

肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型表达对结肠癌预后及 5-FU 化疗敏感性的作用研究

孙奋琪¹, 曹小梅¹, 邹佳杰¹, 王福花², 杨瑞红², 郭素堂²

(1.山西医科大学基础医学院,山西 太原 030001; 2.山西省肿瘤医院,山西 太原 030013)

摘要: [目的] 研究肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型 (inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B) 的表达对结肠癌预后及氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU) 药物敏感性的影响及其机制。[方法] 通过免疫组织化学方法和 R2 在线工具分析 INPP4B 在结肠癌组织的表达及其与预后的关系。构建敲减或过表达 INPP4B 质粒,分别转染结肠癌细胞株 WiDr 细胞和 SW480 细胞,通过实时荧光定量 PCR 技术检测 INPP4B mRNA 的表达情况。通过 Western blot 技术检测细胞中 INPP4B、磷酸化的 Akt(pAkt)和 p27 的表达情况。使用 CCK-8 检测细胞的增殖能力。采取流式细胞术检测细胞的凋亡率和细胞周期的分布。[结果] INPP4B 高表达与结肠癌患者预后不良相关($P<0.05$)。敲减 INPP4B 后,5-FU 处理细胞 24 h,发现与 WiDr shControl 细胞相比,WiDr shINPP4B 细胞存活率显著降低($P=0.011$),凋亡率显著增高($P<0.001$),G₀/G₁ 期细胞比例显著升高($P<0.001$)。过表达 INPP4B 后,与 SW480 空载细胞相比,SW480 INPP4B 细胞存活率显著升高($P=0.002$),凋亡率显著降低($P=0.002$),G₀/G₁ 期的细胞比例显著降低($P=0.001$)。5-FU 处理结肠癌细胞后,与 WiDr shControl 细胞相比,WiDr shINPP4B 细胞中 pAkt (Ser473) 的水平显著降低 ($P=0.003$),pAkt (Thr308)的水平显著降低($P<0.001$),p27 蛋白的表达显著升高($P<0.001$);与 SW480 空载细胞相比,SW480 INPP4B 细胞中 pAkt (Ser473)的水平显著升高($P<0.001$),pAkt (Thr308)的水平显著升高($P<0.001$),p27 蛋白的表达显著降低($P<0.001$)。[结论] INPP4B 高表达与结肠癌患者不良预后相关,并通过激活 Akt/p27 信号轴降低结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。

关键词: 肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型;结肠癌;氟尿嘧啶;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2022)04-0311-10

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2022.04.A009

Relationship of INPP4B Expression with Prognosis of Colon Cancer and Its Effect on Chemosensitivity of Colon Cancer Cells

SUN Fen-qi¹, CAO Xiao-mei¹, ZOU Jia-jie¹, WANG Fu-hua², YANG Rui-hong², GUO Su-tang²

(1. Basic Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shanxi Cancer Hospital, Taiyuan 030013, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the relationship of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (INPP4B) with prognosis of colon cancer and its effect on chemosensitivity of colon cancer cells. [Methods] The correlation between expression of INPP4B and prognosis of colon cancer patients was analyzed with bioinformatics methods. Lentivirus-mediated knock-down or overexpressing INPP4B cell lines were constructed with human colon cancer WiDr or SW480 cells. The expression of INPP4B mRNA and protein was detected by real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blotting, respectively; the phosphorylated Akt (pAkt) and p27 were detected by Western blotting; cell proliferation ability was measured with cytotoxicity kit-8(CCK-8); the apoptotic rate and cell cycle distribution were determined with flow cytometry. [Results] Kaplan-Meier survival analysis showed that the high expression of INPP4B was correlated with poor prognosis of colon cancer patients($P<0.05$). Compared to control cells, INPP4B knockdown increased the sensitivity of colon cancer cells to 5-FU significantly($P=0.011$), enhancing 5-FU-induced cell apoptosis($P<0.001$) and increasing 5-FU-induced G₁ arrest($P<0.001$) of colon cancer cells. Compared to vector control, over-expression of INPP4B decreased the sensitivity of colon cancer cells to 5-FU significantly($P=0.002$), attenuated 5-FU-induced cell apoptosis($P=0.002$) and decreasing 5-FU-induced G₁ arrest ($P=0.001$) of colon cancer cells. Knockdown of INPP4B in colon cancer cells significantly decreased p-AKT protein expression($P=0.003$) and enhanced p27 protein expression($P<0.001$) compared to control cells. Overexpression of INPP4B in colon cancer cells increased p-AKT protein expression($P<0.001$) and reduced p27 protein expression($P<0.001$). [Conclusion] INPP4B is correlated with poor prognosis of colon cancer patients and it can decrease the sensitivity of colon cancer cells to 5-FU via AKT/ p27 signal pathway.

Key words: INPP4B; colon cancer; 5-FU; cell cycle; apoptosis

收稿日期:2022-01-09;修回日期:2022-02-26

基金项目:国家自然科学基金(81972840)

通信作者:郭素堂,E-mail:sutangguo@aliyun.com

结肠癌(colon cancer)是世界上严重威胁人类生命的恶性肿瘤之一^[1]。近年来,我国结肠癌的发病率和死亡率均呈逐年上升趋势。对化疗药物的耐受引起的复发和转移是导致结肠癌患者死亡率偏高的主要原因。氟尿嘧啶(5-FU)通常作为一线药物用于结肠癌的治疗,但是许多患者对以5-FU为主的化疗产生耐药^[2]。治疗失败的根本原因是晚期患者往往存在对药物的先天或者获得性抗性,严重影响了结肠癌的治疗和预后^[2]。5-FU耐药机制为多基因、多因素参与。寻找和发现这些基因对于探讨结肠癌治疗抵抗具有重要的意义。

肌醇多磷酸酯-4-磷酸酶 II 型(INPP4B)是 PI3K/Akt 信号通路关键负向调控因子之一^[3]。研究表明,INPP4B 是一种具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重功能的蛋白,在不同肿瘤中发挥不同作用^[4]。如在三阴性乳腺癌^[5-6]、前列腺癌^[7]、肝癌^[8]和宫颈癌^[9]等中,INPP4B 被发现是一种肿瘤抑制因子,通过抑制 PI3K/Akt 信号转导通路从而抑制肿瘤的生长。但是,INPP4B 在诸如急性髓系白血病(AML)^[10-11]、黑色素瘤^[12]、结肠癌^[13]和喉癌^[14]等肿瘤中发挥促癌因子作用。进一步的研究显示,INPP4B 与多种肿瘤的预后及治疗抗性相关^[4]。如 INPP4B 的高表达与 AML 的不良预后和治疗抗性相关^[10-11],INPP4B 的低表达或缺失在前列腺癌复发以及对紫杉醇治疗抗性中发挥作用^[15],并与前列腺癌的预后相关^[16]。

本课题组前期研究发现,INPP4B 在结肠癌组织中高表达,通过激活 PI3K/Akt 信号通路而促进了结肠癌细胞的生存和增殖^[13]。但 INPP4B 是否对结肠癌治疗和预后产生影响仍不清楚。有研究表明 5-FU 抗性包括 PI3K/Akt 异常激活、细胞周期相关蛋白差异表达、microRNA 失调、基因启动子区甲基化等因素^[2]。p27 是一种抑癌基因,是细胞周期的负调控因子,能抑制多种细胞周期蛋白以及多种细胞周期蛋白依赖性激酶的活性^[17]。有研究表明 PI3K/Akt 信号传导可以通过诱导 p27 蛋白缺失或错误定位,促进肿瘤的生成^[18-20],而 INPP4B 是 PI3K/Akt 信号传导途径中重要的调节因子。所以,我们猜想 INPP4B 是否也会通过 PI3K/Akt 信号传导途径下调 p27,促进细胞周期改变,从而影响结肠癌患者预后和结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。

1 材料与方法

1.1 结肠癌组织样本和结肠癌细胞

实验用的结肠癌石蜡组织 86 例均来源于山西省肿瘤医院住院患者,组织取自 2012 年 4 月至 10 月山西省肿瘤医院住院患者手术切除标本。纳入标准:初诊患者,术前未接受新辅助放化疗或靶向治疗、免疫治疗。本研究通过山西省肿瘤医院伦理委员会的批准(2014071)。人结肠癌细胞株 WiDr、SW480 为本研究室保存。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 主要试剂与仪器

5-FU 购自天津金耀氨基酸有限公司;RNAiso Plus、DNase/RNAase-Free Deionized Water、QuantScript RT Kit、QuantiNova™ SYBR® Green PCR kit 购自北京天根生化科技有限公司。DMEM 高糖培养基、FBS 购自美国 Hyclone 公司;RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自上海碧云天生物技术有限公司。Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 购自美国 Invitrogen 公司;Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;兔抗人 INPP4B 单克隆抗体购自英国 abcam 公司,ab81269 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、兔抗人 Akt 单克隆抗体、鼠抗人 Phospho-Akt(Ser473)单克隆抗体、兔抗人 Phospho-Akt(Thr308)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。鼠抗人 p27 单克隆抗体购自上海 Sigma-Aldrich 贸易有限公司(P2092);HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L),HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测结肠癌组织 INPP4B 蛋白的表达

用常规免疫组织化学三步法染色制作石蜡切片。以胞质出现棕黄色为阳性,根据常用的免疫组织化学分级法,每张切片随机取 5 个高倍视野进行计数,评估细胞的染色强度。染色强度分级标准如下:无色 0 分(-),浅黄色 1 分(+),棕黄色 2 分(++),棕褐色 3 分(+++)。

1.4 CCK-8 检测细胞活性

将细胞以 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板内,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 5-FU 处理

细胞 24 h。检测时向每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂(上海 Dojindo 公司)孵箱中孵育 90 min,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)。药物对细胞活力的抑制率(%)=[1-(实验给药组 A 值-空白组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白组 A 值)] $\times$ 100%。

1.5 RNA 提取及 RT-PCR

RNAiso Plus(日本 TaKaRa 公司)裂解液裂解细胞,氯仿抽提,异丙醇萃取 RNA。反转录使用 the First Strand cDNA Synthesis kit(北京天根生物工程有限公司)。实验采用荧光定量 PCR 试剂盒 QuantiNovaTM SYBR[®] Green PCR kit,通过 Applied Biosystems ViiA7 real-time PCR 系统检测反应数据。对 *GAPDH* 及 *INPP4B* 定量检测,以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算 *INPP4B* 相对表达量。引物序列:*GAPDH-F*:5'-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTG-3';*GAPDH-R*:5'-CAT GGG TGG AAT CAT ATT GGA AC-3';*INPP4B-F*:5'-CCC CGG GTA CTG AGG CTT CG-3';*INPP4B-R*:5'-CTT TGT ATT CTC TCC CGGAGG CG-3'。

1.6 蛋白印迹实验

取汇合度 80%左右的细胞,预冷 PBS 洗 2 遍,吸掉残余液体,加入 RIPA 裂解液(上海碧云天公司)。100 μ L/孔。提取总蛋白,BCA 法(北京索莱宝生物科技有限公司)测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗室温孵育 1 h。使用 ECL 发光液(美国 Millipore 公司)曝光。

1.7 细胞增殖

配制 4 $\times$ 10⁴/mL 的细胞悬液,取 200 μ L (8 $\times$ 10³ 个细胞/孔),24 h 后,设置阴性对照不加药组和实验组,实验组加入含一定浓度的 5-FU 200 μ L/孔的完全培养基,阴性对照组用 200 μ L/孔的完全培养基代替,培养 24 h。吸出原有培养基,加 100 μ L/孔新鲜无血清培养基,再加 10 μ L/孔 CCK-8。CO₂ 培养箱中培养,3 h 后,酶标仪检测吸光度值。

1.8 质粒转染

以 3 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔的密度,将细胞铺于 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,培养 24 h。使用无血清的 DMEM 配制转染试剂 LipofectamineTM 2000。用 shINPP4B-1、shINPP4B-2、shControl 转染 WiDr 细胞;INPP4B cDNA 及空载转染 SW480 细胞。将转染试剂放入细胞中,用无血清的 DMEM 继续培养,8 h 后换成含 10%血

清的完全培养基。转染 24 h 后,用荧光显微镜观察转染效果,如果细胞状态良好,镜下可见发荧光的细胞很多,则收取细胞,然后使用 qPCR 技术和 Western blot 技术分别验证 mRNA 和蛋白质的表达量。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

取对数生长期的细胞以 4 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔的密度,铺在 6 孔板中,10%FBS 培养;24 h 后,给细胞加入一定浓度的 5-FU,每孔 2 mL,同时设置不给药组;24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,同时收集上清液中的细胞,然后将两部分细胞合在一起放于 1.5 mL EP 管中,用 PBS 清洗 2 遍,以备检测需要;细胞凋亡检测:每个 EP 管中加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞,然后加入 5 μ L Annexin V-APC,混匀后,再加入 5 μ L 7-AAD 混匀,常温、避光染色 15 min,最后使用流式细胞仪检测细胞的凋亡率。细胞周期检测:每个 EP 管中加入 1 mL 70%预冷乙醇,-20 $^{\circ}$ C 固定、过夜;加 100 μ L (1 mg/mL) RNase A,再加 250 μ L (40 μ g/mL) PI 染液,常温、避光,染色 20 min;流式细胞仪检测,计数 3 万~5 万个细胞,显示细胞周期分布比例。

1.10 统计学处理

SPSS 18.0 软件用于生存分析。GraphPad Prism 8.0.1 软件分析实验数据,两组数据均值的比较都采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 INPP4B 的表达与结肠癌预后

免疫组织化学结果显示,86 例结肠癌组织切片中 INPP4B 表达情况为 4 例阴性(-),28 例(+),35 例(++),19 例(+++)(Figure 1)。对 86 例患者的总生存分析表明,INPP4B 高表达(+++)与患者的不良预后相关(*P*=0.002)。INPP4B 的高表达与患者年龄、性别、临床分期、淋巴结转移、远端转移、病理分期无明显相关性(*P*>0.05)(Table 1)。通过 R2:Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl/>) 公共数据平台对 SieberSmith 数据集(含 187 例结肠癌患者)和 Sieber 数据集(含 226 例结肠癌患者)进行 Kaplan-Meier 生存分析,同样发现 INPP4B 的高表达与患者不良预后相关(*P*=0.027,*P*=0.004)。而且,对数据集中 INPP4B 的表达与临床分期的相关

性进行了分析,两个数据集中INPP4B 的高表达与患者临床分期均无明显的相关性($P>0.05$)。

2.2 INPP4B 负向调节结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性

2.2.1 构建敲低 INPP4B 和过表达 INPP4B 的细胞

我们前期对 10 种结肠癌细胞株的研究发现,与正常结肠上皮细胞相比较,INPP4B 在结肠癌细胞株中普遍呈高表达^[13],其中 WiDr 细胞的表达最高,SW480 细胞表达最低,因此本研究选择这两株细胞作为研究模型,来构建敲低 INPP4B 和过表达 INPP4B 的细胞。

通过慢病毒介导的质粒转染的方法敲低 WiDr 细胞中的 INPP4B,设置对照组为 WiDr shControl 细胞,实验组为 WiDr shINPP4B 细胞;同时,在 SW480 细胞中过表达 INPP4B,设置对照组为 SW480 空载细胞,实验组为 SW480 INPP4B 细胞。结果显示,与对照 WiDr shControl 细胞相比较,WiDr shINPP4B-1 细胞和 WiDr shINPP4B-2 细胞中 INPP4B mRNA 的表达显著降低 ($P=0.002$, $P=0.001$) (Figure 2A),WiDr shINPP4B-1 细胞和 WiDr shINPP4B-2 细胞中 INPP4B 蛋白的表达显著降低 ($P=0.004$, $P=0.008$) (Figure 2B);相对于 SW480 野生细胞和 SW480 空载细胞,SW480 INPP4B 细胞中 INPP4B mRNA 的表达明显增高 (P 均 <0.001) (Figure 2C),SW480 INPP4B 细胞中 INPP4B 蛋白的表达明显增高 ($P<0.001$, $P=0.010$) (Figure 2D)。

2.2.2 INPP4B 改变了结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性

用不同浓度的 5-FU 处理野生型细胞 WiDr 细胞和 SW480 细胞,在给药 24 h 后,加入 CCK-8,使用酶标仪检测 OD 值,得出 WiDr 细胞的 IC_{50} 为 $2.179 \mu\text{g/mL}$ (Figure 3A),SW480 细胞的 IC_{50} 为 $8.621 \mu\text{g/mL}$ (Figure 3B)。采用 $2 \mu\text{g/mL}$ 5-FU

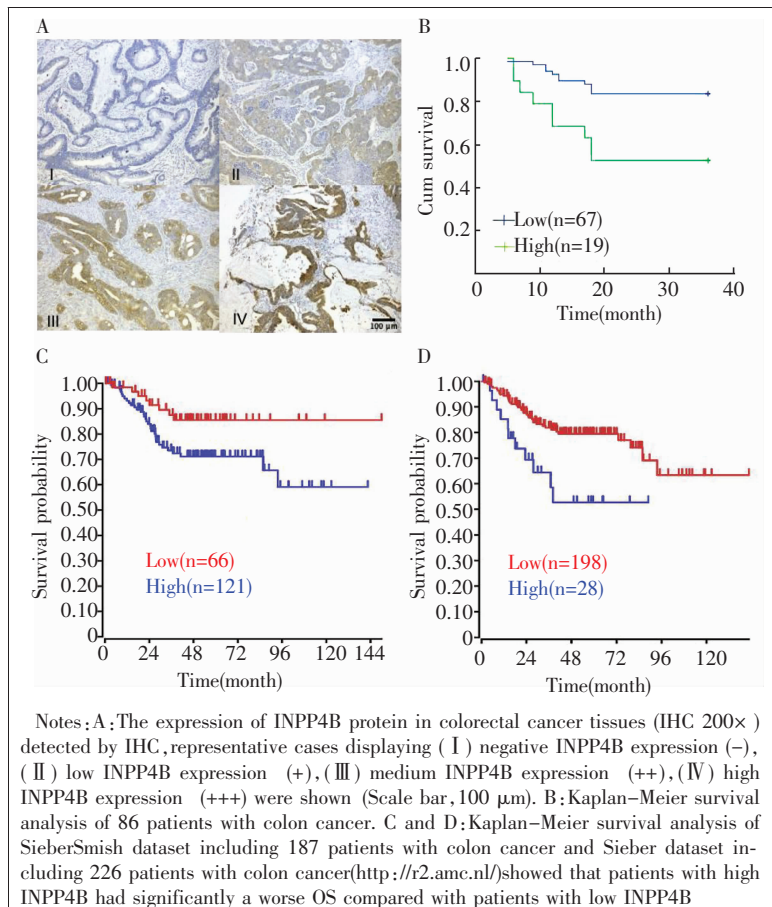
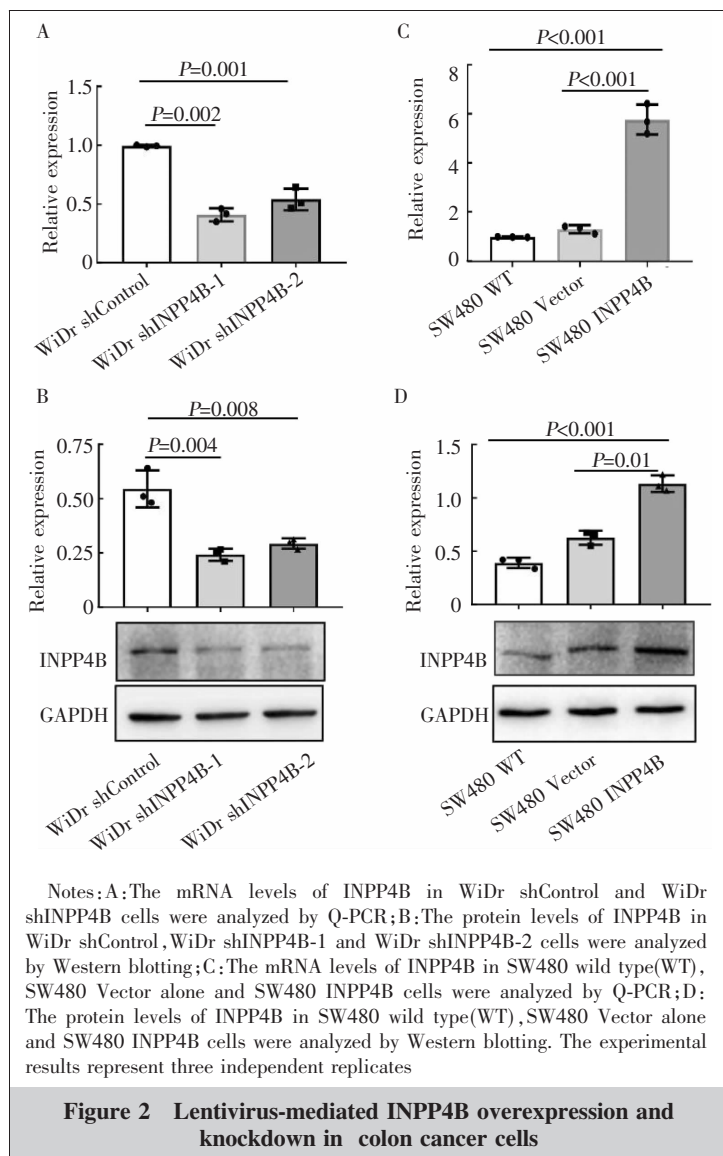


Figure 1 The high expression of INPP4B correlated with poor prognosis of colon cancer patients

Table 1 The association between expression levels of INPP4B and clinical features in colon cancer patients

Factor	Total (n=86)	INPP4B expression		χ^2	P
		Low(n=67)	High(n=19)		
Age(years old)					
≤60	47	36	11	0.102	0.749
>60	39	31	8		
Gender					
Male	47	35	12	0.712	0.399
Female	39	32	7		
Tumor size(cm)					
≤3	34	28	6	0.638	0.424
>3	52	39	13		
Lymph node					
N ₀	49	40	9	1.634	0.201
N ₁ ~N ₂	37	26	11		
Metastasis					
M ₀	80	63	17	0.468	0.494
M ₁	6	4	2		
TNM					
I ~ II	48	40	8	1.837	0.175
III ~ IV	38	27	11		



处理 WiDr 转染细胞株 24 h, 与 WiDr shControl 相比, WiDr shINPP4B-1 细胞的存活率显著降低 ($P=0.011$) (Figure 3C); 采用 $8 \mu\text{g/mL}$ 5-FU 处理 SW480 转染细胞株 24 h, 与 SW480 空载细胞相比, SW480 INPP4B 细胞存活率显著升高 ($P=0.002$) (Figure 3D)。

2.2.3 INPP4B 影响 5-FU 诱导的结肠癌细胞凋亡

为了探究 INPP4B 是否对 5-FU 诱导的结肠癌细胞的凋亡有影响, 5-FU 作用于细胞株 24 h 后, 收集细胞, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡比例。结果显示, WiDr shControl 的凋亡率为 24.06%, WiDr shINPP4B-1 的凋亡率为 46.21% (Figure 4A)。INPP4B 低表达促进 5-FU 诱导的细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$); SW480 空载细胞的凋亡率为 48.83%, SW480 INPP4B 的凋亡率为 25.69% (Figure 4B)。INPP4B 高表达导致

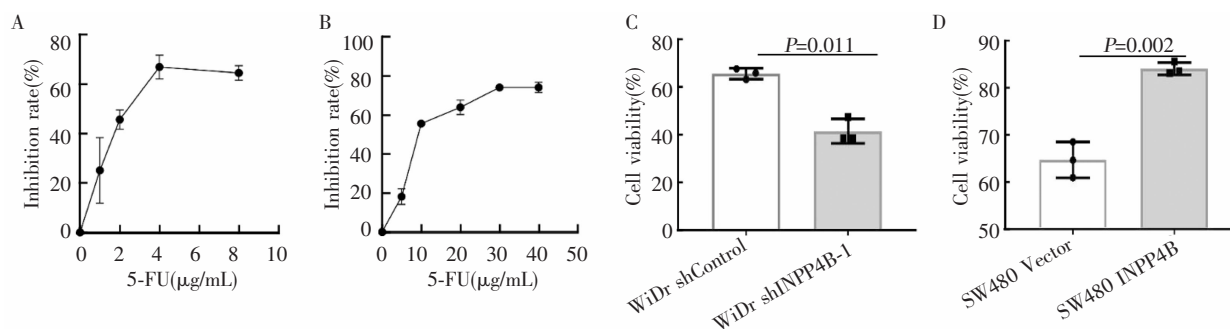
5-FU 诱导的细胞凋亡率显著降低 ($P=0.002$)。

2.2.4 INPP4B 改变了 5-FU 诱导的结肠癌细胞 G₁/S 期分布

5-FU 作用细胞 24 h 后, 采用流式细胞仪检测细胞周期的分布比例。WiDr shControl G₀/G₁ 期细胞比例为 17.53%, G₂/M 期细胞比例为 12.41%, S 期细胞比例为 70.05%; WiDr shControl 加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞比例为 33.79%, G₂/M 期细胞比例为 2.88%, S 期细胞比例为 63.33%; WiDr shINPP4B 加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞比例为 50.29%, G₂/M 期细胞比例为 3.09%, S 期细胞比例为 46.62%; 与 WiDr shControl 加 5-FU 组细胞相比较, 发现 WiDr shINPP4B 加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞数显著升高 ($P<0.001$), G₂/M 期细胞数无明显变化, S 期细胞数显著降低 ($P<0.001$)。提示敲减 INPP4B 表达可以促进 5-FU 诱导的 G₁ 捕获 (Figure 5A~5B)。SW480 空载细胞 G₀/G₁ 期细胞比例为 25.05%, G₂/M 期细胞比例为 3.03%, S 期细胞比例为 71.91%; SW480 空载细胞加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞比例为 34.80%, G₂/M 期细胞比例为 9.10%, S 期细胞比例为 56.10%; SW480 INPP4B 细胞加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞比例为 24.49%, G₂/M 期细胞比例为 4.50%, S 期细胞比例为 71.01%; 相对于 SW480 空载加 5-FU 组, SW480 INPP4B 加 5-FU 组 G₀/G₁ 期细胞显著降低 ($P=0.001$), G₂/M 期细胞数无明显变化, S 期细胞数显著升高 ($P=0.009$) (Figure 5C~5D)。提示 INPP4B 过表达可以逆转 5-FU 诱导的 G₁ 捕获 (Figure 5A~5B)。

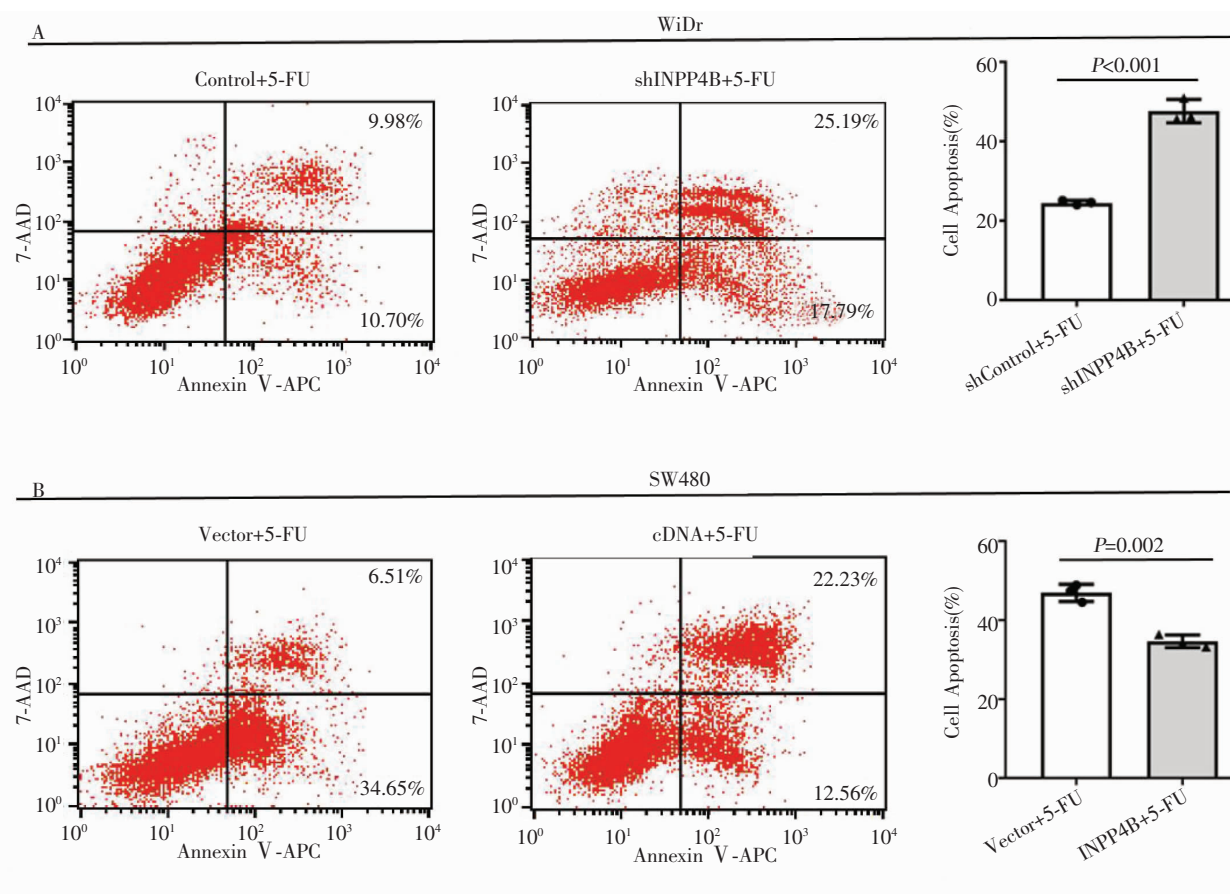
2.3 INPP4B 通过 Akt/P27 信号轴, 降低结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性

前期研究表明, INPP4B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路来促进结肠癌细胞增殖。为了探讨 INPP4B 影响结肠癌细胞对 5-FU 敏感性的机制, 我们对 Akt 的磷酸化水平以及细胞周期相关蛋白 P27 表达进行了检测。结果提示, 5-FU 作用细胞 24 h 后,



Notes: A: WiDr cells were treated with 5-FU for 24 h, cell viability was measured using CCK-8, and the IC_{50} of WiDr was 2.179 $\mu\text{g/mL}$; B: SW480 cells were treated with 5-FU for 24 h, cell viability was measured using CCK-8, and the IC_{50} of SW480 was 8.621 $\mu\text{g/mL}$; C: WiDr shControl and WiDr shINPP4B cells were treated with 2 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU; D: SW480 vector alone and SW480 INPP4B were treated with 9 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU. Cell viability was measured using CCK-8. The experimental results represent three independent replicates

Figure 3 The influence of silence or overexpression of INPP4B on the sensitivity of colon cancer cells to 5-FU



Notes: A: the WiDr shControl and WiDr shINPP4B-1 were treated with 2 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU for 24 h; B: SW480 Vector alone and SW480 INPP4B cells were treated with 9 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU for 24 h; Apoptotic cells stained with Annexin V-APC and 7-AAD were analyzed by flow cytometry. The experimental results represent three independent replicates

Figure 4 Effect of INPP4B on apoptosis level of colon cancer cells induced by 5-FU

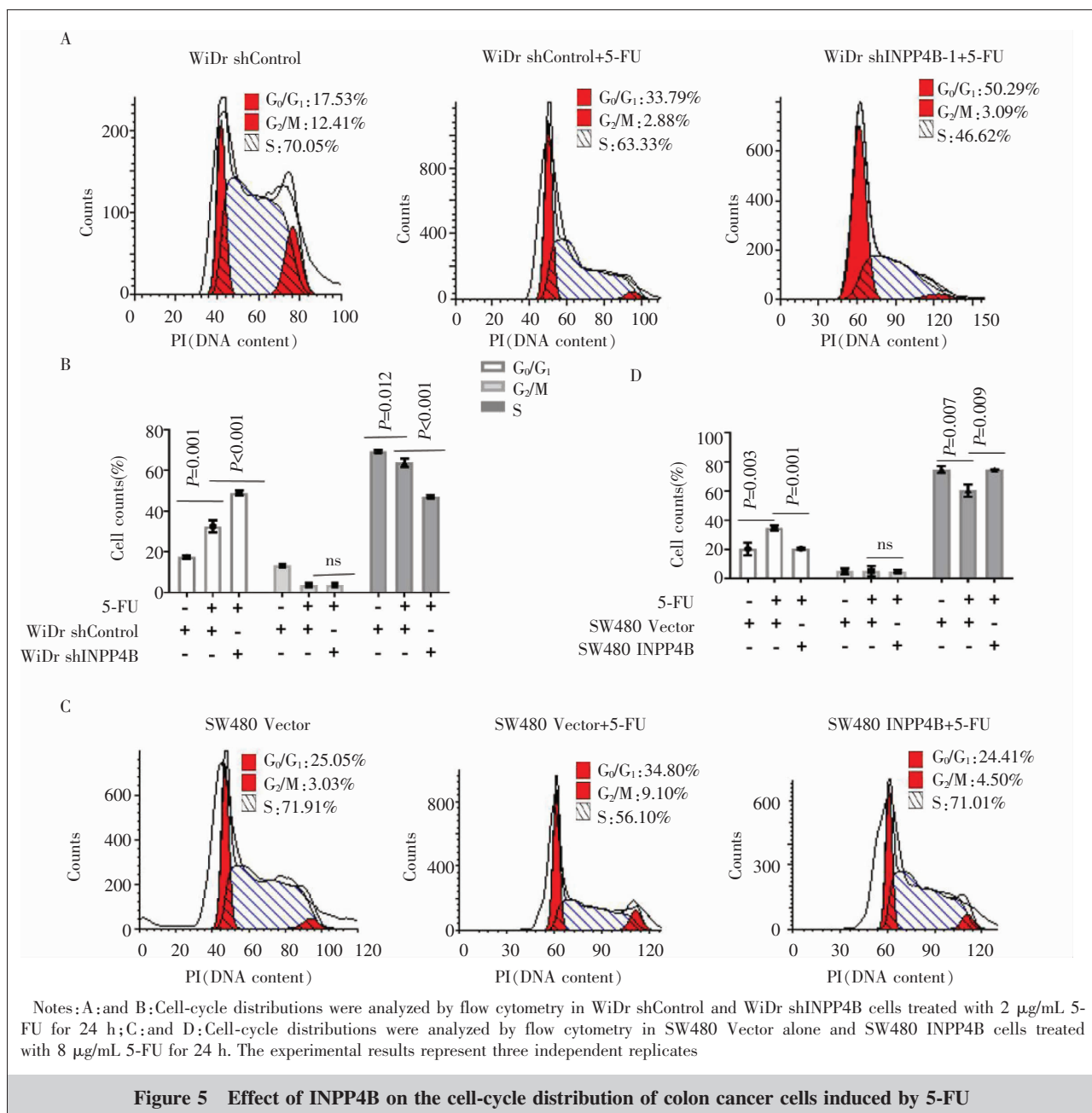
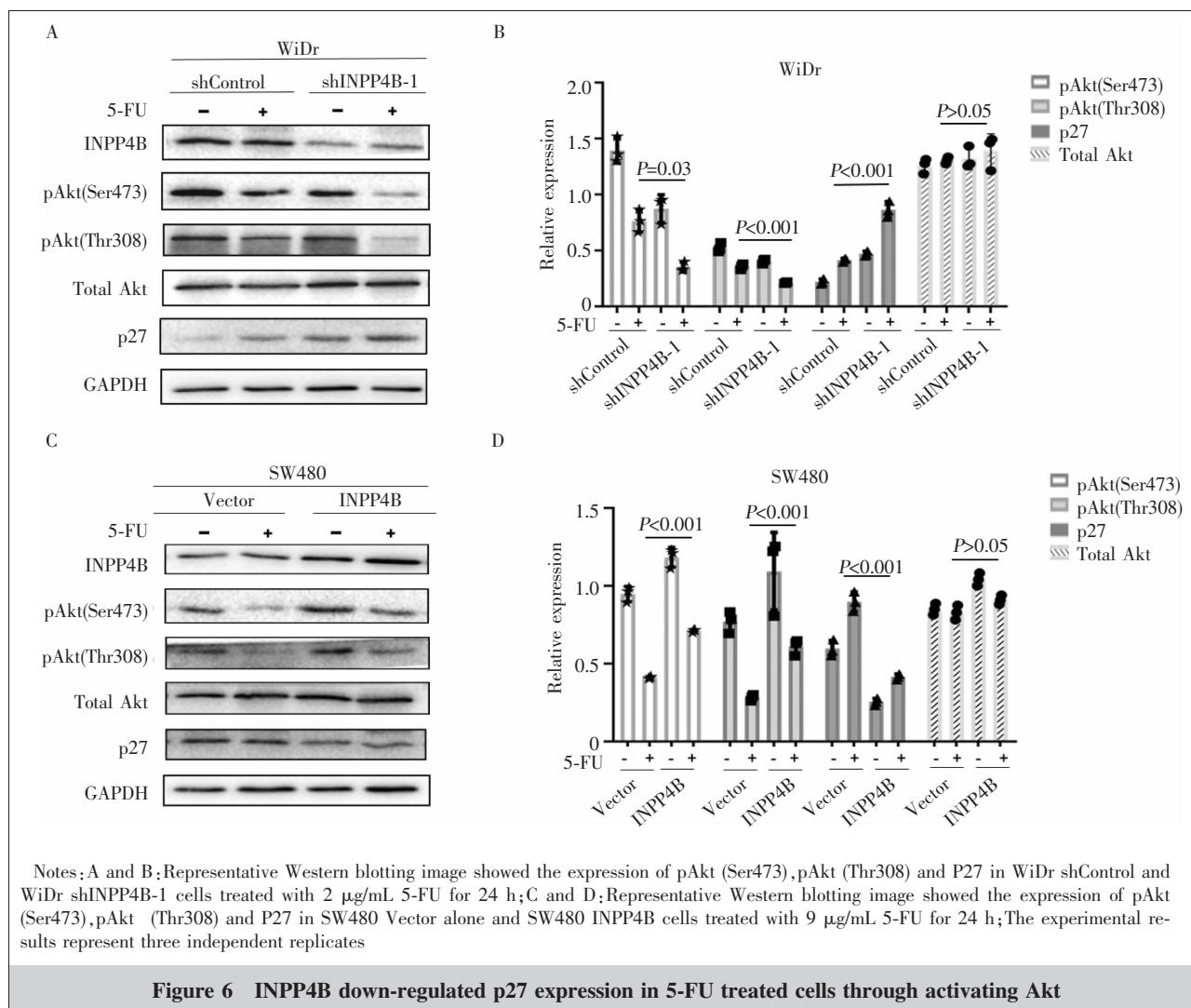


Figure 5 Effect of INPP4B on the cell-cycle distribution of colon cancer cells induced by 5-FU

与 WiDr shControl 细胞相比, WiDr shINPP4B-1 细胞中 pAkt(Ser473) 和 pAkt(Thr308) 的表达水平显著降低 ($P=0.003$, $P<0.001$), p27 的水平显著升高 ($P<0.001$) (Figure 6A~6B)。与 SW480 空载细胞相比, SW480 INPP4B 细胞中 pAkt (Ser473), pAkt(Thr308) 的水平显著升高 ($P<0.001$, $P<0.001$), p27 的水平显著降低 ($P<0.001$) (Figure 6C~6D)。INPP4B 反向调节了 p27 的表达。结果提示, INPP4B 通过上调 PI3K/Akt 通路下调 p27 发挥降低结肠癌细胞对 5-FU 敏感性的作用。

3 讨论

癌症的复杂性在于多个癌基因或者抑癌基因的失控。但有些驱动基因既可是致癌基因也可是抑癌因子, 其作用取决于所处的生物学背景。INPP4B 作为新出现的双重作用癌症驱动基因, 最先被发现与 PTEN 功能类似负向调节 PI3K/AKT 信号通路, 通过其脂质磷酸酶活性水解 PtdIns (3,4)P₂ 为 PtdIns(3)P, 抑制 AKT 磷酸化, 从而抑制 PI3K/AKT 信号通路^[3]。INPP4B 已经报道在多种肿瘤, 包括前列腺癌、甲状腺



癌、基底样细胞乳腺癌等发挥抑癌基因的功能^[4-7]。但在另一些肿瘤中如 AML、黑色素瘤、结肠癌中 INPP4B 发挥癌基因的作用^[10-13]。尽管作为抑癌基因, INPP4B 的作用归功于负向调节 PI3K/AKT 信号通路, 但它作为癌基因的促癌机制尚不完全清楚, 在不同肿瘤的发生发展中发挥不同的作用^[4]。如在黑色素瘤中, INPP4B 是通过激活 SGK3 信号促进细胞增殖; 在 AML 中, INPP4B 通过增强 DNA 修复机制, 对抗常规化疗反应, 引起疾病复发和总体生存率降低。AML 细胞中 INPP4B 过表达导致对柔红霉素和电离辐射的敏感性降低^[10-11]。我们前期研究发现在结肠癌中 INPP4B 主要通过其蛋白磷酸酶的功能活性, 发挥了促癌作用。INPP4B 通过其蛋白磷酸酶活性去磷酸化 PTEN, 使得 PTEN 在 Ser380、Thr382、Thr383、Ser385 这一簇位点的磷酸化水平降低, 导致

PTEN 稳定性降低, 生物活性功能下降, 从而提高细胞内 PI(3,4,5)P3 水平, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进细胞增殖^[13]。

本文进一步探讨了 INPP4B 与结肠癌治疗及疾病进展的关系。对 86 例结肠癌患者的总生存分析表明, INPP4B 高表达(+++)患者与低表达患者相比总生存期明显缩短($P=0.002$)。INPP4B 的高表达与患者临床病理参数包括年龄、性别、临床分期、淋巴结转移、病理分期无明显相关性($P>0.05$), 是独立预后因子。通过 R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl/>) 公共数据平台对 Sieber-Smith 数据集 (含 187 例结肠癌患者) 和 Sieber 数据集 (含 206 例结肠癌患者) 进行 Kaplan-Meier 生存分析, 同样发现 INPP4B 的高表达与患者不良预后相关。说明 INPP4B 高表达对结肠癌预后评估具有

重要的参考价值。

基于 5-FU 的化疗抵抗是晚期结肠癌临床治疗遇到的主要问题。结肠癌中 INPP4B 高表达是否会影响结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性尚未见报道。本研究通过质粒转染技术,构建了 INPP4B 敲减和过表达细胞株。发现 5-FU 处理细胞 24 h 后,与 WiDr shControl 细胞相比,WiDr shINPP4B 细胞的存活率显著降低;与 SW480 空载细胞相比,SW480 INPP4B 细胞存活率显著升高,说明敲减 INPP4B 可以提高结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性,高表达 INPP4B 可以降低结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。细胞凋亡实验结果同样表明 INPP4B 的表达水平与 5-FU 诱导的细胞凋亡率成反比。过表达 INPP4B 削弱了 5-FU 诱导的细胞凋亡率,反过来敲低 INPP4B 提高了 5-FU 诱导的细胞凋亡率。本研究结果表明 INPP4B 负向调节结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性,预示 INPP4B 有可能成为预测基于 5-FU 治疗决策有效性的生物标志物。

进一步分析 INPP4B 对 5-FU 引起的细胞周期变化发现,与 WiDr shControl 细胞相比,WiDr shINPP4B 细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期的细胞显著增加,G₂/M 期细胞比例无明显变化,S 期细胞比例显著减少;与 SW480 空载细胞相比,SW480 INPP4B 细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期的细胞显著减少,G₂/M 期细胞比例无明显变化,S 期细胞比例显著增加。说明 INPP4B 参与了细胞周期的调控,提示敲减 INPP4B 加强了 5-FU 引起的 G₁ 期捕获,过表达 INPP4B 削弱了 5-FU 引起的 G₁ 期捕获。

PI3K/AKT 信号通路不仅调节细胞增殖、存活,而且对细胞周期进程也有重要的调节作用,并在化疗抗性方面发挥重要作用^[21]。有研究表明在细胞周期的 G₁/S 转换过程中,PI3K/AKT 信号通路被显著激活,通过调节包括 p27 在内的多个细胞周期效应因子而发挥作用^[17,19-20]。p27 是一种细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂,p27 蛋白初被发现是作为 cyclinE-CDK2 的抑制剂,p27 在 G₀ 期中,蛋白质稳定性达到最大;在 G₁ 期中,p27 抑制 cyclinE-CDK2 和 cyclinA-CDK2 的活性,从而阻止 G₁/S 期转化^[17]。

INPP4B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路而促进结肠癌细胞增殖和生存,我们的免疫印迹结果表明,与 WiDr shControl 细胞相比,WiDr shINPP4B 细胞

中 pAkt(Ser473)和 pAkt(Thr308)的表达显著降低,p27 的表达显著升高;与 SW480 空载细胞相比,SW480 INPP4B 细胞中,pAkt(Ser473)和 pAkt(Thr308)的表达显著升高,p27 的表达显著降低。表明在结肠癌细胞中 INPP4B 通过激活 Akt 下调 p27 的表达,从而改变了暴露于 5-FU 的细胞的细胞周期分布。

综上所述,我们的研究结果表明 INPP4B 高表达与结肠癌患者生存呈负相关,INPP4B 高表达可以降低结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。INPP4B 有望成为结肠癌患者预后和化疗抵抗的标志物。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Blondy S, David V, Verdier M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: from classical pathways to promising processes [J]. Cancer Sci, 2020, 111(9):3142-3154.
- [3] Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, et al. INPP4B is a PtdIns(3,4,5) P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor[J]. Cancer Discov, 2015, 5(7):730-739.
- [4] Hamila SA, Ooms LM, Rodgers SJ, et al. The INPP4B paradox: like PTEN, but different[J]. Adv Biol Regul, 2021, 82:100817.
- [5] Reed DE, Shokat KM. INPP4B and PTEN Loss Leads to PI-3,4-P2 Accumulation and Inhibition of PI3K in TNBC [J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(6):765-775.
- [6] Rodgers SJ, Ooms LM, Oorschot VMJ, et al. INPP4B promotes PI3K α -dependent late endosome formation and Wnt/ β -catenin signaling in breast cancer[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):3140.
- [7] Zhang M, Suarez E, Vasquez JL, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II regulation of androgen receptor activity[J]. Oncogene, 2019, 38(7):1121-1135.
- [8] Tang W, Yang L, Yang T, et al. INPP4B inhibits cell proliferation, invasion and chemoresistance in human hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:3491-3507.
- [9] Chen Y, Sun Z, Qi M, et al. INPP4B restrains cell proliferation and metastasis via regulation of the PI3K/AKT/SGK pathway[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(5):2935-2943.
- [10] Dzneldz I, He R, Woolley JF, et al. INPP4B overexpression is associated with poor clinical outcome and therapy

- resistance in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2015, 29(7): 1485–1495.
- [11] Rijal S, Fleming S, Cummings N, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II (INPP4B) is associated with chemoresistance and poor outcome in AML[J]. *Blood*, 2015, 125(18): 2815–2824.
- [12] Chi MN, Guo ST, Wilmott JS, et al. INPP4B is upregulated and functions as an oncogenic driver through SGK3 in a subset of melanomas[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37): 39891–39907.
- [13] Guo ST, Chi MN, Yang RH, et al. INPP4B is an oncogenic regulator in human colon cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(23): 3049–3061.
- [14] Kim JS, Yun HS, Um HD, et al. Identification of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II as a novel tumor resistance biomarker in human laryngeal cancer HEP-2 cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(13): 1307–1318.
- [15] Rynkiewicz NK, Fedele CG, Chiam K, et al. INPP4B is highly expressed in prostate intermediate cells and its loss of expression in prostate carcinoma predicts for recurrence and poor long term survival[J]. *Prostate*, 2015, 75(1): 92–102.
- [16] Chen H, Li H, Chen Q. INPP4B reverses docetaxel resistance and epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K/Akt signaling pathway in prostate cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(3): 467–472.
- [17] Sharma SS, Pledger WJ. The non-canonical functions of p27 (Kip1) in normal and tumor biology [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(9): 1189–1201.
- [18] Hnit SS, Xie C, Yao M, et al. p27 (Kip1) signaling: transcriptional and post-translational regulation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 68: 9–14.
- [19] McKay LK, White JP. The AMPK/p27^{Kip1} pathway as a novel target to promote autophagy and resilience in aged cells[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1430.
- [20] Prasad SB, Yadav SS, Das M, et al. PI3K/AKT pathway-mediated regulation of p27 (Kip1) is associated with cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2015, 38(3): 215–225.
- [21] Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 797.