

• 研究论文 •

TRIM25 增强 EGFR 稳定性及信号促进肺癌发展

周丹丹, 余娇娇, 胡卓伟, 花芳*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,
新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150), 北京 100050)

摘要: 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 基因是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中最常见的驱动基因之一, 尤其 EGFR 突变和扩增都参与了肺癌的恶性进程。本文旨在探究 E3 泛素连接酶 TRIM25 (tripartite motif 25) 对肺癌发生发展的作用及分子机制。应用 CCK-8 和 Transwell 实验评价 TRIM25 对肺癌细胞增殖和侵袭能力的影响, 结果发现敲低 TRIM25, 显著抑制了细胞的增殖 (抑制率为 34%) 和侵袭 (抑制率为 42%); 采用基因集富集分析、免疫印迹和免疫组化法分析 TRIM25 对 EGFR 及其下游信号活性的影响, 结果显示, TRIM25 不仅上调了 EGFR 的表达水平, 而且促进了 EGFR 信号活化; 利用免疫共沉淀、实时定量 PCR 以及放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 抑制蛋白质合成实验, 初步探究 TRIM25 上调 EGFR 信号的分子机制。研究结果表明, TRIM25 主要通过促进 EGFR 第 63 位赖氨酸位点发生泛素化修饰, 进而增加 EGFR 蛋白稳定性、上调 EGFR 下游信号活性; 而恢复 EGFR 蛋白表达后可逆转敲低 TRIM25 对肺癌细胞 A549、H1975 增殖和侵袭的抑制作用, 在 A549 细胞中, 细胞增殖率增加了 1.5 倍, 侵袭率提高了 1.6 倍; 同样, 在 H1975 细胞中, 细胞增殖率增加了 2 倍, 侵袭率提高了 1.7 倍。以上研究结果表明, TRIM25 通过维持 EGFR 信号持续活化, 促进肺癌细胞的增殖和侵袭。本研究中所用的人肺癌组织由中国医学科学院肿瘤医院肺癌患者提供, 根据《赫尔辛基宣言》, 已取得所有肺癌患者的知情同意。该研究得到了中国医学科学院肿瘤医院伦理委员会的批准。

关键词: TRIM25; 表皮生长因子受体; K63 位泛素化; 蛋白稳定性

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1026-10

TRIM25 enhances EGFR stability and signaling activity to promote lung cancer progression

ZHOU Dan-dan, YU Jiao-jiao, HU Zhuo-wei, HUA Fang*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study (BZ0150), Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Mutation and amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR), one of the most important driver gene, are both reported to participate in the regulation of lung cancer development and progression. Here we investigated the effect and molecular mechanism of tripartite motif 25 (TRIM25) in the regulation of development of lung cancer. CCK-8 and Transwell assays were used to explore the tumor-promoting effect of TRIM25. Results showed that knockdown of TRIM25 significantly inhibited cell proliferation (34% inhibition rate) and invasion (42% inhibition rate). Gene set enrichment analysis (GSEA), Western blot and immunohistochemistry were adopted to detect the effect of TRIM25 on EGFR expression and its downstream signal activity. The results explained

收稿日期: 2019-04-17; 修回日期: 2019-05-13.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81472717, 81673474); 北京市自然科学基金面上资助项目 (7162133); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-1-007).

*通讯作者 Tel: 86-10-83165034, E-mail: huafang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0289

that TRIM25 not only up-regulated the expression level of EGFR, but also promoted EGFR signal activation. Co-immunoprecipitation, real-time PCR and cycloheximide (CHX) inhibit protein degradation assays were employed to explore the molecular mechanism of TRIM25 in regulating EGFR stability. Preliminary exploration results indicate that TRIM25 increases the expression level of EGFR and activates its downstream signaling activity through promoting K63-linked ubiquitination of EGFR. Restoration of EGFR expression rescues the phenotype of TRIM25 depletion. In A549 cells, overexpression of EGFR increased cell proliferation rate 1.5-fold and invasion rate 1.6-fold compared with knockdown of TRIM25 cells. Similarly, in H1975 cells, cell proliferation rate was enhanced 2-fold and invasion rate was improved 1.7-fold. These data suggest that TRIM25 promotes lung cancer development *via* maintaining EGFR stability and continuous EGFR signaling activation. The human lung cancer tissues were obtained from lung cancer patients at Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences. Informed consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences.

Key words: tripartite motif 25; epidermal growth factor receptor; K63-linked ubiquitination; protein stability

肺癌是世界范围内发病率和死亡率排名首位的恶性肿瘤,主要包括非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),其中非小细胞肺癌所占比例约为80%~85%^[1]。多数肺癌患者起病隐匿,临床确诊时常已处于中晚期,失去了根治性切除的机会。尽管近年来肺癌的诊疗在早期筛查、微创手术及靶向治疗等方面已取得一定进展,然而肺癌5年的相对存活率仍然只有16.6%,其中远处转移患者5年存活率仅有3.9%^[2]。

肺癌的发生发展涉及多种基因的改变,特别是一些促生长因子的激活和肿瘤抑制子的抑制^[3,4]。如活化的转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)不仅促进肿瘤的血管生成,而且对肺癌患者的肿瘤进展和转移具有重要的促进作用^[5];肺癌肿瘤抑制物1(tumor suppressor in lung cancer 1, TSLC1)是最近发现的一种抑癌基因,它的缺失、低表达或抑制其表达等促进了肺癌的发生、侵袭和转移^[6]。三结构域蛋白家族(tripartite motif, TRIM)是一类重要的E3泛素连接酶,参与细胞增殖、天然免疫、细胞分化及细胞凋亡等多种生物学功能的调节。雌激素反应指蛋白(estrogen-responsive finger protein, EFP),又名 tripartite motif 25 (TRIM25),是 TRIM 家族成员之一,在早期筛选雌激素反应基因时被发现命名^[7]。早期的研究主要集中于 TRIM25 作为 E3 泛素连接酶,通过介导多种蛋白质如 RIG-I^[8]、KLF5^[9]和 ATBF1^[10]的泛素化降解过程,参与细胞生物功能的调节。近年来研究发现 TRIM25 不仅作为免疫细胞感应器,参与先天性免疫调节,同时也是一种促癌蛋白,促进乳腺癌^[11]、卵巢癌^[12]、胃癌^[13]和肺癌^[14]等多种肿瘤的发生发展。尽管研究发现肺癌组织中高表达的 TRIM25 促进了肺癌的发展进程,然而有关 TRIM25 调节肺癌恶性进展的分

子机制尚不明确。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种受体酪氨酸激酶,与配体结合被激活后可以活化下游多种信号通路如 MAPK/ERK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、STAT3 信号通路等,与肺癌增殖能力强、分化能力差、淋巴结转移率高、预后不良等密切相关^[15-17]。大量研究发现 40%~80% 的 NSCLC 患者中具有 EGFR 异常高表达或信号过度活化的现象^[18]。EGFR 过表达不仅导致对靶向 EGFR 药物的耐受^[19-21],也导致肿瘤对多种化疗药物的耐受^[22,23]。在很多情况下,EGFR 的表达量与 EGFR 的基因拷贝数并不直接相关,表明 EGFR 的过表达可能是由于 EGFR 蛋白降解调节异常所致。阐明 EGFR 降解机制,将有助于寻找新的靶向分子,制定新的治疗策略,为新型靶向药物的研发提供重要的理论依据。

通过基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),本课题组发现在 TRIM25 高表达的肺癌患者中,EGFR 信号明显富集。基于此,猜想在肺癌肿瘤组织中,TRIM25 与促癌蛋白 EGFR 可能存在一定的联系,TRIM25 可能通过调节 EGFR 信号通路,发挥促肿瘤功能。迄今为止,未有文献报道 TRIM25 与 EGFR 之间的关系。本研究拟探寻 TRIM25、EGFR 和肺癌恶性进展之间的联系,阐明 TRIM25 促进肺癌发生发展的作用和机制。

材料与方法

试剂和抗体 人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购于 PeproTech 公司;放线菌酮(cycloheximide, CHX)购于 Sigma Aldrich 公司;胰酶、胎牛血清、RPMI-1640 培养基、IMDM 培养基购于 Gibco 公司;RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北

京索莱宝科技有限公司; 转染试剂 VifoFect 购于北京威格拉斯生物技术有限公司; Western blot 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。TransZol Up、EasyScript One-Step gDNA Removal 和 cDNA Synthesis Super Mix 购自北京全式金生物技术有限公司。所用抗体: pERK (ERK1/2, Thr202/Tyr204)、ERK (ERK1/2)、pAkt (Ser473)、Akt、pEGFR (Tyr1068)、EGFR、pSTAT5 (Tyr694)、STAT5 和 TRIM25 均购于 Cell Signaling Technology 公司; DDK、Myc、GFP 抗体均购于北京博尔迈生物技术有限公司; GAPDH、HRP 标记二抗购于中杉金桥生物技术有限公司。

细胞及细胞培养 肺癌细胞系 A549、H1975、PC-9 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心; HEK 293T 细胞由本实验室长期保存。A549、H1975 和 PC-9 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基中; HEK 293T 细胞培养于含 10% FBS 的 IMDM 培养基中, 所有细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养, 根据细胞生长状态进行传代。

质粒 pcDNA6A-EGFR-MYC 质粒由本实验室前期保存; 表达质粒 TRIM25-DDK、UB-GFP 购于北京义翘神州科技有限公司。

人肺癌组织 人肺癌组织样本来源于中国医学科学院肿瘤医院肺癌患者, 根据《赫尔辛基宣言》, 已取得所有肺癌患者的知情同意, 并得到了中国医学科学院肿瘤医院伦理委员会的批准。

主要仪器 电泳仪 (北京六一仪器厂)、qPCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)、ImageQuant LAS 4000mini 成像系统 (美国通用电气公司)、激光扫描共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测

细胞总 RNA 提取 用 PBS 溶液洗涤细胞后, 将 TransZol Up 加入到细胞中, 裂解并收集细胞, 向裂解液中加入氯仿涡旋混匀, 静置 5 min, 4 °C、10 000 ×g 离心 15 min, 取上清液置于新的离心管中, 并加入一定比例的异丙醇, 颠倒混匀, 静置 10 min 后 4 °C、10 000 ×g 离心 10 min, 弃去上清, 加入一定量的 75% 乙醇, 4 °C、7 500 ×g 离心 5 min, 弃上清室温晾干后加入 RNA 溶解酶。

RNA 逆转录成 cDNA 按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。引物由睿博兴科生物技术有限公司合成, 序列如下所示: EGFR F: 5'-GACAGGCCACCTCGTCG-3'; EGFR R: 5'-TGCGTGAGCTTGTACTCGT-3'; TRIM25 F: 5'-AGAGCCTGACCAAGAGGGAT-3'; TRIM25 R: 5'-GTGGATTTGTGTGTGGA CGC-3'; Actin F: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-

3'; Actin R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。

Q-PCR 反应 反应体系 (20 μL) 如下: SYBR Premix ExTaq™ 10 μL, 去离子水 6 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 cDNA 2 μL。两步法反应过程如下: 95 °C 预变性 30 s, 进入循环, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 循环次数 40 次。以 Actin 作为内参, 将所得 Ct 值按照 2^{-ΔΔCt} 的方法进行处理。

Western blot (WB) 收集细胞, 加入裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 收集上清液, 测定其蛋白浓度并进行定量处理, 加入 5× 上样缓冲液, 98 °C 变性 10 min。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 0.5 h, 4 °C 一抗孵育过夜, 次日, 用 TBST 洗膜液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后加入 ECL solution 进行显影。

RNAi 实验 TRIM25 siRNA 由广州锐博生物技术有限公司合成, 序列如下: si-h-TRIM25_001, GCAAATGTTCCCAGCACAA; si-h-TRIM25_002, CCTGAGCTCCTGGAGTATT。将适量细胞接种于 6 孔板中, 待其密度合适时, 将 TRIM25 siRNA 稀释于 100 μL 的 RPMI-1640 中, 轻轻混匀; 另外, 将 Lipofectamine RNAi MAX 2 μL 稀释于 100 μL 的 RPMI-1640 中, 室温放置 5 min 后, 将含有 Lipofectamine RNAi MAX 的培养基滴加到含有 siRNA 的培养基中, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min 后滴加到细胞中。

免疫荧光染色 将细胞接种于预先铺有盖玻片的 12 孔板中, 待细胞密度合适时, 用 PBS 清洗细胞, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 清洗 3 次, 0.5% Triton X-100 透化 20 min, PBS 清洗 3 次, 3% BSA 室温封闭 0.5 h, 加入一抗 (1:100 稀释), 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 3 min, 加入对应的二抗 (1:200 稀释), 室温避光孵育 2 h, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 3 min, 用含有 DAPI 的封片剂进行封片, 荧光显微镜观察图像并拍照。

免疫组化染色 将病理石蜡切片放于 60 °C 孵箱烘烤 1 h, 冷却至室温后进行以下流程: 二甲苯 30 min, 二甲苯 30 min, 100% 乙醇 3 min, 90% 乙醇 3 min, 80% 乙醇 3 min, 70% 乙醇 3 min, 一相水 3 min; 将石蜡切片浸入枸橼酸抗原修复液中, 进行微波抗原修复; 之后冷却至室温后, 一相水 5 min, PBS 5 min, 0.5% Triton 透化 20 min, 过氧化氢孵育 15 min, 封闭液孵育 30 min, 滴加一抗 4 °C 孵育过夜; 次日, 用 PBS 清洗 3 次后滴加相应的二抗, 室温孵育 2 h, PBS 清洗 3 次。DAB 显色, 一相水冲洗, 苏木素染色数分钟, 过 1% 盐酸酒精, 流水返蓝 15 min 后, 70% 乙醇 3 min, 80% 乙醇 3 min,

90%乙醇3 min,二甲苯15 min,二甲苯15 min进行脱水,中性树脂封片。

免疫共沉淀实验 (Co-immunoprecipitation, CO-IP) 待细胞生长到70%的密度时进行质粒转染,质粒转染24~48 h后收集细胞,加入细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解30 min,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心30 min,将上清转移至新的1.5 mL离心管中。吸取少量的裂解液用于Western blot分析,剩余的裂解液加入3 μg的抗体和20 μL protein A琼脂糖珠,4 °C缓慢摇晃孵育过夜,使抗体与protein A琼脂糖珠偶连。次日,用缓冲液清洗4次,每次3 000 r·min⁻¹离心5 min。加入2×上样缓冲液,98 °C变性10 min,样品进行Western blot分析。

CCK-8检测细胞活力 收集对数期生长的A549-Control siRNA和A549-TRIM25 siRNA细胞,对其进行计数后按3×10³个细胞/孔接种于96孔培养板中,置于37 °C、5% CO₂的孵箱中培养72 h后,弃去原培养基,每孔加入混合有10 μL CCK-8和90 μL完全培养基的混合液,置于培养箱中孵育1 h,酶标仪检测450 nm波长下的吸光度值(A),计算细胞活力。

Transwell细胞侵袭实验 用培养基稀释2 μg·μL⁻¹的Fibronectin母液,均匀混合,将30 μL Fibronectin工作液均匀地涂到小室外侧晾干;用培养基稀释50 mg·L⁻¹的Matrigel,并将Matrigel工作液均匀地滴加至Transwell小室内,小室晾干后加入无血清的培养基水化30 min;用胰酶消化收集细胞后PBS清洗1~2次,用无血清的培养基重悬细胞并进行计数;将适量细胞接种于Transwell小室内,Transwell小室放置于含有完全培养基的24孔板中,置于细胞培养箱中培养;培养24 h后,弃去Transwell小室内的培养基,用PBS清洗小室外侧,放入4%多聚甲醛中固定20 min,PBS清洗3次,结晶紫染色30 min;棉签擦去小室内部细胞,PBS清洗,置于倒置显微镜下观察图像并拍照。

GSEA分析 从<http://xena.ucsc.edu/>网站下载肺腺癌TCGA数据LUAD HiSeqV2_PANCAN ($n = 576$)。按照TRIM25表达高低进行排序,前20%患者($n = 116$)和后20%($n = 116$)分别被认为是TRIM25高表达组和TRIM25低表达组。从<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>网站下载EGFR (BIOCARTA_EGF_PATHWAY)、RAS (BIOCARTA_RAS_PATHWAY)和ALK (BIOCARTA_ALK_PATHWAY)基因集。运用GSEA软件分别对TRIM25高表达组和低表达组中EGFR、RAS、ALK信号集进行富集分析。其中FDR值(false discovery rate)小于0.25被视为具有显著性差异。

统计学分析 实验平均重复3次以上,数据用

mean ± SEM表示,使用Graphpad Prism 5统计分析软件进行数据统计和计算,用*t*检验各组间的差异,组中的数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),显著性结果以 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 表示。

结果

1 高表达的TRIM25与肺癌不良预后正相关

为了探究TRIM25的表达水平与肺癌患者不良预后之间的关系,本研究首先利用R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)进行生存率分析,结果发现低表达TRIM25的肺癌患者生存期明显高于高表达TRIM25的患者(图1A)。免疫印迹检测肺癌患者中肿瘤组织和癌旁组织中TRIM25蛋白表达水平,结果显示肿瘤组织中TRIM25的表达水平显著高于癌旁组织(图1B)。利用TRIM25特异性siRNA敲低肺癌细胞A549中的TRIM25,结果发现,与对照组相比,敲低TRIM25不仅抑制肿瘤细胞增殖,其抑制率为34%(图1C);而且降低了肿瘤细胞的侵袭能力,其抑制率为42%(图1D)。以上结果表明,肺癌组织中高表达的TRIM25,促进了肺癌细胞的增殖和侵袭,并与肺癌不良预后正相关。

2 肺癌组织中TRIM25和EGFR呈正相关

鼠类肉瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue, KRAS)突变、EGFR突变和棘皮动物微管相关蛋白4-间变性淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule-associate protein-like 4- anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)融合是肺癌发病过程中最常见的几个驱动基因。基于TCGA肺癌患者数据库,课题组利用GSEA方法分析了TRIM25与这几个驱动基因之间的关系,结果显示高表达TRIM25时EGFR信号显著富集(图2A);但这种现象在RAS和ALK信号通路中并不存在(图2B、C)。采用免疫印迹对肺癌患者肿瘤组织中TRIM25和EGFR表达情况进行检测,结果表明高表达TRIM25的患者,其肺癌组织中EGFR的表达量也高(图2D)。免疫组化检测结果进一步印证肺癌组织中TRIM25与EGFR蛋白表达水平具有良好的正相关性(图2E、F)。以上结果表明,肺癌组织中TRIM25和EGFR呈正相关,这提示TRIM25可能通过调节EGFR或EGFR信号通路发挥促肿瘤功能。

3 敲低TRIM25下调EGFR及其下游信号

为了验证TRIM25是否参与EGFR的调节,本研究利用TRIM25特异性siRNA敲低肺癌细胞系A549中的TRIM25,结果显示,敲低TRIM25降低了EGFR表达量;在H1975、PC-9等肺癌细胞系中也得到了一致的结果(图3A)。此外,与对照组相比,敲低肺癌细

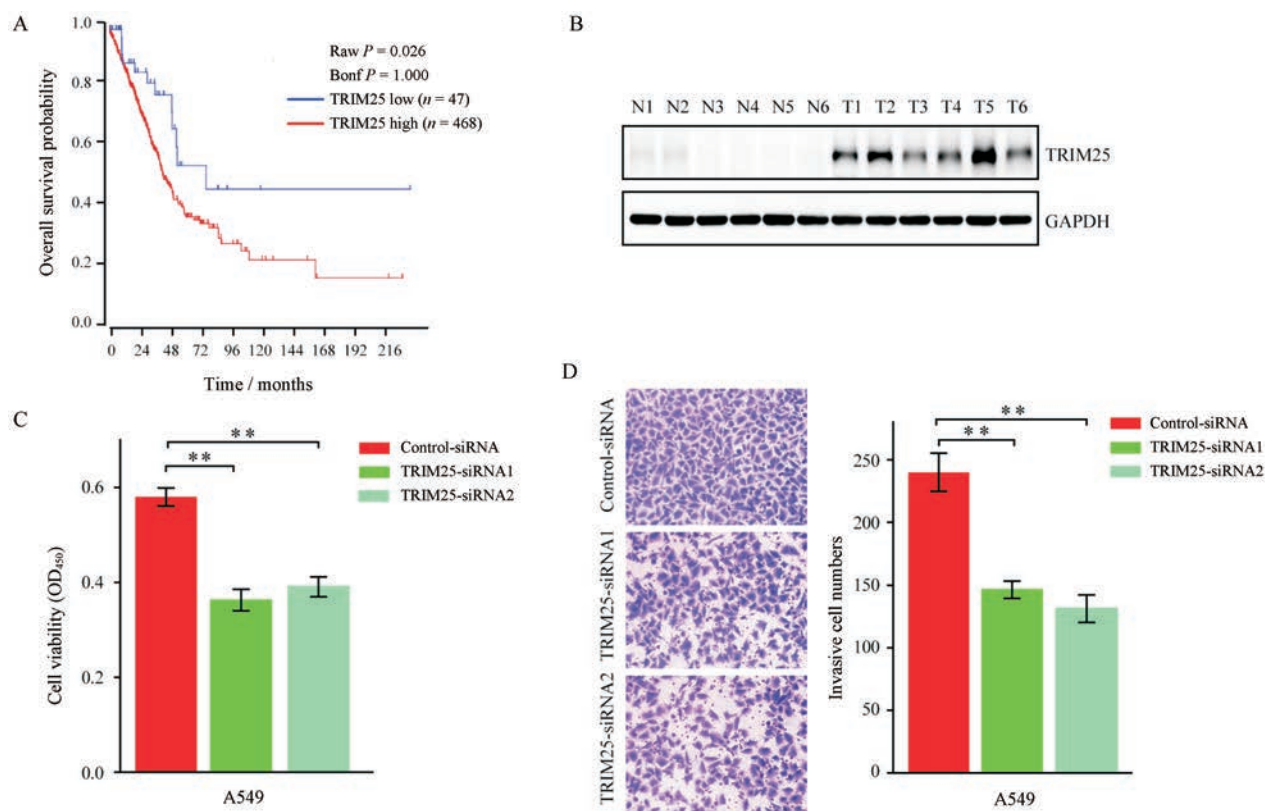


Figure 1 Tripartite motif 25 (TRIM25) positively correlates with poor survival of lung cancer patients and promotes tumor proliferation and invasion. A: Overall survival of patients with lung cancer stratified by R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>) according to TRIM25 expression level. Patients were divided into 2 groups: high TRIM25 expression vs low TRIM25 expression; B: Western blot (WB) analyses of TRIM25 expression in human lung cancer tissues (T) or in the adjacent normal tissues (N); C: Cell proliferation was measured by CCK-8 assay in A549 cells transiently transfected with control-siRNA or TRIM25-siRNAs; D: The invasive capacities of A549 cells transfected with control-siRNA or TRIM25-siRNAs were evaluated with Transwell assays. $n = 3$, mean \pm SEM. $**P < 0.01$

胞中 TRIM25 后, EGFR 诱导的 EGFR、ERK 以及 STAT5 的磷酸化水平也受到抑制 (图 3B)。以上结果表明, 敲低肺癌细胞中的 TRIM25, 不仅下调了 EGFR 的表达水平, 而且也抑制了 EGFR 下游信号活性。

4 TRIM25 维持 EGFR 蛋白稳定性

TRIM25 正向调节了 EGFR 蛋白表达, 为确认 TRIM25 对 EGFR 表达调控的机制, 本研究从 EGFR 转录和蛋白稳定性两个层次进行分析。实时定量 PCR 结果显示, 敲低 A549 细胞中的 TRIM25 并没有影响 EGFR 的转录水平 (图 4A), 由此提示 TRIM25 可能调节 EGFR 的蛋白稳定性。随后, 在不同的时间点加入蛋白合成抑制剂放线菌酮 (CHX), 利用 CHX 阻断 EGFR 从头合成途径, 进而观察 EGFR 的降解速度, 结果发现, 对照组 A549 细胞中 EGFR 的半衰期超过 24 h, 而敲低细胞中的 TRIM25 后, EGFR 的半衰期缩短至 8 h 以内 (图 4B), 由此表明 TRIM25 延长了 EGFR 的半衰期, 增加了 EGFR 的蛋白稳定性。真核细胞内蛋白质的降解途径主要包括泛素-蛋白酶体途径和溶酶体途径^[24], 为进一

步探索 TRIM25 对 EGFR 降解途径的调节, 本研究利用蛋白酶体抑制剂 MG132 和自噬抑制剂 chloroquine 观察 EGFR 的降解过程, 结果发现蛋白酶体抑制剂 MG132 可以逆转 EGFR 的降解 (图 4C), 但自噬抑制剂 chloroquine 则不能 (图 4D), 表明 TRIM25 主要通过泛素-蛋白酶体途径抑制 EGFR 降解, 维持 EGFR 蛋白稳定性。EGFR 与配体结合后内化首先进入早期内体, 进入早期内体的 EGFR 通常有两条去路: ① 再次循环回到细胞膜; ② 转运到溶酶体进行降解。利用 EGF 刺激对照组和敲低 TRIM25 的 A549 细胞, 分别观察了 EGFR 和 Rab11 (再循环内体标记物), 或与 LAMP1 (溶酶体标记物) 的共定位情况。结果显示, 对照组中大量的 EGFR 和 Rab11 共定位; 而敲低 TRIM25 后 EGFR 与 Rab11 的共定位显著减少, 而主要和 LAMP1 共定位 (图 4E)。该结果进一步表明, TRIM25 抑制了 EGFR 降解。

5 TRIM25 通过介导 EGFR 发生 K63 位泛素化而维持 EGFR 蛋白稳定性

为进一步探究 TRIM25 维持 EGFR 蛋白稳定性的

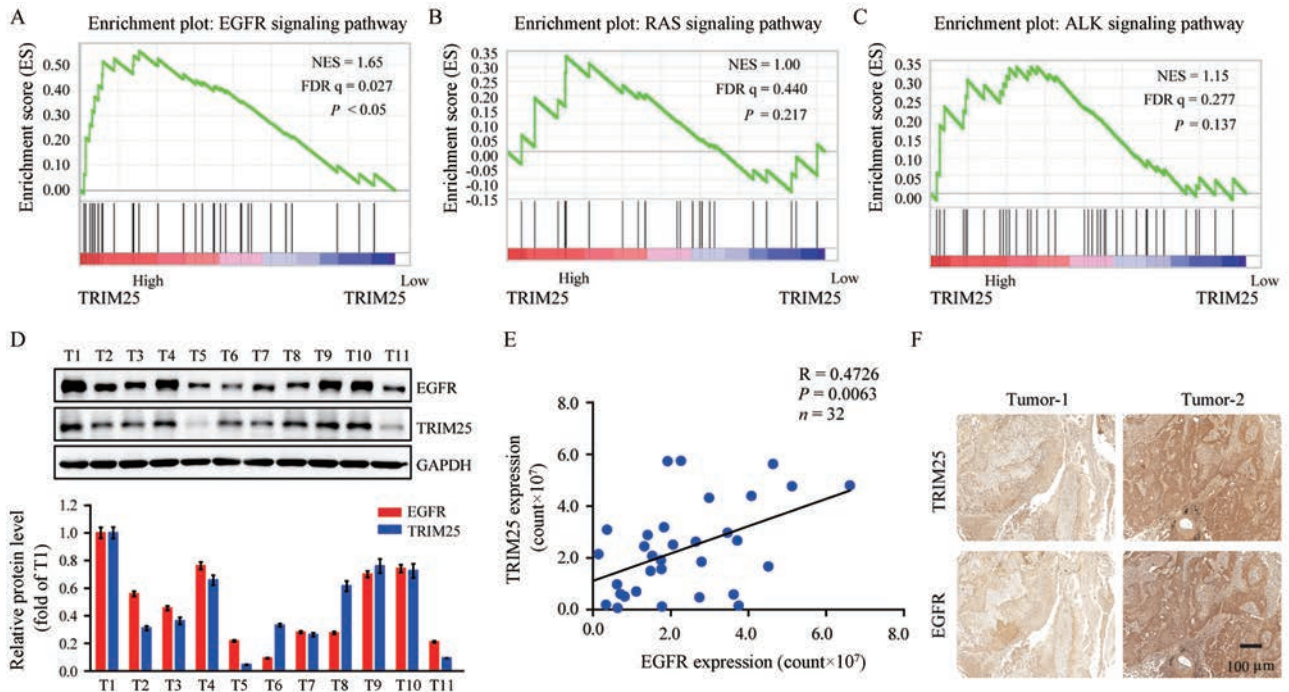


Figure 2 TRIM25 positively correlates with EGFR signaling and expression in lung cancer. A-C: GSEA enrichment plot for the "EGFR signaling", "RAS signaling" and "ALK signaling" gene modules in TRIM25-high or TRIM25-low groups; D: WB analyses of TRIM25 and EGFR expression in human lung cancer tissues; E: Correlation between TRIM25 and EGFR expression in lung cancer patients. The *P* value is measured by Spearman's rank correlation test; F: Representatives of immunohistochemical staining of TRIM25 or EGFR expression in tumor tissue sections from the same patients. EGFR: Epidermal growth factor receptor; RAS: Rat sarcoma; ALK: Anaplastic lymphoma kinase; FDR q: False discovery rate q value; NES: Normalized enrichment score. *n* = 3, mean ± SEM

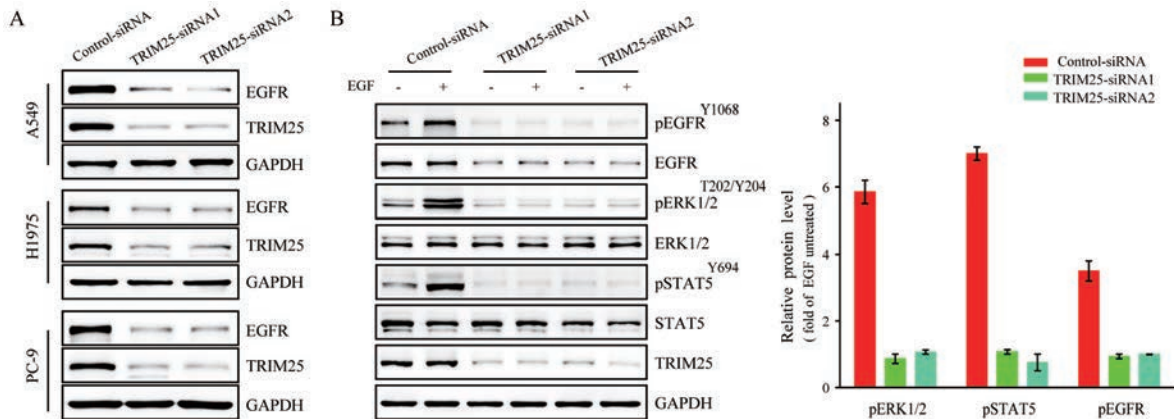


Figure 3 Knockdown of TRIM25 decreased EGFR expression and downstream signal activation. A: WB analyses of TRIM25 and EGFR expression in the indicated lung cancer cells transiently transfected with control-siRNA or TRIM25-siRNAs; B: WB analyses of EGFR and its signaling proteins in A549 cells transiently expressed control-siRNA or TRIM25-siRNAs. *n* = 3, mean ± SEM

机制, 本研究利用 Co-IP 实验检测 TRIM25 和 EGFR 两者的相互作用。结果显示, TRIM25 与 EGFR 存在相互作用 (图 5A)。免疫荧光实验进一步显示这两种蛋白存在共定位 (图 5B)。前期结果表明 TRIM25 主要通过泛素-蛋白酶体途径抑制 EGFR 降解, 维持 EGFR 蛋白稳定性 (图 4C、D), TRIM25 是一种 E3 泛素连接酶。基于此, 课题组猜想 TRIM25 可能是 EGFR 的 E3 泛素连

接酶, 通过调节 EGFR 泛素化过程增加其蛋白稳定性。Co-IP 结果显示, 敲低 A549 细胞中的 TRIM25 后, EGFR 泛素化降低 (图 5C), 提示 TRIM25 可增加 EGFR 的泛素化。多数研究发现 K48 位泛素化主要介导蛋白质降解, 而 K63 位泛素化主要调节蛋白质的功能和稳定性^[25-28]。因此, 本研究进一步分析 TRIM25 对 EGFR K48 和 K63 位泛素化修饰的影响。结果显示, 在细胞

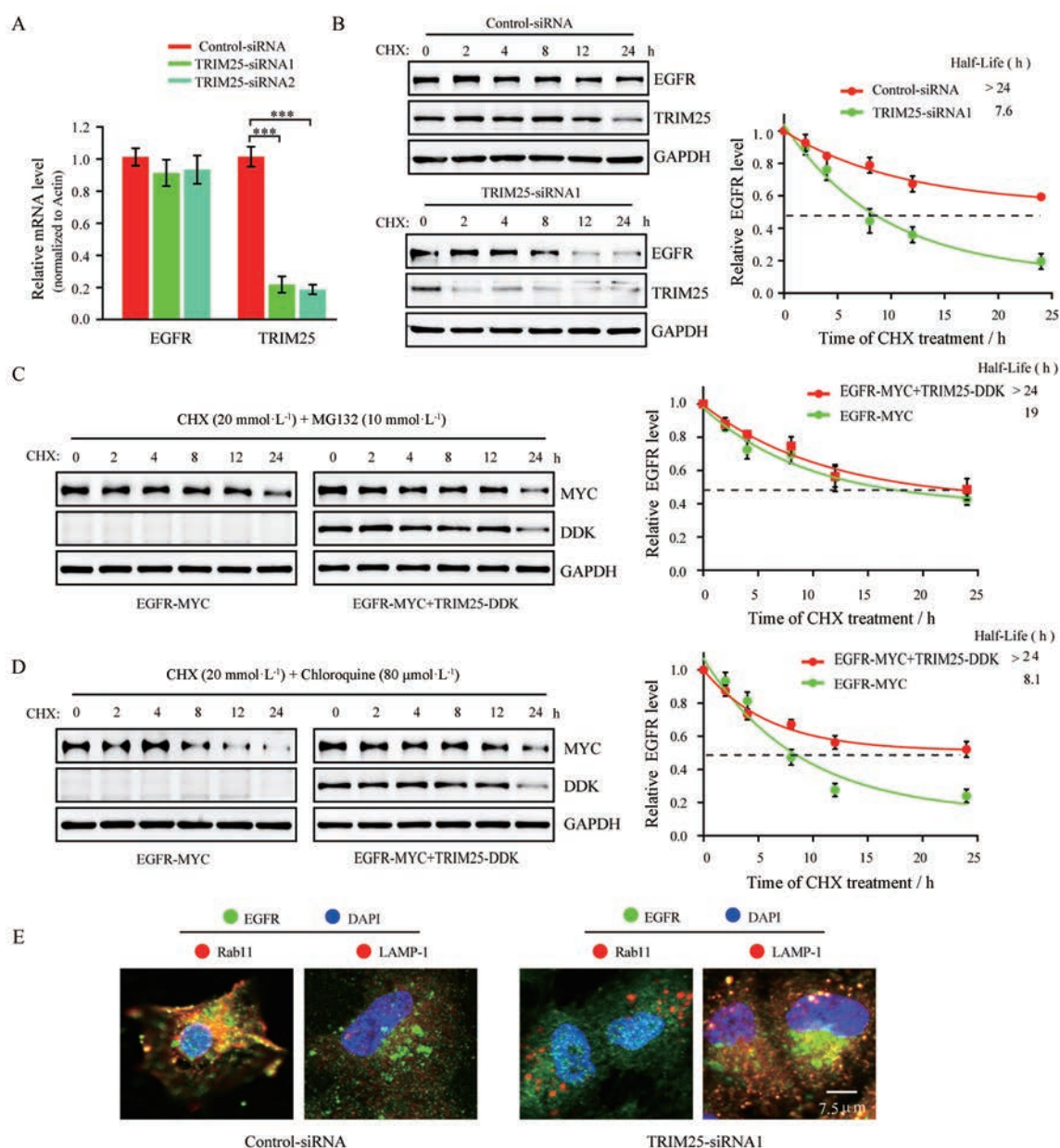


Figure 4 TRIM25 maintains EGFR stability. A: The mRNA levels of TRIM25 and EGFR were detected by quantitative PCR (qPCR) in A549 cells transiently transfected with control-siRNA or TRIM25-siRNA; B: Protein stability of EGFR was determined by cycloheximide (CHX) assay in A549 cells transiently transfected with control-siRNA or TRIM25-siRNA; C, D: Effect of MG132 (C) or chloroquine (D) on EGFR stability regulated by TRIM25 overexpression. HEK 293T cells transfected with EGFR-MYC alone or with TRIM25-DDK were incubated with CHX plus MG132 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (C) or chloroquine ($80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (D) for the indicated time. Indicated proteins were detected by WB analyses; E: Co-localization analysis of EGFR with Rab11 and LAMP1 under EGF treatment in control and TRIM25-silenced A549 cells. $n = 3$, mean \pm SEM

中过表达 TRIM25 增加了 EGFR 的 K63 位泛素化修饰 (图 5D), 而对 K48 位的泛素化没有影响 (图 5E)。以上结果提示, TRIM25 可能是 EGFR 的 E3 泛素连接酶, 通过促进 EGFR 的 K63 位泛素化修饰维持其蛋白稳定性。

6 TRIM25 通过上调 EGFR 信号促进细胞增殖和侵袭

为进一步确认 TRIM25 是通过维持 EGFR 蛋白稳

定性, 上调 EGFR 信号发挥促进肺癌细胞增殖和侵袭能力, 本研究利用 EGFR 表达质粒进行回复实验。结果发现与对照组相比, 敲低肺癌细胞 A549 中的 TRIM25, 细胞的增殖和侵袭能力明显下降 (图 6A、B); 而在此基础上, 恢复 EGFR 的蛋白表达后, 敲低 TRIM25 产生的抑制增殖和侵袭表型得到部分逆转: 与敲低 TRIM25 相比, 其细胞增殖率增加了 1.5 倍, 侵袭率提高了 1.6 倍

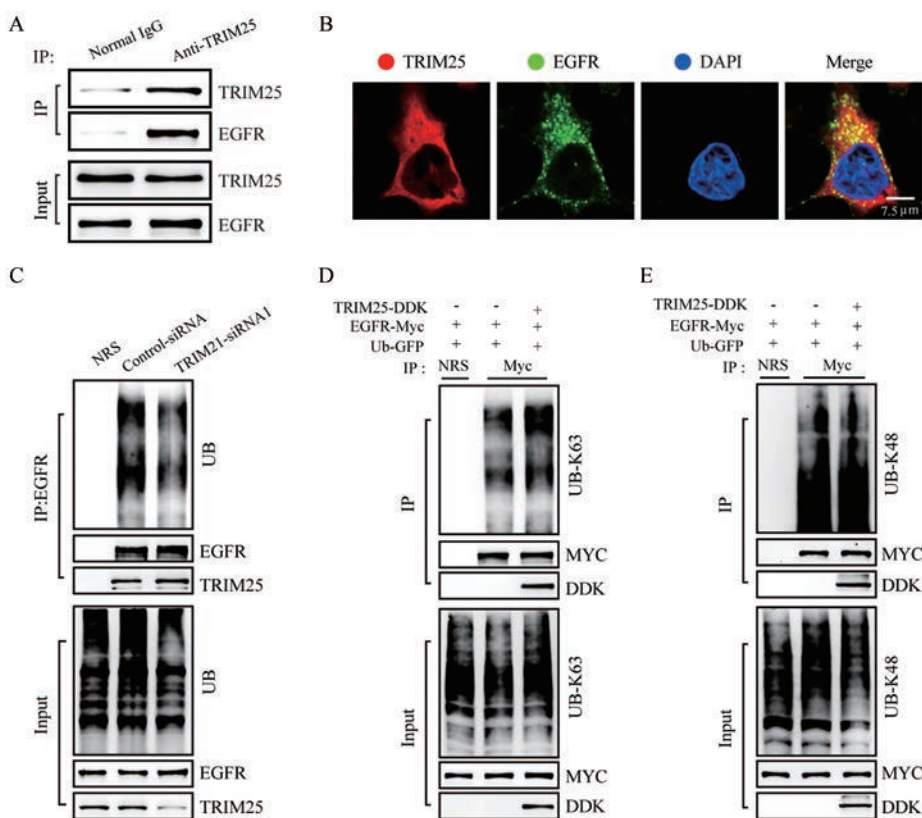


Figure 5 EGFR stability was maintained by K63-linked ubiquitination. A: Co-immunoprecipitation showed interaction between TRIM25 and EGFR; B: Immunostaining images shows co-localization of TRIM25 and EGFR; C: The ubiquitination level of EGFR was detected in control or *TRIM25*-silenced A549 cells; D: The K63-linked ubiquitination of EGFR was detected by WB; E: The K48-linked ubiquitination of EGFR was detected by WB

(图 6A、B); 同样, 在 H1975 肺癌细胞中得到了一致的结论: 细胞增殖率增加了 2 倍, 侵袭率提高了 1.7 倍 (图 6A、B)。此外, WB 结果也表明在 A549 细胞中敲低 TRIM25, 抑制了 EGF 诱导的 ERK1/2、STAT5 和 EGFR 的磷酸化水平, 而恢复 EGFR 蛋白表达后, 显著提高了 EGF 诱导的 ERK1/2、STAT5 和 EGFR 的磷酸化水平 (图 6C)。以上结果表明, TRIM25 的确通过维持 EGFR 及其下游信号, 发挥促肿瘤功能。

讨论

肺癌由于发病率高、易转移以及缺乏有效的治疗策略, 成为严重影响人类健康的恶性肿瘤。大量研究发现, EGFR 高表达或异常活化与肺癌的发生发展、复发转移以及耐药密切相关^[29]。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKIs) 作为一线药物, 已广泛应用于 EGFR 突变的非小细胞肺癌患者, 但其长期疗效却并不令人满意。主要原因在于, 有的肿瘤患者对 EGFR 靶向治疗不敏感; 而那些最初对 EGFR 靶向治疗敏感的患者往往也在一年内产生耐药。研究发现除了获得耐药性突变, EGFR 信号的持续活化和传导不仅为癌细胞提供

了生存优势, 而且也增加了肿瘤细胞的耐药性^[30]。基于此, 研究者需要寻找靶向 EGFR 治疗肺癌的新策略。本研究发现在临床肺癌患者样本中, TRIM25 与 EGFR 存在正相关性。敲低 TRIM25 减弱了其与 EGFR 的相互作用, 促进 EGFR 降解, 并抑制 EGFR 下游信号活化。因此, 靶向干扰 TRIM25/EGFR 相互作用、促进 EGFR 降解, 可能是肺癌治疗的新策略。

近年来研究发现 TRIM 家族与肿瘤的形成密切相关, 既可以作为癌基因也可作为抑癌基因。已有文献报道 TRIM25 可促进肺癌的发生发展, 但其具体的分子机制并未阐明。TRIM25 作为重要的 E3 泛素连接酶, 主要通过对底物进行泛素化修饰发挥作用。泛素分子本身有 7 个赖氨酸残基, 这些赖氨酸残基都可以参与多聚泛素链的合成过程, 目前对 K48 位和 K63 位上的泛素化修饰研究的最为深入。K48 位的泛素化通常介导蛋白质降解, K63 位的泛素化则通常调节蛋白质功能以及维持蛋白稳定性^[25-28]。已有文献报道, TRIM25 可对 RIG-1 (retinoic-acid-inducible gene I) 进行 K63 位泛素化修饰, 增加其蛋白稳定性及其活性, 在抗病毒先天性免疫反应过程中发挥重要作用^[31]。而且

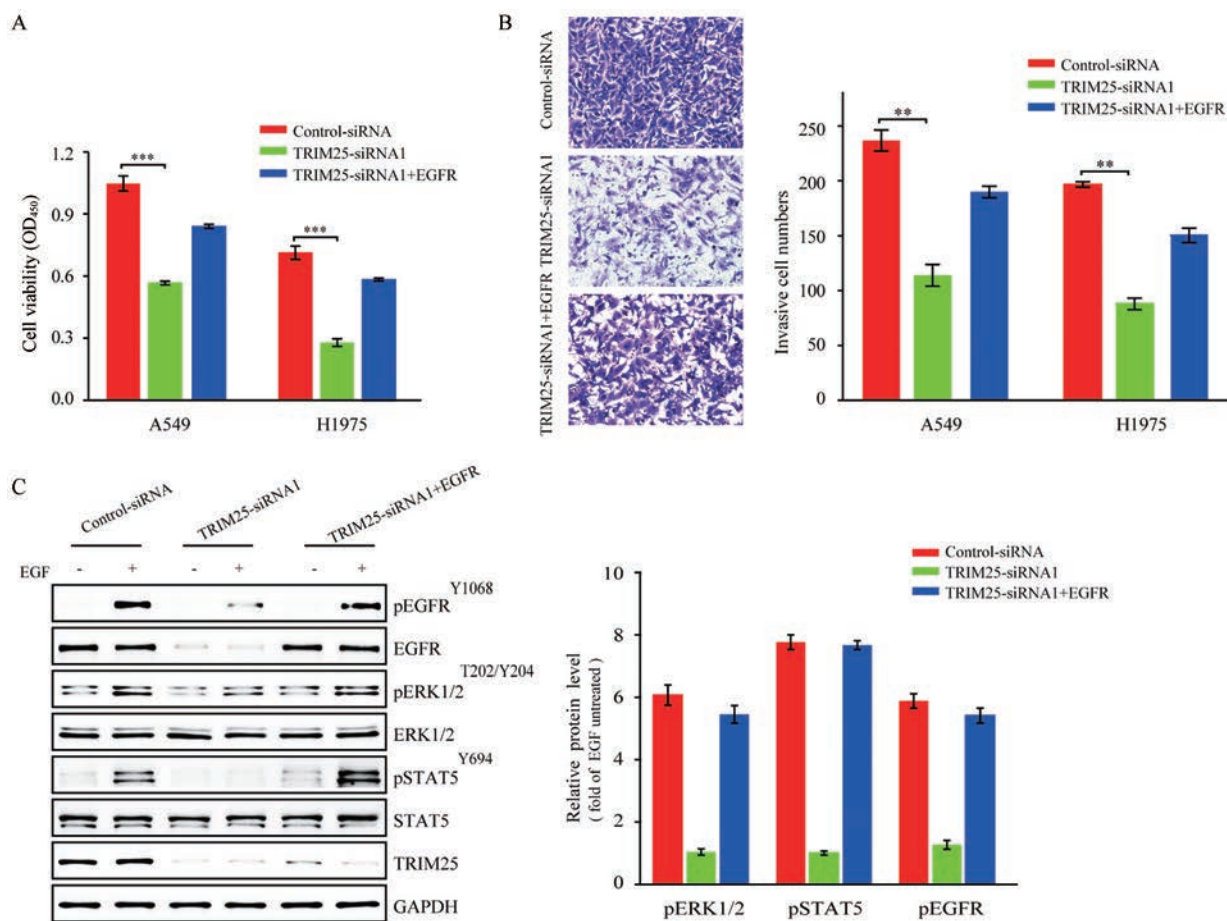


Figure 6 TRIM25 promotes lung cancer cell proliferation and invasion *via* maintaining EGFR signal. A-B: The proliferation and invasion of A549 cells and H1975 cells were evaluated through CCK-8 (A) and Transwell (B) assays, respectively; C: WB analyses of EGFR and its signaling proteins in A549 cells treated as indicated. $n = 3$, mean \pm SEM. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

TRIM25 还能介导蛋白质发生 K48 位泛素化修饰进行降解^[9,32], 如 Liu 等^[33]研究发现亲环素 A (cyclophilin A, CypA) 通过与 TRIM25 竞争性地结合线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondria antiviral signaling protein, MAVS), 抑制 TRIM25 介导的 MAVS K48 位泛素化降解, 增强其蛋白稳定性。本研究结果提示, TRIM25 可能通过介导 EGFR K63 位泛素化, 维持了 EGFR 的蛋白稳定性及其下游信号活性。在后续研究中, 课题组还需采用体内、外泛素化实验进一步验证 TRIM25 是否能促进 EGFR K63 位泛素化, 并寻找关键的泛素化位点; 同时, 还需要在整体动物水平进一步明确 TRIM25 对肺癌发生发展的作用和机制。

综上所述, 本研究结果表明, TRIM25 通过介导 EGFR K63 位泛素化, 维持了 EGFR 的蛋白稳定性以及 EGFR 下游信号的持续活化, 增强了肺癌细胞的增殖和侵袭能力。本研究结果, 有利于深入了解 TRIM25 发挥促肿瘤功能的机制, 为今后相关新型靶向药物的研究提供了重要的理论基础。

References

- [1] Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5: S389-S396.
- [2] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures [R]. Atlanta (GA): American Cancer Society, 2013.
- [3] Miyazaki J, Hirota S, Abe T. Metastasis of lung cancer to the gastrointestinal tract, presenting with a volcano-like ulcerated mass [J]. *Dig Endosc*, 2015, 27: 397-398.
- [4] Littlefield P, Jura N. EGFR lung cancer mutants get specialized [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 15169-15170.
- [5] Xue XY, Zhao S, Zhang ZN, et al. Transforming growth factor beta and lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9: 9766-9780.
- [6] Sussan TE, Pletcher MT, Murakami Y, et al. Tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) alters tumorigenic growth properties and gene expression [J]. *Mol Cancer*, 2005, 4: 28-36.
- [7] Inoue S, Orimo A, Hosoi T, et al. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a ring finger protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 11117-11121.

- [8] Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 ring-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity [J]. *Nature*, 2007, 446: 916-920.
- [9] Zhao KW, Sikriwal D, Dong X, et al. Oestrogen causes degradation of KLF5 by inducing the E3 ubiquitin ligase EFP in ER-positive breast cancer cells [J]. *Biochem J*, 2011, 437: 323-333.
- [10] Dong XY, Fu X, Fan S, et al. Oestrogen causes ATBF1 protein degradation through the oestrogen-responsive E3 ubiquitin ligase EFP [J]. *Biochem J*, 2012, 444: 581-590.
- [11] Ueyama K, Ikeda K, Sato W, et al. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and *in vivo* tumor growth [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17: 624-632.
- [12] Sakuma M, Akahira J, Suzuki T, et al. Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 99: 664-670.
- [13] Zhu Z, Wang Y, Zhang C, et al. TRIM25 blockade by RNA interference inhibited migration and invasion of gastric cancer cells through TGF- β signaling [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19070.
- [14] Qin Y, Cui H, Zhang H, et al. Overexpression of TRIM25 in lung cancer regulates tumor cell progression [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15: 707-715.
- [15] Zhou YC, Ma YH, Shi HT, et al. Epidermal growth factor receptor T790M mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) of Yunnan in southwestern China [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 15426.
- [16] Jiang WX, Cai CQ, Hu PC, et al. Personalized medicine in non-small cell lung cancer: a review from a pharmacogenomics perspective [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 530-538.
- [17] Volm M, Dring P, Wodrich W. Prognostic significance of the expression of *c-fos*, *c-jun*, and *c-erbB1* oncogene products in human squamous cell lung carcinomas [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1993, 119: 507-510.
- [18] Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 663-673.
- [19] Lin AQ, Chen YQ, Chen XR, et al. Lorlatinib: a third generation ALK inhibitor for treatment of non-small cell lung carcinoma [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 601-610.
- [20] Regales L, Gong Y, Shen R, et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 3000-3010.
- [21] Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7: 493-507.
- [22] Wei YJ, Zou ZJ, Becker N, et al. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance [J]. *Cell*, 2013, 12: 1269-1284.
- [23] Sette G, Salvati V, Memeo L, et al. EGFR inhibition abrogates leiomyosarcoma cell chemoresistance through inactivation of survival pathways and impairment of CSC potential [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46891.
- [24] Jayhyuk M, Kyung BK, Craig MC. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21: 245-273.
- [25] Frédéric AM, Stéphane R. K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites [J]. *Cell Res*, 2012, 22: 1221-1223.
- [26] Zhang N, Wang Q, Ehlinger A, et al. Structure of the S5a: K48-linked diubiquitin complex and its interactions with Rpn13 [J]. *Mol Cell*, 2009, 35: 280-290.
- [27] Wang G, Gao Y, Li L, et al. K63-linked ubiquitination in kinase activation and cancer [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 5.
- [28] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation-the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 508-523.
- [29] Yewale C, Baradia D, Vhora I, et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 8690-8707.
- [30] Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC, et al. Stress-induced EGFR trafficking: mechanisms, functions, and therapeutic implications [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26: 352-366.
- [31] Zeng W, Sun L, Jiang X, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity [J]. *Cell*, 2010, 141: 315-330.
- [32] Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis and promotes breast tumour growth [J]. *Nature*, 2002, 417: 871-875.
- [33] Liu W, Li J, Zheng WN, et al. Cyclophilin A-regulated ubiquitination is critical for RIG-I-mediated antiviral immune responses [J]. *Immunology*, 2017, 6: e24425.