

## AHA1蛋白对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响

谢汶蓉<sup>1,2,3</sup>, 梁桂丽<sup>1,2,3</sup>, 石本艳<sup>1,2,3</sup>, 孙雪荣<sup>1,2,3</sup>, 刘新光<sup>1,2,3,4</sup>, 蒋智文<sup>1,2,3\*</sup> (1. 广东医科大学衰老研究所; 2. 广东省医学分子诊断重点实验室; 3. 广东医科大学东莞科研中心, 广东东莞 523808; 4. 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

**摘要:** 目的 研究AHA1蛋白对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响。方法 恶性黑色素瘤A375细胞转染真核表达载体过表达AHA1蛋白后, 用CCK-8法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期变化, 免疫印迹检测P21蛋白表达。结果 AHA1过表达抑制A375细胞增殖( $P<0.01$ ), 增加G0/G1期细胞( $P<0.05$ )和P21表达。结论 过表达AHA1通过上调P21表达、G1期阻滞, 抑制恶性黑色素瘤细胞增殖。

**关键词:** 恶性黑色素瘤; AHA1; 细胞周期; 细胞增殖

中图分类号: R 739.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)01-0032-04

## Effect of AHA1 protein on proliferation of malignant melanoma cells

XIE Wen-rong<sup>1,2,3</sup>, LIANG Gui-li<sup>1,2,4</sup>, SHI Ben-yan<sup>1,2,3</sup>, SUN Xue-rong<sup>1,2,3</sup>, LIU Xin-guang<sup>1,2,3,4</sup>, JIANG

Zhi-wen<sup>1,2,3\*</sup> (1. Institute of Aging Research; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics;

3. Dongguan Scientific Research Center; Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 4. Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of AHA1 protein on the proliferation of malignant melanoma cells. Methods After AHA1 protein overexpression of A375 cells was constructed by transfection with eukaryotic expression vector, the proliferation, cell cycle and P21 expression were respectively detected by CCK-8 assay, flow cytometry and Western blot. Results AHA1 overexpression inhibited proliferation, and increased G0/G1 phase cells and p21 expression. Conclusion AHA1 overexpression may inhibit proliferation of malignant melanoma cells via upregulation of p21 protein and arrest of G1 phase cells.

**Key words:** malignant melanoma; AHA1; cell cycle; cell proliferation

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是源于黑色素细胞的高度恶性、发病隐匿、侵袭性强及致死率高的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>。研究发现热休克蛋白90(heat shock protein 90, Hsp90)的表达与恶性黑色素瘤的发生及发展相关; Hsp90在恶性黑色素瘤患者的血清及恶性黑色素瘤组织中的表达显著高于对照组<sup>[3-4]</sup>。Hsp90的高表达已经成为鉴定恶性黑色素瘤的一种分子标记<sup>[5]</sup>。作为Hsp90其中的一个下游蛋白AHA1(activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1), 是Hsp90/Hsp70分子伴侣机制中普遍存在的协同分子伴侣<sup>[6]</sup>, 其表达亦可能与肿瘤的发生、

发展相关<sup>[7-9]</sup>。本研究通过观察AHA1过表达后对恶性黑色素瘤A375细胞增殖及细胞周期的影响, 旨在为临床治疗MM提供基础依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

A375细胞购自中国科学院上海细胞库; 细胞培养基DMEM和血清FBS购自Gibco公司; pCMV-HA与pCMV-HA-AHA1真核表达载体为本实验室自行构建; Lipofectamine™ 3000和Lipofectamine® RNAi

基金项目: 国家自然科学基金(No.81170327), 广东省自然科学基金(No.2017A030307034), 广东医学院青年基金项目(No.2XK14030)

收稿日期: 2017-10-17; 修订日期: 2017-12-05

作者简介: 谢汶蓉(1997-), 女, 在读本科生。

通信作者: 蒋智文(1982-), 男, 博士, 助理研究员, E-mail: J\_zhiwen@163.com。

MAX 为Invitrogen公司产品; AHA1抗体(sc-166065)购自 Santa-Cruz公司;  $\alpha$ -Tubulin抗体(T5168)购自 Sigma-Aldrich公司; 甲叉双丙烯酰胺购自Bio-Rad公司; TEMED、过硫酸铵、SDS购自Sigma公司; 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自Millipore公司; ECL试剂盒购自Pierce公司; 荧光定量PCR试剂TransStart Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物; CCK8试剂购自Dojindo公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞转染** 使用胰蛋白酶消化A375细胞并计数后, 接种至6孔板。置于细胞培养箱继续培养24 h, 待细胞铺满6孔板面积80%时, 使用Lipofectamine™ 3000试剂分别转染pCMV-HA空载体和AHA1的过表达载体pCMV-HA-AHA1质粒, 转染48 h后, 收集细胞进行分析。

**1.2.2 免疫印迹检测** 将收集到的细胞用预冷的PBS洗两次, 裂解细胞并提取总蛋白, BCA法测定蛋白浓度调整蛋白上样量, 灌制12%分离胶, 行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 使用5%脱脂奶粉室温封闭转印的PVDF膜, 一抗4℃孵育过夜, 二抗室温孵育1 h, 加入ECL化学发光液, 于Azure Biosystems C400凝胶成像系统曝光拍照。结果使用mage J进行灰度值分析, 实验重复3次。

**1.2.3 细胞增殖检测** 将A375细胞接种至96孔板, 培养24 h后, 分别转染AHA1的siRNA片段和过表达载体, 以及相应的阴性对照片段或质粒, 继续培养48 h后, 每孔分别加入10  $\mu$ L的CCK8试剂, 然后转移至细胞培养箱继续培养1 h后, 使用多功能酶标仪测定450 nm处的吸光度。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布情况** 取对数

生长期细胞制成 $5 \times 10^5$ 个/mL单细胞悬液, 取2 mL接种于6孔板中, 每组3个复孔, 培养24 h后, 分别转染AHA1的过表达载体或siRNA片段, 继续培养48 h后分别收集细胞于EP管中, 用预冷的PBS洗涤2次, 然后使用体积分数70%乙醇-20℃固定过夜。固定后的细胞于上机前离心沉淀, 加入50  $\mu$ g/L的PI染色液, 室温避光染色30 min。染色好的细胞立即在BD FACS Canto II 流式细胞仪中进行检测, 并使用FlowJo 7.6软件对细胞周期进行分析。

## 1.3 统计学处理

数据采用软件SPSS 19.0统计分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AHA1的表达水平对细胞增殖的影响

AHA1蛋白过表达能够显著降低A375细胞的吸光度, 抑制A375细胞的增殖, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。详见表1。

表1 AHA1基因过表达对A375细胞增值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | <i>n</i> | 吸光度                          |
|-------------------|----------|------------------------------|
| A375-pCMV-HA      | 3        | 2.44 $\pm$ 0.12              |
| A375-pCMV-HA-AHA1 | 3        | 2.08 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> |

与A375-pCMV-HA组比较: <sup>a</sup> $P < 0.01$

### 2.2 AHA1对A375细胞周期的影响

AHA1基因过表达时, 导致G0/G1期A375细胞的百分比增加, 而S期细胞的百分比减少, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。详见表2。

表2 AHA1基因沉默或过表达对A375细胞周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 细胞                | G0/G1期                        | S期                            | G2/M期           |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| A375-pCMV-HA      | 60.02 $\pm$ 1.48              | 30.81 $\pm$ 3.34              | 9.17 $\pm$ 1.56 |
| A375-pCMV-HA-AHA1 | 69.18 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup> | 22.30 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup> | 8.52 $\pm$ 0.36 |

与A375-pCMV-HA组比较: <sup>a</sup> $P < 0.05$

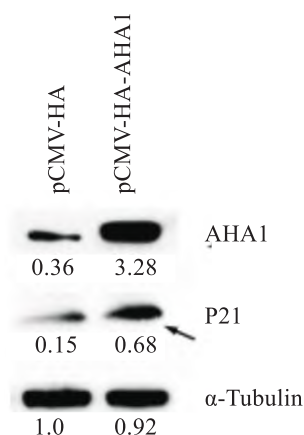
### 2.3 AHA1基因表达对周期相关蛋白P21的影响

A375细胞中的蛋白过表达后, 与转染空载体的A375细胞相比, 细胞中P21的水平大幅上升, 结果如图1所示。

## 3 讨论

本研究结果显示AHA1蛋白过表达能够抑制恶性黑色素瘤细胞的增殖, 而AHA1基因被沉默后,

却未能影响恶性黑色素瘤细胞的增殖, 说明高蛋白质水平的AHA1比低蛋白质水平的AHA1对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响更大。AHA1在多种骨肉瘤的细胞系中高表达<sup>[10-11]</sup>, 利用RNA干扰技术降低细胞中AHA1的表达, 则导致骨肉瘤细胞的增殖被抑制<sup>[10]</sup>, 表明AHA1的表达可能与肿瘤的发生和发展相关。AHA1不仅是Hsp90发挥分子伴侣活性时的协同分子伴侣, 而且还被认为是Hsp90分子伴侣功能的阳性



图中显示的数字为目的蛋白的灰度值/ $\alpha$ -Tubulin的灰度值

图1 AHA1基因过表达对P21蛋白的影响

调节因子。Hsp90蛋白的Y313位点磷酸化促进了AHA1的募集<sup>[12]</sup>,并与Hsp90协同作用激发特定的下游蛋白进入活化状态<sup>[13]</sup>。Hsp90蛋白主要分布在细胞表面,并且在恶性黑色素瘤及普通黑色素瘤细胞的表达量显著高于黑素细胞痣中的表达量<sup>[14]</sup>。进一步研究发现,Hsp90蛋白在转移性黑色素瘤的表达量高于原发性黑色素瘤的表达量<sup>[3,5]</sup>。恶性黑色素瘤是一种常见发生于皮肤的恶性肿瘤,与TP53基因在肺癌和结肠癌等肿瘤中存在高达80%~90%的突变相比,TP53基因在恶性黑色素瘤中只有10%~20%存在突变<sup>[15]</sup>,表明恶性黑色素瘤在发生机制上可能与肺癌、结肠癌等肿瘤存在则显著差异。研究结果显示AHA1在膀胱癌、结肠癌、肝癌和肺癌等肿瘤中的表达显著高于相应的正常组织,而在皮肤癌、卵巢癌和子宫癌中的表达显著低于相应的正常组织<sup>[16]</sup>,表明AHA1在不同肿瘤细胞中的作用可能不尽相同。

本研究发现AHA1蛋白过表达可引起P21蛋白水平上调,并且导致更多的恶性黑色素瘤细胞停留在G1期。然而AHA1基因被沉默后,未能显著改变细胞中P21的蛋白水平。研究结果表明,AHA1蛋白过表达能通过上调P21蛋白的水平,将细胞阻滞在G1期,进而抑制细胞的增殖。P21蛋白主要作为细胞周期进程中G1期向S期转变的调节因子,高表达的P21能够将细胞周期阻滞在G0/G1期<sup>[17]</sup>。在细胞中沉默P53则导致AHA1的表达量上调,并增强Hsp90的ATPase活性<sup>[18-19]</sup>。而Hsp90与P21相互作用,并且Hsp90还能维持细胞中P21的稳定<sup>[20]</sup>,因而我们推测AHA1蛋白通过激活Hsp90的活性,上调细胞中P21的蛋白水平,导致细胞阻滞于G1期,进而抑制细胞的增殖。然而AHA1对细胞周期的调节作用,

以及具体的作用机制尚待更进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈飞. 恶性黑色素瘤的临床病理特点分析[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(21): 100-101.
- [2] Rastrelli M, Tropea S, Rossi C R, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification[J]. *In Vivo*, 2014, 28(6): 1005-1011.
- [3] McCarthy M M, Pick E, Kluger Y, et al. HSP90 as a marker of progression in melanoma[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(3): 590-594.
- [4] Tas F, Bilgin E, Erturk K, et al. Clinical significance of circulating serum cellular heat shock protein 90 (HSP90) level in patients with cutaneous malignant melanoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(3): 599-601.
- [5] Strickler A G, Vasquez J G, Yates N, et al. Potential diagnostic significance of HSP90, ACS/TMS1, and L-plastin in the identification of melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2014, 24(6): 535-544.
- [6] Ran F, Gadura N, Michels C A. Hsp90 cochaperone Aha1 is a negative regulator of the *Saccharomyces* MAL activator and acts early in the chaperone activation pathway[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(18): 13850-13862.
- [7] Zaidi S, McLaughlin M, Bhide S A, et al. The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes by abrogation of homologous recombination resulting in mitotic entry with unresolved DNA damage[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35436.
- [8] Holmes J L, Sharp S Y, Hobbs S, et al. Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1188-1197.
- [9] Restall I J, Lorimer I A. Induction of premature senescence by hsp90 inhibition in small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11076.
- [10] Shao J, Wang L, Zhong C, et al. AHA1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 77: 45-51.
- [11] Guo Q C, Shen J N, Jin S, et al. Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and SV40-immortalized normal osteoblastic cell lines[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 850-858.
- [12] Xu W, Mollapour M, Prodromou C, et al. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50 (CDC37)-AHA1 chaperone machine[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 434-443.
- [13] Chua C S, Low H, Lehming N, et al. Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* co-chaperone Aha1 supports its

- interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 233-245.
- [14] Becker B, Multhoff G, Farkas B, et al. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(1): 27-32.
- [15] Worrall C, Suleymanova N, Crudden C, et al. Unbalancing p53/Mdm2/IGF-1R axis by Mdm2 activation restrains the IGF-1-dependent invasive phenotype of skin melanoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(23): 3274-3286.
- [16] McDowell C L, Bryan Sutton R, Obermann W M. Expression of Hsp90 chaperone [corrected] proteins in human tumor tissue[J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(3): 310-314.
- [17] Gartel A L, Radhakrishnan S K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 3980-3985.
- [18] Okayama S, Kopelovich L, Balmus G, et al. p53 protein regulates Hsp90 ATPase activity and thereby Wnt signaling by modulating Aha1 expression [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(10): 6513-6525.
- [19] Kochhar A, Kopelovich L, Sue E, et al. p53 modulates Hsp90 ATPase activity and regulates aryl hydrocarbon receptor signaling[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(6): 596-606.
- [20] Jascur T, Brickner H, Salles-Passador I, et al. Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISP39, a Hsp90 binding TPR protein [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(2): 237-249.

## 《广东医科大学学报》衰老与疾病研究专栏 征 稿 启 事

我国人口老龄化进程将加快,老年人口高龄化特征将日益凸显。人口的老龄化伴随而来的是衰老相关疾病如心脑血管疾病、神经变性疾病、骨质疏松、糖尿病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病等高发,因此衰老及其干预措施的研究对提高我国老年人的生活质量、减少医疗费用具有至关重要的意义,进行衰老机制与干预的基础研究也已经成为国际生命科学领域研究的前沿和热点。《广东医科大学学报》是由广东医科大学主办、国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊,本刊已从2015年第1期起设立衰老与疾病研究专栏,现诚挚邀请衰老与疾病研究领域的专家、学者以及广大师生、医务工作者踊跃投稿。

本刊编辑部