室温放置 5 min。12 000 $\times g$ 4 $^{\circ}C$ 离心 15 min。样本形成上层的无色水相、中间层和下层的红色苯酚-氯仿相的三相分层状态。小心吸取上层的无色水相至新的 Eppendorf 管中,等体积加入约 0.5 mL 异丙醇,轻微混匀后将样本在室温下孵育 10 min,12 000 $\times g$ 4 $^{\circ}C$ 离心 10 min。弃上清,以 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次,每次 7 500 $\times g$ 4 $^{\circ}C$ 离心 5 min。冰上短暂干燥 RNA(4 $^{\circ}C$ 干燥 5 min 左右)。根据沉淀体积以 RNase-free 的水溶解 RNA,以枪头吹打数次。RNA 保存于-80 $^{\circ}C$ 。使用 Nanodrop 仪器和软件,测定并计算 RNA 的 D_{260}/D_{280} 的比值,判断总 RNA 质量并进行定量。

1.6 引物的设计与合成 PPP1R16A 基因引物序列:上游 5'-CGG AAT TCA TGG CCG AGC ACC TGG-3',下游 5'-CGG GAT CCT CAC ATG AGC AGG CAG CAC-3';内参基因 GAPDH 引物序列:上游 5'-CGG ATT TGG TCG TAT TGG G-3',下游 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG ATT-3'。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)与相对定量分析 实时荧光定量 PCR 实验使用 Applied Biosystems 公司的 StepOne™ Real-Time PCR System 系统。模板为反转录所得的 cDNA 和稀释后的 gDNA。每个反应重复 3 次,每次反应均设 3 个复孔,并均包含了相应的无模板对照。定量结果采用相对定量的方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)进行比较、分析。

1.8 蛋白质印迹法检测 LM3 细胞中 PPP1R16A 的表达 细胞转染 48 h 后提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。根据蛋白定量结果,调整蛋白上样量,每个样品取 20 μ g 加入上样孔,进行 SDS-PAGE(5%浓缩胶:50 V,40 min;12%分离胶:100 V,100 min)。电泳结束后根据蛋白大小进行切胶,并切取同样大小的 NC 膜,按照阴极板-滤纸-

SDS-PAGE 胶-NC 膜-滤纸-阳极板的顺序,以 100 V 进行电转。电转完成后,用 5%脱脂奶粉进行封闭,置于室温,放置 2 h。加入一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜,加入二抗室温孵育 2 h。蛋白条带使用 Li-Cor 公司的 Odyssey infrared scanner 进行扫描、定量。

1.9 CCK-8 细胞增殖实验 将干扰 PPP1R16A 的 HCC LM3 细胞及其对照组细胞消化后等密度重新铺于 96 孔板中,每种细胞铺 5 个复孔,每孔 3 000 个细胞,100 μ L 完全培养基培养。待生长 6 h 细胞贴壁后,按 10 μ L/孔加入 CCK-8 试剂,分别在试剂加入后不同的时间点(0、12、24、36、48、60 h)使用酶标仪测定 D_{450} ,绘制细胞的增殖曲线,根据增殖曲线比较不同组的细胞增殖情况。

1.10 平板克隆形成实验 取对数生长期的细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化吹打成单个细胞,把细胞悬浮在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中备用。按每孔 3 000 个细胞接种于 6 孔板中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。置于 37 $^{\circ}C$ 、5%CO₂ 及饱和湿度的环境下,静置培养 2 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃上清液,用 PBS 浸洗 2 次,加入 4%多聚甲醛,固定 20 min。然后去固定液,按每孔 1 mL 加入 0.5%结晶紫染色液染色 1.5 h,然后用 PBS 洗涤多次,去除染色液,空气干燥。

1.11 流式细胞术检测细胞周期 细胞转染 48 h 后,用胰酶消化细胞,离心收集,1 000 $\times g$ 离心 5 min。吸除上清,加入 1 mL 冰浴预冷的 PBS,重悬细胞。再次离心,吸除上清后,加入 1 mL 冰浴预冷的 70%乙醇,轻轻吹打混匀,4 $^{\circ}C$ 固定 12~24 h。1 000 $\times g$ 离心 5 min,沉淀细胞。小心吸除上清后,加入 1 mL 冰浴预冷的 PBS,重悬细胞。每管样品加入 0.5 mL PI 染色液[0.5 mL 染色缓冲液,25 μ L PI 染色液(20 \times),10 μ L RNase A (50 \times)],缓慢并充分重悬细胞沉淀,37 $^{\circ}C$ 温浴 30 min 后,经流式细胞仪检测并分析细胞周期。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。肝癌与配对癌旁组织的比较采用 Wilcoxon 符号秩检验,多组间均值的比较采用单因素方差分析,两因素的相关性采用 Pearson 相关分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 临床样本中 PPP1R16A 基因组和转录水平的变化 在基因组 DNA 水平,PPP1R16A 在 106 对

肝癌组织和癌旁组织中的相对量分别为 1.87 ± 1.32 和 1.00 ± 0.45 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 证实肝癌组织中 *PPP1R16A* 的拷贝数发生了扩增。在转录水平, *PPP1R16A* 在肝癌和癌旁组织的相对表达量分别为 1.44 ± 0.92 和 1.00 ± 0.64 , 差异有

统计学意义 ($P < 0.01$), 证实 *PPP1R16A* 的转录表达也发生了增加。对 *PPP1R16A* 基因组 DNA 和转录水平进行相关性分析, 两者的 Pearson 相关系数 $R = 0.238$ ($P = 0.015$), 说明 *PPP1R16A* 转录水平的上调与拷贝数的扩增存在正相关 (图 1A~1C)。

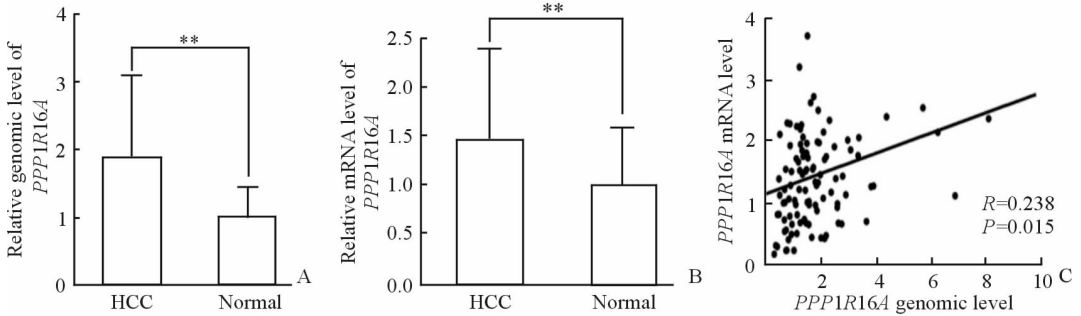


图 1 肝癌组织中 *PPP1R16A* 的拷贝数发生扩增且转录水平增加

Fig 1 The genomic and transcription level of *PPP1R16A* gene were increased in HCC tissues

A: The genomic level of *PPP1R16A* gene in HCC tissues and paired adjacent normal liver tissues (** $P < 0.01$, $n = 106$, $\bar{x} \pm s$); B: The transcription level of *PPP1R16A* gene in HCC tissues and paired adjacent normal liver tissues (** $P < 0.01$, $n = 106$, $\bar{x} \pm s$); C: The correlation between genomic level and transcription level of *PPP1R16A* gene ($n = 106$). HCC: Hepatocellular carcinoma

2.2 *PPP1R16A* 基因组水平与肝癌进展的关系 对 41 例正常肝组织、22 例肝炎组织以及 106 例肝癌组织中 *PPP1R16A* 基因组水平进行比较, 结果发现, 随着肝癌的发病过程, *PPP1R16A* 的基因组水平也在逐渐增加。*PPP1R16A* 在肝癌组织中的基因组水平高于正常肝组织 ($P < 0.01$), 肝炎组织中的基因组水平也高于正常肝组织 ($P < 0.05$)。肝癌组织与肝炎组织中的基因组水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。说明随着肝癌的发展, *PPP1R16A* 基因的拷贝数也逐渐递增。

白组相比基因表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。蛋白质印迹实验结果 (图 3B) 显示, si-16A 组 *PPP1R16A* 蛋白表达量 (0.06 ± 0.05) 低于 NC 组 (2.81 ± 0.71) 和空白组 (2.98 ± 0.51), 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); NC 组与空白组蛋白表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 *PPP1R16A* siRNA 能够有效抑制其基因的转录和翻译。

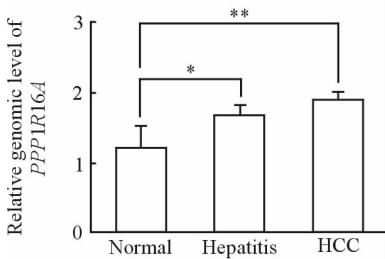


图 2 *PPP1R16A* 的拷贝数水平随着肝癌的进展逐渐增加

Fig 2 The genomic level of *PPP1R16A* gene increased with HCC progression

HCC: Hepatocellular carcinoma. Normal liver tissues, $n = 41$; Hepatitis tissues, $n = 22$; HCC tissues, $n = 106$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $\bar{x} \pm s$

2.3 siRNA 转染 HCC LM3 细胞对 *PPP1R16A* 基因转录和翻译的影响 实时荧光定量 PCR 结果 (图 3A) 显示, 转染 *PPP1R16A* siRNA 后, si-16A 组 *PPP1R16A* 基因的相对表达量低于 NC 组和空白组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); NC 组和空

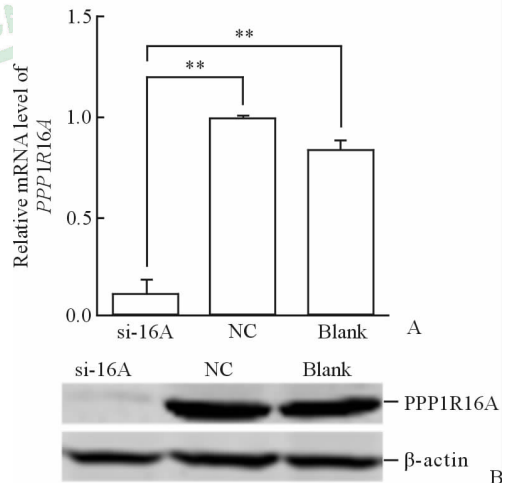


图 3 靶向沉默 *PPP1R16A* 基因抑制 HCC LM3 细胞 *PPP1R16A* 基因转录和翻译

Fig 3 Inhibition on *PPP1R16A* transcription and translation in HCC LM3 cells transfected with *PPP1R16A* siRNA

A: The transcription level of *PPP1R16A* gene in HCC LM3 cells (** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$); B: The expression level of *PPP1R16A* protein in HCC LM3 cells. si-16A: HCC LM3 cells transfected with *PPP1R16A* siRNA; NC: HCC LM3 cells transfected with non-specificity siRNA; Blank: HCC LM3 cells untreated with siRNA

2.4 靶向沉默 *PPP1R16A* 对 HCC LM3 细胞增殖能力和细胞周期的影响 克隆形成实验结果(图 4A、4B)显示, si-16A 组克隆形成率低于 NC 组和空白组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。CCK-8 细胞增殖实验结果(图 4C)显示, 随着时间的延长, si-16A 组细胞增殖明显受到了抑制, 在 60 h 时 si-16A 组 D_{450} (1.43 ± 0.05) 较 NC 组 (3.17 ± 0.15) 和空白

组 (2.61 ± 0.17) 低 ($P < 0.01$), 说明转染 siRNA 后, HCC LM3 细胞增殖被抑制。细胞周期检测结果(图 4D)显示, si-16A 组较 NC 组和空白组处于 G_0/G_1 期的细胞比例增加, 处于 S 期和 G_2/M 期的细胞比例减少。说明转染 *PPP1R16A* siRNA 后 HCC LM3 细胞周期发生了阻滞。

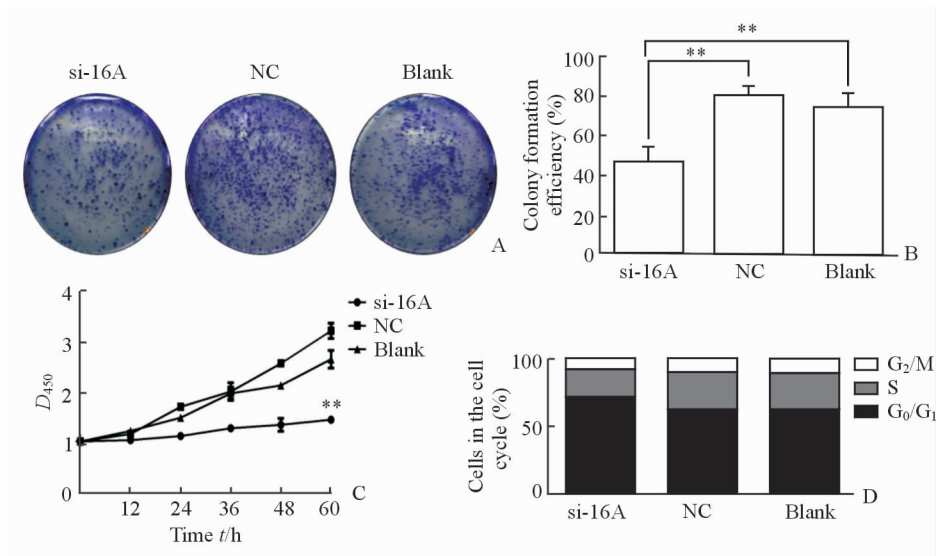


图 4 靶向沉默 *PPP1R16A* 基因抑制 HCC LM3 细胞的增殖并阻滞细胞周期

Fig 4 Transfection of *PPP1R16A* siRNA inhibited HCC LM3 cell proliferation and induced G_0/G_1 arrest in HCC LM3 cells

A: Clone formation assay of HCC LM3 cells transfected with *PPP1R16A* siRNA; B: Analysis of clone formation assay of HCC LM3 cells (** $P < 0.01$, $n=3$, $\bar{x} \pm s$); C: CCK-8 analysis of HCC LM3 cells transfected with *PPP1R16A* siRNA (** $P < 0.01$ vs NC and blank control, $n=3$, $\bar{x} \pm s$); D: Cell cycle of HCC LM3 cells analyzed by flow cytometry

3 讨论

本课题前期通过芯片分析发现, *PPP1R16A* 肝癌组织中的表达异常增高^[9]。同时, 该基因位于拷贝数扩增的高频区段——8 号染色体长臂 2 区 4 带 3 亚带内。基于上述结果, 我们推测, 在肝癌组织中, 由于拷贝数发生了扩增, 导致区段内基因 *PPP1R16A* 的表达增加。故我们首先在 106 例临床样本中对其基因组水平和转录水平进行验证, 我们证实 *PPP1R16A* 基因在肝癌组织中的拷贝数发生了扩增, *PPP1R16A* 的转录表达增加, 并且拷贝数的扩增与基因转录水平的上调呈正相关。

在对肝癌发病各阶段肝脏组织(正常肝、肝炎和肝癌组织)中 *PPP1R16A* 的拷贝数水平进行比较后, 我们观察到, 随着疾病的进展, *PPP1R16A* 的拷

贝数水平也随之增加。说明 *PPP1R16A* 拷贝数的扩增与肝癌的发生密切相关, 并提示其可以作为评判肝癌发病风险的指标。进一步通过检索 Oncomine 数据库中的芯片数据发现, 在基因组 DNA 水平上 *PPP1R16A* 在肝癌组织 ($n=26$) 中的表达高于正常肝组织 ($n=26$), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (GSE32649)^[10]; 在转录水平, *PPP1R16A* 在肝癌组织 (35 例) 中的表达高于肝癌前体组织(肝硬化组织 13 例, 不典型增生组织 17 例), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (GSE6764)^[11]。

PPP1R16A 是蛋白磷酸酶 (protein phosphatase 1, PP1) 的调节亚基^[12]。目前已知, PP1 参与了糖原代谢、基因转录、蛋白合成、细胞分裂和细胞凋亡等诸多生理过程^[13-14]。据报道, PP1 的表达失调与肿瘤细胞的增殖和凋亡密切相关^[15]。在靶向沉默

PPP1R16A后, CCK-8 细胞增殖实验和克隆形成实验显示, HCC LM3 细胞的增殖受到了明显的抑制($P < 0.01$); 细胞周期和凋亡检测结果显示, si-16A 组细胞发生了 G_0/G_1 阻滞, 而细胞凋亡没有受到影响。这一结果提示, PPP1R16A 对细胞增殖的抑制作用主要体现在对细胞周期的阻滞。同时, 我们还在肝癌细胞 Huh7 中观察了干扰 PPP1R16A 对细胞增殖的影响, 结果显示, 靶向沉默 PPP1R16A 并不能抑制 Huh7 细胞的增殖(资料未发表)。针对这一现象, 我们对涉及 HCC LM3 和 Huh7 细胞研究的相关文献进行检索, 发现这两种细胞的差异之一, 体现在其 p53 突变状态的不同。其中, HCC LM3 中的 p53 为野生型(wild-type), Huh7 中 p53 为突变型(mutant)^[16]。当癌基因激活或 DNA 发生损伤时, p53 可以通过抑制细胞周期和促进细胞凋亡而发挥抑癌作用^[17]。p53 参与多种基因的转录激活或抑制^[18], 其自身也受到磷酸化^[19]、乙酰化^[20] 和泛素化^[21] 等多种翻译后的修饰调节^[22]。野生型 p53 的磷酸化可以增强其自身的稳定性, 并在核内聚集, 有利于其发挥抑癌作用, 而突变型 p53 通过磷酸化作用, 则会增强其促癌的功能^[23]。根据以上结论, 我们推测 p53 的突变状态以及磷酸化修饰可能是造成不同细胞增殖的差异表现的原因。

综上所述, 本研究初步发现, 在肝癌组织中, PPP1R16A 基因拷贝数发生扩增, 转录水平上调, 且与肝癌发病密切相关。通过 siRNA 干扰基因的表达, 可以抑制肝癌 HCC LM3 细胞的增殖。提示 PPP1R16A 基因在肝癌中发挥癌基因的作用。后续还将探讨 HCC 中影响 PPP1R16A 拷贝数发生扩增的因素有哪些、能否通过人为干预降低 CNV 的频率并降低肝癌的发病风险等, 为临床预防、诊断和治疗 HCC 提供参考。

[参考文献]

[1] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J C, Llovet J M. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2015, 149: 1226-

1239. e4.

- [2] Jhunjhunwala S, Jiang Z, Stawiski E W, Gnad F, Liu J, Mayba O, et al. Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma [J]. Genome Biol, 2014, 15: 436.
- [3] Zhang F, Khajavi M, Connolly A M, Towne C F, Batish S D, Lupski J R. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans [J]. Nat Genet, 2009, 41: 849-853.
- [4] Mauro J A, Butler S N, Ramsamooj M, Blanck G. Copy number loss or silencing of apoptosis-effector genes in cancer [J]. Gene, 2015, 554: 50-57.
- [5] Neuveut C, Wei Y, Buendia M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis [J]. J Hepatol, 2010, 52: 594-604.
- [6] Xu H, Zhu X, Xu Z, Hu Y, Bo S, Xing T, et al. Non-invasive analysis of genomic copy number variation in patients with hepatocellular carcinoma by next generation DNA sequencing [J]. J Cancer, 2015, 6: 247-253.
- [7] Guo X, Ba Y, Ma X, An J, Shang Y, Huang Q, et al. A meta-analysis of array-CGH studies implicates antiviral immunity pathways in the development of hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2011, 6: e28404.
- [8] Wang K, Lim H Y, Shi S, Lee J, Deng S, Xie T, et al. Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2013, 58: 706-717.
- [9] Yang F, Zhang L, Huo X S, Yuan J H, Xu D, Yuan S X, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans [J]. Hepatology, 2011, 54: 1679-1689.
- [10] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I B, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Genet, 2012, 44: 694-698.

- [11] Wurmbach E, Chen Y B, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, et al. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2007, 45: 938-947.
- [12] Yong J, Tan I, Lim L, Leung T. Phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 3 (MYPT3) and regulation of protein phosphatase 1 by protein kinase A [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 31202-31211.
- [13] Rebelo S, Santos M, Martins F, da Cruz E Silva E F, da Cruz E Silva O A. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events[J]. *Cell Signal*, 2015, 27: 2589-2598.
- [14] Figueiredo J, da Cruz E Silva O A, Fardilha M. Protein phosphatase 1 and its complexes in carcinogenesis[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14: 2-29.
- [15] Winkler C, De Munter S, Van Dessel N, Lesage B, Heroes E, Boens S, et al. The selective inhibition of protein phosphatase-1 results in mitotic catastrophe and impaired tumor growth[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128: 4526-4537.
- [16] Zhao J, Wu G, Bu F, Lu B, Liang A, Cao L, et al. Epigenetic silence of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region-containing protein 1 (ASPP1) and ASPP2 genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51: 142-153.
- [17] Vousden K H, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53[J]. *Cell*, 2009, 137: 413-431.
- [18] Muller P A, Vousden K H. p53 mutations in cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 2-8.
- [19] Jenkins L M, Durrell S R, Mazur S J, Appella E. p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 1441-1449.
- [20] Reed S M, Quelle D E. p53 acetylation: regulation and consequences[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 7: 30-69.
- [21] Brooks C L, Gu W. p53 regulation by ubiquitin[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585: 2803-2809.
- [22] Gu B, Zhu W G. Surf the post-translational modification network of p53 regulation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 672-684.
- [23] Meek D W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer[J]. *Biochem J*, 2015, 469: 325-346.

[本文编辑] 孙岩