

活细胞内以光漂白荧光损失(FLIP)技术分析HuR蛋白的应激动力学行为

高星杰^{1#} 张毅^{2#} 付雪³ 苏超¹ 张春燕³ 张桂敏³ 尹洁¹
王鑫廷³ 姚智³ 杨洁^{1,3*}

(¹天津医科大学基础医学研究中心, 天津 300070; ²天津医科大学药学院, 天津 300070;

³天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

摘要 人类抗原R(human antigen R, HuR)是一种多功能RNA结合蛋白, 参与细胞应激颗粒(stress granules, SGs)的构成。SGs是细胞在受到外界环境刺激时在胞浆中形成的颗粒状结构。该研究是利用光漂白荧光损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)技术对活细胞内的HuR蛋白颗粒进行应激动力学分析。首先, 利用脂质体将RFP-HuR重组质粒瞬时转染入HeLa细胞, 以Western blot和细胞免疫荧光实验确定是否实现对于HuR蛋白的红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记; 然后以405 nm激光束脉冲式重复光漂白HuR应激颗粒, 分别监测同一漂白细胞内的其他HuR颗粒以及核内荧光信号, 并以邻近的未漂白细胞作为对照组。实验结果表明, 转染重组质粒后可有效表达RFP-HuR融合蛋白, 且与SGs标记蛋白G3BP存在共定位关系。在第一个光漂白循环, 漂白区荧光密度便从2 500 a.u.降低至0 a.u.; 而经过约12个漂白循环(240 s)后, 邻近HuR颗粒的荧光密度从漂白前的1 800 a.u.左右降低并维持在200 a.u.左右, 表明活细胞内的HuR颗粒呈现高度的动态性; 而胞核区荧光密度亦从4 400 a.u.降低至2 000 a.u.左右, 表明HuR蛋白是一种核浆穿梭蛋白, 在SGs、胞浆及胞核之间存在一定的动态平衡。利用FLIP技术可以分析并比较SGs不同成分的应激动力学属性, 有助于进行SGs相关临床疾病的分子机制探讨。

关键词 HuR蛋白; 光漂白荧光损失; 应激颗粒; 活细胞; 荧光标记

The Analysis on the Dynamic Properties of HuR Granules in Living Cells via FLIP Technology

Gao Xingjie^{1#}, Zhang Yi^{2#}, Fu Xue³, Su Chao¹, Zhang Chunyan³, Zhang Guimin³, Yin Jie¹,
Wang Xinting³, Yao Zhi³, Yang Jie^{1,3*}

(¹Basic Medical College and Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ²College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ³School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract HuR (human antigen R), a kind of multifunctional RNA-binding protein, is involved in the SGs (stress granules) assembly. SGs are a type of cytoplasmic RNA foci that accumulate in response to environmental

收稿日期: 2014-04-18 接受日期: 2014-05-27

国家杰出青年科学基金(批准号: 31125012)、国家自然科学基金(批准号: 21305103、31100967、31170830、31370749)、教育部“创新团队发展计划”(批准号: IRT13085)和中国博士后科学基金(批准号: 2013T60258)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 022-83336806, E-mail: yangj@tjmu.edu.cn

Received: April 18, 2014 Accepted: May 27, 2014

This work was supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (Grant No.31125012), National Natural Science Foundation of China (Grant No.21305103, 31100967, 31170830, 31370749), Program for Innovative Research Team of Ministry of Education (Grant No.IRT13085) and China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2013T60258)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336806, E-mail: yangj@tjmu.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-28 10:14 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0134.html>

stress stimuli. Here, the fluorescence loss in photobleaching (FLIP) technology was used to study the dynamic nature of HuR granules in living cells. Firstly, the plasmid encoding RFP-HuR fusion protein was transfected into HeLa cells via the liposome reagent. Western blot and immunofluorescence assays were then performed to verify the expression of RFP-HuR protein. For FLIP assay, one HuR granule region of interest (ROI) was repeatedly photo-bleached using 405 nm laser beam, other granule or nuclear region were monitored, and the adjacent non-bleached cell was used as a control. The results indicated that RFP-HuR fusion protein was expressed efficiently and co-localized with the G3BP (Ras-GAP SH₃ domain-binding protein) (one SGs marker protein) in HeLa cells. In FLIP assay, fluorescence density in the cytosolic pulse bleach region was reduced from 2 500 a.u. to 0 a.u. after the first bleaching. The fluorescence density of the adjacent HuR granule region reduced from 1 800 a.u. and maintained at about 200 a.u. after 12 bleaching cycles (240 s), suggesting that HuR-containing SGs structure is highly dynamic. The nuclear fluorescence density also reduced from 4 400 a.u. to 2 000 a.u., suggesting that HuR is a nucleocytoplasmic shuttling protein. The nuclear pool of HuR protein is likely to be in equilibrium with cytosolic SGs-routed pool. The FLIP technology can be used to analyze the dynamic properties of different stress associated proteins, helping to investigate the molecular mechanisms underlying the SGs-related diseases.

Key words HuR protein; fluorescence loss in photobleaching; stress granules; living cells; fluorescence labeling

人类抗原R(human antigen R, HuR)属于果蝇胚胎致死异常视觉(embryonic lethal abnormal vision, ELAV)家族, 在转录后水平调控真核细胞基因表达, 可增强RNA的稳定性, 参与发育、肿瘤发生、细胞应激等过程^[1-3]。研究发现, HuR蛋白参与细胞应激颗粒的形成^[4]。光漂白荧光损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)技术能够有效地分析活细胞内的单分子运动^[5], 本研究中即以此技术分析活细胞内红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记HuR蛋白颗粒的应激动力学行为。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HeLa细胞为本实验室冻存; RFP-HuR重组质粒由美国宾夕法尼亚大学John L. Goodier教授馈赠; RFP-CI空载质粒、多聚甲醛、NP-40裂解液、脱脂牛奶、TBST液购自天津(希尔贝思)公司; 去内毒素质粒提取试剂盒购自Promega公司; 单克隆兔源抗RFP抗体购自MBL公司; 多克隆兔源抗HuR抗体购自Millipore公司; 单克隆鼠源抗G3BP(Ras-GAP SH₃ domain-binding protein)抗体购自Abcam公司; LumiGlo化学发光底物、辣根过氧化物酶标记的抗兔源IgG二抗购自KPL公司; DMEM高糖培养基、Alexa Fluor 488标记的驴抗鼠IgG荧光二抗、脂质体lipo 2000购自Invitrogen公司; 细胞荧光封片液购

自Santa Cruz公司; BCA蛋白定量试剂盒购自美国Pierce公司; 亚砷酸钠购自Sigma公司; 激光共聚焦皿购自NEST公司; 激光共聚焦荧光显微镜(基础医学研究中心)购自日本Olympus公司。

1.2 Western blot实验

以去内毒素质粒提取试剂盒提取无内毒素重组质粒RFP-HuR重组质粒及RFP空载质粒。以含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(含酚红), 37 °C、5% CO₂培养箱常规培养HeLa细胞, 依据产品说明书分别以脂质体lipo 2000瞬时转染RFP-HuR、RFP质粒, 转染48 h后以NP-40裂解液裂解HeLa细胞, 获全细胞裂解液; 以BCA蛋白定量试剂盒检测裂解液中总蛋白浓度; 加入SDS上样缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%甘油, 2.5% β-巯基乙醇), 99 °C热变性5 min; 10% SDS-PAGE电泳; 以半干转法将凝胶上蛋白转移至PVDF膜(转膜25 V, 50 min); 以5%脱脂牛奶-TBST液封闭PVDF膜2 h; TBST液洗涤3次, 10 min/次; 分别加入兔源抗HuR或RFP一抗(1:1 000), 4 °C孵育过夜; TBST液洗涤3次, 10 min/次; 加入辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG二抗(1:15 000)室温孵育2 h; TBST液洗涤3次, 10 min/次; 加入LumiGlo化学发光底物后暗室曝光。

1.3 细胞免疫荧光实验

将高压灭菌后的盖玻片放置入12孔板中, 接种并常规培养HeLa细胞, 以脂质体lipo 2000瞬时转染

RFP-HuR重组质粒, 转染48 h后, 分为未处理组与应激组, 其中应激组给予0.5 mmol/L亚砷酸钠处理1 h, 4%多聚甲醛室温固定细胞10 min, PBS缓冲液洗涤2次, 5 min/次; 0.2%通透液(含0.2% Triton X-100的PBS缓冲液)室温静置通透10 min; 再加入1% BSA封闭1 h; 加入鼠源抗G3BP一抗(1:200), 4 °C孵育过夜。PBS缓冲液洗涤3次, 10 min/次; 再加入Alexa Fluor 488标记的驴抗鼠IgG荧光二抗(1:800), 4 °C孵育8 h。PBS缓冲液洗涤3次, 10 min/次; 取出盖玻片, 以细胞荧光封片液进行封片处理, 4 °C过夜, 以激光共聚焦荧光显微镜检测细胞内的荧光信号。

1.4 光漂白荧光损失(FLIP)技术

以激光共聚焦皿常规培养HeLa细胞, 以脂质体 lipo 2000瞬时转染RFP-HuR质粒, 转染24 h后, 给予0.5 mmol/L亚砷酸钠处理0.5 h, 换上含10%胎牛血清的无酚红DMEM高糖培养基。如图1所示, 在激光共聚焦显微镜油镜下随机选取1个表达有RFP-HuR融合蛋白的待漂白细胞和1个相邻的对照细胞, 并确定6个兴趣区(region of interest, ROI), 包括漂白细胞的胞浆脉冲式漂白区(#1, cytosolic pulse bleach ROI)、胞浆检测区(#2, cytosolic detection ROI)、胞核检测区(#3, nuclear detection ROI), 对照细胞的胞核检测区(#4, nuclear detection ROI in control cell)、胞浆检测区(#5, cytosolic detection ROI in control cell)以及背景检测区(#6, background detection ROI), 其中胞浆检测区均含1个RFP-HuR应激颗粒。漂白处理前进行拍照(注意选择最低的激发光强度), 然后以405 nm激

光束、50%激光强度、10 μ s/像素的扫描速度对#1区进行光漂白处理10 s, 然后进行拍照, 在光漂白后间隔10 s进行下一循环的光漂白处理, 共进行60个脉冲式漂白循环(1 200 s)。最后以激光共聚焦显微镜的分析软件检测不同时点6个兴趣区的荧光密度值, 并以Excel软件进行曲线图分析。#1~#5位点的荧光密度值均减去相应时间点背景#6的荧光密度值。独立实验重复3次, 每次实验分别选择3组细胞。

2 结果

2.1 RFP-HuR质粒的鉴定

将RFP-HuR重组质粒与RFP对照空载质粒分别瞬时转染入HeLa细胞, 48 h后裂解细胞分别以兔源抗RFP、抗HuR抗体进行Western blot鉴定。如图2A所示, 当转染RFP-HuR后, 抗RFP抗体在62 kDa位置检测到融合表达有RFP标签的HuR蛋白, 而转染RFP质粒的对照组, 仅在26 kDa位置检测到RFP蛋白条带。当以抗HuR抗体检测时, 在两组的36 kDa位置均可检测到内源性的HuR蛋白, 而仅在转染RFP-HuR组的62 kDa位置检测到外源表达的RFP-HuR融合蛋白(图2B)。这些结果表明, RFP-HuR重组质粒在HeLa细胞内成功表达RFP-HuR融合蛋白。

2.2 RFP-HuR融合蛋白与G3BP蛋白的荧光共定位分析

将RFP-HuR重组质粒转染入HeLa细胞以表达RFP标记的HuR蛋白, 同时以细胞免疫荧光实验对内源性G3BP蛋白进行绿色荧光染色。如图3所示,

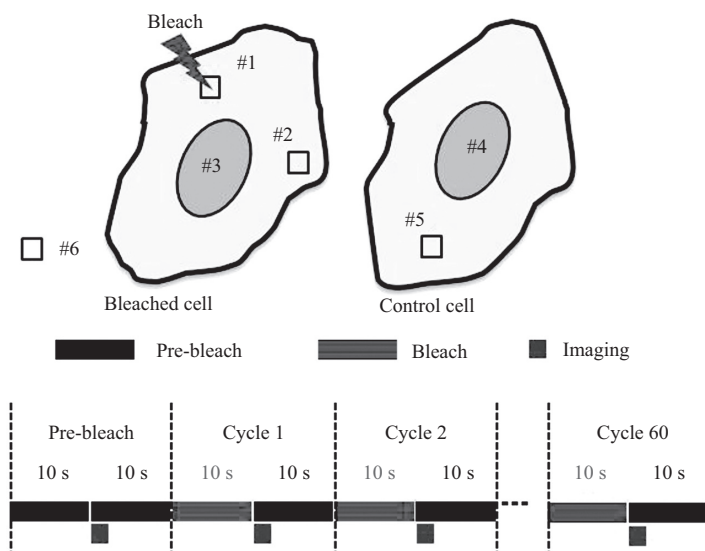


图1 光漂白荧光损失实验设计示意图

Fig.1 The schematic diagram of FLIP assay

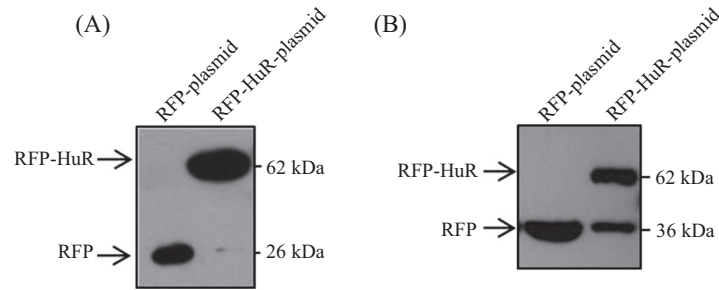


图2 RFP-HuR重组质粒在HeLa细胞内的蛋白表达分析

Fig.2 The analysis on the protein expression of RFP-HuR plasmid in HeLa cells

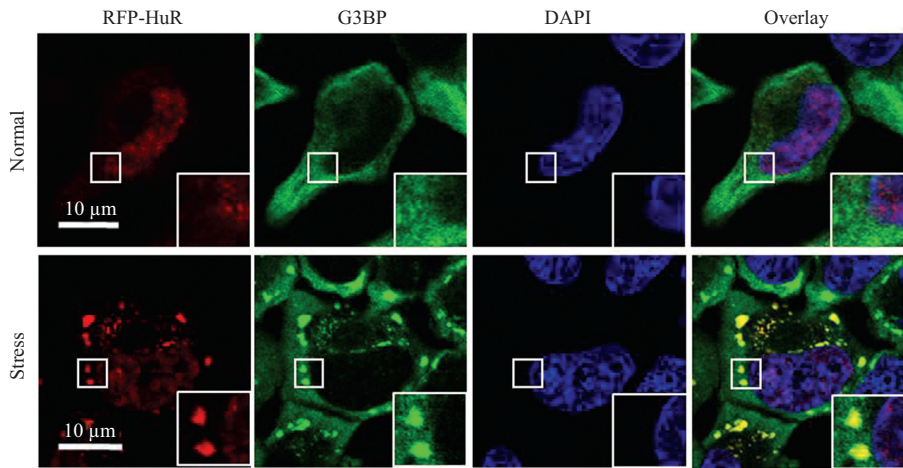
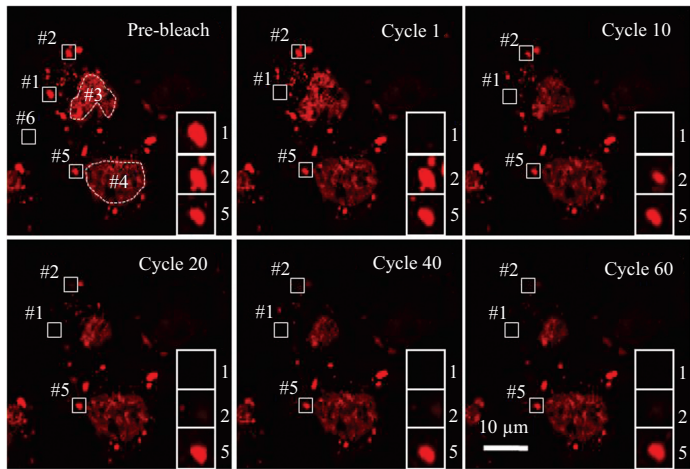


图3 RFP-HuR融合蛋白与G3BP蛋白的荧光共定位分析

Fig.3 The fluorescence co-localization between RFP-HuR and G3BP protein



#1: 漂白细胞的胞浆脉冲式漂白区; #2: 漂白细胞的胞浆检测区; #3: 漂白细胞的胞核检测区; #4: 对照细胞的胞核检测区; #5: 对照细胞的胞浆检测区; #6: 背景检测区。
#1: cytosolic pulse bleach ROI; #2: cytosolic detection ROI; #3: nuclear detection ROI; #4: nuclear detection ROI (in the adjacent non-bleached cell, as a control); #5: cytosolic detection ROI (in control cell); #6: background detection ROI.

图4 应激状态下RFP-HuR蛋白的光漂白荧光损失实验

Fig.4 FLIP analysis of RFP-HuR in HeLa cells under stress condition

融合表达的RFP-HuR蛋白在未处理(Normal)时主要分布在胞核, 而当给予0.5 mmol/L亚砷酸钠应激处理(Stress)后, RFP-HuR蛋白在胞浆中呈现颗粒状聚

集, 这种颗粒结构与SGs的标记蛋白G3BP存在共定位关系, 表达RFP-HuR蛋白可以参与细胞SGs的构成。

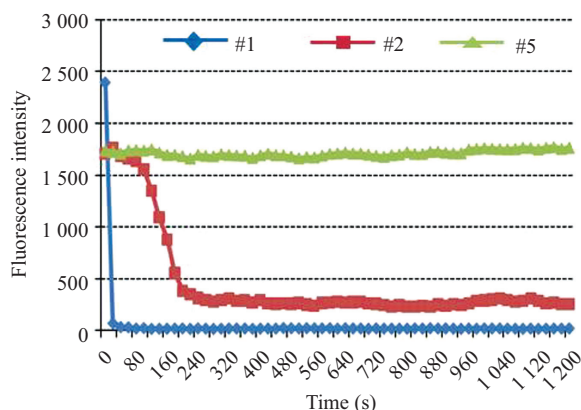


图5 光漂白处理对邻近RFP-HuR颗粒的影响

Fig.5 The effect of photo-bleaching on the adjacent RFP-HuR granules

2.3 转染RFP-HuR质粒后光漂白荧光损失实验

将RFP-HuR重组质粒转染入HeLa细胞后, 以光漂白荧光损失(FRAP)技术分析活细胞内HuR蛋白颗粒的应激动力学行为。如图4、图5所示, 给予#1区脉冲式重复光漂白后, 其颗粒荧光信号完全消失, 在第一个光漂白循环后便从2 500 a.u.降低为0 a.u.; 随着漂白循环数的增多, 同一细胞邻近的#2区颗粒荧光信号逐渐消失, 荧光密度从漂白前的约1 800 a.u.降低为200 a.u., 表明HuR应激颗粒并不是一个固定的结构, 而是表现出一定的颗粒动态性。同时, 对照细胞内的#5区颗粒信号并无明显变化, 表明漂白间隔拍照时激发光对于荧光蛋白的漂白作用很小。

与此同时, 漂白细胞胞核内#3区的荧光信号随着漂白循环数的增多而逐渐降低, 在约12个漂白循环(240 s)后, 其荧光值维持在2 000 a.u.左右(图6), 表明HuR蛋白是一种核浆穿梭蛋白, 可能参与HuR蛋白的应激生物学行为。

3 讨论

生理状态下, HuR蛋白主要定位于细胞核中; 当细胞受到氧化应激、紫外线照射等外界环境刺激时, HuR蛋白从胞核转运至胞浆, 参与细胞应激颗粒(SGs)的形成^[4]。目前, SGs被认为是应激状态下真核细胞发挥RNA保护作用的特殊场所^[6-7]。研究发现, HuR蛋白可与多种mRNA的3'端非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)结合, 避免其被核酸酶降解, 从而增强mRNA的稳定性, 然而HuR蛋白是否会通过SGs发挥应激状态下的mRNA保护作用尚不清楚。另外, SGs聚集过程的异常或应激蛋白动力学属

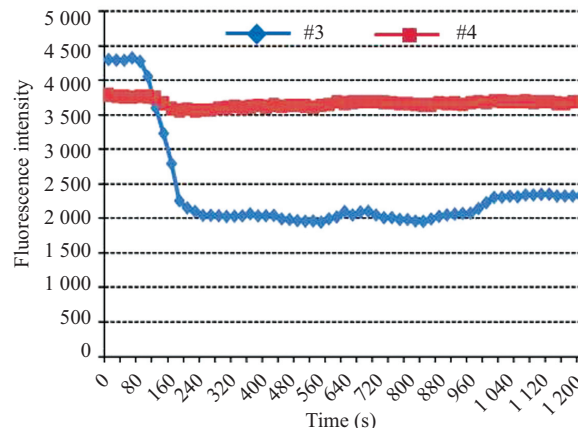


图6 光漂白处理对核内RFP-HuR信号的影响

Fig.6 The effect of photo-bleaching on the nuclear signal of RFP-HuR protein

性的变化常常会影响细胞功能, 与肿瘤、缺血再灌注损伤等多种临床疾病相关^[8-9], 因此研究HuR蛋白在真核细胞内的应激动力学行为很有意义。

细胞是生命体最基本的功能单位, 对于单个“活”细胞的实时动态监测和量化分析有助于真实、准确、全面地获取细胞信息^[10-11]。对于单个活细胞中成分属性的检测得益于光学检测技术的发展, 尤其是近年来基于激光共聚焦显微镜的多项技术的广泛应用, 如活细胞工作站、光漂白荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)、荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、光漂白荧光损失(FRAP)等^[5,12]。其中, FRAP技术可用于检测活细胞内特定成分的动力学参数, 基本原理是以荧光探针标记活细胞内的蛋白或核酸分子, 借助高强度激光束照射胞内某一区域, 使该区域荧光分子发生光猝灭而成为漂白区; 该区域周围的非猝灭荧光分子会由于分子的流动性以一定的速率向漂白区扩散, 从而导致漂白区内荧光强度的逐渐恢复^[5]。荧光漂白损失(FRAP)是FRAP技术的扩展, 它是给予活细胞脉冲式重复光漂白处理, 周围流动态的荧光分子陆续扩散至漂白区发生光猝灭, 直至细胞内流动态荧光分子全部被漂白, 此时便可呈现非流动态荧光分子的胞内分布^[5,12]。另外, 通过激光扫描拍照及分析系统可以实现对于活细胞内目的分子的迁移速率、恢复速率、荧光强度变化等多种动力学参数的实时监测。值得注意的是, 在漂白期间进行拍照处理时, 必须以尽可能弱的激光扫描全视野, 减少对所有荧光蛋白的猝灭; 同时, 一定要设立好对照细胞, 以排除光漂白处理对于非漂白

区的荧光淬灭作用。

荧光抗体仅能用于研究固定后细胞内的蛋白、核酸、离子等成分变化,并不能用于检测活细胞;不同颜色的荧光蛋白(fluorescent protein)系列荧光探针则可融合光漂白、荧光示踪等光学技术,量化分析目的蛋白分子在活细胞内的运动速率、浓度变化以及区域分布等^[5,13]。本研究中便是通过瞬时转染RFP-HuR重组质粒入HeLa细胞,表达带有RFP标签的HuR蛋白,再进行活细胞内的FLIP分析。其中,RFP蛋白是从珊瑚*Discosoma* sp.分离得到的红色荧光蛋白,由225个氨基酸组成,最大吸收波长为558 nm,最大发射波长为583 nm。Western blot实验和免疫荧光共定位实验结果表明,转染重组质粒后可有效表达RFP-HuR融合蛋白,后者可反映活细胞内源性HuR的应激属性。

SGs是应激时细胞胞浆中的一类由蛋白质-核酸复合物聚集而成的动态颗粒结构,会随着刺激强度的变化而发生适应性的组装与去组装,进而发挥对于mRNA的应激保护作用^[6-7,9]。研究发现,当细胞受到应激刺激时,蛋白翻译过程暂时中止,mRNA从核糖体上解离,并在具有RNA结合能力的特定应激蛋白的护送下进入SGs中被保护起来;当应激解除时,mRNA又可借助应激蛋白离开SGs结构,重新进入胞浆继续进行蛋白翻译过程^[9,14-15]。HuR蛋白是定位于SGs中的一种RNA结合蛋白,目前对于它的应激动力学分析数据较少。本实验通过对于HuR蛋白的FLIP分析,发现随着对漂白区的脉冲式重复光漂白处理,邻近HuR应激颗粒的荧光强度逐渐降低,表明活细胞内HuR应激颗粒具有高度的流动性;而未漂白对照细胞内HuR应激颗粒信号变化不明显,从而排除了光漂白及拍照处理对于非漂白区的影响。另外,漂白细胞胞核内的荧光信号也会随着漂白循环的增多而逐渐降低,而对照细胞核内变化不明显,证明HuR蛋白的确是一种核浆穿梭蛋白。值得注意的是,在重复漂白处理后,虽然检测到邻近胞浆HuR颗粒及核内HuR荧光密度的逐渐降低,但并未完全消失,仍保留有一定强度的非流动态HuR荧光分子,表明在真核细胞受到外界应激后,HuR蛋白会在细胞胞浆、SGs、胞核之间发生动态性迁移,最终达到细胞内蛋白浓度分布上的平衡,有利于实现细胞应对环境刺激时的功能调整。

SGs结构中的应激蛋白成分通过自身修饰、蛋

白-核酸相互作用、胞内定位、迁移动力学的改变等多个环节发挥对于细胞内mRNA代谢的应激调控作用^[9,14-16]。利用FLIP技术可以检测不同状态下HuR等多种应激蛋白在活细胞中的动力学参数,有助于分析SGs成分迁移的方向、速度、比例等信息,构建相关理论模型,揭示其在mRNA代谢及细胞应激相关疾病中的作用机制。

参考文献 (References)

- 1 Wang J, Guo Y, Chu H, Guan Y, Bi J, Wang B. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int J Mol Sci* 2013; 14(5): 10015-41.
- 2 Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal* 2008; 20(12): 2165-73.
- 3 Wang H, Zeng F, Liu Q, Liu H, Liu Z, Niu L, *et al.* The structure of the ARE-binding domains of Hu antigen R (HuR) undergoes conformational changes during RNA binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2013; 69(Pt 3): 373-80.
- 4 Fujimura K, Katahira J, Kano F, Yoneda Y, Murata M. Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(11): 1728-37.
- 5 Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. Advanced fluorescence microscopy techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 2012; 17(4): 4047-132.
- 6 Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 2011; 23(2): 324-34.
- 7 Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 4(9): a012286.
- 8 Eberhardt W, Doller A, Akool el-S, Pfeilschifter J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* 2007; 114(1): 56-73.
- 9 Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 2008; 33(3): 141-50.
- 10 Day RN, Schaufele F. Imaging molecular interactions in living cells. *Mol Endocrinol* 2005; 19(7): 1675-86.
- 11 Day RN. Imaging protein behavior inside the living cell. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 230(1/2): 1-6.
- 12 Pranada AL, Metz S, Herrmann A, Heinrich PC, Müller-Newen G. Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* 2004; 279(15): 15114-23.
- 13 Hoffman RM. Fluorescent proteins as visible *in vivo* sensors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 113: 389-402.
- 14 Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends Biochem Sci* 2013; 38(10): 494-506.
- 15 Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 2005; 169(6): 871-84.
- 16 Ohn T, Anderson P. The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1(3): 486-93.