

PRMT5 通过抑制 NF- κ B 削弱 DR4 介导的趋化因子 CCL20 释放

王东生^{①②}, 刘丹^①, 高静^①, 刘敏^①, 刘士廉^①, 刘彦信^{①*}, 郑德先^{①*}

① 中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005;

② 川北医学院附属医院检验科, 南充 637000

* 联系人, E-mail: zhengdx@pumc.edu.cn; liuyx2000@tom.com

2011-12-27 收稿, 2012-02-08 接受

国家自然科学基金(81001315, 30972684)资助

摘要 构建表达 DR4 的质粒 pCMV-DR4-HA(DR4)和表达 PRMT5 的质粒 pCMV-PRMT5-Flag, 共转染 293T 细胞, 验证 DR4 和 PRMT5 的相互作用. 将 DR4 和蛋白精氨酸 N 端甲基化转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5)两种质粒分别或者共转染 293T 细胞, 研究 PRMT5 对 DR4 引起的炎症因子释放的影响, 探讨 PRMT5 抑制 DR4 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1)引起炎症因子释放的分子机制. 分别通过 RT-PCR 和 ELISA 方法对炎症因子的表达进行定量检测. 通过双荧光报告基因方法检测 PRMT5 对 DR4 引起 NF- κ B 活性变化的影响, 并且使用 Western Blot 方法检测 ERK 的表达变化. DR4 和 PRMT5 在 293T 细胞中能相互结合, PRMT5 过表达降低了 DR4 引起的 NF- κ B 活性和 ERK 的磷酸化, 导致 CCL20 分泌减少. 因此, PRMT5 在 293T 细胞中与 DR4 结合, 通过改变 NF- κ B 和 ERK 激酶活性影响了 CCL20 的分泌, 参与了 DR4 介导的细胞免疫调节.

关键词

肿瘤坏死因子相关
凋亡诱导配体
蛋白精氨酸 N 端
甲基化转移酶 5
CCL20
细胞因子

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 超家族的成员^[1]. 与 TNF 家族其他成员不同的是, TRAIL 在体内一般以与细胞膜结合的形式存在. 体外实验表明, 无论膜结合型还是可溶型的 TRAIL, 都能迅速诱导表达 TRAIL 死亡受体的细胞发生凋亡. 在人体中, 已发现 5 种 TRAIL 受体, 包括死亡受体 DR4 (death receptor 4)和 DR5 (death receptor 5/TRAIL-R2/killer), 还有 3 种诱饵受体 TRAIL-R3 (TRID/DcR1), TRAIL-R4 (TRUNDD/DcR2)和 osteoprotegerin (OPG). TRAIL 能够诱导肿瘤细胞凋亡, 但对大部分正常细胞没有毒害, 是潜在的肿瘤治疗药物^[2,3]. 与 TRAIL 处理一样, TRAIL 受体过表达同样

可以在很多细胞系中诱导细胞凋亡^[4]. 一旦与 TRAIL 结合以后, TRAIL 受体能够募集一系列接头分子形成死亡复合物(death-inducing signaling complex, DISC), 激活经典的凋亡信号通路. 但是, 最近发现, DISC 复合物中的一些分子也能激活其他信号通路^[5]. PRMT5 是精氨酸甲基化酶, 能使蛋白质发生甲基化修饰, PRMT5 使蛋白质翻译后发生修饰, 通过调控某些生物的基因转录、核糖核酸剪切和细胞增殖等. 在细胞因子表达调控中, 也有文献报道 PRMT5 能通过表观调控, 影响细胞因子的释放^[6]. 研究表明, PRMT5 与 DR4 结合, 激活 NF- κ B 活性不依赖于 PRMT5 的甲基化活性^[7].

最近, 越来越多的研究结果表明, TRAIL 除了诱

引用格式: 王东生, 刘丹, 高静, 等. PRMT5 通过抑制 NF- κ B 削弱 DR4 介导的趋化因子 CCL20 释放. 科学通报, 2013, 58: 810-814

英文版见: Wang D S, Liu D, Gao J, et al. PRMT5 suppresses DR4-mediated CCL20 release via NF- κ B pathway. Chin Sci Bull, 2012, 57: 4351-4355, doi: 10.1007/s11434-012-5511-6

导细胞凋亡以外,还能激活很多非凋亡的信号途径,如 MAPK, AKT, PKC 和 NF- κ B 等途径^[8,9]. 有研究显示, TRAIL 能够在一些细胞中诱导 IL-8 和 MCP-1 的表达. 我们前期研究发现, TRAIL 通过激活 NF- κ B 途径,促进 CCL20 的释放;过表达 DR4 也能激活类似途径引起 CCL20 的分泌^[10,11],但具体的信号分子尚未阐明. 本研究以蛋白质组学的方法寻找与 DR4 相互作用的蛋白,探寻其影响 CCL20 释放的机制. 发现 PRMT5 能与 DR4 直接结合,影响 NF- κ B 活性,从而并减少 CCL-20 的释放.

1 材料与方法

(i) 质粒、菌种及试剂. pCMV-PRMT5 质粒由中国科学院遗传与发育生物学研究所鲍时来教授惠赠;含 DR4 基因序列的 pCDNA3.1-DR4 载体和 PGL3-NF- κ B 由本课题组保存;限制性内切酶、T4 连接酶、pMD18-T 载体及 DNA marker 购自 TaKaRa 公司;哺乳动物细胞表达载体 pCMV-HA, pCMV-Flag, 兔抗 HA 多克隆抗体,鼠抗 Flag 单克隆抗体及蛋白 G/蛋白 A 琼脂糖珠混悬液购自 ClonTech 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Santa 公司;大肠杆菌 DH5 α 和 HEK 293 细胞由本室保存;质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收 DNA 试剂盒购自北京天根生物技术有限公司;胎牛血清和 DMEM 培养基(高糖)购自 Gibico 公司;转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;通用蛋白裂解/抽提试剂购自北京盖宁公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;预染标准蛋白分子量购自北京赛百胜公司;化学发光试剂盒购自 GE 公司;磷酸化 ERK1/2 抗体和 GAPDH 单克隆抗体来自 cell signaling 公司.

(ii) 重组质粒的构建. 以含 DR4 全长序列的质粒 pCDNA3.1-DR4 (本实验室长期保存)为模板,以寡核苷酸 5'-GGAATTCGGATGGCGCCACCACC-AGCTAG-3'和 5'-CGCTCGAGCTCACTTGTCATC-GTCGTCCTTGTAGTCTCCAAGGACACGGCAG-3'分别为上下游引物,并在上游引物 5'端和下游引物 5'端引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点,进行 PCR 扩增. PCR 反应体系为:5 \times 缓冲液 4 μ L, dNTP 2.5 μ mol L⁻¹, 上下游引物各 10 pmol L⁻¹, Primer star 酶 0.6 U, 模板 DNA 100 ng, 双蒸水补至 20 μ L, 扩增条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min. 预期扩增产物长度为

1584 bp. 10 g L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,并回收目的条带. PCR 产物用 EcoR I 和 Xho I 双酶切. 酶切体系:PCR 产物 1 μ g, EcoR I 酶 10 U, Xho I 酶 10 U, H 缓冲液 1 μ L、双蒸水补至 20 μ L. 10 g L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳进行胶回收. 回收的酶切产物与同样双酶切回收后的 pCMV-HA 载体按 1:5 的浓度比于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,然后转化 DH5 α 感受态菌株. 铺于含 50 μ g mL⁻¹ 氨苄青霉素 LB 平板上培养,37 $^{\circ}$ C 24 h 后挑取单克隆,提取质粒进行酶切鉴定与测序鉴定,鉴定正确的克隆用于后续实验.

(iii) 免疫共沉淀. 将 pCMV-Flag-PRMT5 和 pCMV-HA-DR4 共转染 HEK293 细胞,转染质粒分为 2 组:(1) 10 μ g pCMV-Flag-PRMT5 + 10 μ g pCMV-HA; (2) 10 μ g pCMV-Flag-PRMT5 + 10 μ g pCMV-HA-DR4. 48 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,离心,弃上清;加入 500 μ L 已加入蛋白酶抑制剂的通用蛋白裂解液,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 12000 \times g 离心 10 min,收集裂解液加入 2 μ g 兔抗 HA 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 振荡混合过夜;加入 30 μ L 蛋白 G/蛋白 A 琼脂糖珠混悬液,4 $^{\circ}$ C 振荡混合 6 h,2500 \times g 离心 5 min,弃上清,用通用蛋白裂解液洗涤 3 次;加入 20 μ L 2 \times 电泳缓冲液煮沸 5 min,瞬时离心后进行 SDS-PAGE 电泳. 以抗 HA 标签的单克隆抗体去沉淀蛋白,用抗 Flag 标签的单克隆抗体通过免疫印迹检测目的条带.

(iv) 双荧光素酶报告基因实验. 参考 Promega 公司操作说明,将报告基因质粒和内对照质粒以 50:1 的比例转染 293T 细胞,48 h 后收集细胞. 去除培养基,加入蛋白裂解液 100 μ L/孔至 24 孔板,温和振荡 15 min,测定前,将样品放置于室温,每管加 25 μ L LARII. 设置 2 s 延迟,10 s 测定,继续加入 25 μ L Stop&Glo 试剂,混合,测内对照海肾荧光素酶荧光. 用各样品海肾荧光素酶活性将萤火虫荧光素酶活性标准化,计算相对荧光素酶活性.

(v) RT-PCR 和 ELISA 测定炎症因子. 各组瞬时转染的条件参照 LipofectamineTM 2000 说明书,转染的质粒量保证总量一致,具体的转染分类采用以下的组别:(1) pCMV-Flag 2 μ g + pCMV-HA 2 μ g; (2) pCDNA 3.0-DR4 2 μ g + pCMV-Flag 2 μ g; (3) pCMV-Flag 2 μ g + pCMV-HA-DR4 2 μ g; (4) pCMV-Flag-PRMT5 2 μ g + pCMV-HA 2 μ g; (5) pCMV-Flag-PRMT5 2 μ g + pCMV-HA-DR4 2 μ g. RNA 的提取和

cDNA 合成实验操作参照 Promega 公司的实验操作. IL8: 5'-ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGACC-3', 5'-AACCTCTGCACCCAGTTTTTC-3'; TNF- α : 5'-CCA-GGGACCTCTCTAATCAGC-3', 5'-CTCAGCTTG-AGGGTTTGCTACA-3'; CCL20: 5'-AGAGTTTGCTC-CTGGCTG-3', 5'-GGATGAAGAATACGGTCTGTG-3'; MIP-1 β : 5'-GGAAGCTTCCTCGCAACTTTG-3', 5'-GCTCAGGTGACCTCCCTGAA-3'. GAPDH: 5'-CCGTCTAGAAAAACCTGCC-3', 5'-AGCCAAATT-CGTTGTCATACC-3'. 所有细胞因子的 PCR 反应均扩增 40 个循环, 内对照 GAPDH 扩增 30 个循环. ELISA 参照美国 R&D 公司说明书操作.

(vi) Western Blot 检测 ERK1/2 磷酸化. 蛋白提取、SDS-PAGE 电泳以及蛋白印迹参照文献[12]进行.

2 结果

2.1 PRMT5 引起的细胞因子 mRNA 表达变化

利用 RT-PCR 检测发现, 在 DR4 过表达细胞中, CCL-20, IL-8, TNF α , MIP-1 α 和 MIP-1 β 细胞因子表达明显上升, 而在 PRMT5 与 DR4 同时过表达时, 这些细胞因子表达显著被抑制, 单独过表达 PRMT5 则对它们的表达水平没有影响(图 1).

2.2 DR4 与 PRMT5 相互作用

免疫共沉淀实验表明, DR4 与 PRMT5 能相互结合(图 2), 提示它们之间的结合可能是抑制细胞因子

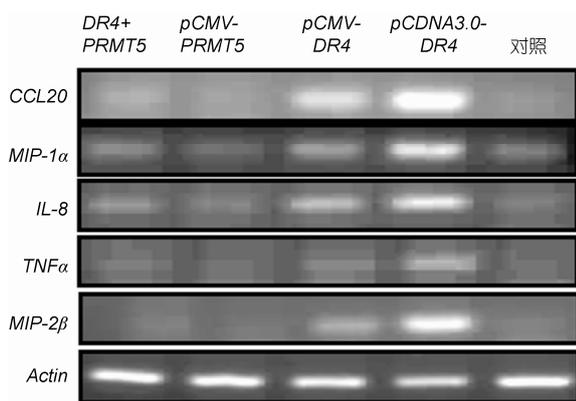


图 1 不同炎症因子在过表达 DR4 和 PRMT5 时 mRNA 的表达水平

单独过表达 DR4 时, 几种炎症因子表达上升, 而 DR4 与 PRMT5 共同过表达时, PRMT5 能抑制这几种细胞因子的表达

释放的分子基础.

2.3 PRMT5 引起 CCL20 蛋白表达变化

ELISA 检测发现, 在 DR4 过表达组中, CCL20 蛋白表达水平明显增高, 而将 PRMT5 与 DR4 一起过表达时, 则 CCL20 的表达就明显下降. 而单独表达 PRMT5 组则没有引起 CCL20 表达改变(图 3).

2.4 PRMT5 对 NF- κ B 活性的影响

双荧光报告基因实验检测结果如图 4 显示, DR4 单独过表达时能激活 NF- κ B, 这与本实验室前期工作结果一致^[11]. PRMT5 过表达时抑制 NF- κ B 活性, 可能是 PRMT5 抑制 DR4 引起 CCL20 释放的分子机制.

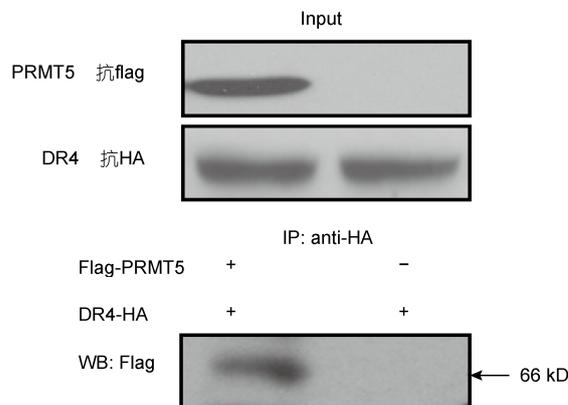


图 2 免疫共沉淀验证 PRMT5 和 DR4 的相互作用

293T 细胞中同时或单独过表达 PRMT5 和 DR4, 在单独转染 DR4 实验组不能检测到 PRMT5, 而在共转染 DR4 和 PRMT5 时, 能通过 Western Blot 检测到 PRMT5, 证明它们之间有相互作用

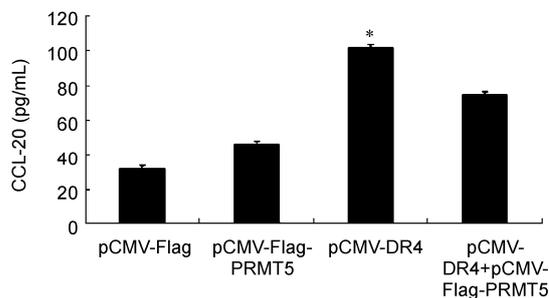


图 3 CCL20 的表达水平

ELISA 检测不同组别中 CCL20 的表达水平, DR4 单独过表达时, CCL20 表达增加, 而单独转染 PRMT5 时没有变化, 共转染 DR4 和 PRMT5 时, CCL20 表达减弱. DR4 组和共转染 DR4 与 PRMT5 组比较, $P < 0.05$

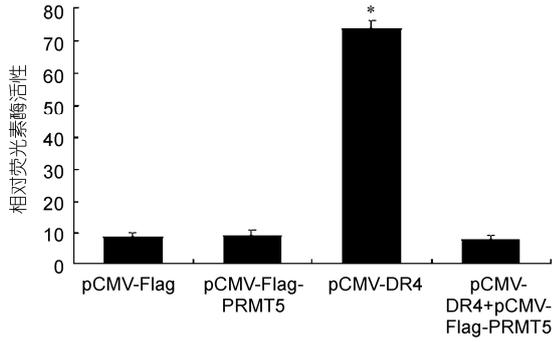


图 4 NF-κB 在不同组别中的活性

双荧光素酶报告基因法检测 NF-κB 活性, DR4 能激活 NF-κB, PRMT5 不能激活, 但能抑制 DR4 激活 NF-κB 的功能. DR4 组和共转染 DR4 与 PRMT5 组比较, $P < 0.05$

2.5 PRMT5 对 ERK1/2 磷酸化的影响

Western Blot 检测结果如图 5 显示, DR4 能激活 MAPK 信号通路, 同时, PRMT5 能抑制 DR4 引起的 ERK1/2 的磷酸化.

3 讨论

TRAIL 在近 10 年的研究中, 因为其对肿瘤作用的特殊性, 大部分工作都是集中在诱导肿瘤凋亡和肿瘤治疗中, 对它在正常机体内的生理功能以及其他相关分子生物学机制研究较少. 我们实验室的前期研究发现, TRAIL 处理或者 DR4 过表达能激活胞内信号途径, 引起一系列的炎性细胞因子释放, 特别是首次发现能诱发 CCL20 的分泌^[12], 并且它的分泌增加依赖于 NF-κB 的活化. 相关研究证实^[7], 在 HeLa 细胞中 PRMT5 能与 DR4 相互作用, 并且影响了 NF-κB 活性, 影响细胞功能. 因此也有可能影响

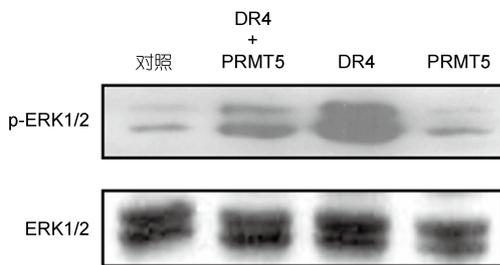


图 5 过表达不同蛋白的 ERK1/2 的活化状态

单独转染 DR4 能激活 ERK1/2, 而与 PRMT5 共转染时, ERK1/2 活性明显受到抑制

DR4 信号通路中的蛋白激酶活性, 使得 CCL20 的分泌受到影响.

CCL20 是趋化因子家族的成员, 在肺炎和慢阻肺患者等中发现 CCL20 与疾病的进程和严重程度相关^[13]. 在结肠癌和硬皮病等疾病中, CCL20 表达也升高^[14,15]. CCL20 与它的受体 CCR6 结合, 诱导免疫细胞趋化和肿瘤细胞迁移等^[16], 可引起细胞内骨架蛋白的聚合与再分布, 调节肿瘤细胞运动与迁移. 而在这些疾病模型中, TRAIL 参与调节肿瘤细胞的凋亡, TRAIL 表达增加或者与其他药物联用, 均能提高疗效. 在这类肿瘤中, TRAIL 可能除诱导他们凋亡以外, 还有其他的抗肿瘤活性.

在本研究中, PRMT5 与 DR4 结合可能与调节 DR4 下游通路中 DISC 复合物成分或者活性相关. 在 TNFα 处理细胞过程中, 可以通过这 2 个分子 TRAF2 和 RIP1 激活 NF-κB. TRAIL 是 TNF 超家族成员之一, 可能具有类似的功能, 募集 RIP1 和 TRAF2 等分子与 DR4 结合, 形成 DISC 复合物. 也通过这 2 个分子激活 NF-κB, 引起下游分子的转录. PRMT5 可能与这 2 个分子竞争结合, 干扰其与 DR4 的结合, 就会使得 NF-κB 活性降低, 这需要在以后的实验中进一步探索. 同时, PRMT5 是否直接作用于 NF-κB, 影响了它的激活也是有可能的. 在实验中发现, 单独过表达 DR4 时, 能激活 NF-κB, 但是当 PRMT5 与 DR4 共同过表达后, NF-κB 的活性明显受到抑制, 相应的 CCL20 的表达也降低. 我们发现, 过表达 DR4 也能激活 ERK1/2. 文献[17]研究表明, MAPK 广泛参与炎症因子的释放, 与本实验结果一致(图 1), 同时将 PRMT5 与 DR4 共表达以后, ERK1/2 的活性明显受到抑制. 本研究发现, 作为抗肿瘤的潜在药物, TRAIL 在诱导细胞凋亡的同时, 还能引起某些细胞因子的释放, 包括 CCL20, MIP-1α, MIP-2β, TNFα 等. 这些细胞因子的表达上调, 具体的生物学意义还有待阐明. CCR6 作为 CCL20 的受体, 在淋巴细胞和巨噬细胞等免疫细胞表面高表达, CCL20/CCR6 轴在免疫细胞迁移和趋化过程中扮演重要角色. 本研究发现 TRAIL 诱导 CCL20 的表达上调, 可能与肿瘤相关的免疫细胞浸润有关. 而这些免疫细胞的增加, 最终是促进肿瘤生长还是抑制其生长, 还需要进一步实验证明. CCL20 在 TRAIL 治疗肿瘤过程中的变化, 为 TRAIL 生物学功能研究提供了新的方向.

参考文献

- 1 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3: 673–682
- 2 Walczak H, Miller R E, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med*, 1999, 5: 157–163
- 3 Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 1999, 104: 155–162
- 4 Park S J, Bijangi-Vishehsaraei K, Safa A R. Selective TRAIL triggered apoptosis due to overexpression of TRAIL death receptor 5 (DR5) in p-glycoprotein-bearing multidrug resistant CEM/VBL1000 human leukemia cells. *Int J Biochem Mol Biol*, 2010, 1: 90–100
- 5 Park S, Zhao D, Hatanpaa K J, et al. RIP1 activates PI3K-Akt via a dual mechanism involving NF-kappaB-mediated inhibition of the mTOR-S6K-IRS1 negative feedback loop and down-regulation of PTEN. *Cancer Res*, 2009, 69: 4107–4111
- 6 Mowen K A, Schurter B T, Fathman J W, et al. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Mol Cell*, 2004, 15: 559–571
- 7 Tanaka H, Hoshikawa Y, Oh-Hara T, et al. PRMT5, a novel TRAIL receptor-binding protein, inhibits TRAIL-induced apoptosis via nuclear factor- κ B activation. *Mol Cancer Res*, 2009, 7: 557–569
- 8 Trauzold A, Wermann H, Arlt A, et al. CD95 and TRAIL receptor mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 2001, 20: 4258–4269
- 9 Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the AKT and ERK pathways. *Circulation*, 2003, 107: 2250–2256
- 10 Tang W H, Wang W M, Zhang Y X, et al. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced chemokine release in both TRAIL-resistant and TRAIL-sensitive cells via nuclear factor kappaB. *FEBS J*, 2009, 276: 581–593
- 11 Tang W H, Wang W M, Zhang Y X, et al. TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Res*, 2009, 19: 758–767
- 12 Wei W, Wang D S, Shi J, et al. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces chemotactic migration of monocytes via a death receptor 4-mediated RhoGTPase pathway. *Mol Immunol*, 2010, 47: 2475–2484
- 13 Demedts I K, Bracke K R, Pottelberge G V, et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175: 998–1005
- 14 Tao J, Li L, Tan Z, et al. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 and its receptor CCR6 in the lesional skin of early systemic sclerosis. *Eur J Dermatol*, 2011, 21: 731–736
- 15 Liu J L, Zhang N, Li Q, et al. Tumor-associated macrophages recruit CCR6⁺ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One*, 2011, 29: e19495
- 16 Rubie C, Frick V O, Ghadjar P, et al. Effect of preoperative FOLFOX chemotherapy on CCL20/CCR6 expression in colorectal liver metastasis. *World J Gastroenterol*, 2011, 26: 3109–3116
- 17 Johnstone R W, Frew A J, Smyth M J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 782–798