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)

MARK2 regulates cell polarity and cell proliferation in HeLa cells

Ge Yinggang[1], *Xu Ge*[2], *Gao Qing*[3], *Liang Xiaoyan*[3]

(*1.Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. Institute of Life Science, Chongqing Medical University; 3. Department of Gastroenterology,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To observe the effect of MARK2 expression on cell polarity and proliferation in HeLa cells, and to investigate the underlying mechanisms. ***Methods***: A stable HeLa cell line highly expressing MARK2 protein was established by using G418 selection. Cell polarity was observed with TRITC-Phalloidin staining. Cell proliferation was examined with plate colony formation assay. Proportions of cells in different phases of cell cycle were analyzed by flow cytometry. Levels of total Rb protein and phosphorylated Rb protein were analyzed by Western blot. ***Results***: High expression of MARK2 in Hela stable cells led to phenotypic changes consistent with reversed epithelial polarity. Decreased cell proliferation, increased G1-phase cell proportion, reduced S-phase cell proportion and inhibited Rb phosphorylation were observed in HeLa stable cells. ***Conclusion***: Enforced expression of MARK2 protein in HeLa cells leads to decreased Rb phosphorylation, arrests cell cycle at G1-stage thus inhibits cell proliferation. MARK2 can reconstruct epithelial polarity of HeLa cells, and modulate both signaling pathways regulating cell polarity and cell proliferation.

【Key words】cell cycle; cell polarity; MARK2

细胞极性的建立和维持是细胞分化和行使正常功能的基础，对多细胞有机体的生长发育至关重要。哺乳动物上皮细胞是高度极性化的细胞，具有不同的顶-侧-基底区域。上皮细胞发生恶性转变时，通常会伴随细胞极性丧失、组织结构排列紊乱等表型[1]。因此，细胞极性障碍是诊断上皮细胞恶性肿瘤即癌症的一个重要指标[2]。

微管亲和力调节激酶（microtubule affinity-regulating kinase, MARK）属于高度保守的钙调蛋白依赖性蛋白激酶家族，包含 4 个亚型（MARK1、MARK2、MARK3、MARK4），在胚胎和成人组织中广泛表达，能够磷酸化微管结合蛋白（microtubule-associated protein, MAPs），降低 MAP 与微管的亲和力，导致 MAP 与微管解聚，从而增强微管的动力，调节细胞骨架形态及细胞器的排列，在上皮细胞顶基极性的建立和维持中发挥着关键性作用[3-5]。

近年来研究发现，MARK 参与细胞增殖调控，与恶性肿瘤的过度生长相关[6-7]，但其分子机制研究较少，在国内尚未见相关报道。本研究以 MARK2 基因为研究对象，构建 MARK2 稳定转染的人宫颈癌 HeLa 细胞模型，观察 MARK2 蛋白表达增强后对 HeLa 细胞极性及增殖的影响，探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 MARK2 基因真核表达质粒（pGFP-MARK2）由英国邓迪大学 Dario Alessi 教授提供；抗体：兔抗人磷酸化 Rb、小鼠抗人 Rb 购自 Cell Signaling 公司，小鼠抗人 MARK2、小鼠抗人 GAPDH 购自 Santa Cruz 公司，辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗购于北京中杉金桥公司；胎牛血清、G418、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司；罗丹明-鬼笔环肽（TRITC-Phalloidin）购自 Roche 公司；DAPI、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于上海碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库，培养于 RPMI 1640 培养基（含 10%胎牛血清），置于 37 ℃、含 5%CO_2 孵箱中，每天观察细胞状态，每隔 24~48 h 换液，必要时以 1:3 或 1:4 比例传代，以维持细胞的良好生长状态。

1.2.2 建立稳定转染 MARK2 基因的 HeLa 细胞系 使用 Lipofectamine 2000 将 pGFP-MARK2 质粒和阴性对照 pGFP 空质粒分别转染对数生长期的 HeLa 细胞；24 h 后以 1:10 比例扩大培养，加入 G418（浓度 600 μg/mL）筛选 14 d，G418 浓度减半维持培养至逐渐形成耐药克隆。各单克隆扩大培养后，提取总蛋白，采用 Western blot 验证 MARK2 基因稳定表达的效果。

1.2.3 TRITC-Phalloidin 染色 置盖玻片于 24 孔板中，接种细胞，贴壁生长至 60%的汇合度，PBS 漂洗，40 g/L 多聚甲醛固定 10 min，0.1% Triton X-100 处理 2 min，100 nmol/L TRITC-phalloidin 避光染色 40 min，DAPI 复染 3 min，甘油封片，激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot 胰酶消化、收集对数生长期的 HeLa 细胞，RIPA 蛋白裂解液裂解细胞、提取总蛋白，BCA 法测定蛋白总浓度，10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离，电转移至 PVDF

膜，5%脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h，一抗 MARK2(1:500)、磷酸化 Rb(1:1 000)、Rb(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)4 ℃孵育过夜，二抗(1:10 000)室温摇床孵育 2 h，ECL 显影液曝光显色，Quantity One 图像分析系统测定各条带灰度值，GAPDH 作为内参以校正各组蛋白的上样量。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 胰酶消化、收集对数生长期的 HeLa 细胞，预冷的 75%乙醇 4 ℃固定过夜，1 mg/mL RNase A 37 ℃水浴 30 min、碘化丙啶(PI)4 ℃染色 30 min 后上流式细胞仪检测。

1.2.6 平板克隆形成实验 胰酶消化对数生长期细胞，接种至 6 孔板，每孔接种 200 个细胞，置于 37 ℃培养箱中静置培养 2 周，甲醇固定，0.5%结晶紫常温染色，显微镜下观察、拍照并计数克隆数。

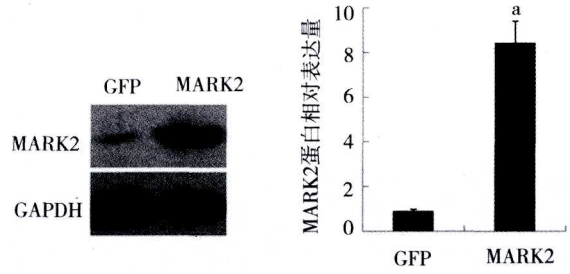
1.3 统计学处理

所有实验重复至少 3 次，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据，两组间比较采用独立样本 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 建立稳定转染人 MARK2 基因的 Hela 细胞系

Western blot 结果(图 1)显示，与稳定转染 GFP 空质粒的 HeLa 细胞(GFP)相比，稳定转染 MARK2 基因的 HeLa 细胞(MARK2)出现与 MARK2 单克隆抗体特异性结合的高表达蛋白条带，MARK2 蛋白的相对表达水平明显升高[(0.90 ± 0.07) vs. (8.44 ± 0.97)，t=−13.445，P=0.005]，表明在 HeLa 细胞中 MARK2 蛋白得到了稳定高效的表达、MARK2 基因稳定转染的人 HeLa 细胞模型构建成功。



a：与 GFP 组相比，差异有统计学意义，P< 0.05

图 1 Western blot 检测 HeLa 细胞中 MARK2 的蛋白表达水平

Fig.1 MARK2 protein expression in HeLa cells examined by Western blot

2.2 MARK2 表达增强对 HeLa 细胞极性的影响

DAPI 标记细胞核、TRITC-phalloidin 染色细胞骨架蛋白 actin 后，激光共聚焦显微镜下观察(图 2)：HeLa 空白细胞(HeLa)以及 GFP 稳定转染的 HeLa 细胞(GFP)呈现长梭形、纺锤形的间质细胞表型，在细胞膜下可见沿细胞长轴平行排列、间质细胞特有的应力纤维；稳定转染 MARK2 的 HeLa 细胞(MARK2)呈现卵圆形的上皮细胞表型，细胞内应力纤维减少，actin 重新定位于细胞膜下，说明增强 MARK2 表达能够重建 HeLa 细胞的上皮极性，抑制上皮-间质转化。

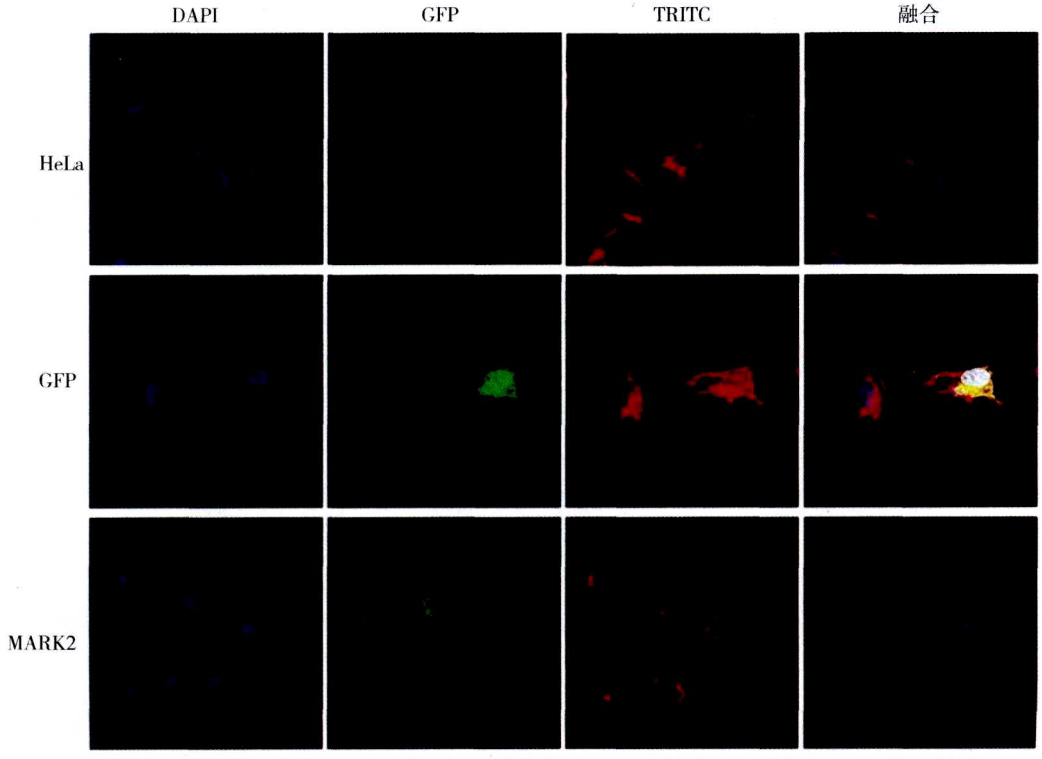
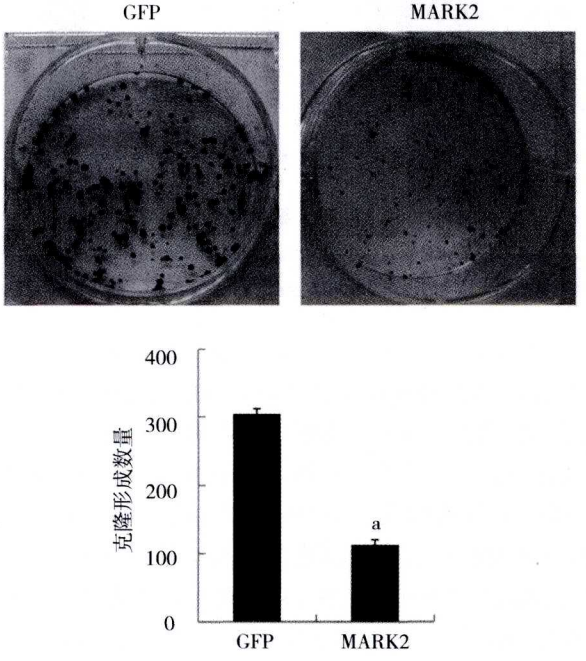


图 2 激光共聚焦显微镜观察 HeLa 细胞形态(800×)

Fig.2 Cells analyzed for morphological changes by confocal microscopy(800×)

2.3 MARK2 表达增强对 HeLa 细胞增殖的影响

平板克隆形成实验(图 3)显示,MARK2 稳定转染的HeLa 细胞克隆形成数量(111.67 ± 7.64)明显低于 GFP 稳定转染的HeLa细胞(303.67 ± 7.77),2 组比较存在统计学差异(t=30.528,P=0.000),表明增强 MARK2 表达可抑制 HeLa 细胞增殖。



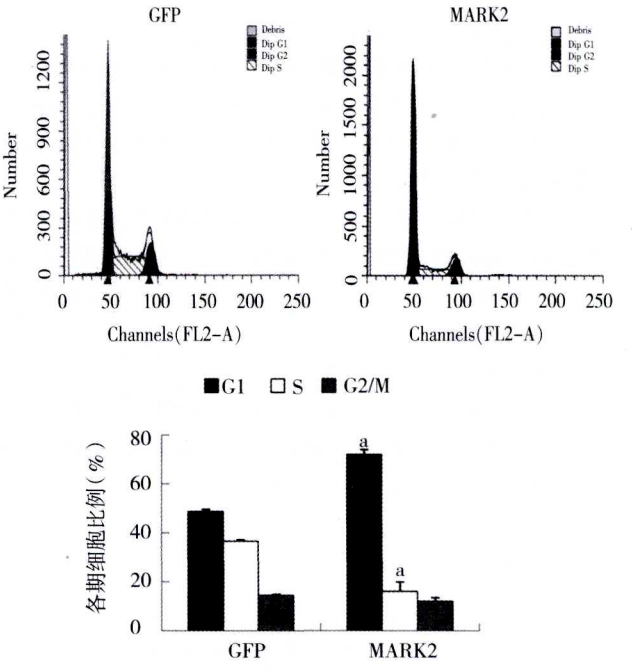
a:GFP 组相比,差异有统计学意义,P< 0.05

图 3 平板克隆形成实验检测 HeLa 细胞增殖

Fig.3 Cell proliferation analyzed by colony formation assay

2.4 MARK2 表达增强对 HeLa 细胞细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(图 4)显示,与 GFP 空质粒稳定转染的细胞相比,MARK2 基因稳定转染的 HeLa 细胞 G1 期比例增加[(48.82 ± 0.84)% vs. (72.01 ± 2.13)%,t=−17.563,P=0.000]、S 期比例降低[(36.60 ± 0.58)% vs. (16.03 ± 3.85)%,t=9.158,P=0.010],G2 期细胞比例无明显变化[(14.58 ± 0.39)% vs. (11.96 ± 1.74)%,t=2.542,P=0.064],表明在 HeLa 细胞中增强 MARK2 表达能够抑制细胞周期的关键调控点 G1/S 的转换,阻滞细胞周期在 G1 期。



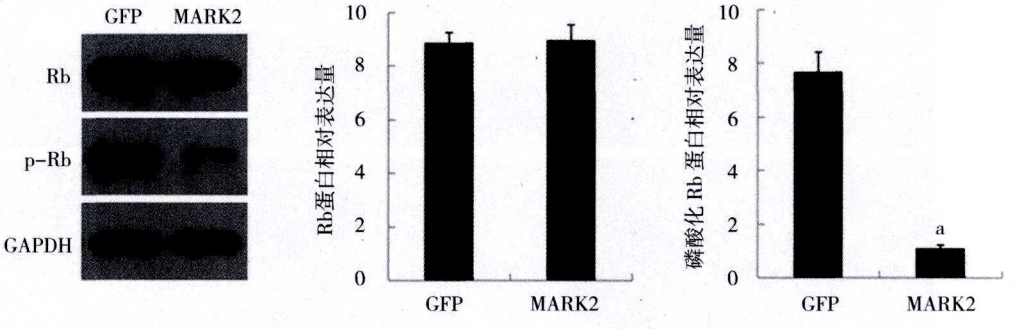
a:与 GFP 组相比,差异有统计学意义,P< 0.05

图 4 流式细胞术分析 HeLa 细胞细胞周期各时相比例

Fig.4 Proportions of cells in different phases of cell cycle analyzed by flow cytometry

2.5 MARK2 表达增强对 HeLa 细胞 Rb 蛋白及其磷酸化的影响

Western blot 结果显示(图 5),与 GFP 对照组细胞相比,MARK2 基因稳定转染的 HeLa 细胞中 Rb 总蛋白水平无显著改变[(8.87 ± 0.40) vs. (8.97 ± 0.59),t=−0.243,P=0.820]、Rb 蛋白的磷酸化水平明显下降[(7.66 ± 0.74) vs. (1.10 ± 0.13),t=15.053,P=0.003],表明在 HeLa 细胞中增强 MARK2 表达能够抑制 Rb 蛋白磷酸化。



a:与 GFP 组相比,差异有统计学意义,P< 0.05

图 5 Western blot 检测 HeLa 细胞中总 Rb 蛋白和磷酸化 Rb 蛋白的水平

Fig.5 Total Rb and phosphorylated Rb protein levels examined by Western blot

3 讨 论

细胞增殖过度和极性障碍是上皮细胞恶性肿瘤的两大主要特征。过去认为，细胞极性丧失是细胞过度增殖后异常聚积的结果[8]。但现在，越来越多的研究表明，细胞极性紊乱参与上皮细胞的早期恶性转化过程，甚至有学者提出极性障碍可能是上皮细胞发生癌变的主要原因，当细胞极性发生紊乱后，正常上皮细胞的屏障功能被破坏，从而解除了对细胞过度增殖、转化的抑制，促进细胞癌变[9]。

近年来多项研究已证实抑癌基因 LKB1 在上皮细胞极性的建立和维持中发挥着重要作用[10-11]。LKB1 活化后，能够在缺乏细胞间连接及其他极性诱导因素的环境下，使单个人小肠上皮细胞自发地形成顶-基极性[12]。LKB1 是一个多功能的丝/苏氨酸蛋白激酶，可以通过直接磷酸化调控包括腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）、MARK、BRSK（brain-specific kinase）等多种蛋白激酶的活性参与上皮细胞极性调节，其中尤以 LKB1/MARK 信号通路发挥着关键性作用[13-14]。LKB1 通过直接磷酸化 MARK 活性域中的 T 环，增强 MARK的蛋白激酶活性，促进 MARK 对 tau、MAP2、MAP4 等微管结合蛋白的磷酸化，使微管解聚、稳定性下降，细胞极性改变[15-16]。

本实验将 MARK2 真核表达质粒转染内源性 LKB1 表达缺陷的人宫颈癌 HeLa 细胞，通过抗性筛选获得稳定转染 MARK2 基因的 HeLa 细胞系，结果发现 MARK2 蛋白表达增强后 HeLa 细胞克隆形成数量明显下降，细胞周期中 G1 期细胞比例明显增加、S 期细胞比例减少、Rb 蛋白磷酸化水平明显下降，表明在 HeLa 细胞中增强 MARK2 蛋白表达能够抑制 Rb 蛋白磷酸化，阻滞细胞周期在 G1 期，使细胞生长增殖减慢。与对照组细胞相比，稳定转染 MARK2 基因的 HeLa 细胞，形态发生改变，长梭形细胞的数量明显降低，细胞内应力纤维形成减少，表明 MARK2 表达增强后能够重新诱导建立上皮细胞极性，抑制间质细胞表型、逆转上皮-间质转化。

本实验结果表明，在人宫颈癌 HeLa 细胞中增强 MARK2 基因表达后能够同时抑制细胞生长、重建细胞上皮极性，提示在上皮细胞癌变过程中，MARK2 调控细胞增殖和细胞极性的两条信号通路紧密联系、协同作用，共同决定着细胞的转归，但相关分子机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity[J]. Cell, 2010, 141(5): 757-774.

[2] Hatakeyama M. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking Helicobacter pylori virulence factor CagA[J]. Oncogene, 2008, 27(55): 7047-7054.

[3] Lee S, Wang JW, Yu W, et al. Phospho-dependent ubiquitination and degradation of PAR-1 regulates synaptic morphology and tau-mediated Aβ toxicity in Drosophila[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1312.

[4] Matenia D, Mandelkow EM. The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton[J]. Trends Biochem Sci, 2009, 34(7): 332-342.

[5] Hurov J, Piwnica-Worms H. The Par-1/MARK family of protein kinases: from polarity to metabolism[J]. Cell Cycle, 2007, 6(16): 1966-1969.

[6] Timm T, von Kries JP, Li X, et al. Microtubule affinity regulating kinase activity in living neurons was examined by a genetically encoded fluorescence resonance energy transfer/fluorescence lifetime imaging-based biosensor: inhibitors with therapeutic potential[J]. J Biol Chem, 2011, 286(48): 41711-41722.

[7] Müller J, Ritt DA, Copeland TD, et al. Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate[J]. EMBO J, 2003, 22(17): 4431-4442.

[8] Lee M, Vasioukhin V. Cell polarity and cancer-cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 8): 1141-1150.

[9] Hezel AF, Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression[J]. Oncogene, 2008, 27(55): 6908-6919.

[10] Brenman JE. AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division[J]. Cell Cycle, 2007, 6(22): 2755-2759.

[11] Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, et al. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism[J]. Physiol Rev, 2009, 89(3): 777-798.

[12] Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD[J]. Cell, 2004, 116(3): 457-466.

[13] Lizcano JM, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1[J]. EMBO J, 2004, 23(4): 833-843.

[14] Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways[J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 137-163.

[15] Mohseni M, Sun J, Lau A, et al. A genetic screen identifies an LKB1-MARK signalling axis controlling the Hippo-YAP pathway[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 108-117.

[16] Shelly M, Poo MM. Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization[J]. Dev Neurobiol, 2011, 71(6): 508-527.

（责任编辑：冉明会）