

人参皂苷 Rg1 组合诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中 Prohibitin 的表达与定位变化

石松林¹⁾, 李祺福^{1)*}, 刘庆榕¹⁾, 许东辉²⁾, 唐剑¹⁾, 梁盈¹⁾

¹⁾ 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

²⁾ 福建医科大学附属厦门第一医院肝、胆、胰、血管外科普外科, 福建 厦门 361005)

摘要 选择性抽提经人参皂苷 Rg1 组合(RCT) 诱导处理前后的人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质, 对 prohibitin 在核基质中的存在、分布及其与相关基因产物在 RCT 处理前后 MG-63 细胞中的共定位关系进行观察研究. 蛋白质组学分析结果显示, prohibitin 存在于人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质蛋白组中, 并在 RCT 处理后细胞核基质中表达下调; 蛋白质印迹杂交确证了 prohibitin 在 MG-63 细胞核基质中的存在及其在 RCT 处理后下调变化; 免疫荧光显微镜观察进一步证实 prohibitin 定位在核基质上, 经 RCT 处理后出现分布位置与表达水平变化; 激光共聚焦显微镜观察可见 prohibitin 与 e-Fos、e-Myc、p53 和 Rb 基因产物均存在共定位关系, 并在 RCT 处理后共定位分布区域出现变化. 本研究证实了 prohibitin 是一种新发现的核基质蛋白, 其在核基质上的定位与表达在 RCT 诱导分化前后发生显著变化, 并与相关癌基因、抑癌基因产物存在共定位关系. 实验表明 RCT 处理引起的 prohibitin 的变化与人成骨肉瘤 MG-63 细胞的诱导分化与调控具有密切关系, 为深入揭示 RCT 等中药有效成分诱导肿瘤细胞分化的机理提供了重要科学依据和深入探索的新方向.

关键词 prohibitin; 核基质; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 细胞分化; 人参皂苷 Rg1

中图分类号 Q245; Q254; Q279

Differentiation Induced by Ginsenoside Rg1 Combined Formula Involved the Alteration of Prohibitin Localization and Expression in Human Osteosarcoma MG-63 Cells

SHI Song-Lin¹⁾, LI Qi-Fu^{1)*}, LIU Qing-Rong¹⁾, XU Dong-Hui²⁾, TANG Jian¹⁾, LIANG Ying¹⁾

¹⁾ Key Laboratory, Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences,

Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²⁾ Department of Hepar Biliary Pancreas Vascular Surgery,

Affiliated Xiamen First Hospital, Fujian Medical University, Xiamen 361005, China)

Abstract Prohibitin is a nuclear matrix protein and associates with various oncogene products. A combined formula with ginsenoside Rg1, cinnamic acid and tanshinone (RCT) was used to treat human osteosarcoma MG-63 cells in this study. We found that the prohibitin expression in the nuclear matrix was of decreased following RCT treatment by Western blot. The colocalization of prohibitin with the products of oncogenes or tumor suppressor genes, including e-Fos, e-myc, p53 and Rb was evaluated by immunofluorescence staining and laser scanning confocal microscopy. We observed significant alternations of prohibitin distribution and the degree of colocalization with the associated gene products after the cells exposed to RCT. The results suggested that prohibitin might be involved in the RCT-induced differentiation in MG-63 cells. Our findings may provide

收稿日期: 2007-08-20, 接受日期: 2007-11-06

国家自然科学基金资助项目(No. 30470877)

* 联系人 Tel: 0592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

Received: August 20, 2007; Accepted: November 6, 2007

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470877

* Corresponding author Tel: 0592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

information to expand the applications of Traditional Chinese Medicine formulas in cancer-related studies.

Key words prohibitin; nuclear matrix; osteosarcoma MG-63 cells; cell differentiation; ginsenoside Rg1

Prohibitin(phb)是一种肿瘤抑制基因,广泛分布于各种细胞中。Prohibitin 蛋白既定位于线粒体内膜上发挥分子伴侣^[1]的作用,又存在于细胞核内具有负性转录调控的作用,对细胞生长、增殖、分化、衰老及凋亡等诸多方面发挥调控作用^[2-5]。目前,在多种肿瘤细胞中发现了 prohibitin 的过表达^[6-8],与其抑制肿瘤细胞增殖作用相矛盾。但其在细胞内的定位与转运机制及其调控细胞增殖分化的机理尚不清楚。

我们对人成骨肉瘤 MG-63 细胞和人胃腺癌 MGc803 细胞分化过程中核基质的表达变化研究中发现 prohibitin 的存在^[9,10]。为此,本文在研究了中药有效成分人参皂苷 Rg1(ginsenoside Rg1)、肉桂酸(cinnamic acid)和丹参酮 A (tanshinone A)组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞终末分化的诱导作用(另文发表)基础上,进一步研究 prohibitin 在 MG-63 细胞核基质中的存在、定位及其表达变化,以及 prohibitin 与 MG-63 细胞相关癌基因、抑癌基因产物的相互关系做进一步研究,从而为阐明 prohibitin 在中药有效成分诱导肿瘤细胞分化过程中的调节作用,深入认识细胞癌变与逆转机制和中药有效成分抗肿瘤作用机理等问题提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与诱导分化处理

人成骨肉瘤 MG-63 细胞(购自中国典型培养物保藏中心)培养于 RPMI-1640(GIBCO 公司)培养液中(内含 15% 热灭活小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素, pH 7.2),于 CO_2 培养箱中 37°C 培养。人参皂苷 Rg1、肉桂酸和丹参酮 A 均为购自中国药品生物制品检定所的标准品。细胞传代培养至 24 h 后,实验组细胞更换含 RCT(33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人参皂苷 Rg1+ 2 mmol/L 肉桂酸+ 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丹参酮 A),此为本研究前期实验做确定的最佳组合浓度)的培养液,对照组细胞同时换上新鲜培养液,细胞每 2~3 d 换液 1 次,连续培养处理 7 d 后收集备用。

1.2 核基质蛋白的提取

依据细胞核基质的常规制备方法^[10-12]优化后提取核基质蛋白。收集的 MG-63 细胞用 PBS 洗涤 2 次,加入细胞骨架提取液 CSK 100(10 mmol/L PIPES,

pH 6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 5% Triton X-100, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF), 0°C 放置 10 min, 400 g 离心, 弃上清液。加入细胞骨架提取液 CSK50 (CSK100 中的 100 mmol/L NaCl 替换为 50 mmol/L) 分别洗涤、离心 2 次, 弃上清液。加入 300 U/ml DNase iv (CSK50 配制) 消化 30 min, 滴加 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 0.25 mol/L, 室温抽提 15 min, 600 g 离心 5 min, 去除上清液中 DNA 和组蛋白, 剩余不溶性沉淀物即为核基质蛋白成分, 以 CSK50 洗 1 次, 以裂解缓冲液溶解, 15 000 g 离心 45 min, 取上清, 蛋白定量后分装在 0.6 ml 离心管, -80°C 贮存备用。

1.3 双向凝胶电泳与图像分析

常规方法进行双向凝胶电泳(3 个实验重复), 以质谱兼容硝酸银染色法染色, 凝胶扫描后以 PD Quest 8.0 (Bio-Rad) 凝胶图像分析软件进行定量分析。光密度差异超过 2 倍的点定义为差异表达的蛋白点。

1.4 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、碘乙酰胺(iodoacetamide)烷基化、干燥、胶内酶解、肽段抽提等步骤后, 通过 MALDI-TOF 质谱仪 (ReFlexTM 型, Bruke 公司) 获取差异表达蛋白的肽指纹(PMF)数据。对 MSDB、Swiss-Prot 和 NCBI 等数据库进行检索, 获得蛋白质鉴定信息。其中 Swiss-Prot 数据库检索结果得分大于 54 定义为可能性显著。

1.5 免疫印迹杂交(Western blot)

核基质蛋白的 SDS-PAGE 于 12.5% 聚丙烯酰胺分离胶上进行。电泳结束后以半干法转移到 PVDF 膜上(Millipore)。电转移结束后, 用丽春红染色检测电转的效果。纯水漂洗去除丽春红后, PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉室温孵育 1.5 h; TTBS(0.05% Tween-20, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 洗膜; 加入 1:1 000 稀释的 prohibitin 抗体(NeoMarkers 公司), 室温孵育 2 h; TTBS 洗膜 3 次; 加入 HRP 标记的相应的二抗, 室温孵育 1 h; TTBS 洗膜 3 次后以 ECL 化学发光法显示特异条带, X 光片扫描后保存图像。以 5% 脱脂奶粉代替特异性抗体作为阴性对照。

1.6 Prohibitin 的免疫荧光染色

对照组 MG-63 细胞和经 RCT 处理 5 d 的细胞接

种到盖玻片条上,继续培养 2~3 d,以 PBS 洗涤 2 次,5 min/次,选择性提取核基质-中间纤维系统,方法见本实验室论文^[13].选择性抽提所得 NM-IF 玻片样品经 4% 多聚甲醛中固定 10 min,考马斯亮蓝 R250 染色观察抽提效果.用含 0.05% Tween-20 的 PBS(TPBS)漂洗,5% BSA 室温封闭 1 h 后滴加稀释的 prohibitin 抗体,室温孵育 30 min,4℃孵育 3~8 h,TTBS 振荡漂洗 3×10 min.滴加 CY3 标记的二抗作用液(1:1000),37℃孵育 30 min,4℃孵育 3 h. TPBS 与蒸馏水分别振荡漂洗 2×10 min.空气中干燥后以 90% 甘油/PBS 封片.以 5% BSA 代替 prohibitin 抗体进行免疫荧光染色,做为阴性对照.二抗孵育以后的过程避光,荧光显微镜观察.

1.7 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察

对照组 MG-63 细胞和经 RCT 处理 5 d 的细胞接种到玻片上,继续培养 2~3 d,玻片以 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中 37℃透膜 30 min, PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,4% 多聚甲醛中固定 10 min. TPBS 漂洗 2 次,5% BSA 室温封闭 1 h.以 5% BSA 配置不同种属来源的双重抗体组合作用液: prohibitin/Rb、prohibitin/P53、prohibitin/e-Myc、

prohibitin/e-Fos,各自滴加 40 μl 于玻片上,室温孵育 30 min,移入 4℃冰箱中孵育过夜;TPBS 振荡漂洗 3×10 min.根据组合不同,分别滴加相应组合的荧光标记二抗作用液,室温孵育 30 min,4℃孵育 3 h,TPBS 振荡漂洗 3×10 min.蒸馏水漂洗、干燥后以 90% 甘油-PBS 封片.TCS-SP2 MP 型激光共聚焦显微镜下观察结果,CY3 以 543 nm 波长激发,FITC 以 488 nm 波长激发.

2 结果

2.1 双向电泳及质谱鉴定

核基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上,经定量分析及质谱鉴定发现,prohibitin 为 RCT 处理前后核基质上差异表达的蛋白. Fig. 1 中的点 P 是鉴定为 prohibitin 的蛋白点, RCT 处理后表达下调. Fig. 2 为 prohibitin 蛋白点的局部放大图像, Fig. 3 显示了 prohibitin 蛋白点在处理前后细胞核基质上的表达量差异. Table 1 是 prohibitin 蛋白点 P 的质谱数据检索结果.检索结果显示,其理论分子量及等电点与双向电泳结果比较符合,得分与酶解肽段覆盖率较高,鉴定结果可信度高.

Table 1 The results of prohibitin identification by MALDI-TOF-MS analysis

Protein name	Accession number	Molecular mass (kD)	pI	Score/coverage	Matching peptides
Prohibitin	P35232-00-00-00	30.0	5.57	101/44%	8

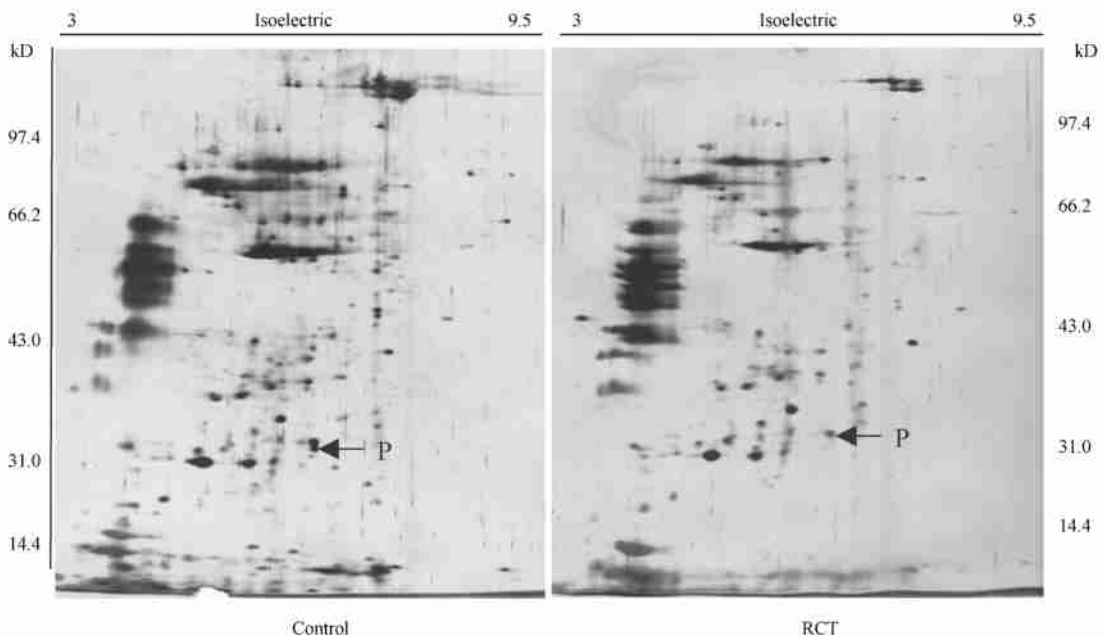


Fig. 1 2-D PAGE analysis of nuclear matrix proteins

The proteins selectively extracted from MG-63 cells (Control) and the cells treated with Ginsenoside Rg1, cinamic acid, and tanshinone (RCT) were separated by 2-D PAGE method. The gels were stained with silver nitrate protocol compatible with MS. The arrow indicated the differential expression of the protein spot (P) which was identified as prohibitin.

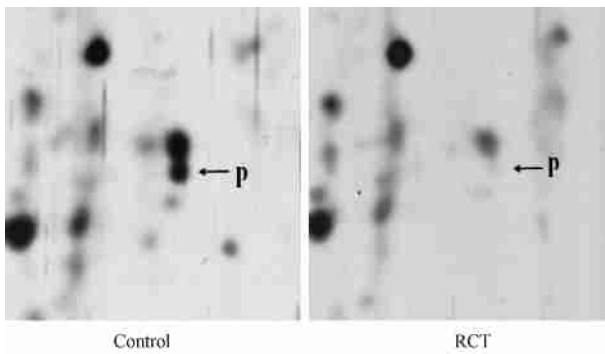


Fig. 2 Enlarged picture of 2-D PAGE

The spots P which marked with arrows respectively showed the differential expression of prohibitin before and after RCT treatment

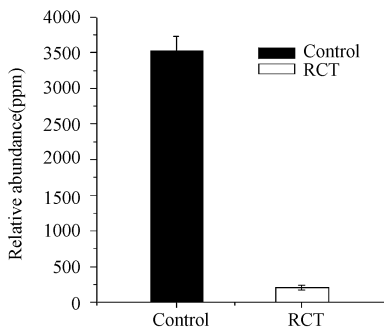


Fig. 3 Relative abundance of the differential spot of pProhibitin

The quantitative analysis of gel images was performed with PD Quest 8.0 software. The relative abundance of prohibitin in MG-63 cell (control) is higher markedly than RCT treated cell

2.2 蛋白质印迹杂交结果

Western 印迹结果显示, 仅在与待测蛋白相当的分子量位置附近有反应的条带, 阴性对照无条带, 显然抗体特异性好, 与其它成分无交叉反应. 人类 prohibitin 基因家族包括 2 个成员 *phb 1* 和 *phb 2*, 蛋白 *phb1* 的分子量为 32 kD, *phb2* 分子量则为 37 kD. Western 印迹结果显示的条带主要位于 32 kD 位置上, 在 MG-63 细胞核基质中表达水平较高, 而在经 RCT 处理后的 MG-63 细胞核基质中表达降低 (Fig. 4). 表达变化与双向电泳结果一致, 都是在处理后减弱.

2.3 Prohibitin 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达

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 (Fig. 5A, B, 见

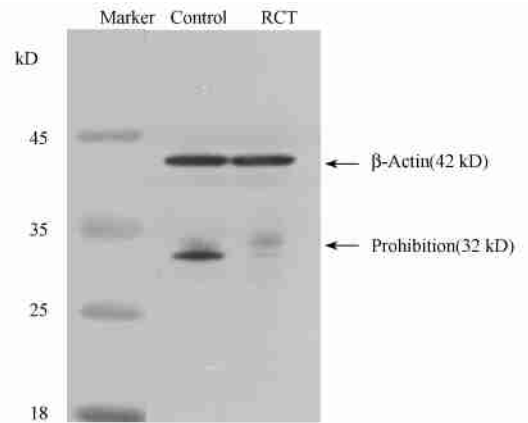


Fig. 4 The results of Western blot showed the expression of prohibitin in the nuclear matrix preparations from MG-63 cells

Control: the nuclear matrix protein sample of MG-63 cell; RCT: the nuclear matrix protein sample of MG-63 cells treated by RCT; Marker: protein molecular weight marker was stained with Ponceau S

185 页彩版).

光镜观察显示, MG-63 细胞的核基质-核纤层-中间纤维系统中, 中间纤维稀少而分布不均; 核纤层较厚且厚薄不均一, 染色较深. 核基质纤维结构层次不均匀, 常见较多个核仁残余悬浮连接在核基质骨架网络中 (Fig. 5A). 经 RCT 组合诱导分化的 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统均呈现分布均匀的特点, 中间纤维细丝均匀而弥散状伸展分布, 结构规则, 染色均匀; 核纤层结构变薄; 核基质网络层次分明, 结构丰富而清晰. 同时整个细胞呈现出核质比减小、整体骨架网络形态更为铺展的特征 (Fig. 5B).

免疫荧光显微镜观察 prohibitin 蛋白在 MG-63 细胞核基质-核纤层-中间纤维系统中的表达和定位. 结果显示, 标记 prohibitin 的红色荧光主要分布在 MG-63 细胞质和细胞核区域, 细胞核内区域分布强度较高 (Fig. 5C); 经 RCT 组合处理后, prohibitin 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的分布发生了明显变化, 荧光强度整体下降, 核基质的中央部位荧光强度减弱或消失, 核基质内的荧光主要分布在核纤层与核膜附近, 中间纤维区域散在分布的点状 prohibitin 颗粒也明显增加, prohibitin 在处理后有向核外转移的趋势 (Fig. 5D).

2.4 Prohibitin 和 e-Fos, e-Myc, P53 以及 Rb 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系

对 MG-63 细胞进行双重免疫荧光染色, prohibitin 抗体以 CY3 标记, 呈红色荧光, e-Fos, e-Myc, P53 以及 Rb 抗体则分别以 FITC 标记, 呈绿色

荧光. 共定位区域荧光叠加显示为黄色或橙黄色.

2.4.1 Prohibitin 和 e-Fos 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系

MG-63 细胞中, prohibitin 荧光主要分布在细胞核内与细胞质及其边缘位置, e-Fos 主要分布于河内核仁位置. 叠加效果显示, prohibitin 和 e-Fos 在细胞核内核仁附近有强烈的共定位荧光; 在 RCT 处理后, MG-63 细胞核和细胞质中均可见到 prohibitin 和 e-Myc 荧光强度减弱, 叠加效果显示核仁位置共定位荧光消失, 而核纤层位置则出现较强烈的共定位荧光, 共定位荧光有从核内向核膜位置转移的现象 (Fig. 6A~ F).

2.4.2 Prohibitin 和 e-Myc 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系

在 MG-63 细胞, Prohibitin 主要分布于细胞核内, 荧光数量多、强度高, 细胞质中也有微弱荧光呈弥散点状分布; e-Myc 分布在细胞核内, 局部表现为高强度的点块状; 叠加显示 prohibitin 和 e-Myc 在细胞核内及核膜内侧有共定位. 经 RCT 处理后 MG-63, 细胞核内 prohibitin 荧光强度减弱或消失, 细胞质中荧光呈点状离散分布; e-Myc 蛋白在细胞核内和细胞质区域都有存在, 整体荧光强度呈下降趋势, 细胞核内荧光较弱呈弥散分布, 核仁区域强度较高; 荧光叠加显示 e-Myc 和 prohibitin 在细胞核与细胞质区域共定位关系不明显 (Fig. 6G~ L).

2.4.3 Prohibitin 和 P53 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系

在 MG-63 细胞, prohibitin 在细胞各部位都有分布, 细胞核内, 红色的荧光离散不规则分布, 核膜位置上荧光最强, 也有荧光呈弥散的点状分布在细胞质区域; p53 的绿色荧光主要存在于细胞核内, 细胞质区域可见 p53 蛋白分布在细胞核周围. 叠加荧光显示, prohibitin 和 p53 在细胞核膜上强烈的叠加荧光, 细胞质内亦存在共定位关系. 而经 RCT 处理后细胞, 在细胞核内 prohibitin 减弱, 呈点状弥散分布在核膜的内侧; p53 蛋白的绿色荧光整体减弱, 主要分布于核内, 细胞质中 p53 的荧光呈点状弥散分布; 叠加荧光显示经 RCT 处理的 MG-63 细胞质区域和核内近核膜部位分布的 prohibitin 与 p53 存在共定位关系, 核膜部位共定位荧光明显减弱 (Fig. 6M~ R).

2.4.4 Prohibitin 和 Rb 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系

在 MG-63 细胞, prohibitin 在细胞核与细胞质都有分布, 核内荧光数量多、荧光强; Rb 主要定位于

细胞核内及核膜位置, 核内荧光弥散分布, 核膜位置上荧光最强, 细胞质区域荧光强度弱, 聚集在核膜周围; 叠加荧光显示, prohibitin 和 Rb 主要在细胞核膜位置上有共定位关系. 在 RCT 处理后 MG-63 细胞, 细胞核内和细胞质区域的 prohibitin 荧光强度减弱, 核膜区域红色荧光强度增加; Rb 蛋白荧光整体加强, 在细胞核内和细胞质区域都有存在, 核仁与核膜区域荧光最强. 叠加荧光显示, Rb 和 prohibitin 在细胞核膜位置存在共定位关系, 且叠加荧光强度较处理前增强 (Fig. 6S~ X).

3 讨论

3.1 Prohibitin 在核基质上的定位及其在 RCT 诱导 MG-63 细胞分化过程中的表达变化

Prohibitin 是一种潜在的抑癌基因表达产物, 其表达与细胞的增殖和癌变密切相关, 它不仅分布在线粒体上^[1], 还定位于细胞核, 是一种新发现的核基质蛋白. 本文研究中, 质谱分析与蛋白质印迹实验结果证实了 prohibitin 是细胞核基质蛋白组分之一, 经 RCT 诱导分化处理后, 其在核基质上的表达量显著下调; 免疫荧光显微镜观察显示, MG-63 细胞中 prohibitin 蛋白主要定位于细胞核区域与细胞质区域, 经 RCT 处理后 MG-63 细胞中 prohibitin 重新分布, 主要定位于靠近核膜区域和细胞质区域. 以上实验结果充分表明, prohibitin 不仅存在于细胞质中, 还定位于细胞核基质上. 目前有关 prohibitin 在核基质上的定位国内外尚未见报道, 本实验室首次发现 prohibitin 定位于核基质上, 是一种核基质蛋白. 而当前有关 Prohibitin 功能作用的研究则比较矛盾: 有研究显示, 增殖时细胞 PHB 表达明显降低, 分化时细胞 PHB 表达明显升高, 抑制细胞增殖^[14]. 但肌细胞的分化研究却发现 PHB 能够抑制肌细胞的分化^[15]. PHB 与 E2F 结合形成一种盘曲的结构域, 这种结构域本身就可以表现出生长抑制作用^[16]. 上述这些看似矛盾的研究结果提示, PHB 的调控作用可能是双向的, 既能阻止细胞过度增殖, 又能维持细胞的生存. Prohibitin 在某些肿瘤细胞中表达水平升高与其肿瘤抑制功能相矛盾, 而基因序列分析在蛋白质编码区并未发现基因突变, 仅在其 mRNA 的 3' 端发现了基因突变现象^[17, 18], 推测 prohibitin 是一个双向调节子, 在肿瘤细胞中的高表达可能也与其结合癌基因、抑癌基因表达产物的能力有关, 是与癌变细胞中调控因子水平的增加相适应的. 本文研究中 prohibitin 在中药有效成分 RCT 组合诱导细胞分化

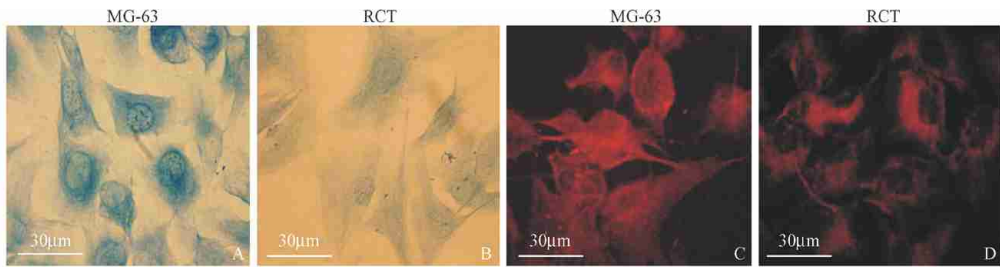


Fig. 5 Expression of pProhibitin on the NM- IF system of MG-63 cell

The nuclear matrix of MG-63 cells were selectively extracted and stained with coomassie brilliant blue or antibody labeled CY3

- (A) Light microscopy shows the NM-IF system in MG-63 cells (CBB stain).
- (B) Light microscopy shows the NM-IF system in MG-63 cells after RCT treatment (CBB stain).
- (C) Immunofluorescence microscopy shows the expression of Prohibitin on the NM-IF system of MG-63 cell.
- (D) Immunofluorescence microscopy shows the expression of Prohibitin on the NM-IF system of MG-63 cell after RCT treatment

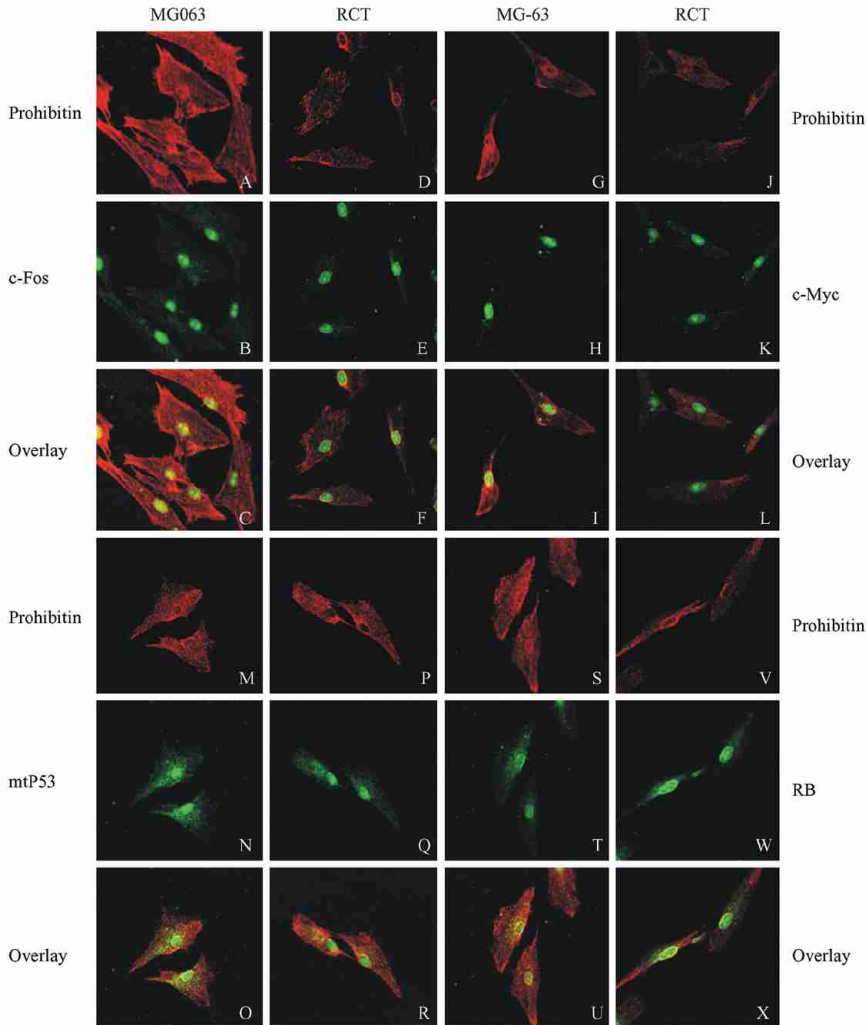


Fig. 6 The co-localizational relationship between prohibitin and the products of some interrelated genes

MG-63 cells treated with or without RCT were stained with antibody labeled with CY3 or FITC and were observed under laser scanning confocal microscopy.

The overlay showed the yellow colocalizational fluorescence.

A ~ F: The localizations of prohibitin and e-FosP53 in MG-63 cells; G ~ L: The localizations of prohibitin and e-Myc in MG-63 cells;

M ~ R: The localizations of prohibitin and P53 in MG-63 cells; S ~ X: The localizations of prohibitin and Rb in MG-63 cells

前后发生了下调的显著变化,提示其是 RCT 作用的一个靶向性蛋白,参与了 MG-63 细胞的分化调控。

3.2 Prohibitin 与相关基因产物的共定位关系及其在 RCT 诱导 MG-63 细胞分化过程中的变化

作为一个潜在的抑癌基因产物,prohibitin 能与相关癌基因、抑癌基因产物的相互作用,从而参与细胞生长、增殖和分化的调控。本研究免疫荧光-激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示,prohibitin 与癌基因 *cfos*、*e-myc* 及抑癌基因 *p53* 和 *Rb* 产物在细胞内均有不同程度的共定位关系并在 RCT 处理后发生共定位的变化。

cfos 与 *e-myc* 是成骨肉瘤中常见的表达异常上调的原癌基因,我们的研究显示,prohibitin 分别与 *e-Fos*、*e-Myc* 共定位于 MG-63 细胞核内,当 MG-63 细胞被诱导分化后,prohibitin 与 *e-Fos* 在核纤层与核膜区域存在较强的共定位关系,prohibitin 与 *e-Myc* 在核内基本不存在共定位,仅在核膜附近可见微弱的共定位荧光。目前,对于 prohibitin 与 *e-Fos*、*e-Myc* 的相互作用关系及其在细胞增殖分化中的作用尚未见报道,仅发现 prohibitin 和 *e-Fos* 均受 *Rb* 的调控,在 *Rb* 过表达的细胞中 *prohibitin* 和 *e-Fos* 的表达受到抑制^[9]; *prohibitin* 是 *e-myc* 的下游基因,在 *e-myc* 过表达的细胞中 *prohibitin* 的表达增加^[20,21]。本研究首次发现在成骨肉瘤细胞中 *prohibitin* 与 *e-myc*、*cfos* 产物在细胞核区域内有共定位关系,并在 RCT 处理后在细胞内的定位改变,提示 *prohibitin* 可能与 *e-Myc*、*e-Fos* 有相互作用并参与调控 MG-63 细胞的增殖分化。

本文研究发现,MG-63 细胞中 *p53* 与 *prohibitin* 蛋白在核膜及核内位置存在存在较强的共定位荧光,而经 RCT 处理后,分布区域均由细胞核转移到了核周及细胞质中,提示二者在细胞内可能存在直接的相互作用,prohibitin 在 MG-63 细胞中可能参与 *p53* 的转录调控。近年来的研究表明,prohibitin 和 *p53* 蛋白可以直接相互作用结合并在核内直接参与基因的表达调控。Fusaro 等^[22,23] 曾在乳腺癌细胞研究中发现,prohibitin 和 *p53* 及 *E2F1* 在细胞核内具有共定位关系,认为 *prohibitin* 激活了 *p53* 介导的转录并增加 *p53* 与启动子的结合能力;在接受凋亡信号刺激后,*p53*-*prohibitin* 发生了向核周和细胞质中转移的现象。我们的发现与前人的研究结果相一致,提示 *p53* 和 *prohibitin* 在细胞内可能存在直接的相互作用,在 MG-63 细胞中参与 *p53* 的转录调控。细胞经诱导分化处理后,prohibitin 与 *p53* 移出细胞核可能是

导致其在细胞核内表达水平降低的原因之一,这种共转移抑制了 *p53* 及其下游基因的转录,从而对细胞增殖分化状态起到调控作用。

近年来的研究发现,prohibitin 和抑癌基因产物 *Rb* 在细胞核内存在共定位关系,prohibitin 可通过与 *Rb* 作用,结合 *E2F* 的不同部位共同抑制基因的转录,调节起始转录因子 *E2F* 的转录活性,抑制细胞增殖^[24-26]。本文研究发现,经 RCT 处理分化后的 MG-63 细胞中,prohibitin 和 *Rb* 在核膜核纤层位置的共定位得到加强,表明这一过程与细胞增殖分化关系密切。核纤层附近是 DNA 复制与转录活跃的位点,显然,prohibitin 在细胞分化前后的位移变化及在核纤层位置与 *Rb* 蛋白的结合加强,可能抑制了 *E2F* 启动下游基因表达的能力,进而造成细胞增殖的抑制与分化。

综上所述,prohibitin 是一个定位于核基质上的重要增殖分化调控因子,其细胞定位的改变在人成骨肉瘤 MG-63 细胞恶性表型逆转过程中发挥重要作用。prohibitin 与癌基因、抑癌基因关系密切,共同调控细胞的增殖分化,对 *prohibitin* 进行深入研究,对于揭示中药有效成分诱导肿瘤细胞分化、阐明癌变与逆转的机理具有重要意义。

中药作用机理研究是中医药发展的关键环节,从细胞分子生物学水平上阐明中药作用机理是中药抗肿瘤研究的新的突破点。prohibitin 是一个重要的涉及细胞增殖、分化与癌变的调控因子。本文工作尝试研究了中药有效成分 RCT 组合诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中 *prohibitin* 的定位与表达变化,及其与相关癌基因、抑癌基因的共定位关系与变化。这为进一步从细胞分子生物学水平上探索中药有效成分抗肿瘤作用机理研究提供了重要的科学依据和研究探索新方向。

参考文献(References)

- [1] Nijtmans L G, de Jong L, Artal Sanz M, *et al.* Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins[J]. *EMBO J*, 2000, **19**(11): 2444-2451
- [2] Artal-Sanz M, Tsang W Y, Willems E M, *et al.* The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(34): 32091-32099
- [3] Nijtmans L G, Artal SM, Grivell L A, *et al.* The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**(1): 143-155
- [4] Piper P W, Jones G W, Bringboe D, *et al.* The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears to be due to defective

- mitochondrial segregation in old mother cells[J]. *Aging Cell*, 2002, **1**(2): 149-57
- [5] Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, *et al.* Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(48):47853-47861
- [6] Jang J S, Cho H Y, Lee Y J, *et al.* The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates[J]. *Oncol Res*, 2004, **14**(10): 491-499
- [7] Tsai H W, Chow N H, Lin C P, *et al.* The significance of prohibitin and e-Met/hepatocyte growth factor receptor in the progression of cervical adenocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2006, **37**(2): 198-204
- [8] Qi Y, Chiu J F, Wang L, *et al.* Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Proteomics*, 2005, **5**(11): 2960-2971
- [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): 10-7
- [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] Midohita 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
- [12] Nickerson J A, Krockmalnic G, Wan K M, *et al.* The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(9): 4446-4450
- [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] Dixit V D, Sridaran R, Edmondson M A, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone attenuates pregnancy-associated thymic involution and modulates the expression of antiproliferative gene product prohibitin [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**(4): 1496-1505
- [15] Sun L, Liu L, Yang X J, *et al.* Akt binds prohibitin2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation[J]. *J Cell Sci*, 2004, **117**(14):3021-3029
- [16] Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, *et al.* A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis [J]. *Biol Biophys Res Commun*, 2003, **312**(2): 459-466
- [17] Campbell I G, Allen J, Eccles D M. Prohibitin 3' untranslated region polymorphism and breast cancer risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, **12**(11 Pt 1): 1273-1274
- [18] Manjeshwar S, Branam DE, Lemer MR, *et al.* Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, **63**(17): 5251-5256
- [19] Buchmann A M, Swaminathan S, Thimmapaya B. Regulation of cellular genes in a chromosomal context by the retinoblastoma tumor suppressor protein [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(8): 4565-4576
- [20] Menssen A, Hermeking H. Characterization of the e-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of e-MYC target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(9): 6274-6279
- [21] Haggerty T J, Zeller K I, Osthus R C, *et al.* A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic e-Myc target sites [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(9): 5313-5318
- [22] Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, *et al.* Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and exported from the nucleus upon apoptotic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(48):47853-47861
- [23] Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, *et al.* Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(5): 2951-2959
- [24] 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
- [25] Fusaro G, Wang S, Chellappan S. Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2002, **21**(29): 4539-4548
- [26] Wang S, Zhang B, Faller D V. Prohibitin requires Brg-1 and Bm for the repression of E2F and cell growth [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(12): 3019-3028