

姜黄素诱导人永生化表皮HaCaT细胞凋亡中 Nucleophosmin的表达和定位变化

杨海波¹ 宋 巍¹ 陈兰英¹ 李祺福^{2*} 于淮滨¹

(¹河南城建学院生命科学与工程学院, 平顶山 467036; ²厦门大学医学院基础医学部, 厦门 361005)

摘要 该文以姜黄素诱导处理前后的人永生化表皮HaCaT细胞为研究对象, 对核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)在核基质中存在、分布及其与凋亡相关基因产物在姜黄素处理前后HaCaT细胞中的共定位关系进行观察研究。Western blot结果显示, NPM存在于人永生化表皮HaCaT细胞核基质蛋白组分中, 并在姜黄素处理后的细胞核基质中表达下调, 免疫荧光显微镜观察显示, NPM定位在核基质上, 经姜黄素处理后出现分布位置与表达水平的变化, 激光共聚焦显微镜观察可见NPM与HaCaT细胞中凋亡相关基因*Bax*、*Bcl-2*、*mtP53*和*Rb*基因产物均存在共定位关系, 但在姜黄素处理后细胞中其共定位分布区域出现变化。研究结果证实NPM是一种核基质蛋白, 定位于核基质上, NPM在HaCaT细胞诱导凋亡过程中的表达分布及其与凋亡相关基因产物的共定位现象值得进一步探索和研究。

关键词 NPM; 人永生化表皮HaCaT细胞; 核基质; 细胞凋亡

Expression and Localization of Nucleophosmin During Curcumin-induced Apoptosis in the Immortalized Human Epithelial HaCaT Cells

Yang Haibo¹, Song Wei¹, Chen Lanying¹, Li Qifu^{2*}, Yu Huaibin¹

(¹College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, China;

²Department of Basic Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract To explore the existence and distribution of nucleophosmin (NPM) in the nuclear matrix and its colocalization with the other apoptosis-related gene products following curcumin treatment in the human epithelial HaCaT cells, the nuclear matrix of HaCaT cells was extracted pre/post curcumin induced apoptosis. Western blot analysis showed that NPM existed in the fractions of nuclear matrix proteins and was down-regulated after curcumin treatment. The immunofluorescence observation revealed that NPM located in the nuclear matrix, curcumin treatment altered its expression level and distribution profile. The colocalization of NPM with the products of apoptosis-related repression genes, including *Bax*, *Bcl-2*, *mtP53* and *Rb*, using laser scanning confocal microscopy, were evaluated, and substantial differences were observed following curcumin treatment. The results implied that NPM is a nuclear matrix protein, and the level of its expression and the colocalization with apoptosis-related gene products may play an important role during the apoptosis of HaCaT cells.

Key words NPM; HaCaT cell; nuclear matrix; cell apoptosis

收稿日期: 2012-12-27 接受日期: 2013-02-28

国家自然科学基金(批准号: 30871241)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

Received: December 27, 2012 Accepted: February 28, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30871241)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-15 15:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130515.1517.001.html>

核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)是一种核仁磷酸化蛋白, 主要存在于核仁颗粒区。NPM具有多方面的功能, 不仅与核糖体的生物合成、染色体复制、中心体复制、调节抑癌基因的活性、作为分子伴侣等过程密切相关, 而且可通过多种信号通路调节细胞增殖和凋亡^[1-3]。此外, 前人研究显示, NPM存在于人肝癌、前列腺癌、人成骨肉瘤MG-63和人胃腺癌MGC-803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^[4-6]。目前, 有关NPM与细胞凋亡的关系及其在细胞内的定位与核转运的机制问题尚不清楚。姜黄素(curcumin)是从多年草本植物姜黄中提取的一种酚类色素, 对于多种细胞系均具有明显的诱导凋亡作用, 在肿瘤细胞凋亡研究中得到充分证实, 是一种理想的细胞凋亡诱导物。我们前期的研究结果已表明, 姜黄素对人永生表皮HaCaT细胞凋亡具有显著诱导作用^[7]。为此, 本文应用姜黄素处理HaCaT细胞, 对NPM在HaCaT细胞核基质中的存在、定位及其表达变化, 以及NPM与HaCaT细胞相关癌基因、抑癌基因产物的相互关系作进一步研究, 从而为进一步阐明NPM在表皮细胞增殖与凋亡过程中的调节作用、为深入认识表皮细胞凋亡及其机理问题提供一定的理论依据, 并为皮肤相关性疾病的治疗研究提供更充分的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人永生表皮HaCaT购自中国典型培养物保藏中心; 小鼠抗人NPM抗体购自NeoMarkers公司; 兔抗人P53抗体、兔抗人Rb抗体、兔抗人Bcl-2抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 山羊抗兔IgG-Cy3、兔抗人Bax抗体和羊抗小鼠IgG-FITC抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 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; 姜黄素购自中国药品生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和诱导凋亡处理 HaCaT细胞培养于RPMI-1640培养液中(内含15%热灭活小牛血清和100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素及50 mg/L卡那霉素, pH7.2), 于37 °C培养。姜黄素用二甲亚砜(DMSO)溶解, 浓度为10 g/L, -20 °C避光保存, 临用

前用培养液稀释成7.5 mg/L工作液。取对数生长期的HaCaT细胞进行消化传代, 接种24 h后, 对照组细胞更换新鲜培养液, 诱导处理组更换姜黄素工作液。

1.2.2 核基质蛋白的提取 依据细胞核基质蛋白的常规制备方法^[8]并加以优化, 分别将对照组与处理组的HaCaT细胞用PBS漂洗2次, 加入含0.5%细胞骨架提取液CSK100, 0 °C放置10 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入细胞骨架提取液, 洗涤2次, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清。加入300 U/mL DNase I(CSK50配制)室温消化30 min, 加入1 mol/L (NH₄)₂SO₄至终浓度为0.25 mol/L, 室温沉淀15 min, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 不溶性沉淀物的成分即为核基质蛋白, 最后CSK50洗1次, 于-80 °C储存备用。

1.2.3 Western blot 取适量核基质蛋白样品进行常规SDS-PAGE电泳。以半干法将蛋白转移到PVDF膜上。纯水漂洗, 干燥。PVDF膜以5% BSA室温孵育1.5 h。TTBS(0.05% Tween-20, 50 mmol/L Tris/HCl, 150 mmol/L NaCl, pH7.4)洗膜; 加入NPM(1:2 000)抗体稀释液, 室温孵育2 h。TTBS洗膜3次; 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3% BSA代替一抗作为阴性对照。实验中以在诱导凋亡处理前后核基质中稳定表达的β-actin作为内参衡量上样量差异^[9]。

1.2.4 NPM的免疫荧光染色 接种在盖玻片条上的对照组和姜黄素组细胞经选择性提取核基质中间纤维系统后, 4%多聚甲醛中于4 °C固定10 min, 5% BSA室温封闭1 h, 分别滴加NPM抗体稀释液, 室温孵育30 min, 用含0.5% Triton X-100的PBS(TPBS)漂洗, 滴加FITC标记的二抗作用液, 室温孵育30 min。PBS振荡漂洗, 蒸馏水漂洗, 室温干燥, 90%甘油/PBS封片。整个过程避光。以3% BSA代替NPM抗体进行免疫荧光染色, 做为阴性对照, 并以考马斯亮蓝染色结果进行对比, 荧光显微镜观察。

1.2.5 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察 玻片培养细胞在含0.5% Triton X-100的PBS中37 °C透膜30 min, PBS洗涤, 4%多聚甲醛中固定10 min, PBS漂洗2次。5% BSA室温封闭1 h。设制抗体组合: NPM与Bax、NPM与Bcl-2、NPM与Rb、NPM与mtP53, 各加40 μL含相应特异抗体的稀释液至玻片上, 4 °C冰箱中孵育过夜; PBS漂洗。分别滴加相

应组合的荧光标记二抗, 室温孵育30 min, PBS漂洗, 避光。90%甘油/PBS封片。在德国莱卡公司的TCS-SP2 MP型激光共聚焦显微系统下观察结果, Cy3以543 nm波长激发, FITC以488 nm波长激发^[10]。

2 结果

2.1 免疫印记杂交结果

经SDS-PAGE分离以后, 再通过电转方式将蛋白转移到PVDF膜上进行Western blot分析, 以不含NPM抗体的孵育液作为阴性对照。阴性对照未见蛋白条带, 各标本与相应抗体反应后, 也仅在与待测蛋白相当的分子量附近有反应的条带, 显然抗体特异性好, 与其他成分无交叉反应。NPM为在Western blot中38 kDa的单一反应条带, 其在HaCaT全细胞和核基质中表达水平较高, 而在经姜黄素处理后, NPM在两者中的表达都大大降低(图1)。

2.2 NPM在HaCaT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内部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(图2A和2B)。

应用免疫荧光技术观察, HaCaT细胞对NPM呈阳性反应, 在荧光显微镜下显示为绿色荧光, 可以观察到NPM主要分布在HaCaT细胞核基质部位, 核基质的中央部位点状荧光多、强度高, 表现为集中分布的斑点状红色荧光, 近核纤层的部位荧光强度弱, 而在中间纤维部位则仅有弱的点状荧光散在分布; 经姜黄素处理后, NPM在HaCaT细胞核基质-中间纤维系统的分布发生了明显变化, 核基质内的点状荧光数量减少、强度下降, 主要分布在核纤层附近, 核基质的中央部位荧光强度减弱或消失, 中间纤维区域散在分布的点状荧光也明显增加(图2C和2D)。

2.3 NPM和Bax、Bcl-2、mtP53以及Rb在HaCaT细胞内的共定位关系

2.3.1 NPM和Bax在HaCaT细胞内的共定位关系
用特异性的NPM抗体和Bax抗体对HaCaT细胞进行双重免疫荧光染色, 以激光共聚焦扫描显微镜观察NPM、Bax在姜黄素诱导凋亡前后的HaCaT细胞中定位的变化, 并对两者在HaCaT细胞分化前后的共定位关系进行分析。NPM抗体以FITC标记, 呈绿色

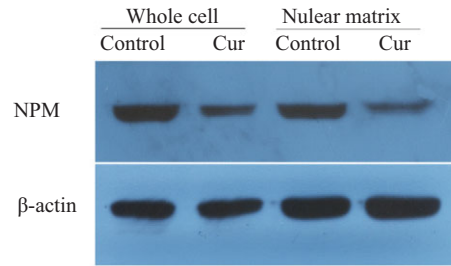
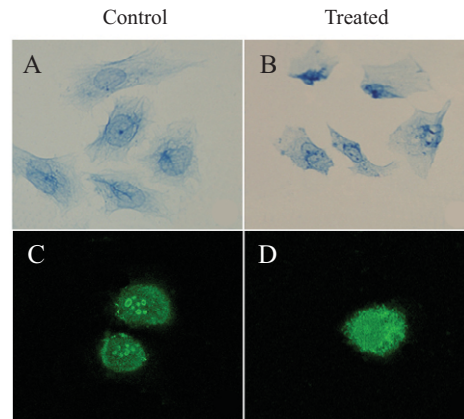


图1 HaCaT细胞处理前后NPM在全细胞和核基质中表达水平的变化

Fig.1 Expressing level of NPM in whole and nuclear matrix of HaCaT cell



A和B为光镜观察结果, C和D为荧光显微镜观察结果。

A,B: morphological changes visualized under an ordinary inverted phase-contrast microscope; C,D: morphological changes visualized under fluorescence microscope.

图2 NPM在HaCaT细胞中核基质-中间纤维的光镜和荧光显微镜下的观察

Fig.2 Light microscope(LM) and fluorescent microscope observation of the nuclear matrix-intemEDIATE filament system of HaCaT cells

荧光, Bax抗体则以Cy3标记, 呈红色荧光。结果显示, NPM主要分布在细胞核仁与核质区域, 核仁部位荧光尤其强烈, 细胞质中也有微弱荧光呈弥散的点状分布; 代表Bax的红色荧光在整个细胞质区域内均有分布, 荧光强度较强, 细胞核内荧光较弱并且分布不均匀, 核仁区域无荧光分布。叠加荧光显示, NPM和Bax在细胞质区域有较强的共定位关系, 在细胞核内的共定位现象较弱, 在核仁区域无共定位现象(图3: 1-4); 而在姜黄素处理后的HaCaT细胞中, 绿色荧光整体减弱, 主要分布于凋亡细胞的凝聚核内, 细胞质与核纤层中亦能见少量荧光; Bax的荧光强度也有所增强, 主要分布于凋亡细胞的凝聚核内, 细胞质区域内荧光强度微弱, 呈弥散状分布, 叠加荧光显示, 两种蛋白在细胞核及核膜区域存在较强的共定位关

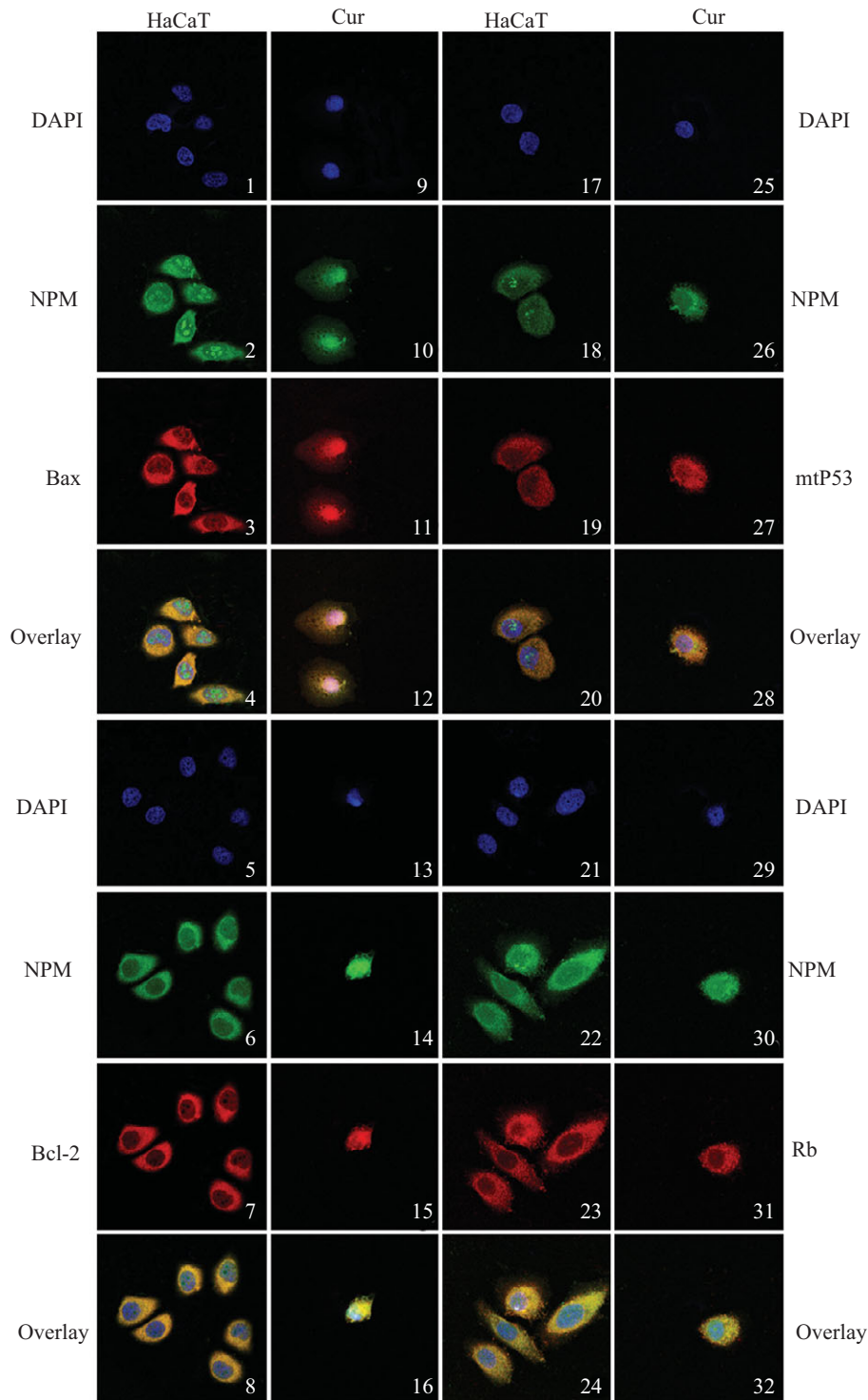


图3 NPM、Bax、Bcl-2、Rb和mtP53在HaCaT细胞凋亡诱导前后的共定位关系的变化
 Fig.3 The colocalization between NPM and Bax, Bcl-2, Rb, mtP53 in HaCaT cells and Cur-treated cells

系, 细胞质区域共定位现象较弱(图3: 9-12)。

2.3.2 NPM和Bcl-2在HaCaT细胞内的共定位关系
 用特异性抗体NPM和Bcl-2抗体对HaCaT细胞进行
 双重免疫荧光染色, 结果表明, 代表Bcl-2的红色荧

光在整个细胞质区域和核膜均有分布, 细胞核内荧
 光较弱并且分布不均匀, 核仁区域无荧光分布。叠
 加荧光显示, NPM和Bcl-2在细胞质区域有较强的共
 定位关系, 在细胞核内的共定位现象微弱, 在核仁

区域无共定位现象(图3: 5-8); 而在姜黄素处理后的HaCaT细胞中, Bcl-2的荧光强度也有所减弱, 在细胞核和细胞质区域都有分布。叠加荧光显示, 两种蛋白在细胞质及核膜区域存在较强的共定位关系, 细胞核区域共定位现象较弱(图3: 13-16)。

2.3.3 NPM和mtP53在HaCaT细胞内的共定位关系 用特异性NPM抗体和mtP53抗体对HaCaT细胞进行双重免疫荧光染色, mtP53的红色荧光则较弱, 亦主要存在于细胞质内, 细胞核中可见mtP53蛋白的微弱荧光分布, NPM和mtP53在细胞质内和核膜周围区域有较强共定位关系, 在细胞核内共定位关系较弱(图3: 17-20)。经姜黄素处理后, HaCaT细胞核和细胞质中都有mtP53蛋白的红色荧光存在, 整体荧光强度减弱。细胞核内荧光较处理前增强, 而细胞质中mtP53的荧光呈点状散在分布, 亦在近核膜的区域荧光较为密集。经姜黄素处理的HaCaT细胞质和细胞核的近核膜部位分布的NPM与mtP53存在较强的共定位关系(图3: 25-28)。

2.3.4 NPM和Rb在HaCaT细胞内的共定位关系 用特异性NPM抗体和Rb抗体组合, 对HaCaT细胞进行双重免疫荧光染色, NPM抗体以FITC标记, 呈绿色荧光, Rb抗体则以Cy3标记, 呈红色荧光。发现NPM主要分布于核仁与核质区域, 核仁部位荧光尤其强烈, 细胞质中也有荧光呈弥散分布; Rb主要分布在HaCaT细胞的细胞质内, 两者在细胞质内和核膜区域有相同的定位关系(图3: 21-24)。在姜黄素处理后, HaCaT细胞核内Rb和NPM减少, 细胞质中也有所减少, 主要分布在细胞质靠近核膜的区域内; Rb和NPM在细胞核膜区域与细胞质中存在共定位关系(图3: 29-32)。

3 讨论

NPM作为一种重要的核仁磷酸化蛋白, 在核糖体的组装和加工过程中起重要作用, 还参与调控中心体复制, 并具有分子伴侣功能。此外, 其亚细胞定位的改变与细胞的增殖、分化和凋亡具有密切的关系。前人研究表明, NPM主要定位在核仁颗粒区, 在其他亚细胞组分中较少分布, 有关其在核基质上的定位尚不明确。本文蛋白质免疫印迹实验证实, NPM存在于HaCaT细胞核基质蛋白样品中。免疫荧光显微镜与激光共聚焦扫描显微镜观察结果均显示, NPM定位于HaCaT细胞核基质上, 分布于核基质

和残余核仁中, 在经姜黄素诱导凋亡处理后, 其在细胞中的分布发生了明显的变化, 由核仁向核内、核膜甚至细胞质位置转移。这与前人的研究结果是一致的。由此进一步证实了NPM是一种核基质蛋白, 定位于核基质上。

NPM的表达与定位变化与细胞增殖调控活动密切相关。本文蛋白质印迹杂交结果显示, 经姜黄素处理后细胞中NPM的表达水平明显下调; 免疫荧光染色结果同样显示, 经姜黄素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在姜黄素诱导HaCaT细胞凋亡过程中呈现表达下调的变化。前人发现, 在肿瘤细胞和生长期细胞中NPM的含量明显高于静止期细胞。而在分化和凋亡细胞中, NPM的表达水平下调。这与我们的实验结果是相一致的^[11-13]。这些结果提示, NPM可能是参与细胞增殖与凋亡变化调控的一个重要调节因子, 在姜黄素诱导HaCaT细胞凋亡过程中, 参与了细胞的凋亡调控。这些结果证实, NPM是一种定位于细胞核基质纤维上的核基质蛋白, 其表达和定位在HaCaT细胞诱导凋亡前后发生了显著的变化。

NPM可能通过与多种凋亡相关基因产物的相互作用来参与细胞凋亡调控。激光共聚焦显微镜观察结果显示, NPM和Bax、Bcl-2、mtP53以及Rb在HaCaT细胞质内和细胞核区域内尤其是核膜位置有共定位关系; 而在诱导凋亡后的细胞中, NPM和几种凋亡基因产物的共定位发生了不同程度的变化。Bax蛋白是重要的细胞凋亡调控蛋白, 它可从细胞质转位于线粒体并与线粒体膜结合而参与细胞凋亡发生。有研究表明, NPM蛋白可以作为Bax的分子伴侣来调节细胞的凋亡^[14]。Bcl-2是最重要的细胞凋亡抑制蛋白, 可以抑制多种组织细胞或阻断多种因素引起的细胞凋亡。目前, 关于NPM和Bcl-2相互作用的研究少见报道。我们发现, 在姜黄素诱导HaCaT细胞的凋亡过程中, NPM和Bcl-2在细胞质及核膜区域存在较强的共定位关系, 但二者的相互作用尚待进一步研究。*p53*是重要的肿瘤抑制基因, 前人研究发现, P53可以通过和其他蛋白的相互作用从而对细胞的凋亡有极其重要的调控作用。NPM可与P53直接结合, 来调节P53蛋白的稳定性和转录活性, 还可参与肿瘤抑制途径的调控^[15-16]。此外, NPM还能与磷酸化的RB相结合而影响E2F1介导的转录^[17]。因此, 本文结果证实了细胞凋亡过程中NPM的表达与

定位变化与Bax、Bcl-2、mtP53以及Rb表达变化具有一定关系。

核基质蛋白NPM作为一种重要的细胞增殖和凋亡调控因子, 其细胞定位及表达水平的改变在HaCaT细胞凋亡过程中发挥了重要作用。NPM可能作为姜黄素作用的靶向性蛋白, 并通过与细胞凋亡相关基因的协同作用, 共同调控细胞的增殖凋亡。NPM的表达及其定位的改变对人表皮细胞的凋亡具有重要影响, 并可能通过与以上凋亡相关基因产物的相互作用而参与细胞凋亡的调控。进一步研究NPM与上述凋亡相关基因产物的相互作用对于探索和揭示表皮细胞凋亡的调控作用机理具有重要意义。

参考文献 (References)

- Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 2002; 21(40): 6170.
- Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(9): 918-23.
- Frehlick LJ, Eirin-López JM, Ausió J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 2006; 29(1): 49-59.
- Yun JP, Chew EC, Liew CT, Chan JY, Jin ML, Ding MX, *et al.* Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 2003; 90(6): 1140-8.
- Helms S. Cancer prevention and therapeutics: Panax ginseng. *Altern Med Rev* 2004; 9(3): 259-74.
- Li QF. Effect of retinoic acid on the changes of nuclear matrix in intermediate filament system in gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 1999; 5(5): 417-20.
- 杨海波, 李祺福, 石松林, 李钟洙, 宋建晔, 刘用金. 姜黄素诱导永生化人HaCaT细胞凋亡. *解剖学报*(Yang Haibo, Li Qifu, Shi Songlin, Li Zhongzhu, Song Jianhua, Liu Yongjin. Curcumin induces apoptosis of immortalized human epithelial cell line HaCaT. *Acta Anatomica Sinica*) 2009; 2: 223-7.
- Michishita E, Kurahashi T, Suzuki T, Fukuda M, Fujii M, Hirano H, *et al.* Changes in nuclear matrix proteins during the senescence-like phenomenon induced by 5-chlorodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp Gerontol* 2002; 37(7): 885-90.
- Liang Y, Li QF, Zhang XY, Shi SL, Jing GJ. Differential expression of nuclear matrix proteins during the differentiation of human neuroblastoma SK-N-SH cells induced by retinoic acid. *J Cell Biochem* 2009; 106(5): 849-57.
- Shi SL, Li QF, Liu QR, Xu DH, Tang J, Liang Y, *et al.* Nuclear matrix protein, prohibitin, was down-regulated and translocated from nucleus to cytoplasm during the differentiation of osteosarcoma MG-63 cells induced by ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA (RCT). *J Cell Biochem* 2009; 108(4): 926-34.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 493-505.
- Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(6): 481-90.
- Weng CH, Yung BY, Weng JJ, Wu MH. Involvement of nucleophosmin/B23 in the cellular response to curcumin. *J Nutr Biochem* 2011; 22(1): 46-52.
- Kerr L, Birse-Archbold JL, Short D, McGregor A, Heron I, Macdonald DC, *et al.* Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene* 2006; 26(18): 2554-62.
- Lambert B, Buckle M. Characterisation of the interface between nucleophosmin (NPM) and p53: Potential role in p53 stabilisation. *FEBS Lett* 2006; 580(1): 345-50.
- Yung BY. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. *Chang Gung Med J* 2007; 30(4): 285-93.
- Lin CY, Liang YC, Yung BY. Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF- κ B, E2F1 and pRB. *Cell Signal* 2006; 18(11): 2041-8.