

核基质与细胞凋亡*

余跃飞 温博贵**

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

摘要 阐述了凋亡过程中, 核基质所发生的形态、生化变化及相关凋亡基因的表达, 尤其是凋亡早期便出现核基质蛋白的降解. 核基质是细胞核最基本的组分, 对维持细胞核形态结构和功能非常重要, 其主要由核纤层, 核内骨架及核孔复合体构成, 在 DNA 复制、转录、RNA 加工转运等事件中起支持作用. 多少年来, 关于凋亡时细胞核形态及生化改变的分子机理一直未阐明, 最近对核基质与细胞凋亡的研究取得了重大进展.

关键词 核基质, 细胞凋亡, 核基质结合区 (MARs), 凋亡基因

学科分类号 Q71, Q591

细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞的一种自杀方式, 对健康机体的维持、神经系统的正常发育、免疫系统正常功能的维持等方面具有重要意义. 细胞凋亡的形态改变是多阶段的, 首先是细胞缩小, 胞质凝缩, 染色质逐渐凝集成新月状, 附在核膜周边, 嗜碱性增强. 以后细胞核固缩成均一的致密物, 进而核破碎, 胞膜完整. 继之核膜出芽, 固缩染色质脱落, 形成膜包凋亡小体. 核基质 (nuclear matrix) 或称核骨架 (nucleoskeleton) 为真核细胞核内网络结构, 是指间期细胞核经 DNase 消化, 高盐抽提去除可溶蛋白成分及染色质后残余的亚核结构, 其主要成分是蛋白质. 因此, 狭义的核基质是指主要由纤维蛋白所组成的纤维网络, 而广义的核基质则包括核纤层, 核内骨架及核孔复合体. 它不仅维持细胞核的形态, 而且与染色体构建、DNA 复制与转录、RNA 加工转运等重要生命活动密切相关. 随着有关细胞凋亡研究的兴起, 近年来, 人们把注意力集中到亚核结构——核基质上. 有关核基质与细胞凋亡的关系逐渐被揭示, 本文就核基质在细胞凋亡中的作用加以综述, 试图引起国内同仁的关注.

1 核基质的结构与功能

核基质的成分复杂, 不同种细胞间, 核基质蛋白组成上显示出一定差异. 另外, 正常细胞与肿瘤细胞间存在相异的核基质蛋白, 为此, 人们试图从核基质差异蛋白着手探寻肿瘤细胞标志物, 已取得了一些进展. 真核细胞中染色质构成 DNA 环, 在此基础上进一步盘曲折叠形成特定的三维结构, 特异的 DNA 序列与核基质结合以维持 DNA 环的稳

定, 这些位于 DNA 环基底的特异 DNA 序列称为 MARs (matrix attachment regions), 即核基质结合区. MARs 通过核基质上的 MARs 结合蛋白与核基质相互作用, 影响 DNA 环的构建, 并参与基因调控. MARs 平均长度 800~1 000 bp, 富含 AT, 有拓扑酶的作用位点. 其结合位点散布在核内骨架及外周核纤层 (lamina) 上. MARs 序列在释放 DNA 超螺旋解链过程中发挥作用, 可能增强相邻基因的表达. 将 MARs 插入到转基因表达载体中, 当目的基因与 MARs 5' 端邻接时, 表达显著增强. MARs 结合蛋白是核基质蛋白的基本成分, 它既有结构性支撑作用, 又发挥各自的功能. 这些作用贯穿于 DNA 复制、修复、转录及 RNA 的剪接和转运等一系列过程. 其中, DNA 是以复制环的形式锚定在核骨架上. 目前, 比较确定的 MARs 结合蛋白有: 拓扑异构酶 II、支架结合因子 A (SAF-A)、C23/核仁素、多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP)、核有丝分裂器蛋白 (NuMA)、核纤层蛋白 laminaB1 及 SATB1 等. 核纤层蛋白 B1 是核纤层的主要结构蛋白. 核纤层是内核膜下的纤维蛋白片层或网络, 它提供了染色质在核周锚定的位点, 从而维持染色质高度有序的结构, 这对基因表达是十分重要的. 核纤层与核内骨架、核孔复合体及胞质内中间丝构成统一的网络系统. 核基质在维持细胞正常形态及功能方面发挥核心作用.

* 广东省教育厅自然科学基金资助项目 (9922).

** 通讯联系人.

Tel: 0754-8900473, E-mail: bgwen@stu.edu.cn

收稿日期: 2001-12-05, 接受日期: 2001-12-30

2 凋亡细胞内核基质的变化

有关的研究显示, 凋亡过程中一些核基质蛋白会发生降解. 核纤层的降解是许多细胞凋亡的显著特征, 并且比其他凋亡事件发生得更早一些, 例如 laminB1 的降解出现在寡聚核小体裂解之前, 且至少有二种不同的途径导致 laminB1 蛋白水解. 核纤层蛋白降解的发生是凋亡中染色质浓缩及核膜得以包裹染色质形成凋亡小体的主要因素. 另一个描述比较多的裂解核基质蛋白是 NuMA, 断裂点发生在 NuMA 蛋白的 N 端, 产生出 200 ku 及 40 ku 的片段. 在用地塞米松处理培养的胸腺细胞中, NuMA 的磷酸化和降解明显早于 DNA 的降解. NuMA 的磷酸化可能引发了蛋白质的构象改变而成为蛋白水解酶的靶. NuMA 的降解可能导致了核基质蛋白之间的互相作用消失和核基质的解聚. NuMA 是一种 MARs 结合蛋白, 为核内骨架的关键部分. Dynlacht 等^[2]用电离辐射, 热休克及依托泊甙 (etoposide) 诱导 HL60 细胞凋亡, 发现 laminB、NuMA 和核孔蛋白 TPR 等几种核基质蛋白均为蛋白水解酶的底物, 三种方法得出的结果有所不同, 照射及依托泊甙作用时, laminB 和 NuMA 比 DNA 发生裂解早, 但广泛的降解却晚于 DNA, 而由热休克诱导的凋亡, 这几种核基质蛋白的降解就早得多了. PARP 是凋亡早期发生降解的另一种核基质蛋白, 最近的研究表明 PARP 可被一种与白介素 1 β 转换酶 (ICE) /Ced-3 家族相似的蛋白酶降解, 这种蛋白酶被称为类 ICE 蛋白 (prICE), 它由两个亚基 (17 ku 和 12 ku) 组成. PARP 的降解影响 DNA 修复, 有助于凋亡细胞中 DNA 的降解. Gotzmann 等^[3]对核基质蛋白 SATB1 的研究证实, 在凋亡过程中, SATB1 发生降解的速度与 laminB1 一样快, 产生一个 70 ku 片段, 其水解酶为 caspase-6; 而 caspase 家族另外一个成员 caspase-3 则降解核基质蛋白 SAF-A^[4], SAF-A 使染色质能结合到核骨架上, 以维持染色质固定的空间构筑. 由此可见, 在细胞凋亡过程中存在一些使核基质蛋白特异性降解的蛋白酶, 它们能使诸如拓扑异构酶 II, NuMA 及 SAF-A 等 MARs 结合蛋白降解, 导致 DNA 从核骨架上解离, DNA 上的酶切位点被暴露出来. 此时, 活化的核酸内切酶切断这些位点, 产生大分子质量的 DNA 片段. 据报道, 在凋亡时有几种核酸内切酶 (包括 DNase I 和 II) 的活性会升高, 更有趣的是, 有些核酸内外切酶 (分

子质量范围在 55~ 63 ku) 是与染色质和核基质相结合. 只有当大分子的多肽水解成 18~ 46 ku 的片段, 才会形成典型的 DNA 梯带 (DNA ladders). LIN 等^[5]用双向电泳法分离凋亡细胞的总核基质蛋白, 发现 59 种核基质结合蛋白有不同程度的表达, 又用蛋白质印迹法着重分析了三种核基质结合蛋白——早幼粒细胞性白血病蛋白 (PML), HSC70 和 NuMA, 发现 PML 和 HSC70 的表达明显上调, NuMA 则下降, 并认为 HSC70 能保护 HL60 细胞抵抗依托泊甙的毒性作用, 而另外一种核基质结合蛋白 PML 则促进了细胞凋亡.

3 核基质与凋亡基因

细胞凋亡离不开凋亡基因的调控, 最新的研究表明, 许多凋亡基因表达产物例如 p53、p21、C-myc 及 Bcl-2 家族等属核基质结合蛋白, 且它们的作用也是在核基质网络上进行. Jiang 等^[6]报道了 p53 的作用是结合在核基质上, p53 与 MARs 的结合具有特异性及高亲和性, 这种结合增加了随后 DNA 的损伤. p53 近 N 端一段富含脯氨酸的区域对于结合核基质显得很重要, 这个区域在 p53 介导的细胞凋亡中也发挥重要作用. C-myc 是调控细胞周期的主要基因, 对细胞增殖和凋亡两个相反过程都有调节作用. 当有某些因素 (低浓度血清, 抑制细胞周期因子等) 存在时, myc 蛋白的表达促进细胞凋亡. 有研究表明^[7], C-myc 的 MARs 可与 HL-60 细胞株的核基质蛋白结合, 经不同的方法抽提核基质后, myc 蛋白仍与核基质牢固结合, 这说明 myc 蛋白是一种与核基质紧密结合的蛋白质, 它和细胞核基质的结合与其功能密切相关. Dynlacht 等^[8]报道了放射线诱导 HL60 细胞凋亡时 Bcl-2 的作用, 正常的 HL60 细胞在照射 4~ 12 h 后, laminB 降解成大约 28 ku 的片段, 当 HL60 细胞内的凋亡抑制基因 Bcl-2 过度表达时, 即使 HL60 细胞暴露于射线达 48 h, 核纤层 laminB 的降解仍受到抑制. Ramakrishnan 等^[9]指出 Bcl-2 基因的核心结合区是一段 33 bp 富含 AT 的高度保守序列, 与它有高亲和性的是 MARs 结合蛋白 SATB1, 故 SATB1 对 Bcl-2 的功能有重大影响. Bcl-2 家族成员 Bax 是一种促凋亡因子, 它也结合在核基质上^[10]. Gajkowska 等^[11]在用喜树碱诱导结肠癌细胞凋亡时证实, 凋亡的出现与 Bax 从胞液转到细胞器及通过核膜孔进入胞核有关, 并检测到 Bax 在核基质上表达增强, 且 Bax 的这种变化早于凋亡的形

态改变. Wang 等^[12]以恶性胶质瘤细胞 U343 为模型研究了 Bcl-2 及 Bax 蛋白与核基质的关系, 他们通过共聚焦显微镜观察到 Bcl-2 表达蛋白定位在核基质的外周, Bax 则位于核基质内. 用蛋白质印迹法从核基质蛋白分析出 26 ku 的 Bcl-2 带及一段 66 ku 的 Bax 带. Somogyi 等^[13]在研究抗凋亡基因 Bcl-2 家族成员 A1-a 时发现, Bcl-2 家族成员抗凋亡功能的获得与其在细胞内的定位密切相关, 用免疫荧光显微镜检测到 A1-a 紧紧结合在细胞核基质上, 而发挥其抗凋亡功能, 并使转染了 A1-a 的 COS-7 细胞免遭凋亡. 李娟等^[14]研究了肿瘤坏死因子 (TNF) 诱导 K562 细胞凋亡中核基质的变化, 发现有 9 种核基质蛋白与 K562 细胞的凋亡有关. 认为这些核基质蛋白功能可能与 K562 细胞凋亡基因的抑制有关.

4 结束语

核基质与细胞凋亡有着非常密切的关系, 核基质网络的破坏是凋亡时胞核毁损的关键因素之一^[15]. 核纤层在凋亡早期就被降解, 但在整个凋亡过程中, 大部分核基质仍是完整无缺的, 由此可见, 核基质在维持凋亡细胞完整性方面扮演重要角色^[16]. 核基质蛋白有组织细胞特异性, 提示它可以作为肿瘤诊断及判断预后的标志, 核基质蛋白可能是血清, 体液及组织里检测肿瘤有用的生物标志化合物^[17]. 另外, 在细胞凋亡发生典型的形态及生化改变之前, 核基质蛋白的变化便显现出来, 例如核基质蛋白 HSC 的表达增加等, 这也许将成为今后检测早期凋亡的敏感指标^[18]. 总之, 细胞凋亡过程中核基质蛋白的变化是明显的, 但作用相当复杂, 许多问题还有待于今后深入地探讨, 弄清核基质蛋白在细胞凋亡中的作用, 对进一步阐明细胞凋亡机理有着极其重要的意义.

参 考 文 献

- Berezney R, Jeon K W. Nuclear Matrix. San Diego: Academic Press, 1995. 8~9
- Dynlacht J R, Earles M, Henthorn J, *et al.* Different patterns of DNA fragmentation and degradation of nuclear matrix proteins during apoptosis induced by radiation, hyperthermia or etoposide. Radiat Res, 2000, **154** (5): 515~530
- Gotzmann J, Meissner M, Gerner C. The fate of the nuclear matrix-associated region-binding protein SATB1 during apoptosis. Cell Death Differ, 2000, **7** (5): 425~438
- Kipp M, Schwab B L, Przybylski M, *et al.* Apoptotic cleavage of scaffold attachment factor A by caspase 3 occurs at a noncanonical cleavage site. J Biol Chem, 2000, **18**: 275 (7): 5031~5036
- Lin J M, Zhang P, Ding M X, *et al.* Altered expression of nuclear matrix proteins in etoposide induced apoptosis in HL-60 cells. Cell Research, 2001, **11** (2): 125~134
- Jiang M, Axe T, Hotgate R, *et al.* P53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding in valves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. Oncogene, 2001, **20** (39): 5449~5458
- Waitz W, Loide P. Cell cycle dependent association of c-myc protein with the nuclear matrix. Oncogene, 1991, **6** (1): 29~35
- Dynlacht J R, Earles M, Henthorn J, *et al.* Degradation of the nuclear matrix is a common element during radiation-induced apoptosis and necrosis. Radiat Res, 1999, **152** (6): 590~603
- Ramakrishnan M, Liu W M, Didroce P A, *et al.* Modulated binding of SATB1, a matrix attachment region protein, to the AT-rich sequence flanking the major breakpoint region of BCL2. Mol Cell Biol, 2000, **20** (3): 868~877
- Gajkowska B, Motyl T, Olszewska Badarczuk H, *et al.* Structural association of Bax with nuclear matrix and cytomatrix revealed by embedment-free immunogold electron microscopy. Cell Biol Int, 2000, **24** (9): 649~656
- Gajkowska B, Motyl T, Godlewski M M, *et al.* Expression of bax in cell nucleus after experimentally induced apoptosis revealed by immunogold and embedment-free electron microscopy. Cell Biol Int, 2001, **25** (8): 725~733
- Wang Z H, Ding M X, Chew-cheng S B, *et al.* Bcl-2 and Bax proteins are nuclear matrix associated proteins. Anticancer Res, 1999, **19** (68): 5445~5449
- Somogyi R D, Wu Y, Orlofsky A, *et al.* Transient expression of the Bcl-2 family member, A1-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine induced apoptosis. Cell Death Differ, 2001, **8** (8): 785~793
- 李娟, 罗绍凯, 张国材, 等. 肿瘤坏死因子诱导 K562 细胞凋亡过程中核基质的改变及意义. 癌症, 1999, **18** (4): 451
- Li J, Luo S K, Zhang G C, *et al.* Cancer, 1999, **18** (4): 451
- Martelli A M, Bortul R, Bareggi R, *et al.* Biochemical and morphological changes in the nuclear matrix prepared from apoptotic HL-60 cells. J Cell Biochem, 1999, **74** (1): 99~110
- Zhao Y, Wu M, Shen Y, *et al.* Analysis of nuclear apoptotic process in a cell-free system. Cell Mol Life Sci, 2001, **58** (2): 298~306
- Hibino Y. Functional arrangement of genomic DNA and structure of nuclear matrix. Yakugaku Zasshi, 2000, **120** (6): 520~533
- Wang Z H, Yu D, Loi H K, *et al.* Alteration of nuclear matrix protein composition of neuroblastoma cells after arsenite trioxide treatment. Anticancer Res, 2001, **21** (1A): 493~498

Nuclear Matrix and Apoptosis*

YU Yue-Fei, Wen Bo-Gui**

(Department of Biochemistry, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract The nuclear matrix is an essential component of the nucleus which is important for the nuclear structural integrity and specific genomic functions. The nuclear matrix is composed of nuclear lamina, internal nuclear skeleton and nuclear pore complex which provides structural support for several processes such as DNA replication, transcription, and RNA splicing and transport. The molecular mechanisms about the morphological and biochemical changes which take place in the cell nucleus during the apoptotic process have escaped clarification for many years. Recently, the studies on the nuclear matrix and apoptosis have made great progress. The biochemical and morphological changes and the apoptotic genes' expression detected in the nuclear matrix during the apoptotic process will be delineated. Particular emphasis will be laid on the proteolysis that some nuclear matrix proteins undergo early during the apoptotic process, which may have important biological significance in researching the molecular mechanisms of apoptosis.

Key words nuclear matrix, apoptosis, matrix attachment regions (MARs), apoptotic gene

* This work was supported by a grant from The Natural Sciences Research Program of Educational Department of Guangdong Province (9922).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900473, E-mail: bgwen@stu.edu.cn

Received: December 5, 2001 Accepted: December 30, 2001