

MUC1 及其 C 端活性片段突变体 具有抑制肿瘤的活性*

魏玲^{1,2)} 易艳萍¹⁾ 刘莹¹⁾ DONALD KUFEL³⁾ 曹诚^{1)**}

¹⁾军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049;

³⁾Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA)

摘要 MUC1 蛋白翻译后成为一条多肽链, 它很快在内质网被切割成 2 个亚基, 形成稳定的异源二聚体. Cys-Gln-Cys (CQC) 3 个氨基酸位于 MUC1 C 端亚基跨膜结构域与胞内结构域的连接处. 研究发现, MUC1 C 端的 CQCRRK 结构域突变成 AQARRK 或使其缺失, 突变体的致瘤性明显降低. 表明: 通过突变 CQC→AQA 来阻碍与 C 端亚基相关的二聚体化, 可能成为肿瘤治疗的新途径.

关键词 MUC1, C-ter, CQC 序列, 异源二聚体

学科分类号 R730.5

粘蛋白(mucins)是一类高分子质量(>200 ku)糖蛋白, 到目前共发现 9 种. 其分子由肽核心和糖链组成, 其中糖链约占其重量的 50%~90%, 多以 O 型糖苷键与肽核心连接. MUC1 是一种粘蛋白样跨膜糖蛋白(以下简称 MUC1), 是 I 型跨膜蛋白^[1], 由一个基因编码, 翻译后在内质网被切割成 2 个片段, N 端(N-ter, 序列 1 的自氨基端第 1~357 氨基酸残基)分泌至胞膜外, 形成胞外区, 称为 α 亚基, 它主要由数量不定的、20 个氨基酸串连的重复单元组成, 以 O 型糖苷键修饰^[2]; C 端(C-ter, 序列 2 即序列 1 的自氨基端第 358~515 位氨基酸残基)包括 58 个氨基酸的胞外区、28 个氨基酸的跨膜区和 72 个氨基酸的胞内区^[3](cytoplasmic domain, CD), 称为 β 亚基. 研究已经证实: MUC1 分泌至胞外的 α 亚基特异性地识别并以非共价键结合到 β 亚基的胞外区^[4], 形成异源二聚体复合物(来自同一母体 MUC1 蛋白的 2 个不对称部分). MUC1 2 个亚基的相互作用有着重要的生物学功能: a. 导致跨膜的 β 亚基胞内区的磷酸化; b. 对细胞形态有显著的影响. 这些研究结果说明: MUC1 α 和 β 亚基能够形成有活性的受体/同源结合蛋白复合物, 正是这个复合物阐明了细胞内的一些生物学反应.

进一步研究发现: MUC1 这种跨膜蛋白有信号转导的特性, 因为 MUC1 C-ter 是定位于膜上的蛋

白质, 它有受体分子的特征, 其胞内结构域的酪氨酸和丝氨酸可以被磷酸化^[5,6], MUC1-CD 正确地磷酸化后, 可以与第二信使蛋白发生反应^[7,8], 产生一系列信号转导途径^[9]. MUC1 起初的分子间反应可能是由于配体结合到 MUC1 胞外结构域, 使 CD 区磷酸化而导致变构反应, 从而发生信号转导及细胞形态改变. 由于 MUC1 胞外的 2 个亚基是以非共价键相互结合, 而且它们可以自由解离和再结合, 所以推测 α 和 β 亚基的相互作用可能是受体-配体相互作用的特例, 而 α 和 β 亚基分别代表配体和受体分子^[10].

MUC1 在大部分卵巢癌和乳腺癌中异常过量表达, 这与 MUC1 C-ter 亚基介导的 c-Src 信号途径有关^[11], 其过量表达可以抑制细胞凋亡、促进相关基因的转录, 并导致细胞转化. 小鼠的基因敲除试验发现, MUC1 在细胞中的表达加速了肿瘤的发生和发展, 这都暗示着 MUC1 基因的产物以某种方式参与了致癌过程.

基于以上研究结果, 我们试图将 MUC1 分子

*国家自然科学基金资助项目(30270316).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931810, Fax: 010-83821044, E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2006-09-13, 接受日期: 2007-01-31

内 α 和 β 亚基的相互作用应用于肿瘤治疗, 通过阻碍二聚体的形成来阻断信号传导途径, 减弱 MUC1 的致癌性. 又因为只有在非还原的条件下才能观察到 MUC1 蛋白复合物, 所以推测 MUC1 分子内形成二硫键, 而位于 C-ter 亚基胞内结构域和跨膜结构域连接处的 CQC 中的半胱氨酸可能参与了蛋白复合物的形成^[2]. 因此, 我们构建了一系列 MUC1 及其 C 端活性片段 CQC→AQA 的突变体, 并利用乳腺癌细胞 HCT116 建立了表达这些突变体的细胞系, 并通过集落形成试验和小鼠体内的致瘤性实验证明: MUC1 及其 C 端活性片段突变体具有抑制肿瘤的活性, 将有可能成为抗肿瘤药物.

MUC1 突变体, 是序列表中的序列 1 自氨基端第 444~449 位氨基酸残基 CQCRRK 突变或缺失的蛋白质. CQCRRK 可突变为 AQARRK, 名称为 MUC1(CQC→AQA), 由 515 个氨基酸残基组成; CQCRRK 缺失的蛋白质, 名称为 MUC1(Δ CQCRRK), 由 509 个氨基酸残基组成. MUC1 C 端活性片段突变体, 是序列表中序列 2 的自氨基端第 87~92 位氨基酸残基 CQCRRK 突变的多肽, 其中, 序列 2 的自氨基端第 87~92 位氨基酸残基 CQCRRK 可突变为 AQARRK, 名称为 MUC1 C-ter(CQC→AQA), 由 158 个氨基酸残基组成.

本研究的序列 1 是 MUC1 自 N 端到 C 端的 515 位氨基酸序列: MTPGTQSPFFLLLLL TVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSST EKNAVSMSTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPA TEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTPPAH DVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPPPGS TAPPAHGVTSAPDTRPPPGSTAPAAHGVTSAPDT RPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALASTAPPVHNVT SASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFS IPSHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSS NHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTD YYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSV VVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY NLTISDVSVSDVPPFSAQSGAGVPGWGIALLLVLCV LVALAIVYLI ALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYH THGRYVPPSSSTRSPYEKVSANGGSSLSYTNPAVAATSANL. 序列 2 是 MUC1 C-ter 158 个氨基酸序列, 即序列 1 的自氨基端第 358~515 个氨基酸残基: SVVVQLTLAFREGTINVH DVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPPFSAQSGAGVPGWGIALLLVLCV LVALAIVYLI ALAV

CQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYH THGRYVPPSSSTRSPYEKVSANGGSSLSYTNPAVAATSANL.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞株. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞由 TIANGEN 生化公司提供. 乳腺癌细胞 HCT116, 军事医学科学院生物工程研究所保存, 培养在 DMEM 培养基中, 并添加 10%胎牛血清、3.7 g/L 碳酸氢钠、100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素. 高糖 (4.5 g/L) DMEM 培养基是 Invitrogen 公司产品. 胎牛血清是 HyClone 产品.

1.1.2 质粒. pIRES-Puro 购自 Clontech 公司. pGEX-4T-1 购自 Amersham Biosciences 公司, pGEX-4T-1-3AA, pGEX-4T-1-6AA, pGEX-4T-1-12AA, pGEX-4T-1-25AA, pGEX-4T-1-37AA 由易艳萍博士提供. 它们在 BL21 大肠杆菌中, 经 IPTG 诱导表达 GST-CQC(3 肽)、GST-CQCRRK(6 肽)及 CQCRRKNYGQLD(12 肽)等 5 种 GST 融合蛋白.

1.1.3 工具酶和化学试剂. 高保真高温 DNA 聚合酶为 Roche 公司产品; 限制性内切酶及 T4 连接酶均为 TaKaRa 产品; 琼脂糖及其他有关化学试剂均为进口或国产分析纯; Puromycin 为 Clontech 公司产品; 蛋白质分子质量标准购自晶美生物公司; anti-MUC1 C-ter 抗体为 NeoMarkers 公司产品; HRP 偶联的二抗及化学发光试剂为 Amersham Biosciences 产品.

1.1.4 试剂盒. PCR 产物回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 质粒提取试剂盒为 Roche 产品; Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品.

1.1.5 4~6 周龄裸鼠由军事医学科学院实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 Cys-Gln-Cys(CQC)介导的二聚体的形成. 将 pGEX-4T-1(空载体), pGEX-4T-1-3AA, pGEX-4T-1-6AA, pGEX-4T-1-12AA, pGEX-4T-1-25AA, pGEX-4T-1-37AA 载体分别转化大肠杆菌 BL21, 并将其铺于含有氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养基平板中, 在 37℃过夜培养. 次日挑单菌落接入含有氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养液中, 37℃过夜培养. 将 50 μ l 每种过夜培养物分别接种到 5 ml 含有氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养液中, 37℃培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续

在 37℃ 培养 3 h, 向菌体中加入等体积 2× 上样缓冲液(不含 DTT 或 β- 巯基乙醇), 沸水煮 5 min, 离心上清经 12% SDS-PAGE 分析蛋白质的表达情况.

1.2.2 MUC1 基因的获得及表达载体的构建. MUC1 基因通过 PCR 反应从人乳腺癌细胞 MCF-7 cDNA 库扩增获得. 使用的引物为: P1, 5' cggatcatg-acccccgggcattcggtctctt, P2, 5' cggattcacaagtggcagaagtgtg. 扩增方法为: MCF-7 cDNA 2 μg, 引物 P1、P2 各 100 ng, dNTP 250 μmol/L, DNA 聚合酶 3.5 U, PCR 缓冲液 5 μl, 加蒸馏水至 50 μl, 用 PE 公司 9700 型 PCR 仪进行 PCR 扩增, 条件为: 94℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 2 min, 共 30 循环. PCR 扩增产物用 DNA 纯化试剂盒纯化后, 用 *EcoRV* 和 *EcoRI* 双酶切, 质粒载体 pIRES-Puro 用 *EcoRV* 和 *EcoRI* 双酶切, 上述 2 片段用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 挑选正确克隆, 经 DNA 序列分析得到结构正确的重组质粒 pIRES-Puro-MUC1.

1.2.3 MUC1(CQC→AQA)基因表达载体的构建. 通过两步 PCR 法构建该突变体. 突变引物为 P3: 5' tccttgccctggcagtgacacaggctcgccgaaagagctat; P4: 5' agcctgtgccactgccagggaagga. 扩增方法如下: 以质粒 pIRES-Puro-MUC1 (1 ng) 为模板, 分别以 P1+P4 或 P2+P3 为引物进行 PCR 反应(扩增条件同上), 但以 P1+P2 为引物扩增时, 72℃ 反应时间为 2 min, 以 P2+P3 为引物时, 72℃ 反应时间为 30 s. 反应结束后, 经 1% 琼脂糖电泳, 用胶回收试剂盒纯化扩增片段. 2 片段各取 10 ng, 混合后作为模板, 用引物 P1+P2 进行 PCR 扩增, 获得全长的、带有突变位点的 MUC1(CQC→AQA) 基因, 同上克隆至 pIRES-Puro 质粒载体, 经 DNA 序列分析得到结构正确的重组质粒 pIRES-Puro-MUC1(CQC→AQA).

1.2.4 MUC1(ΔCQCRRK)基因表达载体的构建. MUC1(ΔCQCRRK)利用步骤 1.2.2 中的突变方法, 进行缺失突变. 但是, 突变引物为: P5, 5' ttgcctggcagtgagctatgggcagctggaca; P6, 5' agctcactgccaggga. 分别用 P1+P6, P2+P5 为引物进行扩增, 然后用 P1+P2 进行扩增, 构建缺失突变体, 经 DNA 序列分析得到结构正确的重组质粒 pIRES-Puro-MUC1(ΔCQCRRK).

1.2.5 MUC1 C-ter(CQC→AQA)基因表达载体的构建. 以 pIRES-Puro-MUC1(CQC→AQA) 为模板, 用引物 P7(5' cggatatctccgtggtgtagaatcga) 和 P2 进行 PCR 扩增(扩增条件同步步骤 1.2.1), 扩增所获得

DNA 片段用同样方法克隆至质粒 pIRES-Puro, 得到结构正确的重组质粒 pIRES-Puro-MUC1 C-ter(CQC→AQA).

1.2.6 表达野生型 MUC1 和 MUC1 及其 C 端活性片段突变体的细胞系建立. 乳腺癌细胞 HCT116 培养于含 10% 胎牛血清的高糖 (4.5 g/L) DMEM 培养基, 质粒 pIRES-Puro-MUC1, pIRES-Puro-MUC1(CQC→AQA), pIRES-Puro-MUC1(ΔCQCRRK), pIRES-Puro-MUC1 C-ter(CQC→AQA) 及载体 pIRES-Puro 各 5 μg, 分别用 Lipofectamine 法(方法见产品说明)转染 HCT116 细胞. 转染 12 h 后, 将细胞按 1:15 进行传代, 然后加入 Puromycin 至终浓度 400 mg/L 进行筛选. 3 周后长出细胞克隆. 连续传代 3 次后用于下述实验.

1.2.7 MUC1 及其 C 端活性片段突变体在细胞系中的表达. 用预冷的细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 mg/L PMSF, 1% NP-40, 蛋白酶抑制剂 1 片/10 ml) 分别裂解上述细胞, 12 000 r/min 离心 10 min, 向裂解上清中加入 2× 上样缓冲液(含 DTT), 离心上清经 15% SDS-PAGE 电泳分离, 转至硝酸纤维素膜上, 与 anti-MUC1 C-ter 在 4℃ 反应过夜, 再用标记了 HRP 的二抗和化学发光试剂检测蛋白质表达.

1.2.8 MUC1 及其 C 端活性片段突变体的集落形成情况. 用 5 ml 含 0.5% Difco Noble 琼脂的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 4.5 g/L 葡萄糖), 铺在 100 mm 细胞培养皿中. 然后将 10⁵ 个在 1.2.6 步骤中建立的细胞系, 悬浮于溶化并预冷至 37℃ 的含 0.3% Difco Noble 琼脂的 DMEM 培养基, 铺在上述含 0.5% Difco Noble 琼脂的 DMEM 培养基上. 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 2 周后, 通过显微计数, 统计含 10 个细胞以上的集落数.

1.2.9 表达 MUC1 及其 C 端活性片段突变体的肿瘤细胞致瘤性. 将 10⁶ 个携带 pIRES-Puro-MUC1, pIRES-Puro-MUC1(CQC→AQA), pIRES-Puro-MUC1(ΔCQCRRK), pIRES-Puro-MUC1 C-ter(CQC→AQA) 及载体 pIRES-Puro 的乳腺癌细胞 HCT116, 接种于 4~6 周龄裸鼠的背部皮下, 每种细胞接种 6 只裸鼠, 3 周后测定肿瘤的体积, 其平均值见图 5 所示.

2 结 果

2.1 CQC 介导的二聚体的形成

为了证明 CQCRRK 序列中的半胱氨酸参与形

成二聚体, 我们将编码 CQCRRK 等氨基酸序列的核苷酸克隆至 pGEX-4T-1 载体上, 位于编码 GST 蛋白的 DNA 序列下游的多克隆位点, 构建了如下质粒: pGEX-4T-1-3AA, pGEX-4T-1-6AA, pGEX-4T-1-12AA, pGEX-4T-1-25AA, pGEX-4T-1-37AA, 它们在 BL21 大肠杆菌中, 经 IPTG 诱导后, 分别表达 GST-CQC(3 肽)、GST-CQCRRK(6 肽)及 CQCRRKNYGQLD(12 肽)等 5 种 GST 融合

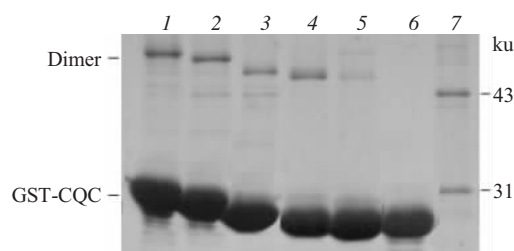


Fig. 1 Formation of the dimer mediated by CQCRRK motif
1: GST-37AA, 2: GST-25AA, 3: GST-12AA, 4: GST-6AA, 5: GST-3AA, 6: GST, 7: Protein molecular mass marker.

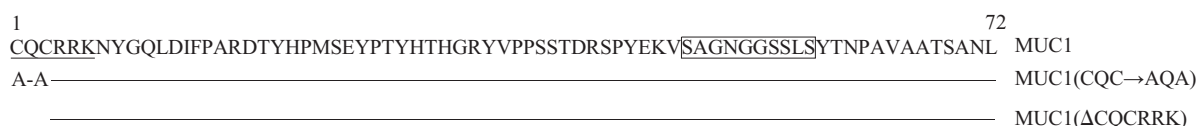


Fig. 2 Comparison of the cytoplasmic domain amino acid sequences among MUC1, MUC1 (CQC→AQA) and MUC1 (ΔCQCRRK)

2.3 MUC1 及其 C 端活性片段突变体在 HCT116 细胞中的表达

将构建完成并测序正确的质粒 pIRES-Puro-MUC1, pIRES-Puro-MUC1 (CQC → AQA), pIRES-Puro-MUC1 (ΔCQCRRK), pIRES-Puro-MUC1 C-ter(CQC→AQA)及载体 pIRES-Puro 分别转染 HCT116 细胞, 建立稳定表达 MUC1 及其突变体的细胞系, 分别收集少量细胞并裂解, 裂解上清在还原条件下经 SDS-PAGE 电泳后, 转至

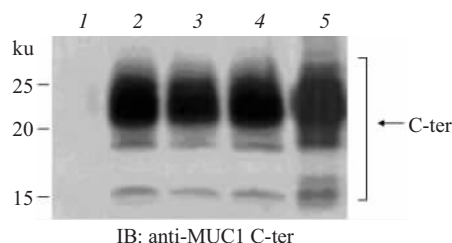


Fig. 3 Expressing of MUC1 C-ter in HCT116 cells

1: HCT116/Vector, 2: HCT116/MUC1, 3: HCT116/MUC1 (CQC → AQA), 4: HCT116/MUC1 (ΔCQCRRK), 5: HCT116/MUC1 C-ter (CQC→AQA).

蛋白, GST-CQC 等融合蛋白及 pGEX-4T-1 载体表达的 GST 蛋白在非还原条件下, 经 SDS-PAGE 分离后, 在图 1 中清晰可见 GST 融合蛋白的单体分子(分子质量约在 26~30 ku 之间)以及二聚体蛋白(分子质量约在 52~60 ku 之间)的条带, 而由 pGEX-4T-1 载体表达的 GST 则在 52~60 ku 之间无相应的二聚体条带. 说明包含 CQC 序列的蛋白质在分子间形成二聚体.

2.2 MUC1 与 MUC1 突变体 MUC1 (CQC → AQA) 和 MUC1 (ΔCQCRRK) 的胞内区氨基酸序列比较

MUC1 C-ter 亚基包括胞外区、跨膜区和胞内区(CD), 图 2 显示了 MUC1 及其突变体的 72 个氨基酸的胞内区序列, MUC1 (CQC → AQA) 是将 MUC1-CD 的 CQC 突变为 AQA, MUC1 (ΔCQCRRK)则是缺失了 MUC1-CD 的 CQC 序列.

硝酸纤维素膜上, 用 anti-MUC1 C-ter 抗体进行免疫印迹检测, 可以在分子质量约 20 ku 附近看到 MUC1 C-ter 蛋白条带. 因为 MUC1 的 3 种突变体都是针对 C-ter 亚基进行的, 又因为在还原条件下, 组成 MUC1 复合物的 N-ter 亚基和 C-ter 亚基解离, 所以图 3 中仅显示 C-ter 亚基.

2.4 MUC1 及其 C 端活性片段突变体的集落形成

图 4 说明的是: 表达 MUC1 (CQC → AQA), MUC1 C-ter(CQC→AQA)和 MUC1(ΔCQCRRK)突变体的细胞在软琼脂培养基中形成集落情况(图 4a)和集落数(图 4b). 结果表明: 表达 MUC1 的细胞形成大量集落; 表达 MUC1 (CQC→AQA)、MUC1 (ΔCQCRRK)、MUC1 C-ter(CQC→AQA)突变体的 HCT116 不形成集落, 说明 MUC1 突变体的成瘤性弱. 与表达野生型 MUC1 的细胞相比, HCT116 细胞或含有载体 pIRES-Puro 的 HCT116 细胞在上述软琼脂培养基上形成较少量集落, 但这并不说明它们没有致瘤性.

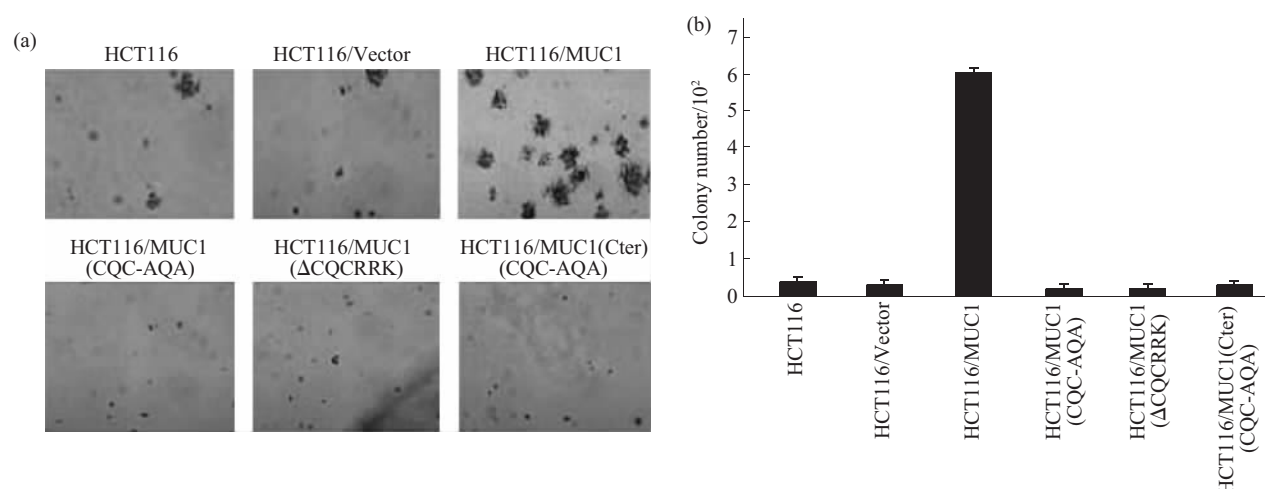


Fig. 4 The colony formation of MUC1 and its C-ter mutants

2.5 表达 MUC1 及其 C 端活性片段突变体的肿瘤细胞致瘤性观察

图 5 表明: 含有空载体的 HCT116 细胞 (HCT116/Vector) 和 HCT116 细胞一样, 可以使裸鼠生成肿瘤; 表达野生型 MUC1 的细胞, 其致瘤能力较 HCT116 细胞显著提高; 但是表达 MUC1 (CQC $\rightarrow$ AQA)、MUC1 (Δ CQCRRK) 和 MUC1 C-ter (CQC $\rightarrow$ AQA) 的 HCT116 细胞对裸鼠几乎没有致瘤能力. 证明 MUC1 及其 C 端活性片段突变体具有抑制肿瘤的活性. 另外, 图 4 和图 5 的实验结果表明: HCT116/Vector 细胞在软琼脂培养基上的集落形成情况与其致瘤性之间并没有绝对的一致性.

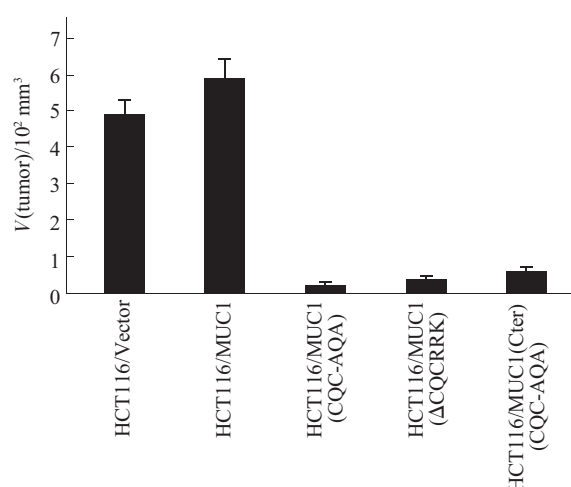


Fig. 5 The oncogenicity of the mutants: MUC1 (CQC $\rightarrow$ AQA), MUC1 (Δ CQCRRK), MUC1 C-ter (CQC $\rightarrow$ AQA)

3 讨 论

在正常情况下, MUC1 主要表达于多种组织、

器官中上皮细胞近管腔或腺腔面, 呈顶端表达, 极性分布. 而在多种肿瘤中, MUC1 异常表达, 主要表现为: a. 表达量增高, 可达到正常时的 100 倍以上; b. 细胞表面分布改变, 丧失极性分布, 整个细胞表面均表达; c. 结构改变, 主要由于糖基化不全, 出现新的糖链及肽表位^[13,14].

MUC1 的跨膜区和胞内结构域在哺乳动物中非常保守^[15], 氨基酸序列的同源性达到 80%~90%, 这暗示着 MUC1 C-ter 对 MUC1 的完整分子的功能起着重要的作用. MUC1-CD 除了与 N-ter 发生类似于受体 - 配体的相互作用外, 还可以与 β -catenin 及 p53 肿瘤抑制因子相互作用^[16], 而且 MUC1-CD 很易被表皮生长因子受体、c-Src 及糖元合酶激酶 3 β (GSK3 β) 磷酸化. 还有研究已经证实, MUC1 的过量表达足以导致肿瘤的发生^[17]. 因此, 下调 MUC1 的表达或功能可能有助于肿瘤的治疗.

MUC1 的 α 和 β 亚基结合形成蛋白质复合物后, 可以行使多种功能, 比如改变细胞形态或启动信号转导途径. 在肿瘤细胞中, 如果阻止蛋白质复合物的形成, 可能会减弱 MUC1 蛋白在肿瘤细胞中的致瘤能力. 又据文献[12]报道, 位于 MUC1-CD 区的, 连接胞内结构域和跨膜结构域的 CQC 三肽, 可能通过形成二硫键参与蛋白质复合物的形成. 因此, 在本次研究中, 我们针对 CQCRRK 进行了点突变和缺失突变, 构建了 pIRES-Puro-MUC1, pIRES-Puro-MUC1 (CQC $\rightarrow$ AQA), pIRES-Puro-MUC1 (Δ CQCRRK) 及 pIRES-Puro-MUC1 C-ter (CQC $\rightarrow$ AQA) 一系列 MUC1 及其 C 端活性片段的突变体, 并在乳腺癌细胞 HCT116 中建立了表达这

些突变体的细胞系. 一方面, 从上述细胞系在软琼脂培养基中形成集落的情况可以看出: 野生型 MUC1 的细胞形成大量集落, 而表达 MUC1 (CQC→AQA)、MUC1(ΔCQCRRK)、MUC1 C-ter (CQC→AQA) 突变体的细胞不形成集落, 说明 MUC1 突变体的成瘤性弱. 另一方面, 从动物实验结果也可以看出: 表达野生型 MUC1 的细胞, 其致瘤能力较含有空载体的 HCT116 细胞显著提高, 但是表达 MUC1 (CQC→AQA)、MUC1 (ΔCQCRRK) 和 MUC1 C-ter (CQC→AQA) 的 HCT116 细胞对裸鼠几乎没有致瘤能力, 证明 MUC1 及其 C 端活性片段突变体具有抑制肿瘤的活性.

综合本次实验结果, 我们对 MUC1 突变体抑制肿瘤的机理做了如下推测: 第一, 可能是 MUC1 突变体与野生型 MUC1 在肿瘤细胞中, 相互竞争与细胞膜的结合, 由于突变体不能通过二硫键形成有活性的二聚体复合物, 减少了由野生型 MUC1 介导的信号途径, 所以 MUC1 突变体的致瘤能力减弱; 第二, MUC1 顶端表达的机制还不清楚, 但是, MUC1 能正确地定位于细胞膜上, 对其功能却是至关重要的, 有文献报道^[8], MUC1 蛋白中至少有 2 个序列参与了顶端定位, 一个是胞外结构域, 另一个就是位于胞内结构域和跨膜结构域交接点的 CQC 序列, 本研究中 CQC→AQA 的突变体或缺失 CQCRRK 的突变体, 有可能因为 MUC1 无法在细胞膜中正确地定位而不能行使信号转导的功能. 综上所述, 在本研究中, 我们以 MUC1 为靶分子进行研究, 证明了 MUC1 及其 C 端活性片段突变体具有抗肿瘤活性, 是研制抗肿瘤药物的新途径.

参 考 文 献

- Kufe D, Inghirami G, Abe M, *et al.* Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma*, 1984, **3** (3): 223~232
- Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, *et al.* A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J Biol Chem*, 1988, **263** (26): 12820~12823
- Merlo G R, Siddiqui J, Cropp C S, *et al.* Frequent alteration of the DF3 tumor-associated antigen gene in primary human breast carcinomas. *Cancer Res*, 1989, **49** (24): 6966~6971
- Baruch A, Hartmann M, Yoeli M, *et al.* The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res*, 1999, **59** (7): 1552~1561
- Li Y, Bharti A, Chen D, *et al.* Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (12): 7216~7224
- Quin R J, McGuckin M A. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. *Int J Cancer*, 2000, **87** (4): 499~506
- Wang H, Lillehoj E P, Kim K C. Identification of four sites of stimulated tyrosine phosphorylation in the MUC1 cytoplasmic tail. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310** (2): 341~346
- Mukherjee P, Tindler T L, Basu G D, *et al.* MUC1 (CD227) interacts with lck tyrosine kinase in Jurkat lymphoma cells and normal T cells. *J Leukoc Biol*, 2005, **77** (1): 90~99
- Schroeder J A, Masri A A, Adriance M C, *et al.* MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene*, 2004, **23** (34): 5739~5747
- Wreschner D H, McGuckin M A, Williams S J, *et al.* Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci*, 2002, **11** (3): 698~706
- Hu X F, Yang E, Li J, *et al.* MUC1 cytoplasmic tail: a potential therapeutic target for ovarian carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, **6** (8): 1261~1271
- Vos H L, de Vries Y, Hilken J. The mouse episialin (Muc1) gene and its promoter: rapid evolution of the repetitive domain in the protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **181** (1): 121~130
- Li Y, Liu D, Chen D, *et al.* Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene*, 2003, **22** (38): 6107~6110
- Ren J, Agata N, Chen D, *et al.* Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*, 2004, **5** (2): 163~175
- Pemberton L, Taylor-Papadimitriou J, Gendler S J. Antibodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **185** (1): 167~175
- Wei X, Xu H, Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell*, 2005, **7** (2): 167~178
- Huang L, Chen D, Liu D, *et al.* MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3beta-mediated phosphorylation and degradation of beta-catenin. *Cancer Res*, 2005, **65** (22): 10413~10422
- Pemberton L F, Rughetti A, Taylor-Papadimitriou J, *et al.* The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (4): 2332~2340

MUC1 C-terminal Heterodimer and Its Tumorigenicity*

WEI Ling^{1,2}, YI Yan-Ping¹, LIU Xuan¹, DONALD KUFE³, CAO Cheng¹**

¹Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA)

Abstract The MUC1 protein is expressed as a stable heterodimer from a single polypeptide, which was cleaved into two subunits in endoplasmic reticulum. It localizes at the cell membrane as an α/β -complex, tethered by the β -subunit transmembrane domain. Previous studies implicated that the three amino acids of the transmembrane domain adjacent to the cytoplasmic domain in MUC1 β -subunit are the residues Cys-Gln-Cys (CQC). Therein, site-directed mutagenesis of the CQC motif was performed and the cell lines were established. These cell lines include HCT116/MUC1, HCT116/MUC1 (CQC $\rightarrow$ AQA), HCT116/MUC1 (Δ CQCRRK), HCT116/MUC1C-ter (CQC $\rightarrow$ AQA), which can express wild type or mutant MUC1 on the cell surface, or its cytoplasmic domain. The effects of CQC $\rightarrow$ AQA mutation or CQCRRK deletion were investigated *in vitro* and *in vivo*. Compared with wild type MUC1, the mutants depressed soft agar colony formation and showed abrogated tumorigenicity in nude mice. These findings implicate that CQCRRK motif mediate the formation of MUC1 protein complex. As a result of this research, disruption of MUC1-C-terminal subunit-associated dimerization by mutation of CQC $\rightarrow$ AQA might represent a novel therapeutic approach for tumor.

Key words MUC1, C-ter, CQC motif, heterodimer

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270316).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66931810, Fax: 86-10-83821044, E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

Received: September 13, 2006 Accepted: January 31, 2007