ARF鸟苷酸交换因子 BIGs 对高尔基体相关的囊泡转运的调控作用

林思思，林 巍，王 莹，周 春，李翠限，沈晓燕*
（中山大学药学院药理毒理实验室，广东 广州 510006）

摘 要：【目的】探讨 ARF 鸟苷酸交换因子 BIG1 和 BIG2 在高尔基体相关囊泡转运方面的功能。【方法】利用脂质体将 siRNA 干扰序列转入细胞中，western blotting 方法检测转染效率； 利用细胞免疫荧光染色方法检测 Hela 细胞中 BIGs 蛋白水平的表达分布；采用 Alexa568 标记的转铁蛋白孵育 Hela 细胞，检测转铁蛋白相关的内吞体循环；利用脂质体转染 VSVG-YFP 病毒质粒，检测新生蛋白经从内质网经高尔基体转运至胞膜的途径。【结果】 BIG1 和 BIG2 的 siRNA 干扰效率均高于 70%，且特异性良好；干扰掉 BIGs 后，细胞内 TGN230 结构变松散，呈现短片状或点状；干扰 BIG2 可导致细胞内转铁蛋白的积聚，而同时干扰 BIG1 则可进一步加剧转铁蛋白的积聚；BIG1 或/和 BIG2 干扰均抑制了新生蛋白的从内质网向高尔基及细胞表面的转运过程。【结论】BIGs 蛋白主要位于反面高尔基体网络，对维持其结构完整性非常重要；它们均参与调控高尔基体相关的囊泡转运，两者具有协同作用。

关键词：RNAi；BIGs；反面高尔基体网络；囊泡转运；VSVG-YFP
中图分类号：Q2 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2012)03-0311-05

ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors, BIGs, Regulates Golgi-Related Vesicular Transport

LIN Si-si, LIN Wei, WANG Ying, ZHOU Chun, LI Cui-xian, SHEN Xiao-yan*
(Department of Pharmacology and toxicology, School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract:【Objective】 To investigate the roles of Brefeldin A-inhibited GEPs (BIG1 and BIG2) in Golgi-related vesicular transport.【Methods】Small interfering RNAs targeting BIG1 and BIG2 were transfected by liposome and the efficiency was verified by Western blotting. Immunostaining of BIG1 or BIG2 combined with TGN230 was used to determine the expression and localization of BIGs. The release of uptaked Alexa568-Transferrin was used to detect the transferrin recycling. Hela cells transfected with VSVG-YFP were used to analyze the progression of VSVG along the secretory pathway.【Results】 BIG1and BIG2 protein expression were suppressed at least 70% with high specificity. The staining of trans-Golgi network (TGN) marker TGN230 was fragmented after BIGs depletion. BIG2 siRNA caused transferrin accumulation, and cotransfection withBIG1 siRNA could enhance this effect. BIG1 or/and BIG2 siRNA inhibited the secretory pathway of VSVG.【Conclusion】BIG1 and BIG2 both localize at the TGN, and are required for the integrality of TGN. BIGs co-operate in regulating of Golgi-related vesicular transport.

Key words: RNAi; BIGs; trans-Golgi network; vesicular transport; VSVG-YFP
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(3):311-315]

Brefeldin A 抑制型鸟苷酸交换蛋白(Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG)，是 ARF(ADP 核糖基化因子，ADP-ribosylation factor)鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange proteins，GEP)家族成员，包括 BIG1 和 BIG2，主要位于高尔基体。BIGs 蛋白中央部分含有一个可激

收稿日期：2011-11-30
基金项目：国家自然科学基金(31070924，81173056)；教育部高等学校博士学科点科研基金(20100171110052)
作者简介：林思思，硕士生，E-mail：linss@student.sysu.edu.cn；* 通信作者：沈晓燕，教授，博士生导师，研究方向：细胞内蛋白质转运在相关疾病病理机制中的作用，E-mail：xyshen08@gmail.com

活 ARF 的 Sec7 功能区，通过诱导 ARF 结合 GTP 而活化，从而启动转运囊泡衣被蛋白的募集，参与调控细胞内蛋白质转运[1]。以往研究报道 BIG1与网格蛋白、AP-1 有共定位[2-3]，沉默 BIG1 蛋白后会导致高尔基体结构松散，而抑制整合素 β1 的成熟与转运[4-5]。BIG2 则被发现位于胞浆内的囊泡结构中，可通过影响内吞体循环，调控一些重要的膜受体的质膜表达水平和功能发挥[6-7]。囊泡的定向转运对保证细胞内膜完整性和维持正常细胞器形态与功能至关重要，其调控机制尚不完全清楚。研究表明小 G 蛋白超家族成员 ARF 家族在囊泡转运和分泌过程中发挥着极其重要的作用[8-10]。小分子 RNA (siRNA)干扰作为一种常规的基因沉默技术，以其高特异性高效率的特点在蛋白质功能基础研究中被广泛使用。本研究采用 siRNA 技术沉默 BIGs 蛋白基因表达，研究其对高尔基体结构、内吞体循环以及 VSVG-YFP 蛋白转运的影响，从各个方面论证 BIGs 蛋白参与调控高尔基体相关的囊泡转运。

1 材料与方法

1.1 材 料

Hela细胞购自于美国 ATCC 细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清，Gibco 公司。LipofectamineTM2000 转染试剂盒，Invitrogen 公司。DharmaFECT2 siRNA 转染试剂，Dharmacon Research 公司。BIG1、2 抗体和 VSVG-YFP 质粒由美国国立卫生院 Dr. Vaughan 赠与[11]。TGN230 抗体购自 BD 公司，Alexa 488 及 594 标记的荧光二抗、Alexa568-Tnf 购自 Molecular Probes。试验耗材购自 Corning，其余化学试剂均购自 SIGMA。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 Hela 细胞生长于含有 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基，在 37℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 小分子 RNA 干扰 根据人源性 BIG1 及 BIG2 基因序列，各设计出相应的 siRNA 序列：BIG1 (5′-TGAATCACCTCAACTTAGA-3′) 和 BIG2 (5′-CAACTACGACTGTGATTTA-3′)。经Dharmacon Research 公司合成。细胞初始密度为 30%，采用 DharmaFECT2 siRNA 转染试剂，干扰 72 h。阴性干扰序列购自于 Invitrogen 公司 (命名为 non-targeting siRNA，NT)，同时采用转染试剂对照组 (命名为 Mock)作阴性对照，具体细胞处理方案参考文献[11]及试剂说明书。

1.2.3 Western blotting 细胞经 RNA 干扰处理后，采用 RIPA 细胞匀浆液裂解抽提蛋白，参照文献[12]方法进行 western blotting 检测。

1.2.4 免疫荧光染色 细胞处理后，经 40 g/L 多聚甲醛固定，用含 100 mL/L 山羊血清的 PBS，室温封闭半小时。分别孵育 TGN230、BIG1 或 BIG2 抗体，接着孵育 Alexa488 或 Alexa594 标记的荧光二抗。用含 DAPI 的封片剂封片。

1.2.5 Transferrin 循环 细胞经 siRNA 干扰后，换含有 10 g/L BSA 的无血清 DMEM 培养基孵育 1 h。接着在无血清培养基中添加 10 μg/mL 的 Alexa568-Tnf，37 ℃孵育 1 h[13-14]。转移细胞至冰上，用预冷的 PBS 漂洗 3 次。换用完全培养基，37℃孵箱孵育 10 min 及 60 min。固定细胞并检测。

1.2.6 VSVG 转运 细胞分别干扰 BIG1、BIG2 及 BIG1/2 后，采用 Lipofectamine 2000 转染 VSVG-YFP 病毒质粒 24 h[15]。转移细胞至 40 ℃孵育24 h，使过表达生成的 YFP 蛋白聚积在内质网。转移细胞至 32 ℃，分别孵育 0、15 min 及 60 min。固定细胞，用 DAPI 染细胞核，上述方法封片并拍摄。其中，黄色荧光蛋白在细胞膜上的分布可用于指示蛋白质从内质网经由高尔基体转运至质膜的效率。

2 结 果

2.1 BIG1 和 BIG2 的 siRNA 干扰效率

Western blot 结果表明在 Hela 细胞中，BIG1 和 BIG2 单独干扰的效率很高，与阴性干扰组相比能显著抑制 BIG1 或 BIG2 的蛋白表达量超过 80%；而两条小分子 RNA 序列共同转染，能抑制 BIG1 的效率约 80%，抑制 BIG2 的效率约 70%(图 1)。表明这两条小分子 RNA 分别能特异性高效沉默 BIG1 或 BIG2 的基因表达，共同转染互不影响干扰效果。因此，后续的实验都采用相同的 siRNA 转染条件。

2.2 siRNA 干扰 BIGs 表达影响反面高尔基体网络标记蛋白 TGN230 的分布

免疫荧光染色的结果表明 BIG1 和 BIG2 蛋白主要分布于反面高尔基体，并与反面高尔基体网络特异性标记蛋白 TGN230 有很高水平的共定

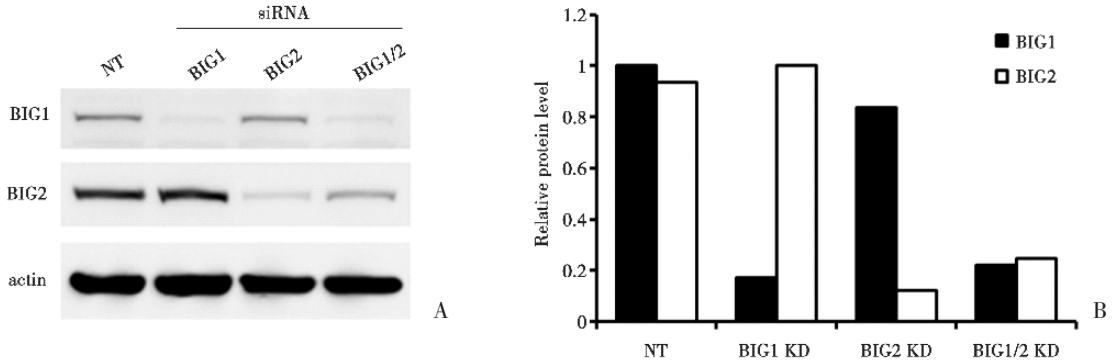


图 1　siRNA 对 Hela 细胞 BIG1、BIG2 蛋白表达的抑制

Fig.1　Reduced BIGs protein expression after siRNA transfection in Hela cells

A: Hela cells were transfected with non-targeting siRNA (NT) or a pool of siRNAs for BIG1, BIG2, BIG1+BIG2. After 72 h, the cells lysates were collected, and subjected to Western blot analysis. B: The expression level of BIG1 or BIG2 were measured and normalized with β-actin by using Quality One software.

位；在 siRNA 干扰后，细胞内 BIG1、BIG2 的表达显著减少，高尔基体上成簇状分布的 TGN230 蛋白均呈现出散在点状或小片段状分布在核周（图 2）。提示反面高尔基体网络的结构发生改变。

2.3　siRNA 干扰 BIGs 可导致细胞内转铁蛋白积聚

经 siRNA BIG1 或/和 BIG2 表达的 Hela 细胞，用 Alexa568-Tnf 孵育、检测转铁蛋白转运。结果显示，同对照组相比，在前 10 min 里 BIG1 或 BIG2 单独敲低的细胞内 Alexa568-Tnf 无显著差异，BIG1 和 BIG2 同时干扰的细胞内 Alexa568-Tnf 已有明显增加（图 3）。60 min 后，阴性干扰组与 BIG1 干扰组细胞内摄取的转铁蛋白大部分被降解；BIG2 干扰组细胞摄取的转铁蛋白大约只被降解一半；而 BIG1 和 BIG2 共同干扰组细胞摄取的转铁蛋白只有少量被降解。表明 BIG2 干扰后，明显抑制了转铁蛋白在细胞内的循环，导致摄取的荧光标记转铁蛋白在核周的循环小体滞留；而 BIG1 和 BIG2 共同干扰加强了这种抑制作用，提示 BIG1 对 BIG2 的囊泡转运功能具有协同作用(图 3)。

2.4　BIGs siRNA 干扰显著抑制 VSVG-YFP 的转运

采用 VSVG-YFP 病毒质粒转染预先经 BIG1 或/和 BIG2 siRNA 干扰处理的 Hele 细胞，研究 BIGs 的调控对内质网转运至高尔基体，并最终至细胞膜的过程是否发挥作用[15]。结果示：0时，对照组与干扰组细胞内 VSVG 蛋白主要定位于内质网；32 ℃孵育 15 min 后，对照组细胞内 VSVG 蛋白大部分转移至高尔基体，而干扰组细胞内 VSVG 蛋白仍大部分留于内质网；32 ℃孵育 60 min 后，对照组有大量 VSVG 蛋白转运至细胞膜上，而干扰组细胞膜上未见 VSVG 蛋白分布(图 4)。

3　讨　论

以往研究表明 BIG1 和 BIG2 主要位于反面高尔基体[3]。我们的免疫荧光染色结果显示，BIGs 主要在核周成簇状结构分布，与反面高尔基体网络标记蛋白 TGN230 高水平的共定位（图 2），表明 BIGs 主要位于反面高尔基体网络。而干扰掉 BIG1 或 BIG2 后，细胞内的 TGN230 部分解聚，提示 BIG1、BIG2 与高尔基体网络的结构完整性有关。

BIGs 通过催化 ARF 结合 GTP 而使其功能活化，从而启动一系列囊泡衣被蛋白的募集，在高尔基体相关囊泡转运过程中发挥重要作用[16]。细胞摄取的 Alexa568-Tnf 主要通过网格蛋白衣被囊泡经由内吞小体转运至循环内体，最后大部分在溶酶体内被降解[13]。我们的实验结果表明，BIG2 与内吞体循环密切相关，干扰 BIG2 后转铁蛋白的降解被显著抑制。Shinotsuka 等人的报道也表明 BIG2 通过调控 AP-1 或 GGA 等衣被蛋白的募集，而影响转铁蛋白囊泡从反面高尔基体转运至溶酶体的过程[7]。而单独干扰 BIG1 对转铁蛋白的循环和降解影响不大。但是当 BIG1 与 BIG2 同时被干扰时，BIG1 干扰后能加强 BIG2 缺失引起的转铁蛋白循环和降解的阻滞作用。表明 BIG1 与 BIG2

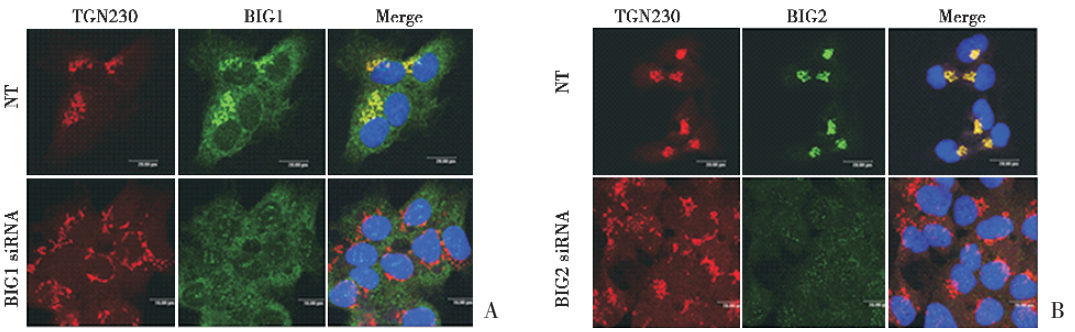


图 2 siRNAs 干扰 BIGs 表达对细胞反面高尔基体网络标记蛋白 TGN230 分布的影响

Fig.2 The distribution of TGN230 was affected by BIGs siRNA

A: Hela cells were transfected with NT and BIG1 siRNA, then immune-stained with TGN230 and BIG1 antibody; B: cells were transfected with NT and BIG2 siRNA, then immune-stained with TGN230 and BIG2 antibody. All the cells were stained with DAPI and analyzed by confocal microscopy, bar = 20 μm.

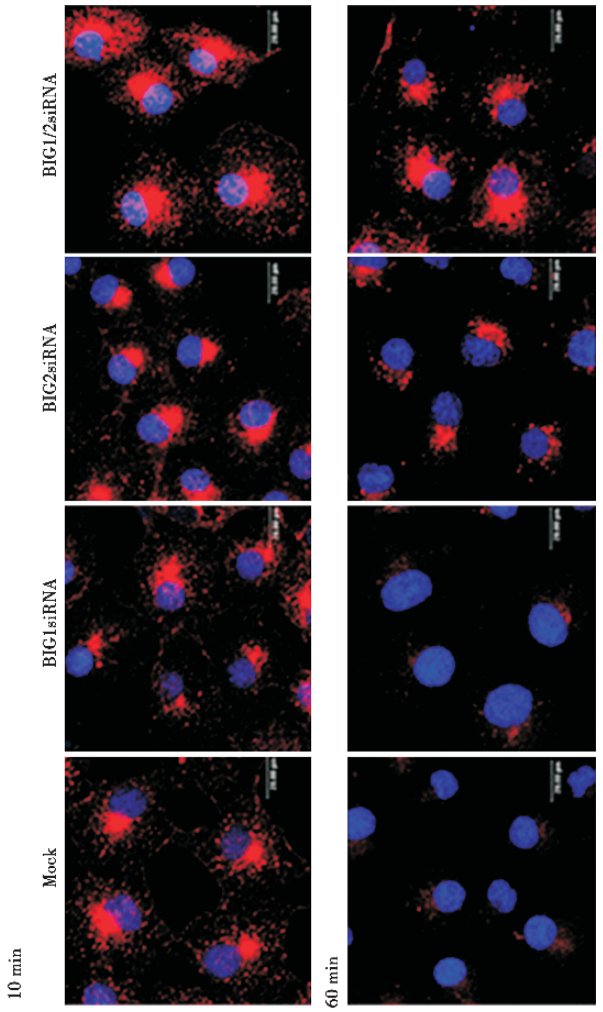


图 3 BIG1 或/和 BIG2siRNA 干扰对转铁蛋白转运的影响

Fig.3 The effect of BIG1 or/and BIG2 siRNA on transferrin trafficking

Hela cells were transfected with indicated siRNA as previous and then incubated with Alexa-546 conjugated transferring for 60 min. After washing thrice with ice-cold PBS, cells were incubated with complete culture medium for 10 or 60 min respectively, and examined by confocal microscopy after fixation, bar = 20 μm.

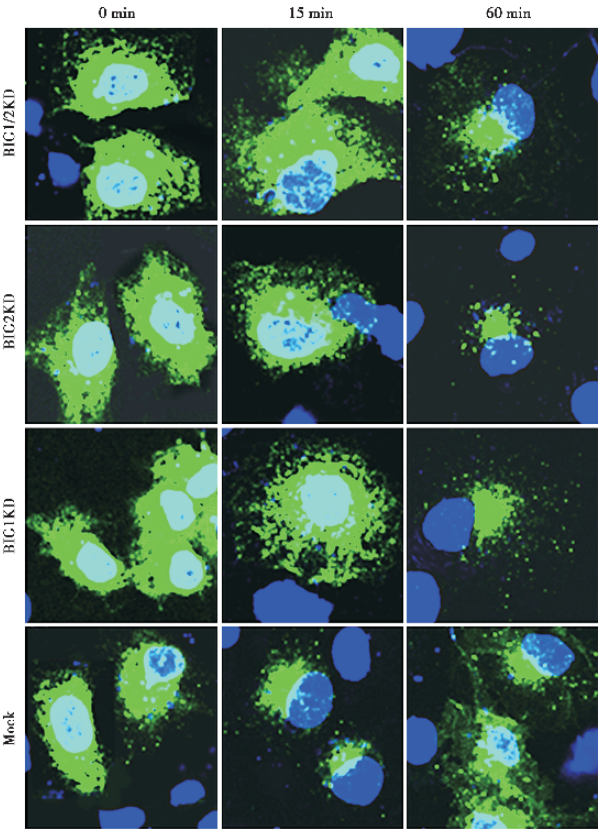


图 4 干扰 BIGs 明显抑制 VSVG-YFP 转运

Fig.4 The trafficking of VSVG-YFP were inhibited by BIGs siRNA

BIG1 or/and BIG2 siRNA treated cells were transfected with VSVG-YFP at 40 ℃ for 24 h, and then transferred to 32℃ for the indicated times (0, 10, and 60 min) before fixation and analysis (×1 000).

两者之间在囊泡转运功能方面具有协同作用。

VSVG蛋白可逆转性地在 39 ℃呈错误折叠状态,而定位于内质网;当温度降低到 33 ℃以下时,VSVG 蛋白能够正确折叠,并通过高尔基体转运至

细胞膜。实验结果证明，单独干扰 BIG1、BIG2 或 BIG1 与 BIG2 双干扰后,均能显著抑制新生 VSVG 蛋白的周转(图 3)。这种抑制作用包括两方面:从内质网转运至高尔基体的速率降低，以及从高尔基体转运至质膜的过程被抑制。研究发现敲低 BIGs 基因,可导致网格蛋白衔接子的缺失,但是对 COP Ⅰ蛋白的生成和聚集没有影响[16];提示 BIGs 蛋白可能通过调控 COPⅡ的募集，进而影响分选蛋白从内质网出位转运至高尔基体。

综上所述:BIG1 和 BIG2 主要定位于反面高尔基体网络，在维持反面高尔基体网络结构完整性方面具有重要作用;BIG1 协同 BIG2 调控了细胞表面如转铁蛋白等的转运、循环及降解;两者共同参与了调控新生蛋白从内质网经由高尔基体转运至胞膜的过程。

参考文献:

[1] Shen X, Meza-Carmen V, Puxeddu E, et al. Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(48): 18788-18793.

[2] Yamaji R, Adamik R, Takeda K, et al. Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(6): 2567-2572.

[3] Zhao X, T K Lasell, P Melancon, et al. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(1): 119-133.

[4] Boal F, D J Stephens. Specific functions of BIG1 and BIG2 in endomembrane organization [J]. PLoS One, 2010, 5(3): 9898.

[5] Shen X, Hong M S, Moss J, et al. BIG1, a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, is required for correct glycosylation and function of integrin beta1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(4): 1230-1235.

[6] Islam A, Shen X, Hiroi T, Moss J, et al. The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles [J]. J Biol Chem, 2007, 282(13): 9591-9599.

[7] Shinotsuka C, Waguri S, Wakasugi M, et al. Dominant-negative mutant of BIG2, an ARF-guanine nucleotide exchange factor, specifically affects membrane trafficking from the trans-Golgi network through inhibiting membrane association of AP-1 and GGA coat proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(2): 254-260.

[8] Mouratou B, Biou V, Joubert A, et al. The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf [J]. BMC Genomics, 2005, 6: 20.

[9] Chavrier P, B Goud, et al. The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(4): 466-475.

[10] Kawasaki M, K Nakayama, S Wakatsuki, et al. Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases[J]. Curr Opin Struct Biol, 2005, 15(6): 681-689.

[11] Shen X, Xu K F, Fan Q, et al. Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during transferrin uptake[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(8): 2635-2640.

[12] Kuroda F, J Moss, M Vaughan, et al. Regulation of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 (BIG1) and BIG2 activity via PKA and protein phosphatase 1gamma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(9): 3201-3206.

[13] Shakor, AB, Taniguchi M, Kitatani K, et al. SMS1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation [J]. J Biol Chem, 2011, 286(41): 36053-36062.

[14] Nagabhushana A, Chalasani M L, et al. Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant[J]. BMC Cell Biol, 2010, 11: 4.

[15] Smith R, Bacos K, et al. Mutant huntingtin interacts with beta-tubulin and disrupts vesicular transport and insulin secretion[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(20): 3942-3954.

[16] Manolea F, Claude A, Chun J, et al. Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi stack and trans-Golgi network, respectively[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(2): 523-535.

(编辑　孙慧兰)