论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1602-03

β-TrCP-OD-HA 重组腺病毒对白血病 K562 细胞凋亡的影响

罗红伟[1],田文君[1],季茂胜[1],刘钉宾[1],王小飞[1],黄宗干[2],冯文莉[1] (400016 重庆,重庆医科大学:临床血液学教研室,临床检验诊断学教育部重点实验室[1],附属第一医院血液科[2])

【摘要】 目的 研究癌蛋白 Bcr-Abl 被泛素-蛋白酶体系统靶向降解的可能性及诱导白血病 K562 细胞凋亡的作用。方法 含有 Bcr-Abl 融合蛋白 N 端寡聚化区(OD)的重组腺病毒 Ad5β-TrCP-OD-HA 特异性结合 Bcr-Abl 融合蛋白的 N 端寡聚化区(OD),通过感染将嵌合泛素连接酶 β-TrCP 运送到靶细胞 K562 细胞,同时,β-TrCP 基因突变的重组腺病毒 Ad5△F-TrCP-OD-HA 和仅含绿色荧光蛋白基因的重组腺病毒 Ad5GFP,分别作为对照。感染后,Western blot 检测 Bcr-Abl 融合蛋白的表达;倒置显微镜、光镜和电镜观察细胞形态学变化。结果 成功建立携 β-TrCP-OD-HA、△F-TrCP-OD-HA 的重组腺病毒的 K562 细胞株,重组腺病毒感染 K562 细胞后,Ad5β-TrCP-OD-HA 组的 Bcr-Abl 融合蛋白含量下降,与 Ad5β-TrCP-OD-HA 组、Ad5GFP 组及对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);倒置显微镜可见 Ad5β-TrCP-OD-HA 作用后细胞体积变小、形态不规则;光镜下发现胞体变小,细胞质空泡,细胞核出现碎裂和凋亡小体;电镜观察到出现了典型的细胞凋亡的超微结构。结论 重组腺病毒介导的 β-TrCP-OD-HA 在白血病 K562 细胞内能够降低 Bcr-Abl 融合蛋白含量,并且诱导 K562 细胞发生了凋亡。

【关键词】 Bcr-Abl 融合蛋白;泛素连接酶;β-TrCP;K562 细胞;细胞凋亡
【中图法分类号】 R394-33;R73-362;R733.7 【文献标志码】 A

Effect of β-TrCP-OD-HA recombinant adenoviruses on apoptosis of leukemia K562 cells

Luo Hongwei[1], Tian Wenjun[1], Ji Maosheng[1], Liu Dingbin[1], Wang Xiaofei[1], Huang Zonggan[2], Feng Wenli[1] ([1]Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Laboratory of Clinical Diagnostics of Ministry of Education, [2]Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To study whether the oncoprotein, Bcr-Abl, can be degraded by ubiquitin-proteasome target system and its role in induction of apoptosis of leukemia K562 cells. Methods Chimeric ubiquitin ligase, β-TrCP, was transported to target K562 cells by Ad5β-TrCP-OD-HA recombinant adenoviruses carrying N-terminal oligomerizaton domain (OD) of Bcr-Abl that can specifically bind to its N-terminal OD through infection. Meanwhile, recombinant adenoviruses with mutational β-TrCP gene (Ad5△F-TrCP-OD-HA) and green fluorescent protein gene (Ad5GFP) were used as controls, respectively. After infection, expression of Bcr-Abl was detected by Western blotting. Cell morphology was observed under inverted, light and electron microscopes, respectively. Results The leukemia K562 cell clones with exogenous recombinant β-TrCP-OD-HA or △F-TrCP-OD-HA gene were established. After infection with recombinant viruses, the expression level of Bcr-Abl was lower in Ad5β-TrCP-OD-HA than in Ad5GFP and controls ($P<0.05$). Inverted microscopy demonstrated small-sized cells in irregular shape, light microscopy showed small-sized cells, vacuolation in cytoplasm, cleavage of nuclei, and apoptotic bodies, and electron microscopy revealed typical ultrastructure of apoptotic cells, after treatment with Ad5β-TrCP-OD-HA. Conclusion Recombinant adenoviruses-induced β-TrCP-OD-HA can reduce Bcr-Abl in leukemia K562 cells and induce their apoptosis.

【Key words】 Bcr-Abl fusion protein; ubiquitin ligase β-TrCP; K562 cells; cell apoptosis

Supported by National Natural Science Foundation of China (30670901). Corresponding author: Feng Wenli, Tel: 86-23-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

有高酪氨酸激酶活性的 Bcr-Abl 融合蛋白是慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)的致病蛋白[1,2],而位于 Bcr-Abl 融合蛋白 N 端寡聚化区域(oligomerization domain, OD)是导致该蛋白酪氨酸激酶活性增强的重要因素[3]。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是生物体内蛋白质选择性降解的重要途径之一[4]。其中 E3 泛素连接酶(β-TrCP)可以通过识别蛋白底物,在调节泛素化系统的活性和特异性中起着重要作用[5]。基于外源性 OD 短肽可与 Bcr-Abl 融合蛋白 N 端寡聚化区域 OD 特异

【基金项目】 国家自然科学基金(30670901)
【通信作者】 冯文莉,电话:(023)68485938,E-mail:fengwlcqmu@sina.com

性结合，我们前期构建了嵌合 β-TrCP、OD 和 HA-tag 标签的 β-TrCP-OD-HA 的重组腺病毒，拟通过外源性 OD 肽将 Bcr-Abl 融合蛋白引入到泛素-蛋白酶体途径上，从蛋白质水平上去除致病蛋白。本研究着重研究 β-TrCP-OD-HA 对白血病 K562 细胞凋亡的影响，探讨通过泛素-蛋白酶体途径治疗 CML 的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的 E1 基因缺失的复制缺陷型重组腺病毒空载体(Ad5GFP)、携嵌合 β-TrCP-OD-HA 融合蛋白的重组腺病毒载体(Ad5β-TrCP-OD-HA)、携嵌合 β-TrCP 突变体的 △F-TrCP-OD-HA 融合蛋白的重组腺病毒载体(Ad5 △F-TrCP-OD-HA)，均通过 AdEasy 系统产生，携带 GFP 基因，由本课题组前期成功构建。HEK293 细胞系及 K562 细胞系由本室冻存。DMEM 和 RPMI1640 为 Gibco 公司产品，蛋白 marker、兔抗 C-ABL 多克隆抗体和化学发光检测试剂盒均为 Cell signal 公司产品，鼠抗 α-tubulin 单抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 为 Santa Cruz 公司产品，Polybrene 购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK293 细胞及 K562 细胞分别用含 10% FCS 的 DMEM 和 RPMI1640 液，培养于含 5% CO_2 的 37 ℃恒温培养箱中，常规换液传代，取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 腺病毒感染 K562 细胞 HEK293 细胞反复扩增 3 次后，Ad5β-TrCP-OD-HA、Ad5 △F-TrCP-OD-HA 和 Ad5GFP 联合 polybrene 分别感染 K562 细胞。

1.2.3 荧光倒置显微镜下计数绿色荧光蛋白表达细胞 3 种(Ad5β-TrCP-OD-HA、Ad5 △F-TrCP-OD-HA 和 Ad5GFP)腺病毒感染 K562 细胞后，以空白 K562 细胞作对照，荧光倒置显微镜下计数绿色荧光蛋白阳性细胞，确定感染效率。

1.2.4 Western blot 检测 Bcr-Abl 融合蛋白的表达 3 种重组腺病毒感染 K562 细胞后，空白 K562 细胞作为对照，提取各组细胞总蛋白，Bradford 法进行蛋白定量。以 α-Tubulin 为内参。蛋白经 SDS-PAGE 后，转移至 PVDF 膜，封闭后，依次加入兔抗 c-ABL 多克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔 IgG，孵育、洗膜后，用化学发光试剂盒显色。Quantity One 软件分析结果，结果以目的条带密度与内参条带密度之比表示。

1.2.5 倒置显微镜及光镜检测 K562 细胞形态 3 种重组腺病毒感染 K562 细胞后，用倒置显微镜观察细胞形态学变化，并对细胞进行瑞特染色于光镜下观察。

1.2.6 电镜检测 K562 细胞凋亡 3 种重组腺病毒感染 K562 细胞后，以空白 K562 细胞做对照，各组细胞用 PBS 洗涤 2 次，转入 EP 管中，加 4% 戊二醛 1 ml，固定 60 min，1 000 r/min 离心 10 min，PBS 冲洗。1% 锇酸固定 1 h。系列丙酮脱水：50% 丙酮溶液 1 次，10 min；70% 丙酮溶液 1 次，10 min；90% 丙酮溶液 2 次，每次 10 min；100% 丙酮溶液 3 次，每次 10 min。618 环氧树脂包埋，光镜定位，超薄切片做成铜网；经醋酸铀、枸橼酸铅双重电子染色，在 Hitachi-600 透射电镜下观察和照相。

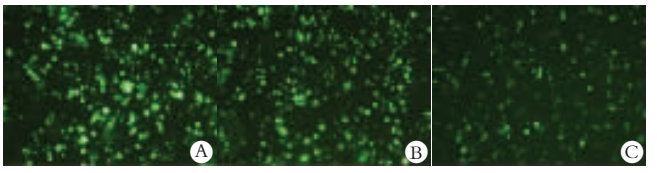
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 3 种重组腺病毒感染 K562 细胞的效率

3 种重组腺病毒感染 K562 细胞 72 h 时可见 60% 以上的细胞表达绿色荧光蛋白(图 1)。

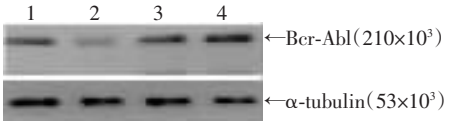


A：Ad5GFP 组；B：Ad5β-TrCP-OD-HA 组；C：Ad5 △F-TrCP-OD-HA 组

图 1 荧光倒置显微镜下 3 种重组腺病毒感染 K562 细胞 72 h 的感染效率 (×100)

2.2 重组腺病毒对 K562 细胞 Bcr-Abl 蛋白含量的影响

Ad5β-TrCP-OD-HA 组 Bcr-Abl 蛋白表达明显下调，光密度比值(0.291 ± 0.002)较对照组[空白对照组(0.628 ± 0.006)、Ad5 △F-TrCP-OD-HA 组(0.741 ± 0.010)、Ad5 GFP 组(0.768 ± 0.015)]下降了 53.7% ($P < 0.05$)(图 2)。

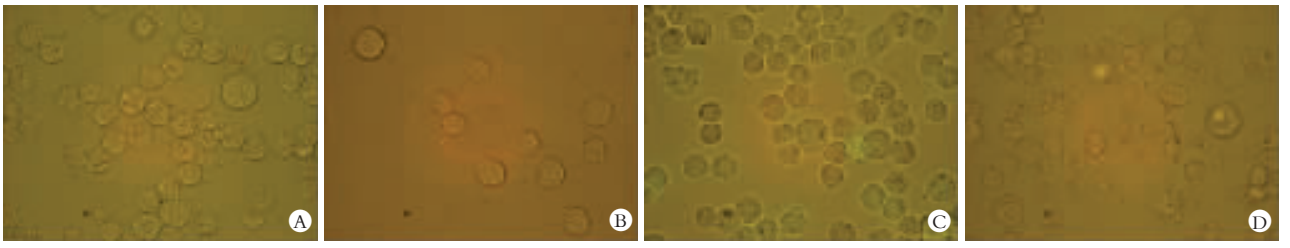


1：空白对照组；2：Ad5β-TrCP-OD-HA 组；3：Ad5 △F-TrCP-OD-HA 组；4：Ad5GFP 组

图 2 Western blot 检测不同腺病毒感染后 K562 细胞中 Bcr-Abl 蛋白的表达

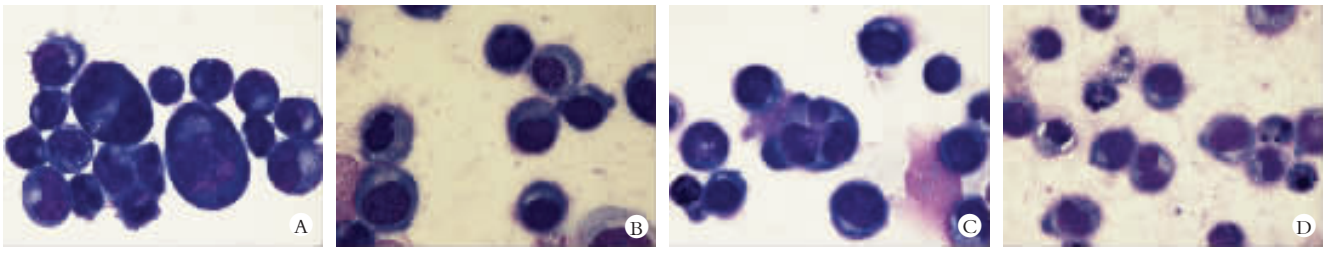
2.3 重组腺病毒对 K562 细胞凋亡的影响

倒置显微镜检测下观察到空白对照组细胞透明度大，折光性强；Ad5β-TrCP-OD-HA 组细胞体积变小、形态不规则、折光性变弱(图 3)。普通光学显微镜下观察到 Ad5β-TrCP-OD-HA 组胞体变小，细胞质空泡，细胞核出现碎裂和凋亡小体，而其他 3 组则未出现这种变化(图 4)。电镜下观察到 Ad5 △F-TrCP-OD-HA 组、Ad5GFP 组和空白对照组的体积较大，核幼稚、核膜完整、核仁清晰可见，常染色体丰富异染色质少，核浆比例大。Ad5β-TrCP-OD-HA 感染的 K562 细胞体积缩小，细胞表面微绒毛结构明显减少，细胞质电子密度增高，可见凋亡小体。核固缩，有明显的凋亡形态学改变(图 5)。



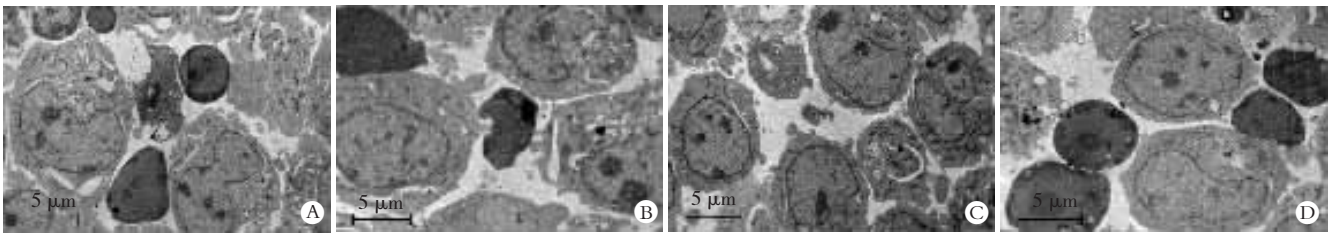
A：Ad5GFP 组；B：空白对照组；C：Ad5 △F-TrCP-OD-HA 组；D：Ad5β-TrCP-OD-HA 组

图 3 倒置显微镜观察 3 种重组腺病毒对 K562 细胞形态的影响 (×100)



A：Ad5GFP 组；B：空白对照组；C：Ad5△F-TrCP-OD-HA 组；D：Ad5β-TrCP-OD-HA 组

图4 普通光学显微镜观察3种重组腺病毒对K562细胞形态的影响 （瑞特染色 ×1 000）



A：Ad5GFP 组；B：空白对照组；C：Ad5△F-TrCP-OD-HA 组；D：Ad5β-TrCP-OD-HA 组

图5 电镜观察3种重组腺病毒对K562细胞形态的影响 （TEM）

3 讨论

融合蛋白 Bcr-Abl 是 CML 发病的根本原因，同时也是该病治疗的主要靶点[1]。Bcr-Abl 通过活化 Ras 和 PI3 激酶途径上调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达，阻止 cytochrome C 的释放和 caspases 的活化，从而增强了白血病细胞的抗凋亡能力[2]。泛素-蛋白酶体途径是细胞内 ATP 依赖的蛋白质选择性降解的主要途径，它广泛参与真核细胞多种生理过程[4,6,7]。β-TrCP 是目前研究比较清楚的一种 F-box 蛋白，β-TrCP 通过 F-box 结合 Skp1 而被连接到核心 SCF 复合物[5]。

通过泛素化途径使癌蛋白降解从而诱导癌细胞的凋亡也是抗癌策略之一[8-10]。在目前基因治疗选用的载体中，能转染增殖期和静止期造血细胞，因而，腺病毒载体近年来已被广泛地用于基因治疗[11]。我们利用前期构建的含嵌合泛素连接酶的 β-TrCP-OD-HA 的重组腺病毒、并以含 β-TrCP 突变体[12] 的△F-TrCP-OD-HA 的重组腺病毒作为突变对照，选择 Bcr-Abl 阳性的 K562 细胞为模型，观察感染含有 β-TrCP 野生型和突变型的重组腺病毒后对 K562 细胞凋亡的影响。结果显示，3 种重组腺病毒感染靶细胞后均可达到较高的感染效率，并且能够明显减低 Bcr-Abl 蛋白的表达。再通过光镜发现感染重组腺病毒 β-TrCP-OD-HA 的 K562 细胞出现体积变小、形态不规则、折光性变弱等形态学变化；电镜观察到感染重组腺病毒的 K562 细胞体积缩小，细胞表面微绒毛结构明显减少，细胞质电子密度增高，可见凋亡小体。染色质浓集，核固缩，有明显的凋亡形态学改变。根据本实验结果我们推测，β-TrCP-OD-HA 的重组腺病毒可能通过 OD 肽与 Bcr-Abl 融合蛋白结合后将 Bcr-Abl 融合蛋白引入到泛素-蛋白酶体降解途径上，诱导了 K562 细胞凋亡。

参考文献：

[1] Druker B J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML[J]. Blood, 2008, 112(13): 4808-4817.

[2] Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2009, 113(8): 1619-1630.

[3] Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, *et al*. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(2): 117-120.

[4] Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(9): 679-690.

[5] Fuchs S Y, Spiegelman V S, Kumar K G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(11): 2028-2036.

[6] Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(6): 438-449.

[7] Bhoj V G, Chen Z J. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity[J]. Nature, 2009, 458(7237): 430-437.

[8] Rodriguez-Gonzalez A, Cyrus K, Salcius M, *et al*. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(57): 7201-7211.

[9] Li X, Shen L, Zhang J, *et al*. Degradation of HER2 by Cbl-based chimeric ubiquitin ligases[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8716-8724.

[10] Hatakeyama S, Watanabe M, Fujii Y, *et al*. Targeted destruction of c-Myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7874-7879.

[11] 陈龙，陈洁平，林晨. 重组反义 c-myc 腺病毒诱导 HL-60 细胞分化的作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(17)：1553-1556.

[12] Kim S E, Yoon J Y, Jeong W J, *et al*. H-Ras is degraded by Wnt/beta-catenin signaling *via* beta-TrCP-mediated polyubiquitylation[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 6): 842-848.

（收稿 2010-01-11 修回 2010-03-30）

（编辑 王小宴）