

基质金属蛋白酶-14和Bst-2通过蛋白质结构域相互作用而抑制Bst-2的生物活性

樊 龙,朱翠翠,皮玉瑞,吴朝蒙,卢 山,刘 平

(南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

[摘要] Bst-2(骨髓基质细胞抗原-2)是一种 II 型膜蛋白,其主要功能是抑制病毒从感染细胞释放;基质金属蛋白酶-14(MT1-MMP)是一种膜蛋白酶,其主要功能是通过激活 proMMP2 在细胞生长和迁移中扮演重要角色.本研究主要探讨了 MT1-MMP 抑制 Bst-2 生物活性的分子机制.实验结果表明,MT1-MMP 通过与 Bst-2 相互作用进而抑制 Bst-2 的活性和功能;并且,在此相互作用中,这两种膜蛋白的细胞质结构域(Bst-2 的 N-末端结构域和 MT1-MMP 的 C-末端结构域)起到了极为关键的作用.此外,还发现 Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 活性的过程中也不可或缺.这些结果为临床上探索抑制病毒感染和肿瘤转移的新方法和新药物研制开发提供了理论依据.

[关键词] 骨髓基质细胞抗原-2,基质金属蛋白酶-14,病毒释放

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)03-0079-10

Matrix Metalloproteinase-14 Inhibits the Activity of Bst-2 via Their Cytoplasmic Domains Dependent Interaction

Fan Long, Zhu Cuicui, Pi Yurui, Wu Zhaomeng, Lu Shan, Liu Ping

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Bst-2(bone marrow stromal cell antigen 2) is a type II membrane protein and acts as a tetherin to inhibit virus releasing from infectious cells. Membrane type-1 matrix metalloproteinase(MT1-MMP) is a protease and plays a pivotal role in cellular growth and migration by activating proMMP-2 into active MMP2. In this study, we explored the molecular mechanism of MT1-MMP inhibiting the activity of Bst-2. From experimental data, it's elaborated that MT1-MMP inhibited the tetherin activity of Bst-2 via the interaction within, and the cytoplasmic domains of both Bst-2 and MT1-MMP play critical roles in the interaction. Furthermore, we found that that N-terminal domain of Bst-2 is not only important in relating to the activity of Bst-2 itself, but important for inhibiting the activities of MT1-MMP and MT1-MMP/proMMP2/MMP2 pathway. These findings suggest that MT1-MMP is a novel inhibitor of Bst-2 in MT1-MMP expressed cell lines and indicate that both N-terminal domain of Bst-2 and C-terminal domain of MT1-MMP are crucial in their activity down-regulation.

Key words: Bst-2, MT1-MMP, virus release

Bst-2(骨髓基质细胞抗原-2,也叫 Tetherin, CD137 或 HM1.24)是一种 II 型膜蛋白,其分子中有两个膜锚定结构:分别是 N-端的穿膜区和 C-末端的磷脂酰肌醇(GPI)结合位点^[1-2]. 现在发现, Bst-2 的主要功能是通过把病毒颗粒束缚在感染细胞的细胞膜上进而抑制病毒颗粒从感染细胞释放,最终抑制病毒在生物体内大量繁殖,使病毒感染就此终结. 不过,这种束缚作用能够被某些冠状病毒(如 HIV)的一种蛋白 Vpu 解除, Vpu 通过与 Bst-2 相互作用消除 Bst-2 对病毒的束缚作用^[3-4]. 结构上, Bst-2 含有胞内区结构域(N-末端结构域,约含 20 氨基酸)、穿膜区(N-端的 TM 结构域)、胞外区(C-端)和一个 GPI 锚;其中,胞内

收稿日期:2016-02-22.

基金项目:国家自然科学基金(81272850, 81172007, 81472415).

通讯联系人:刘平,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤发生与发展的分子机制. E-mail: 08201@njnu.edu.cn

区结构域(N-末端结构域)在 Bst-2 穿梭于胞质和胞膜以及 Bst-2 与 Vpu 相互作用的过程中起到至关重要的作用^[5-6]。除了抑制病毒释放的功能外,Bst-2 还可以与其他一些蛋白质通过相互作用而调节其他蛋白的生物学活性和功能^[7-8]。

基质金属蛋白酶-14(MT1-MMP,也叫 MMP14)是一种 I 型膜蛋白,在很多生理和病理学过程中起作用,包括细胞生长、增值、迁移等等^[9-10],MT1-MMP 的主要功能是自身或通过激活 proMMP2 进而降解细胞周围基质成分,包括 I 型和 II 型胶原蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白和糖蛋白等,肿瘤细胞能够利用 MT1-MMP 的活性来降解基质成分从而达到细胞生长、分化和迁移的目的;而在上述这些过程中,MT1-MMP 的胞内区结构域(C-末端结构域)总是扮演重要的、不可或缺的角色^[11-12]。细胞中,调节 MT1-MMP 活性的方式主要有 3 种:一是内源性抑制分子的抑制作用,如 TIMP2、TIMP3 等^[13];二是通过在胞质和细胞膜之间的穿梭转运来调控其活性^[14-16];三是通过调节 MT1-MMP 基因的表达来调控其活性,如 Wnt- β -catenin-Tcf4 信号通路可以调节 MT1-MMP 基因的表达^[17-18]。

有关 Bst-2 和 MT1-MMP 之间的相互关系,之前曾报道过 Bst-2 通过与 MT1-MMP 相互作用能够抑制 MT1-MMP 活性,而且在此抑制作用中,MT1-MMP 的 C-末端起着关键的作用^[19]。本研究进一步探讨了 MT1-MMP 反过来抑制 Bst-2 活性和生物学功能的分子机制。实验结果表明,MT1-MMP 不仅可以与 Bst-2 相互作用,而且通过这种相互作用,MT1-MMP 抑制了 Bst-2 的活性和功能。在 MT1-MMP 和 Bst-2 的相互作用中,不仅 MT1-MMP 的 C-末端结构域(胞质区)很关键,而且 Bst-2 的胞质区(N-末端结构域)也极为重要、不可或缺。此外,还发现 Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 活性和功能的过程中也起着重要的作用。

1 实验材料和方法

1.1 细胞培养和转染

本研究中所用细胞株是 MDCK 和 HT1080(均从美国 ATCC 中心购买)。MDCK 细胞培养在 DMEM 培养基中,DMEM 培养基含 10% FBS、2 mM L-谷氨酰胺和 50 units/mL 链霉素/盘尼西林。有关 HT1080 细胞的培养基参见文献^[20-21]。最终,细胞在含 5% CO₂/95% 空气的培养箱中 37 °C 培养。

细胞转染实验时,先将细胞培养在必要的培养板或培养皿中过夜,然后用转染试剂 Lipofectamine 2000 按照试剂说明书将构建好的表达质粒转染细胞,使相关基因在细胞内能够瞬时过量表达(转染试剂购自美国 Invitrogen 公司)。

1.2 质粒、抗体和化学试剂

表达质粒 pcDNA3.1(+)/MT1-MMP 和 pcDNA3.1(+)/HA-Bst-2 由本实验室自己构建并保存^[11-12]。突变体表达质粒 pcDNA3.1(+)/MT1-MMP/ Δ C(MT1-MMP 的 C-末端结构域缺失突变体)和 pcDNA3.1(+)/HA-Bst-2/ Δ NT(Bst-2 的 N-末端结构域缺失突变体)是根据购买试剂盒 ONE-STEP MUTAGENESIS 说明书操作构建的。非致病性 HIV 病毒克隆 pNL4-3 购自美国 NIH 的艾滋病研究中心,然后采用上述试剂盒构建病毒衣壳蛋白 Vpu 缺失突变体表达质粒 pNL4-3/ Δ Vpu。

抗体:鼠抗 MT1-MMP 单克隆抗体、兔抗 HA 标签多克隆抗体和兔抗 Bst-2 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;兔抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;免疫荧光二抗 Alexa Fluor® 488 羊抗鼠 IgG 和 Alexa Fluor® 594 羊抗兔 IgG 均购自美国 Invitrogen 公司。免疫共沉淀试剂盒购自美国 Promega 公司,实验中所用 I 型干扰素 α (IFN- α)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,并在实验中的使用浓度为 2 000 U/mL。其他化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 明胶实验、Western-blot 和免疫共沉淀

明胶实验:将 MDCK 和 HT1080 细胞按 3×10^5 /孔接种在 12 孔板中培养过夜后,将相关质粒(如图中所示)转染细胞。转染 24 h 后,将培养基换成含 5%FBS 的 DMEM;再过 24 h,收集培养基离心后上清用于 SDS-PAGE 凝胶电泳(凝胶中预先加有 1 mg/mL 明胶)^[22-23]。然后,将电泳后的凝胶用 Coomassie Blue 在 37 °C 染色过夜,脱色后观察、拍照。

Western-blot 和免疫共沉淀(co-IP):细胞培养过夜后转染相关质粒(如图所示)并培养在含有 MMP 抑制剂 GM6001 的 DMEM 培养基中,48 h 后,收集细胞、离心,将细胞沉淀裂解(裂解液含有 50 mM Tris-

HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.25% 脱氧胆酸钠, 0.1% NP-40 和混合蛋白酶抑制剂)、离心, 上清用于 Western-blot 实验. 免疫共沉淀实验: 收集细胞离心后, 按照免疫共沉淀试剂盒说明书处理细胞沉淀. Western-blot 和免疫共沉淀实验中所用抗体均按图中所示进行.

1.4 RT-PCT 和 qPCR

将 MDCK 和 HT1080 细胞按照图示要求进行转染实验, 48 h 后收集细胞, 并按照 RT 试剂盒(购自加拿大 Life Technologies 公司)说明书抽提细胞总 RNA, 2 mg 总 RNA 用于 RT 实验(逆转录反应混合物含有 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 ng oligo(dT)₁₂₋₁₈, 40 单位 RNAase 抑制剂, 1 mM 脱氧核苷酸三磷酸盐和 8 单位禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶). 逆转录反应条件为 25 °C 10 min, 42 °C 45 min, 95 °C 5 min. 取等体积的 RT 产物用于 PCR, PCR 引物: Bst-2 正义链 5'-CCT GCT CGG CTT TTC GCT TGA ACA T-3', 反义链 5'-CGG AGG GAG GCT CTG GAG GGA GAC-3'; β -actin 正义链 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3', 反义链 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析.

qPCR 实验: 同样按照试剂盒说明书先抽提细胞总 RNA 并进行 RT 反应, 然后定量 cDNA, 取等量 cDNA 在 ABI PRISM 7 500 Real-Time PCR System 实验系统上进行 qPCR 反应. 反应在专用的 96 孔板中进行, 每孔 20 μ L 反应体系(含有 10 μ L Power SYBR Green PCR master mix, 1 μ L 浓度为 5 μ mol/L 的 qPCR 引物以及 1 μ L 含等量 cDNA 模板). 所用 qPCR 引物分别是: Bst-2(正义链 5'-CTG CAA CCA CAC TGT GAT G-3', 反义链 5'-ACG CGT CCT GAA GCT TAT G-3'), GAPDH(反义链 5'-GTC CAC TGG CGT CTT CAC CA-3', 反义链 5'-GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC-3'). GAPDH 作为内参定量总 RNA 中 Bst-2 的 RNA 含量, 即定量 Bst-2 的转录表达水平.

1.5 细胞在三维明胶中生长

MDCK 和 HT1080 细胞在 6 孔板中培养过夜并转染相关表达质粒(如图所示). 转染 24 h 后, 消化收集细胞并将等量细胞(1×10^3)与 500 μ L I 型胶原(浓度为 2.5 mg/mL)混合, 混合物放入 24 孔板并置于 37 °C 0.5 h, 使混有细胞和胶原的混合物凝固成胶状物; 然后, 在胶状物上加新鲜 DMEM 完全培养基并置于培养箱中培养, 每两天换一次培养基. 一星期之后, 细胞在胶原凝胶中的生长情况以及细胞克隆形成状况在显微镜下观察并拍照, 具体操作步骤参考文献[23].

1.6 细胞迁移实验

等量 MDCK 和 HT1080 细胞培养在 6 孔板中过夜并转染相关质粒(如图所示), 当细胞长满至 90% 时, 用移液器头(Tip 头)沿孔中轴线划线以留下一条没有细胞的空白区域, 再用 PBS 洗涤一次(洗掉划痕中被划漂浮起来的细胞); 然后再加入培养基继续培养, 60 h 后, 在显微镜下拍照迁移进入空白区域的细胞. 具体操作参考文献[23].

1.7 免疫荧光激光共聚焦

MDCK 和 HT1080 细胞接种在放有干净盖玻片的 6 孔板中过夜并转染相关表达质粒(如图所示), 在含有 GM6001 抑制剂的培养基中培养 48 h 后, 去除培养基并用 PBS 洗盖玻片上生长的细胞, 然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 再用 PBS 洗 3 遍后用 0.1% Triton X-100 孵育 5 min; 然后用含 3% 羊血清的 PBS 封闭后分别用 0.2 μ g/mL 的抗 MT1-MMP 和抗 HA 的抗体 4 °C 孵育过夜, PBS 洗过后用免疫荧光二抗 Alexa Fluor® 488 羊抗鼠 IgG 和 Alexa Fluor® 594 羊抗兔 IgG 孵育. 最后将用含有 DAPI 的封片油将盖玻片封于载玻片上并在激光共聚焦仪器上观察相关蛋白在细胞中的表达与定位并拍照.

1.8 病毒释放实验

相同数量的 MDCK 和 HT180 细胞接种于 6 孔板过夜后, 转染相关表达质粒(如图所示). 转染 48 h 后, 用 HIV-1 p24 抗原俘获 ELISA 试剂盒测定培养基和细胞裂解物中的病毒衣壳蛋白 p24 含量. 用培养基中衣壳蛋白 p24 含量在总的衣壳蛋白 p24 含量(包括培养基中的衣壳蛋白和细胞裂解物中的衣壳蛋白)中的百分数表示病毒释放情况. 操作步骤参考文献[24].

1.9 统计学分析

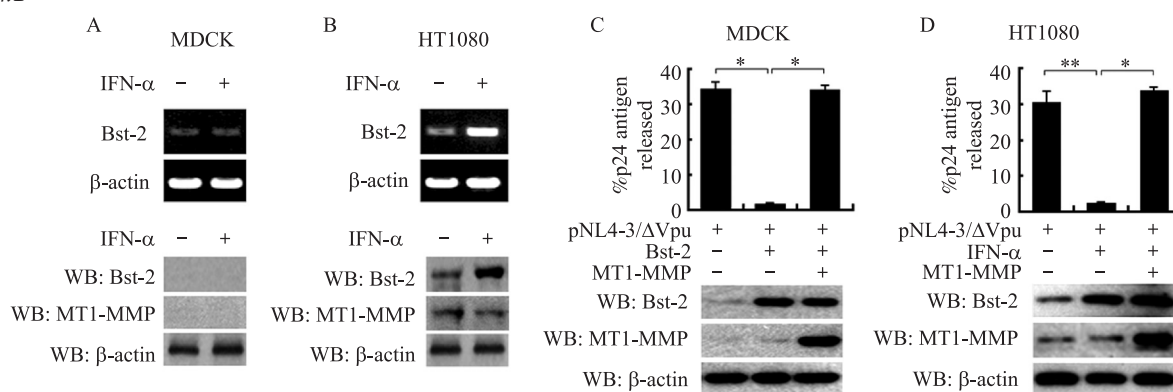
实验结果均为 3 次重复的综合平均结果, 对实验结果均做 *t* 检验; 实验误差 $p < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 实验结果

2.1 在MDCK和HT1080细胞中,Bst-2的表达及其活性被MT1-MMP抑制的情况

MDCK 和 HT1080 细胞接种在 6 孔板中并用 IFN- α 处理,24 h 后,收集细胞做 RT-PCR 和 Western-blot 实验分析.结果表明,无论在 mRNA 水平还是在蛋白质水平,Bst-2 在 MDCK 细胞中都不表达,也不会被 IFN- α 诱导表达;而在 HT1080 细胞中,Bst-2 则有弱的本底表达,当用 IFN- α 处理后,Bst-2 的表达水平大大提高,说明在 HT1080 细胞中,Bst-2 的表达可以被 IFN- α 诱导(图 1A、1B).

MDCK 和 HT1080 细胞中转染如图 1C 和 1D 所示相关质粒,结果显示,转染 pNL4-3/ Δ Vpu 质粒的细胞中,病毒 HIV-1 衣壳蛋白 p24 释放明显被转染表达的 Bst-2 所抑制(MDCK 细胞中)以及被 IFN- α 诱导表达的 Bst-2 所抑制(HT1080 细胞中),而且这种抑制作用又被共转染表达的 MT1-MMP 所逆转(如图 1C 和 1D 所示).这些结果表明,MT1-MMP 可以抑制 Bst-2 活性,进而逆转 Bst-2 抑制病毒颗粒释放的生物学功能.



A、B,Bst-2 在 MDCK 和 HT1080 细胞中的表达情况(有或无 IFN- α 诱导);C、D,MT1-MMP 抑制 Bst-2 生物学活性和功能(HIV-1 表面抗原 p24 释放情况). * p <0.01, ** p <0.05

A、B, Expression of Bst-2 in MDCK and HT1080 cells(with and without IFN- α treatment);

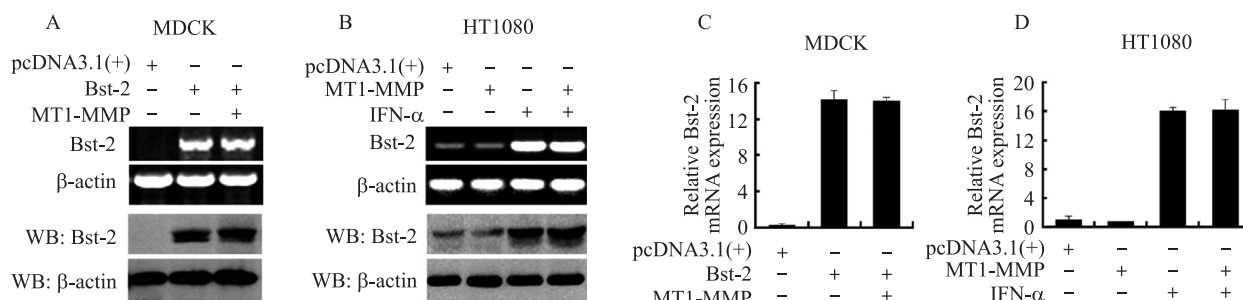
C、D, Activity inhibition of Bst-2 by MT1-MMP in MDCK and HT1080 cells. * p <0.01, ** p <0.05

图1 MDCK和HT1080细胞中Bst-2的表达情况及其活性被MT1-MMP抑制的结果

Fig.1 Expression of Bst-2 and its activity inhibition by MT1-MMP in MDCK and HT1080 cells

2.2 MT1-MMP的表达并不影响Bst-2基因的表达水平

细胞接种在 6 孔板中并转染相关表达质粒(图 2)以及用 IFN- α 处理相关细胞,48 h 后,收集细胞做 RT-PCR、qPCR 和 Western-blot 分析.结果显示,无论是内源性 Bst-2(包括 IFN- α 诱导表达的 Bst-2)还是转染表达的外源性 Bst-2,在 mRNA 水平和蛋白水平均不受过表达的 MT1-MMP 影响(如图 2A 和 2B 所示);此外,qPCR 结果也表明,无论是内源性 Bst-2 还是转染外源性 Bst-2,其转录水平也都不受过表达 MT1-MMP 的影响(如图 2C 和 2D 所示).



A、B,细胞中,Bst-2 基因表达的 RT-PCR 和 western-blot 结果;C、D,细胞中,Bst-2 基因表达的 qPCR 结果

A、B, RT-PCR and western-blot assay of the expression of Bst-2 gene in cells; C、D, qPCR assay of the expression of Bst-2 gene in cells

图2 MDCK和HT1080细胞中,MT1-MMP对Bst-2基因表达情况的影响

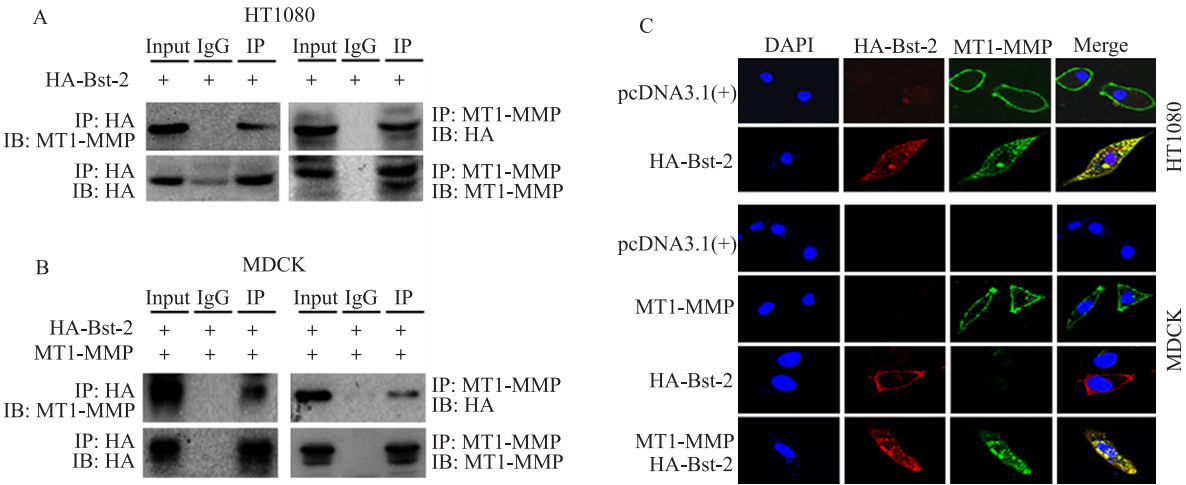
Fig.2 Effect of MT1-MMP on the expression of Bst-2 gene in MDCK and HT1080 cells

结果表明,MT1-MMP 并不影响 Bst-2 基因的表达(包括 mRNA 水平和蛋白质水平);这也暗示,MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性和生物学功能并不是通过抑制 Bst-2 基因的表达来实现的。

2.3 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用并在细胞中共定位

为了检测 MT1-MMP 与 Bst-2 之间的相互作用,MDCK 和 HT1080 细胞接种于 6 孔板中并转染相关质粒(图 3A、3B),转染 48 h 后,收集细胞做免疫共沉淀(co-IP)和 Western-blot 分析。结果显示,在转染 Bst-2 并用 IFN- α 处理的 HT1080 细胞中,用 anti-HA 抗体进行 co-IP 后得到的复合物中,含有与 Input 一致的 MT1-MMP,而用 IgG 做 co-IP 所得的复合物中没有检测到 MT1-MMP 的存在(图 3A);反之,在用 anti-MT1-MMP 抗体进行 co-IP 所得到的复合物中,也含有与 Input 一致的 HA-Bst-2(与 IgG 相比较)。同样,在共转染 Bst-2 和 MT1-MMP 的 MDCK 细胞中,在用 anti-HA 或者用 anti-MT1-MMP 抗体做 co-IP 所得到的复合物中,也都分别检测到了 MT1-MMP 或者 HA-Bst-2(分别与相应的 Input 和 IgG 对照相比较)(图 3B)。结果说明,MT1-MMP 与 Bst-2 之间存在相互作用。

为了进一步确定 MT1-MMP 和 Bst-2 之间的相互作用,采用免疫荧光激光共聚焦实验进一步验证两种蛋白质在细胞内的共定位。将 MDCK 和 HT1080 细胞接种在置有盖玻片的 6 孔板中过夜并转染表达质粒,转染细胞培养在含有 GM6001 抑制剂的培养基中 48 h 后,吸去培养孔中的培养基,按照“实验材料与方法”和文献[18]中的描述对生长在盖玻片上的细胞进行处理,将处理好的盖玻片及细胞用含有 DAPI 的封片油封于载玻片上,制成激光共聚焦实验观察片在激光共聚焦仪上进行观察并拍照。实验结果显示,在 HT1080 细胞中,转染表达的 Bst-2 与内源性 MT1-MMP 在细胞内能够共定位,并主要存在于细胞质中而不是细胞膜上,而没有转染 Bst-2 的细胞中,MT1-MMP 主要定位在细胞膜上。同样,在 MDCK 细胞中,单转染 Bst-2 或者 MT1-MMP 的细胞,过表达的 Bst-2 和 MT1-MMP 主要定位在细胞膜上,而当共转染 MT1-MMP 和 Bst-2 时,MT1-MMP 和 Bst-2 则共定位并主要定位在细胞质中(图 3C)。



A、B,细胞中 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用的 co-IP 实验结果;C、D,细胞中 MT1-MMP 和 Bst-2 共定位的免疫荧光激光共聚焦实验结果

A、B,co-IP results of the interaction between MT1-MMP and Bst-2;C、D,Immunostaining confocal microscopy assay of the co-localization of MT1-MMP and Bst-2 in cells

图3 MDCK和HT1080细胞中MT1-MMP与Bst-2的相互作用与共定位

Fig.3 MT1-MMP interacted and co-localized with Bst-2 in HT1080 and MDCK cells

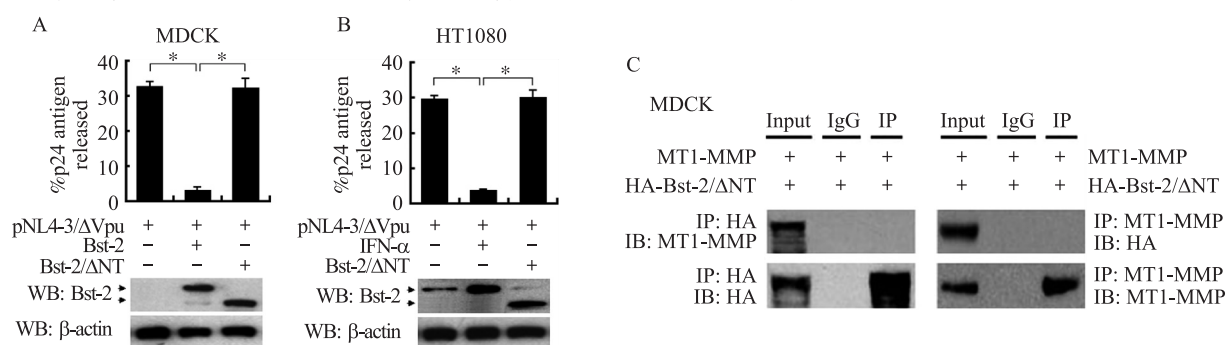
以上结果充分说明,MT1-MMP 和 Bst-2 在细胞中能够相互作用,并且相互作用之后能从细胞膜转移定位到细胞质中。结果提示,MT1-MMP 是通过与 Bst-2 相互作用并共同从细胞膜上转移进入细胞质的方式抑制 Bst-2 的活性和生物学功能。

2.4 Bst-2 的 N-末端结构域在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性的过程中起关键作用

为了检测 Bst-2 的 N-末端结构域在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性中的作用,构建了 Bst-2 的 N-末端缺失突变体表达载体 pcDNA3.1(+)/HA-Bst-2/ Δ NT。将 MDCK 和 HT1080 细胞分别接种在 6 孔板(两组)和 10 cm 细胞培养皿中过夜,然后按图 4 所示分别用 IFN- α 处理细胞和转染相关的表达质粒。48 h 后,6 孔

板中细胞和培养基用于病毒释放实验和 Western-blot 实验分析,10 cm 培养皿中细胞收集后用于 co-IP 实验. 实验结果显示,在 MDCK 和 HT1080 两种细胞中,病毒衣壳蛋白 HIV-1 p24 的释放均能被过表达的 Bst-2(包括 IFN- α 诱导表达的和转染表达的 Bst-2)所抑制,但都不能被突变体 Bst-2/ Δ NT 所抑制(图 4A 和 4B);共转染 MT1-MMP 和 Bst-2/ Δ NT 也不能抑制病毒衣壳蛋白 HIV-1 p24 的释放(图 5),表明 Bst-2 的 N-末端结构域不仅在 Bst-2 抑制病毒颗粒释放中起重要作用,而且在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性中起着关键作用.

为了进一步确定 MT1-MMP 与 HA-Bst-2/ Δ NT 之间是否存在相互作用,将 MDCK 细胞接种在 10 cm 培养皿中过夜后转染相关质粒(图 4C),48 h 后收集细胞进行 co-IP 实验. 结果显示,用 anti-HA 抗体进行 co-IP 后得到的复合物中,不含有与 Input 一致的 MT1-MMP(用 IgG 做 co-IP 作阴性对照);反之,在用 anti-MT1-MMP 抗体进行 co-IP 所得到的复合物中,也没有检测到与 Input 一致的 HA-Bst-2(用 IgG 做 co-IP 作阴性对照)(图 4C). 结果表明,缺失 N-末端结构域的 Bst-2 不能与 MT1-MMP 相互作用,也即 Bst-2 的 N-末端结构域在 MT1-MMP 通过相互作用抑制 Bst-2 活性的过程中扮演重要角色.



A, B, Bst-2 及其突变体 Bst-2/ Δ NT 的生物活性分析和 western-blot 分析;

C, Bst-2 和突变体 Bst-2/ Δ NT 分别与 MT1-MMP 相互作用的 co-IP 分析

A, B, activity assay and western-blot assay of Bst-2 and mutant Bst-2/ Δ NT in cells;

C, co-IP assay of the interaction between MT1-MMP and Bst-2 or Bst-2/ Δ NT. * p <0.01

图4 MDCK 和 HT1080 细胞中, Bst-2 的 N-末端结构域在 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用中的重要地位

Fig.4 Critical role of N-terminal domain (NT domain) of Bst-2 in the interaction between MT1-MMP and Bst-2 in MDCK and HT1080 cells

2.5 MT1-MMP 的 C-末端结构域在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性的过程中起重要作用

为了进一步确定 MT1-MMP 的 C-末端结构域在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性中的重要作用,将 MDCK 和 HT1080 细胞分别接种在 6 孔板中(病毒释放实验和 Western-blot 实验)和 10 cm 培养皿中(co-IP 实验),过夜后如图 6 所示转染相关表达质粒并用 IFN- α 处理细胞,结果显示,在 MDCK 细胞中,病毒衣壳蛋白 HIV-1 p24 的释放被转染表达的 Bst-2 显著抑制,而这种抑制作用又可以被共转染表达的 MT1-MMP 所逆转,却不能被 C-末端结构域缺失的突变体 MT1-MMP/ Δ C 所逆转;同样,在 HT1080 细胞中,用 IFN- α 处理的细胞所释放的病毒衣壳蛋白 HIV-1 p24 明显少于没有用 IFN- α 处理的细胞,而这种减少又可以完全被共转染表达的 MT1-MMP 所逆转,但不能被突变体 MT1-MMP/ Δ C 所逆转(图 6A 和 6B). Co-IP 结果也显示,MT1-MMP/ Δ C 不能与 Bst-2 相互作用(图 6C).

结果表明,MT1-MMP 的 C-末端结构域不仅在 MT1-MMP 与 Bst-2 的相互作用中不可或缺,而且在 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性和生物学功能的过程中起着重要作用.

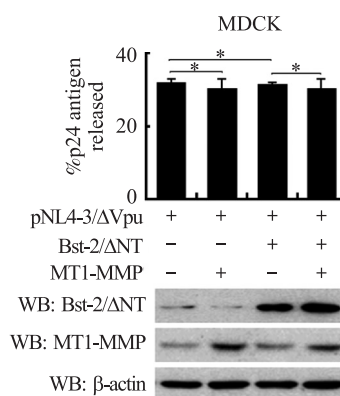
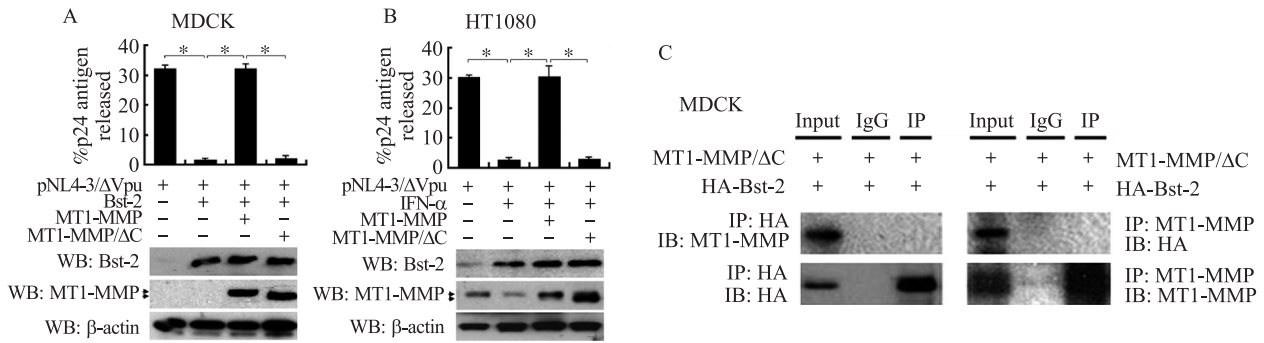


图5 MDCK 细胞中, 转染 Bst-2/ Δ NT 以及共转染 Bst-2/ Δ NT 和 MT1-MMP 均不能抑制病毒衣壳蛋白 HIV-1 p24 的释放

Fig.5 In MDCK cells, transfection of Bst-2/ Δ NT and co-transfection of Bst-2/ Δ NT and MT1-MMP had no effect on the release of HIV-1 p24



A, B, MT1-MMP 的 C-末端结构域抑制 Bst-2 活性的实验结果及相关的 western-blot 分析;

C, MT1-MMP 及其突变体 MT1-MMP/ΔC 分别与 Bst-2 相互作用的 co-IP 实验结果. * $p < 0.01$

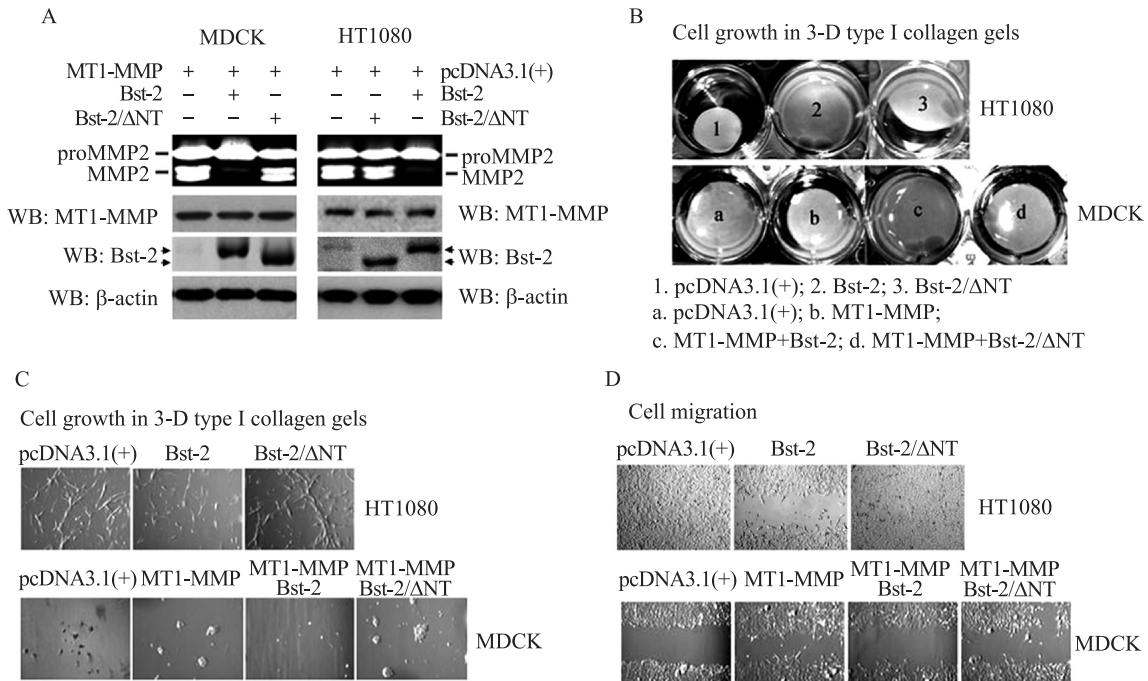
A, B, C, Activity inhibition assay of Bst-2 by MT1-MMP and MT1-MMP/ΔC, and related expression with western-blot assay. * $p < 0.01$

图6 MT1-MMP 的 C-末端结构域在 MT1-MMP 结合 Bst-2 并抑制 Bst-2 活性中的重要作用

Fig.6 Effect of C-terminal domain of MT1-MMP on the activity of Bst-2 and the interaction between these two proteins

2.6 Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 活性中的重要作用

MT1-MMP 激活 proMMP2 的信号通路 (MT1-MMP/proMMP2/MMP2) 对细胞在 I 型胶原蛋白胶中的生长以及细胞的迁移都至关重要^[9]. 之前的报道也证实, Bst-2 能够通过与 MT1-MMP 相互作用而抑制 MT1-MMP 的活性, 进而抑制 MT1-MMP/proMMP2/MMP2 信号通路的功能^[19]. 为了进一步探索 Bst-2 的 N-末端在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 活性中的重要作用, 采用明胶实验、细胞在三维 I 型胶原蛋白胶中的生长实验以及细胞迁移实验等验证了 Bst-2 的 N-末端结构域的重要性. 按照“实验材料与方法”中所述方法步骤处理 MDCK 和 HT1080 细胞, 结果如图 7 所示, 无论是在 MDCK 细胞还是在 HT1080 细胞中, 被 MT1-MMP 激活的 MMP2 (proMMP2 被激活成有活性的 MMP2) 的量明显受制于转染表达的 Bst-2, 而不受制于突变体 Bst-2/ΔNT, 说明 Bst-2 可以抑制 MT1-MMP 活性, 而 Bst-2/ΔNT 却不能抑制 MT1-MMP 的活性 (图 7A).



A, Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 活性中的作用; B, C, Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 促进细胞在 I 型胶原凝胶中生长的促进作用; D, Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 促进细胞迁移的促进作用

A, Effect of N-terminal domain of Bst-2 on MT1-MMP activity; B, C, Effect of N-terminal domain of Bst-2 on MT1-MMP promoted cell growth in 3-D type I collagen gel; D, Effect of N-terminal domain of Bst-2 on MT1-MMP promoted cell migration

图7 MDCK 和 HT1080 细胞中, Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 生物活性和功能中的重要作用

Fig.7 Important role of N-terminal domain of Bst-2 on MT1-MMP activity and MT1-MMP promoted cell growth and migration in MDCK and HT1080 cells

由于 MT1-MMP 以及 MMP2 可以降解胶原蛋白并促进细胞分裂、生长,所以 MT1-MMP 活性越高,细胞在胶原蛋白胶中生长就越好且形成细胞克隆就越多越大;而且降解更多的胶原蛋白,使胶原蛋白胶变得更小。本研究中,细胞在三维胶原蛋白胶中的生长实验结果显示(图 7B 和 7C),无论在 MDCK 细胞还是 HT1080 细胞中,MT1-MMP 活性所表现的效应(如促进细胞分裂生长以及使胶原蛋白胶变小)均明显受到共转染表达的 Bst-2 的抑制,但却不受突变体 Bst-2/ Δ NT 的影响(图 7B 和 7C),说明 Bst-2 能抑制 MT1-MMP 引起的细胞分裂生长和胶原蛋白的降解,而缺失 N-末端结构域的 Bst-2 却不能。

细胞迁移实验结果显示(图 7D),HT1080 细胞的迁移程度明显受到转染表达的 Bst-2 的抑制,却不受突变体 Bst-2/ Δ NT 影响;同样,在 MDCK 细胞的迁移实验中,转染表达的 MT1-MMP 能显著促进细胞的迁移,而这种促进作用又明显被共转染表达的 Bst-2 所抑制,却不被突变体 Bst-2/ Δ NT 抑制。这说明,Bst-2 能抑制 MT1-MMP 引起的细胞迁移作用,而突变体 Bst-2/ Δ NT 却不能。

以上结果表明,Bst-2 的 N-末端结构域不仅在 Bst-2 与 MT1-MMP 相互作用中起关键作用,而且在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 和 MT1-MMP/proMMP2/MMP2 信号通路的活性及其促进细胞生长、降解胶原蛋白和促进细胞迁移等生物学功能的过程中是不可或缺的。

3 实验讨论

Bst-2 和 MT1-MMP 都是穿膜蛋白,两者的胞质部分(即 Bst-2 的 N-末端结构域和 MT1-MMP 的 C-末端结构域)在各自活性和生物学功能的实施过程中都非常重要,是不可或缺的部分^[3,14]。之前的报道表明,Bst-2 能与 MT1-MMP 相互作用而抑制 MT1-MMP 的活性和 MT1-MMP/proMMP2/MMP2 信号通路的生物学功能,并且 MT1-MMP 的 C-末端在 Bst-2 与 MT1-MMP 的相互作用中起到极其重要的作用^[19]。本研究进一步探讨了 MT1-MMP 是否也能抑制 Bst-2 活性及其生物学功能,结果表明,MT1-MMP 能够通过与 Bst-2 的相互作用而抑制 Bst-2 的活性及其相关的生物学功能;而且在 MT1-MMP 与 Bst-2 的相互作用以及 MT1-MMP 抑制 Bst-2 活性的过程中,MT1-MMP 的 C 末端结构域和 Bst-2 的 N-末端结构域均起到关键的、不可或缺的作用。此外,还发现 Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 的活性中也是极为关键的结构域。

据报道,在一些蛋白质(如 Clathrin、Caveolin 等)的帮助下,Bst-2 和 MT1-MMP 这两种膜蛋白各自都可以在细胞膜和细胞质之间穿梭,并通过这种方式调节各自的活性^[7,14,25]。本研究发现,MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用并形成颗粒状复合物,从细胞膜进入细胞质,且主要定位在细胞质中(图 3C)。这表明,MT1-MMP 与 Bst-2 不仅可以各自在其他蛋白质(如 Clathrin、Caveolin 等)的帮助下从细胞膜转运至细胞质,而且相互之间也可以通过相互作用形成复合物一起从细胞膜转移至细胞质。不过,在此复合物中,是否也需要其他蛋白质(如 Clathrin、Caveolin 等)的协助,还有待于进一步的研究。

有文献报道,Bst-2 在细胞膜上需要二聚化形成同二聚体,然后才能发挥其生物学功能,而且在 Bst-2 二聚化过程中,其 N-末端结构域起关键性作用^[26-27]。从结果看,Bst-2 的 N-末端结构域不仅在决定 Bst-2 自身的活性和功能中起重要作用,而且在 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用时,Bst-2 的 N-末端结构域也是关键的结构域,其参与并决定了 MT1-MMP 能否与 Bst-2 发生相互作用(图 3,4,5)。从这些结果不难推测,MT1-MMP 通过与 Bst-2 相互作用阻止了 Bst-2 发生二聚化形成二聚体,进而通过从细胞膜转运至细胞质的方式抑制了 Bst-2 的生物活性和功能,而且在此过程中,Bst-2 的 N-末端结构域参与并决定了 MT1-MMP 结合并阻止 Bst-2 的二聚化。

以前曾报道 Bst-2 能够通过与 MT1-MMP 相互作用而抑制其活性^[19]。本研究进一步发现,Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 与 MT1-MMP 的相互作用以及在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 的活性中极为重要,Bst-2 的 N-末端结构域决定了 Bst-2 能否抑制 MT1-MMP 的活性以及 MT1-MMP/proMMP2/MMP2 信号通路的生物学功能(图 7)。如文献报道,Bst-2 的 N-末端结构域含有 3 个重要的保守氨基酸片段:YxY、KxxK 和 D/GDIWK,这 3 个片段在 N-末端结构域的功能中至关重要^[5]。那么,这 3 个片段在 Bst-2 与 MT1-MMP 的相互作用中是不是也很关键,是都很重要还是其中某一个、两个起关键性作用,还有待进一步实验探究。此外,本实验结果还显示,MT1-MMP 的 C-末端参与并决定了 MT1-MMP 与 Bst-2 的相互作用及其从细胞

膜向细胞质的共转运,进而决定了 MT1-MMP 抑制 Bst-2 的生物活性和功能(图 6 所示).那么,Bst-2 的 N-末端结构域和 MT1-MMP 的 C-末端结构域是否在决定 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用的同时,还存在招募其他协助 MT1-MMP/Bst-2 复合物转运的蛋白质(如 Clathrin、Caveolin 等)进入此复合物的功能呢?这需要进行更多的实验探索.

4 结论

本研究结果阐明了以下几点结论:(1)不仅 Bst-2 可以通过相互作用抑制 MT1-MMP 活性(以前的报道),而且 MT1-MMP 反过来也可以通过相互作用抑制 Bst-2 的生物活性与功能;(2)在 MT1-MMP 与 Bst-2 相互作用并抑制其活性的过程中,MT1-MMP 的 C-末端结构域和 Bst-2 的 N-末端结构域均扮演了决定性的角色;(3)Bst-2 的 N-末端结构域在 Bst-2 抑制 MT1-MMP 的活性中也同样极为关键.综上研究结论,为临床上探索治疗冠状病毒的感染疾病和肿瘤转移等新手段和新药物提供了一些重要的理论依据和参考.

[参考文献]

- [1] KUHLE B D, CHENG V, WAINBERG M A, et al. Tetherin and its viral antagonists[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2011(6): 188-201.
- [2] KUPZIG S, KOROLCHUK V, ROLLASON R, et al. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology[J]. *Traffic*, 2003(4): 694-09.
- [3] NEIL S J, ZANG T, BIENIASZ P D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu[J]. *Nature*, 2008, 451: 425-430.
- [4] VAN DAMME N, GOFF D, KATSURA C, et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein[J]. *Cell Host Microbe*, 2008(3): 245-252.
- [5] EVANS D T, SERRA-MORENO R, SINGH R K, et al. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses[J]. *Trends microbiol*, 2010, 18: 388-396.
- [6] 肖占沛, 郭宏雄, 羊海涛. 束缚蛋白抗 HIV 机制[J]. *生命的化学*, 2011, 31(4): 528-531.
- [7] ROLLASON R, KOROLCHUK V, HAMILTON C, et al. Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120: 3 850-3 858.
- [8] ROLLASON R, KOROLCHUK V, HAMILTON C, et al. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells[J]. *J Cell Biol*, 2009, 184: 721-736.
- [9] SEIKI M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion[J]. *Cancer Lett*, 2003, 194: 1-11.
- [10] ZHOU Z, APTE S S, SOININEN R, et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4 052-4 057.
- [11] D'ORTHO M P, WILL H, ATKINSON S, et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 250: 751-757.
- [12] HOTARY K, ALLEN E, PUNTURIERI A, et al. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149: 1 309-1 323.
- [13] WILL H, ATKINSON S J, BUTLER G S, et al. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoprolytic activation regulation by TIMP-2 and TIMP-3[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 17 119-17 123.
- [14] GÁLVEZ B G, MATÍAS-ROMÁN S, YÁÑEZ-MÓ M, et al. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 678-687.
- [15] UEKITA T, ITOH Y, YANA I, et al. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity[J]. *J Cell Biol*, 2001, 155: 1 345-1 356.
- [16] REMACLE A, MURPHY G, ROGHI C. Membrane type I-matrix metalloproteinase(MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116: 3 905-3 916.
- [17] NAWROCKI-RABY B, GILLES C, POLETTE M, et al. E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 653-661.
- [18] LIU P, YANG J, PEI J, et al. Regulation of MT1-MMP activity by β -catenin in MDCK non-cancer and HT1080 cancer cells[J].

- J Cell Physiol, 2010, 225: 810–821.
- [19] GU G, ZHAO D, YIN Z, et al. BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity[J]. J Cell Biochem, 2012, 113: 1 013–1 021.
- [20] PEI D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 8 925–8 932.
- [21] PEI D, WEISS S J. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity[J]. J Biol Chem, 1996, 271, 9 135–9 140.
- [22] JIANG A, PEI D. Distinct roles of catalytic and pexin-like domains in membrane-type matrix metalloproteinase (MMP)-mediated pro-MMP-2 activation and collagenolysis[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 38 765–38 771.
- [23] KANG T, YI J, YANG W, et al. Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice[J]. FASEB J, 2000, 14: 2 559–2 568.
- [24] POINCLoux R, LIZÁRRAGA F, CHAVRIER P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia[J]. J Cell Sci, 2009, 122: 3 015–3 024.
- [25] WANG H, WANG J, JIA X, et al. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 18 428–18 432.
- [26] SCHUBERT H L, ZHAI Q, SANDRIN V, et al. Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 17 951–17 956.

[责任编辑:黄 敏]