

## PRMT2 及其剪接体在乳腺癌 MCF-7 细胞中的亚细胞定位及意义

陈亚军<sup>1,2,3</sup>, 钟 警<sup>1</sup>, 杨 靖<sup>1</sup>, 文格波<sup>1</sup>

**摘要** 目的 构建蛋白质精氨酸甲基转移酶 2 (PRMT2) 及其差异剪接体与绿色荧光蛋白 (GFP) 的真核表达载体, 转染后观察其融合蛋白在乳腺癌 MCF-7 细胞中的表达及亚细胞定位, 为进一步研究 PRMT2 基因及其新的差异剪接体在乳腺癌中的作用奠定基础。方法 以 pGEM-T-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  载体为模板, 设计引物, PCR 扩增目的基因, 并将 PCR 产物克隆至 pcDNA3.1/NT-GFP-topo 载体, 转化后将阳性克隆扩增, 对 PCR 产物进行跑胶鉴定和测序。提取 pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  及空载体 pcDNA3.1/NT-GFP 质粒, 用脂质体介导转染 MCF-7 细胞, 在激光共聚焦显微镜下, 观察外源性 PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  融合蛋白在 MCF-7 细胞中的亚细胞定位。采用 Western blot 法检测各重组融合蛋白在 MCF-7 细胞中的表达。结果 各 GFP 在细胞中均有表达, 但其在细胞中的分布位置不一致。PRMT2 $\alpha$  与 PRMT2 $\gamma$  的融合蛋白同 PRMT2 的分布一致, 均聚集于核仁外的核浆, 胞质中有少许分布; 而 PRMT2 $\beta$  和空载体的荧光蛋白的分布一致, 都均匀分布于细胞的胞质和胞核, 包括核仁部分。Western blot 法检测表明各重组融合蛋白在 MCF-7 细胞中均有表达。结论 PRMT2 及其各剪接体的亚细胞定位不同, 可能提示其在功能方面存在差异。

**关键词** 乳腺癌; 蛋白质精氨酸甲基转移酶 2; 剪接体; 亚细胞定位

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0423-04

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤, 近年来其发病率在我国呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。在影响乳腺癌发生、发展和预后的诸多因素中, 雌激素起着重要的作用, 雌激素能与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合, 激活含雌激素反应元件基因的表

达<sup>[2]</sup>。蛋白质精氨酸甲基转移酶 2 (protein arginine methyltransferase 2, PRMT2) 作为一种新的 ER $\alpha$  共激活子, 在非洲绿猴肾 COS-7 细胞中能以激素依赖的方式提高 ER $\alpha$  的转录活性<sup>[3]</sup>。本研究在前期工作中发现了 PRMT2 的 3 种新的差异剪接体, 并分别将其命名为 PRMT2 $\alpha$ 、PRMT2 $\beta$ 、PRMT2 $\gamma$  (GenBank 登陆号分别为 FJ436410、FJ436411、FJ436412)。为了探索 PRMT2 基因新的剪接体是否与乳腺癌的发生有关, 该研究采用基因转染的方法, 分别观察 PRMT2 及其各剪接体融合蛋白在乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达及亚细胞定位, 为进一步研究 PRMT2 及其新的剪接体在乳腺癌中的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株、质粒及主要试剂** JM109 菌种、pGEM-T-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  载体均为南华大学附属第一医院临床医学研究所保存; 乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海细胞库; 阳离子脂质体转染试剂 (Lipofect AMINE<sup>TM</sup> 2000)、pcDNA3.1/NT-GFP 载体、TRIzol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司; Blue Ranger 预染蛋白分子标准购自美国 Hyclone-Pierce 公司; Cy3 荧光素标记羊抗兔二抗、兔抗人 ER $\alpha$  多克隆一抗及辣根过氧化物酶购自美国 Santa Cruz 公司; 各种培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Sigma 公司。

**1.2 细胞培养** MCF-7 细胞采用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基进行培养, 培养基中添加 0.1 mmol/L 非必需氨基酸、1.0 mmol/L 丙酮酸钠、0.01 mg/ml 牛胰岛素、1.5 g/L 碳酸氢钠, 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。取对数生长期细胞进行实验。

**1.3 PRMT2 及其剪接体绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 重组质粒的构建与鉴定** 以本实验室保存的 pGEM-T-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  载体为模板, 扩增 PRMT2 基因全长引物为上游: 5'-ATG GCAACATCAGGTGACT-3', 下游: 5'-TCATCTCCA-GATGGGAA-3'; 扩增 PRMT2 $\alpha$  基因引物为上游: 5'-ATGGCAACATCAGGTGACT-3', 下游: 5'-TCAACT

2015-01-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (编号: 31200573); 湖南省自然科学基金资助项目 (编号: 13JJ6051)

作者单位: <sup>1</sup>南华大学附属第一医院临床医学研究所, 衡阳 421001

<sup>2</sup>南华大学附属第二医院内分泌科, 衡阳 421001

<sup>3</sup>南华大学病理生理学教研室, 衡阳 421001

作者简介: 陈亚军, 女, 硕士;

文格波, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wen\_gb@hotmail.com

GTCATCTCCAG-3';扩增 PRMT2 $\beta$  基因引物为上游: 5'-ATGGCAACATCAGGTGACT-3', 下游: 5'-TCAT-CACCCCTCAAGATAT-3';扩增 PRMT2 $\gamma$  基因引物为上游: 5'-ATGGCAACATCAGGTGACT-3', 下游: 5'-TCATCTCCAGATGGGGAAGA-3'; PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 其中上下游引物各 1  $\mu$ l, 模板 1  $\mu$ l, 2  $\times$  Tag PCR Master Mix 10  $\mu$ l, 超纯水 7  $\mu$ l, PCR 仪上扩增。扩增产物连接至 pcDNA3.1/NT-GFP-topo vector 载体, 反应体系为 5  $\mu$ l, 其中 PCR 产物 3  $\mu$ l, topo vector 1  $\mu$ l, salt solution 1  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 连接 1 h 后转化, 将筛选的引物进行 PCR 扩增, 跑胶鉴定及测序(宝生物大连有限公司), Blast 软件进行比对分析。

**1.4 PRMT2 及其剪接体蛋白的亚细胞定位观察**  
取对数生长期细胞按  $3.5 \times 10^5$ /孔密度接种于培养板。待细胞贴壁生长融合约 50% 时, 将 pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2/ $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  及空载体表达质粒转染 MCF-7 细胞;具体操作参照 Lipofect AMINE<sup>TM</sup>2000 说明书。48 h 后, 于室温下细胞用 3% 多聚甲醛溶液固定 10 min, 0.1% Triton X-100 穿透 5 min, 含 Cy3 标记的 ER $\alpha$  抗体孵育 2 h, DAPI 染核 3 min, 每个步骤开始前均加入 PBS 冲洗细胞 2 次, 激光共聚焦显微镜观察 PRMT2 及其剪接体蛋白的亚细胞定位情况。

**1.5 Western blot 法检测重组融合蛋白的表达**  
用细胞裂解液裂解各组细胞, 提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度, 具体方法参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书。于 100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 取等量总蛋白 SDS-PAGE 分离, 转至硝酸纤维素膜上。TBST(含 5% 脱脂奶粉)封闭 2 h 后, 加入兔抗人 GFP 多克隆一抗(1:1 000)过夜;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:4 000)室温孵育 60 min, 化学发光试剂盒显色, 压片显影, 分析 PRMT2 及其剪接体 GFP 融合蛋白表达情况。

## 2 结果

**2.1 PRMT2 及其剪接体基因扩增** 成功扩增出 PRMT2 及其剪接体基因全长, 电泳鉴定 PRMT2 及其剪接体基因 PCR 扩增产物。PRMT2 扩增条带约为 1 300 bp, PRMT2 $\alpha$  与 PRMT2 $\beta$  对应条带约 900 bp, PRMT2 $\gamma$  扩增条带最小, 约 700 bp, 与预计大小基本一致。见图 1。

**2.2 外源性 PRMT2 及其剪接体蛋白的亚细胞定位** 表达载体分别转染 MCF-7 细胞, 8h 后, 用激光

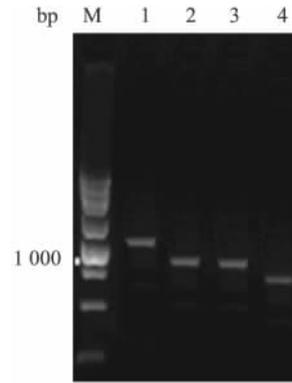


图 1 PRMT2 及其剪接体基因扩增电泳鉴定  
M: Marker; 1: PRMT2; 2: PRMT2 $\alpha$ ; 3: PRMT2 $\beta$ ; 4: PRMT2 $\gamma$

共聚焦显微镜观察 MCF-7 细胞中分别转染了 PRMT2 及其新剪接体的真核表达质粒 GFP 的表达, 结果显示: 剪接体 PRMT2 $\alpha$  与 PRMT2 $\gamma$  融合蛋白的亚细胞分布同野生型 PRMT2 的分布一致, 均聚集于核内除核仁外的核浆部分, 胞质有少许分布。而 PRMT2 $\beta$  则不同, 融合蛋白均匀分布于胞质和胞核, 包括核仁部分, 与空载体 GFP 蛋白的分布一致。见图 2。

**2.3 Western blot 法检测重组融合蛋白的表达** 蛋白经过 SDS-PAGE 电泳转膜 X 线片曝光并显影和定影后观察到转染了 pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2/ $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  及空载体 pcDNA3.1/NT-GFP 都检测到了条带, 表明各组融合蛋白在 MCF-7 细胞中的表达成功。见图 3。

## 3 讨论

目前认为 ER $\alpha$  信号途径活性的改变在乳腺癌的发生发展过程中起着重要的作用, 而 ER $\alpha$  共调节因子的变化, 是导致 ER $\alpha$  信号途径活性改变的重要原因。正常情况下, 雌激素水平在绝经后的妇女中是下降的, 而 ER $\alpha$  转录活性却在绝经后的乳腺癌患者中表现增强, 雌激素主要通过 ER $\alpha$  结合促进乳腺癌的发生发展。目前乳腺癌内分泌治疗主要通过降低体内雌激素水平及抑制雌激素作用, 达到抑制肿瘤细胞生长的目的, 因此对 ER $\alpha$  共调节因子的发现与研究对于指导乳腺癌内分泌药物的有效研发具有重要意义。

PRMT2 属于 PRMTs 的成员之一<sup>[3]</sup>, 在人染色体上定位于 21q22.3 末端着丝粒的位置, 编码 433 个氨基酸。PRMT2 能通过多种机制发挥不同的转

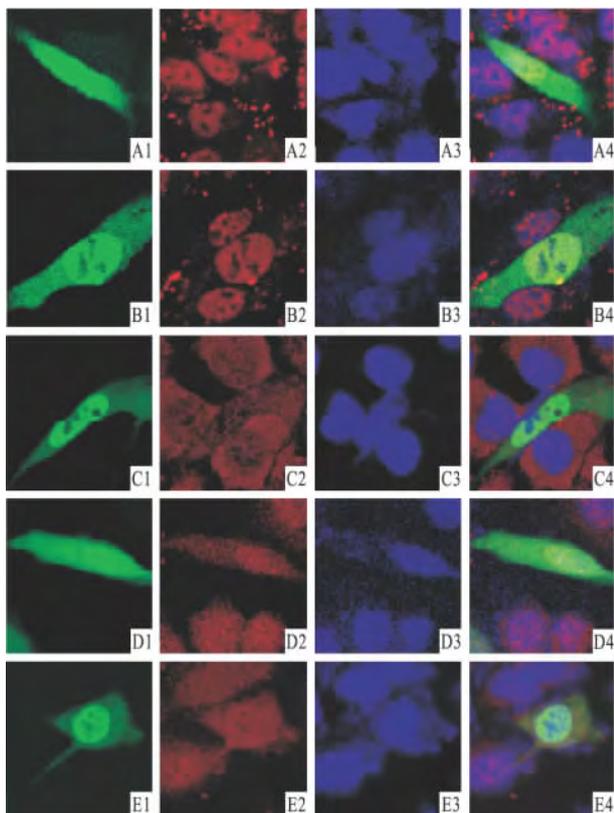


图2 激光共聚焦显微镜观察 PRMT2 及其剪接体在 MCF-7 细胞中的亚细胞定位 ×1 000

A: GFP 空载体; B: PRMT2; C: PRMT2 $\alpha$ ; D: PRMT2 $\beta$ ; E: PRMT2 $\gamma$ ; 1: GFP; 2: ER $\alpha$ ; 3: DAPI; 4: Merge

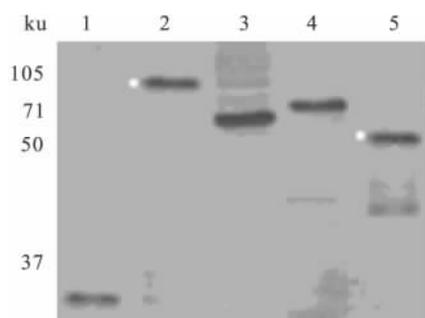


图3 Western blot 法检测 PRMT2 及其各剪接体融合蛋白的表达  
1: GFP; 2: PRMT2-GFP; 3: PRMT2 $\alpha$ -GFP; 4: PRMT2 $\beta$ -GFP; 5: PRMT2 $\gamma$ -GFP

录调节作用,包括转录因子甲基化<sup>[4]</sup>、组蛋白甲基化<sup>[5]</sup>、RNA 差异剪接等<sup>[6]</sup>,并参与细胞分化<sup>[7]</sup>、炎症反应<sup>[8]</sup>及细胞信号转导<sup>[9]</sup>等过程。PRMT2 所起的多种生物学作用主要依赖于其 N-末端的 SH3 结构域。PRMT2 主要通过直接黏附于 ER $\alpha$  的 AF-1 或 AF-2 等结构域来充当 ER $\alpha$  的共激活子,提高其转录活性<sup>[3]</sup>,然而 PRMT2 在乳腺癌细胞中的表达形式、调控 ER $\alpha$  信号途径的机制,目前尚未清楚。研

究<sup>[7]</sup>表明,PRMT2 能阻断 IkB- $\alpha$  的核输出,抑制 NF- $\kappa$ B 依赖的转录,促进细胞凋亡。PRMT2 还能与视网膜细胞瘤基因和 E2F1 结合,形成三体复合物来抑制 E2F1 转录活性,延缓细胞从 G<sub>1</sub> 期至 S 期的进程,促进细胞凋亡<sup>[10]</sup>。这些结果均表明 PRMT2 可通过多种机制发挥不同的转录调节作用。

高等真核细胞可以通过选择性剪接使蛋白质组产生多样性,这是转录后水平调控基因表达的重要机制。从细胞生理、发育调控到疾病的发生发展都与选择性剪接密切相关。近年的研究<sup>[11]</sup>表明,发生在编码蛋白质基因的差异性剪接与许多肿瘤的形成和发展密切相关,并且有些选择性剪接是肿瘤所特有的。研究选择性剪接的发生以及探索相应蛋白异构体的功能对于肿瘤的诊断和治疗具有十分重要的意义。

为了探索 PRMT2 基因及其差异剪接体的功能,本研究构建了 PRMT2 基因及其各差异剪接体的真核表达载体,利用基因转染的方法来初步探讨 PRMT2 及其剪接体的生物学功能。本研究通过脂质体介导转染后采用 Western blot 法证实了 MCF-7 细胞中 PRMT2 及其剪接体融合蛋白均获得较高表达。转染后 48 h,用激光共聚焦显微镜观察外源性 PRMT2 及其差异剪接体 PRMT2 $\alpha$ 、PRMT2 $\beta$ 、PRMT2 $\gamma$  融合蛋白在 MCF-7 细胞中 GFP 的表达,结果显示 PRMT2 及其差异剪接体的融合蛋白在各组细胞中均有表达,但其分布位置不一致。由此推测,PRMT2 及其剪接体之间出现的亚细胞定位差异很可能是由选择性剪接引起的。PRMT2 各差异剪接体在乳腺癌 MCF-7 细胞中拥有不同的亚细胞定位,提示其生物学意义可能有所不同。PRMT2 新的剪接体在体内的作用如何,是否与其亚细胞定位有关,其差异剪接是否对 ER $\alpha$  信号转导途径产生影响,是否将成为一个新的肿瘤标志物,有待于进一步研究证实。

## 参考文献

- [1] Glass A G, Lacey J V Jr, Carreon J D, et al. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(15): 1152-61.
- [2] Lupien M, Eeckhoute J, Meyer C A, et al. Coactivator function defines the active estrogen receptor alpha cisome [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(12): 3413-23.

- [3] Qi C ,Chang J ,Zhu Y ,et al. Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha [J]. *J Biol Chem* ,2002 ,277(32) : 28624 – 30.
- [4] Mowen K A ,Schurter B T ,Fathman J W ,et al. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes [J]. *Mol Cell* 2004 ,15(4) :559 – 71.
- [5] Meyer R ,Wolf S S ,Obendorf M. PRMT2 , a member of the protein arginine methyltransferase family ,is a coactivator of the androgen receptor [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 ,107(1 – 2) :1 – 14.
- [6] Iwasaki H ,Kovacic J C ,Olive M ,et al. Disruption of protein arginine N-methyltransferase 2 regulates leptin signaling and produces leanness *in vivo* through loss of STAT3 methylation [J]. *Circ Res* , 2010 ,107(8) :992 – 1001.
- [7] Ganesh L ,Yoshimoto T ,Moorthy N C ,et al. Protein methyltransferase 2 inhibits NF- $\kappa$ B function and promotes apoptosis [J]. *Mol Cell Biol* 2006 ,26(10) : 3864 – 74.
- [8] Dalloneau E ,Pereira P L ,Brault V ,et al. Prmt2 regulates the lipopolysaccharide-induced responses in lungs and macrophages [J]. *Immunol* 2011 ,187(9) : 4826 – 34.
- [9] Blythe S A ,Cha S W ,Tadjuidje E ,et al. Beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase , Prmt2 [J]. *Dev Cell* ,2010 ,19(2) :220 – 31.
- [10] Yoshimoto T ,Boehm M ,Olive M ,et al. The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function [J]. *Exp Cell Res* ,2006 ,312(11) :2040 – 53.
- [11] David C J ,Manley J L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged [J]. *Genes Dev* 2010 ,24(21) :2343 – 64.

## Subcellular localization of PRMT2 gene and its splicings in breast cancer MCF-7 cells

Chen Yajun<sup>1 2 3</sup> ,Zhong Jing<sup>1</sup> ,Yang Jing<sup>1</sup> ,et al

(<sup>1</sup>*Institute of Clinical Medical Research ,The First Affiliated Hospital ,University of South China ,Hengyang 421001 ;*

<sup>2</sup>*Dept of Endocrinology ,The Second Affiliated Hospital ,University of South China ,Hengyang 421001 ;*

<sup>3</sup>*Dept of Pathophysiology ,University of South China ,Hengyang 421001 )*

**Abstract Objective** To construct eukaryotic expression vectors pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2 and its splicings pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2 $\alpha/\beta/\gamma$  and transfected into breast cancer MCF-7 cells ,observe the subcellular localization of GFP-fusion protein in order to investigate the role of PRMT2 and its splicings in breast cancer. **Methods** The PRMT2 and its splicings genes were amplified from the vectors pGEM-T-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  ,then subcloned into pcDNA3.1/NT-GFP-topo vector and sequenced. The recombinant pcDNA3.1/NT-GFP-PRMT2/ $\alpha/\beta/\gamma$  ,were transfected into breast cancer MCF-7 cells by lipofectamine respectively. The expression of green fluorescent protein was observed under laser scanning microscope ,and the expression levels of PRMT2 $\alpha/\beta/\gamma$  fusion protein were identified by western blot. **Results** The expression of GFP fusion protein of PRMT2 and its splicings were observed under the laser scanning microscope ,indicating that PRMT2 $\alpha$  and PRMT2 $\gamma$  GFP fusion protein resulted in the nuclei except the nucleolus ,cytoplasm has diffusion to scatter ,as well as that of PRMT2. PRMT2 $\beta$  and N-GFP protein showed scatter homogeneously in nuclei and cytoplasm. Western blot indicated the recombinant PRMT2 and its splicings PRMT2 $\alpha/\beta/\gamma$  genes were respectively expressed in breast cancer MCF-7 cells. **Conclusion** The subcellular localization of PRMT2 and its splicings are different and which maybe suggests they that the distinct roles in breast cancer.

**Key words** breast cancer; protein-arginine N-methyltransferase 2; splicings; subcellular localization