

网络出版时间:2022-12-26 17:08:31 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1523.017.html

PPP5C 对人肺腺癌 H1299 细胞迁移侵袭及肿瘤干性的影响及机制研究

曾莉莉^{1,2}, 陈微微¹, 马向瑞², 董洪亮¹, 杜静¹

摘要 目的 探讨磷酸蛋白磷酸酶催化亚基(PPP5C)对人肺腺癌 H1299 细胞迁移侵袭能力及肿瘤干性的影响及机制。方法 构建 PPP5C-pcDNA3.1 过表达载体,转染 PPP5C-pcDNA3.1 和 pcDNA3.1 至 H1299 细胞,遗传霉素(G418)筛选 H1299 稳转细胞系。qRT-PCR 和 Western blot 法鉴定 PPP5C mRNA 和蛋白的表达水平,细胞生长曲线绘制和克隆形成实验检测细胞增殖活性;划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力;诱导干细胞成球实验检测细胞干性。结果 成功构建 PPP5C-pcDNA3.1 真核表达载体,转染 H1299 细胞后 PPP5C 的表达水平显著升高。H1299 细胞过表达 PPP5C 后,生长曲线和克隆形成实验结果显示细胞增

殖能力无变化;划痕和 Transwell 实验显示细胞迁移和侵袭能力显著增强,基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达升高;干细胞成球结果显示细胞干性显著增强,性别决定区 Y-box 2(SOX2)的表达升高。结论 人肺腺癌细胞 H1299 中过表达 PPP5C 不影响细胞增殖,但可通过调控 MMP9 和 SOX2 来增强其迁移侵袭能力及肿瘤干性。

关键词 PPP5C;细胞增殖;迁移和侵袭;肿瘤干性;基质金属蛋白酶 9;SOX2

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0094-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.016

2022-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31900441);山东省自然科学基金面上项目(编号:ZR2019MC026);山东省中医药发展计划(编号:2019-0514);泰山学者青年专家、齐鲁卫生与健康杰出青年人才和外专双百项目资金(编号:WSG2018019)

作者单位:滨州医学院附属医院¹医学研究中心、²口腔颌面外科,滨州 256600

作者简介:曾莉莉,女,硕士研究生;

董洪亮,男,主管技师,责任作者,E-mail:hongliang.234@163.com;

杜静,女,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail:djedith@126.com

肺癌是世界上高发的恶性肿瘤之一,死亡率高达 18%,治愈难度高,患者术后生存率较低^[1]。PPP5C 是目前已鉴定的磷酸蛋白磷酸酶催化亚基(phosphoprotein phosphatase catalytic subunit,PPPCs)家族成员之一,它广泛参与了一些癌症的生理病理过程,已被证明在各种恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用。研究^[2]表明 PPP5C 通过与 AMP 活化蛋白激酶的相互作用可以促进肝癌的发生。PPP5C 高转录水平的胰腺癌患者预后较好^[3]。MiR-520a-5p/PPP5C 调控模式也被确定为胰腺癌吉西他滨耐药的关键^[4]。这些为 PPP5C 在癌症的发生发展、预后

RAW264.7 cells or Exos derived from RAW264.7, followed by evaluations of the cell barrier function and mitochondrial function. **Results** There was an increased number of M1 macrophages in carotid atherosclerotic tissues of diabetic mice and in AGEs treated RAW264.7 cells. CM or Exos significantly induced barrier dysfunction, reactive oxygen species (ROS) accumulation and mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells *in vitro*. In addition, bioinformatics analysis showed that miR-92a was up-regulated in Exos derived from macrophages stimulated by AGEs. Experimentally, Exos participated in CM-induced barrier dysfunction, ROS accumulation and mitochondrial dysfunction in bEnd.3 cells by transferring miR-92a. Finally, a series of rescue experiments further confirmed that Exos regulated the barrier dysfunction and mitochondrial function in vascular endothelial cells through miR-92a. **Conclusion** The expression of AGEs and the number of M1 macrophages in diabetic ApoE^{-/-} mice increase, and AGEs stimulates Exos from macrophages could impair the barrier function and mitochondrial function in vascular endothelial cells by delivering miR-92a *in vitro*.

Key words macrophages; exosomes; microRNA-92a; advanced glycation end products; diabetes; endothelial cell damage

和耐药中的密切关系提供了有力的证据。目前关于 PPP5C 在肺癌转移和干细胞相关方面的研究较少,该研究成功构建了 PPP5C 基因的真核表达载体,转染至人肺腺癌 H1299 细胞,探讨了 PPP5C 对人肺腺癌 H1299 细胞迁移侵袭能力及肿瘤干性的影响及机制,为揭示肺癌发生发展及肺癌治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人肺腺癌细胞 H1299 细胞购于美国模式培养物集存库(ATCC);胎牛血清和 RPMI1640 培养基购于美国 BI 公司;限制性核酸内切酶 Hind III、Xho I 购于美国 NEB 公司;2 × Taq Master Mix 和 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒小提试剂盒购于杭州爱思进生物技术有限公司;胶回收试剂盒购于美国 Omega 公司;PCR 所需引物由上海生物工程公司合成;Easstep® Super 总 RNA 提取试剂盒购于北京普洛麦格生物技术有限公司;转染试剂 Lipofectamine™ 3000 和逆转录试剂盒购于美国赛默飞世尔科技有限公司;2 × NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 购于近岸蛋白质科技有限公司;PPP5C、MMP9 抗体购于美国 Proteintech 公司;α-Tubulin 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;性别决定区 Y-box 2 (sex-determining region Y-box 2, SOX2) 抗体购于美国 Immunway 公司;HRP 标记的山羊抗兔抗体,HRP 标记的山羊抗鼠抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;CCK-8 试剂盒购于日本同仁化学研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299 细胞培养在含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 1640 培养基中,并置于 37 °C 恒温,5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 PPP5C-pcDNA3.1 载体的构建 查找 GenBank 中 PPP5C 的序列,根据 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒的说明书于诺唯赞网站设计引物,引物序列如下:PPP5C-F (Hind III):5'-ctagcgtt-taaactaagcttATGGCGATGGCGGAGGGCGAG-3'、PPP5C-R (Xho I):5'-aacgggccccttagactcgagTCACAT-CATTCCTAGCTGCAGC-3'。利用高保真酶进行 PCR 扩增:PCR supermix 25 μl,模板 cDNA 2 μl,上下游引物各 1 μl,ddH₂O 补齐至 50 μl。反应条件:95

°C、3 min,95 °C、30 s,57 °C、30 s,72 °C、50 s,共 35 个循环,72 °C、10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的基因 PPP5C。用限制性核酸内切酶 Hind III、Xho I 37 °C 酶切 4 h 线性化载体 pcDNA3.1,1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。回收纯化的 PPP5C 和 pcDNA3.1 线性条带按照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒进行重组,重组产物转化至大肠杆菌 DH5α 中,涂在含氨苄抗性的平板上,37 °C 培养 12 h,挑取单克隆进行 PCR 鉴定及质粒提取后双酶切鉴定。

1.2.3 细胞转染与稳转细胞株筛选 将处于对数生长期的 H1299 细胞进行计数,按照 1 × 10⁵ 个/ml 接种于 6 孔板中,过夜培养后细胞密度长至约 70% ~ 90%,设实验组和对照组,实验组转染 PPP5C-pcDNA3.1,对照组转染 pcDNA3.1,另外转染 EGFP-pcDNA3.1 用于转染效率判定。转染具体操作如下:5 μl Lipofectamine™ 3000 溶液混于 125 μl 1640 空培养基作为 A 液,2.5 μg 质粒溶于 125 μl 1640 空培养基,再加入 5 μl P3000™ 溶液混匀作为 B 液,A 液和 B 液各静止 5 min,接着将 B 液加入 A 液混合均匀,室温孵育 15 min 后,缓慢加入细胞中,48 h 后收细胞用于转染效果鉴定,同时留下部分 H1299 细胞加入 400 mg/ml G418 筛选稳转 PPP5C-pcDNA3.1 和 pcDNA3.1 的细胞株。

1.2.4 mRNA 及蛋白表达水平检测 qRT-PCR 检测 PPP5C、MMP9、SOX2 的 mRNA 表达水平。设计引物见表 1。

表 1 相关引物序列

基因	核苷酸序列(5'→3')
ppp5c	F:ACTACTGCCACCAGATGG
	R:AGCAGCGTGTGGCATAG
mmp9	F:CAGTCCACCCTTGTGCTCTT
	R:TGCCACCCGAGTGAACCAT
sox2	F:CCCTGTGGTTACCTCTTCC
	R:CTCCATTTCCTCCGTTT
gapdh	F:CTCCTCCTGTTCCGACAGTCAGC
	R:CCCAATACGACCAAAATCCGTT

根据 Easstep® Super 试剂盒说明书提取总 RNA,用逆转录转录试剂盒合成 cDNA 用于 Q-PCR 检测。Q-PCR 反应体系与条件如下:2 × Taq PCR SuperMix 10 μl,模板 cDNA 2 μl,上下游引物各 1 μl,ddH₂O 补齐至 20 μl。95 °C、4 min,95 °C、15 s,54 °C、30 s,72 °C、20 s,共 39 个循环。Western blot 检测

PPP5C、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 和性别决定区 Y-box 2 (sex-determining region Y-box 2, SOX2) 蛋白的表达水平。离心收集细胞沉淀加入蛋白裂解液冰上裂解 30 min, 离心后取上清液。加入 $5 \times$ loading buffer 混匀后 95°C 煮 10 min, SDS-PAGE 电泳结束后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。接着用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 anti-PPP5C 兔抗 (1 : 1 000), MMP9 兔抗 (1 : 500), SOX2 鼠抗 (1 : 2 000) 和 α -Tubulin 鼠抗 (1 : 2 000), 4°C 孵育过夜; 相应 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后进行显影。凝胶成像仪 (Bio-Rad ChemiDoc XRS+) 进行拍照。Image J 软件扫描分析不同蛋白的灰度值, 以 α -Tubulin 为内参。

1.2.5 细胞生长曲线绘制和克隆形成实验 细胞生长曲线绘制: PPP5C-pcDNA3.1 (实验组) 和 pcDNA3.1 (对照组) 的 H1299 细胞计数后, 96 孔板中按每孔 3×10^3 个/100 μl 接种, 每组设 3 个复孔, 于 0、24、48、72 h 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 37°C 、 CO_2 箱避光孵育 2 h, 酶标仪测定 450 nm 和 630 nm 处的吸光值 (optical density, OD), 绘制细胞生长曲线。克隆形成: PPP5C-pcDNA3.1 (实验组) 和 pcDNA3.1 (对照组) 的 H1299 细胞计数后, 6 孔板中每孔接种 600 个细胞, 每组设 3 个复孔, 37°C 、 CO_2 箱中培养 2 周后, 弃培养基, $1 \times$ PBS 洗 3 次, 4% 甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 30 min, 流动水缓慢冲洗干净, 自然晾干。凝胶成像仪 (Bio-Rad ChemiDoc XRS+) 拍照, Image J 软件进行细胞数目统计。

1.2.6 划痕实验和 Transwell 实验 划痕实验: PPP5C-pcDNA3.1 (实验组) 和 pcDNA3.1 (对照组) 的 H1299 细胞计数后, 按 40 000 个/孔, 接种于 12 孔板, 每组设 3 个复孔, 细胞贴壁后, 200 μl 枪头按十字方向轻划细胞, PBS 冲洗 3 次, Olympus 倒置显微镜下拍照记录 0 h 时的划痕距离 (L0)。48 h 后在同一位置再次拍照记录划痕距离 (L1), 计算迁移率 = $(L0 - L1) / L0 \times 100\%$ 。Transwell 实验: PPP5C-pcDNA3.1 (实验组) 和 pcDNA3.1 (对照组) H1299 细胞计数后, Transwell 小室装置置于 12 孔板中, 分别往上室和下室中加入 200 μl 含 3 500 个细胞的无血清 1640 培养基和 800 μl 含 20% 胎牛血清的 1640 培养基, 37°C 、5% CO_2 的培养箱培养 72 h。用棉棒擦除上室中未穿膜的细胞后, 结晶紫染色 2 min, PBS 清洗后, Olympus 倒置显微镜下拍照, 统计穿透

膜的细胞数。

1.2.7 干细胞成球实验 无血清的 1640 培养基重悬 PPP5C-pcDNA3.1 (实验组) 和 pcDNA3.1 (对照组) 的 H1299 细胞, 计数后按照 2 000 个/孔接种于 12 孔板, 每组设 3 个复孔, 每孔加入 20 ng/ml EGF、20 ng/ml FGF、2% B27, 37°C 恒温 CO_2 培养箱中培养, 诱导细胞成球。2 周后, Olympus 倒置显微镜下拍照统计成球数目。

1.3 统计学处理 所有实验数据均采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间独立样本采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPP5C 真核过表达载体的构建及鉴定 PCR 扩增目的基因 PPP5C (1 500 bp) (图 1A)。并将其克隆至 pcDNA3.1 载体上。通过 Hind III 和 XhoI 双酶切鉴定 (图 1B) 及测序鉴定 (图 1C), 显示插入 PPP5C 基因序列正确, 构建真核过表达载体 PPP5C-pcDNA3.1 成功。

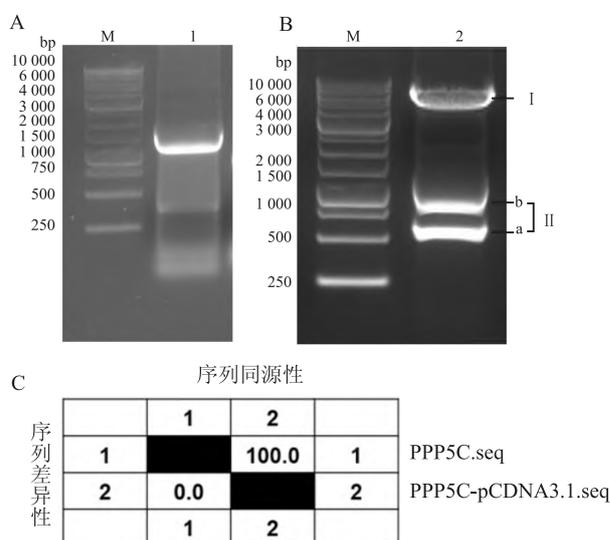


图 1 PCR 扩增目的基因 PPP5C 及真核表达载体的鉴定

A: PPP5C 扩增; B: 质粒酶切鉴定 (PPP5C CDS 序列中 537-543 位置为 Hind III 酶切识别位点); C: 测序结果; M: DNA Marker; 1: PPP5C 扩增产物; 2: PPP5C-pcDNA3.1 酶切产物; I: 线性 pcDNA3.1-5028 bp; II: a-543 bp, b-957 bp

2.2 转染 PPP5C-pcDNA3.1 后, PPP5C 过表达效果鉴定 重组质粒转染至 H1299 细胞后, 利用 400 mg/ml G418 筛选稳转细胞系, 经 qRT-PCR 和 West-

ern blot 验证过表达效率(图 2),结果显示,实验组 PPP5C 的 mRNA($t = 14.97, P < 0.001$)和蛋白($t = 26.04, P < 0.0001$)表达水平均高于转染 pcDNA3.1 的对照组,表明 PPP5C 过表达成功。

2.3 PPP5C 基因过表达对细胞增殖的影响 细胞生长曲线及克隆形成实验结果显示,与 pcDNA3.1 对照组相比,实验组 H1299 细胞过表达 PPP5C 后细胞生长曲线和克隆形成数无明显变化,说明 PPP5C 过表达对 H1299 细胞增殖能力无明显影响(图 3)。

2.4 PPP5C 基因过表达对细胞迁移和侵袭能力的影响 细胞划痕实验结果提示(图 4A),与 pcDNA3.1 对照组相比,实验组 H1299 细胞过表达 PPP5C 后细胞的迁移率升高,差异有统计学意义($t = 3.951, P < 0.05$);Transwell 实验结果显示(图 4B),实验组穿膜的细胞数量多于对照组,差异有统计学意义($t = 15.52, P < 0.001$)。此外, MMP9 的 mRNA($t = 7.043, P < 0.01$)和蛋白($t = 6.831, P < 0.01$)表达水平实验组也高于对照组,差异有统计

学意义(图 4C、D)。

2.5 PPP5C 基因过表达对 H1299 细胞干性的影响

诱导干细胞成球实验结果提示(图 5A),与对照组相比,实验组 H1299 细胞过表达 PPP5C 后,诱导产生的干细胞成球数量增多,球体直径增大,差异有统计学意义($t = 11.57, P < 0.001$);同时, SOX2 的 mRNA($t = 7.670, P < 0.01$)和蛋白($t = 33, P < 0.0001$)表达水平实验组也高于对照组,差异有统计学意义(图 5B、C)。

3 讨论

肿瘤复发与耐药是当前癌症治疗的最大难题。肿瘤干细胞可以通过促进药物外排、增强抗氧化能力、凋亡逃逸、增强 DNA 的损伤修复能力以及和肿瘤微环境的相互作用等多种方式促进肺癌的多重耐药性^[5]。因此,针对肺癌干细胞引发的癌症转移、多重耐药、复发和免疫逃逸等特性的药物研究与新的治疗靶点寻求迫在眉睫。

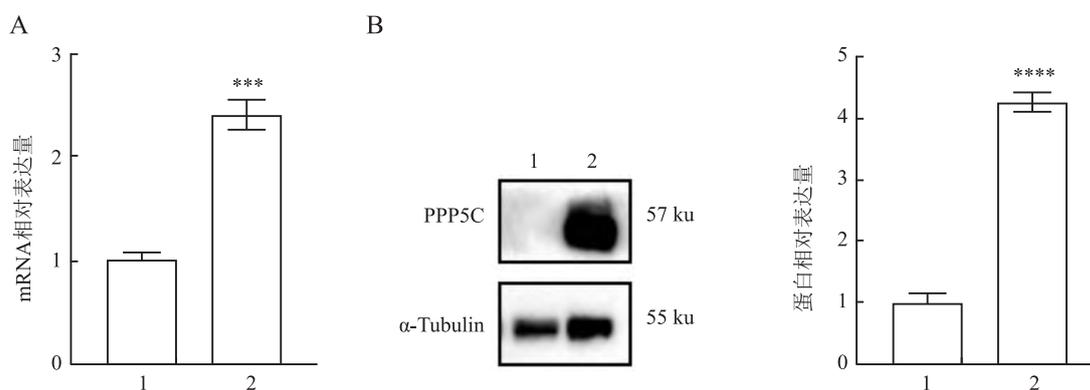


图 2 PPP5C 基因的 mRNA 和蛋白表达水平

A: PPP5C 基因的 mRNA 表达水平比较; B: PPP5C 基因的蛋白表达水平比较及半定量分析; 1: pcDNA3.1; 2: PPP5C; 与对照组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

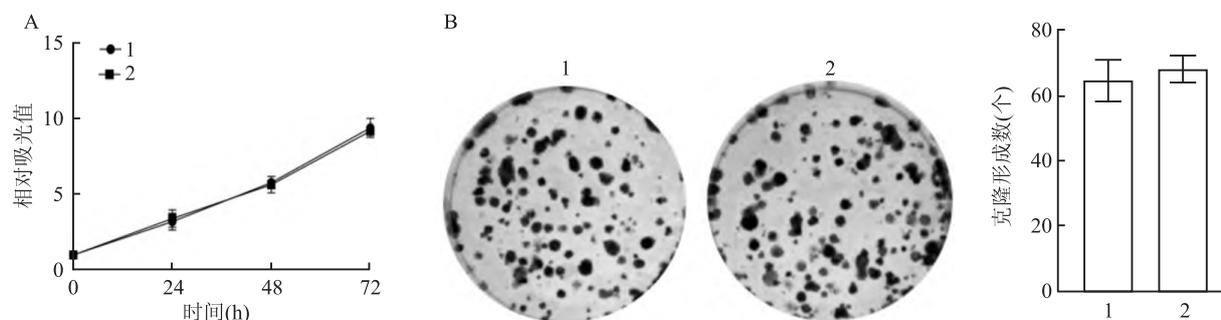


图 3 PPP5C 基因过表达对增殖的影响

A: CCK-8 检测细胞增殖能力; B: 克隆形成实验检测细胞克隆形成数 $\times 100$; 1: pcDNA3.1; 2: PPP5C

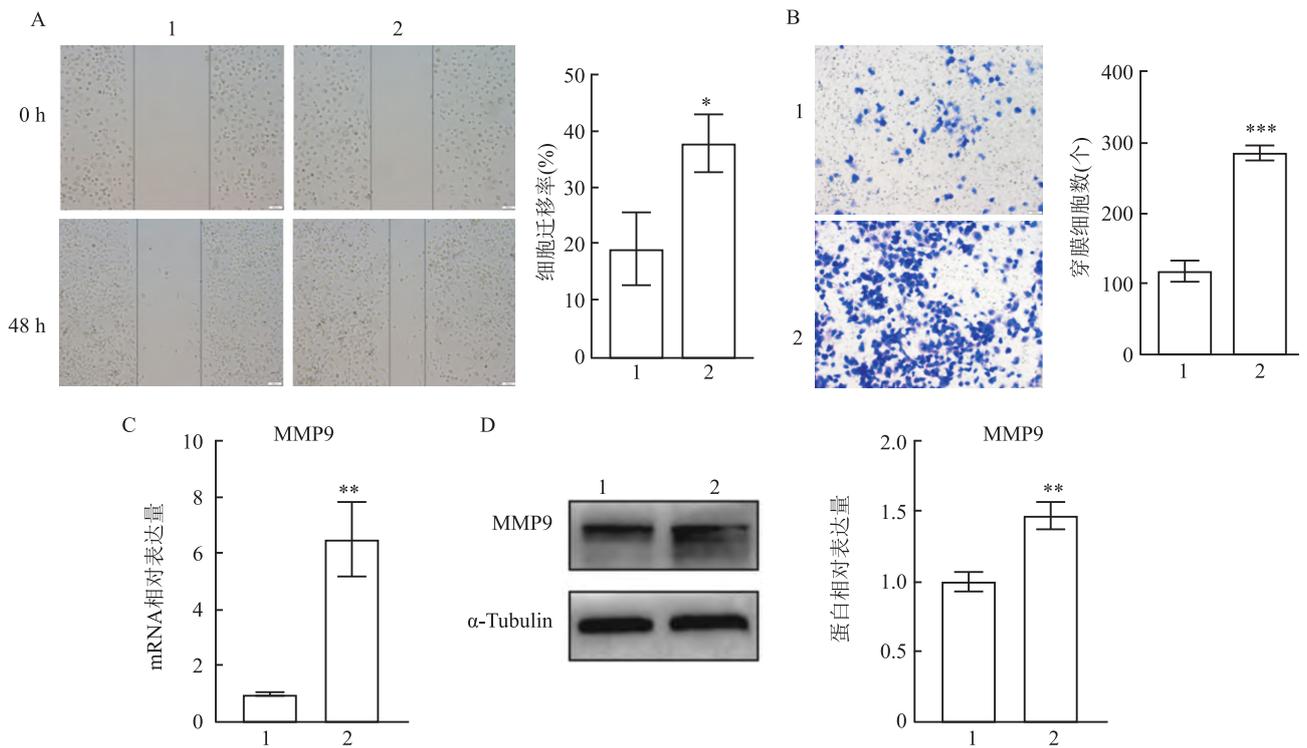


图4 PPP5C 基因过表达对迁移和侵袭的影响

A:细胞划痕实验检测细胞迁移能力 ×100;B:Transwell 实验检测细胞迁移侵袭穿孔数 ×100;C:PPP5C 基因过表达后 MMP9 在 H1299 细胞中的 mRNA 表达水平比较;D:PPP5C 基因过表达后 MMP9 在 H1299 细胞中的蛋白表达水平比较及半定量分析;1:pcDNA3. 1;2:PPP5C;与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

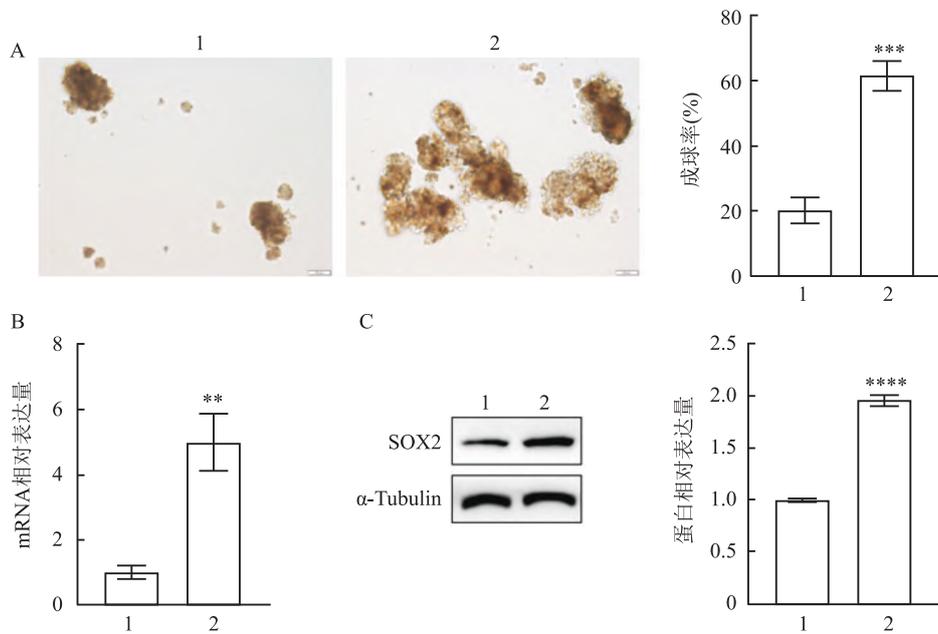


图5 PPP5C 基因过表达对肿瘤干性的影响

A:成球实验检测 PPP5C 基因过表达对 H1299 细胞成球能力的影响及定量分析 ×100;B:PPP5C 基因过表达后 SOX2 在 H1299 细胞中的 mRNA 表达水平比较;C:PPP5C 基因过表达后 SOX2 在 H1299 细胞中的蛋白表达水平比较及半定量分析;1:pcDNA3. 1;2:PPP5C;与对照组比较: ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

尽管磷酸酶在细胞磷酸化调节中发挥着与激酶同等重要的作用,但对其在肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)中的作用与机制一直研究得比较少。许多癌症相关的磷酸酶最近成为药物,表明进一步了解 CSCs 相关的磷酸酶可能为肿瘤治疗提供新的治疗机会,这也让学者们重新看到了希望。抗肿瘤药物班黄素衍生素 LB-100 是一种蛋白磷酸酶 2A (PPP2CA) 和 5 (PPP5C) 的催化抑制剂,研究^[6]证明 LB-100 与铂类化疗联合使用可在体内和体外协同引发抗肿瘤反应,与免疫治疗药物阿替利珠单抗结合使用可增强免疫 T 细胞浸润和杀伤能力,对小细胞肺癌的治疗起到重要作用。

癌细胞的无限增殖能力是肺癌发生和发展的重要因素之一。PPP5C 已被证明在前列腺癌中高表达,并通过调节蛋白激酶的磷酸化来促进人前列腺癌的细胞增殖和存活^[7]。敲除 PPP5C 可以促进体外胰腺癌细胞的凋亡^[8]。而本研究结果显示过表达 PPP5C 并没有促进人肺腺癌 H1299 细胞的增殖,可能是不同细胞系的原因,也可能是 PPP5C 本身在肺癌细胞中就已高表达,再外源性过表达 PPP5C,不会对其增殖能力产生显著的影响。

癌细胞的迁移侵袭能力是肺癌发生转移和复发的重要原因之一。研究^[9]证明 PPP5C 可以加速人类神经胶质瘤的细胞生长和迁移,敲低 PPP5C 显著抑制了神经胶质瘤细胞的迁移。本研究显示,PPP5C 过表达可以提高人肺腺癌 H1299 细胞的迁移和侵袭能力。MMP9 又叫胶原酶,是 MMP 家族中分子量最大的成员,目前已被认为是一种参与肿瘤发生过程中的重要细胞外蛋白酶,可催化细胞外基质如弹性蛋白、胶原蛋白等成分的降解,维持组织动态平衡^[10]。研究^[11]表明 MMP9 在下咽癌组织中的表达明显高于癌组织,且随着淋巴结转移和肿瘤病理分期的增加而增加,说明 MMP9 可能通过多种机制参与下咽癌的发生、发展、侵袭和转移。本研究中,人肺腺癌 H1299 细胞中过表达 PPP5C, MMP9 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高,表明 PPP5C 可以正向调控 MMP9 的转录和翻译。因此,认为肺腺癌 H1299 细胞中,PPP5C 可通过正向调控 MMP9 促进细胞的迁移和侵袭。

CSCs 是构成癌组织新生的主要来源,它们具有自我更新、多能分化和无限增殖的能力,这使得肿瘤治愈问题始终无法突破。大量文献报道了在肺癌的

发生与进展中肿瘤干细胞都起到了至关重要的作用。本实验显示,在诱导人肺腺癌 H1299 干细胞成球实验中,过表达 PPP5C 可增强细胞成球能力,表明在此过程中人肺腺癌 H1299 细胞的干性得以增强,PPP5C 与人肺腺癌 H1299 细胞的干性密切相关。SOX2 是一种干细胞转录因子,是肿瘤干细胞自我更新能力和多项分化潜能的关键调节因子。以往研究^[12]证明,SOX2 的激活上调可以促进前列腺癌细胞的肿瘤干细胞特性,也可诱导诱导胶质母细胞瘤的细胞干性和肿瘤增殖^[13],这充分说明了 SOX2 在维持肿瘤干性方面发挥着举足轻重的作用。课题组前期研究^[14]发现抑制 SOX2 介导的干性调节可以减轻肺腺癌的进展,SOX2 也可以通过神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (glioma-associated oncogene homologue 1, Gli1) 介导的上皮间充质转变来促进肺鳞癌的进展^[15]。本研究中,PPP5C 过表达正向调控了人肺腺癌 H1299 细胞中 SOX2 mRNA 和蛋白的表达水平,PPP5C 可通过正向调控 SOX2 提高人肺腺癌 H1299 细胞的干性。

综上所述,本研究通过构建 PPP5C 过表达的真核载体,外源性提高了人肺腺癌 H1299 细胞中 PPP5C 的蛋白水平,进而证实了人肺腺癌细胞 H1299 中 PPP5C 过表达对细胞增殖无影响,但可以通过正向调控 MMP9 和 SOX2 来增强细胞迁移侵袭能力和肿瘤干性,具体的调控机制还待进一步研究。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Chen Y L, Hung M H, Chu P Y, et al. Protein phosphatase 5 promotes hepatocarcinogenesis through interaction with AMP-activated protein kinase[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 138: 49-60.
- [3] Hang J J, Lau S Y, Yin R H, et al. The role of phosphoprotein phosphatases catalytic subunit genes in pancreatic cancer[J]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20203282.
- [4] Fu R B, Shao Q, Yang B, et al. MiR-520a-5p/PPP5C regulation pattern is identified as the key to gemcitabine resistance in pancreatic cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12: 903484.
- [5] 潘振华,刘红雨,陈军. 肺癌干性样细胞与耐药[J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(2): 111-7.
- [6] Mirzapoizova T, Xiao G, Mambetsariev B, et al. Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in small cell lung cancer[J].

- Mol Cancer Ther, 2021, 20(10): 1820–35.
- [7] Lv J M, Chen L, Gao Y, et al. PPP5C promotes cell proliferation and survival in human prostate cancer by regulating of the JNK and ERK1/2 phosphorylation[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 5797–809.
- [8] Zhu J H, Ji Y, Yu Y Q, et al. Knockdown of serine/threonine protein phosphatase 5 enhances gemcitabine sensitivity by promoting apoptosis in pancreatic cancer cells *in vitro*[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8761–9.
- [9] Zhi X L, Zhang H Q, He C, et al. Serine/threonine protein phosphatase-5 accelerates cell growth and migration in human glioma [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 669–77.
- [10] Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, et al. MMP9: a tough target for targeted therapy for cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1847.
- [11] Song Z, Wang J F, Su Q H, et al. The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma [J]. *Braz J of Otorhinolaryngol*, 2021, 87(5): 521–8.
- [12] Lee Y, Yoon J, Ko D, et al. TMPRSS4 promotes cancer stem-like properties in prostate cancer cells through upregulation of SOX2 by SLUG and TWIST1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 372.
- [13] Lopez-Bertoni H, Johnson A, Rui Y, et al. Sox2 induces glioblastoma cell stemness and tumor propagation by repressing TET2 and deregulating 5hmC and 5mC DNA modifications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 37.
- [14] Chen W W, An J J, Guo J W, et al. Sodium selenite attenuates lung adenocarcinoma progression by repressing SOX2-mediated stemness[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 81(5): 885–95.
- [15] 董洪亮, 曾莉莉, 武艳, 等. SOX2-OT/SOX2 轴通过 Gli1 介导的上皮间质转化调控肺鳞癌 H520 细胞的迁移(英文)[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(10): 1431–9.

The effect and mechanism of PPP5C on the migration and invasion and tumor stemness of human lung adenocarcinoma H1299 cells

Zeng Lili^{1,2}, Chen Weiwei¹, Ma Xiangrui², Dong Hongliang¹, Du Jing¹

(¹Medical Research Center, ²Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of phosphoprotein phosphatase 5 catalytic(PPP5C) on the migration, invasion and tumor stemness of human lung adenocarcinoma H1299 cells. **Methods** The PPP5C-pcDNA3.1 overexpression vector was constructed. PPP5C-pcDNA3.1 and pcDNA3.1 were transfected into H1299 cells, and H1299 stable cell lines were screened with G418. The mRNA and protein expression levels of PPP5C were identified by qRT-PCR and Western blot. The proliferation activity of H1299 cells was detected by drawing cell growth curve and cell clonal formation assay. The wound-healing assay and transwell assay were used to test the migration and invasion abilities of H1299 cells, respectively. The stemness of H1299 cells was evaluated by sphere formation assay. **Results** The PPP5C-pcDNA3.1 eukaryotic expression vector was successfully constructed and the expression levels of PPP5C significantly increased after transfection into H1299 cells. After overexpression of PPP5C in H1299 cells, the cell growth curve and clonal formation assay displayed that the proliferation ability was not affected, the migration and invasion of cells were significantly enhanced through wound-healing assay and transwell assay, accompanied by an increase in the expression of MMP9, stem cell spheroid assay showed a significant increase in stemness of cells, accompanied by increased expression of SOX2. **Conclusion** The proliferation ability of cells is not affected, the migration and invasion and the stemness of cells are enhanced by regulating MMP9 and SOX2 respectively, after overexpression of PPP5C in human lung adenocarcinoma H1299 cells.

Key words PPP5C; cell proliferation; migration and invasion; tumor stemness; MMP9; SOX2