

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000553

鼻咽上皮细胞中过表达 PIN1 激活 JNK 信号通路
上调 CyclinD1 的研究徐 萌¹, 李五一², 罗国炜³(1. 遵义医学院珠海校区口腔系, 珠海 519041; 2. 遵义医学院附属第五(珠海)医院口腔科, 珠海 519000;
3. 香港中文大学病理解剖及细胞学系, 威尔斯亲王医院, 华南国家肿瘤重点实验室, 香港新界)

【摘要】目的:研究肽脯氨酰异构酶 PIN1 (prolyl isomerase, PIN1) 可能影响的肿瘤信号通路和相关基因, 探讨鼻咽癌早期发生发展的机制。**方法:**运用慢病毒表达系统在鼻咽上皮细胞系 NP69 中建立 PIN1 过表达细胞克隆株, real-time PCR、Western blot 检测 PIN1 表达情况; 肿瘤信号通路阵列荧光素酶实验筛选 PIN1 可能影响的细胞信号通路, Western blot 加以验证。**结果:**稳定表达 PIN1 的 NP69 细胞可激活一系列肿瘤信号通路其中激活丝裂原活化蛋白激酶 MAPK/c-Jun 氨基末端激酶 JNK (MAPK/JNK) 信号通路, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 核转录因子- κ B ($P = 0.036$)、癌基因 Myc ($P = 0.048$) 信号通路变化具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示与对照组相比, 稳定表达 PIN1 的 NP69 实验组可明显上调 JNK 信号通路重要的下游转录因子 c-Jun、c-Jun Ser63、c-JunSer73 的表达量, 最终上调下游基因细胞周期蛋白 CyclinD1 ($t = -7.295, P = 0.002$) 的表达。**结论:**稳定表达 PIN1 的 NP69 细胞可激活 MAPK/JNK 信号通路, 明显上调 JNK 信号通路重要的下游转录因子 c-Jun、c-Jun Ser63、c-JunSer73 的表达量, 最终上调下游基因细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达, PIN1 与鼻咽癌早期的发生发展密切相关。

【关键词】慢病毒载体; PIN1; NP69 细胞; JNK 信号通路; CyclinD1; 鼻咽癌**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-19PIN1 overexpression activates JNK signal pathway and upregulates CyclinD1
in nasopharyngeal epithelium cellXu Meng¹, Li Wuyi², Luo Kwokwai³(1. Department of Stomatology, Zunyi Medical University, Zhuhai Campus; 2. Department of Stomatology, No.5
Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; 3. Department of Anatomical and Cellular Pathology, State Key
Laboratory in Oncology in South China, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong)

【Abstract】Objective: To investigate the cancer signal pathways which prolyl isomerase (PIN1) may regulate. **Methods:** PIN1 overexpression NP69 cell line was established by using the lenti-viral system and the PIN1 expression was proved by q-PCR and Western blot. Then PIN1 regulated cancer signal pathways were analyzed by using cancer 10-pathway reporter assay and Western blot. **Results:** PIN1 over expression in nasopharyngeal epithelia cell may activate a serial cancer signal pathways including MAPK/JNK signal pathway, NF- κ B signal pathway and Myc signal pathway. Comparing with those control group, Western blot results showed NP69-Lenti-PIN1 group had higher quantity expressions in c-Jun, c-Jun Ser63, c-JunSer73 and CyclinD1 ($t = -7.295, P = 0.002$). **Conclusion:** The over-expression of PIN1 up-regulates CyclinD1 expression, activates the MAPK/JNK pathway, and increases phosphorylation of c-Jun at Ser63 and Ser73. Therefore PIN1 may contribute to the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma.

【Key words】Lenti-viral vector; PIN1; NP69 cell; JNK signal pathway; CyclinD1; nasopharyngeal carcinoma**作者简介:**徐 萌, Email: xumenggre@163.com,

研究方向: 头颈部肿瘤研究。

通信作者:罗国炜, Email: kwokwailo@163.com。**基金项目:**遵义医学院博士启动基金 F664; 贵州省科技创新人才团

队建设项目 (编号: 黔科合人才团队 (2013)4026)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2145.006.html>

(2015-03-10)

肿瘤发生是一个复杂的过程,涉及一系列基因及信号转导通路的异常^[1],包括癌基因的激活以及抑癌基因的失活等。脯氨酰异构酶 PIN1 (prolyl-isomerase, PIN1) 可特异性地催化蛋白质中磷酸化的 Ser/Thr-Pro 酰胺键的顺反异构,改变蛋白质的构象;调控蛋白质的活性、磷酸化状态、蛋白与蛋白的相互作用、蛋白的稳定及亚细胞定位;调节一系列与 Serine-threonine 相关的细胞信号通路、激活一系列肿瘤基因、生长因子、抑制抑癌基因和生长抑制因子,促进肿瘤的发生^[2-4]。研究显示 PIN1 可以在前列腺癌、宫颈癌、恶性黑色素瘤等多种肿瘤中高表达,且 PIN1 的高表达预示着较差的预后和较短时间的肿瘤复发^[5]。课题组前期免疫组化、Western blot 研究显示 PIN1 在鼻咽癌组织中高表达,提示 PIN1 与鼻咽癌的发生发展密切相关。为了研究 PIN1 在鼻咽癌中的潜在作用,课题组运用慢病毒表达系统在鼻咽上皮细胞系 NP69 中建立 PIN1 过表达细胞克隆株,研究 PIN1 可能影响的肿瘤信号通路和相关基因。

1 材料与方法

1.1 材料

正常鼻咽上皮细胞株 NP69、293TN 细胞,由香港中文大学鼻咽癌研究室保存。角质形成细胞无血清培养基 (keratinocyte serum-free medium, KSMF)、牛脑垂体提取液 (BPE)、重组表皮生长因子 (rEGF) 购自 Invitrogen 公司。RPMI1640 培养液购自 Sigma 公司,10% 胎牛血清购自 Gibco 公司。Lipofectamine 2000 脂质转染试剂,OPTI-MEM medium 购自 Life Technologies 公司。Lenti Starter kit 第三代慢病毒包装系统,购自 System Biosciences 公司。RNA 抽提试剂 TRIZOL,购自 Invitrogen 公司,RT-qPCR 试剂盒,Western blot 相关试剂及 H₂O₂ 溶液购自 Life Technologies 公司。BCA 蛋白含量测定试剂盒,购自 Pierce 公司。PIN1 引物和 β -actin 引物由 Life Technologies 公司合成。慢病毒载体质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-PIN1 (pCDH-PIN1) 及 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (pCDH) 由香港大学 Dr. Roberta Pang 惠赠。肿瘤信号通路阵列荧光素酶试剂盒 Cancer 10-Pathway Reporter Luciferase Kit 购自 SBI 公司。Fugene HD Reagent,购自 Roche 公司。荧光素酶报告基因实验试剂盒 (Dual-Luciferase Reporter Assay kit),购自 Promega 公司。兔源性一抗 PIN1 购自 Calbiochem 公司,羊源性一抗 β -actin 购自 Santa Cruz 公司,兔源性一抗 c-Jun、c-Jun Ser63、c-Jun Ser73 购自 Cell Signaling 公司。相对应二抗购自 Dako 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒转染系统构建稳定的 PIN1 过表达鼻咽癌上皮细胞株 (NP69-Lenti-PIN1) 将 3×10^6 个 293TN 细胞接种到 10 cm 的细胞培养皿中,加入 2 μ g 的 pCDH-PIN1 或 pCDH、10 μ g pACKH1-Plamid mix 及 Lipofectamine 2000 进行共转染,48 h 后收集含有 PIN1 病毒颗粒的培养液,加入 PEG-it 析出病毒颗粒。将 NP69 接种到 T25 培养瓶中,于含有 BPE 及 rEGF 的 KSMF 培养液中培养,加入含有 PIN1 病毒颗粒及 Trans Duxand 混合物新培养液共培养 72 h 后换入新的培养液常规培养。随机检测 5 个高倍视野,记录荧光显微镜下含有 GFP 细胞占总细胞数的百分比,确定 NP69 中 PIN1 的导入情况。qPCR、Western blot 验 NP69-Lenti-PIN1 组及 NP69-vector 组细胞中 PIN1 表达情况。

1.2.2 采用肿瘤信号通路阵列荧光素酶试剂盒测试 NP69-Lenti-PIN1 可能影响的细胞信号通路 加入 0.8 μ l Fugene-HD 及 100 μ l OPTI-MEM 到肿瘤信号通路阵列 96 孔板中溶解板上含有报告基因的质粒,混匀静置 20 min。接种 NP69-Lenti-PIN1 组、NP69-vector 组细胞到已准备好的肿瘤信号通路阵列 96 孔板中 (4.0×10^3 个/孔),进行逆转染。24 h 后,根据使用说明,加入细胞裂解液,配置好 Luciferase Assay ReagentII 及 Stop & Glo Reagent,上机读数,完成荧光素酶报告基因实验。以上实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 Western blot 检测目标蛋白的表达 接种 3×10^5 NP69-Lenti-PIN1 组、NP69-vector 组接种到 10 cm 的细胞培养皿中,待细胞达到 80% 融合时,更换含有 H₂O₂ 的新鲜培养液 (培养液中 H₂O₂ 终浓度为 1 mmol/L),作用 24 h 后收集细胞,加入 RIPA (含有 1% NP40、0.5% 脱氧胆酸钠和 0.1% SDS 的 PBS) 和蛋白酶抑制剂,冰上裂解蛋白 20 min,离心取上清,BCA 法测定蛋白浓度。取适当蛋白加入 SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,冰上冷却,SDS PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂牛奶封闭,加入一抗 PIN1、 β -actin、c-Jun、c-Jun Ser63、c-Jun Ser73、相对应二抗,显影,照片。显影结果经 Image J 软件进行半定量分析,计算净光密度值,结果以相对平均灰度值 (Mean Gray Value MGv) $\times$ 面积 (mm²) 表示。蛋白的相对含量 = (目的蛋白条带 MGv $\times$ mm²) / (β -actin 条带 MGv $\times$ mm²)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。real-time PCR CT 值、肿瘤信号通路阵列荧光素酶试验数据、Western blot 数据为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 利用慢病毒系统载体在鼻咽细胞中构建 PIN1 过表达细胞株

荧光显微镜观察结果发现 (94.4 $\pm$ 2.3) % 的 NP69 细胞携

带 PIN1,发出绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)产生的荧光(见图 1);real-time PCR 检测发现经第 3 代慢病毒载体系统感染鼻咽上皮细胞的 PIN1mRNA 表达水平是对照组的约 20 倍 (见图 2);Western blot 检测 PIN1 蛋白表达量也明显高于对照组(见图 3),具体数值见表 1。

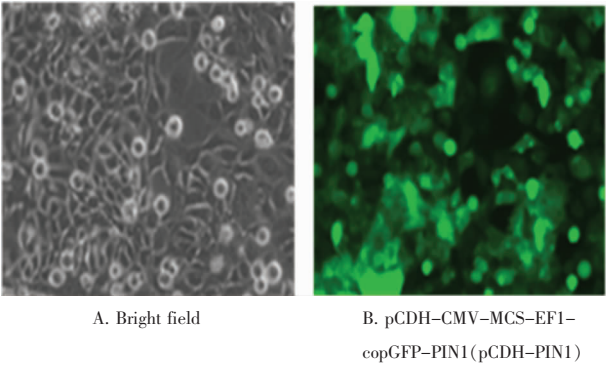


图 1 荧光显微镜观察鼻咽上皮细胞中 PIN1 过表达 (400 ×)
Fig.1 Stable PIN1-over-expressed cell line in NP69 cells under fluorescence microscope (400 ×)

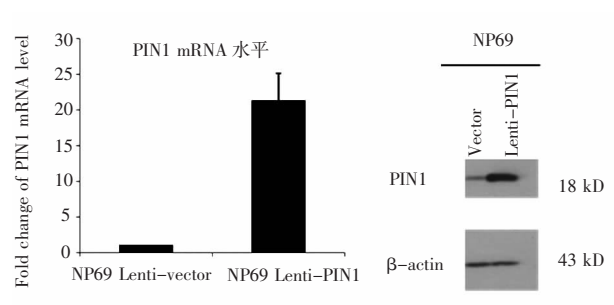


图 2 Real-time PCR 检测鼻咽上皮细胞的 PIN1mRNA 表达水平,
Western blot 检测鼻咽上皮细胞的 PIN1 蛋白表达水平
Fig.2 PIN1mRNA expression and protein expression
in NP69 cells

表 1 鼻咽上皮细胞的 PIN1mRNA 及蛋白相对值的比较

Tab.1 Comparison of PIN1mRNA and protein level between NP69-Lenti-PIN1 and NP69-vector

组别	相对 CT 比值均数 ± 标准差	PIN1 蛋白相对值 (PIN1/β-actin)
NP69Lenti-vector	1.000 ± 0.003	0.376 ± 0.006
NP69Lenti-PIN1	21.259 ± 3.821	3.311 ± 0.051
<i>t</i> 值	-9.813	-57.565
<i>P</i> 值	0.012	0.000

2.2 PIN1 过表达激活一系列肿瘤信号通路

肿瘤信号通路阵列研究发现 PIN1 过表达可以影响一系列肿瘤信号通路,上调 Notch、p53、NF-κB、Myc、MAPK/ERK、MAPK/JNK 等信号通路,Wnt、TGFβ、Cell cycle/pRb-E2F、Hypoxia 等信号通路基本无变化(见表 2)。NP69-Lenti-PIN1 组中 NF-κB、Myc、MAPK/JNK 信号通路的关键转录因子 NF-κB、Myc、AP-1 相对荧光值分别为 1.416 ± 0.141、1.218 ± 0.134、1.656 ± 0.092,与 NP69-vector 组相比,相对荧光值变化明显,其中 NF-κB ($P=0.036$)、Myc ($P=0.048$) 信号通路变化具有统计学意义 ($P<0.05$),MAPK/JNK ($P=0.000$) 信号通路变化,具有显著统计学意义 ($P<0.01$) (见图 3,表 3)。

表 2 PIN1 调节的肿瘤信号通路

Tab.2 PIN1 regulated cancer signal pathways

肿瘤信号通路	关键转录因子	肿瘤信号通路变化
Notch	RBP-Jk	上升
p53/DNA Damage	p53	上升
NF-κB	NF-κB	上升
Myc/Max	Myc/Max	上升
MAPK/ERK	Elk-1/SRF	上升
MAPK/JNK	AP-1	上升
Wnt	TCF/LEF	无变化
TGFβ	SMAD2/3/4	无变化
Cell cycle/pRb-E2F	E2F/DP1	无变化
Hypoxia	HIF1A	无变化

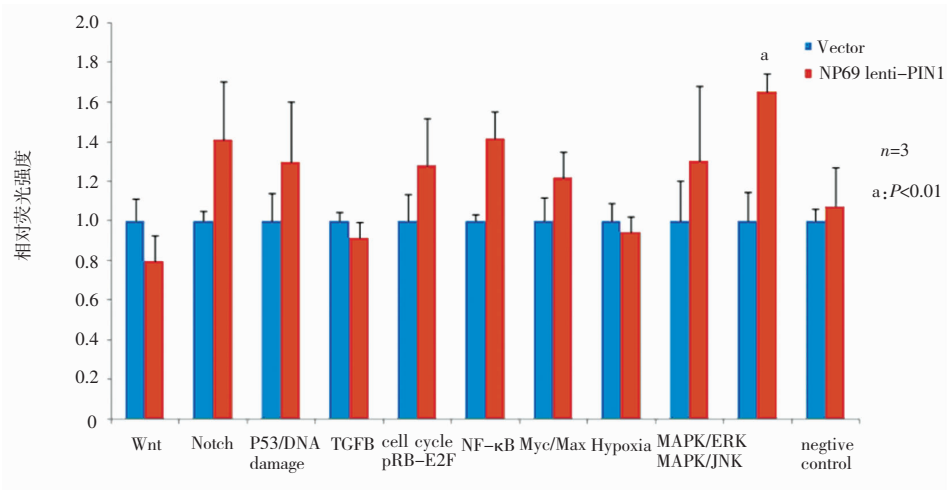


图 3 肿瘤信号通路阵列检测 PIN1 调节的肿瘤信号通路

Fig.3 PIN1 regulated cancer signal pathways by cancer 10- pathway array

表 3 NP69-Lenti-PIN1 组与 NP69-vector 组肿瘤信号通路阵列相对荧光值比较及分析

Tab.3 Comparison of PIN1 regulated cancer signal pathways between NP69-Lenti-PIN1 and NP69-vector

分组	Wnt	Notch	p53/DNA Damage	TGF β	Cell cycle/pRb-E2F	NF κ B	Myc/Max	Hypoxia	MAPK/ERK	MAPK/JNK
NP69-Lenti-PIN1	0.797 $\pm$ 0.129	1.412 $\pm$ 0.291	1.302 $\pm$ 0.301	0.915 $\pm$ 0.818	1.281 $\pm$ 0.239	1.416 $\pm$ 0.141	1.218 $\pm$ 0.134	0.945 $\pm$ 0.081	1.303 $\pm$ 0.383	1.650 $\pm$ 0.092
NP69-vector	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>t</i> 值	2.726	-2.456	-1.739	1.794	-2.035	-5.139	-2.818	1.181	-1.370	-12.285
<i>P</i> 值	0.112	0.070	0.157	0.215	0.179	0.036	0.048	0.359	0.304	0.000

2.3 PIN1 过表达可调节 JNK 信号通路相关因子蛋白表达

Western blot 检测结果见图 4, 在 48 kD 处检测 c-Jun 及磷酸化的 c-Jun Ser63, c-JunSer73; 在 36 kD 处检测到 CyclinD1; 18 kD 处检测到 PIN1; 43 kD 处检测到内参 β -actin。c-Jun、CyclinD1 在 NP69-Lenti-PIN1 组和 NP69-vector 组中蛋白表达量的比较分析结果见表 4。Western blot 结果及统计学分析显示 PIN1 过表达可以明显上调 JNK 信号通路重要的因子 c-Jun 的表达量及磷酸化 c-Jun Ser63, c-JunSer73 的表达量, 最终上调下游基因 CyclinD1 的表达量。

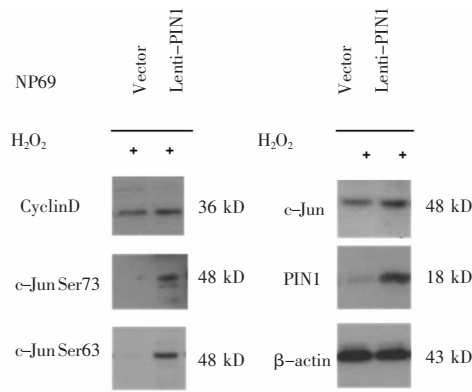


图 4 PIN1 激活 JNK 信号通路

Fig.4 PIN1 can activate JNK cancer signal pathway

表 4 c-Jun、CyclinD1 在 NP69-Lenti-PIN1 组与 NP69-vector 组中蛋白表达量及其分析比较

Tab.4 Comparison on expression of c-Jun and CyclinD1 in NP69-Lenti-PIN1 and NP69-vector groups

分组	c-Jun	CyclinD1
NP69-Lenti-PIN1	0.534 $\pm$ 0.018	0.335 $\pm$ 0.017
NP69-vector	0.339 $\pm$ 0.034	0.225 $\pm$ 0.020
<i>t</i> 值	-8.649	-7.295
<i>P</i> 值	0.001	0.002

3 讨论

PIN1 有 2 个结构区域, N 端的 WW 区域可特异性识别和结合底物中磷酸化的 Ser/Thr-Pro 酰胺

键, C 端催化区域可异构 Ser/Thr-Pro motif, 引起蛋白质构象变化^[6], 在细胞周期, 细胞信号通路传导, DNA 修复等方面均发挥重要作用。细胞周期蛋白 D1 是多信号通路调节的下游基因, 主要作用于细胞周期 G1/S 期, 对细胞的生长发育起及其重要的作用, 与肿瘤的恶化和转移密切相关, 被认定为癌基因^[7]。

研究显示 PIN1 与细胞周期蛋白 D1 关系密切, 可以通过以下几种方式调节细胞周期蛋白 D1: (1) 与 Jun 中 Ser63/73 构架结合, 激活 JNK 信号通路, 调节 JNK 信号通路的下游的癌基因细胞周期蛋白 D1^[8]。(2) PIN1 可以直接和 β -catenin 结合, 使 Ser246 构架磷酸化, 调节其的亚细胞定位, 阻碍其和肿瘤抑制因子 APC (adenomatous polyposis coliprotein) 结合, 从而失去了对 β -Catenin 表达水平的调节。 β -Catenin 在胞浆内大量积聚并进入细胞核, 与 TCF/LEF 转录因子结合, 激活相关基因的转录, 其中包括细胞周期蛋白 D1, 从而导致了细胞增殖异常和肿瘤发生^[9]。(3) PIN1 可以与 NF- κ B 中的 Thr254 位点结合, 使 NF- κ B 磷酸化, 发生细胞核转移, 从而激活细胞周期蛋白 D1 的转录, 增加其表达^[10]。

鼻咽癌中 PIN1 采取何种途径调节 CyclinD1 是研究者关注的, 尽管 90% 的鼻咽癌病例高表达细胞周期蛋白 D1^[11], 但真正由基因扩增引起的少于 10%^[12], 说明鼻咽癌中 CyclinD1 表达上调存在其它可能的机制, 如增加其转录活性。AP-1 属 c-fos/c-jun 异源二聚体, 是细胞内 bZIP 类 DNA 结合蛋白的一种重要的转录因子。AP-1 可作用于靶基因启动子上的 AP-1 结合位点, 即佛波酯 (12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate, TPA) 反应组件 (其序列是 5'-TGACTCA-3'), 调控靶基因的转录。肿瘤信号通路阵列荧光素酶实验测试显示 PIN1 可激活的转录因子 AP-1, 而 CyclinD1 的启动子中包含 AP-1 的结合

位点。以上结果提示 PIN1 可能通过激活 AP-1 来调控 CyclinD1 的转录,增加 CyclinD1 的表达量。

MAPK/JNK 信号途径参与如胚胎发育、免疫反应、细胞分化等许多正常的生理过程,MAPK/JNK 信号途径的异常活化与多种人类肿瘤的发生发展密切相关^[13]。AP-1 是 MAPK/JNK 信号通路重要的转录因子,课题组采用肿瘤信号通路阵列荧光素酶试验(Caner 10-Pathway Array)发现稳定转染 PIN1 的 NP69 细胞可启动与 Serine-threonine 相关的细胞信号通路如 MAPK/JNK 信号通路、Myc 信号通路及 NF- κ B 信号通路,且可以明显上调 JNK 信号通路重要的下游转录因子 c-Jun 的表达量。Western blot 检测显示 c-Jun Ser63, c-JunSer73 的表达量明显上调。c-Jun 具有 Ser/Thr-Pro 酰胺键,其中包括 c-Jun63 及 73 两个重要的丝氨酸磷酸化位点。本研究推测鼻咽上皮细胞中 PIN1 直接与磷酸化的 c-Jun 在氨基末端 63 及 73 位结合,激活 c-Jun 而增强其转录活性,增加 c-Jun 的表达量,激活 AP-1,上调下游基因 CyclinD1 的表达。

综上所述课题组运用慢病毒表达系统在鼻咽上皮细胞系 NP69 中建立 PIN1 过表达细胞克隆株,发现 PIN1 可以通过激活 MAPK/JNK 肿瘤信号通路,上调细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)的表达量,对了解鼻咽癌早期的发生发展非常有意义,为 PIN1 成为治疗鼻咽癌的新的抗癌靶点提供理论和实验依据。

参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer; the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [2] Lu, KP, Hanes, SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis[J]. Nature, 1996, 380(6574): 544-547.
- [3] Liou YC, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins[J]. Trends in Biochem Sci, 2011, 36(10): 501-514.
- [4] Lee TH, Pastorino L, Lu KP. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease[J]. Expert Rev Mol Med, 2011, 13: e21.
- [5] Bao L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers[J]. Am J Pathol, 2004, 164(5): 1727-1737.
- [6] Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, et al. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(8): 639-643.
- [7] Nishi K, Inoue H, Schnier JB, et al. Cyclin D1 downregulation is important for permanent cell cycle exit and initiation of differentiation induced by anchorage-deprivation in human keratinocytes[J]. J Cell Biochem, 2009, 106(1): 63-72.
- [8] Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1[J]. EMBO J, 2001, 20(13): 3459-3472.
- [9] Ryo A, Nakamura M, Wulf G, et al. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 793-801.
- [10] Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, et al. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA[J]. Mol Cell, 2003, 12(6): 1413-1426.
- [11] Tsang CM, Yip YL, Lo KW, et al. Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(50): E3473-E3482.
- [12] Hui AB, Or YY, Takano H, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2005, 65(18): 8125-8133.
- [13] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 537-549.

(责任编辑: 冉明会)