

网络出版时间: 2022-09-14 20:50 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1746.014.html>

RNF43 靶向 PTEN 进行泛素化修饰 抑制人胃癌细胞 AGS 增殖与迁移

邵笑¹, 魏从文², 闵敏³, 董瑞华^{1,4}

摘要 目的 研究 E3 泛素连接酶环指蛋白 43 (RNF43) 在人胃腺癌细胞 AGS 中新的作用靶点及其对 AGS 凋亡、增殖与迁移的影响。方法 使用荧光显微镜观察 RNF43 在人胃腺癌细胞 AGS 中的瞬时转染效率; 使用 Western blot 研究高表达 RNF43 对 AGS 磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 蛋白表达水平的影响; 采用免疫共沉淀实验研究 RNF43 与 PTEN 的相互作用及 RNF43 对 PTEN 的泛素化修饰; 分别用流式细胞实验、CCK-8 实验、细胞划痕实验研究 RNF43 通过调控 PTEN 的表达对 AGS 细胞凋亡、增殖、迁移能力的影响。结果 细胞荧光结果显示, 外源 RNF43 成功在人胃腺癌细胞 AGS 中过表达; RNF43 与 PTEN 在 AGS 中存在相互作用, RNF43 可以通过 K63 形式的泛素化方式对 PTEN 进行泛素化修饰并增加 PTEN 的蛋白表达水平。细胞功能实验结果显示 RNF43 可以通过靶向调控 PTEN 的功能水平进而加速 AGS 的凋亡并抑制 AGS 的增殖与迁移。结论 RNF43 可以通过对 PTEN 的泛素化修饰来抑制人胃癌细胞 AGS 的增殖与迁移。

关键词 RNF43; PTEN; AGS; 泛素化

中图分类号 R 349.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)11-1763-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.014

胃癌 (gastric cancer, GC) 是五大常见肿瘤之一, 目前中国已经成为胃癌发病人数和死亡人数均居高位的国家^[1]。探寻新的治疗靶点, 对于提高胃癌疗

效, 改善预后具有重要的科学意义和应用价值^[2]。

环指蛋白 43 (ring finger 43, RNF43) 具有环状的泛素连接酶结构域和跨膜区, 属于跨膜的 E3 泛素连接酶^[3-4]。研究^[5]表明 RNF43 可以与 Wnt/ β -catenin 信号通路中的受体蛋白 Frizzled 结合, 泛素化卷曲受体蛋白并诱导该蛋白降解, 进而抑制 Wnt 信号通路的活性发挥抑癌作用。前期研究^[6]表明 RNF43 在胃癌中的表达较高, 其作为胃癌中的生物标志物具有较高的研究价值。目前针对 RNF43 泛素化底物蛋白的研究较少, 该实验通过对 RNF43 作用新靶点发现与验证, 进一步明确 RNF43 在胃癌细胞中的分子机制, 为胃癌的靶向治疗提供新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 细胞与质粒 人胃腺癌细胞 AGS 由军事医学科学院八所四室保存; 不同标签的 RNF43 质粒 (Flag-RNF43、HA-RNF43、GFP-RNF43)、第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN) 质粒 Flag-PTEN、HA-PTEN 购自北京义翘神州生物技术责任有限公司; 泛素 (Ubiquitin, Ub) 质粒 Myc-Ub 及泛素 48 位、63 位特异性泛素化的质粒 Myc-Ub (K48)、Myc-Ub (K63) 由实验室保存。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司; α -tubulin 抗体购于美国 Cell signaling technology 公司; 抗 RNF43、PTEN 抗体购于美国 Abcam 公司; 转染试剂购于法国 Ployplus 公司; PTEN 选择性抑制剂 bpV (Hopic)、蛋白酶体抑制剂 MG132 购于美国 Selleck 公司; 细胞增殖检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购于日本东仁化学科技有限公司; ANNEXIN V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于美国 Solarbio 公司。

1.3 主要仪器 恒温细胞培养箱 (型号: 3111)、超净工作台 (型号: 1384) 购于美国 Thermo 公司; 荧光倒置显微镜购于尼康仪器上海有限公司; 恒压恒流电泳仪 (型号: 164-5052) 购于美国 Bio-Rad 公司; 快

2022-07-25 接收

基金项目: 北京市科技新星计划 (编号: Z191100001119140)

作者单位: ¹安徽医科大学解放军总医院第五医学中心临床学院, 100071 北京

²军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 100071 北京

³解放军总医院第五医学中心南院区消化内科, 100071 北京

⁴首都医科大学附属北京友谊医院研究型病房, 100050 北京

作者简介: 邵笑, 女, 硕士研究生;

闵敏, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: minmin823@sina.com;

董瑞华, 男, 研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Ruihua_Dong_RW@163.com

速转膜仪(型号: NovexTM)、流式细胞仪(型号: Attune NxT) 购于美国 Invitrogen 公司; 酶标仪(型号: Spark 20M) 购于瑞士 TECAN 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 AGS 细胞。注意观察培养基颜色以及显微镜下细胞密度,及时给细胞更换培养基、传代。

1.4.2 细胞的瞬时转染 准备四皿人胃腺癌细胞 AGS,其中一皿作为空白对照组,转染前更换细胞培养基,待细胞密度为 80% 左右时准备转染。分别准备 3 个 1.5 ml EP 管,管中分别加入 2、4、8 μg RNF43 绿色荧光质粒和 200 μl buffer 缓冲液,震荡 15 s 后静置 5 min;再分别加入 4、8、16 μl 转染试剂,震荡 15 s 后静置 10 min。将混合液分别转移至 3 皿 AGS 细胞中,4~6 h 后更换细胞培养基,24 h 后显微镜下观察细胞荧光或收集细胞样品,观察细胞荧光前用 DAPI 对细胞核进行蓝色荧光染色。

1.4.3 Western blot 分析 准备四皿 AGS 细胞,分别转染 0、1、2、4 μg 的 Flag-RNF43。收集不同处理组细胞,裂解后离心收集上清液。用 BCA 法测定蛋白样品浓度并加入 SDS 高温煮沸制备蛋白样品。用 SDS-PAGE 分离胶分离蛋白,转膜,用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭;一抗 4 °C 孵育过夜(α-tubulin 抗体稀释比例为 1:5 000; HA、Flag、Myc 标签抗体稀释比例为 1:2 000; RNF43、PTEN 抗体稀释比例为 1:1 000),TBST 洗涤后二抗孵育 1~2 h(山羊抗兔、山羊抗小鼠抗体稀释比例为 1:5 000),ECL 化学发光显影。以 α-tubulin 条带为内参对照,Image J 软件分析 RNF43 及 PTEN 的蛋白相对表达量。

1.4.4 免疫共沉淀分析 准备六皿 AGS 细胞,其中三皿中同时过表达 HA-RNF43、Flag-PTEN 和 Myc-UB(WT、K48、K63);另外三皿中分别过表达 HA 标签的空载体质粒: HA-Vector、Flag-PTEN 和 Myc-UB(WT、K48、K63)。细胞转染处理 24 h 后,加入 NP40 裂解液冰上裂解 30 min,离心取上清液。上清液分成两部分:一部分直接加入 SDS,水浴煮沸制备 Input 细胞蛋白样品;另一部分加入 Flag 标签的磁珠,4 °C 摇床孵育过夜,离心弃去上清液,NP40 洗液反复清洗磁珠 3 次后制备 IP 细胞蛋白样品。注意细胞收样前 8 h 加入 40 nmol/ml 的蛋白酶体抑制剂 MG132。

1.4.5 CCK-8 检测细胞增殖 Bisperoxovanadium (HOpic) [bpV (HOpic)] 是一种有效的和具有选择

性的 PTEN 抑制剂,其 IC₅₀ 为 14 nmol/L^[1]。将 AGS 细胞分组,分别用 bpV (HOpic)、RNF43 处理。将不同处理组的 AGS 细胞接种至 96 孔板中,每组 3 个复孔。待细胞贴壁后 6、12、24、36、48、72 h,用酶标仪测定细胞在 450 nm 波长的吸光度值,绘制增殖曲线来评估细胞的增殖能力。

1.4.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 AGS 肿瘤细胞分为 Control 组、RNF43 组、bpV (HOpic) 组及 RNF43 + bpV (HOpic) 组,每组设置 3 个重复样品。48 h 后将不同处理组的 AGS 细胞用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化,PBS 清洗 2 次,收集细胞。加入 150 μl 结合液将细胞重悬转移至流式管中,分别加入 5 μl AnnexinV-FITC、PI 避光孵育 15 min,流式细胞仪检测 AGS 细胞凋亡情况(Q3 为早期凋亡细胞,Q2 为晚期凋亡细胞,通过计算 Q2 与 Q3 细胞分布总和,计算细胞凋亡总比例)。

1.4.7 划痕实验检测细胞迁移 将 AGS 肿瘤细胞分成 Control 组、RNF43 组、bpV (HOpic) 组及 RNF43 + bpV (HOpic) 组,在 6 孔板中培养、处理 AGS,每组设置 3 个复孔。待细胞密度达到 100% 后用 200 μl 无菌移液枪头垂直与板面划痕,每孔划痕 PBS 洗涤 3 次后加入不含血清的培养基,在显微镜下观察划痕两侧细胞在 0、12、24 h 的迁移情况,拍照记录,Image J 软件分析划痕宽度变化。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,每组数据重复 3 次。多组样本间比较采用单、双因素方差分析,两两组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNF43 在 AGS 细胞中的瞬时转染 随着 RNF43 转染量的增加,细胞绿色荧光增加。蓝色荧光为 DAPI 对 AGS 细胞核的染色。见图 1。

2.2 RNF43 对 PTEN 蛋白表达水平的影响 Western blot 结果显示,随着 RNF43 的表达量增加,内源 PTEN 的蛋白表达量也随之增加,其中过表达 2、4 μg RNF43 时差异有统计学意义(*F* = 25.38, *P* < 0.01, *P* < 0.001),见图 2A、B。免疫共沉淀结果显示 RNF43 与 PTEN 存在相互作用,见图 2C。

2.3 RNF43 对 PTEN 的蛋白表达泛素化修饰的影响 Western blot 结果显示,在 AGS 过表达 RNF43 之前,AGS 细胞内即存在蛋白水平的泛素化调控,而当 AGS 中 RNF43 蛋白水平高表达后,细胞的泛素化水平增强,PTEN 蛋白表达增强。其中以泛素

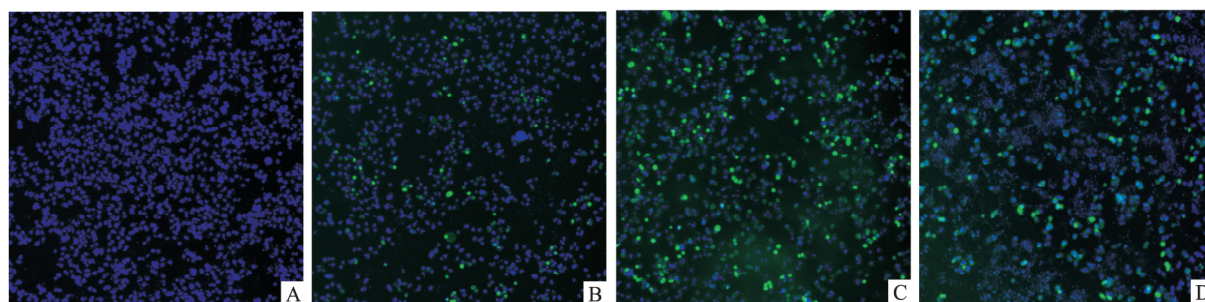


图1 GFP-RNF43 在 AGS 中的表达 ×40

A: DPAI 蓝色染细胞核; B: 绿色荧光标记 2 μg RNF43 蛋白表达; C: 绿色荧光标记 4 μg RNF43 蛋白表达; D: 绿色荧光标记 8 μg RNF43 蛋白表达; 蓝色荧光标记细胞核

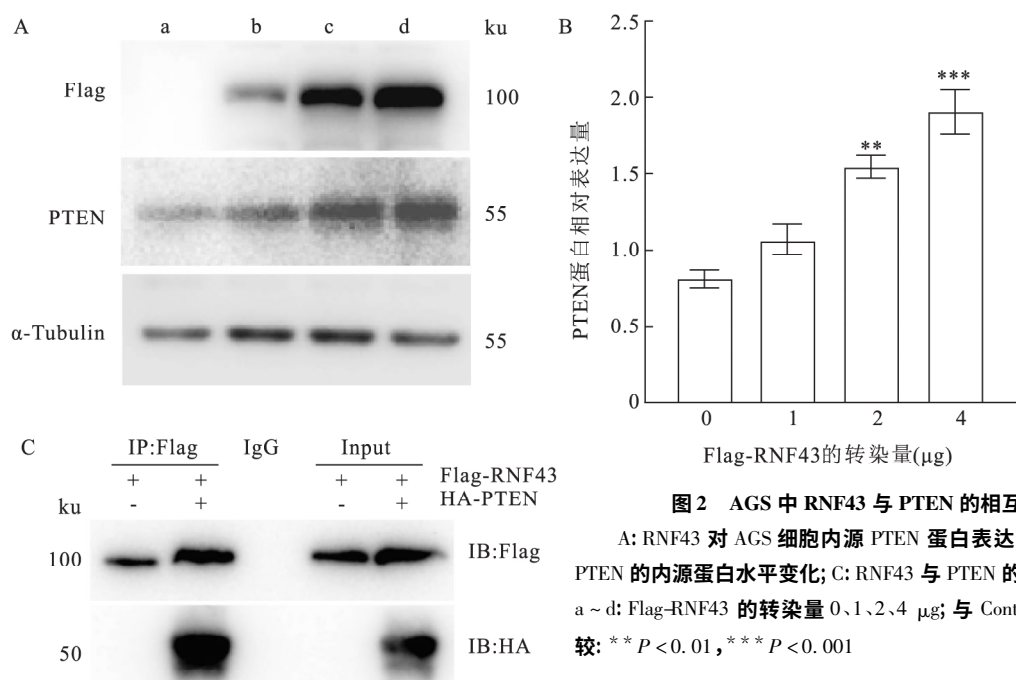


图2 AGS 中 RNF43 与 PTEN 的相互作用

A: RNF43 对 AGS 细胞内源 PTEN 蛋白表达水平的影响; B: PTEN 的内源蛋白水平变化; C: RNF43 与 PTEN 的蛋白相互作用; a ~ d: Flag-RNF43 的转染量 0、1、2、4 μg ; 与 Control 组 (0 μg) 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

分子 K63 位点进行特异性泛素化修饰的蛋白水平显著增加: Ub (K63) + RNF43 组与 Ub (K63) 对照组的 Ub 蛋白水平存在差异 ($t = 5.081, P = 0.037$); Ub (K63) + RNF43 组与 Ub (WT) + RNF43 组的 Ub 蛋白水平存在差异 ($t = 6.945, P = 0.020$)。见图 3。说明 RNF43 主要通过 K63 的泛素化方式靶向修饰 PTEN 并增加 PTEN 的蛋白表达水平。

2.4 RNF43 通过增加 PTEN 的表达对 AGS 细胞增殖的影响 CCK-8 实验结果显示,相较于 Control 组,RNF43 组 AGS 肿瘤细胞增殖能力降低,差异有统计学意义 ($F = 26.46, P < 0.01$);而相较于 RNF43 组,bpV (HOpic) + RNF43 组 AGS 肿瘤细胞增殖能力提高,差异有统计学意义 ($F = 33.26, P < 0.05$)。见图 4。表明 RNF43 可通过增加 PTEN 的表达来抑制 AGS 肿瘤细胞的增殖。

2.5 RNF43 通过增加 PTEN 的表达对 AGS 细胞凋亡的影响 流式细胞实验结果中 Q2、Q3 比例之和为肿瘤细胞凋亡的比例。Control 组凋亡细胞占总肿瘤细胞数量的 16.95%; bpV (HOpic) 组 48 h 之后凋亡细胞比例为 8.79%; RNF43 组凋亡细胞比例为 43.66%,细胞凋亡比例增加; bpV (HOpic) + RNF43 组细胞凋亡比例为 35.29%。与 Control 组相比,RNF43 组 AGS 肿瘤细胞凋亡比例增加,差异有统计学意义 ($t = 10.87, P = 0.0004$);与 RNF43 组相比,bpV (HOpic) + RNF43 组 AGS 肿瘤细胞凋亡减少,活细胞数量增加 ($t = 3.341, P = 0.0288$),差异有统计学意义。见图 5。说明加入 RNF43 之后加强了 AGS 肿瘤细胞内源 PTEN 的表达,对肿瘤细胞活性抑制加强,使肿瘤细胞凋亡增加。

2.6 RNF43 通过增加 PTEN 的表达对 AGS 迁移

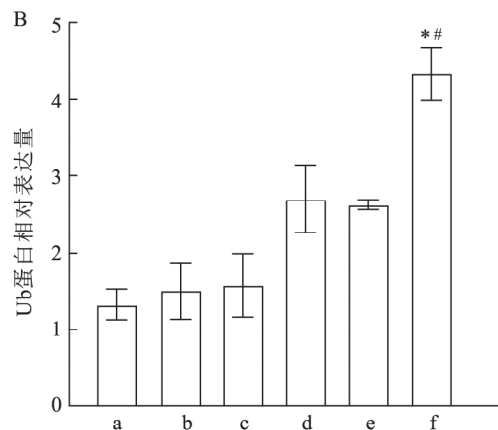
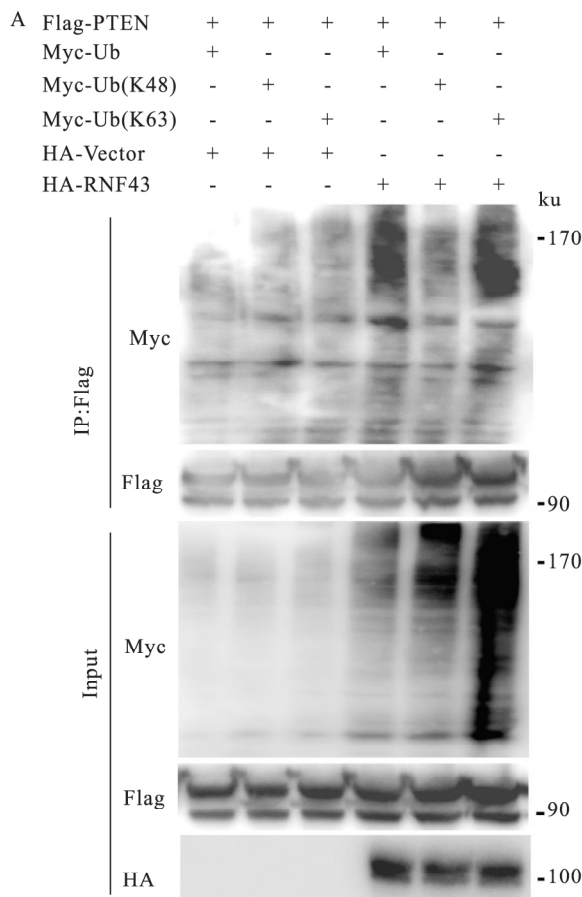


图3 RNF43对PTEN的泛素化修饰

A: AGS 不同处理组的 RNF43、PTEN 及 Ub 的蛋白表达情况;
B: AGS 不同处理组中 Ub 的蛋白相对表达量; a: AGS 高表达 Ub 组; b: AGS 高表达 Ub (K48) 组; c: AGS 高表达 Ub (K63) 组; d: AGS 高表达 Ub 和 RNF43 组; e: AGS 高表达 Ub (K48) 和 RNF43 组; f: AGS 高表达 Ub (K63) 和 RNF43 组; 与 AGS 高表达 Ub (K63) 组比较: * $P < 0.05$; 与 AGS 高表达 Ub 和 RNF43 组比较: # $P < 0.05$

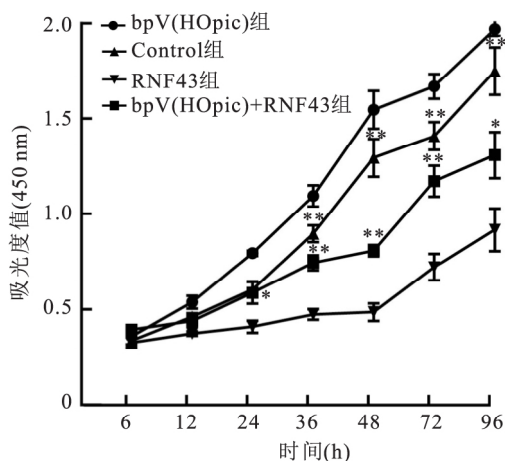


图4 CCK-8 检测 AGS 细胞增殖变化
与 RNF43 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的影响 细胞迁移结果显示,随着时间延长,细胞划痕之间间隙逐渐缩小;与 Control 组相比,RNF43 组 AGS 肿瘤细胞增长速度缓慢 ($t_{12h} = 45.65$, $t_{24h} = 88.03$, $P < 0.0001$);与 RNF43 组相比,bpV (HOpic) + RNF43 组 AGS 肿瘤细胞的生长速度较快 (t_{12h}

$= 14.71$, $t_{24h} = 39.70$, $P < 0.0001$),差异有统计学意义。各组间迁移能力的变化差异表明 RNF43 对 PTEN 的表达起到了增强作用,并抑制了 AGS 的迁移。见图 6。

3 讨论

胃癌患者临床前期症状无特异性,确诊时大多已进入进展期或晚期,预后较差。寻找胃癌新的分子靶点,对改善胃癌患者的临床疗效具有重要意义^[8]。近年来 RNF43 被认为是胃癌的发生发展中重要的生物标志物,研究^[9]表明 RNF43 是 Wnt 信号通路经典的拮抗剂,其主要通过与卷曲蛋白 frizzled 结合并对其泛素化降解来抑制信号通路的活性,RNF43 也可以通过影响 T 细胞因子 4 在细胞内的聚集来发挥 Wnt 信号通路拮抗剂的作用^[10]。PTEN 作为抑癌基因在胃癌细胞中高表达^[11],而泛素化是影响 PTEN 蛋白表达的重要调控机制——PTEN 的单泛素化可以促进 PTEN 的核转移,使其在细胞中表达增加,抑制肿瘤细胞的增殖^[12]。

该研究探讨了在人胃腺癌细胞 AGS 中 RNF43 的蛋白表达、对细胞内源 PTEN 蛋白表达以及对

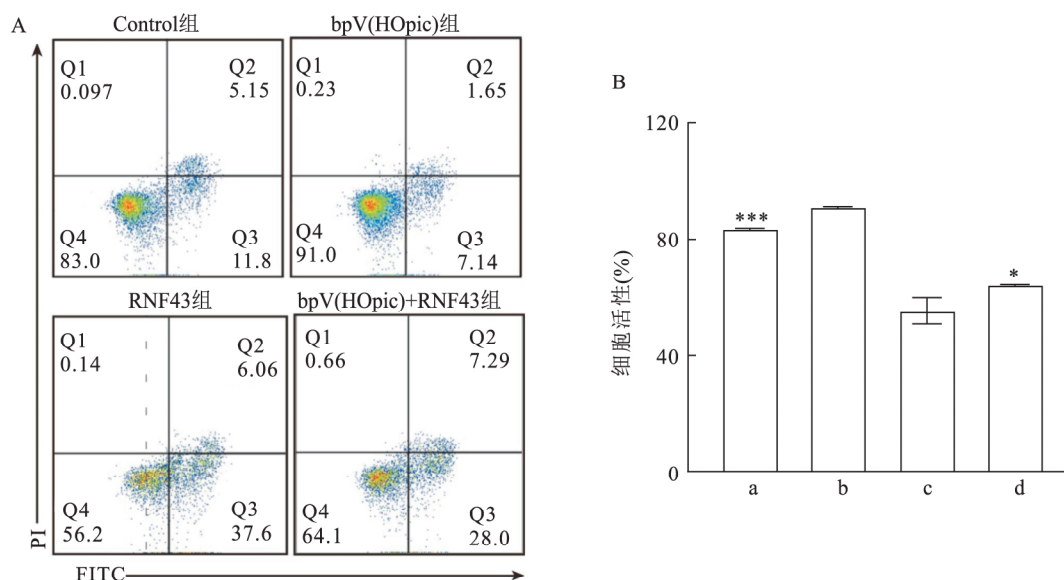


图5 AGS细胞凋亡变化

A: 流式细胞仪检测 AGS 不同处理组细胞凋亡情况; B: AGS 肿瘤细胞活性情况直方图; a: Control 组; b: bpV (HOpic) 组; c: RNF43 组; d: bpV (HOpic) + RNF43 组; 与 RNF43 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

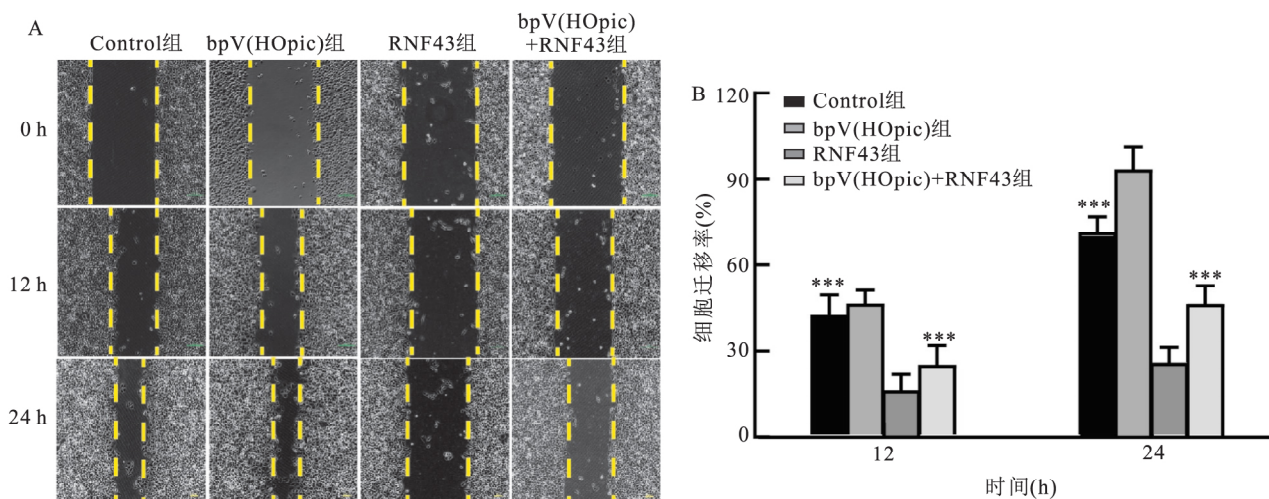


图6 AGS细胞迁移能力的变化

A: AGS 不同处理组细胞迁移能力变化; B: AGS 不同处理组细胞迁移率直方图; 与 RNF43 组比较: *** $P < 0.001$

AGS 细胞功能的影响。RNF43 在肿瘤中的作用是多样的: 它在结肠癌、胃癌、大肠癌等消化道肿瘤中发挥抑癌作用,而在肝癌中则可以加速肿瘤的发生发展。这种不同肿瘤中抑癌与促癌作用的差异,推测与 RNF43 特异性的化学结构有关。泛素化是蛋白质修饰的重要方式之一,而 E3 连接酶在这一过程中发挥重要作用。从结构上来说,RNF43 属于 E3 连接酶,可以通过对不同的底物蛋白进行泛素化修饰,使蛋白降解或表达增强,进而加速细胞的凋亡或增殖。本研究中的泛素化实验证实了 PTEN 是

RNF43 泛素化修饰的底物蛋白,RNF43 的蛋白高表达会使 AGS 细胞内源 PTEN 蛋白表达增加。实验中 AGS 细胞增殖、迁移及细胞凋亡实验均证明了 RNF43 对 PTEN 蛋白表达水平的调控作用会进一步影响细胞功能。然而,研究^[3]已知 PTEN 主要在 PI3K/AKT 通路中发挥重要调控作用,所以 RNF43 对 PTEN 蛋白表达水平的影响是否会间接影响 PI3K/AKT 信号通路的活性仍需要继续探究。

综上所述,实验表明,在人胃腺癌细胞 AGS 中,RNF43 蛋白表达增加会使 PTEN 蛋白表达水平升

高,并且 PTEN 是 RNF43 泛素化修饰的底物蛋白。细胞功能实验证实 RNF43 会通过影响 PTEN 的蛋白表达抑制 AGS 肿瘤细胞的增殖、迁移并加速其凋亡。因此,RNF43 不仅可以作为胃癌患者预后指标,同时它可通过调控不同蛋白的表达发挥抑癌作用,是重要的抑癌靶点,具有一定的深入研究价值。

参考文献

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] 董敏,郑桂丽,仲晨. 靶向治疗联合免疫治疗晚期胃癌的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2021, 35(10): 778-81.
- [3] Sun-Wang J L, Yarritu-Gallego A, Ivanova S, et al. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: self-digestion for metabolic health [J]. Trends Endocrinol Metab, 2021, 32(8): 594-608.
- [4] Serra S, Chetty R. Rnf43 [J]. J Clin Pathol, 2018, 71(1): 1-6.
- [5] Pangestu N S, Chueakwon P, Talabnin K, et al. RNF43 overexpression attenuates the Wnt/beta-catenin signaling pathway to suppress tumour progression in cholangiocarcinoma [J]. Oncol Lett, 2021, 22(6): 846.
- [6] Noto J M, Peek J R M. RNF43: a biomarker with potential ramifications for therapeutic intervention in gastric cancer [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(4): 1202-3.
- [7] Adib S, Valojerdi M R, Alikhani M. Dose optimization of PTEN inhibitor, bpV (HOpic), and SCF for the *in-vitro* activation of sheep primordial follicles [J]. Growth Factors, 2019, 37(3-4): 178-89.
- [8] 董敏,郑桂丽,仲晨. 靶向治疗联合免疫治疗晚期胃癌的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2021, 35(10): 778-81.
- [9] Tsukiyama T, Zou J, Kim J, et al. A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4586.
- [10] Neumeyer V, Grandl M, Dietl A, et al. Loss of endogenous RNF43 function enhances proliferation and tumour growth of intestinal and gastric cells [J]. Carcinogenesis, 2019, 40(4): 551-9.
- [11] Du J, Liang Y, Li J, et al. Corrigendum: gastric cancer cell-derived exosomal microRNA-23a promotes angiogenesis by targeting PTEN [J]. Front Oncol, 2021, 11: 797657.
- [12] Xu H, Ju L, Xiong Y, et al. E3 ubiquitin ligase RNF126 affects bladder cancer progression through regulation of PTEN stability [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(3): 239.
- [13] 陈旭,郑玉,彭泉,等. 汉黄芩素经 PTEN/PI3K/AKT 信号通路对乳腺癌细胞增殖的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 363-8.

RNF43 targeted PTEN for ubiquitination inhibited the proliferation and migration of AGS in human gastric cancer cells

Shao Xiao¹, Wei Congwen², Min Min³, Dong Ruihua^{1,4}

(¹Clinical College, The Fifth Medical Center of Chinese People's Liberation Army, Anhui Medical University, Beijing 100071; ²Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071; ³Gastroenterology, Southern District, The Fifth Medical Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100071; ⁴Research Ward, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050)

Abstract Objective To study the new target and molecular mechanism of E3 ubiquitin ligase Ring finger 43 (RNF43) in human gastric adenocarcinoma cell AGS. **Methods** The transfection efficiency of RNF43 in AGS cell was observed by fluorescence microscopy; the potential interaction between RNF43 and endogenic phosphates and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) in cancer cells was analyzed by Western blot; the specific interaction between RNF43 and PTEN and the ubiquitination of PTEN by RNF43 was verified by CO-IP; the apoptosis, proliferation and migration ability of gastric cancer cells was determined by flow cytometry, CCK-8 assay and scratch test. **Results** Cytofluorescence results showed that exogenous RNF43 was successfully overexpressed in AGS cells; RNF43 interacts with PTEN in AGS cells, and RNF43 could ubiquitinate PTEN through K63 ubiquitination and increase the protein of PTEN expression level. The results of cell function experiments showed that RNF43 could accelerate the apoptosis of AGS and inhibit the proliferation and migration of AGS by targeting and regulating the functional level of PTEN. **Conclusion** RNF43 inhibits the proliferation of AGS cell *via* its functionality of ubiquitination towards PTEN.

Key words RNF43; PTEN; AGS; ubiquitination