

· 论 著 ·

NLK 通过 Smad4 负调控 TGF β 信号通路*张力民, 詹轶群, 李 围, 杨晓明 Δ

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要:目的 探讨 NLK 对转化生长因子 β (TGF β) 信号通路的影响及其分子机制。方法 采用蛋白质稳定性实验检测 NLK 对 Smad4 蛋白质降解的影响; 体内泛素化实验检测过表达 NLK 对 Smad4 泛素化修饰的影响; 荧光素酶报告基因实验检测 NLK 对 TGF β 信号通路报告基因载体 CAGA-luc 和 3TP-luc 的影响; 实时定量 PCR 技术检测 NLK 对 TGF β 信号通路靶基因 p21 和 PAI-1 的影响。结果 在 HEK293T 细胞内, 过表达 NLK 促进 Smad4 的降解和泛素化修饰; 在 HEK293T 细胞内过表达 NLK 抑制细胞因子 TGF β 对 CAGA-luc 和 3TP-luc 的激活作用; 在 HepG2 细胞内过表达 NLK 抑制 TGF β 信号通路靶基因 p21 和 PAI-1 的表达。结论 NLK 促进 Smad4 的泛素化修饰和降解, 进而抑制 TGF β 信号通路。

关键词: NLK; Smad4 蛋白质; 转生长因子 β ; 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)15-1829-03

NLK negatively regulate TGF β signaling pathway via Smad4*Zhang Limin, Zhan Yiqun, Li Wei, Yang Xiaoming Δ

(The Research Institute of Radiation Medicine, the Academy of Military Medicine Science, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To study the effect of NLK on TGF β signaling pathway and explore the molecular mechanism. **Methods** Protein stability assay was used to determine the influence of NLK on the degradation of Smad4. In vivo ubiquitination assay was applied to detect the effect of NLK on the ubiquitination of Smad4. Luciferase reporter gene assay was used to detect the effect of NLK on CAGA-luc and 3TP-luc, the responsive reporter of TGF β signaling pathway. Real time PCR was applied to examine the effect of NLK on the expression of p21 and PAI-1, the target genes of TGF β signaling pathway. **Results** In HEK293T cell, over expression of NLK promotes the degradation and ubiquitination of Smad4. In HEK293T cells, Ectopic expression of NLK inhibits the activity of CAGA luc and 3TP luc stimulated by TGF β . In HepG2 cells, over expression of NLK inhibits the expression of p21 and PAI 1, the target genes of TGF β signaling pathway. **Conclusion** NLK promotes the ubiquitination and degradation of Smad4, consequently inhibits TGF β signaling pathway.

Key words: NLK; Smad4 protein; TGF β ; signaling pathway

NLK 是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 识别靶蛋白中的 S/TP 模序, 通过对靶蛋白进行磷酸化修饰的方式调控其活性, 进而影响靶蛋白参与的生物学过程^[1]。NLK 可磷酸化转录因子 c-myc, 磷酸化的 c-myc 在 E3 泛素连接酶 Fbxw7 的作用下被泛素化修饰, 进而通过蛋白酶体降解^[2]。NLK 在多个物种的胚胎发育过程中发挥至关重要的作用。在爪蟾胚胎发育过程中, NLK 的缺失导致爪蟾头部发育异常^[3]。在海胆胚胎发育过程中, Notch 信号通路激活 NLK 的激酶活性, NLK 磷酸化 TCF 并抑制 TCF- β -catenin 复合体的活性, 促进海胆胚胎的中胚层诱导过程^[4]。在小鼠中, 非经典 wnt 信号通路通过 CaMK II-TAK1 级联反应激活 NLK, NLK 磷酸化 SETDB1 并与 CHD7 结合形成 NLK-SETDB1-CHD7 转录抑制复合体, 抑制核转录因子 PPAR γ 的转录活性, 关闭靶基因的表达, 从而促进小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[5]。NLK 与肿瘤发生存在密切的联系, 在不同肿瘤中发挥不同的功能。在肝癌细胞中, NLK 的表达水平升高, NLK 可促进细胞周期关键调控蛋白-CyclinD1 的表达, 因此, NLK 在肝癌中发挥癌基因的功能^[6]。在前列腺癌中, NLK 抑制雄激素受体的表达和转录活性, 促进前列腺癌细胞的凋亡, 发挥抑癌基因的作用^[7]。

转化生长因子 β (TGF β) 信号通路在调控细胞生长、增殖、

分化、胚胎发育等过程中发挥不可替代的作用。TGF β 信号通路调控异常可引起纤维化和肿瘤等多种疾病。Smad 蛋白家族是 TGF β /Smad 信号通路进行信号转导的关键分子。Smad 家族可分为三类: R-Smad (Smad1/5/8, Smad2/3)、Co-Smad (Smad4) 和 I-Smad (Smad6/7)^[8]。蛋白激酶可通过影响 Smad 家族蛋白的磷酸化修饰调控 TGF β 信号通路。CDK2/4 介导 Smad3 第 8 位苏氨酸、第 179 位苏氨酸和 213 位丝氨酸的磷酸化修饰, 抑制 Smad3 的转录活性, 进而抑制 TGF β 信号通路^[9]。ERK 通过磷酸化 Smad2 第 8 位苏氨酸增强 Smad2 的转录活性^[10]。关于 Smad4 的磷酸化修饰报道较少, ERK 可磷酸化 Smad4 第 277 位的苏氨酸, 促进 Smad4 进入细胞核^[11]。NLK 可与 Smad4 相互作用并磷酸化 Smad4 第 9 位苏氨酸和第 138 位丝氨酸^[12], 但 NLK 与 Smad4 相互作用的功能并不清楚。本研究中, 笔者发现 NLK 可通过增强 Smad4 的泛素化修饰促进 Smad4 的降解, 进而负调控 TGF β 信号通路的活性。

1 材料与方法

1.1 材料 Flag-NLK、Flag-NLK(KM)、HA-Ub、myc-Smad4、CAGA-luc、3TP-luc 和 pRL-TK 载体为实验室前期构建保存。myc 抗体(9E10)、Smad4 抗体(B-8)、 β -actin 抗体(C4)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠抗体(sc-2005)和 ProteinA/G PLUS-

agarose(sc-2003)购自 Santa Cruz 公司。Flag 抗体(M2)、HA 抗体(12CA5)、MG132(C2211)和放线菌酮(CHX)购自 Sigma 公司。DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。细胞总 RNA 纯化试剂盒、反转录 PCR 试剂盒、被动裂解液和荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。HEK293T 细胞, HepG2 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, Hyclone), 5% CO₂, 37 °C。

1.2 引物序列 PAI-1 实时定量 PCR 上游引物序列为: 5'-CTG ACA ACA GGA GGA GAA ACC-3', 下游引物序列为: 5'-AGA TCC CGC TGG ACG AAG-3'。p21 实时定量 PCR 上游引物序列为: 5'-CCC GTG AGC GAT GGA ACT-3', 下游引物序列为: 5'-CGA GGC ACA AGG GTA CAA GA。GAPDH 实时定量 PCR 上游引物序列为: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 下游引物序列为: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。Smad4 干扰序列为: 5'-GUA CUU CAU ACC AUG CCG A-3', 对照干扰序列为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3'。温和细胞裂解液: 50 mmol/L Tris-Cl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 1 mmol/L EDTA。RIPA 裂解液: 50 mmol/L Tris-Cl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS。

1.3 方法

1.3.1 Smad4 稳定性实验 在 NLK 对外源表达 myc-Smad4 蛋白的稳定性影响实验中, HEK293T 细胞转染 myc-Smad4 和不同量的 Flag-NLK 共转染 24 h 后, 细胞经胰酶消化, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次, 加 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 20 min 后, 12 000 r/min, 4 °C 离心 20 min 后, 加上样缓冲液沸水煮 5 min, Western blot 检测 myc-Smad4 蛋白表达水平。在 NLK 对内源 Smad4 蛋白稳定性影响实验中, HEK293T 细胞转染对照空载体或 Flag-NLK 表达载体, 转染 24 h 后, 加放线菌酮(CHX)阻断蛋白质合成, Western blot 检测在未加放线菌酮和加放线菌酮条件下, 过表达 NLK 对内源 Smad4 蛋白稳定性的影响。

1.3.2 体内泛素化实验 HEK293T 细胞转染相应表达载体, 24 h 后加 MG132 抑制蛋白质泛素化降解, 6 h 后收细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加 500 μL 温和细胞裂解液(加 0.25% SDS)冰上裂解 20 min, 超声裂解 1 min, 12 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 收集上清液, 加 2 μg anti-myc 抗体, 4 °C 结合 2 h 后, 加 40 μL Protein A/G PLUS-agarose 4 °C 结合过夜。结合完成后用高盐 NETN 洗 2 次, 低盐 NETN 洗 2 次, 加 50 μL 1×上样缓冲液, 100 °C 煮 10 min。Western blot 检测 Smad4 泛素化修饰情况。

1.3.3 荧光素酶报告基因实验 荧光素酶报告基因载体 CA-GA-luc 或 PAI-1-luc, 内参对照载体 pRL-TK 和 Flag-NLK 转染 HEK293T 细胞 24 h 后, 加细胞因子 TGFβ(5 ng/mL)刺激细胞 6 h, 刺激结束后, 用被动裂解液冰上裂解细胞 20 min, 用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测报告基因荧光素酶表达强度, 操作步骤按照产品使用说明书进行。

1.3.4 实时定量 PCR 实验 HepG2 细胞转染对照载体或 NLK 表达载体 24 h 后, 加 TGFβ 细胞因子刺激靶基因表达, 2 h 后, 细胞用胰酶消化, 离心收集细胞, 用 PBS 将细胞洗 1 次, 用细胞总 RNA 纯化试剂盒进行 RNA 提取。用逆转录 PCR 试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA, 操作步骤根据产品说明书进行。实时定量 PCR 检测 TGFβ 通路靶基因 p21、PAI-1 和内

参基因 GAPDH 的 mRNA 水平。实时定量 PCR 反应体系: 12.5 μL SYBR Green Realtime PCR Master Mix(QPK-201, TOYOBO), 1 μL 引物, 2 μL cDNA, 9.5 μL 去离子水。反应条件: 95 °C, 1 min。95 °C, 10 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 35 个循环。反应结束后, 以 GAPDH 为内参对照, 用 2^{-ΔΔCt} 法检测 NLK 对 p21 和 PAI-1 表达的影响。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NLK 降低 Smad4 的稳定性 在 HEK293T 细胞内转染 NLK 和 Smad4 表达载体, 检测 NLK 对外源 Smad4 蛋白水平的影响。结果显示过表达 NLK 可降低 Smad4 的蛋白水平(图 1A), 可能与降低 Smad4 蛋白质稳定性有关。为进一步证实 NLK 降低 Smad4 的稳定性, 检测了 NLK 对细胞内源 Smad4 蛋白水平的影响, 实验结果显示, 过表达 NLK 降低内源 Smad4 的蛋白水平(图 1B), 这些结果说明, NLK 促进 Smad4 的降解, 降低了 Smad4 的稳定性。

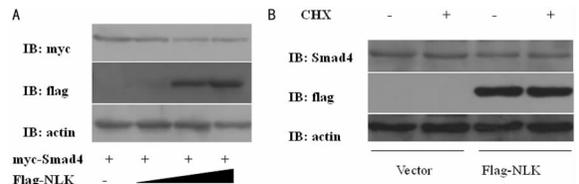


图 1 NLK 对 Smad4 蛋白质稳定性的影响

2.2 NLK 促进 Smad4 泛素化修饰 泛素化-蛋白酶体降解途径是调控蛋白稳定性的重要方式, 作者推测 NLK 可能通过促进 Smad4 的泛素化修饰促进 Smad4 的降解。在 HEK293T 细胞内过表达 Flag-NLK、myc-Smad4、HA-Ub 载体, 检测 NLK 对 Smad4 蛋白泛素化修饰的影响, 实验结果显示, 过表达 NLK 可促进 Smad4 的泛素化修饰, 说明 NLK 通过促进 Smad4 的泛素化修饰, 促进 Smad4 的降解, 见图 2。

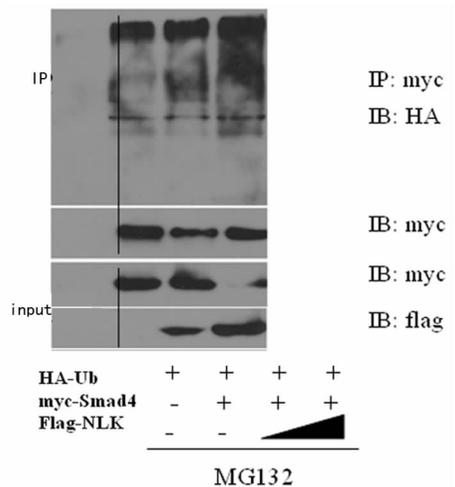


图 2 NLK 对 Smad4 泛素化修饰的影响

2.3 过表达 NLK 抑制 TGFβ 信号通路报告基因活性 CA-GA-luc 和 3TP-luc 是 TGFβ 信号通路的报告基因载体, 可用来反映 TGFβ 信号通路的活性。本实验中, 在 HEK293T 细胞系中转染 CA-GA-luc 和 PAI-1-luc 报告基因载体, 同时转染不同剂量的 NLK 过表达载体, 检测在 TGFβ 细胞因子刺激条件下, NLK 对报告基因活性的影响。实验结果显示, TGFβ 细胞因

子可显著提高报告基因载体的活性,过表达 NLK 显著抑制 TGFβ 对报告基因载体的激活作用,见图 3。

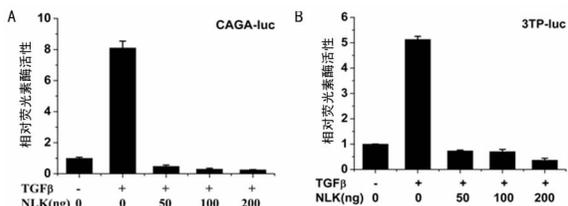


图 3 NLK 对 TGFβ 信号通路报告基因活性的影响

2.4 过表达 NLK 抑制 TGFβ 信号通路靶基因的表达 p21 和 PAI-1 是 TGFβ 信号通路的靶基因,在 HepG2 细胞内过表达 NLK,检测 NLK 对 p21 和 PAI-1 表达的影响。实验结果显示,TGFβ 刺激 2 h 可诱导 p21 和 PAI-1 的表达,过表达 NLK 抑制 TGFβ 对靶基因表达的诱导作用,见图 4。

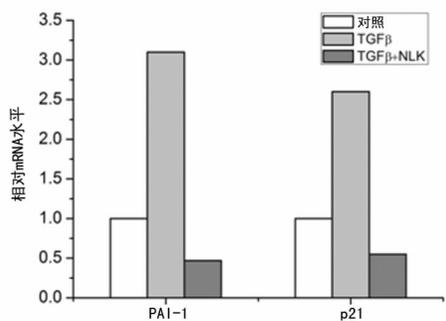


图 4 NLK 对 TGFβ 信号通路靶基因 PAI1 和 p21 表达的影响

3 讨论

多种蛋白可通过泛素-蛋白酶体降解途径调控 Smad4 的活性与功能,进而调控 TGFβ 信号通路。Jab1 与 Smad4 相互作用,过表达 Jab1 抑制内源 Smad4 的蛋白水平,并且 Jab1 负调控 TGFβ 信号通路^[13]。Smurf1、Smad7 与 Smad4 形成复合体,Smurf1 促进 Smad4 的泛素化修饰和降解^[14]。SCF 复合体通过其亚基 β-TrCP1 与 Smad4 相互作用,促进 Smad4 泛素化修饰和降解,抑制 TGFβ 信号通路^[15]。本研究中,笔者发现蛋白激酶 NLK 可促进 Smad4 的降解,进一步研究发现 NLK 可增强 Smad4 的泛素化修饰。Smad4 是 TGFβ 通路信号传递的必需分子,笔者发现过表达 NLK 可抑制 TGFβ 对报告基因载体 CAGA-luc 和 3TP-luc 的激活作用,说明 NLK 抑制 TGFβ 信号通路。笔者对 NLK 调控 TGFβ 信号通路的生物学意义进行了初步研究。有研究表明,NLK 与肿瘤的发生密切相关,但其分子机制尚不清楚。本实验发现,NLK 可抑制 TGFβ 信号通路靶基因 p21 和 PAI-1 的表达。p21 和 PAI-1 是 TGFβ 信号通路发挥抑制肿瘤活性的重要靶基因,因此笔者推测 NLK 可能通过抑制 TGFβ 信号通路促进肿瘤的发生、发展,因此,NLK 调控 TGFβ 信号通路的生理或病理机制有待深入研究。

参考文献:

[1] Ishitani TJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(4): 1379-1389.

[2] Kanei-Ishii C, Nomura T, Takagi T, et al. Fbxw7 acts as

an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase(NLK)-induced degradation[J]. J Biol Chem, 2008, 283(45): 30540-30548.

[3] Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 131-139.

[4] Röttinger E, Croce J, Lhomond G, et al. Nemo-like kinase (NLK) acts downstream of Notch/Delta signalling to down-regulate TCF during mesoderm induction in the sea urchin embryo[J]. Development, 2006, 133(21): 4341-4353.

[5] Takada I, Mihara M, Suzawa M, et al. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma transactivation [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(11): 1273-1285.

[6] Jung KH, Kim JK, Noh JH, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3): 687-696.

[7] Emami KH, Brown LG, Pitts TE, et al. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2009, 69(14): 1481-1492.

[8] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584

[9] Matsuura I, Denissova NG, Wang G, et al. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads[J]. Nature, 2004, 430(6996): 226-231.

[10] Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 4136-4138.

[11] Roelen BA, Cohen OS, Raychowdhury MK, et al. Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 85(4): 823-830.

[12] Shi Y, Ye K, Wu H, et al. Human SMAD4 is phosphorylated at Thr9 and Ser138 by interacting with NLK[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 333(1/2): 293-298.

[13] Wan M, Cao X, Wu Y, et al. Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation[J]. EMBO Rep, 2002, 3(2): 171-176.

[14] Morén A, Imamura T, Miyazono K, et al. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases[J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 2211-2215.

[15] Liang M, Liang YY, Wrighton K, et al. Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived Smad4 mutants by SCFSkp2 [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(17): 7524-7537.