基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001405

探讨 FABD 结构域对 Bcr/Abl 蛋白定位及功能的影响

王 腾,黄峥兰,高 淼,李 会,周芳竹,冯文莉

(重庆医科大学检验医学院、临床血液学教研室、临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:构建 F-actin 结合结构域(F-actin binding domain,FABD)缺失腺病毒载体 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 和野生型 Bcr/Abl 腺病毒载体 Ad-Bcr/Abl,探讨 FABD 结构域对 Bcr/Abl 蛋白定位及功能的影响。**方法**:PCR 扩增 bcr/abl 和 bcr/abl-ΔFABD 片段,双酶切后克隆至穿梭质粒 pAdTrack-CMV,经 AdEasy 构建系统获得腺病毒 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 和 Ad-Bcr/Abl,并在 HEK293 细胞中进行包装。将细胞分为 3 组,Ad-GFP 组、Ad-Bcr/Abl 组以及 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 组,分别加入对应的腺病毒。Western blot 验证 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 在 293T 细胞中的表达水平,间接免疫荧光法检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 在 293T 细胞中的定位。流式细胞术、MTT 法分别检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 对 293T 细胞凋亡、增殖的影响。**结果**:双酶切以及测序验证穿梭质粒构建正确;*Pac* Ⅰ酶切验证重组腺病毒质粒重组成功;绿色荧光显示重组腺病毒包装成功;Western blot 验证 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 可在 293T 细胞中表达;间接免疫荧光发现 Bcr-Abl 蛋白在细胞内的分布依赖于 F-actin;FABD 缺失后虽然不能使 Bcr/Abl 入核,但使其在细胞内的分布方式由均匀变为点状或块状聚集;FABD 缺失后,Bcr/Abl 在细胞内呈块状聚集的方式与 IM 处理后的结果相似。流式细胞术和 MTT 结果显示,与 Bcr/Abl 相比,Bcr/Abl-ΔFABD 组 293T 细胞的凋亡比例增加($P<0.05$),增殖能力降低($P<0.05$)。**结论**:成功构建 Ad-Bcr/Abl 和 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 重组腺病毒,FABD 缺失后使 Bcr/Abl 蛋白在细胞质中的分布方式发生改变,并能抑制 Bcr/Abl 的抗凋亡能力和促增殖能力。

【关键词】Bcr/Abl;FABD;细胞定位;来普霉素;伊马替尼

【中图分类号】733.72 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-03-21

Effect of FABD on Bcr/Abl cytoplasm localization and function in 293T cells

Wang Teng, Huang Zhenglan, Gao Miao, Li Hui, Zhou Fangzhu, Feng Wenli

(*Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To construct the recombination adenoviruses Ad-Bcr/Abl-ΔFABD and Ad-Bcr/Abl, and to explore the effect of FABD on the cytoplasm localization and function of Bcr/Abl oncoprotein. ***Methods***: The fragments of bcr/abl and bcr/abl-ΔFABD gene were amplified by PCR and cloned into shuttle vector pAdTrack-CMV. The adenoviruses Ad-Bcr/Abl-ΔFABD and Ad-Bcr/Abl were constructed by Adeasy system and amplified in human embryonic kidney HEK293 cells. The expressions of Bcr/Abl-ΔFABD and Bcr/Abl in 293T cells were detected by Western blot. The cytoplasm localization of Bcr/Abl-ΔFABD and Bcr/Abl in 293T cells was detected by indirect immunofluorescence. The effect of Bcr/Abl and Bcr/Abl-ΔFABD on apoptosis and proliferation in 293T cell was detected by flow cytometry and MTT. ***Results***: The shuttle plasmids of adenovirus were confirmed to be correctly constructed by double digestion and gene sequencing. The recombination adenovirus plasmids was verified by *Pac* Ⅰ digestion. The expression of GFP indicated the adenoviruses were packed. The constructed adenoviruses were expressed in 293T cells by Western blot. Bcr/Abl-ΔFABD protein located in the cytoplasm not in nuclear as form of particles and did not depend on the distribution of the F-actin? After treating by IM, the distribution of Ber/Abl is similar with that of Bcr/Abl-ΔFABD protein. As results of flow cytometry and MTT, effect of Bcr/Abl-ΔFABD on apoptosis in 293T cell was promoted ($P<0.05$) and effect on proliferation was reduced ($P<0.05$) compared with that of Bcr/Abl. ***Conclusion***: The adenoviruses Ad-Bcr/Abl-ΔFABD and Ad-Bcr/Abl are constructed successfully. The distribution of Bcr/Abl-ΔFABD mutation protein has changed. The deletion of FABD inhibit the anti-apoptosis ability and proliferation of Bcr/Abl.

【Key words】Bcr/Abl;FABD;cytoplasm localization;LMB;Imatinib

作者介绍:王 腾,Email:542362715@qq.com,研究方向:白血病的致病机制和靶向治疗。

通信作者:冯文莉,Email:fengwlcqmu@ sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81572060);重庆市基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2014jcyjA10081)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170919.1611.014.html (2017-09-19)

c-Abl 蛋白是一种广泛表达的非受体酪氨酸激酶，参与细胞分化、粘附、应激等多种生理过程[1]。它含有 3 个核定位信号(nuclear location signal，NLS)和一个核输出信号(nuclear export signal，NES)，可在细胞质和细胞核间来回穿梭[2]。c-Abl 的功能严格依赖于它的亚细胞定位。当受到 DNA 损伤或死亡受体刺激后，c-Abl 入核并磷酸化 p73，可诱导细胞凋亡。而受到生长因子刺激时，c-Abl 在细胞质活化并参与增殖信号转导[3]。当血细胞发生 t(9;22)(q34;q11)易位后，位于 9q34 上的 c-abl 基因与 22q11 上的 bcr 基因形成 bcr/abl 融合基因，产生由 N 端 c-Abl 与 C 端 Bcr 组成的 Bcr/Abl 癌蛋白。Bcr/Abl 癌蛋白虽含有与 c/Abl 相同的 3 个 NLS 和 1 个 NES，但其定位发生改变，只定位于细胞质，而且 c-Abl 的酪氨酸激酶活性被持续激活，通过激活下游 PI3K-Akt、Stat5、Ras 等信号通路，引起细胞增殖失调、凋亡减少、对骨髓基质的粘附异常，导致血细胞数量失衡以及成熟障碍，从而在慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia，CML)发病中起了重要作用[4]。

c-Abl 入核可引起细胞凋亡的现象引起了本课题组强烈的关注。为此，在本课题组前期的研究中，将 6 个 NLS 通过雷帕霉素类似物转运系统(rapamycin analog transport system，RATS)传递给 Abl 结合结构域(Abl-binding domain，ABD)，通过 ABD 特异性结合 Bcr/Abl，从而将 Bcr/Abl 转运入核，通过其组成性激活的酪氨酸激酶活性持续激活 p73 而诱导 CML 细胞凋亡，同时也减弱了细胞质中 Bcr/Abl 的致癌信号[5-6]。Bcr/Abl 这种定位于细胞质时发挥癌蛋白的功能，将它引导入核可诱导 CML 细胞凋亡而产生抗肿瘤效应的现象，引起了本课题组进一步思考：如果能探索 Bcr/Abl 癌蛋白阻滞于细胞质而不能入核的原因并阐明其机制，可为深入研究该蛋白在 CML 中的致病作用和后续的靶向治疗奠定基础。

正常细胞中 c-Abl 蛋白因不同功能的需要，可在细胞质或细胞核间穿梭。已有研究表明，位于 c-Abl 蛋白 C 端的 F-actin 结合结构域(F-actin binding domain，FABD)对于 c-Abl 细胞质定位起极其重要的作用(图 1)[7]，如果将 FABD 缺失，可使 c-Abl 入核。那么 FABD 对于 Bcr/Abl 蛋白的细胞质定位是否也起着至关重要的作用呢？本课题将就此展开研究。采用缺失突变的方法，构建 FABD 缺失的腺病毒载体 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 及野生型腺病毒载体 Ad-Bcr/Abl，以细胞中无野生型 Bcr/Abl 蛋白表达的 293T 细胞为研究对象，探究 FABD 对 Bcr/Abl 细胞定位及功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

MigR-p210 质粒、穿梭质粒 pAdTrack-CMV、AdEasier 细菌、大肠埃希菌 DH5α、HEK293 细胞、293T 细胞、空载腺病毒 Ad-GFP、MTT 试剂和酪氨酸激酶抑制剂 Imatinib 由本实验室保存。限制性内切酶 *Not*、*Xba* Ⅰ，PrimeSTAR(premix)HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自 Takara 公司，限制性内切酶 *Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ、ActinGreen™ 488 ReadyProbes® Reagent 购自 Thermo Fisher 公司，DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购于天根生化科技公司，脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000，荧光二抗 Cy3 为 Invitrogen 公司产品，HA 标签抗体购于 Cell Signaling Technology 公司，辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 购于 Santa Cruz 公司，DAPI 购于碧云天公司。核输出抑制剂来普霉素 B(leptomycin B，LMB)购于 Sigma 公司。

1.2 引物设计与合成

使用 Primer premier 5.0 软件设计用于扩增 bcr/abl、bcr/abl-ΔFABD 的上下游引物，并由北京华大基因公司合成(见表 1)。

1.3 目的基因的扩增

以含有 bcr/abl 融合基因全长的质粒 MigR-p210 为模板，PCR 分别扩增 bcr/abl 和 bcr/abl-ΔFABD，PCR 反应体系为 PrimeSTAR(premix)25 μL，上下游引物各 1 μL，模板质粒 2 μL，dd H_2O 21 μL。PCR 扩增 bcr/abl 基因循环参数：98 ℃，1 min；98 ℃，10 s；62 ℃，15 s；72 ℃，7.5 min，共 30 个循环；72 ℃ 5 min。扩增 bcr/abl-ΔFABD 基因的延伸时间为 7 min，其他条件同上。取 3 μL PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。

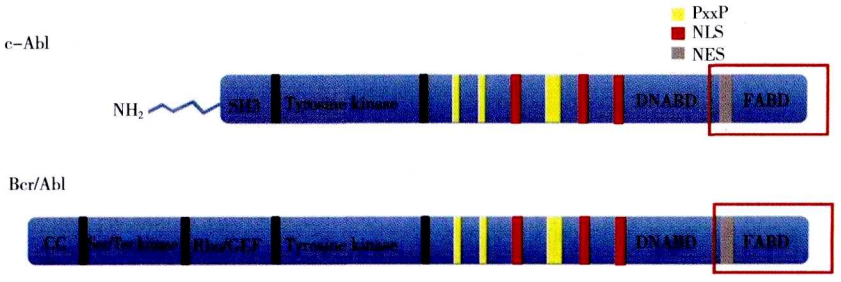


图 1 c-Abl 和 Bcr/Abl 重要结构域 FABD 示意图[14]

Fig.1 The important domain FABD of c-Abl and Bcr/Abl

表 1 扩增 bcr/abl 和 bcr/abl-ΔFABD 的引物

Tab.1 Primers of bcr/abl and bcr/abl-ΔFABD amplification

引物名称	序列
bcr/abl基因上游引物	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCACCATGG CTATGGTGGACCCGGTGGGCTTCG-3'
bcr/abl基因下游引物	5'-GCTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTACCTCTGCACTATGTCACTGA-3'
bcr/abl-ΔFABD基因上游引物	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCACCATG GCTATGGTGGACCCGGTGGGCTTCG-3'
bcr/abl-ΔFABD基因下游引物	5'-GCTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTACGGCTGGTCCCCTGCCAGGGCC GAGGATGC-3'

1.4 腺病毒穿梭质粒的构建

Not Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切目的基因 bcr/abl 和 bcr/abl-ΔFABD 以及穿梭质粒 pAdTrack-CMV，DNA 纯化回收试剂盒回收酶切后片段，使用 T4 DNA 连接酶于 16 ℃过夜连接。将连接产物转化入 DH5α 感受态细胞，接种于含有卡那霉素的 LB 平板，37 ℃敷箱静置 12 h，挑取若干单克隆接种于含卡那霉素的 LB 培养基大量扩增细菌，提取质粒，经酶切、测序验证为正确的穿梭质粒。

1.5 重组腺病毒质粒的构建

Pme Ⅰ酶切各穿梭质粒，使其线性化，并转化入 AdEasier 感受态细菌中，接种于含卡那霉素的 LB 平板，37 ℃静置 16~20 h，挑取单克隆，经大量扩增后提取质粒，*Pac* Ⅰ酶切验证重组腺病毒质粒，如切出 3 000 bp 或 4 500 bp 大小条带即证明重组腺病毒质粒构建成功。

1.6 腺病毒的包装和扩增

Pac Ⅰ大量酶切重组腺病毒质粒，离心柱试剂盒回收酶切后片段，使用 Lipofectamine™ 2000 转染细胞融合率约 60% 的 HEK293，腺病毒含绿色荧光蛋白(GFP)基因，通过观察荧光来检测腺病毒生成情况。10 d 后收集细胞，-80 ℃冷冻、37 ℃水浴、剧烈涡旋振荡释放细胞内的腺病毒，重复 4 次。4 ℃、7 500 r/min 离心 10 min，收集上清液，为原代腺病毒，-80 ℃保存。将原代腺病毒感染 HEK293 细胞进行进一步扩增，最终获得高滴度腺病毒。

1.7 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白的表达验证

将 293T 细胞分为 3 组，Ad-GFP 组、Ad-Bcr/Abl 组以及 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 组，分别加入对应的腺病毒。48 h 后提取细胞总蛋白质，经 8% SDS-PAGE 电泳，将蛋白质电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，HA-Tag 一抗(1:1 000 稀释)4 ℃孵育过夜后加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:2 000 稀释)室温温育 1 h，增强型 ECL 化学发光试剂显色，上机检测 HA 标记的 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白的表达情况。

1.8 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白的细胞定位

将 293T 细胞分为 3 组，Ad-GFP 组、Ad-Bcr/Abl 组以及 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 组，分别加入对应的腺病毒。24 h 后加入 LMB 或 IM 继续培养 6 h 或 24 h，4%多聚甲醛室温固定 15 min，1%Tritonx-100 透化 15 min，即用型山羊血清 4 ℃封闭 1 h，HA-Tag 一抗(1:100，即用型山羊血清稀释)4 ℃孵育过夜，加入荧光二抗(1:200，1 %Tritonx-100 稀释)37 ℃避光温育 1 h，DAPI 染核 15 min，甘油封片，荧光显微镜观察 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白在 293T 中的细胞定位。

1.9 流式细胞术检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 对 293T 细胞凋亡的影响

将 293T 细胞分为 3 组，Ad-GFP 组、Ad-Bcr/Abl 组以及 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 组，待细胞贴壁后，分别加入对应的腺病毒。培养 48 h 收集细胞，PBS 洗涤 2 次，加入 1 mL PBS 重悬细胞，流式细胞术检测 293T 细胞的凋亡情况，重复进行 3 次并分析制图。

1.10 MTT 法检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 对 293T 细胞增殖的影响

将 293T 细胞分为 3 组，Ad-GFP 组、Ad-Bcr/Abl 组以及 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 组，每组 5 个复孔，每孔 2 000 个细胞，待细胞贴壁后，分别加入对应的腺病毒。24、48、72 h 后分别加入终浓度为 2 mg/mL 的 MTT 试剂，4 h 后加入 DMSO，摇匀后上机检测，重复 3 次并分析制图。

1.11 统计学分析

实验均独立重复 3 次，采用 GraphPad Prism 5 软件分析。多组间均数比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 Turkey 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

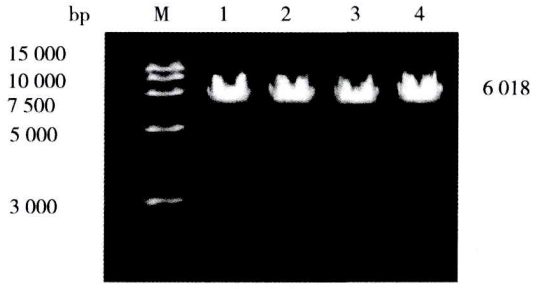
2 结 果

2.1 重组腺病毒质粒 pAd-Bcr/Abl、pAd-Bcr/Abl-ΔFABD 的构建及鉴定

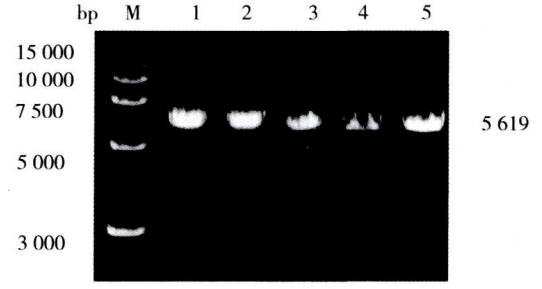
以含有 bcr/abl 全长基因的质粒 MigR-p210 为模板，PCR 扩增 bcr/abl 和 bcr/abl-ΔFABD 基因，得到大小 6 018 bp 的 bcr/abl 基因(图 2A)和大小 5 619 bp 的 bcr/abl-ΔFABD基因(图 2B)。回收各目的基因的 PCR 产物，与线性化的 Ad-Track-CMV 穿梭质粒连接后转化感受态 DH5α，经卡那霉素抗性筛选，挑取单克隆并提取质粒，经 *Not* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切后，琼脂糖电泳进行鉴定(图 2C、D)。结果表明，双酶切切出的片段大小与预期一致。将插入片段大小正确的质粒进行 DNA 测序，测序结果表明插入片段的序列与我们预期的相符，这说明成功构建了相应的穿梭质粒。将正确的穿梭质粒经 *Pme* Ⅰ酶切后，转化 AdEasier 感受态细菌，挑取阳性克隆经 *Pac* Ⅰ酶切，结果如图 1E 所示，重组腺病毒质粒可切出约 4 500 bp 大小的片段，说明成功构建了重组腺病毒质粒pAd-Bcr/Abl 和 pAd-Bcr/Abl-ΔFABD。

2.2 重组腺病毒 Ad-Bcr/Abl、Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 的包装、扩增及目的蛋白的鉴定

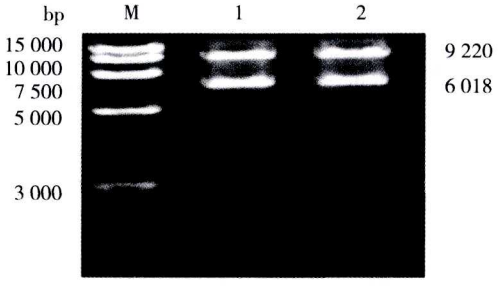
将正确的重组腺病毒质粒经 *Pac* Ⅰ酶切后转染HEK293 细胞进行包装，7~10 d 可见绿色荧光，经 2~3 代扩增后可得到高滴度腺病毒 Ad-Bcr/Abl 和 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD(图 3A、B)。将腺病毒 Ad-Bcr/Abl 和 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 感染 293T 细胞，以空载病毒作为对照，48 h 后提取细胞总蛋白，用 Western blot 实验检测目的蛋白的表达。在构建的载体中，加入了 HA 标签，因而用抗 HA 抗体检测目的蛋白。结果如图 3C 所示，在腺病毒 Ad-Bcr/Abl 和 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 感染的 293T 细胞中，可以分别检测到目的蛋白 Bcr/Abl 和Bcr/Abl-ΔFABD 的表达。



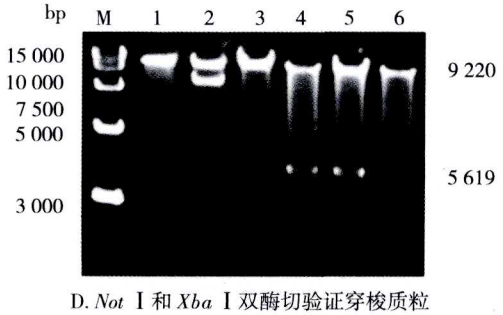
A. 以质粒 MigP-210，PCR 扩增 bcr/abl 融合基因



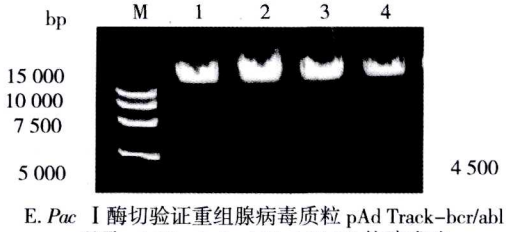
B. 以质粒 MigP-210，PCR 扩增 bcr/abl-ΔFABD 基因



C. *Not* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切验证穿梭质粒 AdTrack-bcr/abl 构建成功



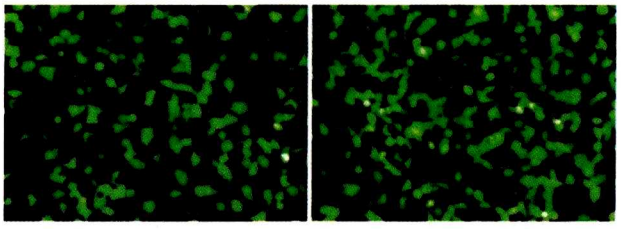
D. *Not* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切验证穿梭质粒 AdTrack-bcr/abl-ΔFABD 构建成功



E. *Pac* Ⅰ酶切验证重组腺病毒质粒 pAd Track-bcr/abl 以及 pAdTrack-bcr/abl-ΔFABD 构建成功

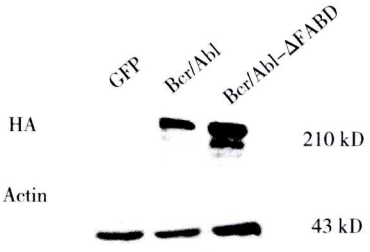
图 2　重组腺病毒质粒 pAd-Bcr/Abl、pAd-Bcr/Abl-ΔFABD 的构建及鉴定

Fig.2　Construction and identification of pAd-Bcr/Abl and pAd-Bcr/Abl-ΔFABD



A. 重组腺病毒 Ad-Bcr/Abl 在 HEK293 中的包装扩增

B. Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 在 HEK293 中的包装、扩增



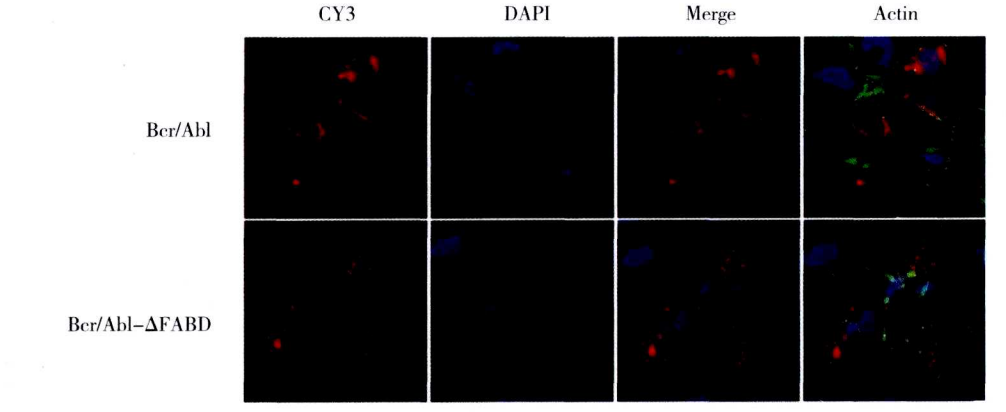
C. 重组腺病毒 Ad-Bcr/Abl、Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 在 293T 中的蛋白表达验证

图 3　重组腺病毒 Ad-Bcr/Abl、Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 的包装、扩增及目的蛋白的鉴定

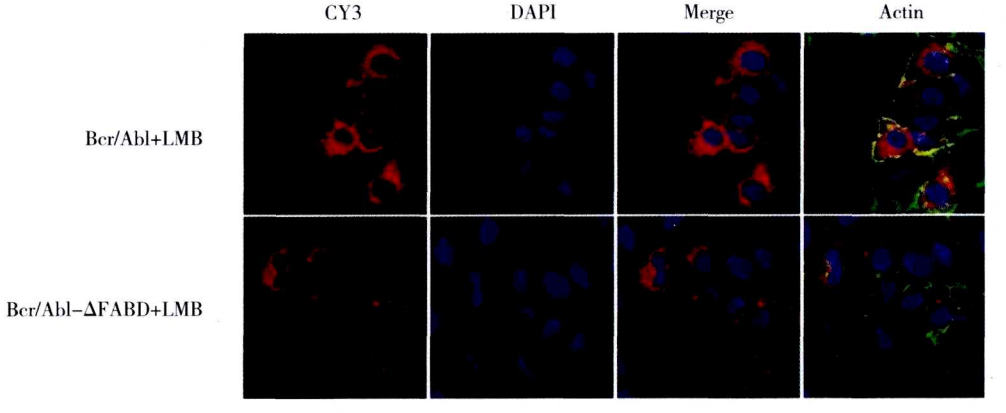
Fig.3　Amplification of Ad-Bcr/Abl、Ad-Bcr/Abl-ΔFABD and expression of Bcr/Abl, Bcr/Abl-ΔFABD

2.3　FABD 对 Bcr/Abl 蛋白细胞定位的影响

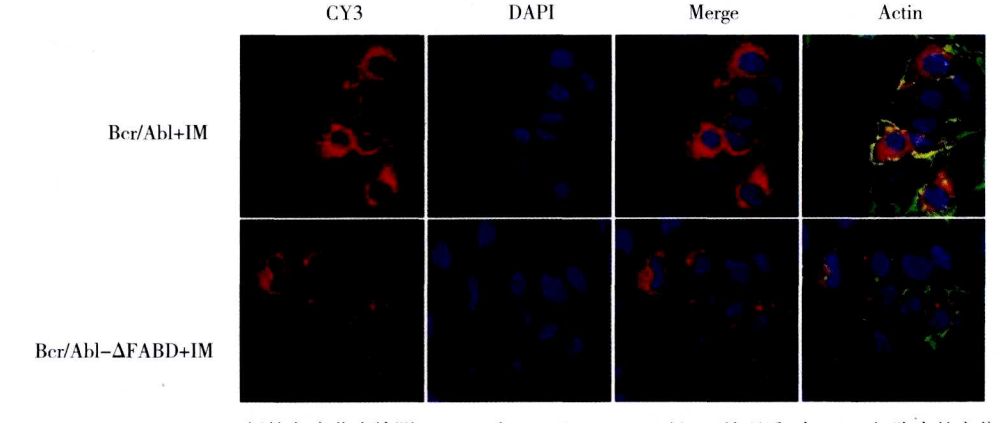
将腺病毒 Ad-Bcr/Abl 和 Ad-Bcr/Abl-ΔFABD 分别感染 293T 细胞，间接免疫荧光实验检测目的蛋白在细胞中的定位。结果如图 4A 所示，Bcr/Abl 蛋白在细胞质中均匀分布，且与 F-actin 存在共定位关系；Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白也定位于细胞质中，但呈点状或斑块状聚集，与 F-actin 不存在共定位关系。细胞内的蛋白定位于细胞核还是细胞质取决于入核信号与出核信号的平衡，Bcr/Abl-ΔFABD 蛋白定位于细胞质是由于没有入核还是入核后被输出而进入细胞质呢？用核输出抑制剂莱普霉素 B(Leptomycin B，LMB)处理细胞，抑制CRM1将蛋白运输出细胞核。间接免疫荧光实验检测蛋白定位，结果如图 4B 所示，Bcr/Abl 仍然滞留于细胞质中，但呈明显的点状或块状聚集；Bcr/Abl-ΔFABD 也定位于细胞质，但聚集的块状更大、更多，说明 FABD 缺失不能使 Bcr-Abl 入核。Bcr/Abl 蛋白具有强烈的酪氨酸激酶活性，它在细胞内的定位是否受激酶活性的影响？用酪氨酸激酶抑制剂 Imatinib(IM)处理细胞后，再用间接免疫荧光实验检测蛋白在细胞内的定位。结果如图 4C 所示，Bcr/Abl 定位于细胞质中，但分布方式发生改变，也呈颗粒状分布，Bcr/Abl-ΔFABD 在细胞中的定位及分布与 Bcr/Abl 相似。以上实验结果说明，Bcr-Abl 蛋白在细胞内的分布不依赖于 F-actin；FABD 缺失后虽然不能使 Bcr/Abl 入核，但使其在细胞内的分布方式由均匀变为点状或块状聚集；FABD 缺失后 Bcr/Abl 在细胞内呈块状聚集的方式与 IM 处理后的结果相似，提示FABD 有可能影响了 Bcr/Abl 蛋白的激酶活性，在后续的实验中将进一步证实。



A. 间接免疫荧光检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 在 293T 细胞中的定位



B. 间接免疫荧光检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 经 LMB 处理后，在 293T 细胞中的定位



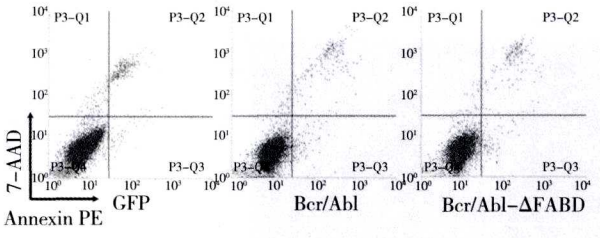
C. 间接免疫荧光检测 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 经 IM 处理后，在 293T 细胞中的定位

图 4　间接免疫荧光检测目的蛋白在 293T 细胞中的定位

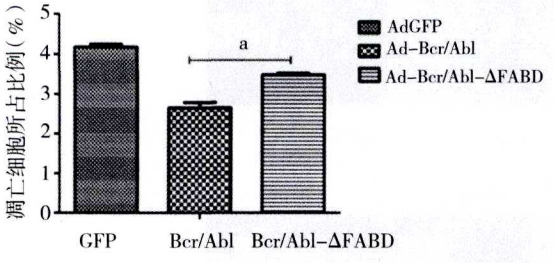
Fig.4　Cytoplasm localization of Bcr-Abl and Bcr-Abl-△FABD in 293T cell by indirect immunofluorescence

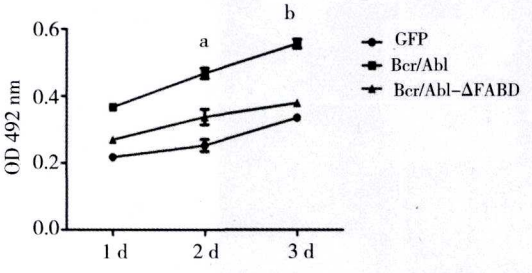
2.4　FABD 对 Bcr/Abl 蛋白抗凋亡、促增殖能力的影响

FABD 使 Bcr-Abl 蛋白在细胞内的分布方式发生改变，进一步检测它对 Bcr/Abl 蛋白抗凋亡、促增殖能力的影响。将腺病毒感染细胞，48 h 后收集细胞，流式细胞术检测细胞凋亡。结果（图 5A、B）表明，与空载对照组相比，Bcr/Abl 组凋亡细胞所占比率明显降低（$P<0.01$）；与 Bcr/Abl 组相比，Bcr/Abl-ΔFABD 组凋亡细胞所占比率增多（$P<0.05$），差异有统计学意义（$F=65.020$，$P=0.003$）。MTT 实验检测 FABD 对 Bcr/Abl 蛋白促增殖能力的影响，结果如图 5C 所示，感染病毒72 h 后，与空载对照组相比，Bcr/Abl 使细胞的增殖能力增强（$P=0.000$）；与 Bcr/Abl 组相比，Bcr/Abl-ΔFABD 组细胞的增殖能力减弱（$P=0.000$），单因素方差分析 $F=134.300$，$P=0.000$）。以上实验结果说明 FABD 可以抑制 Bcr/Abl 对 293T 细胞的抗凋亡能力及促增殖能力。



A、B 流式细胞术检测 FABD 结构域对 Bcr/Abl 抗凋亡能力的影响





C. MTT 试验检测 FABD 结构域对 Bcr/Abl 增殖能力的影响

图 5 FABD 对 Bcr/Abl 蛋白抗凋亡、促增殖能力的影响

Fig.5 Effect of Bcr/Abl and Bcr/Abl-ΔFABD on apoptosis and proliferation in 293T cell by flow cytometry

3 讨 论

CML特征性染色体病变导致细胞质内特异性高表达 Bcr/Abl 蛋白，该蛋白发挥强烈的酪氨酸激酶活性，激活下游 CrkL、Ras 等信号通路[8]，导致细胞增殖紊乱，凋亡受阻。Bcr/Abl 在细胞中的定位直接影响 CML 细胞的存亡，进而影响 CML 整个疾病的进展，但是 Bcr/Abl 特异性定位于细胞质中的机制尚不清楚。

鉴于 FABD 结构域在介导 c-Abl 蛋白细胞质内定位的重要性，本研究开展了 FABD 对 Bcr/Abl 蛋白细胞内定位的研究。结果显示 Bcr/Abl 蛋白在细胞质中均匀分布，且与 F-actin 存在共定位关系；将 FABD 缺失后，Bcr/Abl 蛋白依然定位于细胞质中，但呈点状或斑块状聚集，与 F-actin 不存在共定位关系。Bcr/Abl 以及 Bcr/Abl-ΔFABD 均包含核定位信号（NLS）和核输出信号（NES），因此其细胞质定位可能是一个动态过程，即核输出增多或者入核受阻[9]。因此，本文加入 LMB 抑制转运蛋白的出核，结果证实 Bcr/Abl-ΔFABD 仍然呈块状聚集定位于细胞质，说明 Bcr/Abl 和 Bcr/Abl-ΔFABD 的细胞质定位与核输出增多无关，而可能与入核受阻有关。分析入核受阻的原因，可能与 Bcr/Abl 的其他结构域有关，如 Bcr/Abl 的酪氨酸激酶（tyrosine kinase，TK）活性区[10]。为了探究 TK 活性区对 Bcr/Abl 定位的影响，本文加入 TK 抑制剂 Imatinib（IM）。IM 可以与 ATP 竞争性结合 TK 活性区，从而降低酪氨酸激酶活性。经 IM 处理后，Bcr/Abl 在细胞质中的分布方式发生变化，从均匀弥散在细胞质中转变成如同 Bcr/Abl-ΔFABD 一样，呈颗粒状分布在细胞质中，说明FABD 缺失后可能使 Bcr/Abl 蛋白的激酶活性降低，从而减弱 Bcr-Abl 的抗凋亡、促增殖能力，具体的原因将在后续的研究中进一步探讨。Bcr/Abl 与 c-Abl 相比，尽管都缺失了 Abl 部分的 FABD，但是在细胞内的定位变化却不一致，c-Abl-ΔFABD 能够入核，而 Bcr/Abl-ΔFABD 依然定位于细胞质。分析 Bcr/Abl 与 c-Abl 的结构，两者 C 端的结构一致，唯有 N 端的 Bcr 结构不同，因此推断 Bcr 部分可能对Bcr/Abl蛋白阻滞在细胞质中起至关重要的作用[11-13]。

通过本课题的研究，证实 FABD 影响 Bcr-Abl 蛋白在细胞质内的分布方式，但不影响它定位的改变；进一步证实 Bcr/Abl 蛋白定位于细胞质是由于入核受阻而不是出核增加，并初步排除 TK 活性将 Bcr/Abl 阻滞在细胞质的可能性。基于以上结果，本文推断 Bcr 区域中可能存在对 Bcr/Abl 细胞定位起重要作用的结构域。本研究明确了后续研究的方向，对进一步探究 Bcr/Abl 蛋白的细胞质定位机制有重要意义。

参 考 文 献

[1] Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(1): 33-44.

[2] Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(13): 7457-7462.

[3] Wang JY. The capable ABL: what is its biological function?[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(7): 1188-1197.

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001360

MARK2基因协同调控 HeLa 细胞极性与增殖的机制研究

戈应刚[1],许　舸[2],高　青[3],梁小燕[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆　400016;2. 重庆医科大学生命科学研究院,重庆　400016;
3. 重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆　400016)

【摘　要】目的:观察 MARK2 基因对 HeLa 细胞极性与增殖的影响,探讨其可能的机制。**方法**:脂质体介导 MARK2 质粒转染 HeLa 细胞,G418 抗性筛选获得稳定转染的细胞株。TRITC-Phalloidin 染色观察细胞极性,平板克隆形成试验研究细胞贴壁生长能力,流式细胞术分析细胞周期各时相细胞的比例,Western blot 检测总 Rb 蛋白及磷酸化 Rb 蛋白的水平。**结果**:成功构建稳定转染 MARK2 的 HeLa 细胞系,与空质粒对照组细胞相比,MARK2 蛋白表达增强后 HeLa 细胞形态改变、上皮细胞极性恢复;MARK2 表达增强后 HeLa 细胞形成平板克隆数量明显减少[(303.67 ± 7.77) vs. (111.67 ± 7.64),P=0.000],细胞周期 G1 期比例明显增加[(48.82 ± 0.84)% vs. (72.01 ± 2.13)%,P=0.000]、S 期比例减少[(36.60 ± 0.58)% vs. (16.03 ± 3.85)%,P=0.010],Rb 蛋白的磷酸化水平明显降低[(7.66 ± 0.74) vs. (1.10 ± 0.13),t=15.053,P=0.003]。**结论**:在 HeLa 细胞中,MARK2 通过抑制 Rb 蛋白的磷酸化,使细胞周期停滞在 G1 期,抑制细胞增殖。MARK2 能够重建 HeLa 细胞上皮极性,协同调控细胞极性与细胞增殖两条通路。

【关键词】细胞周期;细胞极性;MARK2

【中图分类号】R730.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2017-03-27

作者介绍:戈应刚,Email:27847782@qq.com,
研究方向:胃肠道肿瘤的微创外科。

通信作者:梁小燕,Email:lxyan925@hotmail.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81201544)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170630.1032.010.html
(2017-06-30)

[4] O'Brien S,Abboud CN,Akhtari M,et al. Chronic myelogenous leukemia[J]. J Natl Compr Canc Netw,2012,10(1):64-110.

[5] Huang ZL,Gao M,Li QY,et al. Induction of apoptosis by directing oncogenic Bcr-Abl into the nucleus[J]. Oncotarget,2013,4(12):2249-2260.

[6] 高　淼,黄峥兰,曹唯希,等. FKBP-RAP-FRB 系统转运 BCR-ABL 入核对 K562 细胞的增殖抑制效应[J]. 中国细胞生物学学报,2014;04:470-475.

[7] Hantschel O,Wiesner S,Guttler T,et al. Structural basis for the cytoskeletal association of Bcr-Abl/c-Abl[J]. Mol Cell,2005,19,36(4):461-473.

[8] Hazlehurst LA,Bewry NN,Nair RR,et al. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation[J]. Cancer Control,2009,16(2):100-107.

[9] Vigneri P,Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase[J]. Nat Med,2001,7(2):228-234.

[10] Preyer M,Vigneri P,Wang JY. Interplay between kinase domain autophosphorylation and F-actin binding domain in regulating imatinib sensitivity and nuclear import of BCR-ABL[J]. PLoS One,2011,6(2):e17020.

[11] McWhirter JR,Galasso DL,Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins[J]. Mol Cell Biol,1993,13(12):7587-7595.

[12] 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.

[13] McWhirter JR,Wang JY. Activation of tyrosinase kinase andmicrofilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusionproteins[J]. Mol Cell Biol,1991,11(3):1553-1565.

[14] Hazlehurst LA,Bewry NN,Nair RR,et al. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation[J]. Cancer Control,2009,16(2):100-107.

(责任编辑:方　济)