



黄颡鱼 STAT3 乙酰化位点验证及其与 SIRT5 去乙酰化酶的关系

郑 华, 徐一闯, 赵 涛, 吕武宏, 余岸良, 何 杨, 谭肖英*

(华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为研究黄颡鱼 STAT3 乙酰化位点及其与 SIRT5 去乙酰化酶家族之间的关系, 实验首先构建带 Flag 标签的 STAT3 过表达质粒及带 HA、GFP 标签的 SIRT5 过表达质粒, 并对 STAT3 可能发生乙酰化的位点进行突变体构建; 其次, 转染 STAT3 及突变体和 STAT3、SIRT5 共转染于 HEK 293T 细胞, 利用免疫印迹、免疫沉淀和免疫荧光等技术进行检测。结果显示, STAT3 是一种胞浆蛋白。与野生型 STAT3 相比, 突变体 K685R 的乙酰化水平显著降低。突变体 K49R、K87R、K680R、K712R 和 K714R 的乙酰化水平与野生型 STAT3 无显著差异, 表明 K685 是 STAT3 的关键乙酰化位点。免疫沉淀和免疫荧光结果显示, SIRT2、SIRT7 与 STAT3 发生蛋白互作并催化 STAT3 的去乙酰化, 而 SIRT5 不与 STAT3 发生蛋白互作, 对其乙酰化水平无明显影响。本研究揭示了黄颡鱼 STAT3 的乙酰化位点及 STAT3 和 SIRT5 之间的关系, 为探讨 STAT3 蛋白乙酰化修饰在鱼类生理功能中的作用奠定基础。

关键词: 黄颡鱼; STAT3; 乙酰化; SIRT5; 过表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

信号传导与转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是 STATs 家族的古老成员, 作为一种转录因子在细胞分化、增殖、发育、凋亡和脂质代谢方面发挥重要作用^[1-2]。

近年来蛋白翻译后修饰 (protein translational modifications, PTMs) 得到广泛研究, 其在调节蛋白功能中发挥着重要作用, 并参与许多生理和病理过程^[3]。STAT3 的主要蛋白翻译后修饰包括磷酸化和乙酰化。STAT3 磷酸化是 STAT3 发挥功能的重要翻译后修饰, 特别是酪氨酸 Try705 与丝氨酸 Ser727 的磷酸化对 STAT3 的激活以及形成稳定的同源或异源二聚体具有重要作用, 最终导致 STAT3 易位到细胞核发挥转录激活的作用, 信号

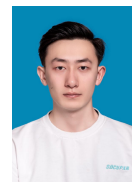
终止后 STAT3 从细胞核转出至细胞质^[4-6]。近年来研究发现, STAT3 乙酰化在调节自身转录活性及机体的生理功能中发挥至关重要的作用。Yuan 等^[7]报道了在细胞因子刺激下 STAT3 赖氨酸 (Lys, K) 685 位发生乙酰化修饰, STAT3 K685 由赖氨酸突变为精氨酸 (Arg, R) 后, 位于羧基端的酪氨酸和丝氨酸虽可以发生较低磷酸化并转移到细胞核, 但其形成二聚体与 DNA 结合的能力降低。Ray 等^[8]发现氨基端 K49 和 K87 可以发生乙酰化修饰, 与 K685 不同的是 K49 和 K87 突变对 STAT3 的转录及 DNA 的结合能力没有影响。通过串联质谱鉴定了 STAT 家族中除羧基末端 K685 外新的乙酰化位点 K679、K707 和 K709, 由于这些乙酰化位点位于

收稿日期: 2020-12-25 修回日期: 2021-02-01

资助项目: 国家自然科学基金 (32172983, 31572605); 国家重点研发计划 (2018YFD0900400); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划 (T201933)

第一作者: 郑华 (照片), 从事水产动物分子营养研究, E-mail: zhenghual@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 谭肖英, 从事水产动物营养生理和代谢调控研究, E-mail: txy7933@mail.hzau.edu.cn



转录激活域 Try705 附近, STAT3 的 Try705 去磷酸化可降低 STAT3 的乙酰化水平, 此外 Try705 的磷酸化可保护 K685 乙酰化的功能^[9-10]。研究还发现 STAT3 的 Lys 乙酰化可以与 Ser 磷酸化协同调节干扰素信号转导通路, 并且 STAT3 的乙酰化对磷酸化的调节起主要作用^[11]。综上表明 STAT3 蛋白的乙酰化与磷酸化存在互作。STAT3 蛋白及其翻译后乙酰化修饰在哺乳动物中研究的比较深入, 在鱼类等水生动物中的作用知之甚少。

STAT3 乙酰化的修饰调控在某种程度上是受去乙酰化酶 (silent information regulators of transcription, SIRT) 家族赖氨酸去乙酰化酶来调节。SIRT 家族因其具有保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺), 具有高度催化功能域, 能够调控细胞各种代谢途径的辅酶^[12]。SIRT 家族成员不仅直接与 STAT3 发生互作去乙酰化 STAT3, 还可以通过去乙酰化其他蛋白 (如丙酮酸激酶 M2、醛酮还原酶 C1), 降低这些蛋白与 STAT3 的结合作用, 进而抑制其转录活性^[13-14]。SIRT2、SIRT5、SIRT7 可能是 STAT3 潜在的去乙酰化酶。SIRT2 是第一个被鉴定的 SIRT 家族的成员, 在机体内参与脂质代谢、糖代谢、氧化应激等生理过程^[15]。SIRT5 主要定位于线粒体和细胞核中^[16-17], 具有赖氨酸去乙酰化酶活性, 在哺乳动物中, 存在于线粒体中的 STAT3 可被 SIRT5 去乙酰化, 进而调节电子传递链的活性^[18-19]。目前对于 SIRT7 的酶活性和功能研究较少, SIRT7 主要定位于核仁及细胞质中, 是组蛋白 3 的去乙酰化酶^[20], 同时还可以去乙酰化 SMAD4、FKBP51 和 GABP β 1 等非组蛋白^[21-23]。而对于 SIRT7 对 STAT3 的去乙酰化作用知之甚少。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 属鲇形目 (Siluriformes) 鲇科 (Bagridae), 是广泛分布于我国内陆的一种淡水杂食性鱼类。其肉质细嫩、营养价值高, 深受人们欢迎。黄颡鱼因其肝脏、肌肉等组织中有较高的脂质积累, 是研究脂质代谢的潜在模型^[24]。Wu 等^[25]对黄颡鱼 *stat3* 进行克隆, 并预测到黄颡鱼 STAT3 具有与哺乳动物一样的保守乙酰化位点 K685。在鱼类中, STAT3 乙酰化位点及去乙酰化修饰报道甚少。本研究通过对黄颡鱼 STAT3 进行乙酰化位点定点突变, 探讨关键乙酰化位点, 利用免疫沉淀和免疫荧光技术研究 SIRT 去乙酰化酶蛋白对 STAT3 乙酰化作用及蛋白互作, 为研究黄颡鱼 STAT3 蛋白及其翻译后修饰的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用黄颡鱼取自华中农业大学水产养殖基地。人肾上皮细胞系 (HEK 293T)、pcDNA3.1 (+) 和 GFP 载体由本实验室保存。本研究所有实验程序均遵循华中农业大学关于实验动物和细胞使用的伦理规范, 并经华中农业大学伦理委员会批准。

1.2 总 RNA 的提取及 CDS 模板制作

总 RNA 提取 本实验按照 TRIzol 试剂盒 (TaKaRa) 的说明步骤, 提取黄颡鱼心脏、肝脏、脑、肾脏、卵巢、肠道、脾脏、肌肉和脂肪总 RNA。总 RNA 的浓度和纯度使用 Nanodrop 2000 分光光度计分析, 结果显示总 RNA 质量均为高纯度。RNA 的完整性使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示总 RNA 为高质量。

CDS 模板制作 按照逆转录试剂盒 (TaKaRa) 的说明步骤, 对提取的黄颡鱼各个组织的总 RNA 混合后进行逆转录。首先合成 1st-stand cDNA, PCR 程序为 70 °C 保温 10 min。然后迅速在冰上冷却 2~4 min, 离心数秒, 使模板 RNA 引物的变性溶液聚集于离心管底部。最后在上述离心管中配置反转录反应液, PCR 程序为 30 °C 反应 10 min, 42 °C 保温 1 h, 70 °C 保温 15 min。结束后在冰上冷却, 最后 -20 °C 保存。

1.3 质粒构建

从 NCBI 中获取黄颡鱼 STAT3、SIRT2、SIRT5 和 SIRT7 的 CDS 序列, 构建 Flag-STAT3、GFP-SIRT2、GFP-SIRT5、GFP-SIRT7、HA-SIRT2、HA-SIRT5 和 HA-SIRT7 质粒。首先根据 pcDNA 3.1 (+) 和 GFP 的酶切位点设计过表达质粒引物 (表 1)。按照 Hieff Canace[®] Gold 高保真 DNA 聚合酶说明书设定 PCR 程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 16 °C 保存。其次从野生型 STAT3 中经 K 位点定向诱变到 R 得到 K49R、K87R、K680R、K685R、K712R 和 K714R 突变体。采用扩增突变引物 (表 2) 进行 PCR 扩增: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 16 °C 保存。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后经质粒连接、DH5 α 感受态转化、克隆和阳性筛选。阳性克隆由武汉擎科生物科技有限公司测序。

表 1 过表达质粒使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for overexpression plasmid

引物 primers	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	应用 usage
STAT3-Flag-F	ATGGCCAGTGGAAATCAGTTGCAG	质粒构建
STAT3-Flag-R	CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCGGGTGCATCAGAGTGT	质粒构建
SIRT2-GFP-F	CTACCGGACTCAGATCTCGAGATGTCAGAACCACAAGAACAAAGTCC	质粒构建
SIRT2-GFP-R	GGATCCCGGGCCCGCGGTACCATTCTTTGATTTGTCAGTAGCTGC	质粒构建
SIRT5-GFP-F	CTACCGGACTCAGATCTCGAGATGCAGAGGTTAGTGTGCAAGGC	质粒构建
SIRT5-GFP-R	GGATCCCGGGCCCGCGGTACCATGACACTCTCGCTTTCATGGG	质粒构建
SIRT7-GFP-F	CTACCGGACTCAGATCTCGAGATGAAAGAAGTAAATATGGAGTCCCA	质粒构建
SIRT7-GFP-R	GGATCCCGGGCCCGCGGTACCATTGTAGTTTTTCTTTCTCTCTCCG	质粒构建
SIRT2-HA-F	CTAGCGTTTAAACTTAAGCTTATGTCAGAACCACAAGAACAAAGTCC	质粒构建
SIRT2-HA-R	AACGGGCCCTCTAGACTCAGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG	质粒构建
SIRT5-HA-F	CTAGCGTTTAAACTTAAGCTTATGTCAGAGGTTAGTGTGCAAGGC	质粒构建
SIRT5-HA-R	AACGGGCCCTCTAGACTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCG	质粒构建
SIRT7-HA-F	CTAGCGTTTAAACTTAAGCTTATGAAAGAAGTAAATATGGAGTCCCA	质粒构建
SIRT7-HA-R	AACGGGCCCTCTAGACTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG	质粒构建

表 2 STAT3 定点突变使用的引物序列

Tab. 2 Primer sequences used for STAT3 site-directed mutagenesis

引物 primers	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	应用 usage
STAT3K49R-F	AGCCAATAGGGAATCTCACGCCACACTGGTATT	定点突变
STAT3K49R-R	GAGATTCCTATTGGTGCATACGCCAGTCC	定点突变
STAT3K87R-F	ATCAGGCAGCACCTGCAGAGCAAGTACCTGGA	定点突变
STAT3K87R-R	TGCAGGTGCTGCCTGATGCGCCTCAGGTTGTGC	定点突变
STAT3K680R-F	CTAGGGAGGAGGCTTTGGGAAGTATTGCAGA	定点突变
STAT3K680R-R	AAAAGCCTCCTCCCTAGGGATGTCGGGGAAAAGG	定点突变
STAT3K685R-F	CTTTTGGGAGGTATTGCAGACCAGAAGCCAG	定点突变
STAT3K685R-R	GCAATACCTCCAAAAGCCTCCTTTAGGGA	定点突变
STAT3K712R-F	GTACCTGAGAACCAAGTTCATCTGCGTCACTCC	定点突变
STAT3K712R-R	ACTTGGTCTCAGTACGGCTGAGTACGATT	定点突变
STAT3K714R-F	GAAGACCAGGTTTCATCTGCGTCACTCCGTGTC	定点突变
STAT3K714R-R	AGATGAACCTGGTCTTCAGGTACGGCTGAGTG	定点突变

1.4 细胞培养及转染

细胞培养 HEK 293T 细胞培养于含 10% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 与 1% 双抗 (青霉素+链霉素) 的高糖 (DMEM) 培养基中, 放置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

细胞转染 本研究进行 2 个独立实验。首先探讨 STAT3 关键乙酰化位点, 将 Flag-STAT3 与 Flag-STAT3 突变体 (K49R、K87R、K680R、K685R、K712R 和 K714R) 转染 HEK 293T 细胞。其次探究 STAT3 与 SIRT5 的相互作用, 将 Flag-

STAT3 与 GFP-SIRT2、GFP-SIRT5、GFP-SIRT7、HA-SIRT2、HA-SIRT5 和 HA-SIRT7 分别共转染于 HEK 293T 细胞。当细胞密度达到 70%~80% 时, 按 Lipofectamine[®] 2000 转染试剂盒 (Invitrogen, 美国) 转染质粒。按 Lipofectamine[®] 2000 脂质体: DNA 质量=1:1 的比例加入 Lipofectamine[®] 2000 脂质体与过表达质粒, 二者混匀平衡 20 min。随后将二者的混合液滴入含有 3 600 μL 无血清培养基中。转染 4 h 后换成等体积 DMEM 培养基继续培养 24 h, 用于提取蛋白。每组实验重复 3 次。

1.5 免疫沉淀

探讨 STAT3 关键乙酰化位点及 STAT3 与 SIRT5 之间的相互关系, 利用免疫沉淀技术将上述细胞转染的 HEK 293T 细胞使用 anti-Flag 抗体 (1 : 30) 富集 Flag-STAT3。将转染 24 h 的 HEK 293T 细胞 2 000 r/min 离心 1 min 收集细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次; 加入 400 μ L 免疫沉淀裂解液 (含 1% PMSF+1% 去乙酰化酶抑制剂), 冰上裂解 30 min; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度; 取 40 μ L 蛋白做全细胞裂解液 (TCL), 按比例加入 5 \times Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C 沸水浴 5 min; 剩余蛋白用于免疫沉淀, 按测定的蛋白浓度加入相应 anti-Flag 抗体 (Abcam), 4 $^{\circ}$ C 旋转过夜; 加入 40~50 μ L protein A/G 琼脂珠继续旋转 4~6 h 免疫沉淀 Flag-STAT3 蛋白; 4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min 条件下离心并弃去上清液, PBS 洗脱液 (含 1% PMSF+1% 去乙酰化酶抑制剂) 洗涤 5 次; 洗脱后加入 40 μ L 1 \times Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C 沸水浴 5 min。

1.6 免疫印迹

利用免疫印迹检测 STAT3 乙酰化水平及 Flag-STAT3、HA-SIRT5 蛋白之间的作用。根据免疫印迹试剂盒 (碧云天) 配置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 恒压 (80 V, 20 min 后 120 V, 90 min) 电泳至溴酚蓝指示剂迁移到胶底部, 终止电泳。并将凝胶恒流 (250 mA, 120 min) 转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜)。随后 4% 脱脂奶粉室温封闭 2~3 h; 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育 anti-acetylation 抗体 (Abcam) (1 : 2 000, 4% BSA 稀释)、anti-Flag 抗体 (1 : 5 000, 4% BSA 稀释)、anti-HA 抗体 (1 : 4 000, 4% BSA 稀释) (anti-acetylation、Flag 抗体用于验证 Flag-STAT3 乙酰化水平, anti-HA 抗体用于验证蛋白质之间的关系); TBST 洗涤液 (含 1% 吐温-20 的 TBS) 洗涤 5 次, 每次 3 min; 然后将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠二抗室温孵育 1~2 h; TBST 洗涤液洗涤 5 次, 每次 3 min; 将 PVDF 膜采用 ECL 化学发光检测系统成像。

1.7 免疫荧光

为研究 STAT3 蛋白在 HEK 293T 细胞中的分布及 Flag-STAT3 与 GFP-SIRT2、GFP-SIRT5、GFP-SIRT7 的相互作用, 采用免疫荧光技术对其进行细胞定位。Flag-STAT3 及 Flag-STAT3 与 GFP-

SIRT2、GFP-SIRT5、GFP-SIRT7 分别共转染于含细胞爬片的 HEK 293T 细胞培养板, 转染后培养 24 h; 4% 多聚甲醛固定 15~30 min, 0.5% BSA 封闭 1~2 h; 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育 anti-Flag 抗体 (1 : 400, 0.1% BSA 稀释); 荧光鼠二抗 (1 : 500, 0.1% BSA 稀释) 室温孵育 1~2 h; 复染核 DAPI (1 : 200, 0.1% BSA 稀释) 避光孵育 15 min; 取出细胞培养板中的爬片, 放置于滴有抗荧光淬灭封片剂的载玻片上, 盖玻片封片; 激光共聚焦显微镜成像荧光结果。

1.8 统计分析

使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 采用 Student *t* test 分析 2 组之间的差异, 数据以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 STAT3 乙酰化位点突变体构建

黄颡鱼 STAT3 编码 789 个氨基酸 (登录号: XP_026999486.1), 蛋白大小约 90 ku。黄颡鱼 STAT3 蛋白与哺乳动物一样, 都具有保守的功能结构域, 包括氨基末端结构域 (N-terminal domain, NH2)、卷曲螺旋结构域 (coiled-coil domain, CCD)、DNA 结合结构域 (DNA-binding domains, DBD)、Src 同源性 2 结构域 (src homology 2 domain, SH2) 和转录激活结构域 (transcriptional activation domains, TAD)^[25] (图 1-a)。为了研究 STAT3 关键乙酰化位点, 实验构建一系列 STAT3 乙酰化位点突变体的过表达质粒: Flag-STAT3、Flag-STAT3 (K49R、K87R、K680R、K685R、K712R 和 K714R) (图 1-a)。STAT3 由赖氨酸 (AAA、AAG) 定点突变成精氨酸 (AGG 或 AGA), 经测序分析, 突变体构建成功 (图 1-b)。

2.2 黄颡鱼 STAT3 蛋白的细胞定位

免疫荧光技术结果表明, STAT3 蛋白在细胞质中表达量较多, 而在细胞核中表达量较少 (图 2), 可以认为黄颡鱼 STAT3 蛋白是一种胞浆蛋白。

2.3 不同乙酰化位点突变对 STAT3 整体乙酰化的影响

为验证黄颡鱼 STAT3 关键的乙酰化位点, 使用 anti-Flag 抗体对 WT Flag-STAT3 及其突变体 (K49R、K87R、K680R、K685R、K712R 和 K714R) 乙酰化进行免疫沉淀 (图 3-a)。结果显示 WT Flag-STAT3 与 Flag-STAT3 乙酰化位点突变体相比,

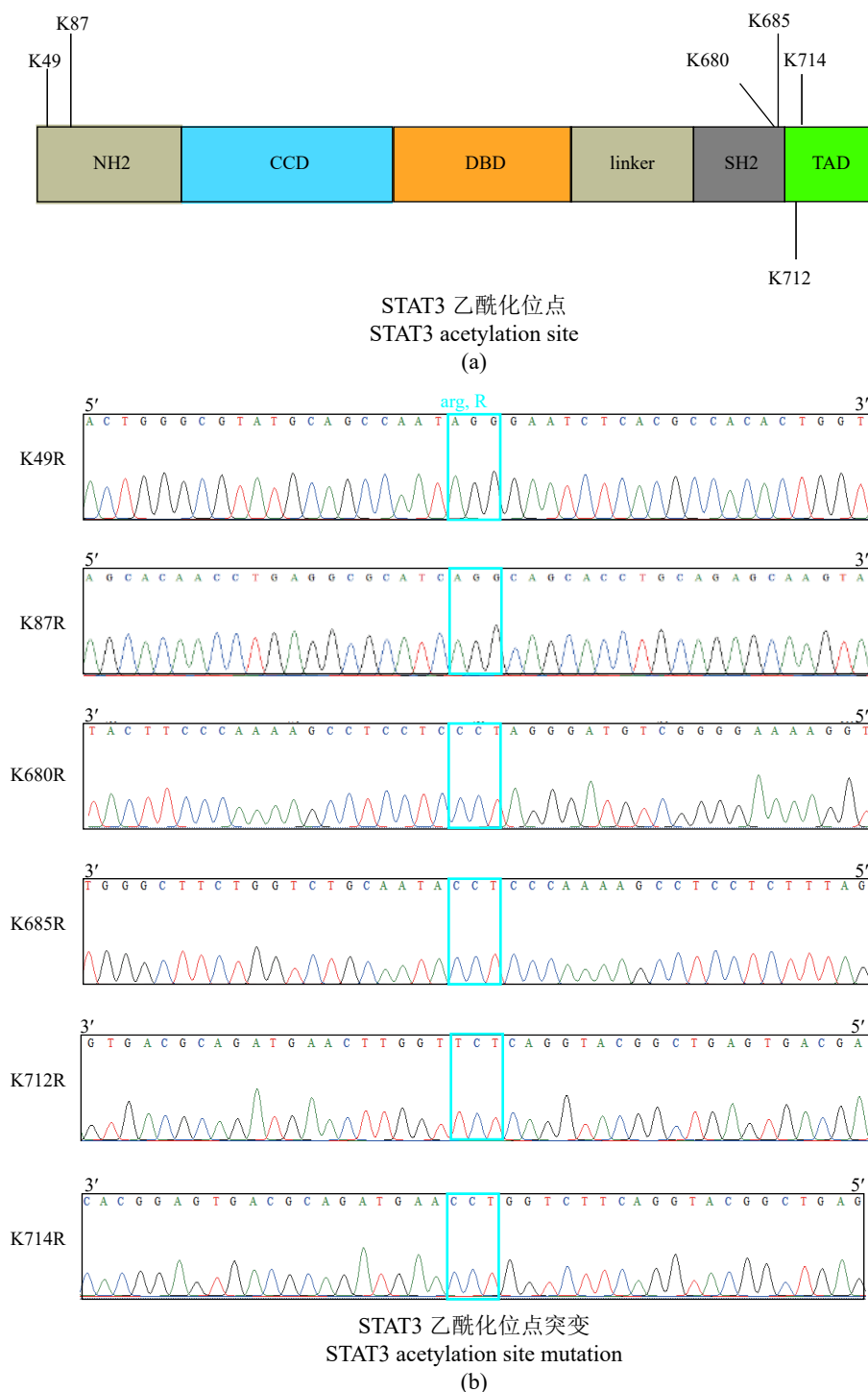


图 1 黄颡鱼 STAT3 乙酰化位点及突变体构建

(a) 黄颡鱼野生型 (WT) STAT3 蛋白结构及其乙酰化位点; (b) 黄颡鱼 STAT3 乙酰化位点突变体测序结果分析

Fig. 1 Acetylation site and mutant construction of STAT3 in *P. fulvidraco*

(a) wild-type (WT) STAT3 protein structure and its acetylation site of *P. fulvidraco*; (b) analysis of sequencing results of mutants of acetylation site of STAT3 in *P. fulvidraco*

STAT3 突变体 K685R 乙酰化水平显著降低 ($P < 0.05$)。而突变体 STAT3 K49R、K87R、K680R、K712R 和 K714R 乙酰化水平无显著差异 (图 3-b)。

2.4 SIRT6 与 STAT3 蛋白的相互作用及其乙酰化水平

将 HA-SIRT2、SIRT5 和 SIRT7 分别与 Flag-

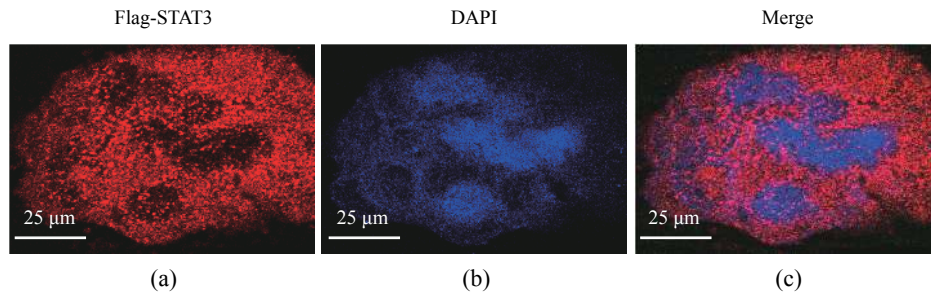


图 2 黄颡鱼 STAT3 蛋白的细胞定位

(a) Flag-STAT3. STAT3 蛋白; (b) DAPI. 细胞核染色; (c) Merge. (a) 与 (b) 共定位

Fig. 2 Cellular localization of STAT3 protein in *P. fulvidraco*

(a) Flag-STAT3. STAT3 protein; (b) DAPI. nuclear staining; (c) Merge. co-localization of (a) and (b)

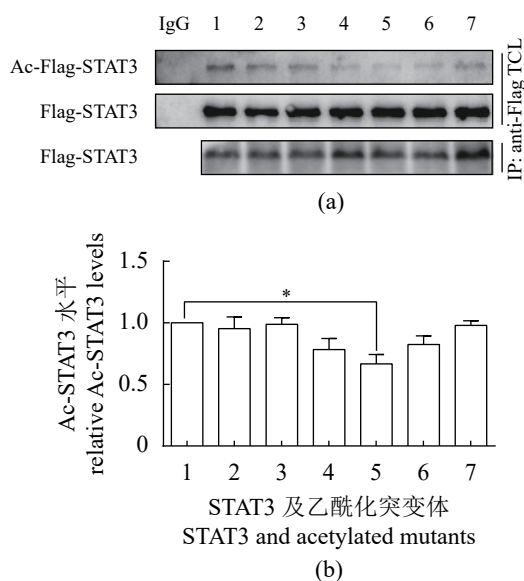


图 3 黄颡鱼 STAT3 及其突变体乙酰化水平分析

(a) 1. WT, 2. K49R, 3. K87R, 4. K680R, 5. K685R, 6. K712R, 7. K714R; TCL. 全细胞裂解液, IgG. 免疫球蛋白 G; (b) WT STAT3 与 STAT3 突变体蛋白乙酰化水平, AC-STAT3 水平为相对于 WT 的差异倍数, “*”代表显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Analysis of acetylation level of STAT3 and its mutants in *P. fulvidraco*

(a) 1. WT, 2. K49R, 3. K87R, 4. K680R, 5. K685R, 6. K712R, 7. K714R; TCL. total cell lysates, IgG. immunoglobulin G; (b) acetylation levels of WT STAT3 and mutants of STAT3, AC-STAT3 levels are relative fold of WT, “*” indicates significant difference, $P < 0.05$

STAT3 共转染于 HEK 293T 细胞内。免疫沉淀结果显示, SIRT2、SIRT7 与 STAT3 发生蛋白互作 (图 4-a), SIRT2、SIRT7 对 STAT3 的去乙酰化作用较强。而 SIRT5 并没有与 STAT3 发生蛋白互作, 对其乙酰化也无影响。为了进一步验证 SIRT2、SIRT5、SIRT7 与 STAT3 之间的关系, 实验制作免疫荧光爬片, 将 GFP-SIRTs (绿光) 与 Flag-STAT3

(红光) 共转染, 免疫荧光结果显示 SIRT2、SIRT7 与 STAT3 发生蛋白互作, 并且 SIRT2 与 STAT3 的结合能力强于 SIRT7, 而 SIRT5 并没有与 STAT3 发生蛋白互作 (图 4-b)。

3 讨论

JAK/STATs 级联是一种普遍存在于细胞内的信号通路, 它将信号从细胞外受体传递到细胞核, 以促进细胞分化、增殖、发育、凋亡和脂质代谢等一系列生理功能^[1, 26]。STAT3 在这一系列过程中发挥重要作用。近年来, 对哺乳动物中 STAT3 乙酰化修饰研究比较深入, 然而在鱼类等水生生物中, 对 *stat3* 的研究集中于基因克隆^[25, 27-30], 对 STAT3 乙酰化修饰报道甚少。

本研究阐明了黄颡鱼 STAT3 蛋白的胞内定位及其乙酰化位点。黄颡鱼 STAT3 在没有细胞因子处理下是一种胞浆蛋白 (图 2)。STAT3 蛋白乙酰化位点 K49、K87 存在于 NH2 端, K680、K685 存在于 SH2 结构域, K712、K714 存在于 TAD 结构域 (图 1-a)。在 STAT3 蛋白结构域中, SH2 结构域是 STAT3 最保守结构域, 其在 STAT3 被激活时形成同源或异源二聚体移位到细胞核中, 转录激活靶基因表达, 这种作用是基于酪氨酸或丝氨酸的磷酸化^[31]。突变 STAT3 乙酰化位点发现, 突变体 K685R 相比于野生型 STAT3 乙酰化程度明显降低 (图 3-b)。但突变 K685 后, 突变体 K685R 的乙酰化并没有完全消失, 这说明还存在其他乙酰化位点发生作用。本研究发现 K680R、K712R 位点乙酰化水平降低。谢红霞等^[32] 和 Nie 等^[9] 在哺乳动物的研究中发现突变体 K685R 的乙酰化同样没有完全消失, 其还在 K679、K707 和 K709 中检测到乙酰化水平降低。总之, 不论是哺乳动物

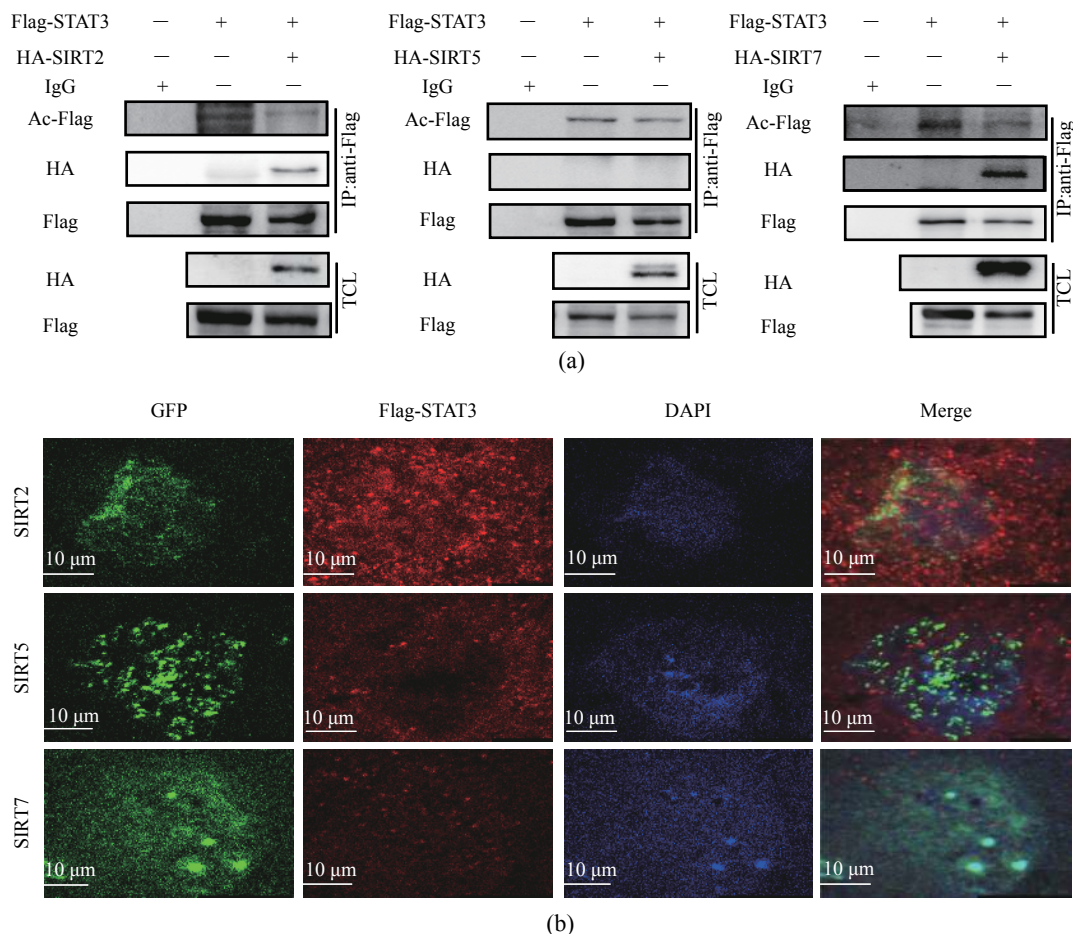


图 4 黄颡鱼 STAT3 与 SIRT2s 的相互作用

(a) 免疫沉淀检测 Flag-STAT3 乙酰化水平及其与 HA-SIRT2s 的相互关系, (b) Flag-STAT3 与 GFP-SIRT2s 共转染 HEK 293T 细胞; anti-Flag 抗体免疫荧光染色法检测细胞内 STAT3 与 SIRT2s 蛋白的共聚焦显微镜图像, GFP. 绿色荧光蛋白

Fig. 4 Interaction between STAT3 and SIRT2s in *P. fulvidraco*

(a) level of acetylation Flag-STAT3 and relationship with HA-SIRT2s by immunoprecipitation, (b) HEK 293T cells were transfected with Flag-STAT3 and GFP-SIRT2s; confocal microscopy images of STAT3 and SIRT2s proteins in the cells were detected by anti-Flag antibody immunofluorescence staining, GFP. green fluorescent protein

还是鱼类, STAT3 羧基末端存在多个乙酰化位点, 其中 K685 是最保守的乙酰化位点。其结果与 Yuan 等^[7] 和 Xu 等^[33] 报道的 K685 是 STAT3 为最保守乙酰化位点的结果相似, 也与 Wu 等^[25] 预测黄颡鱼 K685 是保守的乙酰化位点一致。

去乙酰化酶 SIRT2s 家族属于 class III HDACs, 参与生物体能量代谢、抗氧化、基因组稳定性等多种生物过程^[34-36]。为探究去乙酰化酶 SIRT2、SIRT5、SIRT7 与 STAT3 的关系, 实验将 SIRT2s 与 STAT3 共转染, 并用免疫沉淀检测 SIRT2s 与 STAT3 的蛋白互作及 STAT3 的乙酰化水平。结果显示, SIRT2、SIRT7 可与 STAT3 发生蛋白互作, 并对 STAT3 的乙酰化产生影响(图 4-a)。这证实黄颡鱼 SIRT2、SIRT7 是 STAT3 的乙酰基转移酶。在对哺乳动物小鼠的研究中, 发现 SIRT2 与

STAT3 互作, 进而去乙酰化 STAT3, 并降低 STAT3 磷酸化及其向核内的转运^[37]。本实验通过免疫荧光和免疫沉淀表明 SIRT2 与 STAT3 可发生蛋白互作, 并对 STAT3 乙酰化产生影响(图 4-a)。SIRT7 对 STAT3 蛋白翻译后修饰的研究集中于其磷酸化, 而作为一种去乙酰化酶, SIRT7 对 STAT3 的乙酰化研究较少。在本实验研究表明黄颡鱼 SIRT7 蛋白在细胞质及核内都有表达(图 4-b), 可与 STAT3 发生蛋白互作并去乙酰化 STAT3(图 4-a)。在胶质瘤细胞系中干扰或抑制 SIRT7 可抑制 STAT3 的磷酸化, 进而抑制细胞生长^[38]。根据本实验结果, 猜测 SIRT7 在不同物种或细胞中对 STAT3 的翻译后修饰作用不同。以往研究表明, SIRT5 蛋白作为一种能够选择性去除酸性酰基化的酶, 主要修饰赖氨酸上的琥珀酰化、丙二酰化、戊二酰基

团, 去乙酰化酶的活性较低^[18, 39-40]。而在对哺乳动物的研究中, SIRT5 可与 STAT3 相互结合, 敲除 SIRT5 后小鼠蛋白整体的乙酰化水平并无明显变化^[39, 41]。本研究发现黄颡鱼 SIRT5 与 STAT3 未发生互作 (图 4-a), 免疫荧光结果显示二者之间没有发生共定位 (图 4-b), 这可能是由于黄颡鱼 SIRT5 的去乙酰化能力较低所导致。黄颡鱼 SIRT5 与 STAT3 之间的修饰关系还有待于进一步研究。

4 结论

本研究对黄颡鱼 STAT3 乙酰化位点和 SIRTs 与 STAT3 的关系进行了研究, 黄颡鱼 STAT3 与哺乳动物相比, 具有相同的保守乙酰化位点 Lys685, 突变后其乙酰化水平显著降低。对 STAT3 潜在去乙酰化酶 SIRTs 而言, SIRT2、SIRT7 可以去乙酰化 STAT3, 而 SIRT5 则不能去乙酰化 STAT3。以上结果为研究 STAT3 蛋白及其翻译后修饰在鱼类生理功能中的作用奠定了分子基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] O'Shea J J, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 542-550.
- [2] Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, *et al.* Role of STAT3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism *in vivo*[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(2): 168-174.
- [3] Buuh Z Y, Lyu Z, Wang R E. Interrogating the roles of post-translational modifications of non-histone proteins[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(8): 3239-3252.
- [4] Chen C L, Hsieh F C, Lin J. Systemic evaluation of total stat3 and stat3 tyrosine phosphorylation in normal human tissues[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2006, 80(3): 295-305.
- [5] 薛翔, 刘红梅, 邵旦兵, 等. JAK/STAT信号通路调节机制的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(11): 2161-2165.
Xue X, Liu H M, Shao D B, *et al.* Research progress of regulating mechanism on JAK/STAT signaling pathway[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(11): 2161-2165 (in Chinese).
- [6] Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2628-2637.
- [7] Yuan Z L, Guan Y J, Chatterjee D, *et al.* Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue[J]. *Science*, 2005, 307(5707): 269-273.
- [8] Ray S, Boldogh I, Brasier A R. STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(5): 1616-1632.
- [9] Nie Y, Erion D M, Yuan Z L, *et al.* STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by Sirt1[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(4): 492-500.
- [10] Belo Y, Mielko Z, Nudelman H, *et al.* Unexpected implications of STAT3 acetylation revealed by genetic encoding of acetyl-lysine[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects*, 2019, 1863(9): 1343-1350.
- [11] Tang X, Gao J S, Guan Y J, *et al.* Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor[J]. *Cell*, 2007, 131(1): 93-105.
- [12] Chang H C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2014, 25(3): 138-145.
- [13] Hao L H, Park J, Jang H Y, *et al.* Inhibiting protein kinase activity of pyruvate kinase M2 by SIRT2 deacetylase attenuates psoriasis[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2021, 141(2): 355-363.e6.
- [14] Zhu H, Hu Y, Zeng C M, *et al.* The SIRT2-mediated deacetylation of AKR1C1 is required for suppressing its pro-metastasis function in non-small cell lung cancer[J]. *Theranostics*, 2020, 10(5): 2188-2200.
- [15] Gomes P, Outeiro T F, Cavadas C. Emerging role of Sirtuin 2 in the regulation of mammalian metabolism[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, 36(11): 756-768.
- [16] Tan M J, Peng C, Anderson K A, *et al.* Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(4): 605-617.
- [17] Rardin M, He W J, Nishida Y, *et al.* SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 18(6): 920-933.
- [18] Nishida Y, Rardin M J, Carrico C, *et al.* SIRT5 regulates both cytosolic and mitochondrial protein malonylation with glycolysis as a major target[J]. *Molecular Cell*, 2015, 59(2): 321-332.
- [19] Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y J, *et al.* Function of mitochondrial STAT3 in cellular respiration[J]. *Science*, 2009, 323(5915): 793-797.
- [20] Barber M F, Michishita-Kioi E, Xi Y X, *et al.* SIRT7

- links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation[J]. *Nature*, 2012, 487(7405): 114-118.
- [21] Li W L, Zhu D D, Qin S H. SIRT7 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis by promoting SMAD4 deacetylation[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37(1): 148.
- [22] Yu J, Qin B, Wu F Y, *et al.* Regulation of Serine-Threonine kinase AKT activation by NAD⁺-dependent deacetylase SIRT7[J]. *Cell Reports*, 2017, 18(5): 1229-1240.
- [23] Ryu D, Jo Y S, Lo Sasso G, *et al.* A SIRT7-dependent acetylation switch of GABPβ1 controls mitochondrial function[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 20(5): 856-869.
- [24] Chen Q L, Gong Y, Luo Z, *et al.* Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142-143: 380-386.
- [25] Wu K, Tan X Y, Xu Y H, *et al.* JAK and STAT members of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their roles in leptin affecting lipid metabolism[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 226: 14-26.
- [26] Rawlings J S, Rosler K M, Harrison D A. The JAK/STAT signaling pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(8): 1281-1283.
- [27] Guo T, Leng X J, Wu X F, *et al.* Cloning, molecular characterization, and expression analysis of the signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT₃*) gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1624-1634.
- [28] Wang N, Yang C G, Sun Z Z, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 (*stat3*) homologue in turbot (*Scophthalmus maximus*): molecular characterization and expression analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 255-262.
- [29] Guo C J, Zhang Y F, Yang L S, *et al.* The JAK and STAT family members of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: molecular cloning, tissues distribution and immunobiological activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 349-359.
- [30] Wu K, Tan X Y, Wei C C, *et al.* Isolation and expression analysis of STAT members from *Synechogobius hasta* and their roles in leptin affecting lipid metabolism[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 406.
- [31] Hillmer E J, Zhang H Y, Li H S, *et al.* STAT3 signaling in immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016, 31: 1-15.
- [32] 谢宏霞, 曾凤辉, 刘鸿, 等. 磷酸化和乙酰化修饰对 STAT3功能的调节[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(1): 115-120.
- Xie H X, Zeng F H, Liu H, *et al.* Functional regulation of STAT3 by phosphorylation and acetylation modifications[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(1): 115-120 (in Chinese).
- [33] Xu Y S, Liang J J, Wang Y M, *et al.* STAT3 undergoes acetylation-dependent mitochondrial translocation to regulate pyruvate metabolism[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 39517.
- [34] Houtkooper R H, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(4): 225-238.
- [35] Singh C K, Chhabra G, Ndiaye M A, *et al.* The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, 28(8): 643-661.
- [36] Sauve A A, Youn D Y. Sirtuins: NAD⁺-dependent deacetylase mechanism and regulation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2012, 16(5-6): 535-543.
- [37] Hu F Q, Sun X L, Li G, *et al.* Inhibition of SIRT2 limits tumour angiogenesis via inactivation of the STAT3/VEGFA signalling pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(1): 9.
- [38] Mu P F, Liu K, Lin Q Y, *et al.* Sirtuin 7 promotes glioma proliferation and invasion through activation of the ERK/STAT3 signaling pathway[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(2): 1445-1452.
- [39] Du J T, Zhou Y Y, Su X Y, *et al.* Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase[J]. *Science*, 2011, 334(6057): 806-809.
- [40] Chen Y, Sprung R, Tang Y, *et al.* Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(5): 812-819.
- [41] Nakamura Y, Ogura M, Ogura K, *et al.* SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(23): 4076-4081.

Validation of STAT3 acetylation site and its relationship with SIRT's deacetylase in *Pelteobagrus fulvidraco*

ZHENG Hua, XU Yichuang, ZHAO Tao, LÜ Wuhong,
YU Angen, HE Yang, TAN Xiaoying*

(Fishery College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The present study was conducted to validate the acetylation site of STAT3 and its relationship with SIRT's deacetylase family in *Pelteobagrus fulvidraco*. The STAT3 overexpression plasmids containing Flag tag and the SIRT's overexpression plasmids containing HA and GFP tags were constructed, and mutants were constructed for the possible acetylated sites of STAT3. Then, STAT3 was transfected and the mutants, STAT3 and SIRT's were co-transfected into HEK 293T cells, and the detection was carried out by immunoblotting, immunoprecipitation and immunofluorescence techniques. The results showed that STAT3 is a cytoplasmic protein. Compared with wild-type STAT3, the acetylation level of mutant K685R was significantly reduced. The acetylation levels of mutants K49R, K87R, K680R, K712R and K714R had no significant changes compared with wild-type STAT3. The immunoprecipitation and immunofluorescence showed that SIRT2 and SIRT7 interacted with STAT3 and catalyzed the deacetylation of STAT3, while SIRT5 did not interact with STAT3, and there was no significant change in acetylation level. The study revealed the acetylation site of STAT3 and the relationship between STAT3 and SIRT's in *P. fulvidraco*.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; STAT3; acetylation; SIRT's; overexpression

Corresponding author: TAN Xiaoying. E-mail: txy7933@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172983, 31572605); National Key R & D Program of China (2018YFD0900400); Project of Innovative Group for Excellent Young Scientists, Hubei Provincial Department of Education (T201933)