

利用 9R-GFP-PHD 检测细胞膜上 PIP₂ 的动态变化*韩小建¹, 万玉英², 危永芳¹, 杨章坚¹, 张剑锋¹

(1. 南昌大学转化医学研究院, 南昌 330031; 2. 南昌大学第二附属医院感染管理科, 南昌 330006)

摘要:目的 通过原核细胞表达和纯化 9R-GFP-PHD 重组蛋白, 并利用纯化后的 9R-GFP-PHD 蛋白来检测与磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)和 IP₃ 的结合能力以及细胞膜上 PIP₂ 的动态变化。方法 通过分子克隆技术将磷脂酶 C- δ 1 的普列克同源域(PHD)、荧光蛋白 GFP 及细胞穿膜多肽 9R 融合以构建相应蛋白表达载体。利用原核表达体系 BL21 大肠埃希菌和镍柱进行重组蛋白的表达和纯化, 其中 GFP 和 9R-GFP 为 9R-GFP-PHD 的对照蛋白。获取重组蛋白后, 通过同位素实验和液体闪烁计数器, 分别检测和比较 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 与 [³H] 标记的 PIP₂ 和 IP₃ 的结合能力以及之间的竞争性抑制。另外, 利用 MDCK 细胞检测和比较孵育的 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 后, 3 种重组蛋白在细胞内的分布情况。通过图片相减处理和荧光实时定量分析 MDCK 细胞膜上的 9R-GFP-PHD 在 ATP 刺激后分布的动态变化, 从而间接反映细胞膜上 PIP₂ 的水解变化。结果 通过原核表达和镍柱纯化体系顺利获得了 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 重组蛋白。体外结合实验证实 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 均有很强的结合能力, 而且 IP₃ 能竞争性抑制 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 的结合。在孵育了 3 种荧光融合蛋白后, 荧光共聚焦显微镜观察发现 9R-GFP 主要分布在细胞质中, 而 9R-GFP-PHD 特异性分布于细胞膜上。荧光实时定量分析显示, ATP 刺激通过 P₂y 受体激活磷脂酶 C 以水解 PIP₂, 从而使 MDCK 细胞膜上的 9R-GFP-PHD 减少 20% 左右。结论 本研究中构建的 9R-GFP-PHD 利用了细胞穿膜多肽、PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 结合特性及 GFP 的荧光可视和定量分析特性, 有效地检测细胞膜上 PIP₂ 的动态变化, 将为今后进一步研究细胞内钙动员提供新的工具蛋白。

关键词: C 型磷脂酶类; 穿膜多肽; 普列克同源域; 磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸; 肌醇 1,4,5-三磷酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2308-04

Dynamic changes of PIP₂ on cellular membrane detected by 9R-GFP-PHD*Han Xiaojian¹, Wan Yuying², Wei Yongfang¹, Yang Zhangjian¹, Zhang Jianfeng¹

(1. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China; 2. Department of Hospital Infection Management, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To utilize the purified 9R-GFP-PHD protein to detect the combining capacity with PIP₂/IP₃ and the dynamic change of PIP₂ on cellular membrane by the expression of the prokaryotic cell and the purification of 9R-GFP-PHD recombinant protein. Methods The molecular cloning technique was adopted to conduct the fusion of pleckstrin homology domain(PHD) of phospholipase C- δ 1, fluorescent protein GFP and cell-penetrating peptide 9R for constructing the corresponding protein expression vector. The expression and purification of recombinant protein were conducted by using the prokaryotic system BL21 Escherichia coli and nickel column, in which GFP and 9R-GFP were the control protein of 9R-GFP-PHD. After obtaining the recombinant protein, the binding affinities of GFP, 9R-GFP and 9R-GFP-PHD with [³H] labeled PIP₂ or IP₃ were measured and compared by the isotope experiment and the liquid scintillation counter. In addition, the MDCK cells were utilized to detect and compare the distribution situation of 3 kinds of recombinant protein in cells after incubating GFP, 9R-GFP and 9R-GFP-PHD. The image subtraction processing and the real-time fluorescent quantitative analysis was used to examine the dynamic change of distribution of 9R-GFP-PHD in the MDCK cell membrane after ATP stimulation, thus indirectly reflected the hydrolysis change of PIP₂ in the cell membrane. Results GFP, 9R-GFP and 9R-GFP-PHD recombinant proteins were smoothly obtained by the prokaryotic expression and nickel column purification system. The in vitro binding experiments showed that 9R-GFP-PHD had high binding affinity with PIP₂ and IP₃. After incubation of three kinds of fluorescent fusion protein, the confocal fluorescent microscopic observation found that 9R-GFP was mostly distributed in plasma, while 9R-GFP-PHD was specifically distributed on cellular membrane. The real-time fluorescence quantitative analysis showed that ATP stimulation activated phospholipase C for hydrolyzing PIP₂ by P₂y receptor, thus 9R-GFP-PHD on the MDCK membrane was decreased by about 20%. Conclusion The constructed 9R-GFP-PHD utilizes the cell-penetrating peptide, PHD, PIP₂/IP₃ binding features, fluorescent visibility and the quantitative analytic characteristics of GFP to effectively detect the dynamic change of PIP₂ on cellular membrane, which provides a new tool protein for further study of intracellular calcium mobilization.

Key words: type C phospholipases; cell-penetrating peptides; pleckstrin homology domain; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; inositol 1,4,5-trisphosphate

* 基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助课题——青年教师类(20123601120001); 江西省教育厅科研基金资助项目(GJJ13162)。 作者简介: 韩小建(1973—), 博士, 副研究员, 主要从事信号转导、分子诊断及治疗方面的研究。

磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)不仅是细胞膜的重要磷脂成分,还参与调节多种细胞活动过程,如分泌型囊泡及 clathrin 介导的胞内吞的细胞膜重构等^[1-2]。PIP₂ 是重要第二信使的前体分子。激素、神经递质等刺激细胞的早期反应是激发磷脂酶 C 介导 PIP₂ 水解,从而产生可溶性 IP₃。IP₃ 再通过 IP₃ 受体调节细胞内钙释放、蛋白激酶 C 和二酰甘油。故检测活细胞膜上 PIP₂ 的动态变化对探讨细胞活动具有十分重要的意义。另外,研究表明一些含有特定氨基酸系列的蛋白能够和 PIP₂ 中肌醇的磷酸基团通过静电作用相互结合^[3]。其中研究比较多的是普列克,血小板蛋白激酶 C 的主要底物蛋白。实验已证实普列克同源域(pleckstrin homology domain,PHD)能特异性地识别并结合多种肌醇,如 PIP₂ 和 IP₃^[4]。在本研究中,作者将细胞穿膜多肽 9R、荧光蛋白 GFP 及普列克同源域 PHD 融合以构建 9R-GFP-PHD。通过原核表达和镍柱纯化系统获得重组 9R-GFP-PHD 蛋白。并在离体结合实验中检测 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 的结合能力及其之间的竞争抑制。细胞实验发现,MDCK 细胞经蛋白孵育后,其中 9R-GFP 主要分布在细胞质中,而 9R-GFP-PHD 能特异性分布于细胞膜上,本研究利用 ATP 刺激来诱发细胞膜上 PIP₂ 水解。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 pET-9R 质粒由日本冈山大学的 Hideki Matsui 教授提供。GFP-PHD 质粒由日本熊本大学的 Kazuhito Tomizawa 教授提供。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建和重组蛋白的纯化 GFP-PHD 通过 PCR 扩增并亚克隆到 pET-9R 质粒以构建 9R-GFP-PHD 表达载体。GFP 通过 PCR 扩增并分别亚克隆到 pET21(+)和 pET-9R 质粒以构建 GFP 和 9R-GFP 表达载体。重组蛋白表达时,相应蛋白表达质粒通过电转化到 BL21 大肠埃希菌中。转化后的 BL21 大肠埃希菌先在 1 L 的 LB 培养基中 37 ℃ 培养至 OD 为 0.6~0.8 时,加入 0.2 μmol IPTG 并继续在 37 ℃ 下培养 4~6 h 以诱导目的蛋白表达。细菌经超声破碎后用镍柱纯化系统分别获得重组 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 蛋白。纯化后的重组蛋白先经 PBS 透析,再利用考马斯亮蓝染色以进一步确定。重组蛋白经浓度测定后于 -80 ℃ 保存备用。

1.2.2 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 的结合实验 方法参照文献^[5],0.8 kBq^[3H] 标记的 PIP₂ 和 IP₃ 分别与不同浓度的重组蛋白 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 在冰上孵育 15 min。孵育缓冲液含 50 mmol Na-Hepes,pH 7.4;50 mmol KCl;0.5 mmol MgCl₂ 和 0.01 mmol CaCl₂。在缓冲液中加入 5 μL 人伽玛球蛋白(10 mg/mL)和 50 μL 聚乙二醇 6000 (30%)以终止结合反应。再 10 000 × g 离心 10 min,弃上清液后溶于 0.1 mL 2% 十二烷基磺酸钠,并通过液体闪烁计数器检测放射性强度,从而反映与相应重组蛋白结合的^[3H] PIP₂ 和 IP₃ 的量。其中以最大浓度蛋白为 64 μmol 时结合的放射强度为 100% 进行相应计算。在 IP₃ 对 PIP₂ 与 9R-GFP-PHD 结合的竞争性抑制实验中,6 μmol 9R-GFP-PHD 先与 0.8 kBq^[3H] 标记的 PIP₂ 结合,再在缓冲液中加入 0~4 μmol IP₃ 并继续冰上孵育 10 min。终止结合反应后通过液体闪烁计数器检测结合在蛋白上的 PIP₂ 的放射性强度。其中以未加入 IP₃ 时蛋白上结合

的放射强度为 100% 进行相应计算。

1.2.3 检测孵育后 9R-GFP-PHD 在细胞内的分布 犬肾脏上皮细胞 MDCK 用于本实验。2 × 10⁵ MDCK 细胞先培养于 35 mm 培养皿。DMEM 培养基中含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素。24~48 h 后将 2 μmol 重组蛋白 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 分别加入培养基,继续于 37 ℃ 在 CO₂ 孵箱孵育 2 h 后,用无血清 DMEM 洗 3 次。然后,利用荧光共聚焦显微镜观察 GFP、9R-GFP 和 9R-GFP-PHD 在细胞中的分布情况。

1.2.4 实时观察 ATP 刺激后 9R-GFP-PHD 在细胞膜上的动态变化 2 × 10⁵ MDCK 细胞先培养于 35 mm 培养皿,24~48 h 后将 2 μmol 重组蛋白 9R-GFP-PHD 加入培养基于 37 ℃ 在 CO₂ 孵箱孵育 2 h。蛋白孵育后先用无血清 DMEM 洗 3 次,然后 MDCK 细胞继续于生长培养基中培养。50 μmol ATP 刺激时,通过荧光共聚焦显微镜实时记录刺激前后 9R-GFP-PHD 在细胞膜上的分布。在定量分析 ATP 刺激对细胞膜上 9R-GFP-PHD 分布的影响时,采用了刺激前后图片相减处理和选择特定分析区实时荧光强度定量分析两种方法。其中,以 ATP 刺激前的荧光强度为 100% 进行相应计算。

2 结 果

2.1 GFP、9R-GFP 及 9R-GFP-PHD 表达质粒的构建及蛋白纯化 通过常规的分子克隆技术,将 GFP 分别克隆到 pET21(+)和 pET-9R 以构建 GFP 和 9R-GFP 表达质粒;GFP-PHD 亚克隆到 pET-9R 以构建 9R-GFP-PHD 表达质粒,各重组蛋白结构示意图见图 1。构建的质粒均通过 DNA 测序,合格后用于蛋白表达。各蛋白表达质粒通过电转化到 BL21 大肠埃希菌中,在 LB 培养基 37 ℃ 培养至 OD 值达 0.6~0.8 时加入 0.2 μmol IPTG 刺激目的蛋白表达。离心收集细菌后,超声破碎并用镍离子亲和层析柱进行纯化以获得重组 GFP、9R-GFP 及 9R-GFP-PHD 蛋白。纯化后的各重组蛋白经 PBS 透析后进一步离心浓缩,并利用考马斯亮蓝染色确定,结果见图 2。

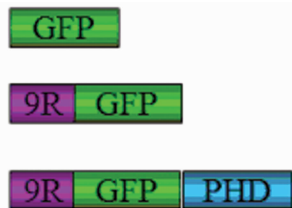
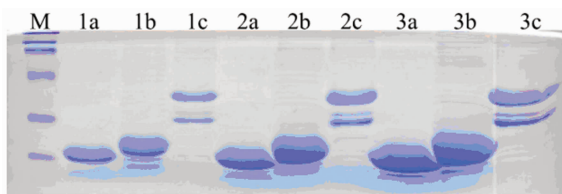


图 1 9R-GFP-PHD 质粒构建示意图



M: 标记物;1~3: 蛋白的不同浓缩批次;a: GFP;b: 9R-GFP;c: 9R-GFP-PHD。

图 2 蛋白纯化结果

2.2 9R-GFP-PHD 蛋白与 PIP₂ 和 IP₃ 的结合能力 如图 3A 所示,GFP 和 9R-GFP 与 PIP₂ 孵育后未检测到明显的相互作用。而 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 间都有很明显的结合能力,而且 PIP₂/IP₃ 的结合量随加入缓冲液 9R-GFP-PHD 量的增加而增加。这说明与 9R 和 GFP 融合后 PHD 仍保持其与

肌醇类相结合的能力,这和之前报道一致^[6]。另外,在 IP₃ 竞争性抑制实验中,0.8 kBq^[3H] 标记的 PIP₂ 预先和 6 μmol 9R-GFP-PHD 结合,随着加入 IP₃ 的量逐渐增加,9R-GFP-PHD 上结合的 PIP₂ 逐渐减少。当加入 IP₃ 的量达到 4 μmol 时,预先和 9R-GFP-PHD 结合的 PIP₂ 基本完全解离下来,如图 3B 所示。这一结果充分说明了 IP₃ 能与 PIP₂ 竞争性结合 9R-GFP-PHD。

2.3 9R-GFP-PHD 导入细胞后特异性分布在细胞膜上
MDCK 细胞与 GFP、9R-GFP 及 9R-GFP-PHD 孵育后,荧光共聚焦显微镜观察发现,孵育 GFP 后的细胞内观察不到明显的荧光信号;孵育 9R-GFP 后的细胞内发现荧光信号均匀分布于细胞质,这和以往报道一致^[7];而孵育 9R-GFP-PHD 后,荧光信号特异性地分布于细胞膜上,这充分提示,9R-GFP-PHD

导入细胞后依然保留与胞膜上 PIP₂ 结合的能力,从而特异性地分布在细胞膜上。见图 4。

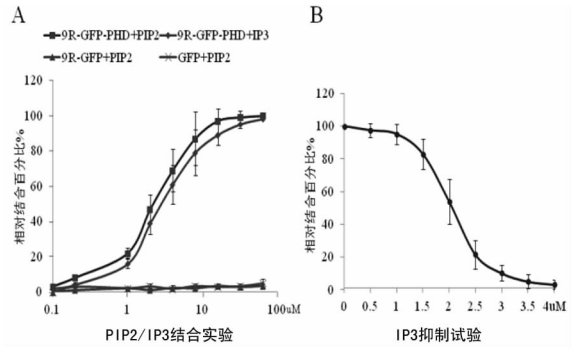
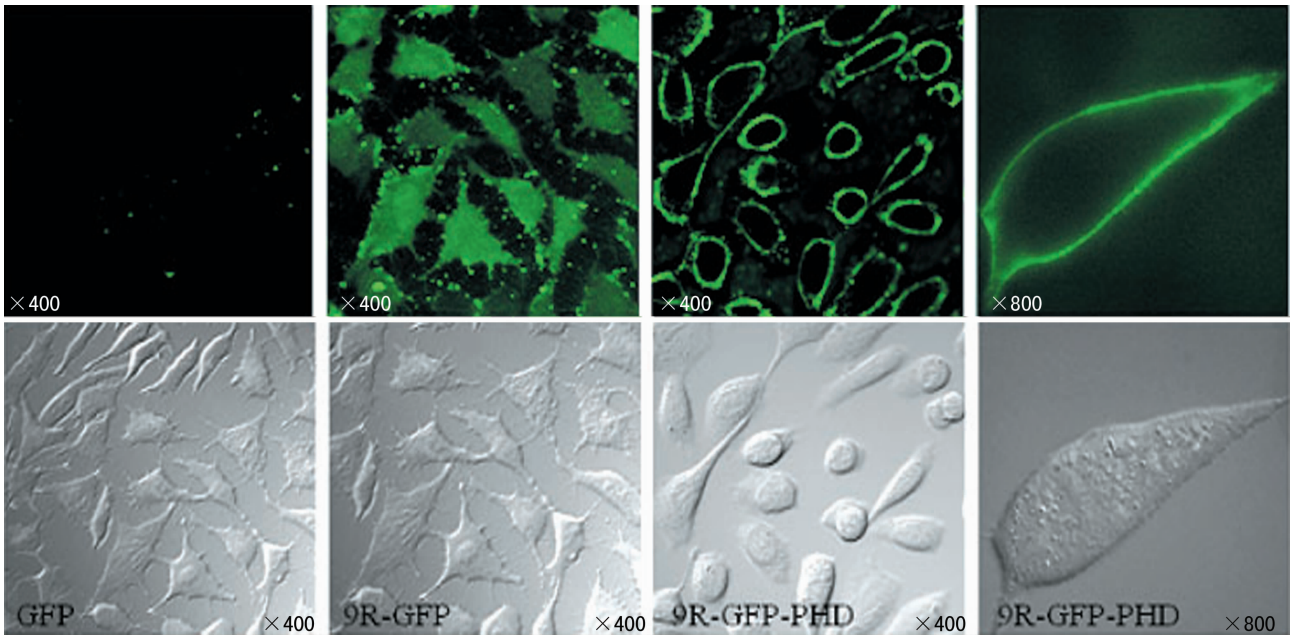
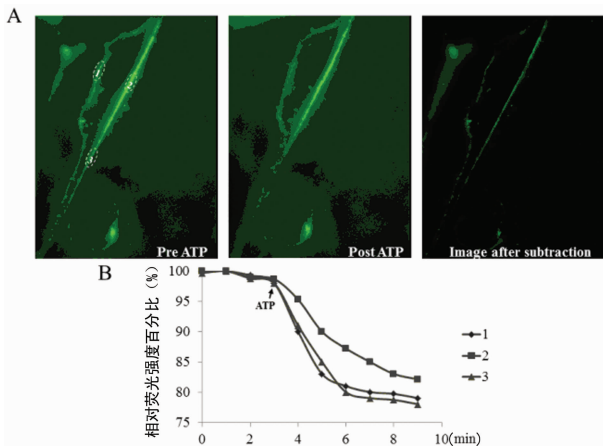


图 3 9R-GFP-PHD 与 PIP₂ 和 IP₃ 的结合及竞争性抑制



上: 荧光照片; 下: 明视视野下观察。

图 4 重组蛋白导入细胞后在细胞内的分布情况



A: 荧光照片(×800); B: 定量图。

图 5 ATP 刺激对 9R-GFP-PHD 在胞膜上分布的影响

2.4 9R-GFP-PHD 实时监测细胞膜上 PIP₂ 的动态变化 通过蛋白导入法进入细胞的 9R-GFP-PHD 能特异性地分布在细胞膜上。为检测胞膜上的 9R-GFP-PHD 是否会随 PIP₂ 的水

解而从胞膜上解离下来,本研究采用了 ATP 刺激 MDCK 细胞,通过 P₂Y 受体激活磷脂酶 C 以水解 PIP₂^[7-8]。荧光共聚焦显微镜实时记录 MDCK 细胞在刺激前后胞膜上 9R-GFP-PHD 的变化。如图 5A 所示,MDCK 细胞经 9R-GFP-PHD 孵育后,荧光信号特异性分布在胞膜上,50 μmol ATP 刺激后,膜上的荧光信号强度出现下降。在分析刺激前后荧光照片时,将 ATP 刺激前的照片减去刺激后的照片所留的荧光信号为刺激过程降低的荧光强度。另外,在细胞膜上随机选择了 3 个区域以定量分析这些区域在刺激过程中荧光强度的变化。结果如图 5B 所示,ATP 刺激引起了膜上的荧光信号的下降,下降幅度为 20% 左右。这些结果说明,ATP 刺激诱导 PIP₂ 水解后,膜上的 9R-GFP-PHD 也随着 PIP₂ 的水解而从膜上解离下来。故 9R-GFP-PHD 能有效监测活细胞膜上 PIP₂ 的动态变化。

3 讨论

1988 年 Green 等^[9] 和 Frankel 等^[10] 分别从人类免疫缺陷病毒中发现 HIV-TAT 能以不依赖受体方式穿透细胞膜,并把这种特殊的多肽称为穿膜多肽 (cell-penetrating peptide,

CPP)。在后来的研究中,陆续发现了几种不同的 CPP,其中常用的穿膜多肽有 HIV-TAT 和多聚精氨酸,如 11R 和 9R。研究发现 CPP 在离体和整体实验中均有良好的穿膜效应,已成功应用于运输多种不同的生物活性分子,如蛋白、多肽、核酸、脂质体等进入细胞以进行治疗,这也被称为蛋白导入疗法^[11-13]。

在本研究中,作者最初是将 11R 与 GFP-PHD 融合,但在纯化 11R-GFP-PHD 时出现严重的重组蛋白聚集,故减少多聚精氨酸的个数,将 9R 与 GFP-PHD 融合。通过镍柱纯化获得足够量的可溶性 9R-GFP-PHD。离体结合实验证实,9R-GFP-PHD 保留了 PHD 与肌醇类 PIP2 和 IP3 的结合能力,且与两者间是竞争性结合。在细胞实验也发现通过蛋白导入法进入细胞的 9R-GFP-PHD 特异性分布在胞膜上,这与 PIP2 是细胞膜上磷脂成分有密切关系。在 ATP 刺激时,能通过 P2y 受体激活磷脂酶 C 以水解膜上的 PIP2。PIP2 水解成可溶性 IP3,研究表明 IP3 能促使 PHD 蛋白从细胞膜上解离。本实验也证实,9R-GFP-PHD 在 ATP 刺激后能从胞膜上解离。这些结果充分说明,9R-GFP-PHD 能有效地监测细胞膜上 PIP2 的动态变化。另外,IP3 与细胞内钙动员密切相关。故本研究将为今后研究细胞内钙动态变化提供新的实验工具蛋白。

参考文献:

- [1] Jost M, Simpson F, Kavran JM, et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation[J]. *Curr Biol*, 1998, 8(25):1399-1402.
- [2] Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, et al. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes[J]. *Science*, 2001, 291(5506):1051-1055.
- [3] Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface[J]. *Cell*, 1996, 85(5):621-624.
- [4] Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, et al. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(23):10472-10476.
- [5] Várnai P, Lin X, Lee SB, et al. Inositol lipid binding and

membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(30): 27412-27422.

- [6] Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, et al. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns[J]. *Science*, 1999, 284(5419):1527-1530.
- [7] Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, et al. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(16):6000-6007.
- [8] Seregi A, Doll S, Schobert A, et al. Functionally diverse purinergic P2Y-receptors mediate prostanoid synthesis in cultured rat astrocytes: the role of ATP-induced phosphatidylinositol breakdown[J]. *Eicosanoids*, 1992, 5 Suppl: S19-22.
- [9] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1179-1188.
- [10] Frankel AD, Pabo CO. cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. *Cell*, 1988, 55(6):1189-1193.
- [11] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells[J]. *Eur Urol*, 2006, 49(1):161-168.
- [12] Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57.
- [13] Snyder EL, Meade BR, Saenz C, et al. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(2):186-193.

(收稿日期:2014-02-03 修回日期:2014-03-24)

(上接第 2304 页)

- [8] Binghui Li, Xiaofeng Ma, Yan W, et al. Structure-Activity relationship of polyphenols that inhibit fatty acid synthase [J]. *Journal of Biochemistry*, 2005, 138(6):679-685.
- [9] Bolden A, Bernard L, Jones D, et al. The PPAR Gamma agonist Troglitazone regulates Erk 1/2 phosphorylation via a PPARγ-independent MEK-dependent pathway in human prostate cancer cells[J]. *PPAR Res*, 2012; 2012: 929052.
- [10] Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, et al. Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth

of human ovarian cancers[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011; 137(8):1219-1228.

- [11] Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1483(3):301-315.
- [12] Mantha AJ, McFee KE, Niknejad, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates lovastatin-induced apoptosis in head and neck carcinoma cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 26(2):350-353.

(收稿日期:2014-01-12 修回日期:2014-03-12)