

MYH9 维持 CTNNB1 蛋白的稳定性并通过 Wnt/ β -catenin 通路促进胶质瘤的增殖、迁移与耐药

颜欣 周海旭 覃德领 谭奔 韦选雷 罗起胜

(右江民族医学院 广西百色 533000)

【摘要】目的 探究MYH9和CTNNB1的表达通过Wnt信号通路对脑胶质瘤细胞增殖、迁移和耐药的影响。方法 通过生物信息学分析MYH9和CTNNB1在脑胶质瘤中的表达及对脑胶质瘤患者的影响。利用蛋白免疫印迹(Western blot)检测MYH9和CTNNB1对Wnt信号通路的影响。利用免疫共沉淀技术(Co-IP)和免疫荧光共定位技术检测MYH9、CTNNB1、USP14之间的相互作用。利用放线菌酮(CHX)和蛋白酶抑制剂(MG132)检测MYH9和USP14对CTNNB1蛋白半衰期的影响。结论 MYH9与CTNNB1在脑胶质瘤中高表达,共同促进脑胶质瘤的恶性与耐药。

【关键词】MYH9; 胶质瘤; CTNNB1; USP14; 去泛素化

MYH9 maintains the stability of the CTNNB1 protein and promotes the proliferation, migration, and drug resistance of glioma via the Wnt/ β -catenin pathway

Yan Xin Zhou Haixu Qin Deling Tan Ben wei Xuanlei Luo Qisheng
(Youjiang Medical College for Nationalities, Guangxi Baise 533000)

[Abstract] Objective To investigate the effects of MYH9 and CTNNB1 expression on the proliferation, migration and drug resistance of glioma cells through Wnt signaling pathway. Methods The expression of MYH9 and CTNNB1 in glioma and their effects on glioma patients were analyzed by bioinformatics. Western blot was used to detect the effects of MYH9 and CTNNB1 on the Wnt signaling pathway. The interaction between MYH9, CTNNB1 and USP14 was detected by co-immunoprecipitation (Co-IP) and immunofluorescence colocalization. The effects of MYH9 and USP14 on the half-life period of CTNNB1 protein were detected by cycloheximide (CHX) and protease inhibitor (MG132). Conclusion MYH9 and CTNNB1 are highly expressed in glioma, which jointly promote the malignancy and drug resistance of glioma.

[Keywords] MYH9; glioma; CTNNB1; USP14; deubiquitination

脑胶质瘤是大脑和脊髓胶质细胞发生癌变产生的肿瘤,作为我国乃至全球发病率和死亡率最高的原发性颅内肿瘤,目前临床上对于脑胶质瘤治疗方案主要以最大范围手术切除为主,再辅以常规放化疗以及靶向药物治疗^[1,2],流行病学调查显示脑胶质瘤的发病率以及死亡率依然在逐年上升^[3]。脑胶质瘤的发病病因复杂,主要与暴露于高剂量电离辐射、遗传突变、饮食以及感染等因素有关^[4,5]。目前有大量文献报道了脑胶质瘤的相关发病机制,但对于胶质瘤具体的发病过程依然缺乏一个全面的解释。因此,进一步探索脑胶质瘤发病过程中的肿瘤组织以及细胞变化规律,寻找与发病机制相关的特异分子靶标将有助于进一步完善脑胶质瘤相关机制研究和找到新的治疗靶点,且为脑胶质瘤的治疗提供新的思路。

非肌性肌球蛋白重链9(myosin heavy chain 9, MYH9)在22q13.1染色体上^[6],在脑胶质细胞中发现了MYH9的广泛表达,MYH9在细胞分裂、迁移、黏附、极化以及维持细胞形态和信号传导方面发挥重要作用^[7,8]。MYH9参与许多肿瘤的发病过程,它参与了肝癌^[9]、前列腺癌^[10]、非小细胞肺癌^[11]、乳腺癌^[12]、结直肠癌^[13]等肿瘤的发病过程。

CTNNB1基因位于3p22.1染色体,其编码的蛋白 β -catenin是一种黏附连接蛋白,介导细胞生长以及细胞间的黏附,对上皮细胞层的构建与维持起着重要作用^[14]。 β -catenin还是控制细胞生长和分化的经典Wnt信号通路作用中的关键信号分子,CTNNB1蛋白通过Wnt/ β -catenin信号途径促进肿瘤细胞的干性、增殖、EMT过程^[15]。

有研究表明MYH9在脑胶质瘤中作为促癌基因,能够促进胶质瘤的恶性进展以及化学耐药^[16],但MYH9与CTNNB1的联合研究目前尚无报道,我们通过对脑胶质瘤的前期研究表明,与正常脑组织相比,MYH9与CTNNB1在胶质瘤中高表达,此外干扰MYH9之后Wnt/ β -catenin通路的下游靶基因MCM6、c-Jun、c-Myc、cyclinD4的表达显著下降,这些结果显示MYH9在脑胶质瘤中可能通过Wnt/ β -catenin通路促进肿瘤细胞的增殖、迁移和耐药能力。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞:本实验所用HEB、U251、LN229、A172、U87细胞株均购买于中国科学院上海细胞库,保存在南方医科大学中西医结合医院中心实验室。

1.1.2 主要实验试剂: Tween20/TBS溶液(20 \times TBST, PH=7.4(北京/雷根生物)、培养基(上海/达特希尔)、胎牛血清(美国/Biotech)、胰酶(美国/Thermo)、细胞冻存液(上海/碧云天)、cck-8试剂盒(上海/碧云天)、Edu试剂盒(上海/碧云天)、4%多聚甲醛(北京/雷根生物)、甘氨酸(Sigma-Aldrich)、DAPI染色液(抗荧光淬灭型)(北京/雷根生物)、Lipofectamine3000(美国/Thermo)、Opti-MEMTM I 血清培养基(美国/Thermo)、RNA提取试剂盒(福际生物公司)、RIPA(强)(上海/碧云天)、IP裂解液(上海/碧云

天)、Evo M-MLV 反转录试剂盒(爱科瑞生物)、二抗稀释液(上海/碧云天)、QuickBlock 免疫荧光二抗稀释液(上海/碧云天)、Loading buffer(上海/碧云天)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京/TianGen)、SDS(Sigma-Aldrich)。

1.1.3 主要实验设备:细胞培养箱(美国/THERMO)、倒置荧光显微镜(日本/奥林巴斯)、共聚焦显微镜(德国/蔡司)、台式微量离心机(美国/BECKMAN)、台式高速冷冻离心机(湖南/湘仪)、全自动酶标仪(BIOTEK)、荧光定量PCR仪(ROCHE)。

1.1.4 引物:本章实验所用引物由广州艾基生物公司合成。

Primers names		Sequence(5-3)
MYH9	Forward	AGTTTGTCTCGGAGCTGTGG
	Reverse	GGTTCGTGTTCTCAGCGTA
CTNNB1	Forward	AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG
	Reverse	CGAGTCATTGCATACTGTCCAT
GAPDH	Forward	CATGGGTGTGAACCATGAGA
	Reverse	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

1.1.5 干扰片段及质粒:本章实验所用 Crispr/cas9 MYH9 sgRNA 由广州艾基生物公司设计并合成, plasmid 由广州锐博公司设计合成。

基因名	片段	Sequence(5-3)
MYH9	sg2	caccGTCAAAGCCACTCTTGTGCGGAgttt
USP14	Oligo(正义链)	UUGGUAACACUUGUUACAU
	Oligo(反义链)	AUGUACAAGUGUUACCAA

1.1.6 主要抗体:

Antibody	Cat.No	Comoany	Species	Dulution
MYH9	11128-1-AP	Proteintech	Rabbit	1: 2000
c-Myc	10828-1-AP	Proteintech	Rabbit	1: 1000
c-Jun	24909-1-AP	Proteintech	Mouse	1: 1000
USP14	14517-1-AP	Proteintech	Rabbit	1: 1000
USP14	67746-1-Ig	Proteintech	Mouse	1: 1000
CTNNB1	80488-1-RR	Proteintech	Rabbit	1: 1000
CCND1	26939-1-AP	Proteintech	Rabbit	1: 1000
GAPDH	pAb AP0063	Bioworld	Rabbit	1: 10000
GAPDH	10494-1-AP	Proteintech	Mouse	1: 5000

1.2 研究方法:

1.2.1 细胞培养:细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养, 孵育箱中的培养环境为 5% CO₂ 浓度、37° C 温度。

1.2.2 细胞转染:将干扰片段及质粒按 Lipofectamine3000 试剂盒说明转染到细胞中。

1.2.3 Co-IP:取 2 × 10⁷ 细胞为一组, 用特异 IP 裂解液将细胞裂解, BCA 试剂盒测量总蛋白浓度, 5mg 总蛋白中加入对应抗体或 igG 混合, 4° C 冰箱翻转过夜。磁珠去除非特异性后与抗体混合, 常温翻转 30min, 去除其余蛋白。洗脱, 回收蛋白, 进行 Western blot 实验。

1.2.4 免疫荧光共定位:取 5 × 10⁴ 细胞铺板于荧光小皿, 过夜培养, 固定、透化细胞后, 加入对应一抗、带荧光二抗, 加入 DAPI 染核, 使用荧光共聚焦显微镜(Carl Zeiss LSM800)

进行可视化。

1.2.5 CHX 和 MG132 处理:在细胞中加入 50 μg/ml CHX 进行处理, 每隔 2h 收一组细胞裂解进行 Western blot 实验。收集细胞进行裂解前 12h 加入 30 μmol/l MG132 进行处理。

1.2.6 统计分析:使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism9.0 用于实验数据的所有统计分析。

2. 研究结果

2.1 MYH9 和 CTNNB1 在胶质瘤中表达增加且与预后相关。

在前期研究中我们通过 TCGA 数据库分析 MYH9 与 CTNNB1 在脑胶质瘤中的表达情况。结果显示, 与正常脑组织相比 MYH9 与 CTNNB1 在脑胶质瘤中的表达上调(图 1a), MYH9 的表达与 CTNNB1 的表达呈正相关(图 1b), 并且 MYH9 与 CTNNB1 的高表达组的总体生存率明显低于低表达组, 表明 MYH9 与 CTNNB1 的高表达与脑胶质瘤患者的不良预后相关(图 1e)。我们又采用 qRT-PCR 和 Western-blot 检测了脑胶质瘤细胞以及胶质瘤细胞中 MYH9 的表达, 在 RNA(图 1c)和蛋白质(图 1d)水平证明了 MYH9 在脑胶质瘤细胞株 U251、LN229、A172、U87 中的表达要高于正常胶质瘤细胞株 HEB 的表达。综合上述结果可知, MYH9 与 CTNNB1 在脑胶质瘤中表达升高且与不良预后呈正相关。

2.2 敲除 MYH9 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路以及脑胶质瘤恶性。

为了进一步确认 MYH9 在脑胶质瘤发生发展过程中的作用, 我们采用 Crispr-cas9 基因敲除技术构建了 MYH9 的敲除片段 sgMYH9, 通过 RT-qPCR 实验(图 2a)和 Western blot 实验(图 2b)在转录以及蛋白质水平确定了 sgMYH9 在 LN229 和 U87 中具有敲除效率后, 进一步的 Western-blot 结果显示 MYH9 敲除后, CTNNB1 的蛋白表达下降, 并且 Wnt 通路下游关键蛋白 c-Myc、EGFR、c-Jun 的表达也随之下降(图 2c)。并且有文献通过 cck-8、Edu、原位成瘤实验、Transwell、Boyden 和 ic50 等功能实验验证了, 在脑胶质瘤细胞中干扰 MYH9 的表达能够抑制细胞的增殖、侵袭、迁移和 TMZ 耐药能力[21]。

2.3 MYH9 通过 USP14 维持 CTNNB1 在胶质瘤细胞中的稳定性。

前文发现在胶质瘤细胞中敲除 MYH9 的表达之后 CTNNB1 的蛋白表达降低, 且 Wnt 信号通路上的关键蛋白也相应降低。为了进一步研究 MYH9 与 CTNNB1 之间的调控关系, 我们通过 BioGrid(<https://thebiogrid.org>) 数据库发现 MYH9 蛋白与 CTNNB1 蛋白存在相互作用。然后通过内源性免疫共沉淀实验 Co-IP 证实了 MYH9 蛋白与 CTNNB1 蛋白存在相互作用(图 2a), 并且通过免疫荧光共定位证实了它们胞质内存在共定位(图 2b)。通过前期的实验发现了 MYH9 蛋白与去泛素化酶 USP14 也存在相互作用并且 MYH9 蛋白与 USP14 共定位于胞质。

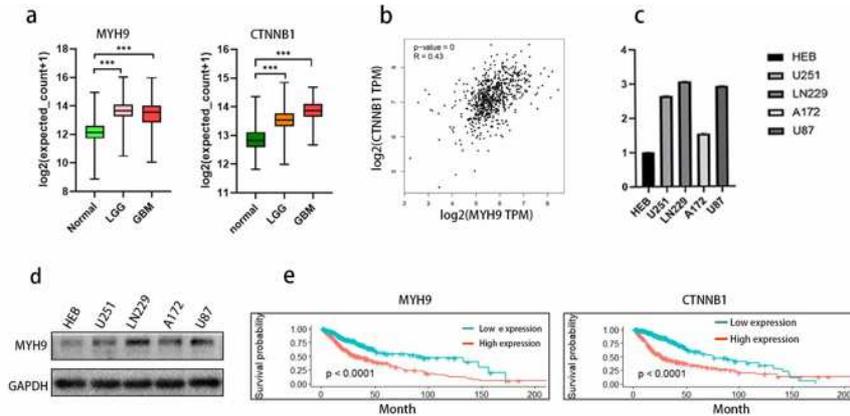


图 1.MYH9 与 CTNNB1 在脑胶质瘤中表达增加且与预后相关

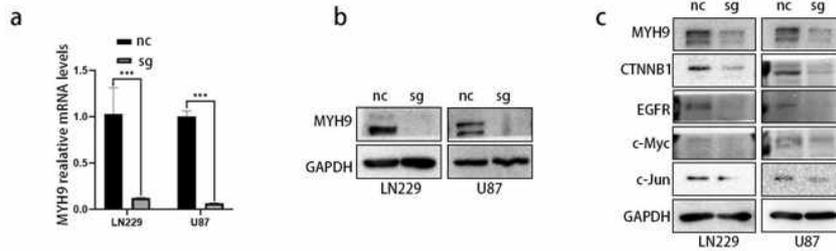


图 2.敲除胶质瘤细胞中 MYH9 表达后 Wnt 通路相关蛋白表达下降

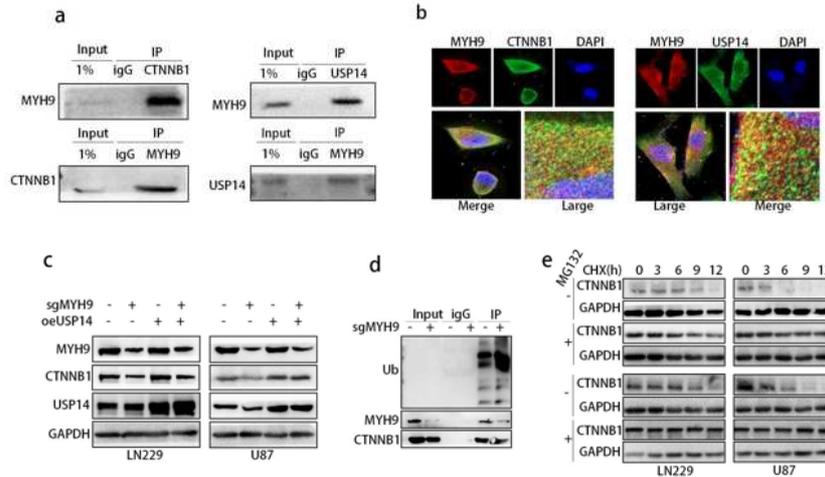


图 3.MYH9 蛋白与 CTNNB1 蛋白、USP14 在胞质内存在相互作用

因此，我们在 MYH9 敲除的胶质瘤细胞株中重新载入 USP14 过表达质粒，Western-blot 实验结果表明 USP14 过表达质粒的载入能够恢复因 MYH9 敲除而表达降低的 CTNNB1 蛋白水平（图 2c）。我们推测 MYH9 在翻译后水平调控 CTNNB1 蛋白的表达水平。通过免疫共沉淀 Co-IP 实验发现敲低脑胶质瘤细胞的 MYH9 表达之后，Western blot 结果显示 CTNNB1 蛋白与泛素的相互作用增加（图 2d）。加入 CHX 和 MG132 处理胶质瘤细胞后，Western-blot 实验结果表明，加入 CHX 处理之后，MYH9 的敲除增加了胶质瘤细胞中 CTNNB1 蛋白的降解速率。加入 CHX 和 MG132 共同处理胶质瘤细胞后，胶质瘤细胞中 CTNNB1 蛋白的降解受到了抑制（图 2e）。

以上结果表明 MYH9 在胞质内能够抑制 CTNNB1 蛋白的泛素化降解，从而使 CTNNB1 蛋白在细胞内积累，并且 MYH9 可能通过 USP14 的去泛素化作用拮抗 CTNNB1 蛋白

的泛素化降解。我们通过免疫共沉淀 Co-IP 以及免疫荧光共定位技术（图 3a），发现 USP14 与 CTNNB1 蛋白存在相互作用，并且在胞质内存在共定位（图 3b）。MYH9 蛋白、USP14 以及 CTNNB1 蛋白在胞质内存在相互作用证实了以上猜想，确定了 MYH9 能够通过去泛素化酶 USP14 抑制 CTNNB1 的泛素化降解。

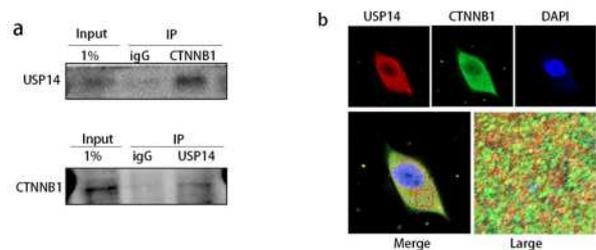


图 5.USP14 与 CTNNB1 蛋白在胞质内存在相互作用

3.讨论

有研究表明 MYH9 在脑胶质瘤中作为促癌基因, MYH9 的表达促进了脑胶质瘤的恶性进展以及化学耐药。为了进一步探究 MYH9 在脑胶质瘤中的促癌机制, 我们通过数据挖掘发现 MYH9、USP14 与 CTNNB1 三者存在相互作用, 进一步 Co-IP 和免疫荧光共定位实验证明了它们在胞质内存在相互作用。在 MYH9 敲除的胶质瘤细胞中重新载入 USP14 过表达质粒, 发现 MYH9 敲除之后 CTNNB1 蛋白的表达水平下降, 但在重新载入 USP14 过表达质粒之后 CTNNB1 蛋白的表达水平得到了恢复。证实了 MYH9 能够通过 USP14 调控 CTNNB1 蛋白的表达水平, 为了进一步探究 MYH9 对

CTNNB1 蛋白的调控, 我们通过 Co-IP 实验发现敲除 MYH9 表达之后, 与对照组相比, CTNNB1 蛋白与泛素的相互作用增加。在加入 CHX 处理之后, 与对照组相比, MYH9 敲除组的半衰期明显缩短, 且加入 CHX 与 MG132 之后, CTNNB1 蛋白的降解受到抑制。证明了 MYH9 能够通过去泛素化酶 USP14 拮抗 CTNNB1 蛋白的泛素化降解, 使 CTNNB1 蛋白在胞质的积累。以上结果说明 MYH9 能够通过 USP14 抑制胞质内 CTNNB1 蛋白的泛素化降解, 使 CTNNB1 在胞质中积累, 继而激活 Wnt 信号通路促进细胞的增殖、迁移与耐药。这项研究结果证明了 MYH9 与 CTNNB1 在脑胶质瘤中存在一定协同作用, 共同促进脑胶质瘤的发生发展, 对患者的不良预后有一定的评估作用, 并且具有成为未来治疗靶点的潜力。

References:

- [1]Heese, O., et al., Complementary therapy use in patients with glioma: an observational study. *Neurology*, 2010. 75(24): p. 2229–35.
- [2]Gerritsen, J., A. Vincent and S. De Vleeschouwer, Maximizing extent of resection while minimizing the risk of neurological morbidity in glioma patients: a novel grading scale to translate these surgical goals into a merged onco-functional clinical outcome. *Neuro Oncol*, 2021. 23(3): p. 504–505.
- [3]Ostrom, Q.T., et al., The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*, 2014. 16(7): p. 896–913.
- [4]Jonsson, P., et al., Genomic Correlates of Disease Progression and Treatment Response in Prospectively Characterized Gliomas. *Clin Cancer Res*, 2019. 25(18): p. 5537–5547.
- [5]Turcan, S., et al., IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 2012. 483(7390): p. 479–83.
- [6]Kelley, M.J., et al., Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet*, 2000. 26(1): p. 106–8.
- [7]Lv, Y., et al., Myosin IIA Regulated Tight Junction in Oxygen Glucose-Deprived Brain Endothelial Cells Via Activation of TLR4/PI3K/Akt/JNK1/2/14-3-3 ϵ /NF- κ B/MMP9 Signal Transduction Pathway. *Cell Mol Neurobiol*, 2019. 39(2): p. 301–319.
- [8]Wu, Y., et al., Ruscogenin alleviates LPS-triggered pulmonary endothelial barrier dysfunction through targeting NMMHC IIA to modulate TLR4 signaling. *Acta Pharm Sin B*, 2022. 12(3): p. 1198–1212.
- [9]Lin, X., et al., Silencing MYH9 blocks HBx-induced GSK3 β ubiquitination and degradation to inhibit tumor stemness in hepatocellular carcinoma. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. 5(1): p. 13.
- [10]Gao, S., et al., TUBB4A interacts with MYH9 to protect the nucleus during cell migration and promotes prostate cancer via GSK3 β / β -catenin signalling. *Nat Commun*, 2022. 13(1): p. 2792.
- [11]Chen, M., et al., MYH9 is crucial for stem cell-like properties in non-small cell lung cancer by activating mTOR signaling. *Cell Death Discov*, 2021. 7(1): p. 282.
- [12]Kas, S.M., et al., Insertional mutagenesis identifies drivers of a novel oncogenic pathway in invasive lobular breast carcinoma. *Nat Genet*, 2017. 49(8): p. 1219–1230.
- [13]Ma, Y.S., et al., Proteogenomic characterization and comprehensive integrative genomic analysis of human colorectal cancer liver metastasis. *Mol Cancer*, 2018. 17(1): p. 139.
- [14]Nelson, W.J. and R. Nusse, Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1483–7.
- [15]Moon, R.T., et al., WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 2004. 5(9): p. 691–701.
- [16]Que, T., et al., HMGA1 stimulates MYH9-dependent ubiquitination of GSK-3 β via PI3K/Akt/c-Jun signaling to promote malignant progression and chemoresistance in gliomas. *Cell Death Dis*, 2021. 12(12): p. 1147.