

IEX-1 相互作用蛋白的筛选与鉴定*

刘立宏¹⁾ 李辉¹⁾ 李洁²⁾ 欧阳玉蓉¹⁾ 郭鸿彬¹⁾ 崔云鹤¹⁾ 刘颖颀¹⁾ 肖涛^{1)**}

(¹⁾中南大学湘雅二医院骨科、创伤骨科研究室, 长沙 410011; ²⁾株洲一医院肾内科, 株洲 412000)

摘要 骨肉瘤即原发于骨的恶性肿瘤, 易发生早期肺转移且预后差, 恶性程度高。本研究小组前期研究发现, IEX-1 在骨肉瘤中具有重要作用。为了阐明其作用机制, 本研究运用酵母双杂交技术筛选其相互作用蛋白, 共鉴定出 12 个 IEX-1 相互作用蛋白, 包括生物氧化相关酶类、分子伴侣、信号转导相关蛋白等。并首次证实 clusterin(CLU, 又名载脂蛋白 J)与 IEX-1 存在相互作用, 两者在细胞中具有很好的共定位。采用 RNAi 干扰减低骨肉瘤细胞中内源性 CLU 表达水平, 显著抑制了细胞增殖与细胞侵袭能力。为阐明 IEX-1 在骨肉瘤发生发展中的作用机制提供了重要的线索, 为骨肉瘤的早期诊治及预后监测提供了新的靶点。

关键词 IEX-1, 骨肉瘤, clusterin, 蛋白质相互作用, 酵母双杂交

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00020

骨肉瘤恶性程度高, 侵袭力强, 易发生早期肺转移, 预后差, 严重影响青少年身心健康。目前治疗手段以手术为主, 全身性化疗为辅的综合治疗, 病人 5 年存活率有一定程度增加^[1]。但这种用于化疗的细胞毒性药物副作用大, 加之肿瘤细胞具有内在性和获得性抗肿瘤药物的多药耐药(MDR)特性, 常导致化疗效果不佳^[2], 终其原因是对骨肉瘤的发病机制缺乏深入了解, 缺乏骨肉瘤靶向治疗药物。

本小组前期研究发现, 早期应激基因 IEX-1 在骨肉瘤中表达水平比癌旁组织和软骨瘤组织高, siRNA “沉默” IEX-1 基因后, MG-63 细胞凋亡率增高, 并且出现了细胞周期 G1 期阻滞, 电镜观察细胞出现了凋亡特征性变化^[3]。进一步实验发现, IEX-1 在 1.0 mol/L 的 As₂O₃ 作用 MG-63 细胞后, 表达水平显著下调, 细胞发生明显的凋亡^[4]。深入研究发现, p53 通过结合 IEX-1 启动子区抑制其转录, 而 p53 基因位点丢失可见于 75% 的骨肉瘤患者组织样本, 突变型 p53 蛋白只出现于恶性或半恶性骨肿瘤中, 而不出现于良性骨肿瘤和反应性骨病变^[5]。同时发现, As₂O₃ 干预骨肉瘤细胞系 MG-63 后, 能诱导 p53 蛋白表达上调, 增加的 p53 蛋白通过与 IEX-1 的启动子结合, 抑制 IEX-1 的转录, 导

致 IEX-1 基因的表达下调, 证实了 IEX-1 基因在骨肉瘤中的重要功能及作用机制^[6]。以上研究充分合理解释为在骨肉瘤细胞中 IEX-1 表达上调是由于 p53 突变后解除转录抑制作用, 另外也显示出 IEX-1 作为治疗靶点的前景。然而, 目前关于骨肉瘤中 IEX-1 对下游靶基因及其相关信号通路的调节并不十分清楚, 寻找相互作用蛋白对阐明信号通路是非常有效的研究策略和切入点。本研究中, 我们应用酵母双杂交筛选鉴定出 IEX-1 相互作用蛋白, 进一步采用免疫共沉淀、免疫荧光共定位验证其相互作用蛋白, 并初步探讨证实的互作蛋白在骨肉瘤中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

引物合成(上海生工生物工程技术有限公司)

* 国家自然科学基金面上项目(30571883)和湖南省自然科学基金重点项目(09JJ3081)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-85292168, E-mail: xiaotaoyl@163.com

收稿日期: 2013-06-26, 接受日期: 2013-09-28

司); DNA 聚合酶、T4 连接酶、内切酶(NEB 公司); Lipofectamine 2000, Alexa Fluor® 488-anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 546 anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 546 anti-rabbit IgG, 酵母双杂交试剂盒及 cDNA 文库购自 Invitrogen 公司; 所用的酵母菌株为 CLONTECH 系统的 AH109.MG-63, U2OS 细胞系本实验室保存; myc、flag 抗体购自 BD 公司; IEX-1、clusterin(CLU)多克隆 / 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; Tip100 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM 培养基(Gibical 公司); CCK8 购自 Dojindo 公司; RNAi 干扰序列由上海吉玛公司合成.

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交筛选 IEX-1 相互作用蛋白. 用 Trizol 常规方法提取 MG-63 细胞总 RNA; RT-PCR 扩增 IEX-1 基因编码区, 产物电泳回收后双酶切连入 pDBLeu 载体, 酶切鉴定后测序验证(引物参考表 1). pDBLeu-IEX-1 和 pDBLeu 空载体分别转化 AH109 酵母感受态细胞, 随机挑取、划线进行自激活检测. 使用诱饵质粒 pDBLeu-IEX-1, 转化感受态细胞. 同时设立阳性对照 (pGADT7-T + pGBKT7-53)和阴性对照(pGBKT7-53+pGADT7-lam), 将菌液涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上初步筛选阳性克隆, 初筛得到阳性克隆进一步行 X-α-gal 显色确认. 此外, 将筛选出 cDNA 融合质粒分别与 pDBLeu-IEX-1 共转化入 AH109 酵母进

行回转验证. 提取真阳性的克隆中 cDNA 融合质粒, 测序, 进一步生物信息分析.

1.2.2 免疫共沉淀验证蛋白质相互作用. 常规构建 pcDNA3.1-IEX-1-myc 和 pcDNA3.1-CLU-flag 质粒, 脂质体转染质粒按照操作说明书进行. MG-63 细胞转染 24 h 后, RIPA 于冰上裂解 30 min. 4℃ 12 000 g 离心 30 min 后收集上清, 取 20 μl 上清, 加入同体积 2×SDS 上样液混匀, 100℃ 煮沸变性后保存备用, 其余上清行免疫沉淀. 每 1 ml 上清中加入 50 μl Protein A Agarose 预吸附, 4℃ 转转 1 h, 4℃ 12 000 g 离心 20 min, 收集上清. 1 ml 经预吸附的上清中加入 4 μg 相应的单克隆抗体(CLU: flag; IEX-1: myc, 阴性对照为非免疫小鼠 IgG) 4℃ 转转 30min, 再加入 50 μl Protein G Agarose, 4℃ 转转 2 h 后离心收集沉淀. 用裂解液洗涤沉淀 3 次, 去上清加入 SDS 上样缓冲液, 100℃ 煮沸 10 min, 离心取上清行 10 %SDS-PAGE, 并将蛋白转至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜封闭 1 h 后加入相应的一抗室温下孵育 1 h, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体室温下孵育 45 min, 洗膜后用 ECL 试剂显影.

1.2.3 免疫荧光共定位检测. pcDNA3.1-IEX-1-myc 和 pcDNA3.1-CLU-flag 按脂质体操作说明共转染 MG-63 细胞. 转染 24 h 后用 3.7%的多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS/0.1%Triton X-100 渗透 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 5%BSA 封闭 30 min. 加一抗室温 1 h(anti-Flag, anti-c-Myc 单克隆抗体), PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min. 加二抗室温 40 min (Alexa Fluor® 488- anti-mouse IgG 和 Alexa Fluor® 546 anti-mouse IgG), PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min(避光操作). DAPI 染细胞核 1 h, PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min(避光操作). 封片后, 用激光共聚焦显微镜扫描和照相.

1.2.4 MG-63 细胞增殖及细胞划痕实验. 骨肉瘤细胞系 MG-63 和 U2OS 细胞接种于 60 mm 培养皿, 常规进行培养, 实验前 24 h 换培养基. 寡核苷酸细胞转染根据 Lipofectamine2000 试剂操作指南进行, 按照实验设计需要设空白对照组, ctr-scramble 对照(ctr-scramble)和干扰组. 转染体系如下: 脂质体 5 μl, 待检或对照 25 nmol/L, Opti-DMEM 培养液 250 μl. 每个质粒至少单独转染 3 次. 脂质体转染 48 h 后, 细胞消化按 5×10³ 细胞浓度接种于 96 孔板, 每组 4 个复孔, 继续培养 24 h 检测. 于检测前 2 h 加入 CCK8 试剂(10 μl/100 μl 培养液),

Table 1 Primers sequence

Primers	Sequence(5'→3')
pDBLeu-IEX-1-F	GG <u>ACTA</u> GTatgtgtcactctcgagctg
pDBLeu-IEX-1-R	ACGCGGCCGCgaagcgccgggtgttc
pcDNA 3.1-IEX-1 Myc-F	GGGAATTCatgtgtcactctcgagctg
pcDNA 3.1-IEX-1 Myc-R	ACA <u>AAGCTT</u> gaagcgccgggtgttc
pcDNA 3.1-CLU Flag-F	GGA <u>AAGCTT</u> atgatgaagactctgctgtg
pcDNA 3.1-CLU Flag-R	GG <u>ACTA</u> Gccgtgcttttgcgtattc
CLU-RNAi-1	agaaagcgctgcaggaata
CLU-RNAi-2	caatgagctccaggaatg
Scramble	cagtcgcgtttgcgactgg

pDBLeu-IEX-1-F and pDBLeu-IEX-1-R were primers using for construction of plasmids of IEX-1 which was used as bait of yeast hybridization. pcDNA 3.1-IEX-1 Myc-F/R and pcDNA 3.1-CLU Flag-F/R were primers using for construction of overexpressing plasmid of candidate genes. CLU-RNi-1/-2 are synthesized RNAi target sequence and Scramble served as control which can't match with any human genomes. Restrict enzyme sites was marked by underlined letters.

10 μ l 1%(w/v) SDS 终止, 于 450 nm 处检测, 测定温度为 25℃, 重复测 3 次, 计算平均值. 细胞划痕实验转染操作同增殖实验, 转染后细胞接种于 6 孔板, 加样器枪头比着直尺, 尽量垂直于背后的横线划痕, 不能倾斜. 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基. 放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养. 分别于 0、6、12、24 h 拍照备用.

1.2.5 数据处理及分析. 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS11.0 软件进行统计学分析. 组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析. 各组均数间两两比

较, 方差齐, 用 LSD 法分析, 方差不齐, 用 Dunnett's T3 法分析.

2 结 果

2.1 酵母双杂交文库筛选

首先进行 pDBLeu-IEX-1 的毒性和自激活检测, 没有发现自激活存在后进行转化效率检测, 10⁻⁷ 倍稀释的培养基平板上共有 44 个单克隆, 转化效率为 4.4×10⁶(图 1a). 以 IEX-1(IER3)作为诱饵筛选成人肝脏 cDNA 文库, 酵母双杂交共筛选出

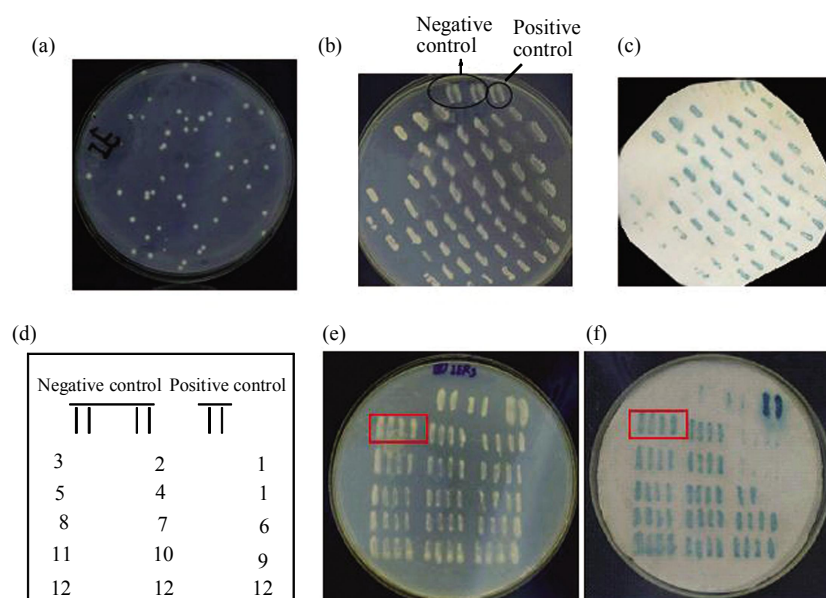


Fig. 1 Interacting protein screening via yeast two hybrid system

(a) Transformation efficiency test: a total of 44 clone glowed in 10⁻⁷ fold dilution medium plates which means that the efficiency is 4.4×10⁶. (b) Reporter gene staining: AH109 cells transformed with pDBLeu-IEX-1 and Liver cDNA library were coated in growth medium. pGADT7-T+pGBKT7-53 and pGBKT7-53 served as positive and negative control respectively. (c) Image of X-gal staining. (d~f) Positive clone verification. (d) Schematic diagram of verification study. (e) SD-Leu-Trp medium. (f) X-Gal staining shows LacZ positive clones. pGADT7-T+pGBKT7-53 and pGBKT7-53+pGADT7-lam served as positive and negative control respectively. CLU gene clone was indicated by a red box.

12 个阳性克隆(图 1b, c). 提取 12 个克隆中 cDNA 融合质粒, 与 pDBLeu-IEX-1 共转化入酵母株回转变验证, 结果表明 12 个克隆为真阳性克隆(图 1d~f). 将真阳性克隆扩大培养、提质粒后测序, 查出该 cDNA 融合质粒对应的基因(表 2).

2.2 免疫共沉淀验证 IEX-1 与 CLU 相互作用

带有 Flag 标签 CLU 与 Myc 标签的 IEX-1 过表达质粒共转染 MG-63 骨肉瘤细胞系, 无论是用 IEX-1-Myc 免疫沉淀, CLU-Flag 检测(图 2a), 还是 CLU-Flag 免疫沉淀, IEX-1-Myc 检测(图 2b), 都

Table 2 Sequencing results of positive clones

Positive clone genes	NM number	Growth medium	Number of verification clones
CRP	NM_000567	LacZ ⁺ /His ⁻ /Ade ⁻	1
SLC39A14	NM_015359	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	2
CLU	NM_203339	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	3
PRRC1	NM_130809	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	4
TNKS1BP1	NM_033396	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	5
CTSB	NM_147780	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	6
HSPH1	NM_006644	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	7
ALB	NM_000477	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	8
LRG1	NM_052972	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	9
DNAJB9	NM_012328	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	10
TNFAIP3	NM_006290	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	11
FGA	NM_021871	LacZ ⁺ /His ⁺ /Ade ⁺	12

显示 IEX-1 与 CLU 能相互作用. Input 为全细胞裂解液.

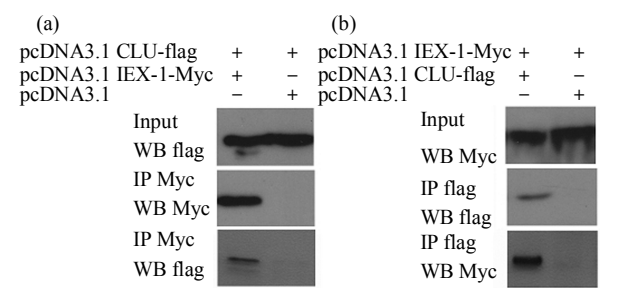


Fig. 2 Verification of interaction between CLU and IEX-1
Cells were transfected with control empty vector, pcDNA3.1 CLU-flg, pcDNA3.1 IEX-1-Myc and control vectors as shown on top of the panel. IEX-1 was immunoprecipitated (IP) followed by immunoblotting (IB) with an anti-Myc antibody and immunoprecipitated CLU were shown(a). CLU was immunoprecipitated(IP) followed by immunoblotting (IB) with an anti-Myc antibody and immunoprecipitated IEX-1 were shown (b).

2.3 IEX-1 与 CLU 显示很好的共定位

带有 Flag 标签 CLU 与 Myc 标签的 IEX-1 过表达质粒共转染 MG-63 骨肉瘤细胞系, 免疫荧光染色显示两者在胞浆具有很好的共定位. 进一步提示两者在细胞内可能存在相互作用 (图 3).

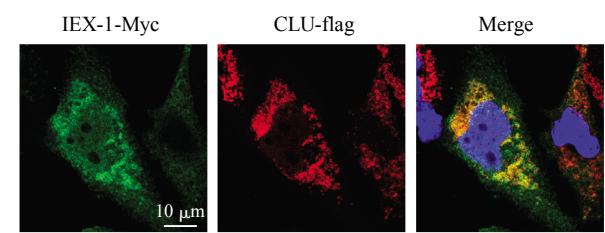


Fig. 3 Co-localization of IEX-1 and CLU
MG-63 cells over expressing Myc-tagged IEX-1 and Flag-tagged CLU were immunostained with anti-Myc (green) and anti-Flag antibodies (Red). IEX-1 was found to co-localize with CLU protein in cytoplasmic. Nuclei were stained with DAPI (blue).

2.4 CCK8 检测 clusterin RNA 干扰对骨肉瘤细胞系增殖的影响

首先对 RNA 的敲减效率进行验证, 如图 4a 和 b 所示, 所选用的两条 RNAi 干扰序列, RNAi-2 的抑制效果相当好, 在后续试验中都采用该序列进行功能研究. 运用 RNAi 干扰敲减内源性 MG-63 和 U2OS 细胞 CLU 基因表达水平, 导致骨肉瘤细胞生长增殖缓慢. MG-63 细胞 RNAi 干扰 CLU 后, 细胞增殖能力(0.442 ± 0.120)相当于正常细胞(1.000 ± 0)的 44.2%和 Scramble 对照组(0.942 ± 0.091)的 46.9%; U2OS 细胞 RNAi 干扰 CLU 后, 细胞增殖能力(0.512 ± 0.107)相当于正常细胞(1.000 ± 0)的 51.2%和 Scramble 对照组(0.929 ± 0.110)的 55.1% (图 4).

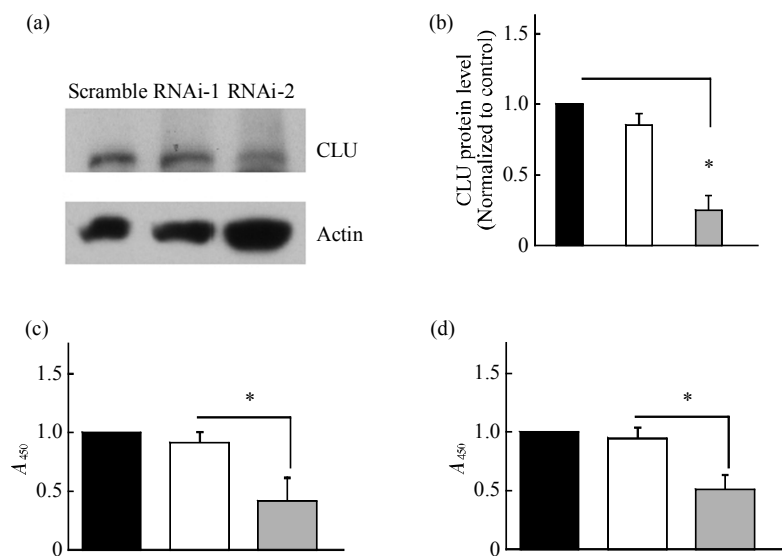


Fig. 4 Cell proliferation test

(a, b) Representative blots showing the knockdown of CLU in MG-63 cell lines. Quantitative results are average based on three independent experiments ($\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$). Knock down of endogenous clusterin (CLU) expression level suppressed the proliferation of MG-63 (c) and U2OS (d) cells. The scramble sequence which does not match to any human genome was used as control. * $P < 0.05$. (b) ■: Control-scramble; □: RNAi-1; ▨: RNAi-2. (c) ■: MG-63; □: Control-scramble; ▨: Clusterin-RNAi. (d) ■: U2OS; □: Control-scramble; ▨: Clusterin-RNAi.

2.5 Clusterin 抑制 U2OS 细胞侵袭能力

运用 RNAi 干扰减低骨肉瘤细胞系 U2OS 内源性 CLU 表达水平, 通过细胞刮痕实验评价其对肿瘤细胞迁移侵袭能力的影响. 结果发现 clusterin 干扰后相比正常细胞和 Scramble 对照组, U2OS 细胞侵袭能力下降显著(图 5).

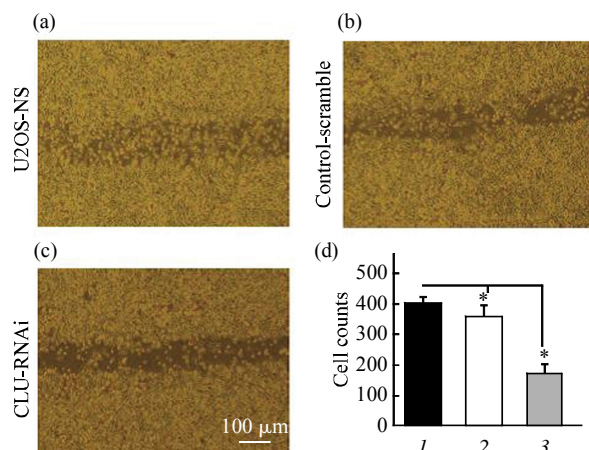


Fig. 5 Scratches invasion assay

Knock down of endogenous Clusterin (CLU) expression level suppressed the proliferation of MG-63 (a) and U2OS (b) cells. The scramble sequence which does not match to any human genome was used as control. * $P < 0.05$. 1: U2OS-NS; 2: Control-scramble; 3: CLU-RNAi.

3 讨 论

IEX-1 首次发现于人类 X 射线照射引起的肿瘤细胞中, 广泛表达于人体各组织细胞中^[7]. 已有研究表明 IEX-1 功能具有组织细胞特异性, 可正性或负性影响细胞生物学功能^[8]. IEX-1 过表达可抑制细胞生长, 促进细胞凋亡^[9]. 亦有研究表明 IEX-1 具有抗凋亡作用^[10], IEX-1 转基因鼠研究表明 IEX-1 可抑制细胞凋亡^[11]. 另有研究表明 IEX-1 基因在很多肿瘤细胞系中高表达^[12-13]. 目前研究证实, IEX-1 与肿瘤的发生、发展有密切关系.

IEX-1 在骨肉瘤中作用研究较少, 本小组首次建立 IEX-1 与骨肉瘤的联系. As_2O_3 可诱导骨肉瘤细胞系 MG-63 凋亡^[4]. As_2O_3 处理 MG-63 细胞 48 h, 出现明显的细胞增殖抑制, 电镜观察细胞出现典型的凋亡特征. 基因芯片分析发现, 早期应答基因 IEX-1 表达明显下调^[3]. 进一步通过萤光素酶分析、EMSA、Western blot 等实验, 发现 As_2O_3 干预骨肉

瘤细胞系 MG-63 后能诱导 p53 蛋白表达上调, 增加的 p53 蛋白通过与 IEX-1 的启动子结合, 转录抑制 IEX-1 基因, 导致 IEX-1 基因表达下调^[6]. 为更深入研究 IEX-1 在骨肉瘤中的作用, 本研究运用酵母双杂交技术筛选 IEX-1 相互作用蛋白. 共筛选出 12 个阳性克隆. 选择 CLU 作为候选蛋白进行相互作用验证及部分功能研究. 进一步的免疫共沉淀证实 IEX-1 与 clusterin 存在直接相互作用, 免疫荧光共定位实验显示两者存在很好的共定位. 采用 RNA 干扰降低骨肉瘤细胞系 U2OS 和 MG-63 的内源性 CLU 表达水平, 抑制细胞增殖. 此外, 细胞刮痕实验证实骨肉瘤细胞的迁移能力也下降, 表明 CLU 在骨肉瘤中具有重要的功能.

目前研究认为 clusterin 参与肿瘤的发生、发展^[14]. Clusterin (CLU, 又名载脂蛋白 J), 是一个分泌型硫化异二聚体糖蛋白, 因其可介导支持细胞聚集故名, 蛋白序列在进化中高度保守. 大量研究表明, CLU 参与体内许多生理过程: 介导细胞聚集、稳定细胞膜、促进生殖功能、细胞凋亡和细胞周期调节、DNA 损伤修复、细胞黏附及组织重塑中起重要作用^[15]. 进一步的研究发现, CLU 在多种病变组织中异常表达, CLU 上调表达可见于卵巢癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌和肺癌等恶性肿瘤组织内, 提示 CLU 可能在各种恶性肿瘤的发生、发展过程中起重要作用^[16-18]. 有研究报道, 高水平表达的 CLU 降低骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性诱导耐药^[19], 具体机制认为是 CLU 通过直接结合聚合的促凋亡蛋白 Bax, 抑制其诱导的细胞色素 C 释放, 导致细胞凋亡通路不能激活而促进细胞存活增殖^[20]. 更引人瞩目的是, Oncogenex 公司已经被批准针对 clusterin 的干扰 RNA 核酸(OGX-011) I 期和 II 临床试验取得很好的效果, OGX-011 可提高前列腺癌化疗、辐射和雄激素撤销的治疗效果, 在治疗局部晚期或转移性非小细胞肺癌中, 与吉西他滨或者顺铂联合使用, 可以显著延长病人的生存期. 与多西紫杉醇联合治疗晚期乳腺癌患者, 可改善病人生活质量, 延长生存时间, 通过诱导细胞凋亡导致肿瘤体积缩小 30% 以上^[21-22]. 以上研究充分说明, clusterin 作为靶点在骨肉瘤基因治疗中具有非常光明的前景.

本研究发现 IEX-1 与 CLU 存在相互作用, 且它们均可调节骨肉瘤细胞的增殖. 在已有文献和研究基础上, 我们推测, 骨肉瘤细胞面临外界刺激情况下, IEX-1 快速响应、稳定 CLU-Bax 复合物,

拮抗细胞凋亡, 从而促进肿瘤细胞存活、增殖, 导致骨肉瘤的发生、发展. 我们还在进行更深入的研究, 探讨其具体的作用机制.

参 考 文 献

- [1] Kager L, Potechner U, Bielack S, *et al.* Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, **6**: 279-286
- [2] Andreou D, Bielack S S, Carrle D, *et al.* The influence of tumor- and treatment-related factors on the development of local recurrence in osteosarcoma after adequate surgery. An analysis of 1355 patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *Ann Oncol*, 2011, **22**(5): 1228-1235
- [3] Xiao T, Li K H, Li G Y, *et al.* Mechanism of apoptosis of human osteosarcoma MG-63 induced by arsenic trioxide. *Journal of Central South University of Technology*, 2005, **12**(suppl 1): 317-321
- [4] 肖 涛, 李康华, 方建珍, 等. 三氧化二砷诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的实验研究. *湖南医科大学学报*, 2002, **27**(2): 111-113
Xiao T, Li K H, Fang J Z, *et al.* *J Central South University(Medical Sciences)*, 2002, **27**(2): 111-113
- [5] Wunder J S, Gokgoz N, Parkes R, *et al.* TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol*, 2005, **1**; **23**(7):1483-1490
- [6] 肖 涛, 朱 武, 姚茂金, 等. 三氧化二砷下调 MG-63 骨肉瘤细胞 IEX-1 基因表达的转录调控机制研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(7): 828-833
Xiao T, Zhu W, Yao M J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(7): 828-833
- [7] Feldmann K A, Pittelkow M R, Roche P C, *et al.* Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues. *Histochem Cell Biol*, 2001, **115**(6): 489-497
- [8] Arlt A, Schafer H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *Eur J Cell Biol*, 2011, **90**(6-7): 545-552
- [9] Schilling D, Pittelkow M R, Kumar R *et al.* IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes. *Oncogene*, 2001, **20**(55): 7992-7997
- [10] Wu M X, Ao Z, Prasad K V, *et al.* IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science*, 1998, **281**(5379): 998-1001
- [11] Zhang Y, Schlossman S F, Edwards R A, *et al.* Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(2): 878-883
- [12] Wu M X, Ustyugova I V, Han L, *et al.* Immediate early response gene X-1, a potential prognostic biomarker in cancers. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, **17**(5): 593-606
- [13] You F, Osawa Y, Hayashi S, *et al.* Immediate early gene IEX-1 induces astrocytic differentiation of U87-MG human glioma cells. *J Cell Biochem*, 2007, **100**(1): 256-265
- [14] Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*, 2010, **17**(1): R1-17
- [15] Shannan B, Seifert M, Leskov K, *et al.* Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ*, 2006, **13**(1): 12-19
- [16] Ahn H J, Bae J, Lee S, *et al.* Differential expression of clusterin according to histological type of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2008, **110**(2): 222-229
- [17] Bi J, Guo A L, Lai Y R, *et al.* Overexpression of clusterin correlates with tumor progression, metastasis in gastric cancer: a study on tissue microarrays. *Neoplasma*, 2010, **57**(3): 191-197
- [18] Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. (Translated from eng) *Endocr Relat Cancer*, 2010, **17**(1): R1-17
- [19] Lourda M, Trougakos I P, Gonos E S. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J. *Int J Cancer*, 2007, **120**(3): 611-622
- [20] Zhang H, Kim J K, Edwards C A, *et al.* Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol*, 2005, **7** (9): 909-915
- [21] Chi K N, Eisenhauer E, Fazli L, *et al.* A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**(17): 1287-1296
- [22] Chi K N, Hotte S J, Yu E Y, *et al.* Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2010, **28**(27): 4247-4254

Characterization of Interaction Protein for Osteosarcoma Related Protein IEX-1*

LIU Li-Hong¹⁾, LI Hui¹⁾, LI Jie²⁾, OUYANG Yu-Rong¹⁾, GUO Hong-Bin¹⁾,
CUI Yun-He¹⁾, LIU Ying-Qi¹⁾, XIAO Tao^{1)**}

¹⁾ Department of Orthopedics and Department of Osteocarcinoma Institute, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410010, China;

²⁾ Department of Nephrology, Zhuzhou NO.1 Hospital, Zhuzhou 412000, China)

Abstract Primary osteosarcoma is the most frequent malignant tumor in bone with early pulmonary metastasis and poor prognosis. Our previous study found that overexpression of IEX-1 in osteosarcoma plays an important role in initiation and development of osteosarcoma. In order to elucidate the mechanism of IEX-1 in osteosarcoma, we have screened its interaction proteins by using yeast two hybrid system. Twelve IEX-1 interacting proteins were identified, including biological oxidation related enzymes, chaperones, signal transduction related protein, etc. The interaction between IEX-1 and CLU was confirmed *in vitro* through co-immunoprecipitation in combination with Western blotting and immunostaining. Knock down of endogenous CLU expression in osteosarcoma cells significantly inhibit cell proliferation and cell invasion ability *in vitro*. This preliminary study on the molecular mechanisms that how IEX-1 promote the occurrence and development of osteosarcoma provides novel clues for early-stage diagnosis and target gene therapy of this malignant bone tumor.

Key words IEX-1, osteosarcoma, clusterin, protein interaction, yeast two-hybrid

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00020

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571883) and Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (09JJ3081).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-85292168, E-mail: xiaotaoyl@163.com

Received: June 26, 2013 Accepted: September 28, 2013