

· 基础研究 ·

EBP50 影响 HeLa 细胞微丝骨架的分布和定位*

郑君芳 王 瑛 陈 鹏^① 贺俊崎

首都医科大学基础医学院生化 and 分子生物学系 (北京市 100069)

摘要 目的: 通过研究与膜-细胞骨架连接蛋白(ezrin-radixin-moesin, ERM)家族相结合的磷酸化蛋白 50 (ERM-binding phospho-protein-50, EBP50)对 HeLa 细胞微丝骨架含量、分布的影响及受血小板源性生长因子 PDGF (platelet-derived growth factor)刺激后,微丝骨架在细胞中定位的变化及微丝骨架定位变化与 EBP50 的关系,阐明 EBP50 蛋白影响肿瘤细胞生长迁移的分子机制。方法:将 pBK-CMV-HA 空载体和 pBK-CMV-HA-EBP50 wt 重组质粒分别转染 HeLa 细胞系, G418 进行稳定表达细胞系的筛选,并用 Western 免疫印迹方法进行蛋白表达的鉴定;利用 Western 免疫印迹、免疫荧光细胞化学染色等方法结合光镜和激光共聚焦扫描显微镜分别观察和分析 HA-HeLa 与 HA-EBP50-HeLa 微丝骨架的含量及分布的异同;然后使用 10ng/ml 和 20ng/ml PDGF 37℃ 刺激细胞 15min 后,分别观察及分析两组细胞微丝骨架的分布情况及 EBP50 在细胞中定位的变化。结果:Western 免疫印迹鉴定证实转染的外源性 EBP50 cDNA 片段可在 HeLa 细胞系中成功表达 EBP50 蛋白,证明获得稳定表达 EBP50 蛋白的 HeLa 细胞系。Western 免疫印迹及免疫荧光结果证实,转染空载 pBK-CMV-HA 的 HeLa 细胞微丝骨架粗大疏松,方向不一,交错排列;与其相比,EBP50 虽然对 HeLa 细胞微丝骨架的含量没有明显影响,但能够促使细胞微丝骨架呈致密细丝状,平行规则排列,并沿细胞极性分布;并且在 PDGF 刺激下,EBP50 能够与微丝骨架一起自胞浆迁移至膜上,并共定位。结论:EBP50 能改变 HeLa 细胞微丝骨架的分布。在受到 PDGF 刺激时,EBP50 还能使 HeLa 细胞系的微丝骨架定位于膜表面。EBP50 可能通过影响微丝骨架的分布和定位来发挥其影响肿瘤细胞生长迁移的功能。

关键词 微丝骨架 HeLa 细胞 EBP50

EBP50 Influences Distribution and Localization of Microfilament Cytoskeleton in Cultured HeLa Cells

ZHENG Junfang¹, WANG Ying¹, CHEN Peng^{1,2}, HE Junqi¹

Corresponding author: HE Junqi, E-mail: jq_he@ccmu.edu.cn

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China

²Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Grant support: National Natural Science Foundation of China (30572183 and 30772573)

Objective: To explore the influence of EBP50 (ezrin-radixin-moesin-binding phospho-protein-50) on microfilament cytoskeleton content and distribution in cultured HeLa cells, to investigate the relationship between the changes in microfilament cytoskeleton localization and EBP50 after PDGF (platelet-derived growth factor) stimulation, and to further clarify the molecular mechanism by which EBP50 suppresses tumor cell proliferation and migration. **Methods:** pBK-CMV-HA-EBP50 wild type recombinant plasmid and pBK-CMV-HA empty vector were transfected into HeLa cells. G418 at 350mg/L was used to screen for cell clones stably expressing EBP50. Western blot was carried out to detect EBP50 expression. Similarities and differences in microfilament cytoskeleton content and distribution in HeLa cells transfected with pBK-CMV-HA-EBP50 wild type recombinant plasmid or pBK-CMV-HA empty vector were analyzed by Western blot, fluorescence staining and confocal microscopy. HeLa cells stably transfected with the pBK-CMV-HA-EBP50 wild type recombinant plasmid and the pBK-CMV-HA empty vector were also treated with PDGF (10 ng/ml and 20 ng/ml, 37℃, 15min) and stained by rhodamine-labeled phalloidin to observe the distribution of microfilament cytoskeleton in the two groups. EBP50 protein distribution in PDGF-stimulated HeLa cells was detected by immunofluores-

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:30572183,30772573)、北京教委重点基金(编号:KZ200610025013)、北京市新世纪优秀人才支持计划(编号:NCEF-06-0184)和北京市优秀人才培养项目资助(编号:20071D0501800253)

① 山东省眼科研究所

通讯作者:贺俊崎 jq_he@ccmu.edu.cn

cence. **Results:** Western blot results confirmed that the EBP50 cDNA fragment could express EBP50 in cultured HeLa cell lines and that cell lines stably expressing EBP50 were successfully obtained. Western blot and fluorescence results showed that in the cell line transfected with empty vector, the microfilament cytoskeleton was thick, loose, multidirectional and displayed crossing arrangements. The content of microfilament cytoskeleton in the cell line transfected with pBK-CMV-HA-EBP50 was different from that found in the cell line transfected with empty vector. EBP50 expression enhanced microfilament cytoskeleton polymerization into compact thin filaments. Under the stimulation of PDGF, EBP50 migrated to the cell membrane from the cytosol together with microfilament cytoskeleton and co-localized there. **Conclusion:** EBP50 can change the distribution of microfilament cytoskeleton in cultured HeLa cells and can also bind the microfilament cytoskeleton to the cell membrane under the stimulation of PDGF. EBP50 may play a role in the proliferation and migration of tumor cells by influencing the distribution and localization of microfilament cytoskeleton.

Keywords Microfilament cytoskeleton; HeLa cell; EBP50

与膜-细胞骨架连接蛋白家族结合的磷酸化蛋白 50 (ERM-binding phosphoprotein-50, EBP50, NHERF, NHERF1)是含有两个PDZ(PDZ1、PDZ2)结构域和一个ERM结合结构域的胞内多功能连接蛋白。PDZ和ERM结合结构域均为典型的蛋白质-蛋白质相互作用的结构域,EBP50能够通过它们与多种蛋白结合。

最近研究发现EBP50具有抑癌潜能,在细胞的生长和迁移中起着非常重要的作用^[1-5],但对其影响细胞生长和迁移的分子机制尚有争议。由于EBP50可通过其ERM结合结构域间接结合细胞骨架,而细胞骨架在细胞分化和运动中起着重要作用^[4,6,7]。因而,本研究采用能够特异结合微丝骨架主要成分-F肌动蛋白的Phalloidin对微丝骨架进行染色^[8],同时对EBP50进行免疫荧光细胞化学染色,进而采用光镜和激光扫描共聚焦显微镜观察细胞中F肌动蛋白的动态变化。分析转染EBP50重组质粒和空载体的HeLa细胞微丝骨架的含量及分布的异同,及PDGF刺激后两组细胞微丝骨架定位的变化,以探讨EBP50对细胞骨架的影响,阐明其影响肿瘤细胞生长迁移的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞系、质粒 菌株E.coli DH5 α 、细胞系HeLa、真核表达质粒pBK-CMV-HA由本实验室保存,重组表达质粒pBK-CMV-HA-EBP50wt为本实验室构建。

1.1.2 试剂 各种限制性内切酶购自Takara公司;DMEM培养基、小牛血清及青/链霉素购自Hyclone公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; β -actin抗体购自Sigma公司;HA抗体购自MBL公司;HRP标记的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司;ECL化学发光试剂盒购自Pierce Biotech公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒的构建 参照参考文献[1]。

1.2.2 细胞培养、稳定转染细胞系的建立 细胞培养参照参考文献[1]。用含浓度为350mg/L G418的筛选培养基筛选已转染重组质粒的HeLa细胞,3~4周后得到抗性细胞克隆。用含G418的维持培养基进行培养和传代。

1.2.3 Western Blot 参照参考文献[1]。

1.2.4 PDGF 刺激 将HA-EBP50-HeLa及HA-HeLa分别接种于内置盖玻片的35mm平皿中,各3孔,每孔细胞数约为 1.5×10^5 ,培养过夜。镜下观察细胞贴壁完全后更换无血清培养基饥饿24h,分别加入终浓度为0、10和20ng/ml的PDGF(Chemicon),37℃刺激15min后,取出细胞爬片,进行荧光染色。

1.2.5 细胞免疫荧光技术标记蛋白^[8] 利用罗丹明-鬼笔环肽荧光探针(Rhodamine-Phalloidin, Molecular Probes,美国)对微丝作直接荧光染色。具体步骤如下:1)PBS洗3次,4%中性多聚甲醛室温固定15min。2)PBS洗3次,0.1% TritonX-100处理细胞5min。3)PBS洗3次,滴加1U Rhodamine-Phalloidin(含10g/L的BSA),于湿盒中室温避光1h。4)PBS洗3次,95%甘油封片。

利用FITC标记的荧光二抗对EBP50进行间接免疫荧光染色。具体步骤基本同上,仅将步骤3改为加入1:100稀释的HA一抗,于湿盒中室温孵育1h,PBS洗3次,加入1:50稀释的FITC标记的荧光二抗,于湿盒中室温避光1h。

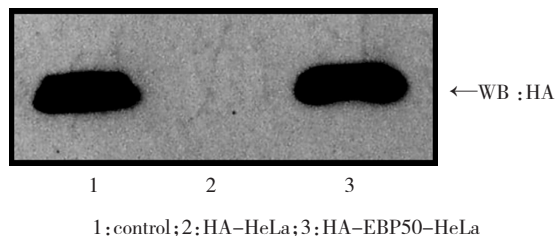
将染色后的细胞爬片置于激光扫描共聚焦显微镜(Leica Microsystem, LAS AF, TCS SP5, Leica,德国)下观察,油镜($\times 63$),激发光540nm,发射光565nm。

2 结果

2.1 稳定表达EBP50蛋白的HeLa细胞系的鉴定

分别收取 1×10^6 的HA-EBP50-HeLa与HA-HeLa制备样品,取10 μ l进行Western Blot实验,证

明获得稳定表达EBP50蛋白的HeLa细胞系(图1)。



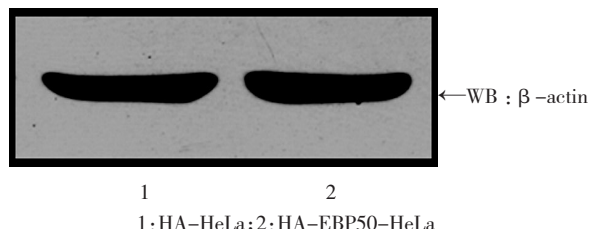
1: control; 2: HA-HeLa; 3: HA-EBP50-HeLa

图1 稳定表达EBP50的HeLa细胞系鉴定

Figure 1 Identification of the HeLa cell line stably expressing EBP50 protein

2.2 EBP50对HeLa细胞微丝骨架表达量的影响

操作过程同上, HA-EBP50-HeLa的F肌动蛋白的表达量与HA-HeLa相比无差别(图2)。



1: HA-HeLa; 2: HA-EBP50-HeLa

图2 EBP5对HeLa细胞微丝骨架表达量的影响

Figure 2 Effect of EBP50 on the expression of microfilament cytoskeleton

2.3 EBP50对HeLa细胞微丝骨架定位的影响

HA-EBP50-HeLa与HA-HeLa相比, 荧光强度无显著差别(与上述Western blot鉴定结果相同), 均广泛分布于胞浆中。但HA-HeLa中F肌动蛋白粗大疏松, 方向不一, 交错排列, 而HA-EBP50-HeLa中F肌动蛋白呈细丝状, 纤维平行, 规则排列, 粗细匀称。与HA-HeLa相比, 骨架变得致密并沿细胞极性分布(图3)。

2.4 PDGF刺激后EBP50对微丝骨架定位的影响

PDGF刺激后, 对照HA-HeLa的微丝骨架没有变化, 而HA-EBP50-HeLa细胞系的微丝骨架迁移至细胞膜处, 胞浆及胞核部位没有荧光, 呈“空洞”状, 细胞边缘清晰, 形态完整(图4)。10ng/ml和20ng/ml的PDGF对HeLa细胞骨架分布的影响无显著差别。

2.5 PDGF刺激后, EBP50与微丝骨架在膜上共定位

与对照组细胞系HA-HeLa相比, HA-EBP50-HeLa受PDGF刺激后, 微丝骨架的定位发生了明显变化, 我们推测这一变化是由于EBP50的介导而发生的。因此, 我们进一步检测了EBP50在细胞中定位的变化。结果显示, 在PDGF刺激后, EBP50在胞浆中减少, 在胞膜上却显著增加, 与微丝骨架在膜上共定位(图5)。也就是说, 影响细胞生

长迁移的细胞骨架的定位与EBP50在细胞中的分布密切相关, 据此认为EBP50对细胞生长迁移的影响是通过其对细胞骨架的调节来实现的。

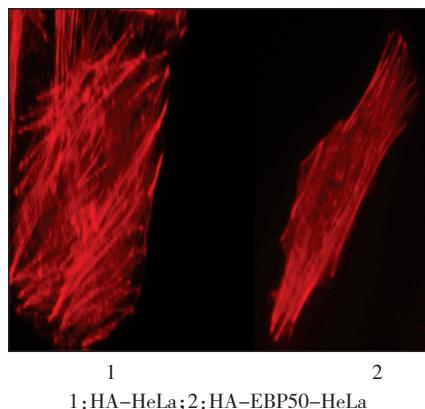


图3 EBP50对微丝骨架定位的影响 油镜×63

Figure 3 Effect of EBP50 on the localization of microfilament cytoskeleton (objective × 63)

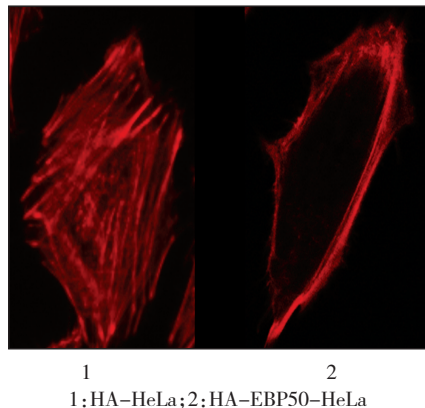


图4 PDGF刺激后EBP50对微丝骨架定位的影响 油镜×63

Figure 4 Effect of EBP50 on the localization of microfilament cytoskeleton in HeLa cells stimulated with PDGF (objective × 63)

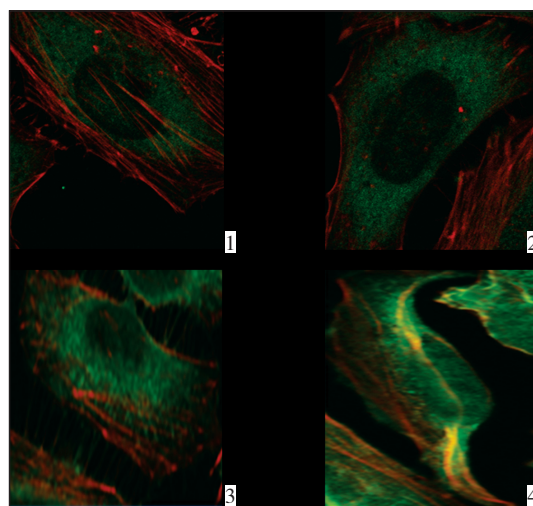


图5 PDGF刺激HeLa细胞后EBP50与微丝骨架的共定位

油镜×63
Figure 5 Colocalization of EBP50 with microfilament cytoskeleton in HeLa cells stimulated with PDGF (objective × 63)

3 讨论

细胞骨架是胞内的网络系统,是细胞运动、分裂和跨膜信息传递的结构基础,在细胞分化和运动时会发生重组^[4,6,7]。近年对细胞凋亡信号转导的研究发现:三种细胞骨架在细胞凋亡过程中变化非常活跃,它们在细胞内的状态直接影响凋亡信号的终点,表明细胞骨架可能是信号转导的空间调控者和功能性分子。细胞骨架的这些功能对肿瘤发生、发展非常重要。细胞骨架的成分之一微丝骨架是肌动蛋白(actin)以非共价键结合形成的纤维型多聚体F肌动蛋白。F肌动蛋白的聚合是细胞骨架重构的基本事件。微丝骨架在细胞分化和运动时会发生重组,而且它还可能起着介导胞外信号分子的作用^[4,6,7]。

EBP50能够通过其PDZ和ERM结合结构域与多种蛋白结合,调节多种信号通路,进而调控肿瘤细胞的生长迁移^[2~4]。为了进一步揭示EBP50与细胞骨架聚合的关系,本研究观察EBP50蛋白在细胞中的分布及与F肌动蛋白的关系。结果显示,EBP50使HeLa细胞微丝骨架变得致密并沿细胞极性分布;在PDGF作为诱导因素的情况下,即细胞在受PDGF刺激后,EBP50与细胞微丝骨架均趋于膜上表达,并共定位。EBP50能够与某些抑癌蛋白如PTEN(phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10)、MERLIN(neurofibromatosis type 2, Nf2抑癌基因产物)等相互作用,并使这些蛋白从胞浆迁移至膜上发挥其抑制生长信号通路的作用^[2,9,10],其机制可能是通过影响细胞微丝骨架的分布和定位,从而起到其影响肿瘤细胞生长迁移的作用。

(致谢:感谢本科室刘华、程杉老师对本文提出建议。感谢司杨和冯桂芬实验员的准备工作。)

参考文献

- 1 Pan Y, Wang L, Dai JL. Suppression of breast cancer cell growth by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) [J]. Breast

Cancer Res, 2006, 8 (6): R63.

- 2 Takahashi Y, Morales FC, Kreimann EL, et al. PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling[J]. EMBOJ, 2006, 25(4): 910-920.
- 3 Shibata T, Chuma M, Kokubu A, et al. EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2003, 38 (1): 178-186.
- 4 Theisen CS, Wahl JK 3rd, Johnson KR, et al. NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(4): 1220-1232.
- 5 Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, et al. Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16 (7): 3117-3127.
- 6 Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling[J]. Physiol Rev, 1998, 78 (3): 763-781.
- 7 Wheeler D, Sneddon WB, Wang B, et al. NHERF-1 and the cytoskeleton regulate the traffic and membrane dynamics of G protein-coupled receptors[J]. J Biol Chem, 2007, 282(34): 25076-25087.
- 8 Huang ZJ, Haugland RP, You WM, et al. Phalloxin and actin binding assay by fluorescence enhancement[J]. Anal Biochem, 1992, 200(1): 199-204.
- 9 Cole BK, Curto M, Chan AW, et al. Localization to the cortical cytoskeleton is necessary for Nf2/merlin-dependent epidermal growth factor receptor silencing[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(4): 1274-1284.
- 10 Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, et al. NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H⁺ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins[J]. J Biol Chem, 1998, 273(3): 1273-1276.

(2008-03-31收稿)

(2008-08-01修回)

(邢颖校对)

书 讯

由方志沂教授主编,中国抗癌协会乳腺癌专业委员会组织全国著名乳腺癌防治专家参加编撰的国家“十一五”重点图书,中国肿瘤医师临床实践指南丛书之一《乳腺癌》已于2007年7月由北京大学医学出版社出版。该书兼顾乳腺癌领域最新研究成果的介绍和临床规范化实用技术的阐述,主要内容涉及预防、流行病学、临床检验等基本知识,同时避免类似书籍中基础内容过多的重复,对乳腺癌诊断、治疗中的新技术、新成果,结合国内外的经验,尤其对较成熟或较有发展前景的研究均有重点介绍。内容详实,图文并茂,即兼顾前沿且重点突出此为本书的特点,可作乳腺肿瘤专业医师、普外工作者及其相关基础研究人员的一本有价值的参考书籍和教材。

每册定价59元,全国新华书店均有售。