

·学科进展·

白血病细胞核基质蛋白的研究

李娟

(中山医科大学附属第一医院血液内科,广州 510080)

[摘要] 核基质是细胞核内成分,它与细胞核中的一系列生化反应有密切关系,并与细胞癌变有关。通过白血病细胞核基质进行了初步研究,发现白血病细胞与正常细胞相比,某些核基质蛋白含量有改变或出现新的核基质蛋白,对新出现的蛋白成分的深入研究,可能可以发现新的致癌基因。

[关键词] 核基质,白血病

1 研究背景

白血病是一种危害人类特别是中青年的恶性肿瘤,其病因和发病机理尚未完全确定。对包括白血病细胞在内的肿瘤细胞的研究,以往大都是在携带遗传信息的 DNA 方面。70 年代中期 Manitoba 大学的生物化学家 James Davie 在研究染色体内部活动时,从细胞核中抽出 DNA 和可溶性蛋白后,发现残留下的那部分物质与基因表达等生命过程密切相关,这些残留下的物质即是核基质。核基质(Nuclear matrix)或核骨架(Nuclear skeleton)是指细胞核内除核膜、Lamina、染色质与核仁以外存在的精密网架体系,核基质的成分复杂,已测定核基质蛋白成分占 98% 以上,主要是非组蛋白的不溶性纤维蛋白,分子量多为 40 000—60 000。近 10 年大量的研究表明:核基质与真核生物细胞核中的一系列生化反应有着密切的联系。

核基质不仅提供了 DNA 超螺旋附着点^[1],而且与 DNA 的转录、复制过程是不可分割的^[2],在核基质的网状结构中,有很多 DNA 转录位点,转录是在核基质上进行的,同样 DNA 复制也要在核基质的固定位置上进行,在核基质中还有 2 种酶:乙酰基转移酶和脱乙酰基酶,它们在基因表达的调节中起着关键性的作用^[3],前者通过把乙酰基转移给染色体中的某些组蛋白而使染色质松弛,基因能拷贝;后者则从染色质除去乙酰基,使基因表达难于进行。核基质除有调节基因活性外,基质分子对 mRNA 的合

成和剪接起组织作用,新合成的 RNA 是紧密结合在核骨架上的。核基质还是某些抗癌药物作用的靶位点^[4]并是某些激素的结合位点^[5];核内 DNA 病毒的复制与装备过程也与核基质相关^[6]。病毒的复制、转录、翻译以及病毒的装备都与细胞核基质有关,例如,腺病毒感染能导致宿主细胞核基质蛋白成分的变化,分别以腺病毒 DNA 的早期和晚期转录片段作探针,Northern 分子杂交的实验结果表明,腺病毒早期和晚期转录的 mRNA 在修饰与拼接前均首先结合在核基质上,然后再转移到核池与胞质。核基质还参与了细胞凋亡过程^[7],细胞株 HL-60 细胞核基质中的 180、125、126、160 Kd 蛋白与细胞凋亡有密切关系。

人们在对核基质的进一步研究中还发现癌细胞核基质蛋白成分与正常细胞相比有明显的变化^[8],1985 年 Eisenmen 发现一些癌基因表达的蛋白结合在核骨架上,某些致癌物如乙-苯甲等在核基质上有结合位点^[9],许多致癌因素均可引起细胞核基质蛋白组成和功能的改变。因此,DNA 不一定是致癌作用唯一的靶子,核基质的损伤或基因控制失常与细胞癌变的关系非常密切,将核基质应用于肿瘤的研究是近年来肿瘤研究领域中的一个新的发展方向。我们的初步研究表明:相同的肿瘤细胞有相同的特异性核基质蛋白,不同的肿瘤细胞其核基质蛋白成分的改变有不同,如多个病人来源的肝癌、鼻咽癌、急性粒细胞性白血病肿瘤细胞的特异性核基质蛋白均分别出现在 94、50、65 Kd 区域的蛋白带上。

本文于 1999 年 2 月 23 日收到。

在多年的白血病核基质研究中我们发现白血病细胞与正常骨髓相应细胞的核基质相比有很大差异,特别是在已抽取的 18 例急性粒细胞白血病细胞的核基质蛋白中,通过 SDS-PAGE 电泳,均在电泳带上分子量为 65 Kd 区域找到一条正常相应细胞所没有的蛋白带。经查 1984 年至今的国内外文献^[10-14],已知的核内癌蛋白有 jun、fos、myc、myb、Blym 基因编码的分子量分别为 39、55、110、30、44/48 Kd 的蛋白,因此,分子量为 65 Kd 的这条蛋白带可能是急性粒细胞白血病细胞特有的核基质蛋白,对这一核基质蛋白的深入研究,将有助于揭示白血病的病因和发病机理,因此,在进一步分离和纯化这一特异的核基质蛋白,并通过对白血病细胞特异性核基质蛋白相关基因的研究,有可能明确急性粒细胞性白血病细胞特异性核基质蛋白的一级结构及其等电点、氨基酸组化分析、疏水性及同源性;明确特异性核基质蛋白在白血病的病因、发病机理、耐药性等的作用和功能。通过核基质蛋白的氨基酸序列分析,推断出可能的几种碱基序列,设计引物,用逆转录聚合酶链反应法(mRNA→cDNA→PCR)扩增产物、测序、合成 DNA 探针、Southern blot 杂交证实、染色体定位,找出相应的基因,查基因库,若该基因未出现过,则是一种新的致癌基因;再通过分子克隆基因表达的蛋白免疫小鼠,产生抗特异性核基质蛋白抗体,酶联免疫吸附法检测病人体内特异性核基质蛋白抗原,以证实其表达成功。若基因表达成功,该基因的检测可以用于临床白血病的诊断,并为白血病的基因治疗打下基础;分离纯化或分子克隆表达的特异性核基质蛋白所制备出的专一的抗核基质蛋白抗体,可与急性白血病患者体内的特异核基质蛋白抗原特异性结合,为临床诊断和治疗提供新的手段。

2 国外研究现状

国外有关肿瘤细胞核基质方面的研究,多集中于小鼠的肝癌、前列腺癌、人的乳腺癌、子宫颈癌、膀胱癌等方面,其中较为著名的是 Jones Hopkins 医学院肿瘤中心的实验室与麻省理工学院的细胞生物学实验室,他们近年主要的课题是系统地研究核基质的结构与功能;在核基质蛋白的临床应用方面也取得某些进展,例如,利用肝癌等肿瘤细胞核基质制备的单克隆抗体已有 12 种之多,这些单克隆抗体大都表现了很高的肿瘤特异性;Thomas^[8]等人对多种不同肿瘤人的血清进行了肿瘤细胞与正常相应细胞相比所特有的某些核基质蛋白的检测,发现大约有

63.2%—73.7%的肿瘤病人血清中可检测出各自特有的核基质蛋白,因此,检测循环中某些核基质的含量,可望成为诊断和治疗肿瘤的一种新方法。但在白血病细胞的核基质方面仅限于 HL-60、K562 细胞株^[7,15],研究的内容仅是检测个别与核基质有关的蛋白质及与细胞凋亡有关的核基质蛋白,尚未见到找到白血病特异性核蛋白及其理化特性和氨基酸序列的报道,未见有与白血病特异性核基质蛋白相关 DNA 表达的研究报道。

3 国内研究现状及预期成果

国内将核基质引入肿瘤的研究甚少,中国医学科学院基础医学研究所对兔网织红细胞与人红白血病细胞株 K562 的杂交体的核基质-中间纤维体系进行了形态学上的研究^[16],温博贵等人^[17-18]对人的肝癌细胞和结肠腺癌的核基质进行了单克隆抗体方面的研究,证实用核基质制备的单克隆抗体有较高的肿瘤特异性,1996 年刘峰等人的研究说明慢性粒细胞性白血病与正常人细胞核基质蛋白有显著差异^[19]。

我们从 1994 年起开始白血病细胞核基质的研究工作,建立了较成熟的提取细胞核基质蛋白的方法,通过 SDS-PAGE 和双向电泳发现急性粒细胞白血病细胞、慢性粒细胞性白血病(慢性期、急性期)与正常粒细胞相比有明显差异,主要改变是白血病细胞与正常相应细胞相比在某些区带出现新的核基质蛋白或某些区带蛋白量的增加,例如,急性粒细胞白血病细胞核基质蛋白在分子量为 65Kd 的区带出现了正常细胞所没有的蛋白带,慢性粒细胞白血病在发生急性变后与慢性期相比也在某些区域出现了新的核基质蛋白,因此认为,核基质蛋白的改变或新的核基质蛋白的出现,可能与白血病的发生、发展有关;我们还比较了用鬼臼乙甙(VP-16)化疗后急性粒细胞白血病患者的核基质蛋白质的改变,Western-blotting 结果显示,位于核基质上的 II 型拓扑异构酶消失,由此说明核基质是 VP-16 等抗癌药物的靶位点,与某些药物的细胞毒性有关^[20]。我们在用 BSA (Borine Serum Albumine)试剂盒测定和比较了不同恶性程度的白血病细胞核基质蛋白含量,结果说明白血病细胞的核基质蛋白含量均明显高于正常细胞的核基质蛋白含量,而在各种白血病细胞中,恶性程度高的其核基质蛋白含量最高,提示细胞的核基质蛋白的含量与细胞分化程度有关,从核基质蛋白含量的高低可以用于白血病细胞恶性程度的判断^[21]。

在难治性白血病的研究中,我们观察了对化疗敏感或耐药患者白血病细胞核基质蛋白的变化,发现在耐药患者中某些区域的核基质蛋白与耐药性产生有关^[22]。最近我们已用急性单核细胞白血病核基质蛋白制备出单克隆抗体,经验证该抗体能与单核细胞白血病患者血清发生特异性结合,提示用核基质蛋白制备的单克隆抗体有较高的特异性,目前正在用不同类型的白血病细胞核基质蛋白制备各种单克隆抗体,如果这些单克隆抗体之间无交叉反应,可望用于临床白血病的特异性诊断和分型。对白血病细胞核基质蛋白的研究有待于进一步深入。

参 考 文 献

- [1] Johansen K M. Dynamic remodeling of nuclear architecture during the cell cycle. *J. cell Biochem.* 1996, **60**(3):289—296.
- [2] Davie J R. Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Mol. Biol. Rep.* 1997, **24**(3):197—207.
- [3] Davie J R. histone modifications, chromatin structure and the nuclear matrix. *J. cell Biochem.* 1996, **62**(2):149—157.
- [4] Tew K D, Wang A L, Schein P S. Alkylating agent interactions with the nuclear matrix. *Biochem. Pharm7acol.*, 1983, **33**(6):3509—3516.
- [5] Tang Y, Defranco D B. ATP-dependent release of glucocorticoid receptors from the nuclear matrix. *Mol. Biol.*, 1996, **16**(5):1989—2001.
- [6] Ben Z A, Abuiafia R, Bratosin E. Herpes simple virus and protein transport and associated with the cytoskeletal framwork and the nuclear matrix in infection. *BSC-cells Virology*, 1983, **129**(1):501—507.
- [7] Zweyer M, Bareggi R, Grill V et al. Behavior of nuclear matrix proteins during camptothecin-induced appoptosis in HL - 60 human leukemia cells. *Exp. Cell Res.*, 1995, **221**(1):27—40.
- [8] Miller T B, Besusang L A, Winchell L F et al. Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients. *Cancer Res.*, 1992, **52**(1):422—427.
- [9] Hemminki K, Vainio H. Preferentied binding of benzo(2)-pyrene into nuclear matrix fraction. *Cancer Lett.*, 1979, **6**(1):167—173.
- [10] Oksi T, Uksila J, Marjamaki M et al. Antibodies against whole sonicated borrella burgdorfer: spirochetes 41-kilodulton flagellin, and p39 protein in patients with PCR or culture proven late lyme borreliosis. *J. clin Microbid.*, 1995, **33**(9):2260—2264.
- [11] Chol C Y, Part G T, Morho H et al. A positive regulatory sequence of hepatitis B viral small X promoter. *Eur J. Biochem.*, 1996, **239**(3):579—587.
- [12] Zrihan-Lidnt S, Weiss M, Keydar I et al. DNA methylation status of the MUCT gene coding for a breast-cancer-associated protein. *Int J. Cancer*, 1995, **62**(3):245—251.
- [13] Pandey S K, Chiasson J L, Srivastara A K et al. p44 vanadium salts kinases. *Mol Cell Biochem.*, 1995, **153**(1—2):69—78.
- [14] Blachere M E, Srivastara P K. Heat shock protein-based cancer vaccines and related thoughts on immunogenicity of human tumors. *Semin Cancer Biol.*, 1995, **6**(6):349—355.
- [15] Neri L M, Riederer B M, Marugg R A et al. The effect of sodium tetrathionate stabilization on the distribution of three nuclear matrix proteins in human k564 erythroleukemia cells. *Histochem Cell Biol.*, 1995, **104**(1):29—36.
- [16] 马文丽. K562细胞核基质-中间细纤维的电镜观察. *解剖学报*, 1993, **3**:168—171.
- [17] 温博贵, 裘俊. 人肝癌细胞与人胚胎肝细胞核基质的免疫相关性. *癌症*, 1994, **13**(2):131—133.
- [18] 温博贵. 人结肠腺癌核基质的单克隆抗体与大肠癌的免疫定位关系. *肿瘤*, 1987, **7**:161—162.
- [19] 刘峰, 李冠武, 温博贵等. 慢性粒细胞和慢性淋巴细胞白血病核基质蛋白的研究. *汕头大学医学院学报*, 1996, **20**(2):26—28.
- [20] 李娟, 任显辉, 黄兆伟等. 白血病细胞核基质蛋白的初步研究. *中华肿瘤杂志*, 1998, **20**(6):425—427.
- [21] 李娟, 罗绍凯, 洪文德等. 白血病细胞核基质蛋白含量测定及其临床意义. *中国肿瘤临床与康复*, 1998, **5**(3):18—19.
- [22] 李娟, 罗绍凯, 洪文德等. 难治性白血病细胞核基质蛋白变化的研究. *肿瘤研究与临床*, 1998, **10**(2):76—78.

STUDY ON THE NUCLEAR MATRIX IN LEUKERMIA CELL

Li Juan

(The Hematology Department of the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, GuangZhou 510080)

Abstract Nuclear matrix is part of the composition of the nucleus. It is made up of 98% of non-histone protein which is a kind of insoluble fibrous protein. It has a close relation with a series of chemical reaction within the nucleus and is also related to the malignancy change of the cell. Preliminary research of the nucleaer matrix of the leukemia cell has discovered new nuclear matrix and has also detected quantity change of the nuclear matrix. Therefore, further study of the composition of this new protein may lead to the discovery of the new oncogene.

Key words nuclear matrix, leukemia