

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00020

· 专题报道 ·

异质性胞核核糖核蛋白 K 在肝癌组织及不同密度肝癌细胞中的表达

范薇薇, 余艳婷, 洪毅, 谈冶雄, 王红阳*

第二军医大学东方肝胆外科研究所国际合作信号转导实验室, 上海 200433

[摘要] **目的:**观察异质性胞核核糖核蛋白 K(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP K)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达及在不同密度肝癌细胞(PLC/PRF/5)中的亚细胞定位。**方法:**免疫组化染色观察肝细胞癌组织中 hnRNP K 的表达;Western 印迹检测肝癌组织(n=30)及对应癌旁组织 hnRNP K 蛋白表达差异;应用细胞免疫组化和 Western 印迹法比较不同密度肝癌细胞 hnRNP K 蛋白的亚细胞定位及表达。**结果:**肝细胞癌组织 hnRNP K 蛋白主要表达于细胞核。hnRNP K 蛋白表达在 30 例的肝癌组织中有 21 例高于其对应的癌旁组织;20 例 HBV 阳性肝癌组织有 16 例高于其对应的癌旁组织,而 10 例 HBV 阴性肝癌组织仅有 5 例表达高于癌旁组织。细胞免疫组化结果表明, hnRNP K 主要表达于 PLC 细胞核中,并且随密度(汇合率为 30%、50%、90%)的上升,其表达量逐渐上升。Western 印迹结果表明,不同密度(汇合率为 30%、50%、70%、90%)肝癌细胞的细胞质中, hnRNP K 的表达量无统计学差异;而在细胞核中,随着细胞密度的增大, hnRNP K 的表达量逐渐升高。**结论:**肝癌组织细胞核 hnRNP K 表达上调,且随着肝癌细胞密度的增加,其表达会逐渐增强,HBV 感染可能会促进其表达。

[关键词] 肝细胞癌;异质性胞核核糖核蛋白 K;乙型肝炎病毒

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0020-04

Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in hepatocellular carcinoma tissues and cell line of different cell densities

FAN Wei-wei, YU Yan-ting, HONG Yi, TAN Ye-xiong, WANG Hong-yang*

International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression changes and the subcellular localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in hepatocellular carcinoma (HCC) and cell line of different cell densities. **Methods:** The expression of hnRNP K in HCC was detected by immunohistochemical staining. The differential expression of hnRNP K in the HCC tissue (n=30) and paired paracancerous tissue was identified by Western blotting assay. The expression and sub-cellular location of hnRNP K in HCC cell line of different cell densities were determined by immunocytochemical staining and Western blotting assay. **Results:** Expression of hnRNP K was mainly detected in the nucleus of HCC cells. Twenty-one of the 30 hepatic cancer tissues had higher hnRNP K expression than the paired paracancerous tissues. Sixteen of the 20 HCC samples with HBV infection had an increased expression of hnRNP K; in the 10 HCC samples without HBV infection, 5 had an increased expression of hnRNP K. Immunocytochemical staining and Western blotting assay both showed that the expression of hnRNP K was increased in the nucleus of HCC cells with the increase of cell densities (30%, 50% and 90% confluence); the result of Western blotting assay also showed that there was no obvious change in hnRNP K expression in the cytoplasm of HCC cells of different cell densities (30%, 50%, 70% and 90% confluence). **Conclusion:** The expression of hnRNP K is elevated in HCC tissues and has an increasing tendency in the nucleus with the increase of cell density. Infection of HBV may be associated with the up-regulation of hnRNP K in HCC cells.

[KEY WORDS] hepatocellular carcinoma; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; hepatitis B virus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 20-23]

异质性胞核核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)被认为是异质性核蛋白

[收稿日期] 2007-07-20 **[接受日期]** 2007-12-26

[基金项目] 上海市自然科学基金(04ZR14108), 国家自然科学基金(30400244). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (04ZR14108) and National Natural Science Foundation of China(30400244).

[作者简介] 范薇薇, 博士生. E-mail: wwfan@fudan.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070856, E-mail: hywangk@vip.sina.com

复合体的一种组分,在从酵母到人的一系列真核生物中具有类似的功能和作用对象^[1]。hnRNP在多细胞生物的生存和发展中具有重要的作用,其不但可以结合激酶,还能募集染色质以及与转录、剪切和翻译等过程相关的细胞因子,广泛参与染色体的再包装、转录、剪切和翻译过程^[2-3]。

hnRNP K是hnRNP家族成员之一,它可作为锚定平台,通过促进激酶与细胞因子的相互作用来整合信号网络并以此介导核酸定向过程^[2-3]。hnRNP K最保守的进化特性是通过KH结构域结合RNA的能力^[4]。在从酵母到哺乳动物的不同物种中,都发现hnRNP K与染色质和RNA因子有相互作用。比较不同物种中hnRNP K蛋白结构域可以发现,它最初是RNA结合蛋白结构,随着进化,其逐渐从单纯的RNA结合蛋白进化到功能复杂的蛋白,使得它能够整合不同的信号通路,并依靠核酸在特定位置产生特定产物^[5]。我们前期应用蛋白质组学方法发现hnRNP K在所检测的10例肝癌组织中表达量明显上升^[6],本研究进一步观察其在肝癌组织中的表达及在肝癌细胞中的亚细胞定位情况,探讨其与肝细胞癌的关系及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 ECL Western印迹检测系统(Amersham-Pharmacia公司);NE-PER核抽提试剂盒(Pierce公司);用于免疫组织化学的hnRNP K多抗(sc-16553)购自Santa Cruz公司,用于免疫印迹的hnRNP K多抗由美国宾夕法尼亚大学医学院Gideon Dreyfuss教授惠赠。人肝癌细胞系PLC/PRF/5由德国马普生化所Axel Ullrich教授提供,培养条件为含10% FBS的DMEM(Gibco公司)、37℃、CO₂体积分数为5%,在6孔板中接种细胞密度为 3×10^5 /孔。

1.2 组织标本来源 选取自2000年1月至2002年12月在第二军医大学东方肝胆外科医院行手术切除的原发性肝细胞癌患者($n=30$)的肝癌组织及对应癌旁组织。所有患者术前均未进行过任何治疗,其中男24例、女6例,HBV感染阳性20例、HBV感染阴性10例。

1.3 免疫组织化学检测肝癌组织hnRNP K蛋白表达 肝癌组织样品(第二军医大学东方肝胆外科医院行手术切除的原发性肝细胞癌,病理号18388)经石蜡包埋,切片后60℃干烤1h,切片脱蜡;使用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复;BSA封闭后,直接加一抗,置于温盒中,4℃冰箱过夜(16h)。室温复温后滴加二抗,37℃孵育30min;

DAB显色2~10min,苏木精复染3~5min,自来水冲洗反蓝;脱水后滴加树脂,盖玻片覆盖封片。

1.4 Western印迹检测肝癌组织及癌旁组织hnRNP K蛋白表达 取肝癌组织及癌旁组织各约100mg,在液氮中研磨,然后裂解样品并离心,取上清定量后进行检测。先将上清进行SDS-PAGE,通过电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Whatman[®] Schleicher and Schuell),丽春红染色1min,标出相对分子质量标志,TBST洗去丽春红,5%脱脂奶粉封闭1h,TBST洗3次,每次5min,5%BSA稀释一抗(1:5000),孵育2h,TBST洗3次,每次5min,5%脱脂奶粉稀释二抗,孵育1h,TBST洗3次,每次10min,化学发光法(ECL)显影。每个样品检测实验独立重复3次,显色结果明显。

1.5 细胞免疫化学观察不同密度肝癌细胞hnRNP K的亚细胞定位及表达 在6孔板中放置盖玻片,每孔接种细胞 3×10^5 ,细胞分别生长24、48、96h,使细胞汇合率分别达到30%、50%、90%,PBS快速冲洗细胞,预冷的4%多聚甲醛4℃固定10min,TBS洗5min,0.2% Triton X-100(TBS配制)处理5min,TBS洗3次,每次5min,加封闭液(5.5%羊血清、0.1% Triton X-100、TBS配制)1h,TBS洗5min,3%BSA(TBS配制)稀释一抗,4℃孵育过夜,TBS/Triton洗2次,每次5min;TBS洗1次,商品化荧光标记二抗,37℃孵育30min,甩掉二抗,直接加DAB显色液,5~10min后停止显色,正置显微镜下观察。每个实验组设置3个复孔。

1.6 Western印迹检测不同密度肝癌细胞系hnRNP K蛋白亚细胞定位及表达 在6孔板中接种肝癌细胞,密度为 3×10^5 /孔,分别生长24、48、72、96h,使细胞汇合率分别达到30%、50%、70%、90%,使用细胞核抽提试剂盒进行核质分离后分别进行Western印迹检测。每个实验组设置3个复孔。检测方法见1.4项下Western印迹方法。

2 结果

2.1 hnRNP K在肝细胞癌组织中的表达 免疫组化检测结果显示,hnRNP K在肝细胞癌组织中主要在细胞核中表达。

2.2 Western印迹检测肝癌组织及癌旁组织中hnRNP K蛋白表达差异 免疫印迹检测结果显示,30例肝癌组织中有21例hnRNP K蛋白表达高于其对应的癌旁组织。20例HBV感染阳性肝癌组织有16例hnRNP K蛋白表达高于其对应的癌旁组

织,而 10 例 HBV 感染阴性肝癌组织仅有 5 例 hnRNP K 蛋白表达高于其对应的癌旁组织(图 1)。

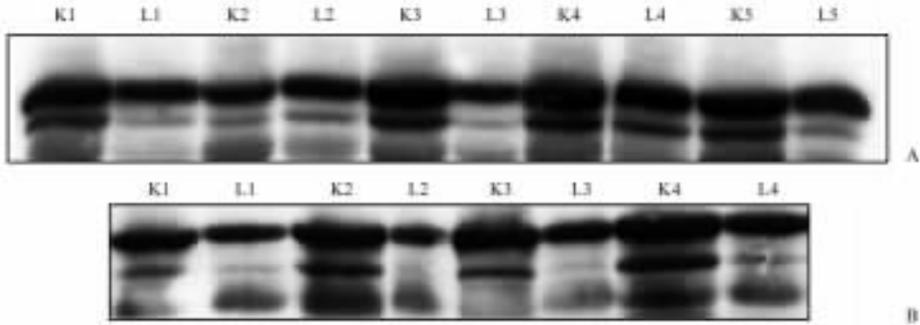


图 1 肝细胞癌及癌旁组织 hnRNP K 蛋白表达的免疫印迹结果

Fig 1 Expression of hnRNP K protein in HCC tissue and paired paracancerous tissue

A:HBV(+) tissue; B:HBV(-) tissue;K:HCC tissue; L:HCC paracancerous tissue;1-5: Number of specimen in each group

2.3 免疫细胞化学观察不同肝癌细胞密度下 hnRNP K 蛋白的亚细胞定位及表达 在人肝癌细胞系 PLC 中,hnRNP K 主要表达在细胞核中,并且随细胞密度的上升,其在细胞核中的表达量逐渐上升,具有向核内聚集的趋势(图 2)。

2.4 Western 印迹检测不同肝癌细胞密度下 hnRNP K 蛋白的亚细胞定位及表达 不同密度肝癌细胞的细胞质中,hnRNP K 的表达量无明显变化;而在细胞核中,随着细胞密度的增大,hnRNP K 的表达量逐渐升高(图 3)。

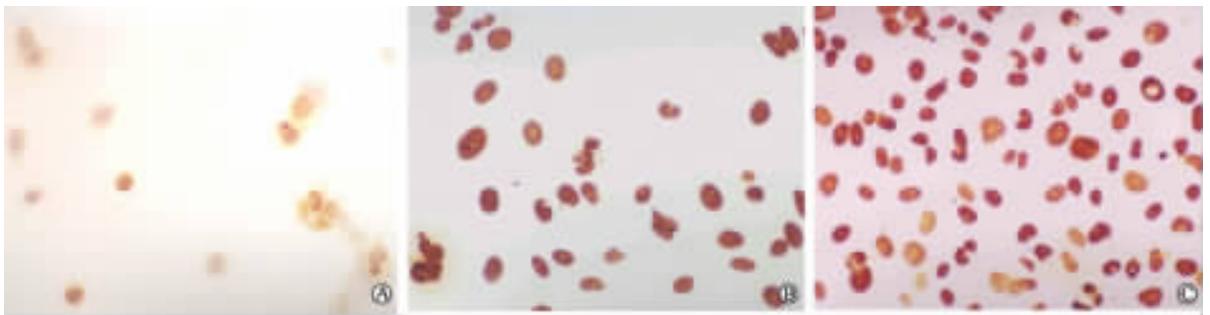


图 2 不同密度 PLC 细胞 hnRNP K 的细胞免疫化学结果

Fig 2 Expression of hnRNP K protein in PLC of different cell densities

A-C:30%, 50%, and 90% confluence, respectively. Original magnification: ×10

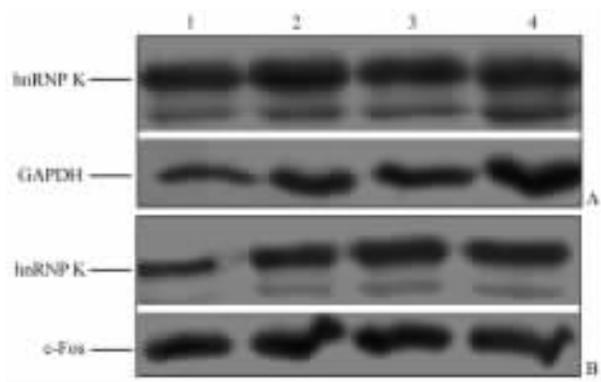


图 3 不同密度 PLC 细胞核和细胞质成分中 hnRNP K 的表达量

Fig 3 Expression of hnRNP K in nucleus and cytoplasm in PLC of different cell densities

A: Cytoplasm; B: Nucleus; 1-4: 30%, 50%, 70%, and 90% confluence, respectively

3 讨论

3.1 hnRNP K 在肝癌组织中的表达 hnRNP K 主要存在于细胞核,在基因转录、翻译及信号转导等方面起重要作用。hnRNP K 作为锚定平台,可把其他很多因子装配成复合体,从而促进多个过程的相互作用^[7]。hnRNP K 作为与 p53 的共同作用因子,在 DNA 损伤修复中起关键作用,hnRNP K 的表达上调能够抑制 DNA 损伤修复中 p53 的作用,使出现 DNA 损伤的细胞不能凋亡而发生癌变^[8]。本研究应用免疫组化及 Western 印迹法观察 hnRNP K 在肝细胞癌组织及癌旁组织中的表达,结果发现其主要表达于肝癌细胞的细胞核,且 70% 的肝癌组织中 hnRNP K 蛋白表达高于其对应的癌旁组织。这表明其可能具有促进肝癌细胞生长的作用。hnRNP K

存在于多种亚细胞结构中,参与基因表达的多个步骤,包括染色质修饰、转录、剪切、翻译,甚至影响mRNA的稳定性^[9-11]。肿瘤组织hnRNP K的异常表达提示其与肿瘤发生发展具有一定的相关性。

本研究还发现,80%(16/20)HBV阳性肝癌组织hnRNP K蛋白表达高于其对应的癌旁组织,而HBV感染阴性肝癌组织仅有50%(5/10)hnRNP K蛋白表达高于其对应的癌旁组织。这提示hnRNP K与HBV可能存在一定的相关性。是HBV上调HCC组织中hnRNP K的表达,还是hnRNP K对于HBV促进HCC发生具有协同作用^[12],仍有待进一步的验证。

3.2 hnRNP K在肝癌细胞中的定位 Cao等^[13]研究发现,hnRNP K在体内和体外均能与染色质修饰因子发生相互作用,与DNA甲基转移酶也有相互作用^[14]。这提示hnRNP K可能主要在细胞核内发挥其生物学功能。本研究细胞免疫组化结果显示:hnRNP K仅定位于细胞核中;鉴于免疫组化检测的灵敏度不高,又使用免疫印迹检测hnRNP K的定位情况,结果亦证实其主要定位于细胞核中,少量存在于细胞质。

hnRNP K是一种mRNA结合蛋白,常通过结合mRNA来调控其他基因的表达,其在细胞中含量的变化往往会影响到其他多种细胞因子的表达。肿瘤细胞培养时不存在接触抑制的现象,在较高密度下,细胞生长较快,增殖能力更强。本研究通过分离不同密度肝癌细胞的细胞质和细胞核,间接观察hnRNP K在细胞增殖过程中的变化。结果显示,随细胞密度的上升,hnRNP K在细胞核中的表达也有所上升,与免疫组化的结果一致。该结果提示,细胞核中hnRNP K的高表达可能会促进细胞增殖。

综上所述,肝癌相关的差异表达蛋白hnRNP K在肝癌组织中呈现高表达,其表达上调可能与细胞的恶性转化和肿瘤发展有密切关系。

[参考文献]

- [1] Bragoszewski P, Habiore A, Walewska-Zielecka B, Ostrowski J. Expression of genes encoding mitochondrial proteins can distinguish nonalcoholic steatosis from steatohepatitis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, 54: 341-348.
- [2] Yoo Y, Wu X, Egile C, Li R, Guan J L. Interaction of N-WASP with hnRNPK and its role in filopodia formation and cell spreading[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15352-15360.
- [3] Kwiec N C, Thacker D F, Datto M B, Megosh H B, Haystead T A. PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K[J]. *Cell Signal*, 2006, 18: 1769-1778.
- [4] Stains J P, Lecanda F, Towler D A, Civitelli R. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter[J]. *Biochem J*, 2005, 385(Pt 2): 613-623.
- [5] Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp H J, Buck F, Richter D, Kandler S. Characterization of Staufin 1 ribonucleoprotein complexes[J]. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 2): 239-246.
- [6] Li C, Tan Y X, Zhou H, Ding S J, Li S J, Ma D J, et al. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 1125-1139.
- [7] Van Seuning I, Ostrowski J, Bustelo X R, Sleath P R, Bomsztyk K. The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26976-26985.
- [8] Ostrowski J, Klimek-Tomczak K, Wyrwicz L S, Mikula M, Schullery D S, Bomsztyk K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 54599-609.
- [9] Ostareck D H, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele B J, Mann M, Hentze M W. mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end[J]. *Cell*, 1997, 89: 597-606.
- [10] Wadd S, Bryant H, Filhol O, Scott J E, Hsieh T Y, Everett R D, et al. The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 28991-28998.
- [11] Ostareck-Lederer A, Ostareck D H, Hentze M W. Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2[J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23: 409-411.
- [12] Ng L F, Chan M, Chan S H, Cheng P C, Leung E H, Chen W N, et al. Host heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a potential target to suppress hepatitis B virus replication[J]. *PLoS Med*, 2005, 2: e163.
- [13] Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing[J]. *Science*, 2002, 298: 1039-1043.
- [14] Ostareck-Lederer A, Ostareck D H, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, et al. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 4535-4543.

[本文编辑] 尹 茶