

• 论 著 •

OTUB2 表达下调对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及 PI3K/AKT 信号通路的影响^{*}

任舒婷¹, 魏晓巍², 任传路^{1△}

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院检验科, 江苏无锡 214044;

2. 南京医科大学第二附属医院检验医学中心, 江苏南京 210011

摘要:目的 探讨含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2(OTUB2)表达下调对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路的影响。方法 采用 Lipofectmine 2000 转染试剂向 MGC-803 细胞中转染 OTUB2 小干扰 RNA(si-OTUB2)序列(si-OTUB2 组)和 si-NC 序列(si-NC 组),以不进行任何转染的胃癌 MGC-803 细胞作为空白对照组。分别采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞中 OTUB2 mRNA 及蛋白的表达水平。采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力,Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力,Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、AKT、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)蛋白表达水平。结果 与空白对照组和 si-NC 组比较,si-OTUB2 组细胞中 OTUB2 mRNA 及蛋白表达水平降低($P<0.05$),细胞增殖能力减弱($P<0.05$),细胞迁移数和侵袭数减少($P<0.05$),细胞中 PCNA、N-cadherin 和 p-AKT 蛋白表达水平降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。结论 下调 OTUB2 可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭,其作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词:含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2; 胃癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.12.005

中图法分类号:R735.2

文章编号:1673-4130(2021)12-1427-05

文献标志码:A

Effect of down-regulation of OTUB2 expression on the proliferation, migration, invasion ability of gastric cancer cells and PI3K/AKT signaling pathway^{*}

REN Shuting¹, WEI Xiaowei², REN Chuanlu^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the 904th Hospital of Joint Logistic Support Force, PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China; 2. Laboratory Medicine Center, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China

Abstract: Objective To explore the effect of down-regulation of ubiquitin-aldehyde-binding protein 2 containing OTU domain (OTUB2) on the proliferation, migration and invasion ability of gastric cancer cells and the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway. **Methods** Used Lipofectmine 2000 transfection reagent to transfect MGC-803 cells with OTUB2 small interfering RNA (si-OTUB2) sequence (si-OTUB2 group) and si-NC sequence (si-NC group), and MGC-803 cells without any transfection were used as the blank control group. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression levels of OTUB2 mRNA and protein in the cells. CCK-8 method was used to detect cell proliferation ability, Transwell chamber was used to detect cell migration and invasion ability, Western blot was used to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA), E-cadherin, N-cadherin, AKT, phosphorylated protein kinase B (p-AKT) protein expression levels. **Results** Compared with the blank control group and si-NC group, the expression levels of OTUB2 mRNA and protein in si-OTUB2 group were decreased ($P<0.05$), the cell proliferation ability was decreased ($P<0.05$), the number of cell migration and invasion were decreased ($P<0.05$), the expression levels of PCNA, N-cadherin and p-AKT protein were decreased ($P<0.05$), and the expression level of E-cadherin protein was increased ($P<0.05$). **Conclusion**

^{*} 基金项目:全军医药卫生科研基金课题(15MS033)。

作者简介:任舒婷,女,主管技师,主要从事肿瘤免疫与自身免疫研究。△ 通信作者, E-mail:clu_ren@126.com。

本文引用格式:任舒婷,魏晓巍,任传路. OTUB2 表达下调对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(12): 1427-1430.

Down-regulation of OTUB2 can inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells, and its mechanism of action may be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: ubiquitin-aldehyde-binding protein 2 containing OTU domain; gastric cancer; proliferation; migration; invasion; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B signaling pathway

胃癌是全球最常见的肿瘤之一,由于早期症状不明显,大多数胃癌患者在确诊时已处于晚期或出现远处转移^[1-3]。胃癌致病和转移机制的复杂性和多因素性被认为是降低该病患者生存率的主要原因。目前,迫切需要能早期识别胃癌进展的关键分子标志物,以帮助临床早期治疗,改善患者预后。含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2(OTUB2)是一种去泛素化酶,属于卵巢肿瘤超家族蛋白,首次在果蝇卵巢肿瘤基因中被发现^[4]。研究表明,OTUB2 有广泛的生物学作用,包括防止病毒诱导激活干扰素调节因子 3 (IRF3)和核因子- κ B(NF- κ B)^[5],促进人类胰腺胰岛 β 细胞生存^[6],并维持 DNA 修复途径,促进乳腺癌和肺癌的进展和转移^[7-10]。然而关于 OTUB2 在胃癌发生、发展中的作用尚不清楚。本研究观察了下调 OTUB2 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人胃癌细胞系 MGC-803 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 仪器与试剂 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Lipofectamine 2000 转染试剂和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,OTUB2 小干扰 RNA(si-OTUB2)及其对照 si-NC 购自上海吉玛制药技术有限公司,PrimeScript RT 试剂盒和 SYBR Premix ExTaq RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,TaqMan 试剂盒购自美国 BioVision 公司,OTUB2 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,CCK-8 试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司,增强化学发光(ECL)试剂盒和二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒购自上海恒斐生物科技有限公司,基质胶购自美国 Thermo 公司,兔多克隆抗体 OTUB2、增殖细胞核抗原(PCNA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、AKT、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)和 GAPDH 购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、转染 所有细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 的湿化培养箱中培养。使用 Lipofectamine 2000 转染试剂根据说明书向 MGC-803 细胞转染 si-OTUB2 序列(si-OTUB2 组)及阴性对照 si-NC 序列(si-NC 组),另设置空白对照组不做任何转染处理。采用实时荧光定

量 PCR(RT-qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测 OTUB2 的转染情况。

1.3.2 RT-qPCR 检测细胞中 OTUB2 mRNA 表达水平 采用 Trizol 试剂并按照说明书要求提取细胞中的总 RNA;采用 PrimeScript RT 试剂盒反转录合成 cDNA;采用 SYBR Premix ExTaq RT-PCR 试剂盒扩增 cDNA;采用 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 水平。以 GAPDH 作为内参基因,使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 OTUB2 mRNA 的表达水平。引物序列,OTUB2:上游引物 5'-ACACTTGGAAACCGGCT-TGAC-3',下游引物 5'-AGCACACGGACTGTCCTGA-3';GAPDH:上游引物 5'-CAGCAAGAGCACAAGAG-GAA-3',下游引物 5'-ATGGTACATGACAAGGT-GCGG -3'。实验重复 3 次。

1.3.3 Western blot 检测细胞中 OTUB2 蛋白表达水平 转染后从细胞中分离出总蛋白,采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白表达水平。蛋白标本经 12% SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,在脱脂乳中封闭后加入 1 : 1 000 稀释的一抗 OTUB2 和 GAPDH,并在 4 °C 孵育过夜,随后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗在室温下孵育 2 h。利用 ECL 检测系统观察蛋白质。以 OTUB2 蛋白条带与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示 OTUB2 蛋白的表达水平。实验重复 3 次。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖情况 按照 CCK-8 试剂盒说明书,将 4 000 个处于对数生长期的 MGC-803 细胞接种到 96 孔板中,培养 96 h。每隔 24 h 加入 CCK-8 试剂,然后孵育 2 h。使用分光光度计检测 450 nm 波长处的吸光度(A)值,用于反映细胞的增殖情况。实验重复 3 次。

1.3.5 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力 细胞迁移实验:将具有 8 mm 孔径的 Transwell 小室放入 24 孔板中检测细胞的迁移能力。将 200 μ L 细胞悬浮液(1 000 个细胞)悬浮于不含胎牛血清的 DMEM 培养基中,然后加入上室中。随后将 500 μ L 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入下室中。24 h 后,用磷酸盐缓冲液冲洗并用结晶紫染色,计算迁移细胞数量。细胞侵袭实验:实验前将 60 μ L 基底胶(50 μ g/mL)加到上室板表面,孵育 2 h,其余步骤同细胞迁移实验。实验重复 3 次。

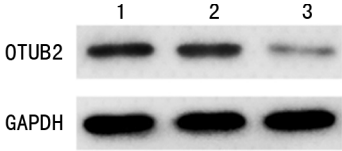
1.3.6 Western blot 检测细胞中 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平 检测步骤同 1.3.3,不同的是在脱脂乳中封闭后,加入 1 : 1 000 稀释的一抗 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平。

in、AKT、p-AKT 和 GAPDH。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染 si-OTUB2 的胃癌细胞中 OTUB2 的表达情况 与空白对照组和 si-NC 组比较,si-OTUB2 组 OTUB2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。



注:1 为空白对照组;2 为 si-NC 组;3 为 si-OTUB2 组。

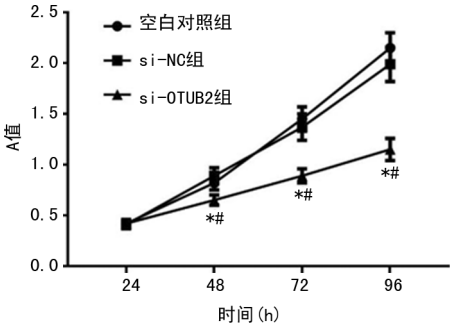
图 1 Western blot 检测 3 组细胞中 OTUB2 蛋白的表达情况

表 1 3 组细胞中 OTUB2 mRNA、蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	OTUB2 mRNA	OTUB2 蛋白
空白对照组	3	1.07±0.02	0.45±0.03
si-NC 组	3	1.00±0.01	0.47±0.01
si-OTUB2 组	3	0.29±0.02* [#]	0.07±0.01* [#]
<i>F</i>		77.341	110.292
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.2 转染 si-OTUB2 的胃癌细胞增殖能力的变化 与空白对照组和 si-NC 组比较,si-OTUB2 组细胞增殖能力减弱 ($P < 0.05$)。见图 2。



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

图 2 3 组细胞的生长曲线

表 3 3 组细胞中 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、p-AKT 和 AKT 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCNA	E-cadherin	N-cadherin	p-AKT	AKT
空白对照组	3	0.83±0.06	0.06±0.03	0.64±0.05	0.71±0.10	0.84±0.10
si-NC 组	3	0.81±0.06	0.07±0.02	0.62±0.06	0.70±0.10	0.84±0.08
si-OTUB2 组	3	0.30±0.03* [#]	0.69±0.02* [#]	0.35±0.07* [#]	0.34±0.09* [#]	0.85±0.11
<i>F</i>		50.868	93.348	8.024	24.169	0.262
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 转染 si-OTUB2 的胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力的变化 与空白对照组和 si-NC 组比较,si-OTUB2 组细胞迁移数和侵袭数均减少 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 2。

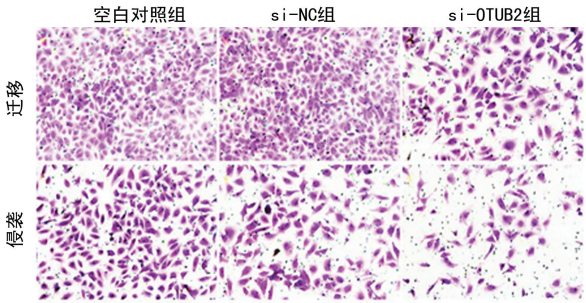


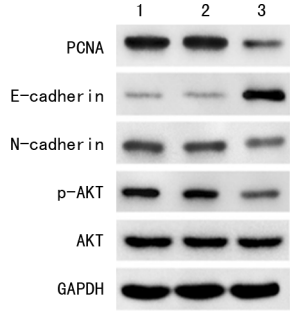
图 3 3 组细胞迁移和侵袭情况

表 2 3 组细胞迁移数和侵袭数比较 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	<i>n</i>	细胞迁移数	细胞侵袭数
空白对照组	3	193.00±8.19	138.00±4.58
si-NC 组	3	186.00±10.82	136.00±9.00
si-OTUB2 组	3	75.33±8.74* [#]	38.33±6.51* [#]
<i>F</i>		81.207	85.183
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.4 转染 si-OTUB2 的胃癌细胞中 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、AKT 和 p-AKT 蛋白表达情况 与空白对照组和 si-NC 组比较,si-OTUB2 组细胞中 PCNA、N-cadherin 和 p-AKT 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 4 和表 3。



注:1 为空白对照组;2 为 si-NC 组;3 为 si-OTUB2 组。

图 4 3 组细胞中 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、p-AKT 和 AKT 蛋白的表达情况

3 讨 论

OTUB2 在调控 DNA 修复通路、病毒触发信号、胰腺细胞活性和肿瘤进展等方面发挥着重要作用。其中,OTUB2 决定 DNA 修复途径的选择,在 DNA 双链断裂反应的早期调节环指蛋白 8(RNF8)介导的致死因子恶性脑瘤样蛋白 1 抗体(L3MBTL1)泛素化^[7]。LI 等^[5]研究发现,OTUB2 可通过直接介导肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 3 和 TRAF6 (TRAF3 和 TRAF6 是 NF- κ B 所需的两种 E3 泛素连接酶)的去泛素化来抑制病毒引发的 I 型干扰素诱导。此外,OTUB2 在肿瘤进展中也发挥了重要作用。MA 等^[11]的研究表明,OTUB2 可以通过 NF- κ B 信号通路促进甲状腺癌细胞的增殖和侵袭。ZHANG 等^[9]发现,OTUB2 通过激活不依赖于 Hippo 的 Yes 相关蛋白(YAP)和具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子(TAZ),促进乳腺癌的体内转移。LI 等^[10]的研究显示,OTUB2 通过 AKT/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路稳定 U2 小核 RNA 辅助因子 2 (U2AF2),促进非小细胞肺癌的瓦尔堡效应,促进肿瘤发生和转移。本研究发现,OTUB2 在胃癌中发挥癌基因的作用,敲减 OTUB2 可以显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

PCNA 是一种重要的真核复制辅助因子,在 DNA 复制和修复、细胞周期调控和细胞凋亡等方面发挥着重要作用,与细胞增殖、DNA 合成、肿瘤细胞的生长密切相关,是反映细胞增殖活性的重要指标^[12-14]。E-cadherin 和 N-cadherin 是参与上皮间质转化(EMT)的相关蛋白,分别是上皮细胞标志物和间质细胞标志物^[15]。肿瘤转移是一个多步骤的细胞生物学过程,包括一个关键事件 EMT,EMT 通过促进上皮细胞去极性,减少上皮细胞标志物的表达,诱导间质细胞标志物的表达,从而促使良性肿瘤发展为恶性转移性肿瘤^[16]。本研究结果显示,下调 OTUB2 的表达后,胃癌细胞中 PCNA 和 N-cadherin 蛋白的表达水平均明显降低,E-cadherin 蛋白的表达水平升高,进一步验证了下调 OTUB2 可以抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的结论。

PI3K/AKT 通路的改变广泛存在于包括胃癌在内的多种肿瘤中,对肿瘤的发生和发展起着至关重要的作用,其中 AKT 在被 PI3K 磷酸化后激活,可促进肿瘤的进展^[17-18]。此外,PI3K/AKT 通路参与细胞增殖、凋亡、转移和 EMT 等多种生物学过程^[19-20]。本研究在胃癌细胞中敲减 OTUB2 基因,从而显著抑制了 PI3K/AKT 信号通路中 p-AKT 的表达,说明下调 OTUB2 的表达可能是通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活化来抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

综上所述,在胃癌细胞中,下调 OTUB2 的表达能显著抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其作用机

制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。OTUB2 有望成为胃癌的潜在预后评估指标和治疗靶点。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA G D, et al. Gastric cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 71 (2): 127-164.
- [3] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2016, 388 (10060): 2654-2664.
- [4] NANA O M H, TCHERNIUK S O, CHROBOCZEK J, et al. Crystal structure of human otubain 2 [J]. EMBO Reports, 2004, 5 (8): 783-788.
- [5] LI S, ZHENG H, MAO A P, et al. Regulation of virus-triggered signaling by OTUB1-and OTUB2-mediated deubiquitination of TRAF3 and TRAF6 [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (7): 4291-4297.
- [6] BECK A, VINIK Y, SHATZ-AZOULAY H, et al. Otubain 2 is a novel promoter of beta cell survival as revealed by siRNA high-throughput screens of human pancreatic islets [J]. Diabetologia, 2013, 56 (6): 1317-1326.
- [7] KATO K, NAKAJIMA K, UI A, et al. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice [J]. Molecular Cell, 2014, 53 (4): 617-630.
- [8] JOHMURA Y, YAMASHITA E, SHIMADA M, et al. Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 31194.
- [9] ZHANG Z, DU J, WANG S, et al. OTUB2 promotes cancer metastasis via Hippo-independent activation of YAP and TAZ [J]. Molecular Cell, 2019, 73 (1): 7-21.
- [10] LI J, CHENG D, ZHU M, et al. OTUB2 stabilizes U2AF2 to promote the Warburg effect and tumorigenesis via the AKT/mTOR signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Theranostics, 2019, 9 (1): 179-195.
- [11] MA Y, SUN Y. miR-29a-3p inhibits growth, proliferation, and invasion of papillary thyroid carcinoma by suppressing NF- κ B signaling via direct targeting of OTUB2 [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 13-23.
- [12] 李德江, 王兵, 马立人. 沉默 Galectin-3 基因对甲状腺癌细胞生长的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53 (4): 488-492.
- [13] 顾清, 张莉, 张新星, 等. 抑制 ERBB2 基因对肝癌 HepG2 细胞生长及 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54 (1): 19-23.
- [14] LI N, DENG W, MA J, et al. Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer [J]. Med Oncol, 2015, 32 (1): 433-437.