

MARCH2多克隆抗体的制备与鉴定及其在组织和细胞系中的表达与亚细胞结构中的定位

夏丹^{1,2*}, 韦志永², 刘文静², 訾臣²

¹山东医学高等专科学校病理教研室, 山东 临沂

²临沂市人民医院病理科, 山东 临沂

收稿日期: 2024年9月23日; 录用日期: 2024年10月15日; 发布日期: 2024年10月24日

摘要

目的: 探讨MARCH2多克隆抗体的制备、鉴定与纯化的方法以及其在组织和细胞系中的表达情况、在亚细胞结构中的定位情况。方法: 利用DNASTAR软件对MARCH2蛋白的抗原性等进行分析, 化学合成MARCH2短肽, 制备成完全抗原免疫家兔, 获取血清, 纯化, 用Western blot、Elisa、免疫荧光进行鉴定。用RT-PCR检测MARCH2在细胞系中的表达情况, 用Western blot检测MARCH2在组织中的表达情况。用免疫荧光法及激光共聚焦显微镜分析检测MARCH2在亚细胞结构中的定位。结果: 成功制备完全抗原免疫家兔, 纯化出多克隆抗体, 用Western blot、Elisa、免疫荧光法证实多克隆抗体制备成功。利用半定量RT-PCR方法, 在32种细胞系中检测了MARCH2 mRNA的表达水平, 结果显示, MARCH2呈广泛表达, 在HeLa、U2OS、HCT116、COS7细胞中表达最高, 在SKBR3、HGC-27、MGC-803细胞中低表达。利用组织芯片及免疫组织化学方法进一步分析了其在正常组织及肿瘤组织中的表达情况, 染色结果显示, MARCH2呈广泛表达, 在前列腺、肝组织中呈高表达, 在横纹肌、甲状腺组织中呈低表达, 主要在胞浆中呈现弥漫均匀细颗粒状分布。此外, MARCH2表达因肿瘤类型的不同有差异。与对应的正常组织相比, MARCH2在某些肿瘤(如前列腺癌、肝癌)组织中表达降低, 而在某些肿瘤(如食管癌、结肠癌)组织中表达增高。用免疫荧光法及激光共聚焦显微镜分析检测MARCH2在亚细胞结构中的定位, 发现MARCH2与内质网、高尔基体共定位, 与溶酶体、内体部分共定位, 与线粒体没有共定位。结论: 成功获得了MARCH2多克隆抗体, 为进一步研究MARCH2蛋白的功能奠定了基础。MARCH2在不同类型肿瘤中的差异表达及其在亚细胞结构中的定位高度提示MARCH2在肿瘤发生发展中具有重要的潜在应用价值。

关键词

MARCH2, 多克隆抗体, 免疫组织化学, 亚细胞结构定位, 组织芯片

*通讯作者。

Preparation and Identification of MARCH2 Polyclonal Antibodies and Their Expression and Subcellular Structural Localization in Tissues and Cell Lines

Dan Xia^{1,2*}, Zhiyong Wei², Wenjing Liu², Chen Zi²

¹Department of Pathology, Shandong Medical College, Linyi Shandong

²Department of Pathology, Linyi People's Hospital, Linyi Shandong

Received: Sep. 23rd, 2024; accepted: Oct. 15th, 2024; published: Oct. 24th, 2024

Abstract

Aims: To explore the preparation, identification, and purification methods of MARCH2 polyclonal antibodies, as well as their expression and subcellular structural localization in tissues and cell lines. **Methods:** DNASTAR software was used to analyze the antigenicity of MARCH2 protein, and MARCH2 short peptides were chemically synthesized to prepare complete antigen-immunized rabbits. Serum was obtained, purified, and identified by Western blot, Elisa, and immunofluorescence. RT-PCR was used to detect the expression of MARCH2 in cell lines, and Western blot was used to detect the expression of MARCH2 in tissues. Immunofluorescence and confocal laser microscopy were used to analyze and detect the localization of MARCH2 in subcellular structures. **Results:** Fully antigen-immunized rabbits were successfully prepared, and polyclonal antibodies were purified. Western blot, Elisa, and immunofluorescence were used to confirm the successful preparation of polyclonal antibodies. Using semi-quantitative RT-PCR method, the expression level of MARCH2 mRNA was detected in 32 cell lines. The results showed that MARCH2 was widely expressed, with the highest expression in HeLa, U2OS, HCT116, and COS7 cells, and low expression in SKBR3, HGC-27, and MGC-803 cells. The expression of MARCH2 in normal and tumor tissues was further analyzed using tissue chips and immunohistochemical methods. The staining results showed that MARCH2 was widely expressed, with high expression in prostate and liver tissues, low expression in striated muscle and thyroid tissues, and mainly distributed in a diffuse and uniform granular form in the cytoplasm. In addition, MARCH2 expression varies depending on the type of tumor. Compared with corresponding normal tissues, MARCH2 expression is reduced in certain tumor tissues (such as prostate cancer and liver cancer), while it is increased in certain tumor tissues (such as esophageal cancer and colon cancer). Using immunofluorescence and laser confocal microscopy to analyze and detect the localization of MARCH2 in subcellular structures, it was found that MARCH2 was co-localized with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, with lysosomes and endosomes partially, but not with mitochondria. **Conclusions:** MARCH2 polyclonal antibodies have been successfully obtained, laying the foundation for further research on the function of MARCH2 protein. The differential expression of MARCH2 in different types of tumors and its localization in subcellular structures highly suggest that MARCH2 has important potential application value in tumor occurrence and development.

Keywords

MARCH2, Polyclonal Antibody, Immunohistochemistry, Subcellular Structural Localization, Tissue Chip

Copyright © 2024 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. 引言

MARCH (Membrane Associated, RING-CH)家族是一个结构上相关联的蛋白家族, 其成员结构特点为由 N 端的 RING-CH 结构域和紧连的 C 端两个或多个跨膜区组成[1]。这种跨膜 RING-CH finger 蛋白具有多种生物学功能, 如免疫调节、蛋白质控和膜运输[1]。

目前, MARCH 家族有 11 个成员(MARCH-I-XI)。2022 年, Luo 团队[2]研究发现, 高温条件下 E3 泛素连接酶 MARCH-IX 能够使 ATG9A 发生 K63 位泛素化修饰, ATG9A 进而与维持高尔基体片层结构的蛋白 GRASP55 互作, 并抑制 GRASP55 的寡聚化, 抑制了 GRASP55 连接高尔基体片层的作用, 最终引起高尔基体片段化。

MARCH-II 基因是 Bartee 课题组在 2004 年发现[1], 定位于 19p13.2, 基因全长 25746 bp, 其开放读码框编码 246 个氨基酸, 相对分子量 26995 Da。MARCH-II 是二次跨膜蛋白, 由 N 端 RING domain、中间的二次跨膜区和 C 端的 PDZ domain 构成。最近, Umthong 课题组[3]揭示了人类 MARCH2 用于限制 HIV-1 的抗病毒机制, 这对所有具有抗病毒功能的 MARCH 蛋白都有潜在的意义。Yu 研究团队[4]在 GUT (IF 25)发表的研究揭示了胰腺导管腺癌血浆细胞外囊泡长链 RNA (exLR)表达谱, 并鉴定了 8 个 exLRs (FGA, KRT19, HIST1 H2BK, ITIH2, MARCH2, CLDN1, MAL2, TIMP1)用于诊断胰腺导管腺癌, MARCH2 是诊断标志物之一, 并且诊断标志显示出很高的准确性。为了更好地研究 MARCH2 的功能及其与肿瘤的相关性, 本研究制备了 MARCH2 多克隆抗体, 并用 RT-PCR 检测 MARCH2 在细胞系中的表达情况, 用 Western blot 检测 MARCH2 在正常组织及肿瘤组织中的表达情况。用免疫荧光法及激光共聚焦显微镜分析检测 MARCH2 在亚细胞结构中的定位, 为进一步研究 MARCH2 的生物学功能奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. MARCH2 多克隆抗体的制备

用化学合成的 MARCH2 肽段 KDPGPRTEKRTL 和 SEWRKTNQKVR (杭州中肽生化有限公司), 偶联 KLH 后免疫动物。选用成年雄性新西兰兔, 初次免疫将 300 μg 的抗原用 PBS 稀释至 1 ml 后与等体积的弗氏完全佐剂充分混合, 于两足部各 0.25 ml 皮下注射, 其余后背部皮下多点注射。之后每 3 周加强免疫一次, 用量同前, 全部后背部皮下多点注射。最后一次加强免疫后 10 天取兔耳缘静脉血样检测效价, 至效价达 $1:10^5$ 以上, 将家兔处死心脏取血, 获取血清。

2.2. MARCH2 多克隆抗体的纯化与鉴定

用 CNBR 活化的 Sepharose 4B (胜创生物科技有限公司)偶联肽段 KDPGPRTEKRTL 和 SEWRKTNQKVR 制备的亲的和层析柱。然后加入抗 MARCH2 的兔免疫血清 4℃ 旋转混合过夜, 用 PBS 冲洗柱料, 然后使用 0.1 M 甘氨酸缓冲液洗脱(pH 2.4)洗脱。每毫升洗脱液中加入 50 μl 1 M Tris (pH 9.0)中和后, 置于 4℃ 用 pH 7.4 PBS 大体积透析, 更换三次, 每次间隔 8 小时, 浓缩后备用。

MARCH2 多克隆抗体的 Western blot 鉴定: 将 MARCH2 表达质粒或空载体转染 HeLa 细胞 24 小时后收取细胞, 提取总蛋白并进行 Western blot 检测, MARCH2 多克隆抗体的使用终浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

MARCH2 多克隆抗体的细胞免疫荧光鉴定: 将 MARCH2-MYC 表达质粒转染 HeLa 细胞 24 小时后,

4%多聚甲醛固定, 4℃, 30 分钟, 然后用 0.2%的 Triton X-100 渗透化处理, 室温 30 分钟, 10% BSA 室温封闭 30 分钟, 然后同时加入 10% BSA 稀释的鼠抗 MYC 抗体和兔抗 MARCH2 抗体进行细胞免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察。

2.3. 细胞培养及转染

HeLa、U2OS、HCT116、A549、HEK293T 和 COS7 等 32 种细胞来源于本实验室, 均培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 常规传代。

质粒转染用 Megatran 1.0, 按产品说明书所述进行。操作步骤如下:

1) 细胞培养: 将 HeLa、U2OS、HEK293T 和 COS7 等细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基铺在细胞培养板中, 在 5% CO₂、37℃的培养箱中培养 24 小时。

2) 制备 DNA-Megatran 1.0 复合物: 用 Opti-MEM 稀释 DNA, 缓慢混合均匀; 加入 3 μL Megatran 1.0 对应每 μg 质粒, 混合均匀, 在室温下放置 10 分钟后, 以形成 DNA-Megatran 1.0 复合物。使用相同总量的 pEGFP-N1 质粒表达绿色荧光蛋白以检测转染效率。

3) 转染: 将 DNA-Megatran 1.0 复合物缓慢滴入细胞培养板, 轻微摇匀。在 5% CO₂、37℃的培养箱中培养, 孵育后的 4~6 小时内更换培养基。转染 24 小时后于荧光显微镜下观察 pEGFP-N1 孔的转染效率。

2.4. RT-PCR

从 RNA (或 mRNA) 反转录合成 cDNA 第一链, 于 95℃加热 5~10 min, 灭活反转录酶, 使 RNA-cDNA 杂交体变性, 然后迅速冰浴冷却, PCR 扩增。cDNA 第一链合成方法: 20 ul 反应液中含 10×PCR 扩增缓冲液, 2 ul; 四种 dNTP (10 mmol/L) 2 ul; RNA 酶抑制剂 20 U; mRNA, 1~2 ug (或 RNA 5~10 ug); AMV, 20 U; 引物, 1 u; 最后用灭菌水补至 20 ul。以上溶液充分混匀后, 于 42℃反应 60 min, 反应完毕后反应管在 95℃下加热 5 min, 使反转录酶失活和 RNA-cDNA 杂交体变性。其后反应液则可置于-20℃下保存备用。

2.5. 组织芯片免疫组化

具体步骤如下:

- 1) 脱蜡: 组织芯片置于二甲苯中浸泡 20 分钟, 换新鲜二甲苯重复一次。
- 2) 再水化: 将脱蜡后的组织切片于 100%乙醇中浸泡 5 分钟 2 次, 95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各浸泡 5 分钟 × 1 次。
- 3) 抗原修复: 抗原修复液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 将抗原修复液微波高温加热至沸腾, 将切片放入, 再用微波高火加热 5 分钟, 补加蒸馏水恢复体积后再用微波高温加热 5 分钟, 自然冷却至室温。
- 4) 去除内源性过氧化物酶: 新鲜配制 3% H₂O₂, 滴片, 室温下避光孵育 10 分钟。
- 5) 封闭: 用正常羊血清工作液室温封闭 20 分钟。
- 6) 一抗反应: 用 10 μg/mL 兔抗人 MARCH2 一抗(以 PBS 稀释)滴片, 37℃孵育 1 小时, 对照组以 PBS 代替一抗; PBS 洗 5 分钟 × 3 次。
- 7) 二抗反应: HRP-羊抗兔抗体 1:200 稀释(以 PBS 稀释), 室温反应 30 分钟。
- 8) PBS 洗 5 分钟 × 3 次。
- 9) 二氨基联苯氨(DAB)显色, 滴片, 镜下观察反应结果。
- 10) 苏木精复染细胞核, 自来水蓝化。
- 11) 乙醇上行脱水: 50%乙醇 5 分钟, 75%乙醇 5 分钟, 95%乙醇 5 分钟, 100%乙醇 5 分钟 × 2 次。
- 12) 中性树胶封片, 于光学显微镜下观察并记录结果。

2.6. 激光共聚焦显微镜观察

HeLa 细胞铺入共聚焦小皿中大约长至 60%~80%密度, 使用 Megatran 1.0 转染带荧光蛋白标签或不带标签的相应蛋白表达质粒, 转染 24 小时后, 细胞用 4%多聚甲醛固定或进一步进行免疫荧光染色, Hoechst33342 染核, PBS 冲洗三次, 置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.7. 统计学分析

以上数据的标准差代表实验中不同分组之间的差异, 以上实验均至少重复三次; Student's *t* 检验分析各组之间是否存在显著性差异, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3. 结果与分析

3.1. MARCH2 多克隆抗体的制备、鉴定和纯化

利用 DNASTar 软件对 MARCH2 蛋白的抗原性、亲疏水性、表面暴露性等进行分析(图 1(A))。在此基础上, 化学合成 MARCH2 两条短肽: KDPGPRTEKRTL 和 SEWRKTNQKVR(图 1(A), 两个方框内的序列), 并用这两个肽段与载体蛋白 KLH 制备成完全抗原免疫家兔, ELISA 分析抗体的效价, 结果发现, KDPGPRTEKRTL 肽段的抗原性较好, 能够刺激家兔产生高效价的抗体(效价达 $1:10^5$ 以上), 将家兔处死, 心脏取血, 获取血清。血清用偶联 KDPGPRTEKRTL 肽段的 Sepharose 4B 亲和柱进行纯化, 获得的抗 MARCH2 兔多克隆抗体进行分析鉴定。该抗体既能检测内源性 MARCH2 表达, 也能检测外源性 MARCH2 表达。在 HeLa 细胞中转染 Vector 或 MARCH2-MYC 质粒, 24 h 后收集细胞, Western blot 检测 MARCH2 表达水平。结果发现, MARCH2-MYC 质粒转染组 MARCH2 蛋白水平显著升高, 表明该抗体能够用于 MARCH2 的 Western blot 检测(图 1(B))。我们也进行了免疫荧光分析, 在 HeLa 细胞中转染 MARCH2-MYC 质粒, 24 h 后收集细胞, 利用 MARCH2 和 MYC 抗体染色, 结果两者分布完全重叠, 表明该抗体能够用于 MARCH2 的免疫荧光检测(图 1(C))。这些结果说明我们制备的 MARCH2 抗体既能识别线性决定簇, 也能识别空间决定簇。

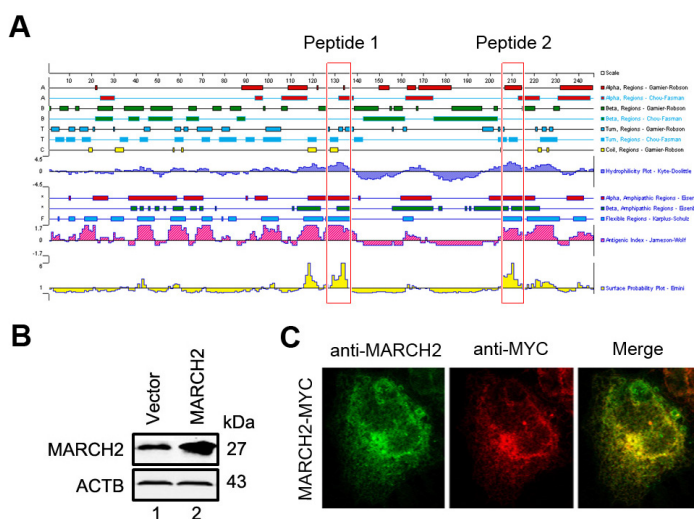


Figure 1. Identification of MARCH2 rabbit anti-human antibody: (A) Analysis of antigenicity, hydrophilicity, hydrophobicity, and surface exposure of proteins; (B) Western blot identification of rabbit anti-MARCH2 polyclonal antibody; (C) Immunofluorescence identification of rabbit anti-MARCH2 polyclonal antibody

图 1. 兔抗人 MARCH2 抗体的鉴定: (A) 蛋白的抗原性、亲疏水性、表面暴露性等分析; (B) 兔抗 MARCH2 多克隆抗体的 Western blot 鉴定; (C) 兔抗 MARCH2 多克隆抗体的免疫荧光鉴定

3.2. MARCH2 在组织及细胞系中的表达

为了分析 MARCH2 的表达谱，我们利用半定量 RT-PCR 方法，在 32 种细胞系中检测了 MARCH2 mRNA 的表达水平，结果显示，MARCH2 呈广泛表达，在 HeLa、U2OS、HCT116、COS7 细胞中表达最高，在 SKBR3、HGC-27、MGC-803 细胞中低表达(图 2)。

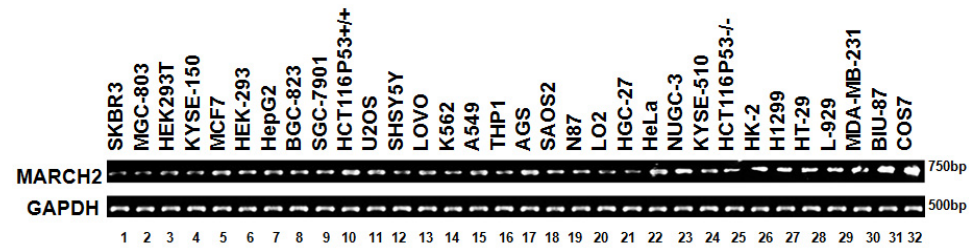
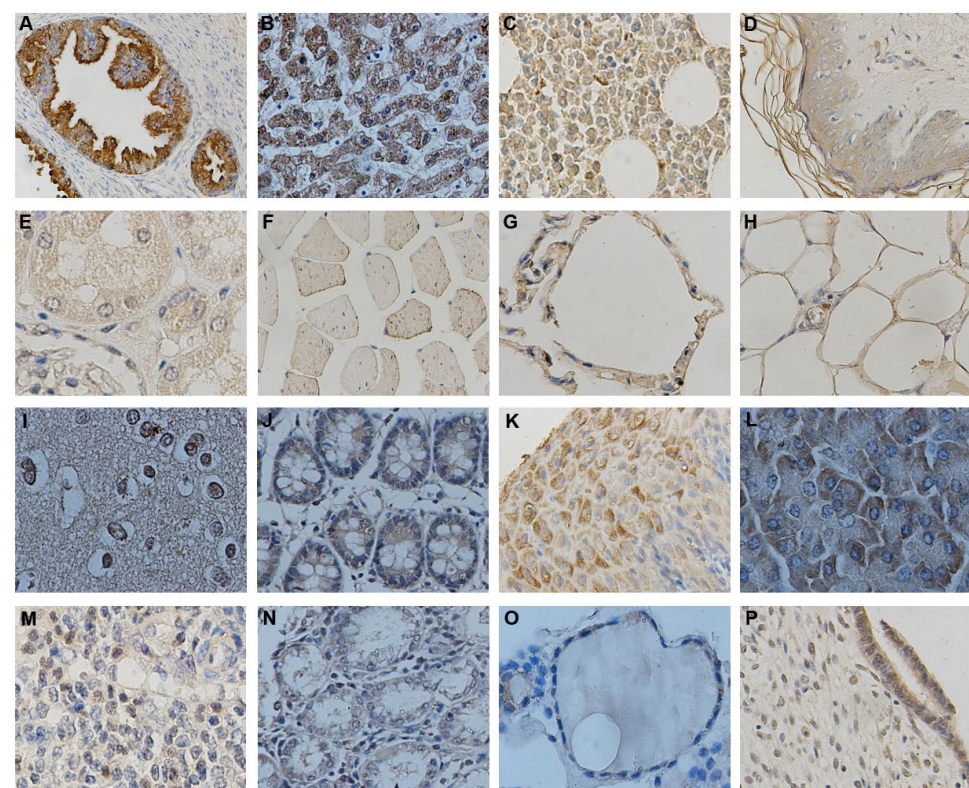


Figure 2. RT-PCR analysis of MARCH2 mRNA expression in 32 cell lines
图 2. RT-PCR 分析 MARCH2 mRNA 在 32 种细胞系中的表达

我们购买了组织芯片，利用免疫组织化学方法进一步分析了其在正常组织中的表达情况，染色结果显示 MARCH2 呈广泛表达，在前列腺、肝组织中呈高表达，在横纹肌、甲状腺组织中呈低表达，主要在胞浆中呈现弥漫均匀细颗粒状分布(图 3)。



注：组织芯片免疫组化分析 MARCH2 在前列腺(A)、肝脏(B)、骨髓(C)、皮肤(D)、肾(E)、横纹肌(F)、肺(G)、乳腺(H)、大脑(I)、结肠(J)、食管(K)、胰腺(L)、脾(M)、胃(N)、甲状腺(O)、子宫内膜(P)中的表达(图像 400×)。

Figure 3. Expression of MARCH2 in normal tissues
图 3. MARCH2 在正常组织中的表达

除此之外,我们还发现,MARCH2 表达因肿瘤类型的不同有差异。与对应的正常组织相比,MARCH2 在某些肿瘤(如前列腺癌、肝癌)组织中表达降低(图 4(B)和图 4(A),图 4(D)和图 4(C)),而在某些肿瘤(如食管癌、结肠癌)组织中表达增高(图 4(F)和图 4(E),图 4(H)和图 4(G))。MARCH2 在不同类型肿瘤的差异表达及临床意义有待进一步研究。

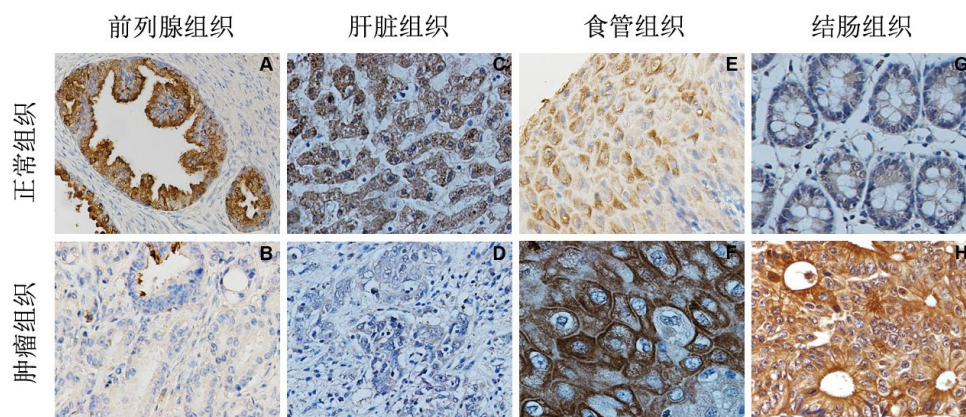
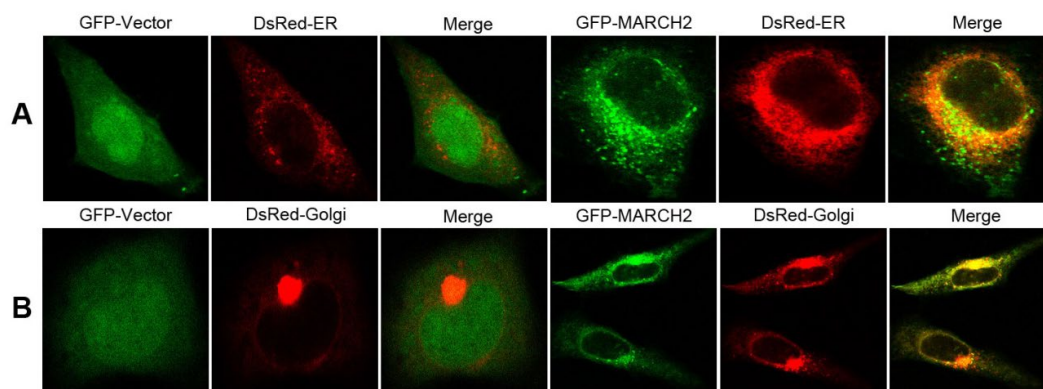


Figure 4. Immunohistochemical analysis of MARCH2 expression in tissues using tissue microarray: (A) Normal prostate tissue; (B) Prostate adenocarcinoma tissue; (C) Normal liver tissue; (D) Hepatocellular carcinoma tissue; (E) Normal squamous epithelium of esophagus; (F) Esophageal squamous cell carcinoma; (G) Normal colon tissue; (H) Colon cancer (image 400×)

图 4. 组织芯片免疫组化分析 MARCH2 在组织中的表达: (A) 前列腺正常组织; (B) 前列腺腺癌组织; (C) 肝脏正常组织; (D) 肝细胞性肝癌组织; (E) 食管正常鳞状上皮; (F) 食管鳞状细胞癌; (G) 结肠正常组织; (H) 结肠癌(图像 400×)

3.3. MARCH2 蛋白的亚细胞器定位

为了明确 MARCH2 在细胞内的定位,我们将 GFP-MARCH2 与 DsRed-ER (DsRed 标记的内质网定位序列)、DsRed-Golgi (DsRed 标记的高尔基体定位序列)、表达质粒共转染 HeLa 细胞,24 小时后用 4% 多聚甲醛固定,然后在激光共聚焦显微镜下观察。结果显示,GFP-MARCH2 能够与 DsRed-Golgi 和 DsRed-ER 发生非常明显的共定位(图 5(A)和图 5(B)),而与 LAMP1-Cherry (溶酶体 marker)、EEA1 (内体 marker)呈部分共定位(图 5(C)和图 5(D)),而与 MitoTracker (线粒体 marker)没有明显共定位(图 5(E))。除此以外,我们发现内源性 MARCH2 与 Calnexin (ER 的 marker)及 TGN46 (Golgi 的 marker)也呈现明显的共定位现象(图 5(F))。上述结果证明 MARCH2 与内质网、高尔基体共定位,与溶酶体、内体部分共定位,与线粒体没有共定位。



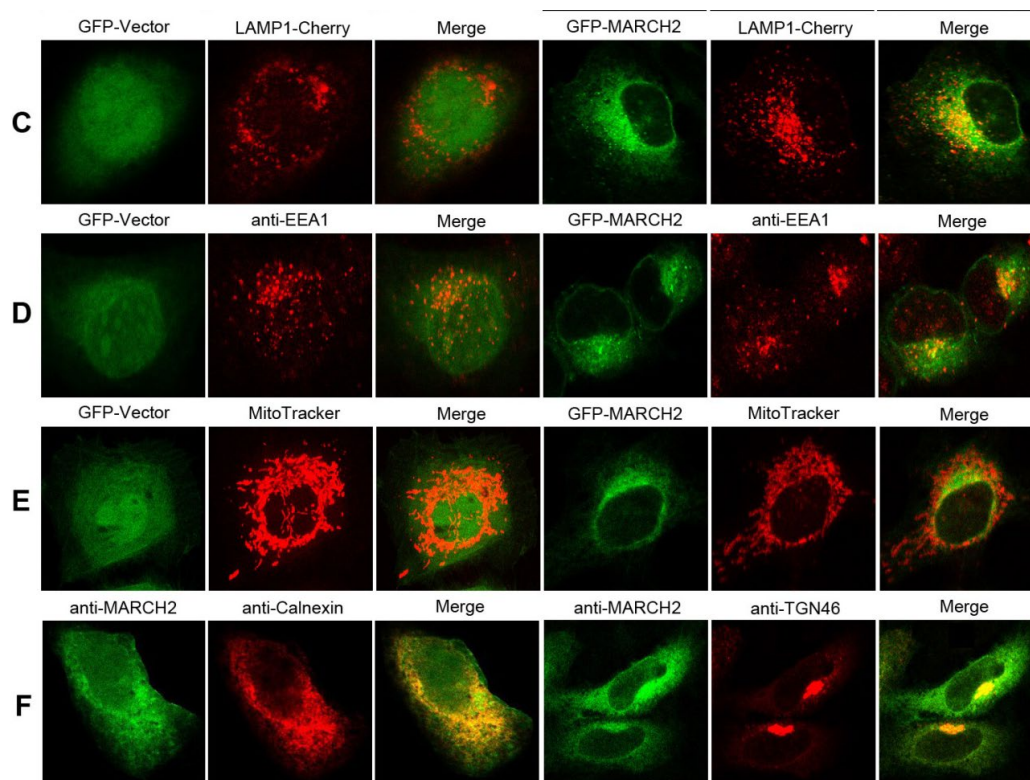


Figure 5. Laser confocal microscopy analysis of overexpression and localization of endogenous MARCH2 in HeLa cells: (A) GFP-MARCH2 or GFP-Vector and DsRed-ER plasmids were co-transfected into HeLa cells, and the localization of overexpression of MARCH2 and ER was observed under confocal microscopy; (B) GFP-MARCH2 or GFP-Vector and DsRed-Golgi plasmids were co-transfected into HeLa cells, and the localization of overexpression of MARCH2 and Golgi was observed under confocal microscopy; (C) GFP-MARCH2 or GFP-Vector and LAMP1-cherry plasmids were co-transfected into HeLa cells, and the localization of overexpression of MARCH2 and LAMP1 was observed under confocal microscopy; (D) GFP-MARCH2 or GFP-Vector plasmids were transfected into HeLa cells, and the overexpression of MARCH2 and localization of endogenous EEA1 were detected using EEA1 polyclonal antibodies; (E) HeLa cells were transfected with GFP-MARCH2 or GFP-Vector plasmids, stained with mitotracker after 24 hours, and the localization of overexpression of MARCH2 and mitotracker was observed under confocal microscopy; (F) In HeLa cells, the localization of endogenous MARCH2 and Calnexin or TGN-46 was detected using MARCH2 and Calnexin or TGN-46 polyclonal antibodies

图 5. 激光共聚焦显微镜分析过表达与内源性 MARCH2 在 HeLa 细胞中的定位: (A) GFP-MARCH2 或 GFP-Vector 和 DsRed-ER 质粒共同转染 HeLa 细胞, 共聚焦显微镜观察过表达 MARCH2 与 ER 的定位情况; (B) GFP-MARCH2 或 GFP-Vector 和 DsRed-Golgi 质粒共同转染 HeLa 细胞, 共聚焦显微镜观察过表达 MARCH2 与 Golgi 的定位情况; (C) GFP-MARCH2 或 GFP-Vector 和 LAMP1-cherry 质粒共同转染 HeLa 细胞, 共聚焦显微镜观察过表达 MARCH2 与 LAMP1 的定位情况; (D) GFP-MARCH2 或 GFP-Vector 质粒转染 HeLa 细胞, EEA1 多抗检测过表达 MARCH2 与内源性 EEA1 的定位情况; (E) GFP-MARCH2 或 GFP-Vector 质粒转染 HeLa 细胞, 24 小时后用 mitotracker 染色, 共聚焦显微镜观察过表达 MARCH2 与 mitotracker 的定位情况; (F) 在 HeLa 细胞中, 用 MARCH2 和 Calnexin 或 TGN-46 多抗检测内源性 MARCH2 和 Calnexin 或 TGN-46 的定位情况

4. 讨论

MARCH (Membrane Associated, RING-CH) 家族是一个结构上相关联的蛋白家族, 其成员结构特点为由 N 端的 RING-CH 结构域和紧连的 C 端两个或多个跨膜区组成[1]。这种跨膜 RING-CH finger 蛋白具有多种生物学功能, 如免疫调节、蛋白质控和膜运输[1]。

目前, MARCH 家族有 11 个成员(MARCH-I-XI)。其中, MARCH-I 可介导 MHC-II 泛素化, 是胸腺

中 T 细胞发育的重要调节子。MARCH-VIII 泛素化 CD86, 参与免疫调节。MARCH-IV 和 MARCH-IX 能有效减少 MHC-I 的表面表达, 与病毒免疫逃逸相关。MARCH-V 是线粒体外膜泛素化连接酶, 通过调节线粒体融合蛋白 MFN2、Drp1, 增加长管状线粒体。MARCH-VI (TEB-4) 和它的酵母同源物 SSM4/DOA10 都是内质网的跨膜泛素连接酶, 参与内质网相关降解和内质网质量控制。MARCH-VII 参与胚胎干细胞神经分化, 并与胸腺发育有关[5]-[8]。MARCH-X 和 MARCH-XI 参与精子的形成和发育[9] [10]。MARCH-III 是 MARCH-II 最相近的同源物, 能与 MARCH-II 和 STX6 相互作用, 参与内体中囊泡运输调节。2022 年, Luo 团队[2]研究发现, 高温条件下 E3 泛素连接酶 MARCH-IX 能够使 ATG9A 发生 K63 位泛素化修饰, ATG9A 进而与维持高尔基体片层结构的蛋白 GRASP55 互作, 并抑制 GRASP55 的寡聚化, 抑制 GRASP55 连接高尔基体片层的作用, 最终引起高尔基体片段化。

MARCH-II 基因是 Bartee 课题组在 2004 年发现[1], 定位于 19p13.2, 基因全长 25746 bp, 其开放读码框编码 246 个氨基酸, 相对分子量 26995 Da。MARCH-II 是二次跨膜蛋白, 由 N 端 RING domain、中间的二次跨膜区和 C 端的 PDZ domain 构成。MARCH-II 能降解细胞表面受体如转铁蛋白受体和共刺激分子 B7.2 (CD86); MARCH 蛋白与内质网以及溶酶体共定位。随后, Nakamura 和他的同事发现, MARCH-II 能与 STX6 直接结合, 参与高尔基体和内体之间的运输。Xavier 研究团队在 HEK293T 细胞中证实 MARCH-II 也能定位在细胞膜上, 通过其 PDZ motif 与 DLG1 相互作用促进 DLG1 泛素化, 减弱 DLG1 在细胞连接点的表达, 影响细胞的极性。Han 课题组证实 MARCH-II 能与 β 2AR 相互作用, β 2AR 拮抗剂卡维地洛能够增强 MARCH-II 与 β 2AR 的相互作用, 促进 β 2AR 的内吞和溶酶体降解。MARCH-II 也能促进 β 2AR 的泛素化, 调节细胞表面的 β 2AR 水平。Guggino 科研团队研究发现, 在 CFBE 细胞中, MARCH-II 通过与 CAL 和 STX6 结合, 能够泛素化并降解 CFTR。

最近, Umthong 课题组[3]揭示了人类 MARCH2 用于限制 HIV-1 的抗病毒机制, 这对所有具有抗病毒功能的 MARCH 蛋白都有潜在的意义。Du 等人[11]报道了 MARCH2 通过靶向 tbk1 负调控草鱼的抗病毒免疫反应。Zeng 团队[12]的研究结果显示, 膜相关泛素连接酶 MARCH2 和 MARCH3 靶向 IL-5 受体 α 负调控嗜酸性气道炎症。Yoo 课题组[13]的研究表明, E3 泛素连接酶 MARCH2 调节内质网 - 高尔基间室蛋白 ERGIC3 依赖的分泌蛋白运输。Chathuranga 研究团队[14]报道了 E3 连接酶 MARCH2 是细菌或病毒感染时 NEMO 介导的信号传导的新型负向调节因子, MARCH2 在感染后期直接与 NEMO 相互作用, 并催化 NEMO 上 Lys326 的 K-48 连接泛素化, 从而导致其降解。MARCH2 的缺失导致对细菌/病毒感染的抵抗力及体内先天免疫反应的显著增强。此外, 由于细胞因子的大量产生, MARCH2^{-/-}小鼠更易接受 LPS 挑战。总之, 这些发现为 NEMO 的分子调控提供了新的见解, 并表明 MARCH2 在先天免疫反应的稳态控制中发挥着重要作用。Sandow 等人[15]报道的蛋白质组学分析表明, 免疫整合素是膜相关环-CH (MARCH) 蛋白 MARCH2、3、4 和 9 调节的主要靶标。2024 年, 复旦大学张英梅、葛均波及中国科学院分子细胞科学卓越创新中心胡荣贵共同通讯在 *Cell Discovery* (IF 34) 发表的研究[16]表明, E3 泛素连接酶 MARCH2 通过负调控 PGAM5/MAVS/NLRP3 轴抑制心肌焦亡, 保护心肌缺血再灌注损伤。Babon 等人[17]报道了小鼠中单个 MARCH 蛋白的遗传删除对 IL6R α 水平没有影响或影响很小, 但 MARCH2、3 和 4 的联合删除显示选定的造血细胞亚群(包括 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞)中 IL6R α 的稳态水平升高。此研究扩展了 MARCH 蛋白的潜在免疫抑制作用, 包括下调 IL6 炎症反应。Zhang 等人[18]报道了膜相关的 RING-CH (MARCH) 1 和 2 是抑制 HIV-1 感染的 MARCH 家族成员。Seo 课题组[19]的研究显示, MARCH 家族 E3 泛素连接酶选择性靶向降解钙粘蛋白家族蛋白。近来, Yu 研究团队[4]在 *GUT* (IF 25) 发表的研究揭示了胰腺导管腺癌血浆细胞外囊泡长链 RNA(exLR)表达谱, 并鉴定了 8 个 exLRs (FGA, KRT19, HIST1 H2BK, ITIH2, MARCH2, CLDN1, MAL2, TIMP1) 用于诊断胰腺导管腺癌, MARCH2 是诊断标志物之一, 并且诊断标志显示出很高的准确性。Yu 等人[20]报道了 MARCH1、2 和 8 通过靶向弗林蛋白酶 P 结构域阻断埃

博拉病毒包膜糖蛋白裂解。

我们的研究成功制备了 MARCH2 多克隆抗体,为进一步研究 MARCH2 的生物学功能打下了基础,在利用半定量 RT-PCR 方法分析 MARCH2 的表达谱时,我们发现 MARCH2 在 32 种肿瘤细胞系中呈广泛表达,在 HeLa、U2OS、HCT116、COS7 细胞中表达最高,在 SKBR3、HGC-27、MGC-803 细胞中低表达,提示 MARCH2 在肿瘤发生发展中有潜在作用。我们购买了组织芯片,利用免疫组织化学方法进一步分析了其在正常组织中的表达情况,染色结果显示, MARCH2 呈广泛表达,在前列腺、肝组织中呈高表达,在横纹肌、甲状腺组织中呈低表达,主要在胞浆中呈现弥漫均匀细颗粒状分布。除此之外,我们还发现, MARCH2 表达因肿瘤类型的不同有差异。与对应的正常组织相比, MARCH2 在某些肿瘤(如前列腺癌、肝癌)组织中表达降低,而在某些肿瘤(如食管癌、结肠癌)组织中表达增高。MARCH2 在不同类型肿瘤的差异表达及临床意义是什么?这个问题有待进一步研究。为了明确 MARCH2 在细胞内的定位,我们将 GFP-MARCH2 与 DsRed-ER (DsRed 标记的内质网定位序列)、DsRed-Golgi (DsRed 标记的高尔基体定位序列)、表达质粒共转染 HeLa 细胞,24 小时后用 4%多聚甲醛固定,然后在激光共聚焦显微镜下观察。结果显示, GFP-MARCH2 能够与 DsRed-Golgi 和 DsRed-ER 发生非常明显的共定位,而与 LAMP1-Cherry (溶酶体 marker)、EEA1 (内体 marker)呈部分共定位,而与 MitoTracker (线粒体 marker)没有明显共定位。除此以外,我们发现内源性 MARCH2 与 Calnexin (ER 的 marker)及 TGN46 (Golgi 的 marker)也呈现明显的共定位现象。上述结果证明 MARCH2 与内质网、高尔基体共定位,与溶酶体、内体部分共定位,与线粒体没有共定位。而近年研究揭示了高尔基应激、内质网应激是有效自噬诱导因素,且自噬在肿瘤发生发展中发挥着促进或抑制的双刃剑作用。而最近有研究报道了 MARCH2 是诊断胰腺导管腺癌的标志物之一。那么, MARCH2 在高尔基应激、内质网应激、自噬及肿瘤中的作用到底是什么?这个问题有待进一步研究。

通过本研究发现了两个国际上亟待解决的科学问题。接下来,我们将在前期研究的基础上通过项目实施,解决这两个科学问题,以实现肿瘤细胞命运相关的理论突破。

基金项目

本研究由国家自然科学基金项目(81702776)、山东省医药卫生科技项目(202304010866)、临沂市重点研发计划(医学类) (2023YX0096)、山东省自然科学基金项目(ZR2020QH041)、山东省医药卫生科技项目(20230206735)、徐州医科大学附属医院发展基金项目(XYFM202348)资助。

参考文献

- [1] Barteel, E., Mansouri, M., Hovey Nerenberg, B.T., Gouveia, K. and Früh, K. (2004) Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. *Journal of Virology*, **78**, 1109-1120. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1109-1120.2004>
- [2] Luo, Q., Liu, Q., Cheng, H., Wang, J., Zhao, T., Zhang, J., *et al.* (2022) Nondegradable Ubiquitinated ATG9A Organizes Golgi Integrity and Dynamics Upon Stresses. *Cell Reports*, **40**, Article ID: 111195. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111195>
- [3] Umthong, S., Timilsina, U., D'Angelo, M. and Stavrou, S. (2023) Determining the Antiviral Mechanism of MARCH2. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.18.558306>
- [4] Yu, S., Li, Y., Liao, Z., Wang, Z., Wang, Z., Li, Y., *et al.* (2019) Plasma Extracellular Vesicle Long RNA Profiling Identifies a Diagnostic Signature for the Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gut*, **69**, 540-550. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318860>
- [5] Baker, R.K., Haendel, M.A., Swanson, B.J., Shambaugh, J.C., Micales, B.K. and Lyons, G.E. (1997) *In Vitro* Preselection of Gene-Trapped Embryonic Stem Cell Clones for Characterizing Novel Developmentally Regulated Genes in the Mouse. *Developmental Biology*, **185**, 201-214. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8541>
- [6] Metcalfe, S.M., Muthukumarana, P.A.D.S., Thompson, H.L., Haendel, M.A. and Lyons, G.E. (2004) Leukaemia Inhibitory

- Factor (LIF) Is Functionally Linked to Axotrophin and Both LIF and Axotrophin Are Linked to Regulatory Immune Tolerance. *FEBS Letters*, **579**, 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.027>
- [7] Muthukumarana, P.A.D.S., Lyons, G.E., Miura, Y., Thompson, L.H., Watson, T., Green, C.J., *et al.* (2006) Evidence for Functional Inter-Relationships between FOXP3, Leukaemia Inhibitory Factor, and Axotrophin/March-7 in Transplantation Tolerance. *International Immunopharmacology*, **6**, 1993-2001. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.09.015>
- [8] Nathan, J.A., Sengupta, S., Wood, S.A., Admon, A., Markson, G., Sanderson, C., *et al.* (2008) The Ubiquitin E3 Ligase MARCH7 Is Differentially Regulated by the Deubiquitylating Enzymes USP7 and USP9X. *Traffic*, **9**, 1130-1145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00747.x>
- [9] Iyengar, P.V., Hirota, T., Hirose, S. and Nakamura, N. (2011) Membrane-Associated RING-CH 10 (MARCH10 Protein) Is a Microtubule-Associated E3 Ubiquitin Ligase of the Spermatid Flagella. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 39082-39090. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.256875>
- [10] Morokuma, Y., Nakamura, N., Kato, A., Notoya, M., Yamamoto, Y., Sakai, Y., *et al.* (2007) MARCH-XI, a Novel Transmembrane Ubiquitin Ligase Implicated in Ubiquitin-Dependent Protein Sorting in Developing Spermatids. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 24806-24815. <https://doi.org/10.1074/jbc.m700414200>
- [11] Du, J., Xiao, H., Hu, Y. and Li, Z. (2023) March2 Negatively Regulates Antiviral Immune Response by Targeting Tbk1 in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, **140**, Article ID: 108965. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108965>
- [12] Zeng, L., Feng, L., Liu, R., Lin, H., Shu, H. and Li, S. (2022) The Membrane-Associated Ubiquitin Ligases MARCH2 and MARCH3 Target IL-5 Receptor Alpha to Negatively Regulate Eosinophilic Airway Inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, **19**, 1117-1129. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00907-9>
- [13] Yoo, W., Cho, E., Kim, S. and Yoon, J. (2019) The E3 Ubiquitin Ligase MARCH2 Regulates ERGIC3-Dependent Trafficking of Secretory Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 10900-10912. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.007435>
- [14] Chaturanga, K., Kim, T., Lee, H., Park, J., Kim, J., Chaturanga, W.A.G., *et al.* (2020) Negative Regulation of NEMO Signaling by the Ubiquitin E3 Ligase March2. *The EMBO Journal*, **39**, e105139. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020105139>
- [15] Sandow, J.J., Webb, A.I., Stockwell, D., Kershaw, N.J., Tan, C., Ishido, S., *et al.* (2021) Proteomic Analyses Reveal That Immune Integrins Are Major Targets for Regulation by Membrane-Associated Ring-CH (MARCH) Proteins MARCH2, 3, 4 and 9. *Proteomics*, **21**, Article ID: 2000244. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000244>
- [16] Liu, S., Bi, Y., Han, T., Li, Y.E., Wang, Q., Wu, N.N., *et al.* (2024) The E3 Ubiquitin Ligase MARCH2 Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through Inhibiting Pyroptosis via Negative Regulation of PGAM5/MAVS/NLRP3 Axis. *Cell Discovery*, **10**, Article No. 24. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00622-3>
- [17] Babon, J.J., Stockwell, D., DiRago, L., Zhang, J., Laktyushin, A., Villadangos, J., *et al.* (2019) Membrane-Associated RING-CH (MARCH) Proteins Down-Regulate Cell Surface Expression of the Interleukin-6 Receptor α Chain (IL6R α). *Biochemical Journal*, **476**, 2869-2882. <https://doi.org/10.1042/bcj20190577>
- [18] Zhang, Y., Tada, T., Ozono, S., Yao, W., Tanaka, M., Yamaoka, S., *et al.* (2019) Membrane-associated RING-CH (MARCH) 1 and 2 Are MARCH Family Members That Inhibit HIV-1 Infection. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 3397-3405. <https://doi.org/10.1074/jbc.ac118.005907>
- [19] Seo, T., Lowery, A.M., Xu, H., *et al.* (2023) MARCH Family E3 Ubiquitin Ligases Selectively Target and Degrade Cadherin Family Proteins. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.10.552739>
- [20] Yu, C., Bai, Y., Tan, W., Bai, Y., Li, X., Zhou, Y., *et al.* (2024) Human MARCH1, 2, and 8 Block Ebola Virus Envelope Glycoprotein Cleavage via Targeting Furin P Domain. *Journal of Medical Virology*, **96**, e29445. <https://doi.org/10.1002/jmv.29445>