

c-abl 通过与雌激素受体 β 相互作用 上调其转录活性

高 远¹⁾ 陈宣男^{2,3)} 魏从文⁴⁾ 郑子瑞⁴⁾ 马红芳⁴⁾ 倪才飞⁴⁾
宋 婷⁴⁾ 齐国先^{1)*} 钟 辉^{4)*} 何 湘^{2)*}

(¹⁾中国医科大学附属第一医院心血管内科, 沈阳 110001; ²⁾解放军疾病预防控制中心, 北京 100071;

³⁾吉林大学公共卫生学院, 长春 130012; ⁴⁾北京生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 雌激素受体 β (ER β) 在心血管疾病发生发展中起着重要的作用, 但是其在心血管病中发挥作用的机制还不清楚. 因此寻找与 ER β 相互作用的共调节因子对阐明 ER β 信号通路具有重要价值. 应用 GST 沉淀、免疫共沉淀技术, 发现 ER β 可以与 c-abl 相互作用, 并可被 c-abl 磷酸化. 通过荧光素酶报告基因方法发现, c-abl 可以上调 ER β 转录激活的活性, 并且上调作用可以被 c-abl 的抑制剂 STI571 抑制. 上述结果提示 c-abl 是新的 ER β 共刺激因子, 为进一步研究 ER β 通路在心血管疾病中发挥作用的机制打下基础.

关键词 雌激素受体 β (ER β), c-abl, 心血管疾病, 蛋白质相互作用

学科分类号 Q2, Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00466

雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 分为 ER α 和 ER β , 它们在结构上有高度的同源性, 但在组织分布、对天然和人工激素的结合亲和性、转录激活活性等方面则有所不同. 在研究 ER β 基因敲除小鼠 (ER β -KO mice) 时, 研究人员发现, 随着年龄的增长, ER β 基因敲除小鼠会产生高血压^[1-2]. 研究还发现, 从 ER β 敲除小鼠分离的血管平滑肌细胞有多重离子通道障碍, ER β 的多态性与左心室大、左心室壁厚及高血压相关, ER β 通过刺激 PI3K/Akt 通路, 促进急性心梗的预后. 此外, 流行病学资料显示, 心血管疾病的发病率与死亡率存在明显的性别差异^[3-6]. 因此, ER β 在心血管系统的调节中发挥了重要作用.

尽管 ER β 在心血管系统中发挥了重要的作用, 但是它发挥作用的分子机制并不清楚. 本研究拟寻找新型的 ER β 调节因子, 为研究 ER β 在心血管系统发挥作用的机制打下基础, 这对心血管疾病预防、诊断和治疗具有重要意义.

本文通过对 ER β 序列分析发现, ER β 存在与非受体性酪氨酸激酶 c-abl 相互作用的模体^[7], 二者可能存在相互作用, 我们通过实验证明了这一猜

想, 因此 c-abl 是 ER β 潜在的共调节因子.

1 材料与方法

1.1 载体、细胞株、质粒及试剂

真核表达载体 pcDNA3 为 Invitrogen 公司产品; pcDNA3/flag 为中国医科大学构建保存; PGEX-4T-1 载体为中国医科大学保存; 限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶、Pyrobest 酶等均购自 Takara 公司; 感受态大肠杆菌 DH5 α 、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 Tiangen 公司产品; 引物和测序由奥科公司完成; 转染用脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; 荧光素酶活性测定试剂盒购自 Promega 公司; Flag 抗体购自 Sigma 公司; Myc 抗体购自 Santa cruz 公司; 4G10

* 通讯联系人. Tel: 024-83283150

齐国先. E-mail: qigx2002@medmail.com.cn

钟 辉. E-mail: jiaozi0927@126.com

何 湘. E-mail: hexiang_spring@yahoo.com

收稿日期: 2009-07-31, 接受日期: 2009-10-22

抗体购自 Cell Signaling 公司; DMEM 培养基为组因生物公司产品; 新生小牛血清购自四季青公司; 格列卫(STI571)为 NOVARTIS 公司出品; ERE 启动子荧光素酶报告基因载体(ERE-luc)质粒由叶棋农教授惠赠. c-abl 相关质粒由曹诚研究员惠赠. 293T、人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 为中国医科大学实验室保存.

1.2 ER β 真核表达载体构建及鉴定

根据 NCBI 上报道的 ER β 编码序列, 设计引物扩增 ER β 基因. ER β 上游引物, 5' CGGGA-TCCATGGATATAAAAACTCACCATC 3', 引入 *Bam*H I 酶切位点; ER β 下游引物, 5' CCGCTC-GAGTCACTGAGACTGTGGG 3', 引入酶切位点 *Xho* I. 以乳腺癌 cDNA 文库为模板, PCR 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min 30 个循环; 72℃ 7 min. 双酶切的 PCR 与 pcDNA3/flag 16℃ 连接过夜. 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 用 Amp 抗生素筛选阳性克隆. 经 PCR 鉴定有插入片段后送奥科公司测序, 测序结果在 NCBI 上进行比对分析. 测序正确的克隆命名为 flag-ER β .

1.3 免疫共沉淀

细胞转染 24 h 后收集细胞, 预冷的 2 ml 1×PBS 洗涤细胞 3 次. 10 cm 培养皿的细胞加入 400 μ l 单去污剂裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.02%叠氮钠、1% NP-40 以及蛋白酶抑制剂(Roche, Inc) 1 片/25 ml), 将细胞与裂解液混匀, 冰浴 10 min 后 14 000 r/min 离心 10 min. 小心吸取细胞裂解上清, 加入 15 μ l 抗 -Flag 抗体交联的琼脂糖珠, 在 4℃ 旋转孵育 2 h, 进行免疫沉淀反应. 2 h 后, 4 000 r/min 离心 30 s, 小心弃去上清, IP 产物用 400 μ l 裂解液洗涤 3 次, 尽量将洗液吸净. 向 IP 产物中加入 30 μ l 1×SDS 凝胶上样缓冲液, 100℃ 水浴 5 min, 10 000 r/min 离心 2 min, 进行 SDS-PAGE.

1.4 GST-ER β 融合蛋白的制备和 GST 沉淀

GST、GST-SH2 和 GST-SH3 质粒转化 BL21 (DE3)感受态细胞, 挑取单克隆, 接种 5 ml LB (Amp)培养基, 37℃ 200 r/min 过夜培养. 取新鲜菌液按照 5%的接种量接种 100 ml LB(Amp)培养基, 37℃ 200 r/min 培养至菌液 $A_{600} = 0.6$. 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 16℃ 培养 12 h 后收集菌液, 用冰浴的 1×PBS 洗涤 2 次. 将菌体重悬于 10 ml 1×PBS 中, 超声破碎后离心取上清, 0.4 ml

Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Inc), 用 4 ml 冰浴的 PBS 洗涤 GSH (Glutathione) 珠子, 1 000 r/min 离心 30 s, 弃尽上清. 重复 3 次后加入细菌裂解上清, 4℃ 旋转孵育 2 h, 使 GST 融合蛋白与 GSH 珠子相交联. 2 h 后, 4 000 r/min 离心 2 min, 弃尽上清. 用 1 ml PBS 洗涤 3 次, 方法如前所述. 20 μ l/管分装后冻存于 -70℃ 备用.

GST 沉淀方法参见免疫共沉淀, 将抗 -Flag 抗体交联的琼脂糖珠换成 20 μ l GSH 珠子相交联 GST 融合蛋白即可.

1.5 免疫印迹

样品进行 SDS-PAGE, 电转移至 PVDF 膜后用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 5%脱脂奶粉稀释的一抗, 用 5%脱脂奶粉稀释的一抗室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 加入用 5%脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶偶联二抗. 室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 用化学发光法显色 5 min, 压片显影.

1.6 转录活性的测定

按照 Promega 公司试剂盒说明书进行. 转录活性的测定是将培养基从转染 24 h 待检细胞的培养皿中吸出, 用 1×PBS 轻柔漂洗细胞. 将 4 倍体积水加入 1 倍体积 5×裂解缓冲液(PLB), 向待检细胞中加入 100 μ l 的 1×裂解缓冲液以覆盖细胞. 室温裂解 20 min, 然后以 12 000 r/min 离心 15 s(室温), 将上清液转移至一个新试管中. 将荧光光度计的程序设置为 3 s 延迟及 10 s 荧光素酶活性测量读数. 将 100 μ l 荧光素酶检测试剂加入荧光光度计试管中, 每管加一个样品. 将 20 μ l 细胞裂解液加入装有荧光素酶检测试剂的荧光光度计试管中, 吹打混匀, 将荧光光度计试管置于 TD-20/20 型荧光光度计上检测萤火虫荧光素酶的发光值, 然后加入 100 μ l 反应终止液, 测定作为内参的海肾荧光素酶的发光值, 两者的比值即为荧光素酶的相对活性(relative luciferase activity, RLA).

2 结 果

2.1 ER β 真核表达载体的构建及其表达

我们从乳腺癌 cDNA 文库中扩增了 ER β 基因, 经酶切后连接入 Flag 载体, 鉴定后送测序, 序列比对完全正确的克隆命名为 Flag-ER β . 提取质粒后转入 293T 细胞, 免疫印迹证实 Flag-ER β 可在真核细胞中表达(图 1).

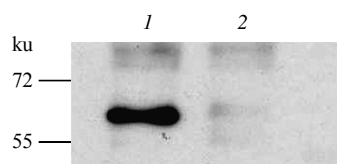


Fig. 1 The expression of ERβ in mammalian cells

Western blot analysis of the Flag-ERβ protein expressed in mammalian cells. 293T cells were transfected with Flag-ERβ (lane 1) or Flag-vector (lane 2). After 24 h transfection, the cells were lysed and subjected to SDS-PAGE for Western blot using anti-Flag antibody.

2.2 GST 沉淀证明 ERβ 与 c-abl 存在相互作用

由于 c-abl 全长的体外表达比较困难, 且 c-abl 与其他分子结合主要通过 SH2 和 SH3 结构域, 因此我们利用 GST-SH2 和 GST-SH3 进行了 GST 沉淀分析. 按材料与方法中所述, 制备转染 Flag-ERβ 的细胞裂解液, 将 GST、GST-SH2 和 GST-SH3 交联的 GSH 珠子分别与裂解液混合, 孵育后进行 GST 沉淀实验. 结果表明, GST-SH3 能与 Flag-c-abl 结合, 而阴性对照 GST 和 GST-SH2 不能与 Flag-ERβ 结合(图 2), 说明 c-abl 通过 SH3 结构域特异结合 ERβ, 验证了我们的猜想.

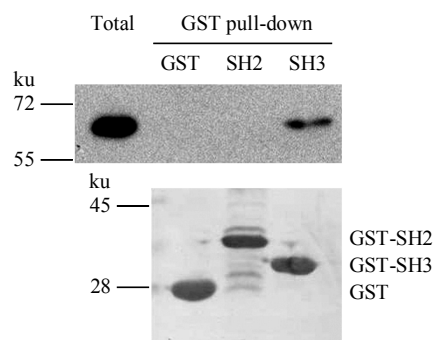


Fig. 2 The interaction of ERβ and c-abl by GST pulldown

293T cells were transfected with Flag-ERβ expressing plasmid. The GST fusion protein absorbates from cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibody.

2.3 免疫共沉淀证明 ERβ 与 c-abl 存在相互作用

按材料与方法中所述转染 24 h 后, 将各组细胞裂解, 加入 anti-Flag 或 IgG 抗体交联的珠子, 进行免疫共沉淀实验. 结果表明, Flag-ERβ 可以与 Myc-c-abl 结合, 但是同型 IgG 不与 Myc-c-abl 结合, 另外 anti-Flag 抗体交联的珠子也不与 Myc-c-abl 结合(图 3), 说明 Flag-ERβ 能特异结合

Myc-c-abl, 从而进一步验证二者可发生相互作用而形成复合物.

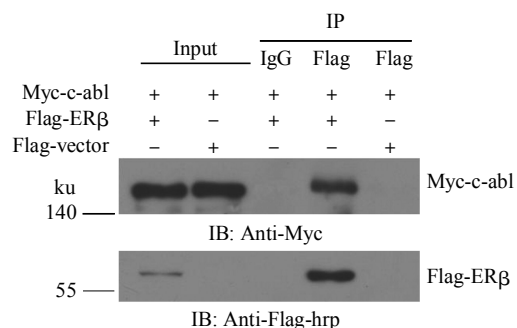


Fig. 3 The interaction of ERβ and c-abl by co-IP

293T cells were cotransfected with Myc-c-Abl and Flag-ERβ expression plasmids or Flag-vector, and anti-Flag or IgG immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-Myc or hrp labeled anti-Flag antibody.

2.4 c-abl 磷酸化 ERβ

因为 c-abl 是酪氨酸激酶, 我们用免疫共沉淀和免疫印迹进一步观察了 c-abl 是否能使 ERβ 发生酪氨酸磷酸化. 研究结果(图 4)表明, Flag-ERβ 可被 Myc-c-abl 酪氨酸磷酸化, 未加入 Myc-c-abl 则 Flag-ERβ 不能被磷酸化, 说明 ERβ 是酪氨酸激酶 c-abl 的底物.

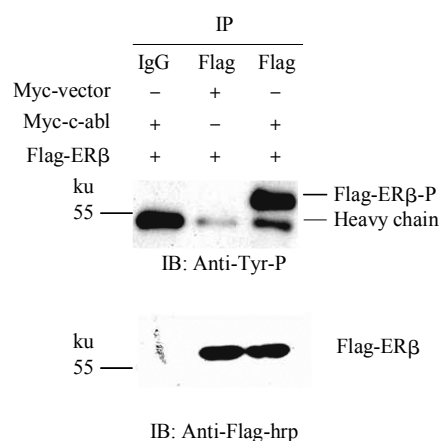


Fig. 4 c-abl Phosphorylate ERβ

293T cells were cotransfected with indicated plasmids, and anti-Flag immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-P-Tyr or anti-Flag antibody.

2.5 c-abl 对 ERβ 转录活性的影响

转录因子 ERβ 能激活含雌激素应答原件(ERE)基因的表达. 通过共转染 293T 细胞(ERα - ERβ-),

探讨了 c-abl 对 ER β 调节下游基因转录的影响. 结果如图 5 所示, flag-c-abl 能够使 ERE-Luc 报道基因的转录活性增强 2.22 倍. 但是作为对照, 单转 flag-vector 不能增强其转录活性, 说明 c-abl 通过与 ER β 相互作用增强它的转录活性. STI571 能够与 c-abl 结合, 并抑制其酪氨酸激酶活性, 从图 5 中可以看到, STI571 可以抑制由 c-abl 引起的转录增强作用, 进一步说明 c-abl 能够特异增强 ER β 的活性. 接下来, 我们在血管平滑肌细胞系 EA.hy926 中重复了这一实验, 得到了类似的结果, c-abl 能够使 ER β 转录活性增强 1.83 倍.

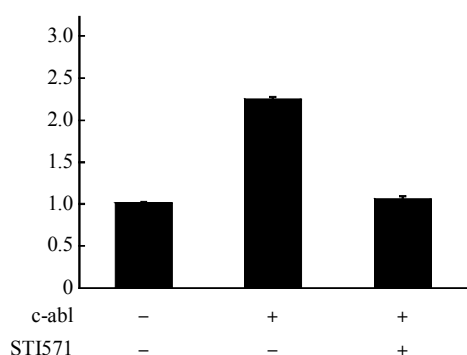


Fig. 5 The transcriptional activity of ER β upregulated by c-abl

293T cells were cotransfected with indicated plasmids, after 24 h culturing, the cells were lysed and luciferase activities were normalized with control. 12 h before luciferase activity assay, STI571 was added to the culture medium.

3 讨 论

在机体细胞内环境中, 蛋白质分子发挥其功能依赖于它们与其他分子间的相互作用. 蛋白质-蛋白质之间的相互识别和作用在蛋白质转运、信号传导、免疫识别、细胞调控等多种生命活动中起着重要的作用. 尤其对那些具有调控功能的蛋白质分子而言, 蛋白质之间的相互作用显得尤为重要. 一方面, 它需要其他蛋白质分子来调节自己的空间结构、活性状态、稳定性或接受上游分子传递的信号; 另一方面, 它又需要其他分子参与传递调控信息或者与某些蛋白质分子共同参与对细胞事件的调控. 在 ER 信号途径中, ER 活性的高效发挥也依赖于 ER 与其他蛋白质的相互作用, 这些与 ER 结合的蛋白质被称为 ER 共调节因子. 这些共调节因子与 ER 相互作用的改变或这些共调节因子本身基因结构、表达水平的改变, 均可能导致 ER 通路的

改变^[8]. 利用酵母双杂交、蛋白质亲和层析、免疫共沉淀结合质谱等技术, 已发现一些与 ER 相互作用的共激活因子和共抑制因子. 与 ER α 相互作用的共激活因子如 SRC-1、p68、SRC-1、GRIP1、AIB1 等. 但是 ER β 的共调节因子极少报道, 且已发现的共调节因子与心血管疾病的关系并不清楚. 因此我们很需要对 ER β 共调节因子进行深入的研究, 以便更好地了解心血管疾病发生发展的分子机理.

本文对 ER β 的序列进行了研究, 发现 ER β 在 20~23、230~233、467~470 位存在 3 个 PXXP 模体(P 为脯氨酸, X 为任意氨基酸), 而具有 PXXP 模体的蛋白质可能与 c-abl 发生相互作用. 本文进一步通过 GST 沉淀、免疫共沉淀等方法验证 ER β 与 c-abl 之间存在相互作用, c-abl 可以酪氨酸磷酸化 ER β , 并且可以增强 ER β 的转录活性.

c-abl (cellular-Abelson gene) 是 Abelson 鼠白血病病毒 (murine leukemia virus) v-abl 原癌基因在细胞内的同源基因, 广泛表达于哺乳动物各组织中. c-abl 也可在血管平滑肌、内皮细胞中表达, 参与血管平滑肌增生、损伤修复等^[9~11]. 此外, c-abl 特异的抑制剂 STI571 可以引起不明原因的心脏衰竭^[12], 说明 c-abl 参与了心血管系统的调节. c-abl 作为非受体型酪氨酸激酶, 主要通过其激酶活性, 使底物蛋白质酪氨酸磷酸化来调节细胞的生命过程. STI571 作为 2- 苯胺嘧啶类药物中的一种, 能够与 c-abl 结合, 并抑制其酪氨酸激酶活性, 已被广泛用于慢性粒细胞白血病(CML)的临床治疗. 我们实验结果表明 ER β 可以被 c-abl 磷酸化, 并且磷酸化作用可以被 c-abl 激酶抑制剂 STI571 抑制.

本研究初步发现 c-abl 可以增强 ER β 的转录活性, 而 STI571 可以抑制这种增强作用, 说明 c-abl 是 ER β 的共刺激因子. 这些结果为我们进一步研究 c-abl 影响 ER β 转录活性的机制以及 c-abl 调节 ER β 通路在心血管系统中起到的作用打下基础.

参 考 文 献

- [1] Zhu Y, Bian Z, Lu P, *et al.* Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science*, 2002, **295**(5554): 505-508
- [2] Skavdahl M, Clark J, Murphy E, *et al.* Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288** (2): H469-476
- [3] Wang M, Wang Y, Weil B, *et al.* Estrogen receptor beta mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved

- myocardial function in female hearts following acute ischemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, **296**(4): 972–978
- [4] Ellis J A, Infantino T, Harrap S B. Sex-dependent association of blood pressure with oestrogen receptor genes ER α and ER β . *J Hypertens*, 2004, **22**(6): 1127–1131
- [5] Arias-Loza P A, Jazbutyte V, Pelzer T. Genetic and pharmacologic strategies to determine the function of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in cardiovascular system. *Gend Med*, 2008, **5**(Suppl A): S34–45
- [6] Babiker F A, Lips D, Meyer R, *et al.* Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(7): 1524–1530
- [7] Liu X, Huang W, Li C, *et al.* Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation. *Mol Cell*, 2006, **22**(3): 317–327
- [8] 王晓辉, 张浩, 周蕾, 等. ER β 相互作用蛋白 PSMC5 的分离及其在 ER β 信号途径中的作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22**(5): 384–389
- Wang X H, Zhang H, Zhou L, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, **22**(5): 384–389
- [9] Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S, *et al.* cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT1 receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circ Res*, 2005, **97**(8): 829–836
- [10] Kimura S, Egashira K, Nakano K, *et al.* Local delivery of imatinib mesylate (STI571)-incorporated nanoparticle *ex vivo* suppresses vein graft neointima formation. *Circulation*, 2008, **118**(14 Suppl): S65–70
- [11] Bregeon J, Loirand G, Pacaud P, *et al.* Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, **297**(5): C1062–1070
- [12] Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, *et al.* Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med*, 2006, **12**(8): 908–916

c-abl Upregulates The Transcriptional Activity of ER β by Their Interaction

GAO Yuan¹⁾, CHEN Xuan-Nan^{2,3)}, WEI Cong-Wen⁴⁾, ZHENG Zi-Rui⁴⁾, MA Hong-Fang⁴⁾,
NI Cai-Fei⁴⁾, SONG Ting⁴⁾, QI Guo-Xian^{1)*}, ZHONG Hui^{4)*}, HE Xiang^{2)*}

¹⁾ The First Affiliated Hospital of China Medical University, Department of Cardiovascular, Shenyang 110001, China;

²⁾ The Institute of Disease Control and Prevention, PLA, Beijing 100071, China;

³⁾ School of Public Health Ji Lin University, Changchun 130012, China;

⁴⁾ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

Abstract Estrogen receptor β (ER β) plays an important role in the development and progression of cardiovascular disease, but the mechanism is not clear yet. Thus, it is of great significance to discover ER β interacting coregulators. It was identified a non-receptor tyrosine kinase c-abl as a novel ER β cofactor. Both GST pull-down and co-IP assay indicated that ER β interacted with c-abl *in vivo* and *in vitro*, and phosphorylation immunoblotting showed that ER β can be phosphorylated by c-abl. Furthermore, the luciferase assay showed that c-abl enhanced ER β mediated transcriptional activities, while c-abl inhibitor STI571 abolished c-abl mediated upregulation of ER β transcriptional activity. These data suggest that c-abl was a novel co-activator of ER β , which may uncover a role of ER β signaling in cardiovascular disease.

Key words estrogen receptor β , c-abl, cardiovascular disease, protein-protein interaction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00466

*Corresponding author. Tel: 86-24-83283150

QI Guo-Xian. E-mail: qigx2002@medmail.com.cn

ZHONG Hui. E-mail: jiaozi0927@126.com

HE Xiang. E-mail: hexiang_spring@yahoo.com

Received: July 31, 2009 Accepted: October 22, 2009