

文章编号 1006-8147(2021)04-0413-06

论著

NNMT 基因启动子双荧光素酶报告系统的构建及其与 SND1 靶向关系的验证

卢鑫^{1,2},任媛媛³,葛林³,杨洁³,何津岩⁴,付晓³

(1.天津医科大学基础医学院细胞生物学系,天津 300070;2.天津医科大学总医院检验科,天津 300052;3.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;4.天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系,天津 300070)

摘要 目的:构建尼克酰胺-N-甲基转移酶(NNMT)启动子区的双荧光素酶报告质粒并检测其活性,从而验证 SND1 蛋白对 NNMT 基因的调控作用。**方法**:根据 NNMT 基因启动子区上、下游-1 500 至+200 区间的序列设计引物,并以 HepG2 细胞提取的 RNA 逆转录得到 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到的 NNMT 启动子区片段经酶切后连接到双荧光素酶报告载体 GLuc-ONTM 启动子报告克隆中,得到 Gluc-NNMT 启动子重组质粒,分别与 pLVX-IRES-Puro-Flag-SND1 质粒和 pLVX-IRES-Puro-vector 质粒共同转染 HeLa 细胞,并检测启动子活性。然后用免疫共沉淀的方法验证 NNMT 蛋白是否与 SND1 蛋白之间存在相互作用。**结果**:重组质粒构建成功。双荧光素酶活性实验显示,共转染 Gluc-NNMT 启动子重组质粒和 pLVX-IRES-Puro-Flag-SND1 过表达质粒的实验组与对照组相比,NNMT 启动子区活性明显增强。结合免疫共沉淀实验结果,证明 NNMT 与 SND1 存在相互作用。**结论**:成功构建了 NNMT 启动子双荧光素酶报告质粒,SND1 对 NNMT 启动子活性有增强作用,SND1 与 NNMT 蛋白之间存在相互作用。

关键词 NNMT;SND1;双荧光素酶报告基因;免疫共沉淀;蛋白相互作用

中图分类号 Q784

文献标志码 A

Construction of NNMT promoter dual luciferase reporter system and verification of its targeting relationship with SND1

LU Xin^{1,2}, REN Yuan-yuan³, GE Lin³, YANG Jie³, HE Jin-yan⁴, FU Xiao³

(1.Department of Cellular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;2. Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China;3. Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;4. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To construct a dual luciferase reporter plasmid in the promoter region of Nicotinamide-N-methyltransferase (NNMT) and test its activity, so as to verify the regulatory effect of SND1 protein on the NNMT gene. **Methods:** Primers were designed according to the sequence from -1 500 to +200 in the upstream and downstream of the NNMT promoter region. PCR amplification was conducted using the cDNA obtained by reverse transcription of RNA extracted from HepG2 cells. The NNMT promoter fragment was ligated with GLuc-ONTM Promoter Reporter Vector after enzymatic digestion, and the Gluc-NNMT promoter recombinant plasmid was obtained. The recombinant plasmid was transfected into HeLa cells with pLVX-IRES-Puro-flag-SND1 plasmid and pLVX-IRES-Puro-vector plasmid, respectively, and promoter activity was detected. Then the interaction between NNMT protein and SND1 protein was verified by Co-immunoprecipitation. **Results:** The recombinant plasmid was constructed successfully. Dual luciferase activity experiments showed that co-transfection of Gluc-NNMT promoter recombinant plasmid and PLVX-IRES-Puro-flag-SND1 in the experimental group showed significantly increased promoter activity compared to control group. The results of Co-immunoprecipitation showed that NNMT and SND1 had an interaction. **Conclusion:** NNMT promoter double luciferase reporter plasmid is successfully constructed. SND1 enhances the activity of NNMT promoter, and there is an interaction between SND1 and NNMT protein.

Key words NNMT;SND1; dual luciferase reporter system; co-immunoprecipitation; protein interaction

尼克酰胺-N-甲基转移酶(NNMT)的主要功能

基金项目 国家自然科学基金(31501056);天津市教委科研计划项目(2019KJ171);天津市自然科学基金(18JCYBJC93800)

作者简介 卢鑫(1989-),男,主管技师,硕士在读,研究方向:细胞生物学;通信作者:付晓, E-mail: fuxiao@tmu.edu.cn。

是以 S-腺苷基甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到烟酰胺(NAM)上,生成 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)和甲基尼克酰胺(MNA)^[1]。其催化反应依赖于 NAD⁺的前体 NAM 和甲基供体 SAM。NNMT 在多种肿瘤组织中高表达^[2]。回顾性研究结果显示,NNMT

高表达是实体肿瘤患者预后不良的标志^[3]。在某些肿瘤如小细胞肺癌中,患者血清中 NNMT 的表达量随着肿瘤组织恶性度的进展而升高,故 NNMT 可以作为反映肿瘤恶性程度的早期指标^[4]。SND1 蛋白也称 Tudor-SN 或 p100 蛋白,在肿瘤细胞中高表达,被认为是一种肿瘤蛋白^[5-7],其作为一种经典的转录共激活因子^[8],可以通过增强肿瘤细胞增殖和迁移能力^[9-11],来促进肿瘤细胞的发生和发展。有最新的报道称,SND1 还可以通过参与调节肿瘤细胞免疫微环境^[12],来促进肿瘤细胞的免疫逃逸。通过分析本实验室前期实验数据和网络数据库,发现 NNMT 的表达量与 SND1 呈正相关。本研究旨在通过构建 NNMT 启动子双荧光素酶报告系统来验证 SND1 蛋白对 NNMT 基因转录活性的增强作用,以及利用免疫共沉淀的方法来探讨 SND1 蛋白与 NNMT 蛋白间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人宫颈癌细胞系 HeLa 来源于本实验传代培养;HeLa 来源的对照及敲除 SND1 基因的 HeLa KO 细胞由本实验室构建并保存;慢病毒包装质粒由天津医科大学石磊教授馈赠;无内毒素质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物小量回收试剂盒购于 Biomiga 公司;转染试剂 PEI 购于 Santa Cruz 公司;助转试剂聚凝胺 (Polybrene) 购于 Millipore 公司;RNA 提取试剂 (Trizol) 和逆转录试剂盒 (Revert aid 1st Cdna Synth Kit) 购于 ThermoFisher 公司;无核酸酶水 (DEPC 水) 购于碧云天公司;嘌呤霉素 (Puromycin) 购于 Gene Operation 公司;双荧光素酶检测试剂盒 (Secretate-PairTM Dual Luminescence Assay Kit) 购于 GeneCopoeia 公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇购于天津致远化学试剂公司;SND1 抗体为本实验室制备;NNMT 抗体购于 Proteintech 公司;SYBRGreen 购于 Roche 公司;凝胶成像仪 (GelDocTM XR⁺) 购于 Bio-Rad 公司;实时定量 PCR 仪 (StepOne Plus) 购于 Applied Biosystems 公司。Tanon 化学发光凝胶成像仪。

1.2 方法

1.2.1 基因相关性分析 NNMT 与 SND1 基因相关性分析,使用的是网络数据库 TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org>),数据来源于 TCGA 数据库。

1.2.2 细胞培养和转染 HeLa 细胞和 HepG2 细胞的培养使用高糖培养基 DMEM,加入 10% 的胎牛血清。置于 5% 二氧化碳的 37℃ 细胞培养箱中进行培养。使用 PEI 作为转染试剂,在转染前 4 h 换液,转染后 8 h 换液。

1.2.3 Gluc-NNMT 启动子重组质粒的构建与测序 使用 Trizol 裂解正常培养的 HepG2 细胞后分离提取得到 RNA,使用 Thermo 公司 RNA 逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,逆转录得到 HepG2 细胞的 cDNA。逆转录试剂盒反应体系为:RNA 5 μ g, Oligo(dT)Primer 1 μ L, 逆转录酶 1 μ L, RiboLock RNA 酶抑制剂 1 μ L, 5 \times Reaction Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, DEPC 水补至 20 μ L。根据 GLuc-ONTM 启动子报告克隆载体信息,上游引物酶切位点选择 SpeI: ACTAGT, 保护碱基为 CGG, 下游引物酶切位点 AgeI: ACCGGT, 保护碱基为 CCC。根据 NNMT 基因启动子区 -1 500 至 +200 区间的编码序列设计引物, 上游引物: 5'-CG-GACTAGTTTTTACATCCTACTAACAGTAGA-3', 下游引物: 5'-CCCACCGGTAGGAGAGCTGCTAAG-GCTGAAATGA-3'。目的基因 NNMT 启动子区的 PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min, 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 5 s, 72℃ 延伸 120 s, 34 个循环后, 72℃ 延伸 480 s。得到的 PCR 产物加入到 1% 的琼脂糖凝胶中, 180 V 电压电泳 25 min。结束后在凝胶成像仪下切下目的条带, 用琼脂糖凝胶 DNA/PCR 回收试剂盒回收目的条带。将回收的载体与 GLuc-ONTM 启动子报告克隆载体一并用 Spe I 和 Age I 进行双酶切, 在 PCR 仪中 37℃ 连接 30 min, 之后 65℃ 灭活 5 min。回收载体和片段酶切产物。回收的酶切载体和片段加入 T4 连接酶, 室温 25℃ 连接 1 h。之后转化连接产物, 将 50 μ L 感受态细胞 Trans1-T1 与 10 μ L PCR 产物混合, 轻柔混匀后置于冰上 30 min, 之后 42℃ 热激 60 s, 再置于冰上 2 min, 结束后, 加入 500 μ L LB 培养基, 放入摇床 37℃, 200 r/min, 摇 45 min。扩增后的菌液接种在加入氨苄青霉素和琼脂的选择培养基上, 37℃ 温箱中倒置过夜。第 2 天, 挑取已长出的单个菌落, 加入 500 μ L 含苄青霉素的 LB 培养基, 放入摇床 37℃, 200 r/min, 摇 4 h, 直至菌液浑浊。将菌液分成 2 份, 一份进行菌液 PCR, 条件同之前目的片段扩增, 若有阳性结果, 另一份菌液提取质粒后进行重组质粒双酶切鉴定和测序。

1.2.4 质粒瞬时转染 复苏 HeLa 野生型细胞和实验室之前已经构建好的 HeLa SND1 敲除细胞, 待细胞生长至对数期, 铺在 6 孔板中, 待细胞汇合度为 70% 时, 转染细胞, 转染前 2 h 换液。转染细胞分为实验组和对照组。实验组同时转染 pLVX-IRES-Puro-vector 与 Gluc-NNMT 启动子两种质粒各 1 μ g; 对照组同时转染 pLVX-IRES-Puro-Flag-SND1 与 Gluc-NNMT 启动子两种质粒各 1 μ g。

1.2.5 荧光素酶活性检测 实验组和对照组细胞转染 48 h 后,每孔取出细胞培养上清液 200 μL ,分成 2 份,每份 100 μL ,置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min,结束后置于冰上备用。将 Secretate-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 试剂盒中的 Buffer AP(10 \times)用蒸馏水稀释成 1 \times 的 Buffer AP 工作液,然后加入 Substrate AP 颠倒混匀后,室温避光孵育 10 min,此为 AP 混合液。向白色不透光的 96 孔板中加入 100 μL 加热后的细胞上清液,再加入 100 μL AP 混合液,室温避光 5 min 后,使用 Promega Glo Max 96 微孔板发光检测仪检测荧光素酶活性,每个孔重复检测 6 次,此为 Gluc 值。将 Secretate-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 试剂盒中的 Buffer GL-S(10 \times)用蒸馏水稀释成 1 \times 的 Buffer GL 工作液,然后加入 Substrate GL 颠倒混匀后,室温避光孵育 25 min,此为 GL 混合液。向白色不透光的 96 孔板中加入 100 μL 加热后的细胞上清液,再加入 100 μL GL 混合液,室温避光 1 min 后,使用 Promega Glo Max 96 微孔板发光检测仪检测荧光素酶活性,每个孔重复检测 6 次,此为 SEAP 值。Gluc 值与 SEAP 值的比值反映了样品荧光素酶的活性,即启动子的活性。

1.2.6 蛋白免疫印迹实验 SND1 蛋白的大小约为 130 kD,NNMT 蛋白的大小约为 30 kD,据此选择浓度为 8%的 SDS-PAGE 胶。待细胞汇合度为 80%时加入裂解液,裂解液为加入蛋白酶抑制剂(PIC,10 μg)的 RIPA。收集到的细胞进一步经过超声处理(强度 45%,超声 10 s,停 10 s,共计 1min),处理后的细胞 12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清,取 5 μL 蛋白上清,通过 BCA 法测蛋白浓度,其余的加入 5 \times Loading Buffer,混匀,置于 99 $^{\circ}\text{C}$ 金属恒温混匀仪中煮 10 min。将样品与蛋白质 Marker 依次加入到 SDS-PAGE 胶的样品孔中,开始分离蛋白样品,条件为 75 V 30 min,待蛋白质 Marker 完全分开后,将电压换成 120 V 60 min。之后用湿转的方法将蛋白转移到 0.45 μm PVDF 膜上,转膜条件为 85 V 1 h。用 5%的脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 4 h,之后敷育一抗过夜。第 2 天,用 1 \times PBST 室温洗涤 PVDF 膜 3 次,之后二抗敷育 2 h。ECL 化学发光试剂盒中的 A 液和 B 液按 1:1 的比例混合,与 PVDF 膜敷育 1 min 后,置于 Tanon 化学发光凝胶成像仪中拍摄。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 设计 QPCR 引物,NNMT 正向引物:5'-GTTTGTTCTAGGCACTCTGCAG-3',反向引物:5'-AGAGCCGATGTCAATCAGCAGG-3'。内参基因选择 GAPDH,正向引物:5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3',反向引物:5'-ACCAC-

CCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。HeLa 野生型细胞和实验室之前已经构建好的 HeLa SND1 基因敲除细胞系复苏后,用 Trizol 提取 RNA,然后用 Revert aid 1st Cdna Synth Kit 试剂盒逆转录 RNA 为 cDNA。此 cDNA 以 1:150 的比例稀释后做为模板。使用 20 μL 反应体系。分别加入 SYBR Green Mix 10 μL ,稀释后的模版 9 μL ,引物(F+R)1 μL 。反应条件为,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,之后扩增阶段,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,重复 45 个循环。溶解曲线阶段为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。最后,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法计算 mRNA 的相对表达量。

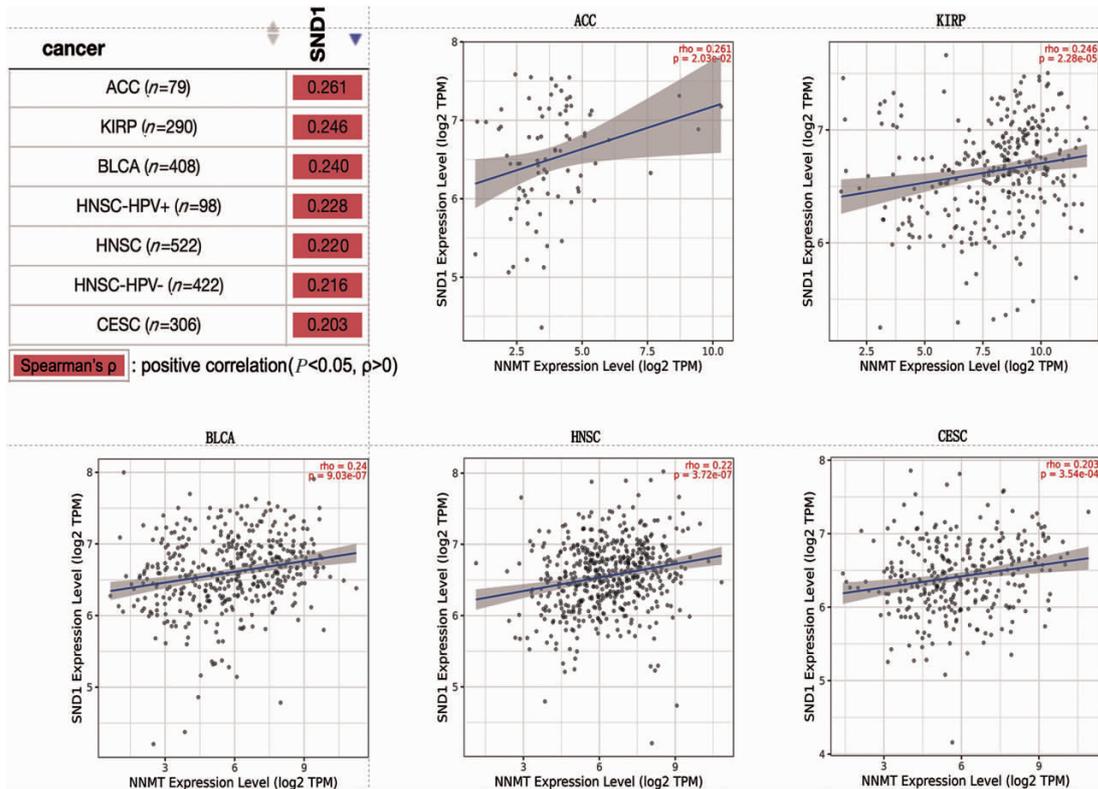
1.2.8 免疫共沉淀实验 抗体与 proteinA/Gbeads 敷育 IP 组加入 800 μL 冰 PBS,200 μL RIPA 裂解液、30 μL proteinA/Gbeads 和 2 μg SND1 抗体或 NNMT 抗体,IgG 组加入 800 μL 冰 PBS,200 μL RIPA 裂解液、30 μL proteinA/Gbeads 和 2 μg 同源的 IgG 抗体。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育 8 h,期间要不停颠倒混匀。细胞蛋白质的提取同前蛋白免疫印迹实验。提取的蛋白质分成 3 份,一份作为 Input,另外两份分别加入到已经孵育好的 Beads 中,每管的蛋白量约为 2 mg。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育过夜,期间要不停颠倒混匀。第 2 天,用预冷的 IP 洗液低温条件下洗涤 Beads 5 次。之后每管加入 40 μL 2.5 \times Loading Buffer,混匀后在金属恒温混匀仪上加热 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,12 000 r/min 10 min,取上清。之后进行蛋白免疫印迹实验,实验方法同前。

1.3 统计学处理 数据分析使用 SPSS 22.0 版本软件,实验组和对照组之间差异的比较采用两个独立样本 t 检验的方法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因相关性分析 通过检索 TIMER 数据库,发现在膀胱癌、宫颈癌、肾癌和头颈鳞状细胞癌中,NNMT 基因与 SND1 基因的表达量呈正相关,见图 1。

2.2 Gluc-NNMT 启动子重组质粒的构建与鉴定 以 HepG2 细胞提取的 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模版,根据 NNMT 基因启动子区-1 500~+200 区间的编码序列设计上游引物,扩增 NNMT 基因启动子,目的片段大小约为 2 500 bp,见图 2。切下目的条带,回收扩增的目的片段。将载体 Gluc-NNMT 启动子重组质粒和目的片段同时进行双酶切。将酶切后的片段和载体以 1:5 的质量比混合在一起,加入 T4 连接酶,室温连接 1 h。连接产物转化感受态细胞 Trans1-T1,放入摇床扩增。取部分扩增后的菌液进行菌液 PCR。菌液 PCR 设置阴性对照组(超纯水),阳性对照组(稀释的 NNMT 启动子区扩增产物)和菌液组(扩增的菌液)。结果显示在 2 500 bp 左右有特

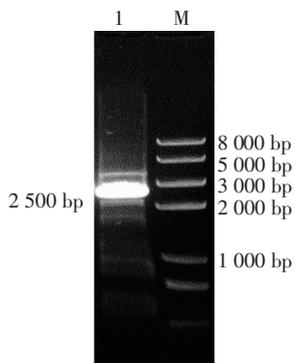


注:ACC:肾上腺皮质癌;KIRP:肾乳头状细胞癌;BLCA:膀胱尿路上皮癌;HNSC:头颈鳞状细胞癌;CESC:宫颈鳞状细胞癌

图 1 NNMT 与 SND1 表达量在多种肿瘤中的相关性

Fig 1 Correlation between expression of NNMT and SND1 in multi cancers

异的条带,见图 3。为了进一步进行验证,选取菌液 PCR 阳性的菌液样本继续扩增,提取质粒,然后与空载质粒一起进行双酶切和琼脂糖凝胶电泳,结果显示,菌液 PCR 阳性的质粒样本的结果中出现两条特异性条带,分别为 8 000 bp 和 2 500 bp,见图 4。



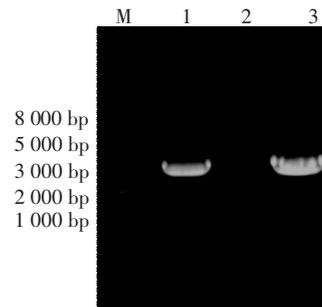
注:M:DNA marker;1:NNMT 基因启动子区片段扩增产物

图 2 PCR 扩增的人 NNMT 基因启动子区序列

Fig 2 Human NNMT gene promoter region sequence amplified by PCR

2.3 Gluc-NNMT 启动子荧光素酶活性检测 将过表达 pLVX-IRES-Puro-Flag-SND1 质粒和空载 pLVX-IRES-Puro-vector 质粒分别同 Gluc-NNMT 启动子质粒一起转染 HeLa 细胞,检测报告基因的转录活性。实验组启动子活性超过对照组的 2 倍,

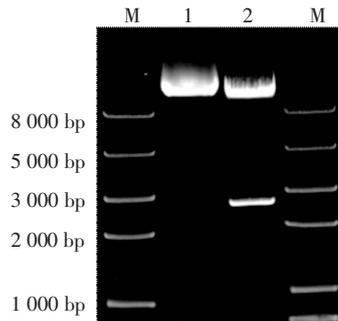
见图 5,差异具有统计学意义($t=2.595, P < 0.0001$)。



注:M:DNA marker;1:阳性对照组;2:阴性对照组;3:挑取的菌落

图 3 菌液 PCR 验证结果

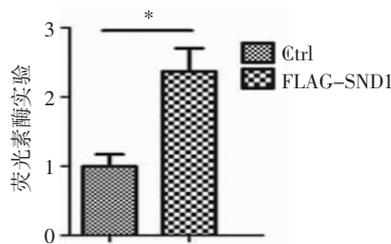
Fig 3 Results of bacterial PCR



注:M:DNA marker;1:空载质粒;2:菌液 PCR 阳性株扩增后提取的质粒

图 4 质粒双酶切验证结果

Fig 4 Results of plasmid double enzyme digestion

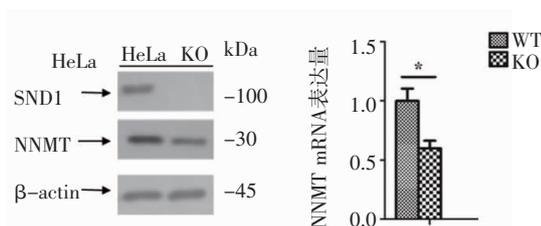


注: * $P < 0.05$

图5 人 NNMT 基因启动子活性测定

Fig 5 Human NNMT gene promoter activity assay

2.4 qPCR 和蛋白免疫印迹验证 SND1 对 NNMT 的转录调控作用 在 HeLa 野生型细胞和实验室预先构建好的 HeLa SND1 KO 细胞中, 分别用免疫印迹法和实时荧光 PCR 从蛋白水平和 mRNA 水平检测 NNMT 的表达水平。结果表明, 在 HeLa SND1 KO 细胞中 NNMT 的蛋白表达量和 mRNA 水平均低于 HeLa WT 细胞($t=5.856, P=0.0042$), 见图 6。



注: * $P < 0.05$

图6 HeLa WT 细胞和 HeLa SND1 基因敲除细胞中 NNMT 的表达情况

Fig 6 Expression of NNMT in HeLa WT cells and HeLa SND1 gene knock-out cells

2.5 免疫共沉淀实验 为了进一步研究 SND1 蛋白与 NNMT 的潜在相互作用, 分别用 SND1 抗体和 NNMT 抗体在野生型 HeLa 细胞的蛋白裂解液中富集蛋白复合物, 然后通过蛋白免疫印迹的方法去验证。结果显示, 生理状态下 SND1 可以与 NNMT 形成蛋白复合物, 见图 7。

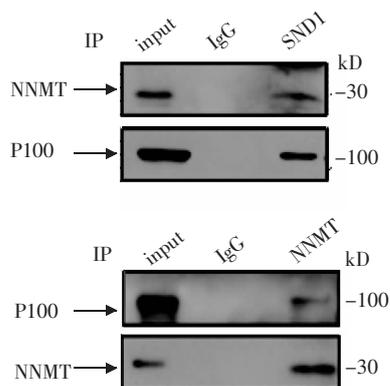


图7 SND1 与 NNMT 存在蛋白水平相互作用

Fig 7 Interaction between SND1 and NNMT in protein level

3 讨论

NNM 是近年利用基因芯片和蛋白组学技术比较不同癌组织和癌旁组织之间差异表达分子时筛选出的在肿瘤组织中异常表达的蛋白质酶。目前发现 NNMT 在多种肿瘤组织中异常高表达, 且与肿瘤细胞多种特征性的生物学功能密切相关。有报道称, 在卵巢癌中, NNMT 通过增加肿瘤细胞对葡萄糖剥夺的耐受性影响肿瘤细胞的增殖^[13], 并通过影响肿瘤细胞的上皮间充质转化(EMT)来影响肿瘤的迁移性^[14]。在乳腺癌中, NNMT 通过影响 SIRT1 的稳定性来增加肿瘤细胞对化疗的敏感性^[15]。在胃癌和肾癌中 NNMT 上调转化生长因子(TGF)- β 1 的表达促进了肿瘤细胞的上皮间充质转化^[16]。在肝癌中, NNMT 可以抑制 CD44 的降解, 进而促进肝癌迁移和侵袭^[17]。在皮肤鳞状细胞癌中, NNMT 可以通过促进基质金属蛋白酶 9 的表达来增强肿瘤细胞侵袭能力^[18]。NNMT 表达量随着肿瘤组织恶性度的进展而升高, 可以作为反映肿瘤恶性程度的早期指标。在免疫微环境中, NNMT 是肿瘤相关成纤维细胞(CAF)分化, 以及基质中肿瘤进展的核心调节因子, 有成为肿瘤治疗靶点的潜力^[14]。此外, 由于 NNMT 催化反应的原料 SAM 与产物 SAH 之间的相对量(SAM/SAH)常常被用来描述其他甲基转移酶的活性, 有人提出 NNMT 可能起到调节甲基供体库的作用^[19]。

SND1 蛋白是经典的转录共激活因子, 其最早被发现可以与 EB 病毒核抗原 2(EBNA2)和转录因子 TF II E 相结合, 促进其下游基因的转录活性^[8]。SND1 在肿瘤细胞中高表达, 被认为是一种肿瘤蛋白^[5-7]。在肝癌中 SND1 中被发现可以通过激活核因子(NF)- κ B 信号通路, 促进肝癌中新生血管的生成^[9], 在乳腺癌中 SND1 通过激活 TGF- β 1 促进乳腺癌 EMT 的发生、发展^[10]。在卵巢癌中, SND1 也可以通过调节钙黏蛋白开关从而影响卵巢肿瘤的上皮间充质转化^[11]。值得注意的是, SND1 在增值旺盛的细胞中高表达, 如肝脏、胰腺, 在终末分化的细胞表达量降低或不表达, 如心肌、骨骼肌、脑等。NNMT 的表达谱也有同样的分布趋势。在人胚胎干细胞中, 随着细胞分化水平的升高, DNA 甲基化水平也逐步升高, NNMT 的表达量逐渐下降, SND1 的表达水平也同样呈现出下降的趋势。这提示 SND1 很可能参与了 NNMT 介导的 SAM 缺失, 从而影响了细胞 DNA 及组蛋白的甲基化水平。

在本研究中, 笔者分析过表达 SND1 的宫颈癌细胞和野生型宫颈癌中 NNMT 基因表达差异以及分析网络数据库中的 SND1 和 NNMT 表达量间的

相关性发现, SND1 与 NNMT 的表达量之间呈一定程度的正相关。为了进一步验证, 笔者通过构建 Gluc-NNMT 启动子重组质粒, 并使用双荧光素酶活性检测的方法, 证明了 NNMT 与 SND1 基因之间存在相互作用, 并通过免疫印迹和实时定量 PCR 的方法验证了笔者的结论。并进一步利用免疫共沉淀的方法证明了 NNMT 与 SND1 之间存在相互作用。为进一步揭示 NNMT 在肿瘤细胞的发生、发展中的功能提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Aksoy S, Szumlanski C L, Weinshilboum R M. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(20): 14835
- [2] Pissios P. Nicotinamide N-methyltransferase: more than a vitamin B3 clearance enzyme[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(5): 340
- [3] Li S, Qiao L, Yang Z, et al. Prognostic value of nicotinamide N-methyltransferase expression in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1407
- [4] Sartini D, Morganti S, Guidi E, et al. Nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: promising results for targeted anti-cancer therapy[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(3): 865
- [5] Ochoa B, Chico Y, Martínez M J. Insights into SND1 oncogene promoter regulation[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 606
- [6] Jariwala N, Rajasekaran D, Mendoza R G, et al. Oncogenic role of SND1 in development and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(12): 3306
- [7] Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, et al. Role of the staphylococcal nuclease and Tudor domain containing 1 in oncogenesis (review)[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 465
- [8] Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(9): 4735
- [9] Yu L, Liu X, Cui K, et al. SND1 Acts downstream of TGFβ1 and upstream of smurf1 to promote breast cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1275
- [10] Yu L, Di Y, Xin L, et al. SND1 acts as a novel gene transcription activator recognizing the conserved Motif domains of Smad promoters, inducing TGFβ1 response and breast cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(27): 3903
- [11] Xin L, Zhao R, Lei J, et al. SND1 acts upstream of SLUG to regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in SKOV3 cells[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 3795
- [12] Wang Y, Wang X, Cui X, et al. Oncoprotein SND1 hijacks nascent MHC-I heavy chain to ER-associated degradation, leading to impaired CD8(+) T cell response in tumor[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(22): eaba5412
- [13] Kanska J, Aspúria P P, Taylor-Harding B, et al. Glucose deprivation elicits phenotypic plasticity via ZEB1-mediated expression of NNMT[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26200
- [14] Eckert M, Coscia F, Chryplewicz A, et al. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts[J]. *Nature*, 2019, 569(7758): 723
- [15] Wang Y, Zeng J, Wu W, et al. Nicotinamide N-methyltransferase enhances chemoresistance in breast cancer through SIRT1 protein stabilization[J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 64
- [16] Liang L, Zeng M, Pan H, et al. Nicotinamide N-methyltransferase promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by activating transforming growth factor-β1 expression [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4592
- [17] Li J, You S, Zhang S, et al. Elevated N-methyltransferase expression induced by hepatic stellate cells contributes to the metastasis of hepatocellular carcinoma via regulation of the CD44v3 isoform[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(9): 1993
- [18] Hah Y S, Cho H Y, Jo S Y, et al. Nicotinamide N-methyltransferase induces the proliferation and invasion of squamous cell carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(5): 1805
- [19] Ulanovskaya O A, Zuhl A M, Cravatt B F. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink[J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(5): 300

(2020-11-24 收稿)