

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 028

Pin1 的细胞定位调控 Rb 蛋白的磷酸化状态

刘瑞红¹, 谢刚², 肖智雄¹, 童英¹

(1. 四川大学生命科学学院生长代谢与衰老研究中心/生物资源和生态环境教育部重点实验室, 成都 610064

2. 四川省中西医结合医院, 成都 610041)

摘要: 为了研究 Pin1 和 Rb 蛋白的细胞定位、Pin1 调控 Rb 磷酸化的相关机制,本研究构建了慢病毒载体 pLVX-Flag-HA-Pin1 和 Plko. 1-shRNA, 包装病毒感染人非小细胞肺癌 (H1299), 免疫印迹检测 Pin1 蛋白表达水平, 采用免疫荧光染色、免疫组化技术研究蛋白的定位。结果表明, 沉默 Pin1 可降低 Rb 的磷酸化并抑制细胞的增殖; 培养的肿瘤细胞和肿瘤组织中, Pin1 可定位到细胞质中, 而胞质定位的 Pin1 也可增加 Rb 的磷酸化。

关键词: Pin1; 视网膜母细胞; 瘤蛋白; 细胞定位; 磷酸化

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0419-05

Cellular localization of Pin1 regulates the phosphorylation status of Rb

LIU Rui-Hong¹, XIE Gang², XIAO Zhi-Xiong¹, TONG Ying¹

(1. Center of Growth, Metabolism and Aging, Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610064, China.

2. Sichuan Integrative Medicine Hospital, Chengdu 610041, China)

Abstract: In order to study the intracellular localization of Pin1 and Rb protein and the mechanisms of Pin1 regulated Rb phosphorylation, lentivirus vector pLVX-Flag-HA-Pin1 and Plko. 1-shRNA were constructed. After lentiviral packaging and infection, Pin1 protein level were detected by western blot in human non-small cell lung carcinoma cell(H1299). Pin1 and Rb protein localization were studied by immunofluorescence staining and immunohistochemistry. The data demonstrated that knockdown of Pin1 result in a decrease of Rb phosphorylation and cellular viability. Pin1 can localize to cytoplasm in cultured tumor cells and tumor tissues, while cytoplasmic Pin1 can increase the phosphorylation of Rb. This is a novel mechanism for Pin1 in regulating Rb function.

Key words: Pin1; Retinoblastoma protein; cellular localization; phosphorylation

1 引言

视网膜母细胞瘤基因 RB1 是第一个被成功克隆的肿瘤抑制基因, 其产物视网膜母细胞瘤蛋白 Rb 在细胞周期调控、细胞增殖、分化和衰老、以及 DNA 损伤反应等方面发挥了重要的作用。Rb 调控细胞增殖的主要途径是通过结合下游转录因子

E2F, 抑制其转录活性, 进而调控细胞周期相关蛋白的表达^[1]。蛋白磷酸化是调节 Rb 蛋白功能的重要方式。低磷酸化的 Rb 能够与细胞蛋白如 E2F 结合, 但经 Cyclin/CDK 磷酸化的 Rb 将失去活性^[2]。Rb 的过磷酸化是人类肿瘤发生发展的一条重要途径。

Pin1 是一类高度保守的磷酸化肽基脯氨酰顺

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 国家自然科学基金(31171362)

作者简介: 刘瑞红(1987-), 女, 甘肃天水人, 硕士, 主要研究方向为医学分子生物学, E-mail: crane728@163.com

通讯作者: 童英. E-mail: tongying@scu.edu.cn

反异构酶,可特异识别磷酸化的丝氨酸或磷酸化的苏氨酸-脯氨酸序列(pSer/pThr-Pro),催化底物蛋白的构象改变,从而影响底物蛋白的稳定性、细胞定位和生物学功能^[3,4]. 已知的 Pin1 底物有多种,如周期蛋白 CyclinD1、癌蛋白 c-Myc、以及抑癌因子 p53 和 p73 等^[4]. 在不同的细胞和不同的处理条件下,Pin1 可结合不同的底物蛋白,进而调控细胞周期的进程、影响细胞的生长和增殖^[5].

最近的研究结果表明,Pin1 可调控 Rb 蛋白的功能^[6]. 我们采用分子与细胞生物学的方法,构建了慢病毒表达载体,发现在 H1299 细胞中过表达 Pin1 可以增加 Rb 蛋白的磷酸化水平;采用 Pin1 shRNA 沉默 Pin1 的表达,则低磷酸化 Rb 蛋白增加,细胞增值受到抑制. 乳腺癌组织病理切片染色表明,肿瘤细胞中,异常增多的 Pin1,除定位在细胞核外,大量分布于细胞质中. 我们还发现,胞质定位的 Pin1 可增加 Rb 的磷酸化,说明 Pin1 的细胞定位有可能影响肿瘤的发生发展,这是 Pin1 调控 Rb 功能的一个崭新的方式.

2 材料与方法

2.1 材料

pLVX-HA-Flag、pLKO.1 慢病毒表达载体以及用于病毒包装的载体 PMD2. G、psPXA2 均由本实验室保存. 293T、H1299 和 MCF10A 细胞均为本实验室保存. DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司. 脂质体 Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司. 胞质与核蛋白分离试剂盒(78833)购自 Pierce. Western 显色试剂购自 BD Biosciences. 免疫组化显色试剂 ABC Elite kit 购自 Vector Laboratories. Pin1 (H-123) (sc-15340)、cyclinA(H-432)、cyclin E (C-19)抗体购自 Santa Cruz Biotechnology;PP2A 鼠多抗(P67775)购自成都正能生物技术;羊抗兔 Actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗鼠、兔抗羊 IgG 购自 Santa cruz Biotechnology;Rb (G3-245, 554136) 购自 BD Biosciences;Anti-Mouse IgG-TRITC (T2402) 购自 Sigma;其他试剂购自成都奥克生物.

2.2 方法

2.2.1 慢病毒载体的包装和感染 选择生长状态良好的 293T 细胞培养至密度达 50% 左右时,换为不含抗生素和血清的 DMEM 培养基,按照 Lipofectamin2000 说明书的方法进行质粒与包装质粒(pMD2. G 和 psPXA2)的共转染. 60h 后收集病

毒上清,低速离心 10 min,过滤后-80℃贮存. 感染时,H1299 细胞培养至 30% 密度时,加入 1mL 慢病毒颗粒,再加入 1mL 完全培养基和 Polybrene (8μg/mL),置 37℃ 培养,12h 后更换培养液继续培养.

2.2.2 Western blot 检测 收集细胞,离心后加入裂解液作匀浆及涡旋振荡处理,样品经 6% 或者 10% 的 SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜上,4% 脱脂奶粉封闭 1h 后,加入一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1h,最后经 ECL 显影成像^[6].

2.2.3 免疫荧光染色 将细胞培养在玻片上,24h 后用 4% 多聚甲醛室温固定 15min,加入 0.3% TritonX-100 通透 15min,1% BSA 牛血清白蛋白室温封闭 15min,一抗 4℃ 孵育过夜,然后用荧光标记的二抗,避光室温孵育 1.5h. 细胞核用 DAPI 染色 3min,然后加入抗淬灭溶液,加盖玻片封片保存.

2.2.4 组织切片的免疫组化染色 人乳腺癌组织切片购自四川大学华西医院. 免疫染色时,切片经二甲苯脱蜡、复水,然后用 1% 过氧化氢/10% 甲醇室温预处理 15min,以猝灭内源性过氧化物酶活性. 切片用 2% 牛血清白蛋白室温封闭 1h,与一抗 4℃ 孵育过夜. 充分洗涤后,用生物素标记的二抗孵育过夜. 按照说明书用 ABC Elite kit 进行显色,苏木精和伊红复染.

2.2.5 细胞活力检测 用 MTS 法检测细胞活力. 细胞接种到 96 孔板中,避光加入 10μL MTS 溶液,继续培养 3h,然后在酶标仪上测定 490 nm 吸光值,根据每天的数值绘制细胞生长曲线.

3 结果与分析

3.1 Rb 蛋白在各种细胞中的表达

Rb 作为一种重要的抑癌蛋白主要定位于细胞核(图 1A). 在培养细胞中可检测到两种状态的 Rb 蛋白:低磷酸化和高磷酸化的 Rb. SDS-PAGE 电泳时,不同程度磷酸化的 Rb 呈现从 105 到 115kD 之间不同大小的条带. 磷酸化 Rb(Hyper-Rb)较低磷酸化 Rb(Hypo-Rb)迁移速度慢(图 1B). 在肿瘤细胞中,例如非小细胞肺癌 H1299、骨肉瘤 U2-OS、人咽鳞状癌细胞系 FaDu 细胞中,Rb 多以高磷酸化形式存在,并失去了抑制细胞增殖的活性,而在正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中则多以具有活性的低磷酸化形式存在.

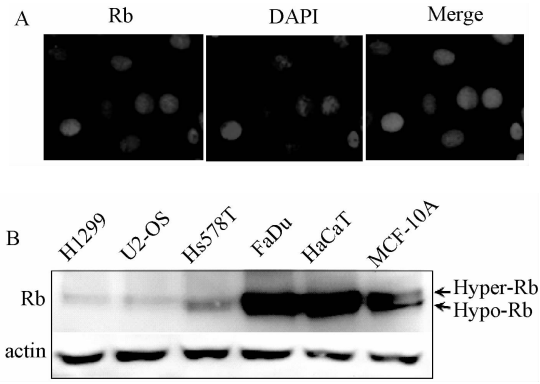


图 1 Rb 蛋白在不同细胞中的表达

A. 免疫荧光染色标记 H1299 细胞中的 Rb 蛋白, DAPI 标记细胞核; B. 细胞中 Rb 蛋白的免疫印迹分析

Fig. 1 Expression of Rb in different cell lines

A. Immunofluorescent analysis of Rb in cultured H1299 cells using anti-Rb monoclonal antibody with DAPI counterstaining for nuclear DNA; B. Western blot analysis of the expression level of Rb in lysates extracted from the indicated tissue culture cells.

3.2 沉默 Pin1 蛋白的表达可抑制肿瘤细胞的增殖

我们选取非小细胞肺癌 H1299 细胞, 过表达融合蛋白 Flag-HA-Pin1 和 Pin1 突变体 Flag-HA-Pin1(W34A), 筛选得到稳定细胞系. 免疫印迹实验表明, 在 H1299 细胞中, Pin1 的过表达, 不影响细胞中 Rb 的总量, 但可促进磷酸化 Rb 水平的上调(图 2A, 中间泳道). 第 34 位的突变(丙氨酸突变为色氨酸), 降低了 Pin1 与底物的结合能力, 因此, Pin1 的 W34A 突变体不能增加 Rb 的磷酸化(图 2A, 右侧泳道). 相反的, 当用 shRNA 沉默 Pin1 表达时, 细胞内磷酸化 Rb 蛋白的量降低而低磷酸化 Rb 蛋白的量增加(图 2B, 右侧泳道). MTT 检测的结果表明细胞的活力降低、生长速度变慢(图 2D). 在 MCF7 细胞中, 当 Pin1 表达被沉默时, 细胞存活率也明显降低(图 2C), 以上结果表明, 抑制 Pin1 可上调低磷酸化 Rb 的蛋白量, 进而抑制细胞的增殖.

3.3 胞质定位的 Pin1 可增加 Rb 的磷酸化

文献报道 Pin1 是一种核蛋白, 在正常组织和细胞中主要定位在细胞核内. 我们采用免疫荧光染色技术, 发现在 MCF-10A 细胞中 Pin1 蛋白不仅定位于细胞核, 在胞质中也存在(图 3A). 免疫组化染色结果也显示, 在 26 例乳腺癌样本中, 13 例表现出胞质着色, 占 50%, 这表明乳腺癌样本中 Pin1 定位到胞质是一个比较普遍的情况(图 3B).

因此, 我们构建了定位到核内的 Pin1 载体 NLS-Pin1. 免疫印迹表明, 核定位信号的加入, 使外源表达的 Pin1 从主要定位到细胞质转移到了核内(图 3C). 与此同时, Rb 的磷酸化程度也发生了改变. 相对于空载体来说, 核定位的 NLS-Pin1 增加了 Rb 蛋白的磷酸化, 但其诱导的 Rb 磷酸化却比非核定位的 Pin1 降低(图 3D), 表明胞质定位的 Pin1 也具有诱导 Rb 磷酸化的作用.

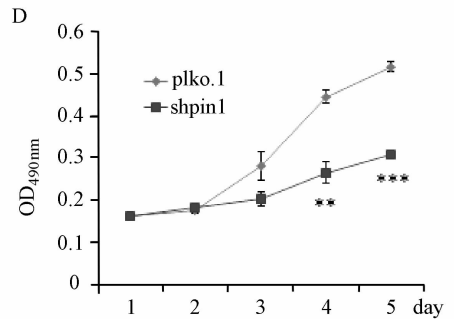
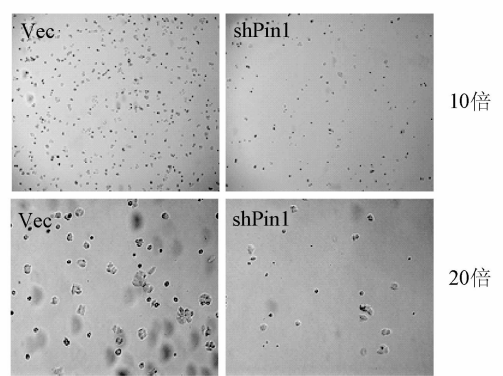
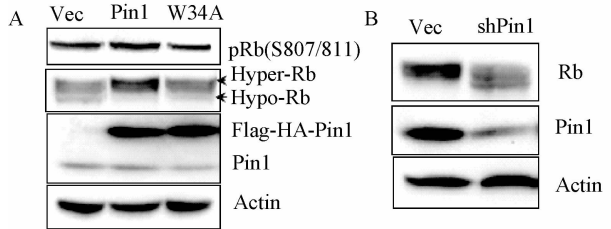


图 2 沉默 Pin1 表达可抑制肿瘤细胞的增殖

A. 稳定表达 Pin1 或 Pin1 突变体 W34A 的 H1299 细胞内 Rb 的磷酸化状态; B. 免疫印迹检测表达 shPin1 的 H1299 细胞中 Rb 蛋白; C. 敲除 Pin1 的 MCF7 细胞, 计算细胞存活率. D. 敲除 Pin1 基因的 H1299 细胞生长曲线 ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Fig. 2 Knockdown of Pin1 inhibits the proliferation of tumor cells

A. Stable H1299 cells overexpressing Pin1, Pin1 mutant W34A or empty vector were subjected for Western blots using antibodies for Rb, phospho-Rb and Pin1. B. H1299 cells expressing shPin1 or vector were subjected for Western blot analysis. C. Knockdown Pin1 in MCF7 cells, cell number were counted. D. Growth curve of H1299-shPin1 cells. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

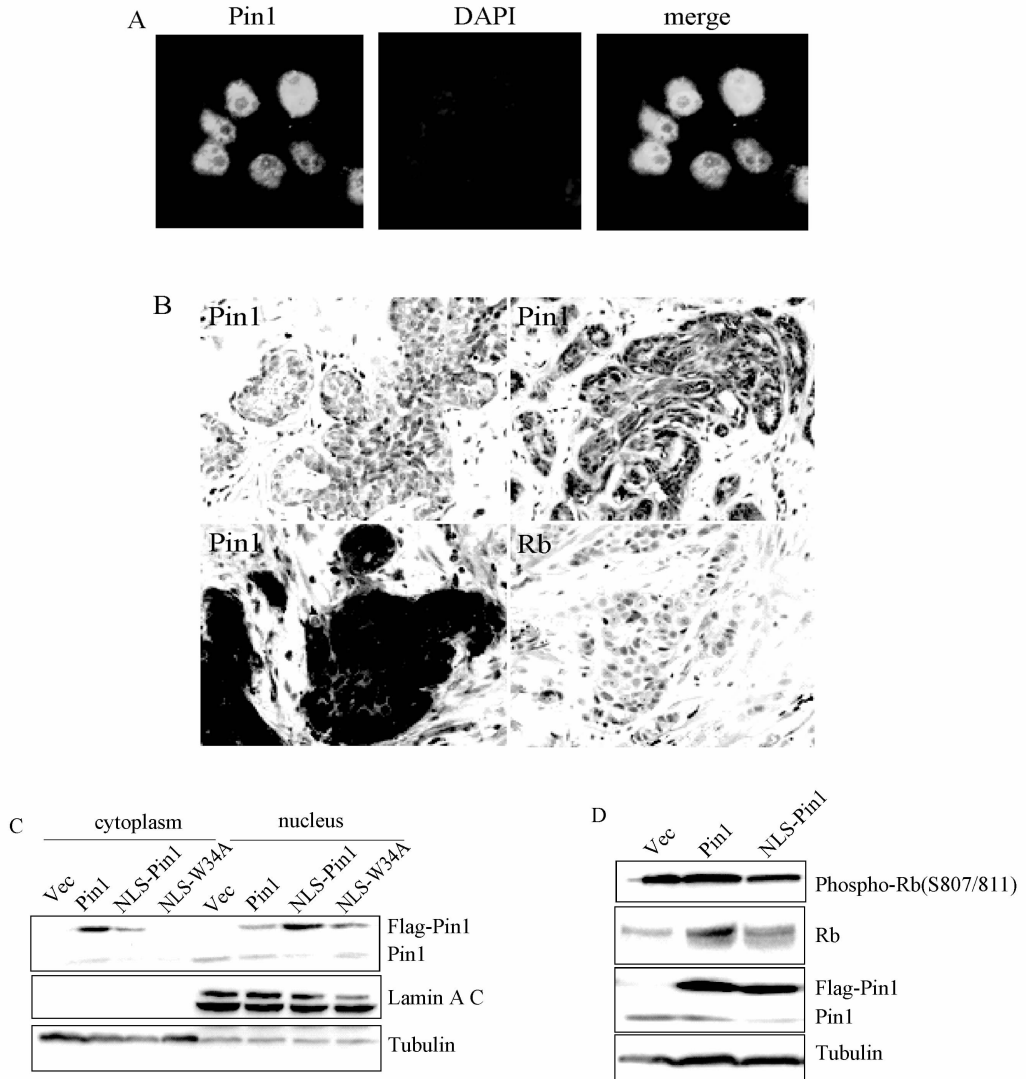


图 3 胞质定位的 Pin1 可增加 Rb 的磷酸化

A. 免疫荧光染色标记 H1299 细胞中的 Pin1 蛋白并用 DAPI 标记细胞核; B. Pin1 和 Rb 蛋白在乳腺癌组织中的表达情况; C. 分别表达 Pin1、NLS-Pin1、NLS-Pin1(W34A) 和空载的 H1299 细胞, 蛋白表达情况; D. 稳定表达 Pin1 或 NLS-Pin1 的 H1299 细胞, Western 检测 Rb 的磷酸化水平

Fig. 3 Cytoplasmic localized of Pin1 could increase the phosphorylation of Rb

Immunofluorescence staining using the Pin1 antibody. DAPI counterstaining for cellular DNA. B. Expression of Pin1 and Rb in breast cancer tissues. C. Western blot analysis of the H1299 cells expressing Pin1, NLS-Pin1, NLS-Pin1(W34A) or vector control; D. Stable H1299 cells overexpressing Pin1, NLS-Pin1 or vector control were subjected for Western blot analysis.

4 讨论

Rb 是一种重要的抑癌因子, Pin1 作为新发现的 Rb 的调控因子^[7], 其调节 Rb 蛋白活性的分子机制, 目前还不清楚。

Pin1 是一种分子量只有 18 kD 的小分子酶类, 没有核定位信号, 在细胞内的定位主要由结合的底物来引导. 文献报道, Pin1 主要定位于细胞核^[8]. Rb 蛋白也主要定位到细胞核; 当它被细胞周期蛋白激酶(CDKs)、Chk1/2 蛋白、p38 MAP 激酶、Abl 催化发生磷酸化失活时, 则被运输

出核^[9,10].

我们的结果表明, 在肺癌细胞 H1299 中, Pin1 不仅定位于细胞核, 也定位于细胞质. 在乳腺癌组织中, 也存在 Pin1 定位到胞质的现象. 更为重要的是, 胞质定位的 Pin1 可增加 Rb 的磷酸化水平, 进而抑制 Rb 的活性. 胞质定位的 Pin1 有可能直接结合并稳定胞质内的磷酸化 Rb, 使 Rb 保持磷酸化的非活性状态, 进而促进细胞的增殖. 这是 Pin1 调控 Rb 功能的一个崭新的方式, 表明可利用 Pin1-Rb 途径为治疗肿瘤寻求一种新的方法。

参考文献:

- [1] Stevaux O, Dyson N J. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(6):684.
- [2] Toko H, Hariharan N, Konstandin M H, *et al.* Differential regulation of cellular senescence and differentiation by prolyl isomerase Pin1 in cardiac progenitor cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(9):5348.
- [3] Lu K P, Zhou X Z. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:904.
- [4] Lu Z, Hunter T. Prolyl isomerase Pin1 in cancer [J]. *Cell Res*, 2014, 24(9):1033.
- [5] Zheng H, You H, Zhou X Z, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response[J]. *Nature*, 2002, 419(6909):849.
- [6] Lufei C, Cao X. Nuclear import of Pin1 is mediated by a novel sequence in the PPIase domain[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583:271.
- [6] Rizzolio F, Lucchetti C, Caligiuri I, *et al.* Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1[J]. *Cell Death and Differ*, 2012, 19(7):1152.
- [7] Rizzolio F. Dissecting Pin1 and phospho-pRb regulation [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228:73.
- [8] Wuif G M, Ryo A, Wuif G G, *et al.* Pin1 is overexpressed in breast cancer and potentiates the transcriptional activity of phosphorylated c-Jun towards the cyclin D1 gene [J]. *EMBOJ*, 2001, 20(13):3459.
- [9] Wikenheiser-Brokamp KA. Retinoblastoma regulatory pathway in lung cancer[J]. *Curr Mol*, 2006, 6:783.
- [10] James M D, Frederick A D. Posttranslational Modifications of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein as Determinants of Function [J]. *Genes Cancer*, 2013, 3(12):619.