

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000682

白血病细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 分子结合研究

王毅,舒逸,秦茹,陈卉,苑俊涛,邹琳

(重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

【摘要】目的:检测急性淋巴细胞白血病细胞(acute lymphoblastic leukemia, ALL)CCRF-CEM 和 Raji 细胞中 Beta-抑制蛋白 1 (Beta-Arrestin1)与 Zeste 增强子同源物-2 蛋白(enhancer of Zeste homolog 2, EZH2)是否存在结合。**方法:**白血病细胞中,Western blot检测 Beta-Arrestin1 与 EZH2 表达水平,激光共聚焦(Confocal)检测 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在细胞中的位置与共定位;免疫共沉淀(CO-IP)检测 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合能力。**结果:**Beta-Arrestin1 与 EZH2 在白血病 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中均有表达。激光共聚焦结果显示 Beta-Arrestin1 与 EZH2 均在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞内共定位,CO-IP 结果显示在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合。**结论:**在 CCRF-CEM 和 Raji 中,Beta-Arrestin1 可与 EZH2 结合。**【关键词】**白血病;Beta-抑制蛋白 1;Zeste 增强子同源物-2 蛋白;蛋白结合
【中图分类号】R34 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2014-08-22

Analysis of the interaction of Beta-Arrestin1 and EZH2 in leukemia cells

Wang Yi, Shu Yi, Qin Ru, Chen Hui, Yuan Juntao, Zou Lin

(Center for Clinical Molecular Medicine, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To test that if Beta-Arrestin1 could bind with enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) in acute lymphoblastic leukemia (ALL) CCRF-CEM and Raji cells. **Methods:** The protein levels of Beta-Arrestin1 and EZH2 in the leukemia cells were determined by Western blot. The location of Beta-Arrestin1 and EZH2 in the leukemia cells was measured by confocal microscopy. Co-immunoprecipitation (CO-IP) was examined for the binding of Beta-Arrestin1 with EZH2 in leukemia cells. **Results:** Western blot results showed that b/Beta-Arrestin1 and EZH2 expressed in those three leukemia cells. Confocal data showed the colocalization of Beta-Arrestin1 and EZH2 in K562, CCRF-CEM and Raji cells. CO-IP assay illustrated that Beta-Arrestin1 bind with EZH2 in three leukemia cells. **Conclusion:** Beta-Arrestin1 could bind to EZH2 in ALL CCRF-CEM and Raji cells.
【Key words】leukemia; Beta-Arrestin1; enhancer of Zeste homolog 2; protein-protein interaction

Beta-抑制蛋白 1 (Beta-Arrestin1) 蛋白是抑制蛋白家族的重要成员,广泛表达于机体细胞,具有介导受体内化^[1],传导信号通路^[2],调控基因表达功能^[3]的作用。本课题前期研究中发现,在急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)中,Beta-Arrestin1 在白血病细胞中异常增高^[4-5]。其中在 CML 中,异常增高的 Beta-Arrestin1 可促进白血病的发生发展,其主要是通过 Beta-Arrestin1

和组蛋白甲基化酶 Zeste 增强子同源物-2 蛋白(enhancer of Zeste homolog 2, EZH2)结合,影响下游基因组蛋白修饰,调控 BCR/ABL 表达,从而促进 CML 细胞增殖^[5]。

尽管如此,ALL 中 Beta-Arrestin1 是否可以通过和 EZH2 结合,来调控相关癌基因表达,目前仍不清楚。本课题通过检测 CML 细胞(K562)、ALL 细胞(Raji、CCRF-CEM)中 Beta-Arrestin1 和 EZH2 的结合,为课题组下一步的分子靶向研究提供基础。

作者介绍:王毅,Email:641807153@qq.com,

研究方向:白血病的分子诊断。

通信作者:邹琳,Email:zoulin74@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81373444)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150708.2311.009.html>

(2015-07-08)

1 资料与方法

1.1 细胞株

人 CML K562 细胞,人急性 T 细胞白血病 CCRF-CEM 细

胞,人急性 B 细胞白血病 Raji 细胞均来自中国科学院上海生命科学细胞中心。(2~5) × 10⁵ 细胞悬浮于 10% 胎牛血清(Gibco 公司)1640 培养基(Gibco 公司),置于 5%CO₂,37 °C 孵箱培养。

1.2 总蛋白提取

每 50 μl 细胞沉淀加入 250 μl RIPA 裂解液(百泰克公司),冰上反复抽提 30 min。4 °C 12 000 g/min 离心 20 min,取上清,加入 5 × Loading Buffer 混匀,100 °C 煮 5 min,-20 °C 保存备用。

1.3 Western blot

取 30 μl 蛋白,SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,牛奶封闭 1 h,EZH2(Abcam 公司),Beta-Arrestin1(Abcam 公司),Beta-Actin(中杉金桥公司)一抗孵育 4 °C 过夜。TBST,TBS 洗膜后孵育相应二抗(联科生物),ECL(凯基生物)发光照相。

1.4 激光共聚焦

细胞滴片后 4% 甲醛固定,PBS 清洗,Triton X 穿孔,小牛血清封闭,孵育 EZH2 和 Beta-Arrestin1 一抗,4 °C 过夜。PBS 清洗后,孵育相应荧光二抗(康为世纪公司),DAPI 染核,防淬灭胶封闭后,激光共聚焦显微镜分析,拍照。

1.5 免疫共沉淀

1 000 μl 体积 2 mg 蛋白加入相应 IP 抗体(IgG,EZH2,beta-Arrestin1)4 °C 震荡孵育过夜后加入 20 μl Protein A/G(凯基基因),4 °C 震荡孵育 6 h,3 000 g 离心 3 min,去上清,RIPA 清洗 3 次剩余磁珠后加入 80 μl 1 × Loading Buffer,100 °C 煮 5 min 震荡,12 000 g 离心 3 min,取上清备用。Western blot 检测蛋白表达。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验指标中正态分布计量资料以均值及标准差列出,偏态分布计量资料采用中位数与四分位间距列出,3 种细胞株间数据分析采用单因素方差分析,若差异具有统计学意义,则用 Bonferroni 法进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Beta-Arrestin1 和 EZH2 蛋白水平检测

Western blot 结果显示,Beta-Arrestin1 和 EZH2 在 K562,CCRF-CEM 和 Raji 细胞中均有表达(图 1A)。单因素方差分析及两两比较发现,Beta-Arrestin1 在 K562 中的蛋白表达水平较 CCRF-CEM 细胞高,有统计学差异, P 值分别为 0.016(图 1,表 1)。而 EZH2 蛋白在 3 种白血病细胞中表达无统计学差异(图 1,表 1)。

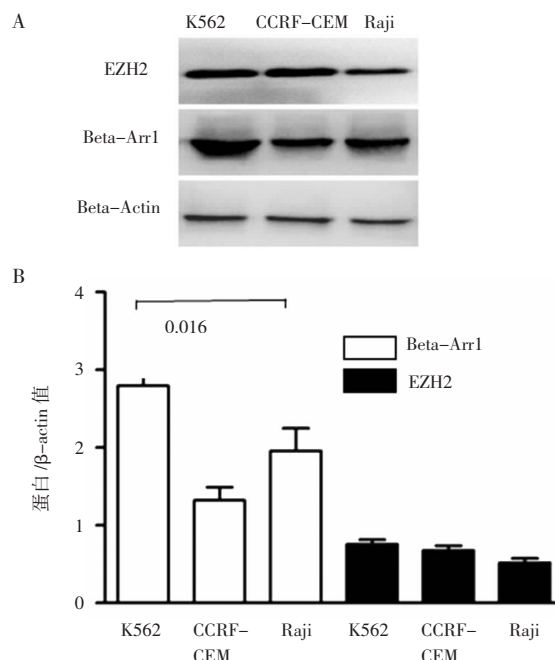
2.2 激光共聚焦检测 Beta-Arrestin1 和 EZH2 在白血病细胞中位置

激光共聚焦结果显示,Beta-Arrestin1 和 EZH2 在 3 株细胞的胞浆与细胞核内均有表达。在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中,Beta-Arrestin1 和 EZH2 在细胞核内空间位置上有明显的重合(图 2A)。通过计数 200 个细胞,统计其中共定位细胞比例,发现在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中共定位细胞比例分别为 65.7%、72.0%和 73.7%(图 2B)。单因素方差分析显示,3 株细胞中 Beta-Arrestin1 和 EZH2 空间位置共定位的细胞数无明显差异(表 1)。在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞

中 Beta-Arrestin1 和 EZH2 空间位置有共定位。

2.3 免疫共沉淀检测 Beta-Arrestin1 和 EZH2 结合

CO-IP 结果显示,上样孔(Input)Beta-Arrestin1 和 EZH2 均正常表达,IgG 阴性对照孔均无蛋白条带。当总蛋白和 Beta-Arrestin1 IP 抗体孵育后,在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中可检测到 EZH2 蛋白条带。当总蛋白和 EZH2 IP 抗体孵育后,在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中可检测到 Beta-Arrestin1 蛋白条带(图 3)。结果显示,在 K562、CCRF-CEM 和 Raji 细胞中 Beta-Arrestin1 和 EZH2 结合。



A. Western blot 检测 K562, Raji, CCRF-CEM 细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 的表达,Beta-肌动蛋白(Beta-Actin)为内参;B. 对 Western blot 结果做灰度分析后,Beta-Arrestin1 或 EZH2 与 Beta-Actin 比值统计。实验重复 3 次,结果以均值 ± 标准差表示

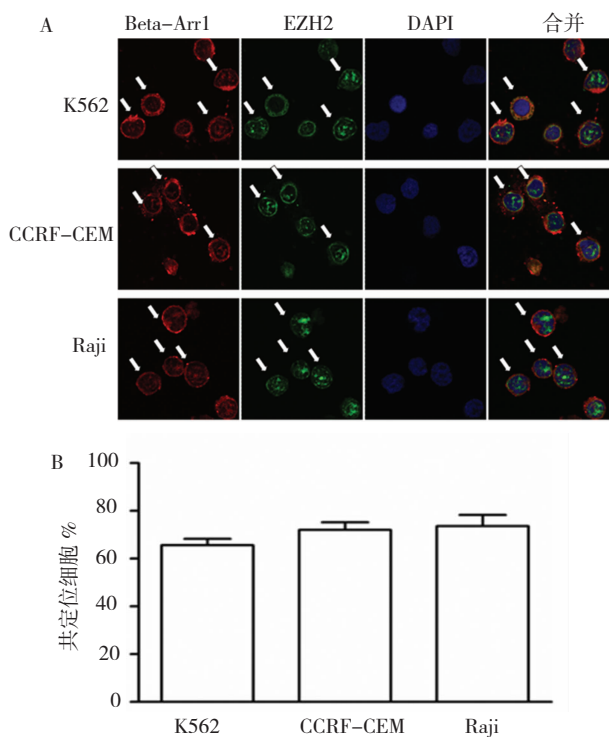
图 1 Western blot 检测白血病细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 表达

Fig.1 The protein expression of Beta-Arrestin1 and EZH2 in leukemia cells

表 1 白血病细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 蛋白表达及共定位细胞数比较分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Beta-Arr1 蛋白灰度	EZH2 蛋白灰度	共定位细胞数
K562	2.857 ± 0.536	0.753 ± 0.100	131.00 ± 9.02
CCRF-CEM	1.323 ± 0.300	0.677 ± 0.115	144.00 ± 12.22
Raji	1.920 ± 0.452	0.520 ± 0.120	144.00 ± 16.37
<i>F</i> 值	9.255	3.380	1.019
<i>P</i> 值	0.015	0.104	0.416

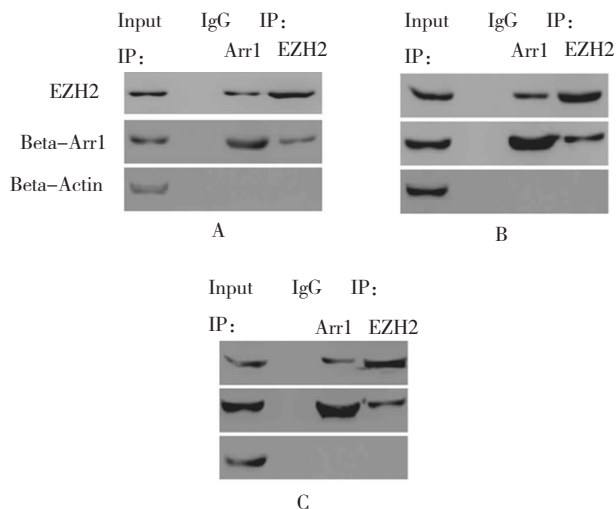
注:Beta-Arrestin1 蛋白灰度两两比较,K562 中 Beta-Arrestin1 表达高于 CCRF-CEM, $P=0.016$,而 K562 与 Raji,CCRF-CEM 与 Raji 中 Beta-Arrestin1 表达无统计学差异, P 值分别为 0.121 与 0.444



A. 激光共聚焦检测 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在白血病细胞中的位置, 箭头标志细胞为 Beta-Arrestin1 与 EZH2 空间位置有重合细胞; B. 计数 200 个细胞, 统计 Beta-Arrestin1 与 EZH2 空间位置有重合细胞比例, 实验重复 3 次, 结果以均值 \pm 标准差表示

图 2 激光共聚焦检测 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在白血病细胞中共定位

Fig.2 Colocalization of Beta-Arrestin1 and EZH2 in leukemia cells



A:CO-IP 检测 K562 细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合能力; B: CO-IP 检测 CCRF-CEM 细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合能力; C:CO-IP 检测 Raji 细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合能力

图 3 CO-IP 检测白血病细胞中 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合能力
Fig. 3 Combination of Beta-Arrestin1 and EZH2 in leukemia cell lines

3 讨论

白血病是小儿最常见恶性肿瘤,其中,又以 ALL 最为高发^[6]。目前研究表明,基因异常是导致小儿 ALL 发生发展的重要原因^[7]。在本课题的前期研究中,发现 Beta-Arrestin1 在小儿 ALL 和成人 CML 中都表达异常增高^[4-5]。在对 CML 研究中发现,Beta-Arrestin1 的异常增高会促进白血病细胞增殖,且发现 Beta-Arrestin1 可以和 EZH2 蛋白结合,调控 CML 细胞增殖相关基因转录,以促进白血病细胞增殖^[5]。在儿童 ALL 研究中也发现 Beta-Arrestin1 可以促进白血病细胞增殖,其中 EZH2 是否也发挥着重要作用,目前并不清楚。

EZH2 作为 PCR2 复合物的重要组成分子,具有组蛋白甲基化转移酶作用^[8],同时,EZH2 还可通过招募组蛋白去乙酰化酶,调节组蛋白乙酰化^[9]修饰,进而调节基因转录。在多种肿瘤细胞中,EZH2 都有不同程度异常表达^[10]。在白血病中,EZH2 表达异常可促进肿瘤细胞发生发展,其具体作用机制仍不清楚^[11-12]。

本研究中,首先通过 Western blot 验证 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在 CML K562 和 ALL Raji,CCRF-CEM 细胞中的表达,发现 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在 3 种细胞中都有表达,同时发现 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在 3 种细胞中表达无线性关系。激光共聚焦结果发现 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在 K562,CCRF-CEM 和 Raji 细胞中有广泛的共定位,共定位比例都达到 70%以上,在空间位置上支持 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合的假设。进一步通过正向与反向免疫共沉淀,检测到 Beta-Arrestin1 与 EZH2 在 K562,CCRF-CEM 和 Raji 细胞中结合,进一步证实了该两蛋白分子在白血病细胞中的结合,为进一步实验研究 Beta-Arrestin1 与 EZH2 结合位点实验提供了理论基础与依据。

参 考 文 献

[1] Lefkowitz RJ,Whalen EJ.beta-arrestins:traffic cops of cell signaling[J].Curr Opin Cell Biol,2004,16(2):162-168.
[2] Shenoy SK,Lefkowitz RJ.beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction[J].Trends Pharmacol Sci,32(9):521-533.
[3] Ma L,Pei G.Beta-arrestin signaling and regulation of transcription [J].J Cell Sci,2007,120(Pt2):213-218.
[4] Liu H,Long J,Zhang PH,et al.Elevated beta-arrestin1 expression correlated with risk stratification in acute lymphoblastic leukemia[J].Int