

·基础研究·

HMBA诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中 hnRNP A2/B1 的表达与定位

赵春红¹, 李祺福¹, 陈兰英², 唐 剑¹, 宋建晔¹, 谢 忠¹

Expression and Localization of hnRNP A2/B1 during Differentiation of Human Osteosarcoma MG-63 Cells Induced by HMBA

ZHAO Chun-Hong¹, LI Qi-Fu¹, CHEN Lan-Ying², TANG Jian¹, SONG Jian-Ye¹, XIE Zhong¹

1. 厦门大学细胞生物学与
肿瘤细胞工程教育部重点
实验室,
福建 厦门 361005

2. 平顶山工学院生物工程系,
河南 平顶山 467001

1. Key Laboratory of Education
Ministry of China for Cell Biology
and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences,
Xiamen University,
Xiamen, Fujian, 361005,
P. R. China
2. Pingdingshan Institute of
Technology,
Pingdingshan, Henan, 467001,
P. R. China

通讯作者: 李祺福

Correspondence to: LI Qi-Fu

Tel: 86-592-2185363

E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项
目 (No. 30470877)

Grant: National Natural Science
Foundation of China
(No. 30470877)

收稿日期: 2007-08-13

修回日期: 2007-12-25

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: The differentially expressed nuclear matrix proteins have great effects on canceration and regulation of cell differentiation. This study was to explore the existence and distribution of ribonucleoprotein hnRNP A2/B1 in nuclear matrix and its co-localization with Actin and Prohibitin in human osteosarcoma MG-63 cells before and after hexamethylene bisacetamide (HMBA) treatment. **METHODS:** The nuclear matrix of MG-63 cells before and after treatment of HMBA were selectively extracted. The expression and localization of hnRNP A2/B1 in nuclear matrix were detected by 2-D PAGE, MALDI-TOF-MS, Western blot, and immunofluorescent staining. The co-localization of hnRNP A2/B1 with Actin and Prohibitin was observed under laser scanning confocal microscope (LSCM). **RESULTS:** hnRNP A2/B1 was detected in the component of nuclear matrix proteins of MG-63 cells by Western blot and immunogold staining and its expression was decreased after treatment of HMBA. hnRNP A2/B1 was located in the nuclear matrix, and its expression was weakened after HMBA treatment. hnRNP A2/B1 was co-localized with Actin or Prohibitin in MG-63 cells, while the co-localization relationship was weakened during differentiation of MG-63 cells. **CONCLUSIONS:** hnRNP A2/B1 is a kind of nuclear matrix protein, and localizes in the nuclear matrix. The distribution and expression of hnRNP A2/B1 and its co-localization with Actin and Prohibitin play important roles during the differentiation of MG-63 cells.

KEYWORDS: hnRNP; Nuclear matrix; Osteosarcoma; MG-63 cell; Cell differentiation

【摘 要】 背景与目的:核基质蛋白的差异表达与细胞癌变和增殖分化调控关系密切。本研究观察了 hnRNP A2/B1 在诱导分化处理前后人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质中的存在和分布,及其与 Actin、Prohibitin 的共定位关系。**方法:**选择性抽提经环六亚甲基双乙酰胺(hexamethylene bisacetamide, HMBA)诱导处理前后的 MG-63 细胞核基质,并运用双向电泳、质谱分析、蛋白质印记杂交、免疫荧光、激光共聚焦等技术检测 hnRNP A2/B1 在核基质中的表达与定位变化,及其与相关蛋白的共定位关系。**结果:**双向电泳及蛋白质印迹杂交结果证实了 hnRNP A2/B1 存在于 MG-63 细胞核基质蛋白组分中,并在 HMBA 处理后细胞核基质中表达下调;免疫荧光显微镜观察显示 hnRNP A2/B1 定位在核基质上,经 HMBA 处理后 hnRNP A2/B1 表达减弱。激光共聚焦显微镜观察结果显示, hnRNP A2/B1 与细胞核基质蛋白组分 Actin、细胞增殖相关调控因子 Prohibitin 具有共定位关系,但在诱导处理后细胞内的共定位关系减弱。**结论:**hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞诱导分化过程中的表达分布,及其与 Actin、Prohibitin 的共定位关系的改变对 MG-63 细胞分化具有重要影响,值得进一步探索和研究。

关键词: hnRNP A2/B1; 核基质; 成骨肉瘤; MG-63 细胞; 细胞分化

中图分类号: Q24; Q27 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2008)07-0677-08

核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 (hnRNP A2/B1)是前体 mRNA 结合蛋白。作为 hnRNP 家族的核心成员之一, hnRNP A2/B1 参与了 mRNA 的转运和转录后修饰, 并可通过结合单链 DNA 在 DNA 复制、转录及重组中发挥重要作用^[1-4]。此外, hnRNP A2/B1 表达的改变与细胞分化及癌变关系密切, 是多种肿瘤早期诊断的潜在标志物^[5-8]。我们的研究发现, 在环六亚甲基双乙酰胺 (hexamethylene bisacetamide, HMBA) 诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞和胃癌 MGC80-3 细胞分化过程中, hnRNP A2/B1 的表达发生明显变化^[9,10], 提示它是一种核基质蛋白, 并与肿瘤细胞增殖分化过程密切相关。HMBA 是一种小分子的平面极性化合物, 近年来被证实对人白血病、成骨肉瘤、肝癌、胃癌等多种人类恶性肿瘤细胞具有显著的诱导分化作用, 并已应用于肿瘤细胞的临床诱导分化治疗中, 是当前用于肿瘤细胞诱导分化研究的特异诱导分化物。我们先前的实验研究已表明 HMBA 对 MG-63 细胞具有诱导分化作用^[11,12]。为此, 本文继续应用 HMBA 诱导处理 MG-63 细胞, 检测 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质中的定位和表达, 并对 hnRNP A2/B1 与细胞增殖分化相关调控因子 Prohibitin 和细胞核基质蛋白组分 actin 的相互关系做进一步研究, 为进一步探索细胞增殖分化过程中 hnRNP A2/B1 的调节作用, 以及深入认识细胞癌变与逆转机理提供相关的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人成骨肉瘤 MG-63 细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。兔抗人 hnRNP A2/B1 抗体购自 Santa Cruz 公司, 鼠抗人 Actin 抗体、羊抗鼠 IgG-TRITC、羊抗兔 IgG-FITC、羊抗小鼠 IgG-Cy3 均购自武汉博士德生物公司, 小鼠抗人 Prohibitin 抗体购自 NeoMarkers 公司, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, HMBA 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与诱导分化处理

MG-63 细胞培养于 RPMI-1640 培养液中 (内含 15% 热灭活小牛血清、100 u/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、50 μg/mL 卡那霉素, pH7.2), 于 37℃ 培养。取对数生长期细胞消化传代。细胞传代培养至 24 h 后, 诱导处理组细胞更换含 5 mmol/L

HMBA 的培养液, 每 2~3 d 换液一次, 连续培养后备用。

1.3 细胞的选择性抽提及光镜样品制备

细胞的选择性抽提参照文献^[13]。经选择性抽提的盖玻片培养细胞用 2% 戊二醛 (无酶消化液配) 于 4℃ 预固定 30 min, 0.1 mol/L PBS (pH7.4) 漂洗后, 于 0.2% 考马斯亮蓝染液中染色 20 min, 蒸馏水漂洗, 晾干, 二甲苯透明, 中性树脂封片, Olympus BH-2 型显微镜下观察拍照。

1.4 核基质蛋白的提取

参照细胞核基质蛋白的常规制备方法^[14]并加以改进。MG-63 细胞用 PBS 洗 2 次后, 加入细胞骨架提取液 I (CSK100, 10 mmol/L PIPES, pH6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF), 0℃ 放置 10 min, 离心去上清, 加入细胞骨架提取液 II (CSK50, 10 mmol/L PIPES, pH6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF), 洗涤 2 次, 离心去除上清液。然后加入以 CSK50 配制的含 300 U/mL DNase I 的消化缓冲液室温消化 30 min, 最后逐滴加入 1 mol/L (NH₄)₂SO₄ 至终浓度为 0.25 mol/L, 室温 15 min, 离心去上清, 剩余不溶性沉淀物即为核基质蛋白成分, -80℃ 贮存备用。

1.5 双向电泳与图像分析

常规方法进行双向电泳, 一向等电聚焦采用 11 cm 的预制干胶条 (pH3-10, Bio-Rad 公司产品), 二向 SDS-PAGE 采用 12.5% 的分离胶及 4% 的浓缩胶。以质谱兼容的硝酸银染色法染色, 对 3 个重复实验组凝胶图像蛋白点的检测、匹配、定量、标准化及统计学分析均通过凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 (Bio-Rad) 进行。蛋白点光密度值进行了标准量化, 相对密度变化超过 2 倍的点定义为差异表达的蛋白点。各差异蛋白点含量为蛋白点与相应样本总上样量的比值, 以去除样本之间上样量差异对蛋白质表达水平的影响, 并对 hnRNP A2/B1 蛋白点的凝胶图像作局部放大。

1.6 核基质蛋白的质谱鉴定

挖取差异表达的蛋白点, 经漂洗、脱色、DTT 还原、烷基化、干燥、胶内酶解、肽段抽提等步骤后, 通过 ReFlexTM III 型 MALDI-TOF 质谱仪 (Bruke 公司) 获取酶解蛋白的肽指纹 (PMF) 数据。数据经分析软件 flexAnalysis 进行处理, 消除误差

与污染峰。最后在 MASCOT (www.matrixscience.com) 蛋白质组数据库中查询鉴定。

1.7 蛋白质印迹杂交

灌制 12.5% 的聚丙烯酰胺分离胶, 4% 浓缩胶, 聚合后取适量核基质蛋白样品进行常规 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后以半干法将条带转移到 PVDF 膜 (Millipore) 上。丽春红染色检测电泳效果, 漂洗, 干燥。PVDF 膜以 5% BSA 室温孵育 1.5 h。加入 hnRNP A2/B1 (1:1000) 抗体稀释液, 室温孵育 2 h。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1 h。ECL 化学发光检测试剂盒进行显色, 图像扫描并保存。以 5% BSA 代替一抗作为阴性对照。以 β -actin 作为内参照。

1.8 hnRNP A2/B1 的免疫荧光标记

将对照组 MG-63 细胞和经 5 mmol/L 的 HMBA 处理 5 d 的细胞接种到玻片上, 继续培养 2~3 d 后取出, 以 PBS 洗涤 2 次, 选择性抽提核基质-中间纤维系统, PBS 洗涤, 在 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 用含 0.5% Triton X-100 的 PBS (TPBS) 漂洗 2 次, 每次 5 min。5% BSA 室温封闭 1 h, 分别滴加 30 μ L 1 000 倍稀释的 hnRNP A2/B1 抗体, 室温 30 min, 移入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。TPBS 振荡漂洗 3 次。滴加 FITC 标记的二抗稀释液, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, TPBS 漂洗。90% 甘油/PBS 封片。以 5% BSA 代替一抗作阴性对照。

1.9 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察

将 MG-63 细胞和经 5 mmol/L HMBA 处理 5 d 的细胞接种到玻片上, 继续培养 2~3 d 后, 取出长有细胞的玻片, PBS 洗涤, 透膜 30 min, 4% 多聚甲醛中固定 10 min, TTBS 漂洗。5% BSA 室温封闭 1 h, 以 5% BSA 配制一抗作用液 (hnRNP A2/B1 稀释 1000 倍, Actin 和 Prohibitin 各稀释 200 倍)。设制双标记抗体组合: hnRNP A2/B1+Actin, hnRNP A2/B1+Prohibitin。各加 40 μ L 相应一抗稀释液至玻片上, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TTBS 漂洗。以 5% 的 BSA 配制相应组合的二抗作用液 (hnRNP A2/B1 以绿色荧光染料 FITC 进行标记, Actin 以红色荧光染料 TRITC 进行标记, Prohibitin 抗体以红色荧光染料 Cy3 标记)。各取 30 μ L 相应组合的二抗作用液加到玻片上, 室温避光孵育 30 min, 移入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 3 h, TPBS 漂洗, 90% 甘油/PBS 封片, TCS-SP2 MP 型激光共聚焦显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 hnRNP A2/B1 在诱导分化前后细胞核基质中的差异表达

对照组 MG-63 细胞与 HMBA 处理组细胞提取的核基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上。HMBA 处理核基质蛋白双向电泳酸性端后发现, 核基质蛋白主要分布在等电点 4~7 分子量 10~100 ku 之间, 以 40 ku 和 100 ku 之间蛋白含量最高; HMBA 处理核基质蛋白双向电泳碱性端后, 碱性端蛋白质较少, 仅有散在分布的数个蛋白点 (S7 蛋白点为质谱鉴定的 hnRNP A2/B1 蛋白)。核基质蛋白双向电泳图谱用 Melanie 软件对差异蛋白质相对含量进行分析, 结果表明 S7 蛋白点的含量下降了 2 倍左右。见图 1。

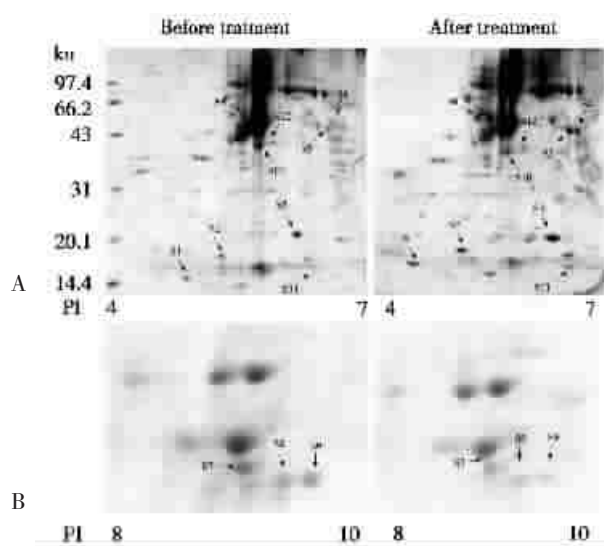


图 1 HMBA 诱导分化前后人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质蛋白双向电泳结果

Figure 1 Expression of nuclear matrix proteins in MG-63 cells before and after HMBA treatment on 2-D PAGE gels A: pI 4-7, silver staining. B: Enlarged maps of changed expression of hnRNP A2/B1, pI 8-10, silver staining.

2.2 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定结果

对编号为 S7 的差异表达蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析获得肽指纹图谱 (图 2), 经 MASCOT 数据库查询之后得到的鉴定结果: NCBI 数据库查询目录号为 gil4504447, 分子量为 36 041 u, 等电点为 8.67, 匹配肽段为 8 个, 序列覆盖率为 37%。

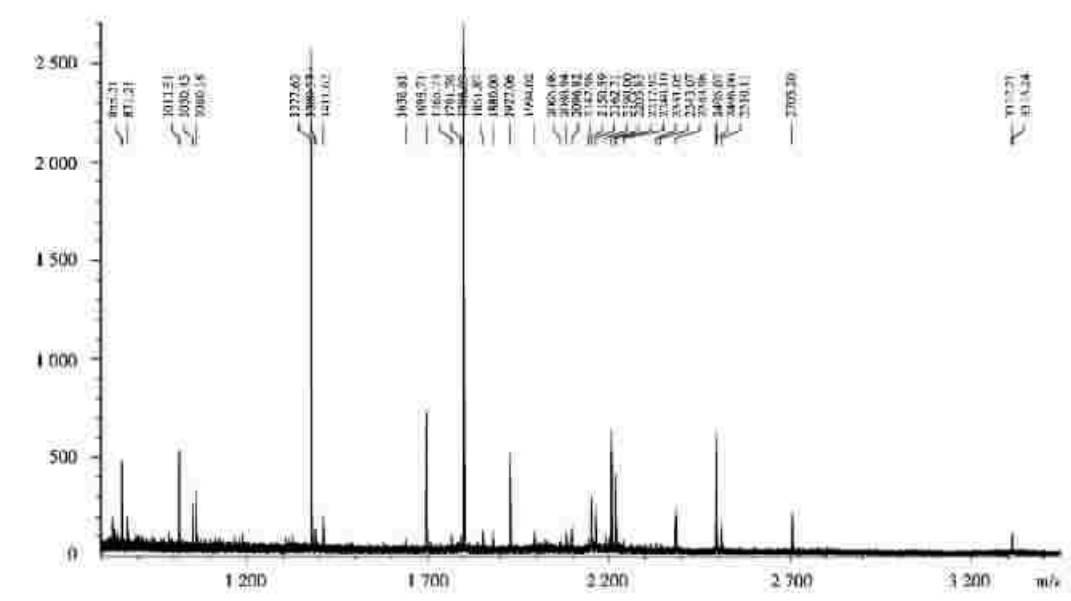


Figure 2 Peptide mass fingerprinting (PMF) of S7 protein

2.3 各组细胞中 hnRNP A2/B1 蛋白的表达

应用抗 hnRNP A2/B1 的抗体对经 SDS-PAGE 并转膜的样品进行免疫检测, 应用化学发光法 (ECL) 进行显色后, 在分子量 37 ku 附近得到一条单一蛋白条带。对照组的条带较粗而深, HMBA 处理组的条带相对较浅而细, 显示经 HMBA 诱导处理后, hnRNP A2/B1 表达量明显降低 (图 3), 阴性对照组未检测到蛋白条带。内标 β -actin (42 ku 处) 的表达在处理前后的 MG-63 细胞核基质中无明显变化。

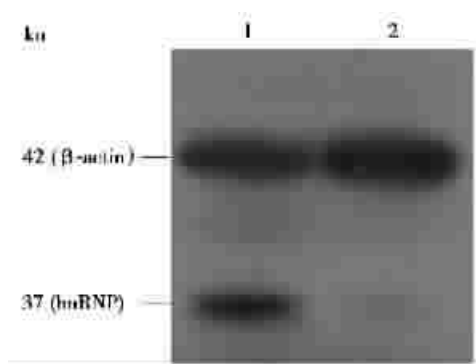


Figure 3 Expression of hnRNP A2/B1 in the nuclear matrix of MG-63 cells

Lane 1: untreated MG-63 cells; lane 2: HMBA-treated MG-63 cells.

2.4 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统上的定位和表达

光镜显示,经选择性抽提后,细胞保留下一个遍布原有细胞部位、呈相互交织的纤维网络,细胞质区域中可见密集细长的中间纤维由核纤层上呈放射状发出,终止于远端的细胞边缘处,两类纤维通过核纤层相连接,形成统一的核基质-核纤层-中间纤维体系。对照组 MG-63 细胞中细胞质靠近核纤层周围的纤维染色较深,中间纤维较为致密,而在细胞质边缘较稀少,分布不均匀;在 HMBA 处理组细胞中,细胞染色较浅,纤维分布较为均匀、铺展(图 4)。

用抗 hnRNP A2/B1 的抗体对 HMBA 处理前后 MG-63 细胞选择性抽提样品做免疫荧光染色,标记以 FITC,经选择性抽提后的 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统对 hnRNP A2/B1 呈阳性反应,在荧光显微镜下显示为绿色荧光。观察显示 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统表达水平较低,仅在细胞核内观察到 hnRNP A2/B1 的绿色荧光,核内分布不均匀,局部区域有较强荧光(图 5A)。而在经 HMBA 诱导分化处理后的 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统中,hnRNP A2/B1 的荧光强度较 MG-63 细胞弱,在核基质显微系统上仅有微量荧光存在(图 5B)。

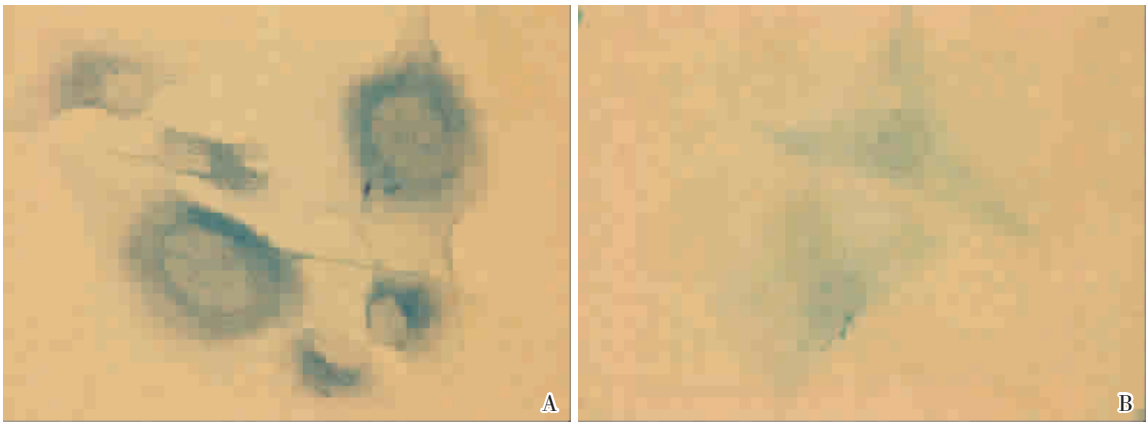


图 4 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统上的定位

Figure 4 Nuclear matrix-intermediate filaments (NM-IF) system in MG-63 cells observed under light microscope (Coomassie brilliant blue $\times 400$)

A: The distribution of nuclear matrix-intermediate filaments in MG-63 cells is irregular.

B: The distribution of nuclear matrix-intermediate filaments in MG-63 cells is relatively regular after HMBA treatment.

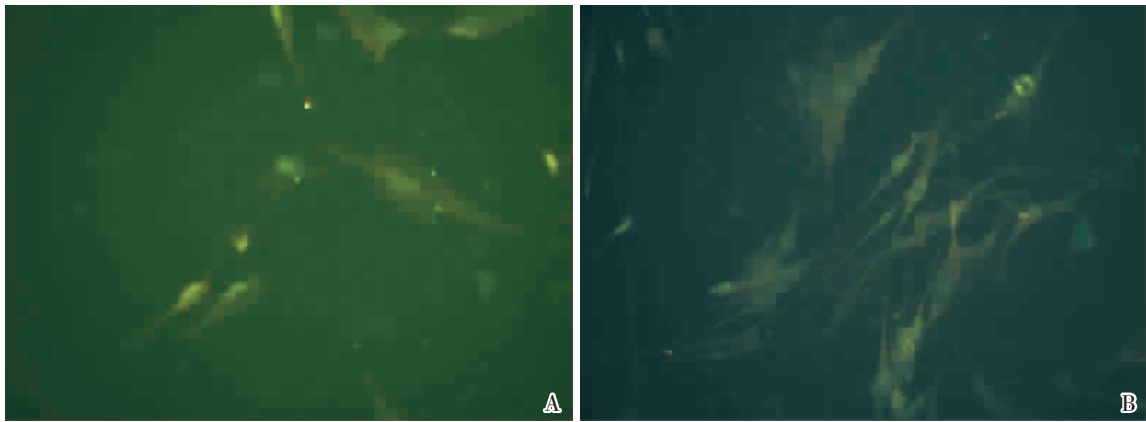


图 5 荧光显微镜示 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统中的表达

Figure 5 Expression of hnRNP A2/B1 in the NM-IF system of MG-63 cells observed under fluorescence microscope ($\times 200$)

A: The expression of hnRNP A2/B1 in the NM-IF system of MG-63 cells is relatively strong.

B: The expression of hnRNP A2/B1 in the NM-IF system of MG-63 cells is relatively weak after HMBA treatment.

2.5 hnRNP A2/B1 与 Actin 以及 Prohibitin 在 MG-63 细胞内的共定位关系

用 hnRNP A2/B1 抗体分别和 Actin 以及 Prohibitin 抗体配对组合,对 MG-63 细胞进行双重免疫荧光染色,hnRNP A2/B1 抗体以绿色荧光染料 FITC 标记,Actin 以红色荧光染料 TRITC 标记,Prohibitin 抗体以红色荧光染料 Cy3 标记。激光扫描共聚焦显微镜观察 hnRNP A2/B1 分别与两种蛋白产物共定位部位叠加后的颜色为黄色或橙黄色。

2.5.1 hnRNP A2/B1 与 Actin 在 MG-63 细胞内的共定位关系 激光共聚焦显微镜观察结果显示,

MG-63 细胞内,代表 hnRNP A2/B1 的绿色荧光主要集中在分布在细胞核区域内,核仁区域荧光较强,代表 Actin 的红色荧光在细胞质和细胞核内均有分布,细胞质区域较强,叠加后显示 hnRNP A2/B1 在细胞核膜附近与 Actin 有共定位关系 (图 6A~C)。经 HMBA 处理后,代表 hnRNP A2/B1 的绿色荧光极弱,偶尔可见散点状分布的荧光,而代表 Actin 的红色荧光在细胞核和细胞质区域中呈束状分布,直至细胞边缘,叠加荧光显示两者之间的共定位关系减弱(图 6D~F)。

2.5.2 hnRNP A2/B1 与 Prohibitin 在 MG-63 细胞内的共定位关系 观察结果显示,Prohibitin 主要

分布在 MG-63 细胞核内,红色的荧光数量多、荧光强,聚集成簇分布,也有少量微弱荧光呈弥散的点状分布在细胞质中;hnRNP A2/B1 主要存在于 MG-63 细胞核内,呈强度不均的点状分布。叠加效果显示 Prohibitin 和 hnRNP A2/B1 在细胞核内有相同的定位关系(图 6G~I)。经 HMBA 处理后, MG-63 细胞核和细胞质中均可见到 Prohibitin 的红色荧光,细胞

核内荧光强度减弱、数量减少,表现为少量点状的荧光弥散分布,细胞质中出现有大量的红色荧光,呈点状聚集分布在细胞质靠近核膜的区域,绿色荧光强度减弱,在细胞内的分布无明显改变,仍主要存在于细胞核内。Prohibitin 和 hnRNP A2/B1 的叠加结果显示, hnRNP A2/B1 和 Prohibitin 在细胞核存在较弱共定位关系(图 6J~L)。

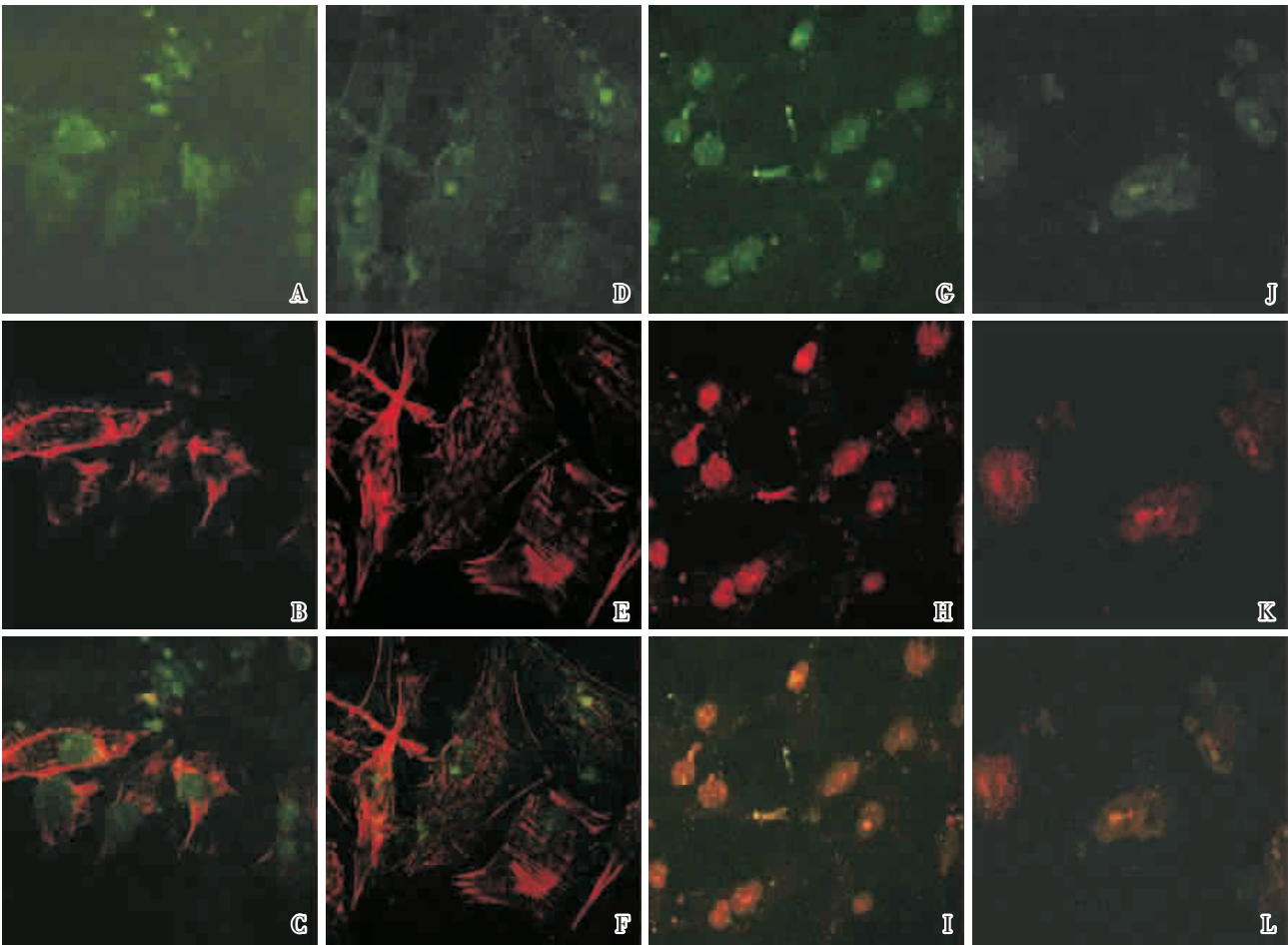


图 6 激光共聚焦示 hnRNP A2/B1 与 Actin、Prohibitin 的共定位关系(×400)

Figure 6 Co-localization of hnRNP A2/B1 with Actin and Prohibitin in MG-63 cells before and after treatment of HMBA observed under laser scanning confocal microscope (×400)

- A: hnRNP A2/B1 is strongly expressed in nuclei of MG-63 cells.
- B: Actin is strongly expressed in cytoplasm of MG-63 cells.
- C: hnRNP A2/B1 and Actin are co-localized in karyotheca of MG-63 cells.
- D: hnRNP A2/B1 is weakly expressed in nuclei of MG-63 cells after HMBA treatment.
- E: Actin is mostly expressed in cytoplasm and karyoplasm of MG-63 cells after HMBA treatment.
- F: Co-localization of hnRNP A2/B1 and Actin in MG-63 cells is weakened after HMBA treatment.
- G: hnRNP A2/B1 is strongly expressed in nuclei of MG-63 cells.
- H: Prohibitin is strongly expressed in nuclei and weakly expressed in cytoplasm of MG-63 cells.
- I: hnRNP A2/B1 and Prohibitin are strongly co-localized in nuclei of MG-63 cells.
- J: hnRNP A2/B1 is weakly expressed in nuclei of MG-63 cells after HMBA treatment.
- K: The expression of Prohibitin is weak in nuclei and relatively strong in cytoplasm of MG-63 cells after HMBA treatment.
- L: Co-localization of hnRNP A2/B1 and Actin in nuclei of MG-63 cells is weakened after HMBA treatment.

3 讨 论

hnRNP A2/B1 是一种与细胞生长、分化以及蛋白质合成密切相关的调控分子,肿瘤细胞中的 hnRNP A2/B1 往往具有与正常细胞不同的分布特点,但有关其在细胞中的具体定位尚不明确。本文应用选择性抽提、双向凝胶电泳发现 hnRNP A2/B1 存在于核基质蛋白组分中,免疫荧光显微镜观察结果显示, hnRNP A2/B1 主要定位于 MG-63 细胞核基质上,并且分布不均匀,局部区域有较强荧光。有学者的研究表明, hnRNP A2/B1 不仅参与 mRNA 前体的剪切和细胞核与细胞质间物质的运输^[15],且在细胞增殖、分化及肿瘤的发生中起重要作用^[16,17]。然而有关 hnRNP A2/B1 在核基质上的定位迄今未见报道。仅有文献报道过 hnRNP U 蛋白在核基质中存在并与 RNA 有结合关系^[18]。前期研究发现, MG-63 细胞和 MGC80-3 细胞核基质中均有 hnRNP A2/B1 蛋白的存在,提示 hnRNP A2/B1 可能是一种核基质蛋白^[9,10]。本研究进一步证实 hnRNP A2/B1 确实是一种核基质蛋白,且定位于细胞核基质上。

hnRNP A2/B1 在癌细胞中的表达变化与细胞癌变密切相关。本研究双向电泳结果显示 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞核基质组分中表达水平较高,经诱导分化处理后其表达水平明显降低。蛋白质印迹杂交结果进一步证实了 hnRNP A2/B1 在诱导后细胞核基质组分中表达下调。免疫荧光染色结果显示, hnRNP A2/B1 定位在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统上,其在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统表达水平低,仅在细胞核内有分布,并且分布不均匀,局部区域有较强荧光。经 HMBA 诱导分化处理后, hnRNP A2/B1 的表达较对照组减弱,在核基质中仅有微量荧光存在。肿瘤细胞的核基质-中间纤维系统具有构型不规则、排列无序等与正常细胞明显不同的特征,且在分化的不同阶段均伴随着特异核基质蛋白组分的改变^[19,20]。研究表明, hnRNP A2/B1 与细胞癌变密切相关,多种肿瘤细胞,如肺癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌和胃癌等细胞中均发现了 hnRNP A2/B1 的表达异常,并在肺癌细胞中证实 hnRNP A2/B1 的增加主要是 hnRNP B1 上调所致^[8,16]。然而有关 hnRNP A2/B1 在诱导分化前后的肿瘤细胞核基质上的定位变化目前尚未见报道。本研究中发现的 hnRNP A2/B1 在 MG-63 细胞分化过程中表达水平的变化与以上

报道一致,进一步证实了 hnRNP A2/B1 参与了 HMBA 诱导 MG-63 细胞分化的调控。

hnRNP A2/B1 的表达及其定位的改变对 MG-63 细胞的增殖分化具有重要影响, hnRNP A2/B1 可能通过与不同的调控蛋白相互作用共同参与肿瘤细胞诱导分化调控。本研究中激光共聚焦显微镜观察结果显示,在 MG-63 细胞内 hnRNP A2/B1 在细胞核膜附近与 Actin 有共定位关系,而在 HMBA 诱导处理后的细胞中两者共定位关系减弱。此外, hnRNP A2/B1 与 Prohibitin 在 MG-63 细胞内具有较强的共定位区域,主要位于细胞核,而在 HMBA 诱导处理后的细胞中减弱。有研究表明, Actin 作为细胞重要结构蛋白,其在核基质-中间纤维系统的定位和分布对于维持细胞的结构和纤维的稳定性具有重要影响,并且细胞核内 Actin 表达水平的高低对于维持细胞核的结构和功能必不可少^[21,22], Actin 在与核骨架及中间纤维网架体系的连系及细胞骨架形态的维持方面起关键作用^[23]。本文结果观察到的 hnRNP A2/B1 与 Actin 在核膜附近的共定位现象并伴随有肿瘤细胞恶性表型的改变提示,两者可能在核纤层处存在直接的相互作用,而在诱导处理后的细胞核基质中,两者的共定位减弱,推测一方面是由于诱导分化过程中两者表达水平降低,另一方面可能与细胞分化过程中细胞核基质-中间纤维体系的重建有关。而 Prohibitin 作为一种潜在的抑癌基因,在维持线粒体功能、调控细胞周期、信号转导方面发挥重要作用,其在细胞内的定位及其修饰、表达变化对肿瘤细胞增殖分化具有重要影响,已成为研究细胞癌变机理和肿瘤诊断的靶蛋白,同时,近年来还发现 Prohibitin 在细胞核内能与多种癌基因、抑癌基因相互作用,募集转录调控因子并抑制后者的活性,使基因表达调控受阻,细胞增殖活性降低^[24,25]。本实验观察到的 hnRNP A2/B1 与 Prohibitin 共定位关系的改变,并伴随有细胞增殖活性的改变提示,前者参与肿瘤细胞增殖分化调控可能与 Prohibitin 的相互作用密切相关,值得进一步研究。

综上所述,核基质蛋白 hnRNP A2/B1 作为一种重要的细胞增殖分化调控因子,其细胞定位及表达水平的改变在 MG-63 细胞分化和恶性表型逆转过程中发挥重要作用。hnRNP A2/B1 可能是 HMBA 作用的靶向性蛋白,并通过与增殖分化相关蛋白如 Actin、Prohibitin 的协同作用,共同调控

细胞的增殖分化。进一步研究 hnRNP A2/B1 在核基质上的功能及其与相关蛋白的相互作用机制,对于揭示细胞增殖分化、癌变与逆转的机理具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Kosturko L D, Maggipinto M J, Korza G, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs [J]. *Mol Biol Cell*, 2006,17(8):3521-3533.
- [2] Moran-Jones K, Wayman L, Kennedy D D, et al. hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(2):486-496.
- [3] Griffin M E, Hamilton B J, Roy K M, et al. Post-transcriptional regulation of glucose transporter-1 by an AU-rich element in the 3'UTR and by hnRNP A2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,318(4):977-982.
- [4] Hutchison S, LeBel C, Blanchette M, et al. Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor [J]. *J Biol Chem*, 2002,277(33):29745-29752.
- [5] Zech V F, Dlaska M, Tzankov A, et al. Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Detect Prev*, 2006,30(5):395-402.
- [6] Fritsch-Stork R, Mullegger D, Skriner K, et al. The spliceosomal autoantigen heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (hnRNP-A2) is a major T cell autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006,8(4):R118.
- [7] Maggipinto M, Rabiner C, Kidd G J, et al. Increased expression of the MBP mRNA binding protein hnRNP A2 during oligodendrocyte differentiation [J]. *J Neurosci Res*, 2004,75(5):614-623.
- [8] Zhou J, Allred D C, Avis I, et al. Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001,66(3):217-224.
- [9] Zhao C H, Li Q F, Zhao Y, et al. Changes of nuclear matrix proteins following the differentiation of human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2006,4(1):10-17.
- [10] Zhao C H, Li Q F. Altered profiles of nuclear matrix proteins during the differentiation of human gastric mucous adenocarcinoma MGC80-3 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2005,11(30):4628-4633.
- [11] 李祺福, 马宗源, 唐 剑. HMBA 对人成骨肉瘤 MG-63 细胞形态结构和终末分化指标表达的影响 [J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2007,46(6):836-841.
- [12] 马宗源, 李祺福, 唐 剑. HMBA 对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和相关基因表达的影响 [J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2007,46(5):702-706.
- [13] Li Q F. Effect of retinoic acid on the changes of nuclear matrix in intermediate filament system in gastric carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 1999,5(5):417-420.
- [14] Michishita E, Kurahashi T, Suzuki T, et al. Changes in nuclear matrix proteins during the senescence-like phenomenon induced by 5-chlorodeoxyuridine in HeLa cells [J]. *Exp Gerontol*, 2002,37(7):885-890.
- [15] Zhou J, Nong L, Wloch M, et al. Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2001,34(3):341-350.
- [16] Satoh H, Kamma H, Ishikawa H, et al. Expression of hnRNP A2/B1 proteins in human cancer cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2000,16(4):763-767.
- [17] Lee C H, Lum J H, Cheung B P, et al. Identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 as the antigen for the gastrointestinal cancer specific monoclonal antibody MG7 [J]. *Proteomics*, 2005,5(4):1160-1166.
- [18] Eggert M, Michel J, Schneider S, et al. The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U [J]. *J Biol Chem*, 1997,272(45):28471-28478.
- [19] Alberti I, Barboro P, Barbesino M, et al. Changes in the expression of cytokeratins and nuclear matrix proteins are correlated with the level of differentiation in human prostate cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2000,79:471-485.
- [20] Jin M L, Zhang P, Ding M X, et al. Altered expression of nuclear matrix proteins in etoposide induced apoptosis in HL-60 cells [J]. *Cell Res*, 2001,11(2):125-134.
- [21] Kadam K, D'souza S, Natraj U. Spatial distribution of actin and tubulin in human sperm nuclear matrix-intermediate filament whole mounts—a new paradigm [J]. *Microsc Res Tech*, 2007,70(7):589-598.
- [22] Bohnsack M T, Stuken T, Kuhn C, et al. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of xenopus oocytes [J]. *Nat Cell Biol*, 2006,8(3):257-263.
- [23] Prasad S, Soldatenkov V A, Srinivasarao G, et al. Intermediate filament proteins during carcinogenesis and apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 1999,14(3):563-570.
- [24] Mishra S, Murphy L C, Nyomba B L, et al. Prohibitin: a potential target for new therapeutics [J]. *Trends Mol Med*, 2005,11(4):192-197.
- [25] Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, et al. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression [J]. *Oncogene*, 2002,21(55):8388-8396.

[编辑及校对:张 菊]