DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.003
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1799-03

论著

Grb2在MCF-7乳腺癌细胞中的核定位研究

陈 敏,陈 彬,李渝萍,陈 健,李 强,钟小林,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆,400038)

提 要:目的 构建Grb2的红色荧光蛋白融合表达质粒pDsRed1-C/Grb2,并观察Grb2在MCF-7乳腺癌细胞的核定位情况。方法 用PCR方法扩增Grb2 cDNA,与红色荧光蛋白表达质粒pDsRed1-C重组构建融合蛋白表达质粒pDsRed1-C/Grb2,酶切、测序鉴定后,瞬时转染MCF-7乳腺癌细胞株,用荧光显微镜观察Grb2的核定位情况。结果 pDsRed1-C/Grb2质粒有正确的阅读框,融合表达蛋白DsRed1-C/Grb2可定位于MCF-7乳腺癌细胞核内。结论 成功构建了Grb2的红色荧光蛋白融合表达质粒pDsRed1-C/Grb2,在MCF-7乳腺癌细胞株中,Grb2除存在于胞浆外,也可定位于细胞核内,可能与其参与核内基因的转录调控有关。

关键词:Grb2;MCF-7乳腺癌细胞;核定位
中图法分类号:Q782;R394-33;R737.9 文献标识码:A

Nucleic localization of Grb2 in MCF-7 cells

CHEN Min, CHEN Bin, LI Yu-ping, CHEN Jian, LI Qiang, ZHONG Xiao-lin, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant plasmid pDsRed1-C/Grb2 expressing a fusion construction of red fluorescent protein pDsRed1-C and Grb2 and observe the nucleic localization of Grb2 in MCF-7 cells. **Methods** A cDNA fragment encoding Grb2 was amplified by PCR and inserted into MCS of red fluorescent protein pDsRed1-C. After identification of the positive clone by digestion of restriction endonuclease and sequencing, the recombinant construct was transiently transfected into MCF-7 cells and the nucleic localization of the fusion protein DsRed1-C/Grb2 was observed by fluorescence microscopy. **Results** The fusion protein, expressed by the plasmid with a correct reading frame, could be localized in the nuclei of MCF-7 cells. **Conclusion** The recombinant plasmid pDsRed1-C/Grb2, which encodes fusion protein of DsRed1-C and Grb2, has been successfully constructed. Grb2 can be localized in the nuclei of MCF—7 cells except as a cytosolic protein.

Key words: Grb2r; MCF-7 cell; nucleic localization

Grb2是生长因子/Ras信号传导途径中的一个关键接头分子[1,2]。Grb2由一个位于中央的SH2(src homology 2)结构域和两个位于两侧的SH3(src homology 3)结构域构成[3],Grb2可通过其SH2结构域与生长因子激活的生长因子受体结合,还能通过其SH3结构域与SOS(son of sevenless,又称Ras的鸟嘌呤核苷酸交换因子)形成复合物[4],从而活化Ras,激活MAP激酶系统,导致细胞的增殖与分化[5]。通常Grb2被认为是一种胞浆蛋白,已有文献表明Grb2可与多种调节蛋白相互作用,参与胞内多种代谢调节[6~8],因此,Grb2也可能从胞浆转移到核内,在核内参与基因的转录调控。为证实这一假设,我们构建了Grb2的红色荧光蛋白融合表达质粒pDsRed1-C/Grb2,并观察了Grb2的核定位情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 红色荧光蛋白表达质粒pDsRed1-C购自Clontech公司。MCF-7乳腺癌细胞株,大肠杆菌DH5a菌株均为本室保存。

1.1.2 引物及主要试剂 PCR引物(上海生工生物工程公司),*Taq* DNA聚合酶、限制性内切酶(New England公司),T4 DNA连接酶(Promega公司)。PCR纯化试剂盒、凝胶抽提试剂盒(Qiagen公司),Eagle's MEM培养液及经木炭葡聚糖(Charcoal-1 dextran)处理的胎牛血清(Hyclone公司);Lipofectin(Life公司)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300126,30370317)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300126, 30370317)
作者简介:陈 敏(1963—),女,江苏省常熟市人,实验师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68775194
通信作者:陈 彬,电话:(023)68752263-8051
收稿日期:2004-02-11;修回日期:2004-05-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增Grb2 cDNA 扩增两端带 *Eco*RⅠ 和 *Bam*H1 位点的Grb2 cDNA 的PCR引物为：

正向引物：5′-GCCGAATTCATGCTGCTGCAGGGGAGCCA-3′

反向引物：5′-CGCGTCGACTCAAGTCTGCTGGGCCTGCAGCAT-3′

以Grb2 真核表达质粒 pCMV5-Grb2 为模板，用上述两条引物进行 PCR 反应。扩增条件为：94 ℃，1 min；58 ℃，1 min；72 ℃，2 min；循环 25 次；94 ℃，1 min；58 ℃，1 min；72 ℃，8 min；循环 1 次。反应体积 100 μl。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化并回收所需 DNA 片段，纯化的 DNA 溶解在 50 μl 的 TE 缓冲液中。

1.2.2 红色荧光蛋白融合表达质粒 pDsRed1-C/Grb2 的构建

用 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 双酶切上述 PCR 产物，Qiagen PCR 纯化试剂盒回收纯化 DNA，加入经相同双酶切处理、Qiagen 凝胶纯化回收红色荧光蛋白表达质粒 pDsRed1-C，经过连接反应，构建成红色荧光蛋白融合表达质粒 pDsRed1-C/Grb2。反应体系为：pDsRed1-C 2 μl（100 ng），Grb2 6 μl（60 ng），10× 连接缓冲液 1 μl，T4 DNA 连接酶 1 μl（3 U），室温 4 h。将 1 μl 连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞，氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆。小量提取质粒，双酶切消化，1% 琼脂糖凝胶电泳，鉴定阳性重组质粒并用 DsRed1-C 测序引物。5′-AGCTGGACATCACCTCCG-ACAACG-3′ 测定序列。

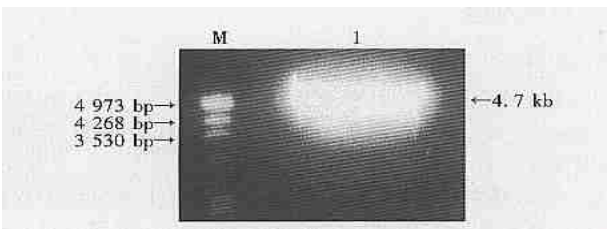
1.2.3 哺乳系细胞培养、瞬时转染及 Grb2 的核定位观察

MCF-7 乳腺癌细胞株培养于 Eagle's MEM 常规培养基中，培养基含 10% FBS，100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素，置 CO_2 培养箱中 37 ℃恒温培养。按 Lipofectin 试剂盒使用手册，将 MCF-7 细胞按 4×10^5 细胞/孔接种 6 孔培养皿，培养至 70%～80% 满密度（18～24 h），分别用 1 μg 的 pDsRed1-C/Grb2 质粒、pDsRed1-C 空质粒和 6 μl 的 Lipofectin 进行转染实验。两种表达质粒瞬时转染 5 h 后，吸出含有 Lipofectin 和 DNA 的培养液，加入含 5% 木炭葡聚糖处理过的胎牛血清培养液。48 h 后，用荧光显微镜观察 Grb2 的核定位情况。

2 结果

2.1 红色荧光蛋白融合表达质粒 pDsRed1-C/Grb2 的构建

2.1.1 红色荧光蛋白表达质粒 pDsRed1-C 的酶切结果 用 *Eco*RⅠ 和 *Bam*H1 双酶切红色荧光蛋白表达质粒 pDsRed1-C，结果见图 1。

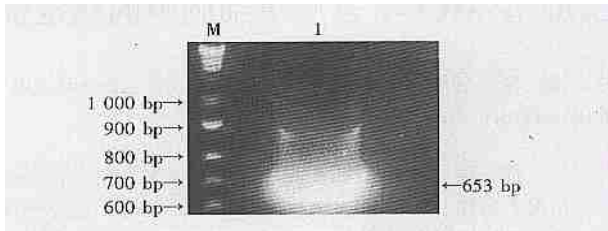


M：Marker；1：pDsRed1-C

图1 ***Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 双酶切红色荧光蛋白表达质粒 pDsRed1-C**

Fig 1 Digestion of pDsRed1-C vector with *Eco*RⅠ and *Bam*HⅠ

2.1.2 Grb2 cDNA 的 PCR 产物电泳分析 取 Grb2 cDNA PCR 产物 10 μl 于 1% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示，在分子量约 653 bp 处有一条带，与 Grb2 的编码区大小一致（图 2）。

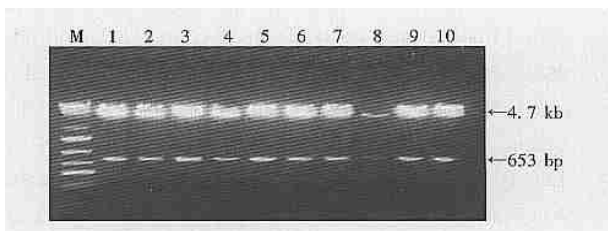


M：Marker；1：Grb2

图 2 **Grb2 编码区的 PCR 产物**

Fig 2 PCR product of the Grb2 coding region with *Eco*RⅠ at 5′ end and *Bam*HⅠ at 3′ end

2.1.3 重组质粒 pDsRed1-C/Grb2 的鉴定 从氨苄抗性 LB 平板上挑取 10 个阳性克隆，小量抽提质粒后，用 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 双酶切，分别可切出约 4.7 kb 和 653 bp 的片段，可初步确定它们均为阳性重组质粒（图 3），阳性重组质粒的测序结果进一步证实上述所得的质粒正确克隆了 Grb2 的编码区 cDNA，插入方向及阅读框均正确（结果未显示）。



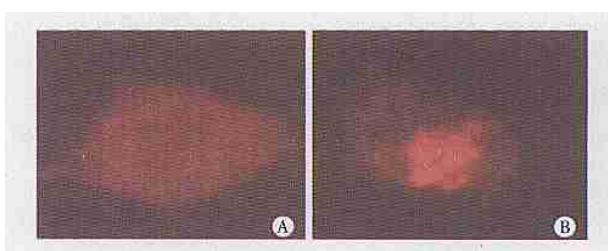
M：Marker；1—10：pDsRed1-C/Grb2

图 3 **pDsRed1-C/Grb2 融合蛋白表达质粒的酶切鉴定**

Fig 3 Restriction digestion to screen the right pDsRed1-C/Grb2 plasmids

2.2 Grb2 的核定位观察结果

分别用 pDsRed1-C/Grb2 质粒、pDsRed1-C 空质粒瞬时转染 MCF-7 乳腺癌细胞株 48 h 后，用荧光显微镜观察 Grb2 的核定位情况，结果显示融合蛋白 DsRed1-C/Grb2 可定位于细胞核内（图 4）。



A：DsRed；B：DsRed/Grb2

图 4 **荧光显微镜观察 DsRed1-C/Grb2 融合蛋白的核定位**

Fig 4 Nucleic localization of DsRed/Grb2 fusion proteins in the transfected MCF-7 cells by fluorescence microscopy

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

Grb2 是 Ras 信号途径所必需的胞内接头蛋白[1, 2]。Grb2 由一个位于中央区的 SH2(src homology 2)结构域和两个位于两侧的 SH3 结构域构成。在无生长因子(如 EGF)刺激的情况下, Grb2 以 Grb2/SOS (son of sevenless, Ras 的鸟嘌呤核苷酸交换因子)复合物的形式存在于胞浆; 当生长因子与位于细胞膜上的受体的胞外结构域结合后, 受体形成二聚体并被激活, 使其胞内结构域上某些酪氨酸残基发生磷酸化。Grb2 通过其 SH2 结构域特异地识别 PYXNX 模体序列, 直接与活化的生长因子受体作用或间接地与生长因子受体相连接的蛋白质发生相互作用。Grb2/SH3 结构域与磷酸化的生长因子受体结合后, 将位于胞浆的以 Grb2/SH3/SOS 复合物形式存在的 SOS 转移到嵌在细胞膜上的 Ras 附近, SOS 以 GPT 取代与 Ras 结合的 GDP, 使无活性的 GDP-Ras 活化成有活性的 GTP-Ras; 活化的 Ras 则激活下游的 MAPK 激酶的级联磷酸化, 导致细胞的增殖与分化[3]。

Grb2 通常被认为是一种胞浆蛋白, 采用免疫荧光显微镜研究 Grb2 在天然细胞中的定位, 可发现 Grb2 定位在膜绉褶处, 这种定位有赖于其 SH3 结构域, 表明 Grb2 可与调节肌动蛋白细胞骨架形成中起重要调节作用的蛋白质结合[9]。最近的文献[6~8]表明 Grb2 可与多种调节蛋白相互作用, 参与胞内多种代谢调节, 我们最近的研究结果也显示, Grb2 可与一种核内的核受体辅活化子 PNRC 相互作用并调节的核受体基因表达。因此, 推测 Grb2 除存在于胞浆外, 也可能从胞浆转移到核内, 在核内参与基因的转录调控。Verbeek[10] 采用免疫组化技术研究了 Grb2 在人乳腺癌细胞及其相应正常组织细胞中的分布情况, Grb2 在所有乳腺癌组织中过表达, 除定位于胞浆外, 在所有正常和乳腺癌组织的细胞核中也可检测到 Grb2, 在乳腺癌组织中 58%的 Grb2 存在于细胞核中, 37%Grb2 存在于胞浆中; 而在正常组织细胞中, 只有 22%的 Grb2 存在于细胞核中, 70%Grb2 存在于胞浆中, 表明 Grb2 在人乳腺癌组织中过表达且主要分布在细胞核中。

与 Verbeek 的上述研究结果相似, 我们构建的 Grb2 红色荧光蛋白融合表达质粒 pDsRed1-C/Grb2 定位在了 MCF-7 乳腺癌细胞核中, 从而进一步证实在正常组织细胞中作为胞浆蛋白和 Ras 信号途径所必需的胞内接头蛋白的 Grb2 在乳腺癌细胞中可转移到核内。由于核受体辅活化子 PNRC 作为一种核蛋白, 主要存在于细胞核, 我们最近的研究结果显示 PNRC 能与 Grb2 发生相互作用, 提示它们在某种条件下必然在细胞的同一位置共定位(colocalization)。我们下一步的实验将把 PNRC 表达成 EGFP-PNRC 绿色荧光融合蛋白, 而将 Grb2 表达成 DSRed-Grb2 红色荧光融合蛋白, 将表达这两种融合蛋白的质粒共转染 MCF-7 乳腺癌细胞后, 用共聚焦荧光显微镜观察这两种不同颜色的融合蛋白在细胞内是否共同存在于一个细胞部位。Grb2 的核定位结果以及 PNRC 与 Grb2 共定位的结果, 将为深入地研究 PNRC 与 Grb2 间的相互作用分别对核受体信号途径和生长因子 Grb2Rao 信号途径的调控及其调控机制, 研究它们相互作用的分子基础, 提供理论基础。

参考文献:

[1] Lowenstein E J, Daly R J, Batzer A G, *et al*. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling[J]. Cell, 1992, 70(3): 431－442.

[2] Fry M J, Panayotou G, Booker G W, *et al*. New insights into protein-tyrosine kinase receptor signaling complexes[J]. Protein Sci, 1993, 2(11): 1785－1797.

[3] Downward J. The GRB2/Sem-5 adaptor protein[J]. FEBS Lett, 1994, 338(2): 113－117.

[4] Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor[J]. Cell, 1993, 73(3): 611－620.

[5] Lewis T S, Shapiro P S, Ahn N G. Signal transduction through MAP kinase cascades[J]. Adv Cancer Res, 1998, 74: 49－139.

[6] Benesch S, Lommel S, Steffen A, *et al*. Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP2)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37771－37776.

[7] Korkaya H, Jameel S, Gupta D, *et al*. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK[J]. J Biol Chem, 2001, 276(45): 42389－42400.

[8] Simpson A, Uitto J, Rodeck U, *et al*. Differential expression and subcellular distribution of the mouse metastasis-associated proteins Mta1 and Mta3 [J]. Gene, 2001, 273(1): 29－39.

[9] Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, *et al*. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules[J]. Cell, 1993, 74(1): 83－91.

[10] Verbeek B S, Adriaansen-Slot S S, Rijksen G, *et al*. Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens[J]. J Pathol, 1997, 183(2): 195－203.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net