

文章编号 1006-8147(2019)06-0563-04

论 著

# PHF20 相互作用蛋白质组学分析及其在肿瘤中的作用研究

孙干成, 侯永强, 高 杰, 邱熔芳

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:探究 PHF20 相互作用蛋白,初步揭示 PHF20 促进肿瘤发生发展的分子机制。方法:通过免疫亲和纯化联合银染质谱的方法检测 PHF20 的相互作用蛋白。免疫共沉淀方法对质谱的结果进行验证。在干扰 PHF20 及对对照乳腺癌细胞系中,用 EdU 和转移小室的实验检测 PHF20 在乳腺癌发生发展中的作用。结果:质谱结果显示,PHF20 可以结合 KDM4A 和 PRC2 等复合物,免疫共沉淀验证了 PHF20 与各个复合物之间相互作用的可信性。EdU 和转移小室实验表明,干扰 PHF20 后与对照细胞相比,其增殖和侵袭能力显著降低。结论:PHF20 在体内与多种表观遗传调控相关的复合物相互作用,并促进肿瘤细胞增殖和侵袭的能力。

**关键词** PHF20;KDM4A;PRC2;恶性肿瘤

**中图分类号** Q7+R730

**文献标志码** A

## A study of proteomic analysis of the PHF20 interactome and its role in tumorigenesis

SUN Gan-cheng, HOU Yong-qiang, GAO Jie, QIU Rong-fang

(1.Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:**To investigate the proteins that are associated with PHF20, and to explore the mechanism of PHF20 promoting carcinogenesis. **Methods:**Affinity purification and mass spectrometry assays were used to identify the proteins that are associated with PHF20 in vivo. Co-IP was performed with antibodies to verify the mass spectrometry results. In the PHF20 knockdown cells and the control cells, we examined the cellular proliferation and invasion of the breast cancer cell lines using an EdU and transwell assays. **Results:**The results of mass spectrometry indicated that PHF20 co-purified with NuRD(MTA1), KDM4A and PRC2 complex in vivo, and the presence of these proteins in the PHF20-interacting complex was confirmed by coimmunoprecipitation experiments. Compared to control cells, EdU and transwell assays showed that knockdown of PHF20 led to a statistically significant decrease in the proliferation and invasive potential of MDA-MB-231 cells. **Conclusion:**PHF20 interacts with multiple transcriptional regulation complexes in vivo and promotes the proliferation and invasive potential of tumorigenesis.

**Key words** PHF20;KDM4A;PRC2;tumorigenesis

PHF 蛋白家族主要是含有 PHD 结构域的锌指蛋白。PHF20 是一个潜在的转录因子,它可以特异性识别甲基化的赖氨酸,并且是赖氨酸乙酰转移酶复合体 MOF-NSL 的一个亚基,催化组蛋白 H4 乙酰化和非组蛋白的乙酰化<sup>[1-2]</sup>。PHF20 位于染色体 20q11 上,编码的蛋白质含有 2 个 Tudor 结构域,1 个 AT-hook 结构域,1 个 C2H2 锌指结构域和 1 个 PHD 结构域<sup>[3]</sup>。

现有研究表明 PHF20 与肿瘤发生相关,但是其在肿瘤增殖和侵袭中的作用仍存在争议。有报道称 PHF20 可以与 AKT 结合,通过诱导 p53 的表达从而抑制肿瘤的发生<sup>[4]</sup>。在胶质母细胞瘤患者中,PHF20 表达阳性的患者表现出较长的生存期<sup>[5]</sup>。与之相反,也有研究表明 PHF20 在许多癌症中高表达,并且可以通过活化 NF- $\kappa$ B 从而促进肿瘤的发

生<sup>[6-8]</sup>。本实验旨在首次系统性分析 PHF20 的相互作用蛋白,初步探索 PHF20 在肿瘤发生发展中的作用。

### 1 材料与方法

1.1 细胞系 人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株(购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)

1.2 质粒和试剂 真核表达载体 pCMV-Tag2B 购自于 Invitrogen 公司。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室制作。EdU 试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。转移小室购自 FALCON 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 MCF-7 细胞采用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO $_2$  培养;MDA-MB-231 细胞采用含有 10%胎牛血清的 1640 培养基,37 $^{\circ}$ C,无 CO $_2$  培养。

1.3.2 免疫亲和纯化 将细胞培养于 15cm 大皿中,当细胞密度到 60%~70%左右时用 PEI(聚乙烯

作者简介 孙干成(1993-),男,硕士在读,研究方向:表观遗传与肿瘤;通信作者:邱熔芳,E-mail: rongfangqiu@tmu.edu.cn。

亚胺)转染试剂转染相应质粒;转染后 48 h 收获细胞, 1 000 r/min 4 ℃离心 4 min 收集细胞, 加入预加cocktail的 IP buffer, 4 ℃条件下在杂交仪上裂解 1 h; 数次超声, 以破碎细胞中的絮状沉淀物; 以最大转速 4 ℃离心 10 min, 收集上清, 取上清于一干净的 15 mL 离心管中, 加入 FLAG M2 珠子 4 ℃条件下在杂交仪上翻转混匀 2 h; 500×g, 4 ℃, 离心 5 min, 弃上清; 加入 IP buffer 将残余的珠子一并转移入预冷的 1.5 mL EP 管中; 500×g, 4 ℃, 离心 5 min, 弃上清; 重复上述步骤两次; 加入 FLAG peptide 翻转洗脱 30 min, 500×g 4 ℃离心 5 min, 吸取上清为洗脱样品。

**1.3.3 免疫共沉淀** 收集细胞用 IP 裂解液裂解后超声, 加入蛋白特异性抗体 4 ℃孵育过夜。之后加入 Protein G 免疫磁珠 4 ℃结合 2 h, 经过洗脱非特异结合后, 对样品 95 ℃变性可用于 Western blot 的检测。

**1.3.4 EdU 检测** 将细胞株接种于 24 孔板, 每孔加入 500  $\mu$ L 培养基正常培养过夜; 加入 EdU 浓度为 20  $\mu$ mol/L 的工作液, 37 ℃孵育 2 h, 加入 4% 多聚甲醛, 在室温下固定 15 min。完全弃去固定液后, 每孔加入 3% BSA 清洗液洗 2 次, 每次 5 min; 弃去清洗液, 加入由 PBS 配制的 0.5% Triton X-100 溶液, 在室温下孵育 20 min。依次加入下列试剂配制染色反应液 (1 mL): 800  $\mu$ L 1×reaction buffer, 20  $\mu$ L CuSO<sub>4</sub> 溶液, 2.5  $\mu$ L picolyl azide, 100  $\mu$ L Reaction buffer additive, 反应液现用现配。用 3% BSA 清洗液清洗 2 次, 每次 5 min。弃去清洗液后加入反应液, 室温避光孵育 30 min。弃反应液, 加入 3% BSA 清洗液避光清洗 5 min, 加入 DAPI 染料封片。室温避光反应 30 min 后荧光显微镜下观察。

**1.3.5 转移小室实验** 500  $\mu$ L 室温的无血清培养基加入转移小室中, 在生物安全柜中室温放置 2 h 以水化 ECM 层; 在这期间用胰酶消化要接种的细

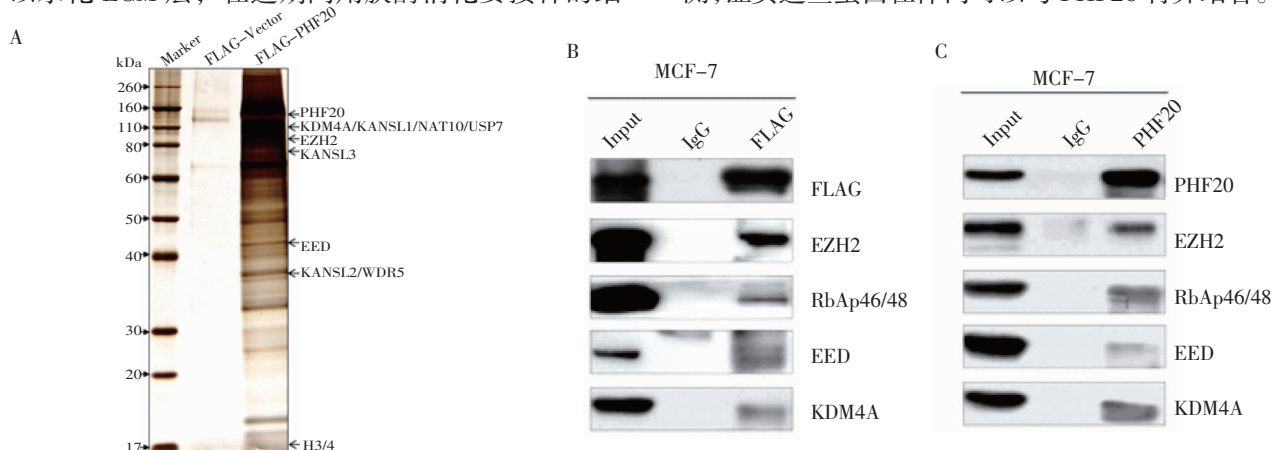
胞, 并用细胞计数仪进行细胞计数; 用移液器小心的将小室上层的培养基吸出, 并加入 300  $\mu$ L 上述细胞悬液; 向 24 孔板的孔中加入 500  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清的培养基, 将上一步的含有细胞的小室移入此孔中; 将 24 孔板(含小室)放于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 ℃细胞培养箱中培养; 18~24 h 把小室置于试剂盒中附带的染色液中, 染色约 20 min, 用试剂盒中自带的棉棒轻轻均匀的擦去 ECM 层, 在倒置显微镜下进行观察并照相计数。

**1.4 统计学分析** 所有实验独立重复 3 次, 两两比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为结果具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PHF20 相互作用蛋白的鉴定和验证** 首先构建了带有 FLAG 标签的 PHF20 融合蛋白 (FLAG-PHF20) 真核表达载体, 将其与空载分别转染 MCF-7 细胞。之后细胞裂解液通过使用 anti-FLAG M2 亲和珠进行免疫亲和纯化。经过数次洗脱非特异结合蛋白后, 用 3×FLAG 短肽进行洗脱, 洗脱样品经过梯度 SDS-PAGE、银染、胶内酶解后进行质谱分析 (图 1A)。质谱结果表明, PHF20 可以结合 PRC2 复合物中的组分和 KDM4A。

为了进一步证实质谱结果, 我们用 MCF-7 细胞过表达了带有 FLAG 标签的 PHF20 后裂解细胞, 利用全细胞裂解液进行了免疫共沉淀实验。结果如图 1B 所示, 我们首先用 FLAG 标签蛋白的特异性抗体进行免疫沉淀, 再用 KDM4A、EZH2、EED、RbAp46/48 的抗体进行 IB 检测, 证实了这些蛋白可以与 PHF20 特异结合。接下来, 我们用 MCF-7 细胞裂解液进行了免疫共沉淀实验。结果如图 1C 所示, 我们在 MCF-7 细胞中用 PHF20 的特异性抗体进行免疫沉淀, 再用 KDM4A、EZH2、EED、RbAp46/48 的抗体进行 IB 检测, 证实这些蛋白在体内可以与 PHF20 特异结合。



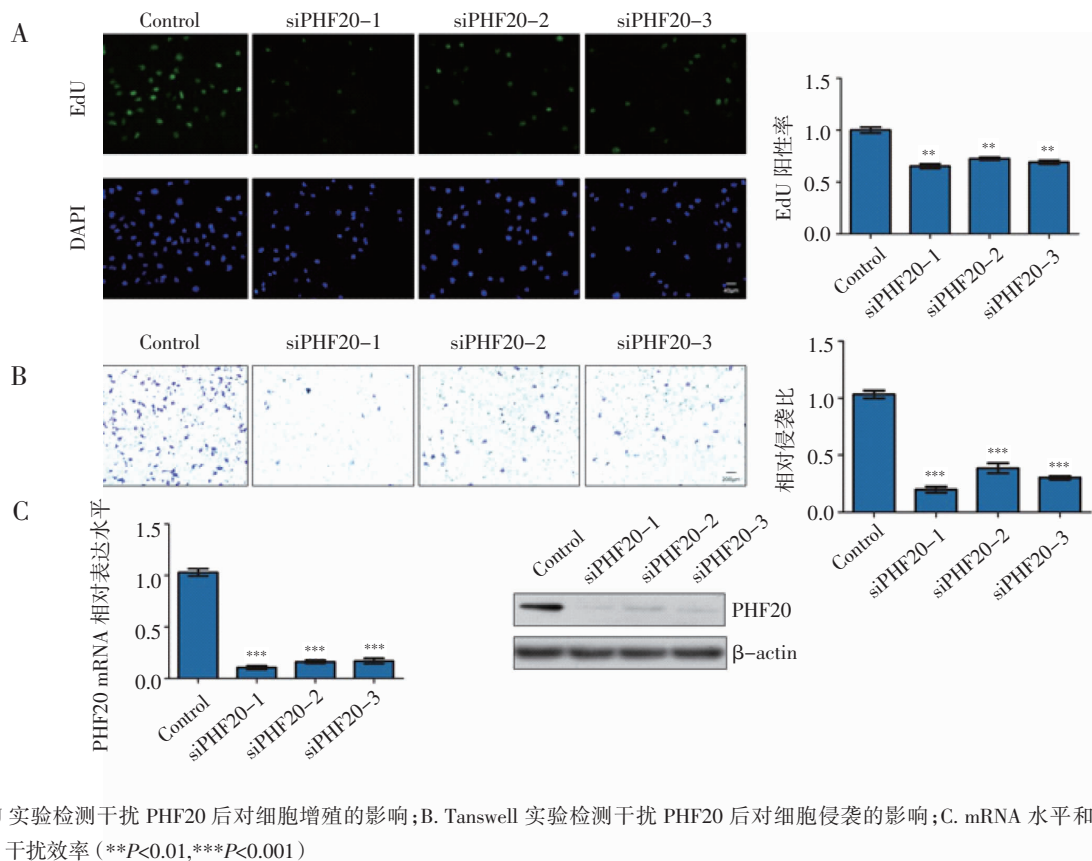
A. 免疫亲和纯化银染质谱检测 PHF20 相互作用蛋白; B. 检测外源 PHF20 与特定蛋白的相互作用; C. 检测内源 PHF20 与特定蛋白的相互作用

图 1 PHF20 相互作用蛋白的鉴定

Fig 1 Identification of PHF20 interacting proteins

2.2 干扰 PHF20 会抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭 为进一步探究 PHF20 对乳腺癌细胞增殖和转移的作用,我们在 MCF-7 细胞中进行 EdU 实验。显微镜下同一位置,统计 EdU 视野中细胞数与 DAPI 视野中的细胞数比值 (Control=0.512 8, siPHF20-1=0.358 4, siPHF20-2=0.395 3, siPHF20-3=0.368 5),结果发现与对照细胞相比,干扰 PHF20 表达的细胞增殖

能力显著降低(图 2A)。我们在MDA-MB-231 细胞中又进行了 transwell 实验。结果如图 2B,与对照细胞相比,干扰 PHF20 表达的MDA-MB-231 细胞穿过基质胶细胞数量明显减少(Control=1, siPHF20-1=0.228 6, siPHF20-2=0.385 7, siPHF20-3=0.285 7),说明 PHF20 能促进乳腺癌细胞侵袭转移。mRNA 水平和蛋白水平检测 PHF20 干扰效率结果见图 2C。



A. EdU 实验检测干扰 PHF20 后对细胞增殖的影响;B. Transwell 实验检测干扰 PHF20 后对细胞侵袭的影响;C. mRNA 水平和蛋白水平检测 PHF20 干扰效率 (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

图 2 PHF20 对乳腺癌细胞增殖和转移的影响

Fig 2 PHF20 promotes proliferation and metastasis of tumor cells

### 3 讨论

恶性肿瘤是全球人类健康的第一杀手,其中乳腺癌是女性排名第一的常见恶性肿瘤,2018 年全球约有 210 万新诊断的乳腺癌病例,约占女性癌症病例的四分之一,严重威胁着女性的身体健康。在过去的 10 年中,由于生活方式、肥胖、生殖因素和内分泌因素的影响,我国居民恶性肿瘤发病率发生了快速增长<sup>[9]</sup>。

PHF20 作为一个组蛋白修饰的识别蛋白在基因的表达调控过程中发挥重要作用。但是迄今为止 PHF20 在肿瘤中的作用还存在争议,这可能与肿瘤类型的差异相关。我们的实验结果显示,干扰 PHF20 的表达可以抑制乳腺癌细胞的增殖和转移,

并与体内多个促进肿瘤发生发展的复合物相互作用,如 PRC2 复合物和 KDM4A 等。PRC2 复合物主要包括 EZH2、SUZ12、EED 和 RbAp46/48,其中 EZH2 催化 H3K27 位点的二甲基化和三甲基化修饰。在哺乳动物中 PRC2 复合物通过参与细胞周期调控、上皮-间质转化和肿瘤发生等多个通路相关基因的转录抑制,进而在发育和肿瘤发生过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。研究表明 PRC2 通过抑制多个抑癌基因的表达促进多种肿瘤的发生,并且其表达水平与肿瘤的恶性程度显著正相关<sup>[11]</sup>。PHF20 与 PRC2 复合物的结合预示着 PHF20 可能作为重要的促癌因子在乳腺癌中扮演重要角色。后续我们将进一步检测 PHF20 是否作为 H3K27 甲基化的“reader”而



发挥作用。KDM4A(赖氨酸特异性去甲基化酶 4A)是 JmjC 去甲基化酶家族中的一员,可以催化去除组蛋白 H3K9 和 H3K36 的三甲基化和二甲基化。KDM4A 已被证实多种肿瘤中异常高表达,并且能够促进肿瘤的增殖和转移。KDM4A 也可以通过与多种转录因子结合,从而调控下游基因的表达<sup>[12]</sup>。我们的检测发现,PHF20 作为一个潜在的转录因子也可以结合 KDM4A,那么 PHF20 是否通过招募 KDM4A 来调控基因的转录或者 PHF20 是否是 H3K27/H3K36 甲基化的“reader”,是我们接下来的研究关注的重点。

在本研究中,我们观察到干扰 PHF20 的表达后,细胞增殖速度降低,细胞侵袭数目也有明显减少,说明 PHF20 在细胞增殖和侵袭过程中发挥重要作用。我们利用 TCGA 数据库及 GEPIA 数据库的数据进行分析,发现 PHF20 在乳腺癌等多种恶性肿瘤中高表达。分析已发表的临床数据也发现 PHF20 与 KDM4A 以及 EZH2 的表达水平正相关。生存期分析表明 PHF20 高表达的多种癌症患者生存期显著降低。上述研究结果结合我们分析 PHF20 相互作用蛋白网络,我们有理由相信 PHF20 在肿瘤发生发展中发挥着重要的作用,PHF20 招募 KDM4A 和 PRC2 复合物的具体分子机制有待于进一步研究,以期恶性恶性肿瘤的诊断和治疗提供新的靶标。

#### 参考文献:

- [1] Liu T, Zhang T, Zhou F, et al. Identification of genes and pathways potentially related to PHF20 by gene expression profile analysis of glioblastoma U87 cell line[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 87
- [2] Badeaux A I, Yang Y, Cardenas K, et al. Loss of the methyl lysine effector protein PHF20 impacts the expression of genes regulated by the lysine acetyltransferase MOF[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 429
- [3] Adams-Cioaba M A, Li Z, Tempel W, et al. Crystal structures of the Tudor domains of human PHF20 reveal novel structural variations on the Royal Family of proteins[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6): 859
- [4] Park S, Kim D, Dan H C, et al. Identification of Akt interaction protein PHF20/TZP that transcriptionally regulates p53[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(43): 22852
- [5] Pallasch C P, Struss A K, Munnia A, et al. Autoantibodies against GLEA2 and PHF3 in glioblastoma: tumor-associated autoantibodies correlated with prolonged survival[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(3): 456
- [6] Zhang T, Park K A, Li Y W, et al. PHF20 regulates NF- $\kappa$ B signalling by disrupting recruitment of PP2A to p65[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2062
- [7] Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Gene expression profiles of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(3): 567
- [8] Li Y W, Park J, Piao L Z, et al. PKB-mediated PHF20 phosphorylation on Ser291 is required for p53 function in DNA damage[J]. *Cell Signall*, 2013, 25(1): 74
- [9] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1
- [10] Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 343
- [11] Chase A, Cross N C. Aberrations of EZH2 in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2613
- [12] Guerra-Calderas L, Gonzalez-Barrios R, Herrera L A, et al. The role of the histone demethylase KDM4A in cancer[J]. *Cancer Genet*, 2015, 208(5): 215

(2019-03-12 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅