

沉默 *PRR14* 基因抑制结肠癌 HCT116 细胞增殖

李方方, 刘鑫*

(陆军军医大学西南医院临床医学研究中心, 重庆 400038)

摘要 已有报道显示,富脯氨酸蛋白 14(proline-rich protein 14,PRR14)促进肿瘤的发生发展,但具体作用机制仍不清楚。本文以结肠癌细胞为模型,探索其对细胞增殖和细胞周期进程的影响。qPCR 和 Western 印迹检测发现,PRR14 在 4 个结肠癌细胞系中呈现高水平表达。合成特异靶向 *PRR14* 基因的 siRNA,转染结肠癌 HCT116 细胞。检测发现,*PRR14* 基因表达下调约 70%。CCK8 结果显示,沉默 *PRR14* 后各时间点细胞增殖能力均显著降低,克隆形成实验细胞克隆数减少约 40%;流式细胞仪结果显示,沉默 *PRR14* 后, G_1 期细胞比例升高约 10%,S 期细胞比例降低约 14%;BrdU 标记免疫荧光检测结果显示,BrdU 阳性细胞比例减少约 50%,表明细胞 DNA 合成速率显著降低。机制分析表明:促 G_1 /S 期转换基因周期蛋白依赖性激酶 2(cyclin dependent kinase 2,CDK2)mRNA 水平降低约 85%,对应的蛋白质水平也明显降低, G_1 /S 期转换抑制因子周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A,CDKN1A/P21)和周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1B(cyclin dependent kinase inhibitor 1B,CDKN1B/P27)mRNA 水平分别升高约 1.8 倍和 5 倍,对应的蛋白质水平也明显升高。沉默 *PRR14* 表达, G_1 /S 期相关基因表达紊乱,导致细胞 G_1 期阻滞并抑制细胞增殖。结肠癌细胞中 PRR14 高表达可促进癌细胞恶性增殖。

关键词 富脯氨酸蛋白 14; HCT116 细胞; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号 R735.3⁺5

PRR14 Silencing Inhibits Proliferation of Colon Cancer HCT116 Cells

LI Fang-Fang, LIU Xin*

(Clinical Medical Research Center, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract It has been reported that proline-rich protein 14 (PRR14) regulates cell proliferation and promotes the occurrence and development of tumors, but the specific mechanism is still unclear. In this paper, colon cancer HCT116 cells were used as a model to explore its effects on cell proliferation and cell cycle progression. qPCR and Western blotting revealed high expression of PRR14 in four colon cancer cell lines. SiRNA specifically targeting *PRR14* was synthesized and transfected into colon cancer HCT116 cells to construct a *PRR14* silencing cell model. CCK8 assays showed that the proliferation rate was significantly reduced at each time point after *PRR14* silencing, and the clone number of colony formation assays was reduced by about 40%. Flow cytometry results showed that the proportion of G_1 phase cells increased by about 10%, while that of S phase cells decreased by about 14% after *PRR14* silencing. The BrdU labeling was detected by immunofluorescence, results showed that the proportion of BrdU positive cells decreased by about 50%, indicating that the DNA synthesis rate was significantly reduced. The mRNA level of cyclin dependent kinase 2 (CDK2) was reduced by about 85%, and the corresponding

收稿日期: 2019-05-27; 修回日期: 2019-08-20; 接受日期: 2019-09-20
陆军军医大学西南医院常规院管项目(No.SWH2016JCYB-52)资助
* 通讯作者 Tel: 13883996795; E-mail: liux0704@tmmu.edu.cn
Received: May 27, 2019; Revised: August 20, 2019; Accepted: September 20, 2019
Supported by Routine Hospital Administration Project of Southwest Hospital (No. SWH2016JCYB-52)
* Corresponding author Tel: 13883996795; E-mail: liux0704@tmmu.edu.cn

protein level was significantly reduced. The mRNA levels of cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A/P21) and cyclin dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B/P27) were increased by about 1.8 and 5 times, respectively, and the corresponding protein levels were significantly increased. Silencing PRR14 disrupts G₁/S phase-related genes expression, leads to G₁ phase arrest and inhibits cell proliferation. In sum, high expression of PRR14 in colon cancer cells promotes malignant proliferation of cancer cells.

Key words proline-rich protein 14(PRR14); HCT116 cell; cell proliferation; cell cycle

结直肠癌是常见的消化系统肿瘤,在我国的发生率和死亡率均排在前 5,且呈逐年上升趋势^[1-4]。目前,结直肠癌发生发展的机制仍不清楚,研究其发生发展机制具有重要临床意义。恶性肿瘤的重要特征之一是过度增殖,而细胞周期进程紊乱与增殖失控密切相关。细胞周期进程的实现依赖于一系列级联调控精确而复杂的调节。大量研究表明,细胞周期紊乱导致细胞恶性增殖是细胞癌变的重要原因^[5-7]。目前,有关细胞周期调控及其与恶性肿瘤发生发展间的关系已取得大量研究成果,但仍有许多问题亟待解决。对不同类型肿瘤组织与细胞中参与调控细胞周期相关基因进行研究,不仅可以深入了解细胞周期调控的具体机制,而且对探索肿瘤等疾病发生发展的机制和研发抗肿瘤药物和实施精准治疗具有重要意义。

富脯氨酸蛋白 14 (proline-rich protein 14, PRR14)是富脯氨酸蛋白家族成员之一,其基因位于 16 号染色体,有 2 个转录本,2 个转录本编码同一个蛋白质。其蛋白质含有 585 个氨基酸残基,N-端和 C-端分别含有一段核定位序列,中间为保守的富含脯氨酸区域,在其 N-端还含有 HP1 的结合区域,参与结合异染色质^[8, 9]。早期研究发现,其在细胞周期进程中随着核纤层周期性的崩解和重建而呈现动态的分布,功能是靶向 HP1 标记的异染色质,使其定位于核纤层^[8, 9]。PRR14 还被发现是通过结合 HP1 激活 MyoD 的活性参与骨骼肌细胞的生成^[10]。关于 PRR14 在肿瘤中的功能,研究表明,PRR14 在肺癌中高表达,其富脯氨酸区域可与 GRB2 蛋白的 SH3 结构域结合以激活 PI3K/AKT 通路,并且仅 PRR14 富含脯氨酸的肽段就可激活 PI3K/AKT 通路,促进肺癌细胞体外增殖和体内成瘤^[11]。该作者还利用 TCGA 数据库分析了 PRR14 在多种肿瘤和对应正常组织中的 mRNA 表达,结果发现,PRR14 在包括结肠癌在内的多种肿瘤组织中呈现高表达^[12]。PRR14 可以作为判断非小细胞肺癌病人预后的指标之一^[13]。在乳腺癌细胞中,PRR14 通过 Ras 通路促进细胞增殖^[14]。但迄今为止,关于

PRR14 在结肠癌中的作用仍未见文献报道。本研究以结肠癌 HCT116 细胞为模型,检测 PRR14 对细胞增殖,周期进程及相关基因表达的影响,探讨其在结肠癌细胞增殖中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

针对 PRR14 的 siRNA 和阴性对照 siRNA 由上海吉码公司合成。siRNA 转染试剂 Lipofectamine RNAiMax (13778150) 购自 Invitrogen 公司。PCR 引物由上海生工生物公司合成。总 RNA 提取试剂盒 (DP419) 购自天根生化科技有限公司,反转录试剂盒 (FSQ-101) 和荧光定量 PCR 试剂盒 (QPK-212) 购自 Toyobo 公司。CCK-8 试剂 (HY-k0301) 购自 Med Chem Express 公司。蛋白质提取试剂盒 T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (78510) 购自 Thermo 公司。细胞周期检测试剂盒 (c1052) 购自碧云天公司。BrdU (Ab142567) 购自 Abcam 公司。兔抗人 PRR14 抗体 (HPA060265) 购自 Sigma 公司。细胞周期相关调控蛋白抗体试剂盒 (9932T) 购自 Cell signaling technology 公司,内含兔抗 CDK2、兔抗 P21、兔抗 P27。大鼠抗 BrdU 抗体 (ab6326)、Alexa Fluor555 标记羊抗兔抗体 (ab150078)、Alexa Fluor488 标记羊抗大鼠抗体 (ab150157) 购自 Abcam 公司。细胞核染色试剂 DAPI (c1005) 购自碧云天公司。

1.2 siRNA 设计及转染

PRR14 进行 RNAi 所用的 siRNA 序列参考文献 [8], siRNA 正义链的序列为: 5'-GGACUGCCUC GACCAAU CATT-3', 反义链序列为: 5'-UGAUUGG UCGAGGCAGUCCTT-3'。阴性对照 NC siRNA 的正义链序列为: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链序列为: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。收集对数生长期的 HCT116 细胞,以 1.5×10⁶ 个/孔的密度接种至 6 孔板,转染参照 Lipofectamine RNAiMax 说明书进行。转染后 48 h,收集细胞进行后期检测。

1.3 RNA 提取和 RT-PCR 检测

RNA 提取、反转录参照试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列如下, *PRR14* 上游引物: 5'-GCACCACAGCTACCATCAGG-3', 下游引物: 5'-CCGGTCCACCTTTTGTGAAG-3'。 *CDK2* 上游引物: 5'-CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA-3', 下游引物: 5'-TTCATCCAGGGGAGGTACAAC-3'。 *P21* 上游引物: 5'-TGTCCGTCAGAACCCATGC-3', 下游引物: 5'-AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC-3'。 *P27* 上游引物: 5'-AACGTGCGAGTGTCTAACGG-3', 下游引物: 5'-CCCTCTAGGGTTTGTGATTCT-3'。 *GAPDH* 上游引物: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。 SYBR green qPCR 试剂用法参照试剂说明书,反应体系为 10 μ L。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析定量 PCR 结果。

1.4 Western 印迹检测

细胞用蛋白质提取裂解液在冰上裂解 30 min,用 BCA 法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 和转膜按常规操作步骤进行。转膜后用 5% BSA 室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。用 Super Singal West Dura 发光试剂盒显色。

1.5 免疫荧光检测

将 5×10^5 的细胞提前 1 d 铺至共聚焦培养皿中,过夜培养。第 2 d 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min, PBS 清洗 3 次,用 0.3% 的 Triton 打孔 10 min,用 10% 的山羊血清封闭 1 h,加入 *PRR14* 抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。第 3 d 用 PBS 清洗细胞,加入荧光二抗,室温孵育 1 h,加入 DAPI 染色液孵育 10 min, PBS 清洗 3 次,拍照。BrdU 标记-免疫荧光检测实验步骤如下:细胞提前 1 d 铺至共聚焦培养皿中,转染 siRNA, 48 h 后加入 BrdU, 10 μ mol/L 终浓度,细胞培养箱中孵育 1 h,依次按以下步骤进行: 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.3% Triton 通透 15 min, 2 N 盐酸处理 20 min,用四硼酸钠中和 5 min, 5% BSA 封闭 1 h,抗 BrdU 一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,二抗室温孵育 1 h, DAPI 染色液染核 10 min, Zeiss LSM780 激光共聚焦显微镜拍照。

1.6 CCK-8 检测细胞增殖

细胞转染 siRNA 24 h 后胰酶消化,计数,将细胞以 1 000 个细胞/孔铺至 96 孔板中。贴壁 6 h 后加入 CCK-8 试剂,细胞培养箱中孵育 1 h,用多功能读数仪检测 450 nm 波长的吸光值,作为 0 h 的 *A* 值。接下来分别于 24 h、48 h、72 h 孵育 CCK-8,检

测吸光值 *A*。

1.7 流式细胞术检测细胞周期

细胞转染 siRNA 48 h,胰酶消化后离心收集细胞,用 70% 的乙醇 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜,第 2 d 离心收集细胞,用冷 PBS 洗 2 次,用碧云天周期检测试剂盒配置含 RNase 的 PI 染色液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 0.5 h,用流式细胞仪检测。

1.8 统计学方法

各实验均重复 3 次,实验数据以均数 \pm 标准差的形式表示,统计学差异使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行分析,实验组与对照组比较采用两独立样本 *t* 检验,双侧检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 在结肠癌 HCT116 细胞中 *PRR14* 的表达及其在细胞中的定位

为了分析 *PRR14* 在结肠癌细胞系中的表达情况,首先利用 4 种结肠癌细胞系 (HCT116、RKO、SW620 和 SW480) 分析了 *PRR14* 在 mRNA 和蛋白质水平表达情况。结果显示,*PRR14* 在 4 种细胞系中都有高水平表达,其中 HCT116 中表达水平最高 (Fig. 1A, B)。免疫荧光检测 *PRR14* 在 HCT116 细胞的表达和定位情况。结果显示,*PRR14* 在细胞周期各时期都有强荧光信号,其在细胞中有位于核周 (白色箭头所示)、在核内呈弥散状分布 (绿色箭头所示) 和分散在整个细胞中 (红色箭头所示) 3 种形态 (Fig. 1C)。结合文献^[8]报道,以及根据细胞核形态判断细胞所处的周期时相发现,*PRR14* 在细胞间期主要定位于细胞核周围,而分裂前期在细胞核中成弥散状分布,中期开始分散在整个细胞中,末期又重新定位于核周 (Fig. 1D)。这些研究结果表明,*PRR14* 在结肠癌细胞中呈现高表达,且其在细胞中的定位与细胞周期时相有关。

2.2 在结肠癌 HCT116 细胞中沉默 *PRR14* 抑制细胞增殖

基于结肠癌细胞系检测结果,利用 HCT116 细胞为模型,深入探索 *PRR14* 在结肠癌中的作用。HCT116 细胞转染 siRNA 48 h 后分别用 qPCR 和 Western 印迹检测 *PRR14* mRNA 和蛋白质表达水平。qPCR 结果显示,与对照 Mock 组 (1.000 ± 0.069) 和 siNC 组 (0.992 ± 0.062) 相比, si*PRR14* 组 (0.303 ± 0.016) *PRR14* 的 mRNA 水平降低约 70% ($P < 0.01$) (Fig. 2A)。Western 印迹结果显示, si*PRR14* 组 *PRR14* 蛋白质水平明显低于阴性对照

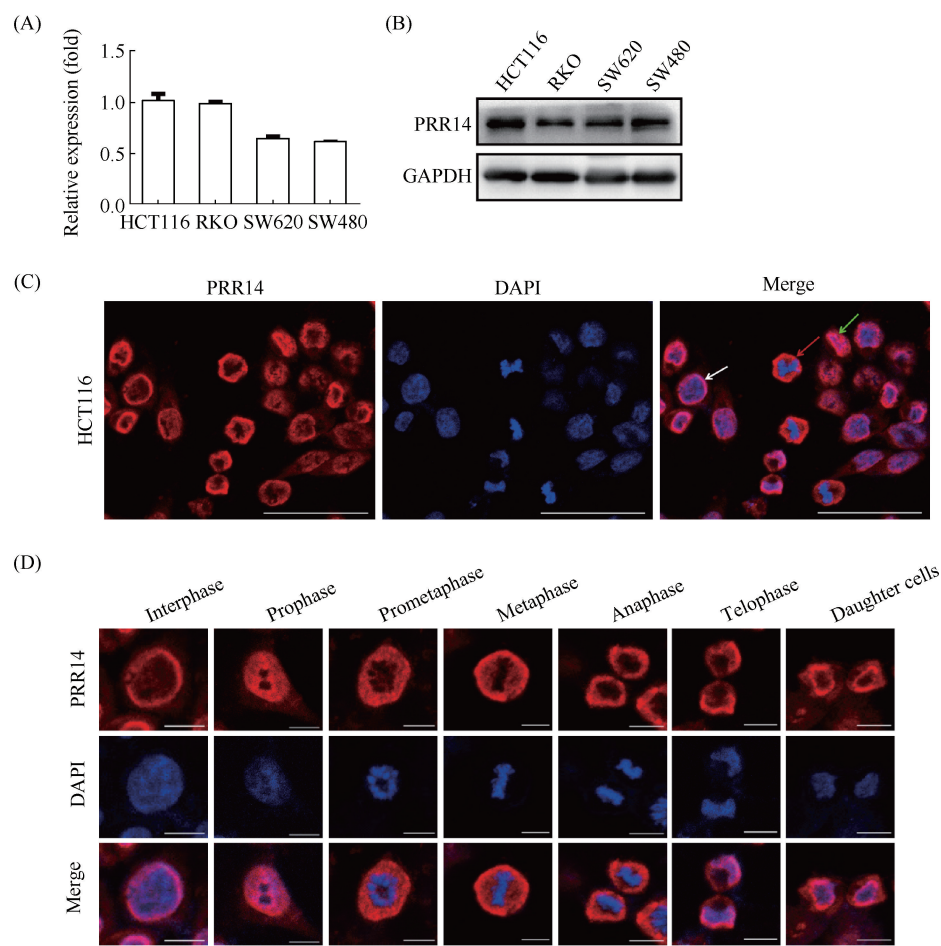


Fig.1 Expression and localization of PRR14 in colon cancer cells (A, B) qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of PRR14 in four colon cancer cell lines, respectively. (C) Expression and localization of PRR14 in HCT116 cells. Cells were fixed, stained with an anti-PRR14 antibody, and imaged using confocal microscopy. The white arrow represents PRR14 located around the nucleus, the green arrow represents PRR14 dispersed throughout the nucleus, and the red arrow represents PRR14 dispersed throughout the cell. Scale bar was 50 μm . (D) Localization of PRR14 at various cell cycle phases in HCT116. Scale bar was 10 μm . $n = 3$

siNC 组,表明所用 siRNA 能有效抑制 *PRR14* 表达 (Fig.2B)。用 CCK-8 和克隆形成实验检测干扰 *PRR14* 对细胞增殖的影响,CCK8 的结果显示,相对于 siNC 组(0 h:0.233 \pm 0.001、24 h:0.325 \pm 0.007、48 h:0.531 \pm 0.016、72 h:0.981 \pm 0.055), siPRR14 组(0 h:0.220 \pm 0.002、24 h:0.284 \pm 0.004、48 h:0.379 \pm 0.004、72 h:0.598 \pm 0.014) 细胞在 24 h、48 h、72 h 增殖速率均显著降低($P<0.01$) (Fig.2C);克隆形成的结果显示,与 siNC 组(52.000 \pm 3.786)相比, siPRR14 组(30.333 \pm 2.333) 细胞克隆数减少约 40%($P<0.01$) (Fig.2D),表明沉默 *PRR14* 基因抑制细胞的增殖。

2.3 沉默 *PRR14* 基因导致细胞周期阻滞于 G_1 期

HCT116 细胞转染 siRNA 48 h,用流式细胞术检测细胞周期分布。结果显示,与对照 siNC 组相比,

siPRR14 组各时相细胞所占比例: G_1 期 (siNC 组: 25.033 \pm 1.169、siPRR14 组:35.933 \pm 2.994) 增加约 10% ($P<0.05$); S 期 (siNC 组: 50.803 \pm 1.735、siPRR14 组: 36.857 \pm 3.819) 减少约 14% ($P<0.05$); G_2/M 期 (siNC 组: 24.163 \pm 1.490、siPRR14 组: 27.210 \pm 5.369) 无明显变化 (Fig.3 A,B)。这些研究结果表明,HCT116 细胞中沉默 *PRR14* 基因诱导细胞阻滞在 G_1 期。

2.4 沉默 *PRR14* 基因抑制细胞 DNA 合成

细胞周期进程中,S 期主要负责合成基因组 DNA。通过分析 DNA 合成情况可直观反映细胞 S 期进程。BrdU 是胸腺嘧啶类似物,在 DNA 合成中可嵌入新合成 DNA 序列中,利用抗 BrdU 特异抗体即可分析新合成 DNA 情况。HCT116 细胞转染 siRNA 48 h 后用 BrdU 标记 DNA 合成,免疫荧光检

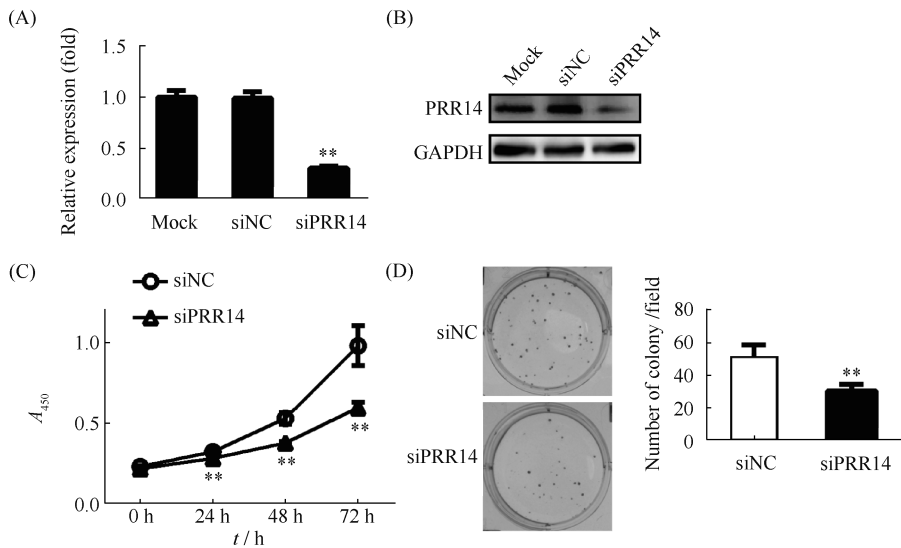


Fig.2 PRR14 was silenced with siRNA in HCT116 cells, and the effect of PRR14 silencing on proliferation was detected (A, B) Cells were transiently transfected with the NC siRNA and PRR14 siRNA, respectively. Total RNA and cell lysates were extracted at 48 hours after transfection and used to detect the expression of PRR14 at both mRNA and protein levels by qPCR and Western blotting, respectively. ** $P<0.01$, vs Mock, vs siNC. (C&D) CCK8 assays and colony formation assays were used to detect the proliferation ability after PRR14 silencing in HCT116 cells, respectively. ** $P<0.01$, vs siNC. $n=3$

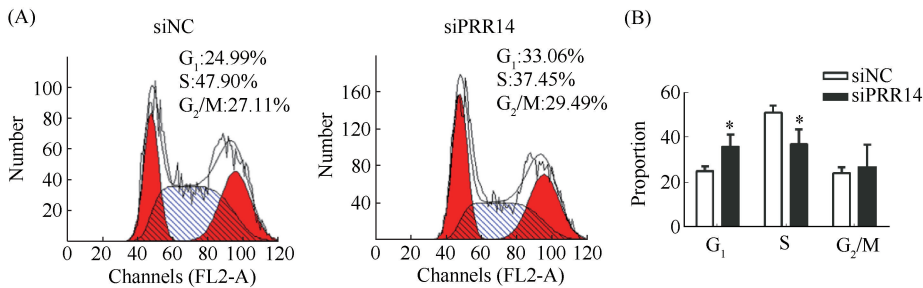


Fig.3 Effects of silencing PRR14 on cell cycle distribution of HCT116 cells (A) Cell cytometry was used to detect the cell cycle distribution after transfection of PRR14 siRNA in HCT116 cells for 48 hours. (B) The proportion of cells in each phase was calculated. * $P<0.05$, vs siNC. $n=3$

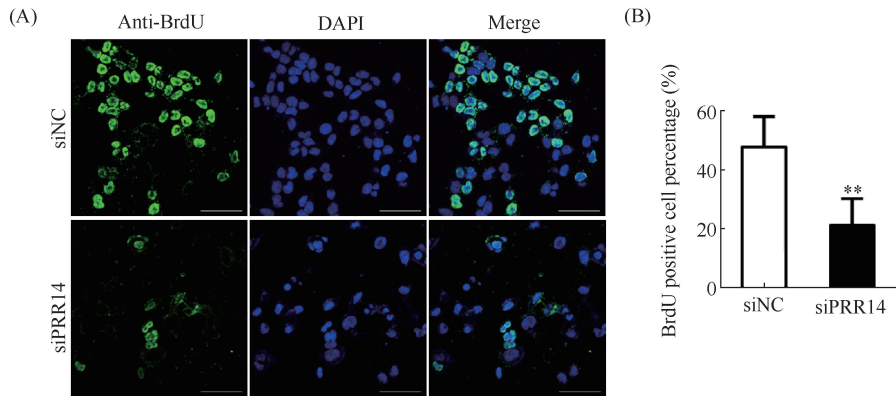


Fig.4 Effects of silencing PRR14 expression on DNA synthesis of HCT116 cells (A) After transfection of PRR14 siRNA in HCT116 cells for 48 hours, BrdU was added to the cell culture medium and incubated for one hour, then immunofluorescence assay was performed to detect the BrdU positive cells. Scale bar was 50 μm . (B) The proportion of BrdU positive cells was calculated. ** $P<0.01$, vs siNC. $n=3$

测。结果显示,与对照 siNC 组(47.834 ± 4.604)%相比,siPRR14 组(21.226 ± 4.019)% 细胞中 BrdU 阳性细胞比例减少约 50% ($P<0.01$) (Fig.4A、B)。表明沉默 PRR14 后具有 DNA 合成活性的细胞数明显减少,细胞 DNA 合成受到抑制,这与流式细胞检测结果沉默 PRR14 导致细胞周期阻滞在 G₁ 期吻合。

2.5 沉默 PRR14 基因影响 G₁/S 期转换相关周期调控基因的表达

为了进一步探索沉默 PRR14 表达抑制细胞周期进程的分子机制,检测了细胞周期相关基因的表达情况。HCT116 细胞转染 siRNA 48 h 时,分别提取细胞总 RNA 和总蛋白质,检测 G₁/S 期转换相关

周期基因 CDK2、细胞周期蛋白 E、P21、P27 mRNA 和蛋白质的表达水平。qPCR 结果显示,沉默 PRR14 后,促进 G₁/S 期转换的基因 CDK2 (siNC 组: 1.002 ± 0.048 、siPRR14 组: 0.143 ± 0.007) mRNA 水平降低约 85% ($P<0.01$),抑制 G₁/S 期转换基因 P21 (siNC 组: 1.018 ± 0.133 、siPRR14 组: 1.877 ± 0.068) ($P<0.01$) 和 P27 (siNC 组: 1.002 ± 0.042 、siPRR14 组: 5.427 ± 0.067) ($P<0.01$),mRNA 水平分别上调约 1.8 倍和 5 倍(Fig.5A)。Western 印迹结果显示,沉默 PRR14 后,CDK2 和细胞周期蛋白 E 蛋白质水平降低,P21 和 P27 蛋白质水平升高(Fig.5B),表明 PRR14 影响 G₁/S 期转换周期基因的表达。

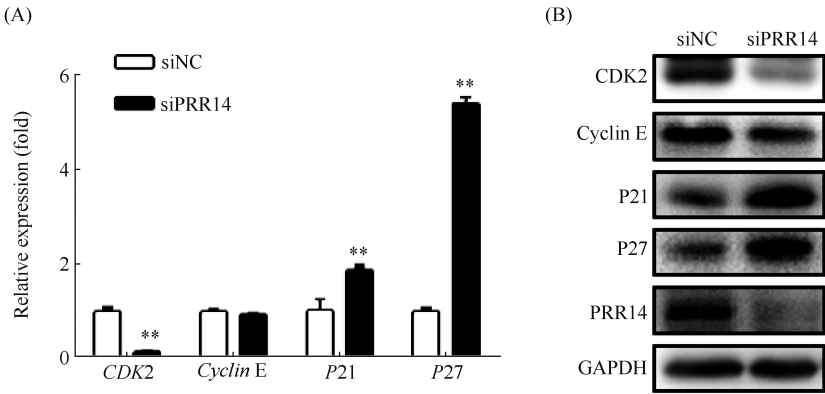


Fig.5 Cell cycle-related molecules expression change following PRR14 silencing (A) qPCR was used to detect the mRNA expression levels of cell cycle genes after transfection of PRR14 siRNA in HCT116 cells for 48 hours. (B) Western blotting was used to detect the protein levels of cell cycle markers. ** $P<0.01$, vs siNC. $n=3$

3 讨论

肿瘤的发生与细胞的恶性增殖相关,抑制肿瘤细胞增殖是有效的抗肿瘤手段。本研究发现,PRR14 在多个结肠癌细胞中呈现高水平表达。沉默 PRR14 基因可显著抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖及细胞周期进程,提示抑制 PRR14 基因表达可能成为抑制结肠癌细胞增殖的有效手段,为临床治疗结肠癌提供了一个新的方向。

PRR14 蛋白促进肿瘤细胞增殖已有报道。在肺癌中,PRR14 通过激活 PI3K 通路促进肺癌细胞的增殖^[11, 12]。在乳腺癌细胞中,PRR14 通过促进 Ras 通路促进细胞生长^[14]。而在本文的研究中,检测到 PRR14 促进结肠癌细胞生长。免疫荧光检测 PRR14 在 HCT116 细胞中表达和定位情况,发现 PRR14 在细胞周期各时期都高表达,且其在间期定位于细胞核周围,分裂期前期弥散状分布在细胞核中,中期随着核膜的崩解分散在整个细胞中,分裂末期随着核膜的重构重新定位于细胞核周。这一现象

与已有文献报道的 PRR14 在细胞周期的间期定位于核纤层,在分裂期前期、中期呈弥散状,分裂末期重新定位于核纤层相一致^[8]。这些结果均表明,PRR14 在细胞中定位与周期时相有关。同时提示,其促进细胞增殖可能与细胞周期进程相关。进一步研究发现,沉默 PRR14 基因导致结肠癌细胞 G₁ 期细胞比例增加,S 期细胞比例下降,表明 PRR14 在推动 G₁/S 期转换过程中发挥了作用,PRR14 通过促进 G₁/S 期转换促进细胞增殖。

PRR14 参与调节多种恶性肿瘤细胞的增殖过程,但其在细胞周期进程中的具体调控机制仍不清楚。多种蛋白质调控细胞周期 G₁/S 期转换,如 CDK2 与细胞周期蛋白 E 结合并活化,磷酸化 Rb 蛋白,保证细胞顺利通过 G₁ 期进入 S 期和促进 DNA 合成^[15-17]。另外,细胞周期进程中存在监控各时相事件顺利完成的调控机制叫做细胞周期检验点。P21 和 P27 是 G₁/S 期检验点的 2 个关键蛋白质,P27 是 CDK2 的抑制因子^[18, 19]。P21 是 P53 的下

游,在 DNA 损伤时介导细胞 G₁ 期阻滞^[20, 21]。为了明确 PRR14 在细胞周期调控中的作用机制,本文利用 HCT116 分析 PRR14 沉默后,CDK2、细胞周期蛋白 E、P21、P27 等与 G₁/S 期相关的细胞周期蛋白质和激酶的表达变化。结果发现,促进 G₁/S 期转换基因 CDK2、细胞周期蛋白 E 表达受到抑制,而抑制 G₁/S 期转换基因 P21 和 P27 表达增强;同时,我们在另一株结肠癌细胞系 RKO 中也获得相似检测结果(数据本文未展示)。以上结果提示,PRR14 基因沉默可能通过增加 P21 和 P27 的表达,抑制 CDK2 等蛋白质的表达从而引起细胞周期 G₁ 期阻滞。且本研究结果沉默 PRR14 后,P21 和 P27 作为 G₁ 期检验点表达上调,结合文献 PRR14 有锚定异染色质到核纤层的功能^[8],推测沉默 PRR14 可能影响了异染色质的定位,使细胞不能顺利通过检验点而阻滞在 G₁ 期,进而 S 期减少、DNA 合成能力降低。以上推测还需更多实验验证。

综上所述,本研究综合利用 siRNA 介导的基因沉默、qPCR、Western 印迹、流式细胞术和免疫荧光等方法,探讨 PRR14 在结肠癌细胞中的表达水平、对结肠癌 HCT116 细胞增殖、周期进程的影响,阐明了 PRR14 通过影响细胞周期进程影响细胞的增殖。后续的工作,将进一步研究 PRR14 表达与结肠癌临床病人的相关性及其调控 G₁/S 期转换和细胞周期基因表达的具体机制,深入探索 PRR14 参与细胞周期调控及在肿瘤发生发展中的分子机制。

参考文献 (References)

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, **67**(1): 7-30

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132

[3] Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, *et al.* Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2017, **18**

(1).pii: E197

[4] Zhang Y, Chen Z, Li J. The current status of treatment for colorectal cancer in China: A systematic review [J]. Medicine (Baltimore), 2017, **96**(40): e8242

[5] Vassilev A, DePamphilis ML. Links between DNA Replication, Stem Cells and Cancer [J]. Genes (Basel), 2017, **8**(2). pii: E45

[6] Kar S. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer [J]. Cell Syst, 2016, **2**(1): 8-10

[7] Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer [J]. J Pathol, 2012, **226**(2): 352-364

[8] Poleshko A, Mansfield KM, Burlingame CC, *et al.* The human protein PRR14 tethers heterochromatin to the nuclear lamina during interphase and mitotic exit [J]. Cell Rep, 2013, **5**(2): 292-301

[9] Poleshko A, Katz RA. Specifying peripheral heterochromatin during nuclear lamina reassembly [J]. Nucleus, 2014, **5**(1): 32-39

[10] Yang M, Yuan ZM. A novel role of PRR14 in the regulation of skeletal myogenesis [J]. Cell Death Dis, 2015, **6**: e1734

[11] Yang M, Lewinska M, Fan X, *et al.* PRR14 is a novel activator of the PI3K pathway promoting lung carcinogenesis [J]. Oncogene, 2016, **35**(42): 5527-5538

[12] Xiao S, Yang M. Discovery of a novel target for cancer: PRR14 [J]. Cell Death Dis, 2016, **7**(12): e2502

[13] Yu H, Zhou P, Li D, *et al.* PRR14 is an independent predictor of poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, **10**(6): 6735-6742

[14] Yang M, Long MJ, Shi XL, *et al.* PRR14, a novel regulator of Ras signaling pathway [C]. AACR Annual Meeting 2017. Cancer Research, 2017

[15] Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms [J]. Oncogene, 2009, **28**(33): 2925-2939

[16] Champeris Tsaniras S, Kanellakis N, Symeonidou IE, *et al.* Licensing of DNA replication, cancer, pluripotency and differentiation: an interlinked world? [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, **30**: 174-180

[17] Mughal MJ, Mahadevappa R, Kwok HF. DNA replication licensing proteins: Saints and sinners in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2019, **58**: 11-21

[18] Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2008, **8**(4): 253-267

[19] Moller MB. P27 in cell cycle control and cancer [J]. Leuk Lymphoma, 2000, **39**(1-2): 19-27

[20] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, **9**(6): 400-414

[21] Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J]. DNA Repair (Amst), 2016, **42**: 63-71