

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.05.004

泛素连接酶 Nedd4 调控人前列腺癌细胞的增殖与凋亡

周 洁, 李玉银, 赵昌彩, 刁爱坡
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了研究泛素连接酶 Nedd4 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响, 利用小 RNA 干扰技术, 通过慢病毒包装, 侵染前列腺癌细胞 DU145, 达到下调 Nedd4 表达的目的. MTT 检测表明, 下调 Nedd4 表达可以抑制 DU145 细胞的增殖; DAPI 染色发现, 下调 Nedd4 表达的 DU145 细胞对星形孢菌素诱导的细胞凋亡更加敏感. 这些结果都说明, 下调 Nedd4 的表达不仅可以抑制 DU145 肿瘤细胞增殖, 而且可以促进细胞凋亡.

关键词: Nedd4; 前列腺癌细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R737.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)05-0015-05

Effects of Ubiquitin Ligase Nedd4 on Human Prostate Cancer Cell Proliferation and Apoptosis

ZHOU Jie, LI Yuyin, ZHAO Changcai, DIAO Aipo
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To study the effects of Nedd4 on tumor cell proliferation and apoptosis, Nedd4 was depleted in prostate cancer cell DU145 by infecting the lentiviruses expression of Nedd4-shRNAs. MTT assay showed that that depletion of Nedd4 decreased DU145 cell proliferation. DAPI staining indicated that knockdown of Nedd4 resulted in greater sensitivity to staurosporine-induced apoptosis of DU145 cells. These results revealed that the down-regulation of Nedd4 expression not only reduced the cell proliferation but also induced the apoptosis of DU145 cells.

Key words: Nedd4; prostate cancer cell; cell proliferation; cell apoptosis

泛素连接酶和肿瘤的发生、发展以及转移密切相关^[1]. 在哺乳动物中, 被鉴定的泛素连接酶有 600 多种. 泛素连接酶主要分两大类: RING 家族和 HECT 家族. HECT 家族由 28 种蛋白组成, 基于结构的不同, HECT 泛素连接酶家族成员多数分属于两个亚家族: Nedd4 家族和 HERC 家族^[2].

Nedd4 家族包括 9 个成员: Nedd4-1、Nedd4-2 (Nedd4L)、ITCH、Smurf1、Smurf2、WWP1、WWP2、NEDL1、NEDL2. 这 9 个成员具有相似的结构, 这些结构包括一个 N 端的 C2 结构域, 中间有 2~4 个 WW 结构域, C 端的与 E6AP (E6 associated protein)^[3] 同源的 COOH 端^[4]. Nedd4 家族泛素连接酶在癌症发生过程中起着重要作用.

在研究基因功能方面, RNA 干扰 (RNA interfer-

ence, RNAi) 技术得到广泛应用. RNAi 是一种普遍的转录后基因沉默机制, 由 Fire 等^[5]于 1998 年发现. 目前, 主要通过两条途径来实现 RNAi: 第一, 通过转染短链干扰 RNA (short interfering RNAs, siRNA), 实现目的基因沉默; 第二, 利用表达载体和逆转录病毒进行短链发夹 RNA (short hairpin RNAs, shRNA) 的转录, 完成目的基因表达的降低^[6-8].

无论是转染 siRNA 还是 shRNA 的转录, 在体内实验和活体实验中^[9], RNAi 的作用都可能出现被抑制的现象. Rubinson 等^[10]利用 shRNA 慢病毒系统实现了在哺乳动物细胞、干细胞、受精卵及已分化的后代细胞中干扰目的基因表达. shRNA 慢病毒系统进行的基因沉默具有高特异性、高稳定性的优点, 并且能够在多种细胞及转基因小鼠中实现基因沉默. 慢

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-03-31

基金项目: 天津市自然科学基金重点资助项目 (10JCZDJC16800); 国家自然科学基金资助项目 (31071181)

作者简介: 周 洁 (1987—), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生; 通信作者: 刁爱坡, 教授, diaoaiipo@tust.edu.cn.

病毒载体能够快速有效地实现基因沉默, 这为基因治疗提供了一种新方法。

李季林等^[1]通过瞬时转染 shRNA 干扰 Nedd4-1 表达, 证明 Nedd4-1 促进胶质瘤细胞的增殖并且影响细胞凋亡。本研究利用慢病毒载体, 稳定下调人前列腺癌细胞 DU145 中 Nedd4 的表达, 构建稳定细胞系, 探讨 Nedd4 对人前列腺癌细胞增殖及细胞凋亡的调控作用, 试图揭示 Nedd4 在前列腺癌中的功能, 探索治疗前列腺癌的新靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人前列腺癌细胞 DU145、人胚肾上皮细胞系 HEK293T, 本实验室保藏。Lipofectamine 2000 转染试剂, Invitrogen 公司; 高糖 DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清、Penicilin and Streptomycin、L-Glutamic, Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、DMSO, Solarbio 公司; Nedd4 抗体、 β -actin 单克隆抗体、干扰质粒载体 pLKO.1-Nedd4 shRNA 及阴性对照载体 pLKO.1-scramble、MISSION Lentiviral Packaging Mix 慢病毒包装试剂盒, Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 干扰载体慢病毒包装及检测

根据 shRNA 设计原则, 在 Sigma 公司共购得 5 个 Nedd4 shRNA 目的序列, 分别为:

①TRCN0000272424: CCGGCGGTTGGAGAATG TAGCAATACTCGAGTATTGCTACATTCTCCAA CCGTTTTTC; ②TRCN0000272425: CCGGAGTGC TACTCGCAGCTATTTACTCGAGTAAATAGCTGCG AGTAGCACTTTTTTC; ③TRCN0000272476: CCGG GCTGAAC TATACGGTTCAAATCTCGAGATTTGAA CCGTATAGTTCAGCTTTTTTC; ④TRCN000027 2477: CCGGTACGTGAGAGTGACGTTATATCTCGA GATATAACGTC ACTCTCACGTATTTTTTC; ⑤TRCN 0000284755: CCGGCCGGAGAATTATGGGTGTC AA CTCGAGTTGACACCCATAATTCTCCGGTTTTTC。

利用 HEK293T 细胞, 参照 Sigma 公司 MISSION Lentiviral Packaging Mix 说明书进行慢病毒包装, 同时包装阴性对照组 scramble。收集慢病毒, 感染 DU145 细胞, Western blot 检测 Nedd4 蛋白表达情况。

1.2.2 下调 Nedd4 表达的 DU145 稳定细胞系的建立

DU145 细胞接种于直径为 10 cm 的培养皿, 等细胞铺展度达到 60%~70%, 用 500 μ L 慢病毒收集

液感染细胞。阴性对照组用 scramble 慢病毒收集液感染 DU145 细胞。24 h 后更换含 0.5 μ g/mL 嘌呤霉素的新鲜培养基进行筛选。此后, 待单克隆长至肉眼可见, 挑起, 转移至新的平板继续培养, 然后收集细胞, 检测稳转细胞系是否建立成功。

1.2.3 免疫印迹检测 Nedd4 蛋白表达

收集慢病毒感染后及阴性对照组 DU145 细胞, 离心弃上清液后, 加入 50 μ L 强 RIPA 细胞裂解液, 于冰浴中裂解 20 min, 然后于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min。离心后弃沉淀, 取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕, 利用半干转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用质量分数为 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 于 4 $^{\circ}$ C 下进行一抗孵育过夜。然后用体积分数为 0.02% 的 Tween 20 的 PBS 缓冲液 (PBST) 漂洗 PVDF 膜 3~5 次, 每次 5 min。洗完后于室温下二抗避光孵育 1 h。PBST 漂洗 3~5 次, 每次 5 min。洗完后, 用 Odyssey 红外激光成像系统成像, 以 β -actin 作对照。

1.2.4 MTT 检测干扰 Nedd4 表达对 DU145 细胞增殖的影响

实验设置阴性对照组与 Nedd4 shRNA 实验组, 实验组取干扰 Nedd4 表达的 DU145 稳定细胞系, 每组设 3 个复孔。96 孔板每孔 5×10^3 个细胞, 用 MTT 法分别于 48、72、96 h 用酶标仪测定波长 570 nm 处吸光度 (A) 以反映细胞增殖状况。

1.2.5 DAPI 染色检测下调 Nedd4 表达对 DU145 细胞凋亡的影响

取干扰 Nedd4 表达的稳定细胞系与阴性对照 scramble 细胞, 接种细胞于盖玻片上, 用 1.5 μ mol/L 星形孢菌素分别处理 24、48 h; 处理完毕后, 取出盖玻片, 用 PBS 溶液洗 2 遍; 用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 5 min, 再用 PBS 洗 2 次; 用体积分数为 0.2% 的 Triton X-100 处理 10 min, 处理完毕后用 PBS 洗 2 次, 再用质量分数为 3% 的 BSA 封闭 30 min; 封闭完成后, 用 DAPI 染细胞核, 室温闭光静置 30 min 后, 用 PBS 洗 3 次, 最后用封片剂封片, 在荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 shRNA 干扰载体的慢病毒包装及检测

为了检测不同序列 shRNA 下调 Nedd4 蛋白表达的效果, 对 shRNA 干扰载体进行慢病毒包装并感染 DU145 细胞, 免疫印迹检测 DU145 细胞内 Nedd4 蛋白表达, 结果如图 1 所示。

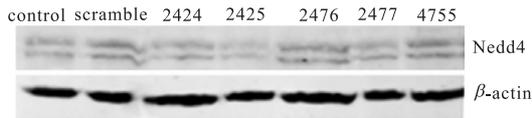


图1 不同序列 shRNA 下调 Nedd4 蛋白表达效果

Fig. 1 Interference of Nedd4 expression by different sequence shRNA

图1中 control 为空白对照, 不含慢病毒; scramble 为阴性对照, 是以含非靶基因 shRNA 的 pLKO.1 载体进行慢病毒包装所得; 2424、2425、2476、2477、4755 为 Nedd4 靶基因 shRNA 的 pLKO.1 载体进行慢病毒包装所得. 如图1所示, 序列 2425 慢病毒收集液对细胞内 Nedd4 蛋白表达干扰效果最好, 序列 2424 和 2477 干扰效果次之, 序列 2476 和 4755 干扰效果最差. 所以选用序列 2425 慢病毒收集液进行后续实验.

2.2 下调 Nedd4 表达的 DU145 稳转细胞系的建立

为了检测下调 Nedd4 表达的 DU145 稳转细胞系是否构建成功, 进行免疫印迹实验, 结果如图2所示. 与对照相比, 用 Nedd4 shRNA 干扰载体慢病毒侵染的 DU145 稳转细胞系中 Nedd4 表达量降低, 即干扰 Nedd4 表达的 DU145 稳转细胞系构建成功.

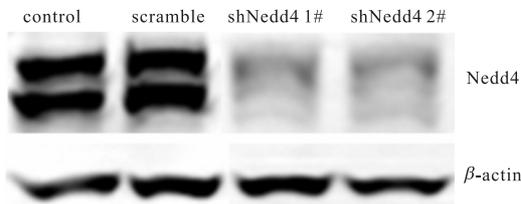


图2 DU145 稳转细胞系中 Nedd4 蛋白表达水平

Fig. 2 The Nedd4 expression level in DU145 stable cell line

2.3 下调 Nedd4 表达对 DU145 细胞增殖的影响

利用 MTT 方法检测下调 Nedd4 表达对 DU145 细胞增殖的影响, 结果如图3所示.

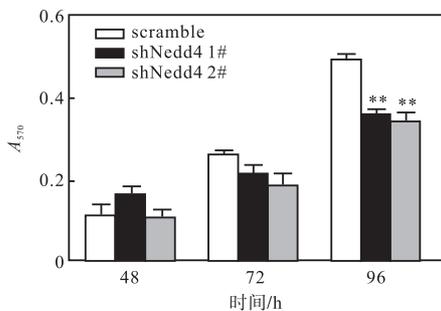


图3 干扰 Nedd4 表达对 DU145 细胞增殖的影响

Fig. 3 Interference of Nedd4 expression on cell proliferation

由图3可知: 各组细胞在接种后的 96 h, 下调 Nedd4 的 DU145 细胞数低于对照组 ($P < 0.01$), 说明下调 Nedd4 表达可以抑制 DU145 细胞增殖.

2.4 下调 Nedd4 表达对 DU145 细胞凋亡的影响

凋亡细胞的细胞核皱缩、形状不规则, 荧光染色较正常细胞核浓, 有些还会碎裂成块状. 利用 DAPI 染色技术检测下调 Nedd4 的表达对 DU145 细胞凋亡的影响, 实验结果如图4所示. 在接受星形孢菌素处理后, 稳定干扰 Nedd4 表达的 DU145 细胞核皱缩量明显多于阴性对照组; 且 48 h 后, 稳定干扰 Nedd4 表达的 DU145 细胞由于凋亡过多, 视野中总细胞量减少. 这些结果都说明下调 Nedd4 表达可以促进 DU145 细胞凋亡.

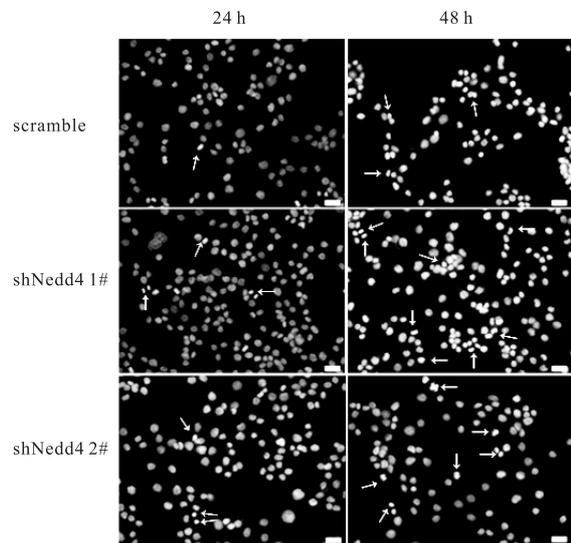


图4 下调 Nedd4 表达对细胞凋亡的影响

Fig. 4 Interference of Nedd4 expression on apoptosis

3 讨论

前列腺癌是在男性群体中比较常见的一种癌症. 研究^[12]表明, Nedd4 作为泛素连接酶家族中的一员, 影响前列腺癌细胞的增殖与凋亡.

本研究采用的慢病毒载体系统是三质粒表达系统, 分别为包装质粒、包膜质粒和载体质粒. 这个系统利用多质粒表达系统构建载体并且尽量减少质粒间重叠数量, 这样可以大大降低通过重组产生可复制性病毒的可能性, 提高了慢病毒载体的安全性.

利用慢病毒载体系统包装慢病毒, 然后侵染 DU145 细胞, 结果证实 Nedd4 的 shRNA 干扰序列 TRCN0000272425 成功下调了 DU145 细胞的 Nedd4

蛋白表达,且利用该序列包装的慢病毒收集液成功构建干扰 Nedd4 表达的稳转细胞系(图 1 和图 2)。

原癌基因可以通过抑制细胞增殖或者促进细胞凋亡来影响肿瘤的生长。MTT 实验表明,干扰 Nedd4 表达后,DU145 细胞的增殖能力较对照组降低,说明 Nedd4 能够促进前列腺癌细胞的增殖(图 3)。DAPI 染色结果显示,下调 Nedd4 表达后,前列腺癌细胞对星形孢菌素诱导的细胞凋亡的敏感性明显增强,说明下调 Nedd4 能够促进细胞凋亡(图 4)。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着重要作用,其中 Caspase-3 作为关键的执行分子,在凋亡信号传导的许多途径中发挥作用。Nedd4 影响细胞凋亡的过程中,是否发生了 Caspase-3 酶原的激活及剪切,还有待进一步研究。

PTEN 作为抑癌基因,在细胞的生长、分化、死亡方面起着重要作用^[13-14]。在多种人类细胞和组织中,PTEN 的突变或敲除促进肿瘤发生^[15]。PTEN 负调控 PI3K/Akt 信号通路^[16],能够被泛素介导的蛋白酶体降解,在老鼠的模型及多种人类癌症样本中,PTEN 的表达水平明显低于正常细胞表达量,与此同时,Nedd4-1 高表达^[17-18],表明 Nedd4-1 对 PTEN 具有负调控作用。

相反,也有研究^[19]表明敲除 Nedd4-1 后,并不影响 PTEN 的降解与它的亚细胞定位。Eide 等^[20]研究发现,Nedd4 在结肠癌细胞中高表达,并且促进癌细胞增殖,但是并不依赖 PI3K/PTEN/Akt 信号通路,PTEN 表达量与 Nedd4 没有直接关系。这对于进一步证实 Nedd4 是否作为 PTEN 的负调控因子并且影响 PTEN 降解与核转移是一个挑战。

Nedd4 参与生长因子受体的调控,包括胰岛素生长因子受体-1(IGF-1R)、血管内皮生长因子受体-2(VEGF-R2)、上皮生长因子受体(EGFR)等^[22-23]。Nedd4 敲除后的转基因小鼠的主要表现为生长阻滞,同时小鼠胚胎成纤维母细胞(MEFs)在敲除 Nedd4 后生长缓慢,并且在血清饥饿处理后,相对于野生型细胞,敲除 Nedd4 的 MEFs 反应异常^[24]。

Nedd4 蛋白家族拥有 9 个成员,9 个成员分别有各自的功能,例如:除 Nedd4-1、Nedd4-2 以外,Smurf1 调控肿瘤细胞运动性、BMP/Smad1 通路等;Smurf2 通过 Smad2 和 TGF- β 受体抑制 TGF- β 信号通路,从而介导完成泛素化降解^[25-26];ITCH 作为细胞命运调节因子 Notch,调控细胞活动;WWP1 参与 p53 的定位与转录;WWP2 是上皮钠离子通道;

NEDL1 是超氧化物歧化酶 1 的突变体;NEDL2 负责稳定 p73 及其转录调控等^[27]。这 9 个家族成员在各自主要功能以外是否存在相互之间的功能补充还需要大量的研究来寻求答案。

参考文献:

- [1] Yang B, Kumar S. Nedd4 and Nedd4-2: Closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 17: 68-77.
- [2] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10: 398-409.
- [3] Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, et al. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(7): 2563-2567.
- [4] Kumar S, Harvey K F, Kinoshita M, et al. cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene[J]. *Genomics*, 1997, 40(3): 435-443.
- [5] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [6] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs(shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. *Genes & Development*, 2002, 16: 948-958.
- [7] Sui G, Soohoo C, Affar E B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(8): 5515-5520.
- [8] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(9): 6047-6052.
- [9] McCaffrey A P, Meuse L, Pham T T T, et al. Gene expression: RNA interference in adult mice[J]. *Nature*, 2002, 418: 38-39.
- [10] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. *Nature Genetics*, 2003, 33:

- 401–406.
- [11] 李季林,于如同,盛罗平,等. NEDD4-1 shRNA 对 U251 胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2011,16(8):366–370.
- [12] Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, et al. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: Multiple players in cancer development[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 10–21.
- [13] Cristofano A D, Pesce B, Cordon C, et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression[J]. *Nature Genetics*, 1998, 19: 348–355.
- [14] Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, et al. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN[J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1179–1181.
- [15] Sansal I, Sellers W R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, 22(14): 2954–2963.
- [16] Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 13375–13378.
- [17] Varshavsky A. The ubiquitin system[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(10): 383–387.
- [18] Wang X, Trotman L C, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN[J]. *Cell*, 2007, 128(1): 129–139.
- [19] Fouladkou F, Landry T, Kawabe H, et al. The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(25): 8585–8590.
- [20] Eide P W, Cekaite L, Danielsen S A, et al. NEDD4 is overexpressed in colorectal cancer and promotes colonic cell growth independently of the PI3K/PTEN/AKT pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(1): 12–18.
- [21] Katz M, Shtiegman K, Tal-Or P, et al. Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4[J]. *Traffic*, 2002, 3(10): 740–751.
- [22] Murdaca J, Treins C, Monthouël-Kartmann M N, et al. Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 26754–26761.
- [23] Peruzzi F, Prisco M, Morrione A, et al. Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 25990–25996.
- [24] Cao X R, Lill N L, Boase N, et al. Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling[J]. *Science Signaling*, 2008, 1(38): 1–10.
- [25] Kavsak P, Rasmussen R K, Causing C G, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6(6): 1365–1375.
- [26] Lin X, Liang M, Feng X H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 36818–36822.
- [27] Chen C, Matesic L E. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2007, 26(3/4): 587–604.

责任编辑:周建军