

Label-free 定量蛋白质组学揭示 GATA6 调控胃癌细胞对曲妥珠单抗耐药的信号通路

刘文虎^{1,2} 袁江北⁴ 常晋霞^{*3}

¹(中南大学湘雅医院分子代谢组学研究中心, 长沙 410008) ²(川北医学院药学院, 南充 637100)

³(川北医学院基础医学院, 南充 637100) ⁴(重庆大学药学院, 重庆 401331)

摘 要 肿瘤细胞对曲妥珠单抗耐药是导致其化疗失败的主要原因。前期研究表明,在曲妥珠单抗耐药胃癌细胞(NCI N87/R)中,转录因子 GATA6 与 DNA 的结合活性显著增强,这与其耐药是否有关尚不清楚。本研究以 NCI N87/R 为研究对象,采用 Crispr/Cas9 技术构建 GATA6 敲除细胞系(NCI N87R/GATA6)。在此基础上,基于 Label-free 定量蛋白质组学技术并结合生物信息学分析 GATA6 调控曲妥珠单抗耐药的信号通路。蛋白样品经还原烷基化,FASP 酶切,肽段经液相色谱分离,LC-MS/MS 定量分析,通过差异倍数及 *t* 检验筛选差异表达蛋白;采用 WebGestalt 数据库进行基因本体分析,利用 GeneAnalytics 数据库进行通路富集分析。结果表明,敲除 GATA6 增强了曲妥珠单抗对 NCI N87/R 的抑制作用,降低其侵袭。采用质谱定量检测出 5792 种蛋白质,其中 305 种在 NCI N87R/GATA6 细胞中表达上调,182 种表达下调。通路富集分析显示,线粒体转运、细胞凋亡、DNA 损伤、葡萄糖代谢、丙酮酸代谢及 TCA 循环、Wnt/ β -catenin 降解通路在 NCI N87R/GATA6 细胞中显著改变。蛋白免疫印迹实验(Western blot)表明,线粒体动力蛋白 OPA1 和 DNMI1L、凋亡蛋白 Caspase-9、TCA 循环代谢酶 SUCLG2 和 MDH1、糖原代谢酶 PYGL 在 NCI N87R/GATA6 中显著改变,表明 GATA6 敲除导致 NCI N87/R 细胞线粒体功能障碍、能量代谢异常,进而诱导其凋亡,提示抑制 GATA6 转录活性可能是逆转胃癌曲妥珠单抗耐药的有效途径。

关键词 曲妥珠单抗; 抗药性; Label-free 定量蛋白质组学; GATA 结合蛋白-6; 信号通路

1 引言

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤,其发病率在所有肿瘤中位居第五,死亡率居第三^[1]。化疗是当前胃癌治疗的主要手段。近年来,随着肿瘤生物学的快速发展及肿瘤分子标志物的不断发现,靶向治疗已成为胃癌治疗的有效途径。曲妥珠单抗是靶向人表皮生长因子受体-2 (Human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)的抗体类药物,通过拮抗 HER-2 信号转导及抗体依赖细胞介导的细胞毒作用,发挥抗肿瘤作用,为 HER-2 阳性乳腺癌、胃癌及胃食管交界癌靶向治疗的经典药物^[2,3]。虽然曲妥珠单抗的抗肿瘤机制明确,疗效肯定,然而肿瘤细胞对其产生抗药性已成为制约其治疗效果的棘手问题。因此,探究曲妥珠单抗耐药机制,发现耐药靶标,对提高胃癌化疗有效性及敏感性具有重要意义。

蛋白质组学是以生命体全部蛋白质为研究对象,对蛋白质进行定性和定量分析,进而揭示蛋白质功能的学科。近年来,随着高通量、高灵敏和快速扫描质谱仪的出现,结合微量蛋白质分离技术,以质谱为检测手段的蛋白质组学技术得到了飞跃发展,并在生命科学领域得到广泛应用^[4,5]。

GATA 结合蛋白 6(GATA6)属于 GATA 家族成员,包含 2 个锌指结构,通过与靶基因序列[(A/T)GATA(A/G)]结合,参与调控细胞的增殖及分化。研究发现,GATA6 异常表达与肿瘤的转移及恶性行为关系密切,且在不同肿瘤中具有组织特异性和功能多样性,如在胰腺癌、结肠癌、食管癌中具有促癌作用^[6-8],而在卵巢癌、胶质瘤中具有抑癌作用^[9,10]。乳腺癌中 GATA6 通过上调 slug 的表达促进癌细胞发生上皮-间质转化^[11],而结肠癌中通过调节尿激酶纤溶酶原激活因子促进肿瘤侵袭^[7]。另有研究表明,GATA6 通过上调自噬促进非小细胞肺癌对埃罗替尼耐药^[12],通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号降低西妥昔单抗对结直肠癌耐药^[13],提示 GATA6 异常表达与肿瘤耐药有关,但 GATA6 是否调控胃癌细胞对曲

2019-10-17 收稿; 2019-11-07 接受

本文系四川省科技厅应用基础科研项目(No. 2019YJ0378)、四川省教育厅项目(No. 17ZB0170)、南充市市校合作项目(No. 18SXHZ0402)和川北医学院博士科研项目(No. CBY17-QD05)资助

* E-mail: jinxiachang@163.com

妥珠单抗耐药,尚不明确。

本课题组前期研究表明^[14],在曲妥珠单抗耐药的 NCI N87/R 细胞中,GATA6 与 DNA 的结合活性显著增强,提示 GATA6 作为癌基因在曲妥珠单抗耐药中具有重要作用。本研究以 NCI N87/R 细胞为研究对象,采用 Crispr/Cas9 构建 GATA6 敲除细胞(NCI N87R/GATA6),探究 GATA6 敲除对 NCI N87/R 细胞曲妥珠单抗耐药的影响,在此基础上,基于 Label-free 定量蛋白质组学技术并结合生物信息学技术分析了 GATA6 调控胃癌细胞对曲妥珠单抗耐药的信号通路及可能机制。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LTQ-Orbitrap Velos Pro 质谱仪、Easy-nLC 2000 nano 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);SONICS 多功能超声仪(美国 Sonics 公司);GL-802B 型真空泵(海门其林贝尔仪器公司);5810R 真空浓缩仪(德国 Eppendorf 公司);CKX31 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);LRH-70 生化培养箱(上海一恒科学仪器公司);小型 Trans-Blot 电泳转印槽(美国伯乐生物公司)。

NCI N87 和 NCI N87/R 细胞由军事医学科学院施明教授惠赠,NCI N87R/GATA6 细胞由实验室构建。注射用曲妥珠单抗(440 mg, S20060026, 罗氏制药公司);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司);DMEM 培养基、胰酶(美国 Mediatech 公司);双抗(北京纽英泰克生物有限公司);二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、吡啶-3-乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)、尿素、NaHCO₃(美国 Sigma 公司);甲醇、乙醇、乙腈、甲酸、蛋白酶抑制剂(美国 Thermo Fisher 公司);Bradford 蛋白浓度试剂盒(北京康为生物有限公司),一抗 OPA1(67589)、DNM1L(5391)、Caspase-9(7237)和 GAPDH(5174)(美国 CST 公司);SUCLG2(ab96172)、MDH1(ab180152)和 PYGL(ab198268)(英国 Abcam 公司);羊抗兔(或鼠)IgG 二抗(碧云天生物技术公司);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);BsmBI(美国 NEB 公司);T4 连接酶(日本 TAKARA 公司);CCK-8 kit(日本同仁化学研究所)。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养 细胞于 DMEM 培养液(10% FBS 和 1% 双抗)中,在 5% CO₂、37℃ 条件下培养,细胞 2 次传代后用于实验。为保持细胞的耐药性,NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞培养液中加入终浓度为 80 μg/mL 的曲妥珠单抗^[13]。

2.2.2 gRNA 及寡核苷酸链合成 依据网站 <http://crispr.mit.edu> 设计 GATA6 的 gRNA,在线选取得分最高的前两个核苷酸序列,分别为:①正向 5'-CACCGGAGCGCGCGCCGGACCCC-3',反向 3'-AAACGGGGTCCGGCCGCCCTCC-5';②正向 5'-CACCGCGGAGAGCGGGCCCCCG-3',反向 3'-AAACCCGGGGCCCCGCTCTCCGCC-5'。

2.2.3 Cas9-GATA6 gRNA 载体构建 使用 BbsI 酶切 Cas9 质粒,gRNA 靶序列与 Cas9 质粒经 T4 连接酶连接后转化到大肠杆菌 BH5α 感受态细胞中,涂布于 LB-Amp 平板上,取单克隆分析测序,确定 gRNA 载体构建成功(Cas9-GATA6 gRNA)。

2.2.4 细胞转染及筛选 将 2 μg Cas9-GATA6、6 μg gRNA、1 μg pMD 2.0 和 1.5 μg psPAX2 混合质粒及 15 μL Lipofectamine 2000 转染试剂分别加入 100 μL 无血清无抗性培养基,室温孵育 10 min,共转染至 293T 细胞包装慢病毒,并用特异靶向敲除绿色荧光蛋白的 gRNA 与 pMD2.0、psPAX2 共转染作为对照,培养 72 h 后收集上清液,慢病毒液经 0.45 μm 滤膜过滤,-80℃ 保存备用。将 NCI N87/R 细胞按每孔 10⁵ Cell/mL 接种于六孔板,培养至 70% 更换无血清培养液,慢病毒感染细胞,48 h 后加入 0.5 μg/mL 嘌呤霉素处理细胞 72 h,流式分选单细胞于 96 孔板中,扩大培养,PCR 初选(引物序列正向:5'-TCCAGCGCGGAGCCCT-3',反向:5'-GCGCCGAAGGTCCGTGG-3'),蛋白免疫印迹实验(Western blot)验证。

2.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 对数期 NCI N87、NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞分别接种于 96 孔板中,每孔含细胞数约 5000 个,按文献[15]的方法检测细胞增殖能力。

2.2.6 Transwell 检测细胞侵袭 于 Transwell 小室的上室中加入 200 μL 不含血清的 DMEM 培养基,

将对数期 NCI N87、NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞分别重悬,按文献[16]的方法进行 Transwell 实验,每个样本随机选取 6 个视野拍照,记录穿膜细胞数,统计分析。

2.2.7 Western blot 检测蛋白质表达 提取 NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞全蛋白质,按文献[15]的方法进行蛋白质变性、聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿法转膜、封闭、孵育抗体及显影。抗体 OPA1、DNM1L、Caspase-9、SUCLG2、MDH1、PYGL 和 GAPDH 按 1:1000 稀释,二抗按 1:5000 稀释。采用 Image J 进行灰度值分析,GraphPad Prism 7.04 进行定量分析。

2.3 色谱及质谱条件

2.3.1 色谱条件 Easy nLC 2000 nano 高效液相色谱仪,使用反相 C₁₈ 分离柱(2 cm×100 μm×3 μm)和 C₁₈ 分析柱(15 cm×75 μm×3 μm, 美国 Thermo Fisher 公司)。液相色谱分离条件:流动相 A 为水(0.1% (V/V) 甲酸),流动相 B 为乙腈(0.1% 甲酸),梯度洗脱: 0~5 min, 0~5% B; 6~90 min, 6%~35% B; 91~110 min, 36%~98% B; 111~120 min, 2% B; 流速 200 nL/min。

2.3.2 质谱及其检测参数 LTQ-Orbitrap Velos Pro 型质谱仪,电喷雾(Electrospray ionization, ESI)离子源,电压为 3.8 kV,毛细管温度 350℃,源加热温度 300℃,鞘气流速 40 arbitrary units,辅助气 10 arbitrary unit; Orbitrap 一级扫描质荷比(m/z) 200~2000,分辨率 30000,数据格式 Profile,多级质谱扫描分辨率 7500,数据格式 Centroid,多级碎裂模式为碰撞诱导解离,归一化裂解能量为 35%。离子扫描电荷数范围+2~+6,排除同位素干扰峰,动态排除重复时间为 10 s,重复次数为 5,排除列表大小为 50,排除时间为 20 s,高、低排除质量宽度为 3.0 Da。

2.4 细胞全蛋白提取

收集细胞沉淀,使用预冷磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)洗涤 2 次,加入 8 mol/L 尿素(含 1% 蛋白酶抑制剂),涡旋 30 s,冰上裂解 10 min,超声 2 min,12000 r/min 离心 15 min (4℃),取上清液,用 Bradford 法测定蛋白浓度。

2.5 还原烷基化及 FASP 酶切^[17]

用 50 mmol/L NH₄HCO₃ 分别配制 0.5 mol/L 的 DTT 和 IAA。取蛋白样品 100 μg,加入 DTT(终浓度为 20 mmol/L),混匀,56℃ 反应 30 min,冷却后加入 IAA(终浓度为 50 mmol/L),混匀,室温避光 30 min,加入 20 mmol/L DTT,室温避光 15 min,12000 r/min 离心 5 min,上清液转入超滤管(MWCO 10 kD),12000 r/min 离心 40 min,加入 300 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃,12000 r/min 离心 3 次,每次 40 min。加入 50 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 和 5 μg 胰蛋白酶混合液,37℃ 孵育 4 h,补加 150 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 和 5 μg 胰蛋白酶,37℃ 酶切过夜,12000 r/min 离心 40 min,以 300 μL 水清洗 1 次,合并两次洗脱液,减压得肽段样品。

2.6 肽段分离

肽段经 Waters 2695 HPLC 分离,流动相 A 为水,流动相 B 为乙腈。洗脱梯度:0~34 min, 0~98% B; 35~40 min, 98% B。流速 0.5 mL/min,按 1 min/管收集肽段洗脱液,合并(方法为:① 1、6、11、16、21; ② 2、7、12、17、22; ③ 3、8、13、18、23; ④ 4、9、14、19、24; ⑤ 5、10、15、20、25; ⑥ 26~30; ⑦ 31~35; ⑧ 36~40),得到 8 个混合肽段组分,60℃ 减压干燥,采用质谱检测。

2.7 肽段检测、定量及差异表达蛋白质的筛选

肽段样品经 0.1% 甲酸复溶,12000 r/min 离心 10 min,取上清液,经高效液相色谱分离后进入质谱仪在线检测,搭载 Mascot 2.3 搜索引擎的 Proteome Discover 1.4 搜库,数据库为美国国家生物信息中心人源 Refseq 蛋白质序列库。检索参数:母离子质量公差为 20 ppm,子离子为 0.5 Da。蛋白质修饰:半胱氨酸脒甲基化(Carbamidomethylation)为固定修饰,蛋氨酸 N-乙酰化及氧化(N-term acetylation, oxidation)为动态修饰,采用 Percolator 正/反库匹配搜索,肽段水平错误发现率(False discovery rate, FDR)设定小于 1%。

使用数据依赖分析(Data dependence analysis, DDA)采集数据,基于强度定量法(Intensity based absolute quantification, iBAQ)进行蛋白质定量^[18],采用 FOT(Fraction of total)表示蛋白质标准化后的峰值,含义为每个蛋白质的 iBAQ 除以样本中全部蛋白的 iBAQ(即 $FOT = iBAQ / \sum iBAQ$)^[19]。为方便计

算, $FOT \times 10^5 = iFOT$ 。肽段筛选标准为: 每个蛋白质被检测到的特异性肽段数 ≥ 1 , Mascot ≥ 20 。采用差异倍数及双样本等方差假设 t 检验进行差异蛋白质筛选, 规定若某蛋白的定量值在两组样本中的均值之比 ≥ 2 或 ≤ 0.5 , 且满足 $p < 0.05$, 则此蛋白质在两组样本中的表达具有差异。

3 结果与讨论

3.1 NCI N87R/GATA6 细胞构建及评价

基于 Crispr/Cas9 构建 NCI N87R/GATA6 细胞, Western blot 及质谱定量分析结果证实, GATA6 在 NCI N87/R 细胞中被完全敲除, 表明 NCI N87R/GATA6 细胞构建成功(图 1A 和 1D, 本研究中使用 NCI N87R/GATA6 gRNA1 细胞系进行实验)。Transwell 实验结果表明, NCI N87/R 细胞的侵袭能力较 NCI N87 显著增加($p=0.01$), 而敲除 GATA6 使 NCI N87/R 的侵袭潜能降低($p=0.04$) (图 1B); 进一步采用 CCK-8 试剂盒检测了曲妥珠单抗对 NCI N87、NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞的抑制作用, 显示曲妥珠单抗对 NCI N87 细胞抑制最强, NCI N87R/GATA6 次之, 而 NCI N87/R 最不敏感(图 1C), 提示敲除 GATA6 增强了曲妥珠单抗对 NCI N87/R 细胞的抑制作用。

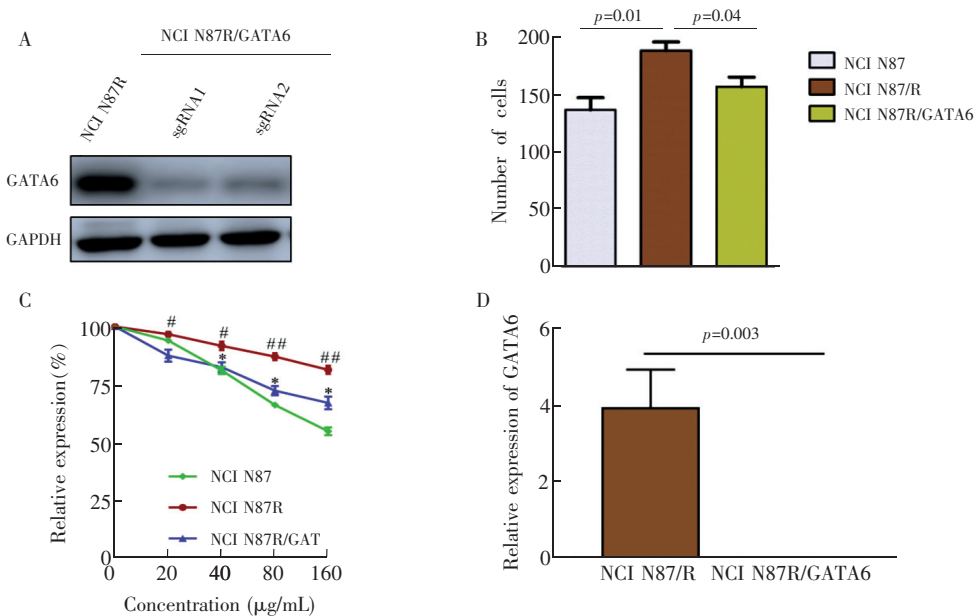


图 1 NCI N87R/GATA6 细胞构建及评价: (A) Western blot 检测 GATA6 在 NCI N87/R 细胞中敲除; (B) Transwell 方法评价 NCI N87、NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞的侵袭能力; (C) CCK-8 试剂盒评价曲妥珠单抗对 NCI N87、NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞的抑制作用; (D) 质谱定量分析 GATA6 在 NCI N87R/GATA6 细胞中的表达

Fig. 1 Establishment and evaluation of cell line NCI N87R/GATA6: (A) Detection of Knockout GATA6 in NCI N87/R cells by Western blot; (B) Invasion ability of NCI N87, NCI N87/R and NCI N87R/GATA6 cell lines evaluated by transwell assays; (C) Inhibitory effect of different concentrations of trastuzumab on NCI N87, NCI N87/R and NCI N87R/GATA6 cells by CCK-8 assays; (D) Eexpression of GATA6 in NCI N87R/GATA6 cells by mass spectrometry analysis

$n=3$, mean $\pm$ SEM, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs NCI N87 cells, * $p<0.05$ vs NCI N87/R cells.

3.2 细胞全蛋白检测及定量分析

为明确 GATA6 敲除对 NCI N87/R 细胞曲妥珠单抗耐药的影响, 采用 Crispr/Cas9 构建 NCI N87R/GATA6 细胞, 基于 Label-free 定量蛋白质组学技术对两组细胞的全蛋白定量分析, 考察 GATA6 敲除对 NCI N87/R 细胞表达谱的影响, 并采用生物信息学筛选差异表达蛋白质, 探究 GATA6 调控曲妥珠单抗耐药的信号通路及可能机制, 实验流程如图 2 所示。

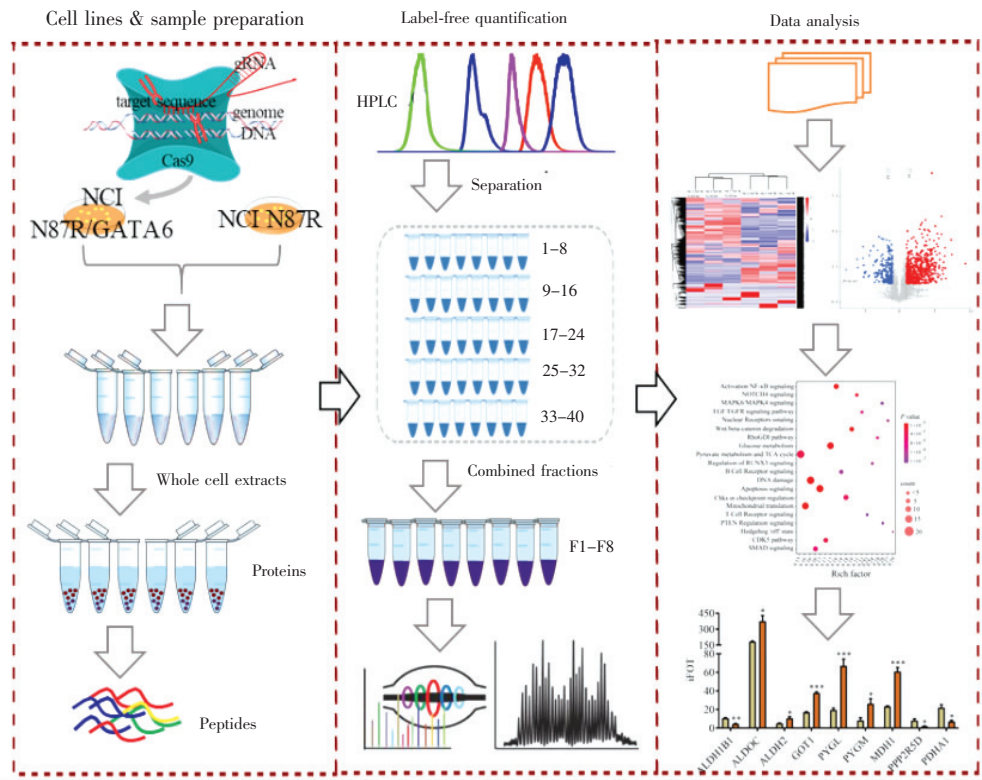


图 2 基于 Label-free 定量蛋白质组学技术研究 GATA6 调控曲妥珠单抗耐药胃癌细胞的信号通路实验流程图

Fig.2 Schematic diagram of signaling pathways regulated by GATA6 in trastuzumab-resistant gastric cancer cells based on label-free quantitative proteomics technique

3.3 数据质控分析

对 NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞样本分别进行 3 次生物学重复,基于 Spearman 方法进行相关性分析。结果显示,组内各样本的相关系数均大于 0.90 (电子版文后支持信息图 S1),表明实验重复性和稳定性良好。

3.4 蛋白表达谱轮廓分析

先分析了两组样本蛋白质表达谱的整体变化,并采用主成分分析法 (Principal component analysis, PCA) 进行轮廓辨析,得到样品组内、组间得分图。由图 3 可知,NCI N87R 和 NCI N87R/GATA6 对应的

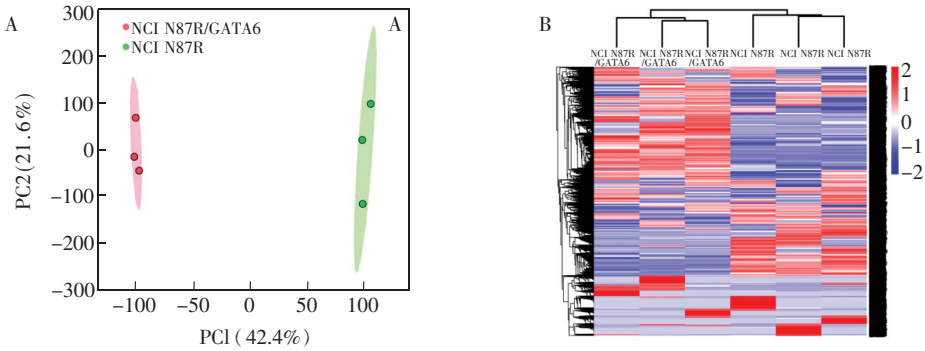


图 3 NCI N87R 和 NCI N87R/GATA6 细胞蛋白质组主成分得分图(A)及热图分析(B)

Fig.3 Score plots of principal component analysis (A) and heatmap analysis (B) based on proteomics profiling of NCI N87R and NCI N87R/GATA6 cells

样本分别沿主成分 1 和主成分 2 (Principal component, PC1 和 PC2) 分开,且承载样本信息的圈在组内聚集良好,而组间明显偏离(图 3A)。从热图(图 3B)得知,组内蛋白质表达水平相似,而组间差异较大,表明 GATA6 敲除对 NCI N87R 细胞蛋白质表达谱产生了明显影响。

3.5 蛋白质鉴定及差异蛋白质的筛选

为保证肽段定量的准确性及鉴定蛋白的可靠性,将肽段水平的卡值设置为“Strict”,并在蛋白水平设置 $\leq 1\%$ 的 FDR,共鉴定到 5792 种蛋白质,其中 3792 种蛋白在每组细胞的 2 个以上样本中被定量测定,将这 3792 种蛋白质用于生物信息学分析。为明确数据分布,对 NCI N87/R 和 NCI N87 R/GATA6 样本中蛋白质的变化倍数(Fold change, FC)分析,即将 NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 样本 3 次重复实验中的蛋白质峰面积均值之比作为变化倍数,再进行对数转化,发现 95% 以上的蛋白质在两组样本中的 FC 值(NCI N87/R/NCI N87R/GATA6)在 2 倍范围内,数据呈正态分布(电子版文后支持信息图 S2A)。因此,数据分析适合独立样本 t 检验。进一步根据显著性水平及均值的变化倍数绘制了火山图(电子版文后支持信息图 S2B)。规定若某蛋白质在 3 次独立实验中的均值在两组样本中的比值 ≥ 2 或 ≤ 0.5 ,且 $p < 0.05$,则此蛋白质在两组样本中的表达具有差异,上调蛋白在火山图中对应的点被标注为红色,下调蛋白对应的点被标注为蓝色,除此以外的蛋白认为在两组样本中的表达未发生显著变化,被标注为灰色。结果表明,487 种蛋白在 NCI N87R/GATA6 中的表达发生了变化($p < 0.05$),其中上调 305 种,下调 182 种(电子版文后支持信息表 S1),未显著变化 3305 种($p > 0.05$)。

3.6 差异表达蛋白质基因本体分析

通过 WebGestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/option.php>)数据库对差异表达蛋白质从生物学过程(Biological process, BP)、细胞成分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)方面进行基因本体分析(电子版文后支持信息图 S3)。细胞成分中,表达上调的蛋白主要定位于线粒体基质、线粒体内膜及线粒体复合物,下调的蛋白主要定位在线粒体基质、线粒体外膜及局部黏附;分子功能方面,表达上调的蛋白质表现为调节核苷及 GTP 连接,下调的蛋白主要参与调控激酶活性;生物学过程方面,表达上调的蛋白主要参与调控中性粒细胞在免疫中的调节及代谢作用,而下调的蛋白在物质转运、信号通路、细胞分化等方面具有重要作用。

3.7 通路富集分析

利用 GeneAnalytics 数据库(<https://ga.genecards.org/>)对差异表达蛋白质进行通路分析,并用气泡图对前 20 个通路($p < 1 \times 10^{-3}$)可视化展示(图 4)。结果表明,丙酮酸代谢和 TCA 循环($p = 5.33 \times 10^{-5}$)、细胞凋亡($p = 4.19 \times 10^{-5}$)、DNA 损伤($p = 2.42 \times 10^{-5}$)、线粒体转运($p = 3.56 \times 10^{-5}$)、葡萄糖代谢($p = 3.04 \times 10^{-5}$)、Wnt/ β -catenin 降解($p = 6.18 \times 10^{-5}$)通路显示较小 p 值(相关蛋白定量见图 4B),提示 GATA6 敲除导致 NCI N87/R 细胞的多条通路发生改变。

采用 Western blot 检测了 OPA1、DNM1L、Cleaved caspase-9、SUCLG2、MDH1 及 PYGL 的表达,以进一步评价质谱定量分析的结果。结果表明,上述蛋白在 NCI N87/R 和 NCI N87R/GATA6 细胞中的变化趋势与质谱定量分析结果一致(图 5)。

众所周知,线粒体不仅对维持细胞稳态至关重要,而且在调控细胞能量代谢、诱导内源性凋亡过程中必不可少。线粒体诱导的细胞凋亡与其内外膜的融合及分裂过程密切相关^[20,21]。生理情况下,线粒体膜融合与分裂之间存在动态平衡,但在 DNA 损伤、外界刺激或基因缺失时,上述平衡被打破,导致线粒体物质转运异常^[22]。作为线粒体内膜融合调控基因,OPA1 缺失或表达下调可引起线粒体融合能力降低,结构呈片段化,也可以引起线粒体内膜结构嵴改变,而结构嵴改变与线粒体诱导的凋亡直接相关^[22,23]。另一方面,作为线粒体重要分裂调控基因,DNM1L 对维持线粒体形态及功能至关重要,在凋亡早期,DNM1L 从细胞质募集到线粒体外膜,启动线粒体分裂机制,当 DNM1L 缺失或下调时,不仅线粒体分裂能力下降,而且其能量代谢异常,细胞凋亡启动,且 DNM1L 的突变引起线粒体外膜延伸,形态改变^[24]。结果显示,NCI N87R/GATA6 细胞中 DNM1L 表达上调,OPA1 表达下调,且调控线粒体膜延伸相关蛋白(MRPS35、MRPL42、MRPL38、MPRL37、MRPL49、MRPL4、MRPS23、MRPS15、MRPL28 和 MRPL44)的表达发生变化,表明线粒体结构及功能发生异常。此外,NCIN87R/GATA6 细胞中凋亡相关蛋白

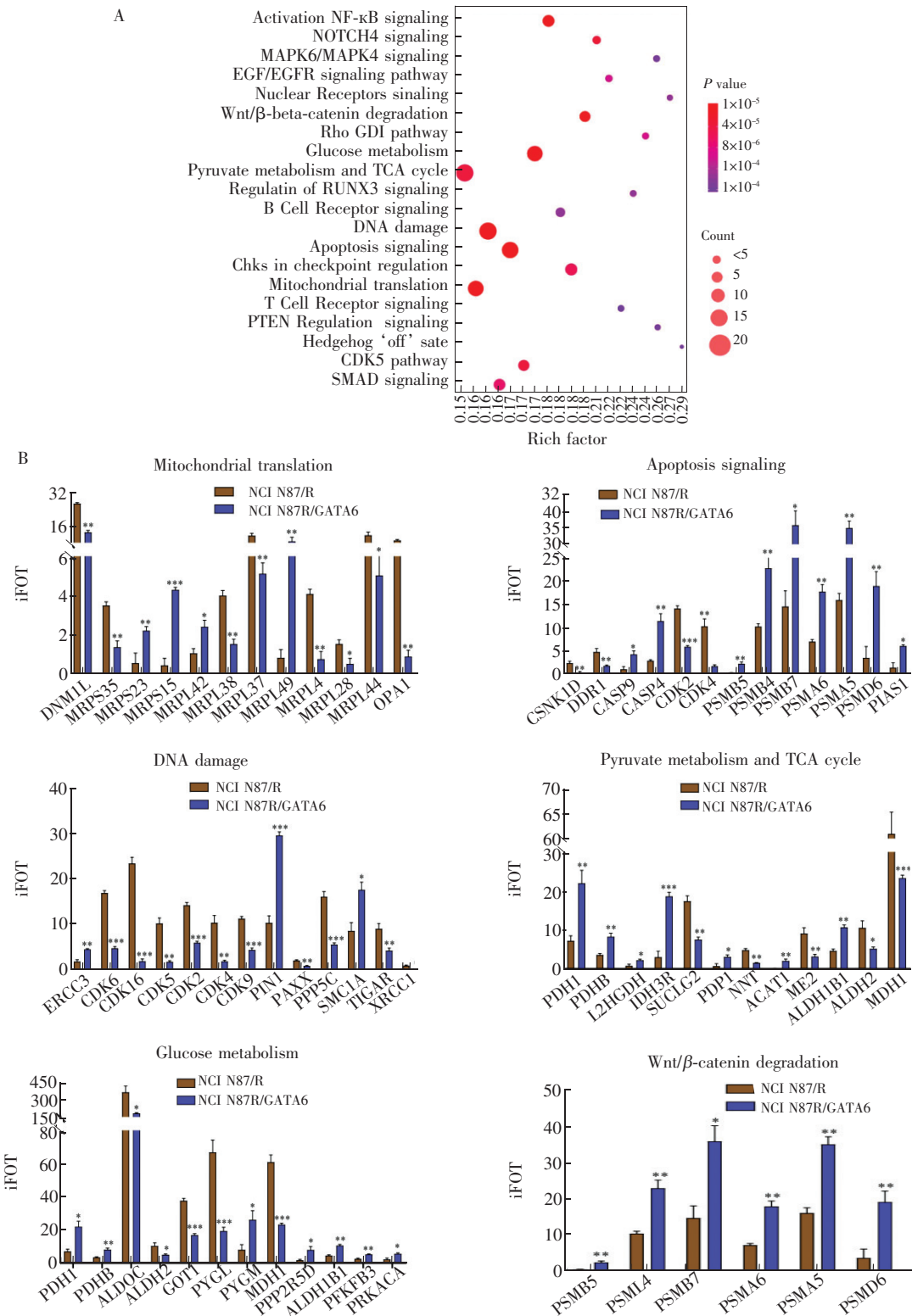


图 4 (A) 差异表达蛋白质通路富集分析; (B) 激活通路蛋白质定量

Fig. 4 (A) Enrichment analysis of signaling pathways of differentially expressed proteins; (B) Quantification of proteins in activated signaling pathways

$n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs NCI N87/R

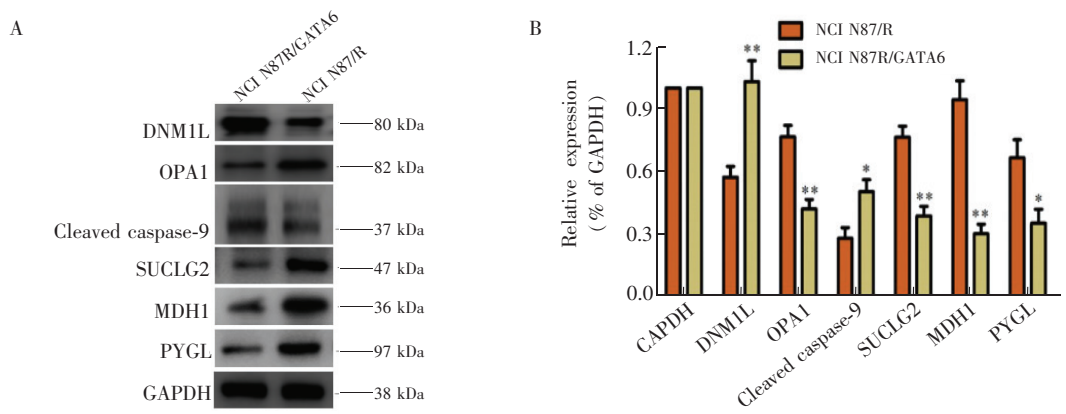


图5 (A) Western blot 检测 NCI N87/R 和 NCI N87/R/GATA6 细胞中 OPA1、DNMI1L、Cleaved caspase-9、SUCLG2、MDH1 和 PYGL 的表达; (B) OPA1、DNMI1L、Cleaved caspase-9、SUCLG2、MDH1 和 PYGL 在两组细胞中的定量检测结果

Fig. 5 (A) Expression of OPA1, DNMI1L, Cleaved caspase-9, SUCLG2, MDH1 and PYGL proteins in NCI N87/R and NCI N87/R/GATA6 cell lines analyzed by Western blot; (B) Quantification of OPA1, DNMI1L, Cleaved caspase-9, SUCLG2, MDH1 and PYGL in two groups of cell lines

$n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs NCI N87/R

(Caspase-4、Caspase-9)表达上调,而细胞周期蛋白(CDK4、CDK6、CDK16、CDK5、CDK2 和 CDK9)表达均下调。据此推断,GATA6 敲除导致 NCI N87/R 细胞线粒体功能障碍,能量代谢异常,DNA 损伤,细胞周期阻滞,经线粒体途径诱导 NCI N87R/GATA6 凋亡,这可能是 GATA6 敲除导致 NCI N87/R 细胞对曲妥珠单抗增敏的重要原因。

葡萄糖经糖代谢途径转化为丙酮酸,后者经三羧酸循环(TCA cycle)产生 ATP,因此,葡萄糖是肿瘤细胞获取能量的直接来源。琥珀酰辅酶 A 连接酶 2 (SUCLG2)是催化琥珀酸合成琥珀酰辅酶 A (Succinyl-CoA)的关键酶,后者经琥珀酰辅酶 A 转移酶(SCOT)催化,将辅酶 A 转移至乙酰乙酸,催化合成乙酰乙酰辅酶 A (Acetoacetyl-CoA),而 Acetoacetyl-CoA 断裂生成乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA)进入 TCA 循环^[25]。结果表明,GATA6 敲除导致 NCI N87R/GATA6 细胞中 SUCLG2 表达下调,而低水平的 SUCLG2 使肿瘤细胞代谢受阻,ATP 生成减少,导致肿瘤细胞增殖、侵袭及转移能力降低。另一方面,作为糖代谢的关键酶,苹果酸脱氢酶(MDH1)能够催化苹果酸转化为草酰乙酸,后者经氧化转变为 ATP。结果显示,GATA6 敲除导致 NCI N87R/GATA6 细胞 MDH1 低表达,提示 GATA6 直接或间接影响了 NCI N87R/GATA6 细胞 TCA 循环,进而导致能量供应失衡,细胞增殖受限。

糖原代谢是肿瘤细胞能量代谢的重要组成部分,需要多种酶的催化才能完成,其中肝型糖原磷酸化酶(PYGL)是催化糖原磷酸化生成 1-磷酸葡萄糖(1-P-G)的限速酶,而 1-P-G 在磷酸葡萄糖变位酶(PGM-1)作用下转变成葡萄糖-6-磷酸(G-6-P),后者既可以通过糖酵解途径产生 ATP,也可以进入磷酸戊糖途径产生 NADPH 及 5-磷酸核糖,而且 PYGL 通过动员肿瘤细胞的糖原分解,引起肿瘤细胞的代谢内环境改变,减少肿瘤细胞活性氧(Reactive oxygen species, ROS)聚集,抑制由 ROS/p53/p21 通路激活引起的衰老,促进肿瘤细胞增殖^[26]。PYGL 异常表达与肿瘤耐药有关,抑制 PYGL 的活性,能够促进贝伐珠单抗的抗肿瘤效果^[26],且在胃癌多药耐药细胞株 EPG85257RDB 中,PYGL 表达上调,提示 PYGL 催化糖原分解与肿瘤耐药有关^[27]。本实验结果表明,敲除 GATA6 能够降低 NCI N87R/GATA6 细胞 PYGL 的表达,推测 GATA6 可能通过调控 PYGL 降低 NCI N87R/GATA6 细胞的糖原代谢能力,进而造成糖利用减少,能量供应不足。综上所述,GATA6 在胃癌曲妥珠单抗耐药中具有重要作用,其机制可能与线粒体功能异常,肿瘤细胞供能不足或代谢异常,进而通过线粒体途径诱导细胞凋亡有关。

此外,本研究组前期研究表明^[15],Wnt/ β -catenin 信号通路激活对胃癌曲妥珠单抗耐药具有重要贡献。本研究表明,GATA6 敲除导致 Wnt/ β -catenin 信号通路降解蛋白表达上调(PSMB4、PSMA5、PSMA6、

PSMB5、PSMD6 和 PSMB7), 表明 GATA6 对 Wnt/ β -catenin 通路具有抑制作用, 提示 GATA6 是 Wnt/ β -catenin 的转录抑制因子, 这与文献[13]报道一致。另外, CDK5、SMAD、NF- κ B 及 NOTCH4 通路在 NCI N87R/GATA6 细胞中显著变化, 提示 GATA6 还可能通过其它途径参与调控 NCI N87/R 细胞对曲妥珠单抗耐药, 其机制有待后续探究。

4 结 论

采用 Crispr/Cas9 技术构建了 GATA6 敲除胃癌细胞株 NCI N87R/GATA6, 探究了 GATA6 敲除对曲妥珠单抗耐药的影响。基于 Label free 定量蛋白质组学技术并结合生物信息学分析了 GATA6 参与调控 NCI N87/R 细胞的信号通路, 结果显示, 敲除 GATA6 对耐药细胞线粒体功能、凋亡、葡萄糖代谢、丙酮酸代谢和 TCA 循环及 Wnt/ β -catenin 通路产生影响。本研究为逆转胃癌曲妥珠单抗耐药治疗提供了参考。

References

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. *CA Cancer J. Clin.*, **2018**, 68(6): 394–424
- 2 Boku N. *Gastric Cancer*, **2014**, 17(1): 1–12
- 3 Liu T S, Qin Y R, Li J, Xu R H, Xu J M, Yang S J, Qin S K, Bai Y X, Wu C P, Mao Y X, Wu H Y, Ge Y L, Shen L. *Cancer Commun.*, **2019**, 39: 38
- 4 ZHOU Ye, LIU Zhe-Yi, WANG Fang-Jun. *Chinese Journal of Chromatography*, **2019**, 37(8): 788–797
周 烨, 刘哲益, 王方军. 色谱, **2019**, 37(8): 788–797
- 5 CHAI Shuang-Shuang, MA You-Ning, GAO Huan-Huan, QIN Mei-Ling, YANG Huan, ZHANG Han-Tong, HE Qiao, LIN Xiao-Yan. *Chinese Journal of Chromatography*, **2018**, 36(2): 107–113
柴爽爽, 马有宁, 高欢欢, 秦美玲, 杨 欢, 张涵彤, 何 巧, 林晓燕. 色谱, **2018**, 36(2): 107–113
- 6 Martinelli P, Carrillo-de Santa Pau E, Cox T, Sainz B, Dusetti N, Greenhalf W, Rinaldi L, Costello E, Ghaneh P, Malats N, Büchler M, Pajic M, Biankin AV, Iovanna J, Neoptolemos J, Real F X. *Gut*, **2017**, 66(9): 1665–1676
- 7 Belaguli N S, Aftab M, Rigi M, Zhang M, Albo D, Berger D H. *Neoplasia*, **2010**, 12(11): 856–865
- 8 Lin L, Bass A J, Lockwood WW, Wang Z, Silvers A L, Thomas D G, Chang A C, Lin J, Orringer M B, Li W, Glover T W, Giordano T J, Lam W L, Meyerson M, Beer D G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109(11): 4251–4257
- 9 Shen W W, Niu N, Lawson B, Qi L S, Zhang J, Li T, Zhang H L, Liu J S. *Hum. Pathol.*, **2019**, 86: 163–169
- 10 Kamnarsan D, Qian B P, Hawkins C, Stanford W L, Guha A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104(19): 8053–8058
- 11 Song Y C, Tian T, Fu X, Wang W J, Li S N, Shi T T, Suo A L, Ruan Z P, Guo H, Yao Y. *Exp. Mol. Pathol.*, **2015**, 99(3): 617–627
- 12 Ma R S, Li X, Liu H, Jiang R, Yang M P, Zhang M H, Wang Y, Zhao Y B, Li H L. *Cancer Biol. Ther.*, **2019**, 20(9): 1206–1212
- 13 Lu Y Y, Zhao X D, Liu Q, Li C X, Graves-Deal R, Cao Z, Singh B, Franklin J L, Wang J, Hu H Y, Wei T Y, Yang M L, Yeatman T J, Lee E, Saito-Diaz K, Hinger S, Patton J G, Chung C H, Emmrich S, Klusmann J H, Fan D M, Coffey R J. *Nat. Med.*, **2017**, 23(11): 1331–1341
- 14 CHANG Jin-Xia, WANG Yi, ZHANG Fan, LIU Wen-Hu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2019**, 47(7): 1035–1044
常晋霞, 汪 宜, 张 帆, 刘文虎. 分析化学, **2019**, 47(7): 1035–1044
- 15 Liu W H, Yuan J B, Liu Z Z, Zhang J W, Chang J X. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(7): 1981
- 16 Liu W H, Chang J X, Liu M W, Yuan J B, Zhang J Q, Qin J, Xia X F, Wang Y. *Oncotarget*, **2017**, 8(28): 45793–45806
- 17 Wi-niewski J R, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. *Nat. Methods*, **2009**, 6(5): 359–362
- 18 Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. *Nature*, **2011**, 473(7347): 337–342
- 19 Lai M, Liang L Z, Chen J W, Qiu N Q, Ge S, Ji S H, Shi T L, Zhen B, Liu M W, Ding C, Wang Y, Qin J. *Mol. Cell. Proteomics*, **2016**, 15(7): 2263–2278
- 20 Li Y Z, Liu X H. *J. Cell. Physiol.*, **2018**, 233(8): 5589–5597

- 21 Kiriyama Y, Nochi H. *Cells*, **2017**, 7(1): 1
- 22 Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. *Essays Biochem.*, **2018**, 62(3): 341–360
- 23 Lee H, Smith S B, Yoon Y. *J. Biol. Chem.*, 2017, 292(17): 7115–7130
- 24 El-Hattab A W, Suleiman J, Almannai M, Scaglia F. *Mol. Genet. Metab.*, **2018**, 125(4): 315–321
- 25 Puchalska P, Crawford P A. *Cell Metab.*, **2017**, 25(2): 262–284
- 26 Favaro E, Bensaad K, Chong M G, Tennant D A, Ferguson D J, Snell C, Steers G, Turley H, Li J L, Günther U L, Buffa F M, McIntyre A, Harris A L. *Cell Metab.*, **2012**, 16(6): 751–764
- 27 Heim S, Lage H. *In Vivo*, **2005**, 19(3): 583–590

Label-free Quantitative Proteomics for Investigation of Signaling Pathways of GATA6 Regulating Trastuzumab Resistance in Gastric Cancer Cells

LIU Wen-Hu^{1,2}, YUAN Jiang-Bei⁴, CHANG Jin-Xia^{*3}

¹(Research Center of Molecular Metabolomics, Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, China)

²(Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

³(School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

⁴(School of Pharmaceutical Sciences and Innovative Drug Research Center, Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract Trastuzumab resistance is one of the principal causes of failure in tumor chemotherapy. Previous studies show that the DNA-binding activity of GATA6, a transcription factor, has a remarkable enhancement in trastuzumab resistant gastric cancer cells (NCI N87/R), while its correlation to resistance remains unclear. In this study, Crispr/Cas9 was employed to establish a GATA6 knock-out cell line (NCI N87R/GATA6). The signaling pathways regulated by GATA6 and related to trastuzumab resistance were investigated based on label-free quantitative proteomics combined with bioinformatics. The extracted proteins were alkylated, and digested using filter aided sample preparation (FASP), and the peptides were separated *via* high performance liquid chromatography and thereafter quantified by LC-MS/MS. Differentially expressed proteins were screened by fold change and student's *t*-test between NCI N87/R and NCI N87R/GATA6 cells. WebGestalt website was adopted for Gene ontology analysis, and GeneAnalytics was utilized for pathway enrichment analysis. The results demonstrated that GATA6 knock-out enhanced the antiproliferative effect of trastuzumab on NCI N87/R cells and suppressed their invasion ability. A total of 5792 proteins were quantified by LC-MS/MS, among which 305 proteins were up-regulated in NCI N87R/GATA6 cells while 182 ones down-regulated. Pathway enrichment analysis revealed that mitochondrial transport, apoptosis, DNA damage, glucose metabolism, pyruvate metabolism and TCA cycle and Wnt/ β -catenin degradation pathways exhibited significant changes. Western blot manifested that the expression of mitochondrial dyneins OPA1 and DNM1L, apoptosis protein caspase-9, TCA metabolic enzymes SUCLG2 and MDH1, and glycogen metabolic enzyme PYGL changed significantly in NCI N87R/GATA6 cells, manifesting that GATA6 knock-out gave rise to mitochondrial dysfunction and abnormal energy metabolism, and therefore inducing the apoptosis of NCI N87R/GATA6 cells. The result implicated that inhibiting the transcriptional activity of GATA6 could be an effective strategy to reverse trastuzumab resistance in gastric cancer.

Keywords Trastuzumab; Resistance; Label-free quantitative proteomics; Transcription factor GATA-6; Signaling pathway

(Received 17 October 2019; accepted 7 November 2019)

This work was supported by the Applied Basic Research Program of Science and Technology of Sichuan Province, China (No. 2019YJ0378), the Project of Sichuan Province Education Department (No. 17ZB0170), the Doctoral Program of North Sichuan Medical College (No. CBY17-QD05), and the Program of Science and Technology of Nanchong, China (No. 18SXHZ0402).