

· 论 著 ·

## PKD3 上调 HEK293 中 uPAR 的表达及机制\*

邹志鹏, 冯 丽, 许万福, 邓 凡<sup>△</sup>

(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 D 3(PKD3)对人胚肾上皮细胞系 HEK293 细胞中尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)表达水平的影响及其机制,以阐明 PKD3 调控 uPAR 表达的重要作用。方法 首先在 HEK293 细胞中过表达 PKD3,并以佛波酯(PMA)刺激 24 h,而后采用实时定量 PCR 扩增 PKD3、uPAR cDNA,并使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法比较其相对表达量的变化。然后在 HEK293 细胞中转染  $\beta$ -连环蛋白野生型质粒,并以 PMA 刺激 1 h,用免疫沉淀法检测 PKD3 与  $\beta$ -连环蛋白之间的相互作用。结果 在转染的 HEK293 细胞中 PKD3 过表达,而且过表达 PKD3 可明显上调 PMA 诱导的 uPAR mRNA 表达水平。同时在 PMA 刺激作用下,可明显增强 HEK293 细胞中 PKD3 与  $\beta$ -连环蛋白之间的相互作用。结论 PKD3 可能通过与  $\beta$ -连环蛋白的相互作用上调 uPAR 表达。

**关键词:**蛋白激酶 D3; 尿激酶型纤溶酶原激活物受体; $\beta$ -连环蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.005

中图分类号:R737.25;R730.23

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2100-03

## PKD3 contributes to up-regulation of uPAR expression in HEK293 cells\*

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

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

**Abstract: Objective** To explore the functional role and mechanism of PKD3 on uPAR expression in human embryonic kidney 293 cells. **Methods** HEK293 cells were transfected with pEGFP-C2 or pEGFP-PKD3 plasmid followed by PMA treatment for 24h, mRNA levels of PKD3 and uPAR were then analyzed by RT-QPCR using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Furthermore, HEK293 cells were transfected with pEGFP-C2 or pEGFP-Beta-Catenin and then treated with PMA for 1h, cells were harvested and possible interaction of PKD3 with Beta-Catenin was measured by Immunoprecipitation assay. **Results** uPAR mRNA level triggered by PMA was dramatically increased in HEK293 cells transfected with pEGFP-PKD3 compared with cells transfected with pEGFP-C2. Meanwhile, interaction of Beta-Catenin with PKD3 was enhanced in response to PMA stimulation manifested by Immunoprecipitation. **Conclusion** PKD3 may up-regulate uPAR expression through Beta-catenin in HEK293 cells.

**Key words:** protein kinase D3; uPAR; Beta-catenin

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,目前已鉴定出 3 种 PKD 亚型(PKD1、2、3),分别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<sup>[1-2]</sup>。PKD1 在低侵袭型前列腺癌细胞 LNCaP 中表达水平较高,不仅如此 PKD1 可磷酸化 E-钙粘素(E-Cadherin),从而增强 LNCaP 的聚集,减弱其迁移能力<sup>[3]</sup>。作者最近的研究显示,在高侵袭型前列腺癌细胞 PC-3 中 PKD3 的表达水平明显高于 LNCaP,在 LNCaP 中过表达 PKD3 可抑制 PMA 诱导的细胞凋亡,并促进细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期转换;反之敲低(knockdown)PC-3 中的内源性 PKD3 可促进细胞凋亡,也可导致 G<sub>0-1</sub> 期阻滞,从而抑制 PC-3 增殖<sup>[4]</sup>。而在非小细胞肺癌 A549 中 PKD3 可通过基质金属蛋白酶-2(MMP-2)促进肿瘤的迁移(尚未发表)。提示 PKD3 可能通过不同的机制而促进细胞的迁移、侵袭。

尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)隶属于 Ly-6 蛋白超家族,与其配体 uPA 前体结合后导致 uPA 的激活,从而切割纤溶酶原产生有活性的纤维蛋白溶酶,继而降解细胞外基质,同时激活一系列 MMP-2,如 MMP-3、MMP-9 及 MMP-13,在肿瘤的迁移、侵

袭和转移中起重要作用<sup>[5-6]</sup>。uPAR 的表达受多种转录因子如 AP1、HIF1- $\alpha$  及 SP1 调控,同时有研究表明, $\beta$ -连环蛋白-TCF4 信号通路可通过 AP1 间接上调结肠癌细胞中 uPAR 的表达<sup>[7]</sup>。

尽管 PKD3 与 uPAR 均可促进肿瘤的迁移,但肿瘤迁移和侵袭中 PKD3 及 uPAR 的相互调控关系尚未阐明。本研究拟以人胚肾上皮细胞系 HEK293 为研究模型,探求 PKD3 对于 uPAR 的调控作用及其初步机制,为阐明 PKD3 调控细胞迁移及肿瘤迁移和侵袭的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** DMEM 液体培养基以及胎牛血清购自 Hyclone,转染试剂 Hilymax 购自日本同仁化工,丙烯酰胺、SDS、CHPAS 及甘氨酸等超纯生化试剂均购自美国 Promega 公司,焦磷酸钠、氟化钠和钒酸钠购自 Sigma, pEGFP-C2、pEGFP-PKD3 及 pEGFP- $\beta$ -连环蛋白质粒由美国匹兹堡大学医学院 Dr. Wang Q. Jane 惠赠, Rabbit Anti-PKD3 Polyclonal Antibody (A300-319A)购自 Bethyl Laboratories, Mouse Anti-Beta-Catenin Monoclonal Antibody(SC-7963)购自 Santa Cruz, 逆转录和实时定量 PCR 试剂盒购自复能基因公司(FULGENE),实时定量 PCR 相关基因的引物由上海英俊公司设计和合成,其序

\* 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)。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: fandeng@smu.edu.cn。

列为 PKD3 正向引物: 5'-ACCCGTCCCACGATATGTCAG-TA-3', PKD3 反向引物: 5'-CAGCGTTTATGGCAGTT-GAATTTG-3'; uPAR 正向引物: 5'-GGTGACGCCTTCAG-CATGA-3', uPAR 反向引物: 5'-CCCCTGCGGTACTGGA-CAT-3'; 内参照基因为次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1(hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, HPR1), HPR1 正向引物: 5'-TGACACTGGCAAACAATGCA-3', HPR1 反向引物: 5'-GGTCCTTTTACCAGCAAGCT-3'。

**1.2 细胞株与细胞培养** 人胚肾上皮细胞系 HEK293 细胞由本室保存, 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% CO<sub>2</sub>。

**1.3 质粒转染与实验分组**

**1.3.1 实时定量 PCR** HEK293 细胞按 2.5 × 10<sup>5</sup>/mL 密度接种于 6 孔板中, 24 h 后分别转入 pEGFP-C2 及 pEGFP-PKD3, 24 h 后血清饥饿 12 h, 继以 100 nM PMA 刺激 24 h, 上述 4 组分别记为 CTL、CTL+PMA、PKD3、PKD3+PMA 组。转染过程按照 Hilymax 说明书进行。

**1.3.2 免疫沉淀** 将 HEK293 细胞接种于 6 cm 培养皿中, 24 h 后达到约 50% 融合密度, 此时分别转染 pEGFP-C2(CTL) 或 pEGFP-Beta-Catenin(Beta-Catenin), 24 h 后血清饥饿 16 h, 以 DMSO 或 100 nM PMA 刺激 1 h 后裂解上述 4 组细胞准备进行免疫沉淀分析。

**1.4 总 RNA 提取及逆转录** 总 RNA 提取按照 TRIZOL 试剂盒说明书进行。逆转录按照复能基因(FULGENE)逆转录试剂盒说明书进行。

**1.5 实时定量 PCR 检测** 按照复能基因(FULGENE)实时定量 PCR 试剂盒说明书进行, PCR 反应: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C、10 s, 58 °C、15 s, 72 °C、20 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 72 °C 采集荧光信号。以 Beta 2-微管蛋白(B2M)作为内参照基因, 并采用相对定量法进行定量。相对表达量 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>[8], ΔCt = 目的基因平均 Ct 值 - 内参照基因平均 Ct 值, ΔΔCt = 实验组 ΔCt - 对照组 ΔCt。

**1.6 免疫沉淀与免疫印迹**

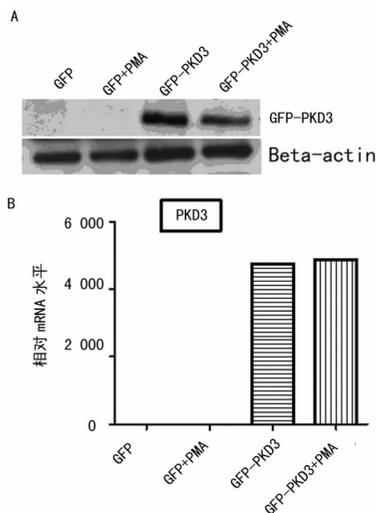
**1.6.1 免疫沉淀** 向每个皿中加入预冷 IP 裂解缓冲液(40 mM HEPES, pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 焦磷酸钠, 10 mM β-甘油磷酸钠, 50 mM 氟化钠, 1.5 mM 钒酸钠, 0.3% CHAPS)500 μL(约 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL)冰上裂解 30 min, 期间摇动平皿几次以促使裂解液与细胞充分接触。裂解后的细胞经 4 °C、12 000 × g 离心 10 min, 取上清液标为全细胞裂解液。蛋白定量后取 500 μg 全细胞裂解液与相应的抗体 4 °C 孵育过夜, 孵育完成后加入蛋白 A/G-琼脂糖树脂(根据抗体属性选择) 4 °C、2 h, 孵育完毕后用裂解缓冲液漂洗树脂 3 次, 漂洗缓冲液(50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.3 CHAPS)漂洗 2 次, 每管加入 40 μL 2 × SDS 上样缓冲液 100 °C 加热 5 min, 12 000 × g 离心 5 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 或者置 -70 °C 保存。

**1.6.2 免疫印迹** 收集细胞, 加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min, 于 4 °C、12 000 × g 离心 20 min, 取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转位到 PVDF 膜上, 最后采用化学发光法检测。具体步骤及试剂配方参见参考文献[9]。

**2 结 果**

**2.1 Western blot 和实时定量 PCR 检测证实 HEK293 细胞中 PKD3 过表达** GFP-PKD3 转染的 HEK293 细胞中 PKD3

明显过表达, 而 pEGFP-C2 转染的 HEK293 细胞中未见外源性 PKD3 表达, 而且, 有、无 PMA 刺激的 GFP-PKD3 转染的 HEK293 细胞 PKD3 表达一致(图 1A、1B)。



瞬时转染 GFP-PKD3 的 HEK293 细胞中 PKD3 蛋白和 mRNA 水平均过表达。

图 1 Western blot 和实时定量 PCR 检测结果

**2.2 过表达 PKD3 增强 HEK293 细胞中 PMA 诱导的 uPAR 表达** 在无 PMA 刺激时过表达 PKD3 即可明显上调 HEK293 细胞中 uPAR 转录水平, 而 PMA 刺激则明显增强(图 2)。

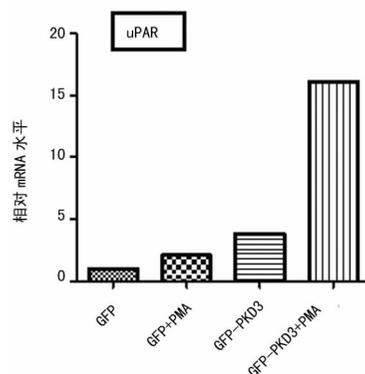


图 2 在 HEK293 中过表达 PKD3 可增加 PMA 刺激诱导的 uPAR 转录

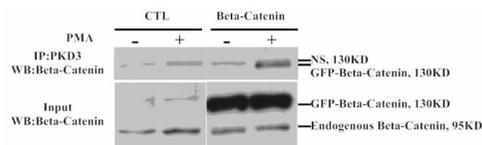


图 3 HEK293 细胞中 PMA 刺激诱导 PKD3 与 β-连环蛋白相互作用。

**2.3 在 HEK293 细胞中 PMA 刺激诱导 PKD3 与 β-连环蛋白结合** 在 HEK293 中过表达 PKD3 可明显增强 PMA 刺激诱导 uPAR 转录(图 2), 而在结肠癌细胞和组织中过表达 β-连环蛋白可明显上调 uPAR mRNA 和蛋白水平[7], 因此作者设想 PKD3 直接或间接通过 β-连环蛋白上调 uPAR 转录活性。如图 2 所示, 过表达 β-连环蛋白的 HEK293 细胞在 PMA 刺激时 PKD3 与 β-连环蛋白有明显的共沉淀现象, 提示 PMA 可诱导 PKD3 与 β-连环蛋白相互作用。有趣的是, 即使在未转染 GFP-β-连环蛋白 CTL 组中, 免疫沉淀复合物中也检测到了约

130×10<sup>3</sup> 的条带(NS),与 GFP-β-连环蛋白相对分子质量极为接近。而在未做免疫沉淀的全细胞裂解液(Input)中,β-连环蛋白抗体同样检测到了此条带,提示该条带很可能代表一种可与 PKD3 及 β-连环蛋白免疫复合物结合的非特异蛋白(图 3)。

### 3 讨论

作者前期研究证实,PKD3 不仅调控前列腺癌细胞的增殖和存活<sup>[4]</sup>,还促进非小细胞癌 A549 的迁移和侵袭(尚未发表)。uPAR 与 uPA 前体结合后可激活 uPA 的活性,激活纤维蛋白酶,降解细胞外基质,激活一系列基质金属蛋白酶,从而促进包括前列腺癌在内的多种肿瘤的迁移和侵袭<sup>[5-6]</sup>。本研究表明,单纯过表达 PKD3 即可上调 HEK293 中 uPAR 的转录水平,而以 PMA 激活 PKD3 活性后 uPAR 的转录水平更是明显上调,提示 PKD3 很可能通过上调 uPAR 的表达介导细胞的迁移和侵袭。

PKD3 通过什么途径上调 uPAR 的表达呢? 前期有研究提示,β-连环蛋白-TCF4 信号通路可通过 AP1 间接上调结肠癌细胞和组织中 uPAR 的表达<sup>[7]</sup>,而近期有文献报道,PKD1 可磷酸化 β-连环蛋白并使之从细胞核转位到细胞膜并与 E-Cadherin 结合,从而促进肿瘤细胞的黏附,抑制其侵袭<sup>[10-11]</sup>。鉴于 PKD1 与 PKD3 的同源性和可能存在的功能拮抗,本研究假设 PKD3 可磷酸化 β-连环蛋白并使之转位到细胞核,从而间接激活 uPAR 的转录。与之相符,PMA 刺激 HEK293 细胞可诱导 PKD3 与 β-连环蛋白直接结合,为进一步验证上述假设提供了有效证据。

在随后的研究中,作者拟采用激光共聚焦显微镜探求在不同细胞系(HEK293 及前列腺癌细胞系)中及不同条件下 PKD3 与 β-连环蛋白之间可能存在的共定位关系,并以亚细胞组分分离(subcellular fractionation)研究 PKD3 及 β-连环蛋白应对各种刺激时在细胞质、细胞膜和细胞核之间的穿梭情况,以进一步证实 PKD3 与 β-连环蛋白之间的相互作用,并定位其相互作用的区域。同时作者还将在不同的前列腺癌细胞系中以报告基因 Topflash 验证 PKD3 的表达和活性是否调控 TCF4 的转录活性。

### 参考文献:

[1] Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signa-

(上接第 2099 页)

- vision[J]. *Mol Cell Biol*,2006,26(12):4489.
- [2] Martin S, Nishimune A, Mellor JR, et al. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission [J]. *Nature*,2007,447(7142):321.
- [3] Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, et al. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53 [J]. *Cell*,2000,101(7):753.
- [4] Carter S, Bischof O, Dejean A, et al. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53 [J]. *Nat Cell Biol*,2007,9(4):428.
- [5] Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, et al. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase [J]. *Nature*,2005,436(7049):428.
- [6] Karamouzian MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, et al.

ling [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, Rao PS, Smith DJ, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C<sub>μ</sub> is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2005,65(2):483.
- [4] Chen J, Deng F, Singh SV, et al. Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCε/PKD3 pathway downstream of Akt and ERK 1/2 [J]. *Cancer Res*,2008,68(10):3844.
- [5] Li Y, Cozzi PJ. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer [J]. *Cancer Treat Rev*,2007,33(6):521.
- [6] Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2010,11(1):23.
- [7] Mann B, Gelos M, Siedow A, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1999,96(4):1603.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method [J]. *Methods*,2001,25(4):402.
- [9] Lu G, Chen J, Espinoza LA, et al. Protein kinase D 3 is localized in vesicular structures and interacts with vesicle-associated membrane protein 2 [J]. *Cell Signal*,2007,19(4):867.
- [10] Du C, Jaggi M, Zhang C, et al. Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin [J]. *Cancer Res*,2009,69(3):1117.
- [11] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C<sub>μ</sub> is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2005,65:483.

(收稿日期:2010-06-29)

SUMO and estrogen receptors in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2008,107(2):195.

- [7] Xhemalce B, Riising EM, Baumann P, et al. Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2007,104(3):893.
- [8] 郭武华,袁丽华,肖志华,等. SUMO-1 基因在肝癌中的表达及意义 [J]. *重庆医学*,2009,38(24):2308.
- [9] Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems; a plea of no contest [J]. *Trends Cell Biol*,2005,15(10):525.
- [10] 郭武华,袁丽华,肖志华,等. SUMO-1 基因 siRNA 抑制肝癌细胞 SMMC-7721 生长的研究 [J]. *天津医药*,2010,38(1):4.

(收稿日期:2009-10-25 修回日期:2010-01-12)