

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.007

PTPRD 去甲基化通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控胃癌细胞的增殖、迁移及化疗耐药性

刘妍慧^{a,b}, 高紫玉^a, 任鹏^b, 杜予馨^b, 刘彩霞^a, 邢智伟^a (内蒙古医科大学 a. 附属医院 肿瘤内科; b. 研究生院, 内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘要] **目的:** 探究蛋白酪氨酸磷酸酶 D (PTPRD) 去甲基化通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对胃癌细胞增殖、迁移及化疗耐药性的影响。**方法:** 体外培养胃癌细胞 MKN-74、MKN-45 和 人胃黏膜上皮细胞 GES-1 并检测 PTPRD 表达。常规培养 MKN-45 细胞及耐药 MKN-45/5-FU 细胞, 分别转染 PTPRD 空载体 (NC 组、NC/5-FU 组)、PTPRD 过表达腺病毒 (PTPRD 组、PTPRD/5-FU 组)、shRNA 空载体 (sh-NC 组、sh-NC/5-FU 组)、shRNA-PTPRD 慢病毒 (sh-PTPRD 组、sh-PTPRD/5-FU 组) 和 PTPRD 过表达腺病毒 + 10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P 处理 (PTPRD + 740Y-P 组、PTPRD + 740Y-P/5-FU 组)。MTT 法、划痕愈合实验检测各组细胞的增殖活力和迁移能力, 细胞自噬实验检测细胞的自噬水平, WB 法检测细胞中 EMT 和 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达。采用 0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza 处理 MKN-45 细胞, qPCR 法、MTT 法检测细胞中 PTPRD mRNA 表达和细胞增殖活力。**结果:** PTPRD mRNA 和蛋白在胃癌细胞中均呈低表达 ($P < 0.05$)。与 MKN-45 组相比, PTPRD 组自噬体与自噬溶酶体数量、PTPRD、上皮钙黏素 (E-cadherin)、BAX 蛋白表达均增加 (均 $P < 0.05$), 细胞增殖活力、细胞迁移率、p-PI3K、波形蛋白 (vimentin)、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达均降低 (均 $P < 0.05$), sh-PTPRD 组细胞增殖活力、细胞迁移率、p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达均增加 (均 $P < 0.05$), 自噬体与自噬溶酶体数量、PTPRD、E-cadherin、BAX 蛋白表达均减少 (均 $P < 0.05$); 与 PTPRD 组相比, PTPRD + 740Y-P 组细胞增殖活力、细胞迁移率、p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达均增加 (均 $P < 0.05$), 自噬体与自噬溶酶体数量、PTPRD、E-cadherin、BAX 蛋白表达减少 (均 $P < 0.05$)。随着 5-aza 浓度的增加, MKN-45 细胞中 PTPRD mRNA 表达增加、细胞增殖活力均降低 (均 $P < 0.05$)。与 MKN-45/5-FU 组相比, PTPRD/5-FU 组细胞迁移率、细胞增殖活力均降低 (均 $P < 0.05$), sh-PTPRD/5-FU 组细胞迁移率、细胞增殖活力均增加 (均 $P < 0.05$); 与 PTPRD/5-FU 组相比, PTPRD + 740Y-P/5-FU 组细胞迁移率、细胞增殖活力均增加 (均 $P < 0.05$)。**结论:** PTPRD 在胃癌细胞中呈低表达状态, PTPRD 去甲基化可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制胃癌细胞增殖、迁移并增强其对化疗的敏感性。

[关键词] 蛋白酪氨酸磷酸酶 D; 胃癌; 增殖; 迁移; PI3K/Akt/mTOR 通路; 化疗耐药性; 甲基化

[中图分类号] R735.2; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 01-0048-08

PTPRD demethylation regulates the proliferation, migration, and chemoresistance of gastric cancer cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway

LIU Yanhui^{a,b}, GAO Ziyu^a, REN Peng^b, DU Yuxin^b, LIU Caixia^a, XING Zhiwei^a (a. Department of Oncology, Affiliated Hospital; b. Graduate School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of protein tyrosine phosphatase D (PTPRD) demethylation on the proliferation, migration, and chemoresistance of gastric cancer (GC) cells through the phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. **Methods:** The gastric cancer MKN-74 and MKN-45 cells, as well as human gastric mucosal epithelial GES-1 cells, GES-1 were cultured *in vitro* and PTPRD expression was detected. MKN-45 cells and their drug-resistant variant MKN-45/5-FU cells were routinely cultured and transfected with various vectors: PTPRD empty vector (NC group, NC/5-FU group), PTPRD overexpressing adenovirus (PTPRD group, PTPRD/5-FU group), shRNA empty vector (sh-NC group, sh-NC/5-FU group), shRNA PTPRD lentivirus (sh-PTPRD group, sh-PTPRD/5-FU group), and PTPRD overexpressing adenovirus + 10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P treatment (PTPRD + 740Y-P group, PTPRD + 740Y-P/5-FU group). MTT assay and wound healing assay were used to assess cell proliferation and migration. Cell autophagy levels were assessed using autophagy assay, and the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and PI3K/Akt/mTOR pathway related proteins was detected using western blot (WB). MKN-45 cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza solutions, and the PTPRD mRNA expression and cell proliferation in MKN-45 cells were detected using qPCR and MTT assays. **Results:**

[基金项目] 内蒙古自治区科技计划项目 (No. 2020GG0171); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (No. NJZZ23013)

[作者简介] 刘妍慧 (2000—), 女, 硕士生, 主要从事消化道肿瘤的研究。E-mail: 15047058618@139.com

[通信作者] 邢智伟 (1980—), E-mail: xzw1980wei@163.com

PTPRD mRNA and protein were significantly downregulated in gastric cancer cells ($P < 0.05$). Compared with the MKN-45 group, the numbers of autophagosomes and autophagosomes, as well as the protein expression of PTPRD, E-cadherin, and BAX significantly increased in the PTPRD group (all $P < 0.05$), while cell proliferation, migration rate, and protein expression of p-PI3K, vimentin, p-Akt, and p-mTOR decreased significantly (all $P < 0.05$); However, in the sh-PTPRD group, cell proliferation activity, migration rate, and protein expression of p-PI3K, vimentin, p-Akt, and p-mTOR increased notably, while the quantity of autophagosomes, autophagosomes, and protein expression of PTPRD, E-cadherin, and BAX decreased (all $P < 0.05$). Compared with the PTPRD group, the PTPRD + 740Y-P group showed an increase in cell proliferation activity, migration rate, protein expression of p-PI3K, vimentin, p-Akt, and p-mTOR (all $P < 0.05$), and a decrease in number of autophagosomes, autophagosomes, and protein expression of PTPRD, E-cadherin, and BAX (all $P < 0.05$). With the increase of 5-aza concentration, the mRNA expression of PTPRD in MKN-45 cells increased ($P < 0.05$), while the cell proliferation activity decreased ($P < 0.05$). Compared with the MKN-45/5-FU group, the cell migration rate and proliferation activity decreased in PTPRD/5-FU group, while the sh-PTPRD/5-FU group showed an increase in cell migration rate and proliferation activity (all $P < 0.05$). Compared with the PTPRD/5-FU group, the PTPRD + 740Y-P/5-FU group showed an increase in cell migration rate and proliferation activity (all $P < 0.05$). **Conclusion:** PTPRD is downregulated in GC cells, and its demethylation may inhibit proliferation and migration of GC cells and enhance chemosensitivity by suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway.

[Key words] protein tyrosine phosphatase D (PTPRD); gastric cancer (GC); proliferation; migration; PI3K/Akt/mTOR pathway; chemotherapy resistance; methylation

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(1): 48-55. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.007]

胃癌具有高度侵袭性和异质性,其发病率随着年龄的增长而上升,环境和遗传因素都会对其发生和发展产生影响^[1]。胃癌确诊时大多已处于疾病的晚期阶段,患者的预后通常较差,目前对局部晚期或转移性胃癌患者进行全身治疗可以在一定程度上缓解症状、改善生存结局并提高生活质量^[2]。然而,胃癌治疗方案相对有限,因此,探索可靠的监测及评价指标并深入了解其潜在机制,对于胃癌的防治具有重要意义。蛋白酪氨酸磷酸酶D(protein tyrosine phosphatase D, PTPRD)是一种抑癌基因,在多种肿瘤中失活,能调控多种细胞信号通路及细胞的侵袭与凋亡,其高甲基化可能导致肿瘤的发生,从而参与肿瘤的进展和免疫抑制^[3]。既往研究^[4]表明,PTPRD在肿瘤细胞中失活,其能通过调节STAT3、PD-L1表达调控细胞的存活与免疫,参与肿瘤进展和免疫逃逸。磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)和哺乳动物雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是细胞内的重要调节通路,不仅在调控细胞周期和多种细胞功能活动中起关键作用,而且在维持正常的生理状态以及肿瘤在内的各种病理状况的发展过程中也起着至关重要的作用^[5]。研究^[6]显示,催化PI3K/Akt/mTOR通路可调节多种肿瘤细胞凋亡、转移、自噬和耐药性,对胃癌的发生和预后具有一定作用。酪蛋白激酶2 α 1(CSNK2A1)能通过PI3K/Akt/mTOR通路增强胃癌细胞的侵袭能力,在胃癌进展中发挥致癌作用^[7]。但是,PTPRD能否通过PI3K/Akt/mTOR通路调控胃癌进展目前还尚未得到证实。因此,本研究主要探索PTPRD通过PI3K/Akt/mTOR通路调节胃癌细胞的增殖、迁移及化疗耐药性,以期为胃癌的诊治提供新的生物标志物和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人胃癌细胞MKN-74(货号:YT800282)、MKN-45(货号:YT800283)和人正常胃黏膜上皮细胞GES-1(货号:YT800289)购于北京伊塔生物科技有限公司。人胃癌耐药细胞MKN-74/5-FU、MKN-45/5-FU由本实验室前期构建和保存。

PTPRD过表达腺病毒、shRNA-PTPRD慢病毒、PTPRD空载体、shRNA空载体由重庆威斯腾生物公司合成,RPMI 1640培养液(货号:YS-3015)购于上海彩佑实业有限公司,TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(货号:GOY-9884)购于上海谷研实业有限公司,MTT细胞增殖试剂盒(货号:BJ-R65663)、PI3K激活剂740Y-P(货号:BJ-15249)购于上海邦景实业有限公司,mRFP-GFP-LC3(货号:GT-AP-V103)购于兴拓生物医药科技有限公司,Lipofectamine™ 3000(货号:L3000015)购于赛默飞世尔科技公司,p-PI3K、波形蛋白(vimentin)、p-Akt、上皮钙黏素(E-cadherin)、PTPRD、BAX、p-mTOR、GAPDH一抗及山羊抗兔二抗(货号:ab182651、ab217673、ab8933、ab76319、ab233806、ab216494、ab314037、ab181603及ab97051)购于英国Abcam公司,DNA甲基转移酶抑制剂5-aza(货号:EY-19996)购于上海一研生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与分组转染

将胃癌GES-1、MKN-74、MKN-45、MKN-74/5-FU、MKN-45/5-FU细胞复苏后,置于37℃、5% CO₂的RPMI 1640培养基中培养传代。收集对数期生长期MKN-45细胞,随机分为MKN-45组、NC组、PTPRD组、sh-NC组、sh-PTPRD组、PTPRD + 740Y-P组。MKN-45组细胞进

行常规培养, NC组细胞转染PTPRD空载体, PTPRD组细胞感染PTPRD过表达腺病毒, PTPRD + 740Y-P组细胞感染PTPRD过表达腺病毒 + 10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P处理^[8], sh-NC组细胞转染shRNA空载体, sh-PTPRD组细胞感染shRNA-PTPRD慢病毒, 使用Lipofectamine™ 3000转染细胞, 24 h后收集各组细胞进行后续实验。同时按上述分组处理条件处理耐药细胞MKN-45/5-FU, 并将其分为MKN-45/5-FU组、NC/5-FU组、PTPRD/5-FU组、sh-NC/5-FU组、sh-PTPRD/5-FU组和PTPRD + 740Y-P/5-FU组。

1.3 qPCR法检测胃癌细胞中PTPRD mRNA表达水平

提取各组胃癌细胞的总RNA, 逆转录为cDNA。qPCR法检测PTPRD mRNA的表达。PCR引物序列: PTPRD正向引物为5'-TTACACGAACACCCGTTGA-3', 反向引物为5'-CGGAGTCCGTAAGGGTTGTA-3'; GAPDH正向引物为5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCA-3', 反向引物为5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'。PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 共40个循环。结果通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算PTPRD mRNA的相对表达量。

1.4 MTT法检测胃癌细胞的增殖活力

将各组胃癌细胞接种至96孔板(5×10^3 个/孔)中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿润环境中培养1~3 d, 加入适量培养液和50 μL MTT溶液, 继续培养4~8 h, 加入200 μL DMSO和25 μL 甘氨酸缓冲液, 混匀后, 采用酶标仪检测波长570 nm处的光密度(D)值, 以 D 值表示细胞的增殖活力。

1.5 划痕愈合实验检测胃癌细胞的迁移能力

将各组胃癌细胞接种在6孔板(1×10^6 个/孔)中, 待细胞汇合度达90%时, 用10 μL 移液器吸头划痕, 弃去旧的培养基, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中继续培养24 h, 在光学显微镜下观察、拍照。依据公式“细胞迁移率(0 h时-24 h时)划痕面积/0 h时划痕面积 $\times 100\%$ ”计算细胞迁移率。

1.6 电子显微镜及共聚焦显微镜检测胃癌细胞的自噬水平

将各组MKN-45细胞接种在6孔板(1.5×10^5 个/孔)中, 按1.2节中的方法处理细胞后用2%多聚甲醛和0.2%戊二醛溶液固定1 h, 脱水、包埋切片并用3%醋酸铀酰和柠檬酸铅染色, 最后通过电子显微镜可视化并拍摄图像。

使用mRFP-GFP-LC3腺病毒转染细胞12 h, 更换培养基, 通过使用共聚焦显微镜对各组细胞进行成像并量化荧光斑点的数量, 以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的共定位为自噬体的标志, 而不含GFP的RFP点为自噬溶酶体。

1.7 WB法检测各组胃癌细胞中PTPRD、PI3K/Akt/mTOR通路及EMT相关蛋白的表达

采用RIPA溶液提取各组细胞的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。经电泳、转膜并封闭后, 加入兔抗PTPRD(1:2 000)、p-PI3K(1:500)、vimentin(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、E-cadherin(1:10 000)、p-mTOR(1:5 000)、BAX(1:1 000)、GAPDH(1:10 000)一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日, PBS清洗后, 加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:2 000)室温下反应120 min, ECL法显影, 用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.8 去甲基化实验检测5-aza对胃癌细胞PTPRD mRNA表达和增殖的影响

将密度为 1×10^5 的MKN-45细胞接种至RPMI 1640培养基中, 用PBS将5-aza配置成0.25、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 分别处理MKN-45细胞48 h。根据前述qPCR法和MTT法检测不同浓度5-aza处理对MKN-45细胞的PTPRD mRNA表达和细胞增殖活力的影响。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复6次。采用SPSS 26.00软件分析实验数据。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTPRD mRNA和蛋白在胃癌细胞中呈低表达

qPCR法和WB法(图1)检测结果显示, 与GES-1细胞相比, MKN-74、MKN-45细胞中PTPRD mRNA和蛋白表达均显著降低[mRNA: (0.76 ± 0.03)、(0.52 ± 0.02) vs (1.05 ± 0.03), 均 $P < 0.05$; 蛋白: (0.71 ± 0.02)、(0.46 ± 0.02) vs (1.02 ± 0.04), 均 $P < 0.05$], 在MKN-45细胞中表达水平较低($P < 0.05$), 因此, 选择MKN-45细胞进行后续研究。

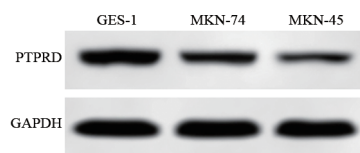


图1 WB法检测GES-1细胞和胃癌MKN-74、MKN-45细胞中PTPRD蛋白的表达

2.2 PTPRD和740Y-P对MKN-45细胞增殖活力的影响

MTT法检测结果(表1)显示, MKN-45组、NC组、sh-NC组细胞的增殖活力比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与MKN-45组、NC组相比, PTPRD组细胞的增殖活力显著降低(均 $P < 0.05$); 与MKN-45组、sh-NC组相比, sh-PTPRD组细胞增殖活

力增加($P < 0.05$);与PTPRD组相比,PTPRD + 740Y-P 组细胞的增殖活力增加($P < 0.05$)。实验结果表明,沉默PTPRD可增强细胞的增殖活力;PTPRD过表达可降低MKN-45细胞的增殖活力,而同时使用PI3K 激活剂740Y-P则可增强细胞的增殖活力。

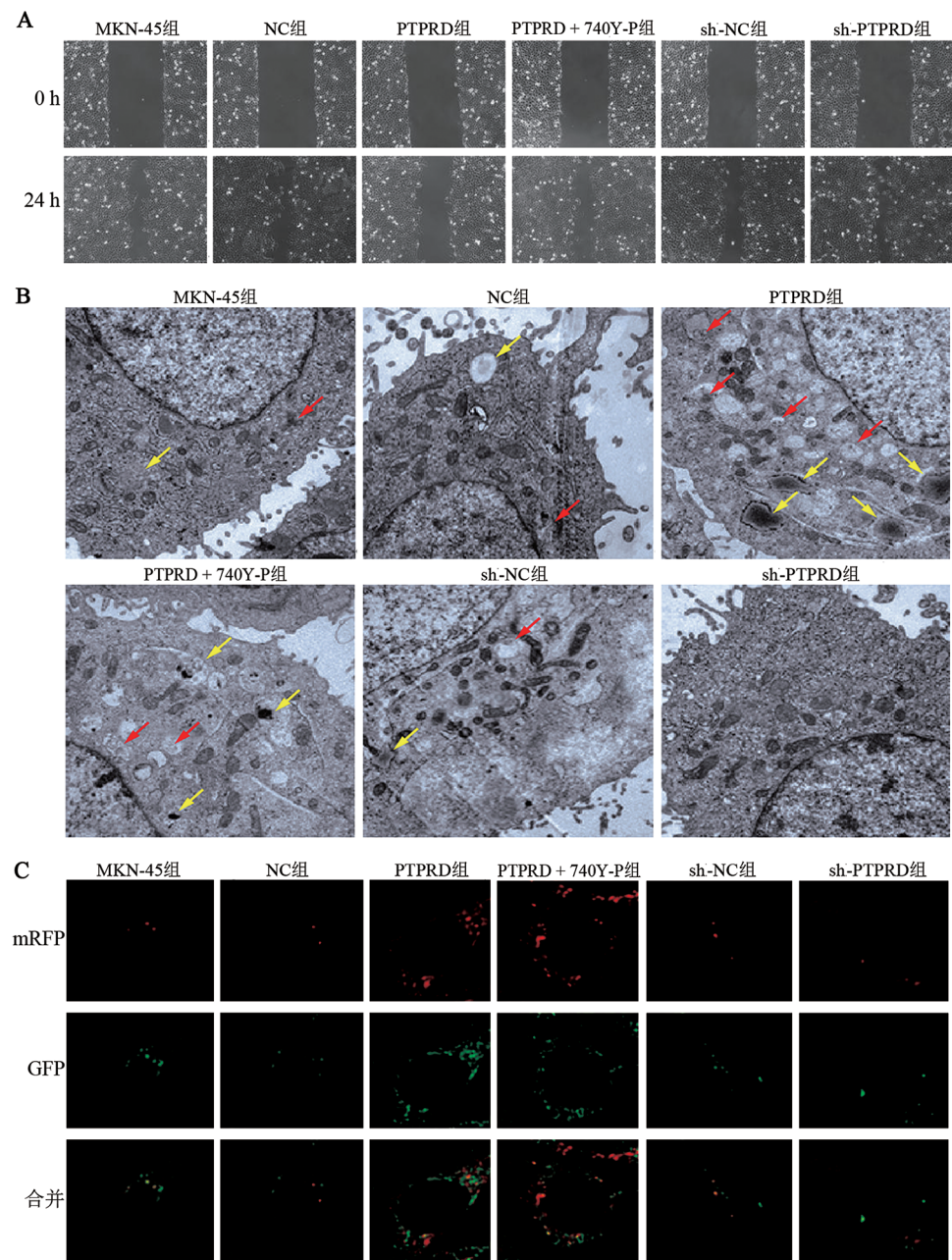
2.3 PTPRD和740Y-P对MKN-45细胞迁移能力的影响

划痕愈合实验结果(图2A,表1)显示,与MKN-45 组、NC组相比,PTPRD组MKN-45细胞迁移率显著降低(均 $P < 0.05$);与MKN-45组、sh-NC组相比,sh-PTPRD 组细胞的迁移率显著升高(均 $P < 0.05$);与PTPRD组相比,PTPRD + 740Y-P组细胞的迁移率升高($P < 0.05$)。结果表明,沉默PTPRD可提高细胞迁移率;PTPRD过

表达可降低MKN-45细胞迁移率,而同时使用PI3K 激活剂740Y-P可提高细胞迁移率。

2.4 PTPRD和740Y-P对MKN-45细胞自噬的影响

自噬实验结果(图2B,表1)显示,与MKN-45组、NC组比,PTPRD组MKN-45细胞中自噬体、自噬溶酶体数量均显著增加(均 $P < 0.05$);与MKN-45组、sh-NC组比,sh-PTPRD组细胞中自噬体、自噬溶酶体数量均减少(均 $P < 0.05$);与PTPRD组相比,PTPRD + 740Y-P组细胞中自噬体、自噬溶酶体数量均减少(均 $P < 0.05$)。结果表明,沉默PTPRD可抑制细胞自噬;PTPRD过表达可促进MKN-45细胞自噬,而同时使用PI3K激活剂740Y-P可抑制细胞自噬。



A:细胞划痕愈合实验检测细胞的迁移能力($\times 100$);B:电子显微镜观察自噬体的形态和数量(红色箭头示自噬体,黄色箭头示自噬溶酶体; $\times 8\,000$);C:共聚焦显微镜检测细胞的自噬体水平($\times 1\,000$)。

图2 PTPRD及740Y-P对MKN-45细胞迁移和自噬的影响

表1 PTPRD及740Y-P对MKN-45细胞增殖、迁移和自噬的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞增殖(D_{570})	细胞迁移率/%	自噬体/个	自噬溶酶体/个
MKN-45组	0.73 ± 0.05	71.52 ± 3.11	2.65 ± 0.04	2.33 ± 0.04
NC组	0.75 ± 0.07	71.43 ± 3.02	2.66 ± 0.05	2.34 ± 0.03
PTPRD组	$0.31 \pm 0.02^{*\Delta}$	$38.47 \pm 2.14^{*\Delta}$	$18.25 \pm 1.93^{*\Delta}$	$15.26 \pm 1.65^{*\Delta}$
PTPRD + 740Y-P组	$0.65 \pm 0.03^{\Delta}$	$69.55 \pm 2.83^{\Delta}$	$12.53 \pm 1.37^{\Delta}$	$9.75 \pm 1.06^{\Delta}$
sh-NC组	0.76 ± 0.04	71.46 ± 3.25	2.61 ± 0.05	2.35 ± 0.04
sh-PTPRD组	0.82 ± 0.03	$88.92 \pm 4.17^{*\nabla}$	$1.13 \pm 0.03^{*\nabla}$	$1.01 \pm 0.02^{*\nabla}$

与MKN-45组比, $^*P < 0.05$; 与NC组比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与PTPRD组比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与sh-NC组比, $^{\nabla}P < 0.05$ 。

2.5 PTPRD和740Y-P对MKN-45细胞PI3K/Akt/mTOR通路及EMT相关蛋白表达的影响

WB实验结果(图3,表2)显示,与MKN-45组、NC组相比,PTPRD组MKN-45细胞中p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR蛋白表达均降低(均 $P < 0.05$),PTPRD、E-cadherin、BAX蛋白表达均增加(均 $P < 0.05$);与MKN-45组、sh-NC组比,sh-PTPRD组MKN-45细胞中p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR蛋白表达均增加(均 $P < 0.05$),PTPRD、BAX、E-cadherin蛋白表达均降低(均 $P < 0.05$);与PTPRD组比,PTPRD + 740Y-P组MKN-45细胞中p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR蛋白表达均增加(均 $P < 0.05$),PTPRD、E-cadherin、BAX蛋白表达均降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,沉默PTPRD可抑制细胞中PTPRD、E-cadherin、BAX蛋白表达,促进p-PI3K、vimentin、p-Akt、p-mTOR蛋白表达;PTPRD过表达可促进MKN-45细胞中PTPRD、E-cadherin和BAX蛋白表达,抑制p-PI3K、vimentin、p-Akt和p-mTOR蛋

白表达,而同时使用PI3K激活剂740Y-P则可逆转这种作用。

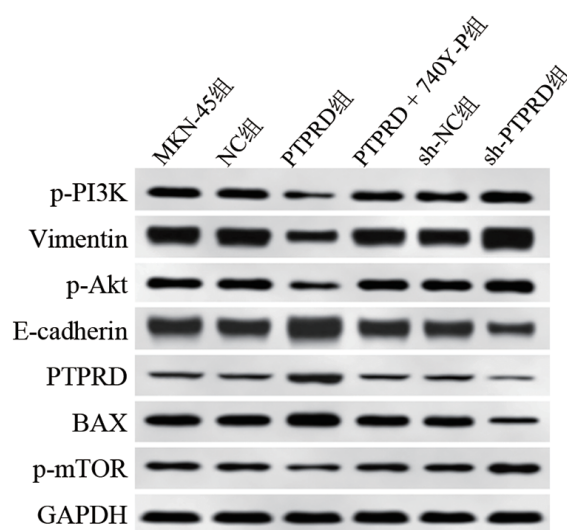


图3 PTPRD及740Y-P对MKN-45细胞PTPRD、PI3K/Akt/mTOR通路及EMT相关蛋白表达的影响

表2 PTPRD及740Y-P对MKN-45细胞中PI3K/Akt/mTOR通路及EMT相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	p-PI3K	Vimentin	p-Akt	E-cadherin	PTPRD	BAX	p-mTOR
MKN-45组	1.02 ± 0.04	1.65 ± 0.08	0.93 ± 0.04	1.51 ± 0.07	0.48 ± 0.02	1.13 ± 0.04	0.76 ± 0.03
NC组	1.03 ± 0.04	1.66 ± 0.07	0.90 ± 0.03	1.49 ± 0.05	0.45 ± 0.02	1.12 ± 0.03	0.75 ± 0.04
PTPRD组	$0.65 \pm 0.03^{*\Delta}$	$0.73 \pm 0.04^{*\Delta}$	$0.37 \pm 0.02^{*\Delta}$	$1.87 \pm 0.09^{*\Delta}$	$0.88 \pm 0.03^{*\Delta}$	$1.65 \pm 0.06^{*\Delta}$	$0.41 \pm 0.03^{*\Delta}$
PTPRD + 740Y-P组	$0.97 \pm 0.04^{\Delta}$	$1.58 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.88 \pm 0.03^{\Delta}$	$1.53 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.52 \pm 0.03^{\Delta}$	$1.20 \pm 0.04^{\Delta}$	$0.72 \pm 0.04^{\Delta}$
sh-NC组	1.01 ± 0.04	1.66 ± 0.09	0.91 ± 0.03	1.50 ± 0.04	0.47 ± 0.03	1.10 ± 0.05	0.77 ± 0.04
sh-PTPRD组	$1.28 \pm 0.05^{*\nabla}$	$1.95 \pm 0.04^{*\nabla}$	$1.15 \pm 0.04^{*\nabla}$	$0.97 \pm 0.03^{*\nabla}$	$0.22 \pm 0.02^{*\nabla}$	$0.55 \pm 0.03^{*\nabla}$	$0.91 \pm 0.04^{*\nabla}$

与MKN-45组比, $^*P < 0.05$; 与NC组比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与PTPRD组比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与sh-NC组比, $^{\nabla}P < 0.05$ 。

2.6 去甲基化对MKN-45细胞增殖的影响

qPCR法和MTT法检测结果显示,随着5-aza浓度的增加,MKN-45细胞中PTPRD mRNA表达增加(图4A,均 $P < 0.05$),细胞增殖活力显著降低(图4B,均 $P < 0.05$)。结果表明,去甲基化可显著上调MKN-45细胞PTPRD mRNA的表达,降低MKN-45细胞的增殖活力。

2.7 PTPRD和740Y-P对MKN-45/5-FU细胞增殖活

力及迁移的影响

MTT法和划痕愈合实验检测结果(图5,表3)显示,与MKN-45/5-FU组比,PTPRD/5-FU组细胞增殖活力和迁移率均降低(均 $P < 0.05$),sh-PTPRD/5-FU组细胞增殖活力和迁移率均增加(均 $P < 0.05$);与PTPRD/5-FU组比,PTPRD + 740Y-P/5-FU组细胞增殖活力和迁移率均增加(均 $P < 0.05$)。结果表明,沉默PTPRD后去甲基化可促进细胞增殖活力和迁移

率;PTPRD 去甲基化可降低 MKN-45/5-FU 细胞增殖活力和迁移率,使用 PI3K 激活剂 740Y-P 后去甲基化可促进细胞增殖活力和迁移率。

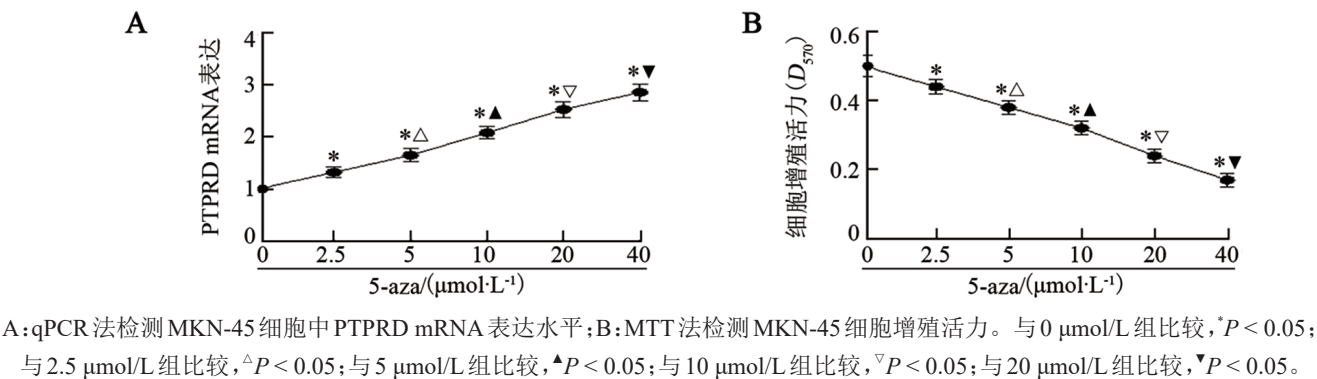


图4 去甲基化上调MKN-45细胞PTPRD mRNA表达并降低细胞的增殖活力

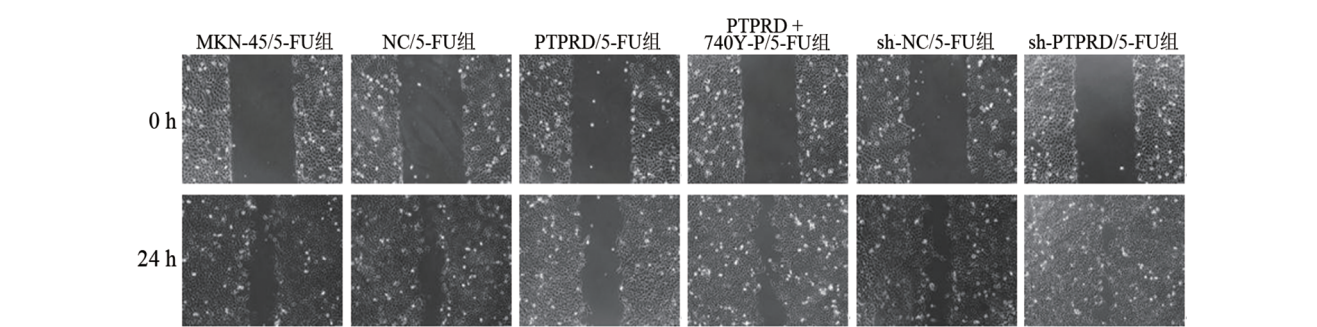


图5 划痕愈合实验检测PTPRD和740Y-P对MKN-45/5-FU细胞迁移的影响(×100)

表3 PTPRD和740Y-P对MKN-45/5-FU细胞增殖和迁移的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	细胞增殖活力(D_{50})	细胞迁移率/%
MKN-45/5-FU 组	0.43 ± 0.04	67.42 ± 3.01
NC/5-FU 组	0.42 ± 0.03	66.59 ± 2.97
PTPRD/5-FU 组	$0.25 \pm 0.02^{*\Delta}$	$33.65 \pm 2.32^{*\Delta}$
PTPRD + 740Y-P/5-FU 组	$0.40 \pm 0.03^{\blacktriangle}$	$65.87 \pm 2.68^{\blacktriangle}$
sh-NC/5-FU 组	0.43 ± 0.03	66.73 ± 3.15
sh-PTPRD/5-FU 组	$0.57 \pm 0.04^{*\nabla}$	$83.64 \pm 3.59^{*\nabla}$

与 MKN-45/5-FU 组比, * $P < 0.05$; 与 NC/5-FU 组比, $\Delta P < 0.05$; 与 PTPRD/5-FU 组比, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 sh-NC/5-FU 组比, $\nabla P < 0.05$ 。

3 讨 论

胃癌是一种严重的疾病,其全球总体生存率较低,多数患者在疾病晚期才被确诊,这导致了较差的预后,包括肿瘤转移、高度异质性及化疗耐药性等^[9]。幽门螺杆菌感染是目前已知胃癌的危险因素,其能通过各种细胞内机制影响疾病进展^[10]。胃癌主要分为贲门胃癌和非贲门胃癌,二者在流行病学特征和危险因素上存在显著差异。目前,临床晚期患者常采用化疗,但其反应具有异质性,且长伴随严重的不

良反应和较低的生存率^[11]。因此,探究胃癌发生发展的分子机制有助于胃癌的预防和治疗。

PTPRD 是穿膜蛋白磷酸酶,参与免疫信号通路、细胞分化和恶性转化等多个生物学过程,其突变会导致磷酸化降低和功能丧失,与肿瘤进展和预后有关,在多种肿瘤的发生中起着不可或缺的作用^[12]。研究^[13]表明,PTPRD 在胃癌中表达下调,其表达缺失与总生存期较差和远处转移有关;PTPRD 缺失能增加 CXCL8 表达,进一步参与 ERK 和 STAT3 信号转导,从而诱导血管生成,增强胃癌细胞活力并促进其转移。WU 等^[14]报道,胃癌组织中 PTPRD 表达缺失与患者预后不良相关,沉默 PTPRD 表达可显著促进胃癌发生和转移。WANG 等^[15]发现,胃癌组织中 PTPRD 表达降低,其表达下调与肿瘤大小、分期及患者低生存率相关,PTPRD 低表达可明显促进肿瘤细胞生长速率,导致细胞增殖,可能在胃腺癌的发生中起一定的作用。本研究结果显示,PTPRD 过表达的 MKN-45 细胞中自噬体、自噬溶酶体数量增加,细胞增殖活力和迁移率降低;PTPRD 沉默的 MKN-45 细胞增殖活力和迁移率增加,自噬体、自噬溶酶体数量减少,表明 PTPRD 过表达可能减缓胃癌细胞增殖、迁移,增强自噬,进而导致细胞死亡。PTPRD 过表达的 MKN-45/

5-FU细胞增殖活力和迁移率均降低,PTPRD沉默的MKN-45/5-FU细胞增殖活力和迁移率均增加,提示PTPRD过表达可能增强胃癌细胞化疗敏感性,进而影响癌细胞的进展。

PI3K属于脂质激酶,可控制蛋白质定位、受体结合和激活,介导细胞生长和自噬;Akt具有多种细胞功能,能调节组织稳态和细胞转化,参与肿瘤生长;mTOR能介导关键细胞过程,调节细胞自噬和细胞周期^[16]。三者构成PI3K/Akt/mTOR信号通路在肿瘤中广泛存在,对癌细胞增殖、迁移和代谢至关重要,其异常激活能触发EMT并影响自噬过程,从而加速肿瘤的进展和增强化疗耐药性^[17]。据报道^[18],PI3K/Akt/mTOR信号通路为自噬的关键调控因子,参与多种肿瘤的发生和发展,并在维持肿瘤微环境的平衡中起重要作用,对肿瘤的进展和化疗耐药性具有显著影响。研究结果^[19]表明,FOXDI-AS1能激活PI3K/Akt/mTOR通路,从而促进胃癌细胞的增殖和迁移并增强化疗耐药性,加重胃癌进展。RONG等^[20]研究表明,红景天苷能降低PI3K和Akt磷酸化,通过PI3K/Akt/mTOR通路增强胃癌细胞自噬及凋亡,从而抑制胃癌生长。WANG等^[21]报道,磷酸赖氨酸磷酸组氨酸无机焦磷酸磷酸酶可调节PI3K/Akt/mTOR通路,从而抑制胃癌细胞的增殖和EMT,在胃癌中发挥抑癌基因的作用。本研究对PTPRD进行分析,发现PTPRD过表达的MKN-45细胞中PTPRD、E-cadherin、BAX蛋白表达增加,p-PI3K、vimentin、p-Akt和p-mTOR蛋白表达降低;PTPRD沉默的MKN-45细胞中PTPRD、E-cadherin、BAX蛋白表达减少,p-PI3K、vimentin、p-Akt和p-mTOR蛋白表达增加,说明PTPRD过表达可能抑制PI3K/Akt/mTOR通路并调控EMT及凋亡相关蛋白的表达,可能在胃癌中发挥抑癌作用。本研究采用PI3K激活剂740Y-P进一步分析,发现740Y-P可改变PTPRD过表达对细胞增殖、迁移的抑制作用,说明PTPRD过表达对胃癌的抑制作用。此外,升高甲基化酶抑制剂5-aza浓度,MKN-45细胞中PTPRD mRNA表达增加、细胞增殖活力降低,提示PTPRD的表达与甲基化有关,PTPRD去甲基化可能抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路从而调控胃癌进展。

综上所述,PTPRD在胃癌细胞中呈低表达状态,其去甲基化可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,进而抑制细胞增殖与迁移并增强其对化疗的敏感性。然而。本研究不足之处是,未进行体内实验,也未对PTPRD基因的甲基化状态进行深入分析。未来的研究将致力于对本研究的结论进行进一步验证,并从基因层面展开更深入的探索与研究。

[参考文献]

- [1] YASUDA T, WANG Y A. Gastric cancer immunosuppressive microenvironment heterogeneity: implications for therapy development[J/OL]. Trends Cancer, 2024, 10(7): 627-642[2024-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11292672/>. DOI: 10.1016/j.trecan.2024.03.008.
- [2] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, *et al.* Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0008.
- [3] HUANG X J, QIN F Z, MENG Q H, *et al.* Protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD)-mediated signaling pathways for the potential treatment of hepatocellular carcinoma: a narrative review[J/OL]. Ann Transl Med, 2020, 8(18): 1192[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7576031/>. DOI: 10.21037/atm-20-4733.
- [4] MENG Q H, TIAN J, QIN F Z, *et al.* Protein tyrosine phosphatase receptor type delta (PTPRD) suppresses the expression of PD-L1 in human hepatocellular carcinoma by down-regulating STAT3[J/OL]. Transl Cancer Res, 2020, 9(9): 5574-5584[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8798851/>. DOI: 10.21037/tcr-20-2425.
- [5] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, *et al.* Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 80: 1-17. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.12.008.
- [6] FATTABI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond[J/OL]. Life Sci, 2020, 262: 118513[2024-04-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011222/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118513.
- [7] JIANG C, MA Z H, ZHANG G A, *et al.* CSNK2A1 promotes gastric cancer invasion through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway[J/OL]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 10135-10143[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6897054/>. DOI: 10.2147/CMAR.S222620.
- [8] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯B通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的恶性生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004.
- [9] YU A T, SARFATY E, PAHLKOTTER M, *et al.* Open gastric surgery for gastric cancer[J]. Surg Clin North Am, 2025, 105(1): 1-13. DOI: 10.1016/j.suc.2024.06.002.
- [10] BURZ C, POP V, SILAGHI C, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer: a 2024 update[J]. Cancers, 2024, 16(11): 1958[2024-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38893079/>. DOI: 10.3390/cancers16111958.
- [11] KIM R, AN M, LEE H, *et al.* Early tumor-immune microenvironmental remodeling and response to first-line fluoropyrimidine and platinum chemotherapy in advanced gastric cancer[J/OL]. Cancer Discov, 2022, 12(4): 984-1001[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9387589/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0888.
- [12] SHANG X L, ZHANG W G, ZHANG X, *et al.* PTPRD/PTPRT mutation as a predictive biomarker of immune checkpoint inhibitors

- across multiple cancer types[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 991091[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9556668/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.991091.
- [13] BAE W J, AHN J M, BYEON H E, *et al*. PTPRD-inactivation-induced CXCL8 promotes angiogenesis and metastasis in gastric cancer and is inhibited by metformin[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 484[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6896474/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1469-4.
- [14] WU L, GAO L Y, KONG D C, *et al*. Loss of tyrosine phosphatase delta promotes gastric cancer progression *via* signal transducer and activator of transcription 3 pathways[J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(11): 3164-3172. DOI: 10.1007/s10620-019-05637-z.
- [15] WANG D D, WANG L L, ZHOU J, *et al*. Reduced expression of PTPRD correlates with poor prognosis in gastric adenocarcinoma [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113754[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4239117/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0113754.
- [16] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, *et al*. The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: At the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4507[2024-04-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32630372/>. DOI: 10.3390/ijms21124507.
- [17] PENG Y, WANG Y Y, ZHOU C, *et al*. PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: are we making headway?[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 819128[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8987494/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.819128.
- [18] XU Z R, HAN X, OU D M, *et al*. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587. DOI: 10.1007/s00253-019-10257-8.
- [19] WU Q, MA J L, WEI J, *et al*. FOXD1-AS1 regulates FOXD1 translation and promotes gastric cancer progression and chemoresistance by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway[J/OL]. *Mol Oncol*, 2021, 15(1): 299-316[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782086/>. DOI: 10.1002/1878-0261.12728.
- [20] RONG L, LI Z D, LENG X, *et al*. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J/OL]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, 122: 109726[2024-04-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31918283/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109726.
- [21] WANG D F, LI J H, LI W H. LHPP suppresses gastric cancer progression *via* the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. *J Cancer*, 2022, 13(14): 3584-3592[2024-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9723988/>. DOI: 10.7150/jca.78098.

[收稿日期] 2024-04-24

[修回日期] 2024-12-12

[本文编辑] 党瑞山