

HAP的凋亡诱发功能对其内质网定位的依赖性

李其岚, 刘鑫, 项荣, 屈小玲, 齐义鹏*

(教育部病毒学重点实验室, 武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 *hap* 是从人胚肺细胞系(WF38) cDNA文库中克隆的ASY相互作用蛋白基因, 它为已知基因RTN3的同源体。*hap* 过表达能引起多种细胞凋亡。激光共聚焦显微观察显示N端带有EGFP标签的HAP蛋白定位于内质网上, C端带有EGFP标签的HAP蛋白则游离分布于整个细胞中。用Hoechst33342染色观察、DNA ladder分析以及流式细胞仪检测均表明, 定位在内质网上的HAP蛋白高表达的HeLa细胞呈现明显的凋亡特征, 而游离的HAP高表达的HeLa细胞则没有明显的凋亡现象。结果表明, HAP蛋白的亚细胞定位决定其是否具有诱导细胞凋亡的功能。推测HAP蛋白可能是内质网上的钙通道的重要组成部分。

关键词 HAP, 内质网, 亚细胞定位, 凋亡

中图分类号 Q27

The Apoptosis-Inducing Function of HAP Depends on Its ER Localization

LI Qi-lan, LIU Xin, XIANG Rong, QU Xiao-ling, QI Yi-peng*

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract *hap*, identical to RTN3, was a gene encoding an ASY interacting protein and was identified by cloning complementary DNA from human lung cell line (WF38) cDNA library using yeast two-hybrid screen. It has been verified that overexpression of *hap* can induce apoptosis in several cells. Confocal microscopy showed HAP protein with EGFP at its N-terminal located on endoplasmic reticulum(ER) while HAP protein with EGFP at its C-terminal suffused in the whole cell. DNA ladder analysis, hoechst33342 staining and flow cytometry analysis demonstrated that apparent apoptosis characteristics exhibited in HeLa cells overexpressing ER-locating HAP but not in HeLa cells overexpressing suffused HAP. The subcellular localization decides whether HAP has the function of inducing apoptosis. Combining with the previous results, it was suggested that HAP was an important part of calcium channel on ER.

Key words HAP, endoplasmic reticulum, subcellular localization, apoptosis

ASY(apoptosis/saibousi yulldou)基因是Li等^[1]新近报道的一个人类细胞凋亡诱发基因。本研究室齐兵等^[2]采用酵母双杂交系统, 从人胚肺细胞系(WF38) cDNA文库中克隆了ASY相互作用蛋白(homologue of ASY protein)基因*hap*。从GenBank上搜索, HAP是最近发现的RTN3的同源体。

RTN3属于reticulon(RTN)家族成员, 此家族成员皆有两个显著的特点^[3]: 其一是定位于内质网; 其二是具有高度同源的C末端, 而N末端则有较大差异。RTN家族成员种类繁多, 在酵母、植物和动物中均有广泛分布, 但大多功能不详, RTN3的功能迄今未见报道。

*hap*和*asy*作为目前已知的RTN家族中唯一一对具有凋亡诱发功能的基因, 受到学术界的高度重

视。我们以前的工作证实, *hap*在多种人类正常组织中组成性表达, 尤其在脑组织中表达量最高^[4]。齐兵等用免疫荧光方法检测到HAP蛋白定位于内质网上^[2]; Qu等^[5]发现, HAP蛋白可诱导HeLa细胞发生凋亡特征性变化, 并指出内质网钙库中Ca²⁺的排空可能是介导HAP蛋白诱导HeLa细胞凋亡的主要

收稿日期: 2003-09-06, 接受日期: 2003-11-04

国家自然科学基金(No. 30170455)资助项目

*联系人 Tel: (027) 87682938, E-mail: qiypeng@whu.edu.cn

李其岚, 女, 1977年5月出生, 硕士

Received: September 6, 2003; Accepted: November 4, 2003

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30170455)

*Corresponding author Tel: (027) 87682938,

E-mail: qiypeng@whu.edu.cn

媒介;刘青珍等^[6]发现, HAP 蛋白自身可形成同源聚合体, 并且可与 ASY 相互作用形成异源聚合体, 并通过调节聚合体的形成方式来调控多种细胞凋亡的发生. 然而, 他们都没有对提出 HAP 蛋白的内质网定位与它能诱发细胞凋亡的功能之间有什么必然联系.

本项研究中, 我们利用了增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 与其它蛋白融合表达后可在活细胞或生物体内观察所研究蛋白的表达、分布及效应^[7,8]. 本文利用不同方式构建的 *egfp* 与 *hap* 融合表达载体, 研究 HAP 蛋白凋亡功能与其内质网定位的密切关系, 发现只有定位在内质网上的 HAP 蛋白才具有诱发细胞凋亡的功能, 进而根据其一级结构对 HAP 蛋白的功能区进行了分析, 推测 HAP 蛋白可能为内质网上潜在的钙离子通道.

1 材料与方法

1.1 材料

N 端带有 *egfp* 标签的 *hap* 真核表达载体 pEGFP *hap3* 由武汉大学项荣博士惠赠; 质粒 pB63 由武汉大学齐兵博士惠赠; 质粒 pEGFP-N₁, *E. coli* DH₅ 菌株由本室保存; HeLa 细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心; RPMF 1640 培养基、小牛血清以及转染试剂 LipofectAMINETM 2000 Reagent 购自 Gibco/BRL 公司; DNA 结合染料 Hoechst 33342、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自 Sigma 公司; RNase A、蛋白酶 K 购自 Promega 公司; 其它生化及分子生物学试剂均购自华美生物工程公司.

1.2 细胞培养与转染

HeLa 细胞培养于含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMF 1640 培养基中, 培养条件为 5% CO₂, 37 °C. 转染按照 LipofectAMINETM 2000 Reagent 的操作说明书进行. 细胞生长至丰度为 70% ~ 80% 时进行转染. 每孔细胞转染所用的质粒量为 1 μg, LipofectAMINETM 2000 Reagent 2 μl. 转染 4 ~ 6 h 后, 换含 10% 小牛血清的 RPMF 1640 培养基继续培养.

1.3 PCR 扩增 *hap* 基因及克隆

以质粒 pB63 为模板, 以 5'-TTGAATCCATGG CGGAGCCGTCGCGG-3' 和 5'-AAGGTACCTCGAGT 和 *kpn* 分别双酶切 PCR 产物和 pEGFP-N₁ 质粒, 将 *hap* 基因编码区定向克隆至 pEGFP-N₁, 然后转化感受态大肠杆菌 DH₅, 筛选重组子.

1.4 流式细胞仪测定凋亡细胞百分率

以重组质粒和对照质粒转染的 HeLa 细胞, 经 PBS 离心冲洗 2 次, 以 70% 乙醇固定过夜, 以 PBS 离心洗去乙醇, 加入核糖核酸酶 A (终浓度 60 μg/ml) 摇匀, 37 °C 温育 30 min, 加入 PI (终浓度 50 μg/ml) 避光染色 30 min, 用 Coulter EPICSXL 型流式细胞仪测定 PI 荧光强度, 以 Sub-G 峰的细胞百分率为凋亡百分率^[9].

1.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳

收集转染 HeLa 细胞, 按常规方法提取细胞总 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察 DNA 片段.

1.6 融合蛋白的表达及其亚细胞定位

用重组质粒和对照质粒转染 HeLa 细胞, 转染 16h 后用 PBS 洗去原有的培养基, 加入终浓度为 50 μg/ml 的 PI 避光染色 30 min. 以倒置荧光显微镜观察融合蛋白的表达情况, 以激光共聚焦扫描显微镜 (Confocal laser scanning microscope, Confocal, 德国 Leica 公司) 观察荧光分布.

1.7 Hoechst 33342 染色观察

取质粒转染 HeLa 的细胞, 加入终浓度为 10 μg/ml 的 Hoechst 33342, 37 °C 下避光染色 30 min. Olympus 荧光显微镜观察, 选择合适的视野拍照.

2 结果

2.1 EGFP 与 HAP 融合表达载体 pEGFP *hap5* 的构建及鉴定

C 端带有绿色荧光蛋白的融合表达载体 pEGFP *hap5* 由 *hap* 基因的编码区序列插入 pEGFP-N₁ 形成. 构建的真核表达质粒 pEGFP *hap5* 经 *EcoR* 和 *Kpn* 酶切鉴定, 重组子有约 0.8 kb 的插入片段 (Fig. 1). DNA 序列测定结果表明插入片段 *hap* 基因编码区序列及读码框架完全正确.

融合载体 pEGFP *hap5* 与融合载体 pEGFP *hap3* 的区别仅在于其所携带的 *egfp* 在 C 端而不是 N 端 (Fig. 2).

2.2 HAP 定位于内质网依赖其 C 端序列

在转染的 HeLa 细胞中, 绿色荧光显示 EGFP 及其融合蛋白的定位, PI 的红色荧光显示细胞核的定位. pEGFP-N₁ 转染的 HeLa 细胞中 EGFP 呈游离状态, 弥散分布于细胞质和细胞核中 (Fig. 3A); 在 pEGFP *hap5* 转染的 HeLa 细胞中, C 端带有 EGFP 标签的 HAP 蛋白亦均匀分布于细胞质、核中所有区域, 与 EGFP 在细胞中的分布一致 (Fig. 3B); 而在 pEGFP *hap3* 转染的 HeLa 细胞中, N 端带有 EGFP 标

态规则. 此结果表明只有定位在内质网上的 HAP 蛋白能诱导 HeLa 细胞凋亡, 而游离在细胞中的 HAP 蛋白则不具有凋亡诱发功能.

(A) (B) (C)

Fig. 4 Hoechst 33342 staining analysis for the nuclear morphological changes in HeLa cells

(A) HeLa cells transfected with pEGFP-N1 for 48 hours ; (B) HeLa cells transfected with pEGFP *hap5* for 48 hours ;

(C) HeLa cells transfected with pEGFP *hap3* for 48 hours

2.4 定位在内质网上的 HAP 蛋白诱导了 DNA 片段化

检测凋亡特征性的“DNA 梯形 (DNA ladder)”谱带的存在是检测细胞凋亡的一经典方法^[10]. 琼脂糖凝胶电泳 (Fig. 5) 可见, 转染 48 h 后, 仅 pEGFP *hap3* 转染的 HeLa 细胞 DNA 表现为大小约为 180 ~ 200 bp 及其整数倍的典型的“梯形”谱带 (泳道 3); 而 pEGFP *hap5* 转染的 HeLa 细胞 (泳道 2) 和转染对照质粒的 HeLa 细胞 (泳道 1) 仅在电泳加样孔附近出现一条较大的基因组 DNA 条带, 无“DNA ladder”形成. 由此可见, 只有定位在内质网上的 HAP 蛋白可诱导 HeLa 细胞发生凋亡特征性的生化变化, 而游离在细胞中的 HAP 蛋白则不能诱导凋亡.

1 2 3

Fig. 5 Electrophoresis analysis of DNA fragmentation

1: HeLa cells transfected with pEGFP-N1 for 48 hours;

2: HeLa cells transfected with pEGFP *hap5* for 48 hours;

3: HeLa cells transfected with pEGFP *hap3* for 48 hours

2.5 定位在内质网上的 HAP 蛋白诱导了细胞 DNA 出现亚二倍体峰

流式细胞仪检测细胞周期 DNA 含量是应用最广泛的定量检测细胞凋亡的一种特异性方法^[9]. 细胞凋亡时, 流式细胞仪可检测到凋亡细胞产生的特征性亚二倍体核型峰, 即凋亡峰. 本研究中, 对 3 种质粒分别转染的细胞 DNA 以 PI 染色后进行流式细胞仪检测. 结果显示, 仅仅 pEGFP *hap3* 转染的 HeLa 细胞中出现特征性的低于 G_0/G_1 相 DNA 峰为亚二倍体 DNA 峰. 转染后 48 h, 对照质粒转染的 HeLa 细胞凋亡率为 3.6% (Fig. 6A); pEGFP *hap5* 转染的 HeLa 细胞凋亡率仅 1.88% (Fig. 6B), 甚至低于 3.6% 的本底水平, 但这一差异在实验误差范围内, 可能是由于实验误差所致; 而 pEGFP *hap3* 转染的 HeLa 细胞凋亡率达到 27.3% (Fig. 6C), 高出本底水平近 10 倍. 此结果再次证明了只有定位在内质网上的 HAP 蛋白能诱导 HeLa 细胞凋亡, 而游离在细胞中、没有固定亚细胞定位的 HAP 蛋白则不具有凋亡诱发功能.

3 讨论

细胞凋亡是目前生命科学领域研究的热门领域, 随着细胞凋亡研究的日益深入, 细胞凋亡的实验室检测方法也得到了一定的发展. 本实验采用了特异性荧光染料 Hoechst33342 染色观察^[11], 检测凋亡特征性的 DNA ladder 和流式细胞仪检测凋亡特征性的亚二倍体峰这 3 种方式来检测转染了质粒 pEGFP *hap5* 和 pEGFP *hap3* 的 HeLa 细胞是否凋亡. 使用 3 种检测方法得到的结果是一致的, 即定位在内质网上的 HAP 蛋白高表达可诱导 HeLa 细胞凋亡, 而游离在细胞中的 HAP 蛋白高表达并不能诱导 HeLa 细胞凋亡.

同时我们还发现以不同的方式与 EGFP 融合的

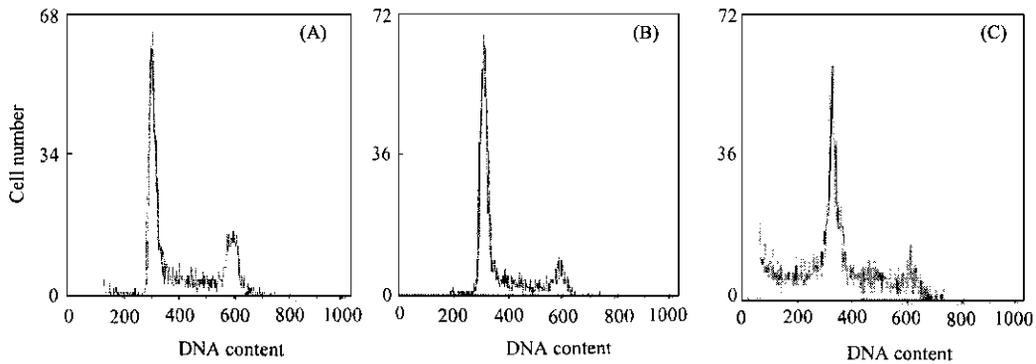


Fig. 6 Percentage of apoptosis detected by flowcytometry

- (A) HeLa cells transfected with pEGFP-N1 for 48 hours; (B) HeLa cells transfected with pEGFP *hap5* for 48 hours;
(C) HeLa cells transfected with pEGFP *hap3* for 48 hours

HAP 蛋白的亚细胞定位也不同, N 端带有 EGFP 标签的 HAP 蛋白定位于内质网, 与单独表达的 HAP 蛋白亚细胞定位相同, C 端带有 EGFP 标签的 HAP 蛋白的定位则发生了改变, 游离存在于整个细胞中. 这种改变可能是由于 EGFP 与 HAP 蛋白以某种方式融合时改变了 HAP 蛋白 3 端的三维结构, 封闭了 HAP 蛋白与内质网膜结合的部位, 进而影响了 HAP 的定位及功能.

本室以前的工作发现 HAP 为定位于内质网的二次跨膜蛋白, 它过表达诱导细胞凋亡的过程中伴随着内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 钙库的钙离子排空以及细胞内游离钙离子浓度的增加^[5]. 为了进一步研究 HAP 蛋白结构与其功能定位的关系, 使用 BLOCK 方法^[12] 对 HAP 蛋白的结构进行分析, 发现在第一个跨膜区附近, 存在着若干个可以与钙等二价金属结合及转运的功能保守性位点, 如氨基酸 30 ~ 55 的钙结合 EGF 样结构域特征 (calcium-binding EGF-like domain signature); 氨基酸 39 ~ 68 的 EF 手性钙结合域 (EF-hand calcium-binding domain); 氨基酸 68 ~ 107 的 S-100/IcaBP 型钙结合蛋白特征 (S-100/IcaBP type calcium binding protein signature); 氨基酸 69 ~ 85 钴转运蛋白 (cobalt transport protein CbiN); 氨基酸 60 ~ 92 ABC 3 转运家族 (ABC 3 transport family); 65-93SecD/SecF/SecDF 运输膜蛋白 (SecD/SecF/SecDF export membrane proteins). 此外还存在若干与能量代谢有关的区域, 如氨基酸 85 ~ 104 的 NADH 泛素氧化还原酶链 5 特征 (NADH ubiquinone oxidoreductase chain 5 signature); 氨基酸 166 ~ 196 NADH 泛素氧化还原酶链 4 L (NADH ubiquinone oxidoreductase chain 4L). 使用 ScanProsite^[13] 发现 HAP 序列中还有一些磷酸化的位点, 如氨基酸 96 ~ 98,

氨基酸 161 ~ 163 的蛋白酶 C 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site); 氨基酸 203 ~ 206, 氨基酸 218 ~ 221 为酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 (casein kinase phosphorylation site), 它们可能与 HAP 蛋白的激活、抑制以及功能调节相关.

内质网是细胞内重要的 Ca^{2+} 贮库, 对维持细胞内 Ca^{2+} 的稳态起重要作用. Ca^{2+} 是重要的胞内信号转导因子, 许多细胞以 Ca^{2+} 作为第二信使分子传递胞内信息, 诱发一系列的细胞形态、生理、生化和分子生物学事件的发生^[14]. 研究表明, 细胞内 Ca^{2+} 稳态的改变对细胞凋亡具有重要的调控作用^[15, 16]. 多种细胞凋亡的诱导因素^[16-18] 可以改变细胞质内游离 Ca^{2+} 的浓度以及亚细胞器内 Ca^{2+} 的分布, 从而在细胞凋亡的信号通路中起调控作用. 由于 HAP 过表达诱导细胞凋亡的过程中伴随着内质网钙库的钙离子排空以及细胞内游离钙离子浓度的增加, Qu 等推测特异性 ER 定位的凋亡诱发蛋白 HAP 可能是通过干扰细胞内 Ca^{2+} 的稳态平衡, 进而引起内质网应激反应, 激活 caspase-12 途径或通过内质网与线粒体之间的相互联系来介导线粒体凋亡信号通路, 从而诱导细胞凋亡^[5]. 根据以前的试验结果及采用生物信息学方法分析的 HAP 蛋白的结构特点, 我们推测它可能是内质网上的钙通道或钙通道的重要功能性组成部分. 然而从大小上看, 仅仅由 236 个氨基酸组成, 分子量为 26 kD 的 HAP 比其他已知的钙通道小得多, 所以它更可能是钙通道的重要组分. 结合刘青珍等发现 HAP 的同源聚合体和异源聚合体能诱导多种凋亡^[6], 我们认为 HAP 有可能与其本身或其他蛋白 (如 ASY 蛋白) 形成多聚体从而行使钙通道的功能. 本室以前工作发现的 *hap* 在脑组织中表达量相当高^[4] 可能亦与 Ca^{2+} 作为重要的神经递质释放

信号转导因子有关。

我们的研究结果亦可用这一推论解释: 当过量的 HAP 蛋白以某种聚合方式定位于内质网膜上时能开启钙离子通道, 促进钙离子从内质网释放到细胞质中, 大量钙离子流动打破了细胞内的钙稳态, 从而引起细胞凋亡; 如果 HAP 蛋白不能定位在内质网上, 它就不能形成钙离子通道, 因而不能引起细胞凋亡。然而 HAP 蛋白究竟是不是钙离子通道或其组分仍待进一步验证。

参考文献 (References)

- Li Q, Qi B, Oka K, Shimakage M, Yoshioka N, Inoue H, Hakura A, Kodama K, Stanbridge E J, Yustudo M. Link of a new type of apoptosis inducing gene ASY/Nog-B to human cancer. *Oncogene*, 2001, **20**: 3929 ~ 3936
- 齐兵, 齐义鹏, Masuo Y, 刘青珍. 用酵母双杂交系统分离一个新的人类凋亡诱发基因. 中国科学: C 辑 (Qi Bing, Qi Yi-peng, Masuo Y, Liu Qing-zhen. Isolation and characterization of a human apoptosis-inducing gene with yeast two-hybrid system. *Sci China, Series C*), 2000, **43**: 310 ~ 320
- Oertle T, Schwab ME. Nopg and its parTners. *Trends Cell Biol*, 2003, **13**(4): 187 ~ 194
- Qu X, Qi Y, Qi B. Generation of multiple mRNA transcripts from the novel human apoptosis-inducing gene hap by alternative polyadenylation utilization and the translational activation function of 3' untranslated region. *Arch Biochem Biophys*, 2002, **400**(2): 233 ~ 244
- Qu X, Qi Y, Lan P, Li Q. The novel endoplasmic reticulum (ER)-targeted protein HAP induces cell apoptosis by the depletion of the ER Ca²⁺ stores. *FEBS Lett*, 2002, **529**(2-3): 325 ~ 331
- 刘青珍, 甘淼, 齐义鹏, 李凌云, 齐兵. 两种新的凋亡诱发蛋白的聚合作用及其对细胞凋亡的调控. 中国科学 C 辑 (Liu Qing-zhen, Gan Miao, Qi Yi-peng, Li Ling-yun, Qi Bing. Dimerization of two novel apoptosis-inducing proteins and its function on regulating apoptosis. *Sci China, Series C*), 2003, **2**: 160 ~ 170
- 何诚, 贺平, 朱运松. Nm23-H1-GFP 融合蛋白在人肺癌细胞株中的表达及其对肿瘤体外侵袭能力的影响. 中国生物化学与分子生物学报 (He Cheng, He Ping, Zhu Yun-song. Expressing of Nm23-H1-GFP fusion protein in human lung cancer cells and its effect on *in vitro* invasive potential of tumor cells. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16**(1): 51 ~ 56
- 吕颂雅, 杨复华, 刘祖强, 齐义鹏. gfp 基因标记的重组标状病毒对棉铃虫幼虫的侵染历程. 中国生物化学与分子生物学报 (Lü Song-ya, Yang Fu-hua, Liu Zu-qiang, Qi Yi-peng. Infectious course of recombinant baculovirus marked with green fluorescent protein gene in larvae of cotton bollworm. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(6): 743 ~ 750
- Sherwood S W, Schimke R T. Cell cycle analysis of apoptosis using flow cytometry. *Methods Cell Biol*, 1995, **46**: 77 ~ 97
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovas Res*, 2000, **45**(3): 528 ~ 537
- 杨涛, 祝华斌, 齐义鹏. 癌胚抗原 (CEA) 启动子在肿瘤细胞中的特异表达及介导 bak 基因诱发凋亡. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Tao, Zhu Hua-bin, Qi Yi-peng. Specific expression and apoptosis induction with bak gene in tumor cells by carcinoembryonic antigen (CEA) promoter. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2003, **19**(6): 723 ~ 730
- Henikoff S, Henikoff J G. Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics*, 1994, **19**: 97 ~ 107
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinformatics*, 2002, **1**: 107 ~ 108
- Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(7): 517 ~ 529
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F D, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J*, 2001, **20**: 2690 ~ 2701
- Tagliarino C, Pink J J, Dulyak G R, Nieminen A L, Boothman D A. Calcium is a key signaling molecule in beta-lipaphone-mediated cell death. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 19150 ~ 19159
- Jayadev S, Barrett J C, Murphy E. Elevated ceramide is downstream of altered calcium homeostasis in low serum-induced apoptosis. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2000 Nov, **279**(5): C1604 ~ C1647
- Wang L, Bhattacharjee A, Zuo Z, Hu F, Honkanen R E, Berggren P O, Li M. A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*, 1999, **140**: 1200 ~ 1204