

# 携带人MST4或人dnMST4转基因的肺癌细胞株构建

韩留鑫<sup>1\*</sup>, 夏加伟<sup>1\*</sup>, 李云珍<sup>1</sup>, 朱江春<sup>1</sup>, 沈含章<sup>1</sup>, 周玮莎<sup>1</sup>, 赵文淘<sup>2#</sup>, 李静<sup>3</sup>, 肖东<sup>3</sup>

<sup>1</sup>昆明市第三人民医院(云南省传染病临床医学中心, 大理大学第六附属医院), 重症医学科, 血液净化中心, 云南 昆明

<sup>2</sup>昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院, 云南省癌症中心), 消化肿瘤内科, 云南 昆明

<sup>3</sup>南方医科大学肿瘤研究所, 广东 广州

收稿日期: 2022年12月7日; 录用日期: 2023年1月2日; 发布日期: 2023年1月10日

## 摘要

目的: 利用慢病毒感染分别建立稳定过表达MST4和dnMST4的人肺癌细胞株。方法: 分别以pcDNA3.1-MST4、pcDNA3.1-MST4 T178A质粒为模板, PCR分别扩增MST4、MST4 T178A序列(均为1.251 kb), 片段两侧分别添加EcoR I/BamH I和Xba I/BamH I酶切位点, 分别In-Fusion克隆至pCDH-RFP和pHEZG中, 次日挑选单克隆菌落, 提取质粒并进行测序和酶切鉴定; 所构建的载体分别命名为pCDH-MST4-RFP和pHEZG-dnMST4。按标准程序进行慢病毒包装, 并确认是否成功生产慢病毒; 用携带MST4和RFP基因的慢病毒分别感染人肺癌细胞A549和HCC827, 用携带dnMST4和GFP基因的慢病毒分别感染人肺癌细胞A549和HCC827, 以建立稳定过表达MST4和dnMST4的人肺癌细胞系。应用qRT-PCR和Western blot检测所建立肺癌细胞系中MST4和dnMST4在RNA层面和蛋白层面的表达水平。结果: 测序和酶切鉴定的结果均证实成功构建了pCDH-MST4-RFP和pHEZG-dnMST4, 按标准程序生产的携带MST4和RFP基因以及携带dnMST4和GFP基因的慢病毒均能成功感染人肺癌细胞。结论: 成功构建稳定过表达MST4或dnMST4的人肺癌细胞株, 为进一步研究MST4在肺癌恶性进程中的生物学功能及机制打下了良好基础。

## 关键词

MST4, dnMST4, 慢病毒载体, 肺癌

# Construction of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Lines Stably Overexpressing MST4 or dnMST4 Transgenes

\*第一作者: 韩留鑫, 夏加伟。

#通讯作者: 赵文淘。

Liuxin Han<sup>1\*</sup>, Jiawei Xia<sup>1\*</sup>, Yunzhen Li<sup>1</sup>, Jiangchun Zhu<sup>1</sup>, Hanzhang Shen<sup>1</sup>, Weisha Zhou<sup>1</sup>, Wentao Zhao<sup>2#</sup>, Jing Li<sup>3</sup>, Dong Xiao<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, Blood Purification Centre, The Third People's Hospital of Kunming (Yunnan Infectious Diseases Clinical Medical Center, The Sixth Affiliated Hospital of Dali University), Kunming Yunnan

<sup>2</sup>Department of Gastrointestinal Oncology, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Yunnan Cancer Hospital, Yunnan Cancer Center), Kunming Yunnan

<sup>3</sup>Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

Received: Dec. 7<sup>th</sup>, 2022; accepted: Jan. 2<sup>nd</sup>, 2023; published: Jan. 10<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** To establish non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines stably overexpressing MST4 and dnMST4 Transgenes by lentivirus infection, respectively. **Methods:** The fragment of human MST4 gene was amplified by PCR from the template of pcDNA3.1-MST4, and subsequently cloned into the plasmid of pCDH-RFP to obtain the final vector of pCDH-MST4-RFP, which was used to produce lentiviruses carrying MST4 and RFP genes. The fragment of human dnMST4 gene was also amplified by PCR from the template of pcDNA3.1-MST4 T178A, and subsequently cloned into the plasmid of pHEZG to obtain the final vector of pHEZG-dnMST4, which was used to produce lentiviruses carrying dnMST4 and GFP genes. To establish human NSCLC cell lines stably overexpressing MST4 or dnMST4, lentiviruses harboring MST4 and RFP genes were employed to infect A549 and HCC827 cells, and lentiviruses harboring dnMST4 and GFP genes were also employed to infect A549 and HCC827 cells. The expression levels of MST4 and dnMST4 in the infected lung cancer cell lines at RNA and protein levels were detected by Western blot and qRT-PCR. **Results:** The lentivirus vector of pCDH-MST4-RFP and pHEZG-dnMST4 were successfully constructed. NSCLC cell lines A549 and HCC827 harboring MST4 and RFP transgenes were generated showing the expression of both MST4 and RFP transgenes. And the cell lines harboring dnMST4 and GFP transgenes were also generated showing the expression of both dnMST4 and GFP transgenes. **Conclusion:** NSCLC cell lines A549 and HCC827 stably expressing MST4 and dnMST4 transgenes were generated, which had laid a great foundation for further research on the biological function and mechanism of MST4 in the malignant process of lung cancer.

## Keywords

MST4, dnMST4, Lentivirus Vector, Lung Cancer

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

肺癌是目前发病率和死亡率最高、对人类生命健康威胁最大的肿瘤, 国家癌症中心在 2022 年 3 月最新发布的中国肿瘤现状和趋势报道中显示, 肺癌的发病率在男性居首位, 在女性居第二位, 而肺癌的死亡率在男性和女性均居首位, 在城市和农村肺癌的死亡率均居首位[1]。可见, 肺癌是严重威胁我国人民生命健康的首位疾病。虽然靶向治疗、免疫治疗新药在肺癌治疗中取得了一些临床进展, 但是目前报道的肺癌五年生存率仍低于 15% [2]。肺癌容易发生侵袭转移是造成患者死亡率高、预后差的主要原因[3],

我们前期的预实验结果提示 MST4 可能在抑制肺癌细胞上皮-间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)和侵袭转移过程中发挥重要作用。因此,我们拟分别建立稳定过表达人 MST4 和人 MST4 基因的显性负性突变体(Dominant negative mutant MST4, dnMST4)的肺癌细胞株,为下一步研究 MST4 在肺癌恶性进程中的生物学作用及机制打下良好基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与试剂

#### 2.1.1. 载体

空载过表达质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP (简称为 pCDH-RFP 或 pLV-con1) 购自 System Biosciences (SBI) 公司; 空载过表达质粒 pHAGE-fullEF1a-MCS-IzGreen (简称为 pHEZG 或 pLV-con2) 由 Jeng-Shin Lee 教授惠赠; 模板质粒 pCDNA3.1-MST4 和 pCDNA3.1-MST4 T178A 由 Hans Clevers 教授赠予; psPAX2 和 pMD2.G 慢病毒包装质粒由日内瓦大学 Didier Trono 博士赠予。

#### 2.1.2. 主要试剂

高保真 TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xba* I、*EcoR* I 和 *Bam*H I、dNTP、平末端磷酸化连接(BKL) 试剂盒、DNA 连接试剂盒和胶回收试剂盒、去磷酸化(BAP)试剂盒、裂解液 Trizol 和荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 脂质体转染剂 Lipofectamine2000、细胞培养用 RPMI 1640 培养基、细胞培养用胰蛋白酶、OptiMEM<sup>®</sup>I Medium 和 DMSO 均购自美国 Invitrogen 公司, 细胞培养瓶和培养板购自美国 Corning 公司, 细胞培养用胎牛血清购自德国 PAA 公司, 逆转录试剂盒购自 Bio-Rad 公司, 八连管购自 AXYGEM 公司, 0.45um PVDF 膜购自 Millipore 公司, SDS 蛋白上样缓冲液购自杭州弗德生物, RIPA 蛋白裂解液购自美国 Thermo Fisher 公司, 蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光试剂购自凯基生物公司, BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天公司, 蛋白分子 Marker 购自 Fermentas 公司, MST4 一抗(ab52491)和兔二抗(ab7090)均购自英国 Abcam 公司, 其他科研试剂为国产或进口化学纯或分析纯。

#### 2.1.3. 细胞

293FT 细胞培养方法参见文献[4], 人肺癌细胞 A549 和 HCC827 细胞培养基为含有 10%胎牛血清的 1640 培养基。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 携带人 MST4 和 RFP 基因的慢病毒表达载体 pCDH-MST4-RFP 的构建

以 pcDNA3.1-MST4 质粒为模板, 设计引物, PCR 扩增 MST4 片段(1.251kb) (5'→3'), In-Fusion 克隆至利用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切的 pCDH-RFP 中(保留 *EcoR* I 和 *Bam*H I 的酶切位点), MST4 正向插入方向: 插入片段的起始密码靠近 *EcoR* I 位点, 终止密码靠近 *Bam*H I 位点。次日挑选单克隆菌落, 质粒提取并进一步行测序和酶切鉴定, 鉴定正确的载体命名为 pCDH-MST4-RFP。

### 2.2.2. 携带人 MST4 基因的显性负性突变体 dnMST4 (Dominant Negative MST4)和 GFP 基因的慢病毒表达载体 pHEZG-dnMST4 的构建

以 pcDNA3.1-MST4 T178A 质粒为模板, 设计引物, PCR 扩增 MST4 T178A 片段(1251bp) (5'→3'), In-Fusion 克隆至利用 *Xba* I/*Bam*H I 双酶切的 pHEZG 中(保留 *Xba* I 和 *Bam*H I 的酶切位点), MST4 T178A 正向插入方向: 插入片段的起始密码靠近 *Xba* I 位点, 终止密码靠近 *Bam*H I 位点。次日挑选单克隆菌落,

质粒提取并进一步行测序和酶切鉴定, 鉴定正确的载体命名为 pHEZG-dnMST4。

### 2.2.3. 制备携带 MST4 和 RFP 基因的慢病毒

慢病毒的具体包装步骤参见文献[3]。借助 Lipofectamine™2000 将病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 和慢病毒载体 pCDH-MST4-RFP 共转染入 293FT 细胞, 转染后 48~72 h, 借助倒置荧光显微镜观察到细胞发出红色荧光, 说明细胞已成功表达 RFP 蛋白, 确认转染成功后, 3000~4000 r/min 离心 15 min 以丢弃细胞碎片, 将病毒上清收集于 EP 管中备用。

### 2.2.4. 制备携带 dnMST4 和 GFP 基因的慢病毒

操作方法如前述, 借助 Lipofectamine™2000 将病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 和慢病毒载体 pHEZG-dnMST4 共转染入 293FT 细胞, 转染后 48~72 h, 借助倒置荧光显微镜观察到细胞发出绿色荧光, 说明细胞已成功表达 GFP 蛋白, 确认转染成功后, 3000~4000 r/min 离心 15 min 以丢弃细胞碎片, 将病毒上清收集于 EP 管中备用。

### 2.2.5. 确认病毒成功包装并用慢病毒感染肿瘤细胞以建立稳定过表达 MST4 或 dnMST4 的肺癌细胞株

将携带 RFP 或 MST4-RFP 的病毒上清分别加入内含 A549 或 HCC827 细胞的细胞培养皿内, 感染 6~12 h 后, 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基替换感染液, 慢病毒感染细胞后 24~48 h, 在倒置荧光显微镜下观察红色荧光情况。同时将携带 HEZG 或 HEZG-dnMST4 的病毒上清分别加入内含 A549 或 HCC827 细胞的细胞培养皿内, 感染 6~12 h 后, 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基替换感染液, 慢病毒感染细胞后 24~48 h, 在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光情况。

### 2.2.6. 荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测所建立的肺癌细胞株中 MST4 或 dnMST4 转基因的表达

dnMST4 转基因是 MST4 基因的显性负性突变体(突变型蛋白和相关蛋白形成无功能二聚体), 它可以抑制野生型 MST4 蛋白的功能; 即 dnMST4 的作用仅在于使 MST4 的编码蛋白在有机体内丧失功能, 产生无功能蛋白的蓄积, 而不能使 MST4 在有机体内被敲除。qRT-PCR 检测转基因 dnMST4 和 MST4 表达所用引物是相同的, 引物序列如表 1 所示, GAPDH 为内参, 引物序列如表 1 所示; 提取所建立的稳定细胞株总 RNA, 逆转录为 cDNA, 采用 SYBR 方法检测肺癌细胞株中 dnMST4 和 MST4 的表达水平。

**Table 1.** Primers for qRT-PCR analysis of human MST4 and GAPDH expression

**表 1.** qRT-PCR 检测肺癌细胞株中 MST4 和 GAPDH 表达水平所用引物

引物名称	引物序列
MST4-forward primer	TAACCGTACCCAGCAAGTCG
MST4-reverse primer	AGATCCAGTGCTGAACCACC
GAPDH-forward primer	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA
GAPDH-reverse primer	GTCATGGATGACCTTGCCAGG

### 2.2.7. Western Blot 检测所建立的肺癌细胞株中 dnMST4 或 MST4 转基因表达

取对数生长期的细胞, PBS 洗 2 次以充分去除细胞培养基, 加入适量 RIPA 裂解液并分别收集于 EP 管中, 冰上震荡裂解 30 min, 4℃条件下 14,000 rpm 离心 20 分钟, 收集上清, 用蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。将检测浓度后的蛋白样品调整为同样浓度后 95℃煮 5 min 变性。对于每个蛋白样品, 每孔分别上样 50 μg 后在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离蛋白, 然后通过湿转法将目的蛋白转到活化后的 PVDF 膜上。将膜用 1×TBST 配制的 5% BSA 室温封闭 2 h, 通过 marker 标尺条带, 截取适合目的蛋白分子量的膜并做好相应标记, 在 4℃环境下孵育一抗(>15 h), 目的蛋白 MST4 的一抗孵育浓度为

1:2000。兔二抗(1:10,000 浓度)在室温孵育 1 h。将孵育二抗后的 PVDF 膜用  $1 \times$  TBST 洗涤 3 次。最后, 通过增强型化学发光液 ECL 曝光检测到目的蛋白的印迹。

### 2.3. 统计学方法

统计分析均采用 SPSS 22.0 软件进行, 两独立样本间的比较采用两独立样本  $t$  检验。两独立样本  $t$  检验的假设  $H_0$  为两样本的总体均值相等,  $H_1$  为两样本的总体均值不等, 若  $P < 0.05$ , 则拒绝假设  $H_0$ , 接受  $H_1$ , 认为两独立样本总体均值的 95% 可信区间不相等, 两样本之间的差异具有统计学意义。

## 3. 结果

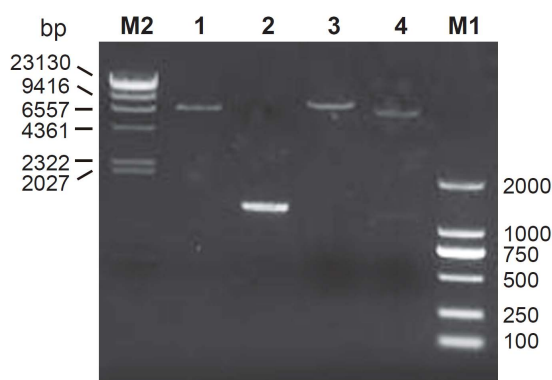
### 3.1. 慢病毒载体 pCDH-MST4-RFP 和 pHEZG-dnMST4 的构建及鉴定

#### 3.1.1. pCDH-MST4-RFP 和 pHEZG-dnMST4 的构建

按照“方法”中所提及的具体步骤成功构建了携带 MST4 或 dnMST4 的慢病毒载体, 并将载体分别命名为 pCDH-MST4-RFP 和 pHEZG-dnMST4。

#### 3.1.2. pCDH-MST4-RFP 测序和酶切鉴定

取  $1 \mu\text{l}$  前述连接用空载表达质粒 pCDH-RFP 产物进行电泳, 可见一条带大小与理论预测值 7.484 kb 相符(图 1, Lane 1)。取  $5 \mu\text{l}$  前述 PCR 扩增制备的 MST4 的 PCR 产物进行电泳, 可见一条带大小与理论预测值 1.251 kb 相符(图 1, Lane 2)。获得连接用 Vector DNA 和 Insert DNA 后, 将二者进行连接反应, 然后取上述产物进行质粒转化, 次日随机挑选单克隆菌落摇菌, 提取质粒 DNA 进一步行测序和酶切鉴定。经测序结果确认基因片段长度为 1.251 kb 的 MST4 的插入片段序列与原始序列一致(结果未提供)。应用 *Bam*H I 将 pCDH-MST4-RFP 单酶切后电泳, 可以见到一个条带, 长度与理论预测值 8.725 kb 相符(图 1, Lane 3), 应用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 将 pCDH-MST4-RFP 双酶切后电泳, 可以见到两个条带, 其长度与理论预测值 7.474 kb 和 1.251 kb 相符(图 1, Lane 4)。以上实验结果表明 pCDH-MST4-RFP 构建成功。



M1: DL 2000 (TaKaRa); M2:  $\lambda$ -Hind III digest (TaKaRa); Lane 1: pCDH-RFP Vector DNA; Lane 2: MST4 Insert DNA; Lane 3: pCDH-MST4-RFP digested by *Bam*H I; Lane 4: pCDH-MST4-RFP digested by *Bam*H I and *Eco*R I.

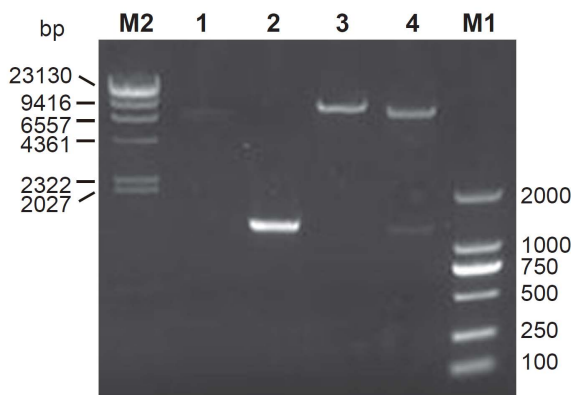
**Figure 1.** Enzyme digestion identification of pCDH-MST4-RFP

**图 1.** pCDH-MST4-RFP 载体酶切鉴定

#### 3.1.3. pHEZG-dnMST4 测序和酶切鉴定

取  $1 \mu\text{l}$  前述连接用空载表达质粒 pHEZG 产物进行电泳, 可见一条带大小与理论预测值 8.346 kb 相符(图 2, Lane 1)。取  $5 \mu\text{l}$  前述 PCR 扩增制备的 MST4 T178A 的 PCR 产物进行电泳, 可见一条带大小与

理论预测值 1.251 kb 相符(图 2, Lane 2)。获得连接用 Vector DNA 和 Insert DNA 后, 将二者进行连接反应, 然后取上述产物进行质粒转化, 次日随机挑选单克隆菌落摇菌, 提取质粒 DNA 进一步行测序和酶切鉴定。经测序结果确认基因片段长度为 1.251 kb 的 MST4 T178A 的插入片段序列与原始序列一致(结果未提供)。应用 *Bam*H I 将 pHEZG-dnMST4 单酶切后电泳, 可以见到一个条带, 长度与理论预测值 9.597 kb 相符(图 2, Lane 3), 应用 *Bam*H I 和 *Xba* I 将 pHEZG-dnMST4 双酶切后电泳, 可以见到两个条带, 其长度与理论预测值 8.346 kb 和 1.251 kb 相符(图 2, Lane 4)。以上实验结果表明 pHEZG-dnMST4 构建成功。



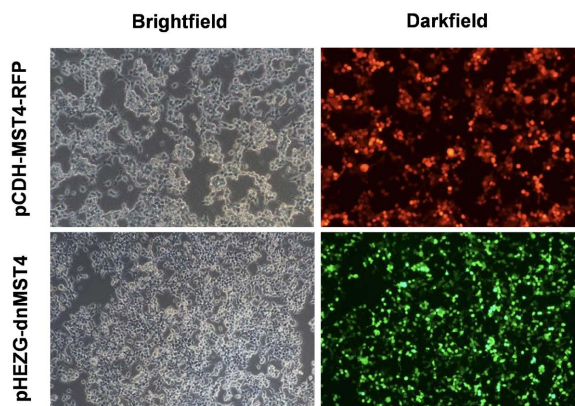
M1: DL 2000 (TaKaRa); M2:  $\lambda$ -Hind III digest (TaKaRa); Lane 1: pHEZG Vector DNA; Lane 2: dnMST4 Insert DNA; Lane 3: pHEZG-dnMST4 digested by *Bam*H I; Lane 4: pHEZG-dnMST4 digested by *Xba* I and *Bam*H I.

**Figure 2.** Enzyme digestion identification of pHEZG-dnMST4

**图 2.** pHEZG-dnMST4 载体酶切鉴定

### 3.2. 携带 MST4 和 RFP 基因的慢病毒包装以及携带 dnMST4 和 GFP 基因的慢病毒包装

将病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 与 pCDH-MST4-RFP 质粒共转染 293FT 细胞, 转染 48 h 后在倒置荧光显微镜下可以观察到红色荧光, 证明转染成功(图 3)。将病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 与 pHEZG-dnMST4 质粒共转染 293FT 细胞, 转染 48 h 后在倒置荧光显微镜下可以观察到绿色荧光, 证明转染成功(图 3)。

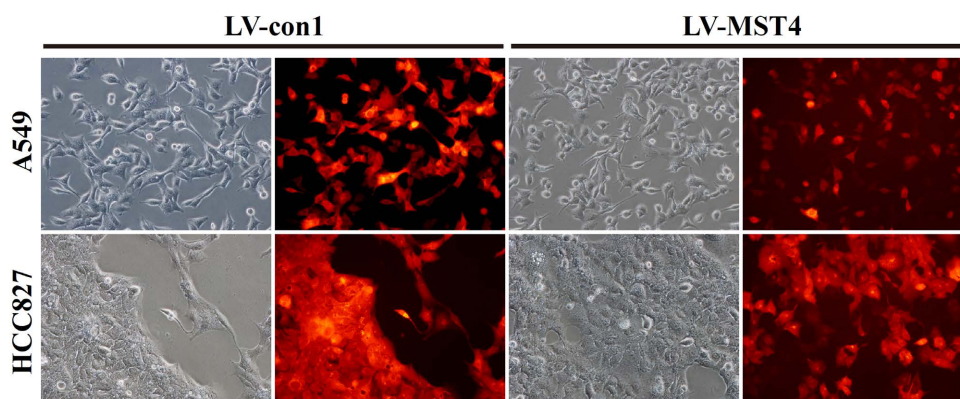


**Figure 3.** 293FT cells were transiently transfected with pCDH-MST4-RFP and pHEZG-dnMST4, respectively (virus package) ( $\times 100$ )

**图 3.** pCDH-MST4-RFP 和 pHEZG-dnMST4 分别瞬时转染 293FT 细胞(病毒包装) ( $\times 100$ )

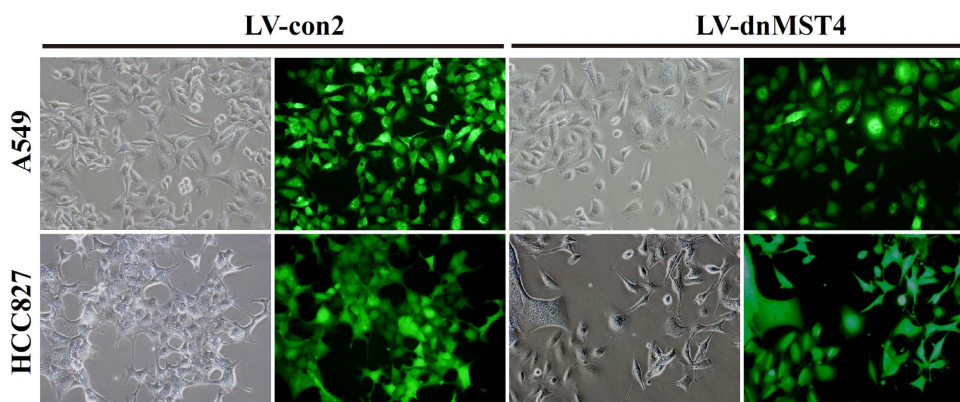
### 3.3. 应用慢病毒感染人肺癌细胞

按“材料与方法”部分的具体实验步骤,用携带 MST4 和 RFP 基因的慢病毒分别感染人肺癌细胞 A549 和 HCC827,感染后 48 h 可在倒置荧光显微镜下观察到细胞内的红色荧光,目的细胞被慢病毒成功感染,同时也说明经慢病毒感染的肺癌细胞已成功表达 RFP 蛋白(图 4)。用携带 dnMST4 和 GFP 基因的慢病毒分别感染人肺癌细胞 A549 和 HCC827,感染后 48 h 可在倒置荧光显微镜下观察到细胞内的绿色荧光,目的细胞被慢病毒成功感染,同时也说明经慢病毒感染的肺癌细胞已成功表达 GFP 蛋白(图 5)。



**Figure 4.** A549 and HCC827 cells were successfully infected by lentivirus carrying MST4 and RFP genes ( $\times 200$ )

**图 4.** 携带 MST4 和 RFP 的慢病毒感染肺腺癌细胞株( $\times 200$ )



**Figure 5.** A549 and HCC827 cells were successfully infected by lentivirus carrying dnMST4 and GFP genes ( $\times 200$ )

**图 5.** 携带 dnMST4 和 GFP 的慢病毒感染肺腺癌细胞株( $\times 200$ )

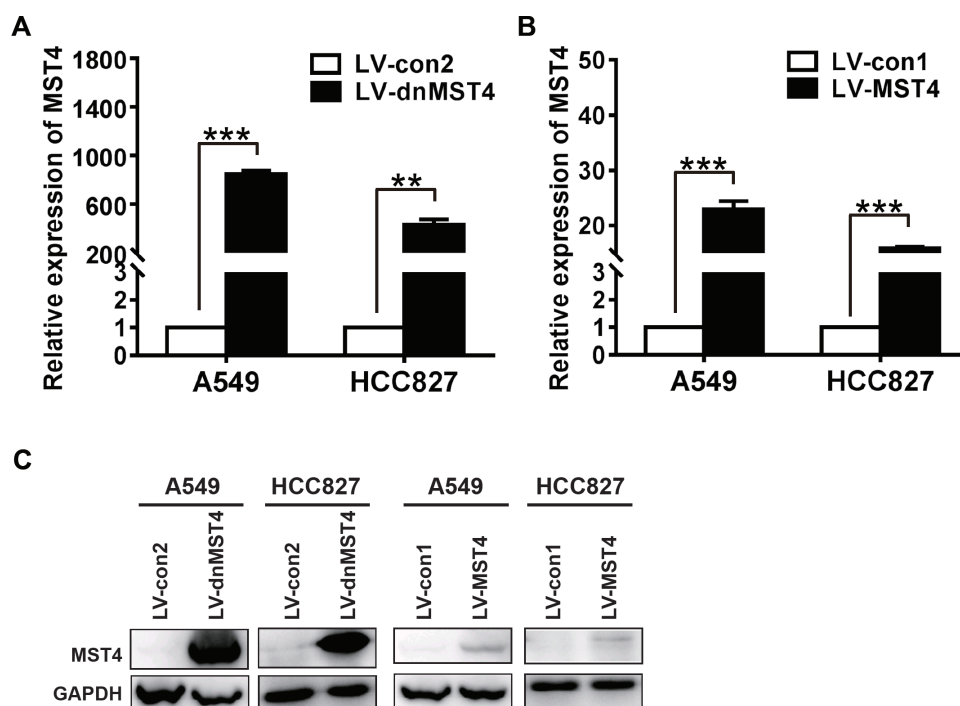
### 3.4. qRT-PCR 和 Western Blot 检测所建立的人肺癌细胞株中 MST4 或 dnMST4 在 RNA 层面和蛋白层面的表达水平

检测结果显示,人肺癌细胞 A549 和 HCC827 中 MST4 和 dnMST4 表达水平在 RNA 水平和蛋白水平均明显升高,说明成功建立了稳定过表达 MST4 和稳定过表达 dnMST4 的人肺癌细胞株(图 6)。

## 4. 讨论

慢病毒属于逆转录病毒的一种,可以高效感染处于分裂期和非分裂期的细胞;借助慢病毒感染可将

其携带的外源基因高效整合进宿主细胞基因组中, 外源基因可在细胞内长期稳定表达, 这些优势是其它病毒介导的外源基因传递系统无可比拟的[5]。



A: qRT-PCR 检测稳定携带 dnMST4 转基因的 A549 和 HCC827 细胞株中 MST4 mRNA 水平; B: qRT-PCR 检测稳定携带 MST4 转基因的 A549 和 HCC827 细胞株中 MST4 mRNA 水平; C: Western blot 检测稳定携带 MST4 或 dnMST4 的 A549 和 HCC827 细胞株中 MST4 蛋白表达。\*\*\*:  $P < 0.0001$ 。

**Figure 6.** Detection of dnMST4 and MST4 expression in A549 and HCC827 cells after infected by lentivirus, respectively

**图 6.** 稳定携带 MST4 或 dnMST4 的肺腺癌细胞株中 MST4 表达水平

在本研究中我们构建了 MST4 基因的显性负性突变体 dnMST4, 进而抑制野生型 MST4 蛋白的功能。显性负性突变体基因与野生型基因相比, 其编码的蛋白质结构域或模体发生了变化, 进而通过异常的二聚体或竞争性抑制改变野生型基因的功能。有研究表明, 突变型 p53 蛋白能通过显性抑制效应抑制野生型 p53 蛋白的功能, 所产生的效应即表现为显性负面效应(Dominant-negative effect), 这种显性负面效应是指基因发生突变时, 其会导致基因产物反向影响相同细胞中野生型的基因产物功能[6]。有研究表明, 通过基因的显性负性突变体来抑制内源性该基因的活性, 是最特异的基因活性抑制方式[7]。该研究中, 我们在探究 MST4 基因功能时没有采用基因敲除的技术, 而是采用显性失活突变技术, 构建了 MST4 的显性负性突变体 dnMST4, 通过慢病毒感染的方式建立了稳定过表达 MST4 或 dnMST4 的人肺癌细胞株, 意在从 MST4 基因功能获得和基因功能缺失两个方面来全面阐明 MST4 在肺癌细胞中的生物学功能。

磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 MST4 (Serine/threonine protein kinase MST4, mammalian Ste20-like protein kinase 4)基因定位于人类染色体 Xq26, 该基因编码的 MST4 蛋白全长 416 个氨基酸, 包含一个 N 端激酶结构域和一个 C 端调节结构域[8] [9]; MST4 在人类组织中普遍性表达, 其中在胎盘、胸腺和外周血白细胞中高表达, 在脑、心、肺、肝、肌肉和肾脏中等量表达, 在骨骼肌和胰腺低表达; MST4 蛋白属于 Ste20 激酶 GCKIII 亚家族, 其在细胞增殖[10] [11]、细胞凋亡[12]、天然免疫[13]、细胞代谢[14]、



细胞生长和转化[15]、EMT 和转移[16]等过程中发挥重要作用。

我们课题组成员前期在肝癌上的研究显示, MST4 在过表达 miR-122 诱导发生间充质 - 上皮转化 (Mesenchymal-epithelial transition, MET) 的肝癌细胞中表达升高, 发生 MET 的肝癌细胞迁移能力下降[17]。然而 MST4 在 EMT 和肺癌侵袭转移中的作用未见报道。我们前期的预实验结果提示 MST4 可能在肺癌 EMT 和侵袭转移过程中发挥抑制作用。因此, 构建携带人 MST4 和人 dnMST4 转基因的肺癌细胞株就为后续从基因功能获得和缺失两个方面深入探究 MST4 在肺癌 EMT 和侵袭转移过程中的作用打下了良好的研究基础。

蛋白激酶是一种催化蛋白质磷酸化过程的酶, 其通过磷酸化调节蛋白质的活性, 从而参与了包括肿瘤恶性进程、炎症、自身免疫病、神经性疾病等在内的多种病理生理过程[18]。蛋白激酶已成为 21 世纪最重要的药物靶点之一, 全世界高达 20%~33% 的药物发现都和蛋白激酶超家族相关, 截止 2022 年有 68 种 FDA 批准的治疗药物以大约 24 种不同的蛋白激酶为靶点, 其中有 58 种药物用于肿瘤治疗[19]。目前临床上很多抗肿瘤靶向药物均为蛋白激酶抑制剂, 如肺癌的靶向治疗药物受体酪氨酸激酶抑制剂(吉非替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿法替尼、AZD9291 和 CO-1686), 治疗慢性髓性白血病和恶性胃肠道间质瘤的酪氨酸激酶抑制剂(伊马替尼、达沙替尼)等。MST4 作为一种蛋白激酶, 具备作为靶向药物作用靶点的潜质。然而, MST4 作为一种被新近发现的蛋白激酶, 其在肺癌中的生物学功能及作用目前未见任何报道, 因此构建稳定过表达人 MST4 和人 dnMST4 转基因的肺癌细胞株, 对于进一步研究 MST4 在肺癌恶性进程中的生物学功能及机制具有重要意义。

## 基金项目

云南省科技厅地方高校联合专项(202001BA070001-043、202001BA070001-063); 国家自然科学基金(82060425); 云南省科技厅基础研究专项(202201AT070044)。

## 参考文献

- [1] Zheng, R.S., Zhang, S.W., Zeng, H.M., *et al.* (2022) Cancer Incidence and Mortality in China, 2016. *Journal of the National Cancer Center*, **2**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.02.002>
- [2] Yang, T., Xiong, Y., Zeng, Y., *et al.* (2022) Current Status of Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 989461. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.989461>
- [3] 张文谦, 李辉. 肺癌侵袭及转移机制的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(3): 198-201.
- [4] 贾俊双, 孙妍, 肖东, 等. 慢病毒介导的外源基因体外投递系统的建立[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(10): 1028-1029.
- [5] 赵文淘, 赵尊兰, 史俊文, 等. 稳定过表达 miR-26a 肝癌细胞株的建立[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(2): 140-142.
- [6] Boettcher, S., Miller, P.G., Sharma, R., *et al.* (2019) A Dominant-Negative Effect Drives Selection of TP53 Missense Mutations in Myeloid Malignancies. *Science*, **365**, 599-604. <https://doi.org/10.1126/science.aax3649>
- [7] Yeh, P.Y., Yeh, K.H., Chuang, S.E., *et al.* (2004) Suppression of MEK/ERK Signaling Pathway Enhances Cisplatin-Induced NF-kappaB Activation by Protein Phosphatase 4-Mediated NF-kappaB p65 Thr Dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 26143-26148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402362200>
- [8] Qian, Z., Lin, C., Espinosa, R., *et al.* (2001) Cloning and Characterization of MST4, a Novel Ste20-Like Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 22439-22445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009323200>
- [9] Lin, J.L., Chen, H.C., Fang, H.I., *et al.* (2001) MST4, a New Ste20-Related Kinase That Mediates Cell Growth and Transformation via Modulating ERK Pathway. *Oncogene*, **20**, 6559-6569. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204818>
- [10] Hao, W.C., Zhong, Q.L., Pang, W.Q., *et al.* (2020) MST4 Inhibits Human Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest via Suppression of PI3K/AKT Pathway. *Journal of Cancer*, **11**, 5106-5117. <https://doi.org/10.7150/jca.45822>
- [11] Han, X.M., Tian, P.Y., *et al.* (2019) MicroRNA-486-5p Inhibits Ovarian Granulosa Cell Proliferation and Participates in the Development of PCOS via Targeting MST4. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 7217-7223.

- 
- [12] Shi, Z., Jiao, S., Zhang, Z., *et al.* (2013) Structure of the MST4 in Complex with MO25 Provides Insights into Its Activation Mechanism. *Structure*, **21**, 449-461. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.01.007>
- [13] Jiao, S., Zhang, Z., Li, C., *et al.* (2015) The Kinase MST4 Limits Inflammatory Responses through Direct Phosphorylation of the Adaptor TRAF6. *Nature Immunology*, **16**, 246-257. <https://doi.org/10.1038/ni.3097>
- [14] Caputo, M., Cansby, E., Kumari, S., *et al.* (2021) STE20-Type Protein Kinase MST4 Controls NAFLD Progression by Regulating Lipid Droplet Dynamics and Metabolic Stress in Hepatocytes. *Hepatology Communications*, **5**, 1183-1200. <https://doi.org/10.1002/hep4.1702>
- [15] Ma, X., Zhao, H., Shan, J., *et al.* (2007) PDCD10 Interacts with Ste20-Related Kinase MST4 to Promote Cell Growth and Transformation via Modulation of the ERK Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, **18**, 1965-1978. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0608>
- [16] Lin, Z.H., Wang, L., Zhang, J.B., *et al.* (2014) MST4 Promotes Hepatocellular Carcinoma Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis via Activation of the p-ERK Pathway. *International Journal of Oncology*, **45**, 629-640. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2455>
- [17] Wang, S.C., Lin, X.L., Li, J., *et al.* (2014) MicroRNA-122 Triggers Mesenchymal-Epithelial Transition and Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Motility and Invasion by Targeting RhoA. *PLOS ONE*, **9**, e101330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101330>
- [18] 龙春庭, 邵敏, 陆小云. 激酶小分子抑制剂研究进展[J]. 药学学报, 2021, 56(2): 414-431.
- [19] Roskoski, R. (2022) Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2022 Update. *Pharmacological Research*, **175**, Article ID: 106037. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106037>