

# hnRNP A2/B1在人永生化表皮HaCaT细胞凋亡过程中的表达及其调控作用研究

陈兰英<sup>1</sup> 杨海波<sup>1</sup> 李祺福<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>河南城建学院生物工程系, 平顶山467036; <sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

**摘要** 该文以姜黄素诱导人永生化表皮HaCaT细胞凋亡为基础, 对hnRNP A2/B1在核基质中的存在、分布及其与细胞凋亡相关基因产物的共定位及相互作用关系进行了研究。蛋白质印迹结果显示, hnRNP A2/B1存在于HaCaT细胞核基质蛋白组分中, 在经过姜黄素处理后, 表达下调; 激光共聚焦显微镜观察显示, hnRNP A2/B1在HaCaT细胞中分别与Fas、p53和Bax等基因产物具有共定位关系, 姜黄素处理后其共定位区域出现由核膜或核仁向胞质转移的趋势。GST pull-down实验证实, hnRNP A2/B1分别与Fas、p53和Bax有直接相互作用关系。结果表明, hnRNP A2/B1作为一种核基质蛋白, 通过与细胞凋亡相关基因产物的相互作用参与HaCaT细胞的凋亡诱导调控过程, 这对深入认识核基质蛋白在细胞凋亡过程中的调控机制具有重要意义。

**关键词** hnRNP A2/B1; 人永生化表皮HaCaT细胞; 细胞凋亡

hnRNP A2/B1蛋白是脊椎动物前体mRNA结合蛋白之一, 作为hnRNP A2/B1家族的核心成员, hnRNP A2/B1参与mRNA前体的剪切和细胞核与细胞质间物质的运输, 近年来的研究发现, hnRNP A2/B1在细胞内的表达水平及其分布与细胞增殖、分化及肿瘤的发生密切相关<sup>[1-3]</sup>。hnRNP A2/B1与肿瘤之间的联系最早是在肺癌的研究中发现的, 在肺癌组织中的表达水平明显高于正常组织, 并且发现hnRNP A2/B1参与了细胞生长增殖调控过程<sup>[4]</sup>。随后也分别在肝癌、胰腺癌、乳腺癌和胃癌等组织中发现hnRNP A2/B1的表达异常<sup>[2,5]</sup>。一些研究报道表明, hnRNP A2/B1在细胞中的表达水平不仅与细胞增殖有关, 同时与细胞凋亡也有关系<sup>[6]</sup>, 但有关hnRNP A2/B1在肿瘤细胞凋亡中的表达变化及其作用尚不明确。我们在应用姜黄素诱导人永生化表皮HaCaT细胞凋亡时核基质蛋白变化的分析中, 发现了hnRNP A2/B1的存在。本文在这一基础上, 进一步研究了人永生化表皮HaCaT在细胞凋亡过程中hnRNP A2/B1的表达变化及其与细胞凋亡基因产物的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人永生化表皮HaCaT细胞购自中国科学院细胞库, 小鼠抗人hnRNP A2/B1抗体购自NeoMarkers公司, 山羊抗小鼠IgG-FITC、山羊抗兔IgG-TRITC、

兔抗人Bax抗体、兔抗人Fas抗体、兔抗人p53抗体购自Santa Cruz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 细胞培养和凋亡诱导处理

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 μg/mL卡那霉素, pH7.2), 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。姜黄素用DMSO溶解, 浓度为10 mg/mL, -20 °C避光保存。取对数生长期的HaCaT细胞进行消化传代, 接种24 h后更换含7.5 mg/L姜黄素的培养液进行诱导处理, 连续培养72 h后收集细胞备用。对照组细胞相应扩增, 收集备用。

### 1.3 Western blot 检测

收集对照组和处理组细胞, 提取核基质蛋白。蛋白样品以15% SDS-PAGE分离后通过半干转印法转移至PVDF膜上。5% BSA封闭1 h; 然后加入相应的一抗作用液(5% BSA配制)室温条件下震荡孵育1.5 h, TBST洗膜3次, 每次10 min; 加入HRP标记的相应二抗作用液(5% BSA配制), 室温条件下震荡孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min; ECL显色观察, 以β-actin做内参照。

收稿日期: 2012-02-11 接受日期: 2012-03-13

国家自然科学基金(No.30871241)资助项目

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

## 1.4 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察

人永生表皮HaCaT细胞和经7.5 mg/L姜黄素诱导处理至第5 d的细胞接种到盖玻片条上,继续培养2 d后,取出长有细胞的盖玻片条,PBS漂洗3次,每次5 min,在4%的多聚甲醛中固定15 min,PBS漂洗3次,每次5 min;用0.5% Triton X-100的透化试剂(PBS配)室温透膜20 min,PBS漂洗3次,每次5 min。3% BSA室温封闭1 h,以3%的BSA配制含0.05% Tween-20的一抗作用液。各加30  $\mu$ L含相应特异抗体的稀释液至玻片上,4  $^{\circ}$ C,湿盒中孵育过夜;PBST漂洗3次,每次10 min,洗涤在摇床上进行。然后加入分别以3%的BSA配制相应组合的二抗作用液,室温孵育1 h,孵育过程注意避光。PBST漂洗3次,每次10 min,洗涤过程中注意保持摇动、避光。在PBST中漂洗2次,然后以蒸馏水漂洗2次。室温干燥。抗荧光淬灭剂封片,指甲油包边,于TCS-SPZMP型激光扫描共聚焦显微镜下观察染色结果。

## 1.5 GST pull-down

分别接种空质粒载体菌种及构建好的原核表达菌种,并诱导可溶性表达,取适量的Glutathione sepharose 4B,用上述方法分别将GST蛋白及GST融合蛋白纯化;将收集的大量人永生表皮HaCaT细胞用RIPA细胞裂解液将其裂解,12 000 $\times$ g,4  $^{\circ}$ C离心5 min,取细胞上清分别与结合了beads的GST和GST-hnRNP A2/B1于4  $^{\circ}$ C孵育1 h;分别将与细胞上清孵育过的GST-beads以及GST-hnRNP A2/B1 P-beads,用GST Wash Buffer洗3次,同时原先保留的细胞裂解液,加5 $\times$ SDS上样缓冲液,进行SDS-PAGE。Western blot验证与目的蛋白相互作用的蛋白。

## 2 结果

### 2.1 hnRNP A2/B1在人永生表皮HaCaT细胞中的表达变化

HaCaT细胞经过姜黄素处理后,hnRNP A2/B1蛋白在HaCaT细胞中的表达量与对照组相比显著降低(图1)。

### 2.2 hnRNP A2/B1与癌基因Bax、Fas以及抑癌基因p53表达产物在细胞内的共定位观察结果

2.2.1 hnRNP A2/B1和Bax在人永生表皮HaCaT细胞内的共定位关系 观察结果显示,对照组中细胞核部分经DAPI染色后呈现蓝色,代表hnRNP A2/B1的绿色荧光在整个细胞区域内均有分布,细

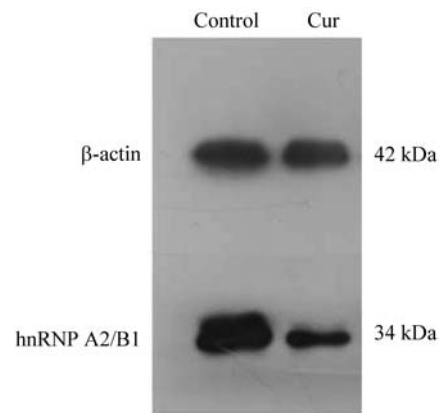


图1 Western blot检测HaCaT细胞中hnRNP A2/B1蛋白的表达

Fig.1 Expression of hnRNP A2/B1 protein in HaCaT cell detected by Western blot

胞质中的荧光相对较强,核周荧光较密集;代表Bax的红色荧光主要分布于胞质中,核质中的荧光分布较均匀,核仁区域荧光较强,叠加荧光显示hnRNP A2/B1和Bax在胞质和核仁区域有共定位现象。而在经姜黄素诱导处理后的HaCaT细胞中,细胞核内的红色荧光强度减弱,核膜位置上荧光较强;绿色荧光强度则整体减弱且均匀分布于细胞质中。叠加荧光显示hnRNP A2/B1和Bax在胞质中存在共定位关系,特别是在细胞核外围的胞质区域,表明二者共定位区域有由核仁向细胞质转移的趋势(图2)。

#### 2.2.2 hnRNP A2/B1和Fas在HaCaT细胞内的共定位关系

在人HaCaT细胞中,代表Fas的红色荧光在整个细胞中分布相对均匀,核仁区域较稀疏,而胞质中分布较均匀。叠加荧光显示hnRNP A2/B1和Fas在核膜及靠近核周的胞质区域具有共定位关系,细胞质区域内也可见少量散点状分布的橙色荧光。而在经姜黄素诱导处理后的HaCaT细胞中,细胞质区域内的绿色荧光相对较强,核膜处的荧光密集成簇;Fas红色荧光分布较为分散,在整个细胞内均有分布,主要分布在核周区域。叠加荧光显示hnRNP和Fas在细胞质中均存在共定位关系,核周区域也具有一定的共定位关系。提示诱导处理后两者的共定位区域有由核膜向胞质转移的趋势(图3)。

#### 2.2.3 hnRNP A2/B1和p53在人HaCaT细胞内的共定位关系

在人HaCaT细胞中,代表hnRNP A2/B1的绿色荧光在整个细胞区域内均有分布,核仁处荧光密集成簇,代表p53的红色荧光整体强度也较强,

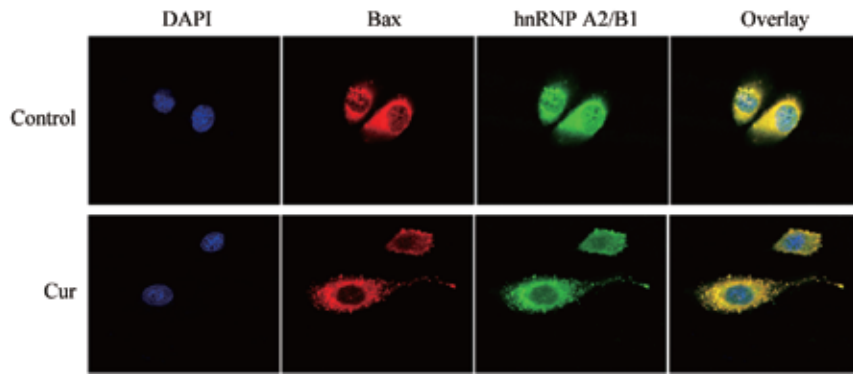


图2 hnRNP A2/B1和Bax在HaCaT细胞凋亡诱导前后的共定位关系的变化

Fig.2 The co-localization between hnRNP A2/B1 and Bax in the HaCaT cell before and after treated with curcumin

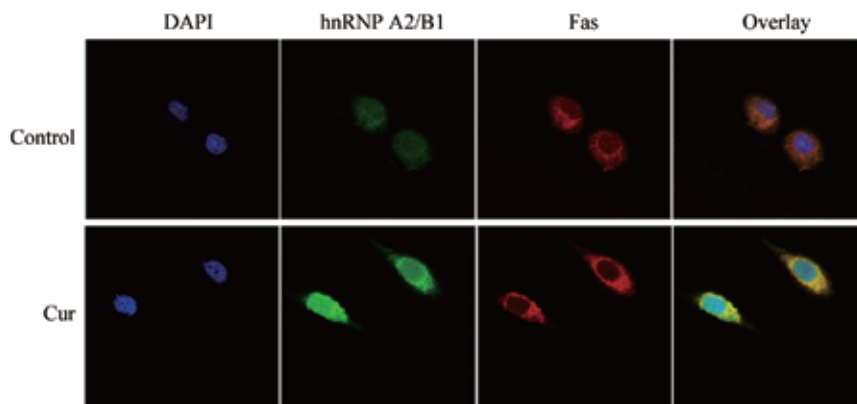


图3 hnRNP A2/B1和Fas在HaCaT细胞凋亡诱导前后的共定位关系的变化

Fig.3 The co-localization between hnRNP A2/B1 and Fas in the HaCaT cell before and after treated with curcumin

细胞质分布比较集中,核内除核仁区域的荧光较密集,核仁中心有空泡化现象。叠加荧光显示hnRNP A2/B1和p53在细胞质区域具有明显的共定位关系。而在经姜黄素诱导处理后的HaCaT细胞中,绿色荧光主要分布于核内及核膜四周,而在细胞核内红色荧光分布比较集中。叠加荧光显示hnRNP A2/B1和p53在核周及贴近核膜的细胞质区域内有明显的共定位关系,且分布较为均匀,表明二者的共定位区域有由细胞核向核膜及胞质转移的趋势(图4)。

### 2.3 hnRNP A2/B1和HaCaT细胞相关癌基因、抑癌基因蛋白相互作用

图5显示,重组蛋白hnRNP A2/B1蛋白与HaCaT细胞上清孵育后,出现了与阳性对照组p53蛋白位置相同的条带,说明hnRNP A2/B1重组蛋白在与HaCaT细胞上清孵育过程中, hnRNP A2/B1与p53在人永生表皮细胞内具有直接的相互作用关系,这与二者细胞内的共定位关系相互印证。同时,我们发现纯

化的hnRNP A2/B1蛋白与HaCaT细胞上清孵育后出现了与HaCaT细胞本身Bax蛋白位置相同的条带,说明hnRNP A2/B1重组蛋白在与HaCaT细胞上清孵育过程中,由于Bax与hnRNP A2/B1存在相互作用而被hnRNP A2/B1蛋白结合下来。此外我们也发现,纯化的带GST标签的hnRNP A2/B1蛋白与HaCaT细胞上清孵育后,显出了Fas蛋白条带,并与阳性对照中Fas蛋白条带位置相同(图5),说明重组蛋白在与HaCaT细胞上清孵育过程中, Fas蛋白与hnRNP A2/B1蛋白相结合。因此,推测二者在HaCaT细胞内具有直接的相互作用关系并且这与二者细胞内的共定位关系相互印证。

## 3 讨论

hnRNP A2/B1基因是一种有效的肿瘤抑制基因,广泛分布于各种真核细胞中,它所编码的产物hnRNP A2/B1分子量介于30 kDa~32 kDa之间,是一

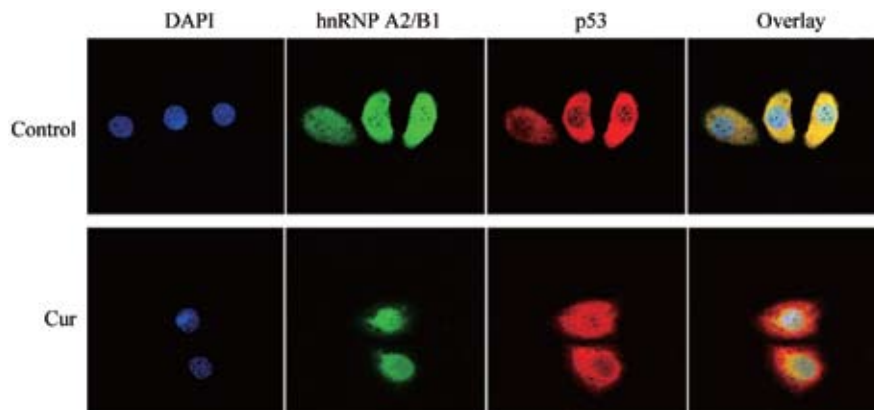


图4 hnRNP A2/B1和p53在HaCaT细胞凋亡诱导前后的共定位关系的变化

Fig.4 The co-localization between hnRNP A2/B1 and p53 in the HaCaT cell before and after treated with curcumin

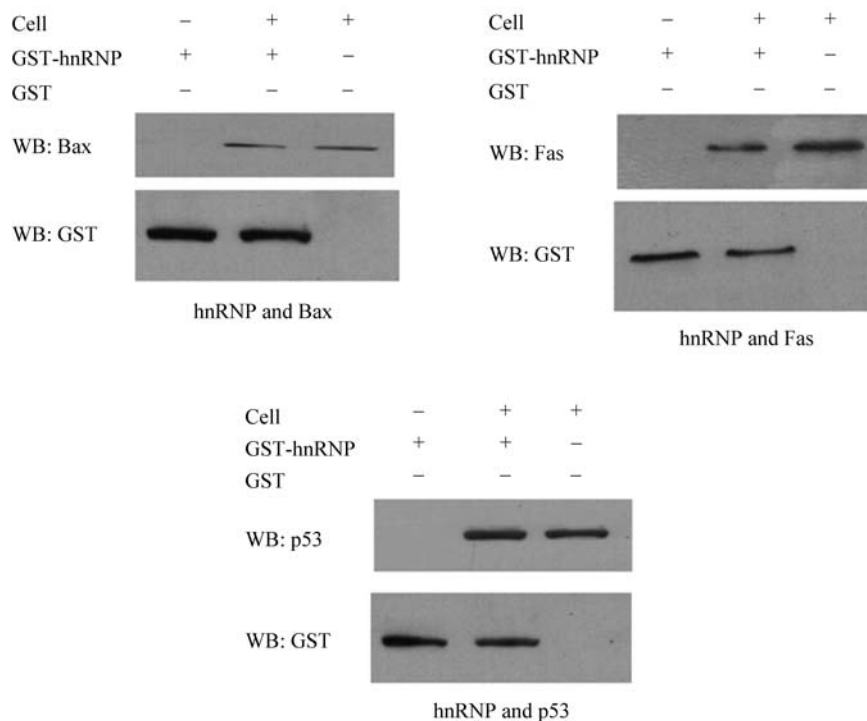


图5 hnRNP A2/B1与Bax、Fas和p53的相互作用

Fig.5 The interaction between hnRNP A2/B1 and Bax, Fas or p53

种进化上高度保守的蛋白<sup>[7]</sup>。hnRNP A2/B1既存在于线粒体内膜上发挥分子伴侣作用,也存在于细胞核内,具有负性转录调控作用,对细胞代谢、生长、分化、衰老以及凋亡等诸多方面发挥着重要的调控作用<sup>[8-9]</sup>。近年研究发现, hnRNP A2/B1是一个肿瘤相关抗原,在肺癌患者癌前病变及肿瘤组织中高表达, hnRNP A2/B1在同一病人配对的活检肺癌组织/癌旁组织检测蛋白和分子水平表达是一致的,也有研究观察到若上调其表达,往往伴随着细胞增殖活

性的增强及肿瘤的形成<sup>[4]</sup>。本文在HaCaT细胞的核基质蛋白中发现了hnRNP A2/B1的存在,以及在细胞中的定位,其主要分布于细胞质和细胞核中,用姜黄素处理后, hnRNP A2/B1在HaCaT细胞中的表达水平也出现了降低。

p53是重要的肿瘤抑制基因,前人研究表明, p53对细胞的凋亡有极其重要的调控作用<sup>[10]</sup>,它的失活使得细胞DNA损伤不能得到及时修复,恶性程度不断积累而导致癌变。本文激光共聚焦观察结果显示,

hnRNP A2/B1与p53在人永生表皮HaCaT细胞内的共定位区域分布不均匀, 主要位于核质区域, 而在诱导凋亡处理后的细胞中, 两者的共定位区域发生了位移, 提示人永生表皮HaCaT细胞的诱导凋亡调控可能与两种蛋白的相互作用有关。而后的GST pull-down结果进一步证实了二者之间存在的相互作用关系。

另外, Bcl-2/Bax是凋亡过程的上游分子, 它们对细胞色素C的释放和Caspase的激活等下游事件有重要的调节作用, 在细胞凋亡调控中也扮演着很重要的角色, 是目前细胞凋亡研究的热点之一<sup>[11]</sup>。Fas为典型的死亡受体, 又名CD95、APO-1, 属于肿瘤坏死因子受体家族<sup>[11]</sup>。Fas的天然配体为FasL, 属肿瘤坏死因子配体家族成员, 激活的受体与具有死亡功能区的Fas相关蛋白(Fas-associating protein with a novel death domain, FADD)结合, 再与Caspase-8相互作用使后者激活, 形成死亡诱导信号复合物, 促进Fas蛋白所在细胞的凋亡发生<sup>[12]</sup>。本文研究发现, Bax和Fas在人永生表皮HaCaT细胞中分别与hnRNP存在共定位关系, 而且在经过姜黄素诱导凋亡后, 它们在细胞中的位置都发生了位移和变化, GST pull-down实验同时验证了Bax和hnRNP A2/B1存在相互作用关系。这一结果表明, hnRNP A2/B1在人HaCaT细胞诱导分化过程中发生了由细胞核向细胞质的亚细胞定位的改变, 这种改变对于hnRNP A2/B1在不同亚细胞区域发挥特定的细胞凋亡调控功能产生了重要影响。由此表明, 人永生表皮HaCaT细胞增殖活性受阻, 癌基因、抑癌基因表达异常可能与hnRNP和p53、Bax、Fas之间的相互作用有关。

本文研究表明, hnRNP A2/B1存在于细胞核基质中, 作为一种细胞增殖与凋亡的重要调控因子, hnRNP A2/B1在HaCaT的细胞凋亡过程中的表达水平及hnRNP A2/B1与其相互作用的凋亡基因产物的共定位变化, 显示其在细胞凋亡过程中发挥了重要作用。这为进一步分析hnRNP A2/B1在人永生表皮HaCaT细胞的功能及其与相关癌基因、抑癌基因

相互关系的问题提供了重要的实验依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Tauler J, Zudaire E, Liu H, Shih J, Mulshine JL. hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2010; 70(18): 7137-47.
- 2 Satoh H, Kamma H, Ishikawa H, Horiguchi H, Fujiwara M, Yamashita YT, *et al.* Expression of hnRNP A2/B1 proteins in human cancer cell lines. *Int J Oncol* 2000; 16(4): 763-7.
- 3 Golan-Gerstl R, Cohen M, Shilo A, Suh SS, Bakacs A, Coppola L, *et al.* Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4464-72.
- 4 Zhou J, Nong L, Wloch M, Cantor A, Mulshine JL, Tockman MS. Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34(3): 341-50.
- 5 Lee CH, Lum JH, Cheung BP, Wong MS, Butt YK, Tam MF, *et al.* Identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 as the antigen for the gastrointestinal cancer specific monoclonal antibody MG7. *Proteomics* 2005; 5(4): 1160-6.
- 6 Fraschini A, Bottone MG, Scovassi AI, Denegri M, Risueno MC, Testillano PS, *et al.* Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histol Histopathol* 2005; 20(1): 107-17.
- 7 Zhou J, Mulshine JL, Unsworth EJ, Scott FM, Avis IM, Vos MD, *et al.* Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody 703D4. *J Biol Chem* 1996; 271(18): 10760-6.
- 8 McGlincy NJ, Tan LY, Paul N, Zavolan M, Lilley KS, Smith CW. Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay. *BMC Genomics* 2010; 11: 565.
- 9 Han SP, Friend LR, Carson JH, Korza G, Barbarese E, Maggipinto M, *et al.* Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceforms. *Traffic* 2010; 11(7): 886-98.
- 10 Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3): 851-8.
- 11 Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37(3): 299-310.
- 12 Ikner A, Ashkenazi A. TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and Caspase-8. *J Biol Chem* 2011; 286(24): 21546-54.

## The Expression of hnRNP A2/B1 and Regulation during the Apoptosis in Human Immortalized Epidermal HaCaT Cells Induced by Curcumin

Chen Lanying<sup>1</sup>, Yang Haibo<sup>1</sup>, Li Qifu<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467044, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** This paper explore the existence and distribution of hnRNP A2/B1 in nuclear matrix, and the co-localization relationship between hnRNP A2/B1 and the products of some apoptosis interrelated genes in the human immortalized epidermal HaCaT cells before and after curcumin treatment. It was confirmed by Western blot that hnRNP A2/B1 existed in the component of nuclear matrix protein of HaCaT cells and its expression was decreased by curcumin treatment. The co-localization between hnRNP A2/B1 and the products of apoptosis interrelated genes including Fas, p53 and Bax were observed by using laser scanning confocal microscopy. The recombinant protein was expressed and purified after building a prokaryotic expression vector pGEX-4T-2-hnRNP A2/B1, and GST pull-down assay confirmed that hnRNP A2/B1 directly interacted with Fas, p53 and Bax, respectively. The results of this study demonstrated that hnRNP A2/B1 was a nuclear matrix protein and located in the nuclear matrix, and the distribution of hnRNP A2/B1 and its relationship with associated gene products play important role during the apoptosis of HaCaT cells, which had great significance in in-depth understanding of regulatory mechanisms of nuclear matrix proteins in apoptosis.

**Key words** hnRNPA2/B1; human immortalized epidermal HaCaT cells; apoptosis

---

Received: February 11, 2012 Accepted: March 13, 2012

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

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