

# Thr592 磷酸化修饰对 SAMHD1 抗胃癌的影响及其机制

袁未未<sup>1</sup>, 陈章明<sup>2</sup>, 孟磊<sup>2</sup>, 应松成<sup>3</sup>, 徐阿曼<sup>2</sup>

**摘要** 目的 阐明苏氨酸 592 (Thr592) 位点磷酸化修饰对不育  $\alpha$  基序和含 HD 结构域蛋白 1 (SAMHD1) 抑制胃癌增殖的影响以及潜在的作用机制。方法 分析数据库中胃癌组织和细胞系中 SAMHD1 蛋白的翻译后修饰 (PTMs), 免疫组织化学染色检测胃癌患者配对组织中 SAMHD1 Thr592 磷酸化情况。在胃癌细胞中, 构建并瞬时转染 SAMHD1 Thr592 变异体, 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖。加用不同浓度细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 6 抑制剂帕博西尼 (Palbociclib), 抑制下游 CDK2 蛋白苏氨酸 160 (Thr160) 位点的磷酸化, 降低 SAMHD1 蛋白 Thr592 磷酸化水平。利用 3 个在线数据库分析 SAMHD1 的互作蛋白并取交集得出 Nik 相关激酶 (NRK) 蛋白。采用免疫共沉淀 (Co-IP)、质谱分析和 Western blot 验证 SAMHD1 与 NRK 蛋白互作, 并检测 NRK 对 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化的影响。结果 与类泛素化等 PTMs 比较, 肿瘤中 SAMHD1 的磷酸化修饰水平最高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 免疫组化实验显示, 磷酸化 SAMHD1 (Thr592) 在胃癌组织中表达高于癌旁正常黏膜组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。Western blot 检测结果显示在 MKN-45 细胞中过表达野生型和突变体组细胞内的 SAMHD1 蛋白表达升高, 野生型、T592E 和 HD/AA 组中磷酸化 SAMHD1 水平也升高, CCK-8 实验表明, SAMHD1 野生型和 T592A 均能抑制胃癌细胞增殖, 而 T592E 和 HD/AA 对胃癌增殖无影响。在过表达 SAMHD1 基础上, 加入不同浓度 Palbociclib 处理后, CCK-8 提示细胞增殖受到抑制, 且 Western blot 检测提示磷酸化水平也降低。通过 Co-IP 和质谱鉴定来筛选 SAMHD1 的互作蛋白谱和数据库交集取得 NRK 蛋白, Co-IP 和 Western blot 实验结果提示 NRK 与 SAMHD1 蛋白互作, 促进 SAMHD1 Thr592 位点发生磷酸化。结论 Thr592 位点磷酸化修饰可能会促使 SAMHD1 失去抑制胃癌细胞增殖的能力, 但是这一过程可被 Palbociclib 逆转; NRK 与 SAMHD1 蛋白互作, 促进 SAMHD1 Thr592 位点发生磷酸化。

**关键词** SAMHD1; 磷酸化修饰; Thr 592; 胃癌; 细胞增殖  
中图分类号 R 329.25; R 735.2; R 730.21; R 394.2; R 977.6  
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0615-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.016

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。据 2020 年全球癌症统计显示, 在所有恶性肿瘤中, 胃癌的发病率及病死率分别位于第五及第四位<sup>[1]</sup>。全球范围内, 胃癌的病死率及发病率没有明显降低。不育  $\alpha$  基序和含 HD 结构域蛋白 1 (sterile alpha motif and HD-domain-containing protein 1, SAMHD1) 参与调节癌症发展, 如肺癌和皮肤 T 细胞淋巴瘤。前期研究<sup>[2]</sup>表明 SAMHD1 可通过负调控 MAPK p38 信号通路抑制胃癌的增殖, 这提示 SAMHD1 可能作为抑癌因子, 参与调控胃癌增殖。2013 年, SAMHD1 的磷酸化位点苏氨酸 592 (Threonine 592, Thr592) 首次被报道<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明, 细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 1/2 可以识别<sup>592</sup>TPQK<sup>595</sup>氨基酸序列, 并促进 SAMHD1 蛋白 Thr592 位点发生磷酸化。然而, Thr592 磷酸化对 SAMHD1 调控胃癌进展的影响和机制仍不清楚, 除 cyclins/CDKs 复合物外, 干扰素  $\beta$  (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ ) 也能抑制 SAMHD1 Thr592 的磷酸化。在胃癌中, 是否存在调控 Thr592 位点磷酸化的其他机制有待进一步明确。该研究主要阐明 Thr592 磷酸化修饰对 SAMHD1 抑制胃癌的调节作用, 明确帕博西尼 (Palbociclib) 对 SAMHD1 抗胃癌增殖的价值, 并初步探索调控 Thr592 位点磷酸化的其他机制, 为开展胃癌靶向药物临床试验提供新的思路和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 收集 2019 年 1 月—2020 年 12 月于安徽医科大学第一附属医院胃肠外科收治的胃癌患者的胃癌组织及其癌旁正常黏膜组织 58 例。所有患者术前均未进行新辅助化疗或者转化治疗, 无其他恶性肿瘤, 无严重全身性疾病, 无临床检查资料不完整者, 所有胃癌患者经病理诊断确诊。

2023-02-22 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划(编号: 202104j07020029)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院(安徽省公共卫生临床中心) 普外科, 合肥 230012<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022<sup>3</sup> 安徽医科大学基础医学院免疫教研室, 合肥 230032

作者简介: 袁未未, 男, 硕士研究生;

徐阿曼, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xuaman@ahmu.edu.cn

**1.1.2 细胞株** 人胃癌细胞株(HGC-27)细胞是由安徽医科大学基础医学院免疫教研室提供,人胃腺癌细胞株(AGS)和人胃癌细胞株(MKN-45)购自中国科学院上海细胞库。

**1.1.3 主要实验试剂** 蛋白 A/G 琼脂糖珠( protein A/G beads, 货号: sc-2003) 购自美国 Santa Cruz 公司; Palbociclib( 货号: P126849) 购自上海阿拉丁公司; EcoR I 内切酶( 货号: 1040S) 购自日本 Takara 公司; Xba I 内切酶( 货号: 1093S) 购自日本 Takara 公司; FuGENE® HD( 货号: E2311) 购自北京 Promega 公司; Polybrene( 货号: REVG0001) 购自上海吉凯公司; 细胞计数试剂盒-8( cell counting kit-8, CCK-8, 货号: C0042) 购自上海碧云天公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** 首先设计并合成 Nik 相关激酶( Nik-related kinase, NRK) 引物, 提取胃癌细胞 HGC-27 的 mRNA 逆转录合成 cDNA, 再通过 PCR 目的基因序列。引物 NRK F: 5'-GGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCGGGACCTGGGGCTGGA-3'; R: 5'-GCTCTAGATTAGACATCATAATTGCTTTGGAGCTCTTCAAGTTT-3'。接下来, 使用限制性内切酶 Takara 对目的片段及载体进行双酶切, 并依次进行质粒连接、转化、摇菌和质粒提取, 并进行测序验证。pLVX-HA-SAMHD1 野生型、pLVX-HA-SAMHD1-T592A、pLVX-HA-SAMHD1-T592E 和 pLVX 空载体质粒均由武汉淼灵生物科技有限公司提供。

**1.2.2 Western blot** 转染 48 h 后, 在胃癌细胞 HGC-27、AGS 中加入适宜体积的含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 充分裂解后取上清液。然后使用 BCA 试剂盒对蛋白质进行浓度测定, 并绘制标准蛋白浓度曲线后加入上样缓冲液, 100 °C 煮 10 min。取 30 μg 蛋白经 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜, 室温下使用 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 2 h, 之后用 TBST 洗涤 3 次, 加入一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后去除一抗, 加入二抗室温孵育 1 h。上述过程结束后, 去除二抗, 加入 TBST 洗涤 3 次后通过使用化学发光 ECL 试剂显影检测蛋白表达, 采用 Image J 软件计算目的蛋白与内参灰度值。

**1.2.3 CCK-8 实验** 采用 CCK-8 方法检测细胞增殖速度。将处于对数生长期的胃癌细胞 AGS 和 MKN45 用胰酶消化后用未添加血清的培养基重悬, 以 3 000 个细胞/孔接种于 96 孔板, 每孔培养体积为 100 μl。细胞贴壁后进行转染, 在培养箱孵育 24 h, 弃除培养基, 添加 90 μl 完全培养基和 10 μl

CCK-8 液的混合检测液, 继续放入培养箱中培养 1 h, 使用酶标仪( 波长 450 nm) 测定每孔吸光度值, 最后绘制细胞的增殖曲线。

**1.2.4 免疫组化辣根过氧化物酶( DAB) 显色法及评分** 患者未进行辅助治疗, 无相关免疫疾病, 术前活检病理诊断为胃腺癌。在肿瘤的外周切取大小约 5 mm × 5 mm 的胃癌组织, 在距离肿瘤边缘 5 cm 处, 切取大小约为 5 mm × 5 mm 癌旁正常组织黏膜。依次固定、脱水、包埋、封块、切片、烘干, 然后进行脱蜡水化。加入 3% BSA 封闭液中封闭 1 h。滴加抗磷酸化 SAMHD1 一抗( 浓度为 1 : 100) , 37 °C 孵育 60 min。滴加二抗( 浓度为 1 : 400) , 37 °C 孵育 20 min。滴加显色剂。最后, 依次通过梯度乙醇进行脱水, 使用中性的树胶滴进行封片并晾干拍照。SAMHD1 Thr592 的免疫染色评分按下述公式进行计算: 染色强度( 阴性: 0 分; 弱阳性: 1 分; 中度阳性: 2 分; 强阳性: 3 分) × 阳性面积率( 0% : 0 分; 1% ~ 25% : 1 分; 26% ~ 50% : 2 分; 51% ~ 75% : 3 分; 76% ~ 100% : 4 分)。

## 1.2.5 免疫共沉淀( immunoprecipitation, Co-IP) 法

使用预冷 PBS 洗涤胃癌细胞 HGC-27 两次, 加入 1 ml 细胞裂解液: 950 μl IP 裂解液 + 20 μl 蛋白酶抑制剂 + 20 μl 磷酸酶抑制剂 + 10 μl PMSF( 100 ×)。在冰上裂解 5 min 后刮下细胞离心取上清液 80 μl 为 Input, 另取上清液 80 μl 于新的 1.5 ml EP 管中, 作为 IP 样及 IgG 样本; 分别加入 20 μl 目的蛋白抗体和 IgG 抗体。4 °C 孵育过夜后加入蛋白 A/G 琼脂糖珠, 弃上清液加入 1 ml IP 裂解液, 旋转孵育重复洗涤 5 次后尽量弃上清液。加入蛋白上样缓冲液 100 °C、5 min, 样品用 Western blot 检验。

**1.2.6 SDS-PAGE 银染** 依次取 10 μl Input、目的蛋白抗体 IP 液和 IgG IP 液, 加入到 SDS-PAGE 胶中进行分离。电泳结束后, 使用 PAGE 凝胶快速银染试剂盒对蛋白条带进行染色, 在白光下进行拍照。

**1.2.7 LC-MS/MS 鉴定** 切取上述阳性条带( 目的蛋白和 IgG 抗体) , 送至中科新生命依次进行酶解、LC-MS/MS 质谱分析( liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 、数据库搜索比对和蛋白质鉴定。最后, 通过 Venn 图分析出 SAMHD1 的互作蛋白谱。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并采用 Student's *t* 检验分析两组之间的差异性。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肿瘤中 SAMHD1 蛋白的翻译后修饰和磷酸化位点信息** 使用中山大学肿瘤防治中心建立的数据库 qPTM, 分析目前已报道的关于癌组织和细胞系中 SAMHD1 翻译后修饰数据: 与 SUMO 化修饰 (SUMOylation), 蛋白质的泛素化 (Ubiquitylation), 乙酰化修饰 (Acetylation), 蛋白质的甲基化 (methylation) 等 PTMs 比较, 肿瘤中 SAMHD1 的磷酸化修饰水平最高 (图 1 A), 且 Thr592 是 SAMHD1 蛋白磷酸化中最常见的位点 (图 1B)。

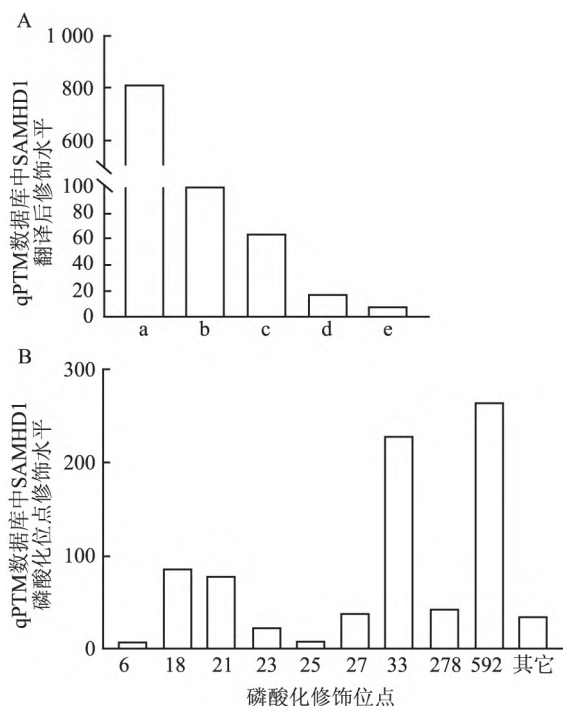


图 1 肿瘤中 SAMHD1 蛋白的翻译后修饰和磷酸化位点信息统计

A: qPTM 数据库中人癌组织和细胞系 SAMHD1 翻译后修饰的信息分析; a: Phosphorylation 组; b: SUMOylation 组; c: Ubiquitylation 组; d: Acetylation 组; e: Methylation 组; B: qPTM 数据库中人癌组织和细胞系中 SAMHD1 蛋白各磷酸化修饰位点分析

**2.2 胃癌组织中 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化水平变化** 磷酸化 SAMHD1 (Thr592) 主要表达于胃腺癌成分中, 在癌旁正常黏膜组织中表达较少 (图 2A)。免疫染色评分结果表明, 磷酸化 SAMHD1 (Thr592) 在胃腺癌中表达高于癌旁正常黏膜组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 2B)。这提示 SAMHD1 Thr592 位点发生磷酸化可能是 SAMHD1 失去抑制胃癌的机制之一。

**2.3 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化对胃癌细胞增殖的能力的影响** 课题组构建了 SAMHD1 空白对

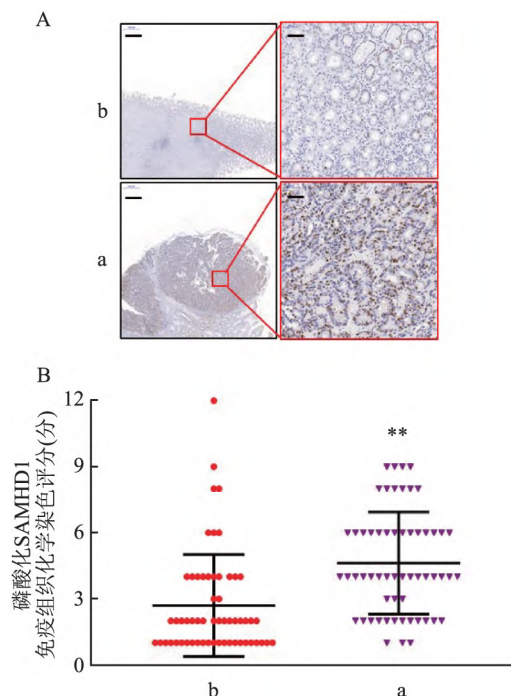


图 2 磷酸化 SAMHD1 (Thr592) 在胃癌组织和癌旁正常黏膜组织中的表达水平

A: 58 例胃癌患者配对胃癌及癌旁正常黏膜组织中磷酸化 SAMHD1 (Thr592) 的免疫组化 DAB 显色图片  $\times 4$ ; B: 对上述的免疫组化染色图片进行免疫染色评分; a: 胃癌组织; b: 癌旁正常黏膜组织; 与癌旁正常黏膜组织比较: \*\*  $P < 0.01$

照野生型和变异体质粒, 包括 T592A (非磷酸化)、T592E (拟磷酸化) 和 H206A / D207A (HD/AA, 缺失水解酶活性) 质粒设计如图 (3A) 所示。分别将上述质粒转染进入 MKN-45 细胞内, 转染 48 h 后收集各个组的细胞悬液并制备成细胞总蛋白。Western blot 实验显示, 与空白对照 (Vector) 组相比, 过表达野生型组和突变体 (T592A、T592E、HD/AA) 组细胞内的 SAMHD1 表达水平升高, 同时与空白对照组相比, 野生型组和突变体 (T592E 和 HD/AA) 组磷酸化 SAMHD1 表达水平也随之上升, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3B、C)。CCK-8 实验检测表明, 与空白对照组相比, SAMHD1 WT 组和 T592A 组增殖水平下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。而 T592E 和 HD/AA 对胃癌增殖影响差异无统计学意义 (图 3D)。

**2.4 Palbociclib 通过抑制 CDK2 进一步下调 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化对胃癌增殖能力的影响** 不同浓度 Palbociclib 处理 AGS 细胞 48 h 后, 用 CCK-8 检测细胞的增殖能力。结果显示, Palbociclib 浓度越高, 细胞的增殖能力越弱, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 4A)。不同浓度的

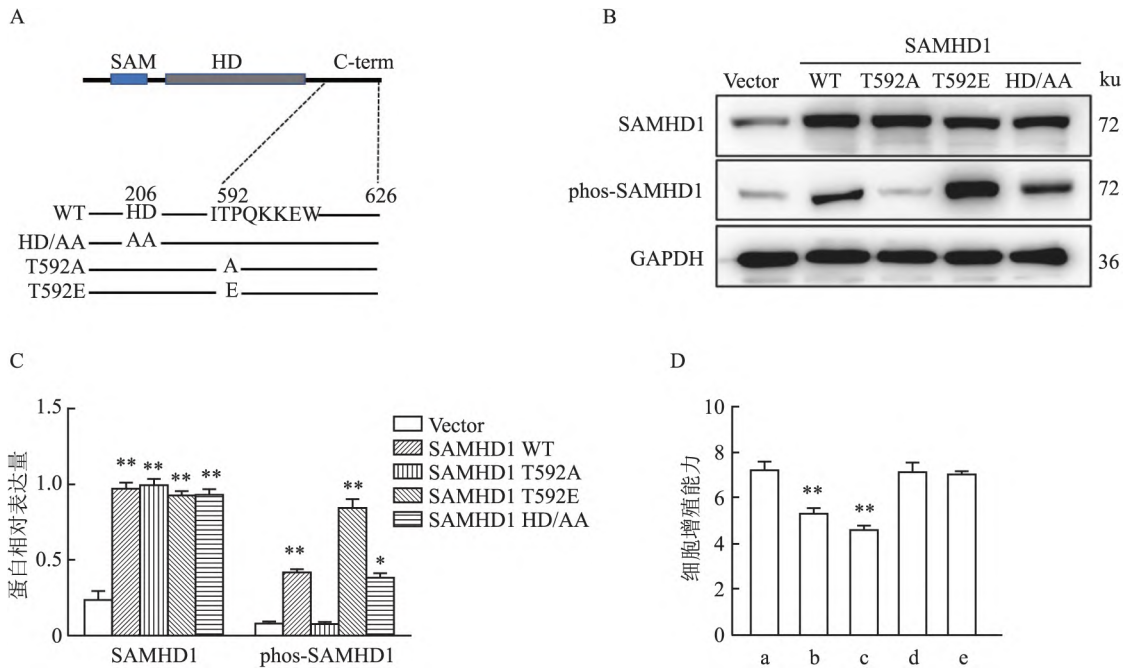


图3 SAMHD1 在 Thr 592 位点发生磷酸化对胃癌增殖的活性影响

A: pLVX SAMHD1 野生型及其突变体的构建; B: 通过 Western blot 检测 SAMHD1 和 Thr592 位点磷酸化的 SAMHD1 的相对表达水平; C: 灰度值比值并绘制柱状图; D: 利用 CCK-8 法检测 SAMHD1 不同变异体对 MKN-45 细胞增殖能力的影响; a: 空白质粒组; b: SAMHD1 野生型组; c: SAMHD1 非磷酸化组; d: SAMHD1 拟磷酸化组; e: SAMHD1 缺失水解酶活性组; 与空白质粒组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Palbociclib 处理 AGS 细胞 48 h 后,提取细胞总蛋白,Western blot 实验显示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  Palbociclib 处理的空白对照组比较,细胞内 CDK2、RB 和 SAMHD1 的磷酸化水平均降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 4B);将过表达 SAMHD1 的质粒转染至 AGS 细胞后,加入不同浓度的 Palbociclib 处理,用 CCK-8 检测细胞的增殖能力,结果显示:随着 Palbociclib 浓度上升,细胞的增殖能力下降,呈剂量依赖性,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 4C);在过表达 SAMHD1 的质粒转染至 AGS 细胞后加入不同浓度的 Palbociclib 处理 48 h,收集不同浓度的细胞悬液并提取细胞总蛋白,Western blot 实验提示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  Palbociclib 处理的过表达 SAMHD1 组比较,过表达组 SAMHD1 的磷酸化水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 4D)。

**2.5 NRK 结合 SAMHD1 对 Thr 592 位点磷酸化的影响** 通过 CO-IP 和质谱筛选的 SAMHD1 的互作蛋白谱与在线数据库分析的互作蛋白取交集,得到 NRK 蛋白(图 5A);提取胃癌细胞系(MKN-45, AGS, MGC-803, HGC-27)的总蛋白,Western blot 实验检测 NRK 蛋白表达水平与 SAMHD1 磷酸化水平,结果表明 NRK 蛋白表达水平与 SAMHD1 磷酸化水平呈正相关(图 5B);分别采用抗 SAMHD1 抗

NRK 抗体和 IgG 抗体对 HGC-27 细胞内目的蛋白进行免疫沉淀,免疫复合物通过 Western blot 进行验证,Western blot 实验检测总细胞蛋白液(Input)中及免疫沉淀(IP)洗脱液中诱饵蛋白 NRK 的表达,结果显示,在 Input 组中均可以检测到 NRK 蛋白的表达,这表明 NRK 和 SAMHD1 蛋白可能存在互作(图 5C);在 HGC-27 细胞内,分别转染空白质粒(Vector)、pcDNA3.1-NRK 质粒过表达外源性 NRK 蛋白,提取细胞悬液并制备成细胞总蛋白,Western blot 实验检测提示 NRK 蛋白表达水平和 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化水平均升高,表明过表达 NRK 蛋白可促进 HGC-27 细胞内 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化水平(图 5D)。

### 3 讨论

研究<sup>[5]</sup>表明,磷酸化修饰是限制 SAMHD1 抗病毒能力的重要因素。然而,尚无研究阐明肿瘤组织中 SAMHD1 磷酸化的作用及机制。该实验通过分析 qPTM 数据库<sup>[6]</sup>显示,在所有位点中,Thr592 位点磷酸化水平最高,Ser33 位点居第 2 位。由于缺少商品化的 Ser33 磷酸化 SAMHD1 抗体,从而使其检测和进一步实验受到限制。因此,本实验中主要探讨 SAMHD1 Thr592 在胃癌中的作用和机制。本研究

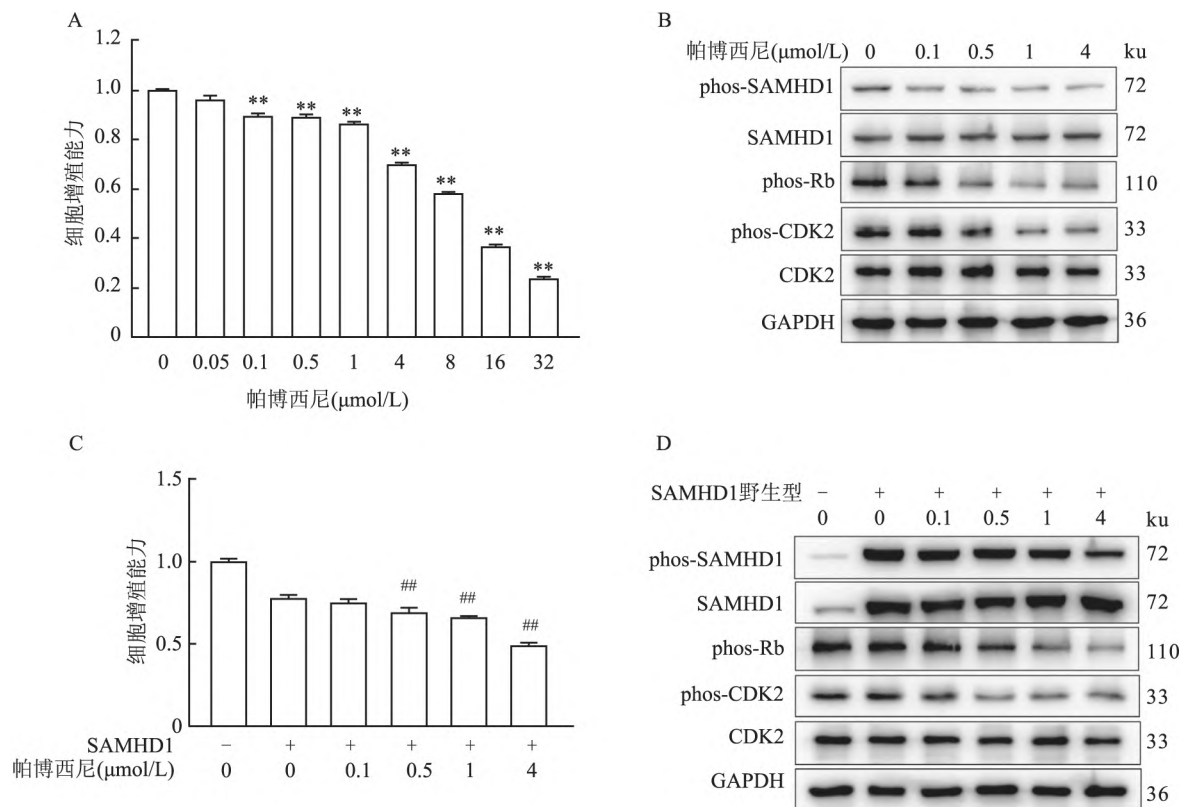


图4 Palbociclib 通过抑制 CDK2 介导的 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化对胃癌增殖的活性的影响

A: 不同浓度 Palbociclib 处理 AGS 细胞 48 h 后检测细胞的增殖水平; B: Western blot 检测细胞内 CDK2、Rb 和 SAMHD1 的磷酸化水平; C: 过表达 SAMHD1 的质粒转染 AGS 细胞后加入不同浓度 Palbociclib 处理 48 h ,CCK-8 检测细胞增殖情况; D: 过表达 SAMHD1 的质粒转染 AGS 细胞后加入不同浓度 Palbociclib 处理 48 h ,Western blot 检测细胞内 CDK2 和 SAMHD1 的磷酸化水平; 与 0  $\mu\text{mol/L}$  Palbociclib 处理的空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 0  $\mu\text{mol/L}$  Palbociclib 处理的过表达 SAMHD1 组比较: ##  $P < 0.01$

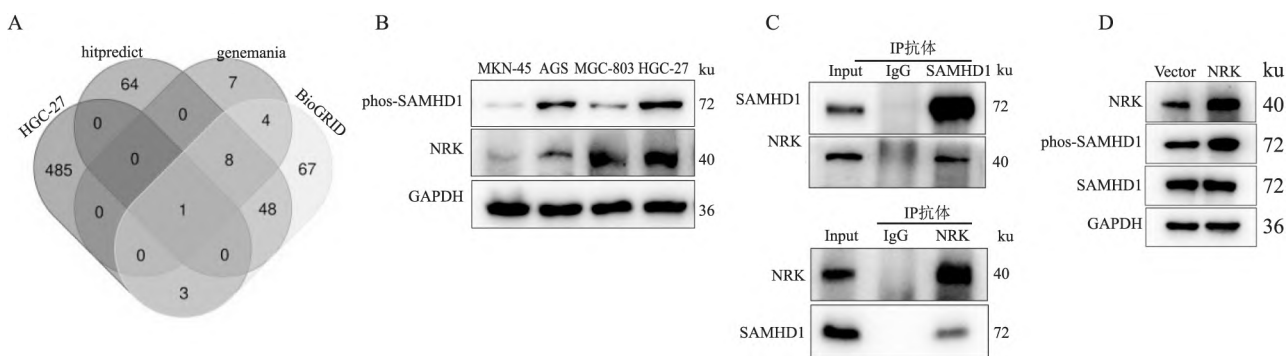


图5 NRK 和 SAMHD1 互作对 Thr592 位点磷酸化的影响

A: 通过 Co-IP 和 LCMS/MS 鉴定 HGC-27 细胞内 SAMHD1 互作蛋白 并与 HitPredict、GeneMANIA 和 BioGRID 数据库的 SAMHD1 互作蛋白谱取交集 绘制 Venn 图; B: Western blot 检测四株胃癌细胞系 NRK 表达与 phospho-SAMHD1 ( Thr592 ) 表达水平; C: 在 HGC-27 细胞内 ,诱饵蛋白 NRK 和 SAMHD1 在 Input 和 IP 洗脱液中的表达通过 Western blot 检测; D: 在 HGC-27 细胞内 ,分别转染空白质粒 ( Vector ) 、pcDNA3.1-NRK 质粒过表达外源性 NRK 蛋白 ,Western blot 检测 NRK 蛋白的表达水平和 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化水平

首次发现胃癌组织中 SAMHD1 蛋白 Thr592 位点磷酸化水平升高。体外实验证实 Thr592 位点磷酸化失去了抑制胃癌的特性。虽然过表达 SAMHD1 能抑制胃癌细胞增殖 ,但是仍有部分 SAMHD1 蛋白在

细胞内发生了磷酸化。所以 ,降低 SAMHD1 磷酸化水平可能会增强其抗胃癌效果。多项研究证实 ,细胞周期 S 期的关键蛋白—cyclin E/cyclin A2/CDKs 复合物可以与 SAMHD1 羧基端的<sup>592</sup>TPQK<sup>595</sup>序列相

互作用并促使 SAMHD1 在 Thr592 位点发生磷酸化<sup>[7]</sup>。该磷酸化在 DNA 复制开始之前,细胞周期蛋白 E 在转录因子 E2F 调节下,控制 G<sub>1</sub> 期向 S 转变,细胞周期蛋白 E 和 A 的底物特异性重叠,促使了 DNA 的形成和复合物的集聚,这可能是几个细胞周期蛋白共同参与 SAMHD1 磷酸化的原因。Pauls et al<sup>[8]</sup> 发现,Palbociclib 通过降低 CDK6 下游 CDK2 Thr160 位点的磷酸化,从而降低了细胞内 SAMHD1 磷酸化(Thr592)。本研究表明 Palbociclib 可通过抑制 CDK2 介导的 SAMHD1 Thr 592 位点磷酸化,进一步增强 SAMHD1 的抗胃癌作用。但美国一项 II 期临床试验纳入了 21 例晚期胃癌患者,这些患者化疗前肿瘤免疫组织化学染色提示 RB 蛋白阳性,经过 Palbociclib 治疗后,中位无进展生存期为 1.8 个月,中位总生存时间为 3 个月,这提示 Palbociclib 在改善晚期胃癌患者生存预后的效果仍非常有限<sup>[9]</sup>。此预后改善不明显的原因可能是该临床试验纳入病例时未对组织中 SAMHD1 磷酸化进行检测,且该研究纳入样本数较少,缺乏对照组及质量控制,得出的结论还不足以彻底否定 Palbociclib 在胃癌中的潜在价值,Palbociclib 在临床中作用是否与 SAMHD1 有关仍不清楚, Ser33 磷酸化位点未检测。在后续临床试验中,可对磷酸化 SAMHD1 和 RB 高表达的胃癌患者,进一步探讨 Palbociclib 在胃癌中的临床应用价值。

生发中心激酶 IV 家族是一种结构相关丝氨酸/苏氨酸激酶,由 NIK、NRK、TNIK 和 MINK1 组成<sup>[10]</sup>。其中, NRK 被认为是乳腺癌的驱动基因之一<sup>[11]</sup>,且其变异率与三阴乳腺癌患者预后相关<sup>[12]</sup>。Wei et al<sup>[13]</sup> 发现在肺癌相关成纤维细胞中 NRK 表达升高,可作为肺癌患者生存预后不良的重要因子。本研究通过 Co-IP 和质谱技术筛选出 SAMHD1 互作蛋白,与三个在线数据库中 SAMHD1 互作蛋白取交集,最终得到 NRK。该实验通过细胞学实验证实 SAMHD1 可与 NRK 互相结合,而且过表达 NRK 可促使胃癌细胞内 SAMHD1 Thr592 磷酸化水平升高。因此,除 cyclin/CDKs 外, NRK 是另一个促进 SAMHD1 磷酸化的激酶。然而,关于 NRK 的结构和功能研究较少,后续可继续对其展开研究。

综上所述, Thr592 位点磷酸化可促使 SAMHD1 失去抑制胃癌细胞增殖的能力。Palbociclib 通过抑制 SAMHD1 Thr592 位点磷酸化,进一步增强 SAM-

HD1 的抗胃癌作用。NRK 与 SAMHD1 蛋白互作用,促进 SAMHD1 Thr592 位点发生磷酸化。

### 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: Cancer J Clin* 2021, 71 (3): 209–49.
- [2] Chen Z, Jiang Z, Meng L, et al. SAMHD1, positively regulated by KLF4, suppresses the proliferation of gastric cancer cells through MAPK p38 signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21 (19): 2065–78.
- [3] White T E, Brandariz-Nuñez A, Valle-Casuso J C, et al. Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1 [J]. *Virology*, 2013, 436(1): 81–90.
- [4] Takeda D Y, Wohlschlegel J A, Dutta A. A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases [J]. *J Biol Chemistry*, 2001, 276(3): 1993–7.
- [5] Deutschmann J, Schneider A, Gruska I, et al. A viral kinase counteracts *in vivo* restriction of murine cytomegalovirus by SAMHD1 [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(12): 2273–84.
- [6] Yu K, Zhang Q, Liu Z, et al. qPhos: a database of protein phosphorylation dynamics in humans [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D451–8.
- [7] Cribier A, Descours B, Valadao A L, et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1 [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1036–43.
- [8] Pauls E, Badia R, Torres-Torronteras J, et al. Palbociclib, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinase4/6, blocks HIV-1 reverse transcription through the control of sterile alpha motif and HD domain-containing protein-1 (SAMHD1) activity [J]. *AIDS*, 2014, 28(15): 2213–22.
- [9] Karasic T B, O'Hara M H, Teitelbaum U R, et al. Phase II trial of palbociclib in patients with advanced esophageal or gastric cancer [J]. *Oncologist*, 2020 25(12): e1864–8.
- [10] Naito S, Fukushima T, Endo A, et al. NIK-related kinase is targeted for proteasomal degradation by the chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP [J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(11): 1778–86.
- [11] Rajendran B K, Deng C X. Characterization of potential driver mutations involved in human breast cancer by computational approaches [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 50252–72.
- [12] Dong P, Yu B, Pan L, et al. Identification of key genes and pathways in triple-negative breast cancer by integrated bioinformatics analysis [J]. *BioMed Res Int*, 2018, 2018: 2760918.
- [13] Wei T, Song J, Liang K, et al. Identification of a novel therapeutic candidate, NRK, in primary cancer-associated fibroblasts of lung adenocarcinoma microenvironment [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(4): 1049–64.

## Effect and mechanism of phosphorylation modification of Thr592 site in SAMHD1 protein on gastric cancer

Yuan Weiwei<sup>1</sup>, Chen Zhangming<sup>2</sup>, Meng Lei<sup>2</sup>, Ying Songcheng<sup>3</sup>, Xu Aman<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Anhui Public Health Clinical Center, Hefei 230012; <sup>2</sup>Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>3</sup>Dept of Immunology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To elucidate the effect of phosphorylation modification at the threonine 592 ( Thr592) site on the inhibition of gastric cancer proliferation by sterile alpha motifs and HD structural domain – containing protein 1 ( SAMHD1) and the potential mechanism of action. **Methods** Post-translational modifications ( PTMs) of SAMHD1 protein in gastric cancer tissues and cell lines in the database were analyzed, and immunohistochemical staining was performed to detect SAMHD1 Thr592 phosphorylation in paired tissues of gastric cancer patients. In gastric cancer cells, SAMHD1 Thr592 variants were constructed and transiently transfected, and cell proliferation was detected using the cell counting kit 8 ( CCK-8) method. The phosphorylation of the cyclin-dependent kinases ( CDK) 2 protein threonine 160 ( Thr160) site was inhibited by the addition of different concentrations of the CDK6 inhibitor, Palbociclib, which reduced the level of SAMHD1 protein Thr592 phosphorylation. Three online databases were used to analyze the SAMHD1 reciprocal proteins and take the intersection to derive the Nrk-related kinase ( NRK) protein. Immunoprecipitation ( Co-IP), mass spectrometry and Western blot were used to verify the interactions between SAMHD1 and NRK proteins and detect the effect of NRK on the phosphorylation of the SAMHD1 Thr592 site. **Results** Compared with PTMs such as ubiquitination, the highest level of phosphorylation modification of SAMHD1 was observed in tumors, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemical experiments showed that phosphorylated SAMHD1 ( Thr592) was expressed higher in gastric adenocarcinoma than that in normal mucosal tissue adjacent to the cancer, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Western blot assay showed that SAMHD1 protein expression was elevated in MKN-45 cells in the overexpression wild type and mutant groups, and phosphorylated SAMHD1 levels were also elevated in the wild type, T592E and HD/AA groups. CCK-8 assay showed that both SAMHD1 wild type and T592A could inhibit gastric cancer cell proliferation, while T592E and HD/AA had no effect on gastric cancer proliferation. On the basis of overexpression of SAMHD1, CCK-8 suggested that cell proliferation was inhibited after adding different concentrations of Palbociclib treatment, and Western blot assay suggested that the phosphorylation level was also reduced. NRK protein was obtained by Co-IP and mass spectrometry identification to screen the SAMHD1 reciprocal protein profile and database intersection, and NRK was found to interact with SAMHD1 protein and promote phosphorylation at SAMHD1 Thr592 site by Co-IP and Western blot assay. **Conclusion** Phosphorylation of the Thr592 site contributes to the loss of SAMHD1's ability to inhibit gastric cancer cell proliferation, which is reversed by Palbociclib. NRK interacts with SAMHD1 protein, promoting phosphorylation of the SAMHD1 Thr592 site.

**Key words** SAMHD1; phosphorylases; Thr 592; gastric cancer; cell proliferation