

MYPT1 通过 RhoA/ROCK 信号通路抑制 结直肠癌细胞增殖和迁移*

唐军伟¹ 彭洪² 郑和平¹ 黄梅¹ 龚磊³ 马一丹¹ 张燕¹

(南充市中心医院 1. 中西医结合科; 2. 肛肠外科; 3. 胃肠外科, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨实肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1 (MYPT1) 在结直肠癌发生发展中的作用及其可能的作用机制。方法 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平, Western blot 检测蛋白表达水平, CCK-8 法检测细胞增殖活性, Transwell 法检测结直肠癌细胞迁移能力, 生物信息学软件筛选可与 MYPT1 相互作用的蛋白质, 通过 TCGA 数据库分析 MYPT1 表达水平及与 RAS 同源基因家族成员 A (RhoA) 和锌离子相关的 RhoA 蛋白 1 (ROCK1) 的相关性。根据实验方案进行分组, 分为空白对照组、阴性对照组、MYPT1 过表达组、RhoA 过表达组、MYPT1 过表达+RhoA 空载组和 MYPT1 过表达+RhoA 过表达组。结果 和癌旁正常组织及正常肠粘膜细胞相比, MYPT1 在结直肠癌组织和细胞中低表达 ($P < 0.05$)。过表达 MYPT1 可抑制结直肠癌细胞增殖和迁移 ($P < 0.05$)。MYPT1 负调控 RhoA 和 ROCK1 的表达 ($P < 0.05$)。过表达 RhoA 促进结直肠癌细胞增殖和迁移 ($P < 0.05$)。MYPT1 通过下调 RhoA 的表达抑制 ROCK1 表达 ($P < 0.05$)。MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制细胞增殖和迁移 ($P < 0.05$)。结论 MYPT1 在结直肠癌组织和细胞中低表达, 其通过 RhoA/ROCK 信号通路调控结直肠癌细胞增殖和迁移。

【关键词】 结直肠癌; 肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1; RAS 同源基因家族成员 A; 锌离子相关的 RhoA 蛋白 1

【中图分类号】 R735.3 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.006

MYPT1 inhibits colorectal cancer cell growth and migration by RhoA/ROCK signaling pathway

TANG Junwei¹, PENG Hong², ZHENG Heping¹, HUANG Mei¹, GONG Lei³, MA Yidan¹, ZHANG Yan¹

(1. Department of Combine Traditional Chinese and Western Medicine, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China;

2. Department of Anorectal Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China;

3. Department of Gastrointestinal Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 **Objective** This study aimed to demonstrate the role of MYPT1 (Myosin phosphatase-targeting subunit 1) in the development of colorectal cancer (CRC) and determine the potential mechanisms of action. **Methods** mRNA expression level was detected by RT-PCR, protein expression level was detected by Western blot, cell proliferation activity was detected by CCK-8 method, migration ability of colorectal cancer cells was detected by Transwell method, protein that could interact with MYPT1 was screened by bioinformatics software. The expression level of MYPT1 and its correlation with RhoA protein 1 (ROCK1), A member of RAS homologous gene family, were analyzed by TCGA database. According to the experimental plan, groups were divided into blank control group, negative control group, MYPT1 overexpression group, RhoA overexpression group, MYPT1 overexpression+RhoA no-load group and MYPT1 overexpression+RhoA overexpression group. **Results** Compared with normal adjacent tissues and normal intestinal mucosal cells, MYPT1 was lower expressed in tissues and cells of colorectal cancer ($P < 0.05$). Overexpression of MYPT1 inhibited the

基金项目: 四川省中医药管理局课题 (2020JC0078, 2020LC0145); 南充市市校合作科研专项基金 (19SXHZ0297); 南充市研发资金项目 (20YFZJ0118); 南充市市级应用技术与开发资金项目 (18YFZJ0019); 南充市哲学社会科学重点研究基地名老中医医案研究中心科研项目 (YAZX19-Y-12); 南充市科技局 (16YFZJ0034)

通信作者: 郑和平, 主任医师, E-mail: 1525767252@qq.com

引用本文: 唐军伟, 彭洪, 郑和平, 等. MYPT1 通过 RhoA/ROCK 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖和迁移 [J]. 西部医学, 2022, 34(7): 966-972. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.006

proliferation and migration of colorectal cancer cells ($P < 0.05$). MYPT1 negatively regulates the expression of RhoA and ROCK1 ($P < 0.05$). Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of colorectal cancer cells ($P < 0.05$). This paper presumes that MYPT1 inhibited ROCK1 expression by downregulating RhoA expression ($P < 0.05$). MYPT1 inhibited cell proliferation and migration by negatively regulating RhoA ($P < 0.05$). **Conclusion** MYPT1 is lowly expressed in CRC cancer tissue and cells, and MYPT1 regulates the proliferative and migratory abilities via the RhoA/ROCK pathway.

【Key words】 colorectal cancer; MYPT1; RhoA; ROCK

结直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,其早期症状并不明显^[1-2]。在全球范围内结直肠癌发病率仅次于肺癌和胃癌位居第三。结直肠癌从癌前病变(腺瘤)发展到恶性病灶有一个较长的过程,但是其具体发病机制尚不清楚,因此阐明结直肠癌的具体发病机制是一个亟待解决的问题^[3-5]。肌球蛋白主要存在于平滑肌中,是肌原纤维粗肌丝的主要组成成分,其分子形态如豆芽状,由多条重链和多条轻链构成^[6]。肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1(Myosin phosphatase-targeting subunit 1, MYPT1)属于哺乳动物 MYPT 家族,其功能是调控亚细胞定位和底物特异性^[7-8]。MYPT 家族成员有多个共同的保守结构域,包括与催化亚基 PP1c 结合的 RVXF 基序和多个锚蛋白重复序列,参与人体多种生理活动,并与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移密切相关^[9-11]。最近的研究发现 MYPT1 可能作为 miR-30d 的直接作用靶点促进前列腺癌的血管生成和肿瘤生长。体内实验也表明 MYPT1 可下调 VEGF 和 CD31 的表达,并可抑制小鼠微血管内皮细胞增殖和肿瘤血管的形成^[12]。但是 MYPT1 在结直肠癌组织中的表达及其与结直肠癌发生发展的关系鲜有报道。本研究检测 MYPT1 在结直肠癌组织中的表达并分析其与结直肠癌恶性生物学行为的关系,探讨 MYPT1 是否通过 RhoA/ROCK 信号通路调控细胞增殖和迁移,以期能为结直肠癌的诊断和治疗提供新的肿瘤标志物及药物治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人结直肠癌细胞株 HCT116、SW480、LOVO 与正常人结肠上皮细胞株 HCoEpiC 购自中国科学院细胞库(上海,中国)。细胞计数试剂盒 8(CCK8)购自 Beyotime 公司(上海,中国)。酶标仪购自 Bio-Rad 公司(Hercules, CA, USA)。10%胎牛血清、TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA, USA)。RIPA 缓冲液购自 Thermo Fisher 公司(Waltham, MA, USA)。Cat IgG 二抗购自 Sungene Biotech 公司(上海,中国)。RHOA 和 ROCK1 一抗购自 Abcam 公司(Cambridge, MA, USA)。Transwell 小室购自 Corning 公司(Costar, CA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 细胞在含有 10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI1640 培养基中生长,培养箱中含有 5%的 CO_2 , 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。按照说明书,用慢病毒表达载体在细胞中转染 LV-MYPT1(MYPT1 过表达组)、LV-MYPT1 NC(MYPT1 阴性对照组)、LV-RhoA(RhoA 过表达组)和 LV-RhoANC(RhoA 阴性对照组)。根据实验方案不同进行不同分组。检测 MYPT1 对细胞增殖和迁移的影响时分为空白对照组、阴性对照组(LV-MYPT1 NC)及 MYPT1 过表达组(LV-MYPT1);检测 MYPT1 对 RhoA 和 ROCK1 蛋白表达的影响时分为空白对照组和 MYPT1 过表达组;检测 RhoA 对细胞增殖和迁移的影响时分为空白对照组、阴性对照组(LV-RhoA NC)及 RhoA 过表达组(LV-RhoA)组;检测 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制 ROCK1 基因表达和结直肠癌细胞增殖和迁移时分为阴性对照组(LV-MYPT1 NC)、MYPT1 过表达组(LV-MYPT1)、MYPT1 过表达 + RhoA 空载组(LV-MYPT1 + LV-RhoANC)和 MYPT1 过表达 + RhoA 过表达组(LV-MYPT1 + LV-RhoA)。

1.2.2 CCK8 检测 采用 CCK8 法检测细胞增殖活性。将对数生长期的细胞收集,消化后计数,制成密度为 5×10^4 cells/mL 的细胞悬液,在 96 孔板上每孔加入 100 μL 细胞悬液。培养 24、48、72 h 后,每孔添加 10 μL CCK8 溶液,继续培养 4 h 后用酶标仪测量 450 nm 波长处 OD 值。

1.2.3 qRT-PCR 检测 根据说明书使用 TRIzol 试剂从结直肠癌细胞中提取总 RNA,再用 MiScript SYBR Green PCR 试剂盒进行逆转录,使用 ABI7500 快速实时 PCR 系统检测 mRNA 的相对表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。引物序列如下: MYPT1: 5'-GAGCCTCCGGTGGTGAAG-3' (forward), 5'-GGCAGTGAGTCCGTCCAC-3' (reverse); ROCK1: 5'-AACATGCTGCTGGATAAATCTGG-3' (forward), R: 5'-TGTATCACATCGTACCATGCC T-3' (reverse)。

1.2.4 Western blot 检测 采用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀分析(RIPA)缓冲液进行蛋

白质提取,根据说明书采用 BCA 法测量蛋白质浓度。用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后转移到 PVDF 膜上,室温下用脱脂牛奶或 BSA 溶液(5%)封闭 PVDF 膜 1 h,然后将膜与一抗在 4℃ 下孵育过夜。第二天用 TBST 溶液(10 min/次)冲洗 PVDF 膜 3 次,然后在室温下用二抗孵育 1 h。使用增强化学发光底物试剂盒和 ImageJ 软件(NIH, Bethesda, Maryland, USA)检测蛋白表达。用 Quantity One V4. 6. 2 软件(Bio-Rad, USA)分析蛋白灰度值。

1.2.5 Transwell 使用 Transwell 小室进行细胞迁移能力分析。Transwell 小室含有明胶涂层聚碳酸酯膜过滤器(孔径为 8 μm),将细胞以每孔 40000 个细胞的密度接种,24 h 后用 D-PBS 冲洗,按照说明书进行细胞迁移能力的评估,考马斯蓝染色后在显微镜下观察细胞并计数。

1.3 生物学数据库的使用 使用蛋白质互作数据库(<https://string-db.org/>)分析可与 MYPT1 相互作用的蛋白质,并使用 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)数据库分析基因在结直肠癌肿瘤组织中的表达及不同基因表达的相关性。

1.4 统计学分析 用 SPSS 21.0 软件(美国纽约州阿蒙克市 IBM 公司)进行统计分析,所有实验至少重复 3 次。两组间比较采用 Student's *t* 检验,多组间采用方差分析和 Scheffe-post-hoc 检验。实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据用 Graph Pad prism 软件((La Jolla, CA, USA)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MYPT1 在结直肠癌患者中低表达 首先通过 GEPIA 数据库分析结直肠癌组织和癌旁正常组织中 MYPT1 的表达水平,结果显示在结肠癌和直肠癌组织中 MYPT1 均呈低表达($P < 0.05$),见图 1。

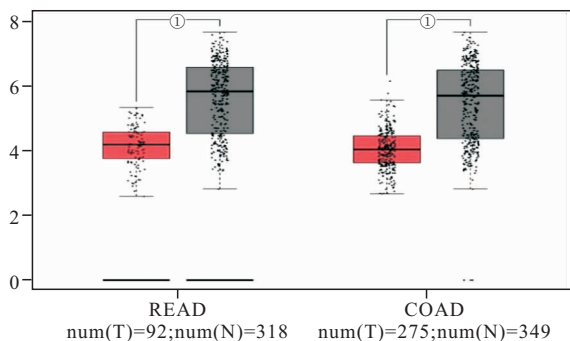


图 1 MYPT1 在结直肠癌中的表达

Figure 1 Expression of MYPT1 in colorectal carcinoma

注:READ. 直肠癌;COAD. 结肠癌;T. 肿瘤组织;N. 癌旁正常组织。与癌旁正常组织比较,① $P < 0.05$

2.2 MYPT1 在结直肠癌细胞中低表达 通过 qRT-PCR 法检测结直肠癌细胞株 HCT116、SW480、LOVO 与正常人结肠上皮细胞株 HCoEpiC 中 MYPT1 表达水平。结果显示,与 HCoEpiC 细胞株(0.96 ± 0.04)相比,MYPT1 在结直肠癌细胞株 HCT116($0.38 \pm 0.04, t = 21.437, P < 0.01$)、SW480($0.42 \pm 0.05, t = 19.31, P < 0.01$)、LOVO($0.58 \pm 0.05, t = 13.14, P < 0.01$)中的表达水平均明显降低,见图 2。选择 SW480 进行后续实验。

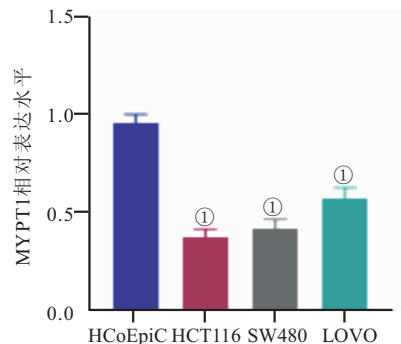


图 2 MYPT1 在结直肠癌细胞株中的表达

Figure 2 Expression of MYPT1 in colorectal cancer cell lines

注:与 HCoEpiC 细胞株比较,① $P < 0.05$

2.3 过表达 MYPT1 抑制结直肠癌细胞增殖 为分析 MYPT1 对细胞增殖的影响,本研究构建了 MYPT1 过表达载体 LV-MYPT1 及空白载体 LV-MYPT1 NC, CCK8 检测结果显示,24 h 时,各组间细胞增殖活性无明显差异($P > 0.05$);48、72 h 时,与空白对照组及阴性对照组相比,MYPT1 过表达组细胞增殖能力明显降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 MYPT1 对细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of MYPT1 on cell proliferation

组别	24 h	48 h	72 h
过表达组	0.31±0.03	0.45±0.04 ^{①②}	0.63±0.05 ^{①②}
空白对照组	0.32±0.03	0.56±0.03	0.76±0.04
阴性对照组	0.33±0.04	0.57±0.05	0.79±0.06

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阴性对照组比较,② $P < 0.05$

2.4 过表达 MYPT1 抑制结直肠癌细胞迁移 Transwell 结果显示,与空白对照组($53.67 \pm 3.51, t = 10.898, P = 0.01$)及阴性对照组($55.33 \pm 2.52, t = 10.898, P < 0.01$)相比,MYPT1 过表达组(26.00 ± 2.65)细胞迁移能力明显降低,见图 3。

2.5 通过生物信息学数据库分析 MYPT1 相互作用蛋白 为探寻 MYPT1 发挥作用的机制,我们通过蛋白质互作数据库 <https://string-db.org> 分析可与 MYPT1 相互作用的蛋白,发现 RhoA 可与 MYPT1 基因编码的蛋白磷酸酶 1 调节亚单位 12A (Protein

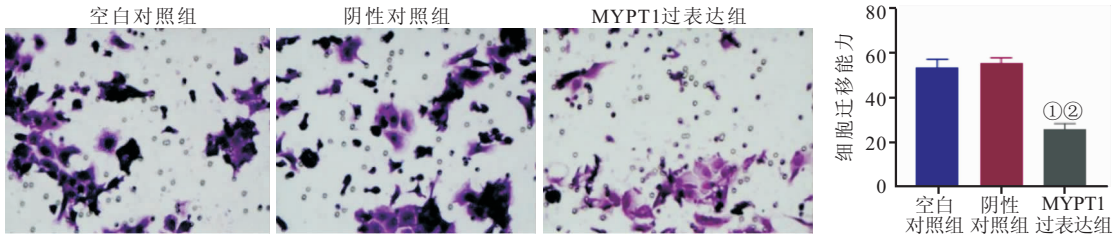


图 3 MYPT1 对结肠直肠癌细胞迁移能力影响

Figure 3 Effect of MYPT1 on Migration Ability of colorectal cancer cell

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阴性对照组比较,② $P < 0.05$

Phosphatase 1 Regulatory Subunit 12A, PPP1R12A) 相互作用,见图 4。

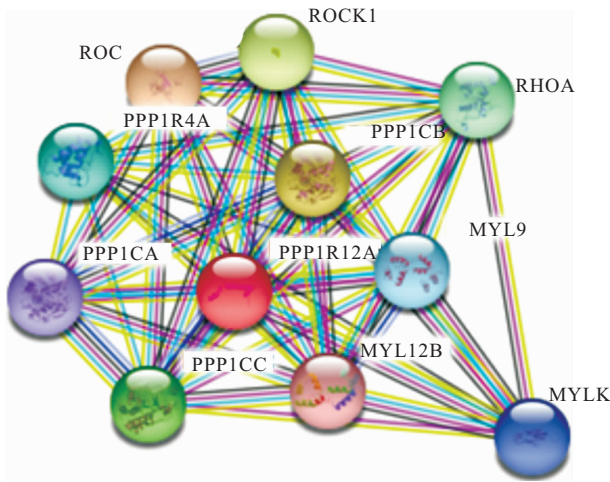


图 4 筛选可与 PPP1R12A 相互作用的蛋白

Figure 4 Screening proteins interacted with PPP1R12A

2.6 MYPT1 负调控 RhoA 和 ROCK1 蛋白表达 为分析 MYPT1 对 RhoA 及其下游信号通路关键蛋白 ROCK1 表达的影响,通过 Western blot 检测过表达 MYPT1 后 RhoA 和 ROCK1 蛋白表达水平,结果显示与空白对照组相比,MYPT1 过表达组中 RhoA($t = 29.942, P < 0.01$)和 ROCK1($t = 50.278, P < 0.01$)蛋白表达水平均明显降低,见图 5。

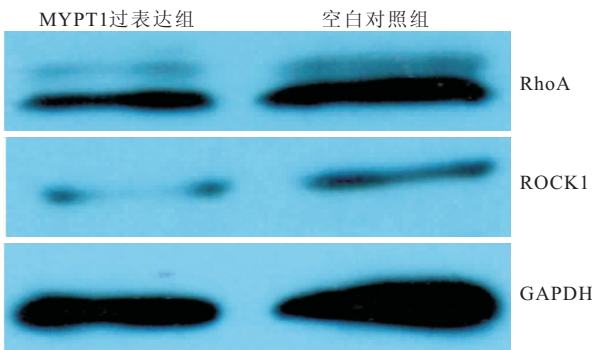


图 5 MYPT1 对 RhoA 和 ROCK1 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of MYPT1 on the expression of RhoA and Rock1 proteins

2.7 RhoA 和 ROCK1 表达呈正相关 通过 GEPIA 数据库分析结肠直肠癌中 RhoA 和 ROCK1 表达的相关性,结果发现 RhoA 和 ROCK1 表达呈正相关,见图 6。

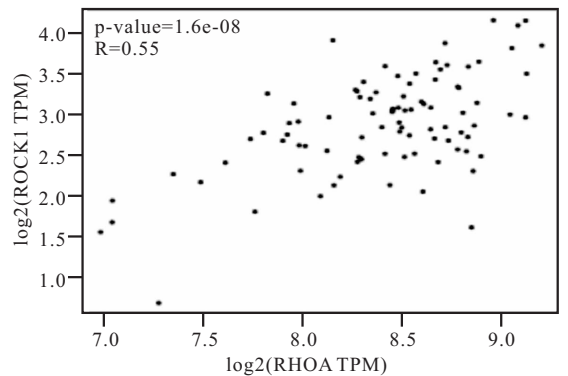


图 6 RhoA 和 ROCK1 表达的相关性

Figure 6 The Correlation between RhoA and ROCK1

2.8 过表达 RhoA 促进结肠直肠癌细胞增殖 进一步分析 RhoA 对结肠直肠癌 SW480 细胞增殖能力的影响,结果显示,24 h 时,各组细胞增殖活性无明显差异($P > 0.05$);48、74 h 时,与空白对照组及阴性对照组相比,RhoA 过表达组中 SW480 细胞增殖能力明显增强($P < 0.05$),见表 2。

表 2 过表达 RhoA 对细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of overexpression RhoA on cell proliferation

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.32 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.64 ± 0.06
阴性对照组	0.33 ± 0.05	0.48 ± 0.07	0.65 ± 0.05
RhoA 过表达组	0.35 ± 0.03	0.61 ± 0.04 ^{①②}	0.78 ± 0.03 ^{①②}

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阴性对照组比较,② $P < 0.05$

2.9 过表达 RhoA 促进结肠直肠癌细胞迁移 本研究分析了 RhoA 对结肠直肠癌 SW480 细胞迁移能力的影响,结果显示与空白对照组($32.67 \pm 3.06, t = -6.682, P = 0.003$)及阴性对照组($34.33 \pm 4.04, t = -5.128, P = 0.007$)相比,RhoA 过表达组(49.33 ± 3.06)中 SW480 细胞迁移能力明显增强,见图 7。

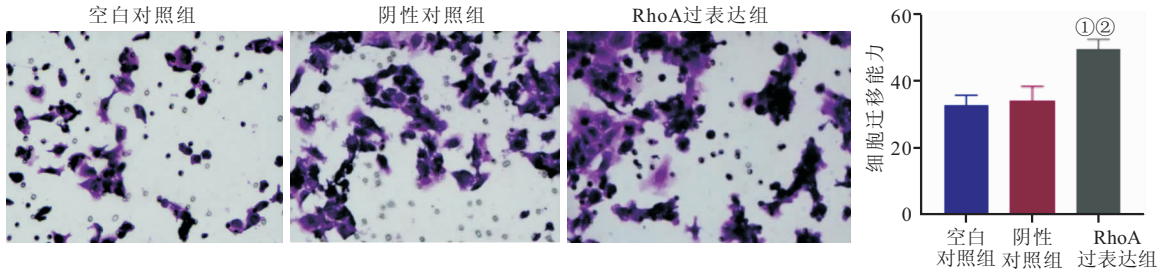


图 7 RhoA 对结直肠癌细胞迁移能力的影响

Figure 7 Effect of RhoA on migration ability of colorectal cancer cell

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阴性对照组比较,② $P < 0.05$

2.10 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制 ROCK1 基因表达 本研究接下来分析了 MYPT1 是否通过抑制 RhoA 的表达从而负调控 ROCK1 的表达。使用 qRT-PCR 法检测 ROCK1 的表达,结果显示与阴性对照组(0.95 ± 0.06)相比,MYPT1 过表达组($0.56 \pm 0.05, t = 11.99, P < 0.01$)及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组($0.59 \pm 0.05, t = 10.583, P < 0.01$)中 ROCK1 表达水平明显降低;与 MYPT1 过表达组($t = -6.624, P < 0.01$)及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组($t = -5.786, P < 0.01$)相比,MYPT1 过表达+RhoA 过表达组(0.74 ± 0.03)中 ROCK1 表达水平则有所增高,证实 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制 ROCK1 基因表达,见图 8。

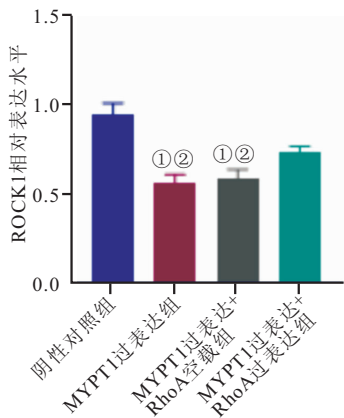


图 8 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制 ROCK1 基因表达

Figure 8 MYPT1 inhibit ROCK1 expression by negative regulation of RhoA

注:与阴性对照组比较,① $P < 0.05$;与 MYPT1 过表达组+RhoA 过表达组比较,② $P < 0.05$

2.11 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制结直肠癌细胞增殖 为验证 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制结直肠癌细胞增殖,使用 CCK8 法检测细胞增殖能力,结果显示,24 h 时,各组细胞增殖能力无明显差异($P > 0.05$),48、72 h 时,与阴性对照组相比,MYPT1 过表达组及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组中细胞增殖能

力明显降低,但是与 MYPT1 过表达组及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组相比,MYPT1 过表达+RhoA 过表达组中细胞增殖能力则有所增高(均 $P < 0.05$),证实 RhoA 可逆转 MYPT1 对细胞增殖活性的抑制作用,见表 3。

表 3 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制结直肠癌细胞增殖($\bar{x} \pm s$)

Table 3 MYPT1 inhibit colorectal cell proliferation by negative regulation of RhoA

组别	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	0.30 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.80 ± 0.04
MYPT1 过表达组	0.30 ± 0.05	0.42 ± 0.03 ①	0.67 ± 0.04 ①
MYPT1 过表达+RhoA 空载组	0.32 ± 0.05	0.41 ± 0.04 ①	0.65 ± 0.05 ①
MYPT1 过表达+RhoA 过表达组	0.31 ± 0.05 ②③	0.48 ± 0.05 ②③	0.75 ± 0.04 ②③

注:与阴对照组比较,① $P < 0.05$;与 MYPT1 过表达+RhoA 过表达组比较,② $P < 0.05$;与 MYPT1 过表达+RhoA 空载组比较,③ $P < 0.05$

2.12 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制结直肠癌细胞迁移 通过拯救实验本研究验证 MYPT1 是否通过负调控 RhoA 抑制结直肠癌细胞迁移,通过 Transwell 法检测细胞迁移能力,结果显示与阴性对照组(93.33 ± 3.06)相比,MYPT1 过表达组($59 \pm 3.00, t = 13.889, P < 0.001$)及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组($61.67 \pm 2.52, t = 13.857, P < 0.001$)中细胞迁移能力明显降低;与 MYPT1 过表达组($t = -6.054, P = 0.004$)及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组($t = -5.353, P = 0.006$)相比,MYPT1 过表达+RhoA 过表达组(72.67 ± 2.52)中细胞迁移能力则有所增高,证实 MYPT1 对细胞迁移能力的抑制作用至少部分是通过负调控 RhoA 实现的,见图 9。

3 讨论

肿瘤细胞的增殖失控、侵袭和迁移是恶性肿瘤最基本的生物学特征。肿瘤细胞的迁移和侵袭可由多种化学物质诱导,这些化学诱导剂和相关的一些细胞因子可与肿瘤细胞表面的受体结合,激活细胞内的信号转导通路并调节细胞骨架的重组,从而促进肿瘤细

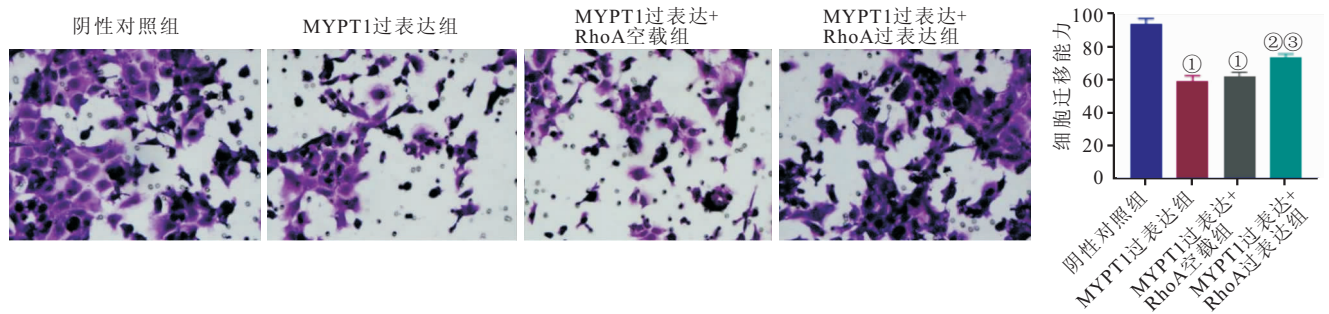


图 9 MYPT1 通过负调控 RhoA 抑制结肠癌细胞迁移

Figure 9 MYPT1 inhibit colorectal cell migration by negative regulation of RhoA

注:与阴性对照组比较,① $P < 0.05$;与 MYPT1 过表达组比较,② $P < 0.05$;与 MYPT1 过表达+RhoA 空载组比较,③ $P < 0.05$

细胞的增殖和转移^[13-14]。研究发现肌球蛋白作为细胞骨架的重要组成部分,可通过对其轻链磷酸化和去磷酸化的调节影响肌球蛋白的活性,在肿瘤的增殖和迁移中发挥着重要作用^[15]。还有研究表明由于细胞分裂依赖细胞骨架的活性,并且细胞的运动行为依赖于细胞骨架的动态变化,因此肌球蛋白轻链的磷酸化可通过调控肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用影响细胞骨架的活性,进一步增强肿瘤细胞的增殖和迁移能力^[16]。MYPT1 是蛋白磷酸酶 1 (Protein phosphatase 1, PP1) 的调控亚单位,MYPT1 和 PP1 的复合物可以通过去磷酸化肌球蛋白轻链调控肿瘤细胞增殖和转移。既往研究发现 MYPT1 在多种恶性肿瘤中低表达,过表达 MYPT1 可抑制胃癌的发生发展和转移,并且在卵巢癌细胞和动物模型中敲除 MYPT1 可促进肿瘤的生长及导致对铂类药物耐药性的增加^[17-18]。通过 GEPIA 数据库本研究发现 MYPT1 在结肠癌和直肠癌组织中的表达水平明显降低,与正常人结肠上皮细胞株 HCoEpiC 相比,MYPT1 在结直肠癌细胞株 HCT116、SW480、LOVO 中的表达水平也明显降低,并且过表达 MYPT1 可抑制结直肠癌细胞株的增殖和迁移。结果表明 MYPT1 在结直肠癌的发生发展中扮演着抑癌基因的角色,与既往研究结果相符,证实 MYPT1 可作为结直肠癌新的肿瘤标志物及潜在的药物作用靶点。

本研究探讨了 MYPT1 发挥抑癌作用的分子机制。通过蛋白质互作数据库分析了可与 MYPT1 编码的 PPP1R12A 蛋白相互作用的蛋白,发现 RhoA 可与 PPP1R12A 相互作用。RhoA 是 Rho 小 G 蛋白家族的一员,参与调节肌动蛋白细胞骨架重排^[19-21]。越来越多的数据表明 RhoA 信号通路通过肌动蛋白细胞骨架重排参与肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭。RhoA 可诱导应力纤维的形成并可将细胞外信号传递给肌动蛋白和微管细胞骨架。ROCK1 是 ROCK 家族

之一,也是 RhoA 蛋白的下游激酶,其可增加肌球蛋白磷酸化,促进细胞产生收缩力,而这种张力是细胞增殖所必需的。ROCK1 还可以通过磷酸化肌球蛋白轻链增强肌动球蛋白的收缩能力^[22]。研究表明 RhoA/ROCK 信号通路是癌症进展的关键信号通路^[23],Wang 等^[24]的研究发现激活 RhoA/ROCK 信号通路可以增加卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力,Xia 等^[25]的研究证实 RhoA/ROCK 信号通路参与血管生成拟态的形成,抑制 RhoA/ROCK 信号通路可通过减少肿瘤血供抑制非小细胞肺癌的生长和转移。因此靶向 RhoA/ROCK 信号通路可能是抑制肿瘤细胞增殖和迁移的有效策略。本研究发现过表达 MYPT1 可抑制 RhoA 和 ROCK1 蛋白的表达,RhoA 和 ROCK1 表达呈正相关,并且过表达 RhoA 可促进结直肠癌细胞的增殖和迁移,提示 MYPT1 可能通过 RhoA 信号通路发挥抑癌作用。进一步通过功能回复实验发现与阴性对照组相比,MYPT1 过表达组及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组中 ROCK1 表达水平明显降低,细胞增殖和迁移能力明显降低,但是与 MYPT1 过表达组及 MYPT1 过表达+RhoA 空载组相比,MYPT1 过表达+RhoA 过表达组中 ROCK1 表达水平、细胞增殖和迁移能力有所增高,表明 RhoA 可逆转 MYPT1 对 ROCK1 基因表达的下调作用和对细胞增殖和迁移能力的抑制作用,证实 MYPT1 通过 RhoA/ROCK 信号通路抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移。

4 结论

MYPT1 通过调控 RhoA/ROCK 信号通路抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移,为阻断结直肠癌的发生发展提供了潜在的治疗靶点。但是 MYPT1 的上游调控基因及其在动物实验中的作用还需要进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 林嘉敏, 吴夏慧, 罗毅. 结直肠癌的炎癌转化研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2021, 28(3): 378-381.
- [2] 陈猛云, 樊晓明. 长链非编码 RNA 在结直肠癌发生发展中的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2021, 48(2): 267-270.
- [3] 胡嘉怡, 陈蕾. 肠道菌群失调与结直肠癌的相关研究进展[J]. 转化医学杂志, 2021, 10(1): 57-60.
- [4] 陆玮, 肖乾, 胡焯婷等. 微生物与结直肠癌的发病机制、早期诊断和治疗的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2020, 47(12): 909-914.
- [5] 康争春, 鄂继福, 吕桂芬等. 结直肠癌相关长链非编码 RNA 调控信号通路研究进展[J]. 西部医学, 2020, 32(2): 304-307, 312.
- [6] YOKOYAMA M, KIMURA M Y, ITO T, *et al.* Myosin Light Chain 9/12 Regulates the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 594297.
- [7] LIU C, SHI Y, LI J, *et al.* O-GlcNAcylation of myosin phosphatase targeting subunit 1(MYPT1) dictates timely disjunction of centrosomes[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(21): 7341-7349.
- [8] DONG G, HUANG Y, DING H, *et al.* Mypt1 regulates Bmp signaling to promote embryonic exocrine pancreas growth in zebrafish[J]. *Genesis*, 2020, 58(2): e23345.
- [9] KISS A, ERDŐDI F, LONTAY B. Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme[J]. *BiochimBiophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(1): 2-15.
- [10] GONZÁLEZ-TORRES A, BAÑUELOS-VILLEGAS E G, MARTÍNEZ-ACUÑA N, *et al.* MYPT1 is targeted by miR-145 inhibiting viability, migration and invasion in 2D and 3D HeLa cultures[J]. *BiochimBiophys Res Commun*, 2018, 507(1-4): 348-354.
- [11] LIANG Y, ZHUO Y, LIN Z, *et al.* Decreased Expression of MYPT1 Contributes to Tumor Angiogenesis and Poor Patient Prognosis in Human Prostate Cancer[J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18(2): 100-108.
- [12] LIN Z Y, CHEN G, ZHANG Y Q, *et al.* MicroRNA-30d promotes angiogenesis and tumor growth via MYPT1/c-JUN/VEGFA pathway and predicts aggressive outcome in prostate cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 48.
- [13] 牛艳芳, 柴芳玉, 庞文会, 等. TRIM21 通过泛素化稳定细胞骨架蛋白质促进下咽癌分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(6): 790-797.
- [14] 尹一峰, 胡启辉, 杜毅超, 等. 细胞外基质在肝细胞性肝癌发生发展过程中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30(1): 91-97.
- [15] 高文, 李科, 李雪萍, 等. 肌球蛋白轻链激酶介导的肌球蛋白调节轻链磷酸化研究[J]. 医学信息, 2021, 34(8): 28-30, 35.
- [16] SHUTOVA M S, ASOKAN S B, TALWAR S, *et al.* Self-sorting of nonmusclemyosins IIA and IIB polarizes the cytoskeleton and modulates cell motility[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(9): 2877-2889.
- [17] MUÑOZ-GALVÁN S, FELIPE-ABRIO B, VERDUGO-SIVIANES EM, *et al.* Downregulation of MYPT1 increases tumor resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway and increasing the stemness[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 7.
- [18] WANG F, SUN Y. Overexpression of Myosin Phosphatase Target Subunit 1(MYPT1) Inhibits Tumor Progression and Metastasis of Gastric Cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2508-2517.
- [19] YU G, WANG Z, ZENG S, *et al.* Paeoniflorin Inhibits Hepatocyte Growth Factor-(HGF-) Induced Migration and Invasion and Actin Rearrangement via Suppression of c-Met-Mediated RhoA/ROCK Signaling in Glioblastoma[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 9053295.
- [20] 王鹏, 王遵义, 邵建强, 等. RhoA 在乳腺癌中的表达及与淋巴管生成、淋巴结转移的关系[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(2): 147-150.
- [21] 李敬东, 韩效林, 杨翠, 等. miR-34b-5p 上调抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤的侵袭及 RhoA/ROCK 信号通路[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(2): 186-190.
- [22] XU N, LIU F, WU S, YE M, *et al.* CHD4 mediates proliferation and migration of non-small cell lung cancer via the RhoA/ROCK pathway by regulating PHF5A[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 262.
- [23] YUAN J, CHEN L, XIAO J, *et al.* SHROOM2 inhibits tumor metastasis through RhoA-ROCK pathway-dependent and -independent mechanisms in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 58.
- [24] WANG W, DU H, LIU H, *et al.* SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 promotes ovarian cancer cell migration and invasion via the activation of the RhoA/ROCK signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 668-676.
- [25] XIA Y, CAI X Y, FAN J Q, *et al.* The role of sema4D in vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(9): 2227-2238.

(收稿日期: 2021-08-01; 修回日期: 2022-05-10; 编辑: 刘灵敏)