

Smac 类似物 BV6 泛素化对肺癌细胞 A549 迁移的影响

王希方¹, 秦思达², 刘屹¹, 雷雨¹, 侯银银¹, 曹菲¹, 刘莹¹, 孙超¹, 王海鹏¹

1. 陕西省人民医院肿瘤内科, 陕西 西安 710068; 2. 西安交大第一附属医院胸外科, 陕西 西安 710061

摘要: **目的** 探讨 Smac 类似物 BV6 泛素化对肺癌细胞 A549 迁移的影响及 BV6 泛素化诱导肺癌细胞 A549 迁移的机制。**方法** 采用空载质粒(空白对照组)、BV6-flag 质粒(BV6-flag 组)、BV6-flag 质粒分别与泛素 HA-ub 质粒(BV6-ub 组)、泛素 HA-K48 质粒(BV6-K48 组)和泛素 HA-K63 质粒(BV6-K63 组)转染肺癌 A549 细胞。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 BV6 mRNA 转录情况;免疫共沉淀和免疫印迹法(Western blot)检测 BV6 泛素化情况;Transwell 小室法检测细胞迁移情况;Western blot 和 qRT-PCR 检测 NF- κ B/p65 蛋白和 mRNA 表达情况。**结果** 转染后,BV6-flag 组、BV6-ub 组、BV6-K48 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 BV6 mRNA 表达显著高于空白对照组($P < 0.05$);而各转染组间 BV6 mRNA 表达无统计学差异($P > 0.05$)。各转染组 A549 细胞中 BV6 都发生泛素化,且 BV6-K63 组泛素化水平最高。与空白对照组比较,BV6-flag、BV6-ub、BV6-K63 组 A549 细胞迁移数显著增高($P < 0.05$);与 BV6-flag 组比较,BV6-ub 组、BV6-K63 组 A549 细胞迁移数显著增高($P < 0.05$)。与空白对照组比较,BV6-flag 组、BV6-ub 组、BV6-K48 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 NF- κ B/p65 蛋白和 mRNA 表达上调($P < 0.05$);与 BV6-flag 组比较,BV6-ub 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 NF- κ B/p65 蛋白和 mRNA 表达显著上调($P < 0.05$)。**结论** Smac 类似物 BV6 可能主要通过 K63 位点发生泛素化促进 A549 细胞中 NF- κ B/p65 表达,诱导迁移的发生。

关键词: 肺癌; Smac 类似物 BV6; 泛素化; 迁移; A549; NF- κ B/p65

中图分类号: R-33 R 734.2 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)11-1462-04

Effect of Smac analogue BV6 ubiquitination on A549 migration in lung cancer cells

WANG Xi-fang*, QIN Si-da, LIU Yi, LEI Yu, HOU Yin-yin, CAO Fei, LIU Ying, SUN Chao, WANG Hai-peng

* Department of Oncology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China

Corresponding author: WANG Hai-peng, E-mail: 32570535@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of Smac analogue BV6 ubiquitination on A549 migration in lung cancer cells and the mechanism by which BV6 ubiquitination induces A549 migration in lung cancer cells. **Methods** The empty vector plasmid (blank control group), BV6-flag plasmid (BV6-flag group), BV6-flag plasmid combined with ubiquitin HA-ub plasmid (BV6-ub group), ubiquitin HA-K48 plasmid (BV6-K48 group) and ubiquitin HA-K63 plasmid (BV6-K63 group) respectively were transfected into A549 cells. The mRNA transcription of BV6 was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Immunoprecipitation and Western blot were used to detect the ubiquitination of BV6. Transwell chamber method was used to detect the migration. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of protein and mRNA of NF- κ B/p65. **Results** The mRNA expression of BV6 in A549 cells of BV6-flag group, BV6-ub group, BV6-K48 group and BV6-K63 group were higher than that of the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in mRNA expression of BV6 among each transfection groups ($P > 0.05$). BV6 was ubiquitinated in A549 cells of each transfection group, and the ubiquitination level of BV6-K63 transfection group was the highest. Compared with the blank control group, the mobility number of A549 cells was significantly increased in BV6-flag group, BV6-ub group and BV6-K63 group ($P < 0.05$). Compared with BV6-flag group, the mobility number of A549 cells in BV6-ub group and BV6-K63 group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the protein and mRNA expression of NF- κ B/p65 was significantly up-regulated in A549 cells of BV6-flag group, BV6-ub group, BV6-K48 group and BV6-K63 group ($P < 0.05$). Compared with BV6-flag group, the protein and mRNA expression of NF- κ B/p65 in A549 cells was significantly up-regulated in BV6-ub group and BV6-K63 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Smac

analogue BV6 may promote the expression of NF- κ B/p65 in A549 cells and induces migration through ubiquitination at the K63 locus.

Key words: Lung cancer; Smac analogue BV6; Ubiquitination; Migration; A549; NF- κ B/p65

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81402506)

肺癌是我国发病率和死亡率增长最快的恶性肿瘤之一^[1]。肺癌患者多数处于晚期不具备手术机会,肺癌细胞迁移扩散与肺癌的发展、病理有着密切的联系^[2]。理解迁移在肺癌中发生、发展及它所处具体环境中错综复杂的关联,将有助于发现并提出新型肺癌治疗等药物。蛋白质的泛素化修饰是由酶催化的一个级联反应,该反应需要以下三个酶的密切配合及共同参与:泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)和泛素连接酶(ubiquitin ligase, E3)^[3]。泛素分子是由具有高度保守性的 76 个氨基酸小分子蛋白质组成的,在真核生物细胞中分布广泛,在酶的介导下,泛素分子与蛋白质结合,使靶蛋白被 26S 蛋白酶体识别并降解^[4]。Smac 是线粒体凋亡通路中重要的信号调节分子,目前的研究表明,Smac 类似物 BV6 有诱导肿瘤细胞趋化运动的作用^[5]。目前关于 Smac 模拟类似物的报道主要与细胞自噬与凋亡相关,而关于细胞迁移的报道较少。关于 BV6 泛素化对肺癌细胞的迁移机制目前还未见报道,本文通过实验研究探讨 Smac 类似物 BV6 是否诱导肺癌细胞迁移。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人肺癌细胞系 A549 (广东省实验中心)。

1.2 实验用药 Smac 类似物 BV6 (厦门慧嘉生物科技有限公司,批号:EHJ-CAS0014912)。

1.3 主要实验仪器 蛋白印迹仪[帝肯(上海)贸易有限公司,型号:PROFIBLOT 48],细胞培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,型号:BC-J80/160S)。

1.4 主要实验试剂 RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司,批号:507767),胎牛血清(杭州亿枫生物公司,批号:11011-8613),考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(武汉科昊佳生物科技有限公司,批号:AR0145),RNA 提取试剂盒(批号:D1736),反转录试剂盒(批号:D1821)、PCR 检测试剂盒(哈尔滨经纬百科生物技术有限公司,批号:D1945),p65 一抗、二抗(百奥莱博,批号:YT827-NJI, CYB167002-TPX),过表达质粒(BV6-flag 质粒分、泛素 HA-ub 质粒、泛素 HA-K48 质粒和泛素 HA-K63 质粒)(上海联迈生物工程有限公

司,批号:ATCC339996), anti-SmacmAb (厦门慧嘉生物科技有限公司,批号:567360-100UG), β -actin 单克隆抗体(PL Laboratories,批号:PL0401312), IP 裂解液(普利莱基因技术有限公司,批号:C1054-100)。

1.5 实验分组 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清),置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中传代培养人肺癌细胞系 A549。将传代培养的 A549 细胞,调整为 1×10^5 个/ml 细胞悬液。BV6-flag 质粒与泛素 HA-ub 质粒、泛素 HA-K48 质粒和泛素 HA-K63 质粒共转染 A549 细胞,转染后细胞分为 3 组,转染 BV6-ub 组、BV6-K48 组、BV6-K63 组,另以转染空载质粒和转染 BV6-flag 质粒的 A549 细胞为空白对照组和转染 BV6-flag 组,按转染试剂盒说明书分别转染。

1.6 检测方法

1.6.1 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测各组 BV6 的 mRNA 转录情况 收集转染后各组 A549 细胞,采用 Trizol 法提取 RNA,通过逆转录来合成 cDNA,采用 SYBR Green 染料法检测 BV6 的基因表达量,扩增具体步骤按产品说明书进行。

1.6.2 免疫共沉淀和免疫印迹法(Western blot)检测各组 BV6 泛素化情况 收集转染后各组 A549 细胞,裂解,提取好的蛋白质中按比例加入抗体(1:200),孵育,加入 Protein A/G beads,孵育,洗涤,蛋白质样品金属浴中变性,离心机离心。anti-SmacmAb 免疫共沉淀孵育后,用 HA 抗体去免疫沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳,检测 BV6 泛素化条带,设置内参 β -action 蛋白,进行分析。检测 3 次,取平均值计算 P65 相对表达量。

1.6.3 Transwell 小室法检测各组迁移情况 (1)将转染后各组 A549 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /ml,在 Transwell 小室的上室中 5 个组均加入 A549 细胞悬液 100 μ l,置于培养箱内培养。(2)培养 48 h 后,洗涤,染色。随机选取 200 倍下的 5 个视野,计数穿过小室的 A549 细胞数量,求平均数,进行统计学分析。每个实验独立重复 3 次,计算迁移细胞数。

1.6.4 Western blot 检测 A549 细胞中 NF- κ B/p65 的蛋白表达情况 收集并裂解细胞后,提取细胞蛋白,BCA 盒测定各组细胞的 p65 蛋白含量,按说明书进行具体操作。随后,进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶转膜加一抗、二抗进行免疫反应。设置内参 β -action 蛋

白。检测 3 次,取平均值计算 p65 蛋白相对表达量。

1.6.5 qRT-PCR 检测 A549 细胞中 NF- κ B/p65 的 mRNA 表达 采用 Trizol 法提取各个分组 A549 细胞的 RNA,通过逆转录来合成 cDNA,采用 SYBR Green 染料法检测 NF- κ B/p65 的基因表达量,扩增具体步骤按产品说明书进行。每个反应体系一式三份作为平行重复。实验结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算待测目的基因的 mRNA 相对表达量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测各组 BV6 mRNA 转录情况 转染后,BV6-flag 组、BV6-ub 组、BV6-K48 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 BV6 mRNA 表达水平均高于空白对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而各转染组间 BV6 的 mRNA 表达基本相同 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 免疫共沉淀和 Western blot 检测各组 BV6 泛素化情况 各转染组中的 A549 细胞中 BV6 都发生泛素化,且 BV6-K63 组泛素化水平最高。见图 1。

2.3 Transwell 小室法检测各组细胞迁移情况 与空白对照组比较,BV6-flag、BV6-ub、BV6-K63 组 A549 细胞迁移数显著增高 ($P < 0.05$);与 BV6-flag 比较,BV6-ub、BV6-K63 组 A549 细胞迁移数显著增高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 qRT-PCR 和 Western blot 检测 A549 细胞中 NF- κ B/p65 蛋白和 mRNA 的表达情况 与空白对照组比较,BV6-flag 组、BV6-ub 组、BV6-48 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 NF- κ B/p65 表达显著上调 ($P < 0.05$);与 BV6-flag 比较,BV6-ub 组、BV6-K63 组 A549 细胞中 NF- κ B/p65 表达显著上调 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

3 讨论

肺癌中的非小细胞肺癌 (NSCLC) 是最常见的病理类型,占肺癌中大部分^[6]。多数患者确诊时已为肺癌晚期,失去手术机会,放疗、化疗就成为主要治疗手段,但效果欠佳^[7]。Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low PI) 是第二线粒体来源的半胱氨酸蛋白水解酶激活剂,通过与 X-连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP) 的结合发挥其促进肿瘤细胞凋亡的作用,并且在肿瘤的发生、发展及治疗中有重要作用^[8-9]。因此,Smac 类似物成为治疗肿瘤的研究前沿。

表 1 各组转染后 A549 细胞中 BV6 mRNA 相对表达及 A549 细胞迁移情况比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

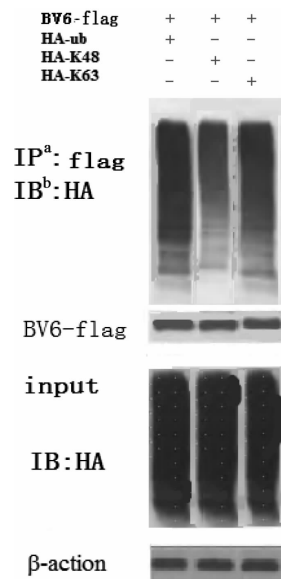
组别	BV6 mRNA	A549 细胞迁移数
空白对照组	0	80.600 \pm 14.200
BV6-flag 组	0.469 \pm 0.031 ^a	120.760 \pm 20.600 ^a
BV6-ub 组	0.476 \pm 0.040 ^a	205.540 \pm 22.780 ^{ab}
BV6-K48 组	0.410 \pm 0.023 ^a	111.260 \pm 13.220
BV6-K63 组	0.432 \pm 0.052 ^a	239.200 \pm 24.780 ^{ab}

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 BV6-flag 组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组 A549 细胞 NF- κ B/p65 蛋白和 mRNA 相对表达量比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	p65 蛋白	p65 mRNA
空白对照组	1.012 \pm 0.026	0.436 \pm 0.015
BV6-flag 组	1.244 \pm 0.164 ^a	0.602 \pm 0.036 ^a
BV6-ub 组	1.618 \pm 0.086 ^{ab}	0.813 \pm 0.037 ^{ab}
BV6-K48 组	1.374 \pm 0.086 ^a	0.656 \pm 0.022 ^a
BV6-K63 组	1.863 \pm 0.156 ^{ab}	0.882 \pm 0.024 ^{ab}

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 BV6-flag 组比较,^b $P < 0.05$ 。



注:自左至右依次为:BV6-flag 和 HA-ub 共转染 (BV6-ub 组)、BV6-flag 和 HA-K48 共转染 (BV6-K48 组)、BV6-flag 和 HA-K63 共转染 (BV6-K63 组);IP^a 表示免疫沉淀法;IB^b 表示免疫印迹法。

图 1 转染后 A549 细胞中 BV6 泛素化情况

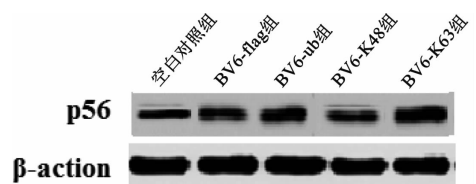


图 2 各组 A549 细胞 p65 蛋白相对表达

BV6 是小分子 Smac 模拟类似物,BV6 能够诱导 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 积累,激活非经典 NF- κ B 途径,促使凋亡抑制蛋白 (IAP) 家族中 cIAP1 和 cIAP2 的显著降解,诱导 NF- κ B 靶基因表达,刺激迁移和侵袭^[10]。赖彦^[11]研究表明,NF- κ B p65 表达在人肺腺癌 A549 细胞迁移中起到重要的作用。本研究结果

表明, BV6 可能通过激活 NF- κ B 信号通路, 促进 p65 表达。

泛素化是一个复杂的过程, 泛素化修饰可分为 3 个步骤。第一步, ATP 水解提供能量, 酶 E1 被泛素激活与泛素分子 C 末端的半胱氨酸残基结合, 并激活泛素分子。第二步, 活化的泛素分子被泛素激活酶 E1 转移到泛素结合酶 E2 上。第三步, 泛素结合酶 E2 上的泛素分子被泛素连接酶 E3 转移到靶蛋白上, 完成泛素化修饰^[12]。本研究结果表明, 转染 BV6 质粒组中 BV6 mRNA 转录基本相同, BV6 mRNA 的转录并不受到泛素化位点的影响。

泛素化修饰根据泛素分子的连接方式可以分为 1 个泛素分子连接在靶蛋白的赖氨酸残基上的单泛素化修饰和多个泛素分子结合形成链状连接在靶蛋白的赖氨酸残基上多聚泛素化^[4]。相关研究报道显示, 蛋白质的泛素化降解与 K48 位点有关, 且 K63 位点在泛素化中主要起到激活和蛋白质运输的作用^[13-15]。

本研究结果表明, 各转染组中的 A549 细胞中 BV6 都发生泛素化, BV6 诱导 A549 细胞迁移且主要通过 K63 位点发生泛素化的 BV6 诱导 A549 细胞迁移更明显, 推测 K48 位点可能影响 BV6 蛋白的磷酸化; 而 K63 位点可能影响 BV6 蛋白的泛素化降解功能。

本研究初步证明 BV6 促进人肺癌细胞系 A549 的迁移, 在人肺癌细胞系 A549 中, 通过 BV6 的泛素化, 调控激活迁移活动等, 对肺癌患者的治疗和预后恢复提供参考。但泛素化过程复杂, 与肺癌细胞迁移机制中众多因子相互关联, 还有较多因素未考虑。故下一步研究可尝试 BV6 在人肺癌细胞系 A549 信号通路中的作用机制, 从不同的角度探究肺癌病理变化。

参考文献

[1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡

分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.

- [2] 邱协. 肺癌肿瘤间质细胞和气腔扩散的关系研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [3] Seo J, Kim MW, Bae KH, et al. The roles of ubiquitination in extrinsic cell death pathways and its implications for therapeutics[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 162: 21-40.
- [4] 崔钰晗, 宋迪, 刘月, 等. 泛素化修饰与细胞自噬[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(8): 654-657.
- [5] Tchoghandjian A, Jennewein C, Eckhardt I, et al. Identification of non-canonical NF- κ B signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e564.
- [6] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(7): 61.
- [7] 周茜茜, 王森舟. 非小细胞肺癌免疫治疗不良反应及疗效预测指标研究进展[J]. *广东医学*, 2019, 40(7): 885-889.
- [8] 陈风华, 于程程, 徐畅, 等. Smac 蛋白促进肿瘤细胞凋亡作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(7): 1196-1198.
- [9] 王娜, 杨俭, 李胜棉. Smac 在肿瘤进展及治疗中的意义[J]. *河北医科大学学报*, 2011, 32(6): 739-742.
- [10] El-Mesery M, Shaker ME, Elgaml A. The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF- α and TRAIL-induced apoptosis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(18): 2015-2022.
- [11] 赖彦. 谷氨酰胺对人肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移及 TNF- α 和 NF- κ B p65 表达的影响[D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [12] Zhou MJ, Chen FZ, Chen HC. Ubiquitination involved enzymes and cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(8): 93.
- [13] Yang WL, Jin GX, Li CF, et al. Cycles of ubiquitination and deubiquitination critically regulate growth factor-mediated activation of Akt signaling[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(257): ra3.
- [14] Lin K. The akt DUBbed InAktive [J]. *Sci Signal*, 2013, 6(257): pe1.
- [15] Li PZ, Liu HX, Zhang YY, et al. Endotoxin tolerance inhibits degradation of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 by suppressing pellino 1 expression and the K48 ubiquitin ligase activity of cellular inhibitor of apoptosis protein 2[J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(6): 906-915.

收稿日期: 2019-05-26 修回日期: 2019-06-24 编辑: 王国品