

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.04.030

# T 细胞蛋白 p80 调控 c-Myc 表达的机理

王 巧, 蒋贤杰, 张渝君

(四川大学生命科学学院 生长代谢与衰老研究中心, 成都 610065)

**摘 要:** 为了解 p80 在正常 T 细胞以及 T 细胞癌变过程中的作用, 在缺失 p80 的 T 淋巴瘤细胞中重新表达 p80, 其结果显示: 原癌基因 c-Myc 的表达受到显著抑制, 且细胞周期在 G1 期出现了停滞. 定量 PCR 的结果表明: p80 对 c-Myc 表达的抑制是转录水平的抑制. 双荧光素酶报告基因试验表明: p80 对 c-Myc 的抑制作用定位于 c-Myc 启动子上相对于转录起始位点的 -1042bp~-630bp 区域. 运用 TFSEARCH 软件对这一区域的分析发现存在多个 c-Myb 结合位点. 在稳定表达 p80 的 T 淋巴瘤细胞中敲低 c-Myb, 表明 p80 对 c-Myc 的转录抑制是通过 c-Myb 来实现的. 免疫共沉淀实验表明 p80 和 c-Myb 在细胞中存在相互作用. 进一步的研究显示 p80 对 c-Myc 的转录抑制依赖于组蛋白去乙酰化酶的活性. 研究结果表明 p80 有可能通过与 c-Myb 的相互作用将组蛋白去乙酰化酶募集至 c-Myc 启动子区域, 并通过组蛋白的去乙酰化抑制 c-Myc 的表达.

**关键词:** 白介素 16 前体蛋白; 组蛋白去乙酰化酶; 细胞周期; T 细胞淋巴瘤

**中图分类号:** Q291      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2019)04-0771-08

## The mechanism of c-Myc expression regulated by T cell protein p80

WANG Qiao, JIANG Xian-Jie, ZHANG Yu-Jun

(Center for Growth, Metabolism and Aging, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Our experimental data indicate that overexpression of p80 in p80 null T cell leukemia cells significantly down-regulates c-Myc oncoprotein and blocks cell cycle progression from G1 to S phase. The qPCR examination and protein stability test found that p80 regulates expression of c-Myc at the transcriptional level. The analysis of c-Myc promoter activity at the presence of p80 by Dual-Luciferase Reporter Assay indicated that the transcriptional repression of p80 on c-Myc promoter is located at -1042bp~-630bp above the transcription start site of c-Myc gene. The transcription factor binding sites search of this region by software TFSEARCH revealed multiple binding sequences of c-Myb, another oncoprotein and transcription factor which plays an important role in the proliferation and differentiation of blood cells during hematopoiesis. Knockdown c-Myb in MOLT-4 cells stably expressing p80 indicate that p80 suppresses the transcription of c-Myc gene through c-Myb. Co-immunoprecipitation experiment demonstrated that p80 interacts with c-Myb inside cells. The further experiment has shown that transcriptional repression of c-Myc by p80 is dependent on the enzymatic activity of histone deacetylase. Taken together, our results suggest that p80 recruits histone deacetylase to the c-Myc promoter through interaction with transcription factor c-Myb, and p80 suppresses c-Myc expression by histone

收稿日期: 2018-07-28

基金项目: 国家自然科学基金(31170729)

作者简介: 王巧(1991-), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生, 主要研究领域为基因的分子生物学. E-mail: 824583698@qq.com

通讯作者: 张渝君. E-mail: yzhang2010@scu.edu.cn

deacetylation.

**Keywords:** p80; HDAC; Cell cycle; T cell lymphoma

## 1 引言

蛋白 pro-IL-16 是细胞因子 IL-16 的前体蛋白,在 1997 年被发现并克隆出来<sup>[1]</sup>. 由于 pro-IL-16 在 SDS 凝胶电泳中迁移到约 80 kD 处,故又被称作 p80. 该基因定位于人的 15 号染色体上接近端粒的部位(Ch15q26.3),在人的 T 细胞淋巴瘤细胞中这一部位常有断裂现象发生. 人 p80 蛋白分子由 631 个氨基酸组成,经过 caspase3 剪切后,由其 C 末端 121 个氨基酸残基形成成熟的、具有生物活性的 IL-16 并被分泌到胞外<sup>[2]</sup>,作为促炎症细胞因子参与炎症反应. p80 由五个独立的结构域所组成,包括位于 C 末端的三个 PDZ 结构域、一个 N 末端的 CcN 结构域和中间的一个 SH3 结合位点<sup>[2]</sup>. 研究认为,p80 N 端的 CcN 结构域具有核定位的功能<sup>[2]</sup>. p80 不含有可识别的 DNA 结合序列,也无酶功能的相关序列,其三个广为人知的蛋白与蛋白之间相互作用的 PDZ 结构域表明它的功能为衔接蛋白. 已知 p80 大量存在于静止期的 T 淋巴细胞中<sup>[3,4]</sup>;当 T 细胞被激活,细胞中 p80 的含量则几乎消失<sup>[5,6]</sup>. 后续研究发现,p80 与 T 淋巴细胞的增殖与生长密切相关<sup>[7,8]</sup>,它能够通过募集组蛋白去乙酰化酶 3 到基因 *skp2* 的启动子上,并与转录因子 GABP $\beta$ 1 相互作用来抑制 *skp2*,上调 p27 从而调控细胞周期<sup>[9]</sup>.

原癌基因 *c-Myc* 在转录和翻译水平的表达调控均与细胞周期密切相关. *c-Myc* 广泛参与了细胞增殖、细胞分化以及细胞程序性死亡<sup>[10,11]</sup>,它在 20% 的人类癌症中均处于被激活的状态<sup>[12]</sup>,比如在 70% 的结肠癌、80% 的乳腺癌以及 60% 的干细胞类癌症中,原癌基因 *c-Myc* 都是异常高表达的. 在 T 细胞淋巴瘤中,*c-Myc* 也处于高表达的状态,但影响其高表达的分子机制还不是非常清楚. *c-Myb* 则是一个细胞周期调控相关的核转录因子,对细胞的增殖与生长起着重要的作用. 在绝大多数人白血病和急性淋巴细胞白血病中,MYB 的 mRNA 含量是非常高的<sup>[13]</sup>. 全基因组测序研究表明,大多数细胞周期相关基因的启动子序列上都有一些保守的核苷酸区域,其中就含有 *c-Myb* 结合位点<sup>[14,15]</sup>,另有研究报道在原癌基因 *c-Myc* 的启动子上存在着多个 *c-Myb* 结合位点<sup>[16,17]</sup>.

在本课题研究发现 *c-Myc* 是 p80 在 T 细胞内作用的又一靶分子,p80 的缺失将导致 *c-Myc* 在 T 细胞中的异常表达,从而成为 T 细胞癌变转化的诱因之一. 本研究表明 p80 或许可作为 T 细胞淋巴瘤发生发展的一个标志性诊断分子,也有可能作为 T 细胞淋巴瘤治疗的一个靶点. 因此,深入了解 p80 对 T 细胞淋巴瘤细胞增殖的抑制机理或许可提供更多的对 T 细胞淋巴瘤的诊断和治疗方法.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2.1.1 细胞、菌种及质粒 人正常肾表皮细胞系 HEK-293T、人 T 淋巴瘤细胞株 MOLT-4-GFP 和稳定表达 p80 的人 T 淋巴瘤细胞株 MOLT-4-GFP-p80(由本实验室保存);大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$ ;表达质粒 pLVX-Puro-*c-Myc*、Flag-PXM-p80、慢病毒包装质粒 PsPAX2 和 PMD2G(均为本实验室保存);人 *c-Myc* 基因启动子的双荧光报告基因质粒 HPRM14159-PG04(含转录起始位点前 1042bp 以及转录起始位点后 240bp)购自 GeneCopoeia;质粒 EX02-Myb 购自上海毅乐生物.

2.1.2 主要试剂 PVDF 膜和 ECL 显影液(Millipore 公司)、蛋白预染 Marker(Fermentas 公司)、脂质体 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen 公司)、RPMI 1640 培养基(Gibco)、DMEM 培养基及血清/胰酶/青霉素/链霉素(Hyclone)、二甲亚砜 DMSO/放线菌酮 CHX(Sigma)、蛋白浓度分析工作液(Bio-Rad)、限制性内切酶(NEB)、质粒中量和小量提取纯化试剂盒(Invitrogen)、双荧光素酶报告基因试剂盒(广州易锦生物)、总 RNA 提取试剂盒(QIAGEN)、RNA 反转录试剂盒(Promega)、QPCR 试剂盒(Bio-Rad)、质粒测序(成都擎科生物)等.

2.1.3 主要抗体 p80 抗体(自制鼠多抗,1:50)、人 *c-Myc* 兔多抗(Epitomics catalog # 1472-1,1:1000)、人 *c-Myb* 兔多抗(Cell Signaling Technology catalog # 12319,1:1000)、人 *skp2* 兔多抗(Epitomics catalog # 3729-1,1:1000)、人 p27 兔多抗(Santa Cruz Biotechnology: sc-528,1:500)、人 Flag 鼠多抗(Sigma F-1084,1:1000)、人 GAPDH 兔单抗(Epito-

mics catalog # 5632-1, 1 : 2000)、人 HDAC3 兔多抗 (Santa Cruz sc-11417 # E1905, 1 : 300)、-goat anti-mouse IgG-HRP (cat. # sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 3000)、-goat anti-rabbit IgG-HRP (cat. # sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 3000)。

## 2.2 方法

2.2.1 细胞培养及瞬时转染 首先参照质粒中量提取纯化试剂盒说明书进行质粒的制备和纯化<sup>[18]</sup>,以便后续试验的进行。将 HEK-293T 细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,置于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>且箱底有无菌去离子水的恒温培养箱中培养。所有细胞操作均在生物安全柜内进行。转染前按一定的比例接种细胞于六孔细胞培养板或 10 cm 的细胞培养板中,待 2 d 细胞贴壁并长至 70%~80%时,使用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 按照转染试剂说明书将质粒瞬转<sup>[19]</sup>至 HEK-293T 内。

2.2.2 流式细胞术 消化并收集细胞,PBS 洗涤两次,离心去 PBS,加入预冷 70%乙醇固定细胞,4 °C 2h,离心弃去固定液后 PBS 重悬,离心弃去 PBS,加入 500 μL 含浓度为 50 μg/mL PI 和 100 μg/mL RNase A 的 PBS,37 °C 避光染色 40 min,流式细胞仪检测并分析结果。

2.2.3 双荧光报告基因实验 将 Flag-PXM-p80 和含 c-Myc 启动子的双荧光报告基因质粒(c-Myc promoter 控制一种新型的分泌性荧光素酶(Gaussia luciferase)的表达,使荧光素酶的检测无需裂解细胞,直接取细胞培养的上清即可。该质粒同时含有 CMV 启动子控制的分泌型碱性磷酸酶的表达序列)共同瞬转入 293T 细胞,24 h 后更换新鲜培养基,48 h 收集培养基,3000 r/min 离心 5 min 除去细胞碎片(若不现用可保存在 -20 °C,一个月之内使用即可)。根据双荧光报告基因实验说明书对应加入酶与 buffer,并使用酶标仪进行测定。

2.2.4 荧光定量 PCR 采用总 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA,后用反转录试剂盒将 RNA 样品逆转录为 cDNA。根据逆转录 10 μL 体系(RNA, 1mM Primer F, 1mM PrimerR 各 1 μL; Q-PCR mix 5 μL; dd H<sub>2</sub>O 2 μL)进行荧光定量 PCR。

2.2.5 Western Blot 蛋白样品进行 10% SDS PAGE 变性电泳(90~150V)后,于 100 V、1.5 h 条件下电转至 PVDF 膜上,后室温于水平振荡器上用封闭液(5%的脱脂牛奶溶于 1×TBST 溶液)封闭 1 h。后 1×TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。随后将

膜转入一抗(BSA 按适当比例配制)中,放于 4 °C 摇床过夜。取出 PVDF 膜后用 1×TBST 洗 3 次,每次 10 min。再将膜放入到对应的二抗中,常温振荡孵育 1 h。再用 1×TBST 洗 3 次,每次 10 min,最后在凝胶成像仪中进行 ECL 曝光显影(GAPDH 作为内参验证目标蛋白的含量)。

2.2.6 免疫共沉淀 利用细胞刮将细胞从细胞密度为 80%汇合度的培养盘中刮下来,1500 r/min,离心 5 min。倒掉废液,用事先预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞,并转移至超速离心 EP 管中。1500 r/min,4 °C 离心 5 min。弃 PBS 后,加入 IP lysis buffer (1 mL 0.25% NP40、10 μL PI、10 μL PMSF、10 μL NaF、10 μL Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>),加入体积按 360 μL/100mm 平板来计算。轻轻重悬细胞,再冰上静置 30 min,每 10 min 用枪轻轻混匀吹打。真空离心机中 4 °C, 10000 g 离心 1 h。上清液转移至已灭菌 1.5 mL EP 管中,放置于冰上。测上清液测蛋白浓度后将浓度调平。通常取出 50 μL 作为 Input,并加入对应体积的 5× SDS。混匀并 100 °C 蛋白变性 10 min, -80 °C 保存。

若使用 Protein A/G beads 用于实验,则后续步骤为:依据抗体说明书,将剩下的对应体积的上清液与一抗按一定比例混合。混匀后用封紧 EP 管,放入垂直混匀器中 4 °C 摇 6 h。取出 4 °C 保存的 Protein A/G beads,加入 500 μL wash buffer (1 mL 0.1% NP40、10 μL PI、10 μL PMSF、10 μL NaF、10 μL Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)洗三遍,500 g, 1 min。弃上清并将混合了 6 h 的蛋白上清与一抗的混合液加入到洗好的 Protein A/G beads 中,轻轻颠倒混匀后封口膜封紧,后于垂直混匀器中 4 °C 摇 2 h。500 g, 离心 1 min 弃大部分上清,留 30~50 μL。再加入等体积 2× SDS, 100 °C 蛋白变性 10 min, 放于 -80 °C 保存。

若使用 Flag 偶联的 beads 用于实验,则实验步骤为:取出 4 °C 保存的 Flag 偶联的 beads,加入 500 μL wash buffer 洗三遍,500 g, 1 min 弃上清。将剩余的蛋白上清液与 Flag beads 混合,轻轻颠倒混匀后封紧,垂直混匀器中 4 °C 摇 8 h。500 g, 离心 1 min。弃大部分上清,留 30~50 μL 上清。再加入等体积 2× SDS, 100 °C 蛋白变性 10 min, 放于 -80 °C 保存(注:整个实验需要混匀的过程,都不能使用涡旋仪)。制备的 Input 和 IP 蛋白样品用于免疫印迹验证蛋白与蛋白是否相互作用,操作方法同 2.2.5。

### 3 结果

#### 3.1 原癌蛋白 c-Myc 是 p80 抑制 T 细胞淋巴瘤细胞生长的关键分子

为了研究 p80 抑制 T 细胞淋巴瘤细胞生长的分子机理,本实验着眼于 p80 对与 T 细胞淋巴瘤发生发展密切相关的原癌蛋白的影响,在 p80 缺失的 MOLT-4 和 Jurkat 细胞中过表达 p80,发现 p80 显著抑制了原癌蛋白 c-Myc 的表达,并伴随着 E3 泛素连接酶 Skp2 的下调,以及 p27 蛋白在细胞中的富集(图 1A,泳道 2);生物学效应表现为细胞周

期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 的停滞(图 1B). 慢病毒感染在稳定表达 p80 的 T 淋巴瘤细胞株 MOLT-4-GFP-p80 中过表达 c-Myc(图 1C),western blot 显示随着 c-Myc 表达量的恢复(泳道 3),下游蛋白 skp2 的表达增加,其直接作用的 p27 蛋白量相应减少. 流式结果显示,过表达 c-Myc 后,由 p80 所诱导的细胞周期停滞现象有所减弱(图 1D). 以上结果表明,c-Myc 能补偿部分 p80 诱导的细胞周期抑制现象,p80 是通过抑制原癌基因 c-Myc 的表达来调节细胞周期的进程.

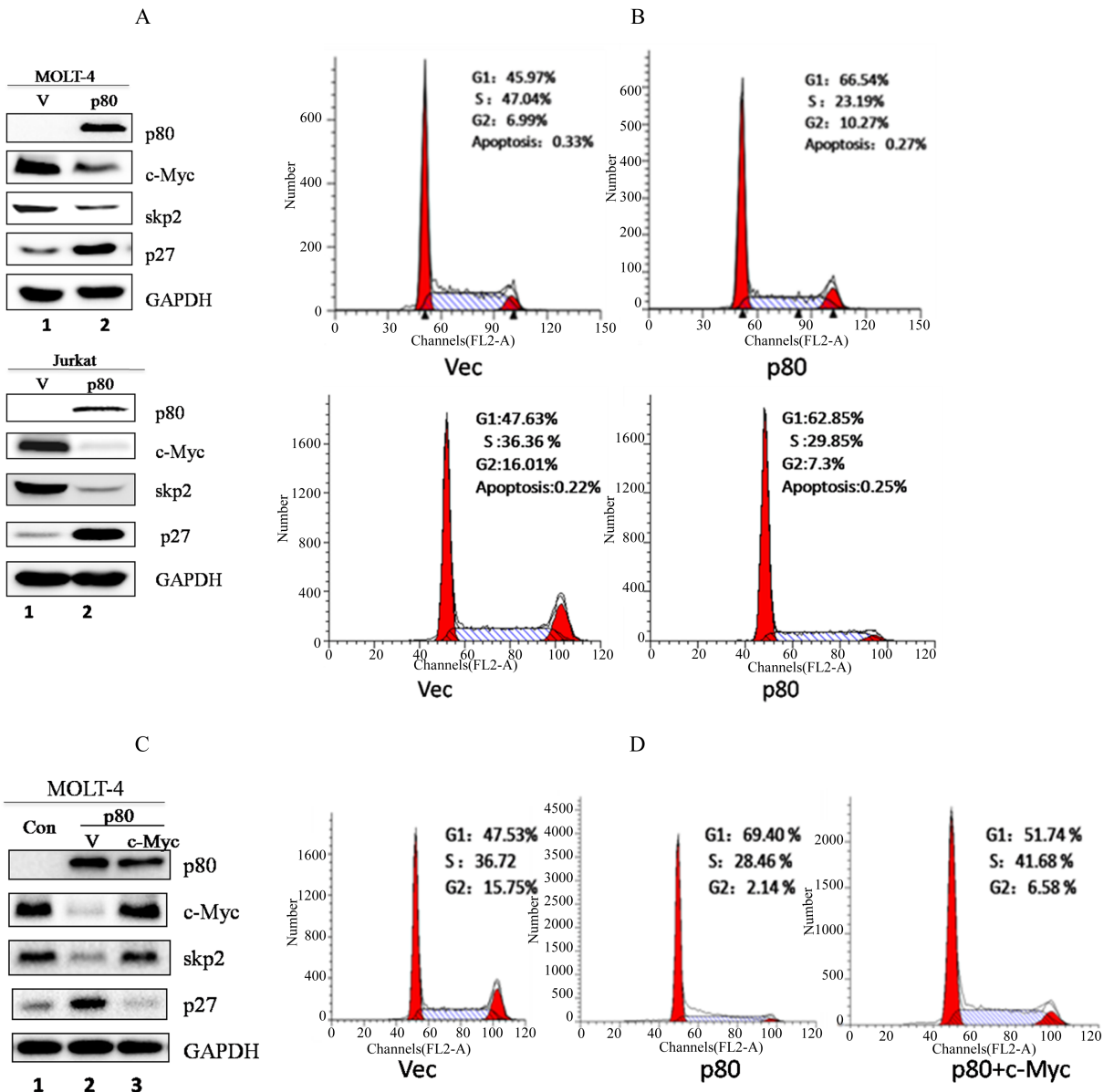


图 1 p80 通过调控 c-Myc 来影响细胞周期

(A) P80 能抑制 MOLT-4 和 Jurkat 细胞中原癌基因 c-Myc 的表达。(C) 原癌基因 c-Myc 能部分逆转 p80 诱导的细胞周期抑制现象。(B) 和 (D) 流式检测显示细胞周期情况。

Fig. 1 p80 causes cell cycle arrest at G<sub>1</sub> phase by regulating the expression of c-Myc

### 3.2 p80 在转录水平调控原癌基因 c-Myc 的表达

实时荧光定量 PCR (QPCR) 检测 c-Myc 和 *skp2* mRNA 在 GFP-p80+ 和仅 GFP+ 的 MOLT-4 细胞中的表达量 (图 2A), 其统计学分析结果显示 p80 能够在转录水平上显著抑制原癌基因 c-Myc 的表达, 同时 c-Myc 下游靶基因 *skp2* 的表达也受到相应的抑制. 然后对 T 淋巴瘤细胞株 MOLT-4-GFP 和稳定表达 p80 的 MOLT-4-GFP-p80 细胞同时进行放线菌酮 (CHX, 50 μg/mL) 的处理, 按照时间梯度检测 p80 对于 c-Myc 半衰期的影响. 实验结果 (图 2B) 表明 p80 几乎不影响 c-Myc 的蛋白稳定性. 综上, p80 是在转录水平上影响 c-Myc 基因的表达, 而对 c-Myc 蛋白的稳定性几乎没有影响.

为研究 c-Myc 启动子受 p80 转录调控的区域, 将人 c-Myc 基因启动子的双荧光报告基因质粒 (HPRM14159-PG04) 命名为 P1, 并在原有启动子克隆 P1 的基础上, 通过 PCR 引进 *Ecor* I 与

*Hind*III 酶切位点, 构建了截断的 P2 (-630bp ~ +240bp) 和 P3 (-156bp ~ +240bp) 启动子报告基因质粒. 经琼脂糖凝胶电泳 (图 2C) 和 DNA 测序确认, 获得了预期的不同长度 c-Myc 启动子报告基因克隆质粒. 将表达质粒 PXM-GFP 或 PXM-GFP-p80 与不同长度序列的 c-Myc 启动子荧光素酶报告基因质粒共同转入 HEK-293T 细胞中, 通过分泌型双荧光素酶报告基因试剂盒 (secreted-pair Gaussia luciferase Assay kit) 及酶标仪检测各实验组的荧光素酶活性 (GLuc 与 SEAP), western blot 检测各蛋白的表达量 (图 2D, 泳道 1~3 是将 PXM-GFP-p80 分别与 P1、P2、P3 共转, 泳道 4~6 是将 PXM-GFP 分别与 P1、P2、P3 共转). 统计学软件分析各组的荧光值 (图 2E), 结果显示, 相比较于截断启动子 P2 和 P3, p80 对全长启动子 P1 的抑制效果最显著, 说明 p80 对 c-Myc 的调控区域在其启动子上游 -1042bp ~ -630bp 序列内.

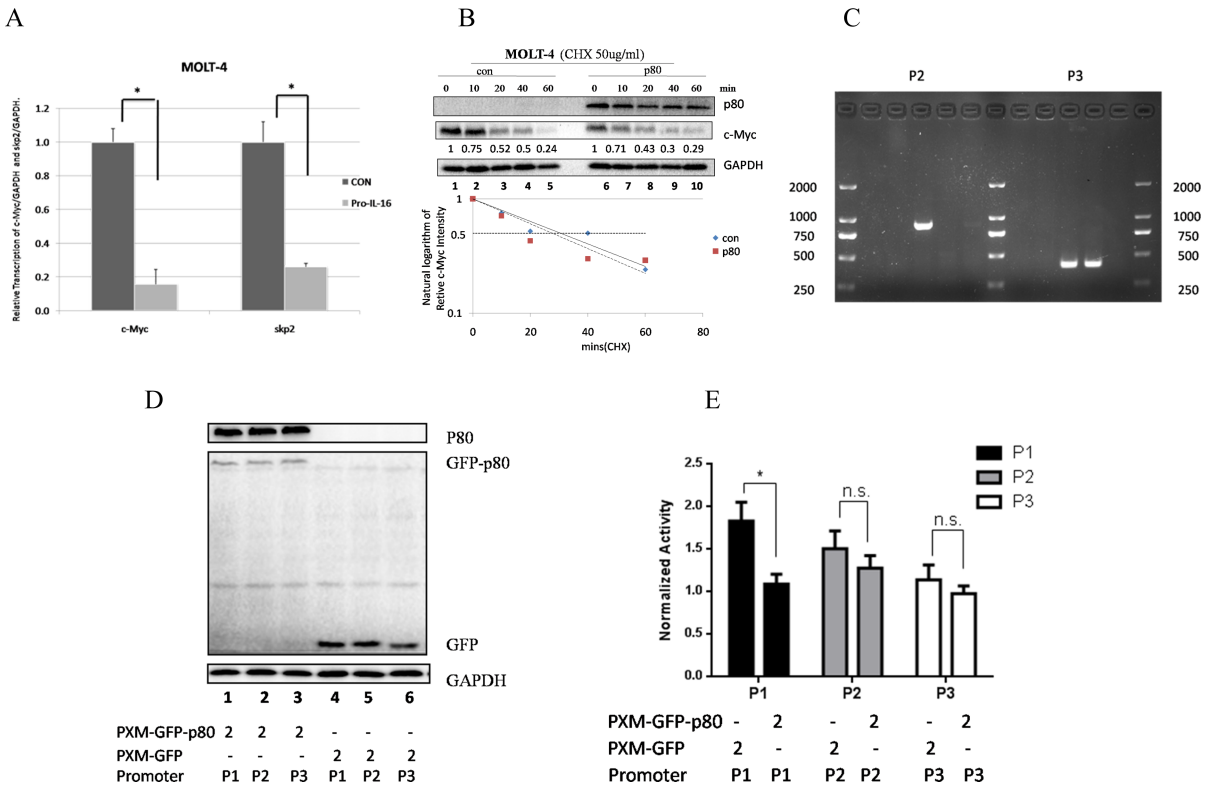


图 2 p80 调控 c-Myc 启动子上游 -1042bp ~ -630bp 的区域

(A) P80 的表达可以显著抑制 c-Myc 的 mRNA 水平. (B) P80 对 c-Myc 的蛋白稳定性几乎没有影响. (C) c-Myc 截断启动子质粒的构建. (D) 和 (E) P80 对 c-Myc 基因表达的调控位于转录起始位点上游约 -1042bp ~ -630bp.

Fig. 2 The area that p80 represses MYC gene expression might be in upstream -1042 bp ~ -630 bp of c-Myc promoter

### 3.3 p80 通过 c-Myb 调控 c-Myc 基因的表达

启动子分析软件 TF-search 显示, c-Myc 启动

子序列 -1042bp ~ -630bp 区域有多个 c-Myb 转录因子的结合位点, 这些结合位点的 DNA 序列与

经典的 c-Myb consensus 序列<sup>[20]</sup> 的匹配率达到 95%(图 3A). 为确认转录因子 c-Myb 是否有参与到 p80 调控 c-Myc 的过程, 在稳定表达 p80 的 MOLT-4-GFP-p80 T 淋巴瘤细胞株中利用 short hairpin RNAs 敲低内源性 c-Myb, western blot 结果如图 3B, 过表达 p80 后, Myc 下调, skp2 下调, p27 上调(泳道 2), 这与前面观察到的现象一致; 敲低 c-Myb 后, c-Myc 表达量得到恢复, 同时下游靶基因 skp2 上调, p27 蛋白表达降低(泳道 3 和 4). 流式结果显示在稳定表达 p80 的 T 淋巴瘤细胞 MOLT-4-GFP-p80 中敲低 c-Myb, 能够显著降低处于 G1 期的细胞数(图 3C). 以上均表明, 转录因子 c-Myb 确实参与了 p80 对 c-Myc 基因的转录调控.

后续采用经典的免疫共沉淀方法检测 p80 和 c-Myb 是否存在蛋白间的相互作用, 首先在 HEK-293T 细胞 (p80-, c-Myb-) 中共表达 Flag-p80 和 c-Myb, 利用 Flag 抗体偶联的 beads 来 pull-down

Flag-p80 蛋白, 通过 anti-c-Myb 的抗体检测在 pull-down 的 Flag-p80 洗脱液中是否有 c-Myb 的存在. 实验结果如图 3D 所示, 在 Input 部分中, Flag-p80(泳道 2 和 4) 和 c-Myb(泳道 3 和 4) 均在 HEK-293T 细胞中正常表达; 在 IP 部分中, 在 p80 和 c-Myb 共同表达的实验组中检测到 c-Myb 蛋白(泳道 8), 表明 Flag-p80 与 c-Myb 蛋白存在蛋白与蛋白之间的相互作用. 为了进一步验证 Flag-p80 与 c-Myb 之间的相互作用, 在 HEK-293T 细胞 (p80-, c-Myb-) 中进行了反向免疫共沉淀实验-共表达 Flag-p80 和 c-Myb, 用 anti-c-Myb 抗体通过 proteinA beads 进行 pull-down. 如图 3E 所示, 在 Input 部分中, p80(泳道 2 和 4) 和 c-Myb(泳道 3 和 4) 正常表达; 在 IP 部分中, 只在 p80 和 c-Myb 共同表达的实验组中才检测到 p80 蛋白(泳道 8), 再次证明 Flag-p80 与 c-Myb 蛋白存在蛋白与蛋白之间的相互作用.

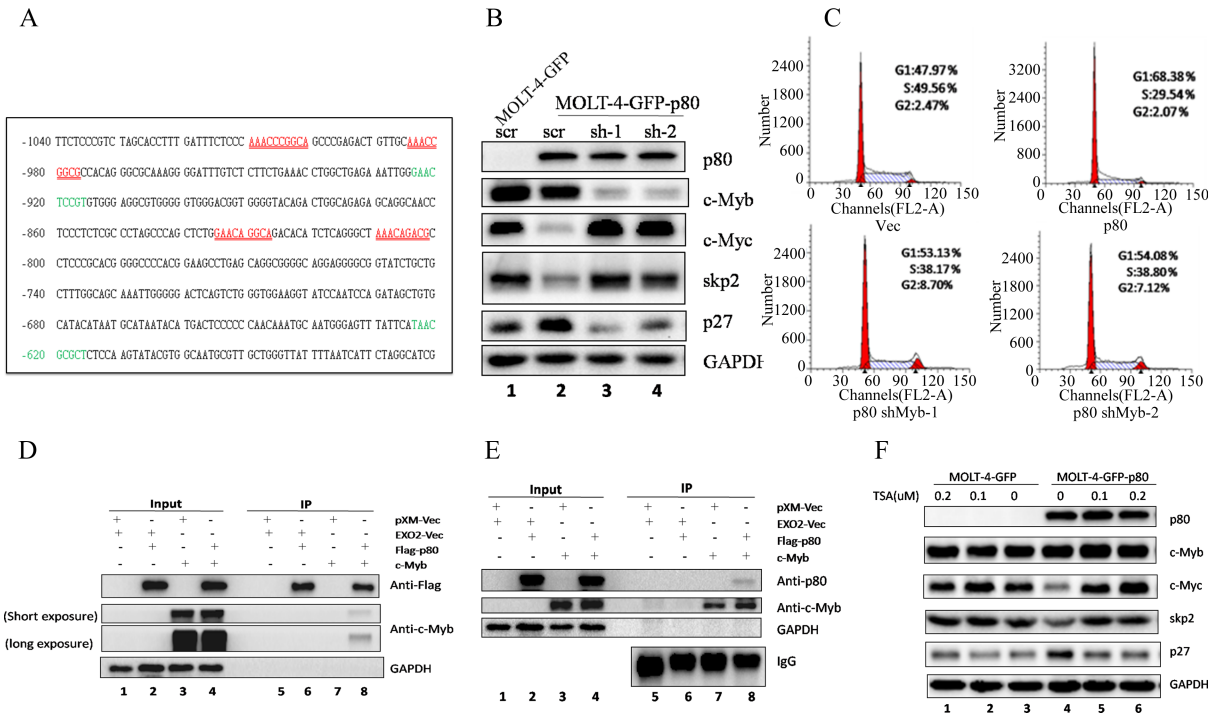


图 3 在 MOLT-4 细胞中 p80 通过 c-Myb 调控 c-Myc 基因的表达

(A) c-Myc 启动子含有的转录因子结合位点分析. (B)和(C) 敲低 c-Myb 可以部分恢复 p80 对 c-Myc 的抑制作用. (D)和(E) Co-IP 实验检测 HEK-293T 细胞内 p80 和 c-Myb 蛋白的相互作用. (F) P80 对原癌基因 c-Myc 的调控过程需要 HDAC 催化活性.

Fig. 3 P80 might repress c-Myc through protein-protein interaction with c-Myb

已有文献报道<sup>[9]</sup>, p80 可以通过与转录因子 GABPβ1 以及组蛋白去乙酰化酶 HDAC3 的作用抑制 skp2 基因的表达. 那么 p80 抑制 c-Myc 基因的表达是否也需要 HDAC 的催化活性呢? 在等数

均匀铺有 MOLT-4-GFP 细胞和稳定表达 p80 的 MOLT-4-GFP-p80 细胞的六孔板中, 按照浓度梯度(0、0.1 和 0.2 μM)加入组蛋白去乙酰化酶的抑制剂 TSA(空白组加入等体积 DMSO), 培养 6 h

后收集细胞进行 western blot 检测. 结果如图 3F 所示, 只有在稳定表达 p80 的 MOLT-4-GFP-p80 细胞中加入 TSA 能部分逆转 p80 对 c-Myc 的抑制效应(泳道 4, 5 和 6), 表明 HDAC 的活性可以影响 c-Myc 基因的表达, 而 p80 的存在是必要条件. 如预期所示, 随着 c-Myc 蛋白水平的升高, *skp2* 的表达增加, p27 的蛋白水平相应降低, 说明 HDAC 的酶活性对于 p80 通过 c-Myc 介导的 c-Myc 转录抑制作用非常重要.

## 4 讨论

P80 是少见的一种具有独立生物学结构与功能的前体蛋白, 在 T 淋巴瘤白血病的发生发展中发挥着重要的作用. 研究报道称, p80 可以调控 T 细胞增殖<sup>[4, 8, 21]</sup>, 引起细胞周期停滞. 在未被激活的人类 T 细胞(Naïve T cell)中, p80 是大量存在于核内及胞内的<sup>[3]</sup>; 微阵列基因芯片分析已表明, T 细胞被激活后, p80 的 mRNA 水平显著下调<sup>[5, 6]</sup>. Southern blot 分析发现, 人类 T 细胞白血病细胞株 Jurkat 和 HUT78 等均缺失 p80 基因; 在 T 细胞白血病细胞 H9 中, p80 基因发生了突变, 不再定位于细胞核中<sup>[22]</sup>. 这些研究均表明, p80 是 T 细胞淋巴瘤的一个重要的肿瘤抑制因子, 细胞核内 p80 的缺失是 T 细胞恶性增殖的诱因之一.

本研究发现, p80 可以在转录水平抑制 c-Myc 的表达, 这种抑制作用是通过与转录因子 c-Myb 的相互作用来实现的. 已有研究报道称, p80 可以募集 HDAC3 至 *skp2* 基因启动子上, 通过组蛋白去乙酰化酶活性来调控其表达<sup>[9]</sup>, 进而调控 T 细胞周期. 本实验结果显示, 组蛋白去乙酰化酶的抑制剂 TSA 能够缓解 p80 对 c-Myc 的抑制作用, 表明 p80 对 c-Myc 的调控也需要组蛋白去乙酰化酶活性. 可能的解释是 p80 的某个 PDZ 结构域与 c-Myb 结合, 其另一个 PDZ 结构域结合组蛋白去乙酰化酶并将其募集至 c-Myc 基因启动子上, 组蛋白的去乙酰化阻止了 c-Myb 上调 c-Myc 的作用, 整体表现出抑制 c-Myc 基因表达的效应.

但 P80 是通过怎样的结构域与 c-Myb 相互作用的还未可知. 一般来说, p80 是利用其 PDZ 结构域与其他 PDZ 蛋白相互作用来调控相关基因的表达. 有报道, p80 能通过其 PDZ 结构域与肌球蛋白的磷酸酶亚基相互作用, 共同定位于肌球蛋白纤维和应力纤维<sup>[23]</sup>, 然而转录因子 c-Myb 并没有 PDZ 结构域. 有报道称, p80 的 PDZ 结构域不止只与 PDZ

蛋白相互作用, 还可能与蛋白的亮氨酸拉链结构域相互作用. 转录因子 c-Myb 在其 NRD 结构域中, 存在一个亮氨酸拉链序列, 已有文献表明 c-Myb 可以通过自身亮氨酸拉链与其他蛋白发挥作用<sup>[24]</sup>. 我们推测 c-Myb 有可能通过此途径与 p80 的相互作用, 进而共同调控一些细胞周期相关基因, 参与 T 淋巴瘤的发生发展. 本研究结果为进一步探讨 p80 调控 T 细胞周期提供了新的研究思路, 不过仍还存在许多未解决的问题有待后续的研究.

## 参考文献:

- [1] Baier M, Bannert N, Werner A, *et al.* Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 5273.
- [2] Wilson K C, Cruikshank W W, Center D M, *et al.* Prointerleukin-16 contains a functional CcN motif that regulates nuclear localization [J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 14306.
- [3] Zhang Y, Kornfeld H, Cruikshank W W, *et al.* Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 1299.
- [4] Chupp G L, Wright E A, Wu D, *et al.* Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16 [J]. *J Immunol*, 1998, 161: 3114.
- [5] Cristillo A D, Bierer B E. Identification of novel targets of immunosuppressive agents by cDNA-based microarray analysis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 4465.
- [6] Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, *et al.* Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 316.
- [7] Wilson K C, Center D M, Cruikshank W W, *et al.* Binding of HTLV-1 tax oncoprotein to the precursor of interleukin-16, a T cell PDZ domain-containing protein [J]. *Virology*, 2003, 306: 60.
- [8] Ren F, Zhan X, Martens G, *et al.* Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4+ lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 2738.
- [9] Zhang Y, Tuzova M, Xiao Z X, *et al.* Pro-IL-16 recruits histone deacetylase 3 to the *Skp2* core promoter through interaction with transcription factor GABP [J]. *J Immunol*, 2008, 180: 402.
- [10] Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J. Myc and the cell cycle [J]. *Front Biosci*, 1998, 3: d250.
- [11] Henriksson M, Luscher B. Proteins of the Myc net-

- work; essential regulators of cell growth and differentiation [J]. *Adv Cancer Res*, 1996, 68: 109.
- [12] Nesbit C E, Tersak J M, Prochownik E V. MYC oncogenes and human neoplastic disease [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 3004.
- [13] Westin EH, Gallo RC, Arya SK, *et al.* Differential expression of the *amv* gene in human hematopoietic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79: 2194.
- [14] Wasner M, Tschop K, Spiesbach K, *et al.* Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism [J]. *FEBS Lett*, 2003, 536: 66.
- [15] Wasner M, Haugwitz U, Reinhard W, *et al.* Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter [J]. *Gene*, 2003, 312: 225.
- [16] Spender L C, Inman G J. Developments in Burkitt's lymphoma; novel cooperations in oncogenic MYC signaling [J]. *Cancer Manag Res*, 2014, 6: 27.
- [17] Bretones G, Delgado M D, Leon J. Myc and cell cycle control [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849: 506.
- [18] 陈静, 易勇, 贺寒冰, 等.  $\Delta$ Np63 $\gamma$  和  $\Delta$ Np63 $\alpha$  及其 C 端在 H1299 细胞凋亡中的作用 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50: 605.
- [19] 王承恩, 罗玉, 贺正池, 等. 长非编码 RNA LINC00941 在结直肠癌中的表达及对细胞增殖的影响 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 1301.
- [20] Biedenkapp H, Borgmeyer U, Sippel A E, *et al.* Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity [J]. *Nature*, 1988, 335: 835.
- [21] Cruikshank W, Little F. Interleukin-16: the ins and outs of regulating T-cell activation [J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28: 467.
- [22] Center D M, Cruikshank W W, Zhang Y. Nuclear pro-IL-16 regulation of T cell proliferation: p27 (KIP1)-dependent G0/G1 arrest mediated by inhibition of Skp2 transcription [J]. *J Immunol*, 2004, 172: 1654.
- [23] Bannert N, Vollhardt K, Asomuddinov B, *et al.* PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 42190.
- [24] Kanei-Ishii C, MacMillan E M, Nomura T, *et al.* Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 3088.

#### 引用本文格式:

中文: 王巧, 蒋贤杰, 张渝君. T 细胞蛋白 p80 调控 c-Myc 表达的机理 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 771.

英文: Wang Q, Jiang X J, Zhang Y J. The mechanism of c-Myc expression regulated by T cell protein p80 [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 771.