

CBL通过泛素化降解NCK2抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭

宋筱羽¹, 肖斌², 陆景润³, 张文武², 李锦潮⁴, 竹昕², 孙朝晖⁴, 李林海^{1,2}

¹南方医科大学检验与生物技术学院, 广东 广州 510515; ²广州医科大学附属第六医院, 清远市人民医院检验医学部, 广东 清远 511500; ³贵阳市第一人民医院医学检验科, 贵州 贵阳 550002; ⁴中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广东 广州 510010

摘要:目的 阐明 Casitas B 系淋巴瘤(CBL)蛋白对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响并探讨其作用机制。方法 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MCF7 常规培养, 实验分为 NC 组、过表达 CBL 组和 siNC 组、siCBL 组, 采用克隆形成法和细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)、伤口愈合实验、Transwell 实验检测过表达(沉默)CBL 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响; 流式细胞术和 Western blot 验证 CBL 对乳腺癌细胞周期进程、细胞周期标志物和上皮-间充质转化(EMT)的影响; 罗丹明标记的鬼笔环肽染色细胞骨架观察 CBL 对细胞丝状伪足数量的影响。采用 IP-质谱法筛选 CBL 的相互作用蛋白并确定 NCK2 为研究对象。实验分为 CBL 组、NCK2 组、CBL+NCK2 组, 通过免疫共沉淀(IP)和免疫荧光共定位实验验证 CBL 与 NCK2 蛋白互作情况。通过环己酰亚胺追踪实验和泛素化实验检测 CBL 对 NCK2 蛋白稳定性和泛素化的影响。采用 CCK-8 和 Transwell 实验检测 NCK2 对 CBL 介导的乳腺癌细胞增殖及迁移能力的影响。结果 过表达 CBL 组的细胞增殖、迁移、侵袭能力显著降低($P<0.05$); 沉默 CBL 组的细胞增殖、迁移、侵袭能力显著增加($P<0.01$)。沉默 CBL 促进 MCF7 细胞周期 G1/S 转换($P<0.05$)。过表达 CBL 下调乳腺癌细胞周期相关蛋白 CDK2/4($P<0.01$)、Cyclin A2/B1/D1/D3/E2($P<0.05$)、EMT 相关蛋白 Snail、N-Cadherin、Claudin-1($P<0.05$), 同时上调 E-Cadherin($P<0.05$); 沉默 CBL 上调乳腺癌细胞周期相关蛋白 CDK2/4/6($P<0.05$)、Cyclin A2/B1/D1/D3/E2($P<0.05$), EMT 相关蛋白 Snail、Vimentin、Claudin-1($P<0.05$), 同时下调 E-Cadherin($P<0.05$)。过表达 CBL 使乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中丝状伪足数量减少; 沉默 CBL 使乳腺癌细胞系 MCF7 中丝状伪足数量增加。NCK2 与 CBL 相互作用。过表达 CBL 抑制 NCK2 蛋白稳定性($P<0.05$), 并促进其泛素降解($P<0.01$)。过表达 NCK2 能够逆转 CBL 介导的乳腺癌细胞增殖和迁移的抑制作用($P<0.01$)。结论 CBL 可通过泛素化降解 NCK2 抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: CBL; 酪氨酸激酶非催化区蛋白 2; E3 连接酶; 泛素化; 细胞增殖; 细胞侵袭

CBL inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells by ubiquitylation-mediated degradation of NCK2

SONG Xiaoyu¹, XIAO Bin², LU Jingrun³, ZHANG Wenwu², LI Jinchao⁴, ZHU Xin², SUN Zhaohui⁴, LI Linhai^{1,2}

¹School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Laboratory Medicine, Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511500, China; ³Department of Laboratory Medicine, First People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550002, China; ⁴Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theatre Command of PLA, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To observe the effects of Casitas B lymphoma (CBL) protein on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells and explore its mechanism of action. **Methods** Cultured breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7A were transfected with a CBL-overexpressing plasmid and a specific siRNA targeting CBL (siRNA-CBL), respectively, and the changes in cell proliferation, migration and invasion were examined using colony-forming assay, cell counting kit-8 (CCK-8), scratch test and Transwell assay. Flow cytometry and Western blotting were performed to examine the effects of CBL overexpression on cell cycle and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of MDA-MB-231 cells, and the changes in the number of filamentous pseudopodia were observed by rhodamine-labeled phalloidin staining of the cytoskeleton. IP-mass spectrometry identified NCK2 as the interacting proteins of CBL, and their interaction was verified by immunoprecipitation and immunofluorescence co-localization experiments in HEK-293T cells transfected with the plasmids for overexpression of CBL, NCK2, or both. Cycloheximide tracking and ubiquitination assays were used for assessing the effects of CBL on stability and ubiquitination of NCK2 protein in MDA-MB-231 cells; CCK-8 and Transwell assays were used to determine the effect of NCK2 overexpression on CBL-mediated proliferation and migration of the cells. **Results** The proliferation, migration and invasion were significantly suppressed in MDA-MB-231 cells overexpressing CBL ($P<0.05$) and significantly enhanced in MCF7 cells with CBL silencing ($P<0.01$). Silencing of CBL promoted G1/S transition in MCF7 cells ($P<0.05$). Overexpression of CBL significantly decreased the expressions of CDK2/4 ($P<0.01$), cyclin A2/B1/D1/D3/E2 ($P<0.05$), Snail, N-cadherin, claudin-1 ($P<0.05$), and upregulated the expression of E-cadherin ($P<0.05$). CBL silencing upregulated the expressions of CDK2/4/6 ($P<0.05$), cyclin A2/B1/D1/D3/E2 ($P<0.05$), Snail, vimentin, and claudin-1 ($P<0.05$) and down-regulated E-cadherin expression ($P<0.05$). CBL

overexpression obviously reduced the number of filamentous pseudopodia in MDA-MB-231 cells, and the reverse changes were observed in MCF7 cells with CBL silencing. In MDA-MB-231 cells, CBL overexpression lowered NCK2 protein stability ($P<0.05$) and promoted its ubiquitin-mediated degradation ($P<0.01$). Overexpression of NCK2 obviously reversed CBL-mediated inhibition of cell proliferation and

收稿日期: 2022-07-02

基金项目: 国家自然科学基金(81802634); 全军卫勤保障能力创新与生成专项(20WQ029); 广州市科技计划-民生科技攻关项目(201903010060); 全军装备科研项目(LB20191A010001)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81802634).

作者简介: 宋筱羽, 在读硕士研究生, E-mail: 656893503@qq.com

通信作者: 李林海, 主任技师, 博士生导师, E-mail: mature303@126.com

migration ($P < 0.01$). **Conclusion** CBL can inhibit the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through ubiquitination-mediated degradation of NCK2.

Keywords: CBL; tyrosine kinase non-catalytic region protein 2; E3 ligase; ubiquitylation; cell proliferation; cell invasion

乳腺癌已成为世界范围内40岁以下女性癌症死亡的第2大原因,每年全世界新发病例约24.4万^[1]。国内女性乳腺癌发生率呈现年轻化趋势,年轻乳腺癌患者普遍存在就诊时间晚,确诊多为晚期,预后较差的特点^[2,3]。挖掘新的诊断和预后评估标志物以提升乳腺癌的早期诊断和疗效监测手段刻不容缓。

泛素蛋白酶体系统(UPS)是细胞周期进程的关键驱动因素,该系统中E3连接酶的功能失调与癌症有密切关联^[4]。E3连接酶CBL蛋白是Casitas B系淋巴瘤蛋白家族的一员。CBL蛋白家族N端都拥有高度保守的酪氨酸激酶结合结构域和RING结构域,两者均参与泛素化调控^[5]。将黑色素瘤细胞植入小鼠体内后,CBL敲除小鼠的肿瘤促进血管生成的能力更强,表明CBL通过抑制肿瘤血管生成进而抑制黑色素瘤的发生发展^[6]。但其在乳腺癌中的作用仍不明确。课题组前期围绕E3泛素连接酶CBL展开系列研究,已证实CBL在乳腺癌组织中的mRNA和蛋白表达水平均低于癌旁组织;CBL的表达水平在乳腺癌TNM分级和临床分期的进展逐渐降低,并且高表达CBL与乳腺癌患者预后良好呈正相关^[7]。以上结果提示,CBL可能是潜在的抑癌基因,但其在乳腺癌中的生物学作用仍不清楚,其泛素降解底物和作用机制也值得深入探究。

酪氨酸激酶非催化区蛋白2(NCK2)蛋白包含SH2/SH3结构域,可将磷酸酪氨酸信号与肌动蛋白动力学结合,介导细胞伪足形成从而促进血管形成和细胞迁移^[8]。NCK2通过激活伪足小体介导的细胞外基质作用促进内皮细胞的趋化迁移和侵袭^[9]。NCK2还能够促进酪氨酸蛋白磷酸化并下调细胞表面粘附蛋白表达,进而促进人黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[10]。研究证实NCK2在乳腺癌组织中显著高表达并与乳腺癌侵袭高度相关^[8,9],但其分子机制仍未阐明,NCK2的泛素降解机制也有待探索。

本研究旨在探究CBL对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,验证CBL与NCK2的相互作用,阐明CBL促进NCK2的泛素降解的机理,以明确CBL/NCK2调控轴在乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK-293T细胞系与人乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7(ATCC,中国科学院上海细胞库)。DMEM培养基(高糖)、胎牛血清(FBS)、Trizol及NucBlue™

Live ReadyProbes™试剂(Invitrogen)。反转录试剂、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)[宝生物工程(大连)有限公司]。RIPA裂解液、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒、SDS-PAGE电泳凝胶配置试剂盒、ECL超敏化学发光试剂盒、5×Loading buffer、1×Loading buffer(碧云天)。RT-qPCR法所需引物中CBL正向引物序列为5'-TCTACATGAAGTGCATCCCATCA-3',反向引物序列为5'-AAGAGGACCAGGGCTGAAAGA-3';NCK2正向引物序列为5'-CTACGTGGAGCGGAAGAACA-3',反向引物序列为5'-GAAGTCGCTGGGCTAGTGTG-3';GAPDH正向引物序列为5'-GGTATGACAACGAA TTTGGC-3',反向引物序列为5'-GAGCACAGGGTAC TTTATTG-3',(广州擎科生物技术有限公司)。siNC、siRNA-CBL(5'-TCGGATTACTAAAGCAGAT-3')(广州锐博生物技术有限公司)。Lipofectamine™3000转染试剂盒、PageRuler预染蛋白Ladder(Thermo Fisher Scientific),细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(日本同仁化学研究所),Transwell小室(Corning),Matrigel基质胶(BD),免疫(共)沉淀试剂盒、环己酰亚胺、PI细胞周期与凋亡试剂盒(上海爱必信生物科技有限公司),罗丹明标记鬼笔环肽(北京索莱宝科技有限公司),细胞周期调控抗体采样试剂盒、上皮-间充质转化(EMT)抗体采样试剂盒、兔抗Flag、HA标签一抗、鼠抗Flag、HA标签一抗、兔抗GAPDH一抗、鼠抗Ub一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔(鼠)免疫球蛋白G(IgG)二抗(Cell Signaling Technology)。鼠抗人CBL抗体(Bioworld),兔抗人NCK2抗体(Abcam)。His-Ub质粒及对应的空质粒载体骨架为pcDNA3.1,重组plenti-SFB-CBL质粒及对应空质粒的载体骨架为Plenti-puro,pCDH-HA-NCK2质粒、pLVX-DsRed-NCK2质粒、pEGFP-CBL质粒及对应的空质粒载体骨架均为pCDH-CMV-MCS-EF1-CoGFP-T2A-puro(南昌聚焦生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用10% FBS的DMEM培养基,在37℃、5%体积分数的CO₂条件下培养MDA-MB-231、MCF7、HEK-293T细胞,待细胞生长至75%融合时,使用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的各细胞进行研究。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种至6孔板中,2.0×10⁵/孔,随机分为NC组(转染Plenti-puro对照质粒)、过表达CBL组(转染plenti-SFB-

CBL质粒);取对数生长期的MCF7细胞接种至6孔板中, 1.5×10^5 /孔, 随机分为siNC组(转染siNC)、siCBL组(转染siRNA-CBL)。转染前将6孔板中培养基更换为DMEM培养基。MDA-MB-231细胞每孔加入4 μ L Lipofectamine™ 3000试剂、3 μ g质粒及6 μ L P3000试剂; MCF7细胞每孔加入4 μ L Lipofectamine™ 3000试剂、10 μ L siRNA。转染6 h后换液, 将细胞置于培养箱中继续培养。

1.2.3 RT-qPCR法和Western blot 上述1.2.2转染的细胞培养48 h后, 提取各组细胞内的总RNA, 采用RT-qPCR法检测各组细胞中的CBL和NCK2的mRNA表达; 使用RIPA裂解液提取各组细胞内的总蛋白, BCA试剂盒检测总蛋白浓度, 加入1/4体积5 \times Loading buffer后煮沸15 min。采用Western blot检测各组细胞中的CBL蛋白水平, 其中鼠抗人CBL一抗(1:1000), 兔抗人NCK2一抗(1:1000), 兔抗GAPDH一抗(1:1000), 细胞周期调控抗体试剂盒与EMT抗体试剂盒一抗稀释比例均为1:1000, 羊抗兔二抗(1:2000), 羊抗鼠二抗(1:2000)。

1.2.4 克隆形成与CCK-8法检测细胞增殖能力 制备上述1.2.2转染后各实验组及对照组MDA-MB-231与MCF7细胞悬液, 以 1×10^3 /孔接种于6孔板中, 直到出现肉眼可见的克隆时停止培养, 4%多聚甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色10 min, 清洗后晾干并拍照; CCK-8法按照上述1.2.2实验分组或随机分为NC+NC组(转染2 μ g pCDH对照质粒、2 μ g Plenti-puro对照质粒)、NC+CBL(转染2 μ g pCDH对照质粒、2 μ g plenti-SFB-CBL质粒)组、CBL+NCK2组(转染2 μ g plenti-SFB-CBL质粒、2 μ g pCDH-HA-NCK2质粒), 转染24 h后以 2×10^3 /孔接种于96孔板中, 每组设置4个平行复孔并在37 $^{\circ}$ C下培养0、24、48、72和96 h。随后将10 μ L CCK-8试剂加入每孔, 在37 $^{\circ}$ C下孵育2 h后使用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度($A_{450\text{nm}}$)值。

1.2.5 Transwell实验检测细胞迁移能力 将Transwell小室置于24孔板, 在下室加入600 μ L 10% FBS的DMEM培养基, 按照上述1.2.4中CCK-8法实验分组, 制备转染后各实验组及对照组MDA-MB-231与MCF7细胞悬液, 以 5×10^4 /200 μ L加入上室, 在37 $^{\circ}$ C下培养24 h后, 将小室膜下表面浸入4%多聚甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色10 min, 清洗后晾干, 在显微镜下观察各组迁移细胞数目并随机选择3个视野拍照。

1.2.6 Matrigel基质胶实验检测细胞侵袭能力 将涂有Matrigel基质胶的Transwell小室置于24孔板, 在下室加入600 μ L 10% FBS的DMEM培养基, 于37 $^{\circ}$ C培养箱中放置2 h, 后续操作步骤与1.2.4相同。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的MCF7细胞接种至6孔板中, 1.5×10^5 /孔, 随机分为siNC

组(转染siNC)、siCBL组(转染siRNA-CBL)。收集转染后24 h各实验组及对照组MCF7细胞悬液, 1000 g离心5 min, 弃上清。沉淀用1 mL预冷的PBS重悬, 再次1000 g离心5 min, 弃上清, 用1 mL -20 $^{\circ}$ C预冷的75%乙醇轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C固定过夜。每组细胞加入0.5 mL配置好的PI染色工作液重悬, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 通过流式细胞仪检测细胞周期, 激发光波长为488 nm。

1.2.8 鬼笔环肽染色细胞骨架 按照上述1.2.2实验分组转染24 h后从6孔板中取出各实验组及对照组MDA-MB-231与MCF7细胞爬片, PBS清洗细胞2次后使用4%甲醛溶液进行细胞固定10 min。PBS清洗细胞2次, 用0.5% Triton X-100溶液透化处理5 min, PBS清洗后每张爬片滴加200 μ L配制好的罗丹明标记鬼笔环肽工作液, 室温避光孵育30 min。用PBS清洗盖玻片3次, 使用200 μ L DAPI溶液复染5 min后封片, 置于倒置激光共聚焦显微镜下观察并拍摄。

1.2.9 IP-质谱法 取对数生长期的HEK-293T细胞接种至6 cm培养皿中, 随机分为NC组(转染2 μ g Plenti-puro对照质粒)、过表达CBL组(转染2 μ g plenti-SFB-CBL质粒), 转染步骤同1.2.2。转染48 h后收集各实验组及对照组MDA-MB-231细胞总蛋白, 向细胞裂解液中加入鼠抗人CBL一抗(1:100)置于4 $^{\circ}$ C轻柔混合过夜, 加入5 μ L Protein A和5 μ L Protein G后在4 $^{\circ}$ C温和地混匀3 h, 12 000 g离心后使用1 \times loading buffer重悬沉淀, 煮沸15 min后进行SDS-PAGE电泳, 使胶条保持湿润并于4 $^{\circ}$ C保存, 由上海中科新生命生物科技有限公司采用质谱技术对胶条进行鉴定及分析。

1.2.10 免疫共沉淀(IP)实验 取对数生长期的HEK-293T细胞接种至6 cm培养皿中, 随机分为CBL组(转染2 μ g plenti-SFB-CBL质粒、2 μ g pCDH对照质粒)、NCK2组(转染2 μ g pCDH-HA-NCK2质粒、2 μ g Plenti-puro对照质粒)、CBL+NCK2组(转染2 μ g plenti-SFB-CBL质粒、2 μ g pCDH-HA-NCK2质粒)。转染步骤同1.2.2。转染后48 h使用RIPA裂解液提取各组细胞内的总蛋白, 正向co-IP实验中取500 μ L细胞裂解液, 添加兔抗Flag标签一抗4 μ g, 置于4 $^{\circ}$ C轻柔混合过夜, 加入5 μ L Protein A和5 μ L Protein G后在4 $^{\circ}$ C温和地混匀3 h, 12 000 g离心后使用1 \times loading buffer重悬沉淀, 煮沸15 min后进行Western blot并分别使用鼠抗Flag、HA标签一抗(1:1000)检测各组SFB-CBL与HA-NCK2标签蛋白表达。反向co-IP实验中取500 μ L细胞裂解液添加兔抗HA标签一抗4 μ g, 其余步骤与正向co-IP实验相同。另取80 μ L细胞裂解液加入20 μ L 5 \times Loading buffer, 煮沸15 min后通过Western blot检测各组Input中SFB-CBL与HA-NCK2标签蛋白表达。

1.2.11 免疫荧光共定位实验观察 CBL 与 NCK2 互作 将 pLVX-DsRed-NCK2 质粒和 pEGFP-CBL 质粒共转至 HEK-293T 细胞和 MDA-MB-231 细胞。具体步骤同上述 1.2.2。转染 48 h 后滴加 NucBlue™ Live ReadyProbes™ 试剂使细胞核着色,置于倒置激光共聚焦显微镜下观察并拍摄 NCK2 和 CBL 的荧光表达情况。

1.2.12 环己酰亚胺追踪实验检测 CBL 对 NCK2 蛋白稳定性的影响 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种至 6 孔板中,随机分为 NCK2 组(转染 2 μ g pCDH-HA-NCK2 质粒、2 μ g Plenti-puro 对照质粒)、CBL+NCK2 组(转染 2 μ g plenti-SFB-CBL 质粒、2 μ g pCDH-HA-NCK2 质粒)。转染后 24 h 加入环己酰亚胺(终浓度为 100 μ mol/L),分别提取环己酰亚胺处理 0、3、6、12、24 h 后各组总蛋白,进行 Western blot 并使用兔抗人 NCK2 一抗(1:1000)检测 NCK2 蛋白水平。

1.2.13 泛素化实验检测 CBL 对 NCK2 蛋白泛素化水平的影响 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种至 6 cm 培养皿中,随机分为空白对照组(未转染)、NCK2 组(转染 Plenti-puro 对照质粒、pcDNA3.1 对照质粒、pCDH-HA-NCK2 质粒)、NCK2+Ub 组(转染 Plenti-puro 对照质粒、pCDH-HA-NCK2 质粒、His-Ub 质粒)、CBL+NCK2+Ub 组(转染 plenti-SFB-CBL、pCDH-HA-NCK2、His-Ub 质粒);取对数生长期的 MCF7 细胞接种至 6 cm 培养皿中,随机分为空白对照组(未转染)、siNC+NCK2 组(转染 siNC、pcDNA3.1 对照质粒、pCDH-HA-NCK2 质粒)、siNC+NCK2+Ub 组(转染 siNC、pCDH-HA-NCK2、His-Ub 质粒)、siCBL+NCK2+Ub 组(转染 siRNA-CBL、pCDH-HA-NCK2、His-Ub 质粒)。转染后 48 h 使用 RIPA 裂解液提取各组细胞内的总蛋白,直接取 80 μ L 细胞裂解液煮沸后通过 Western blot 检测各组 Input 中 CBL、NCK2 蛋白的表达水平;使用兔抗 Flag 标签一抗(1:1000)进行 IP 实验,并使用鼠抗 Ub 一抗(1:1000)检测各组蛋白的泛素标记水平,使用兔抗人 NCK2 一抗(1:1000)检测 NCK2 蛋白水平。

1.2.14 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。对计量资料进行正态性和方差齐性的检验,呈正态分布且方差齐的计量资料采用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。多组比较采用方差分析,两两比较采用 LSD。非正态分布的计量资料使用中位数 \pm 四分位数间距($M\pm IRQ$)表示,使用 wilcoxon 秩和检验进行各组间相互比较。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CBL 抑制乳腺癌细胞增殖

根据 CCLE 网站 (<https://sites.broadinstitute.org/ccle/>) 中 CBL 在不同乳腺癌细胞中的表达水平(图 1A),且 CBL 在乳腺癌组织和细胞中低表达,我们预测 CBL

是乳腺癌的抑癌基因,故选择侵袭性较弱的 Luminal 型 MCF7 细胞中敲低 CBL,并在侵袭性较强的 TNBC 型 MDA-MB-231 细胞中过表达 CBL。Western blot 实验表明过表达和敲低 CBL 的乳腺癌细胞构建成功(图 1B)。克隆形成实验显示,与对照组相比,过表达 CBL 的 MDA-MB-231 细胞形成集落的数量显著下降($P<0.05$,图 1C),沉默 CBL 的 MCF7 细胞形成集落的数量显著上升($P<0.01$,图 1D);CCK-8 法结果表明,过表达 CBL 的 MDA-MB-231 细胞的增殖能力显著低于对照组($P<0.01$,图 1E),敲低 CBL 后,细胞增殖能力显著增强($P<0.01$,图 1F)。Western blot 实验证明过表达 CBL 下调乳腺癌细胞周期相关蛋白 CDK2/4、Cyclin A2/B1/D1/D3/E2($P<0.05$,图 1G);沉默 CBL 上调 CDK2/4/6、Cyclin A2/B1/D1/D3/E2($P<0.05$,图 1H);流式细胞术分析结果显示沉默 CBL 后 S 期细胞比例显著提高($P<0.05$,图 1I、J)。

2.2 CBL 抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭

伤口愈合实验结果显示,过表达 CBL 后,由划痕两侧向伤口中心迁移的距离缩短($P<0.01$,图 2A),敲低 CBL 后,迁移的距离比对照细胞更大($P<0.01$,图 2B);Transwell migration 和 invasion 实验检测结果显示,过表达 CBL 后,迁移至下室的细胞数目比对照组显著减少($P<0.01$,图 2C、E),而沉默 CBL 后,细胞迁移数目明显增加($P<0.01$,图 2D、F)。Western blot 实验证明过表达 CBL 下调间充质标志物 Snail、N-Cadherin、Claudin-1 的表达($P<0.05$,图 2G),同时上调上皮标志物 E-Cadherin 的表达($P<0.05$,图 2G);沉默 CBL 上调 Snail、Vimentin、Claudin-1 的表达($P<0.05$,图 2G),同时下调 E-Cadherin 的表达($P<0.05$,图 2G)。鬼笔环肽染色细胞骨架结果显示过表达 CBL 的 MDA-MB-231 细胞丝状伪足数量减少,而沉默 CBL 的 MCF7 细胞丝状伪足数量增加(图 2H)。

2.3 CBL 的相互作用蛋白图谱鉴定

利用 IP 从稳定过表达 CBL 的 293T 细胞及对照细胞的细胞裂解液中将 CBL 及其相互作用蛋白分离纯化,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并采用液相色谱串联质谱技术对凝胶中的蛋白定性,将检测到的肽段与数据库比对,得到 588 个可能与 CBL 有相互作用的蛋白(肽段 ≥ 1);将对比得到的候选蛋白进行 GO 功能注释及 KEGG 通路富集,发现 CBL 的相互作用蛋白主要参与细胞代谢与细胞周期进程(图 3A);将筛选出检测到肽段 ≥ 3 且排名靠前的候选蛋白使用 STRING 在线软件预测,发现 CBL 蛋白可能与 NCK2、CD2 相关蛋白(CD2AP)等蛋白存在相互作用(图 3B)。NCK2 作为酪氨酸激酶适配器蛋白家族的一员可促进卵巢癌的发生发展,但其在乳腺癌中的作用仍不清楚。因此,我们选择 NCK2 作为 CBL 的底物蛋白进行后续研究。

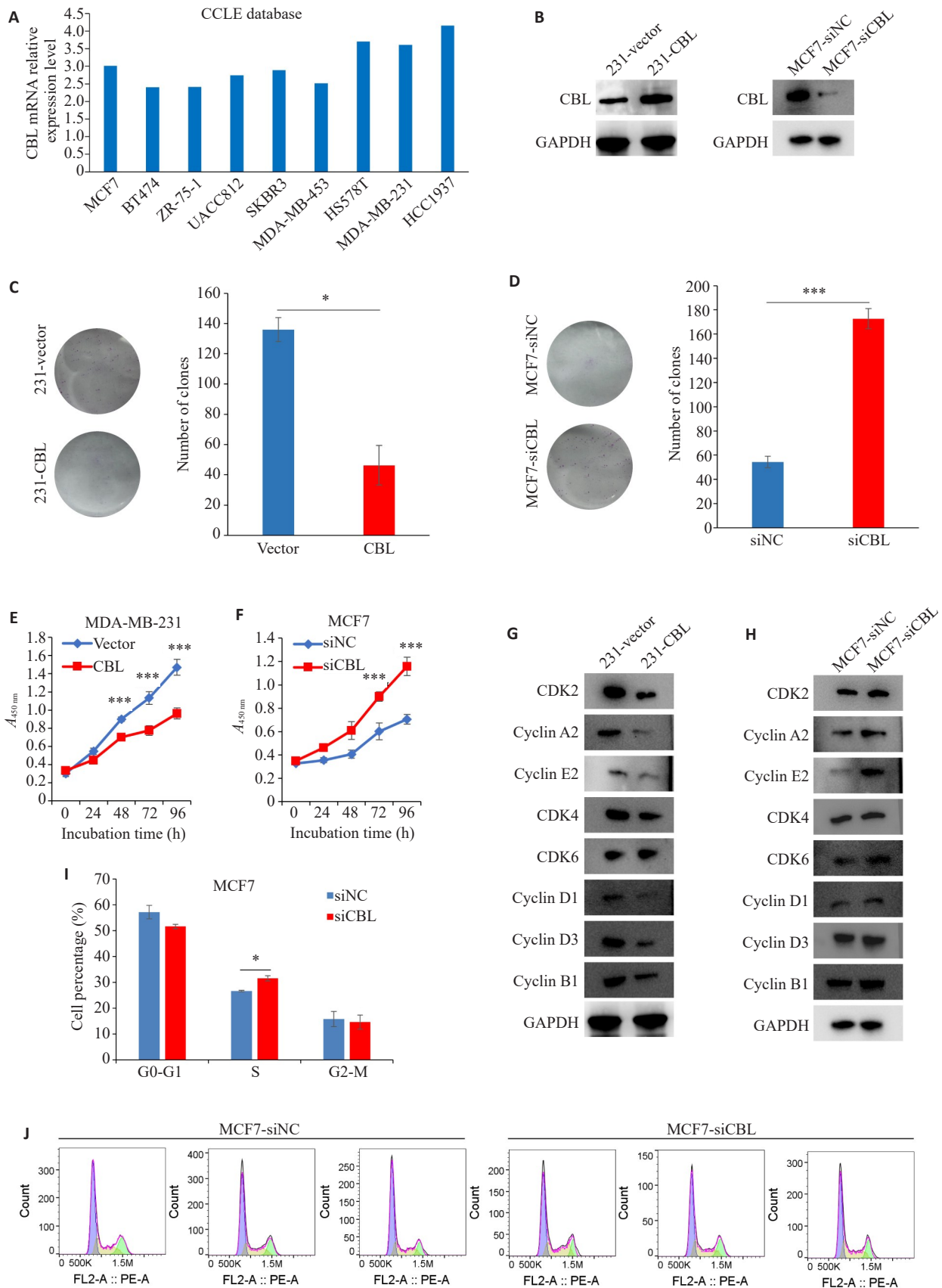


图1 过表达(沉默)CBL对乳腺癌细胞增殖的生物学作用

Fig.1 Effects of CBL overexpression and knockdown on proliferation of breast cancer cells. **A**: Analysis of CBL mRNA expression levels in different breast cancer cells based on data from the CCLE website. **B**: Western blotting of CBL. **C**, **D**: Colony-forming assay of the cells seeded at 1×10^3 cells per well in a 6-well plate. **E**, **F**: Assessment of proliferation of the cells seeded at 2×10^3 cells per well in 96-well plates (with 4 parallel wells per group and cultured at 37 °C for 0, 24, 48, 72 and 96 h before measurement of OD value at 450 nm). **G**, **H**: Western blotting of CDK2/4/6, cyclin A2/B1/D1/D3/E2. **I**, **J**: Cell cycle detection by flow cytometry. * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

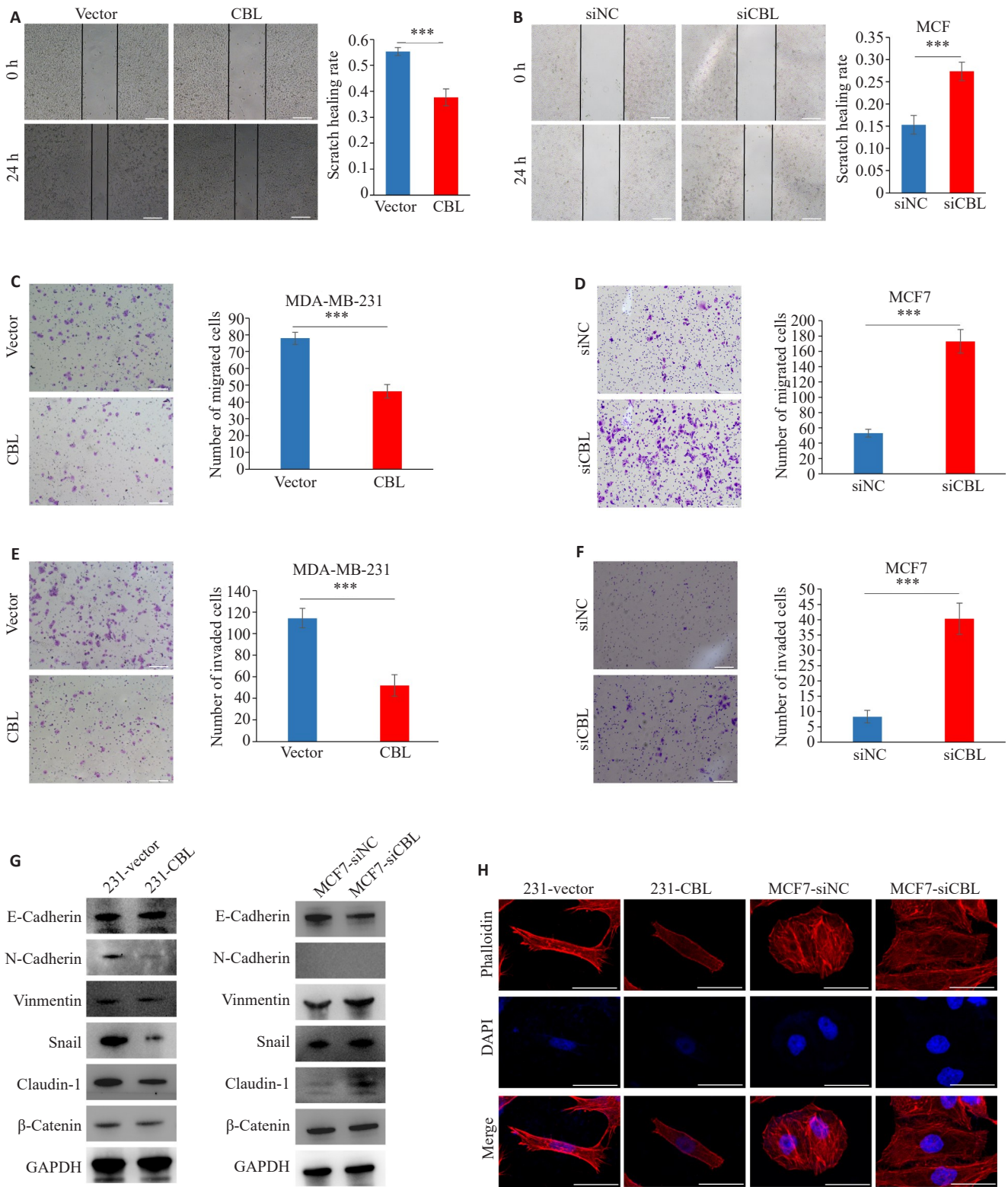


图2 过表达(沉默)CBL对乳腺癌细胞迁移和侵袭的生物学作用

Fig.2 Effects of CBL overexpression and knockdown on migration and invasion of breast cancer cells. A, B: Detection of wound healing 24 h after scratch. C-F: Transwell assay of the cells using Matrigel matrix gel (5×10⁴ cells/200 μL). G: Western blots of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Snail, claudin-1, and β-catenin. H: Staining of the cytoskeleton with phalloidin after cell transfection. ***P<0.01.

2.4 CBL与NCK2相互作用

免疫荧光共定位结果显示,CBL蛋白定位于细胞质,NCK2蛋白定位于细胞质和细胞核。在荧光叠加图

中,CBL与NCK2共定位于细胞质中,显示为黄色荧光(图3C);双向co-IP实验结果显示,使用Flag-tag抗体下拉SFB-CBL后,可以在IP复合物中检测到HA-NCK2,

反之使用HA-tag 抗体下拉 HA-NCK2后,可以在 IP 复合物中检测到 SFB-CBL(图 3D、E)。基于 NCK2 与 CBL 相互作用,我们推测 NCK2 可能是 CBL 作为 E3 泛素连接酶的底物蛋白。

2.5 CBL 促进 NCK2 的泛素降解

过表达 CBL 抑制 NCK2 蛋白表达,而沉默 CBL 增强了 NCK2 蛋白表达(图 4A),但过表达 CBL 对 NCK2 的 mRNA 水平没有显著影响(图 4B)。环己酰亚胺追踪实验结果表明:过表达 CBL 降低了 NCK2 蛋白稳定性($P < 0.05$,

图 4C);泛素化实验结果显示:过表达 CBL 增强了 NCK2 蛋白泛素化水平($P < 0.01$,图 4D),沉默 CBL 后 NCK2 蛋白泛素化水平降低($P < 0.01$,图 4E)。

2.6 NCK2 是 CBL 的功能性底物蛋白

CCK8 实验结果显示过表达 NCK2 能够部分恢复由过表达 CBL 导致的乳腺癌细胞增殖抑制作用($P < 0.01$,图 4F)。Transwell migration 实验结果显示过表达 NCK2 能够部分中和过表达 CBL 介导的乳腺癌细胞迁移抑制作用($P < 0.01$,图 4G)。

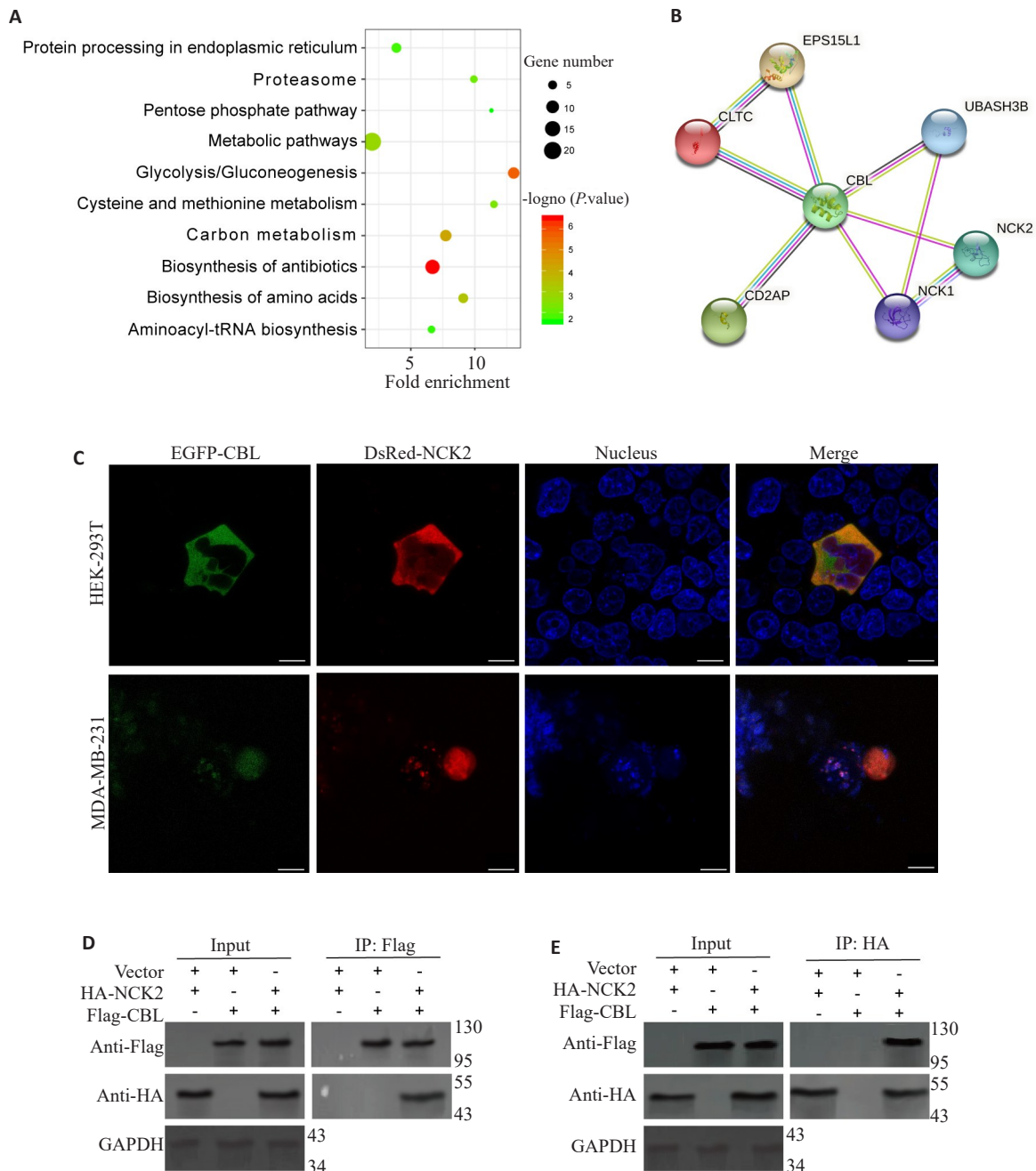


图3 CBL与NCK2相互作用鉴定

Fig.3 Identification of the interaction between CBL and NCK2. A: Enrichment of the KEGG pathway after screening of the peptides detected by IP-mass spectrometry. B: The top-ranked candidate proteins screened for peptides ≥ 3 were predicted using STRING online software. C: Fluorescence distribution of NCK2 and CBL in 293T and MDA-MB-231 cells under inverted laser confocal microscopy. D, E: co-IP of NCK2 and CBL in 293T cells detected by WB.

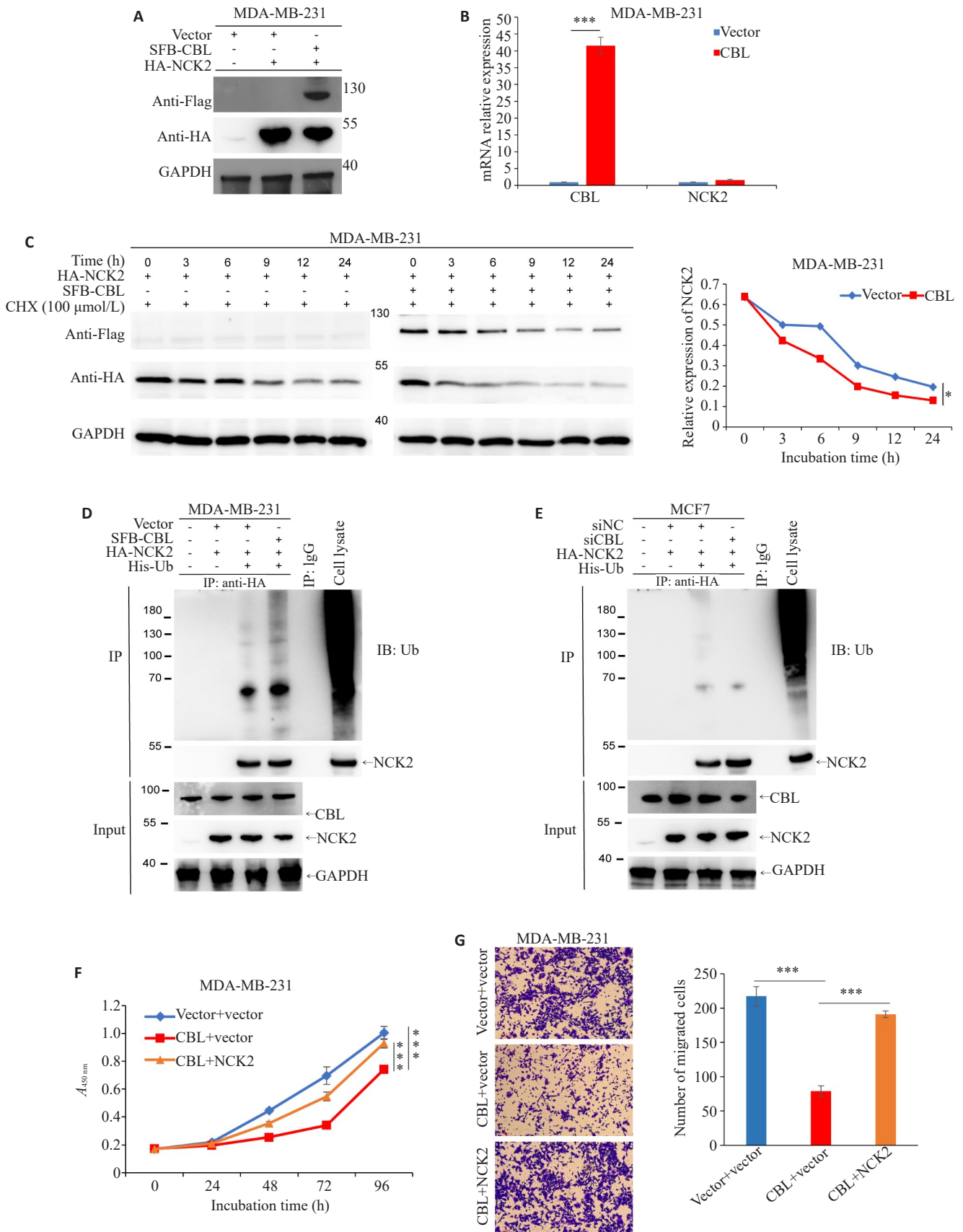


图4 CBL对NCK2表达水平、稳定性和泛素降解的影响及NCK2在乳腺癌中的生物学作用

Fig.4 Effects of CBL on expression level, stability and ubiquitin degradation of NCK2 and biological role of NCK2 in breast cancer. **A**: Effect of overexpression of CBL on NCK2 protein levels detected by Western blotting. **B**: Effect of overexpression of CBL on NCK2 mRNA levels detected by RT-qPCR. **C**: Effect of overexpression of CBL on stability of NCK2 protein detected by Western blotting. **D**, **E**: Effect of overexpression and knockdown of CBL on NCK2 protein ubiquitination detected by Western blotting. **F**: OD values at 450 nm after 0, 24, 48, 72 and 96 h of culture in each group. **G**: Transwell assay of the cells. * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

3 讨论

当前对CBL的研究主要是集中在其作为E3连接酶介导底物泛素化的功能上,已有研究探明CBL可与富含SH2或SH3结构域的蛋白互作进而影响不同的信号通路^[11,12],同时有报道CBL同家族的CBLB能够抑制乳腺癌细胞的EMT进程^[13]。实验证明CBL抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,因此我们初步验证了CBL对细胞周期、EMT相关蛋白的影响,发现过表达(沉默)CBL下调(上调)CDK2、Cyclin A2/E2的能力最为显著,结合流式分析细胞周期显示敲低CBL后乳腺癌细胞S期占比显著增加,提示CBL可能通过抑制CDK2与Cyclin E2的结合阻滞乳腺癌细胞的G1/S期转换与S期DNA复制,从而抑制乳腺癌细胞的增殖能力。甲基转移酶样3(METTL3)的缺失导致EMT关键转录因子Snail的表达水平及其CDS和3'UTR区域被m6A甲基化的水平增加,从而激活细胞EMT进程^[14]。本研究证实CBL过表达(沉默)显著下调(上调)乳腺癌细胞中Snail蛋白水平、同时上调(下调)了E-Cadherin的表达,表明CBL可能通过抑制EMT进程影响乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

除了本研究中的CBL外,课题组还对CBL家族的CBLB和CBLC进行研究,并发现CBLB和CBLC均为抑癌基因(结果未报道)。CBL蛋白家族介导特定底物泛素降解的能力对于其抑癌作用至关重要。CBL家族蛋白的N端都拥有高度保守的TKB结构域及环指结构域,两者共同在CBL家族蛋白作为E3泛素连接酶发挥泛素化调控的过程中起决定性作用^[15-17]。

本研究证实CBL通过介导NCK2的泛素化修饰促进其降解,从而抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移侵袭能力,但CBL的抑癌能力和作用底物与CBLB、CBLC截然不同,其原因可能是CBL、CBLB和CBLC的C端结构域存在较大差异。CBL蛋白包含22个酪氨酸残基,C端的酪氨酸残基中Y700、Y731、Y774是最突出的磷酸化位点,CBLB包含的Y655和Y709磷酸化位点分别与Y700、Y774同源,可以与含有SH2结构域的蛋白相互作用^[18-21]。CBL蛋白特有的Y731位点的酪氨酸残基可以与PI3K的p85亚基的SH2结构域结合,进而调节PI3K的功能^[22-24]。Y731磷酸化位点是CBL蛋白独有的,我们认为该磷酸化位点可能导致了CBL与CBLB在底物识别上的差异。CBL与CBLB的C端都拥有一个保守的泛素化相关(UBA)结构域,UBA结构域能够相互作用,使CBL与CBLB各自形成同源或异源二聚体,但其具体作用尚不清楚^[18]。其中仅CBLB的UBA结构域可以与泛素化蛋白相互作用,并且抑制了许多泛素化蛋白的降解进程^[18,19]。这种现象可能导致了CBL与CBLB在介导底物泛素化能力上的差异。而CBLC

缺少UBA结构域,可能导致其在底物选择上与CBL和CBLB的差异性。

NCK家族可以介导促血管生成因子诱导的细胞骨架重构,导致内皮细胞定向迁移^[25],NCK2作为酪氨酸激酶适配器蛋白家族的一员,能够通过下游效应因子调节细胞骨架动力学^[26],并且NCK2可能通过与EMT和肿瘤血管生成相关的因子结合促进EMT进程,进而促进卵巢癌的发生发展^[8,27]。有研究证实NCK2通过上调Vimentin使卵巢癌细胞侵袭性增加^[16,28]。本研究发现:CBL抑制EMT进程关键因子Vimentin、N-Cadherin表达,并且CBL诱导NCK2蛋白泛素化并促进其降解,更重要的是,过表达CBL对乳腺癌细胞增殖迁移的抑制作用能够被过表达NCK2逆转,表明CBL可能通过泛素降解NCK2,抑制NCK2介导的EMT进程,从而影响乳腺癌细胞的发生发展,但其具体作用机制仍需深入研究。

综上所述,通过前期报道及本次研究结果^[7],我们对CBL在乳腺癌发生发展中的作用及其临床意义进行了探讨。该系列研究进一步完善了CBL/NCK2调控轴的分子机制,为靶向激活CBL治疗乳腺癌提供了一种可能。后续我们将深入研究CBL在细胞周期CDK2、Cyclin A2/E2蛋白的表达和EMT进程中的作用机制。

参考文献:

- [1] Daly AA, Rolph R, Cutress RI, et al. A review of modifiable risk factors in young women for the prevention of breast cancer [J]. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2021, 13: 241-57.
- [2] 梁家玮, 郭海峰. 乳腺癌中缺氧作用机制的研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*, 2022, 43(2): 122-5.
- [3] 叶丹, 李勇, 林琅, 等. 年轻乳腺癌诊断延迟影响因素及现状[J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(9): 1540-3.
- [4] Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(11): 1144-61.
- [5] Shalev M, Arman E, Stein M, et al. PTPRJ promotes osteoclast maturation and activity by inhibiting Cbl-mediated ubiquitination of NFATc1 in late osteoclastogenesis [J]. *FEBS J*, 2021, 288(15): 4702-23.
- [6] Lyle CL, Belghasem M, Chitalia VC. C-cbl: an important regulator and a target in angiogenesis and tumorigenesis [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 498.
- [7] 陆景润, 肖斌, 邓淳, 等. Casitas B系淋巴瘤原癌基因在乳腺癌组织中的表达水平及其临床预后分析[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(2): 149-54.
- [8] Fanelli M, Camperchioli A, Petrella L, et al. Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2 (NCK2) pathways as factor promoting aggressiveness in ovarian cancer [J]. *Int J Biol Markers*, 2018, 33(1): 124-31.
- [9] Chaki SP, Barhoumi R, Rivera GM. Nck adapter proteins promote podosome biogenesis facilitating extracellular matrix degradation and cancer invasion [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(17): 7385-98.

- [10] Labelle-Côté M, Dusseault J, Ismaïl S, et al. Nck2 promotes human melanoma cell proliferation, migration and invasion *in vitro* and primary melanoma-derived tumor growth *in vivo* [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 443.
- [11] Shen HR, Xu X, Fu ZP, et al. The interactions of CAP and LYN with the insulin signaling transducer CBL play an important role in polycystic ovary syndrome [J]. Metabolism, 2022, 131: 155164.
- [12] Vdovenko D, Bachmann M, Wijnen WJ, et al. The adaptor protein c-Cbl-associated protein (CAP) limits pro-inflammatory cytokine expression by inhibiting the NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 87: 106822.
- [13] Xu L, Zhang Y, Qu XJ, et al. E3 ubiquitin ligase cbl-b prevents tumor metastasis by maintaining the epithelial phenotype in multiple drug-resistant gastric and breast cancer cells [J]. Neoplasia, 2017, 19(4): 374-82.
- [14] Lin XY, Chai GS, Wu YM, et al. RNA m 6 A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2065.
- [15] Belizaire R, Koochaki SHJ, Udeshi ND, et al. CBL mutations drive PI3K/AKT signaling *via* increased interaction with LYN and PIK3R1 [J]. Blood, 2021, 137(16): 2209-20.
- [16] Ahmed SF, Buetow L, Gabrielsen M, et al. E3 ligase-inactivation rewires CBL interactome to elicit oncogenesis by hijacking RTK-CBL-CIN85 axis [J]. Oncogene, 2021, 40(12): 2149-64.
- [17] Liyasova MS, Ma K, Voeller D, et al. Cbl interacts with multiple E2s *in vitro* and in cells [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216967.
- [18] Paolino M, Thien CBF, Gruber T, et al. Essential role of E3 ubiquitin ligase activity in Cbl-b-regulated T cell functions [J]. J Immunol, 2011, 186(4): 2138-47.
- [19] Elly C, Witte S, Zhang Z, et al. Tyrosine phosphorylation and complex formation of Cbl-b upon T cell receptor stimulation [J]. Oncogene, 1999, 18(5): 1147-56.
- [20] Wang Y, Lai XW, Wu DP, et al. Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery through the miR-199a-3p/145-5p-mediated NGF/TrkA signaling pathway in rats [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 117.
- [21] Tang R, Langdon WY, Zhang J. Regulation of immune responses by E3 ubiquitin ligase Cbl-B [J]. Cell Immunol, 2019, 340: 103878.
- [22] Lee V, Griffin TD, Suzuki-Horiuchi Y, et al. Downregulation of Src-family tyrosine kinases by Srcasm and c-Cbl: a comparative analysis [J]. J Carcinog, 2021, 20: 21.
- [23] Blaize G, Daniels-Treffandier H, Aloulou M, et al. CD5 signalosome coordinates antagonist TCR signals to control the generation of Treg cells induced by foreign antigens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(23): 12969-79.
- [24] Luff DH, Wojdyla K, Oxley D, et al. PI3K δ forms distinct multiprotein complexes at the TCR signalosome in naïve and differentiated CD4+ T cells [J]. Front Immunol, 2021, 12: 631271.
- [25] Dubrac A, Künzel SE, Künzel SH, et al. NCK-dependent pericyte migration promotes pathological neovascularization in ischemic retinopathy [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3463.
- [26] Chang CJ, Chang MY, Lee YC, et al. Nck2 is essential for limb trajectory selection by spinal motor axons [J]. Dev Dyn, 2018, 247(9): 1043-56.
- [27] Xiong YP, He LL, Shay C, et al. Nck-associated protein 1 associates with HSP90 to drive metastasis in human non-small-cell lung cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 122.
- [28] Jacquet K, Banerjee SL, Chartier FJM, et al. Proteomic analysis of NCK1/2 adaptors uncovers paralog-specific interactions that reveal a new role for NCK2 in cell abscission during cytokinesis [J]. Mol Cell Proteomics, 2018, 17(10): 1979-90.

(编辑:余诗诗)