

论著·基础研究

黏蛋白 1 调控肿瘤细胞恶性特征的功能位点分析

高珂星, 廖春华, 李昇泽, 马双羽, 黄 雷

上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025

[摘要] **目的**·探究黏蛋白 1 (mucin 1, MUC1) 调控肿瘤细胞增殖、迁移和干性维持的功能位点。**方法**·通过癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析寻找 *MUC1* 基因在不同癌症中的突变特征, 对不同 *MUC1* 突变位点进行定位, 并按突变出现频率排序; 通过 Western blotting 筛选出突变频率较高且蛋白稳定表达的 *MUC1* 突变体, 利用乳腺癌细胞株 BT549 敲除 *MUC1* 细胞系和乳腺非转化细胞株 MCF-10A, 应用慢病毒表达系统构建 *MUC1* 野生型 (*MUC1*-WT) 和突变体稳定表达的细胞系。采用免疫荧光法检测不同 *MUC1* 突变体的细胞定位。以 *MUC1*-WT 为阳性对照、*MUC1*-AQA 功能丧失突变体为阴性对照, 对不同突变细胞的肿瘤生物学功能进行分析: 通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 及克隆形成实验检测细胞增殖能力; 通过划痕实验及 Transwell 实验检测细胞迁移能力; 通过成球实验检测细胞干性。使用 PyMOL 软件分析 *MUC1* 突变体结构定位并通过蛋白质对接软件 (ZDOCK Server) 进行分子对接分析。**结果**·在 TCGA 数据库中得到 102 个位于 *MUC1* 编码区的突变, 其中 P418S、S251R、V359I、N271S、N465H 5 个错义突变出现频率较高且位于非数目可变串联重复序列 (non-variable number of tandem repeats, non-VNTR) 区域。进一步检测发现 *MUC1*-S251R、N271S、V359I 突变体可稳定表达; 细胞定位分析发现这 3 个突变体主要分布于细胞质, 同时细胞核也有一定的分布, 核质比与野生型未见明显差异。表达不同 *MUC1* 突变体细胞的肿瘤生物学功能分析发现: ① *MUC1*-WT 高表达显著增强 BT549 和 MCF-10A 细胞的增殖能力; 与 *MUC1*-WT 细胞相比, *MUC1*-AQA、S251R、N271S 突变体细胞增殖能力下降, 但 *MUC1*-V359I 突变体细胞与 *MUC1*-WT 细胞具有相似的增殖能力。② *MUC1*-WT 高表达细胞的迁移能力显著增强, 而 *MUC1*-AQA 细胞迁移能力减弱。在 BT549 细胞中, *MUC1*-S251R 与 *MUC1*-V359I 突变体细胞迁移能力与 *MUC1*-WT 细胞相似, 但 *MUC1*-N271S 细胞的迁移能力较 *MUC1*-WT 细胞降低。在 MCF-10A 细胞中, *MUC1*-N271S 与 *MUC1*-V359I 细胞的迁移能力接近 *MUC1*-WT 细胞; 但 *MUC1*-S251R 细胞较 *MUC1*-WT 细胞迁移能力显著下降。③ *MUC1*-WT 高表达显著增强 2 种细胞的干性, 而 *MUC1*-AQA 细胞干性丧失; *MUC1*-N271S、V359I 与 *MUC1*-WT 具有相似的维持细胞干性的能力, 而 *MUC1*-S251R 使细胞干性减弱。PyMOL 软件分析结果显示, *MUC1*-N271S 及 V359I 位于海胆精子蛋白-肠激酶-聚集蛋白 (sperm protein-enterokinase-agarin, SEA) 区域及附近, 分别处于 loop 区及 β -折叠处; 分子对接结果显示, *MUC1*-WT 及 V359I 与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 胞外域形成复合物的稳定性强于 *MUC1*-N271S 和 S251R, 其稳定性排序为 V359I>WT>N271S>S251R。**结论**·*MUC1* 突变体对肿瘤细胞的生物学功能具有不同影响, 其对增殖能力影响可能与 EGFR 信号通路相关。*MUC1*-V359I 与 *MUC1*-WT 相似, 并未影响 *MUC1* 对肿瘤细胞增殖、迁移及干性维持的作用; 而 *MUC1*-S251R、N271S 位点可能参与细胞增殖和迁移的信号通路调控且 *MUC1*-S251R 位点对维持细胞干性较为重要。

[关键词] 黏蛋白 1; 错义突变; 肿瘤; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞干性**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.11.004 **[中图分类号]** R730.2 **[文献标志码]** A

Functional site analysis of mucin 1 in regulating the malignant characteristics of tumor cells

GAO Kexing, LIAO Chunhua, LI Shengze, MA Shuangyu, HUANG Lei

Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To identify the functional motifs of mucin 1 (MUC1) involved in regulating tumor cell proliferation, migration, and stemness maintenance. **Methods**·Mutational characteristics of the *MUC1* gene across different cancers were identified from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Various *MUC1* mutation sites were analyzed and localized, followed

[基金项目] 国家自然科学基金 (81874197, 82073111); 上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项 (21S11901600)。**[作者简介]** 高珂星 (2000—), 女, 硕士生; 电子信箱: xingke_gao@163.com。**[通信作者]** 黄 雷, 电子信箱: leihuang@shsmu.edu.cn。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82372764, 82073111); Biomedical Science and Technology Support Special Project in “Science and Technology Innovation Action Plan” by Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (21S11901600).**[Corresponding Author]** HUANG Lei, E-mail: leihuang@shsmu.edu.cn.

by ranking based on mutation frequency. Western blotting was used to screen high-frequency MUC1 mutants with stable protein expression. BT549 cell line with *MUC1* knocked out and MCF-10A cell line were used to stably overexpress MUC1 wild-type (MUC1-WT) and mutants by using lentiviral technology. Immunofluorescence was used to detect the cellular localization of MUC1 mutants. Using MUC1-WT as a positive control and MUC1-AQA, a loss-of-function mutant, as a negative control, the biological functions of different MUC1 mutant cells were analyzed: cell proliferation ability was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and colony formation assay; cell migration ability was evaluated by wound-healing and Transwell assays; cell stemness was examined by sphere formation assay. Structural localization of MUC1 mutants was analyzed by using PyMOL software, and molecular docking analysis was performed by using a protein docking software (ZDOCK Server). **Results** A total of 102 mutations located in the *MUC1* coding region were identified in the TCGA database, among which five missense mutations (P418S, S251R, V359I, N271S, and N465H) exhibited higher frequencies and were located in the non-variable number of tandem repeats (non-VNTR) region. Further examination revealed that the MUC1-S251R, N271S, and V359I mutants could be stably expressed. The cellular localization assay indicated that these three mutants predominantly localized in the cytoplasm, but were also presented in the nucleus. The nuclear-to-cytoplasmic ratio showed minimal differences between MUC1-WT and the mutants. Analysis of the tumorigenic biological functions of the cells expressing different MUC1 mutants revealed that: ① High expression of MUC1-WT significantly enhanced the proliferation ability of both BT549 and MCF-10A cells; the proliferation of MUC1-AQA, S251R, and N271S mutant cells was decreased compared to MUC1-WT cells, while MUC1-V359I mutant cells exhibited a similar proliferative profile to MUC1-WT cells. ② The migration ability of MUC1-WT high-expressing cells was significantly enhanced, whereas MUC1-AQA cells demonstrated attenuated migration. In the BT549 cells, the migration ability of MUC1-S251R and V359I cells was similar to that of MUC1-WT cells, whereas MUC1-N271S cells showed reduced migration. In the MCF-10A cells, the migration ability of MUC1-N271S and MUC1-V359I cells was similar to that of MUC1-WT cells, whereas MUC1-S251R cells exhibited significantly decreased migration. ③ Stemness was enhanced in both cell types with high MUC1-WT expression, while MUC1-AQA cells lost stemness; the cells with MUC1-N271S, V359I and MUC1-WT showed comparable maintenance of stemness, whereas MUC1-S251R cells demonstrated compromised stemness. PyMOL software analysis unveiled that MUC1-N271S and V359I were located in or around the sperm protein-enterokinase-agarin (SEA) region, specifically in the loop region and the β -sheet, respectively. The molecular docking analysis revealed that the stability of the complex formed by MUC1-WT or V359I with the extracellular domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) surpassed that of MUC1-N271S or S251R, indicating a stability hierarchy of V359I>WT>N271S>S251R. **Conclusion** MUC1 mutants exhibit diverse impacts on the biological functions of tumor cells, with their effects on proliferation correlating with the EGFR signaling pathway. MUC1-V359I is similar to MUC1-WT, indicating a negligible effect on tumor cell proliferation, migration, and stemness maintenance. Conversely, MUC1-S251 and N271 sites may be involved in the regulation of signaling pathways governing cell proliferation and migration and the MUC1-S251 site plays a critical role in maintaining cell stemness.

[Key words] mucin 1 (MUC1); missense mutation; tumor; cell proliferation; cell migration; cell stemness

黏蛋白 (mucin, MUC) 家族是一类大分子糖蛋白, 有 21 个家族成员, 可分为跨膜型和分泌型 2 种类型^[1-2]。MUC 家族多个成员的异常表达与癌症和炎症性疾病相关, 例如 MUC13、MUC17 的表达上调与胃癌和胰腺癌的发生有关^[3-4], *MUC13* 基因敲除可以使肠上皮细胞凋亡增加从而促进肠道炎症的发生^[5-6]。*MUC1* 基因位于 1 号染色体 q22 区域, 转录为单一的 mRNA, 翻译产生的肽链在内质网中被水解为 N 末端亚基 (MUC1-N) 和 C 末端亚基 (MUC1-C), 两者通过非共价键连接形成 MUC1 蛋白^[7-8]。MUC1-N 包含数目可变串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTR) 区和部分海胆精子蛋白-肠激酶-聚集蛋白 (sperm protein-enterokinase-agarin, SEA) 结构域; 其中, VNTR 区域富含丝氨酸 (serine, Ser)、苏氨酸 (threonine, Thr) 和脯氨酸 (proline, Pro), 是发生 O-连接 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 修饰的位点; SEA 结构域中的 GSVVV 基序是 MUC1 被水解为 2 个

亚基的关键位点^[9-10]。MUC1-C 由胞外段 (extracellular domain, ED)、跨膜段 (transmembrane domain, TM) 及胞内段 (cytoplasmic domain, CD) 组成^[11]。MUC1-CD 含有 7 个酪氨酸 (tyrosine, Tyr), 可以参与多种激酶信号通路^[12]; MUC1-CD 头部含 CQC (半胱氨酸-谷氨酰胺-半胱氨酸) 基序, 是 MUC1 形成同源二聚体并行使生物学功能所必需^[13-14]。MUC1 在组织器官中广泛分布, 主要包括消化道、生殖管道、呼吸系统, 以及各种腺体的管腔上皮细胞表面。正常情况下, MUC1 与 MUC 家族其他成员一起形成黏液层, 润滑并保护上皮细胞免受环境因素的刺激^[15-16]; 在肿瘤组织中, MUC1 丧失极性分布并过度表达, 其蛋白水平可达到正常水平的 50~100 倍^[17]。此外, MUC1 侧链被高度唾液酸化, 阻止糖链的进一步延伸, 从而暴露配体结合域并增强致癌信号^[18]。因此, MUC1 的胞外抗原 CA15-3^[19] 和 CA19-9^[20] 已作为乳腺癌和胰腺癌诊断的临床标志物。

MUC1, 特别是 MUC1-C, 在肿瘤中参与多种信号通路的异常转导, 调控肿瘤细胞增殖、转移、凋亡、干性维持及化疗耐药等恶性特征^[21], 但是 MUC1 参与肿瘤各种恶性特征调控的基序并不完全清楚。过往研究主要聚焦于 MUC1 过表达与肿瘤的关系, 关于 *MUC1* 的基因突变研究仅限于由 VNTR 区 AG 缺失导致的移码突变, 进而引发的常染色体显性遗传肾小管间质性肾病 (autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease, ADTKD)^[22-23]。目前尚无研究对肿瘤中 *MUC1* 的错义突变及功能进行分析。为了研究 MUC1 蛋白参与肿瘤恶性特征调控的功能基序, 我们通过癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析, 寻找 *MUC1* 在不同癌症中的突变位点; 并选择突变频率较高且稳定表达的突变体, 研究它们对肿瘤细胞增殖、迁移、干性维持的影响, 以探究 MUC1 不同位点的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒 人类三阴性乳腺癌细胞 BT549、人乳腺上皮细胞 MCF-10A、人胚胎肾细胞 HEK293T 均购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心。3 种细胞均经细胞系遗传背景鉴定 [即短串联重复序列 (STR) 鉴定, 由上海翼和应用生物技术有限公司完成], 且无支原体污染。BT549 *MUC1* 敲除 (gMUC1) 细胞系与对照组 (gCtrl) 细胞系来自本实验室前期已构建细胞^[24]。质粒 pMD2.G、psPAX2 来自 Addgene, 质粒 pIRES-puro2、pENTR-1A、pInducer-20 均来自上海交通大学医学院 DNA 文库。

1.1.2 主要试剂和仪器 高糖 DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、DMEM-F12 培养基、牛血清白蛋白 (BSA)、霍乱毒素 (cholera toxin, CTX) 购自上海源培生物科技股份有限公司, 限制性内切酶 *Bsu36 I*、*Not I* 购自美国 BioLabs 公司, T4 连接酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Gateway™ LR Clonase™ II 酶混合物购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 质粒快速小抽试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 预制胶、胰蛋白酶、青霉素-链霉素双抗和 Nano293T 转染试剂购自苏州新赛美生物公司, 聚凝胺 (polybrene) 购自美国 Sigma-

Aldrich 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、B-27 无血清添加剂购自美国 Gibco 公司, 马血清购自美国 Biological Industries 公司, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) 购自美国 PeproTech 公司, 胰岛素购自北京兰博利德生物技术有限公司, 结晶紫、DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司, 氢化可的松 (hydrocortisone)、细胞计数试剂盒 (CCK-8) 购自上海陶素生化科技有限公司, 抗 MUC1-N 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 抗 MUC1-C 抗体购自美国 Selleck 公司, 抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购自美国 CST 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)-羊抗兔二抗、HRP-羊抗鼠二抗购自上海 Abmart 公司, Texas-Red-羊抗兔二抗购自美国 Jackson 公司。

超微量分光光度计 (ND8000LAPTOP, 美国 Thermo Fisher Scientific), Azure Biosystems 化学发光成像系统 (C300, 美国 Azure), 倒置显微镜 (Eclipse Ts2R-FL, 日本 Nikon), 共聚焦显微镜 (TCS SP8 X, 德国 Leica), 酶标仪 (Multiskan™ FC, 美国 Thermo Fisher Scientific)。

1.2 方法

1.2.1 不同肿瘤中 *MUC1* 突变位点的分析 通过 TCGA 数据库 (<https://www.cbiportal.org/>), 查找不同肿瘤患者样本中 *MUC1* 的突变位点, 分析各突变位点的来源、频率及定位。

1.2.2 细胞培养 BT549 细胞用含 1% 双抗和 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基培养; MCF-10A 细胞培养基配方为 25 mg/mL 胰岛素 10 μ L、100 μ g/mL EGF 10 μ L、5 mg/mL 氢化可的松 5 mL、1 mg/mL CTX 5 mL、马血清 2.5 mL, DMEM-F12 培养基补足至 50 mL; HEK293T 细胞用含 1% 双抗和 10% FBS 的高糖 DMEM 完全培养基培养。细胞均在含有 5% CO₂ 的培养箱中 37 °C 恒温培养。

1.2.3 *MUC1* 突变体质粒的构建 根据数据库检索到的 *MUC1* 突变位点, 设计对应的引物 (表 1)。以 pIRES-puro2-MUC1-WT^[25] 为模板通过聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 构建 *MUC1* 定点突变质粒, 即 pIRES-puro2-MUC1-AQA/S251R/N271S/V359I/P418S/N465H (pIRES-puro2-MUC1-mutants), 其中, MUC1-AQA 为 MUC1-CQC 功能丧失的突变体,

此处作为阴性对照^[26-27]。PCR反应程序：94℃ 4 min；94℃ 30 s，62℃ 30 s，72℃ 1 min，30个循环；72℃ 5 min。将以上构建的突变质粒经过*Bsu*36 I、*Not* I酶

切连接至pENTR-1A质粒中，然后采用Gateway重组方法构建pInducer-MUC1-WT/AQA/S251R/N271S/V359I/P418S/N465H（pInducer-MUC1-WT/mutants）质粒。

表1 PCR引物序列
Tab 1 Primer sequences for PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
AQA	GCCTTGGCTGTCGCTCAGGCCCGCCGAAAGAAC	GTTCTTTCGGCGGGCCTGAGCGACAGCCAAGGC
S251R	CCTCCAATCACAGGACTTCTCCCCAG	CTGGGGAGAAGTCCTGTGATTGGAGG
N271S	TTCACATTTCAAGCCTCCAGTTTAATT	AATTAAACTGGAGGCTTGAAATGTGAA
V359I	ACGATCTCAGACATCAGCGTGAGTGAT	ATCACTCACGCTTACGTCTGAGATCGT
P418S	CAGCTGGACATCTTTTCAGCCCGGGAT	ATCCCGGGCTGAAAAGATGTCCAGCTG
N465H	TCTTACACACCCAGCAGTGGCAGCC	GGCTGCCACTGCTGGGTGTGTGTAAGA

1.2.4 MUC1 突变体稳转细胞系的构建和诱导表达
①病毒包装：HEK293T细胞培养至汇合度为60%~70%时，以1:3:4的比例，加入pMD2.G质粒、psPAX2质粒及pInducer-vector或pInducer-MUC1-WT/MUC1-mutants质粒体系，并用Nano293T转染试剂转染，于培养箱中分别培养48 h和72 h后，用20 mL注射器吸取病毒上清液。上清液经孔径0.45 μm滤头过滤后，保存于-80℃。②病毒感染：采用BT549 gMUC1细胞系^[24]及MCF-10A细胞系，待上述细胞长至30%~40%汇合度时，进行病毒感染，病毒感染体系为4 mL无双抗的完全培养基、1 mL病毒液和4 μL polybrene（终浓度8 μg/mL），感染4~6 h后换液，继续培养48 h后按一定比例传代，并加入抗性筛选药物G418（终浓度50 μg/mL），筛选7 d后，加入多西环素（doxycycline, DOX）处理48 h诱导MUC1的表达并收集混合克隆细胞检测蛋白表达。
1.2.5 Western blotting分析 通过胰蛋白酶消化收集细胞，并用含蛋白酶抑制剂（1:100）的NETN150裂解液裂解细胞，超声破碎。通过Quick Start Bradford试剂对蛋白质进行定量，SDS-PAGE分离蛋白质并转移至硝酸纤维素膜。在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h后，将膜依次与抗MUC1-N一抗、抗MUC1-C一抗在4℃下孵育过夜；在室温下加入HRP-二抗孵育30 min，采用化学发光法检测。
1.2.6 免疫荧光实验 先将灭菌的圆形盖玻片置入6孔板中，然后每孔加入3×10⁴个细胞，培养箱中培养过夜。次日，PBS洗净后加入4%多聚甲醛，室温固定10 min。PBS洗净后加入0.1% Triton X-100处理10 min，PBS洗净后加入含5%山羊血清的BSA，室温封闭1 h。PBS洗净后加入抗MUC1-C一

抗，4℃孵育过夜。PBS洗净后加入按比例稀释带有Texas-Red荧光标记的二抗，避光37℃孵育2 h。PBS洗净后吸去盖玻片上多余水分，将有细胞附着的一面朝下贴在滴加DAPI的载玻片上，室温孵育10 min，指甲油封片。随后使用激光共聚焦显微镜进行荧光拍照。
1.2.7 细胞增殖实验 细胞接种于96孔板中（BT549细胞1 500个/孔，MCF-10A细胞1 000个/孔），使用CCK-8法测定细胞活力，按试剂盒说明书操作。酶标仪测量450 nm波长处的吸光度。
1.2.8 细胞克隆形成实验 细胞接种于6孔板中（1 000个/孔），加入含10% FBS的培养基培养5~9 d，直至形成肉眼可见的细胞克隆。然后采用4%多聚甲醛固定30 min，并以0.1%结晶紫染色1 h，扫描仪成像拍照。
1.2.9 细胞划痕实验 按照1×10⁶个/孔将细胞接种于6孔板，采用含10% FBS的培养基培养。次日待细胞达到100%汇合度后，用200 μL的枪头进行划线。然后更换为无血清培养基，分别在初始和培养48 h后，采用显微镜拍摄同一视野下细胞的迁移照片。细胞迁移率=（初始宽度-48 h宽度）/初始宽度×100%。
1.2.10 Transwell实验 将细胞接种于Transwell上室（BT549细胞2×10⁴个/孔，MCF-10A细胞7×10⁴个/孔），并置于24孔板中。其中上室加入不含或减血清的培养基，下室加入含有10% FBS的完全培养基。细胞培养24 h后，将下室细胞用4%多聚甲醛固定30 min，并以0.1%结晶紫染色1 h，擦去上室细胞后在显微镜下拍照并统计细胞数量。
1.2.11 细胞成球实验 将细胞接种于超低吸附的24

孔板中 (BT549 细胞 2 000 个/孔, MCF-10A 细胞 7 000 个/孔)。细胞成球实验采用无血清的 DMEM-F12 培养基, 含 0.4% BSA、20 ng/mL EGF、20 ng/mL b-FGF、50 μ g/mL 胰岛素和 1 \times B-27。细胞培养 7 d 后, 在显微镜下对微球体 (直径>50 μ m) 进行计数。

1.2.12 MUC1 突变体蛋白结构定位及分子对接分析 应用 PyMOL 软件 (v2.5.4) 对 MUC1 突变体的 SEA 结构进行分析, 使用 ZDOCK Server (<https://zdock.umassmed.edu/>) 对 MUC1 与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 胞外域 (extracellular domain, ECD) 进行分子对接分析, 并通过 PDBePISA 软件 (v1.52) 分析分子结合的吉布斯自由能。

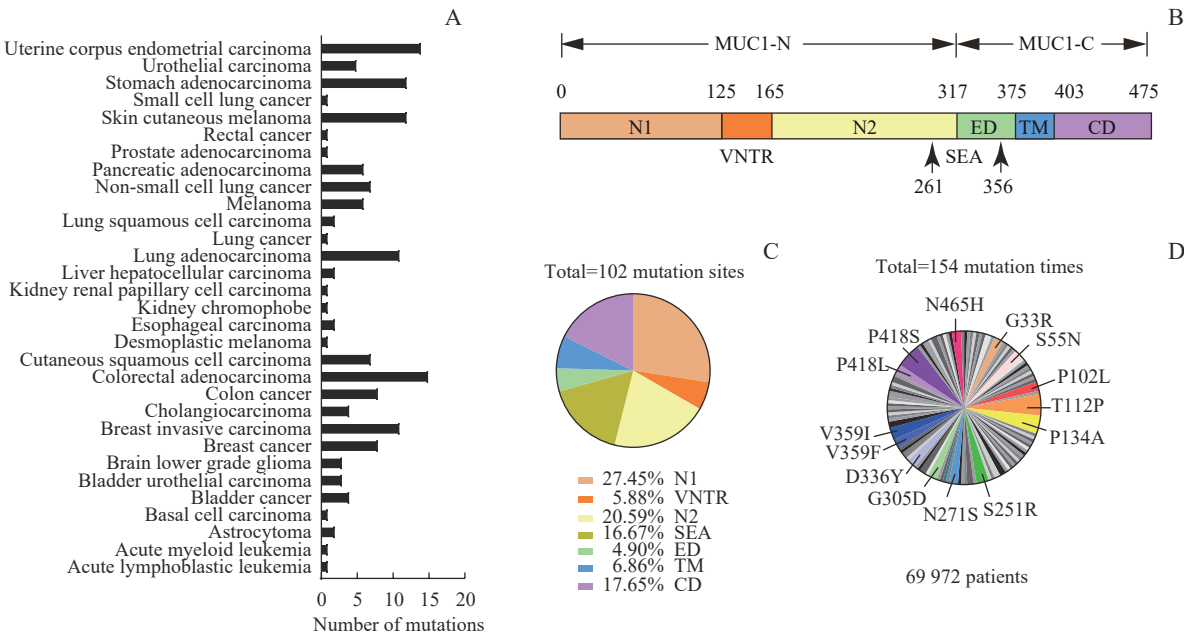
1.3 统计学分析

所有统计分析均应用 GraphPad Prism 8.0 软件。定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 实验重复 3 次, 组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA 数据库分析 MUC1 基因突变

首先利用 TCGA 数据库查找 MUC1 基因突变位点, 结果显示 MUC1 突变较多的肿瘤包括结直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、皮肤黑色素瘤、肺腺癌、浸润性乳腺癌等 (图 1A)。随后, 对 MUC1 蛋白功能域中的突变进行了分析, 其中 MUC1-N 以 VNTR 为界将前后分别定义为 N1 和 N2 区段 (图 1B)。最终得到的 102 个突变位点中, 28 个位于 N1 段, 6 个位于 VNTR 段, 21 个位于 N2 段, 17 个位于 SEA 段, 5 个位于 ED 段, 7 个位于 TM 段, 18 个位于 CD 段 (图 1C)。进一步对突变位点出现频率进行分析, 统计了出现频率 $\geq 1.95\%$ 的突变, 共 14 个 (图 1D)。将这 14 个突变按照出现频率从高到低排序, 并综合考虑以下因素: 突变频率较高且位于非 VNTR 区, 优先选择 MUC1-C 区或易发生糖基化的位点。最终选择 5 个错义突变 P418S、S251R、V359I、N271S 及 N465H 用于进一步研究 (表 2)。



Note: A. Proportion of MUC1 mutations in various tumor types. B. MUC1 protein consisting of N1, VNTR, N2, SEA, ED, TM, and CD domains. C. Location of 102 mutation sites in MUC1 protein. D. The mutation sites with a frequency of 1.95% or more in tumor samples.

图1 TCGA 数据库中 MUC1 突变位点来源、定位及频率分析

Fig 1 Analysis of sources, positions, and frequencies of MUC1 mutation sites in the TCGA database

2.2 MUC1 不同突变体的蛋白水平分析

结果如图 2 所示。首先, 我们构建了 AQA、S251R、N271S、V359I、P418S 及 N465H 的表达载体。此处以 MUC1-AQA 作为阴性对照, 野生型 MUC1 (MUC1-WT) 作为阳性对照。在 HEK293T 细胞中导入

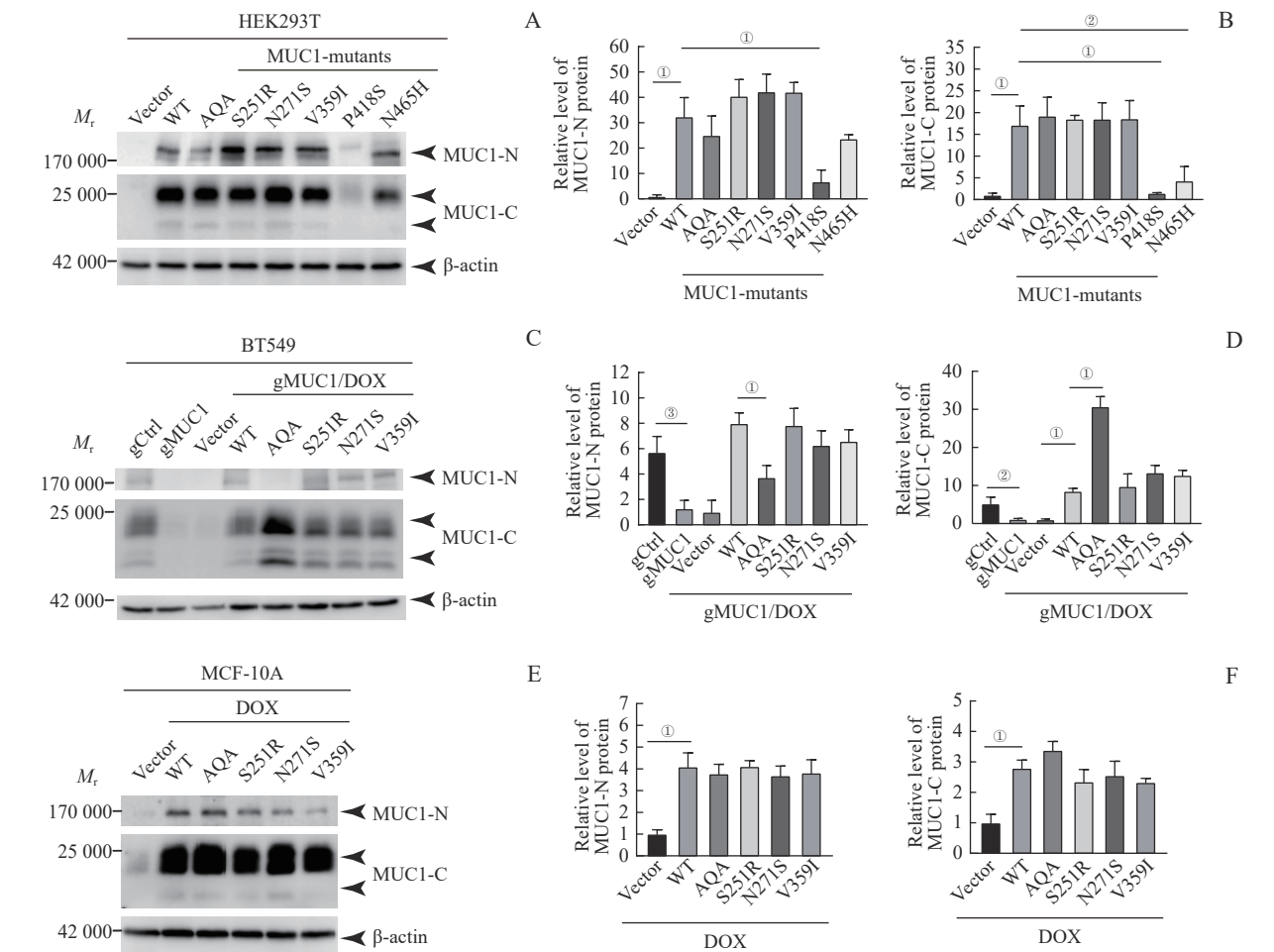
上述载体, Western blotting 结果表明: S251R、N271S、V359I 突变体的 MUC1-N 及 MUC1-C 亚基的蛋白水平与野生型相当, 而 P418S 和 N465H 突变体的蛋白水平较低 (图 2A、B)。

为了研究 MUC1 突变体在肿瘤细胞中的表达情况,

表 2 14 个 *MUC1* 高频突变体的信息

Tab 2 Information of 14 *MUC1* mutants with high frequency

Mutant	Cancer type	Location	Frequency/%
P418S	Lung squamous cell carcinoma	CD	5.19
T112P	Bladder urothelial carcinoma/pancreatic adenocarcinoma	N1	4.55
P134A	Pancreatic adenocarcinoma/melanoma	VNTR	3.90
S251R	Esophagogastric cancer/stomach adenocarcinoma	N2	2.60
V359I	Colorectal adenocarcinoma/breast invasive carcinoma	ED	2.60
G33R	Cutaneous squamous cell carcinoma	N1	1.95
S55N	Uterine corpus endometrial carcinoma	N1	1.95
P102L	Stomach adenocarcinoma	N1	1.95
N271S	Breast invasive carcinoma	SEA	1.95
G305D	Stomach adenocarcinoma	SEA	1.95
D336Y	Lung adenocarcinoma	SEA	1.95
V359F	Breast invasive carcinoma	ED	1.95
P418L	Cutaneous squamous cell carcinoma	CD	1.95
N465H	Uterine corpus endometrioid carcinoma	CD	1.95



Note: A/C/E. Western blotting was used to detect MUC1 protein expression levels in HEK293T cells (A), BT549 cells (C) and MCF-10A cells (E). B/D/F. Statistical analysis of MUC1 protein levels in HEK293T cells (B), BT549 cells (D) and MCF-10A cells (F). ① $P < 0.001$, ② $P = 0.020$, ③ $P = 0.002$.

图 2 MUC1-WT 及其突变体在细胞中的蛋白表达水平

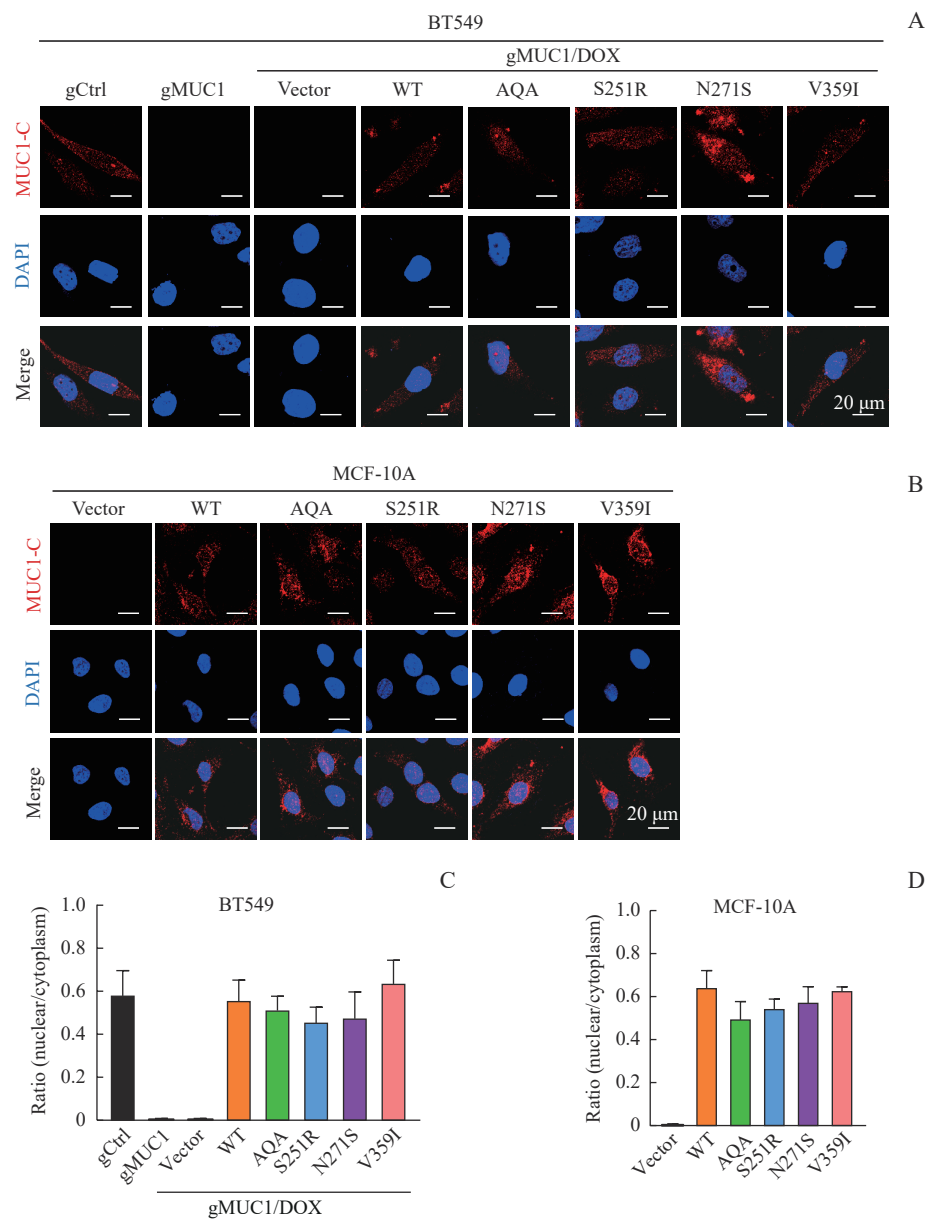
Fig 2 Protein expression levels of MUC1-WT and mutants in the cells

利用三阴性乳腺癌BT549细胞系，敲除MUC1后分别回转MUC1-WT及各突变体并对其表达水平进行检测。结果发现S251R、N271S、V359I突变体MUC1-N及MUC1-C的蛋白水平与野生型相似（图2C、D），MUC1-AQA一定程度上降低了MUC1-N的表达，但MUC1-C的蛋白表达水平较高。进一步在人正常乳腺上皮细胞系MCF-10A中验证S251R、N271S和V359I突变体MUC1-N及MUC1-C的蛋白表达水平，结果可见表达水平与野生型类似（图2E、F）。因此，将S251R、N271S、V359I 3种突变用于后续功能

研究。

2.3 MUC1突变体细胞定位的分析

进一步利用BT549和MCF-10A细胞系对MUC1及其突变体的细胞定位进行分析。免疫荧光结果显示，在2种细胞系中，MUC1-WT及各突变体主要分布在细胞质中，同时细胞核中也存在一定的分布（图3A、B）。与野生型相比，各突变体核质比例无明显差异，提示这3种突变对MUC1的细胞定位无明显影响（图3C、D）。



Note: A/B. Detection of cellular localization of MUC1 mutants by immunofluorescence in BT549 cells (A) and MCF-10A cells (B)($\times 600$). C/D. Statistical analysis of MUC1 nuclear/cytoplasm ratio in BT549 cells (C) and MCF-10A cells (D).

图3 MUC1-WT及其突变体的细胞定位

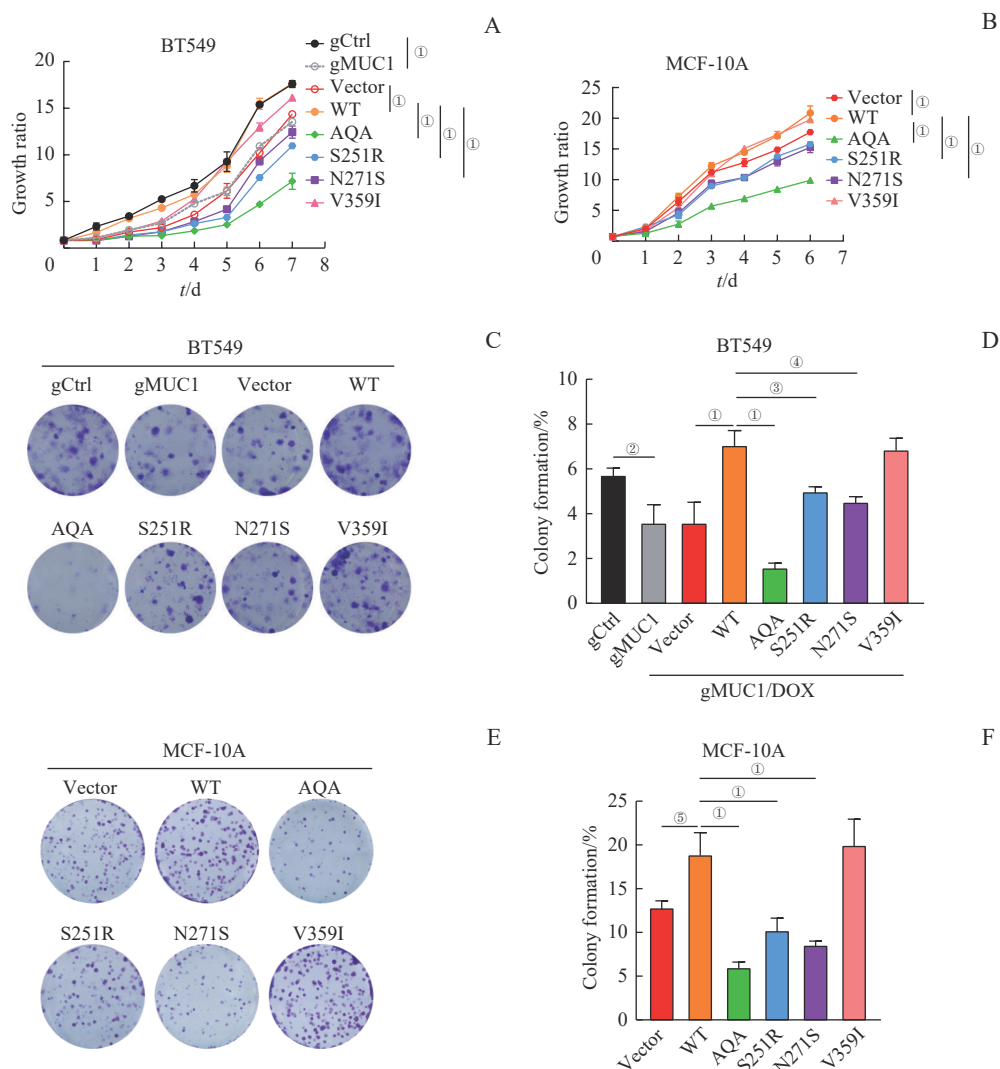
Fig 3 Cellular localization of MUC1-WT and mutants

2.4 MUC1突变体对细胞增殖能力的影响

利用BT549和MCF-10A细胞系进一步研究突变体对细胞增殖能力的影响。CCK-8结果显示, BT549细胞中, 与gCtrl细胞相比, MUC1敲除(gMUC1细胞)显著降低细胞的增殖能力。之后在gMUC1细胞中, 分别回补空载体(Vector)、MUC1-WT及各突变体; 与Vector相比, MUC1-WT可增强细胞的增殖能力; 相较MUC1-WT细胞, MUC1-AQA、S251R和N271S细胞增殖能力显著降低; 而MUC1-V359I细胞具有与MUC1-WT细胞相似的增殖

能力(图4A)。与CCK-8检测结果一致, MUC1-WT细胞和V359I细胞克隆形成数无明显差异, 而MUC1-AQA、S251R、N271S细胞克隆形成率显著降低(图4C、D)。

在MCF-10A细胞中, 也观察到类似的结果。相比空载对照组(Vector), MUC1-WT细胞增殖能力增强; 相比MUC1-WT细胞, MUC1-AQA、S251R和N271S细胞增殖水平和克隆形成率均显著降低; 而MUC1-V359I细胞与MUC1-WT细胞增殖能力和克隆形成能力相似(图4B、E、F)。



Note: A/B. Growth curves of BT549 cells (A) and MCF-10A cells (B) expressing MUC1-WT or mutants detected by CCK-8. C/D. Colony formation analysis of BT549 cells expressing MUC1-WT or mutants. Representative crystal violet-stained images (C) and corresponding statistical analysis (D). E/F. Colony formation analysis of MCF-10A cells expressing MUC1-WT or mutants. Representative crystal violet-stained images (E) and corresponding statistical analysis (F). ① $P < 0.001$, ② $P = 0.003$, ③ $P = 0.005$, ④ $P = 0.007$, ⑤ $P = 0.009$.

图4 MUC1-WT及其突变体对细胞增殖能力的影响

Fig 4 Effect of MUC1-WT and mutants on cell proliferation

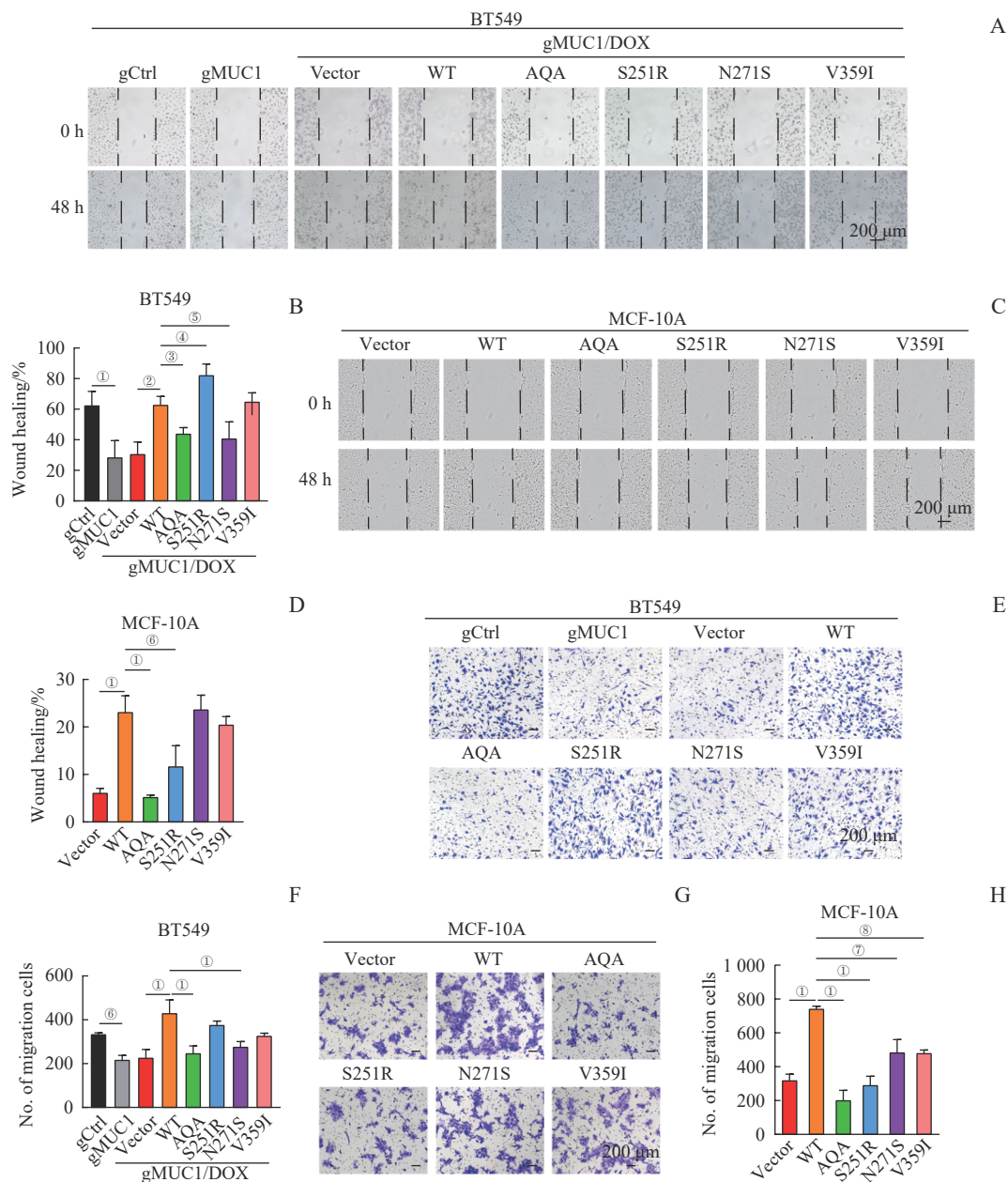
以上结果提示, MUC1的S251R和N271S突变体在不同程度上破坏了MUC1促细胞增殖的功能, 而

MUC1-V359I则与MUC1-WT类似, 仍有促进细胞增殖的作用。

2.5 MUC1 突变体对细胞迁移能力的影响

为了研究不同 *MUC1* 突变体对细胞迁移能力的影响, 对表达 *MUC1* 不同突变体的细胞系进行细胞划痕实验及 Transwell 实验 (图 5)。结果显示, 在 BT549 细胞中, 敲除 *MUC1* (gMUC1) 细胞与 gCtrl 细胞相比, 迁移能力显著降低。之后在 gMUC1 细胞中分别回补空载体 (Vector)、*MUC1*-WT 及各突

变体, *MUC1*-WT 细胞相比 Vector 细胞迁移能力显著提高; 与 *MUC1*-WT 细胞相比, *MUC1*-AQA 和 N271S 细胞的迁移能力显著降低, 与 *MUC1* 敲除细胞和 Vector 细胞差异无统计学意义; 而 *MUC1*-S251R 和 V359I 细胞与 *MUC1*-WT 细胞迁移能力相似, *MUC1*-S251R 细胞的迁移能力在划痕实验中甚至高于 *MUC1*-WT 细胞。



Note: A/B. Wound healing assay of BT549 cells expressing *MUC1*-WT or mutants. Representative images of cells at 0 h and 48 h (A, $\times 200$) and corresponding statistical analysis (B). C/D. Wound healing assay of MCF-10A cells expressing *MUC1*-WT or mutants. Representative images of cells at 0 h and 48 h (C, $\times 200$) and corresponding statistical analysis (D). E/F. Transwell migration analysis of BT549 cells expressing *MUC1*-WT or mutants. Representative crystal violet-stained images (E, $\times 100$) and corresponding statistical analysis (F). G/H. Transwell migration analysis of MCF-10A cells expressing *MUC1*-WT or mutants. Representative crystal violet-stained images (G, $\times 100$) and corresponding statistical analysis (H). ^① $P < 0.001$, ^② $P = 0.004$, ^③ $P = 0.014$, ^④ $P = 0.030$, ^⑤ $P = 0.025$, ^⑥ $P = 0.003$, ^⑦ $P = 0.050$, ^⑧ $P = 0.042$.

图5 *MUC1*-WT 及其突变体对细胞迁移的影响

Fig 5 Effect of *MUC1*-WT and mutants on cell migration

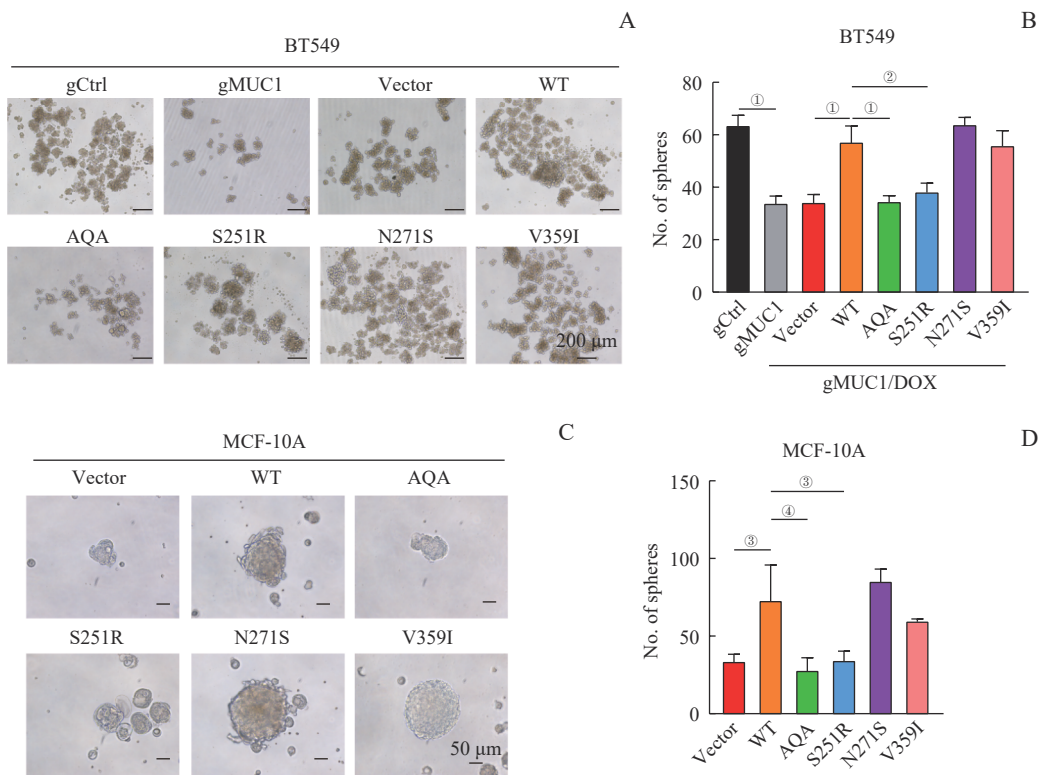
在MCF-10A细胞中,相比空载对照(Vector)组,MUC1-WT细胞迁移能力增强;MUC1-AQA和S251R细胞迁移能力较MUC1-WT细胞显著减弱,而MUC1-N271S和V359I细胞迁移能力在划痕实验中与MUC1-WT细胞无明显差异,在Transwell实验中有略微降低的趋势,但总体迁移能力仍高于Vector细胞。

以上结果说明,V359I突变体基本保留了MUC1促肿瘤细胞迁移的功能,而S251R和N271S突变体在不同细胞中对细胞迁移能力的影响存在差异。

2.6 MUC1突变体对细胞干性的影响

为了检测MUC1突变体对细胞干性的影响,利

用细胞成球实验对表达不同MUC1突变体的细胞进行分析。结果显示,在BT549细胞中,gMUC1细胞与gCtrl细胞相比,细胞的成球能力显著降低;在gMUC1细胞中分别回补空载体(Vector)、MUC1-WT及各突变体后,MUC1-WT细胞相比Vector细胞的成球能力显著提升。MUC1-N271S、V359I细胞与MUC1-WT细胞的成球能力相似,而MUC1-AQA和S251R细胞成球能力下降(图6A、B)。在MCF-10A细胞中得到了相似的结果(图6C、D)。这些结果提示,MUC1-S251R突变体丧失了维持细胞干性的能力,MUC1-N271S和V359I突变体仍保留了维持细胞干性的能力。



Note: A/B. Sphere formation assay of BT549 cells expressing MUC1-WT or mutants. Representative images of spheres (A, $\times 100$) and corresponding statistical analysis (B). C/D. Sphere formation assay of MCF-10A cells expressing MUC1-WT or mutants. Representative images of spheres (C, $\times 200$) and corresponding statistical analysis (D). ① $P < 0.001$, ② $P = 0.004$, ③ $P = 0.007$, ④ $P = 0.002$.

图6 MUC1-WT及其突变体对细胞干性的影响

Fig 6 Effect of MUC1-WT and mutants on cell stemness

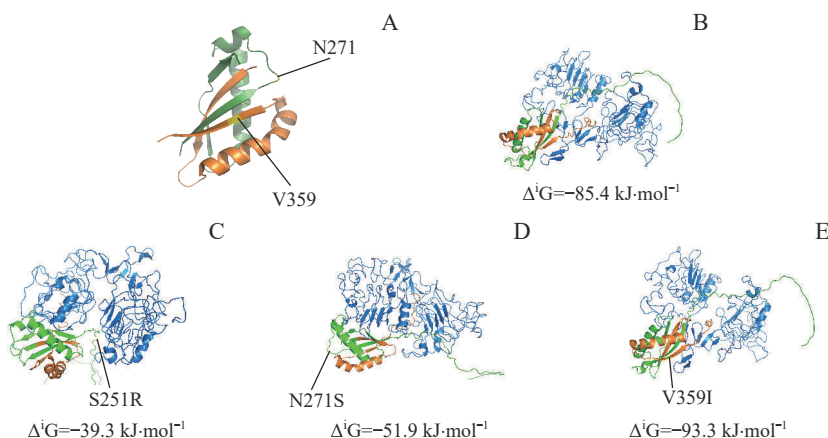
2.7 MUC1不同突变体的蛋白结构定位及分子对接分析

为了进一步探究突变影响MUC1功能的可能机制,应用PyMOL软件对已被完全解析的SEA功能域及附近(第261~371个氨基酸)的突变位点进行定位分析(图7A),结果显示N271位于loop区,V359位于 β -折叠处。应用ZDOCK Server对MUC1-WT及

S251R、N271S、V359I突变体胞外段(第208~365个氨基酸)与EGFR胞外域(ECD;第25~645个氨基酸)进行分子模拟对接,并通过PDBePISA软件以吉布斯自由能的变化量评估两者形成复合物的稳定性。结果显示,MUC1-WT与EGFR-ECD结合的吉布斯自由能变化量为 -85.4 kJ/mol,MUC1-S251R、N271S、V359I与EGFR-ECD结合的吉布斯自由能变化量

分别为-39.3、-51.9、-93.3 kJ/mol (图 7B~E)。根据吉布斯自由能变化量, MUC1-WT 及突变体与 EGFR-

ECD 形成复合体的稳定性排序为 V359I>WT>N271S>S251R。



Note: A. PyMol software was used to localize MUC1 mutants in or around the SEA domain. B-E. ZDOCK Server was used to analyze the molecular docking of MUC1-WT (B) and mutants (C, S251R; D, N271S; E, V359I) with EGFR-ECD. Green represents the MUC1-N region (before the GSVVV sequence), orange represents the MUC1-C region (after the GSVVV sequence), blue represents EGFR-ECD region, and yellow represents the localization of the mutation sites.

图7 SEA区域及附近的MUC1突变定位及相应突变体与EGFR-ECD的分子对接分析

Fig 7 Analysis of localization of MUC1 mutation sites in or around the SEA domain and molecular docking of the mutants with EGFR-ECD

3 讨论

有研究在微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI) 型结直肠癌中发现 MUC1 同家族成员 MUC4 存在 VNTR 异常扩增^[28], 提示黏蛋白遗传变异可能在癌症发生中发挥一定的作用。另外, 也有研究发现 MUC1 剪接变异 (splice variants, SVs), 即在基因的不同位置剪接后可产生不同的蛋白质异构体, 与癌症病理、炎症性疾病和免疫调节有关。如 MUC1 基因外显子 2 中的第 3506 位 A/G 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可以调节内含子 1 中的 3' 剪接位点的选择, 并产生不同的 MUC1 短亚型蛋白^[29], 进而促进肿瘤形成; 说明 MUC1 突变不仅对基因产物的多样性具有潜在影响, 还可参与癌症进展。为了研究 MUC1 参与肿瘤各种恶性特征调控的功能基序, 本研究利用 TCGA 数据库对肿瘤样本中 MUC1 突变位点进行统计定位, 共获得 102 个编码区突变。数据分析发现 83% MUC1 突变为点突变, 包括错义突变和无义突变, 但也存在剪接、插入和缺失, MUC1 突变的产生可能是由于不准确的 DNA 复制过程和遗传物质的化学损伤导致的 SNP 或错配修复机制缺陷 (mismatch repair, MMR)。

已知癌症的发生是肿瘤细胞中驱动基因突变的结果, 在癌症发展中被正向选择^[30]。癌症的驱动基因突变通常表现为在不同肿瘤中反复出现, 因此也作为

肿瘤的生物标志物和治疗靶点^[31]。基于此, 本研究对 MUC1 突变体筛选主要考虑 3 个因素: 第一, 突变频率; MUC1-S251R、N271S、V359I、P418S、N465H 5 个突变的频率较高, 均 $\geq 1.95\%$ 。第二, 突变位置; 选择非 VNTR 区便于聚焦 MUC1 非重复序列的功能域研究。第三, 蛋白水平; 由于 MUC1 为癌蛋白, 我们主要关注功能获得性突变, 因此选择了 MUC1 稳定表达的突变体进行功能研究, 即 MUC1-S251R、N271S、V359I。

MUC1 是高度糖基化的蛋白, 除了主要发生在 VNTR 多肽链的 Ser/Thr 连接的 O-GalNAc 聚糖外, 还有与 5 个天冬酰胺 (asparagine, Asn) 残基连接的 N-聚糖, 其中 4 个 Asn 位于 N2, 1 个位于 ED^[32]。而 MUC1 胞外结构域糖基化在肿瘤中发生改变, 可以形成独特的糖抗原, 称为肿瘤相关糖类抗原 (tumor-associated carbene antigen, TACA); TACA 是抗肿瘤治疗的理想靶标^[7]。本研究中 MUC1-S251R 和 N271S 突变分别发生在可被糖基化的 Ser 和 Asn 残基上, 突变后可能对 TACA 产生不同的影响。此外, MUC1-P418S、N465H 突变位于 MUC1-CD, 2 种 MUC1 突变体的蛋白水平均降低, 提示这 2 个突变位点可能影响 MUC1 蛋白的降解途径。已有研究表明, MUC1-C 可以由整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK)、E3 泛素连接酶过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ ,

PPAR- γ)^[33]和含WW域E3泛素连接酶1(WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1, WWP1)^[34]介导的蛋白酶体途径调控其稳定性;因此推测这2个突变位点可能通过调控蛋白水平动态修饰机制来实现MUC1蛋白的降解,但相关机制还有待进一步研究。

本研究进一步利用MUC1-S251R、N271S、V359I突变体稳转细胞系,分析MUC1突变体的细胞定位,发现核质比在MUC1-WT和突变体之间无显著差异,提示这些突变可能并未影响MUC1的核质定位。鉴于MUC1在肿瘤生长、转移和干性中的调控作用,我们研究了MUC1突变体对细胞增殖、迁移、干性的影响。结果显示V359I突变并未影响MUC1对细胞的增殖、迁移、干性等等的调控功能;而MUC1-S251R和N271S突变降低了细胞的增殖能力,但在不同细胞系中显示出不同的迁移能力,提示该2个位点有可能参与细胞增殖和迁移的信号通路调控,但在细胞迁移能力的调控中还受到细胞中其他蛋白的影响。上述结果说明MUC1的不同位点参与了肿瘤不同的恶性特征调控,MUC1-S251为调控细胞增殖、迁移及干性所必需;而N271可能参与调控细胞增殖和迁移。我们并未发现表达3种突变体细胞存在明显高于MUC1-WT细胞的肿瘤生物学功能,后续将进一步从MUC1结合蛋白出发,研究这些突变对相关信号通路的影响。

为了初步分析突变影响MUC1功能的可能机制,我们从MUC1突变结构定位和模拟分子对接方面进行了探究。现有MUC1蛋白结构仅SEA及附近区域被完全解析,对该区域内的突变进行定位,发现N271、V359分别位于loop区及 β -折叠处。已有研究^[35]揭示了氨基酸单点突变对于调控 β 折叠组装结构的重要作用,强调了氨基酸残基突变可能导致蛋白质高级结构的全局变化。因此,推测该区域位点的突变,特别是 β -折叠处的突变,可能影响MUC1蛋白质结构^[36]。

又由于SEA区域内的GSVVV基序是MUC1多肽链被切割为2个肽段,即MUC1-N和MUC1-C的关键区域^[37],因此该区域及附近的突变可能影响MUC1翻译后水解或共价连接过程,进而可能进一步影响MUC1-C端的下游信号转导途径。此外,通过分子对接分析发现3个突变体与EGFR形成复合物的稳定性不同,V359I突变体和WT类似,与EGFR的结合较稳定;而N271S与S251R突变体和EGFR形成复合物的稳定性较差。有文献^[38]报道,肿瘤中MUC1过表达可以通过胞外结构域与EGFR相结合,从而参与EGFR的活化并持续激活致癌信号通路促进肿瘤的生长。我们发现V359I突变不影响肿瘤细胞的增殖能力,而MUC1-S251R和N271S突变抑制了细胞的增殖,提示MUC1及突变体可能通过调控EGFR下游信号通路途径对细胞增殖能力产生影响。

综上所述,本研究结合大数据筛选和实验研究,对肿瘤患者中MUC1不同位点错义突变进行分析,揭示了MUC1不同功能部位调控不同肿瘤恶性表型的现象,为后续进一步研究MUC1的致癌机制打下基础,也为靶向MUC1治疗提供新思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突

All authors disclose no relevant conflict of interests

作者贡献/Authors' Contributions

高珂星、廖春华、李昇泽完成实验操作和数据分析;高珂星、马双羽、黄雷负责论文的写作与修改;黄雷负责课题设计。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The experimental operation and data analysis were completed by GAO Kexing, LIAO Chunhua and LI Shengze. GAO Kexing, MA Shuangyu and HUANG Lei were responsible for manuscript draft and revision. HUANG Lei was responsible for project design. All authors have read the final manuscript and agreed to the submission.

- Received: 2024-02-11
- Accepted: 2024-03-22
- Published online: 2024-11-28

参·考·文·献

- [1] KUFU D W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(12): 874-885.
- [2] ANDRIANIFAHANANA M, MONIAUX N, BATRA S K. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1765(2): 189-222.
- [3] MONIAUX N, ANDRIANIFAHANANA M, BRAND R E, et al. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy[J]. Br J Cancer, 2004, 91(9): 1633-1638.
- [4] GAEMERS I C, VOS H L, VOLDERS H H, et al. A STAT-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(9): 6191-6199.
- [5] SHENG Y H, LOURIE R, LINDÉN S K, et al. The MUC13 cell-

- surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis[J]. *Gut*, 2011, 60(12): 1661-1670.
- [6] SINGH A P, MONIAUX N, CHAUHAN S C, et al. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 622-630.
- [7] NATH S, MUKHERJEE P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6): 332-342.
- [8] CHEN W Q, ZHANG Z, ZHANG S Q, et al. MUC1: structure, function, and clinic application in epithelial cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6567.
- [9] HATTRUP C L, GENDLER S J. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins[J]. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70: 431-457.
- [10] LEVITIN F, STERN O, WEISS M, et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33374-33386.
- [11] CARSON D D. The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place[J]. *Sci Signal*, 2008, 1(27): pe35.
- [12] KUFEL D W. MUC1-C in chronic inflammation and carcinogenesis; emergence as a target for cancer treatment[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(9): 1173-1183.
- [13] LENG Y M, CAO C, REN J, et al. Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(27): 19321-19330.
- [14] RAINA D, AHMAD R, RAJABI H, et al. Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5): 1643-1649.
- [15] VAN PUTTEN J P M, STRIJBIS K. Transmembrane mucins: signaling receptors at the intersection of inflammation and cancer[J]. *J Innate Immun*, 2017, 9(3): 281-299.
- [16] YOLKEN R H, PETERSON J A, VONDERFECHT S L, et al. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis[J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(5): 1984-1991.
- [17] LAU S K, WEISS L M, CHU P G. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study[J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 122(1): 61-69.
- [18] KASHYAP B, KULLAA A M. Regulation of mucin 1 expression and its relationship with oral diseases[J]. *Arch Oral Biol*, 2020, 117: 104791.
- [19] SAFI F, KOHLER I, RÖTTINGER E, et al. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer[J]. *Cancer*, 1991, 68(3): 574-582.
- [20] STEINBERG W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen[J]. *Am J Gastroenterol*, 1990, 85(4): 350-355.
- [21] SUPRUNIUK K, RADZIEJEWSKA I. MUC1 is an oncoprotein with a significant role in apoptosis (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2021, 59(3): 68.
- [22] YAMAMOTO S, KAIMORI J Y, YOSHIMURA T, et al. Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in MUC1 reveals characteristic features of mutant MUC1 protein[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(12): 2010-2017.
- [23] WENZEL A, ALTMUELLER J, EKICI A B, et al. Single molecule real time sequencing in ADTKD-MUC1 allows complete assembly of the VNTR and exact positioning of causative mutations[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4170.
- [24] LI Q F, CHU Y K, LI S Z, et al. The oncoprotein MUC1 facilitates breast cancer progression by promoting Pink1-dependent mitophagy via ATAD3A destabilization[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 899.
- [25] JIN W, LIAO X D, LV Y P, et al. MUC1 induces acquired chemoresistance by upregulating ABCB1 in EGFR-dependent manner[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2980.
- [26] RAZAWI H, KINLOUGH C L, STAUBACH S, et al. Evidence for core 2 to core 1 O-glycan remodeling during the recycling of MUC1[J]. *Glycobiology*, 2013, 23(8): 935-945.
- [27] KINLOUGH C L, MCMAHAN R J, POLAND P A, et al. Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(17): 12112-12122.
- [28] PASTRELLO C, SANTAROSA M, FORNASARIG M, et al. MUC gene abnormalities in sporadic and hereditary mucinous colon cancers with microsatellite instability[J]. *Dis Markers*, 2005, 21(3): 121-126.
- [29] ZHANG L X, VLAD A, MILCAREK C, et al. Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(3): 423-435.
- [30] STRATTON M R, CAMPBELL P J, FUTREAL P A. The cancer genome[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 719-724.
- [31] MARTÍNEZ-JIMÉNEZ F, MUÑOZ F, SENTÍS I, et al. A compendium of mutational cancer driver genes[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(10): 555-572.
- [32] NABAVINIA M S, GHOLLOBI A, CHARBGOO F, et al. Anti-MUC1 aptamer: a potential opportunity for cancer treatment[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(6): 1518-1539.
- [33] HOU Y, GAO J, XU H, et al. PPAR γ E3 ubiquitin ligase regulates MUC1-C oncoprotein stability[J]. *Oncogene*, 2014, 33(49): 5619-5625.
- [34] LIAO C H, YU L P, PANG Z, et al. WWP1 targeting MUC1 for ubiquitin-mediated lysosomal degradation to suppress carcinogenesis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 297.
- [35] ZHANG W B, LIU M W, YU L L, et al. Perturbation effect of single polar group substitution on the self-association of amphiphilic peptide helices[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 610: 1005-1014.
- [36] ZHANG W B, LIU M W, WANG Y, et al. β -sheet assembly translates conservative single-site mutation into a perturbation in macroscopic structure[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(6): 2370-2378.
- [37] MACAO B, JOHANSSON D G, HANSSON G C, et al. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(1): 71-76.
- [38] MERLIN J, STECHLY L, DE BEAUCÉ S, et al. Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2011, 30(22): 2514-2525.

[本文编辑] 瞿麟平