

CUEDC1 抑制 $\text{TNF}\alpha$ 激活的 AP—1 的转录活性

王晨辉 李文龙 魏传宇 穆蕊 陈亮 方迪峰

周涛 靳宝锋 巩伟丽 李爱玲*

(国家生物医学分析中心,北京 100850)

摘要 为了研究 CUEDC1 蛋白质是否参与了 AP—1 信号通路,首先在真核细胞中成功表达了 Flag—CUEDC1 蛋白质,通过双荧光报告系统,研究了 CUEDC1 对 AP—1 信号通路的影响。结果显示,过表达 CUEDC1 能够显著抑制 $\text{TNF}\alpha$ 激活的 AP—1 转录活性,而对 $\text{IFN}\alpha$ 激活 STAT3 的转录活性没有影响,并且 CUEDC1 抑制 AP—1 转录活性影响是发生在 TRAF2 分子或者上游水平。

关键词 CUEDC1 AP—1 转录活性

中图分类号 Q257 Q756 Q785; **文献标志码** A

AP—1 转录因子是最早被鉴定的哺乳动物转录因子之一^[1],广泛参与细胞增殖、死亡、分化和存活等多种细胞生物学过程。AP—1 之所以具有如此多的生物学功能取决于它的结构以及复合体的组成,AP—1 包括 Jun (c—Jun, JunB, JunD)、Fos (c—Fos, FosB, Fra—1, Fra2)、Maf (c—Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) 和 ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B—ATF, JDP1, JDP2) 亚家族,它能够结合 TPA 和 cAMP 反应元件^[1]。 $\text{TNF}\alpha$ 激活 AP—1 转录因子的研究已有很多报道, $\text{TNF}\alpha$ 通过与 TNFR 结合,招募 TRAF2、ASK1,进而激活 JNKK4、JNKK7、JNK1、JNK2,从而磷酸化 c—jun, c—fos 等 AP—1 转录因子^[2,3]。 $\text{TNF}\alpha$ 激活 AP—1 最主要生物学效应是细胞凋亡,如果 $\text{TNF}\alpha$ 激活的 NF— κ B 通路受到抑制,则 JNK 通路持续激活 AP—1,导致细胞凋亡^[4,5]。CUEDC1 是一个含有的 CUE 结构域的蛋白质,其功能尚不明确。文献报道 CUEDC1 在转移肿瘤中表达量上调,提示它与肿瘤转移的发生相

关^[6]。本研究发现过表达 CUEDC1 能够抑制 $\text{TNF}\alpha$ 激活的 AP—1 转录活性,并且证明 CUEDC1 发挥抑制作用是在 TRAF2 或者上游水平。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及 CUEDC1 的表达分析

人胚胎肾细胞 HEK293 和 293T 细胞都采用 DMEM 培养基,加入 10% 胎牛血清,于 37℃,5% CO_2 进行培养。将 293T 细胞接种到 12 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时用 Lip2000 (INVITROGEN 公司)进行细胞转染,每孔中分别转染 pcDNA3.0—Flag 空载体、pcDNA3.0—Flag—CUEDC1 (0.1 μg) 和 pcDNA3.0—Flag—CUEDC1 (1.0 μg),6 h 后更换新鲜培养基,24 h 后用 1 × SDS Buffer 裂解细胞,通过 Western Blot 分析检测外源蛋白质表达情况。

1.2 CUEDC1 对 $\text{TNF}\alpha$ 激活 AP—1 转录活性的影响

将 HEK293 细胞接种到 12 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时进行细胞转染,在每孔中分别转染报告基因 pAP—1—Luc (200 ng)、海肾荧光素酶质粒 (20 ng)。Flag—CUEDC1^[7] (本实验室构建)按不

同的剂量梯度分别转染 0 μg 、0.5 μg 、1.0 μg 。用 Lip2000 转染后 6 h 更换新鲜培养基,细胞转染后 24 h 加入 10 nM TNF α (Sigma 公司)处理 6 h。处理完毕后裂解细胞,利用荧光素酶分析系统(promega 公司)测定 AP—1 的转录活性。

1.3 CUEDC1 对 IFN α 激活 STAT3 转录活性的影响

将 293T 细胞接种到 12 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时进行细胞转染,在每孔中分别转染报告基因、pSTAT3—Luc(200 ng)、海肾荧光素酶质粒(20 ng)、Flag—STAT3(50 ng)。Flag—CUEDC1 按不同的剂量梯度分别转染 0 μg 、0.5 μg 、1.0 μg 。用 Lip2000 转染后 6 h 更换新鲜培养基,细胞转染后 24 h 加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IFN α (SIGMA 公司)处理 6 h。处理完毕后裂解细胞,利用荧光素酶分析系统测定 STAT3 的转录活性。

1.4 CUEDC1 对过表达 TRAF2、JNK1 激活 AP—1 转录活性的影响

将 293T 细胞接种到 12 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时进行细胞转染,在每孔中分别转染报告基因 pAP-1-Luc(200 ng)、海肾荧光素酶质粒(20 ng)。分别转染 0.5 μg 的 HA 空载体、HA-TRAF2、HA-JNK1 以及 1.0 μg Flag 空载体和 Flag—CUEDC1。用 Lip2000 转染后 6 h 更换新鲜培养基,细胞转染后 24 h 裂解细胞,利用荧光素酶分析系统测定 AP—1 的转录活性。

2 结 果

2.1 CUEDC1 在真核细胞中的表达

为了验证 CUEDC1 在真核细胞中的表达情况,利用 Lip2000 转染 293T 细胞,通过 Western Blot 检测 CUEDC1 的表达情况。如图 1 所示,用 Flag 抗体进行免疫杂交,在分子量 50 kD 位置检测到一条特异的表达条带,而且随着转染量的增加,表达量也增加,而各组 α —Tublin 的表达量没有明显差异,说明 Flag—CUEDC1 表达正确。

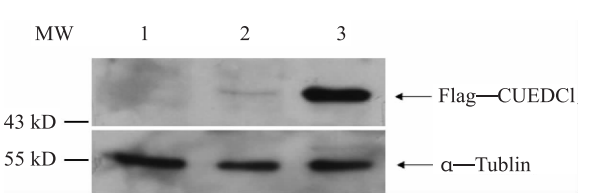


图 1 CUEDC1 在真核细胞中的表达
1—Flag 空载体(1.0 μg),2—Flag 空载体(0.9 μg)和 Flag-CUEDC1(0.1 μg),3—Flag-CUEDC1(1.0 μg)

2.2 过表达 CUEDC1 能够抑制 TNF α 激活的 AP—1 转录活性

利用双荧光报告系统,检测了过表达 CUEDC1 对内源 AP—1 转录活性的影响。如图 2 所示,过表达 CUEDC1 能够显著抑制 TNF α 激活的 AP—1 转录活性,而且这种抑制作用具有一定的剂量依赖性。

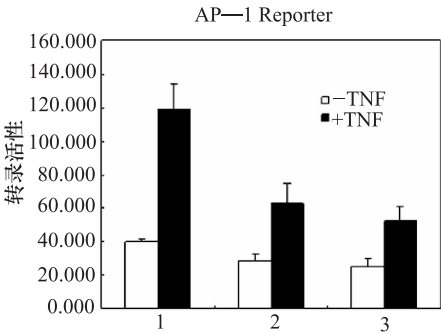


图 2 过表达 CUEDC1 能够抑制 TNF α 激活的 AP—1 的转录活性
1—Flag 空载体(1.0 μg),2—Flag 空载体(0.5 μg)和 Flag-CUEDC1(0.5 μg),3—Flag-CUEDC1(1.0 μg)

2.3 过表达 CUEDC1 对 IFN α 激活的 STAT3 转录活性无明显影响

以上实验表明过表达 CUEDC1 能够显著抑制 TNF α 激活 AP—1 的转录活性,为了验证 CUEDC1 对 AP—1 的抑制效应是否具有特异性,进一步研究了过表达 CUEDC1 是否影响 IFN α 激活的 STAT3 通路。STAT3 通路对于肿瘤的发生发展以及转移发挥十分重要的作用。如图 3 所示,在 293T 细胞中过表达 CUEDC1,对 IFN α 激活的 STAT3 通路无明显影响,说明 CUEDC1 对于 AP—1 的抑制作用具有一定的通路特异性。

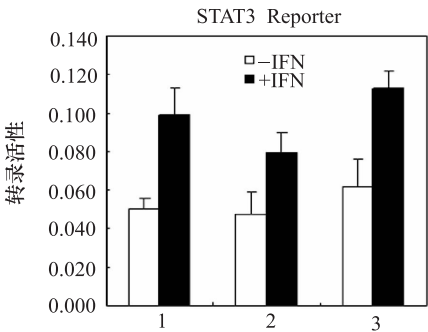


图3 过表达 CUEDC1 对 IFN α 激活的 STAT3 的转录活性没有影响

1—Flag 空载体 (1.0 μg), 2—Flag 空载体 (0.5 μg) 和 Flag-CUEDC1 (0.5 μg), 3—Flag-CUEDC1 (1.0 μg)

2.4 CUEDC1 抑制 AP—1 的转录活性是作用于 TRAF2 或者上游信号分子水平

为了验证 CUEDC1 对 AP—1 抑制作用可能的作用机制以及作用水平,在 293T 细胞中过表达了 HA-TRAF2 和 HA-JNK1,观察 CUEDC1 能否抑制过表达 TRAF2 和 JNK1 激活的 AP—1 转录活性。如图 4 所示,过表达 HA-TRAF2 和 HA-JNK1 均能够激活 AP—1,而过表达 CUEDC1 时,能够显著抑制 HA-TRAF2 激活 AP—1 的转录活性,但是对 JNK1 激活的 AP—1 转录活性未见有明显影响,说明 CUEDC1 对 AP—1 的抑制作用发生在 TRAF2 或者上游分子水平。

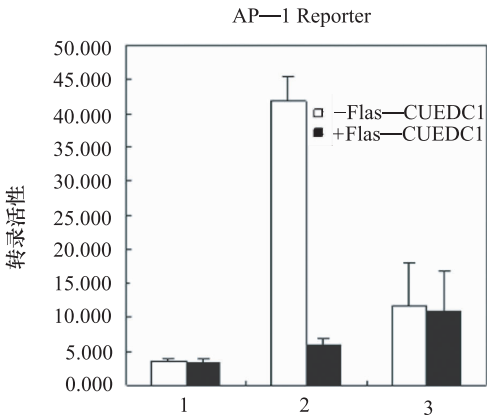


图4 过表达 CUEDC1 能够抑制 TRAF2 激活的 AP—1 转录活性

1—HA 空载体 (0.5 μg) 和 Flag-CUEDC1 (1.0 μg), 2—HA-TRAF2 (0.5 μg) 和 Flag-CUEDC1 (1.0 μg), 3—HA-JNK1 (0.5 μg) 和 Flag-CUEDC1 (1.0 μg)

3 讨论

AP—1 转录因子在细胞中发挥着十分重要的生物学功能,广泛参与细胞生长、分化、死亡和存活,对于 AP—1 转录因子的调控机制研究一直是细胞生物学的热点。对 AP—1 的调控主要包括: jun、fos 基因的转录水平调控; jun、fos 蛋白质的降解; jun、fos 蛋白质的翻译后修饰调控;与其它转录因子结合从而调节 AP—1 的转录活性^[1]。因此,对 AP—1 的调控研究主要集中在转录因子水平。我们研究发现 CUEDC1 能够抑制 AP—1 的转录活性,并且这种抑制作用是发生在 TRAF2 或者更上游的水平。目前,普遍认为 TRAF 家族蛋白具有 E3 泛素连接酶功能,能够催化许多蛋白发生泛素化。CUEDC1 含有 CUE 结构域,CUE 结构域被认为能够结合单泛素^[8],因此,是否 CUEDC1 能够影响 TRAF2 的泛素连接酶功能,或者 CUEDC1 能够影响 TRAF2 的降解,这些假设需要进一步的研究验证。以往研究证明,细胞凋亡与肿瘤的发生发展密切相关。肿瘤细胞之所以能够不受控制的生长,其重要原因之一是由于细胞凋亡受到抑制^[9]。文献报道, CUEDC1 在一些转移肿瘤中表达升高^[6],表明其可能与肿瘤的转移相关。研究表明 CUEDC1 能够抑制 TNF α 激活 AP—1 的转录活性,而在肿瘤细胞中, TNF α 激活 AP—1 是决定细胞存活与否的最重要转录因子之一,因此推测,肿瘤中 CUEDC1 的表达量升高可能通过抑制 TNF α 激活 AP—1 转录活性,抑制肿瘤细胞凋亡,在促进肿瘤的发生与转移中发挥重要作用。

参考文献

- 1 Shaulian E, Karin M. AP—1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, 2002; 4: E131—E136
- 2 Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, *et al.* ASK1 Is Essential for JNK/SAPK Activation by TRAF2. *Mol Cell*, 1998; 2: 389—395
- 3 Natoli G, Costanzo A, Ianni A, *et al.* Activation of SAPK/JNK by TNF Receptor 1 Through a Noncytotoxic TRAF2-Dependent Path *Science*, 1997; 275: 200—203
- 4 Tang G, Minemoto Y, Dibling B, *et al.* Inhibition of JNK activation

through NF—kB target genes. NATURE,2001;414:313—317

5 Smaele E D, Zazzeroni F, Papa S, *et al.* Induction of gadd45 β by NF—kB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. Nature, 2001; 414:308—313

6 Biewengaa P, Buista M R. Moerlandb P D, *et al.* Gene expression in early stage cervical cancer. Gynecol Oncol, 2008;108:520—526

7 穆蕊,赵洁,陈媛,等. CUEDC1 的克隆表达及其对 PRB 和 ER α 转录活性的影响. 科学技术与工程,2009;9(9):3041—3043

8 Prag G, Misra S, Jones E A. ,*et al.* Mechanism of Ubiquitin Recognition by the CUE Domain of Vps9p. Cell,2003;113:609—620

9 Lowe S W, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. Nature, 2004;432:307—315

CUEDC1 Inhibits the Transcriptional Activity of AP—1 Stimulated by TNF α

WANG Chen-hui, LI Wen-long, WEI Chuan-yu, MU Rui, CHEN Liang, FANG Di-feng,
ZHOU Tao, JIN Bao-feng, GONG Wei-li, LI Ai-ling
(National Center of Biomedical Analasis, Beijing 100850, P. R. China)

[Abstract] To study the effect of CUEDC1 on the transcriptional activity of AP—1 stimulated by TNF α , Flag-CUEDC1 protein was overexpressed in eukaryocytes, and Dual—Luciferase Reporter Assay System was used to evaluate the effect of CUEDC1 on transcriptional activity of AP—1 stimulated by TNF α . We found that overexpression of CUEDC1 inhibited the activation of AP—1 signaling pathway stimulated by TNF α , and had no effect on the activation of STAT3 stimulated by IFN- α . The inhibitory effect of CUEDC1 on AP—1 activation was associated with TRAF2 or its upstream factors.

[Key words] CUEDC1 AP—1 Transcriptional activity