



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2023.06.013

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.06.013>

· 临床研究 ·

多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 调控 β -1, 4-甘露糖基转移酶介导甲状腺癌细胞增殖机制

刘梅 黄晶 张燕妮 李珊 胡绍波 刘芳 胡玉海 孙文早

【摘要】 目的 探讨多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1) 调控 β -1, 4-甘露糖基转移酶 (ALG1) 对甲状腺癌 (TC) 细胞增殖/凋亡的影响及其潜在机制。**方法** 采用慢病毒表达载体 (pLV) 构建 pLV-EGFP 空载与 pLV-ALG1 过表达 8305C 细胞系, 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞蛋白水平表达, 使用 Kaplan-Meier 数据库分析 TC 患者总生存期 (OS); 采用细胞计数试剂盒 (CCK)-8 和集落形成实验检测细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。从 TCGA 数据库中筛选出 TC 患者中与 PARP1 表达呈显著相关的前 1 000 个差异基因, 富集相关信号通路, 比较这些通路的差异表达状况, 并在过表达细胞系中进行相应验证。**结果** PARP1 在 TC 细胞系中表达显著增加, 且与患者 OS 呈负相关 ($P < 0.05$)。PARP1 抑制剂 (NMS-P118) 显著抑制 8305C 细胞的增殖, 促进细胞凋亡 ($P < 0.05$)。TCGA 数据库筛选并富集分析发现, N-糖基化修饰信号通路显著富集, NMS-P118 显著抑制了 β -1, 4-甘露糖基转移酶 (ALG1) 的表达水平 ($P < 0.05$), 但对 p38 的影响不明显 ($P > 0.05$)。生物素标记的甘露糖结合凝集素 (MBL) 检测发现 NMS-P118 显著下调了 8305C 细胞的甘露糖修饰水平 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 数据库分析发现 TC 中 ALG1 高表达的患者 OS 具有降低倾向 ($P < 0.05$)。过表达 ALG1 可逆转 NMS-P118 对 8305C 细胞增殖的抑制, 减少细胞凋亡 ($P < 0.05$)。**结论** PARP1 可通过促进糖基转移酶 ALG1 的表达介导 TC 的增殖并抑制其凋亡, PARP1 可能是治疗 TC 的重要新靶点。

【关键词】 多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1; 甲状腺癌; β -1, 4-甘露糖基转移酶; 增殖; 靶点

【中图分类号】 R581.9 **【文献标识码】** A

Mechanism of poly ADP-ribose polymerase 1 promotes the proliferation of thyroid carcinoma cells by regulating β -1, 4-mannosyltransferase Liu Mei*, Huang Jing, Zhang Yanni, Li Shan, Hu Shaobo, Liu Fang, Hu Yuhai, Sun Wenzao. * Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hankou Hospital, Wuhan 430013, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) on proliferation/apoptosis of thyroid carcinoma (TC) cells by β -1, 4-mannosyltransferase (ALG1) and its potential mechanism. **Methods** Lentiviral expression vector (pLV) was used to construct PLV-EGFP empty vector and PLV-ALG1 overexpression 8305C cell lines. Cell protein levels were detected by western blotting. Overall survival (OS) of TC patients was analyzed by Kaplan-Meier database. Cell proliferation was detected by cell counting kit 8 (CCK-8) and colony formation assay, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The top 1000 differentially expressed genes significantly related to PARP1 expression in TC patients were screened from TCGA database, and the related signaling pathways were enriched to explore the downstream signaling pathways that PARP1 may regulate. **Results** The expression of PARP1 was significantly increased in TC cell lines, and negatively correlated with OS of patients ($P < 0.05$). PARP1 inhibitors NMS-P118 significantly inhibited the proliferation of 8305C cells and promoted apoptosis ($P < 0.05$). TCGA database screening and enrichment analysis showed that N-glycosylated signaling pathways were significantly enriched, NMS-P118 significantly inhibited the activation of

基金项目:湖北省卫生健康委员会联合基金重点项目 (WJ2018H183); 武汉市卫生健康委员会科研项目 (WZ22Q08); 仙桃市科技局科技研究与开发计划项目 (XKW202105)

作者单位:430013 武汉市汉口医院检验科 (刘梅、张燕妮、胡玉海); 长江大学附属仙桃市第一人民医院内分泌科 (黄晶、李珊、胡绍波、刘芳、孙文早)

通讯作者:孙文早, E-mail: sunwenzao@sina.cn

glycosylated modifying enzymes ALG1 ($P < 0.05$), but had no significant effect on P38 ($P > 0.05$). Biotin-labeled mannose-binding lectin (MBL) assay showed that NMS-P118 significantly down-regulated the levels of mannose modification in 8305C cells ($P < 0.05$). Kaplan-Meier database analysis showed that patients with high expression of ALG1 in TC had a tendency to decrease OS ($P < 0.05$). Overexpression of ALG1 could reverse the inhibition of NMS-P118 on proliferation of 8305C cells and reduce cell apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** PARP1 can mediate the proliferation and inhibit the apoptosis of TC cells by promoting the expression of glycosyltransferases ALG1, suggesting that PARP1 may be an important new target for the treatment of TC.

[Key words] Poly ADP-ribose polymerase 1; Thyroid cancer; β -1,4-mannosyltransferase; Proliferation; Target

甲状腺癌(TC)的发病率逐年上升,已成为最常见的内分泌相关恶性肿瘤^[1]。大多数甲状腺未分化癌(ATC)患者首次就诊时即发生远处转移,经传统治疗并不能明显提高ATC患者的生存率^[2]。目前TC的发病机制尚未阐明^[3]。但近年随着对TC分子生物学发病机制的深入研究,发现多种基因与TC的发病密切相关^[4],这些基因的多靶点多激酶抑制剂已被开发并应用于TC的临床治疗,但部分患者疗效仍不理想^[5]。因此,进一步发掘新型介导TC发病及进展的关键分子将为其治疗提供新方向。 β -1,4-甘露糖基转移酶(ALG1)主要参与蛋白质糖基化修饰的初始阶段,前期在肝癌的研究中显示高表达的ALG1具有抑制肝癌细胞迁移的作用^[6]。然而,ALG1在TC中的具体研究尚少。多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)1在DNA损伤修复过程中发挥关键作用^[7]。研究表明,PARP1(Val762Ala)因缺乏多聚腺苷二磷酸(ADP)RNA酶活性而无法进行碱基切除修复,从而增加TC患病风险^[8],但PARP1对TC发生发展的具体作用机制尚不明确。前期我们的研究表明,PARP1表达活化可能在TC的发展过程中发挥重要作用^[9],本研究拟在此基础上,进一步探讨PARP1对TC细胞增殖、凋亡的影响,筛选出介导PARP1促进TC进展的关键糖基转移酶,从而为TC的靶向治疗提供理论依据。

材料与方法

1. 材料:人正常甲状腺滤泡上皮细胞系(Nthy-ori 3-1,上海舜冉);TC细胞系(SW579及8305C)、人胚胎肾细胞(HEK293T,中国科学院细胞库);慢病毒表达载体(pLV)-EGFP/ALG1(武汉擎科);细胞培养基(RPMI1640)、细胞培养基(DMEM)、胎牛血清(美国Gibco);Trizol(美国Invitrogen);逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(日本Takara);蛋白酶抑制剂、细胞计数试剂盒8(CCK-8)和二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天);PARP1、磷酸化蛋白激酶R样内质网激酶(pERK)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶p38(pp38)、磷酸化氨基末端蛋白激酶(pJNK)、磷脂

酰肌醇3-激酶[PI3K(p110 α)]、大鼠样肉瘤病毒癌基因(Kras)、ALG1和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(武汉Proteintech);NMS-P118(美国Sigma-Aldrich)。全自动酶标仪(英国Biochrom);微量离心机(德国Eppendorf);流式细胞仪(美国BD);荧光显微镜(日本Olympus);凝胶成像系统(美国UVP)。

2. 方法

(1)细胞培养:Nthy-ori3-1细胞系培养采用含10%胎牛血清和1%双抗(青霉素/链霉素)的RPMI1640培养基,TC细胞系培养采用含10%胎牛血清和1%双抗(青霉素/链霉素)的DMEM培养基,传代消化采用0.25%胰蛋白酶进行,培养环境为37℃,5%CO₂。

(2)基因表达数据:下载肿瘤基因组图谱(TCGA)Thyroid Cancer (THCA)数据库的数据,采用BRB-Array Tools进行数据分析。共包含502例标本,其中甲状腺乳头状癌490例,其他病理类型12例。使用Kaplan-Meier数据库(<http://kmplot.com>)分析PARP1表达与总生存(OS)率之间的关系。采用R2:基因组学分析与可视化平台(<http://r2.amc.nl>)对TCGA TC数据集中与PARP1表达相关的前1000个差异基因进行筛选分析,并对差异基因控制的前19个生物学过程的通路富集分析。

(3)蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平:冰上裂解细胞样本,采用BCA法测定蛋白浓度。采用SDS-PAGE法经电泳、转膜后,与相应的一抗、二抗进行孵育,加入增强型化学发光试剂(ECL)发光剂,经UVP凝胶成像仪成像显影。在检测ALG1糖基化修饰实验中,转膜后用BSA封闭,生物素标记的MBL孵育后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素进行显影。

(4)CCK-8法检测细胞增殖情况:将对数期8305C细胞以1×10³个/孔的密度接种到96孔板,相应处理后,加入10μl/孔CCK-8后,避光再孵育4h,用酶标仪检测450nm处的吸光度值,其与活细胞数量成正比。

(5)8305C细胞过表达的构建:将人ALG1的cDNA克隆到pLV-EGFP过表达慢病毒载体构建pLV-ALG1

过表达载体,引物序列:ALG1 上游引物为 5'-ATAC-CGGTAGCCAAGATGGCGGCCTCATG-3',下游引物为 5'-GCGTCGACTTCATCTCAAAACAAAATTTA-3'。阳性克隆经测序验证正确后,进行高纯度目的基因质粒抽提。将构建好的目的基因质粒和慢病毒共转染 293T 细胞,获得高质量浓缩慢病毒。取对数生长期的 8305C 细胞,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板培养。对照组(pLV-EGFP 组)与实验组(pLV-ALG1 组)各加入 $4 \mu\text{l}$ 浓缩慢病毒(滴度 5×10^8 TU/ml),经嘌呤霉素抗性筛选 2 天后扩增。荧光显微镜下观察感染后细胞状态及感染率,Western blot 验证 ALG1 过表达效果。

(6)流式细胞术检测细胞凋亡情况:使用 Accuri C6 流式细胞仪进行检测。收集分别经 DMSO 和 NMS-P118($1 \mu\text{M}$)处理 24 h 的 8305C 细胞 2×10^5 个,加入 $195 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,随后依次加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{l}$ PI 染液轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,随后冰浴、上机检测。

3. 统计学处理:应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同甲状腺细胞系中 PARP1 表达水平比较:两种 TC 细胞系(SW579 和 8305C)中 PARP1 表达水平高于正常细胞系 Nthy-ori 3-1(1.43 ± 0.28 比 0.42 ± 0.15 , 2.17 ± 0.33 比 0.42 ± 0.15 , P 均 < 0.05)。

2. NMS-P118 对 TC 细胞增殖凋亡的比较:NMS-P118 + 8305C 细胞 24 h、48 h 及 72 h 后细胞增殖均低于同期的 DMSO + 8305C 细胞(0.25 ± 0.04 比 0.35 ± 0.10 , 0.51 ± 0.13 比 0.76 ± 0.25 , 1.03 ± 0.26 比 1.56 ± 0.52 , P 均 < 0.05)。NMS-P118 + 8305C 细胞 24 h 后细胞凋亡明显高于同期 DMSO + 8305C 细胞(34.6 ± 3.51 比 10.4 ± 0.62 , $P < 0.05$)。

3. PARP1 调控 TC 细胞生物信息学结果分析:PARP1 高表达 TC 患者总生存期(OS)低于 PARP1 低表达 TC 患者($HR = 3.21$, 95% CI $1.11 \sim 9.27$, $P < 0.05$)。TCGA 数据库中筛选出与 PARP1 表达相关的前 1000 个差异基因(图 1),并富集分析所调控的关键信号通路,结果显示除已被报道与 PARP1 功能相关的 MAPK 和 Kras 通路外,N-糖基化修饰信号通路中的基因显著富集(图 2)。ALG1 高表达患者 OS 具有降低倾向($HR = 4.24$, 95% CI $1.25 \sim 14.27$, $P < 0.05$)。

4. PARP1 调控 TC 细胞机制的验证:NMS-P118 显著抑制 ERK、JNK 和 Kras 的活化水平(0.61 ± 0.12 比 0.08 ± 0.03 , 1.24 ± 0.15 比 0.31 ± 0.08 , 3.07 ± 0.25

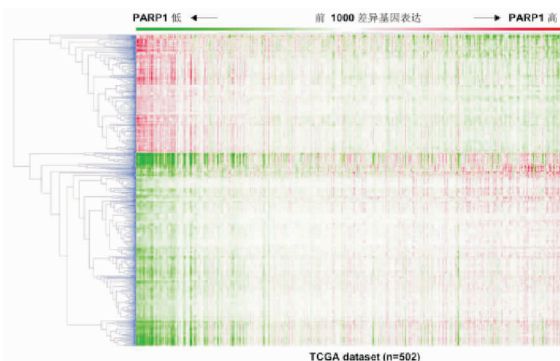


图 1 TCGA 数据库 PARP1 表达显著相关的前 1000 个差异基因

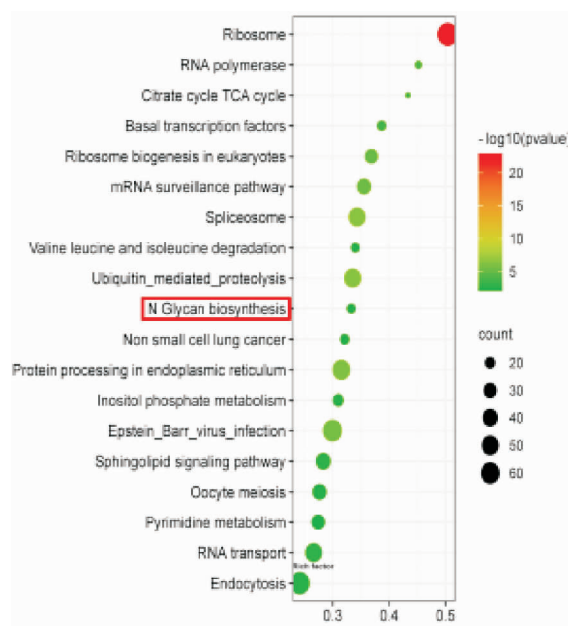


图 2 差异基因的富集分析

比 0.86 ± 0.18 , P 均 < 0.05),但对 p38 的影响不明显(0.35 ± 0.10 比 0.29 ± 0.08 , $P > 0.05$)。NMS-P118 显著抑制 ALG1 表达(1.21 ± 0.25 比 0.28 ± 0.07),显著下调 8305C 细胞的甘露糖修饰水平(0.57 ± 0.21 比 0.26 ± 0.06 , P 均 < 0.05)。

5. 不同表达水平 ALG1 对 TC 细胞增殖凋亡的比较:过表达 ALG1 可明显逆转 NMS-P118 + 8305C 细胞 24 h、48 h 及 72 h 的细胞增殖作用(0.41 ± 0.02 比 0.24 ± 0.08 , 0.84 ± 0.05 比 0.52 ± 0.13 , 1.60 ± 0.18 比 1.03 ± 0.24 , P 均 < 0.05)。过表达 ALG1k 可逆转 NMS-P118 促进 TC 细胞凋亡的作用(5.46 ± 0.48 比 35.99 ± 4.48 , $P < 0.05$)。

讨 论

抑制凋亡在 TC 的进展中具有关键作用,如磷脂酶 C83(PLCD3)通过 Hippo 通路促进 TC 细胞的增殖、迁移和侵袭,从而抑制其凋亡,进而促进 TC 进展^[10]。

虽然 PARP1 在多种肿瘤中具有促凋亡作用^[11-12],但研究显示 PARP1 对卵巢癌等肿瘤的发展具有促进作用^[13]。为探究 PARP1 在 TC 中的作用,我们通过对正常甲状腺细胞系和两种 TC 细胞系进行 PARP1 检测,发现 PARP1 在两种 TC 细胞系中均高水平表达。同时 TCGA 数据库分析也显示 PARP1 高表达 TC 患者 OS 低于 PARP1 低表达的 TC 患者,这说明 TC 中 PARP1 高水平表达预示不良预后,可能有利于 TC 进展。此外,我们使用 NMS-P118 处理 8305C 细胞后,检测细胞增殖与凋亡状况,结果显示抑制 PARP1 的表达可显著抑制 TC 细胞的增殖并促进其凋亡,这进一步表明 PARP1 可能在促进 TC 细胞增殖而加快 TC 进展过程中发挥着重要作用。

在研究 PARP1 影响 TC 细胞生物学功能具体机制的过程中,我们通过对 TCGA 数据库中筛选出与 PARP1 表达呈显著相关的前 1 000 个差异基因,并通过富集分析找出其所调控的主要信号通路。结果显示,PARP1 参与调节 TC 细胞中包括剪接体、泛素化蛋白水解、RNA 转运和内存作用在内的多种生物学过程。PARP1 调节 TC 细胞生物学过程的多面性既为我们靶向 PARP1 治疗 TC 提供了更多的可能性,又让我们的研究方向充满了复杂性。本研究中我们发现 PARP1 下游调控的 ERK、JNK 信号通路及 N-糖基化修饰都可能在 TC 细胞中发挥抑制凋亡的作用。且我们使用 PARP1 抑制剂也证实抑制 PARP1 表达可显著抑制 TC 细胞中 ERK 和 JNK 的磷酸化水平。研究表明 PARP1 不但通过 MAPK 促进卵巢癌的进展^[14],还在非小细胞肺癌通过 MAPK 通路促进其转移^[15]。值得注意的是,虽然最近的研究发现 p38 介导了核蛋白 Kin17 对 TC 细胞增殖和迁移的促进作用^[16],但本研究中 PARP1 抑制剂对 TC 细胞 p38 的激活无明显抑制作用,因此 PARP1 可能通过独立于 p38 的 MAPK 通路在 TC 细胞中发挥促癌作用,具体机制有待进一步深入探究。

除了常规信号通路,本研究还重点关注了 N-糖基化修饰途径。N-糖基化修饰是真核生物中一种高度保守的蛋白质修饰过程,多种甘露糖基转移酶参与 N-糖基化途径并在不同的肿瘤当中发挥促癌作用^[17]。但是,不同的唾液酸转移酶对肿瘤的进展具有不同作用,如 ST3GAL1 能够促进前列腺癌细胞增殖、侵袭,抑制其凋亡^[18],而 ST6GAL1 则通过增加细胞间黏附因子 1 (ICAM-1) 的唾液酸化而增加其蛋白质的稳定性,抑制结直肠癌细胞的转移能力^[19]。我们通过 TCGA 数据库对 TC 患者中 ALG1 的表达与预后情况进行分析,发现 ALG1 高表达的 TC 患者 OS 具有降低倾向。此外,

过表达 ALG1 可逆转 NMS-P118 对 TC 细胞的抑制作用。这说明 N-糖基化修饰可能在 TC 的发展过程中扮演着重要角色,且有可能受 PARP1 的影响。但 ALG1 通过 N-糖基化修饰下游何种关键靶分子进而影响 TC 细胞功能,还有待进一步的实验探索。

综上所述,本研究表明 TC 中高度表达的 PARP1 通过调节 N-糖基化酶 ALG1 促进 TC 细胞的 N-糖基化修饰,从而抑制 TC 细胞凋亡,促进其增殖。高水平表达的 PARP1 和 ALG1 都预示 TC 患者 OS 降低,这将为靶向 PARP1 治疗 TC 提供重要理论依据。

参 考 文 献

- [1] Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2019, 48(1):23-35.
- [2] Ferrari SM, Elia G, Ragusa F, et al. Novel treatments for anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Gland Surg*, 2020, 9(Suppl 1):S28-S42.
- [3] Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(11):646-653.
- [4] Prete A, Borges de Souza P, Censi S, et al. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer[J]. *Front Endocrinol*, 2020, 2020(11):102.
- [5] 李浩, 聂荣成, 张途. 甲状腺癌靶向治疗进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(3):504-508.
- [6] Cao X, Shao Y, Meng P, et al. Nascent Proteome and Glycoproteome Reveal the Inhibition Role of ALG1 in Hepatocellular Carcinoma Cell Migration[J]. *Phenomics*, 2022, 2(4):230-241.
- [7] Ilic N, Tao Y, Boutros-Suleiman S, et al. SMURF₂-mediated ubiquitin signaling plays an essential role in the regulation of PARP1 PARylating activity, molecular interactions, and functions in mammalian cells[J]. *FASEB J*, 2021, 35(4):e1436.
- [8] Bashir K, Sarwar R, Saeed S, et al. Interaction among susceptibility genotypes of PARP1 SNPs in thyroid carcinoma[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9):e0199007.
- [9] 刘梅, 黄晶, 王军, 等. 碘化钾通过诱导 PARP1 表达活化 NF- κ B/NLRP3 炎症小体促进甲状腺滤泡细胞焦亡[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37(9):820-829.
- [10] Lin L, Wen J, Lin B, et al. Phospholipase C Delta 3 inhibits apoptosis and promotes proliferation, migration, and invasion of thyroid cancer cells via Hippo pathway[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(4):481-491.
- [11] Zhao Q, Lan T, Su S, et al. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by a PARP1-targeting PROTAC small molecule[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(3):369-372.
- [12] Hu Y, Lin J, Fang H, et al. Targeting the MALAT1/PARP1/LIG3 complex induces DNA damage and apoptosis in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2018, 32(10):2250-2262.
- [13] Chang H, Zhang X, Li B, et al. PARP1 Is Targeted by miR-519a-3p and Promotes the Migration, Invasion, and Tube Formation of Ovarian Cancer Cells[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2022, 37(9):824-836.
- [14] Long X, Song K, Hu H, et al. Long non-coding RNA GAS5 inhibits DDP-resistance and tumor progression of epithelial ovarian cancer via GAS5-E2F4-PARP1-MAPK axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):345.
- [15] Chowdhury P, Dey P, Ghosh S, et al. Reduction of metastatic potential by inhibiting EGFR/Akt/p38/ERK signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition after carbon ion exposure is potentiated by PARP-1 inhibition in non-small-cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):829.
- [16] Jiang QG, Xiong CF, Lv YX. Kin17 facilitates thyroid cancer cell proliferation, migration, and invasion by activating p38 MAPK signaling pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2):727-739.
- [17] Xu Z, Zhang Y, Ocansey DKW, et al. Glycosylation in Cervical Cancer: New Insights and Clinical Implications[J]. *Front Oncol*, 2021, 2021(11):706862.
- [18] 崔振鹏, 刘建华, 罗林, 等. α -2,3 唾液酸转移酶 I 对前列腺癌细胞系 PC3 生物学行为的影响[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2020, 40(6):987-990.
- [19] Zhou L, Zhang S, Zou X, et al. The beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1) inhibits the colorectal cancer metastasis by stabilizing intercellular adhesion molecule-1 via sialylation[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 2019(11):6185-6199.

(收稿时间:2022-09-09)

(本文编辑:高婷)