

PKC ζ 对维持 KRAS 突变结肠癌生存的作用及机制

朱玥 潘珏宇 王佩佩 李楠 朱彤波

(四川大学华西基础医学与法医学院免疫教研室, 四川 成都 610041)

【摘要】 目的 探讨 PKC ζ 在维持 KRAS 突变结肠癌生存中的作用及相关分子机制。方法 选取携 KRAS 突变的 HCT116 细胞和不携 KRAS 突变的 RKO 细胞为研究材料, 两种细胞分别设置空白对照组(Control 组)、ATM 抑制组、shRNA-prkci 组及 shRNA-kras 组。流式细胞术检测结肠癌细胞的凋亡及增殖情况。免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 KRAS、YAP1、PKC ζ 的相对表达量。免疫荧光实验检测 YAP1 的表达。结果 在携 KRAS 突变的 HCT116 细胞中, PKC ζ 的抑制伴随着细胞凋亡和生长抑制(均 $P < 0.05$); 并且抑制 PKC ζ 可显著下调 HCT116 中 YAP1 的表达。而在不携带 KRAS 突变的 RKO 细胞中这种效应不明显。结论 PKC ζ 通过调控 YAP1 维持 KRAS 突变结肠癌生存。PKC ζ 与 YAP1 为潜在的结肠癌治疗靶标。

【关键词】 结肠癌; PKC ζ ; YAP1; KRAS**【中图分类号】** R735.3⁺5 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.002

PKC ζ maintains the survival of KRAS mutation colon cancer

ZHU Yue, PAN Jueyu, WANG Peipei, LI Nan, ZHU Tongbo

(West China School of Basic Medical Sciences, Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of PKC ζ on maintaining the survival process of KRAS mutation colon cancer and its molecular mechanism. **Methods** HCT116 and RKO, colon cancer cells were selected and divided into blank control group, ATM group, shRNA-prkci group and shRNA-kras group. The apoptosis was determined by flow cytometry. Protein level and mRNA level were detected by western blot and qPCR. Cell location and relative expression of YAP1 were validated by immunofluorescence. **Results** In HCT116 cells carrying KRAS gene mutations, PKC ζ inhibition was accompanied by apoptosis and growth inhibition ($P < 0.05$). Furthermore, inhibition of PKC ζ significantly down-regulated YAP1 expression in HCT116. This effect was not obvious in RKO cells without KAS mutation. **Conclusion** PKC ζ maintains the survival of KRAS mutant colon cancer by regulating the expression of YAP1. PKC ζ and YAP1 are potential targets for colon cancer with KRAS mutation.

【Key words】 Colon cancer; PKC ζ ; YAP1; KRAS

根据 2019 年全球癌症统计数据, 结肠癌为全球第三大癌症, 发病率为 10.2%, 死亡率为 9.2%, 仅次于肺癌^[1]。KRAS 属于 RAS 基因家族, 其突变广泛存在于多种癌症中, 结肠癌患者中约 40% 含有 KRAS 突变^[2]。虽然近年来针对 KRAS^{G12C} 的药物筛选取得了一定的进展, 但其作用效果与作用机制仍未明确^[3]。故寻找与 KRAS 有交互作用, 可选择性诱导携

KRAS 突变结肠癌细胞凋亡的信号蛋白仍非常重要。PKC ζ 属于非典型性蛋白激酶 C (atypical protein kinase C, aPKC), 可通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸从而激活下游多条信号通路, 有研究证明 aPKC 的异常激活与结肠癌生成有密切关系^[3-5]。Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 是 Hippo 信号通路的关键信号分子。已有研究表明, YAP1 在包括结肠癌在内的多种癌症中均存在异常升高的表达^[6], 可促进癌症细胞生长、迁移、上皮-间充质转化(EMT)并诱导干细胞特性^[7-9]。本研究通过化学抑制剂或 shRNA 分别对结肠癌细胞中的 KRAS、PKC ζ 进行抑制, 并在 mRNA、蛋白、细胞水平观察 YAP1 等信号分子在结

通信作者: 朱彤波, E-mail: tbzhu@163.com

引用本文: 朱玥, 潘珏宇, 王佩佩, 等. PKC ζ 对维持 KRAS 突变结肠癌生存的作用及机制[J]. 西部医学, 2022, 34(7): 943-947. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.002

肠癌细胞中的变化,探讨 PKC ϵ 在携 KRAS 突变的结肠癌细胞生长中的作用及其与 Hippo 信号通路的关系。

1 材料与方 法

1.1 细胞及主要试剂 细胞株 HCT116、RKO、293T 为四川大学基础医学与法医学院免疫教研室贮存细胞。抗体:PKC ϵ (BD Biosciences), GAPDH, YAP1 (CST, Cell Signaling Technology), PDL1 (Abcam)。脂质体 Lipofectamine[®]2000、胎牛血清、凯基凋亡试剂盒购于成都溶海康华生物科技有限公司, RPMI-1640、DMEM、YQ 培养基购自成都晨飞生物技术有限公司, ATM(Aurothiomalate)购自 Sigma 公司。逆转录及 RT-PCR 试剂盒购于成都微克生物技术有限公司。本研究所用引物均为上海生工有限公司合成。质粒 pLL3.7-prkci、pLL3.7-kras 为本课题组前期构建的重组质粒,包装质粒 PSPA \times 2、PMD2G 为课题组贮存质粒。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 以携 KRAS 突变的 HCT116 和不携 KRAS 突变的 RKO 结肠癌细胞为研究对象,用慢病毒 shRNA-prkci 和 PKC ϵ 活性抑制剂(ATM)分别处理上述两种细胞,即慢病毒 shRNA-prkci 组、ATM 组,分别与 Control 组和 shRNA-Control 比较并检测相应指标并观察其变化。

1.2.2 慢病毒的制备 使用 YQ 培养基,以 5×10^6 /mL 的密度将 293T 细胞接种于 100 mm² 培养皿中。细胞培养 12 h,将含有 shRNA 序列的重组质粒以及包装质粒使用脂质体 Lipofectamine[®]2000 转入 293 T 细胞。48 h 后收取上清液,4 $^{\circ}$ C、3000 r/min,离心 15 min;0.45 μ m PVDF 过滤器过滤,EP 管分装(1 mL/管)置于-80 $^{\circ}$ C 备用。shRNA 序列信息:shRNA-prkci: 5'-GGTTGTTCTCCTGGTCATTGAGTA-3', shRNA-kras: 5'-GCAGTTGAGACCTTCTAATTGG-3'。

1.2.3 细胞处理 以 3×10^5 /mL 的密度接种细胞于六孔板。用 ddH₂O 配制 ATM 浓度为 1 M,使用终浓度为 0.1 mM ATM 分别处理细胞 36 h 和 48 h 后,进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 WB 实验。同时使用制备的慢病毒液感染 HCT116 和 RKO 细胞 10 h 后换液,收样前观察荧光强度为 70%以上,表明感染成功。最后根据不同的实验目的在相应的时间段内处理收样。

1.2.4 免疫印迹法(Western blot) 使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,使用碧云天 BSA 试剂盒定量后,加入 Loading buffer,金属浴 100 $^{\circ}$ C 煮样 10 min,使蛋白变性。电泳条件为 80 V 30 min 后调节电压为 120 V,

继续 1 h。转膜条件为 300 mA 1.5 h,使用 0.22 μ m 孔径 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗封闭 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温孵育 1 h,使用 TBST 洗涤三次(5 min/次)后曝光检测。

1.2.5 qRT-PCR 检测 采用 Trizol 法(Invitrogen)提取细胞总 RNA,使用 RT reagentKit with Gdna Eraser 试剂盒逆转录获得 cDNA。使用 TB green Premix Ex Taq 试剂盒于实时荧光 PCR 仪上检测靶基因的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 Sequences for qPCR primers

名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
GAPDH	GAGTCAACGGATTGG TCGT	GACAAGCTTCCC GTTCTC AG
PKC ϵ	TGGGTTGTCATCCTCA AACA	CATCTGGAGTGAGCTGG ACA
KRAS	TATTGATGGAGAAAC CTGTCTCTTG	TTATGGCAAATACACAA AGAAAGCC
YAP1	CCCGACAGGCCAGTAC TGAT	CAGAGAAGCTGGAGAGG AATGAG

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 标记凋亡细胞 使用不含 EDTA 胰酶将细胞消化后,PBS 洗 3 次(PBS 需提前预冷),每管的染料配方为 500 μ L 1 \times buffer+5 μ L Annexin V-FITC/PI,使用染料混合液重悬细胞后,冰上避光孵育 15 min;上机检测。

1.2.7 免疫荧光技术及共聚焦显微镜成像分析 将处理后的细胞移除培养基,4%多聚甲醛固定 15 min,去除固定液后 0.3% Tritonx-100 通透 10 min,5% BSA 封闭 1 h,封闭完成后依次孵育一抗 2 h、二抗 1 h,移除二抗后以 1 μ g/mL DAPI 溶液染核 5 min,移除 DAPI 溶液后封片,共聚焦显微镜观察拍照。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKC ϵ 的抑制可诱导 KRAS 突变结肠癌细胞凋亡 与对照组凋亡率 3%相比,PKC ϵ 抑制剂 ATM 处理可使 HCT116 凋亡率升高至 16%左右,同样,在使用 shRNA 抑制 PKC ϵ 表达后,HCT116 凋亡率由 6%升高至 10%,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对于不携 KRAS 突变的 RKO 细胞,对照组、ATM 处理组与 shRNA 对照组、处理组凋亡率分别为 6%、7%、8%、9%左右,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 PKC ϵ 可影响 KRAS 突变结肠癌细胞的 YAP1 表达水平 Western blot(图 2A)与免疫荧光(图 2B)实验均证明,在 HCT116 细胞中,ATM 抑制 PKC ϵ 活

性,可显著下调 YAP1 的表达($P < 0.05$);而在不携带 KRAS 突变的 RKO 细胞中这些抑制作用则不明显,

提示在 KRAS 突变的结肠癌细胞中, YAP1 的表达水平及活性可能受 PKC ζ 调控。

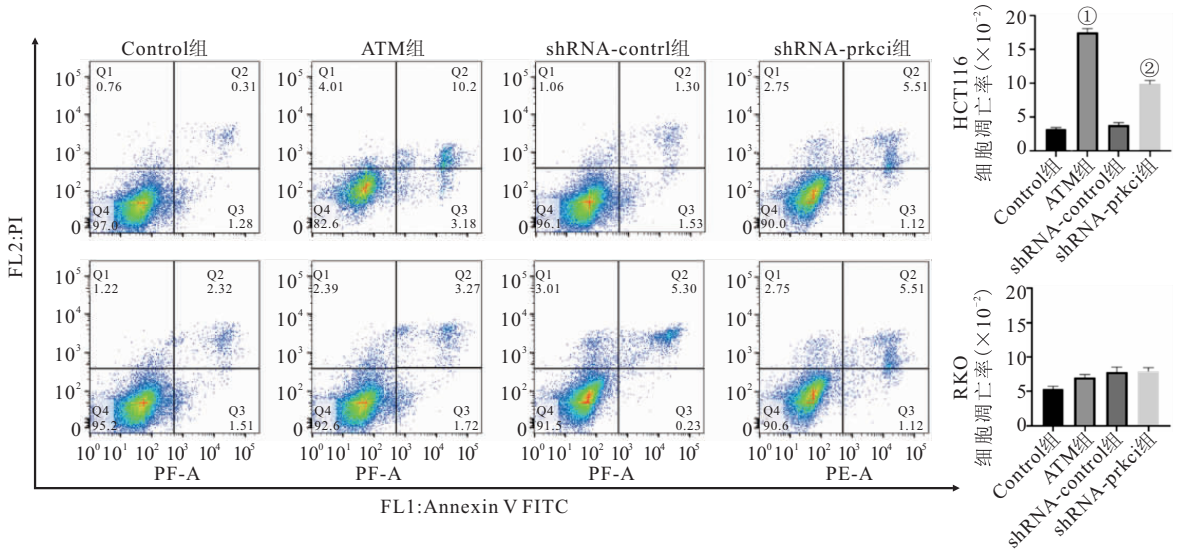


图 1 流式细胞仪检测抑制 PKC ζ 对 KRAS 突变结肠癌细胞生长的影响

Figure 1 Flow cytometry detection of the effect of inhibiting PKC ζ on the growth of KRAS mutant colon cancer cells

注:与 Control 组比较,① $P < 0.05$;与 shRNA-Control 组比较,② $P < 0.05$

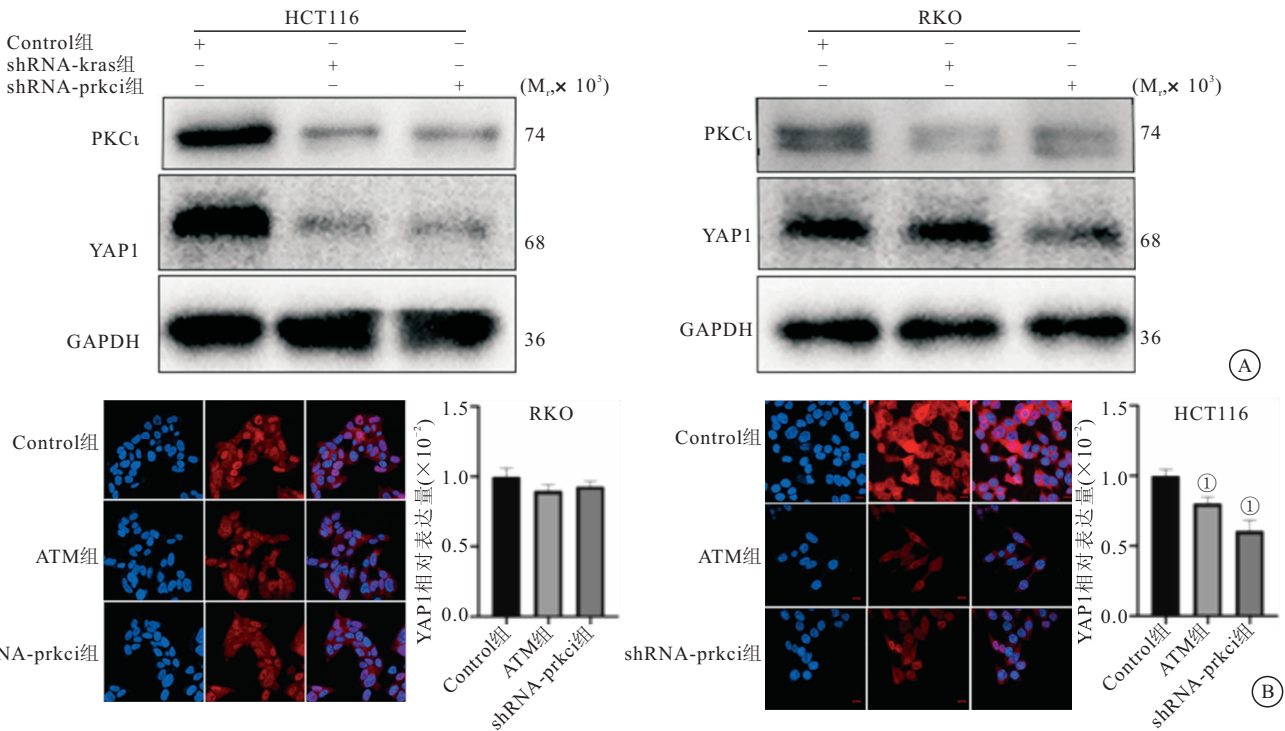


图 2 抑制 PKC ζ 对 KRAS 突变结肠癌细胞 YAP1 表达的影响

Figure 2 Inhibition of PKC ζ on the expression of YAP1 in KRAS mutant colon cancer cells

注:A. 通过 PKC ζ 抑制剂或 shRNA 敲低 PKC ζ 两种处理方式在 HCT116 和 RKO 细胞株中,观察 YAP1 的蛋白表达水平。B. 通过免疫荧光检测抑制 PKC 后 YAP1 在 RKO, HCT116 两个细胞株的表达。与 Control 组比较,① $P < 0.05$

2.3 PKC ζ -YAP1 信号轴受 KRAS 调控 在携 KRAS 突变的 HCT116 细胞中使用 shRNA 抑制 PKC ζ 表达后,可显著抑制 YAP1 表达水平($P < 0.05$);且 KRAS 表达被敲低后,PKC ζ 与 YAP1 的表

达均明显下调(图 3)。提示在 KRAS 突变结肠癌细胞中,PKC ζ 可影响 YAP1 的表达,且 PKC ζ 与 YAP1 均受到 KRAS 的调控。突变的 KRAS 通过激活 PKC ζ -YAP1 信号以维持结肠癌细胞生长。

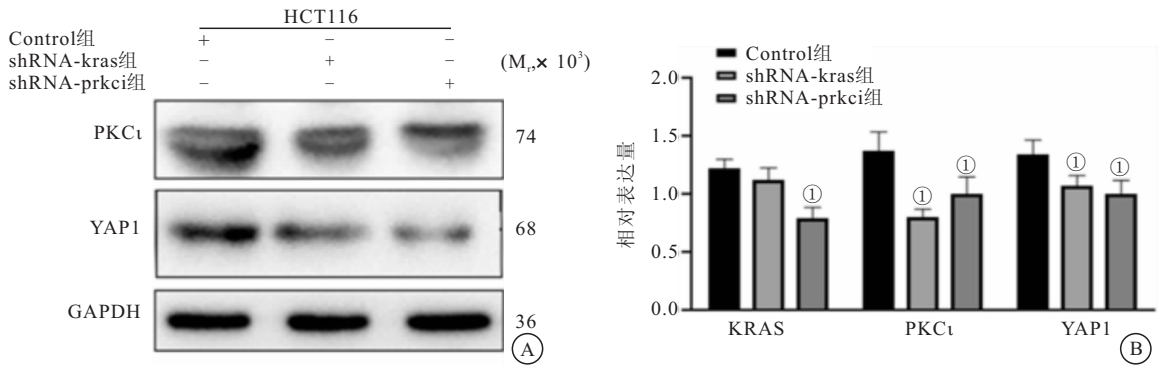


图 3 PKCι-YAP1 信号轴受 KRAS 调控

Figure 3 The PKCι-YAP1 signal axis is regulated by KRAS

注: A. 通过 Western blot 观察 shRNA 敲低 PKCι 和 KRAS 后 PKCι 和 YAP1 的蛋白水平变化; B. 通过 qRT-PCR 检测 KRAS 和 PKCι 以及 YAP1 的 mRNA 水平变化。与 Control 组比较, ①P<0.05

3 讨论

结肠癌是世界上发病率最高, 致死率最高的癌症之一, 携 KRAS 突变的结肠癌患者占结肠癌患者的 40%^[2-3], KRAS 作为致瘤子基因与多种肿瘤的发生发展^[4-6], 调节细胞糖酵解过程^[7]以及对表皮生长因子受体(EGFR) 抑制剂耐药性有显著相关性^[10], 导致 KRAS 突变患者预后不良比例较高, 常被作为预后不良的标志^[11]。目前针对 KRAS 突变的药物筛选有了长足的进步, 针对 KRAS^{G12C} 的抑制剂已经进入临床实验阶段^[12-13], 但是其作用效果与安全性还有待进一步阐明, 针对 KRAS 突变肿瘤下游信号通路中与 KRAS 有交互作用信号蛋白的研究仍有重要意义。

蛋白激酶 C(PKC) 是一个结构相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 在细胞增殖迁移以及维持细胞功能中起到重要的作用^[14-15]。其中 PKCι 属于非典型性 PKC(αPKC) 家族的一员, 在结肠癌中有显著上调, 在促进肿瘤的形成与发展过程中起着重要的作用^[16-17]。PKCι 的表达水平与 KRAS 突变在肺腺癌(LAC)与胰腺导管癌(PDCA) 中有显著的相关性^[18-20]。在本研究中, 发现 KRAS 突变的结肠癌细胞中 PKCι 表达水平明显上升, 在使用 ATM 或 shRNA 抑制 PKCι 的表达后, 可特异性的诱导携 KRAS 突变的结肠癌细胞凋亡, 证明 KRAS 突变与 PKCι 表达相关性在结肠癌中同样存在。

YAP1 是 Hippo 信号通路中的一个重要分子, 可上调与细胞增殖、重编程、干细胞特性、上皮-间充质转化、以及抗凋亡相关的转录因子^[21-24], 在肿瘤的发生与维持过程中起到重要的作用。YAP1 可通过诱导 ERK 通路激活, 通过调控 AXL 使癌细胞对于 EGFR-TKI 产生耐药, 这与 KRAS 突变导致的 EGFR 耐药有着高度相似性, 提示 YAP1 与 KRAS 突变之间存在

某种联系^[25]。本研究的前期研究中发现 PDCA 中 KRAS 突变可导致 PKCι 的表达水平的异常升高, PKCι 的异常升高可抑制 LATS 导致 YAP1 的去磷酸化在细胞核中积累, 从而起到激活多种转录因子促进肿瘤细胞生长的作用^[26]。本研究显示, 在 KRAS 突变结肠癌抑制 PKCι 同样可导致 YAP1 的明显下调以及细胞凋亡, 提示 KRAS 突变条件下, PKCι 对 YAP1 的调控在结肠癌中同样存在。

本研究证明了在结肠癌细胞中 PKCι 为 Hippo 信号通路的调控因子, 并影响 YAP1 分子的表达以及在其促进肿瘤细胞增殖的相关目标基因转录。同时 PKCι 与 YAP1 的表达增加以及 PKCι 对 YAP1 的调控依赖于 KRAS 在结肠癌中的突变。

4 结论

本研究选用携 KRAS 突变 HCT116 和不携 KRAS 突变的 RKO 结肠癌细胞株作为肿瘤细胞模型, 通过 shRNA 敲低和使用活性抑制剂两种处理方式从 mRNA 水平和蛋白表达水平等层面对 KRAS、PKCι 和 YAP1 之间调控关系的研究, 最终发现 PKCι、YAP1 为 KRAS 突变结肠癌的潜在治疗靶点, 为 KRAS 突变结肠癌的药物开发与治疗提供了新的思路。

【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] SCOTT A, GOFFREDO P, GINADER T, et al. The Impact of KRAS Mutation on the Presentation and Prognosis of Non-Metastatic Colon Cancer: an Analysis from the National Cancer Database[J]. J Gastrointest Surg, 2020, 24(6):1402-1410.
- [3] 王峻立, 陶成成, 乔玲. 自噬基因结肠癌预后模型建立及验证

- [J]. 西部医学, 2021, 33(2): 173-179.
- [4] HALLIN J, ENGSTROM L D, HARGIS L, *et al.* The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(1):54-71.
- [5] DROSTEN M, BARBACID M. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 543-550.
- [6] 邓希, 陈宋奇, 林伟洵. 结肠癌中死亡域相关蛋白及蛋白激酶 C- α 的表达及意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(98):1-2.
- [7] YANG R, CAI T T, WU X J, *et al.* Tumour YAP1 and PTEN expression correlates with tumour-associated myeloid suppressor cell expansion and reduced survival in colorectal cancer[J]. *Immunology*, 2018, 155(2):263-272.
- [8] LIU M, ZHANG Y, YANG J, *et al.* Zinc-Dependent Regulation of ZEB1 and YAP1 Coactivation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Plasticity and Metastasis in Pancreatic Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5):1771-1783.
- [9] YU S, ZHANG Y, LI Q, *et al.* CLDN6 promotes tumor progression through the YAP1-snail axis in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12):949.
- [10] NAKATANI K, YAMAOKA T, OHBA M, *et al.* KRAS and EGFR amplifications mediate resistance to rociletinib and osimertinib in acquired afatinib-resistant NSCLC harboring exon 19 deletion/T790M in EGFR[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(1): 112-126.
- [11] KAWADA K, TODA K, SAKAI Y. Targeting metabolic reprogramming in KRAS-driven cancers[J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22(4):651-659.
- [12] SCOTT A, GOFFREDO P, GINADER T, *et al.* The Impact of KRAS Mutation on the Presentation and Prognosis of Non-Metastatic Colon Cancer: an Analysis from the National Cancer Database[J]. *J Gastrointest Surg*, 2020, 24(6):1402-1410.
- [13] MURRAY N R, WEEMS J, BRAUN U, *et al.* Protein kinase C betaII and PKC δ /lambda: collaborating partners in colon cancer promotion and progression[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2):656-662.
- [14] 邓强, 龙鼎新. 蛋白激酶 C 研究进展[J]. 生命的化学, 2018, 38(3):433-437.
- [15] ISAKOV N. Protein kinase C(PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 48: 36-52.
- [16] NEWTON A C. Protein kinase C: perfectly balanced[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2018, 53(2):208-230.
- [17] RAHIMOVA N, COOKE M, ZHANG S, *et al.* The PKC universe keeps expanding: From cancer initiation to metastasis[J]. *Adv Biol Regul*, 2020, 78:100755.
- [18] KIM K H, CHUNG C, KIM J M, *et al.* Clinical significance of atypical protein kinase C(PKC δ and PKC ζ) and its relationship with yes-associated protein in lung adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):804.
- [19] DAHLEM C, BARGHASH A, PUCHAS P, *et al.* The Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein IMP2/IGF2BP2 is Overexpressed and Correlates with Poor Survival in Pancreatic Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3204.
- [20] MAUGERI-SACCÀ M, DE MARIA R. The Hippo pathway in normal development and cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186:60-72.
- [21] NISHIOM, MAEHAMA T, GOTO H, *et al.* Hippo vs. Crab: tissue-specific functions of the mammalian Hippo pathway[J]. *Genes Cells*, 2017, 22(1):6-31.
- [22] 张雯, 刘赞心, 万盟, 等. 白杨素调控 YAP 介导的 EMT 进程抑制人结肠癌 HCT-116 细胞转移的机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(23):1948-1954.
- [23] 陈胜民, 袁峰. 蛋白激酶 C/Yes 相关蛋白 1 与人乳头瘤病毒在肿瘤微环境中的作用研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(24): 3224-3227.
- [24] 毛静月, 刘蕊, 李彩云, 等. siRNA 靶向沉默 YAP1 对卵巢癌细胞 skov3 增殖凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(4): 797-799.
- [25] KURPPA K J, LIU Y, TO C, *et al.* Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 104-122. e12.
- [26] WANG P, WEI D, ZHANG H, *et al.* PKC δ and YAP1 are crucial in promoting pancreatic tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(67):32736-32750.

(收稿日期:2021-03-11;修回日期:2022-04-26;编辑:刘灵敏)