

[文章编号] 1000-4718(2009)10-2022-05

野生型 stathmin 1 及其 C 末端突变体的功能研究*

张彦^{1,2}, 熊建军², 王嘉励², 杨光², 朱振宇^{2,3△}⁽¹⁾广东省妇幼保健院产前诊断中心, 广东广州 510010; 中山大学²中山医学院生物化学教研室,³达安基因公司, 广东广州 510080)

[摘要] 目的: 研究 stathmin 1 过表达对黑色素细胞的生长和功能的作用; 探讨 C 末端 7 个氨基酸残基的突变对 stathmin 1 生物功能的影响。方法: 构建 stathmin 1 克隆载体及其 C 末端定点突变载体。转染载体到黑色素细胞中, MTT、流式细胞仪、分光光度法等研究野生型以及突变型 stathmin 1 对于黑色素细胞生长以及细胞特异性功能的影响。结果: 成功构建含有野生型 stathmin 1 的克隆载体 pAdTrack-stathmin 1 及其定点突变载体 pAdTrack-stathmin 1-mut; MTT 法和流式细胞仪检测到突变型和野生型 stathmin 1 都能有效抑制黑色素细胞生长、诱导细胞凋亡; 分光光度法检测黑色素细胞特异性功能黑色素产量以及酪氨酸酶活性因 stathmin 1 的转染而受到明显影响。结论: Stathmin 1 稳定表达对于黑色素细胞的生长有重要意义, 高表达可以抑制细胞生长以及细胞特异性功能, C 末端模序结构的破坏并不能影响 stathmin 1 的生物学功能。

[关键词] Stathmin 1; 定点突变; 黑素细胞**[中图分类号]** R363**[文献标识码]** A

Functions of wild stathmin 1 and the C terminal mutant

ZHANG Yan^{1,2}, XIONG Jian-jun², WANG Jia-li², YANG Guang², ZHU Zhen-yu^{2,3}⁽¹⁾The Center of Prenatal Diagnosis, Guangdong Women-children Hospital, Guangzhou 510010, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhongshan Medical College, ³The Daan Gene Co. Ltd., Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China. E-mail: zhangyan1981_2003@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To illustrate the effects of overexpression of stathmin 1 on melanocyte growth and the relationship between C terminal motif and stathmin 1 function. **METHODS:** The overexpression vector and C terminal mutant coding vector were constructed. The vectors were transfected into melanocytes by Lipofectamine 2000. MTT and FCM were used to inspect the cell growth, Western blotting was a tool in caspase-3 measurement, and spectrophotography was used to detect the melanin products and tyrosinase activity. **RESULTS:** The vectors of overexpression and mutation were constructed and transfected into melanocytes successfully. Both of them inhibited the melanocyte growth, induced apoptosis, and decreased the melanin products and tyrosinase activity. **CONCLUSION:** Overexpression of stathmin 1 inhibits melanocyte growth, melanin products and tyrosinase activity. The change of C terminal motif could not affect the role of stathmin 1 in melanocyte markedly.

[KEY WORDS] Stathmin 1; Site-directed mutation; Melanocytes

Stathmin 1 是广泛存在于真核细胞胞浆中的一种小分子蛋白质^[1], 149 个氨基酸构成的肽链上有 4 个丝氨酸磷酸化位点, 这些位点分别被不同的蛋白激酶系统磷酸化^[2-4]。Stathmin 1 主要参与细胞微管骨架的解聚/组装过程, 它可以直接和微管蛋白 α/β 异二聚体结合抑制其聚合, 也可以直接作用于组装好的微管促进其解聚。磷酸化可以使 stathmin 失活, 从而促进微管组装, 在细胞周期过程中需要多种蛋白激酶多次调节 stathmin 1 的磷酸化、去磷酸化过程。

定点突变 (site directed mutation) 是分子生物学用于研究结构功能关系的一种重要技术, 广泛用于分子生物学研究^[5,6]。本实验利用基于 PCR 的方法在克隆载体的基础上构建针对 stathmin 1C 末端的定点突变载体, 研究 C 末端结构对于 stathmin 1 生物功能的影响。

Segerman 等^[7]已证实几个肽段突变对 stathmin 1 与微管蛋白结合的关系, 研究方法是缺失突变。作为分子量只有 17K 的小分子蛋白质, 缺失一段有可能引起局部模序 (motif) 的改变, 虽然作者检测到

[收稿日期] 2008-10-31 [修回日期] 2009-04-02

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30672358)

△通讯作者 Tel: 020-61118667; E-mail: zhangyan1981_2003@yahoo.com.cn

139 - 147aa 缺失对于结合功能没有造成明显影响,但是发现对于结合的协同效应却有较大影响。本研究旨在通过改变最少氨基酸而破坏 stathmin 1 可能的功能模序,从而阐释 stathmin 1 结构和功能的关系。根据 SwissProt 数据库显示 stathmin 1 C 端第一个 α 螺旋位于 143 - 149aa,因此本实验将其作为研究靶点。

材 料 和 方 法

1 载体构建

1.1 Stathmin 1 克隆载体的构建 查询 GenBank 数据库,获得 stathmin 1 cDNA 全序列(NM_203401),设计引物分别加入 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点识别序列,引物序列如下: stathmin 1 - AdTrack 正义链: 5' - GCAGATCTATGGCTTCTTCTG - 3' (*Bgl* II); stathmin 1 - AdTrack 反义链: 5' - GCGTGCAGCTTAGTCAGCTTCAG - 3' (*Sal* I)。RT-PCR 法从人肺癌细胞 A549 (中山大学动物实验中心)中扩增得到 stathmin 1 cDNA 序列,*Sal* I/*Bgl* II 双酶切后连接到已经线性化的 pAdTrack 质粒(香港理工大学葛啸虎博士赠)中,测序鉴定后扩大培养,提取质粒备用。

1.2 定点突变载体的构建 查询数据库 http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz-page+Launch+-id+1E_ff1UHILQ+-appl+garnier+-launch-From+top 得到 stathmin 1 的预测二级结构,针对其 C 末端 7 个氨基酸 (ADETEAD) 构成的 α 螺旋进行突变改造,拟破坏其螺旋结构,突变后氨基酸序列为 GDQTQAD。

利用 Stratagene 公司定点突变引物在线设计程序 <http://www.stratagene.com/QPCR/tmCalc.aspx> 进行突变引物的设计,使引物 T_m 值在 75 $^{\circ}\text{C}$ 以上。序列如下: AdTrackSTMN - mut primer 正义链 5' - GAATCCAAAGACCCTGGTGACCAGACTCAAGCTGACTAAGTCGACG - 3'; AdTrackSTMN - mut primer 反义链 5' - CGTCGACTTAGTCAGCTTGAGTCTGGTCACCAGGGTCTTTGGATTC - 3'。

PCR 反应体系为: ddH₂O, 36.5 μL ; 10 \times buffer, 5 μL ; pAdTrack - stathmin1, 2 μL ; AdTrackSTMN - mut primer F (100 mg/L), 1.25 μL ; AdTrackSTMN - mut primer R (100 mg/L), 1.25 μL ; dNTP, 1 μL ; QucikSolution, 3 μL ; PfuTurbo, 1 μL 。反应程序为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 循环 20 次,最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。反应结束后,向反应体系中加 1 μL DPN I 核酸内切酶(QuikChange[®] XL 试剂盒提供, Stratagene), 混匀后离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。按照

试剂盒说明转化感受态细胞,挑单克隆测序鉴定后扩大培养,提取质粒备用。

2 细胞转染

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 环境下用 DMEM 高糖培养基 (Gibco) 含 10% 胎牛血清培养黑色素细胞(达安基因公司石会刚博士赠)。待细胞融合度达 60% 时将过表达载体及其突变载体用脂质体 (Invitrogen) 进行瞬时转染。操作方法按照说明书进行。

3 黑色素细胞生长状态检测

3.1 MTT 绘制细胞生长曲线 将细胞接种到 96 孔板,每孔接种 5×10^4 个细胞,培养 24 h 后转染干扰质粒、过表达质粒以及各自对照质粒和点突变质粒,每组细胞平行接种、转染 3 孔,转染后继续用 DMEM 生长培养基正常培养。分别培养 0、24、48、72、96 h 后向细胞培养孔中加 5 g/L MTT (Sigma) 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 继续培养 4 h。小心吸去每个加入 MTT 孔中的培养基,补加 100 μL DMSO 室温放置 15 min,待蓝色甲坎结晶溶解后用酶标仪测定 570 nm 的吸光度 (A_{570}) 值,每组细胞每个时点测得 3 个数据,求平均值绘制细胞生长曲线。

3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 1 000 r/min 室温离心 5 min,收集各组转染细胞,PBS 洗 1 次,PBS 重悬沉淀,调整细胞浓度为 1×10^{10} cells/L;将 100 μL 细胞悬液与 20 μL PE 标记的 CD19 抗体混匀;室温避光孵育 30 min;PBS 洗 1 次后,离心弃上清,1 mL PBS 重悬沉淀放入冰盒,避光进行流式细胞仪细胞凋亡检测。

3.3 Western blotting 检测黑色素细胞 caspase - 3

200 μL 上样缓冲液裂解黑色素细胞;超声打碎核酸,沸水浴 10 min,10 000 r/min 室温离心 10 min,吸取上清即为总蛋白质样品;BCA (Roche) 蛋白染色法确定提取的蛋白质样品浓度,10 mL 去离子水溶解 1 片 complete mini (Roche) 蛋白酶抑制剂与 7 mL 蛋白质样品混合;制胶板灌制 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,待胶凝固后进行垂直电泳,开始电压为 80 V,待蛋白质样品进入分离胶后改电压为 120 V;电泳结束后,将 PAGE 凝胶从玻璃板剥离下来,切去浓缩胶,将分离胶、滤纸与预先用甲醇和冰冷的转膜缓冲液浸泡过的 PVDF 膜按照特定顺序贴好,避免夹入气泡;装好转膜体系,100 V 稳压转膜 60 min;将 PVDF 膜用封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;将膜放入杂交袋中,加入用封闭液稀释好的 I 抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用 TBS 于脱色摇床上室温洗膜 3 次,每次 15 min;将膜放入杂交袋中,加入用封闭液稀释好的 II 抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用 TBS 于脱色摇床上室温洗膜 3 次,每次 15 min;放射

自显影法压片、显影、定影。

4 黑色素细胞功能检测

黑色素细胞转染相应质粒后经流式细胞仪筛选得到转染成功的细胞 (pAdTrack 有 EGFP 筛选标记),用于下一步黑色素产量和酪氨酸酶活性检测。

4.1 黑色素量检测 操作参见 Hunt 等^[8]方法,简要如下:接种黑色素细胞到细胞培养瓶中,用 DMEM 高糖培养基加 10% FBS 培养 1 周后 0.25% 胰酶消化,2 000 r/min 室温离心 5 min,分别收集 10⁶ 个细胞。PBS 洗 2 次,沉淀用 200 μL NaOH(1 mol/L)溶解,吹打混合均匀,置于液氮中 5 min,拿出后迅速置于 50 °C 水浴 5 min,重复冻融 1 次。将离心管置于 65 °C 水浴 1 h,溶解黑色素。酶标仪测定 400 nm 的吸光度值(A₄₀₀),每组细胞重复 3 次实验,最后数据为 3 次结果的平均值。

4.2 酪氨酸酶活性检测 操作参见 Nakajima 等^[9]方法,简要如下:黑色素细胞于 DMEM 生长培养基中正常培养 1 周,收集 10⁶ 个细胞,PBS 洗 1 次,弃上清。125 μL 1% Triton X-100 重悬沉淀,迅速置于 -80 °C 30 min,室温解冻后加 250 μL 1% 左旋多巴,37 °C 反应 2 h,测定 490 nm 的吸光度值(A₄₉₀),平行做 3 组,分别测定数据后求平均值。

5 统计学处理

数据以多次平行实验所得结果的均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Stathmin 1 过表达载体转染组以及突变载体转染组细胞分别和对照质粒转染组以及未转染组进行配对 *t* 检验。相应数据经统计学软件 SPSS12.0 处理。

结 果

1 构建 stathmin 1 克隆载体以及定点突变载体

重组质粒酶切结果见图 1,双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 pAdTrack-stathmin 可以切出和 stathmin 1 大小相当的片段(第 5 泳道)。

2 黑色素细胞生长状态

2.1 生长曲线 MTT 法绘制转染了不同质粒黑色素细胞的生长曲线,见图 2,正常黑色素细胞以及对照质粒 pAdTrack 转染组细胞生长旺盛,过表达载体 pAdTrack-stathmin 1 以及突变载体 pAdTrack-stathmin 1-mut 转染后的黑色素细胞生长明显受到抑制。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 过表达载体和突变载体都能显著提高黑色素细胞的凋亡率。在 G₁ 期前面都出现了明显的 M₁ 凋亡峰,有约 40% - 50% 的细胞进入了不可逆的程序性死亡,对照质粒转染

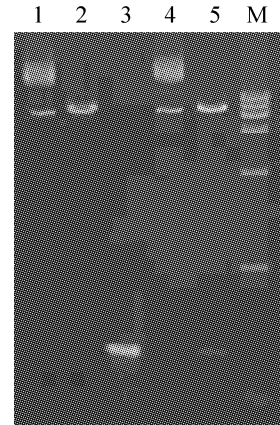


Fig 1 Digestion of plasmid pAdTrack-stathmin 1. Lane 1: pAdTrack(9 220 bp); Lane 2: pAdTrack digested by Sal I and Bgl II; Lane 3: stathmin 1(450 bp); Lane 4: pAdTrack-stathmin 1(9 670 bp); Lane 5: pAdTrack-stathmin 1 digested by Sal I and Bgl II; M: DNA marker (15 000 bp,10 000 bp,7 500 bp,5 000 bp,2 500 bp,1 000 bp,250 bp).

图 1 过表达载体双酶切鉴定电泳

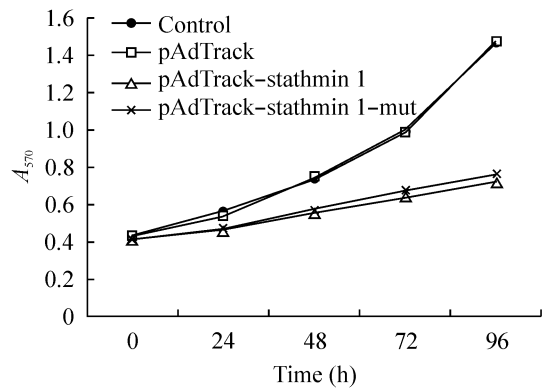


Fig 2 Cell proliferation analyses of melanocytes. Parental and transfected melanocytes were cultured in triplicate, quantified over a 96 h period, and the triplicate data were averaged. Standard errors were omitted to make the curve clearer.

图 2 黑色素细胞生长曲线

的黑色素细胞以及空白对照细胞的凋亡率都小于 10%,见图 3。配对 *t* 检验,pAdTrack-stathmin 1 和 pAdTrack-stathmin 1-mut 转染组相对于 pAdTrack 转染组以及空白组细胞凋亡率差异显著 ($P < 0.01$); pAdTrack-stathmin 1 和 pAdTrack-stathmin 1-mut 转染的黑色素细胞凋亡率差异无显著 ($P > 0.05$); pAdTrack 转染组和空白组细胞凋亡率差异无显著 ($P > 0.05$)。

2.3 Western blotting 检测细胞 caspase-3 过表达载体以及突变载体的转染可以导致黑色素细胞 caspase-3 激活。空白对照细胞以及对照质粒 pAdTrack 转染的黑色素细胞 caspase-3 为 34 kD 蛋

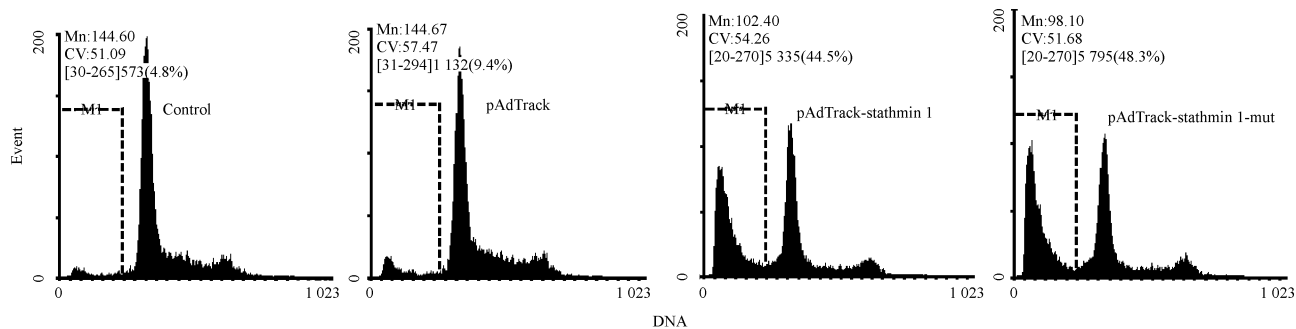


Fig 3 Apoptosis analyses of melanocytes. Representative results of flow cytometric sorting of chromosomal DNA in parental melanocytes and in melanocytes transfected by pAdTrack, pAdTrack - stathmin 1 or pAdTrack - stathmin 1 - mut with each reaction repeated five times.

图3 黑色素细胞凋亡率分析

白质; pAdTrack - stathmin 1 和 pAdTrack - stathmin 1 - mut 转染的黑色素细胞除了 34 kD 的蛋白条带以外, 出现 1 条粗重的 17 kD 蛋白条带, 即为 caspase - 3 活化产物, 是细胞进入凋亡程序的一种标志分子, 见图 4。

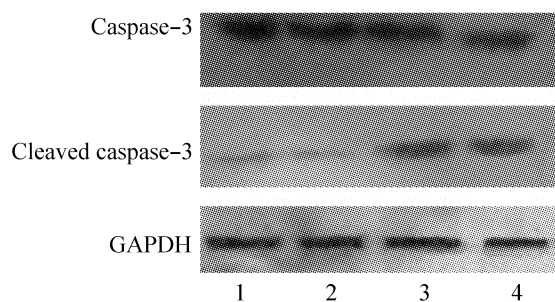


Fig 4 Caspase - 3 changes in melanocytes detected by Western blotting. Lane 1: parental melanocyte; Lane 2: melanocyte transfected by pAdTrack; Lane 3: melanocyte transfected by pAdTrack - stathmin 1; Lane 4: melanocyte transfected by pAdTrack - stathmin 1 - mut. GAPDH was used as a loading control.

图4 蛋白质印迹法检测黑色素细胞 caspase - 3 表达

3 黑色素细胞特异性功能

产生黑色素是黑色素细胞特有的功能, 酪氨酸酶参与黑色素的产生过程。实验中质粒转染导致黑色素细胞中 stathmin 1 的表达水平增加, 观察到黑色素量由于 pAdTrack - stathmin 1 或 pAdTrack - stathmin 1 - mut 的转染明显减少, 而对照质粒却未能引起相应改变; 酪氨酸酶活性也有相似情况的改变, 见图 5。配对 *t* 检验, pAdTrack - stathmin 1 和 pAdTrack - stathmin 1 - mut 转染组相对于 pAdTrack 转染组以及空白细胞组酪氨酸酶活性和黑色素量差异均显著 ($P < 0.01$)。pAdTrack - stathmin 1 和 pAdTrack - stathmin 1 - mut 转染的黑色素细胞之间酪氨酸酶活性以及黑色素量无显著差异 ($P > 0.05$); pAdTrack

转染组和空白细胞组之间酪氨酸酶活性以及黑色素量无显著差异 ($P > 0.05$)。

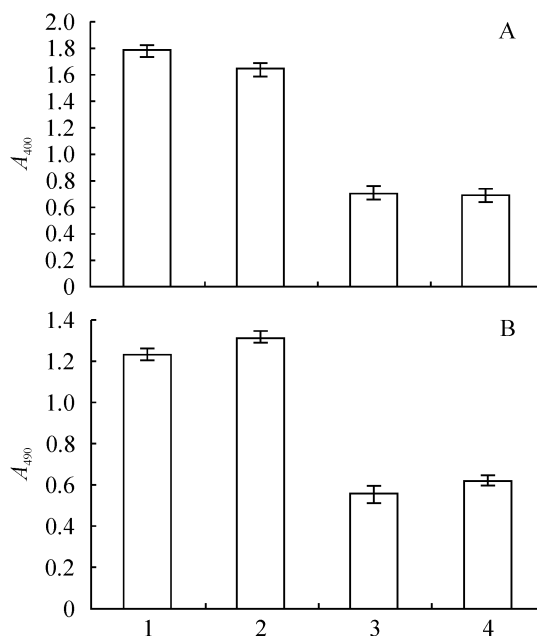


Fig 5 Melanin products and tyrosinase activity. Lane 1: parental melanocyte; Lane 2: melanocyte transfected by pAdTrack; Lane 3: melanocyte transfected by pAdTrack - stathmin 1; Lane 4: melanocyte transfected by pAdTrack - stathmin 1 - mut. Melanin production (A_{400} nm in A) and cellular tyrosinase activity (A_{490} nm in B) were assayed in triplicate and averaged, using 1×10^6 melanocyte.

图5 黑色素量及酪氨酸酶活性检测结果

讨 论

Stathmin 1 是一种在脊椎动物中高度保守的蛋白质, 在不同组织中表达水平不一, 在增殖更新较快的组织中高表达^[9]。

研究发现, stathmin 1 在细胞生长分化过程中的作用主要有两方面: 促进微管塌陷和抑制微管聚

合^[10]。Stathmin 1 C 末端的 α 螺旋结构可能在一作用发挥过程中有重要意义^[7, 10]。本实验设计思路是基于过表达载体 pAdTrack - stathmin 1, 针对 stathmin 1 C 末端 7 个氨基酸残基构成的 α 螺旋结构进行突变, 破坏其二级结构。Stathmin 1 蛋白质突变体的高级结构尚未经 X 射线衍射以及核磁共振证实, 数据库提供的构象为计算机预测结果。已有针对 stathmin 1 C 末端进行缺失突变的研究^[7], 但本实验针对 C 末端的 7 个氨基酸进行点突变的报道尚属首次。设计过程中本着尽可能地减少突变并且选择相似突变。经过多次更改氨基酸序列, 发现最少需要突变 3 个氨基酸残基, 即 143 位的丙氨酸突变为甘氨酸, 145 位和 147 位的谷氨酸突变为谷氨酰胺, 才可以破坏 C 末端的 α 螺旋结构, 结果显示破坏 C 末端第 1 个 α 螺旋不能影响 stathmin 1 的微管去组装功能, 尚需进一步实验来寻找 stathmin 1 的关键功能模序列。

实验验证了过表达载体以及突变载体对黑色素细胞 stathmin 1 表达的影响。结果表明 stathmin 1 对于维持黑色素细胞内环境稳态很重要, 上调表达会促进细胞凋亡, 这一现象与 Rubin 等^[10]的研究结果一致。

实验中 stathmin 1 有效维持黑色素细胞生死平衡的现象进一步验证了 stathmin 1 在细胞内微管组装中作为微管去组装分子的重要作用。对 K562 细胞的研究表明过表达 stathmin 1 在有丝分裂早期阻止纺锤体形成, 导致细胞停滞在有丝分裂的后期^[10]。本实验过程中虽然看到了细胞凋亡, 亦有微管形态的改变, 但却没有检测到细胞周期改变, 因此需要进一步实验探讨。

酪氨酸酶活性不仅决定了黑色素产量而且与黑色素细胞的分化成熟相关^[11]。因此, stathmin 1 是否存在微管非依赖途径影响黑色素细胞分化的功能就成为 1 个让人感兴趣的课题, 值得进一步去研究探讨。

实验结果表明 stathmin 1 突变体可以发挥同野生型 stathmin 1 异常表达同样的效应, 并未观察到突变对 stathmin 1 功能有明显的影响, 这与 C 末端的 α 螺旋结构对于其发挥微管解聚功能必不可少的部分研究报道^[10, 12]结果不一致, 原因可能是虽然对 stathmin 1 进行了 C 末端的突变, 但仍然保留了 stathmin 1 的 4 个磷酸化位点以及 N 末端的结构, 因此 stathmin 1 还会继续发挥部分正常功能。

[参 考 文 献]

- [1] Wallon G, Rappsilber J, Mann M, et al. Model for stathmin/OP18 binding to tubulin [J]. *Embo J*, 2000, 19 (2): 213 - 222.
- [2] Hayashi K, Pan Y, Shu H, et al. Phosphorylation of the tubulin - binding protein, stathmin, by Cdk5 and MAP kinases in the brain [J]. *J Neurochem*, 2006, 99(1): 237 - 250.
- [3] Marklund U, Larsson N, Gradin HM, et al. Oncoprotein 18 is a phosphorylation - responsive regulator of microtubule dynamics [J]. *Embo J*, 1996, 15 (19): 5290 - 5298.
- [4] Gradin HM, Larsson N, Marklund U, et al. Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP - dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells [J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(1): 131 - 141.
- [5] 潘 艳, 鞠桂芝, 佟明华, 等. 人肝再生增强因子 FAD 辅助的巯基氧化酶活性测定及其活性位点研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(11): 2247 - 2250.
- [6] 杨云霞, 冯 云, 王伯瑶. PCR 定点突变法构建人抗菌肽 FALL - 39 基因突变体及其功能的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(11): 1565.
- [7] Segerman B, Larsson N, Holmfeldt P, et al. Mutational analysis of Op18/stathmin - tubulin - interacting surfaces. Binding cooperativity controls tubulin GTP hydrolysis in the ternary complex [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (46): 35759 - 35766.
- [8] Hunt G, Thody A. Agouti protein can act independently of melanocyte - stimulating hormone to inhibit melanogenesis [J]. *J Endocrinol*, 1995, 147(2): R1 - R4.
- [9] Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, et al. Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity [J]. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(1): 12 - 17.
- [10] Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(2): 242 - 250.
- [11] Hirobe T, Wakamatsu K, Ito S, et al. The slaty mutation affects eumelanin and pheomelanin synthesis in mouse melanocytes [J]. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(6): 537 - 549.
- [12] Holmfeldt P, Larsson N, Segerman B, et al. The catastrophe - promoting activity of ectopic Op18/stathmin is required for disruption of mitotic spindles but not interphase microtubules [J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(1): 73 - 83.