

蛋白磷酸酶 4 在人肺癌细胞 A549 增殖中的功能分析*

黄秀清 龙治涛 宁丽峰 孙玲玲 桑建利**

(北京师范大学细胞增殖与调控教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要 蛋白磷酸酶 4 (PP4) 是 PP2A 亚家族的重要成员之一. 已有研究表明 PP4 在果蝇与线虫中参与了中心体成熟, 但作为一个进化上高度保守的蛋白质, PP4 在哺乳动物细胞中的确切功能至今仍知之甚少. 选择人肺癌细胞 A549 为材料, 转染发夹型 siRNA 表达质粒, 筛选鉴定获得了 PP4 表达抑制细胞株, 然后对细胞的形态、生长特性及有丝分裂过程进行观察分析. 与对照细胞相比, 发现其生长速率明显减慢, 细胞群体中 DNA 含量为 4N 的细胞比率明显增高. 这一结果是由细胞群体中出现了高比例的多核细胞造成的, 进一步的分析揭示, 高比例多核细胞的产生是由于 PP4 表达下降, 致使细胞有丝分裂和胞质分裂受到严重干扰所导致的. 由此推测 PP4 对于保证细胞有丝分裂及胞质分裂的正常进行具有重要作用, PP4 受到抑制将会导致多核细胞的产生, 进而抑制 A549 细胞的增殖.

关键词 A549, 细胞周期, 蛋白磷酸酶 4 (PP4) 微管, 有丝分裂, 胞质分裂

学科分类号 Q2

哺乳动物细胞中, 蛋白质的可逆磷酸化是许多生命活动的主要调控方式, 它几乎涉及所有的生理及病理过程. 蛋白质磷酸化和去磷酸化过程分别由蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化完成. 蛋白激酶与蛋白磷酸酶及其底物被整合到一个精细的信号传递系统中. 蛋白质磷酸化水平的稳定状态受控于蛋白激酶和蛋白磷酸酶之间互为相反的作用结果, 这关系到转导信号的强度与持续时间^[1].

PP4 (也称为 PPX) 是 PP2A 亚家族的重要成员之一^[2], 在进化过程中高度保守, 人源 PP4 与鼠源 PP4 有 100% 同源性^[3], 与兔有 99.3% 同源性^[4], 与河豚有 99% 同源性^[5], 与果蝇有 94% 同源性^[6]. 线虫中两种编码 PP4 的蛋白 PPH-4.1 和 PPH-4.2 与人类 PP4 蛋白同源性分别为 74% 及 71%^[7]. 对低等生物的研究表明 PP4 是一种非常重要的磷酸酶. 果蝇 PP4 基因 P 元件的插入导致 PP4 低水平表达的突变体胚胎出现半致死表型, 其中微管组织混乱或完全无组织, 星体微管和纺锤体都不能与中心体相连, 这表明 PP4 对微管最初在中心体上的生长及微管与中心体连接和维持上都起到重要的作用^[8]. 此外, 利用 RNAi 技术抑制线虫中 PP4 同源基因 PPH-4.1, 发现相当数量 PPH-4.1 表达抑制的精子

出现了核数量异常或中心体数量异常^[7], 或二者兼而有之, 这表明 PPH-4.1 可调控精子减数分裂中核的正确分裂. 在哺乳动物中, 由于未找到有效的抑制 PP4 表达的方法, 所以对 PP4 的研究还非常有限. 目前发现 PP4 可以与 NF- κ B, HPK-1, α 4 蛋白相互作用, 推测它可能参与了 NF- κ B^[8], HPK-JNK^[9~11], TOR^[12] 信号通路. 这些发现表明, PP4 在哺乳动物细胞内可能通过作用于不同底物参与多种细胞生理过程的调控^[13]. 然而作为一个进化上保守的蛋白质, PP4 在哺乳动物细胞中是否具有其在低等生物中相似的功能仍不为所知. 本研究通过筛选得到特异性抑制 PP4 表达的干扰片段及干扰细胞株, 并对 PP4 表达抑制后细胞的相关特性, 特别是细胞有丝分裂过程进行了研究, 这为全面了解 PP4 在哺乳动物细胞周期中的作用提供了新的研究结果和研究思路.

*国家自然科学基金资助项目 (30270663).

** 通讯联系人. Tel: 010-58806226, Fax: 010-58807721

E-mail: sangjianli@263.net

收稿日期: 2006-02-26, 接受日期: 2006-03-28

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系为人肺癌细胞 A549. 干扰质粒 pAVU6 由 Engelke 博士惠赠; Vigofect 购自 VIGOROUS (威格拉斯) 公司; G418、DMEM 培养基购自 GIBICO 公司; 胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术有限公司; 限制性内切酶购自 Promega 公司; PP4 抗体购自 CHEMICON 公司; α -tubulin 及 actin 抗体购自 Sigma 公司; 二抗购自中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pAVU6-PP4i 和 pAVU6-control 的构建. 重组质粒 pAVU6-PP4i 和 pAVU6-control 中干扰片段由赛百盛公司合成. 退火后插入 *Sal* I / *Xba* I 双酶切的 pAVU6 质粒中. 转化后挑克隆, 测序鉴定.

1.2.2 细胞培养、筛选及稳定细胞株的鉴定. 细胞培养方法主要参考 ATCC(American Type Culture Collection) 提供的方法. 人肺癌细胞 A549 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (GIBICO) 培养基于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养. 用 Vigofect (威格拉斯公司) 转染重组质粒 pAVU6-PP4i 或 pAVU6-control 到 A549 细胞中, 然后用 G418 (500 g/L) 筛选 5 周, 扩大培养得到稳定细胞株 A549-PP4i 和 A549-control. 转染过程参照转染剂的操作说明书进行. 处于对数生长期的 A549 细胞以 1×10^5 个 / ml 密度接种在 24 孔板中, 于转染前培养 24 h. 转染前 1 h 更换新鲜培养基 (0.5 ml / 孔). 2.25 μ g 质粒 DNA 及 0.5 μ l Vigofect 高效转染剂分别用 25 μ l 150 mmol/L NaCl 稀释, 充分混匀, 室温下放置 5 min. 混合 2 种溶液, 充分混匀, 于室温下放置 15 min. 将转染混合物加入细胞培养液中, 混匀, 37℃ 培养 6 h. 弃去培养基, 用无血清培养基洗涤细胞, 再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 24 h. 筛选方法参考《细胞生物学实验指导》^[4].

1.2.3 不同细胞株生长速率的比较. 取 A549-PP4i 和 A549-control 对数生长期细胞, 按 3×10^4 个 / ml 接种于 96 孔板中 (每个孔 200 μ l), 在 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养. 24 h 后, 将 3 个平行孔中的培养基吸尽, 加入 100 μ l 的新培养基和 10 μ l MTT (5 g/L 溶于 PBS), 于 37℃ 孵育 4 h, 再加入裂解液 (10%

SDS, 0.01 mol/L HCl). 14 h 后测 A_{570} . 以后每隔 24 h 以同样方法测 3 个平行孔, 持续 8 天.

1.2.4 检测不同细胞株中 PP4 表达量. 提取 A549-PP4 RNAi 和 A549-control 细胞总蛋白质 (裂解液: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF), Bradford 法测定蛋白质浓度, 用 SDS-PAGE 分离蛋白质, 并将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 通过蛋白质印迹检测不同细胞株中 PP4 的表达情况. 其中 actin 作为内对照. 电泳, 转膜及蛋白质印迹的具体步骤参照《分子克隆》^[5].

1.2.5 流式细胞光度术 (FCM) 分析细胞周期. 细胞按 4×10^6 个 / 瓶接种于细胞培养瓶 (瓶底面积大约为 40 cm²) 中, 培养至对数生长期, 胰酶消化, 离心收集细胞, PBS 洗 2 次, 70% 乙醇 4℃ 固定过夜. 离心收集固定好的细胞, 重悬于 PBS, 加入终浓度为 50 mg/L RNase, 37℃ 保温 30~45 min, 冰浴 1 min. 加入终浓度为 50 mg/L 的 PI, 4℃ 避光染色 30 min. 流式细胞仪分析细胞周期.

1.2.6 间接免疫荧光分析. 处于对数生长期的细胞以 1×10^5 个 / ml 密度接种在放置有盖玻片的 12 孔板中, 24 h 后弃去培养基, 4℃ 预冷 PBS 洗细胞 2 次, 用 -20℃ 预冷的甲醇固定液 -20℃ 固定 10 min, PBS 洗 3 次, 5 min / 次. 一抗 37℃ 温育 1 h, 4℃ 预冷的 PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 二抗 37℃ 温育 1 h, 4℃ 预冷的 PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 双蒸水洗 1 次, 10 min. 封片 (封片剂: 防淬灭甘油与 PBS 以 9:1 混合), 利用 Olympus confocal 系统对标本进行观察, 采集的荧光图象进行图象叠加合成处理.

2 结 果

2.1 PP4 干扰的克隆细胞株的鉴定

选择 3 个 19 bp 干扰片段, 构建特异针对 PP4 的发夹 siRNA 表达质粒 pAVU6 +27/PP4i-1, pAVU6+27/PP4i-2, pAVU6+27/PP4i-3 以及对照干扰质粒 pAVU6+27/control-1, pAVU6+27/control-2, pAVU6+27/control-3 (图 1a), 稳定转染 A549 细胞, 通过 G418 进行了约 30 天的筛选, 获得了二十多个细胞克隆, 选择其中的一些克隆, 进一步利用抗 PP4 抗体通过蛋白质印迹检测细胞内 PP4 蛋白表达, 确定 PP4i-2, PP4i-3 细胞株中干扰片段均有效抑制了 PP4 表达, 而 PP4i-1 干扰片段及对照干扰片段中未筛选出 PP4 表达被有效抑制的克隆 (图 1b).

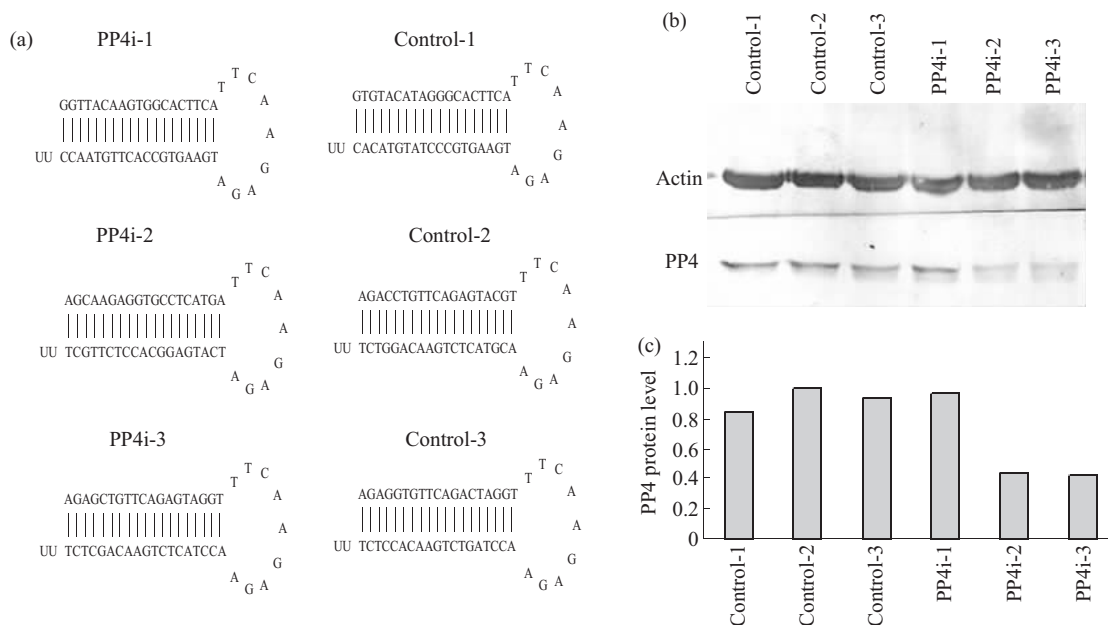


Fig. 1 The construction of RNAi constructs and identification of PP4 silencing cells

(a) Sequence and expected structure of the hairpin siRNA against PP4 and control insert *in vivo*. (b) Western blot analysis of PP4 expression in control siRNA cells and stable PP4 silencing cells using anti-PP4 antibody, and anti-actin antibody as a control to check for equal loading. PP4 expression was effectively knocked down in the stable PP4 siRNA cells, but not in control siRNA cells. (c) PP4 protein levels from Western blot analysis (b) expressed as a percentage of the levels of PP4 protein in control cells following normalization with actin.

2.2 PP4 干扰细胞株中细胞生长及形态学变化

由于 PP4 表达明显被抑制的 PP4i-2 和 PP4i-3 细胞株中表型相同, 所以仅出示 PP4i-2 的实验数据. 在 PP4 表达受抑制的细胞株中, 细胞生长受到明显的抑制 (图 2a), 从细胞生长曲线的分析中可看出, 细胞培养第 8 天时, 细胞生长的抑制率为 58.8%. 通过流式细胞光度术检测, 显示 PP4 干扰细胞株中, 细胞群体中 DNA 含量为 4N 的细胞比率明显增高 (图 2b). 为了深入分析这些现象, 我们对 PP4 干扰细胞株及对照细胞进行了微管蛋白 α -tubulin 和 PI 的双染色, 发现 PP4 干扰细胞株有 $(30.5 \pm 6) \%$ 细胞出现了多核现象 (图 2c), 此外, 还有 $(7 \pm 5.6) \%$ 的细胞出现小核 (图 2c). 因此多核细胞的增多是造成流式结果中 DNA 含量变化的主要原因, 同时也是导致细胞生长缓慢的原因之一. 我们还发现, 抑制 PP4 表达后, 细胞的微管网络也变得异常, 部分细胞的微管网络变得疏松紊乱, 大约有 $(5.5 \pm 2.2) \%$ 细胞出现异常的核分布, 甚至出现核丢失 (图 2d), 而在对照细胞中没有发现这种现象.

2.3 PP4 干扰细胞株中细胞有丝分裂及胞质分裂受到影响

PP4 干扰细胞株中出现较多的多核细胞, 这使我们有兴趣了解这些变化是否是由于细胞有丝分裂及胞质分裂异常造成的, 因此对细胞的有丝分裂过程进行了系统观察. 通过对细胞进行微管蛋白 α -tubulin 和 PI 的双染色, 发现 PP4 表达受抑制的细胞株中细胞有丝分裂及胞质分裂均受到影响. 在所检测的 408 个有丝分裂中期细胞中, 有 $(34 \pm 4.8) \%$ 的细胞形成多极纺锤体 (图 3a-B) 及异常星体 (图 3a-C) 等不规则纺锤体. 而在对照细胞中仅有 $(4.1 \pm 0.8) \%$ 的细胞形成异常纺锤体. 在所检测的 297 个有丝分裂后期细胞中, 有 $(7.1 \pm 2.2) \%$ 的后期细胞形成异常的中央纺锤体 (图 3b-B, C), 其中部分细胞的中央纺锤体无法正常收拢 (图 3b-B), 部分细胞的中央纺锤体中微管蛋白无法正确形成束状结构 (图 3b-C), 这部分细胞很有可能无法进行正常胞质分裂, 缢缩环消退 (图 3b-D), 最终形成多核细胞, 而在对照细胞中未发现此种现象. 在所检测的 675 个有丝分裂末期细胞中有 $(33.0 \pm 3.2) \%$

的末期细胞形成多极分裂，多核或者两者兼而有之(图 3c-B, C, D)，而在对照细胞中仅有(3.8 ± 1.2) % 出现这种现象。此外，在这些末期细胞中，有(23.0 ± 1.2) % 的细胞出现异常的中体，两个分离的

子细胞间形成细长的胞质桥(图 3c-E)，而在对照细胞中仅(0.8 ± 0.3) % 出现这种现象。总之，在 PP4 干扰细胞株中大约有 38.9% 的有丝分裂期细胞都出现了有丝分裂及胞质分裂异常。

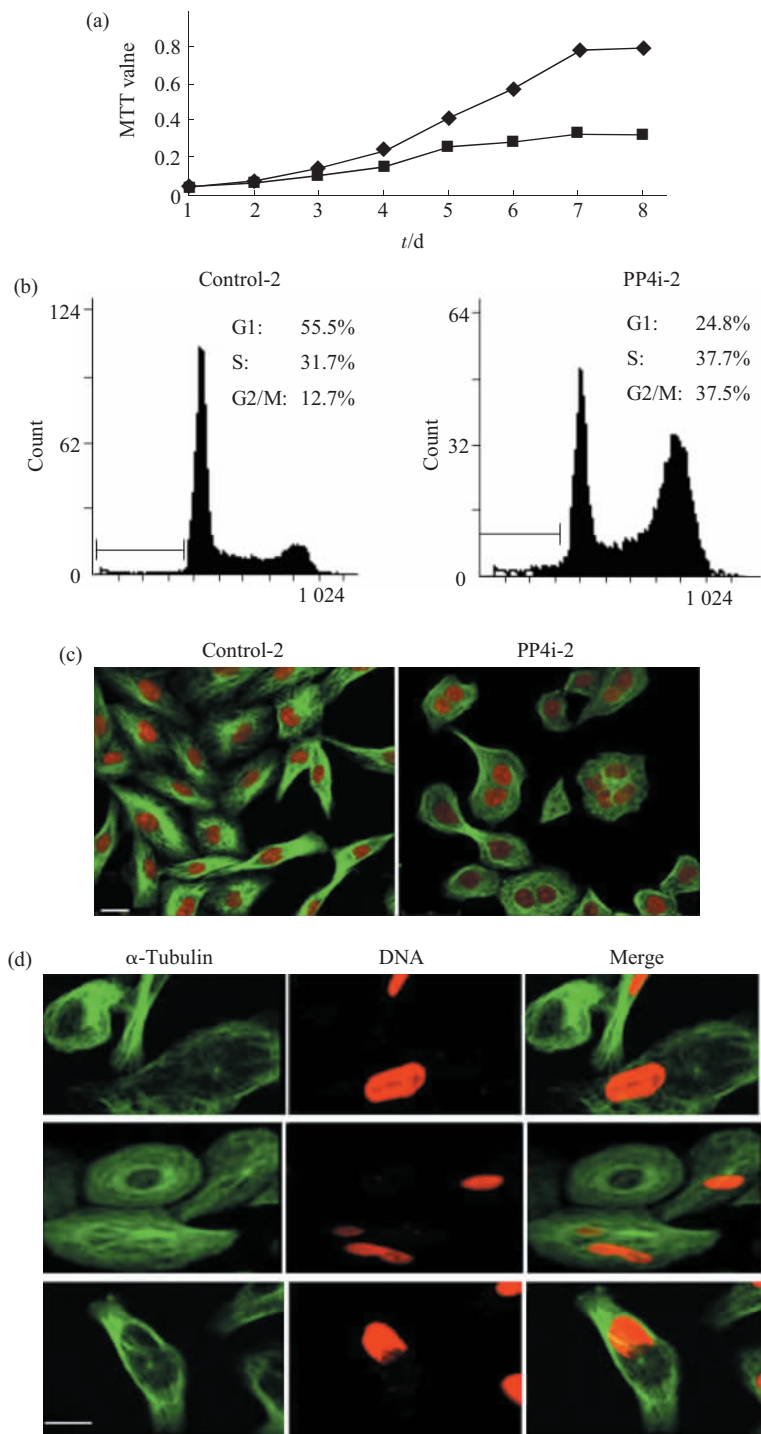


Fig. 2 The proliferation and morphology changed in PP4 silencing cells

(a) Growth curve of cells showing cell growth and proliferation of stable PP4 silencing cells was greatly slowed down. ◆—◆: Control-2; ■—■: PP4i-2. (b) FCM showed abnormal DNA content in PP4 silencing cells. (c) Cells stained with anti- α -tubulin antibody for microtubule (green) and propidium iodide (red) for DNA. As shown in the merge images, cells became multinuclei in stable PP4 siRNA cells compared with control cells. Bar: 50 μ m. (d) Improper nuclear location could be detected in PP4 silencing cells. Bar: 10 μ m.

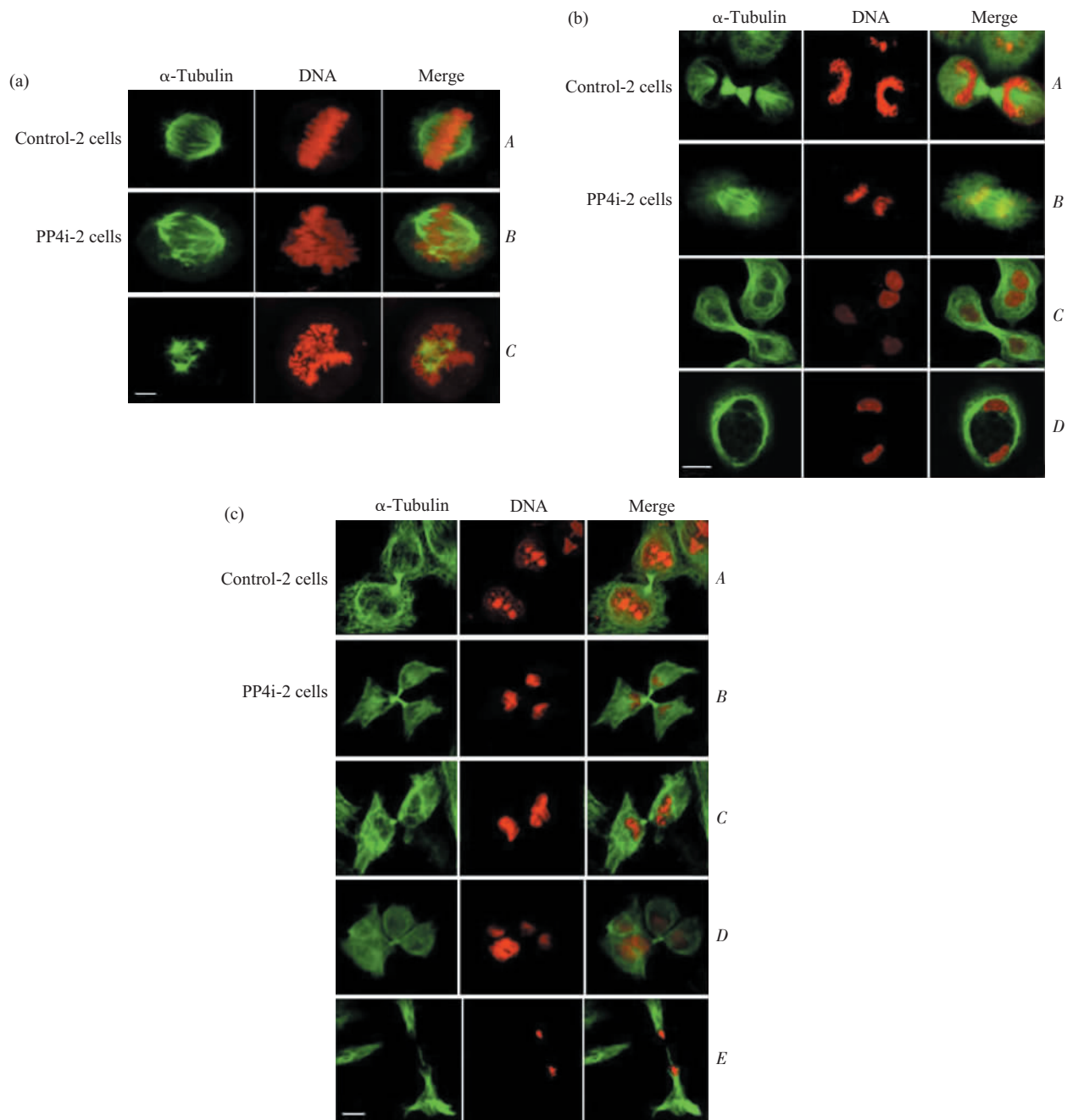


Fig. 3 Abnormal mitosis and cytokinesis process after PP4 silence

Cells were stained with anti- α -tubulin antibody for microtubule (green) and propidium iodide (red) for DNA. (a) Stable PP4 silencing cells formed multipolar spindles (B) or aberrant spindles (C) in metaphase compared with control-2 cells (A) in metaphase. Bar: 5 μ m. (b) Stable PP4 siRNA cells formed abnormal central spindles (B, C, D) in anaphase cells compared with control-2 cells (A). And some cells showed abnormal chromosome division (C). Bar: 10 μ m. (c) Stable PP4 silencing cells underwent multipolar division (B), and some cells formed bipolar division, but there were multinuclei in division cells (C) or both (D). Furthermore, cytoplasm bridge that became increasingly narrow could be detected between two dividing cells. Bar: 10 μ m.

3 讨 论

在哺乳动物细胞中蛋白质的可逆磷酸化是许多生命活动的主要调节机制, 因此全面了解调控细胞周期的激酶及磷酸酶活性的复杂机制, 对于理解正

常及异常的细胞周期进程是非常重要的. 与激酶研究不同, 在磷酸酶研究过程中, 由于缺乏特异性磷酸酶抑制剂, 研究单个磷酸酶作用的进展非常缓慢. PP4 最早于 1992 年被发现, 然而 PP4 在细胞中的作用至今知之甚少, 已有研究表明 PP4 在果蝇

和线虫中心体成熟过程中起着关键的作用. 研究表明, 果蝇 PP4 基因 P 元件插入而导致 PP4 低水平表达的突变体胚胎出现半致死表型, 其中微管组织混乱或完全无组织, 星体微管和纺锤体都不能与中心体相连, 这表明 PP4 对微管最初在中心体上的生长及微管与中心体连接和维持上都起到重要的作用^[6]. 此外, 利用 RNAi 技术对线虫中 PP4 同源基因 PPH-4.1 进行抑制, 发现相当数量 PPH-4.1 缺失的精子出现有异常数量的核或异常数量的中心体^[7], 或者二者兼而有之, 这表明 PPH-4.1 可调控精子减数分裂中核的正确分裂. 作为一个进化上保守的蛋白质, 在哺乳动物细胞中 PP4 是否具有相似的功能仍不为所知.

为了探讨 PP4 在哺乳动物细胞中的作用, 我们通过筛选得到特异性抑制 PP4 表达的干扰片段及干扰细胞株, 并对 PP4 表达受到抑制后的表型进行了系统的研究. 根据研究结果, 对 PP4 表达抑制导致的细胞多核, 小核及胞质桥等现象进行总结分析(图 4). 正常有丝分裂过程中, 纺锤体正常形成, 将染色体拉向两极, 此时以微管为主要成分的中央纺锤体收缩, 形成束状, 而后形成中体, 两细胞分开(图 4a). 我们的结果表明, PP4 表达下降可能影响中心体功能, 形成异常纺锤体, 从而影响染色体的正确分离, 导致染色体不均一分布, 最后产生多核及小核现象(图 4b). 中心体是哺乳动物细胞中重要的微管组织中心, 它参与了包括细胞极性生长、细胞运动、细胞中物质运输及有丝分裂期纺锤体形成等众多的细胞生命活动, PP4 是目前发现的定位于中心体上的少数蛋白磷酸酶之一^[16]. 虽然在不同种类细胞中 PP4 在中心体定位的时相略有不同, 但它都可定为于中心体上. PP4 的这种定位表明它在细胞生理过程中起到了独特的作用. 在本研究结果中, PP4 表达下降导致大约有 $(34 \pm 4.8) \%$ 的中期细胞形成多极纺锤体及异常星体等不规则纺锤体, 表明 PP4 极有可能参与了中心体的成核功能. 此外, PP4 表达下降可能影响中央纺锤体, 中板的结构, 导致缢缩环消退, 两个细胞核形成于同一细胞中, 最终形成多核细胞(图 4c). 中央纺锤体, 中板和中体等结构中主要由微管蛋白 α 及 β -tubulin 组成, 许多重要的蛋白质如 ZEN-4, CHO-1 都在此定位, 并且发生复杂的可逆磷酸化事件^[17]. 已有研究表明, 中板和中体基质在分裂沟及缢缩环的形成、消退过程以及胞质分裂完成过程中起重要作用^[18], 并且许多定位于该处的蛋白质的

功能缺失会导致细胞胞质分裂异常. PP4 表达被抑制后, 一定数量的后期细胞出现异常的中央纺锤体及中板结构. 这也提示我们, 作为一种蛋白磷酸酶, PP4 很有可能参与调节了此处相关蛋白质的可逆磷酸化事件. 此外, PP4 可能参与胞质分裂最后阶段的完成. 两个子细胞间连接的胞质降解后, 两个子细胞才能正常分离, 而 PP4 表达下降的细胞中, 有 $(23.0 \pm 1.2) \%$ 的细胞在分离的子细胞间形成细长的胞质桥, 虽然这部分细胞由于胞质桥异常的断裂而形成 DNA 含量正常的细胞(图 4d), 但高比率的胞质桥的出现也表明了 PP4 在胞质分裂过程中的作用.

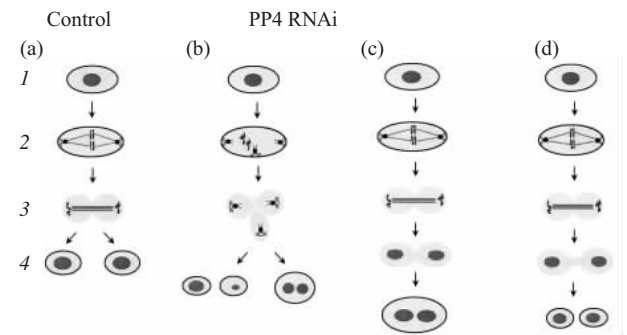


Fig. 4 Diagram of cell division illustrating the mechanism of abnormal mitosis cells of PP4i cells

(a) Cells with control RNAi had no apparent effect on cell cycle progression into mitosis (1), the formation of mitotic spindles (2), the onset of telophase (3), or the formation of daughter cells (4). (b) Cells treated with the PP4i resulted in abnormal spindle formation, thus resulted in inhomogenous nuclear material division. (c) Cells treated with the PP4i resulted in abnormal cytokinesis, the contractile ring appears to relax after the formation of a deep cleavage furrow, and two apparently normal nuclei reform which resulted in multinuclei. (d) Cells treated with the PP4i resulted in abnormal cytoplasmic bridge, and two cells formed after rupture of cytoplasmic bridge.

综合本研究结果, 在哺乳动物中 PP4 参与了中心体相关功能的调节, 如微管成核, 纺锤体形成等. PP4 表达下降导致间期微管疏松与紊乱, 细胞出现异常的核分布, 甚至出现核丢失, 这表明了 PP4 作为一个定位于中心体上的保守的蛋白磷酸酶, 对于保证中心体的正常功能是必不可少的. 在低等生物中 PP4 表达下降后, 几乎所有细胞因形成异常纺锤体而被阻滞于有丝分裂中期, 而在哺乳动物细胞出现多种异常现象, 表明在哺乳动物细胞中 PP4 有可能参与了更多的细胞周期事件, 如中央纺锤体、中板的结构和功能的调节以及胞质分裂最后阶段的完成. 对于 PP4 功能来说还有许多值得

深入研究的问题, 我们的研究工作为全面了解 PP4 在细胞周期中的作用提供了新的研究结果和研究思路.

参 考 文 献

- 1 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001. 136~138
Sun D Y *et al.* Cell Singal Transduction. 3rd. Beijing: Science Press, 2001. 136~138
- 2 Huang X, Cheng A, Honkanen R E. Genomic organization of the human PP4 gene encoding a serine/threonine protein phosphatase (PP4) suggests a common ancestry with PP2A. *Genomics*, 1997, **44** (3): 336~343
- 3 Hu M C, Shui J W, Mihindukulasuriya K A, *et al.* Genomic structure of the mouse PP4 gene: a developmentally regulated protein phosphatase. *Gene*, 2001, **278** (1~2): 89~99
- 4 Brewis N D, Cohen P T. Protein phosphatase X has been highly conserved during mammalian evolution. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1171** (2): 231~233
- 5 Koh Cgoshbs. Serine/threonine phosphatases of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Gene*, 1997, **198** (1~2): 223~228
- 6 Helps N R, Brewis N D, Lineruth K, *et al.* Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila embryos*. *J Cell Sci*, 1998, **111** (10): 1331~1340
- 7 Sumiyoshi E, Sugimoto A, Yamamoto M. Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci*, 2002, **115** (7): 1403~1410
- 8 Yeh P Y, Yeh K H, Chuang S E, *et al.* Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF- κ B activation by protein phosphatase 4-mediated NF- κ B p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem*, 2002, **279** (25): 26143~26148
- 9 Zhou G, Mihindukulasuriya K A, Mac Corkle-Chosnek R A, *et al.* Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor- α -induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, 2002, **277** (8): 6391~6398
- 10 Zhou G, Boomer J S, Tan T H. Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem*, 2004, **279** (47): 49551~49561
- 11 Ip Y T, Davis R J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10** (2): 205~219
- 12 Nanahoshia M, Tsujishita Y, Tokunaga C, *et al.* Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Letters*, 1999, **446** (1): 108~112
- 13 Patricia T W. Cohen, Amanda Philp, Cristina Va' zquez-Martin. Protein phosphatase 4 - from obscurity to vital functions. *FEBS Letters*, 2005, **579** (15): 3278~3286
- 14 斯佩克特 L, 戈德曼 R D, 莱因万德 L A. 黄培堂, 等译. 细胞实验指南 (下册). 北京: 科学出版社, 2001. 783~784
Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. Translated by Huang P T, *et al.* Cell Experiment Manual. Beijing: Science Press, 2001. 783~784
- 15 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫 等译. 分子克隆. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999. 889~898
Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* Molecular Clone. 2nd. Beijing: Science Press, 1999. 889~898
- 16 Brewis N D, Street A J, Cohen P T, *et al.* PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J*, 1999, **12** (3): 987~996
- 17 Mullins J M, Bieseke J J. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol*, 1997, **73** (3): 672~684
- 18 Mullins J M, McIntosh J R. Isolation and initial characterization of the mammalian midbody. *J Cell Biol*, 1982, **94** (3): 654~656

Function Analysis of PP4 on Proliferation of A549 Human Lung Adenocarcinoma Cells*

HUANG Xiu-Qing, LONG Zhi-Tao, NING Li-Feng, SUN Ling-Ling, SANG Jian-Li**

(The Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education,
College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Protein phosphatase 4 (PP4) is an important protein serine/threonine phosphatase belonging to PP2A family. Previous study showed that protein phosphatase 4 played an important role in centrosome maturation in *D. melanogaster* and *C. elegans*. But as an evolutionary conserved phosphatase, little was known on its function in mammalian cells. siRNA expression vector was used to suppress PP4 expression in A549 and clonal cell lines was obtained in which the expression of PP4 was inhibited. The morphology, growth and mitosis process of the cells were investigated. It was found that cell growth and proliferation were greatly inhibited and many cells became multinuclei comparing with the control cells. Further study showed that the mitosis and cytokinesis became

abnormal in PP4 silencing cells. It was proposed that PP4 played an important role in mitosis and cytokinesis. PP4 expression suppression resulted in multinucleus, then inhibited the proliferation of cells.

Key words A549, cell cycle, protein phosphatase 4, microtubule, mitosis cytokinesis

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270663).

**Corresponding author . Tel: 86-10-58806226, Fax: 86-10-58807721, E-mail: sangjianli@263.net

Received: February 26, 2006 Accepted: March 28, 2006