

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001674

PLCD1对胰腺癌 CAPAN-1 和 BXPC-3
细胞上皮间充质转化的影响

张 桐, 姜 政

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:进一步探索肿瘤相关基因磷脂酶 C δ 1(phospholipase C δ 1, PLCD1)对胰腺癌细胞系增殖、侵袭及迁移的影响和潜在分子行为机制。**方法:**用脂质体法将 pcDNA3.1-PLCD1 质粒转入肿瘤,同时设立空载体组;综合利用 CCK-8、克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 验证 PLCD1 对胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,Western blot 实验研究其潜在机制。**结果:**瞬时转染过表达质粒后的胰腺癌细胞 CAPAN-1 和 BXPC-3 中,PLCD1 表达明显提高($P<0.05$);CCK-8 和克隆形成实验结果表明,高表达的 PLCD1 抑制胰腺癌细胞增殖速度($P<0.05$);划痕实验和 Transwell 实验结果表明,细胞运动、侵袭及迁移能力下降($P<0.05$)。Western blot 实验发现,MAPK/ERK 通路中磷酸化的 ERK 1/2,间质细胞标志分子 N-cadherin 和 Vimentin 表达受抑制($P<0.05$),同时上皮细胞标志分子 E-cadherin 表达上调($P<0.05$)。**结论:**本研究发现 PLCD1 可能通过抑制 MAPK/ERK 通路来抑制上皮间充质转化,从而抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移。本研究为进一步探索 PLCD1 在胰腺癌中的作用机理奠定了基础。

【关键词】胰腺癌;PLCD1;侵袭;迁移;上皮间充质转化**【中图分类号】**R735.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-12-12Effect of phospholipase PLCD1 on epithelial-mesenchymal transition of
pancreatic cancer cells CAPAN-1 and BXPC-3

Zhang Tong, Jiang Zheng

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of the phospholipase C δ 1(PLCD1), a potential tumour gene, in pancreatic cancer cells, on the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells. **Methods:** Liposome method was used to transfer the pcDNA3.1-PLCD1 to pancreatic cancer cells and the Vector group with empty vector was set. The proliferation, migratory and invasive abilities of pancreatic cancer cells were detected with CCK-8 assay, clone formation assay, Transwell assay and wound healing assay. In addition, Western blot was used to demonstrate the potential mechanism. **Results:** PLCD1 was significant up-regulated in CAPAN-1 and BXPC-3 cells after being transiently transfected with the PLCD1 over-expressing plasmid($P<0.05$). The ability of proliferation showed significant inhibition with CCK-8 and clone formation assay($P<0.05$). The motility, invasion and migration were remarkable restrained with Transwell assay and wound healing assay($P<0.05$). Additionally, Western blot showed PLCD1 induced MAPK/ERK pathway molecule p-ERK1/2($P<0.05$), as well as the mesenchymal markers N-cadherin and Vimentin were decreased($P<0.05$). And the expression of the epithelial marker E-cadherin was increased($P<0.05$). **Conclusion:** PLCD1 may inhibit the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells through inhibiting the MAPK/ERK pathway and suppressing the EMT, which lay the foundation for the further study of PLCD1 in pancreatic cancer.

【Key words】pancreatic cancer; PLCD1; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

在消化道肿瘤中,胰腺癌是一种高度恶性的肿瘤,全球范围中每年死亡患者超过 200 000 例^[1]。根

作者介绍:张 桐, Email:cdzt@qq.com,

研究方向:消化道肿瘤。

通信作者:姜 政, Email:jiangzheng1753@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20180503.1344.022.html>

(2018-05-03)

据美国肿瘤协会的调查,患者的 5 年生存率为 8%^[2]。在美国,胰腺癌位于肿瘤相关性死亡第 4 位,预计 2017 年会有 22 300 名男性患者与 20 790 名女性患者将因胰腺癌而死^[2]。在中国,胰腺癌发病率与死亡率呈逐年上升趋势,在 2015 年预计有 79 400 人因胰腺癌而死亡^[3]。因此,探索胰腺癌发病机制,研究胰

腺癌细胞转移过程的分子机制,对改善胰腺癌治疗、提高患者生存率极其重要。

磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)在磷脂酶代谢系统中发挥重要作用^[4]。磷脂酶 C 可以将 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇进一步水解为 1,4,5-三磷酸肌醇和二酰基甘油。根据蛋白质结构与调节机制,PLC 被区分为 $\beta, \gamma, \delta, \varepsilon, \zeta, \eta$ 6 个类别^[5],部分类别与肿瘤发生有密切联系^[6-7]。PLCD1 属于 PLC 超家族成员^[8],位于 3 号染色体短臂 22.3 区,该区域存在众多抑癌基因,如 PLCD1、FHIT、RASSF1A^[9]。在过去的研究中发现,PLCD1 在结直肠癌^[10]、胃癌^[11]、食管鳞癌^[12]、胰腺癌^[13]、乳腺癌^[14]、慢性粒细胞白血病^[15]中被证实发挥抑癌基因的效果。

本课题组的前期研究中,发现过表达的 PLCD1 在胰腺癌细胞系中阻滞细胞周期并促进胰腺癌细胞凋亡。但其对侵袭和迁移抑制的相关机制仍然不明,故本研究进一步探讨 PLCD1 在胰腺癌中的发生发展机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺癌细胞系 CAPAN-1、PLCD1 质粒和 Vector 质粒由分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室赠送。胰腺癌细胞系 BXP-3 购于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。PLCD1 基因引物购自南京金斯瑞生物科技有限公司合成;RNA 提取、逆转录、PCR 扩增试剂购自 Takara 公司;Lipo 6000TM 转染试剂、ECL 发光液、全蛋白提取试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司;无内毒素质粒中量提取试剂盒(Plasmid Mini Kit II)购自 OMEGA 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青公司;TranswellTM 小室购自康宁公司、MatrigelTM 基底膜基质胶购自 BD 公司;CCK-8 试剂盒购自上海锐赛生物技术有限公司;G418 购自 Amersco 公司。兔抗人 PLCD1 抗体购自 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 抗体购自博士德生物公司;兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 单克隆抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;BCA 全蛋白浓度测定试剂盒、HRP 标记的抗兔和抗鼠 IgG 二抗购自博士德生物公司。ERK1/2、p-ERK1/2 由 Santa 公司提供。

1.2 细胞培养

从 -80 °C 冰箱中取出细胞,快速移至 37 °C 水浴箱中,震动让其融化。向其中加入约 1 mL 含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基,吹打混匀后,分装在 2 个装有 3 mL 完全培养基的培

养皿中。随后将培养皿放置于 37 °C、5%CO₂ 细胞孵箱中。根据细胞生长速度与状态的差异,每 36~48 h 换液 1 次。当细胞融合度达 80%~90%时,可消化传代。

1.3 RT-PCR 检测 PLCD1 表达

使用 RNA 提取试剂盒提取各细胞系中的 RNA,使用 Takara 公司的逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。再使用 PCR 扩增试剂盒进行 PCR 反应。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像仪成像。PLCD1:F 5'-TGTCGCTACT-CAAGTGAGTC-3',R 5'-AGTCCTCTGAAGTTGTAG-3';其目的片段大小 197 bp。 β -actin:F 5'-TGACGTGGACATC-CGCAAAG-3',R 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3',其目的片段大小为 205 bp。

1.4 将 PLCD1 瞬时转染入胰腺癌细胞

使用质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit II)提取 PLCD1 质粒和 Vector 质粒(按说明书操作)。转染前 12 h,按 4.5×10^5 个/mL 细胞数接种于培养皿(6 cm)中,37 °C、5%CO₂ 孵箱中孵育 20 h。待细胞汇合度达 70%~80%时,将 5 μ g 质粒和 6 μ L Lipo 6000TM 试剂混合加入胰腺癌细胞,培养基不含 FBS(按说明书操作)。转染 4~6 h 后更换为含 FBS 的完全培养基。培养转染细胞 48 h 后,进行后续试验,实验分为 PLCD1 质粒转染组和 Vector 质粒转染组。

1.5 免疫印迹检测 PLCD1 及相关 EMT maker 蛋白表达

提取转染 PLCD1 质粒和 Vector 质粒 48 h 后的 CAPAN-1 和 BXP-3 胰腺癌细胞蛋白,用 BCA 法测定其蛋白浓度。加入 1/4 总体积的 5 $\times$ Buffer SDS 上样缓冲液,100 °C 水浴 10 min 使其变性;使用 12%的 SDS-PAGE 分离胶,每个电泳泳道加入 40 μ g 蛋白样品后;在 100 V 恒压条件下转膜,使用 0.2 μ m 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,在 50 g/L 脱脂牛奶封闭 90 min。在 4 °C 冻库中一抗过夜。次日在常温环境下,用 TBST 洗涤 15 min $\times$ 4 次,二抗在室温下孵育 1~2 h。随后用 TBST 洗涤 15 min $\times$ 4 次。最后在显影室中使用 ECL 发光液显影,用 Fusion 软件测量分析光密度。

1.6 CCK-8 检测转染 PLCD1 后胰腺癌的增殖能力

将细胞按照 PLCD1 组、Vector 组,每组设 5 个复孔,分别将转染 48 h 的胰腺癌细胞,接种于 96 孔板,每孔细胞控制在 5×10^3 个。每孔细胞溶液总量控制在 100 μ L。放置在细胞孵箱中,在 24、48、72 h 后进行 CCK-8 测量。每个时间点,于每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,并分别做 100 μ L 培养基与 10 μ L CCK-8 的空白对照孔。于细胞孵箱培养 2 h,再用酶标仪分析各孔 450 nm 处的光密度。

1.7 划痕实验检测转染 PLCD1 后胰腺癌的侧向运动能力

用 Maker 笔在 6 孔板底部垂直划一条红线,将 PLCD1 组和 Vector 组细胞接种于 6 孔板(5×10^5 个/孔),次日细胞融合度达 100%,用 10 μ L 枪头垂直于红线均匀划痕。PBS 清洗 2 次,加入含 2% FBS 的 DMEM 高糖培养基,倒置显微镜下拍

照,此时记录为 0 h。然后于 24、48 h 在相同位置拍照记录。

1.8 侵袭迁移实验检测转染 PLCD1 后胰腺癌细胞的侵袭迁移能力

1.8.1 迁移实验 将分别转染了 48 h 的 PLCD1 质粒和 Vector 质粒的胰腺癌细胞消化后,不含 FBS 的培养基重悬,调整细胞密度为 3.0×10^8 个/L,往小室内加入 200 μ L 细胞悬液,24 孔板中各孔加入 700 μ L 含 FBS 的 DMEM 培养基。再将小室放入孔板之中。孵育 24 h 后取出小室。用沾有 PBS 的棉签洗涤小室内壁细胞,4%多聚甲醛固定 25 min,自然风干后,用 1 g/L 结晶紫染色 25 min。自然风干后用 PBS 轻轻洗涤小室内侧壁。用显微镜计数穿膜细胞。

1.8.2 侵袭实验 将不含 FBS 的培养基与 Matrigel™ 基底膜基质胶按照 7:1 比例混合,每个小室内侧加入 50 μ L 混合液,孵育箱中放置 5~6 h,待其凝固后使用。其余步骤同迁移试验。

1.9 克隆形成试验

使用 G418 筛选、稳定转染细胞株。随后分别取 PLCD1 质粒组、Vector 质粒组稳定转染细胞,按 500 个/孔接种于 6 孔板中,每组 3 孔。胰腺癌细胞最低死亡浓度进行克隆形成,培养 2 周左右,PLCD1 转染组、Vector 质粒组中待克隆生长到肉眼可见的 50 个细胞左右,即可停止培养。首先在 PBS 清洗 2 次,随后用 4%多聚甲醛固定 25 min;固定完毕后用 0.1% 结晶紫染色 25 min,再用 PBS 清洗,待细胞表面干燥后拍照计数。

1.10 统计学处理

统计分析均使用 SPSS 24.0。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数间比较采用 *t* 检验。重复测量资料使用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 转染 PLCD1 后胰腺癌细胞 mRNA 及蛋白表达水平分析

为了深入研究过表达 PLCD1 对胰腺癌细胞的生物学行为影响,将 PLCD1 质粒和 Vector 质粒分别转染进胰腺癌细胞系中。在瞬时转染后 48 h,分别提取胰腺癌细胞的总 RNA 和蛋白质。运用半定量 PCR 和 Western blot 检验 PLCD1 表达水平。结果显示:与 Vector 组相比,PLCD1 组中 PLCD1

相对表达量显著提升(图 1),具有统计学差异(表 1)。这表明在胰腺癌细胞中的 PLCD1 质粒转染成功,可以用于后续实验。

表 1 不同处理组胰腺癌细胞 RT-PCR 和 Western blot 灰度值分析 ($n=3, \%$)

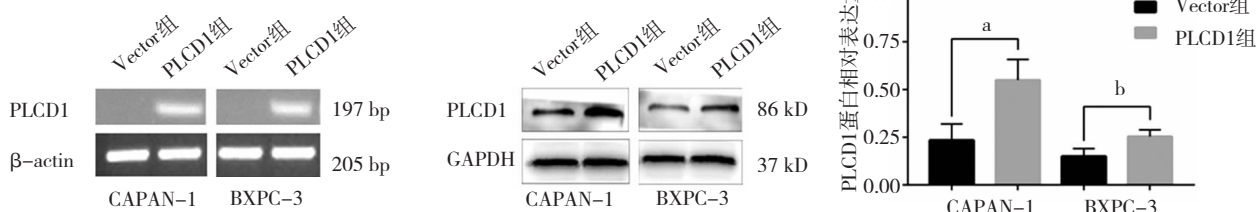
组别	RT-PCR校正灰度值		Western blot 校正灰度值	
	CAPAN-1	BXPC-3	CAPAN-1	BXPC-3
Vector组	0.23 $\pm$ 0.09	0.11 $\pm$ 0.22	0.23 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.02
PLCD1组	0.71 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.02
<i>P</i> 值	0.003	0.038	0.016	0.028

2.2 过表达 PLCD1 对胰腺癌细胞增殖的影响

为了检测 PLCD1 上调表达后对胰腺癌细胞 CAPAN-1 和 BXPC-3 增殖的影响,本研究设计了 CCK-8 和克隆形成实验检测细胞增殖情况。从图 2A 可见,各组肿瘤细胞 PLCD1 组光密度分析较 Vector 组低。重复测量方差分析发现,2 组细胞株的组间比较、时间比较、组间与时间交互作用均有显著差异(表 2),提示细胞组间光密度水平不同,各组各时间点的光密度水平有较大变化,且光密度有随时间变化的趋势。这说明转染 PLCD1 质粒后,胰腺癌增殖能力受到明显抑制。随后,使用 G418 筛选出稳定转染 PLCD1 的 CAPAN-1 和 BXPC-3 细胞,进行克隆形成实验。结果表明(图 2B),CAPAN-1 细胞中,稳定表达 PLCD1 的细胞形成的克隆数比 Vector 组下降(16 ± 2 vs. 132 ± 7),差异具有统计学意义($P=0.003$)。同时,在 BXPC-3 细胞中,稳定表达 PLCD1 的细胞形成的克隆数比 Vector 组下降(41 ± 9 vs. 104 ± 23),差异具有统计学意义($P=0.000$)。这些结果说明,PLCD1 会抑制胰腺癌细胞的增殖活力。

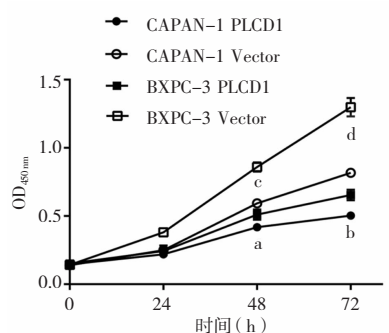
表 2 不同处理组胰腺癌细胞 OD_{450nm} 值 ($n=3$)

时间 / 组别	CAPAN-1		BXPC-3	
	Vector组	PLCD1组	Vector组	PLCD1组
0 h	0.13 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01
24 h	0.25 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.10	0.38 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.01
48 h	0.59 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.04
72 h	0.82 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02	1.30 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.04
组间比较	$F=238.45; P=0.000$		$F=505.565; P=0.000$	
时间比较	$F=1252.39; P=0.000$		$F=68.77; P=0.001$	
时间与分组交互	$F=128.15; P=0.000$		$F=405.94; P=0.000$	

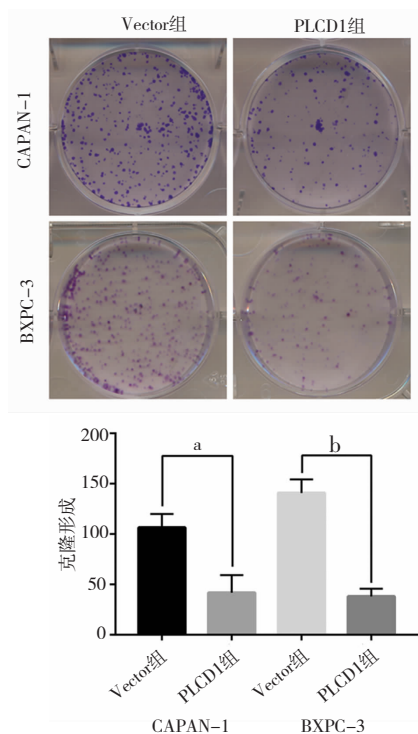


注:a,CAPAN-1 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.016$;b,BXPC-3 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.028$

图 1 转染 PLCD1 质粒在胰腺癌细胞中 mRNA 和蛋白质表达



A. CCK-8 检测增殖速率



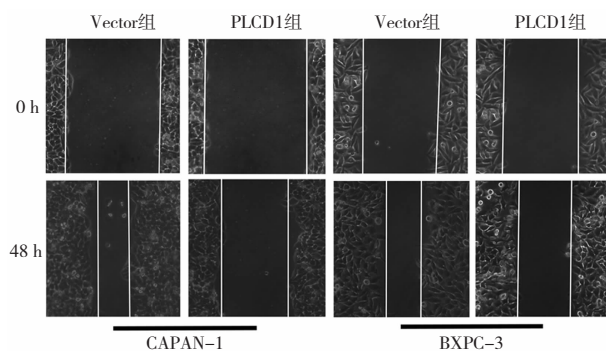
注:a,CAPAN-1 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.003$;
b:BXPc-3 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.000$

B. 克隆形成实验验证细胞增殖活力

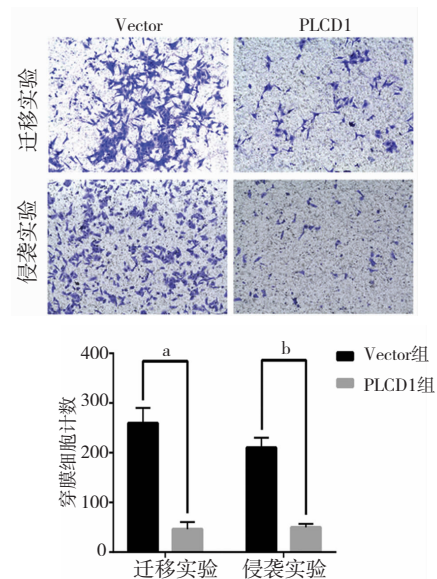
图2 PLCD1 抑制胰腺癌细胞增殖

2.3 过表达 PLCD1 对胰腺癌细胞侧向运动能力、侵袭及迁移能力的影响

为了探讨 CAPAN-1 和 BXPc-3 细胞表达 PLCD1 后对细胞运动能力的影响,本研究设计了划痕及 Transwell 迁移和侵袭实验。划痕实验结果显示(图 3A),CAPAN-1 细胞 48 h 的划痕愈合率,PLCD1 组较 Vector 组下降(33.45 ± 3.56 vs. 54.57 ± 5.92),差异具有统计学意义($P=0.012$);BXPc-3 细胞 48 h 划痕愈合率,PLCD1 组较 Vector 组下降(31.19 ± 1.29 vs. 49.05 ± 3.75),差异具有统计学意义($P=0.003$)。而 Transwell 实验结果表明,无论是侵袭还是迁移,与 Vector 组细胞相比 PLCD1 组中穿膜细胞数量明显减少(图 3B、C),其差异具有统计学意义(表 3)。这些结果说明,高表达 PLCD1 的胰腺癌细胞的细胞侧向运动能力、侵袭及迁移能力受到了抑制。

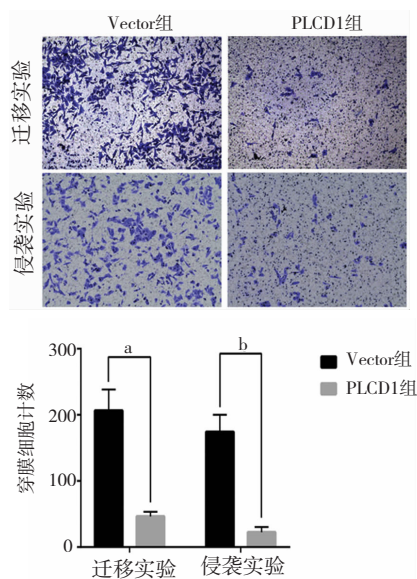


A. 划痕实验



注:a,CAPAN-1 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.000$;
b:CAPAN-1 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.000$

B. CAPAN-1 细胞中迁移、侵袭实验



注:a,BXPc-3 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.000$;b:BXPc-3 细胞中,与空质粒组相比, $P=0.000$

C. BXPc-3 细胞中迁移、侵袭实验

图3 PLCD1 抑制细胞的侵袭迁移能力

表 3 Transwell 实验中各组胰腺癌细胞穿膜细胞数 ($n=3$)

组别	CAPAN-1		BXPC-3	
	迁移	侵袭	迁移	侵袭
Vector组	259.3 ± 17.8	210.2 ± 11.5	206.3 ± 18.5	174.0 ± 15.1
PLCD1组	46.5 ± 8.3	49.7 ± 4.1	46.33 ± 4.1	22.3 ± 4.7
P 值	0.000	0.000	0.001	0.000

2.4 过表达 PLCD1 对 EMT 相关基因的影响

考虑到过表达 PLCD1 抑制胰腺癌细胞的侵袭及迁移能力,为深入探索 PLCD1 参与胰腺癌细胞侵袭及迁移的分子机制,本研究进一步通过 Western blot 检测在瞬转质粒后 CAPAN-1 和 BXPC-3 细胞系中上皮间充质转换相关基因的表达情况。结果表明,高表达 PLCD1 的胰腺癌细胞上皮细胞标志物 E-cadherin 表达上调。同时,间叶细胞标志物 N-cadherin 及 Vimentin 表达均下调(图 4,表 4 和表 5)。这些研究结果表明,胰腺癌细胞中表达 PLCD1 基因后,CAPAN-1 和 BXPC-3 细胞的上皮表型增强,同时间叶表型减弱,最终导致细胞运动能力减弱。文献发现在其他肿瘤中 PLCD1 抑制 MAPK/ERK 通路影响肿瘤的生物行为^[10,14],本研究使用 Western blot 探究转染 PLCD1 的胰腺癌 MAPK/ERK 信号通路相关分子表达情况。结果显示,p-ERK1/2 受到抑制(图 4,表 4 和表 5)。这些结果说明,在胰腺癌组织中 PLCD1 表达可能通过影响 MAPK/ERK 通路来影响 EMT。

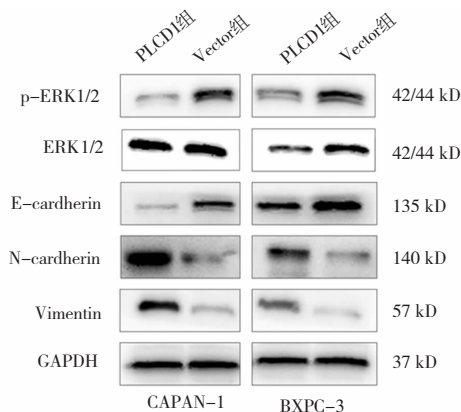


图 4 PLCD1 影响胰腺癌细胞中 EMT、MAPK/ERK 通路关键分子表达变化

表 4 不同处理组 CAPAN-1 细胞中 p-ERK1/2、ERK1/2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的相对表达量 ($n=3$, %)

组别	p-ERK1/2	ERK1/2	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
Vector组	1.01 ± 0.16	0.75 ± 0.07	0.34 ± 0.17	1.86 ± 0.33	0.85 ± 0.11
PLCD1组	0.59 ± 0.08	0.65 ± 0.15	0.75 ± 0.11	0.59 ± 0.20	0.34 ± 0.06
P 值	0.029	0.443	0.049	0.010	0.004

表 5 不同处理组 BXPC-3 细胞中 p-ERK1/2、ERK1/2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的相对表达量 ($n=3$, %)

组别	p-ERK1/2	ERK1/2	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
Vector组	1.08 ± 0.13	0.95 ± 0.20	0.65 ± 0.06	1.40 ± 0.33	0.66 ± 0.09
PLCD1组	0.48 ± 0.15	0.59 ± 0.17	1.06 ± 0.19	0.69 ± 0.04	0.29 ± 0.11
P 值	0.013	0.120	0.040	0.039	0.023

3 讨论

胰腺癌是人类常见的恶性肿瘤之一,以预后差著称。在美国,胰腺癌患者的 5 年生存率仅 8%^[2]。胰腺癌是一种容易发生早期转移的肿瘤,几乎 90% 的胰腺癌患者确诊时已发生远处转移^[2]。研究发现,人类 3 号染色体短臂 22.3 区 (3p22.3) 在诸多肿瘤中缺失^[7]。该区域存在众多肿瘤抑制基因,包括 PLCD1 基因。PLCD1 的缺失参与多种肿瘤生物学行为。在乳腺癌、胃癌中,通过 MSP 实验发现基因启动子区域存在异常的甲基化状态,因此用表观遗传学解释了 PLCD1 表达异常^[11,16]。在本课题组前期研究发现,PLCD1 基因对于结直肠癌^[10]、胃癌^[11]、食管癌^[12]和乳腺癌^[14]侵袭、迁移有抑制效果。本研究设计了划痕实验、Transwell 小室的侵袭迁移实验,结果证明上调 PLCD1 的表达会抑制胰腺癌细胞的侵袭、迁移能力,因此推测 PLCD1 基因与胰腺癌远处转移密切相关。

在胰腺癌转移机制的研究中,上皮间叶转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是参与肿瘤转移必不可少的机制^[17-18]。在诸多肿瘤中,EMT 是循环肿瘤细胞在体内播散中必不可少的机制^[19],参与肿瘤对化疗药物耐药性的形成^[20-21],也是肿瘤干细胞中多能分化必需的^[22]。结合 PLCD1 对胰腺癌细胞远处转移的抑制,本研究检验了 EMT 的关键标志物。本研究发现 PLCD1 的表达引起了 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 等 EMT 主要指标物的改变,提示 PLCD1 参与 EMT,也暗示 PLCD1 可能是通过抑制 EMT 来抑制胰腺癌细胞侵袭、迁移能力。对 EMT 而言,MAPK/ERK 等是其经典的上游调控信号通路。

本研究检验了 MAPK/ERK 通路中的关键指标 ERK 1/2 和 p-ERK 1/2, Western blot 发现 p-ERK 1/2 被 PLCD1 抑制, 提示过表达 PLCD1 可能抑制 MAPK/ERK 通路。本结论与 Shao 等^[14]、Satow 等^[10]的研究发现相似。Shao 等^[14]发现在乳腺癌中, 通过生物信息学推测出驱动蛋白 KIF3A 可能是 PLCD1 发挥作用的关键蛋白, 并且证明改变 KIF3A 可以减弱 PLCD1 对 MAPK/ERK 通路的作用。在 K-ras 突变的结直肠癌中, Satow 等^[10]发现 PLCD1 可以通过 E-cadherin 抑制 p-ERK 1/2。本课题组将在进一步实验中讨论胰腺癌中 PLCD1 是否也通过 KIF3A 发挥调控作用。

综上所述, 通过 PLCD1 重组质粒转染的胰腺癌细胞系 CAPAN-1 和 BXPC-3, 成功构建 PLCD1 高表达的细胞株, 进一步证明 PLCD1 高表达对胰腺癌细胞增殖、侵袭及迁移具有重要作用, 并且可能通过 MAPK/ERK 通路调控 EMT。这为后续相关研究奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, et al. Pancreatic cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10039): 73-85.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Lattanzio R, Piantelli M, Falasca M. Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis[J]. Adv Biol Regul, 2013, 53(3): 309-318.
- [5] Fukami K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes[J]. J Biochem, 2002, 131(3): 293-299.
- [6] Lo VV, Leopizzi M, Puggioni C, et al. Neuropeptide Y reduces the expression of PLCB2, PLCD1 and selected PLC genes in cultured human endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394(1-2): 43-52.
- [7] Yang Q, Yoshimura G, Mori I, et al. Chromosome 3p and breast cancer[J]. J Hum Genet, 2002, 47(9): 453-459.
- [8] Irino Y, Cho H, Nakamura Y, et al. Phospholipase C delta-type consists of three isozymes; bovine PLCδ2 is a homologue of human/mouse PLCdelta4[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(2): 537-543.
- [9] Qin YR, Fu L, Sham PC, et al. Single-nucleotide polymorphism-mass array reveals commonly deleted regions at 3p22 and 3p14.2 associated with poor clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 123(4): 826-830.
- [10] Satow R, Hirano T, Batori R, et al. Phospholipase Cδ1 induces E-cadherin expression and suppresses malignancy in colorectal cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(37): 13505-13510.
- [11] Hu XT, Zhang FB, Fan YC, et al. Phospholipase C delta 1 is a novel 3p22.3 tumor suppressor involved in cytoskeleton organization, with its epigenetic silencing correlated with high-stage gastric cancer[J]. Oncogene, 2009, 28(26): 2466-2475.
- [12] Fu L, Qin YR, Xie D, et al. Characterization of a novel tumor-suppressor gene PLCD1 at 3p22 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10720-10726.
- [13] 胡丹, 姜政. 磷脂酶 Cδ1 (PLCD1) 抑制 CAPAN-1 和 BXPC-3 胰腺癌细胞增殖和侵袭迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(6): 739-745.
- [14] Shao Q, Luo X, Yang D, et al. Phospholipase Cδ1 suppresses cell migration and invasion of breast cancer cells by modulating KIF3A-mediated ERK1/2/beta-catenin/MMP7 signalling[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29056-29066.
- [15] Song JJ, Liu Q, Li Y, et al. Epigenetic inactivation of PLCD1 in chronic myeloid leukemia[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(1): 179-184.
- [16] Mu H, Wang N, Zhao L, et al. Methylation of PLCD1 and adenovirus-mediated PLCD1 overexpression elicits a gene therapy effect on human breast cancer[J]. Exp Cell Res, 2015, 332(2): 179-189.
- [17] Le Large TYS, Bijlsma MF, Kazemier G, et al. Key biological processes driving metastatic spread of pancreatic cancer as identified by multi-omics studies[J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44: 153-169.
- [18] Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT: 2016[J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [19] Khoo BL, Lee SC, Kumar P, et al. Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy[J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 15578-15593.
- [20] Sosa MS, Parikh F, Maia AG, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RARβ-driven quiescence programmes[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6170.
- [21] Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance[J]. Nature, 2015, 527(7579): 472-476.
- [22] Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prx1[J]. Cancer Cell, 2012, 22(6): 709-724.

(责任编辑: 张辉洁)