

STIP1 调控 EGR1 表达并促进胃癌细胞 DNA 损伤修复

李全营^{1*}, 唐红娜¹, 秦长江¹, 翟二涛^{2*}

1. 河南大学淮河医院 普通外科, 河南 开封 475000

2. 中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 探讨应激诱导磷酸化蛋白 1(STIP1)表达对于胃癌化疗抵抗的影响,并进一步探讨其潜在机制。方法 构建 STIP1 过表达及敲低胃癌细胞系后,应用 CCK-8、单克隆形成等实验检测胃癌细胞对 5-氟尿嘧啶及顺铂、奥沙利铂的敏感性;并对过表达 STIP1 的胃癌细胞系进行 RNA 测序并验证获得 STIP1 所调控的下游分子及信号通路;最后应用免疫荧光、免疫印迹等方法检测 STIP1 对胃癌细胞化疗抵抗的影响是否依赖于其下游分子。结果 STIP1 过表达可显著增强胃癌细胞对于 5-氟尿嘧啶及顺铂、奥沙利铂等细胞毒性药物的抵抗作用;并可促进化疗抵抗相关基因的表达;RNA 表达谱测序发现 STIP1 可能促进重组修复相关信号通路的活化,而免疫印迹及 qPCR 等检测证实 STIP1 过表达可促进该通路相关基因的表达;免疫荧光检测进一步证实 STIP1 表达可影响 5-氟尿嘧啶诱导的 DNA 损伤的重组修复能力;而应用重组修复抑制剂干预胃癌细胞后,免疫荧光检测获得 STIP1 表达对于 5-氟尿嘧啶所诱导的胃癌细胞 DNA 损伤的影响主要是通过影响其同源重组修复途径。对于其下游机制的探索,通过生物信息学分析、免疫印迹、qPCR 及免疫荧光,证实 STIP1 可调控 EGR1 表达进一步影响 5-氟尿嘧啶所诱导的 DNA 损伤重组修复。结论 STIP1 调控 EGR1 表达影响胃癌细胞 DNA 损伤修复,进而促进其化疗抵抗。

【关键词】 应激诱导磷酸化蛋白 1; 早期生长反应基因 1; DNA 损伤修复; 胃癌

STIP1 regulates EGR1 expression and promotes DNA damage repair in gastric cancer cells

Li Quanying^{*}, Tang Hongna, Qin Changjiang, Zhai Ertao^{*}

1. Department of General Surgery, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, China

2. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangzhou, China

Corresponding author: Li Quanying, E-mail: 19152824@qq.com; Zhai Ertao, E-mail: Tao450000@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and potential mechanism of stress-induced phosphorylated protein 1 (STIP1) on chemotherapy resistance of gastric cancer. **Method** Gastric cancer cells with STIP1 overexpression and knockdown were constructed, and then the chemotherapy sensitivity of these cells to 5-fluorouracil, cisplatin and oxaliplatin was detected by CCK-8 proliferation assays and monoclonal formation assays. RNA sequence was employed to obtain the downstream molecules and signal pathways regulated by STIP1 and qPCR and western blotting were used for further validation. Finally, immunofluorescence and western blotting were used to detect whether the effect of STIP1 on chemotherapy resistance of gastric cancer cells depended on the downstream molecules. **Result** Overexpression of STIP1 significantly enhanced the resistance of gastric cancer cells to 5-fluorouracil, cisplatin, oxaliplatin and other cytotoxic drugs. It can also promote the expression of chemotherapy-resistance related genes. RNA sequence revealed that overexpression of STIP1 could activate the pathways related to DNA recombination and repair, immunoblotting and qPCR further confirmed that STIP1 could promote the expression of genes related to this pathway. Immunofluorescence assay further confirmed that the expression of STIP1 could affect the recombination

基金项目:河南省科技发展计划项目(192102310099),国家自然科学基金青年基金(82003112)

*通信作者:李全营, E-mail: 19152824@qq.com; 翟二涛, E-mail: Tao450000@163.com

repair ability of DNA damage induced by 5-fluorouracil. After using recombinant repair inhibitors to intervene in gastric cancer cells, we found the effect of STIP1 on DNA damage was mainly focused on the activation of homologous recombination repair pathway. As for the exploration of its downstream mechanism, bioinformatics analysis, western blot, qPCR and immunofluorescence were employed and confirmed that STIP1 could regulate the expression of EGR1 and further affect the DNA damage recombination repair induced by 5-fluorouracil. **Conclusion** STIP1 can promote chemotherapy resistance of gastric cancer by regulating the expression of EGR1 and influencing DNA repair.

[Key words] Stress-Induced Phosphoprotein 1; early growth response gene 1; DNA damage repair; Gastric cancer

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤,在中国胃癌每年发病率和死亡率均居恶性肿瘤前列^[1,2]。胃癌的治疗手段以外科根治性切除为主,术前和术后化疗、分子靶向药物治疗和免疫治疗等手段在一定程度上可延长患者生存期。但胃癌患者的5年总生存率仍较低^[3]。影响胃癌患者预后的主要因素为部分胃癌患者存在原发性或获得性的化疗药物抵抗。目前临床上尚无有效的逆转肿瘤化疗抵抗的手段,其重要原因是肿瘤化疗抵抗的发生发展过程中诸多决定性分子事件尚未明确。因此,阐明胃癌化疗抵抗的分子机制,对于胃癌患者个体化化疗方案的制定和提高患者长期生存具有重要意义。

应激诱导磷酸化蛋白1(stress-induced phosphoprotein 1, STIP1)可以参与到RNA剪切和转录、蛋白折叠、信号转导和细胞周期调节等多种细胞生物学事件,激活PKA、MAPK或PI3K-mTOR等信号通路^[4-6],导致正常细胞恶性转化,并具有促进肿瘤增殖、迁移和侵袭等恶性行为的能力^[7,8]。在之前的研究中我们证实胃癌细胞STIP1过表达激活WNT/ β -catenin信号通路,促进胃癌细胞发生上皮间质转化,进而增强胃癌侵袭和转移能力^[8,9]。然而,STIP1与胃癌化疗抵抗的关系尚不明朗,在该研究中,我们围绕这一问题展开了系列探索。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、传代及转染 人胃癌细胞系AGS、SGC7901、BGC823、MGC803等购买自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所,根据其推荐培养基类型并加入10%胎牛血清(FBS)在CO₂培养箱中培养。显微镜下观察细胞生长密度至90%时,用胰酶消化细胞并进行1/3传代。

1.2 细胞转染 构建STIP1及EGR1的敲低siRNA及过表达质粒并包装慢病毒。按照试剂盒使用

说明,胃癌细胞通过Lipofectamine 3000(Thermo Fisher,美国)转染siRNA和质粒载体(广州,锐博)。转染48h后细胞被收集用于进一步研究;包装pLVX-puro慢病毒表达载体(广州,锐博),以空pLVX-puro慢病毒表达载体作为对照,转染48h后收集细胞用于下一步实验。转染效果分别通过荧光密度、qPCR及Western Blot进行验证。

1.3 细胞活性检测及克隆形成实验 用96孔板种板,密度为 5.0×10^3 /孔,5-氟尿嘧啶和顺铂按照不同浓度稀释加入培养孔,每组设置3个复孔,96孔板边缘孔用无菌PBS填充,以免试剂蒸发。培养24h后弃去上清,更换含10% CCK8试剂(Takara,日本)的完全培养基,置细胞于恒温培养箱中继续培养3h,用酶标仪检测各孔450nm处的吸光值,计算IC₅₀,进行数据分析。

1.4 蛋白提取及检测 根据试剂盒说明,常规提取细胞蛋白,BCA法检测蛋白浓度,8%~12%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至PVDF膜。5%BSA室温封闭1h后孵育一抗,4℃过夜,二抗孵育1h漂洗后暗室曝光,常规显影,定影,蛋白条带使用ImageJ软件分析相对灰度值。

1.5 RT-PCR检测方法 使用TaKaRa公司RNA提取试剂盒9109提取细胞RNA,使用ReverTra Ace qPCR试剂盒(Takara,日本)反转录RNA为cDNA后,采用THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix体系进行RNA检测,以GAPDH为内参。

1.6 差异基因分析 利用R包Limma进行差异基因,最后选择Log₂FC绝对值大于1且P<0.05的基因作为最终的差异基因。使用R包ggplot2的volcano功能,绘制差异基因分析的火山图。

1.7 基因功能注释及GSEA分析 使用R包clusterProfiler和org.Hs.eg.db进行基因功能注释,基因选择上述差异基因中上调的基因,功能选择

biological process。最后以气泡图的形式可视化该差异分析结果。使用桌面版 GSEA 软件, 搭载 JAVA 运行环境, 将差异基因表达谱导入 GSEA, 运行 GSEA, 参考基因集选择 Hallmaker(h.all.v7.5.symbols.gmt) 及 biological process (C5.go.bp.v7.5.symbols.gmt), 默认参数运行。

2 结果

2.1 STIP1 表达水平与胃癌细胞毒性药物化疗抵抗密切相关 为了探讨 STIP1 表达与胃癌化疗抵抗的相关性。我们首先应用胃癌临床化疗中常用的细胞毒性化疗药物 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂和顺铂等干预 STIP1 过表达或干扰的胃癌细胞, 应用 CCK-8 法检测药物干预后胃癌细胞的 OD 值, 结果提示过表达 STIP1 胃癌细胞对 5-氟尿嘧啶、顺铂和奥沙利铂等细胞毒性药物敏感性降低 (图 1A); 而下调 STIP1 表达呈相反的趋势 (图 1B)。进一步应用克隆形成实验检测奥沙利铂 (5 $\mu\text{g/ml}$) 干预 STIP1 差异表达胃癌细胞后的细胞存活状态, 结果发现过表达 STIP1 可增加胃癌细胞单克隆形成, 并可减弱奥沙利铂对细胞的杀伤作用 (图 1C); 而下调 STIP1 表达呈相反趋势 (图 1D)。此外, 应用 qRT-PCR 法检测了 STIP1 差异表达对化疗抵抗相关基因 (*ATM*、*CD4*、*BIRC3* 和 *MDR1*) 表达 (图 1E、F), 结果提示上调 STIP1 表达可促进 *ATM*、*CD4*、*BIRC3* 和 *MDR1* 表达。而敲低 STIP1 可抑制 *ATM*、*CD4*、*BIRC3* 和 *MDR1* 等基因表达。

2.2 STIP1 调控胃癌细胞 DNA 损伤修复 既往研究指出 DNA 损伤修复是细胞自我修复, DNA 损伤修复异常可导致细胞凋亡、衰老和癌变^[10]; 因此, 当细胞 DNA 损伤修复能力增强时, 细胞可在一定程度上抵抗化疗或放疗的细胞杀伤作用。

在发现 STIP1 可促使胃癌细胞获得化疗抵抗的能力后, 为了明确其可能的机制, 我们对胃癌细胞进行了表达谱芯片检测, 并进行 GO 富集分析, 以期获得 STIP1 可能调控的信号通路。结果发现 STIP1 过表达可引起同源重组修复信号通路基因富集 (图 2A&B); 差异表达基因分析也证实 STIP1 过表达可上调相关基因表达 (图 2C); PCR 和免疫印迹检测进一步证实 STIP1 过表达可上调 *RAD51*、*RAD50*、*BRCA1* 和 *BRCA2* 等同源重组修复基因表达 (图 2D); 此外, 我们发现过表达 STIP1 后, 再用 5-氟尿嘧啶 (25 $\mu\text{g/ml}$) 进行干预, 通过检

测 DNA DSBs 标志物 γH2AX 的表达, 结果提示 STIP1 表达上调可加速 DNA DSBs 的损伤修复 (图 2E)。为了进一步证实 STIP1 调控同源重组修复途径, 我们在差异表达 STIP1 的基础上, 应用同源重组修复抑制剂 (RI-1) 和非同源末端连接途径抑制剂 (Nu7026) 进行干预, 通过检测 5-氟尿嘧啶干预后 24 h 后的 γH2AX 表达和细胞增殖能力, 结果发现阻断 HR 和 NHEJ 修复途径可减缓 5-氟尿嘧啶 (25 $\mu\text{g/ml}$) 诱导的 DNA 损伤修复 (图 2F) 并抑制细胞增殖能力 (图 2G), 而阻断 HR 途径显得尤为明显。据此, 我们首次在胃癌中发现 STIP1 对 DNA 损伤修复的影响, 也初步证实 STIP1 调控胃癌细胞化疗抵抗可能是通过影响细胞 DNA 损伤修复引起的。

2.3 STIP1 调控 EGR1 影响 DNA 损伤修复促进胃癌 5-氟尿嘧啶化疗抵抗 在发现 STIP1 影响 DNA 损伤修复促进胃癌 5-氟尿嘧啶化疗抵抗后, 我们进一步探索了这一生物学过程背后的潜在机制。利用生物信息学手段分析了 STIP1 所调控的下游基因, 结合既往研究报道, 我们提出 STIP1 在调控胃癌 5-氟尿嘧啶化疗抵抗的过程中, EGR1 可能扮演重要角色 (图 3A、B)。qPCR 检测了 EGR1 对化疗抵抗相关基因 (图 3C) 和重组修复相关基因表达 (图 3D) 的影响, 结果提示 EGR1 干扰可抑制相关基因表达; 免疫荧光检测进一步证实下调 EGR1 表达可延缓 5-氟尿嘧啶诱导的 DNA 损伤修复 (图 3E)。

3 讨论

化学药物治疗是肿瘤综合治疗的重要组成部分, 而化疗药物抵抗是造成恶性肿瘤治疗失败的主要原因之一^[11]。胃癌细胞化疗抵抗的产生是一个涉及多方面、多因素的复杂分子机制; 涉及 P53、MAPK、PI3K/AKT 和 BCL2 相关信号通路等细胞存活或死亡信号通路的失调, 细胞内药物浓度降低、药物靶点改变以及肿瘤细胞与肿瘤微环境间的相互作用等^[12-15]。因此, 明确胃癌化疗抵抗的分子机制, 是克服胃癌化疗抵抗、提高化疗效果的关键。

在该项研究中, 我们发现, STIP1 表达水平与胃癌细胞毒性药物化疗抵抗密切相关。近年来多项研究支持, DNA 损伤在化疗抵抗过程中发挥了重要作用^[16-18]。ZEB1 通过与 P300 和 PCAF 形成蛋

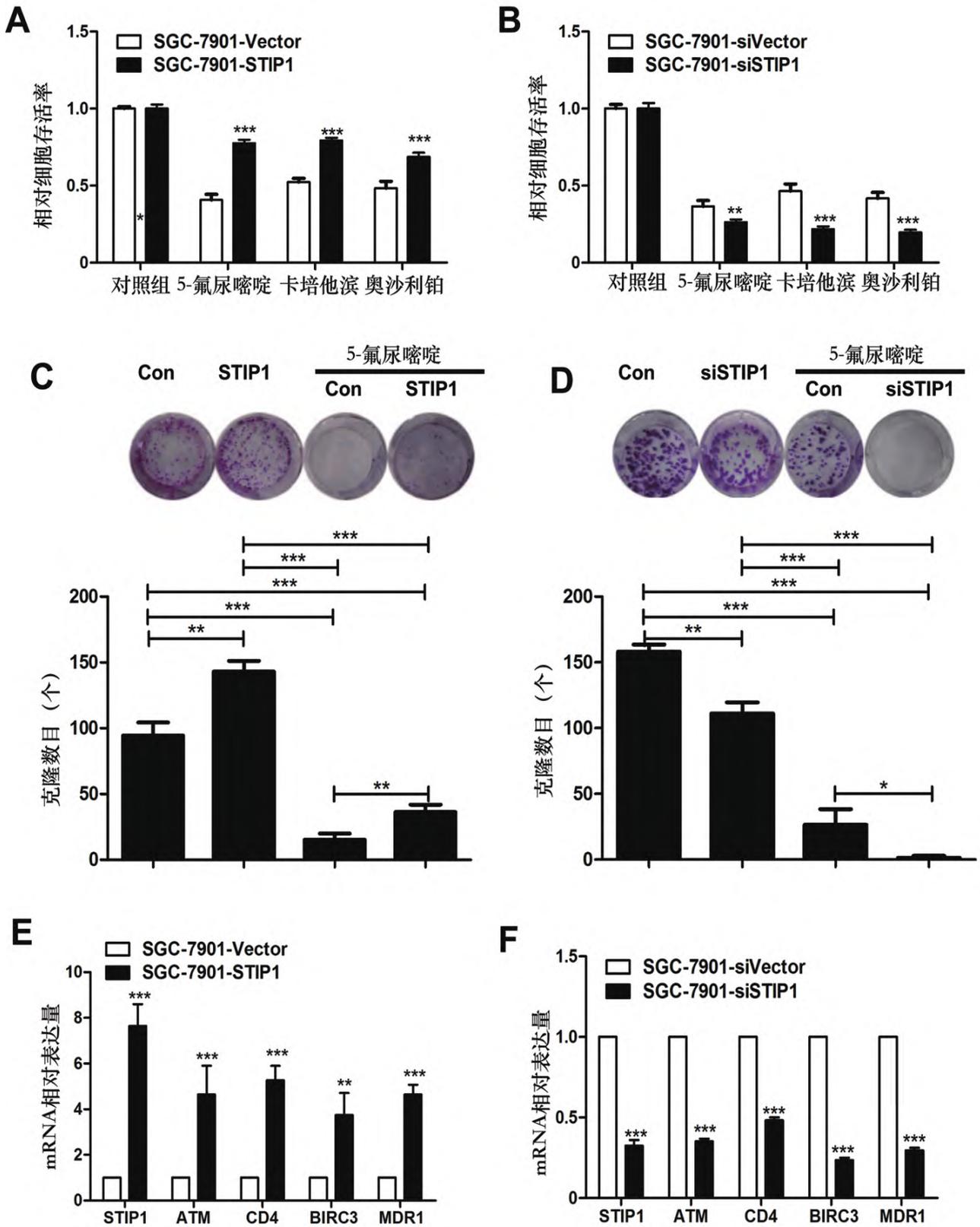


图1 STIP1表达促进胃癌细胞化疗抵抗

注:A、B,不同细胞毒性药物(5-氟尿嘧啶、顺铂和奥沙利铂)处理STIP1过表达(A)和敲除(B)细胞后的细胞活力;C、D,单克隆形成法检测5-氟尿嘧啶(5 μg/ml)处理STIP1上调或下调的胃癌细胞后的细胞存活率;E、F,ATM、CD4、BIRC3和MDR1在STIP1上调或下调胃癌细胞中的表达。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

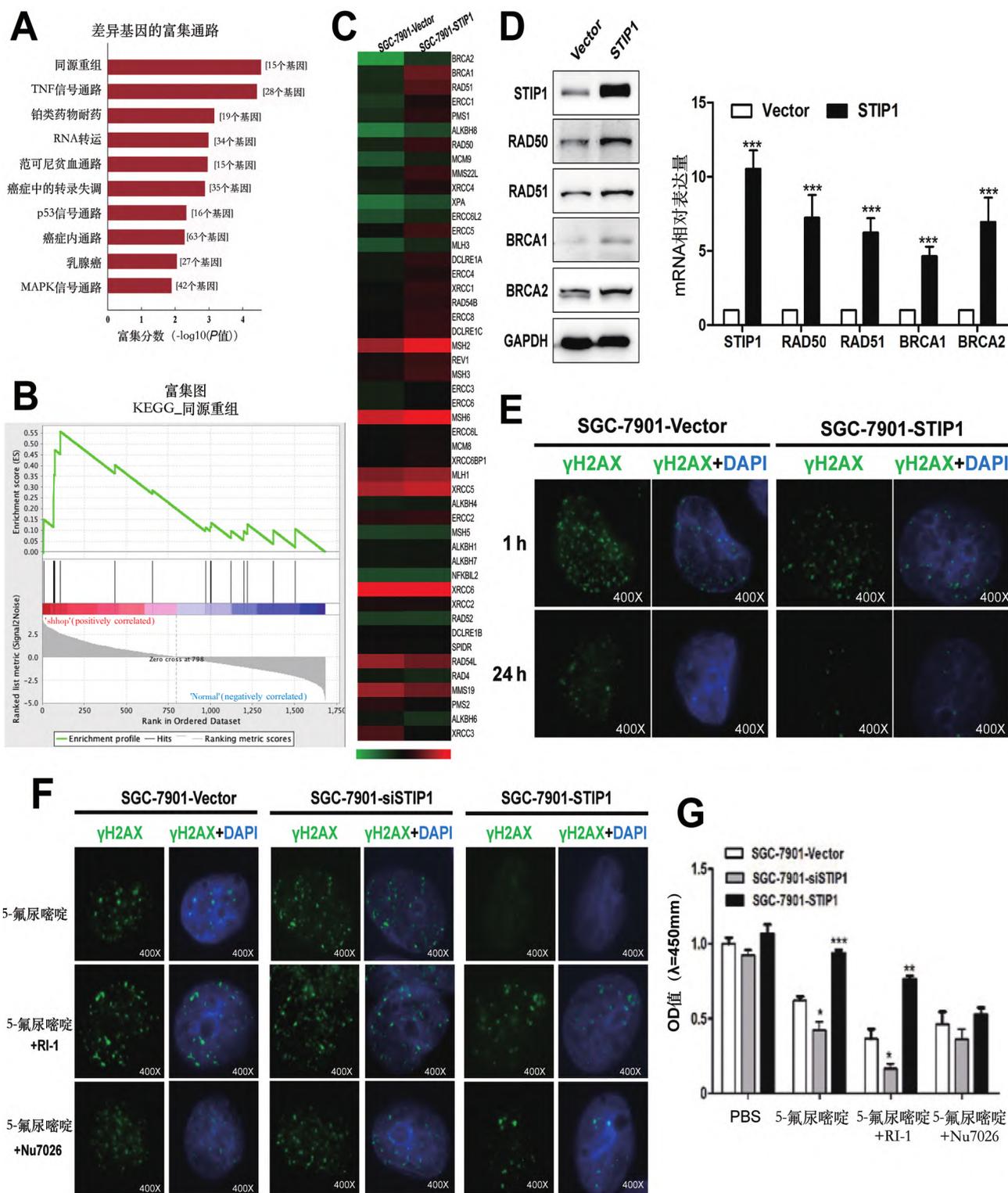


图2 STIP1通过同源重组修复途径促进DNA损伤修复

注:A, RNA 测序检测 STIP1 高表达后激活的信号通路; B, 通过基因集富集分析显示 STIP1 上调激活同源重组修复通路; C, 热图显示 STIP1 过表达后胃癌细胞内同源重组修复相关基因的表达; D, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测上调 STIP1 后胃癌细胞内 RAD50、RAD 51、BRCA1 和 BRCA2 的表达; E, 免疫荧光法检测 5-氟尿嘧啶 (25 μ g/ml) 处理后不同时间点 γ H2AX 的表达; F, 免疫荧光检测 RI-1 和 Nu7014 处理后胃癌细胞内 γ H2AX 的表达水平; G, CCK8 法检测 RI-1 和 Nu7014 处理后胃癌细胞存活率。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

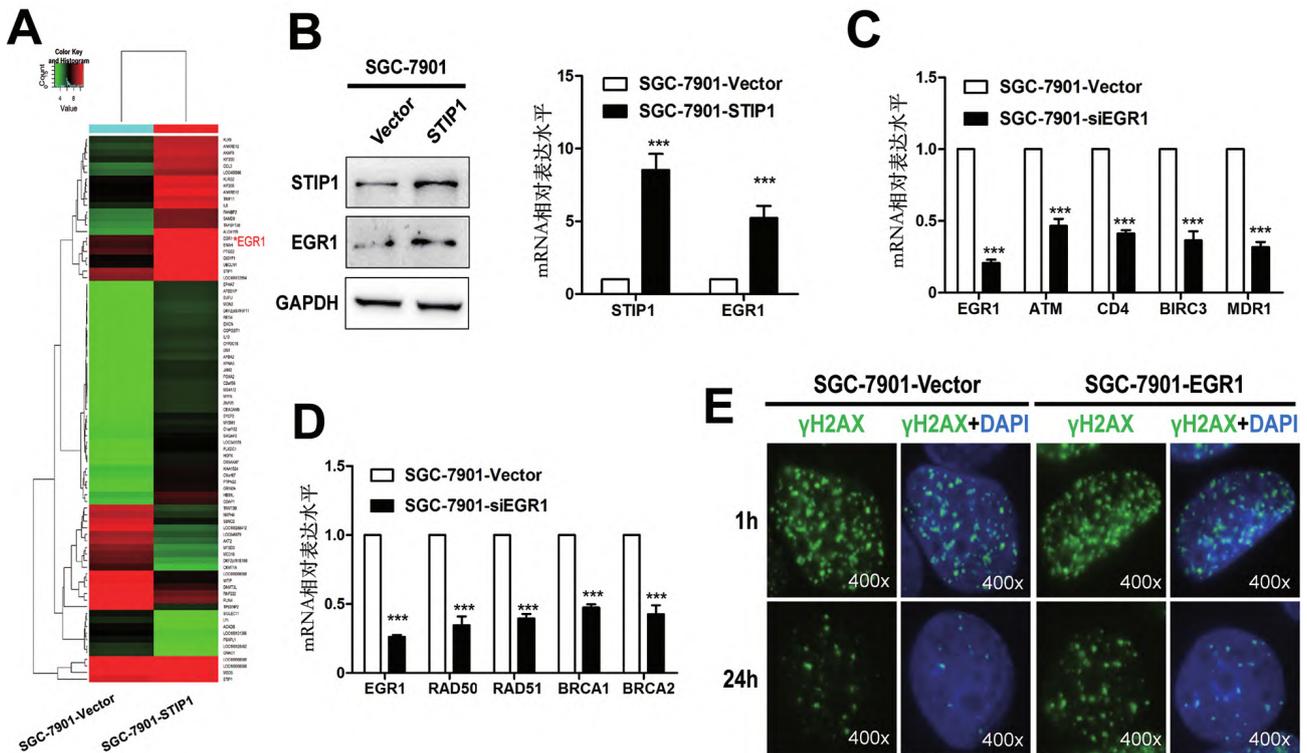


图3 STIP1通过调控EGR1促进DNA损伤修复和耐药

注:A, 热图显示RNA测序的基因表达(倍数变化大于10); B, Western blot和qRT-PCR检测过表达STIP1后胃癌细胞内EGR1的表达; C、D, EGR1过表达后耐药相关基因(C)和同源重组修复相关基因的表达水平(D); E, 免疫荧光法检测5-氟尿嘧啶处理后不同时间点 γ H2AX的表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

白复合物, 促进同源重组调节的DNA损伤修复, 增强乳腺癌细胞的化疗抵抗作用^[16]。ZNF830与CTIP蛋白互作并调节CTIP在DNA损伤位点的聚集, 直接参与到DNA断端剪切, 通过HR途径促进DNA损伤修复, 进而影响恶性肿瘤细胞的化疗抵抗^[17]。而Dicer可调节SIRT和H3K18Ac在DNA DSBs位点的结合, 影响NHEJ修复复合体募集, 进而调节结肠癌细胞对氟尿嘧啶的药物敏感性^[18]。

目前鲜有关于STIP1与恶性肿瘤化疗抵抗和DNA损伤修复的研究报道。我们进一步研究发现EGR1是STIP1的下游基因, 既往研究发现在肺癌、乳腺癌和头颈部鳞癌等恶性肿瘤中, EGR1高表达提示患者具有较好的长期获益, 其作为抑癌基因影响肿瘤恶性进展, EGR1通过调控PTEN、CCND1和Fibronectin等基因表达, 活化NF- κ B、MAPK和AMPK等信号通路, 从而影响肿瘤细胞恶性行为^[19-22]。然而, STIP1是否可以通过EGR1影响胃癌化疗抵抗尚未得到关注。进一步实验探索发现, EGR1可以影响DNA损伤及化疗抵抗相

关分子的表达, 而在阻断EGR1的表达后, STIP1对胃癌化疗抵抗的调控作用减弱。因此, 我们认为调控EGR1影响DNA损伤修复促进胃癌5-氟尿嘧啶化疗抵抗。

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [3] JOU E, RAJDEV L. Current and emerging therapies in unresectable and recurrent gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(20):4812-4823.
- [4] SCHMID AB, LAGLEDER S, GRÄWERT MA, et al. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop [J]. EMBO J, 2012, 31(6):1506-1517.
- [5] VAN DER SPUY J, KANA BD, DIRR HW, et al. Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs [J]. Biochem J, 2000, 345 Pt 3:645-651.
- [6] COLLUM RG, BRUTSAERT S, LEE G, SCHINDLER C. A

- Stat3 -interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(18): 10120-10125.
- [7] BERALDO FH, ARANTES CP, SANTOS TG, et al. Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress -inducible protein 1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(47):36542-36550.
- [8] CAETANO FA, LOPES MH, HAJJ GN, et al. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1 [J]. J Neurosci, 2008, 28(26):6691-6702.
- [9] HUANG LL, ZHAI ET, CAI SR, et al. Stress -inducible Protein -1 promotes metastasis of gastric cancer via Wnt/ β -catenin signaling pathway. J Exp Clin Cancer Res [J]. 2018, 37(1):6.
- [10] SHI WJ, GAO JB. Molecular mechanisms of chemoresistance in gastric cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2016, 8(9): 673-681.
- [11] WEI Y, YANG P, CAO S, et al. The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy [J]. Arch Pharm Res, 2018 Jan, 41(1):1-13.
- [12] ZHANG YZ, AN JH, LIU YX, et al. XRCC2 -Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3):1207-1219.
- [13] KEIJZERS G, BAKULA D, SCHEIBYE -KNUDSEN M. Monogenic Diseases of DNA Repair [J]. N Engl J Med, 2017 Nov 9, 377(19):1868-1876.
- [14] KHAN FA, ALI SO. Physiological Roles of DNA Double-Strand Breaks [J]. J Nucleic Acids, 2017, 2017:6439169.
- [15] KIM JW, KIM JY, KIM JE, et al. HOXA10 is associated with temozolomide resistance through regulation of the homologous recombinant DNA repair pathway in glioblastoma cell lines [J]. Genes Cancer, 2014, 5(5-6):165-174.
- [16] ZHANG X, ZHANG Z, ZHANG Q, et al. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM [J]. Cell Death Dis, 2018 Jan 19, 9(2):57.
- [17] CHEN G, CHEN J, QIAO Y, et al. ZNF830 mediates cancer chemoresistance through promoting homologous -recombination repair [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(3):1266-1279.
- [18] CHEN X, LI WF, WU X, et al. Dicer regulates non-homologous end joining and is associated with chemosensitivity in colon cancer patients [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(9):873-882.
- [19] SUN M, NIE FQ, ZANG C, et al. The Pseudogene DUXAP8 Promotes Non -small -cell Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion by Epigenetically Silencing EGR1 and RHOB [J]. Mol Ther, 2017, 25(3):739-751.
- [20] SHAJAHAN -HAQ AN, BOCA SM, JIN L, et al. EGR1 regulates cellular metabolism and survival in endocrine resistant breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(57):96865-96884.
- [21] YOON TM, KIM SA, LEE DH, et al. EGR1 regulates radiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4):1717-1722.
- [22] ZHENG L, PU J, JIANG G, et al. Abnormal expression of early growth response 1 in gastric cancer: association with tumor invasion, metastasis and heparanase transcription [J]. Pathol Int, 2010, 60(4):268-267.