

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

李祺福* 石松林 刘庆榕 唐 剑 梁 盈 宋建晔

(厦门大学生命科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)

摘要 选择性抽提经中药有效成分人参皂甙 Rg1 组合(简称 RCT)诱导处理前后的人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质, 对 nucleophosmin (NPM)在核基质中的存在、分布及其与相关基因产物在 MG-63 细胞中的共定位关系进行了观察研究。双向凝胶电泳和质谱鉴定结果显示 NPM 存在于 MG-63 细胞核基质蛋白组分中, 在 RCT 处理后细胞核基质蛋白中表达下调。蛋白质印迹杂交结果证实了 NPM 在 RCT 处理前后 MG-63 细胞核基质蛋白中的存在及其表达下调变化。免疫荧光显微镜观察显示 NPM 定位于 MG-63 细胞核基质上, 经 RCT 处理后出现分布位置与表达水平的变化。免疫荧光-激光扫描共聚焦显微镜的观察结果显示 NPM 在 MG-63 细胞中与 c-fos、c-myc、RB、p53 等基因产物具有共定位关系, 并在 RCT 处理后细胞核内其共定位区域发生了变化。研究结果证实了 NPM 存在于核基质上, 是一种核基质蛋白, 其在 RCT 诱导人成骨肉瘤 MG-63 分化过程中的表达与分布变化及其与相关癌基因、抑癌基因的关系显然对 MG-63 细胞分化具有重要影响, 这为深入揭示中药有效成分诱导肿瘤细胞分化的机制提供了重要科学依据和深入探索的新方向。

关键词 nucleophosmin; 核基质; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 诱导分化; 人参皂甙 Rg1

人参皂甙 Rg1(ginsenoside Rg1)、肉桂酸(cinnamic acid)、丹参酮(tanshinone II A)分别是传统中药人参、桂皮和丹参的有效成分。前人的研究证明其成分通过调控特定基因的表达、阻滞细胞增殖而具有抗肿瘤作用^[1,2]。我们的前期研究工作通过人成骨肉瘤 MG-63 细胞的终末分化指标已证明三者的低浓度组合(RCT)具有诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞终末分化的效果, 但是 RCT 抗肿瘤作用的分子机制至今尚不明了。

Nucleophosmin (NPM)是一个定位于核仁的磷酸蛋白, 在细胞中具有多种功能, 它参与 RNA 装配与合成、中心体复制、调节肿瘤抑制基因 p53 和 p14^{ARF} 的功能并作为分子伴侣防止蛋白质集聚等, 而在细胞生长和增殖中发挥重要的作用^[3-5]。然而目前有关 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清楚。目前 NPM 在肿瘤方面的研究结果比较矛盾。一方面, 积累的证据表明 NPM 可能是一个原癌基因, 在很多肿瘤中发现了 NPM 的过度表达, 另一方面, NPM 又被认为具有肿瘤抑制作用^[6-8]。其从细胞核仁到核质与细胞质的转移曾用来评价与检测抗癌剂的作用效果^[9-11]。

我们在中药有效成分组合 RCT 诱导人成骨肉瘤

MG-63 细胞分化过程中核基质变化研究中发现了 NPM 在核基质上的存在与表达变化。为此本文对 NPM 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质中的存在、定位及其表达变化, 以及 NPM 与 MG-63 细胞相关癌基因、抑癌基因的相互关系做进一步研究, 以期能揭示 NPM 在中药有效成分组合 RCT 诱导肿瘤细胞分化过程中的调节机制, 为阐明中药抗肿瘤作用机制, 深入认识细胞癌变与逆转机制问题提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和诱导分化处理

人成骨肉瘤 MG-63 细胞(引自武汉大学动物资源保藏中心)培养于 RPMI1640 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, pH 7.2), 于 37 °C 培养备用。取对数生长期细胞进行消化传代培养 24 h 后加入含有 33 µg/ml 人参皂甙 Rg1+0.3 µg/ml 肉桂酸+0.3 µg/ml 丹参酮 II A 的培养液(均为购自中国药品生

收稿日期: 2007-08-17 接受日期: 2007-12-03

国家自然科学基金资助项目(No.30470877)

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

物制品检定所的标准品,以下用 RCT 表示,此为本研究前期实验做确定的最佳组合浓度)进行诱导分化处理,同时以未加 RCT 的培养液同步培养 MG-63 细胞作为对照组。前期的研究工作观察到 RCT 组合比单一组分处理细胞具有更显著的增殖抑制作用及分化诱导效果。MG-63 细胞终末分化指标骨黏素、骨钙蛋白的表达呈强阳性,并观察到典型骨节结的形成,充分证明 RCT 对 MG-63 细胞显著的终末分化诱导作用。

1.2 核基质蛋白的双向电泳分离与图像分析

1.2.1 核基质蛋白样品制备 依据细胞核基质的常规制备方法^[12-14]加以优化后提取核基质蛋白。简要过程如下:收获的细胞加入含 100 mmol/L NaCl 的细胞骨架提取液(CSK100),0 °C 温育 10 min,600 g 离心,弃上清液。含 50 mmol/L NaCl 的细胞骨架提取液(CSK50)洗涤 2 次,离心,弃上清液。加入 CSK50 配制的 300 u/ml DNase I 室温消化 30 min,滴加 1 mol/L 硫酸铵至终浓度为 0.25 mol/L,室温抽提 15 min,650 g 离心 5 min,剩余不溶性沉淀物即为核基质成分。以 CSK50 洗一次,以裂解缓冲液[7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫尿,4% CHAPS,1.5% Triton X-100,1% 两性电解质(pH 3~10, Amersham Biosciences),65 mmol/L DTT,40 mmol/L Tris,1 mmol/L PMSF,5 mmol/L EDTA]溶解,15 000 g 离心 45 min,取上清液,Bradford 方法蛋白质定量,分装在 0.6 ml 离心管,-80 °C 贮存备用。

1.2.2 双向凝胶电泳与图像分析 常规方法进行双向电泳,以质谱兼容的硝酸银染色法染色,凝胶以 400 DPI 以上分辨率扫描并保存为 TIF 文件格式。对 3 个重复实验组凝胶图像蛋白质点的检测、匹配、定量、标准化及统计学分析通过凝胶图像分析软件 PD Quest 8.0(Bio-Rad)进行。蛋白质点光密度进行了标准量化,相对密度变化超过 2 倍的点定义为差异表达的蛋白质点。

1.3 蛋白质的质谱鉴定

挖取差异表达的蛋白质点,经漂洗、脱色、DTT 还原、碘乙酰胺烷基化、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)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。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。

1.4 蛋白质印迹实验

核基质蛋白样品以 SDS-PAGE 分离后以半干法转移到 PVDF 膜上(Millipore)。NPM 一抗以适宜的浓度与 PVDF 膜在室温温育 3 h,漂洗 3 次,每次 10 min,去除未结合的抗体,以辣根过氧化物酶结合的相应抗体作为二抗(1:1 000 稀释)与膜温育 2 h,经漂洗 3 次,每次 10 min 后以 DAB 检测试剂盒显示蛋白质条带。

1.5 核基质-中间纤维系统观察样品制备

核基质-中间纤维(NM-IF)系统的选择性抽提过程如下:细胞培养 2 天后传代于玻片上,培养 2 天后细胞经 D-Hanks 液(37 °C)漂洗 2 次,然后 4 °C 下高离子强度提取液[10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 250 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L PMSF, 0.5% Triton X-100]抽提 3 min,无酶消化液(10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 50 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L PMSF, 0.5% Triton X-100)漂洗后,含酶消化液(DNase I、RNase A 各 400 µg/ml)于 23 °C 消化 20 min,再经高离子强度提取液于 23 °C 抽提 5 min,存留的即为 NM-IF 结构样品。

1.6 光镜观察与荧光显微镜观察样品制备

选择性抽提所得 NM-IF 玻片样品经 2% 戊二醛(无酶消化液配)4 °C 预固定 30 min, PBS (pH 7.4) 漂洗,0.2% 考马斯亮蓝染色液中染色 20 min,纯水漂洗,晾干,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察。

选择性抽提所得 NM-IF 玻片样品经 4% 多聚甲醛(PBS 配)于 4 °C 固定 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,5% BSA 室温封闭 1 h 后加 NPM 抗体稀释液(1:300, 5% BSA 配制)至玻片上,室温温育 30 min,4 °C 温育过夜,TTBS 漂洗 3 次,每次 10 min,滴加以 5% BSA 配制的荧光染料 Cy3 标记二抗作用液(1:1 000),室温温育 30 min,4 °C 温育 3 h。TPBS 漂洗 2 次,每次 10 min,蒸馏水漂洗 2 次,每次 10 min。室温干燥,90% 甘油/PBS 封片。整个过程避光。荧光显微镜观察。

1.7 NPM 与相关癌基因、抑癌基因产物细胞内共定位关系样品制备与观察

玻片培养细胞以 PBS 洗涤,含 0.5% Triton X-100 的 PBS(或 TBS)中 37 °C 透膜 30 min, PBS 洗涤后以 4% 多聚甲醛中固定 10 min, PBS 洗涤。5% BSA 室温封闭 1 h。设制抗体组合: NPM/c-Fos、NPM/c-Myc、NPM/Rb、NPM/P53 等,每一组合的抗体血清来源动物不能相同。各加 40 µl 含相应特异抗

体的一抗作用液至玻片上, 室温温育 30 min, 4 °C 温育过夜(注意防止蒸发干燥); TTBS 漂洗 3 次, 每次 10 min。根据组合不同, 分别配制相应组合的荧光标记二抗作用液。二抗室温温育 30 min, 4 °C 温育 3 h, 温育过程注意避光。TPBS 摇动漂洗 4 次, 每次 10 min, 洗涤过程避光。在 PBS 及纯水分别漂洗 2 次, 每次 10 min, 室温干燥后封片。激光共聚焦显微镜观察结果, 荧光染料 Cy3 以 543 nm 波长激光激发, FITC 以 488 nm 波长激发。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳与图像分析结果

对照组 MG-63 细胞与 RCT 处理组细胞提取的核

基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上, 采用 Bio-Rad 公司的凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 对采集到的双向电泳图像进行定量分析。图 1A 中的 S1 和 S2 是鉴定为 NPM 的蛋白质点。图 1B 为 NPM 的蛋白质点局部放大图像, 图 1C 显示了 NPM 的蛋白质点在处理前后细胞核基质上的表达量差异。

2.2 MALDI-TOF 质谱分析与数据库检索结果

经 MALDI-TOF 质谱分析与数据库检索, 鉴定两个差异表达的相邻蛋白质点为 NPM 同源蛋白, 其分子量及等电点理论值与双向电泳实验观察结果基本相符(表 1)。

2.3 Western 印迹验证结果

NPM 的理论分子量约为 38 kDa, Western 印迹

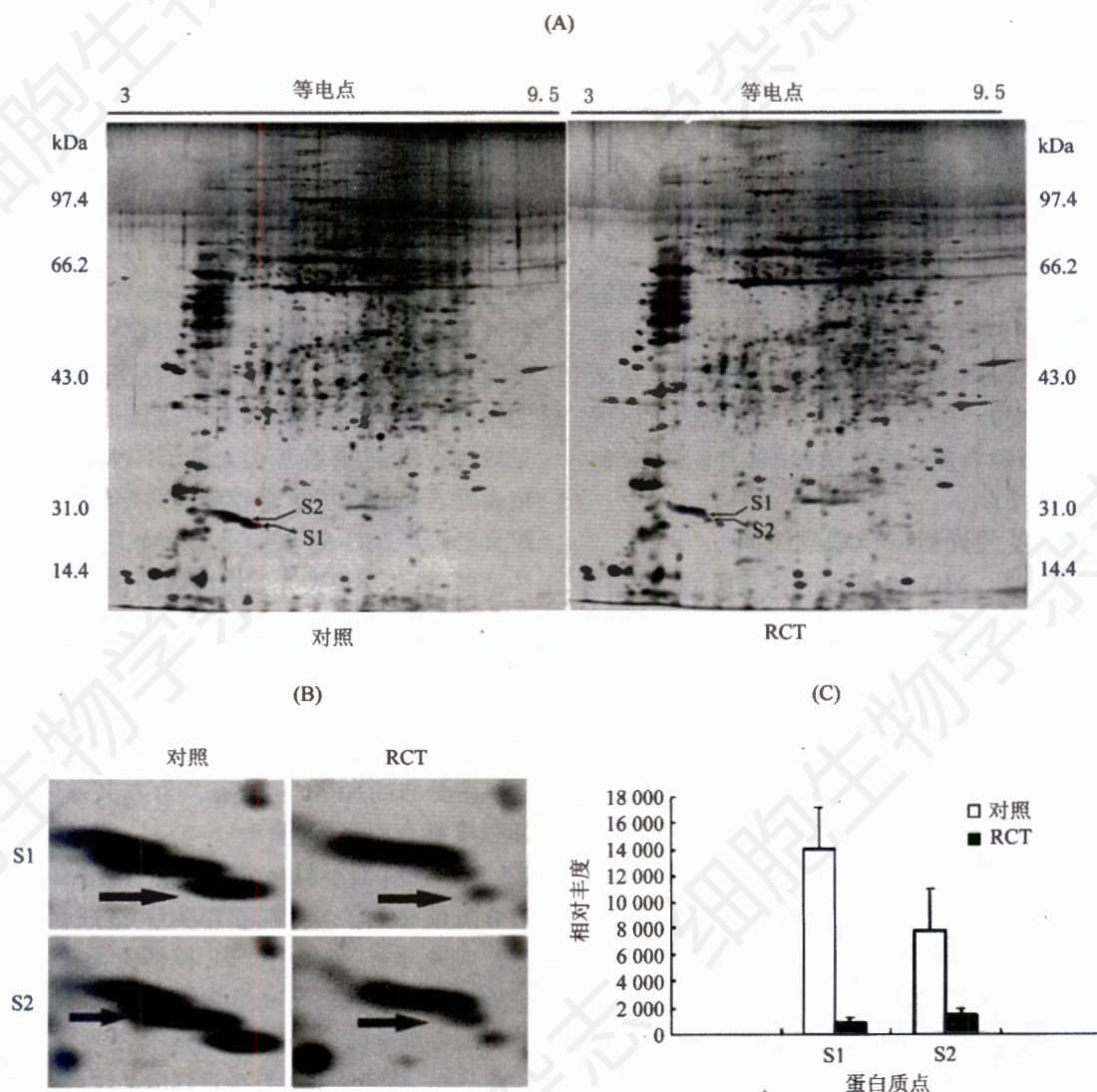


图1 人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质蛋白双向电泳

蛋白质在等电点(X轴)和分子量(Y轴)差异的基础上分离并被银染。差异蛋白用 MALDI-TOF-MS 进行鉴定。(A) 2-DE 图像, S1 和 S2 为鉴定为 NPM 的两个蛋白质点; (B) S1 和 S2 在凝胶图像上的放大部分。(C) S1 和 S2 在凝胶染色后的光密度变化。

表1 鉴定为 NPM 的差异表达核基质蛋白

蛋白质点	蛋白质名称	数据库检索号 (Swiss-Prot)	分子量(理论值) (Da)	pI	匹配肽段覆盖率	匹配肽段数	得分
S1	Nucleophosmin	P06748	32 726	4.64	28%	6	58
S2	Nucleophosmin	P06748	32 726	4.64	28%	6	64

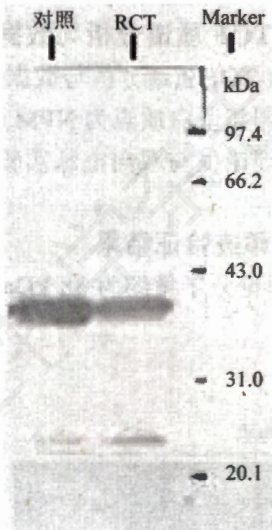


图2 NPM 的 Western 印迹确证

结果显示在 38 kDa 分子量的位置出现了比较宽粗的蛋白质条带。对照组的条带较粗而深，处理组相对较浅而细,这与双向电泳图像分析显示 NPM 表达减弱的结果是符合的。在 23 kDa 分子量位置附近出现的极浅的条带可能为部分水解的 NPM 片断或 NPM 的同源蛋白(图 2)。

2.4 光镜与免疫荧光显微镜观察结果

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(图 3-1)。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(图 3-2)。

免疫荧光显微镜观察 NPM 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 NPM 的红色荧光主要分布在 MG-63 细胞核仁区域, 荧光强度非常高, 核基质与核纤层部位也有荧光分布, 而在中间纤维部位基本没有分布(图 3-3); 经 RCT 组合处理后, NPM 在 MG-63 细胞核基质 - 中间

纤维系统的分布发生了明显变化, 核基质内的荧光数量减少、强度下降, 主要分布在核纤层与核膜附近, 而核内核仁部位荧光强度减弱, NPM 在处理后有向核内基质转移的趋势, 中间纤维区域有散在分布的极微弱荧光(图 3-4)。

2.5 NPM 与相关癌基因、抑癌基因在细胞内的共定位关系

用 NPM 抗体分别和 c-Fos、c-Myc、P53 和 Rb 等蛋白质的特异性抗体配对组合, 对 MG-63 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, 其他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(图 4)。

2.5.1 NPM 和 c-Fos 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系 对照组 MG-63 细胞中, 代表 NPM 的红色荧光主要在核仁部位成簇分布, 荧光多而强, 细胞质中也有极少量微弱荧光存在; c-Fos 主要定位于细胞核内, 荧光强度较强且成簇分布, 细胞质中可见散在点状分布; 叠加荧光显示 NPM 和 c-Fos 在细胞核内尤其是核仁位置有较强的共定位荧光。在 RCT 组合处理后 MG-63 细胞中, NPM 的红色荧光强度整体减弱, 核仁部分荧光强度减弱而核内基质部分荧光呈弥散状有所增强, NPM 有从核仁向核内扩散的趋势; c-Fos 整体荧光强度急剧下降, 在细胞核内围绕核仁部位成簇分布, 细胞质中 c-Fos 的荧光强度变弱呈点状散在分布; NPM 和 c-Fos 的叠加荧光显示在细胞核内分布的 NPM 与 c-Fos 均存在共定位关系, 但整体强度都有所下降(图 4, 1~6)。

2.5.2 NPM 和 c-Myc 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位关系 在对照组 MG-63 细胞, NPM 围绕核仁成簇分布, 荧光强度高, 核仁荧光表现为空泡状, 细胞质中也有微弱荧光呈弥散的点状分布; c-Myc 主要分布在细胞核内, 核仁位置及周边表现为高强度的点状分布, 细胞质中亦有少量弥散的绿色荧光存在; 叠加荧光显示 NPM 和 c-Myc 在细胞核内有共定位, 核仁位置叠加荧光最强。RCT 处理后的 MG-63 细胞中, 核内荧光强度减弱, 点状弥散分布, 核仁部位荧

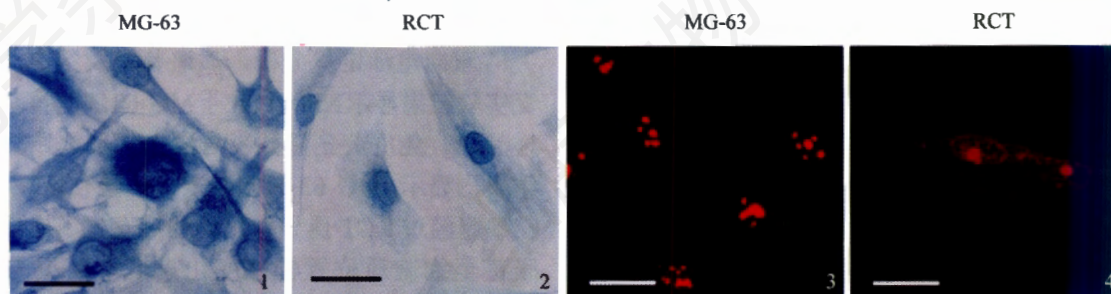


图3 RCT处理前后MG-63细胞核基质-中间纤维系统构型变化及NPM在其上的定位分布

1、2: 选择性分级抽提考马斯亮蓝 G-250 染色光镜观察示 RCT 处理前后 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统(标尺: 30 μm) ; 3、4: 选择性分级抽提荧光显微镜观察示 NPM(荧光染料 Cy3 标记)在 RCT 组合处理前后 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统上的定位分布(标尺: 30 μm)。

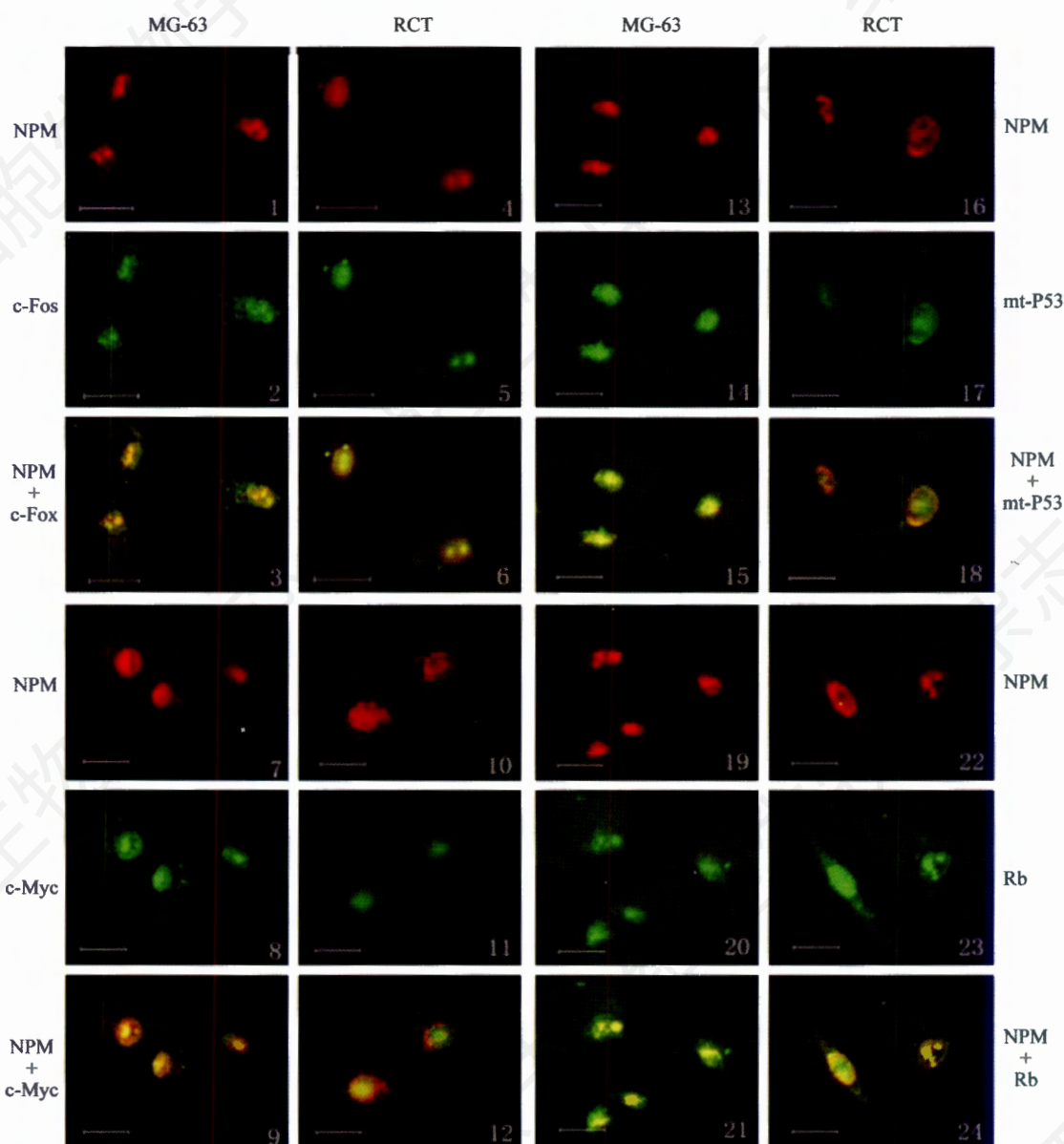


图4 RCT处理前后NPM及相关癌基因、抑癌基因蛋白在MG-63细胞内的表达与分布变化及共定位关系。

1~6: NPM 和 c-Fos 在 MG-63 细胞内的表达与共定位关系; 7~12: NPM 和 c-Myc 在 MG-63 细胞中的表达与共定位关系; 13~18: NPM 和 mt-P53 在 MG-63 细胞中的表达与共定位关系; 19~24: NPM 和 Rb 在 MG-63 细胞中的表达与共定位关系。标尺: 30 μm 。

光空泡化,细胞质中较强的点状红色荧光主要分布在靠近核膜的区域,NPM有转移到核膜区域及细胞质趋势;c-Myc荧光在细胞核内变弱,成弥散状分布,主要聚集在核仁部位,细胞质中c-Myc荧光明显减弱至消失;叠加荧光显示c-Myc和NPM在细胞核纤层与细胞核仁部位存在共定位关系,且在核仁部分的共定位荧光均较处理前减弱(图4,7~12)。

2.5.3 NPM和mt-P53在人成骨肉瘤MG-63细胞内的共定位关系 在对照组MG-63细胞中,NPM主要在核仁区域成簇分布,荧光较强,在核质中也有微弱荧光呈弥散点状分布;突变型mt-P53的绿色荧光主要存在于细胞核内,呈不均匀块状分布,荧光强度高,细胞质中可见mt-P53微弱荧光分布;叠加荧光显示NPM和mt-P53在细胞核内核仁位置有共定位关系。RCT处理后MG-63细胞中,NPM在细胞核减弱,在核纤层及其内缘有较多分布,显示NPM由核仁区域向核纤层及核质中发生转移;mt-P53的绿色荧光整体强度下降,弥散状分布,近核膜区域荧光明显增强;叠加荧光显示经处理的MG-63细胞核内核仁、核纤层与近核膜部位分布的NPM与mt-P53存在共定位关系(图4,13~18)。

2.5.4 NPM和Rb在人成骨肉瘤MG-63细胞内的共定位关系 在对照组MG-63细胞,NPM主要成簇聚集分布在核仁部位,强度较高;Rb主要定位于细胞核内,分布不均,细胞质荧光强度弱;叠加荧光显示NPM和Rb在细胞核核仁区域有相同的定位关系。在诱导分化处理后细胞中,NPM分布发生改变,核纤层上出现较强荧光,核仁区域荧光强度降低,表现出从核仁向核质及核膜扩散趋势,细胞质中也可见NPM微弱荧光;Rb荧光强度明显增加,主要聚集在核仁及核膜区域,可见有的细胞核内Rb荧光呈弥散状分布在核内;叠加荧光显示Rb和NPM在细胞核仁与核纤层位置存在共定位关系,叠加荧光有从核仁向核纤层转移趋势(图4,19~24)。

3 讨论

3.1 NPM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

NPM是一种主要位于核仁颗粒区的多功能核磷酸蛋白,有关其在核基质上的定位尚不明确,仅有研究报道NPM存在于人肝癌及前列腺癌细胞核基质组分^[15,16]中。NPM可以在细胞核与细胞浆之间穿梭,其定位受细胞周期及一些细胞毒药物的影响^[17],NPM的

表达与定位变化与细胞增殖调控活动密切相关。

双向电泳定量分析、质谱鉴定及蛋白质印迹杂交实验结果显示NPM存在于MG-63细胞核基质蛋白样品中。免疫荧光显微镜与激光共聚焦显微镜观察结果均显示,MG-63细胞中定位于核仁区域的NPM在细胞经过RCT诱导分化处理后发生了向核内及核膜甚至细胞质位置转移变化。这些结果与前人的NPM定位于核仁区域的研究相互印证,由此证实了NPM是一种核基质蛋白。而NPM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于报道,曾有报道指出NPM在核内的定位伴随着细胞周期发生变化,细胞毒药物处理也会使NPM由核仁向核质转移^[18],但是NPM的这种定位转移机制尚不清楚。作为一种核基质蛋白,NPM在MG-63细胞分化过程中的这种定位变化可能作为一种调控机制参与了RCT诱导的细胞分化调控过程。

NPM在多种肿瘤细胞中过度表达^[5,6]。双向电泳定量分析、质谱鉴定及蛋白质印迹杂交实验结果显示,RCT诱导人成骨肉瘤MG-63细胞分化过程中NPM的表达显著下调。免疫荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察结果也定性的证实了NPM表达下调的变化趋势。前人研究发现在维甲酸(RA)诱导细胞分化中NPM的转录呈下调趋势^[19],这与本文研究结果相印证,提示NPM可能是参与细胞癌变与逆转变化的一个重要调节因子,在RCT诱导MG-63细胞过程中,参与了细胞的分化调控。

本文结果证实,NPM是定位于核基质纤维上的一种核基质蛋白,其表达和定位在MG-63细胞诱导分化前后发生了显著变化。进一步研究NPM的表达与定位变化机制将有助于阐明NPM在MG-63细胞诱导分化中的调控作用。

3.2 NPM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

NPM是一个重要的调控因子,可能通过与多种相关癌基因、抑癌基因产物的相互作用而参与细胞分化的调控途径。激光共聚焦显微镜观察结果揭示在MG-63细胞中,NPM分别与c-Fos、c-Myc、mt-P53和Rb在核内有着类似的共定位关系;在细胞被诱导分化后,其共定位免疫荧光强度减弱,并有从核仁位置向核内及核膜位置转移的现象;同时激光共聚焦显微镜观察结果还显示c-Fos、c-Myc、mt-P53表达的下调及Rb表达的上调。

C-Myc的激活可使细胞提早进入S期完成DNA

合成, c-Myc 的过表达加速了细胞的增殖。C-Fos 则可与 c-Jun 形成异二聚体转录因子 Ap-1 调控细胞的生长、发育和分化。人类的 NPM 基因座上具有 c-Myc 的结合位点^[20], c-Myc 表达的上调可提高 NPM 的转录水平^[21]。NPM 分别与 c-Myc 和 c-Fos 在核内有着共定位关系并在细胞分化前后发生定位变化, 提示它们的基因产物之间可能也存在这直接的相互作用关系, 这在目前尚无报道。

前人研究显示 NPM 能与磷酸化的 ppRB 及 NF- κ B 相结合^[22,23]而影响 E2F1 介导的转录, 促进细胞周期的运转; NPM 的下调可阻滞细胞周期。低磷酸化的 pRB 则对 E2F1 介导的转录激活起抑制, 使细胞阻滞于 G₁ 期。这些结果提示, NPM 的过表达会使细胞进入增殖状态, 而 pRB 表达增强则有助于细胞阻滞于 G₁ 期, 促进细胞的分化。本研究中 RCT 组合处理使 NPM 表达下调而 RB 表达上调, 提示 RCT 组合通过 NPM 和 RB 的表达变化阻滞了 MG-63 细胞周期进程。在诱导分化过程中 NPM 与 Rb 在核纤层位置的共定位荧光的增强, 提示了 pRB 在核周内缘基因表达活跃区域的富集而抑制 E2F1 活性, 但是这种转移机制目前尚未见报道。

有研究发现 NPM 与 P53 可以直接结合, NPM 与 P53 结合并调节 P53 的稳定性和转录活性^[24-26]。前人研究认为, NPM 还涉及到 ARF-p53 肿瘤抑制途径的调控^[27], NPM 通过与 ARF 的结合将其限制在核仁部位, 从而阻碍了其肿瘤抑制功能^[28]。我们的实验结果显示 NPM 与 mt-P53 在细胞核内确实存在共定位关系, 这印证了前人关于 NPM 与 P53 直接作用的研究。而 MG-63 细胞分化过程中, NPM 与 mt-P53 的表达都显著下调, 提示 NPM 的表达减少, mt-P53 不稳定被大量降解, 被抑制的野生型 P53 表达, 进而引起肿瘤细胞恶性表型的逆转。而中药有效成分诱导细胞分化过程中 NPM 与 P53 共定位的核质转移的生物学意义尚不明了, 有待进一步深入研究。本研究结果提示 NPM 分别与 c-Fos、c-Myc、mt-P53 和 Rb 在核内有着相互作用关系, 并在 RCT 处理后发生了相互作用位置改变的现象, 包括 NPM 与 c-Fos、c-Myc 的共定位关系。

本文研究工作证实了中药有效成分 RCT 组合诱

导 MG-63 细胞分化过程中, NPM 与 c-Fos、c-Myc、mt-P53 和 Rb 存在共定位关系与变化, 提示 NPM 是中药有效成分 RCT 组合的关键靶向性蛋白之一。RCT 通过调节 NPM 和相关基因的表达及其在核基质上的定位变化, 调控了 MG-63 细胞的分化。这一过程涉及 NPM 与各种转录因子之间复杂的调控网络。本实验室前期工作发现不同的诱导分化物处理同一肿瘤细胞和同一诱导分化物处理不同肿瘤细胞, 都发现了 NPM 相似的变化, 更说明了 NPM 在这一分化调控过程中扮演了关键的调控角色。对 NPM 在核基质上的表达与定位变化及其在肿瘤细胞分化调控的作用机制的深入研究, 不仅能够进一步揭示 NPM 在肿瘤细胞分化过程中的调控作用, 并对于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制和肿瘤细胞诱导分化机制, 有着十分重要的意义。

参考文献(References)

- [1] Helms S. *Altern Med Rev*, 2004, 9: 259
- [2] Yun TK. *Lancet Oncol*, 2001, 2: 49
- [3] Frehlick LJ et al. *Bioessays*, 2007, 29: 49
- [4] Ye K. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4: 918
- [5] Naoe T et al. *Cancer Sci*, 2006, 97: 963
- [6] Tsui KH et al. *Urology*, 2004, 64: 839
- [7] Colombo E et al. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 8874
- [8] Lim MJ et al. *Cancer Detect Prev*, 2006, 30: 481
- [9] Yung BY. *Chang Gung Med J*, 2007, 30: 285
- [10] Yung BY et al. *Int J Cancer*, 1991, 48: 779
- [11] Chan PK et al. *Cancer Lett*, 1996, 100: 191
- [12] Michishita E et al. *Exp Gerontol*, 2002, 37: 885
- [13] Nickerson JA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4446
- [14] Zhao CH et al. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 4628
- [15] Yun JP et al. *J Cell Biochem*, 2003, 90: 1140
- [16] Subong EN et al. *Prostate*, 1999, 39: 298
- [17] Chou YH et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217: 313
- [18] Chan PK et al. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57: 1265
- [19] Alsayed Y et al. *J Biol Chem*, 2001, 276: 4012
- [20] Zeller KI et al. *J Biol Chem*, 2001, 276: 48285
- [21] Guo QM et al. *Cancer Res*, 2000, 60: 5922
- [22] Dhar SK et al. *J Biol Chem*, 2004, 279: 28209
- [23] Lin CY et al. *Cell Signal*, 2006, 18: 2041
- [24] Lambert B et al. *FEBS Lett*, 2006, 580: 345
- [25] Colombo E et al. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 529
- [26] Kurki S et al. *Cancer Cell*, 2004, 5: 465
- [27] Bertwistle D et al. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 985
- [28] Korgaonkar C et al. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 1258

The Localizational and Expressive Alteration of Nucleophosmin during the Differentiation of Human Osteosarcoma MG-63 cells Induced by the Combination of Ginsenoside Rg1

Qi-Fu Li*, Song-Lin Shi, Qing-Rong Liu, Jian Tang, Ying Liang, Jian-Ye Song

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology & Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract To explore the existence, distribution of nucleophosmin (NPM) in the nuclear matrix of the osteosarcoma MG-63 cells and the co-localizational relationship between NPM and the products of some interrelated genes, the MG-63 cells treated with or without the combination of ginsenoside Rg1, cinnamic acid and tanshinone II A (RCT) were selectively extracted and subjected to proteomic methodologies and laser scanning confocal microscopy (LSCM). 2-D PAGE, MS and Western blotting methods confirmed the existence of NPM and its decreased expression in the nuclear matrix proteins. LSCM observation showed that there were altered co-localization after RCT treatment between NPM and the product of genes c-fos, c-myc, RB and p53, respectively. Our study confirmed the existence of NPM in the nuclear matrix and the important role its expression and distribution played during the differentiation of MG-63 cells induced by effective ingredients from Chinese materia medica.

Key words nucleophosmin; nuclear matrix; human osteosarcoma MG-63 cells; induced differentiation; ginsenoside Rg1

Received: August 17, 2007

Accepted: December 3, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470877)

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