DOI:10.16016/j.1000-5404.202007249

BCAR1 促进肺腺癌细胞增殖、生长及其互作蛋白网络的研究

茆春国,蒋莎莎,范小青,隆 谭,金 花,谭群友,邓 波 400042 重庆,陆军军医大学大坪医院全军胸外科研究所

[摘要] **目的** 本研究旨在探索乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白 1(breast cancer anti-estrogen resistance 1,BCAR1,p130cas)在肺癌发生发展中的生物功能与互作蛋白网络。**方法** ①免疫印迹实验(western blot)研究 15 对肺癌及癌旁组织中 BCAR1 表达情况,免疫组化(immunohistochemistry,IHC)分析 54 例早期肺腺癌组织芯片中 BCAR1 与预后的关系,并通过 TCGA 数据库进一步验证。②通过 CRISPR/Cas9 分别构建人肺腺癌 H1975,H1299 BCAR1 敲除(knock out,KO)细胞株,通过调取 cDNA 文库构建 A549 过表达(overexpression,OE)细胞株,四唑盐比色实验(MTT)检测细胞增殖能力、平板克隆形成实验检测细胞存活能力。③免疫共沉淀质谱分析(immunoprecipitation mass spectrometry,IP-MS)联合生信分析找出工具细胞即 293T 细胞中 BCAR1 的互作蛋白网络及可能的关键节点。④western blot 验证细胞系 BCAR1-KO 或 BCAR1-OE 后关键节点基因的表达变化,并在肺癌组织芯片中予以验证基因表达的相关性。**结果** ①western blot:BCAR1 在肺腺癌组织较癌旁组织显著高表达($P<0.05$);IHC:BCAR1 高表达的早期肺癌患者预后差(HR=5.026,$P=0.001$),TCGA:BCAR1 高表达肺腺癌患者预后差(HR=1.5,$P=0.008\ 7$)。②成功构建 BCAR1-KO 与 BCAR1-OE 稳定细胞株,细胞增殖能力及细胞克隆形成率均随 BCAR1 敲除降低,过表达后升高。③IP-MS 联合生信分析:哺乳动物酵母同源致命因子 Sec13 蛋白 8(MLST8)可能作为 BCAR1 的关键互作蛋白;④相比癌旁组织,MLST8 在癌组织中高表达($P<0.05$),并与 BCAR1 表达显著正相关($R=0.422\ 1$,$P=0.001\ 5$)。细胞系中 MLST8 的表达在 BCAR1 敲除后降低,过表达后升高。**结论** BCAR1 在肺癌中发挥重要的促瘤效应。MLST8 表达与 BCAR1 显著相关,可能是 BCAR1 的关键下游蛋白。

[关键词] 乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白 1;哺乳动物酵母同源致命因子 Sec13 蛋白 8;细胞增殖;细胞克隆形成;免疫共沉淀质谱分析;肺癌

[中图法分类号] R341;R394.3;R734.2 [文献标志码] A

Promoting effect of breast cancer anti-estrogen resistance 1 on proliferation and growth of lung adenocarcinoma cells and potential networks of its interacting proteins

MAO Chunguo, JIANG Shasha, FAN Xiaoqing, LONG Tan, JIN Hua, TAN Qunyou, DENG Bo Institute of Thoracic Surgery, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the biological functions of breast cancer anti-estrogen resistance 1 (BCAR1, also known as p130cas) in the incidence and development of lung cancer, and investigate the potential networks of its interacting proteins. **Methods** ① Western blotting was performed to study the expression of BCAR1 in 15 pairs of lung cancer tissues and para-cancerous normal tissues, and immunohistochemical (IHC) assay was carried out in paraffin-embedded tissues from 54 patients with early stage lung cancer in order to determine the relationship between BCAR1 level and prognosis. TCGA analysis

[基金项目] 国家自然基金面上项目(81572285),重庆市自然科学基金(CSTC2018jcyjAX0592)

[通信作者] 邓 波,E-mail:dengbo@tmmu.edu.cn

was also performed as further validation. ②BCAR1 knockout (KO) cell lines were established in H1975 and H1299 lung cancer cells, respectively, using CRISPR/Cas9. And A549 cells with overexpression (OE) of BCAR1 were constructed by transfection of BCAR1 cDNA. MTT analysis and plate colony formation assay were used to detect the proliferation and viability of the cells, respectively. ③Immunoprecipitation mass spectrometry (IP-MS) along with bioinformatics analysis was employed to identify the key protein of BCAR1 interacting networks in 293T tool cells. ④The expression variations of the key node gene were confirmed in BCAR1-KO and BCAR1-OE cells using Western blotting, and the correlation between the key node gene and BCAR1 was verified in the lung cancer tissue microarray. **Results** ①The expression of BCAR1 was significantly higher in the lung cancer tissues than para-cancerous tissues ($P<0.05$). Higher expression of BCAR1 was associated with worse prognosis in the patients with early-stage lung cancer (HR = 5.026, P = 0.001) and TCGA cohort study (HR = 1.5, P = 0.008 7). ②BCAR1-KO and BCAR1-OE cells were successfully constructed, and the cell proliferation and colony formation were decreased with BCAR1-KO and increased following BCAR1-OE respectively. ③Mammalian lethal with SEC13 protein 8 (GβL, mLST8) was revealed to be a key protein of BCAR1 interacting network. ④MLST8 was significantly expressed at a higher level in the lung cancer tissues than the para-cancerous tissues ($P<0.05$), and its expression was positively correlated with the expression of BCAR1 (R=0.422 1, P=0.001 5). Furthermore, the expression of MLST8 was decreased in BCAR1-KO cells and increased in BCAR1-OE cells. **Conclusion** BCAR1 plays a critical carcinogenetic role in lung cancer. MLST8 expression is significantly correlated with BCAR1, and may be a key downstream regulatory protein of BCAR1.

[**Key words**] BCAR1; mammalian lethal with SEC13 protein 8; cell proliferation; cell colony formation; immunoprecipitation mass spectrometry; lung cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572285) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2018jcyjAX0592). Corresponding author: DENG Bo, E-mail: dengbo@tmmu.edu.cn

BCAR1是目前肿瘤研究的热点,其相对分子质量为130×10^3,是细胞外基质与胞内信号传导的桥梁分子:细胞与胞外基质接触后激活整合素→FAK激活并结合到BCAR1氨基端→磷酸化BCAR1羟基端→BCAR1与Src激酶结合→BCAR1活化→形成BCAR1/Crk复合体→Crk通路被激活[1-2]。

研究表明,BCAR1高表达与多种癌症的细胞侵袭和转移相关:在前列腺癌中,BCAR1的高表达与肿瘤早期复发密切相关[3]。在子宫内膜腺癌中,BCAR1参与肿瘤细胞的生长和转移[4]。在口腔鳞癌中,BCAR1通过调节上皮-间质转化(Epithelial mesenchymal transformation,EMT)和细胞增殖促进骨侵袭和转移[5]。我们前期研究发现:BCAR1在肺癌组织中高表达,而在癌旁组织中低表达[6-7];开展的多中心临床研究证实肺癌BCAR1-mRNA及蛋白表达水平越高,患者预后越差[7]。而且,BCAR1高表达可诱导肺腺癌细胞发生EMT促进肺腺癌细胞迁移和侵袭[8-9]。所以,BCAR1有望成为肺癌精准治疗的分子靶点[10]。

目前BCAR1研究多局限于肿瘤侵袭转移,较少聚焦细胞增殖和克隆形成。鉴于BCAR1基因促癌效应复杂,其相互作用蛋白研究较少,相关通路和网络尚不明确。本研究拟通过下调及上调BCAR1的表达及免疫共沉淀质谱分析,旨在深入探索上述问题。

1 材料与方法

1.1 材料

GV371载体,Cas9载体,CV146载体,GV141载体(均来自吉凯基因),H1975、H1299、A549、293T(ATCC),胎牛血清(Gibco,10099141),胰酶(Gibco,25200-056),BCAR1(CST,#13846),GAPDH(CST,#2118s),MLST8(CST,#3227),Rabbit IgG(Santa Cruz,sc-2004),嘌呤霉素(Clontech,631305),MTT(Solarbio,M8180),dsDNA oligo(吉凯基因,P212-03),2×*Taq* Plus Master Mix(Vazyme,M0318S),TOP10感受态(吉凯基因,R0539L),BbsI(sigma,D0281-59),T7 DNA Ligase(sigma,D4041),ATP(10 μmol/L)(Takara,DP11),Yeast Extract(OXOID),Agar Powder(OXOID,A-2180),Trizol试剂盒(上海普飞),1 kp DNA ladder Marker(Fermentas,#SM0311),250 bp DNA ladder Marker(捷瑞,DL250+,100T),In-Fusion™ PCR Cloning Kit(clontech,639626),Taq polymerase(SinoBio,E001-02B),dNTP(Takara,D4030A),Primer(捷瑞生物),限

制性内切酶(NEB),Plasmid 抽提 Kit(Promega,A1460),X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent(Roche,06336236001)等。

1.2 病例来源

该研究方案经陆军军医大学大坪医院[TMMU-DPH]的研究伦理委员会审查和批准(2019-183),获得患者同意并签署知情同意书。收集胸外科 2016 年 9 月至 2019 年 4 月影像学诊断并经病理证实的早期肺腺癌患者 54 例,排除接受过治疗、患有重大基础疾病或其他恶性肿瘤患者,基线特征见表 1。获取 54 例蜡块癌组织,15 对新鲜癌组织及远癌组织进行后续试验。

表 1 54 例早期肺腺癌患者临床和病理特征

病例参数	统计量
男:女/例	24:30
年龄/岁	60.4±9.1
肿瘤大小/cm	2.3±0.7
分期(1a:1b)/例	46:8
生存时间/d	582.5±385.9

1.3 方法

1.3.1 western blot 实验 研磨裂解组织细胞或提取细胞蛋白后 BCA 法测蛋白浓度,电泳,转膜,相应一抗 1∶1 000 稀释,孵二抗,ECL 显影曝光,Image J 软件(1.52a version. USA)进行蛋白条带半定量分析。

1.3.2 组织芯片制作及 IHC 实验 步骤详见文献[8]。将前述 54 例肺癌样本制作组织芯片,进行 BCAR1(1∶50)及 MLST8(1∶50)染色。Image J 软件计算染色芯片平均光密度,进行相关性分析。

1.3.3 构建人肺腺癌细胞 H1975、H1299 BCAR-KO 稳定株 CRISPR/Cas9 实验方案参见文献[11],简述如下:首先将 CAS9 载体(图 1A)转染 H1975 及 H1299 细胞,并通过 2 μg/mL 嘌呤霉素成功筛选 H1975-CAS9 及 H1299-CAS9 稳定株。依据 GenBank ID(NM_001170714)的 BCAR1 序列设计 BCAR1-sgRNA 及阴性对照 CON244-sgRNA 干扰靶点序列(表 2),引物退火形成双链 DNA,连入 sgRNA 载体 GV371(图 1A),TOP10 感受态转化,菌落 PCR 得到阳性克隆后测序鉴定。再将 sgRNA 慢病毒质粒转染 H1975-CAS9、H1299-CAS9 稳定细胞株,通过荧光鉴定构建的 BCAR1-KO 稳定细胞株后 western blot 验证 BCAR1 敲除效果。

表 2 合成 oligo 以构建 BCAR1 sgRNA

序号	序列 5′-3′
BCAR1-sgRNA-a	CACCgCAGCAACGGGTCTCGGCCAT
BCAR1-sgRNA-b	aaac ATGGCCGAGACCCGTTGCTGc

1.3.4 构建人肺腺癌细胞 A549 BCAR1-OE 稳定株

根据 GenBank ID(NM_001170714)的 BCAR1 基因序列设计引物如表 3,进行 PCR 扩增目的基因片段,PCR 产物插入酶切载体 CV146(图 1A)后进行转化,PCR 法鉴定菌落并扩增抽提质粒。转染细胞后嘌呤霉素 2 μg/mL 药筛阳性细胞并扩增,western blot 验证 BCAR1 过表达效果。

1.3.5 MTT 实验 0.25%胰酶消化对数生长期的细胞,制备单细胞悬液,按分组 5 000/孔于 96 孔板接种,接种后 0、24、48、72 h 每孔加入 20 μL MTT 试剂(5 mg/mL),培养 4 h,加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,酶标仪 490 nm 测各孔吸光度值。

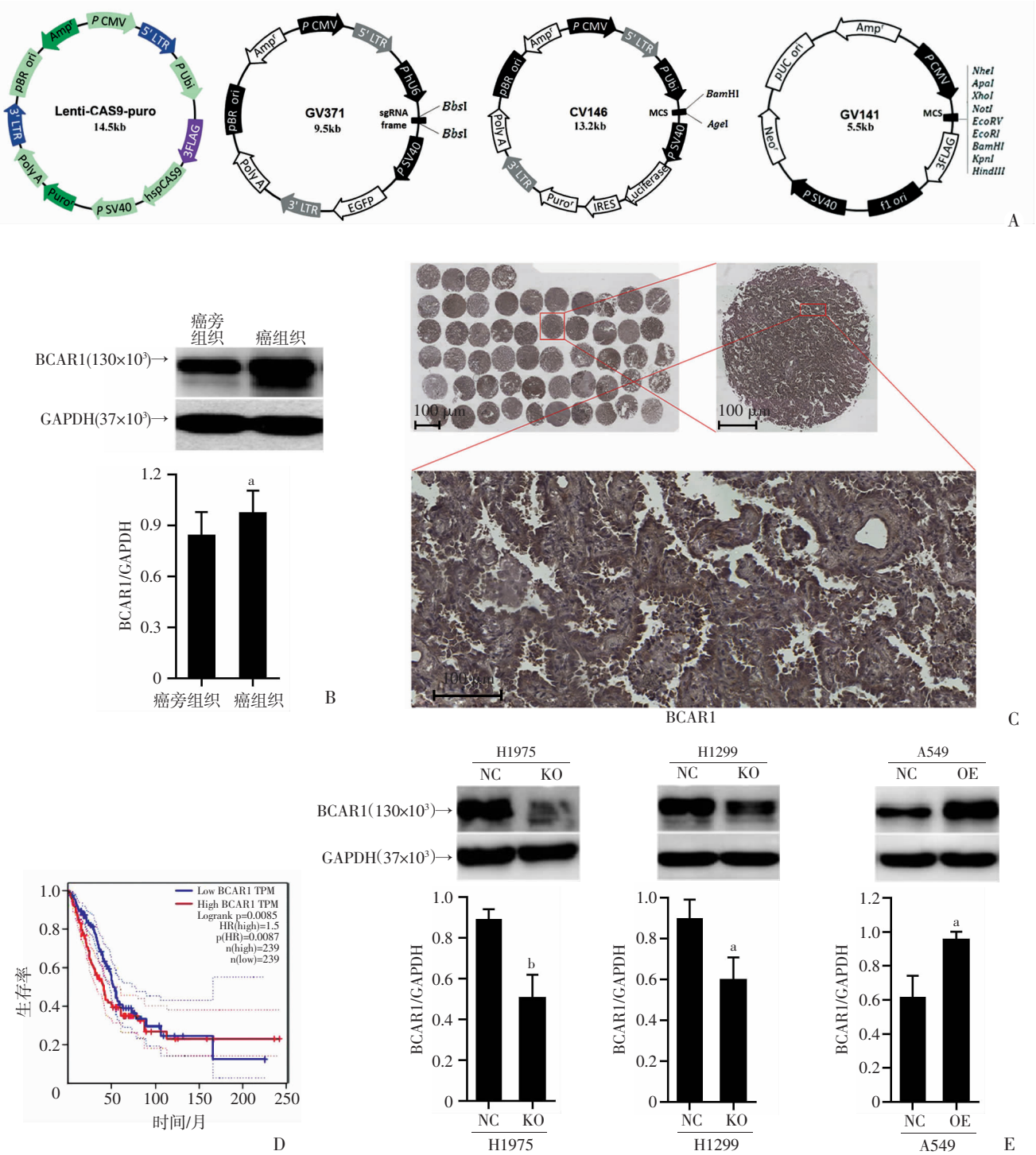
1.3.6 细胞平板克隆形成实验 0.25%胰酶消化对数生长期的细胞,制备单细胞悬液,按分组 1 000/皿(10 cm)铺板,37 ℃,5% CO_2 培养箱培养,直至肉眼可见明显的细胞克隆形成,4%多聚甲醛固定细胞 30 min,0.25%结晶紫染色细胞 15 min,晾干,拍照,Image J 软件分析。

1.3.7 IP-MS 实验 依据 BCAR1 基因序列设计引物(表 4)钓取 BCAR1,PCR 扩增目的基因片段,产物与酶切载体 GV141 连接反应(图 1A),构建 BCAR1 过表达质粒并鉴定,质粒抽提,X-tremeGENE 与过表达质粒以 1∶1比例混合,转染 293T 细胞,24 h 后换液,加入 200 μg/mL G418 进行药筛 5 d 获得 293T 细胞 BCAR1 过表达细胞株。提取细胞蛋白,BCA 法测浓度,Shotgun 法进行质谱分析,主要步骤如下:FASP 酶解,QExactive 质谱仪进行质谱分析,质谱文件转换获得数据。步骤详见文献[12],将获得的 BCAR1-NC 组蛋白与 BCAR1-OE 组蛋白进行比对分析。

1.3.8 生物信息学分析 TCGA 数据库(https://www.cancer.gov/)查询与 BCAR1 表达显著正相关的基因。搜索限制条件:癌症类型:肺腺癌;位置:支气管、肺;分期:Stage ia ,Stage ib;数据库选择:TCGA-LUAD;数据类型:Gene Expression Quantification;方法:RNA-Seq。选取 FDR 值<10^{-6} 的 BCAR1 正相关基因与 IP-MS 结果比对分析,获取 BCAR1 互作蛋白。

将获得的基因输入 PPI String 数据库(https://string-db.org/)进行 BCAR1 信号通路分析,生成拥有多个节点的基因 BCAR1 信号通路图。

利用 GEPIA 在线工具(http://gepia.cancer-pku.cn/)对肺癌患者 BCAR1 基因进行生存分析,验证 BCAR1 与预后的关系;并获取的基因进行基因差异表达筛选,选取癌组织较癌旁组织显著高表达的基因研究。



A:载图谱体; B:早期肺腺癌及癌旁组织 BCAR1 表达,a: $P<0.05$,与癌旁组织比较;C:IHC 示 BCAR1 表达;D:GEPIA 数据库肺腺癌患者 BCAR1 生存分析;E:western blot 验证肺腺癌细胞株 BCAR1 敲除与过表达,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$,与 NC 组比较

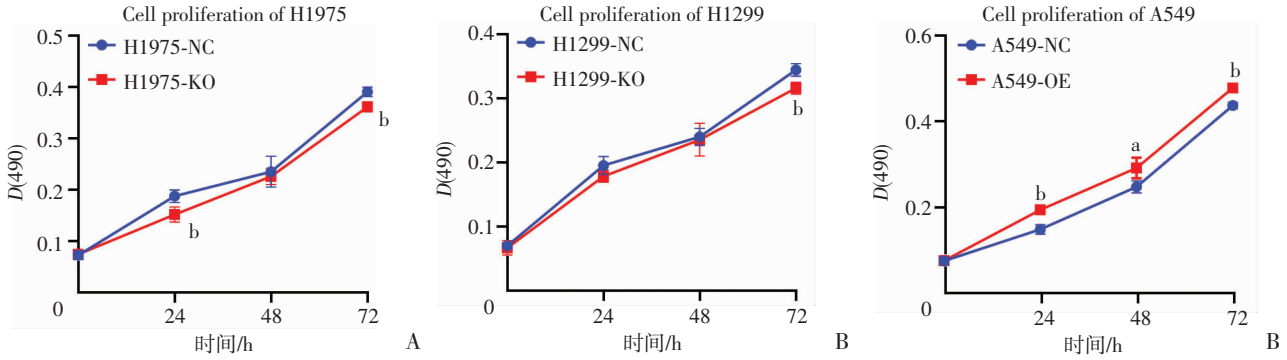
图 1 肺腺癌患者 BCAR1 表达、预后分析及人肺腺癌细胞系 BCAR1 敲除与过表达构建

表 3 构建引物调取 BCAR1 cDNA 文库上调 A549 细胞中 BCAR1 表达

引物序号	序列
BCAR1(45429-1)-P1	AGGTCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCATGCCTGCCAAGCCCTTCCTCTCTTCTG
BCAR1(45429-1)-P2	CACAGGCTAGCTCAACCGGTTCAGGCGGCTGCCAGCTGGCCTAGGACGCGG

表 4 构建引物调取 BCAR1 cDNA 文库上调 293T 细胞中 BCAR1 表达

引物序号	序列
BCAR1(55742-1)-P1	ACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGCCACCATGCCTGCCAAGCCCTTCCTCTCTTC
BCAR1(55742-1)-P2	AGTCACTTAAGCTTGGTACCGAGGCGGCTGCCAGCTGGCCTAGGAC



A:H1975;B:H1299;C:A549,a: $P<0.01$;b: $P<0.001$,与 NC 组比较

图 2 肺腺癌细胞系 BCAR1 敲除或过表达对细胞增殖的影响

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行数据分析,统计数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,计量资料两样本比较使用独立 t 检验,相关性分析采用两变量相关分析,生存分析采用单因素 cox 回归模型,$P<0.05$(双侧)具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌组织中,BCAR1 高表达预后不良

如图 1B, western blot 示相比癌旁组织,肺腺癌组织中 BCAR1 显著高表达($P<0.05$);如图 1C, IHC 示 BCAR1 在肺癌细胞质及细胞核中均有表达,BCAR1 高表达患者预后差(HR = 5.026,P = 0.001, 95%CI: 1.948~12.963),如图 1D 示,TCGA 数据库生存分析亦验证了肺癌患者 BCAR1 高表达其预后差(HR = 1.5, P = 0.008 7)。

2.2 人肺腺癌细胞 H1975、H1299 BCAR1-KO 以及 A549BCAR1-OE 稳定细胞株成功构建

如图 1E,在 H1975 细胞株及 H299 中,BCAR1 蛋白相对表达水平 KO 组细胞较 NC 组分别降低 43.43%($P<0.01$)与 33.57%($P<0.05$);在 A549 细胞株中,BCAR1 蛋白相对表达 OE 组较 NC 组增加 1.55 倍($P<0.05$)。

2.3 肺癌细胞增殖能力 BCAR1-KO 后降低,而 BCAR1-OE 后升高

如图 2,在 H1975 细胞株中,在 24、72 h,KO 组细胞增殖较 NC 组均显著降低($P<0.000\ 1$,$P<0.000\ 1$);在 H1299 细胞株中,72 h KO 组细胞增殖较 NC 组显著降低($P<0.000\ 1$);在 A549 细胞株中,在 24、48、72 h,OE 组细胞增殖较 NC 组均显著增加($P<0.000\ 1$,$P<0.001$,$P<0.000\ 1$)。

2.4 细胞克隆形成率 BCAR1-KO 后降低,而 BCAR1-OE 后升高

如图 3,在 H1975 细胞株中,细胞克隆形成率 KO 组细胞较 NC 组显著降低($P<0.000\ 1$);但在 H1299 细胞株中,趋势尚不明显($P>0.05$);在 A549 细胞株中,细胞克隆形成率 OE 组细胞较 NC 组细胞显著增加($P<0.000\ 1$)。

2.5 IP-MS 联合生信分析发现 MSLT8 为 BCAR1 的关键互作用蛋白

成功构建 293T BCAR1 过表达细胞株,BCAR1 蛋白相对表达水平 OE 组细胞较 NC 组显著高表达($P<0.001$,图 3);并且 IP-MS 实验在 293T 细胞 BCAR1-NC 组获得 2 813 个蛋白(与标签蛋白互相作用),在 BCAR1-OE 组获得 2 713 个蛋白(与标签蛋白及 BCAR1 互相作用,表 5)。比对分析后得到 419 个蛋白(图 3)仅表达于 BCAR1-OE 组的潜在 BCAR1 互作蛋白通过 TCGA 数据库,得到 2 479 个与 BCAR1 表达显著正相关的基因比对分析后获得 68 个可能与 BCAR1 相互作用的基因(图 3)。

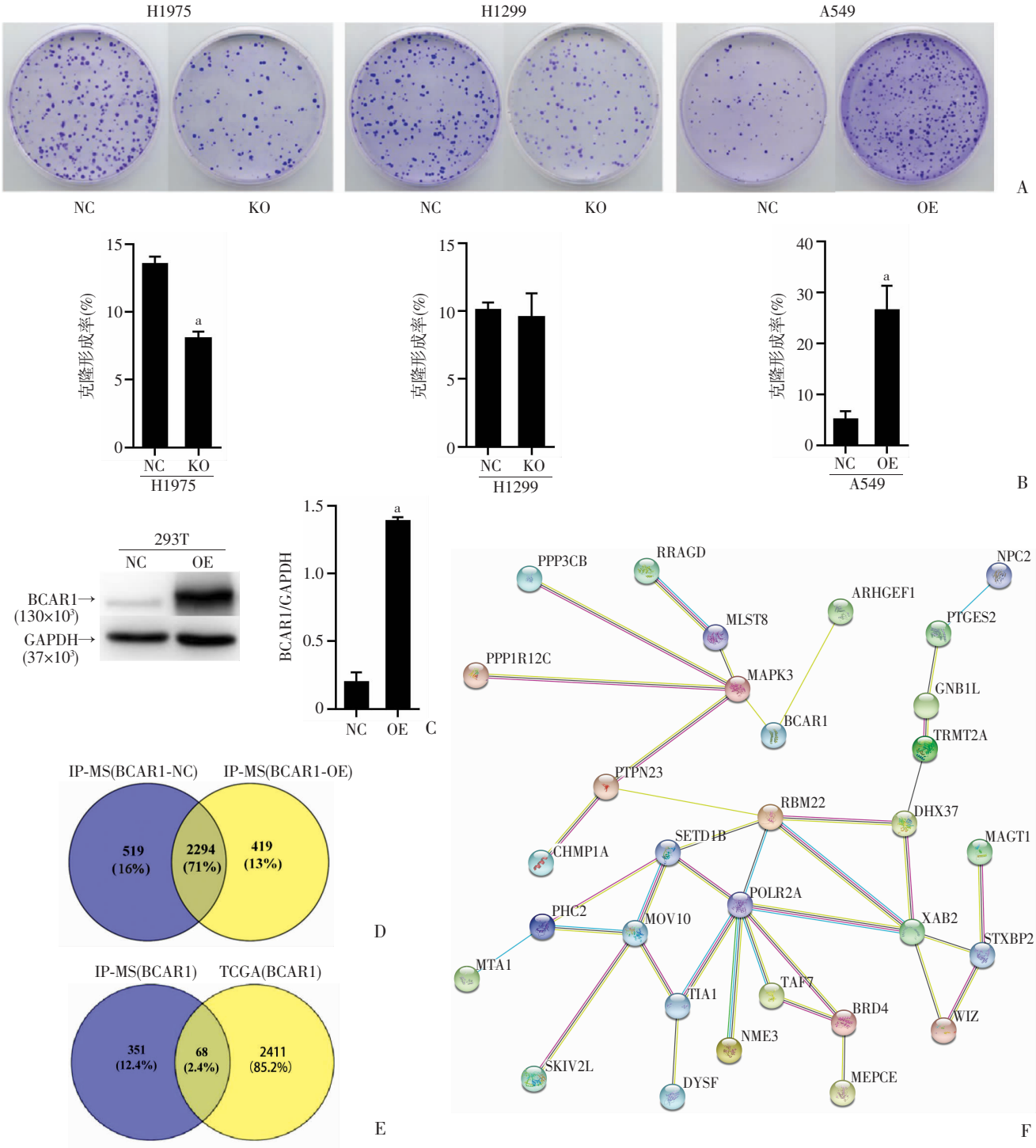
通过 PPI String 数据库,从 68 个基因中获得 18 个拥有多节点的基因,获得信号通路图(图 3)。

GEPIA 数据库的差异基因筛选显示,*MSLT8*, *TAF7*, *GNB1L*, *PTGES2*, *DHX37* 这 5 个基因在癌组织

中的表达显著高于癌旁正常组织(图 4A)。图 3 显示 MLST8 与 BCAR1 共同连接 MAPK3。而我们的前期研究证实,BCAR1 是参与 MAPK 信号通路的衔接蛋白[8],因此以 MSLT8 为重点进行后续验证。

表 5　免疫共沉淀质谱分析结果

数据库	样品类型	总肽段数目	匹配到肽段的质谱图谱总数	肽段数	蛋白数目
人	293T-NC	29 387	17 587	13 604	2 813
人	293T-OE	28 021	15 823	12 884	2 713



A:细胞克隆形成结晶紫染色结果;B:细胞克隆形成率的比较, a: $P<0.001$,与 NC 组比较;C:293T 细胞 BCAR1 表达 western blot 验证, a: $P<0.001$, 与 NC 组比较;D:免疫共沉淀质谱分析揭示 419 个潜在 BCAR1 作用蛋白;E:TCGA 数据库揭示 68 个潜在 BCAR1 相互作用蛋白;F:PPI String 数据库 BCAR1 互作蛋白网络分析

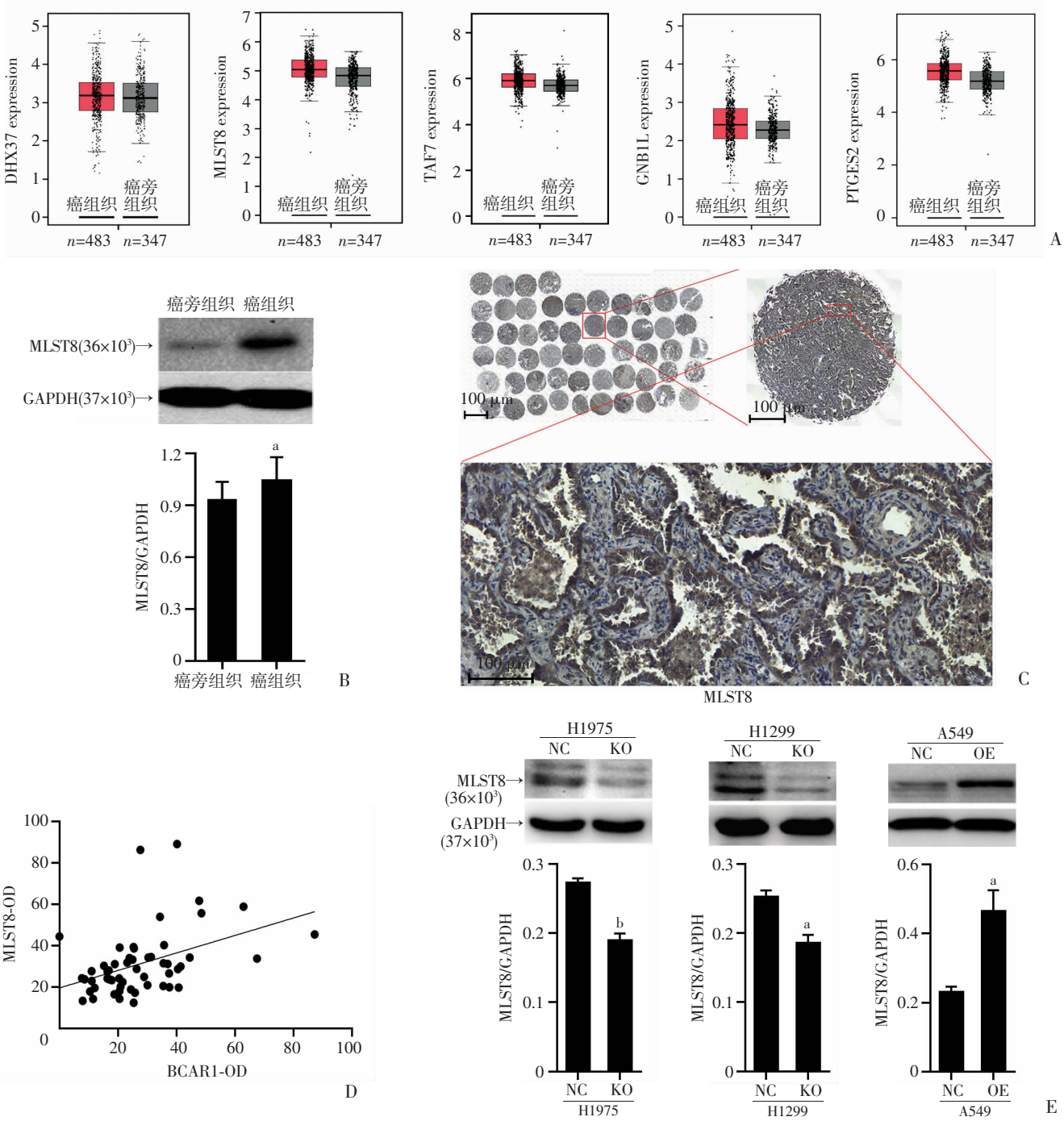
图 3　肺腺癌细胞系 BCAR1 敲除或过表达对克隆形成的影响及 BCAR1 的互作蛋白网络研究

2.6 在肺癌细胞及组织中 MLST8 与 BCAR1 表达密切相关

如图 4B,在肺腺癌组织中,MLST8 表达癌组织较癌旁组织显著高表达($P<0.000\ 1$);如图 4C,IHC 示 MLST8 主要表达于细胞质;如图 4D,BCAR1 与 MLST8 相关性分析显示 BCAR1 与 MLST8 具有显著正相关性($R=0.422\ 1$,$P=0.001\ 5$)。

2.7 细胞水平 western blot 验证 BCAR1 与 MLST8 表达关系

如图 4E,在 H1975,H1299 人肺腺癌细胞株中,BCAR1-KO 后 MLST8 蛋白表达显著降低($P<0.001$,$P<0.01$),在 A549 细胞株中,BCAR1-OE 后 MLST8 蛋白表达显著增高($P<0.01$)。



A:GEPIA 数据库差异基因表达筛选;B:western blot 证实 MLST8 在肺腺癌组织显著高表达于癌旁正常组织,a:$P<0.05$,与癌旁组织比较;C:IHC 分析 MLST8 在肺腺癌组织中的表达情况;D:IHC 检验 BCAR1 与 MLST8 的相关性;E:BCAR1 敲除或过表达前后肺腺癌细胞株验证 MLST8 的表达情况,a:$P<0.01$;b:$P<0.001$,与 NC 组比较

图 4 临床样本组织和细胞水平验证 BCAR1 与 MLST8 的表达关系

3 讨论

本研究发现,BCAR1 在早期肺癌中亦高表达,且与预后不良密切相关,此结论与乳腺癌的研究结论类似[13]。研究揭示,BCAR1 高表达与多种癌症的细胞增殖、存活密切相关[14],特别在乳腺癌中报道较多,而对肺癌细胞增殖及细胞克隆形成的影响却鲜有关注。我们研究发现,在肺癌细胞株中敲除或过表达 BCAR1,细胞增殖及克隆形成能力显著降低或增高。在 H1299 细胞株中,虽然 BCAR1 敲除未影响克隆形成,考虑与 BCAR1 在 H1299 中敲除效果稍差所致,亦有可能在不同细胞背景下,BCAR1 生物学功能有所差异。结合 A549 细胞中 BCAR1 过表达后,细胞增殖与克隆形成显著增加,我们认为,BCAR1 在肺癌的细胞增殖、存活与克隆形成上发挥着重要的作用。

通过 IP-MS 结合生信分析,我们找到了几个潜在 BCAR1 互作蛋白,MSLT8、TAF7、GNB1L、PTGES2、DHX37。这些基因在癌组织中表达显著高于正常组织。前期研究显示,磷酸化 BCAR1 羟基端使得 BCAR1 与 Src 激酶结合[15-16],增强 Src 介导的 p130cas 和 PI3K-AKT-mTOR 信号级联反应,MMPs 表达增加,促进肿瘤转移[17-18]。MLST8 作为一类激酶,在基因注释上与 BCAR1 功能有很多相似之处。MLST8 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)的结合蛋白,为激酶激活必不可少的一部分,由它们构成的复合物结构显示:MLST8 可以稳定 mTOR 的活性位点,其表达水平上调激活 mTORC1 和 mTORC2 通路而促进肿瘤进展[19-20]。体外研究表明:PSMA 与 phospho-p130cas、phospho-c-Src 中的 FLNa 结合,激活 AKT/mTOR/BAD 和 MAPK 途径,维持细胞的增殖和抗凋亡作用[21]。而我们从 PPI String 获得的信号通路中显示,BCAR1 与 MLST8 紧邻着 MAPK3 相连接,而我们课题组前期研究证实 BCAR1 是参与 MAPK 信号通路的衔接蛋白[8],故 MLST8 被作为 BCAR1 的关键互作蛋白进行研究。

本研究通过临床与细胞水平证实,BCAR1 与 MLST8 显著相关,MLST8 随着 BCAR1 的变化在细胞水平出现相应的趋势变化,在 BCAR1 敲除后低表达,在 BCAR1 过表达后高表达,揭示 MLST8 可能为 BCAR1 互作的下游调节蛋白。但是,BCAR1 与 MLST8 发生作用的具体机制仍不清楚。下一步,我们将通过免疫共沉淀或 Duolink PLA 实验研究 BCAR1 与 MLST8 相互关系,以及调控 MLST8 对于 BCAR1 功能的影响。总之,BCAR1 及 MLST8 有望成为肺癌治疗的新靶点。

参考文献:

[1] SAWADA Y, TAMADA M, DUBIN-THALER B J, *et al*. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas[J]. Cell, 2006, 127(5): 1015-1026. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.044.

[2] GEIGER B. A role for p130Cas in mechanotransduction[J]. Cell, 2006, 127(5): 879-881. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.020.

[3] HEUMANN A, HEINEMANN N, HUBE-MAGG C, *et al*. High BCAR1 expression is associated with early PSA recurrence in ERG negative prostate cancer[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 37. DOI: 10.1186/s12885-017-3956-3.

[4] YIN X Y, YANG X, CUI Y, *et al*. Expression of three proteins in endometrioid adenocarcinoma and their significance in clinical nursing, diagnosis and treatment[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(1): 55-61. DOI: 10.26355/eurrev_201801_14100.

[5] YAGINUMA T, GAO J, NAGATA K, *et al*. p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelial-mesenchymal transition and cell proliferation[J]. Carcinogenesis, 2020, 41(8): 1038-1048. DOI: 10.1093/carcin/bgaa007.

[6] DENG B, HUANG W, TAN Q Y, *et al*. Breast cancer antiestrogen resistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum[J]. Mol Diagn Ther, 2011, 15(1): 31-40. DOI: 10.1007/BF03257191.

[7] DENG B, SUN Z F, JASON W, *et al*. Increased BCAR1 predicts poor outcomes of non-small cell lung cancer in multiple-center patients[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(Suppl 3): S701-S708. DOI: 10.1245/s10434-013-3184-2.

[8] HUANG W, DENG B, WANG R W, *et al*. BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. PLoS ONE, 2012,7(4): e36124. DOI: 10.1371/journal.pone.0036124.

[9] DENG B, TAN Q Y, WANG R W, *et al*. P130cas is required for TGF-β1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer[J]. Oncol Lett, 2014,8(1): 454-460. DOI: 10.3892/ol.2014.2123.

[10] GEMPERLE J, DIBUS M, KOUDELKOVA L, *et al*. The interaction of p130Cas with PKN3 promotes malignant growth [J]. Mol Oncol, 2019, 13(2): 264-289. DOI: 10.1002/1878-0261.12401.

[11] HUDACSEK V, GYORFFY B. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system and applications in cancer research [J]. Magy Onkol, 2018, 62(2): 119-127.

[12] MACCARRONE G, BONFIGLIO J J, SILBERSTEIN S, *et al*. Characterization of a protein interactome by Co-immunoprecipitation and shotgun mass spectrometry[J].

Methods Mol Biol, 2017, 1546: 223-234. DOI: 10.1007/978-1-4939-6730-8_19.

[13] GEMPERLE J, HEXNEROVÁ R, LEPŠÍK M, *et al*. Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8057. DOI: 10.1038/s41598-017-08303-4.

[14] CAMACHO LEAL M D P, COSTAMAGNA A, TASSONE B, *et al*. Conditional ablation of p130Cas/BCAR1 adaptor protein impairs epidermal homeostasis by altering cell adhesion and differentiation[J]. CellCommun Signal, 2018, 16(1): 73. DOI: 10.1186/s12964-018-0289-z.

[15] CAMACHO LEAL M D E L P, SCIORTINO M, TORNILLO G, *et al*. p130Cas/BCAR1 scaffold protein in tissue homeostasis and pathogenesis[J]. Gene, 2015, 562(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.gene.2015.02.027.

[16] RADULOVIĆ P, KRUŠLIN B. Immunohistochemical expression of NEDD9, E-cadherin and γ-catenin and their prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(3): 246-251. DOI: 10.17305/bjbms.2018.2378.

[17] TOMITA Y, DORWARD H, YOOL A J, *et al*. Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): E299. DOI: 10.3390/ijms18020299.

[18] PALLARÈS V, HOYOS M, CHILLÓN M C, *et al*. NEDD9, an independent good prognostic factor in intermediate-risk acute myeloid leukemia patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 76003-76014. DOI: 10.18632/oncotarget.18537.

[19] YU X N, ZHANG G C, SUN J L, *et al*. Enhanced mLST8 expression correlates with tumor progression in hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2020, 27(5): 1546-1557. DOI: 10.1245/s10434-020-08263-6.

[20] XU Y Q, HUANG Y N, WENG L H, *et al*. Effects of single-nucleotide polymorphisms in the mTORC1 pathway on the risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(1): 273-285. DOI: 10.1007/s00432-019-03059-y.

[21] PERICO M E, GRASSO S, BRUNELLI M, *et al*. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) assembles a macromolecular complex regulating growth and survival of prostate cancer cells "*in vitro*" and correlating with progression "*in vivo*"[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 74189-74202. DOI: 10.18632/oncotarget.12404.

(**收稿**:2020-07-31;**修回**:2020-09-28)

(编辑 邓强庭)