中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 1 期: 1~5
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

磷酸化 TrkA 受体在与其核转位相关的运输膜泡内的定位

龚爱华* 张志坚* 肖德生 杨 勇 王永忠 陈永昌

(江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 大量的跨膜受体能靶向并定位于细胞核内, 但细胞表面的受体是如何转运到细胞核内尚不清楚. 报道了磷酸化的 TrkA 在人脑胶质瘤细胞株 U251 中的定位. 利用免疫细胞化学和免疫荧光技术, 发现磷酸化的 TrkA 主要定位于一系列的运输泡和细胞核内, 这些膜泡包括: 细胞膜侧的环状泡、核周的大核心泡和小核心泡; 同时还观察到大核心泡出芽成小核心泡, 以及小核心泡与核膜相互作用. 基于上述结果认为这些膜泡可能与跨膜受体 TrkA 转位到核的通路相关.

关键词 TrkA 大核心泡 小核心泡 核转位

许多跨膜受体被发现定位在细胞核内 [1,2]. 它们可以调控基因的功能 [3,4], 细胞的分化 [5]和生长 [6,7]. 然而, 令人费解的问题是: 跨膜受体是如何转位到核的? 目前, 已有许多证据表明跨膜受体的全长以及去除跨膜区或者胞外区的片段均可以转位和积聚在细胞内 [8~12]. 根据这些有说服力的证据, 多个跨膜受体核转位模型被提出, 这些模型均认为: 跨膜受体是从膜脂质双分子层"逃离"到细胞质后进入细胞核的. 2002 年Wells和Marti[1]总结了相关的研究结果(主要是关于表皮生长因子转位到核的证据), 并提出了全长和片段的受体"逃离"的三种不同的机制. 除了上述机制外, 其他学者也提出了一些类似的假设, 对于上述"逃离"机制进行补充, 例如: 跨膜受体经由内质网相关的降解系统从膜上"逃离"后, 进入细胞质中, 再转位到细胞核内 [2]. 在最近的文献中, 又一个新的模型认为: 跨膜受体ErbB-2 经由早期内体转位进入细胞核内 [13]. 然而, 该模型依然认为受体必须首先从双分子膜上"逃离"后, 才能转位到细胞核内.

在前期的研究中, 在细胞系U251 中发现NGF/TrkA积聚在细胞核和有丝分裂器上 [14], 那么, 跨膜受体TrkA是否同样通过上述"逃离"的方式转位到细胞核? 我们发现受体在内化后, 磷酸化的TrkA(pTrkA)定位在一系列转运泡中, 受体在其中被分选和浓缩, 最终可能通过膜泡与核膜相互作用的方式将受体释放入细胞核内.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞株 U251 购自 ATCC, 用含 10%小牛血清(GIBCO)的 DMEM(GIBCO)培养液, 37℃, 5%CO_2 培养细胞, 细胞长满后, 以 2×10^5 个/mL 浓度接种到 35 mm 培养皿和 24 孔板(Coster, 美国)中, 每孔 0.5 mL. 37℃, 5%CO_2 培养 72 h.

1.2 免疫细胞化学染色

将上述细胞吸去培养基, 洗涤, 用 4%多聚甲醛固定, 室温下放置 40 min. 常规免疫组化染色如下: 用 0.3% Triton X-100 处理 10 min 后, 用 3%过氧化氢甲醇溶液孵育 10 min, 封闭内源性的过氧化物酶的活性, 然后, 用 1%的羊血清孵育 1 h, 以降低非特异

收稿日期: 2006-09-13; 接受日期: 2006-12-18
国家自然基金资助项目(批准号: 30270639, 30570894, 30570981)
* 联系人, E-mail: ahg5@163.com, zzj@ujs.edu.cn

性抗体结合. 然后, 加入 1∶200 兔抗人 pTrkA 多克隆抗体(Tyr496, Santa Cruz), 4℃过夜, 第二天 37℃孵育 1 h, 接着用 PBS 漂洗 5 次, 再加入 1∶200 羊抗兔 IgG-biotin(Vector), 37℃孵育 1 h, 再用 PBS 漂洗 5 次, 用加入 1∶100 avidin-biotin-HRP complex (Vector), 37℃孵育 1 h, 再用 PBS 漂洗 5 次, 然后用 0.05% diamino-benzidine (DAB) 37℃孵育 1 h 后, 再用 PBS 漂洗 5 次, 0.005%过氧化氢显色. 用显微镜(Leica)观察结果, 并摄像. 阴性对照用兔的 IgG 代替一抗.

1.3 免疫荧光染色

上述固定过的细胞用 0.2 μmol/L 核荧光染料 Hoechst 33342(Sigma) 处理 5 min 后, 用 0.3% Triton X-100 处理 10 min, 然后用 1%的羊血清孵育 1 h, 以降低非特异性抗体结合. 加入 1∶200 兔抗人 pTrkA 多克隆抗体(Tyr496, Santa Cruz), 4℃过夜, 第二天 37℃孵育 1 h, 接着用 PBS 漂洗 5 次, 用 1∶400 红色荧光 Cy3 标记的二抗(Sigma)结合 pTrkA 抗体, 37℃孵育 1 h, 再用 PBS 漂洗 5 次; 然后用荧光显微镜(Leica)观察结果, 并拍照. 阴性对照用兔的 IgG 代替一抗.

1.4 细胞裂解

U251 细胞培养 72 h 后, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 最后一次吸干 PBS; 加入预冷的含有蛋白酶抑制剂(1 μg/mL aprotinin, 50 μg/mL phenylmethy-lsul-fonyl fluoride 和 1 μg/mL leupeptin)和磷酸酶抑制剂(1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 μg/mL benza-midine, 1 mmol/L sodium pyrophosphate 和 1 mmol/L sodium fluoride)的 NP40 裂解 Buffer(10^7 个/mL 细胞、10 cm 培养皿或 150 cm^2 培养瓶); 用预冷的细胞刮子将细胞从培养皿上刮下, 把悬液转到 1.5 mL EP 管中, 4℃, 600×g 离心 5 min 收获细胞; 在 4℃下, 用匀浆器破坏细胞膜, 再用核-质分离提取试剂盒(康成生物工程有限公司, 中国)分离细胞核和细胞质蛋白; 立即将上清转移到一个新的离心管中, 储存于–80℃超低温冰箱中, 待测.

1.5 免疫印迹试验

等量的细胞核和细胞质裂解液在 10% SDS-丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 转到 PDVF 膜(Millipore, Bed-ford, MA)上; PDVF 膜用一抗 1∶200 兔抗人 pTrkA 多克隆抗体(Tyr496, Santa Cruz), 4℃过夜, 37°C 孵育二抗, 用 ECL-Plus 发光试剂盒 (Amersham) 检测, 用 Typhoon system (Amersham)扫描 PDVF 膜.

2 结果

在本研究中, 用免疫荧光和免疫细胞化学追踪跨膜受体 pTrkA 在 U251 细胞中的分布情况, TrkA 在该细胞中的大量分布进一步被证实. 更重要的是, 我们捕捉和分析了跨膜受体 pTrkA 在 U251 细胞中的核转位模式.

2.1 pTrkA 在内化的膜性结构上的定位

通过免疫荧光染色发现, 红色荧光小颗粒广泛分布在或靠近细胞表面(图 1). 但是, 由于荧光染色在观察不同类型的膜泡上存在一定的局限性, 我们用了免疫细胞化学染色来区分不同的膜泡类型. 尽管阳性着色的膜泡的分布与免疫荧光染色是相似的, 但是观察到两个重要的膜性结构: 一种是在细胞膜上的 pTrkA 阳性的帽状脂筏和杯状小凹(图 2 和 3), 另一种是在或靠近细胞膜上的 pTrkA 阳性的环状泡(ring-like vesicle , RLV) (图 2 和 3).

由于在本研究中兔抗 pTrkA 抗体是多克隆的, 可能存在非特异性染色. 为了排除这种可能性, 阴性对照用正常的兔 IgG 代替一抗. 同时, 我们分离了细胞质和细胞核裂解液, 用免疫印迹技术分析了 pTrkA 在细胞质和细胞核内的分布(图 2(b)). 结果表明 pTrkA 主要分布在细胞核内, 少量分布在细胞质中, 这与形态学上的分布是一致的.

2.2 pTrkA 在运输泡内的定位

通过免疫荧光染色, 不同大小的红色荧光颗粒广泛分布靠近细胞表面(图 1). 为了进一步分析这些颗粒, 用免疫细胞化学染色发现了 3 种不同类型的运输泡. 除了上述的环状泡外(图 3), 在核周发现了一种大核心泡 (large core vesicle, LCV)和一种小致密核心泡(small dense core vesicle, SDCV)(图 3). LCV 是一个吸引人的细胞内的泡状结构, 它具有不规则的外形、含有一个到多个的 pTrkA 阳性的致密核(图 3). SDCV 是一个圆形的含有一个 pTrkA 阳性的致密核的泡. 有些 SDCV 是游离并靠近细胞核, 有些明显地与 LCV 有着紧密的联系, 像是从 LCV 出芽的脐带核(图 4), 而且, LCV 所出的芽对着细胞核并紧靠着核膜.

2.3 SDCV 与核膜的相互作用

通过免疫荧光着色, 图 1 显示出红色荧光颗粒紧贴于细胞核. 通过免疫细胞化学染色, 发现一些

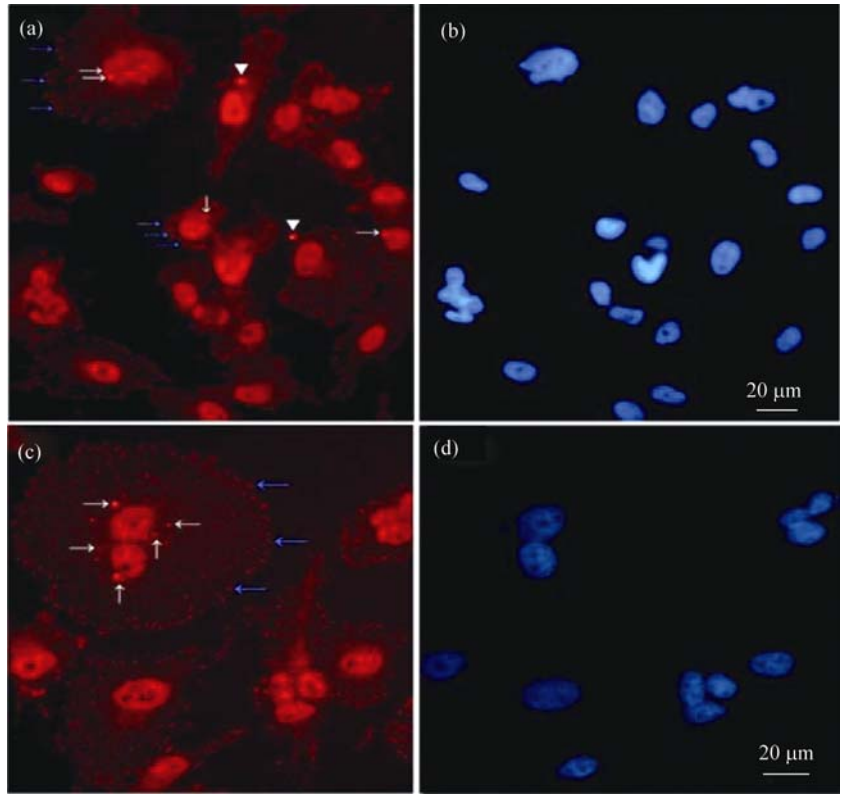

图 1　pTrkA 在 U251 细胞中的分布

通过免疫荧光染色，小的红色荧光颗粒广泛分布在或靠近细胞表面(蓝色箭头所示, (c))、细胞质和细胞核内((a), (c))，一些大的红色颗粒出现在细胞膜或靠近细胞膜的位置(白色三角箭头所示, (a))．在一个双核细胞的核周，有不同大小的阳性颗粒分布(白色箭头, (c))．(b)和(d)中细胞核用 Hoechst 33342 着色

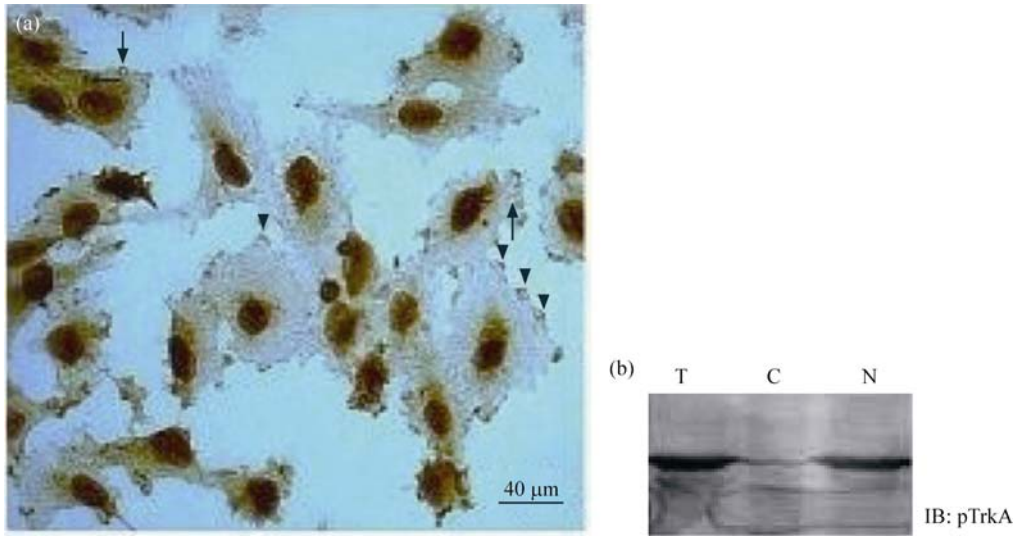

图 2　pTrkA 在 U251 细胞中的内化

用免疫细胞化学技术研究了 pTrkA 在细胞中的内化过程．几种重要的膜性结构被观察到了：帽状脂筏((a)中三角箭头所示)和环状泡((a)中黑色箭头所示)．用免疫印迹技术分析了细胞质和细胞核裂解液中 pTrkA 的分布((b))，T 表示总蛋白；N 表示核裂解液；C 表示细胞质裂解液

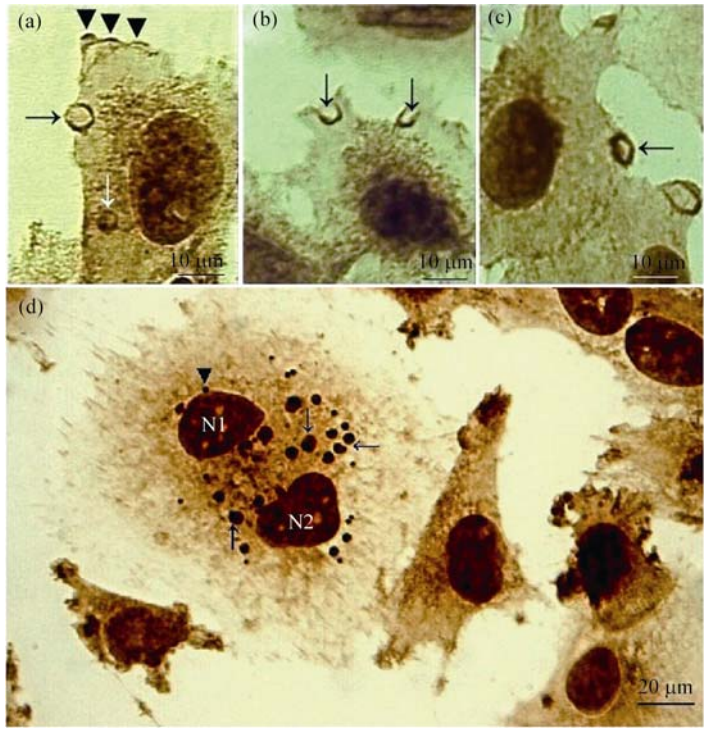

图 3 pTrkA 在细胞内的膜泡运输

通过免疫细胞化学技术分析含 pTrkA 的膜泡在 U251 细胞内的分布. 显示了细胞内的一系列膜性结构, 包括: 帽状脂筏((a)三角箭头所示)、杯状小凹((a)中黑色箭头、环状泡((a)白色箭头以及(c)黑色箭头所示)、大核心泡(黑色箭头所示, (d))和小致密核心泡(三角箭头, (d)). N1 和 N2 是一个双核细胞的两个核, 周围分布着许多运输泡

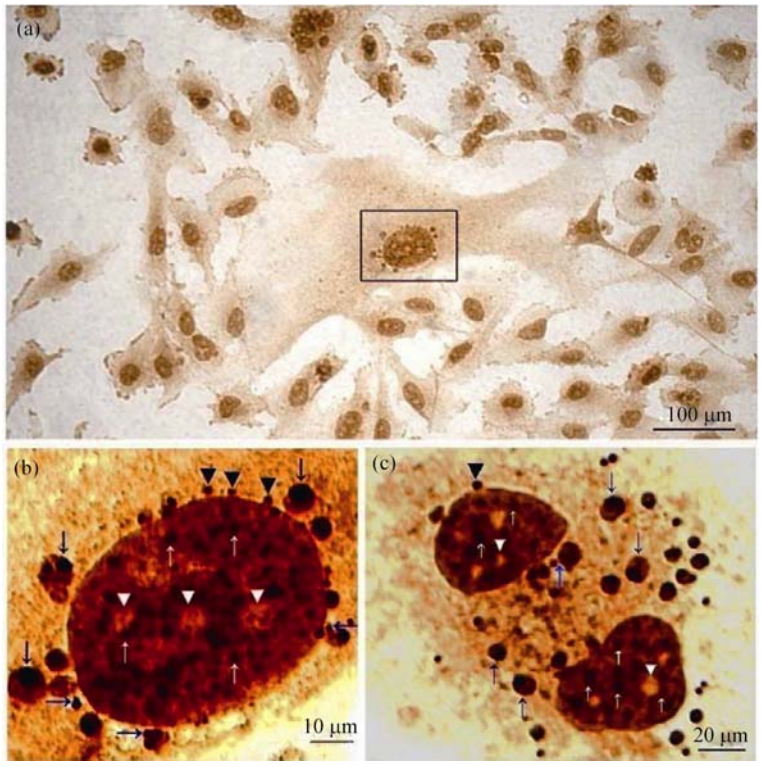

图 4 SDCV 与核膜的相互作用

通过免疫细胞化学着色, (b)和(c)显示大核心泡(LCV, 黑色箭头)和小致密核心泡(SDCV, 三角箭头), 一些 SDCV 正从 LCV 出芽(蓝色箭头). 三角箭头表示 SDCVs 与核膜间相互作用((b)和(c)). 大量的阳性颗粒分布在细胞核质, 但在核仁未见明显分布(白色三角箭头). (b)为(a)中方框内局部放大

SDCV 不同程度地与核膜间存在相互作用(图 4). 另外, 大量的、均一的阳性颗粒分布在细胞核质, 但在核仁未见明显分布, 这些颗粒与SDCV的核心的大小相差不大(图 4).

3 讨论

跨膜受体如何转位到细胞核的问题已经成为了一个核信号转导的中心问题 [1,2,13]. 在本研究中, 根据直接的形态学证据, 并参考前期的研究结果, 认为跨膜受体TrkA转位到核的途径如下: 跨膜受体在细胞表面内化后, 受体通过一系列膜泡转运, 在此过程中受体被分选和浓缩到运输泡内, 最后通过小致密核心泡与核膜间的作用进入细胞核内.

3.1 跨膜受体 TrkA 的内化和运输

通过免疫细胞化学着色, 发现了一系列从细胞表面到细胞核的不同膜性结构. 比照一般的受体介导的内吞作用 [15], 这些膜性结构依次为: 内吞膜结构, 如细胞表面的杯状小凹和靠近细胞质膜的环状泡, 它们可能是有衣小凹和有衣小泡或无衣小泡; 而细胞质中的运输泡包括: RLVs, LCVs 和SDCVs, 可能是早期内体或晚期内体. 在这些膜性结构中, 核周的LCVs 和 SDCVs以及它们间的相互关系至今未有描述或定义. 含有pTrkA阳性颗粒的LCVs 出芽形成靠近核的SDCV, 以及SDCV与核膜相互间的作用的证据, 不但支持了细胞表面受体的内吞过程是受体核转位通路中的关键事件, 而且表明了受体从细胞表面内吞后, 能够通过膜泡运输的方式到达核膜表面.

3.2 TrkA 在转运泡中的分选和处理

在已有的报道 [1,2,13]中, 跨膜受体在内吞后到细胞核的过程中, 内体中发生了什么生物学事件一直未有定论. 本研究通过追踪TrkA在一系列膜性结构中的变化, 提供了一些关于受体在相关膜性结构中分选和处理的信息. 发现在环状泡上的环状分布的受体, 在核周LCVs中却变成了一个或多个致密核心. 因此, 我们认为一个动态过程应该是: (ⅰ) 环状泡间相互融合或者与其他膜性结构融合形成LCVs, 在此间, 受体从膜上被分选和转位到膜腔内; (ⅱ) 聚集在腔中的受体被浓缩和移向LCVs的一侧而出芽形成核周的SDCV; (ⅲ) 新生成的SDCVs向细胞核运送受体, 从而为进一步为受体转位到核做准备.

3.3 SDCV 与核膜的相互作用

在本研究中, 一个非常重要的现象是: SDCVs 不同程度的与核膜间的作用, 很有可能是通过融合的方式作用. 此外, SDCV 中的 pTrkA 阳性核心与细胞核内的阳性颗粒大小一致. 因此, 认为跨膜受体 TrkA 是通过 SDCV 与核膜间的相互作用从 SDCV 中释放到细胞核中去的.

虽然我们提出的跨膜核转位通路中相关机制有待于进一步的系统地研究, 但是该核转位通路与其它受体的“逃离”模型有着本质的区别. 这个通路可以作为一个通用的细胞膜表面受体核转位通路, 该途径将为生物医药和生物技术提供很有前景的研究途径, 如药物的靶向、基因治疗、基因工程和病毒的感染等.

参　考　文　献

1 Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3: 697—702 [DOI]

2 Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15: 143—148 [DOI]

3 Reilly J f, Maher P A. Importin β-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. J Cell Biol, 2001, 152: 1307—1312 [DOI]

4 Stachowiak M K, Fang X, Myers J M, et al. Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal “feed-forward-and-gate” signaling module that controls cell growth and differentiation. J Cell Biochem, 2003, 90: 662—691 [DOI]

5 Mathew D, Ataman B, Chen J, et al. Wingless signaling at synapses is through cleavage and nuclear import of receptor DFrizzled2. Science, 2005, 310: 1344—1347 [DOI]

6 Kuruvilla R, Zweifel L S, Glebova N O, et al. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. Cell, 2004, 118: 243—255 [DOI]

7 Li X, Carthew R W. A microRNA Mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the drosophila eye. Cell, 2005, 23: 1267—1277 [DOI]

8 Ni C Y, Murphy M P, Golde T E, et al. *g*-Secretase-dependent cleavage and nuclear localization of ErbB4 receptor tyrosine kinase. Science, 2001, 294: 2179—2181 [DOI]

9 Jullien J, Guili V, Derrington E A, et al. Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. J Biol Chem, 2003, 278: 8706—8716 [DOI]

10 Chen Q Q, Chen X Y, Jian Y Y, et al. Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. Cell Res, 2005, 15: 504—510 [DOI]

11 O'Dowd B F, Ji X, Alijaniaram M, et al. Dopamine receptor oligomerization visualized in living cells. J Biol Chem, 2005, 280: 37225—37235 [DOI]

12 Usuku T, Nishi M, Morimoto M, et al. Visualization of glucocorticoid receptor in the brain of green fluorescent protein-glucocorticoid receptor knockin mice. Neuroscience, 2005, 135: 1119—1128 [DOI]

13 Giri D K, Ali-Seyed M, Li L Y, et al. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. Mol Cell Biol, 2005, 25: 11005—11018 [DOI]

14 Zhang Z, Yang Y, Gong A, et al. Localization of NGF and TrkA at mitotic apparatus in human glioma cell line U251. Biochem Biophy Res Commun, 2005, 337: 68—74 [DOI]

15 Wiley H S, Burke P M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. Traffic, 2001, 2: 12—18 [DOI]