

# HMBA 对人肝癌 SMMC-7721 细胞核基质-中间纤维系统构型的影响

牛竞文<sup>1</sup>, 田玉玲<sup>2</sup>, 唐 剑<sup>1</sup>, 李祺福<sup>1\*</sup>

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

2. 深圳福田医院消化内科, 广东 深圳 518033)

**摘要:**应用选择性抽提, 整装光镜和电镜样品制备技术, 观察人肝癌 SMMC-7721 细胞经 HMBA 处理后核基质-中间纤维系统的变化. 经 HMBA 诱导处理后, 人肝癌细胞核基质纤维和中间纤维数量增多, 结构层次丰富, 分布均匀, 并通过核纤层使 3 种纤维之间形成紧密联系. 结果表明人肝癌细胞在诱导分化过程中核基质-中间纤维系统构型发生明显变化, 对肿瘤细胞恶性表型逆转变化具有重要影响.

**关键词:**核基质; 肝癌细胞; 诱导分化; HMBA

中图分类号: Q247. Q28

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0011-05

核基质(Nuclear matrix, NM)是存在于真核细胞核内的以纤维蛋白为主的网络骨架, 该纤维网络与核纤层(Lamina)、中间纤维(Intermediate Filaments, IF)形成了核基质-核纤层-中间纤维统一体系(NM-IF). 核基质在维持胞核形态、染色质的空间定位与组装方面起着重要作用, 并与 DNA 复制与转录、RNA 修饰等一系列重要的细胞生命活动密切相关<sup>[1~3]</sup>. 近年来研究表明核基质蛋白还可参与细胞信号转导系统对基因表达进行调控, 高度动态的核基质及其蛋白组成与细胞的增殖分化密切相关<sup>[4, 5]</sup>. 肿瘤细胞核基质与同组织来源的正常细胞在纤维构型及蛋白组成上均具有显著差异<sup>[6~9]</sup>, 研究这些差异已成为人们深入探索细胞癌变发生过程与逆转机理的重要方向. 前人研究提示某些药物对肿瘤细胞的作用方式可能通过核基质起作用. 我们以往的研究亦证明, 通过用肿瘤诱导分化剂环六亚甲基双乙酰胺((hexamethylene bisacetamide, HMBA)和维甲酸(Retinoic acid, RA)处理人胃腺癌细胞, 其核基质构型能产生与相应正常细胞相似的恢复性变化<sup>[10, 11]</sup>. 为进一步研究细胞 NM-IF 系统与细胞癌变及恶性表型逆转之间的关系, 本文应用 HMBA 处理人肝癌 SMMC-7721 细胞并通过整装电镜样品制备技术, 观

察研究肝癌细胞在诱导分化过程中 NM-IF 系统的构型变化, 为肿瘤的发生及逆转提供实验依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞购自中国生命科学学院上海细胞库, 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购自 Sigma 公司. DNase I, RNase A 购自华美公司.

### 1.2 细胞培养与诱导分化处理

SMMC-7721 细胞培养于含 15% 新生牛血清, 100 IU/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素及 50 mg/L 卡那霉素的 RPMI 1640 培养液中. 传代后 24 h 更换含 5 mmol/L HMBA 的培养液, 对照组细胞常规培养, 处理 8~9 d 观察细胞出现明显的形态学改变时, 0.02% 的 EDTA 消化细胞收集备用.

将 SMMC-7721 细胞和处理组细胞分别接种于有盖玻片条和 Ni 网(预先覆盖 Formvar 膜、喷镀碳膜并用多聚赖氨酸包被)的培养瓶中, 分别加正常培养液和含 HMBA 培养液, 37℃ 培养 48~72 h 后备用.

### 1.3 整装样品制备及光镜、电镜观察

(1) 细胞的选择性抽提

参照 Capco 的方法<sup>[12]</sup>. 取盖玻片培养的细胞经温

收稿日期: 2006-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(30470877)和福建省自然科学基金(C0310003)资助

作者简介: 牛竞文(1983-), 女, 硕士研究生.

\* 通讯作者: chifule@xmu.edu.cn

D-Hanks液(37℃)漂洗2次后,在4℃下先用高离子强度提取液(10 mmol/L PIPES pH 6.8, 250 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L PMSE, 0.5% TritonX-100)抽提3 min;经无酶消化液(10 mmol/L PIPES pH 6.8, 50 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L PMSE, 0.5% TritonX-100)短暂漂洗后,用含酶消化液(DNase I RNase A各400 μg/mL)于23℃消化20 min,最后于23℃在高离子强度提取液中再次抽提5 min得到NM-IF结构样品。

### (2)光镜样品制备

细胞选择性抽提后样品经PBS漂洗3次,考马斯亮蓝R250染色20 min,重蒸水漂洗干净,自然晾干,二甲苯透明后中性树脂封片,直接于Olympus BH-2型光学显微镜下观察拍照。

### (3)整装透射电镜样品制备

生长于Ni网的细胞经选择性抽提所得NM-IF样品经2%戊二醛(无酶消化液配)于4℃预固定30 min,0.1 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗后再用1% OsO<sub>4</sub> 4℃固定5 min,乙醇系列脱水、醋酸异戊酯置换、CO<sub>2</sub>临界点干燥后,所得样品直接在JEM 2100 HC透射电镜下观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 光镜观察结果

在光学显微镜下观察分级抽提及用考马斯亮蓝染色后样品,显示细胞残余的核内纤维网架系统由中间纤维与核基质纤维在核纤层处相连接,人肝癌细胞中间纤维的分布较为不均匀,主要分布于靠近核纤层周围的区域,远核区分布稀少;其核纤层结构致密、呈厚层不均一状;核基质纤维结构厚薄不一,亦呈现结构层次不均的现象(图版 I)。经HMBA处理后,细胞NM-IF系统发生形态学变化:处理后核基质纤维与中间纤维均呈现出均匀分布,核纤层结构为薄层,中间纤维细丝由核纤层部位起始弥散状伸向胞质区域(图2)。

### 2.2 电镜观察结果

透射电镜观察显示,SMMC-7721细胞经选择性抽提后存留细胞骨架纤维网络系统,并由核基质及核纤层维持原有的细胞核区域,形成相互连接的核基质-核纤层-中间纤维体系。经HMBA诱导分化处理后,肝癌细胞的NM-IF构型出现如下变化:

#### (1)核纤层

在肝癌细胞整装抽提后的样品中,核纤层呈现出明显的厚层致密结构,且在不同区域薄厚不一。向胞质侧多可见细长的中间纤维丝或束终止其上;向核侧与稀疏的核基质纤维相联系,且与其交联的核基质纤维和中间纤维均较为稀疏且大多是通过较细的纤维丝来维持不甚紧密的联系(图版 I3)。经HMBA处理后的细胞核纤层呈一薄层致密纤维结构,其内侧的核基质纤维通过错落有致的纤维丝或束均匀交织与其形成密切联系,外侧中间纤维通过粗细不等的纤维直接终止于核纤层。与其相联的这两种纤维数量增多、不同直径的纤维过渡均匀,三者核纤层连接处结构层次丰富,关系更为密切(图版 I4)。

#### (2)核基质

SMMC-7721细胞核基质纤维数量少且稀薄,分布极为不均,呈现出稀疏杂乱的细线状。核基质纤维中粗纤维不发达、纤维单丝多聚集成束状结构,并相互交织成无序网络(图版 I5)。经HMBA处理后,核中粗纤维数量增多、与单纤维之间的层次丰富,粗细不等的纤维分布均匀,相互交织形成较为规则、精细发达的网络结构(图版 I4.6)。

#### (3)中间纤维

人肝癌SMMC-7721细胞的中间纤维数量比较少,主要出现于核周围的胞质区域,在胞质边缘较少,分布非常不均。其单纤维成份无规则散在于胞质中,或成束状(图版 I7)。经HMBA处理后的胞质中,中间纤维丰富,并以胞核为中心向四周较为均匀分布至胞质边缘,粗纤维与细长的单纤维排列均匀,在胞质区域交织成规则的网状结构(图版 I8)。

## 3 讨论

自1974年Beazney和Coffey等首次将核基质作为细胞核内独立的结构体系进行研究以来,真核细胞内核基质的研究已受到人们的重视,发现核基质与DNA复制、RNA转录加工、染色体装配及病毒复制等一系列的生命活动相关。核基质-中间纤维体系是近年来新发现的一种细胞内重要结构,越来越多的研究者们注意到该体系与细胞分化、基因表达调控密切相关。前人报道,肿瘤细胞核基质具有结构不规则、畸形等明显区别于正常细胞的构型特征。本文观察结果表明,SMMC-7721细胞的核基质纤维较为稀薄,分布不均匀,多以较细的单纤维散在于核内,相互交织成杂乱无

序的网络.核纤层为厚致密结构层,与核基质纤维和中间纤维联系不密切.中间纤维数量较少、分布不均或聚集成束.经 HMBA 诱导分化后的细胞 NM-IF 体系中,核基质纤维数量增多,层次丰富,在核区域内均匀分布,相互交织成较规则的网络结构.呈薄层致密纤维结构的核纤层,在内外侧分别与粗细不等、层次多样的核基质纤维及中间纤维密切联系. NM-IF 所呈现的精细发达的规则网络结构,较均匀地分布于整个细胞中.显示 HMBA 能促使 SMMC-7721 细胞 NM-IF 系统的构型发生逆转性改变.这种具有组织性和整体性的构型特征与人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的差异,表现出与正常细胞相似的特点,与前人研究中逆转后的肿瘤细胞相一致<sup>[10]</sup>.诱导分化中细胞核基质的这种向正常构型的恢复现象,是肝癌细胞恶性表型逆转的一种重要形态特征和功能表现.

细胞核基质不仅作为核内支架结构维持细胞核的形态,同时参与 DNA 复制及染色体构建而直接影响细胞分裂和增殖活动.核基质通过对基因转录和 RNA 的加工修饰及定向运输等作用对细胞基因表达起调节作用.在对肿瘤细胞核基质功能的研究<sup>[13,14]</sup>中,已发现肿瘤相关基因与核基质之间有密切联系,有报道肿瘤细胞的癌基因主要存在于与核基质结合的 DNA 片段,癌基因的转录需结合在核基质上才能进行.一些重要的抑癌基因 *p53* *pR6* 和癌基因 *c-myc* 的蛋白产物及一些 DNA 肿瘤病毒蛋白 HPV E7 和 EBNA-LP-2-3A、-3C 都是核基质结合蛋白(即 MARs 结合蛋白质).另外,参与细胞周期调节的一些蛋白 P21 WAF1/CIP1 也是核基质结合蛋白.近来发现一些 MARs 结合蛋白质,如 SATB1、核仁素、DNA 拓扑异构酶 II、高移动组成蛋白质 IY 和核纤层蛋白质 B1 等核基质结合蛋白质定位于核内,成为核基质网架的基本成分,既发挥着共同的结构支撑作用,同时也发挥着各自的功能性作用<sup>[15]</sup>. MARs 可能提供了一个能使特异的核基质结合蛋白质复合体作用于 DNA 的网架结构.细胞发生癌变时,这些与核基质密切相关的蛋白在细胞重要生命事件中表现尤为活跃,同时伴有一些与肿瘤发生相关的核基质蛋白出现.因此,我们用 HMBA 诱导后肝癌细胞核基质构型上向正常细胞的恢复,推测对于肝癌细胞相关癌基因和抑癌基因表达的调控起了重要作用.深入探索细胞核基质在癌细胞诱导分化过程中的功能变化,对于进一步研究细胞癌变发生与逆转机理,具有重要意义.

## 参考文献:

- [1] Miller T B, Besusang L A, Windell L F, et al. Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients [ J ]. *Cancer Res*, 1992, 52(1): 422-427.
- [2] Berezney R, Mortillaro M J, Mah, et al. The nuclear matrix: a structural milieu for nuclear genomic function [ J ]. *Int Rev Cytol*, 1995, 162A: 1-65.
- [3] Pederson T. Half a century of "the nuclear matrix" [ J ]. *Mol. Biol. Cell*, 2000, 11(3): 799-805.
- [4] Wang H M, Yu S H, Davis A T, et al. Cell cycle dependent regulation of protein kinase CK2 signaling to the nuclear matrix [ J ]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003, 88: 812-822.
- [5] Marchisio M, Santavenere E, Paludi M, et al. Erythroid cell differentiation is characterized by nuclear matrix localization and phosphorylation of protein kinases C (PKC)  $\alpha$  and  $\delta$  [ J ]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 205: 32-36.
- [6] Koney B, Nangia A, Nguyen T, et al. Identification of nuclear matrix protein alterations associated with renal cell carcinoma [ J ]. *Urol*, 1998, 159: 1359-1363.
- [7] Martelli A M, Bortol R, Fackelmayer F O, et al. Biochemical and morphological characterization of the nuclear matrix from apoptotic HL 60 cells [ J ]. *Cell Biochem.*, 1999, 72(1): 35-46.
- [8] Brunagel G, Vietmeier B, Bauer A, et al. Identification of nuclear matrix protein alterations associated with human colon cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62: 2437-2442.
- [9] Zhang Q X, Ding Y, Li Z, et al. Comparison of nuclear matrix proteins between gastric cancer and normal gastric tissue [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(12): 1819-1821.
- [10] Li Q F. Effect of retinoic acid on the changes of nuclear matrix intermediate filament system in gastric carcinoma cells [ J ]. *World J Gastroenterol*, 1999, 5(5): 417-420.
- [11] Zhao C H, Li Q F. Altered profiles of nuclear matrix proteins during the differentiation of human gastric mucous adenocarcinoma MG c80-3 cells [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30): 4628-4633.
- [12] Capco D G, Wan K M, Permian S. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition [ J ]. *Cell*, 1982, 29: 847-858.
- [13] Buni R, Giuseppetti R, Rapicetta B M, et al. Scaffold attachment region located in a locus targeted by hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinomas [ J ]. *Cancer Detect Prev*, 2003, 27(3): 175-181.
- [14] Reydet C G, Gégouire D, Vassetzky Y, et al. DNA repli

cation initiates at domains overlapping with nuclear matrix attachment regions in the xenopus and mouse *cmyc* promoter [ J ]. *Gene* 2004 12( 332): 129 - 138.

[ 15 ] Liu J , Bamett A , Neufeld E et al . Homeoproteins CDP and SATB1 interact : potential for tissue - specific expression [ J ]. *Mol Cell Biol* , 2001 17 : 5275 - 5287.

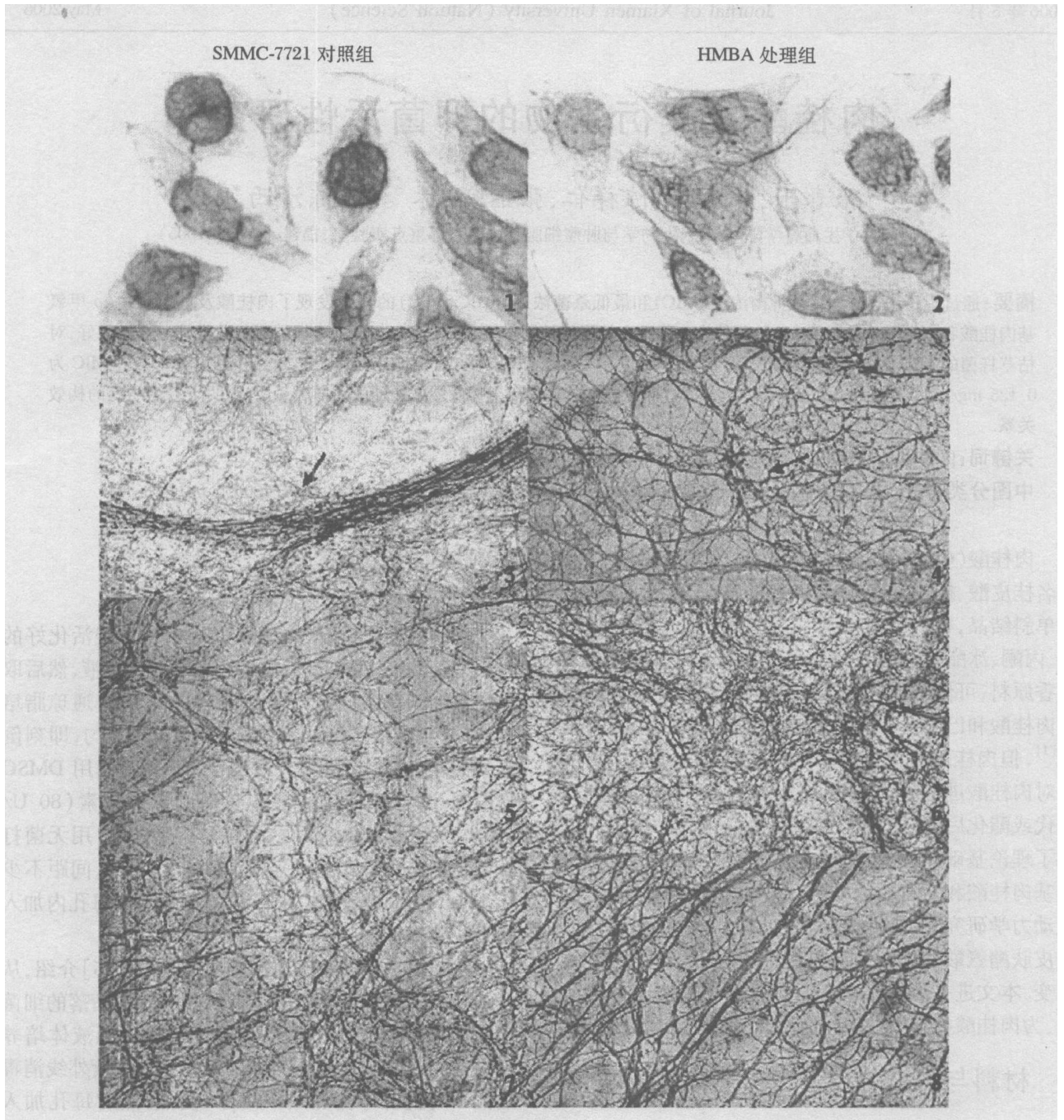
## Effects on Nuclear Matrix Intermediate Filaments Configuration of Human Hepatocarcinoma SMMC-7721 Cell with HMBA Treatment

NIU Jingwen<sup>1</sup>, TIAN Yuling<sup>2</sup>, TANG Jian<sup>1</sup>, LI Qi fu<sup>1\*</sup>

( 1. Laboratory of Cell Biology Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology & Tumor Cell Engineering School of Life Sciences Xiamen University Xiamen 361005 China 2. Shenzhen Municipal Futian Hospital Digestion Medicine Shenzhen 518033 China )

**Abstract** To investigate the configurational variation of cell nuclear matrix during induced cell differentiation of human hepatocarcinoma cell in vitro by HMBA treatment here we used selective extraction ways to obtain Nuclear Matrix lamina Intermediate Filaments (NM-IF) samples of cultured SMMC-7721 cell treated with HMBA or not and the whole mount specimens were then observed by optic and electron microscope respectively. The NM-IF system was changed obviously between samples treated with HMBA and non induced cells. NM filaments were changed from desultory clutters into regular network. IF placed in cytoplasmic region showed more homogeneous distribution and the shape of lamina with other two kinds of filaments revealed more compact linkage and subtle construction. It is implied that the ultrastructure of the carcinoma cell NM-IF system had undergone some restorational transformation similar to normal cells after treatment of HMBA, and these phenotypic reversion represents some pivotal morphological and functional changes of the malignant cancer cells. The particular mechanism is to be identified.

**Key words** nuclear matrix; hepatocarcinoma cell; HMBA; induced differentiation



图版 I 人肝癌 SMMC 7721 细胞经 HMBA 处理后细胞整装抽提及光镜电镜观察结果

Plate I Observation of optic and electron microscope of human hepatocarcinoma cell line SMMC 7721 after treated with HMBA

1~2 SMMC 7721 细胞分级抽提后光镜照片, NM-IF 分布不均, 排列无序, 结构层次不清, L 薄厚不一, 经 HMBA 处理后细胞 NM-IF 纤维分布均匀, 结构分明, L 呈一薄层。(400×)

3~4 电镜显示细胞 NM-IF 系统, 肝癌细胞 L 为厚层致密结构且薄厚不一, 与 NM 和 IF 联系不密切, 处理后 L 为薄层, 与核基质及中间纤维联系密切有规则, 箭头由核基质区指向核纤层。(10 000×)

5~6 显示肝癌细胞 NM 主要由稀少的纤维细丝无规则排列交织, 处理后纤维密集发达并呈现规律性交织且层次丰富。(12 000×)

7~8 细胞 IF 系统由处理前的杂乱无序状转变为处理后的结构层次丰富清晰且纤维联系紧密的规则枝状网络结构。(12 000×)