

· 论 著 ·

PKD1 对 HeLa 细胞中 AP1 的转录激活作用*

邹志鹏, 许万福, 冯 丽, 柯志勇, 邓 凡[△]

(南方医科大学细胞生物学教研室, 广州 510515)

摘要:目的 研究蛋白激酶 D1(PKD1)对人 HeLa 细胞中 AP1 转录激活作用,为探讨 PKD1 作用的 AP1 靶基因的功能作用奠定基础。方法 首先将对照质粒 pcDNA3.1、PKD1 野生型质粒(pcDNA-PKD1)或无激酶活性突变型质粒 pcDNA-PKD1-DN 与 AP1 转录活性报告质粒 pAP1-luc 及内参照报告质粒 pRL-SV40 共转染人 HeLa 细胞,同时将对照 siRNA(si-CTL)或 PKD1 siRNA(siRNA-PKD1)与 AP1 转录活性报告质粒 pAP1-luc 及内参照报告质粒 pRL-SV40 也共转染入 HeLa 细胞。转染 48 h 后,分别收集细胞裂解液进行 Western blot 检测外源性 PKD1 过表达或内源性 PKD1 敲低状况,并以 Promega 双报告基因分析试剂盒测定 AP1 荧光素酶活性,计算 AP1 相对转录活性。结果 Western blot 证实 HeLa 细胞中外源性 pcDNA-PKD1、pcDNA-PKD1-DN 过表达,而且 siRNA-PKD1 明显敲低 HeLa 细胞中内源性 PKD1 表达;双色荧光素酶报告基因检测表明,与对照质粒 pcDNA3.1 比较,pcDNA-PKD1 过表达明显增强 AP1 转录活性($P<0.05$),相反,与 pcDNA-PKD1 比较,pcDNA-PKD1-DN 过表达则明显降低 AP1 转录活性($P<0.05$)。与之相符,与 si-CTL 比较,siRNA-PKD1 对内源性 PKD1 敲低,也明显抑制 AP1 转录活性($P<0.01$)。结论 PKD1 表达和激酶活性增强 HeLa 细胞中 AP1 转录激活,提示 PKD1 可能通过 AP1 调控相关靶基因表达。

关键词:蛋白激酶 D1;AP1;siRNA;转录激活

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.004

中图分类号:R329.28

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1945-03

PKD1 contributes to activator protein-1 activation in human HeLa cells*

ZOU Zhi-peng, XU Wan-fu, FENG Li, et al.

(Department of Cell Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To explore functional role of PKD1 on the AP1 transcriptional activation and its targets gene in human HeLa cells. **Methods** pcDNA3.1, wild type of pcDNA-PKD1, kinase dead mutant of pcDNA-PKD1-DN, non specific siRNA (si-CTL) or siRNA of PKD1 was cotransfected with activator protein 1(AP1)luciferase reporter AP1-luc and Renilla luciferase reporter pRL-SV40 into human HeLa cells. After 48 h transfection, cell lysates were harvested to measure the exogenous overexpression of wild type PKD1 and dominant negative PKD1 or endogenous PKD1 knockdown by siRNA using Western blot assay. Furthermore, AP1 transcriptional activity were determined by dual-luciferase reporter assay. **Results** Over-expression of PKD1, dominant negative mutant PKD1(PKD1-DN) or knockdown of PKD1 by siRNA in HeLa cells was confirmed by Western blot. Compared with pcDNA3.1, AP1 transcriptional activation triggered by PKD1 was significantly increased in HeLa cells transfected with pcDNA-PKD1 ($P<0.05$), whereas dramatically reduced by pcDNA-PKD1-DN transfection compared with wild type of pcDNA-PKD1 transfection ($P<0.05$). In addition, AP1 transcriptional activation was also significantly inhibited by siRNA knockdown of endogenous PKD1 compared with control siRNA transfection ($P<0.001$). **Conclusion** Enhanced AP1 transcriptional activation induced by PKD1 expression and kinase activity in HeLa cells suggested that PKD1 may regulate target genes expression through AP1 transcriptional activation.

Key words: protein kinase D1; activator protein 1; siRNA; transcriptional activation

蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD) 属于一类新的结合二酰基甘油(DAG)和佛波脂(PMA)的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,由于其激酶结构域与钙/钙调蛋白调节性激酶(CAMK)家族的同源性高于 PKC 家族,现已归为 CAMK 家族激酶。目前已鉴定出 3 种 PKD 亚型(PKD1、2、3)。现已证实 PKDs 参与细胞高尔基体反面膜转运、细胞存活、迁移、细胞分化、细胞增殖和凋亡等多种细胞功能的调节^[1-3]。

AP1 是一类早期基因编码的核转录因子,通常是由 c-Jun 和 c-Fos 组成的异源二聚体。参与生长控制、细胞凋亡及免疫调节等多种细胞功能作用^[4-6]。本研究以人 HeLa 细胞为研究

模型,观察过表达或敲低 PKD1 对 HeLa 细胞中 AP1 转录激活作用的影响,为进一步探讨 PKD1 调控 AP1 靶基因的表达及其功能作用奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 DMEM 液体培养基和胎牛血清购自 Hyclone, PKD1(A-20)抗体(货号:SC-638)购自 Santa Cruz, Beta-Actin 抗体(C4)(货号:SC-47778)购自 Santa Cruz, Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司,HiLymax 转染试剂购自日本同仁化学,聚丙烯酰胺凝胶电泳所需之丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、SDS、Tris 及甘氨酸等超纯生化试剂均购自美国 Pro-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973014);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(K1010353);南方医科大学院长基金资助项目(JC0701)。△ 通讯作者,E-mail:fandeng@smu.edu.cn。

mega 公司, siRNA-PKD1-1 和 siRNA-PKD1-2 由 Invitrogen 公司设计并证实具有抑制作用的 PKD1 Validated Stealth™ RNAi (Part No./Catalog No. 45-1812), 其序列为: siRNA-PKD1-1: 5'-GCA CUA UUG GAG AUU GGA UAG CAA A-3', siRNA-PKD1-2: 5'-GGG UUC UGG ACA GUU UGG AAU UGU U-3'。pcDNA3.1、pcDNA-PKD1、pcDNA-PKD1-DN 质粒由美国匹兹堡大学 Q. Jane Wang 惠赠, AP1 荧光素酶报告质粒 pAP1-luc 购自 Clontech 公司, 海肾荧光素酶内参照报告质粒 pRL-SV40 购自 Promega 公司, Dual luciferase assay kit (E1910) 购自 Promega 公司。

1.2 细胞株与细胞培养 人 HeLa 细胞株引自美国标准生物制品收藏中心(ATCC), 培养于 DMEM 完全培养基(10%胎牛血清、100 u/mL 青霉素、100 ng/mL 链霉素)中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。

1.3 质粒转染与实验分组 HeLa 细胞按 1.5×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板中, 24 h 后分别将对对照质粒 pcDNA3.1、PKD1 野生型质粒 (pcDNA-PKD1) 或无激酶活性突变型质粒 pcDNA-PKD1-DN 与 AP1 转录活性报告质粒 pAP1-luc 及内参照报告质粒 pRL-SV40 共转染人 HeLa 细胞, 转染过程按 Hily-max 说明书进行。

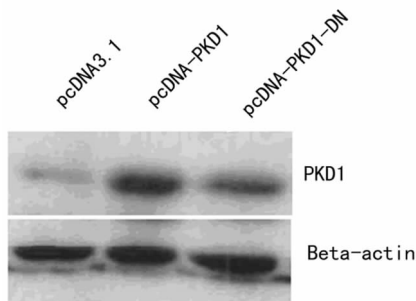
1.4 siRNA 与荧光素酶报告基因共转染 HeLa 细胞按 1×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板中, 24 h 后分别将对对照 siRNA (si-CTL) 或 PKD1 siRNA (siRNA-PKD1) 与 AP1 转录活性报告质粒 pAP1-luc 及内参照报告质粒 pRL-SV40 共转染人 HeLa 细胞, 转染过程按 Lipofectamine2000 说明书进行。

1.5 荧光素酶报告质粒 AP-luc 转录活性检测 用 Vector3 多色荧光检测仪分别测定荧光素酶报告质粒 AP-luc 和海肾荧光素酶报告质粒 pRL-SV40 的活性, 以二者相对比值作为荧光素酶相对活性单位 (relative luciferase unit, RLU)。具体方法参照 Promega 的 Dual-Luciferase 双荧光素酶报告基因检测系统说明书。

1.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 条图的制作和统计均使用 Graphpad Prism5.0 软件。多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较行 Turkey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测证实 PKD1 转染 HeLa 细胞中 PKD1 过表达 pcDNA-PKD1、pcDNA-PKD1-DN 转染 HeLa 细胞中 PKD1 明显过表达, 而对照质粒 pcDNA3.1 转染 HeLa 细胞中只有微量内源性 PKD1 表达, 见图 1。

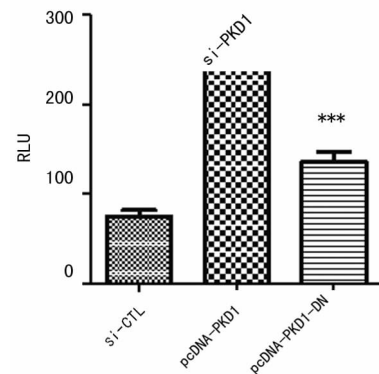


PKD1、PKD1-DN 转染的 HeLa 细胞中 PKD1 过表达。

图 1 Western blot 检测

2.2 过表达 PKD1 增强 AP1 转录活性而 PKD1-DN 过表达则明显降低 AP1 转录活性 与 si-CTL 比较, 过表达 PKD1 明显

增强 HeLa 细胞中 AP1 转录激活 ($P < 0.05$), 相反尽管与 si-CTL 比较, pcDNA-PKD1-DN 过表达也增加 AP1 转录激活, 但与 pcDNA-PKD1 比较, pcDNA-PKD1-DN 过表达则明显降低 AP1 转录激活 ($P < 0.05$)。提示 PKD1 增强 AP1 的转录激活部分依赖于 PKD1 激酶活性, 见图 2。



PKD1 的过表达显著增强 AP1 的转录激活。

图 2 双色荧光素酶报告基因检测

2.3 敲低内源性 PKD1 表达降低 AP1 转录激活 与 si-CTL 比较, 瞬时转染 siRNA-PKD1 48 h 后, si-PKD1 明显敲低 HeLa 细胞中内源性 PKD1 表达, 见图 3。敲低内源性 PKD1 表达可明显降低 HeLa 细胞中 AP1 转录激活 ($P < 0.001$), 见图 4。

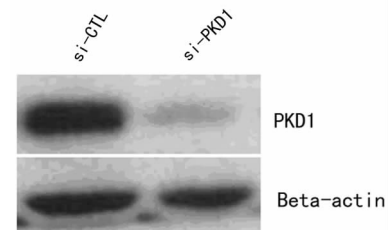
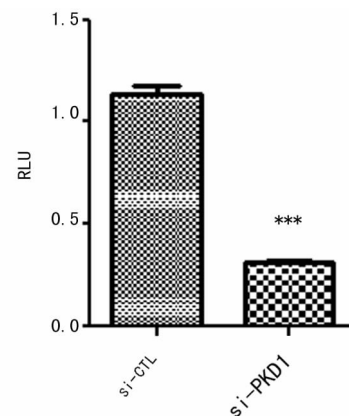


图 3 si-PKD1 敲低 HeLa 细胞中内源性 PKD1 的表达



敲低内源性 PKD1 的表达降低 AP1 转录激活。

图 4 双色荧光素酶报告基因检测

3 讨论

PKDs 属于一类新的结合 DAG 和 PMA 并受 PKC 激活的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 目前已鉴定出 3 种 PKD 亚型 (PKD1、2、3)^[1-2]。作为 DAG 和 PKC 的双重靶分子, 现已证实参与细胞高尔基体反面膜转运、细胞存活、迁移、细胞分化、细胞增殖和凋亡等多种细胞功能的调节^[1-3]。3 种亚型中对于 PKD1 研究最多, PKDs 在肿瘤中的作用近年来越来越受到人们关注。PKD1 不但有促进胰腺癌细胞增殖和抗凋亡的作

用^[7],而且抑制胰腺癌、前列腺癌、胃癌和乳腺癌细胞的迁移^[8-11]。然而对 PKD1 参与的肿瘤生长、侵袭和迁移的信号通路的精确调节机制还了解甚少。因此对 PKD1 下游靶分子的调控研究,尤其对转录因子激活的研究将有助于阐明 PKD1 在肿瘤发生和进展中的机制,并为治疗提供新的途径。

AP1 是多种信号通路的下游转录因子,可以被包括 PMA 在内的多种刺激所诱导活化,从而与基因上游调控序列中的 TPA 反应元件(TRE)结合,激活许多与肿瘤有关的基因,如细胞周期素、金属蛋白酶、胶原酶等的表达,调控细胞生长、凋亡等多种生理过程^[4-5]。本研究利用双色荧光素酶报告基因系统,探讨 PKD1 对 AP1 转录因子报告基因的转录激活作用,首次证实人类 HeLa 细胞中 PKD1 过表达明显增强 AP1 转录激活(图 2),而与 pcDNA-PKD1 过表达比较,pcDNA-PKD1-DN 则显著降低 AP1 转录激活(图 2)。由于 pcDNA-PKD1-DN 是在其催化结构域 733 位点进行 D733A 定点突变,不能结合 ATP,因而丧失了 PKD1 的激酶活性^[12]。上述结果提示 PKD1 对 AP1 的转录激活部分依赖于 PKD1 的激酶活性。

siRNA 的靶向特异性是抑制或敲低内源性基因表达的关键。为此作者利用 Invitrogen 公司设计并证实具有抑制作用的 PKD1 Validated Stealth TM RNAi DuoPak 与 AP1 的萤火虫荧光素酶报告质粒 pAP1-luc 及海肾荧光素酶报告质粒 pRL-SV40 共转染人 HeLa 细胞,结果表明,si-PKD1 明显敲低 HeLa 细胞中内源性 PKD1 表达(图 3),而且双色荧光素酶报告基因检测表明,敲低内源性 PKD1 表达可明显降低 HeLa 细胞 AP1 转录激活(图 4)。上述结果进一步证实,PKD1 通过其激酶活性增强 AP1 转录激活作用,提示 PKD1 通过激活 AP1 转录激活而调节相关靶基因表达。但 PKD1 调控的 AP1 靶基因以及在肿瘤发生、进展及侵袭和迁移中的作用尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(6): 317.
- [2] Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13205.
- [3] Jaggi M, Du C, Zhang W, et al. Protein kinase D1: a pro-dependent promyelocyte capable of biphenotypic differentiation to neutrophils or macrophages, independent of enforced meis expression [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3274.
- [4] Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(1): 65.
- [5] Shaulian E. AP-1—The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise[J]. Cell Signal, 2010, 22(6): 894.
- [6] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11): 859.
- [7] Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, et al. PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells [J]. Oncogene, 2003, 22(55): 8939.
- [8] Eiseler T, Schmid MA, Topbas F, et al. PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration[J]. FEBS Lett, 2007, 581(22): 4279.
- [9] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 483.
- [10] Eiseler T, Doepler H, Yan IK, et al. Protein Kinase D1 regulates MMP expression and inhibits breast cancer cell invasion[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(1): R13.
- [11] Kim M, Jang HR, Kim JH, et al. Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(3): 629.
- [12] Iglesias T, Cabrera-Poch N, Mitchell MP, et al. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D [J]. J Biol Chem, 2000, 275(51): 40048.
- [13] Calvo KR, Sykes DB, Pasillas M, et al. Hoxa9 immortalizes a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent promyelocyte capable of biphenotypic differentiation to neutrophils or macrophages, independent of enforced meis expression [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3274.
- [14] Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, et al. Stage- and lineage-specific expression of the HoxA10 homeobox gene in normal and leukemic hemtopoietic cells[J]. Exp Hematol, 1995, 2(11): 1160.
- [15] Calvo KR, Knoepfler PS, Sykes DB, et al. Meis 1a suppresses differentiation by G-CSF and promotes proliferation by SCF: Potential mechanisms of cooperativity with Hoxa9 in myeloid leukemia [J]. PNAS, 2001, 98(23): 13120.

(收稿日期: 2010-06-29)

(上接第 1944 页)

et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated HXOA9 gene in bonGiampaolo A, Felli N, Diverio D, et al. Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2002, 16(7): 1293.

[11] Magnusson M, Brun AC, Lawrence HJ, et al. HXOA9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects[J]. Exp Hematol, 2007, 35(9): 1421.

[12] Wagner W, Ansorge A, Wirkner U, et al. Molecular evidence for stem cell function of the slow dividing fraction among human Hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis[J]. Blood, 2004, 104(3): 675.

[13] Calvo KR, Sykes DB, Pasillas M, et al. Hoxa9 immortalizes a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-

(收稿日期: 2009-06-23 修回日期: 2010-01-13)