

Mpl 的新配体 HNUDC 的研究进展

段杏华 郑克勤

核迁移蛋白 C (nuclear distribution protein C, NUDC) 首先是在丝状酵母 *aspergillus nidulans* 中发现的,是介导核迁移所必须的一类高度保守的蛋白质^[1]。人核迁移蛋白 C (human nuclear distribution protein C, HNUDC) 在正常细胞生长和有丝分裂中起着重要作用。在恶性增殖细胞中, HNUDC 高水平表达。最近研究发现 HNUDC 是血小板生成素受体 (myeloproliferative leukemia, Mpl) 的新配体。体外细胞研究中, HNUDC 和细胞因子血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 介导受体 Mpl 在诱导巨核细胞增殖和分化的功能上存在着重叠, HNUDC 主要作用在巨核细胞的成熟期, 而 TPO 在巨核细胞发育前期增殖阶段起作用^[2-5]。

一、HNUDC 的基因结构与表达分布

HNUDC 基因由长约 66 ~ 266bp 的 9 个外显子和长约 92 ~ 2000bp 的 8 个内含子组成, 全长为 8kb。通过荧光原位杂交发现 HNUDC 基因定位在 1p34 ~ p35, 编码含 331 个氨基酸的 HNUDC 蛋白。HNUDC 广泛存在于在不同的细胞类型中。在人造血细胞中, HNUDC 最初定位于胞质附核, 后被拉到细胞的一极, 部分 HNUDC 也可在正常的或恶性的前体细胞分散的核区检测到^[6]。在扩增的神经祖细胞、有诱导增殖的细胞和高度增殖的组织细胞中都有表达, 特别是在人脑和造血前体细胞中 HNUDC 高水平表达, 而在许多非增殖细胞中 HNUDC 低水平表达。而且蛋白的表达被高度调控, 在增殖细胞 (如食管膜、支气管、输卵管的纤毛上皮细胞)、精细胞、早期造血细胞、皮层胸腺细胞、免疫母细胞、基底结肠黏膜和食管等不同增殖能力的细胞中表达水平不同。相对正常组织, 细胞系中 HNUDC 的表达水平非常高^[7]。

二、HNUDC 的生物学功能

NUDC、LIS1、NUDL/NUDE 和动力蛋白/肌动蛋

白相互作用, 在核迁移、神经细胞迁移、细胞内转运、有丝分裂和细胞分裂等多种细胞生理过程中发挥作用。LIS1, 是一种典型的无脑回基因突变, 在有丝分裂和核迁移中发挥重要作用。然而, LIS1 蛋白是怎么被调节的在很大程度上还是未知的。基因研究发现, HNUDC 的类似突变 (L279P) 会导致 LIS1 的下调。进一步研究其机制发现 NUDC 蛋白 p23 结构域结合在分子伴侣 Hsp90 上, 分子伴侣 Hsp90 与 LIS1 也有联系。用格尔德霉素 (geldanamycin) 或根壳赤菌素 (radicol) 抑制 Hsp90 的伴侣功能, LIS1 水平将会下降, 同时 Hsp90 的表达可以扭转 NUDC - L279P 过表达所致的 LIS1 降解。实验还发现 NUDC 可以调节 Hsp90 的 ATP 酶活性^[8]。这些结果说明 NUDC 的分子伴侣功能参与 LIS1 稳定性的调节^[8,9]。NUDC 和 LIS1 的相互作用在神经细胞形成、神经迁移和脑发育中有重要作用^[1]。对胚胎老鼠大脑的 cDNAs 编码的 shRNAs 和野生与突变的 NUDC 进行电穿孔, 显示 NUDC 和 LIS1 一样, 是新大脑皮质形成中所必须的神经迁移蛋白; 在放射状神经胶质祖细胞中, NUDC 对顶端核迁移有特定的作用^[1]。通过原位杂交发现, NUDC 与 LIS1 在整个神经上皮发育中共表达。NUDC 与 LIS1 形成复合物, 与胞质动力蛋白/肌动蛋白复合物的成分共同定位在成纤维细胞、神经细胞核周围的微管组织中心。在体内神经核迁移中, NUDC 与 LIS1 及胞质动力蛋白/肌动蛋白复合物相互作用, 参与人皮质的发育^[6]。

NUDC 在细胞生长中有关键作用, 与细胞增殖密切相关。在正常人骨髓中, 早期骨髓祖细胞和红系祖细胞中的 HNUDC 蛋白和 mRNA 高水平表达, 在这些细胞终止分化时, HNUDC 蛋白和 mRNA 表达水平下降^[6]。HNUDC 参与恶性造血细胞生长, 患急性骨髓和成淋巴细胞白血病的患者体内抽提的骨髓细胞裂解物中, HNUDC 蛋白的表达量比正常个体显著增加, 说明 HNUDC 在恶性造血细胞增长中也有重要作用^[6]。在转基因鼠的前列腺癌组织和高速生长的细胞中, NUDC 的表达也明显增加。为研究 NUDC 在肿

基金项目: 广东医学院科技创新基金资助项目 (STIF201129)

作者单位: 523808 东莞, 广东医学院医学遗传学教研室

通讯作者: 郑克勤, 电子邮箱: zhengkq@gdmc.edu.cn

瘤发生发展中的作用, Lin 等^[10]用表达 NUDC 的腺病毒载体 (Ad - NUDC) 来检测 NUDC 对前列腺癌细胞的作用, 在软琼脂糖克隆分析中, 表达的 NUDC 能抑制前列腺癌细胞 LNCaP 的自主生长。在细胞水平上, 表达 NUDC 的 DU145 或 PC - 3 细胞在 Ad - NUDC 感染 48h 后, 细胞增殖下降。在异种肿瘤细胞移植模型中, NUDC 的过度表达也能抑制 DU145 或 PC - 3 细胞在模型中生长, 这些结果表明 NUDC 的过表达可抑制前列腺癌细胞的生长。在鼻咽癌患者中也发现了 HNUDC 高表达, 并且 HNUDC 的表达有随着鼻咽癌临床分期的进展而增加的趋势^[11]。在小鼠 B16 黑色素瘤细胞的研究中, 抗 HNUDC 抗体可消耗培养液或癌细胞内游离的 NUDC, 从而能促进黑色素瘤细胞的增殖^[12]。这些研究都表明, HNUDC 与恶性增殖密切相关, 这提示着其可以作为一种监测肿瘤的蛋白质和可以作为肿瘤的治疗靶点^[11,13]。

另外, NUDC 在纤毛细胞的高水平表达说明, 其在纤毛的运动和组织中也有重要作用。最新研究发现, 小鼠 NUDC 与血小板活化因子 - 乙酰水解酶 I [platelet activating factor acetylhydrolase I, PAF - AH (I)] 相互作用调控炎症反应, NUDC 通过其羧基末端的半高度保守蛋白增加 PAF - AH (I) 的催化活性。这暗示着 HNUDC 可作为一种新的抗炎药^[14]。

三、HNUDC 介导 Mpl 诱导巨核细胞增殖和分化

1. HNUDC 为 TPO 受体 Mpl 的配体之一: 巨核细胞的增殖和分化受多种物质的调控, 包括细胞因子、生长因子、化学因子、胞外基质分子等, 它们大部分是有骨髓微环境中得干细胞产生的。目前研究结果表明 TPO 是刺激巨核细胞细胞增殖和分化的主要因子, 其他已知的细胞因子如 IL - 1、IL - 3、IL - 6、IL - 11、GM - CSF 和 SCF 等主要是辅助 TPO 刺激巨核细胞的增殖和分化。另有实验证明, TPO 只作用于巨核细胞的增殖及前期成熟时期, 对细胞后期成熟尤其是前血小板的生成没有明显促进作用^[4]。HNUDC 是 TPO 受体 Mpl 的另一配体^[15], 它和 TPO 都与 Mpl 受体的胞外区结合, 它能促进小鼠血小板的生成并能促进体外巨核细胞的增殖和分化。HNUDC 在巨核细胞的多倍体化和胞质成熟阶段以及前血小板形成阶段的作用明显优于 TPO, 提示 HNUDC 对巨核细胞的作用可能主要集中于巨核细胞的后期的成熟^[16], 尤其是巨核细胞的多倍体化与胞质成熟阶段或者血小板生成的阶段^[5]。

2. HNUDC 与受体 Mpl 结合的关键区域: 用酵母杂双交系统血小板生成素受体胞外区域 (Mpl - EC) 为钓饵, 从人体胎儿肝脏 cDNA 文库中筛选出与血小板生成素受体 (Mpl) 互相作用的新配体蛋白 hNUDC, 发现在 Mpl - EC - D1, 氨基酸 (amino acid, aa) 102 ~ 251 强烈参与配体结合。进一步定位 Mpl - EC (102 ~ 251 aa) 与两配体 TPO 和 HNUDC 结合的最小区段, 结果发现 Mpl - EC - D1 (206 ~ 251 aa) 区段是 TPO 和 HNUDC 共同的有效结合微区域。为阐明两配体与受体结合的具体氨基酸位点, 通过一系列丙氨酸置换突变的工作, 突变了 15 个相关氨基酸位点, 通过噬菌体 ELISA 结合分析, 得到位于 Mpl - EC - D1 (206 ~ 251 aa) 两个疏水性氨基酸 Lue - 228 和 Lue - 230 对 HNUDC 与受体的结合有重要作用; 而 Asp - 235 和 Leu - 239 对 TPO 与受体的结合起关键作用^[17]。

3. HNUDC 介导巨核细胞增殖分化的信号转导机制: 为了更好地研究 hNUDC 对巨核细胞增殖分化形成血小板的作用, 有学者构建了 Mpl 载体, 利用脂质体转染技术, 通过 G418 的长期筛选, 得到了稳定表达 Mpl 的 UT - 7/EPO 细胞系, 即 UT - 7/EPO - Mpl^[2]。用 HNUDC 刺激 UT - 7/EPO - Mpl 细胞增殖的过程, 发现 HNUDC 可以刺激细胞的形态发生改变, 上调巨核细胞分化的表面特异性抗原 CD41 的表达, 并且诱导细胞多核化^[2]。用 HNUDC 刺激 UT - 7/EPO - Mpl 12h 情况下发现, 在 MAPK 途经中, HNUDC 可以激活 ERK1/2、p38 的磷酸化, 且结果与 TPO 的诱导效果一致。分别使用 ERK1/2、P38 特异性的抑制剂 PD98059 和 SB203580 来拮抗 HNUDC 对 MAPK 途经的激活作用, MTT 结果显示细胞增殖的效果被部分抑制; 而细胞分化方面, 用了抑制剂的细胞, 虽然还可以出现巨核化和多核化, 但程度减弱了; 且 PD98059 比 SB203580 效果更明显。这说明了 HNUDC 可以通过 ERK1/2、P38 介导的 MAPK 途经调控巨核细胞的增殖和分化^[2,3]。HNUDC 可以激活巨核细胞 Trk2 - Jak2/Stat1 - Stat3 - Stat5 途经, 以及 SHP2/Gab/PI3/Akt 途经^[2]。但 HNUDC 介导 Mpl 作用于巨核细胞增殖、分化的具体机制还不清楚。采用 PCR 方法将 GFP 基因与 Mpl 基因构建融合荧光蛋白的真核表达载体, 用脂质体介导转染 NIH3T3 细胞核稳定筛选细胞系^[17,18]; 使用荧光显微镜方法和 WESTERN BLOTTING 检测了 Mpl 在 NIH3T3 细胞中得表达与活性, 结果表明, GFP 的融合并不影响 Mpl 的功

能,因此构建的融合质粒级表达的融合蛋白可用于对 Mpl 的进一步研究^[19]。转染 Mpl 的 NIH3T3 细胞中 Mpl 的存在可通过细胞内质网和微管系统介导 HNUDC 的分泌表达,为此,将 HNUDC 基因单独或者同时与 Mpl shRNA 发卡结构克隆进行慢病毒表达载体中,并将获得的慢病毒感染 Dami 细胞,实现两者在 Dami 细胞中的单独或者同时表达,以研究 NUDC 与 Mpl 之间的相互关系,NUDC 慢病毒载体的构建为其进一步研究提供了新的方法^[20]。将重组表达质粒 pPICZ α A-hNUDC-his 用 BstX I 单酶切,电击转入 *Pichia pastoris* KM71,采用 Zeocin 筛选获得转化子;在加酶水解酪蛋白的同时降低诱导表达时的培养温度至 10℃,通过优化诱导表达条件,通过 SDS-PAGE 分析诱导培养上清,可见目的蛋白的完整性有大幅提高,占总蛋白 80% 以上。这为 HNUDC 的高效表达提供新的思路。

综上所述,HNUDC 在细胞生长中有重要作用,与细胞增殖密切相关。研究表明 HNUDC 的水平与不同细胞类型、组织、癌的增长方式有关,因此 HNUDC 的表达水平可能成为检测肿瘤发生的一项指标^[6]。最近研究表明 HNUDC 的过表达可抑制前列腺癌细胞在体内的克隆生长。HNUDC 在肿瘤形成中有重要作用提示,研究 HNUDC 促进细胞增殖的机制将为控制肿瘤的增生包括白血病细胞的增生提供新的治疗途径。研究 HNUDC 对巨核细胞的增殖和分化的信号传导机制不仅对理解受体间的相互作用的分子机制以及信号转导机制产生新的认识,同时也将为开发治疗血小板减少症的新药品开拓新的途径。

参考文献

- Cappello S, Monzo P, Vallee RB. NudC is required for interkinetic nuclear migration and neuronal migration during neocortical development[J]. *Dev Biol*,2011,357(2): 326-335
- Tang YS, Zhang YP, Xu P. hNUDC promotes the cell proliferation and differentiation in a leukemic cell line via activation of the thrombopoietin receptor (Mpl)[J]. *Leukemia*, 2008,22:1018-1025
- Duan XY, Yang Y, Zhang Q, *et al.* The additive effects of combined murine nuclear migration protein with murine thrombopoietin in vitro and in vivo on normal and myelosuppressed mice[J]. *Int J Hematol*, 2011,94(1):44-53
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, *et al.* Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2007,1(6):671-684
- Chen YQ, Ge YC, Xu PL, *et al.* hNUDC promotes proliferation and differentiation of megakaryocytopoiesis on human CD34+ cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 24(10): 962
- Miller BA, Zhang MY, Gocke CD, *et al.* A homolog of the fungal nuclear migration gene nudC is involved in normal and malignant human hematopoiesis[J]. *Experimental Hematology*,1999, 27: 742-750
- Gocke CD, Reaman GH, Stine C, *et al.* The nuclear migration gene NudC and hematopoiesis[J]. *Leuk Lymphoma*,2000;39(5-6):447-454
- Zhu XJ, Liu X, Jin Q, *et al.* The L279P mutation of nuclear distribution gene C (NudC) influences its chaperone activity and lissencephaly protein 1 (LIS1) stability[J]. *Biol Chem*,2010,285(39):29903-29910
- Zheng M, Cierpicki T, Burdette AJ, *et al.* Structural features and chaperone activity of the NudC protein family[J]. *Mol Biol*,2011,409(5):722-741
- Lin SH, Nishino M, Luo W, *et al.* Inhibition of prostate tumor growth by over expression of NUDC, a microtubule motor-associated protein [J]. *Oncogene*, 2004, 23(14): 2499-2506
- Chen Y, Yang Y, Lin Z, *et al.* Expression and clinical significance of human nuclear distribution C in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*,2011,25(2): 71-73
- Gao DF, Niu L, Zhang CY, *et al.* Cloning and expression of murine nuclear distribution C protein gene in *pichia pastoris* GS115[J]. *Biotechnology bulletin*,2011,8:140-143
- Riera J, Lazo PS. The mammalian NudC-like genes: a family with functions other than regulating nuclear distribution[J]. *Cell Mol Life Sci*,2009,66(14): 2383-2390
- Riera J, Rodríguez R, Carcedo MT, *et al.* Isolation and characterization of nudC from mouse macrophages, a gene implicated in the inflammatory response through the regulation of PAF-AH(1) activity [J]. *Epub*,2007,581(16): 3057-3062
- Pan RM, Yang Y, Wei MX, *et al.* A microtubule associated protein (hNUDC) binds to the extracellular domain of thrombopoietin receptor (Mpl)[J]. *J Cell Biochem*,2005,96(4):741-750
- Wu D, Hao YY, Zhuang YP, *et al.* Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon- α mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2008, 80(6):1063-1071
- Chen WM, Yu B, Zhang Q, *et al.* Identification of residues in the extracellular domain of thrombopoietin receptor involved in the binding of thrombopoietin and a nuclear distribution protein (human NUDC) [J]. *Biol Chem*,2010,285(34): 26697-26709
- Zhang YP, Tang YS, Chen XS, *et al.* Regulation of cell differentiation by hNUDC via a Mpl-dependent mechanism in NIH3T3 cells[J]. *Exp Cell Res*,2007,313:3210-3221
- Chen YQ, Zhang YP, Xu PL, *et al.* Construction and expression of eukaryotic expression vector of Mpl and green fluorescent protein fusion gene[J]. *Progress in Modern Biomedicine*,2009,9(9):1612
- Pang SF, Li XK, Zhang Q, *et al.* Interference RNA (RNAi)-based silencing of endogenous thrombopoietin receptor (Mpl) in Dami cells resulted in decreased hNUDC-mediated megakaryocyte proliferation and differentiation[J]. *Exp Cell Res*,2009,315:3563-3573

(收稿日期:2012-09-26)

(修回日期:2012-10-24)