

STAT1 与 CD74/CD44 在结肠癌细胞中协同调控 上皮-间质转化机制研究^{*}

武汉市第四医院 刘峰 王建祥 周锐 王平^{*}, 武汉 430033

摘要 目的:研究信号转导和转录激活子 1(STAT1)与 CD74/CD44 在结肠癌细胞上皮-间质转化调控中的相互作用关系。方法:构建基因 STAT1 和 CD74/CD44 真核表达质粒以及上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子荧光素酶报告基因表达质粒,真核表达质粒经转染后,利用免疫共沉淀技术探讨基因 STAT1 和 CD74/CD44 的相互作用,通过荧光素酶分析技术分析基因 STAT1 和 CD74/CD44 对上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子是否存在协同激活作用。结果:STAT1 可将 CD74/CD44 沉淀下来,CD74/CD44 可将 STAT1 沉淀下来,上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子荧光表达质粒与两者共转染比单独转染 STAT1 或 CD74/CD44 对上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子的激活作用更强。结论:STAT1 和 CD74/CD44 之间具有相互作用,在结肠癌发生及发展过程中起着重要的协同作用。

关键词 上皮-间质转化调控; STAT1; CD74/CD44; 结肠癌; 相互作用

中图分类号 R735.3⁺5 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20180324

信号转导子和转录激活子 1(STAT1)是一种重要的核转录因子,STAT1 广泛参与调控细胞发生、发展、分化和凋亡过程^[1,2]。CD74 在免疫细胞中,可以特异性地与细胞因子 MIF 结合,并在 CD44 的共刺激下,激活胞内 ERK1/2 的磷酸化,进而由 MAPK 通路调控多种转录因子的表达,且 CD74/CD44 共刺激信号可能与 STAT1 之间可能有循环正反馈的双向调控机制^[3]。本文分析两者对上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子协同作用,报道如下。

材料与方法

试剂 荧光素酶活性分析试剂盒、pCMV-Myc 载体和 pCMV-HA 载体,均购自上海硕盟生物;pTal-luc-DDR2 载体,购自上海碧云天生物;Myc 的多克隆抗体和抗 HA-tag 抗体,购自美国 GIBCO 公司;HRP 耦联的羊抗鼠 IgG 单克隆抗体,HRP 耦联的羊抗兔 IgG、抗 HA、抗 Myc 的单克隆抗体,购自武汉博士德公司;Lipofectamine 2000 转染试剂盒,购自美国 Santa Cruz 公司;免疫化学发光显影试剂盒,购自美国 Clontech 公司。

仪器 新生小牛血清、凝胶成像系统,购自美国 Sigma 公司;蛋白质-A/G 偶联 Sepharose 蛋白质分子量标准,购自美国 Santa Cruz 公司;LSLS-B50L 立式圆形压力蒸汽灭菌锅,购自美国 Tuttnauer 公司。全能型高性能台式冷冻离心机(Haeaus, Biofuge Stratos 德国),紫外分光光度计(Tuttnauer, 2540MK 美国);

荧光分析仪(SCW-HS-840 型,OLYMPUS,日本)。

细胞培养与传代^[4] 结肠癌细胞(中国科学院细胞库)培养于含 10% 胎牛血清及双抗的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 孵箱中传代培养。当细胞密度达到 4 × 10⁶ 以上的时候进行传代,清洗培养基后,用含 0.02% EDTA 的胰蛋白酶进行细胞消化,倒置显微镜观察细胞回缩即终止消化,加入同体积的血清培养基,吹打,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,取细胞悬液,计数后接种到新的培养瓶中。

细胞转染^[5] 当细胞达到 90% 融合的时候进行转染, pCMV-Myc-STAT1、pCMV-HA-STAT1、pCMV-Myc-CD74/CD44、pCMV-HA-CD74/CD44 分别转染结肠癌细胞,用不含抗生素的无血清 DMEM 250 μL 稀释混合 DNA 10 μg,孵育 5 min,再用不含抗生素无血清 DMEM 240 μL 稀释 Lipofectamine 2000 转染试剂 10 μL,孵育 5 min,以上两者混合后室温孵育 20 min,并将六孔板的培养基换成无抗生素无血清的 DMEM,加入转染的混合液,混合均匀之后置入培养箱当中,培养 6 h 之后弃去培养基,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 继续进行培养。

免疫共沉淀^[6] 将转染 48 h 之后的细胞弃去培养基,在冰上进行操作,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗并刮下细胞,弃掉上清之后加入 RIPA 裂解液 100 μL,细胞在 -70℃ 环境下冷冻 15 min,并在 37℃ 快速进行溶解,重复 2 次,在 4℃ 的细胞裂解液环境下进行离心,将 pCMV-HA-STAT1、pCMV-Myc-CD74/CD44 转染到细胞当中,裂解收集细胞,血清沉淀多克隆抗体及细胞裂解液,用 HA 的单克隆抗

^{*}基金项目:武汉市卫计委课题(No:WX14C60)

^{*}通信作者:王平, E-mail:fy.kid@hotmail.com

体进行检测,对照 Myc-与 HA-反应 2 h,加入蛋白质-A/G 耦连珠子反应 6 h 之后,使用 RIPA 洗涤 3 次以后加入聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液 20 μ L $\times$ 2,煮沸 5 min 之后,进行电泳,用 Western 杂交的方法对蛋白质进行转膜,经过抗 Myc 的多克隆抗体沉淀细胞裂解液可以检测到相关条带,多克隆抗体与抗 HA 及抗 Myc 抗体相互作用确定蛋白的作用关系。

启动子荧光素酶报告基因分析^[7] 当细胞达到 90% 融合的时候进行转染,将质粒 DNA 用 Lipofectamine 2 000 转染试剂进行转染,收集和裂解细胞,PBS 漂洗之后加入 RIPA,反复冻融之后使细胞裂解,取上清进行 β 半乳糖苷酶分析,用紫外分光光度计计算 420 nm 的吸光度,根据吸光度的数值进行定量分析,确定细胞提取液的浓度,再将每管样品放入荧光分析仪中测量荧光的强度。

观察指标 检测 STAT1 和 CD74/CD44 是否存在共沉淀现象,不同抗体的 pCMV-Myc-STAT1、pCMV-HA-STAT1、pCMV-Myc-CD74/CD44、pCMV-HA-CD74/CD44 分组转染后,比较单独转染与共转染对上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子活性的影响。

统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件,遵循正态分布且方差齐性,两两比较用 LSD 检验。非参数检验法对各组转染的荧光强度进行比较,应用 Kruskal-wallis H 检验进行多组间数据的比较,应用 Mann-whitney U 检验法进行两两数据之间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

CD74/CD44 沉淀 STAT1 的相互作用分析 以 β -actin 作为内参,CD74/CD44 具有沉淀 STAT1 的作用,见图 1。

STAT1 沉淀 CD74/CD44 的相互作用分析 以 β -actin 作为内参,STAT1 具有沉淀 CD74/CD44 的作用,见图 2。

荧光素酶报告基因检测 共转染 pCMV-HA-STAT1 及 pCMV-Myc-CD74/CD44 组与空转染组间差异有统计学意义,见表 1。

表 1 各组 A420 nm 值及荧光强度比较

组别	A420nm	定量(μ L)	荧光强度
pCMV-Myc-STAT1	0.586	16.9	164.6 $\pm$ 16.3
pCMV-HA-STAT1	0.634	16.2	169.7 $\pm$ 21.6 *
pCMV-Myc -CD74/CD44	0.562	17.5	351.2 $\pm$ 28.9 *
pCMV-HA-CD74/CD44	0.513	19.6	213.8 $\pm$ 20.5 *

注:与 pCMV-Myc-STAT1 组比较, * $P < 0.05$

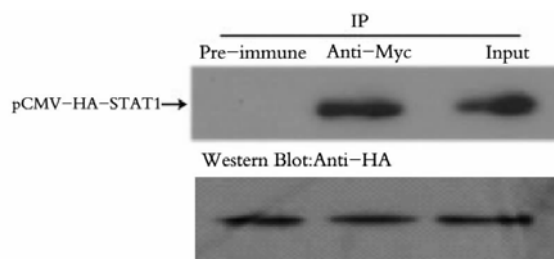


图 1 CD74/CD44 沉淀 STAT1 的相互作用

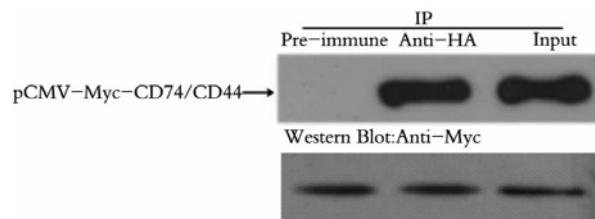


图 2 STAT1 沉淀 CD74/CD44 的相互作用

讨 论

对结肠癌相关的基因表达的研究,可以阐明结肠癌 STAT1 是一种重要的核转录因子^[8]。STAT1 可以在细胞受到外界信号刺激下激活,并直接入核,激活相应的靶基因的转录。STAT1 由 750 个氨基酸组成,其分子量约为 91kDa,可分为 6 个结构域:N 端保守序列,螺旋区、DNA 结合域、链接区、SH2 结构域及 C 端转录活性域。其 DNA 结合域可识别的 DNA 序列碱基数较短,因此可以激活多个靶基因的表达。已有研究证明 STAT1 参与调控细胞发生、发展、分化和凋亡相关的功能性基因及细胞因子基因的表达。STAT1 在原发性肝细胞癌、肺癌和乳腺癌等恶性肿瘤细胞中均存在异常表达的情况。其下游的信号通路对肿瘤的发生、发展及转移亦起到了重要的作用。

CD74 是一类分子表面标志物,是 HLA II 复合物的 γ 亚基,CD74 在乳癌、肝癌及白血病细胞等多种肿瘤细胞表面表达^[9]。CD74 在免疫细胞中,可以特异性地与细胞因子 MIF 结合,并在 CD44 的共刺激下,激活胞内 ERK1/2 的磷酸化,进而由 MAPK 通路调控多种转录因子的表达。既往有研究证实,MAPK 信号通路是 STAT 家族多种分子基因表达的调控信号通路;而 CD74/CD44 共刺激信号可能与 STAT1 存在循环正反馈的双向调控机制;CD74 与 STAT1 的表达存在一定的相关性。STAT1 具有能升高细胞周期蛋白 D1 水平,具有促细胞增殖功能的作用,从而进一步促进肿瘤的侵袭和生长迁移;CD74/CD44 还可上调血管内皮生长因子的表达,促进肿瘤血管生成间接刺激肿瘤生长和转移^[10]。因

此,STAT1 与 CD74/CD44 对肿瘤的发生和发展是多方面多层次影响的,其主要通过自身分泌、相关受体、胞内相关因子等环节影响肿瘤细胞的迁移和粘附以及凋亡和分化能力,进而影响肿瘤的发生发展以及侵袭和转移。

本研究显示,STAT1 与 CD74/CD44 在细胞内存在相互作用。荧光素酶报告基因检测结果显示,上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子荧光表达质粒与 CD74/CD44 和 STAT1 共转染对上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)启动子的激活作用更强,同时也促进了上皮-间质转化酪氨酸激酶受体-2(DDR2)的表达。STAT1 与 CD74/CD44 的相互作用是否通过直接结合发挥协同作用尚不明确,仍需进一步探究。

STAT1 和 CD74/CD44 两者之间存在着相互的协调作用关系,为今后的肿瘤机制研究提供了一定的参考,为进一步对结肠癌的诊疗提供依据。

参考文献

- 1 Afonja O, Juste D, Das S, et al. Induction of STAT1 CD74/CD44 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in

- apoptosis[J]. *Oncogene*, 2014, 23(49):8135-8145.
 - 2 Loh PG, Yang HS, Walsh MA, et al. Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor STAT1 with CD74/CD44[J]. *Embo J*, 2009, 28(3):274-285.
 - 3 Chang JH, Cho YH, Sohn SY, et al. Crystal structure of the eIF4A-STAT1 with CD74/CD44 complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9):3148-3153.
 - 4 葛仁英, 杨颖乔. 白藜芦醇的小分子类似物 RSVA314 对白血病 K562 细胞迁移和增殖的影响[J]. *内科急危重症杂志*, 2017, 23(3):252-253.
 - 5 马刚, 刘江, 张浩, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在胃癌组织中的表达及临床病理学意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(7):481-484.
 - 6 Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3):836-845.
 - 7 Xu H, Cheng IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15):6275-6281.
 - 8 Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(40):15805-15810.
 - 9 Yang J, Eckert MA. Targeting invadopodia to block breast cancer metastasis[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7):562-568.
 - 10 Pinho AV, Rooman I, Real FX. p53-dependent regulation of growth, epithelial mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(8):1312-1321.
- (2017-09-13 收稿 2018-04-09 修回)

(上接第 225 页)

参考文献

- 1 Nehal M Elsherbiny, Mohammed M H Al-Gayyar, The Role of IL-18 in Type 1 Diabetic Nephropathy: The problem and future treatment[J], *Cytokine*, 2016, 19(4):1874-1883.
- 2 Liqun Ma, Rongguo Fu, Zhaoyang Duan, et al, Sirt1 is essential for resveratrol enhancement of hypoxia-induced autophagy in the type 2 diabetic nephropathy rat[J], *Pathology - Research and Practice*, 2016, 6(2):864-872.
- 3 Yanli Cheng, Jingjing Zhang, Weiying Guo, et al, Up-regulation of Nrf2 is involved in FGF21-mediated fenofibrate protection against type 1 diabetic nephropathy[J], *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 21(1):93-104.
- 4 Min Wang, Suyu Wang, Di Yao, et al, A novel long non-coding RNA CYP4B1-PS1-001 regulates proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy[J], *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 7(2):365-372.
- 5 Yaeni Kim, Cheol Whee Park. AMP-Activated protein kinase in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Research and Clinical Practice*, 2016, 26(3):487-495.
- 6 Xin Qian, Xinghui Li, Fenfen Ma, et al, Novel hydrogen sulfide-releasing compound, S-propargyl-cysteine, prevents STZ-induced diabetic nephropathy[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 14(1):395-403.
- 7 Samar M, Said, Samih H, et al, Silent diabetic nephropathy[J], *Kidney International*, 2016, 11(3):742-749.

- 8 Snehal Nitin Mestry, Jayesh Bachu Dhodi, Sangita Balbhini Kumbhar, et al, Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by Punica granatum Linn, leaves extract[J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2016, 19(1):736-742.
 - 9 Onur Elmas, Oytun Erbas, Gurkan Yigiturk. The efficacy of aesculus hippocastanum seeds on diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J], *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 5(3):147-154.
 - 10 Julie Klein, Adela Ramirez-Torres, Anette Ericsson, et al, Urinary peptidomics provides a non-invasive humanized readout of diabetic nephropathy in mice[J], *Kidney International*, 2016, 18(3):1643-1654.
 - 11 Wenjuan Liu, Yeping Yang, Yemei Liu, et al. Exogenous kallikrein protects against diabetic nephropathy[J]. *Kidney International*, 2016, 38(2):1765-1773.
 - 12 Marjolein Garsen, Angelique LWMM, Rops, et al, Cathepsin L is crucial for the development of early experimental diabetic nephropathy[J], *Kidney International*, 2016.
 - 13 Djamila Aroune, Farid Libdiri, Sophie Leboucher, et al. Changes in the NFkB and E-cadherin expression are associated to diabetic nephropathy in Psammomys obesus[J], *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 8(2):1462-1471.
 - 14 Mohamed MA, Hussein, Mohamed K, Mahfouz. Effect of resveratrol and rosuvastatin on experimental diabetic nephropathy in rats[J], *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 17(3):275-284.
- (2016-10-31 收稿 2018-06-18 修回)