

胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 中 MTA1 的泛素化修饰及其对 MTA1 表达的影响

付海京*, 王 锐, 陈一天, 张 群, 孙 茜, 黄小银, 管晓翔, 王靖华, 陈龙邦*

(南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院(金陵医院)肿瘤内科, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的: 转移相关基因 1(metastasis associated 1, MTA1) 已知与肿瘤转移密切相关, 且与胃癌恶性程度明显相关, 并可以通过影响信号转导途径发挥其功能, 本研究拟确定 MTA1 是否可以被泛素化途径所调控。方法: 以蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理胃癌细胞后, 以 IP/WB 实验检测 MTA1 的表达水平, 并将带 Myc 标签的 MTA1 质粒以及带 HA 标签的泛素(HA-Ub)质粒转入该细胞, 检测 Myc-MTA1 的表达。结果: 以蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理胃癌细胞 MKN-45、SGC-7901 后, MTA1 表达水平显著增加; 免疫共沉淀实验显示泛素分子可以与 MTA1 直接结合, 并且实验组较对照组相比泛素化程度明显增加; 将 HEK293 细胞以 siMTA1 处理封闭 MTA1 的表达后, 将 Myc-MTA1 质粒以及 HA-Ub 质粒转入该细胞, 发现当后者存在时 Myc-MTA1 可被强烈泛素化。结论: 在胃癌细胞中 MTA1 是可被泛素化途径修饰的蛋白。

[关键词] 胃癌; 转移相关基因 1; 泛素化

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1503-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141109

Ubiquitination and expression of MTA1 in gastric cancer MKN-45 and SGC-7901 cells

Fu Haijing*, Wang Rui, Chen Yitian, Zhang Qun, Sun Qian, Huang Xiaoyin, Guan Xiaoxiang, Wang Jinghua, Chen Longbang*

(Department of Medical Oncology, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** Metastasis associated 1(MTA1) is a protein closely related to the malignant degree of gastric cancer. We try to prove that MTA1 can be regulated by the ubiquitin pathway in this study. **Methods:** After the proteasome inhibitor MG-132 treatment in gastric cancer cells, the expression level of MTA1 was detected though IP/WB. MTA1 expressing plasmid containing the Myc tag and HA tagged ubiquitin plasmid(HA-Ub) were co-transfected into cells, and the expression of Myc-MTA1 was detected. **Results:** After treatment with MG-132, the protein level of MTA1 in gastric carcinoma cell line SGC-7901 increased significantly. Myc-MTA1 was strongly ubiquitinated by HA-Ub in HEK293 cells. **Conclusion:** MTA1 in human gastric cancer cells can be regulated through ubiquitination pathway.

[Key words] gastric cancer; metastasis associated 1; ubiquitination

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1503-1506]

肿瘤转移相关基因(metastasis associated, MTA)家族, 是与肿瘤转移密切相关的一类基因, 系统地研究其结构特点和功能将有助于了解恶性肿瘤的转移机制。MTA 基因家族包含 3 个定位不同的基因[转移

相关基因 1 (metastasis associated 1, MTA1) 位于 14 q; MTA2 位于 11 q; MTA3 位于 2 q]以及数个选择性剪接变体 (MTA1s, MTA1-ZG29 p 和 MTA3L)^[1]。MTA1 最初是在转移性乳腺癌的相关研究中被发现而命名^[2]。人 MTA1 基因位于染色体 14 q32.3, 编码由 715 个氨基酸组成的分子量 82 000 的蛋白质^[3-4]。MTA1 分子可能通过其自身的多个酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶磷酸化位点来发挥影响信

[基金项目] 国家自然科学基金(81272734, 81372588)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: dr.chenlb@163.com; fuhjnj@gmail.com

号转导调控功能。尽管 MTA1、2、3 的氨基端序列非常相似,但是只有 MTA1 在羧基端包含一个富含脯氨酸的 SH3 结构域相关的区域,这为 MTA1 与信号分子的相互作用提供了生物化学基础^[5]。

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,早期常无典型表现,大多数患者病情进展至晚期才被确诊,常合并多器官转移。胃癌的侵袭、转移与 MTA1 关系密切,近年来研究表明泛素化或去泛素化水平的改变与包括胃癌在内的多种肿瘤密切相关^[6]。泛素(ubiquitin)是一类高度保守的多肽,由 76 个氨基酸组成,广泛存在于真核生物中。泛素化修饰(ubiquitination)是一种重要的翻译后修饰,是在酶的作用下一个或多个泛素分子与底物蛋白质分子共价结合的过程,参与调控转录因子活性、受体内存及溶酶体运输等重要生理过程。泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3)、去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)等共同组成泛素化修饰的酶系统^[7-8]。越来越多的研究表明,MTA1 的信号调控途径参与表观遗传学修饰过程对胃癌生物学行为的影响^[9],然而其中是否包括泛素化调控机制尚未明了,因此我们拟对其进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒

MKN-45 细胞购自上海研谨生物科技有限公司,SGC-7901、HEK293 细胞购自上海华研生物科技有限公司;带有 HA 标签的 HA-Ub 质粒购自美国 Addgene 公司;具有 Ub 和 Myc 标签的 MTA1 质粒、siMTA1 质粒均为南京军区南京总医院肿瘤内科实验室构建。

1.1.2 试剂

培养基、血清购自美国 Hyclone 公司;protease inhibitor cocktail (蛋白酶抑制复合物)购自美国 Roche 公司;MG-132 购自美国 Sigma 公司;细胞转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;anti-Myc 和 anti-HA 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;Western Blot 发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将 HEK293 细胞在 60 mm 细胞培养皿(约 28cm²)内培

养 48 h。对照组为 HEK293 细胞 [Myc-MTA1(-)、HA-Ub (-)],3 个实验组细胞为分别转染入带 Myc 标签的 MTA1 质粒 [Myc-MTA1(+)、HA-Ub(-)]和带 HA 标签的泛素质粒 [Myc-MTA1(-)、HA-Ub(+)]以及共同转染入该两种质粒的 HEK293 细胞 [Myc-MTA1(+)、HA-Ub(+)]。细胞首先经过 PBS 缓冲液洗涤,再加入 10 ml 37℃预热的培养基。向每个培养皿内转染 2 μg 质粒,24 h 后更换培养液,继续培养 24 h 后即可收获细胞。需要用 MG-132 处理的细胞以 15 μmol/L 的终浓度在收获前 12 h 加入皿中。该实验重复 3 次。

1.2.2 细胞裂解

以预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次后,加入 1 ml 细胞裂解液(RIPA Buffer:150 mmol/L NaCl,0.5% NP-40,50 mmol/L Tris-HCl pH7.5,5 mmol/L EDTA,1% protease inhibitor cocktail),用预冷的细胞刮将细胞轻轻刮下,将细胞悬液转移到预冷的离心管中,4℃水平摇床中缓慢晃动 30 min,使得细胞充分裂解。后经过 2 次 12 000 r/min 离心 30 min,获得上清液,弃去沉淀,经 SDS-PAGE 电泳后,进行 Western Blot 分析。

1.2.3 免疫沉淀(immuno precipitation, IP)

用 BCA 蛋白定量试剂盒检测上清液中的蛋白质含量后,用细胞裂解液来调节标本之间的蛋白质浓度,使标本间蛋白质浓度相同。取 700 μl 上清液,加入 2 μg 相应的抗体(如抗 IgG、MTA1 或 MYC 的抗体)和 150 μl 琼脂糖微珠,4℃缓慢摇晃孵育过夜,通过微量离心机以 3 000 r/min 的速度离心 5 min 收集免疫沉淀产物,小心吸除上清。用细胞裂解液洗涤 5 次。IP 产物(immunoprecipitates)经 SDS-PAGE 后,进行蛋白质印迹分析,根据蛋白质浓度不同分别用检测试剂显色。

2 结果

2.1 MG-132 处理对 MTA1 表达水平的影响

以蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理胃癌细胞 MKN-45、SGC-7901 后,随着处理时间的延长,MTA1 表达水平显著增加,说明 MTA1 是有可能受蛋白酶体途径调控的分子(图 1)。

2.2 免疫沉淀检测结果

为了检测细胞内是否存在 MTA1 的泛素化修饰,实验组胃癌 MKN-45 细胞以蛋白酶体抑制剂 MG-132 (15 μmol/L)处理 6 h,对照组细胞不进行处理。IP 实验显示泛素分子可以与 MTA1 直接结

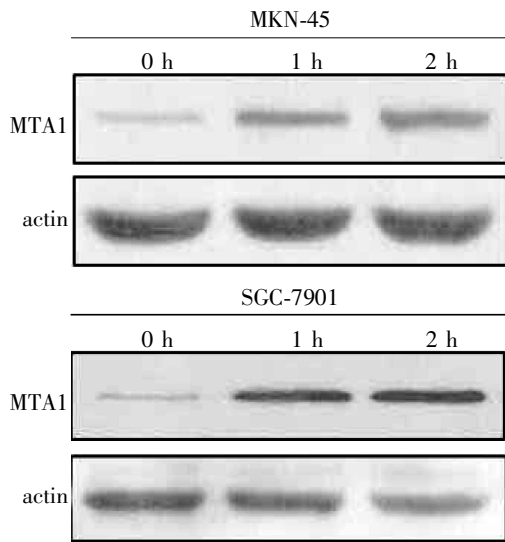


图 1 胃癌 MKN-45、SGC-7901 细胞中 MG-132 处理后 MTA1 表达水平检测

Figure 1 Detection of MTA1 expression after proteasome inhibitor MG-132 treatment in gastric cancer MKN-45, SGC-7901 cells

合,并且与对照组相比,实验组泛素化程度明显增加。因此,泛素蛋白酶体降解途径参与了内源性的 MTA1 的调控(图 2)。

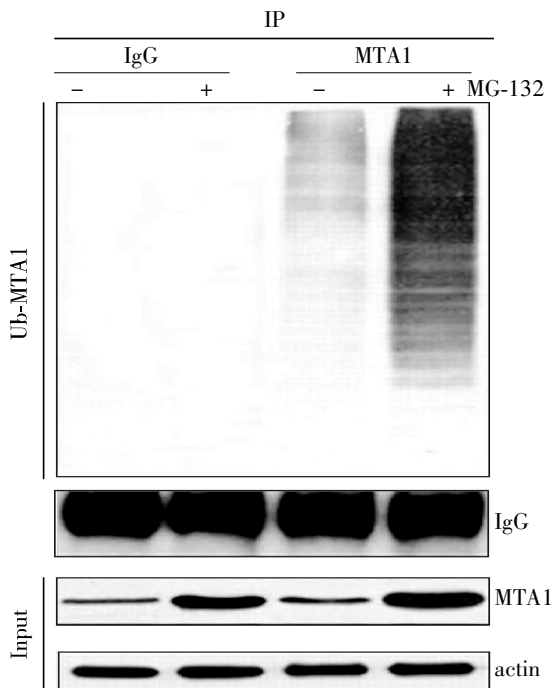


图 2 MG-132 处理后 MTA1 泛素化水平检测

Figure 2 Detection of MTA1 ubiquitination levels after treatment with MG-132

2.3 过表达泛素对 MTA1 泛素化的影响

为了进一步验证以上实验结果,将带 Myc 标签的 MTA1 质粒(Myc-MTA1)以及带 HA 标签的泛素

质粒(HA-Ub)转入 HEK293 细胞,发现仅有当 HA-Ub、Myc-MTA1 均表达时,可以检测到 Myc-MTA1 可被强烈泛素化(图 3)。由此进一步确证了 MTA1 是可被泛素化的蛋白分子。

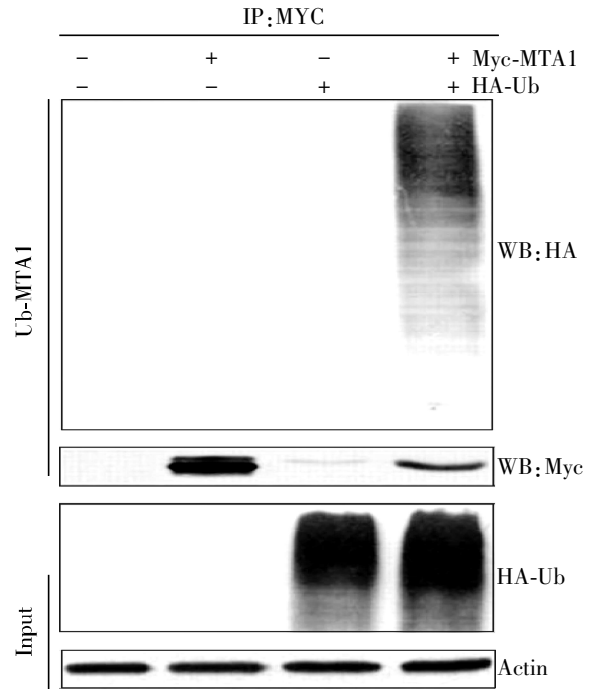


图 3 外源性 MTA1 可被泛素化修饰

Figure 3 exogenous MTA1 can be regulated through the ubiquitin pathway

3 讨论

胃癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤,大多数患者在确诊时已属晚期并发生了多器官转移,转移是关系到胃癌患者生死攸关的瓶颈,胃癌一旦发生其他脏器转移则明显预后不良,而且也显示具有较低的术后生存率。

部分研究发现泛素化调控过程与胃癌有着密切的关系。如在 MET 基因扩增的胃癌细胞系中存在依赖于 Met(一类 RTK 激酶)的 Cbl(E3 连接酶)蛋白缺失,其参与 EGFR 信号通路的间接活化过程^[10]。另有研究者指出在胃癌中存在 H2B 单泛素化的下调,ubH2B 可能促进了肿瘤发生,有可能成为一个潜在的治疗靶点^[11]。

而 MTA1 的表达与肿瘤恶性行为密切相关,术后的胃癌和结直肠癌组织标本与正常组织比具有更高的 MTA1 mRNA 表达水平^[12],并且在肠癌中 MTA1 mRNA 的过表达与肿瘤肠壁的浸润深度、Dukes 分期和更高的淋巴结转移率相关,在胃癌中其表达与浆膜浸润以及更高的淋巴结转移和血行转移率相

关,使其可成为结直肠癌和胃癌的一个新的肿瘤标志物。越来越多的研究逐渐发现其在肺癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌中高表达^[13-15],且与这些肿瘤的侵袭、转移以及预后密切相关。甚至更新的研究表明 MTA1 基因在所有肿瘤细胞中均有表达,且 MTA1 主要定位于核内^[16]。

MTA1 分子的相关研究揭示了部分细胞分化调控及肿瘤转移的机制,然而详细的调控机制尚不明确。本研究中观察到,选择性蛋白酶抑制剂 MG-132 可以增强胃癌细胞中 MTA1 的蛋白表达,MTA1 也存在泛素化修饰。因此,我们推测泛素蛋白酶体途径通过影响 MTA1 的稳定性而参与肿瘤细胞侵袭、转移的发生。其具体调控途径和分子机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yaguchi M, Wada Y, Toh Y, et al. Identification and characterization of the variants of metastasis-associated protein 1 generated following alternative splicing [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1732(1-3): 8-14
- [2] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37): 22958-22963
- [3] Nawa A, Nishimori K, Lin P, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79(2): 202-212
- [4] Toh Y, Kuminaka S, Endo K, et al. Molecular analysis of a candidate metastasis-associated gene, MTA1: possible interaction with histone deacetylase 1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2000, 19(1): 105-111
- [5] Manavathi B, Kumar R. Metastasis tumor antigens, an emerging family of multifaceted master coregulators [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1529-1533
- [6] Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer [J]. *Immunol Rev*, 2011, 244(1): 9-28
- [7] Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533
- [8] Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3): 192-201
- [9] Cong L, Pakala SB, Ohshiro K, et al. SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(51): 43793-43808
- [10] Lai AZ, Durrant M, Zuo D, et al. Met kinase-dependent loss of the E3 ligase Cbl in gastric cancer [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(11): 8048-8059
- [11] Wang ZJ, Yang JL, Wang YP, et al. Decreased histone H2B monoubiquitination in malignant gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(44): 8099-8107
- [12] Toh Y, Oki E, Oda S, et al. Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis [J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(4): 459-463
- [13] Toh Y, Ohga T, Endo K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 362-367
- [14] Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, et al. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3): 825-829
- [15] Yi C, Li X, Xu W, et al. Relationship between the expression of MTA-1 gene and the metastasis and invasion in human osteosarcoma [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2005, 25(4): 445-447
- [16] Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, et al. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site [J]. *Science*, 1993, 259(5098): 1157-1161

[收稿日期] 2013-04-02