

# HSPE1-MOB4 在肿瘤细胞中的表达及其新剪接形式的鉴定

刘小艳<sup>1</sup>, 黄浩<sup>1</sup>, 鲁梅芳<sup>2</sup>, 李洪<sup>1</sup>, 吕正梅<sup>1</sup>, 蔡春林<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究热休克蛋白家族成员 1 (HSPE1) 和鼠类人  $\alpha$ -趋化因子类似物 (MOB4) 形成的融合蛋白 HSPE1-MOB4 在不同细胞中的表达。方法 采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测融合蛋白 HSPE1-MOB4 在不同细胞中的表达; Sanger 基因测序探究融合蛋白的不同亚型; 免疫荧光技术和激光共聚焦显微成像检测蛋白表达位置; 免疫印迹法检测融合蛋白 HSPE1-MOB4 在正常细胞及肿瘤细胞中的表达。结果 融合蛋白 HSPE1-MOB4 在正常细胞及肿瘤细胞中均有表达; 基因测序结果显示融合蛋白 HSPE1-MOB4 有两种不同亚型, 且两种亚型的表达位置相同; 相较于正常细胞, 在肿瘤细胞中融合蛋白的表达量更高。结论 融合蛋白 HSPE1-MOB4 有两个亚型, 已报道的亚型在肿瘤细胞中表达量较正常细胞高。这可能为寻找新的肿瘤生物标志物提供新的思路。

**关键词** 融合蛋白 HSPE1-MOB4; Sanger 基因测序; 免疫荧光技术

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-0992-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.002

融合蛋白是由联合基因产生的连读转录蛋白<sup>[1]</sup>。目前, 仅有 34 个融合蛋白被描述<sup>[2]</sup>。近年来, 已在不同的癌症中检测到了此类融合蛋白, 并被推测可能具有致病性<sup>[3]</sup>。热休克蛋白家族成员 1 (heat shock protein family member 1, HSPE1) 是热休克蛋白家族的一员, 可以与线粒体热休克蛋白 60 (heat shock protein family D member 1, HSPD1) “共伴侣”帮助其他蛋白质折叠并驱动有缺陷的蛋白质降解<sup>[4]</sup>。鼠类人  $\alpha$ -趋化因子类似物 (murine human-like alpha-chemokine analog one binder family member 4, MOB4) 为 MOB 家族成员, 可以结合蛋白激酶, 在

细胞内发挥辅助信号转导的作用<sup>[5]</sup>。HSPE1-MOB4 融合蛋白是由相邻基因 HSPE1 和 MOB4 连读形成, 在正常组织中广泛表达。目前, NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/553164>) 收录的融合蛋白 HSPE1-MOB4 的信息中仅见分子量大小 (约 30 ku) 及所对应的一条 mRNA 序列。虽有报道在甲状腺滤泡癌的蛋白组学分析及精神病基因组学联盟的基因集中提及此融合蛋白<sup>[6-7]</sup>, 但均未展开对此融合蛋白的研究。由此该研究对 HSPE1-MOB4 的表达及其融合亚型进行初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 本实验所用细胞系: 人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1、人正常肝细胞 LO-2、人正常卵巢上皮细胞 IOSE-80、人正常肺上皮细胞 HFL-1 (CBP60185)、人胃癌细胞 MGC803、人肝癌细胞 Hep3B (CBP60197)、人卵巢癌上皮细胞 OV90、人肺癌上皮细胞 A549 (CBP60084) 均购自南京科佰生物科技有限公司。

**1.1.2 试剂** DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (以色列 BI 公司); 青霉素/链霉素 (上海碧云天生物技术有限公司); 细胞总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); PCR Master mix (南京诺唯赞生物科技有限公司); DNA 琼脂糖 (西班牙 BIOWESTE 公司); DNA Marker (广东东盛生物科技有限公司); DNA 回收试剂盒 (安徽朵能生物科技有限公司); HSPE1-MOB4、HSPE1-MOB4 鼠抗人多克隆抗体 (武汉三鹰生物科技有限公司); 山羊抗鼠 IgG (美国 Proteintech 公司); 显影液 (美国 MILLIPORE 公司); pCDNA3.1 (+) 载体 (北京质粒载体菌种细胞基因保藏中心); 限制性核酸内切酶 EcoRI、XhoI (上海碧云天生物技术有限公司); 质粒抽提试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 磷酸钙细胞转染试剂盒 (安徽朵能生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞总 RNA 的提取及处理** 使用 Primer

2020-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81572364)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学基础医学院组胚教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup> 黄石市中心医院生殖科, 黄石 435000

作者简介: 刘小艳, 女, 硕士研究生;

李洪, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hong.li@yale.edu

吕正梅, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 523613115@qq.com

3.0 软件设计引物,并送生物公司合成。细胞总 RNA 的提取及逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 严格按照商品说明书实验步骤操作。PCR 扩增,总体系 20  $\mu$ l,以反转录的 cDNA 为模板。程序为:95  $^{\circ}$ C 预热 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环,最后一次延伸 72  $^{\circ}$ C 10 min。融合蛋白 HSPE1-MOB4 所用引物为 H1-M2。具体引物名称及序列见表 1。

表 1 PCR 引物

引物名称	引物序列
H1	ACGAGCTGTACAAGGAATTCATGGCAGGACAAGCGTT
H2	TTAAACTTAAGCTTCTCGAGTCAGTCTACGTACTTTCC
M1	ACGAGCTGTACAAGGAATTCGGGACGGCAGTCTGCTGAGG
M2	TTAAACTTAAGCTTCTCGAGTCATGCTTCACTTTCCCC

1.2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳及凝胶回收 2% 的琼脂糖凝胶,PCR 产物全部上样,电压 90 V。切条带回收,按照试剂盒说明书操作,回收后送测序。

1.2.3 质粒载体的构建 用 EcoRI、XhoI 消化载体及 PCR 回收产物,消化后的载体和片段回收,用回收后的载体和片段配连接体系,连接体系 22  $^{\circ}$ C 2 h 或 16  $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物转化,涂氨苄抗性细菌板。筛选正确细菌克隆,抽提质粒。铺细胞爬片,转染细胞,48 h 后待用。

1.2.4 细胞免疫荧光实验 细胞转染 48 h 后,弃培养基,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,摇床上 PBS 洗 3 遍,每次 15 min,DAPI 用 PBS 和 TritonX-100 所配制的破膜液 1:3 000 稀释,37  $^{\circ}$ C 避光静置 40 min, PBS 避光洗 3 次,每次 15 min,将洗好的爬片放置于载玻片上,加入抗荧光猝灭剂,避光放置,待干燥后加固定液将爬片固定于载玻片上,4  $^{\circ}$ C 备用。

1.2.5 蛋白质免疫印迹实验 培养细胞至满皿,收集细胞,提取总蛋白,煮样;15% 的聚丙烯酰胺凝胶,电压 90 V,进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳,转印至醋酸纤维素膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,HSPE1、MOB4、HSPE1-MOB4 鼠抗人多克隆抗体用 TBST 配置的 1% 牛奶 1:2 000 稀释,4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 洗膜 3 次,每次 20 min。二抗用含 TBST 的 2.5% 牛奶 1:5 000 稀释,室温孵育 2 h,洗膜 3 次,每次 20 min。显影 拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行处理分析,正常组和肿瘤组 HSPE1-MOB4 表达量的比较采用两独立样本的 *t* 检验,实验数据以  $\bar{x} \pm s$

表示。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 融合蛋白 HSPE1-MOB4 有两种融合形式 琼脂糖凝胶电泳显示有 2 条带,分别切胶回收送测序。融合蛋白 HSPE1-MOB4 的大小约为 30 ku,对应的编码区序列长度约为 783 bp,测序结果显示有两种序列。融合部位的两端碱基相同,融合处碱基不同且数量也存在差异,一种碱基数为 61 bp,另一种碱基数为 88 bp,说明这是两种不同的融合形式。融合部位碱基数为 61 bp 所在的序列为 Pubmed 上已公示的序列,且 Pubmed 上仅显示了这一条序列。已公示的融合部位为 HSPE1 的第三个外显子和 MOB4 的第一个外显子,实验中另一种融合部位为 HSPE1 的第一个外显子和 MOB4 的第二个外显子,是一种尚未被报道的融合形式。图 1~6 中已被报道的 HSPE1 和 MOB4 信息均来源于 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)。



图 1 HSPE1、MOB4 的基因位置(绿色箭头为转录方向)

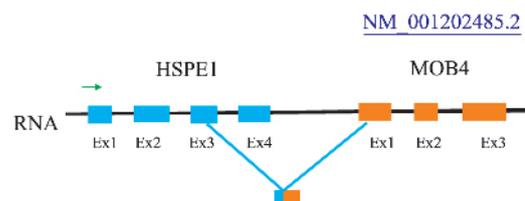


图 2 数据库已收录的 HSPE1 和 MOB4 融合的位置

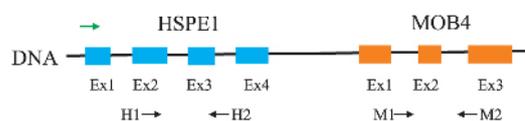


图 3 实验所设计的 HSPE1 及 MOB4 的引物位置及方向

2.2 HSPE1-MOB4 在细胞内的表达位置 细胞爬片免疫荧光实验后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。HSPE1 在细胞质中表达,MOB4 在细胞质中和细胞核内均有表达,融合蛋白 HSPE1-MOB4 在细胞质及细胞核内均有表达。见图 7。

2.3 融合蛋白 HSPE1-MOB4 在细胞中的表达 通过 RT-PCR 和 Western blot 实验对 8 种细胞进行 HSPE1-MOB 表达水平的检测,每种细胞实验重复 4 次。结果显示在所检测的正常细胞和肿瘤细胞中

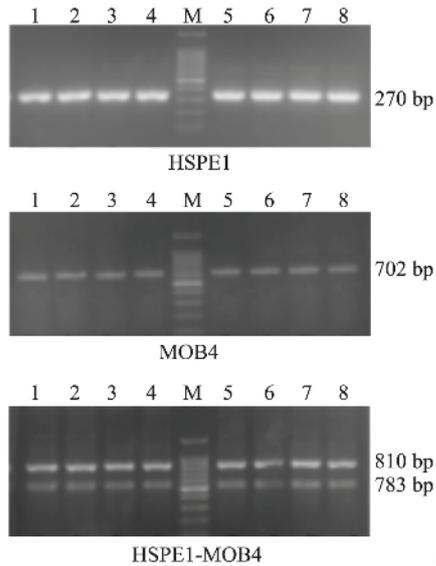


图4 HSPE1、MOB4 及 HSPE1-MOB4 的琼脂糖凝胶电泳图

M: Marker; 1: GES-1; 2: LO-2; 3: IOSE-80; 4: HFL-1; 5: MGC803; 6: Hep3B; 7: OV90; 8: A549

HSPE1、MOB4 均有表达,且表达量未见明显差异,HSPE1-MOB4 在正常细胞和肿瘤细胞中也均有表达。在 mRNA 水平上,肿瘤细胞的表达量均较正常

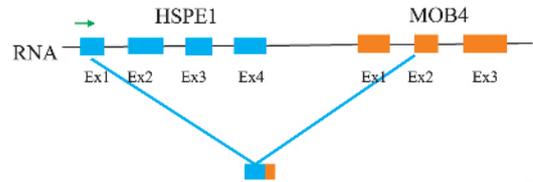


图5 HSPE1 和 MOB4 的另一种融合位置

细胞高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在蛋白质水平上,胃癌细胞中表达量较正常细胞高 ( $t = 5.079, P < 0.01$ ),肝癌细胞中较正常细胞高 ( $t = 4.387, P < 0.01$ ),卵巢癌细胞中较正常细胞高 ( $t = 4.630, P < 0.01$ ),肺癌细胞中较正常细胞高 ( $t = 5.079, P < 0.01$ )。见图8。

### 3 讨论

真核生物转录是一个高度复杂的过程,基因组的重叠和其他复杂转录本正逐渐被意识到<sup>[1]</sup>,如通读转录,连接或共转录的基因。融合蛋白是由两个原本独立的基因转录连读产生的,这种新形成的蛋白一般具有新的特性,如新的细胞定位和新的生物功能<sup>[8]</sup>。

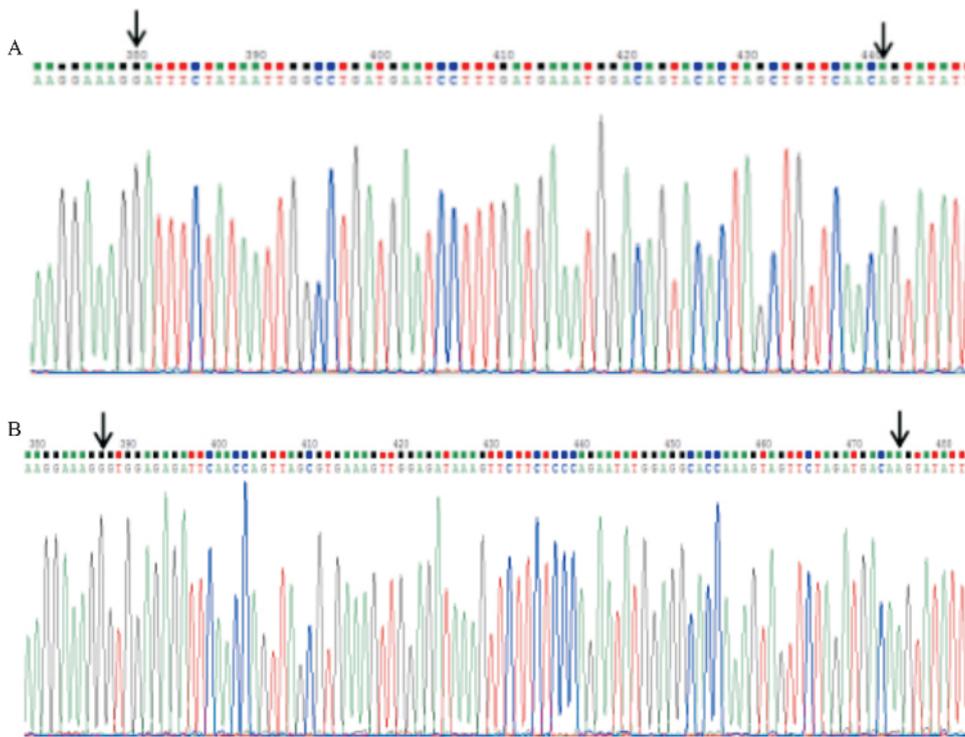


图6 DNA 测序峰图

A: 对应序列 (NCBI 已收录,红色为融合部位): AAGGAAAGGATTCTATAATFGGCCTGATGAATCCTTTGATGAAATGGACAGTACACTAGCT GTTCAACAGTATATT; B: 对应序列 (NCBI 未收录,红色为融合部位): AAGGAAAGGCTGGAGAGATTCAACCAGTTAGCGTGAAAGTTGGAGATA AAGTCTTCTCCAGAATATGGAGGCCACAAAGTAGTTCTAGATGACAAGTATATT; HSPE1-MOB4 有新的亚型; 黑色箭头为融合部位,对应红色序列部分

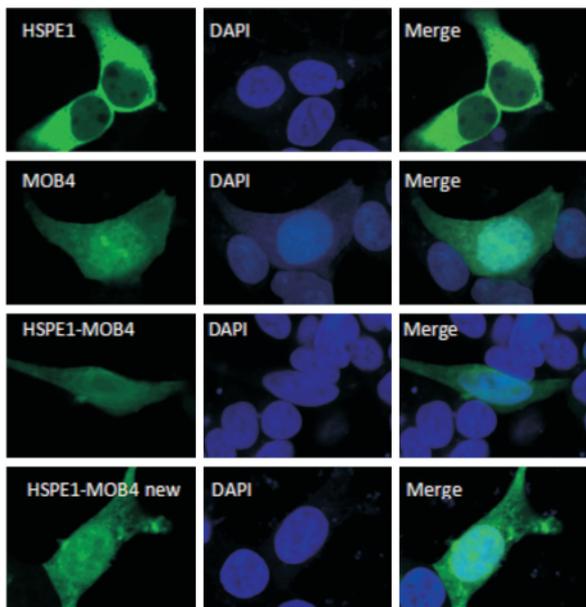


图7 HSPE1、MOB4 及融合蛋白 HSPE1-MOB4 两种融合亚型在细胞内的表达 ×40( oil)

HSPE1 又称 HSP10, 主要表达于线粒体中, 近年来, 超出“伴侣”的作用逐渐被报道, 如参与免疫调节、细胞增殖分化<sup>[9]</sup>及癌变过程<sup>[10]</sup>。MOB4 是没有任何已知酶活性的球状支架蛋白, 在真核生物界中高度保守。有文献<sup>[11]</sup>报道 MOB4 可通过丝、苏氨酸激酶 38 抑癌激酶激酶家族成员的调控作用而具有多种与癌症相关的细胞功能。HSPE1-MOB4 是由同位于 2 号染色体 33.1 区域的转录方向相同的两基因转录嵌合后翻译而成的天然融合蛋白。目前, 已被报道的具有功能和可用性的天然融合蛋白的数量很少, 而其中的大多数和肿瘤有相关性<sup>[12]</sup>。

HSPE1 和 MOB4 被报道和肿瘤相关, 天然融合蛋白可能与肿瘤有关, 由此推测 HSPE1-MOB4 可能也与肿瘤有关。

本研究在转录和翻译水平检测到融合蛋白 HSPE1-MOB4 在肿瘤细胞中的表达量较对照组的正常细胞高。而在肿瘤细胞中有较高表达的蛋白往往具有成为肿瘤标记的潜力。融合蛋白是一种特殊转录形式的产物, 两蛋白经常(95%)被独立翻译, 在某些情况下, 才会连读翻译<sup>[1]</sup>, 且已检测到的大多融合蛋白有组织特异性, 提示这种形式的蛋白可能有其内在的意义, 这一理论及研究结果均支持融合蛋白 HSPE1-MOB4 与肿瘤相关的猜想。测序发现的 NCBI 数据库目前尚未收录的新的融合亚型在正常细胞和肿瘤细胞中均有表达, 且与已知亚型的表达位置相同, 与单独的 HSPE1 和 MOB4 相比较, HSPE1 和 MOB4 蛋白的融合未出现新的蛋白质定位, 可能其特性是通过功能体现而不是定位。在生物进化的过程中每种成分都有其存在的功能和价值, 且已发现的融合蛋白数量较少, 故 HSPE1-MOB4 融合蛋白这种新的融合亚型可能也有其特殊的作用和意义。在有机体内, 不仅翻译的产物蛋白质可以发挥相应的病理生理作用, 转录的产物 RNA 也可以参与调节病理生理过程。连读转录本这种特别的存在对于生物体而言可能有其独特的意义。目前, 已有报道称在癌细胞中产生的连读转录本可能和肿瘤有关, 而在正常细胞中存在的通读转录本可能和细胞应激有关<sup>[8]</sup>。尚有文献报道在肿瘤中检测到连读转录本, 如乳腺癌、前列腺癌和胃癌, 有实验表明

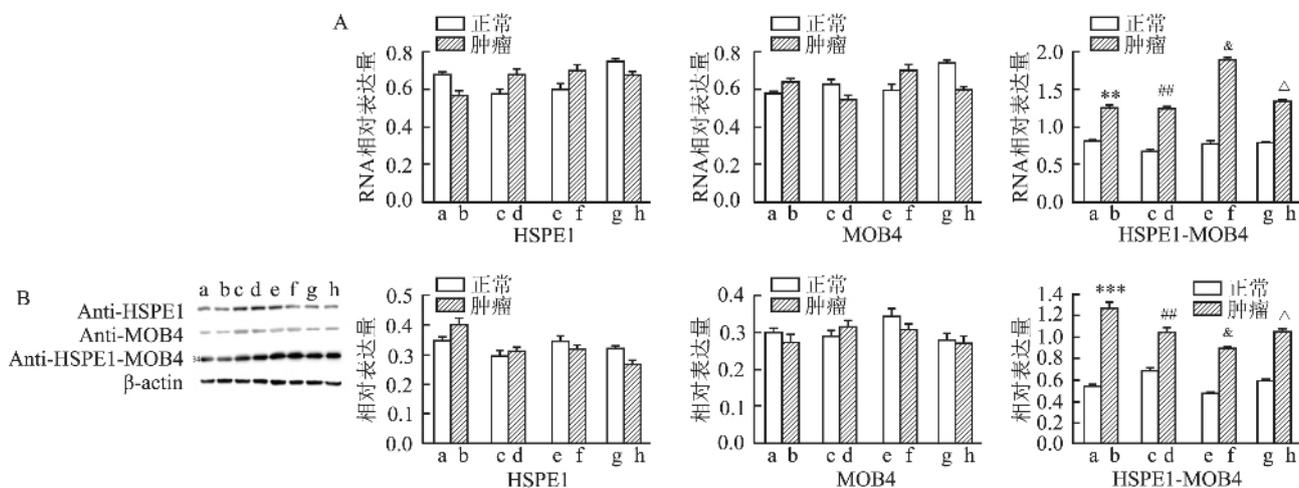


图8 HSPE1、MOB4 及融合蛋白 HSPE1-MOB4 在肿瘤细胞中的表达

A: RNA 水平的相对表达量; B: 蛋白质水平的相对表达量; a: GES-1; b: MGC803 c: LO-2 d: Hep3B e: IOSE-80; f: OV90; g: HFL-1 h: A549; 与 a 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 c 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 e 组比较: &  $P < 0.05$ ; 与 g 组比较: △  $P < 0.05$

在肿瘤细胞系中沉默转录本可以减少癌细胞的增殖<sup>[13-15]</sup> 这提示癌组织中的连读转录本可能具有致瘤性。HSPE1 和 MOB4 的连读转录本在肿瘤细胞中表达量较正常细胞高,也可能提示此连读转录本与肿瘤间关系的潜在性,也可能是其发挥作用的一种形式。综上所述,融合蛋白 HSPE1-MOB4 有新的融合亚型,在 RNA 水平和蛋白水平的表达增高可能与肿瘤相关。

### 参考文献

- [1] Helen Pearson. What is a gene[J]. *Nature* 2006 ,441( 7092) : 398-401
- [2] Prakash T , Sharma V K. Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes [J]. *PLoS One* , 2010 ,5 ( 10) : e13284.
- [3] Johannessen L E , Panagopoulos I. Upregulation of INS-IGF2 read-through expression and identification of a novel INS-IGF2 splice variant in insulinomas[J]. *Oncol Rep* 2016 ,36 ( 5) : 2653 - 62.
- [4] Macario A J L , De Macario E C. Sick chaperones , cellular stress , and disease[J]. *N Engl J Med* 2005 ,353 ( 14) : 1489 - 501.
- [5] Gundogdu R , Hergovich A. MOB ( Mps one Binder) proteins in the hippo pathway and cancer[J]. *Cells* 2019 ,8( 6) : e569.
- [6] Lai X , Umbricht C B , Fisher K et al. Identification of novel biomarker and therapeutic target candidates for diagnosis and treatment of follicular carcinoma [J]. *J Proteomics* ,2017 ,166: 59 - 67.
- [7] Birnbaum R , Jaffe A E , Chen Q ,et al. Investigation of the prenatal expression patterns of 108 schizophrenia-associated genetic loci [J]. *Biol Psychiatry* 2015 ,77( 11) : e43 - 51.
- [8] Frenkel-Morgenstern M , Valencia A. Novel domain combinations in proteins encoded by chimeric transcripts [J]. *Bioinformatics* , 2012 ,28 ( 12) : i67 - 74.
- [9] Jia H , Halilou A I. Heat shock protein 10 ( Hsp10) in immune-related diseases: one coin ,two sides [J]. *Int J Biochem Mol Biol* , 2011 ,2 ( 1) : 47 - 57.
- [10] Rappa F , Pitruzzella A. Quantitative patterns of Hsps in tubular adenoma compared with normal and tumor tissues reveal the value of Hsp10 and Hsp60 in early diagnosis of large bowel cancer [J]. *Cell Stress Chaperones* 2016 ,21 ( 5) : 927 - 33.
- [11] Kohler R S , Schmitz D. Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases [J]. *Mol Cell Biol* 2015 ,30 ( 18) : 4507 - 20.
- [12] Zhang H , Lin W. Aberrant chimeric RNA GOLM1-MAK10 encoding a secreted fusion protein as a molecular signature for human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget* 2013 ,4( 11) : 2135 - 43.
- [13] Varley K E , Gertz J. Recurrent read-through fusion transcripts in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat* ,2014 ,146 ( 2) : 287 - 97.
- [14] Nacu S , Yuan W. Deep RNA sequencing analysis of readthrough gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples [J]. *BMC Med Genomics* 2011 ,4: 11.
- [15] Kim H , Cho G. Novel fusion transcripts in human gastric cancer revealed by transcriptome analysis [J]. *Oncogene* ,2014 , 33 ( 47) : 5434 - 41.

## The expression of HSPE1-MOB4 in tumor cells and identification of a novel splicing form

Liu Xiaoyan<sup>1</sup> , Huang Hao<sup>1</sup> , Lu Meifang<sup>2</sup> et al

(<sup>1</sup>Dept of Histology and Embryology , School of Basic Medical Sciences , Anhui Medical University , Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Reproductive Medicine , Huangshi Central Hospital , Huangshi 435000)

**Abstract Objective** To investigate the expression of fusion protein HSPE1-MOB4 in heat shock protein family member 1 ( HSPE1) and murine human-like alpha-chemokine analog1 ( MOB4) in different cells. **Methods** Reverse transcription polymerase-chain reaction ( RT-PCR) was used to detect the expression of fusion protein HSPE1-MOB4 in different cells. Sanger gene sequencing was used to explore different subtypes of fusion protein. Protein position in cells was detected by immunofluorescence technique and laser confocal microscopy. The expression of fusion protein HSPE1-MOB4 in normal cells and tumor cells was detected by immunoblotting. **Results** The fusion protein HSPE1-MOB4 was expressed in normal cells and tumor cells. The results of gene sequencing showed that the fusion protein HSPE1-MOB4 had two different subtypes , and the expression positions of the two subtypes were the same. Compared with normal cells , the amount of fusion protein expressed in tumor cells was higher. **Conclusion** The fusion protein HSPE1-MOB4 has two subtypes and the reported one is highly expressed in tumor cells. This may provide new ideas for finding new tumor biomarkers.

**Key words** fusion protein HSPE1-MOB4; Sanger gene sequencing; immunofluorescence