

HMBA 诱导人肝癌 SMMG-7721 细胞分化过程中 Nucleophosmin 的表达与定位变化

李祺福^{*}, 唐剑, 刘庆榕, 石松林, 陈祥峰, 宋建晔

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

摘要 通过选择性抽提经环六亚甲基双乙酰胺(hexamethylene bisacetamide, HMBA) 诱导处理前后的人肝癌 SMMG-7721 细胞核基质, 并运用亚细胞蛋白质组学等分析技术, 研究 nucleophosmin (NPM) 在核基质上的表达和定位变化, 及其与相关基因产物的共定位关系, 观察研究了 nucleophosmin 在诱导分化前后人肝癌 SMMG-7721 细胞核基质中的存在、分布及其与相关基因产物的共定位关系。双向凝胶电泳和质谱鉴定结果显示, nucleophosmin 存在于 SMMG-7721 细胞核基质蛋白组分中, 在 HMBA 处理后细胞核基质中表达下调。蛋白质印迹杂交实验结果确证了 nucleophosmin 在核基质中的存在及其在诱导处理后细胞核基质中表达下调的变化。免疫荧光显微镜观察显示, nucleophosmin 定位在 SMMG-7721 细胞核基质上, 经 HMBA 处理后出现分布位置与表达水平的变化。激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示, SMMG-7721 细胞中, nucleophosmin 与 e-fos, e-myc, rb, p53 等基因产物具有共定位关系, 但在诱导处理后细胞内的共定位区域发生了改变。研究结果证实, nucleophosmin 是一种核基质蛋白, 定位于核基质纤维上, nucleophosmin 在人肝癌 SMMG-7721 细胞诱导分化过程中的表达分布, 及其与相关癌基因、抑癌基因产物的关系对 SMMG-7721 细胞分化具有重要影响。

关键词 nucleophosmin; 核基质; 肝癌细胞; 细胞分化

中图分类号 Q24; Q27

Expression and Localization of Nucleophosmin During HMBA-induced Differentiation in Human Hepatocarcinoma SMMG-7721 Cells

LI Qi-Fu^{*}, TANG Jian, LIU Qing-Rong, SHI Song-Lin, CHEN Xiang-Feng, SONG Jian-Ye

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

Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract To explore the existence and distribution of nucleophosmin in the nuclear matrix and its co-localization with the other related gene products following HMBA treatment in the human hepatocarcinoma SMMG-7721 cells, the nuclear matrix of SMMG-7721 cells was extracted pre/post HMBA induced differentiation. 2D PAGE proteomics analyses showed that nucleophosmin existed in the fractions of nuclear matrix proteins and was down-regulated after HMBA treatment with further confirmation by Western blot analysis. The immunofluorescence observation revealed that nucleophosmin located in the nuclear matrix, HMBA treatment altered its expression level and distribution profile. The co-localization of nucleophosmin with cancer-related genes and the products of oncogenes or tumor repression genes, including e-fos, e-myc, p53 and Rb, using laser scanning confocal microscopy, were evaluated, and substantial differences were observed following HMBA treatment. The results implies that nucleophosmin, as a nuclear matrix protein, the level of its expression

收稿日期: 2007-08-06, 接受日期: 2007-11-01

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 6, 2007; Accepted: November 1, 2007

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

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

and the colocalization with cancer-related gene products may play an important role during the differentiation of SMMG-7721 cell.

Key words nucleophosmin; nuclear matrix; hepatocarcinoma cell; cell differentiation

Nucleophosmin(又称 NPM、B23、numatrin、NO38) 是主要的核仁磷酸化蛋白。NPM 具有多方面功能, 不仅与 RNA 装配与合成、染色体复制、调节抑癌基因 p53 和 p14 的活性、作为分子伴侣防止蛋白集聚等过程密切相关, 而且参与监控核仁活性及细胞增殖, 因而, 在细胞增殖和生长中发挥重要作用^[1-3]。目前, 有关 NPM 与细胞分化的关系及其在细胞内的定位与核转运的机制问题尚不是很清楚。研究表明, NPM 可能是一种潜在的癌基因, 在肝癌、胃癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中存在高表达的现象, 并在肿瘤细胞分化过程中呈表达下调趋势^[4,5], 这与有关 NPM 在某些细胞内的高表达引发肿瘤抑制功能的报道相矛盾, NPM 与癌细胞恶性表型逆转的关系问题尚待进一步研究。此外, 前人研究显示, NPM 存在于人肝癌及前列腺癌细胞核基质组分中, 并作为一种核质穿梭蛋白在维持细胞核稳定性及基因表达调控方面起重要作用^[6,7]。我们以前对人成骨肉瘤 MG-63 细胞的研究中发现, NPM 存在于核基质组分中, 并随着肿瘤细胞分化而出现表达量的改变, 提示其是一种核基质蛋白, 并与肿瘤细胞增殖分化过程密切相关。为此, 本文应用 HMBA 诱导处理人肝癌 SMMG-7721 细胞, 对 NPM 在人肝癌 SMMG-7721 细胞核基质中的存在、定位及其表达变化, 以及 NPM 与 SMMG-7721 细胞相关癌基因、抑癌基因的相互关系做进一步研究, 从而为揭示 NPM 在肿瘤细胞增殖分化过程中的调节作用, 以及阐明细胞癌变与逆转机理问题提供进一步的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SMMG-7721 细胞购自中科院上海生命科学研究院细胞库, 小鼠抗人 NPM 抗体购自 NeoMarkers 公司, 山羊抗兔 IgG-FITC、山羊抗鼠 CY3、兔抗人 P53 抗体、兔抗人 Rb 抗体购自武汉博士德生物公司, 兔抗人 e-Myc 抗体和兔抗人 e-Fos 抗体购自北京中杉生物公司, 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, 环六亚甲基双乙酰胺 (hexamethylene bisacetamide, HMBA) 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与诱导分化处理

人肝癌 SMMG-7721 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 μ g/ml 链霉素、50 μ g/ml 卡那霉素, pH 7.2), 于 37 $^{\circ}$ C 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, 细胞每 2~3 d 换液 1 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

细胞的选择性抽提同文献[8]。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 $^{\circ}$ C 预固定 30 min, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 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 选择性抽提核基质蛋白

依据细胞核基质蛋白的常规制备方法^[9]并加以优化, SMMG-7721 细胞用 PBS 洗 2 次后, 加入含 0.5% Triton X-100 的细胞骨架提取液^v(CSK100, 10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF), 0 $^{\circ}$ C 放置 10 min, 离心, 去上清, 加入含 0.5% Triton X-100 细胞骨架提取液^④ CSK50, 10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 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, 于 -80 $^{\circ}$ C 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, 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 公司) 进行。蛋白点的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。

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 ④型 MALDI-TOF 质谱仪 (Bruker 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 (Western 印迹)

取适量核基质蛋白样品进行常规 SDS-PAGE. 电泳结束后, 以半干法将条带转移到 PVDF 膜 (Millipore) 上. 丽春红染色检测电转效果, 漂洗, 干燥. PVDF 膜以 5% BSA 室温孵育 1.5 h. 加入 NPM (1:2000) 抗体稀释液, 室温孵育 2 h. 漂洗后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1 h. 漂洗后以 ECL 化学发光检测试剂盒检测, X 光片图像扫描并保存. 以 5% BSA 代替一抗作为阴性对照. 实验中以在诱导分化处理前后核基质中稳定表达的 β 肌动蛋白作为内参衡量上样量差异.

1.8 Nucleophosmin 的免疫荧光显微镜观察

SMMG-7721 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, 5 min/次, 选择性抽提核基质-中间纤维系统 (具体步骤参照 1.3), PBS 中洗涤, 4% 多聚甲醛中固定 10 min, PBS 漂洗, 5% BSA 室温封闭 1 h. 分别滴加 1000 倍稀释的 NPM 抗体 30 μ l, 室温孵育 30 min, 移入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜, 漂洗. 滴加 Cy3 标记的二抗稀释液, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 漂洗, 抗荧光淬灭剂 (Beyotime 公司产品) 封片. 以 5% BSA 代替 NPM 抗体进行免疫荧光染色, 作为阴性对照. 荧光显微镜下观察拍照.

1.9 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察

SMMG-7721 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, 以 PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min, 透膜, 4% 多聚甲醛中固定, 5% BSA 室温封闭 1 h, 以 5% BSA 配制一抗作用液 (NPM 稀释 1000 倍, P53、Rb、e-Myc 和 e-Fos 各稀释 200 倍). 设制共定位抗体组合: NPM/e-Fos、NPM/e-Myc、NPM/Rb、NPM/P53 等. 各加 40 μ l 相应一抗稀释液至玻片上, 室温孵育 30 min, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 漂洗. 配制相应组合的二抗稀释液, 各取 30 μ l 加到玻片上, 室温孵育 30 min, 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 避光, 漂洗. 抗荧光淬灭剂封片. TCS-SP2 MP 型激光共聚焦显微镜下观察拍照.

2 结果

2.1 双向凝胶电泳结果与图像分析

人肝癌 SMMG-7721 细胞与 HMBA 处理后细胞提取的核基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上, 以至少 2 次的电泳图谱为基础, 采用 Bio-Rad 公司的

PDQuest 8.0 版本凝胶图像分析软件对采集到的双向电泳图像进行定量分析. Fig. 1-A 中的 C 20 和 H 20 分别为处理前后鉴定为 NPM 蛋白点. Fig. 1-B 为 NPM 蛋白点局部放大图像. Fig. 1-C 为 NPM 蛋白点在处理前后细胞核基质上表达量差异的相对水平. 分析结果显示, HMBA 诱导处理后 NPM 相对表达量从 6800 下降为 2700, 处理前是处理后的 2.5 倍.

2.2 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定

对差异表达的蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 将获得的肽指纹图谱输入数据库进行肽段匹配检验, 其中编号为 C 20 的蛋白点经查询后, 鉴定为 NPM 蛋白, 相关结果见 Table 1.

2.3 蛋白质印迹杂交验证结果

应用抗 NPM 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 38 kD 附近得到 1 条单一蛋白条带. SMMG-7721 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, NPM 表达量明显降低 (Fig. 2). 阴性对照组未检测到蛋白条带. 内参 β -Actin (42 kD) 显示对照与处理组的上样量无显著差异.

2.4 Nucleophosmin 在 SMMG-7721 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 (NM-IF) 系统. SMMG-7721 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 (Fig. 3A, Fig. 3B).

NPM 抗体免疫荧光标记观察经 HMBA 处理前后 SMMG-7721 细胞选择性抽提的样品, 观察结果显示 SMMG-7721 细胞核基质-中间纤维系统中标记 NPM 的红色荧光较强, 主要分布在细胞核区域尤其是残余核仁中, 其中残余核仁荧光较强, 核基质与核纤层区域荧光较微弱 (Fig. 3C); 经 HMBA 处理后细胞的核基质-中间纤维系统, NPM 在细胞核基质中的分布发生了明显变化, 细胞核区域内的荧光强度整体减弱, 且荧光有从残余核仁向核内基质和核纤层扩散的趋势 (Fig. 3D). 阴性对照组未观察到荧光.

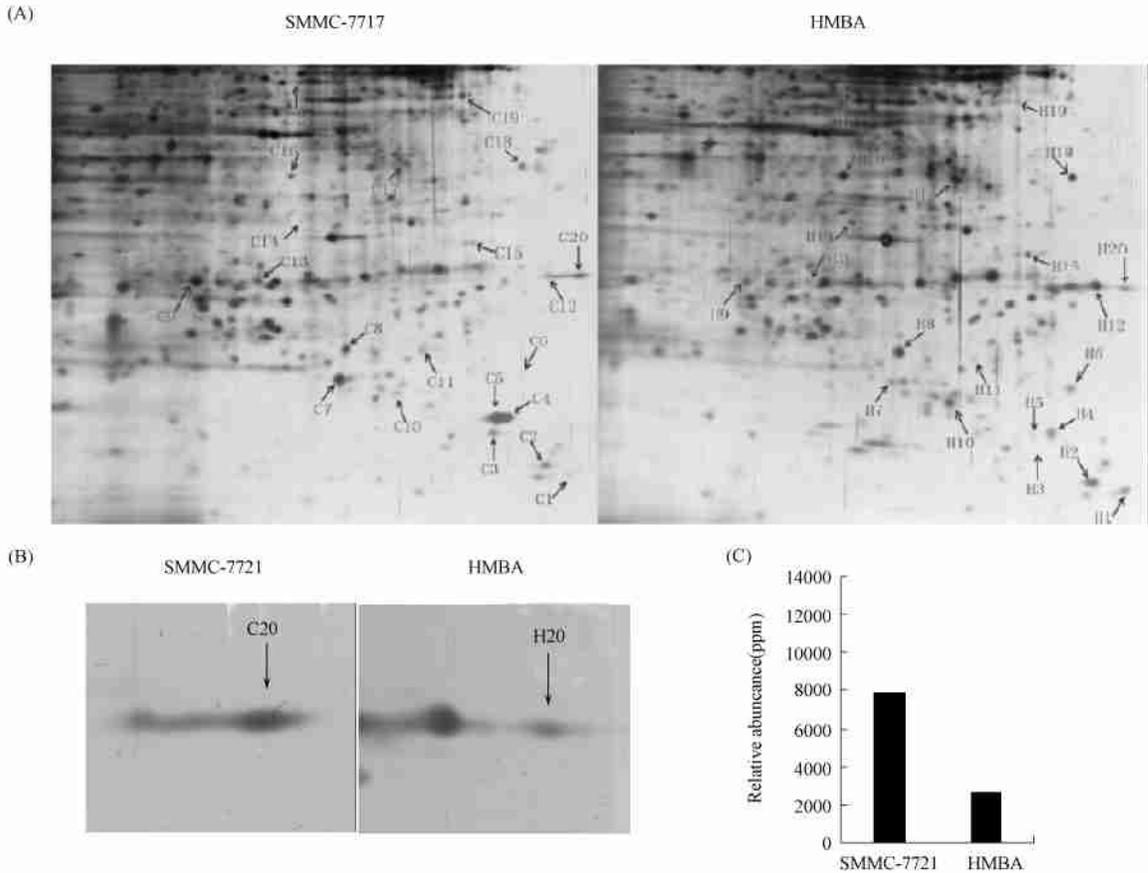


Fig. 1 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from SMMC-7721 cells (silver staining)

(A) 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from SMMC-7721 cells before and after HMBA treatment; (B) Enlarged maps of changed expression of NPM from SMMC-7721 cells; (C) Relative expression level of NPM in nuclear matrix

Table 1 Proteins identified by using MASCOT database (www.matrixscience.com)

Spot No.	NCBI nr entry	Protein name	M _r /pI	Sequence coverage	Score	Biological function
No. 20	gi83641870	Nucleophosmin1 isoform 3	28 497/4.56	23%	69	Also known as NPM, numatrin, No38, B23 protein
	gi40353734	Nucleophosmin1 isoform 2	29 617/4.47	23%	65	A major nucleolus phosphoprotein, a component of NM

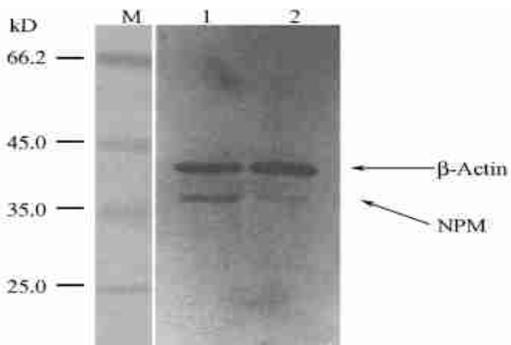


Fig. 2 Western blotting of NPM in nuclear matrix of SMMC-7721 cell

Nuclear matrix proteins were obtained by extraction as described in 1.4. 1: SMMC-7721 cells; 2: HMBA-treated cells; M: Marker; β -Actin:

2.5 Nucleophosmin 与癌基因 *e-fos*、*e-myc*、*mp 53* 以及抑癌基因 *rb* 表达产物在细胞内的共定位关系

用 NPM 抗体分别和 *e-Fos*、*e-Myc*、P53 以及 Rb 等的特异性抗体配对组合,对 SMMC-7721 细胞进行双重免疫荧光染色, NPM 抗体以红色荧光染料 Cy3 标记,其它抗体以绿色荧光染料 FITC 标记,激光扫描共聚焦显微镜观察 NPM 及相应基因产物的定位关系及其变化,两者共定位部位叠加后为黄色或橙黄色(Fig. 4).

2.5.1 NPM 和 *e-Fos* 在人肝癌 SMMC-7721 细胞内的共定位关系 双重免疫荧光标记结果显示,对照组 SMMC-7721 细胞中,代表 NPM 的红色荧光主要分布于核仁与核质区域,核仁部位荧光尤其强烈,细

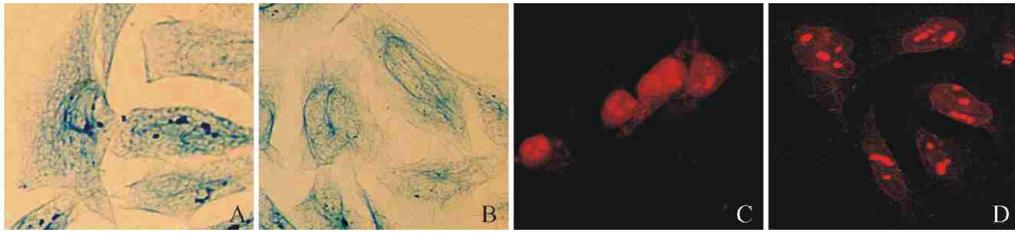


Fig. 3 Light microscope(LM) or fluorescent microscope observation of the nuclear matrix-intermediate filament system of SMMC-7721 cells

Cells were selective extracted. (A) LM observation of NM-IF system in SMMC-7721 cells (Coomassie brilliant blue staining, 400 \times). (B) LM observation of NM-IF system in SMMC-7721 cells after treatment with HMBA (Coomassie brilliant blue staining, 400 \times). (C) Immunofluorescence staining of NPM in the nuclear matrix-intermediate filament system of SMMC-7721 cells (200 \times). (D) Immunofluorescence staining of NPM in the nuclear matrix-intermediate filament system of SMMC-7721 cells after HMBA treatment (200 \times)

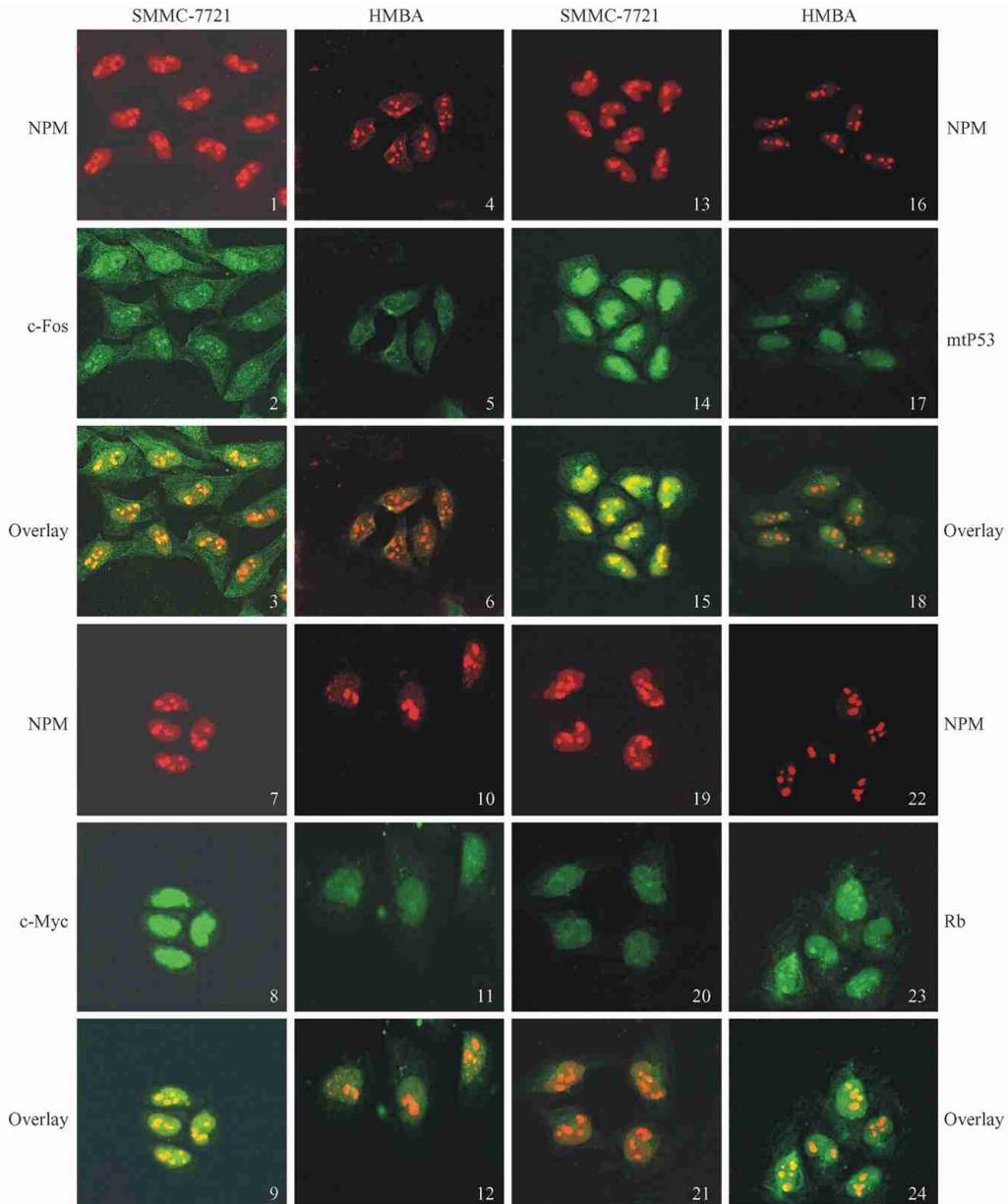


Fig. 4 SCM observation of the co-localization of NPM and e-Fos, e-Myc, P53 and Rb SMMC-7721 cells and HMBA-treated cells were extracted with Triton X-100 buffer

(1—6) Expression of NPM and e-Fos in SMMC-7721 cells (100 \times); (7—12) Expression of NPM and e-Myc in SMMC-7721 cells (100 \times);

(13—18) Expression of NPM and mtP53 in SMMC-7721 cells (100 \times); (19—24) Expression of NPM and Rb in SMMC-7721 cells (100 \times)

胞质内荧光极弱;代表 e -Fos 的绿色荧光在整个细胞区域内均有分布,细胞核内荧光较强并且相当密集,核仁区域荧光密集成簇,细胞质荧光分布较均匀,呈发散状分布,直至细胞边缘。叠加荧光显示,NPM 和 e -Fos 在细胞核内尤其是核仁的中心区域有较强的共定位关系;而在 HMBA 处理后的 SMMG-7721 细胞中,红色荧光整体减弱,主要分布于核仁,核质与核纤层中亦能见少量荧光; e -Fos 的荧光强度也有所减弱,主要位于核仁及核仁四周,细胞质区域内荧光强度较弱,呈弥散状分布,叠加荧光显示两种蛋白在细胞核仁及核膜区域存在共定位关系(Fig. 4(1~6))。

2.5.2 NPM 和 e -Myc 在人肝癌 SMMG-7721 细胞内的共定位关系 结果显示,对照组 SMMG-7721 细胞中,红色荧光主要分布于核仁与核质区域,荧光较强,绿色荧光主要分布在细胞核内,核仁区域荧光强度较高,细胞质靠近细胞核的区域中有少量荧光呈弥散状分布,叠加荧光显示 NPM 和 e -Myc 在细胞核内有共定位,核仁的中心区域最明显,核仁四周叠加荧光相对较弱,核质中的共定位较弱;经 HMBA 处理后的细胞中,红色荧光整体减弱,主要分布于核仁,核质与核纤层中有少量荧光,绿色荧光强度整体较弱,主要集中在核仁及核质区域中,细胞质中荧光极弱,偶尔可见呈散点状的荧光分布。叠加荧光显示, e -Myc 和 NPM 在细胞核仁的中心区域存在共定位关系,核质中出现大量呈散点状的黄色和橙黄色的荧光,提示两者的共定位有由核仁向核质扩散的趋势(Fig. 4(7~12))。

2.5.3 NPM 和 mtP53 在人肝癌 SMMG-7721 细胞内的共定位关系 野生型 P53 蛋白的半衰期极短(仅约 6 min),本研究免疫细胞化学方法检测到的 P53 蛋白主要是相对稳定的突变型 P53 产物。激光共聚焦显微镜观察结果显示,对照组 SMMG-7721 细胞中,代表 NPM 的红色荧光主要分布于核仁与核质区域,荧光强度高,绿色荧光在整个细胞区域内强度均较高,核区域荧光强烈,密集成簇,细胞质中荧光相对较弱,呈弥散状分布,直至细胞边缘,叠加荧光显示 NPM 和 mtP53 主要在核仁及靠近核仁的核质区域内有共定位关系,核周稍弱;经诱导分化处理后的细胞中,红色及绿色荧光强度均整体减弱,红色荧光主要分布于核仁,核质与核纤层中有少量荧光,细胞核区域内的绿色荧光呈块状分布,细胞质中绿色荧光极弱,偶尔可见散点状的荧光分布,两种颜色荧光叠加后显示,NPM 与 mtP53 在核仁中心及核质中靠

近核膜的区域存在共定位关系,显示两者的共定位有由核质向核周转移的趋势(Fig. 4(13~18))。

2.5.4 NPM 和 Rb 在人肝癌 SMMG-7721 细胞内的共定位关系 激光共聚焦显微镜观察结果显示,对照组 SMMG-7721 细胞内,绿色荧光主要定位于细胞核内,核仁区域荧光较强,分布不均匀,细胞质荧光稍弱,叠加荧光显示,NPM 和 Rb 主要在核仁及核质内的大部分区域均有相同的定位;而经 HMBA 诱导分化处理后,红色荧光整体减弱,主要分布于核仁及核质,绿色荧光整体增强,主要聚集在核质及核仁中,细胞质中绿色荧光相对减弱,叠加荧光显示 Rb 和 NPM 在核仁处存在共定位关系,两者共定位关系有由核质向核仁转移的趋势(Fig. 4(19~24))。

3 讨论

3.1 Nucleophosmin 在核基质上的定位及其在 SMMG-7721 细胞分化过程中的表达变化

NPM 作为一种重要的核仁磷酸化蛋白,不仅参与了核糖体、中心体以及组蛋白的组装、rRNA 前体的加工等重要生命活动,同时,其亚细胞定位的改变与细胞的增殖分化与癌变密切相关。前人研究表明,NPM 位于核仁的颗粒区,在其它亚细胞组分中较少分布,且其定位受细胞周期及一些细胞毒药物的影响,有关它在核基质上的定位尚不明确。仅有研究显示,NPM 存在于人肝癌及前列腺癌细胞核基质组分中^[6,7],本文双向电泳及蛋白质印迹杂交实验均证实,人肝癌 SMMG-7721 细胞核基质蛋白组分中存在 NPM 的表达,免疫荧光显微镜观察结果显示,NPM 定位于 SMMG-7721 细胞核基质上,分布于核基质和残余核仁中,在经 HMBA 诱导处理后细胞核基质中则出现 NPM 从残余核仁向核基质边缘区域和核纤层扩散的分布位置变化。有关 NPM 在诱导分化前后的肿瘤细胞核基质上的定位变化目前仍未见报道,仅有研究称肝细胞再生过程中,NPM 在细胞内的定位发生了由核仁向核质、核膜及细胞质转移的改变,因此本文研究结果进一步证实了 NPM 是一种核基质蛋白,定位于核基质上。

NPM 在细胞增殖和生长中发挥重要作用^[1~3],并在多种肿瘤细胞中存在高表达现象^[10],与细胞癌变具有密切关系。本文双向电泳结果显示,NPM 在人肝癌 SMMG-7721 细胞核基质蛋白组分中表达水平较高,而经 HMBA 处理后细胞中其表达水平显著降低。蛋白质印迹杂交结果进一步证实了 NPM 在 HMBA 诱导后细胞核基质蛋白组分中表达明显下

调,免疫荧光染色结果同样显示经 HMBA 处理后细胞核基质-中间纤维系统中 NPM 表达明显减弱.充分表明了 NPM 在 HMBA 诱导人肝癌 SMMG-7721 细胞分化过程中呈现表达下调的变化.前人曾有过人骨髓白血病 K562 细胞分化过程中出现 NPM 表达下调的报道^[9],而我们在对人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质蛋白的研究中,已发现 NPM 存在于核基质组分中,并在 MG-63 细胞核基质蛋白的研究中出现表达下调的变化(待发表资料).本文有关人肝癌细胞核基质中 NPM 表达的研究,进一步肯定了 NPM 表达的变化,证实 NPM 参与肿瘤细胞增殖与分化的调控.

3.2 Nucleophosmin 与相关癌基因、抑癌基因表达产物的共定位关系及其在 SMMG-7721 细胞分化过程中的变化

NPM 不仅参与维持细胞核、核仁及染色体的稳定,并与核糖体的装配、转运、DNA 合成等一系列重要过程密切相关^[1-3],NPM 参与肿瘤细胞诱导分化的调控涉及复杂的机制和途径.本文研究结果显示,NPM 和 e-Fos、e-Myc、mtP53、Rb 在人肝癌 SMMG-7721 细胞核区域内尤其是核仁位置有共定位关系;而在诱导分化后的细胞中,NPM 和 e-Fos、e-Myc、mtP53 表达降低,Rb 表达升高.其中,NPM 与 e-Fos 的共定位区域主要位于核仁及核膜区域,NPM 与 e-Myc 的共定位区域有从核仁向核质中扩散的趋势,NPM 与 mtP53 在核仁中心及核质中靠近核膜的区域存在共定位关系,并有由核质向核周转移的趋势,Rb 和 NPM 的共定位关系则发生了由核质向核仁转移的趋势.前人研究表明,在维甲酸(RA)诱导人白血病细胞分化过程中,e-myc 介导的 NPM 的表达呈转录下调趋势^[11],人类的 NPM 基因座上具有 e-Myc 的结合位点,e-myc 基因表达的上调可提高 NPM 的转录水平^[12].NPM 的 C 端结构域与 P53 的 2 个结构域相互作用,表明它们可以直接结合,NPM 与 P53 结合并调节 P53 蛋白的稳定性和转录活性,NPM 还涉及到 ARF-p53 肿瘤抑制途径的调控^[13-15].此外,NPM 能与磷酸化的 ppRB 相结合而影响 E2F1 介导的转录^[6].因此,本文结果证实了 SMMG-7721 细胞分化过程中 NPM 的表达与定位变化与 e-Fos、e-Myc、P53 以及 Rb 表达变化具有一定关系,NPM 的表达及其定位的改变对人肝癌 SMMG-7721 细胞的增殖分化具有重要影响,并可能通过与以上相关癌基因或抑癌基因产物的相互作用而参与细胞分化的调控.

综上所述,核基质蛋白 NPM 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人肝癌 SMMG-7721 细胞分化和恶性表型逆转过程中发挥重要作用.NPM 可能是 HMBA 作用的靶向性蛋白,并通过与癌基因、抑癌基因的协同作用,共同调控细胞的增殖分化.进一步研究 NPM 在核基质上的功能,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(References)

- [1] Frehlick LJ, Eirin-Lopez JM, Ausio J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones [J]. *Bioessays*, 2007, **29**(1): 49-59
- [2] Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication [J]. *Oncogene*, 2002, **21**(40): 6170-6174
- [3] Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, *et al.* Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies [J]. *Cancer Sci*, 2006, **97**(10): 963-969
- [4] Lin MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer [J]. *Cancer Detect Prev*, 2006, **30**(6): 481-490
- [5] Chou CC, Yung BY, Hsu CY. Involvement of nPKC-MAPK pathway in the decrease of nucleophosmin/B23 during megakaryocytic differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells [J]. *Life Sci*, 2007, **80**(22): 2051-2059
- [6] Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, *et al.* Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO: 4-216) recognizes nucleophosmin/B23 [J]. *Prostate*, 1999, **39**(4): 298-304
- [7] Yun JP, Chew EC, Liew CT, *et al.* Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix [J]. *J Cell Biochem*, 2003, **90**(6): 1140-1148
- [8] Li QF. 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
- [9] Midishita 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
- [10] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, *et al.* Nucleophosmin and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(7): 493-505
- [11] Yung BY. e-Myc-mediated expression of nucleophosmin/B23 decreases during retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells [J]. *FEBS Lett*, 2004, **578**(3): 211-216
- [12] Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, *et al.* Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(51): 48285-48291
- [13] Lambert B, Buckle M. Characterisation of the interface between nucleophosmin (NPM) and p53: Potential role in p53 stabilisation [J]. *FEBS Lett*, 2006, **580**(1): 345-350
- [14] Kurki S, Peltonen K, Latonen L, *et al.* Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from

- HDM2-mediated degradation[J]. Cancer Cell, 2004, 5(5): 465-475 [16] Lin CY, Liang YC, Yung BY. Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF-kappaB, E2F1 and pRB [J]. Cell Signal, 2006, 18(11): 2041-2048
- [15] Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(3): 985-996

中国生物化学与分子生物学会 2008 年组织活动计划表

活动, 规模(人)	主要内容	时间, 地点	联系人, 电话
1 酶学专业委员会三届一次会议(10)	讨论专业委员会工作, 筹备第九届酶学会议有关事宜	2008. 01. 20 北京	刘江红, 田玉兰 010-64888489/80
2 分子生物技术专业委员会第一届会议(40)	讨论专业委员会工作	2008. 04. 29 杭州	盛清, 吕正兵 0571-86843199/91
3 中国生物化学与分子生物学会第九届二次全体理事会(90)	讨论学会工作	2008. 09. 20 贵阳	王同喜 021-54921088
4 医学生物化学与分子生物学会常务理事会议(17)	讨论分会工作, 讨论 2008~2009 的学术活动和工作交流	2008. 04 待定	缪时英 010-65240803 陈保生, 周新, 黎健 鄢盛恺, 王贤理 010-65296413 027-67813233 010-58115048 010-84205213 13705778078
5 脂蛋白专业委员会五届三次会议(20)	1. 第九届全国脂蛋白学术会议筹备会 2. 第九届全国脂蛋白学术会议审稿会	2008. 05 温州	金新根 010-62248069
6 工业生物化学与分子生物学会常务理事会议(15)	讨论分会工作	2008. 06 待定	汪德清 010-66939433
7 临床应用生物化学与分子生物学会常务理事会议(30)	总结上半年的工作, 讨论下半年的学术活动	2008. 06 北京	高雪, 郑俊杰 010-80705115
8 蛋白质组学专业委员会第二届委员会第二次会议(50)	讨论专业委员会建设、学术交流、教育培训及 2009 年活动计划	2008. 07. 27 乌鲁木齐	许雷 010-68919695
9 农业生物化学与分子生物学会常务理事会议(67)	讨论分会工作	2008. 08 待定	陈保生, 周新, 黎健 鄢盛恺, 王贤理 010-65296413 027-67813233 010-58115048 010-84205213 13705778078
10 脂蛋白专业委员会五届四次会议(20)	讨论增补部分委员	2008. 09 西宁	汪德清 010-66939433
11 临床应用生物化学与分子生物学会常务理事会议(40)	讨论分会工作, 汇报一年来的组织建设以及学术交流	2008. 12 北京	