

温度对人肺癌细胞 A549 蛋白质表达的影响*

陈子瑛 王三英 陈晋安 彭宣宪**

(厦门大学生命科学学院生物学系, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 肺癌蛋白质组的研究, 有助于阐明其发病机制并对肺癌的防治有益。本文从研究人肺癌细胞热休克蛋白的表达情况出发, 通过比较 37℃、42℃ 和 45℃ 培养条件下的人肺癌细胞 A549 总蛋白质的双向电泳图谱, 获得 3 个温度敏感的差异蛋白点, 依次命名为 P₁、P₂、P₃。对差异蛋白进行 MALDI-TOF-MS 分析和采用 SWISS-PROT 数据库中的 Peptident 软件检索后, 初步鉴定 P₁ 与 2 种醛酮还原酶家族成员相匹配, P₂ 可能为一种新蛋白, P₃ 为锌指蛋白 11 A。

关键词: 双向电泳 肽质量指纹谱 基质辅助激光解吸/飞行时间质谱 人肺癌细胞 热休克蛋白

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 其发生主要与吸烟、环境和遗传因子有关。热休克蛋白(HSPs)是 70 年代美国学者 Tissieres A 等发现的一类在细胞内高度保守性的蛋白质^[1], 具有温度敏感性的特点。大部分的 HSPs 都具有分子伴侣和蛋白降解的功能, 参与蛋白质的折叠、组装、转运及降解等重要生命过程。许多肿瘤细胞的表面可以高度表达或特异性表达不同亚型 HSPs, 其表达参与了基因调控机制, 与肿瘤细胞的分化程度, 癌基因及抑癌基因有密切的内在联系^[2]。这些结果提示, 研究温度对肿瘤细胞蛋白质表达的影响, 可能有助于阐明其发病机制并对肺癌的防治有益。至今尚未见温度升高对肺癌细胞蛋白质组变化影响的报道。

蛋白质组学(Proteomics)是一种高通量筛选技术, 已成为当前研究的一个重要热点^[3]。虽然用于蛋白质组学研究的新兴技术层出不穷, 但与庞大数据库结合的高分辨率的双向电泳(2-DE)和高灵敏度的质谱(Mass spectrometry)技术仍是当前分离鉴定蛋白质的两大支柱技术。基质辅助激光解吸/飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)具有高灵敏度和高质量检测范围, 适合分析绝大多数蛋白质, 且能耐受一定量的小分子如盐和去污剂等。肽质量指纹谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)是对蛋白质酶解或降解后的多肽混合物进行质谱分析所得到的图谱。通过数据库搜索, PMF 与理论肽质量数相比较可用于高通量鉴定蛋白质。

本文对 37℃、42℃、45℃ 三个温度下人肺癌细胞总蛋白质的双向电泳图谱进行了比较, 获得了 3

个差异蛋白质点。随后对这 3 个差异点进行了质谱分析, 得到其肽质量指纹谱, 通过数据库 Peptident 软件搜索进行了初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞

人肺癌细胞株 A549 由本院李祺福教授提供。

1.1.2 试剂

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、CHAPS、超纯尿素、二硫苏糖醇、十二烷基硫酸钠、考马斯亮蓝 R-250 均为上海生工产品。碘乙酰胺(I-CH₂CONH₂)为美国 Sigma 公司产品, 三氟乙酸(TFA)为日本东京化成工业株式会社产品; 乙腈(ACN)为国产生色谱纯; 胰蛋白酶(trypsin)为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞总蛋白质的提取

将培养于含 10% 小牛血清培养基中的人肺癌细胞分别接种于 3 瓶培养基中, 37℃ 继续培养。待细胞生长良好接近汇合时, 分别置于 37℃、42℃、45℃ 下继续培养 1h, 弃培养液, 加入含 0.02% EDTA 的消化液, 收集细胞, D' Hanks 液洗涤 2 次。按 10⁶ 细胞加入 80 μl 细胞裂解液(8 mol/L urea, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT), 快速反复冻融 4-5 个循环, 离心收集上清, 此即为上样样品。

1.2.2 双向凝胶电泳

双向电泳参照文献^[4]进行并稍作改进。第一向预电泳 200V 15min, 300V 30min, 400V 2h, 上样后电压 400V, 4h 后调至 500V, 14h。等电聚焦后迅速取出胶条, 平衡后移至 10% SDS-PAGE 胶上继续电泳, 其一端外侧加上标准蛋白质, 1% 琼脂糖封固。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色,

本文 2002 年 6 月 3 日收到。2002 年 7 月 18 日接受。

* 本课题受国家自然科学基金资助(30080029)。

** 通讯作者。

扫描,输出照片。

1.2.3 质谱样品的制备

比较三个样品的双向电泳图谱,找到差异蛋白点,做好标记。用一干净解剖刀切下目的蛋白点,从无蛋白质污染区切下一块大致相同的胶块为对照,把胶块切成约 1mm^3 大小,置于 0.5ml Eppendorf 中,接着按以下步骤进行:

用 50% ACN 洗胶块以脱掉考马斯亮蓝 ($2-3$ 次 $\times 15$ min),弃 50% ACN; 100% ACN 覆盖胶块至白色,弃 ACN;接着用 0.1 mol/L NH_4HCO_3 泡胀,然后反复用 ACN / 0.1 mol/L NH_4HCO_3 洗至无色,真空离心干燥。用 10 mmol/L DTT / 0.1 mol/L NH_4HCO_3 于 56°C 还原 45 min 后,再用新鲜配置的 55 mmol/L 碘乙酰胺 / 0.1 mol/L NH_4HCO_3 烷基化,避光 30 min 。重复上述步骤至脱色干净。真空离心干燥后加入 Trypsin ($12.5\text{ }\mu\text{g/mL}$) 冰上孵育 45 min ,吸掉多余酶液后加入无酶消化液, 37°C 过夜。依次用 5% TFA 和 50% ACN / 2.5% TFA 反复抽提 $1-2$ 次,合并上清液,真空离心干燥。点样前加 $1-2\text{ }\mu\text{l}$ 0.1% TFA 溶解样品。

1.2.4 质谱分析

质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlex™ III MALDI-TOF 质谱仪进行分析,反射模式,离子源加速电压 1 为 20 kV ,加速电压 2 为 23 kV , N_2 激光波长 337 nm ,脉冲宽度为 3 ns ,离子延迟提取 2000 ns ,真空度 $1.4 \times 10^{-7}\text{ Torr}$,质谱信号单次扫描累加 50 次,并用标准 Marker 峰作为外标校正质谱峰,正离子谱测定,获得肽质量指纹图谱。

1.2.5 数据库查询

通过 ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptide 软件 (<http://www.expasy.org/tools/peptide.html>) 进行查询。

查询条件:肽质量指纹图谱中的肽片段质量控制在 $800-3500$,表观 Mr 的误差范围为 $\pm 20\%$,对表观 pI 值未做要求,肽片段分子量最大容许误差范围为 $\pm 0.5\text{ Da}$,每个肽允许有 2 个不完全裂解位点,物种来源选择人类,离子选择 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 monoisotopic,最少匹配肽片段数规定为 4 ,半胱氨酸为碘乙酰胺处理。

2 结果

2.1 不同温度下人肺癌细胞系 A549 总蛋白双向电泳图谱的比较

37°C 、 42°C 、 45°C 下的人肺癌细胞系 A549 总蛋白双向电泳图谱如图 1 所示。从图 1 可见,三张图谱非常相似,蛋白点的等电点和分子量分布范围广,但主要集中于 pI $4-8$ 和 Mr $20-75\text{ kD}$ 的区域。从获得的人肺癌细胞系 A549 总蛋白的双向电泳图谱来看,虽然未采用较为灵敏的银染法,但肉眼已可辨别约 300 多个蛋白点,且蛋白点之间区分得比较清楚,因而可以对其进行蛋白质表达的差异分析。

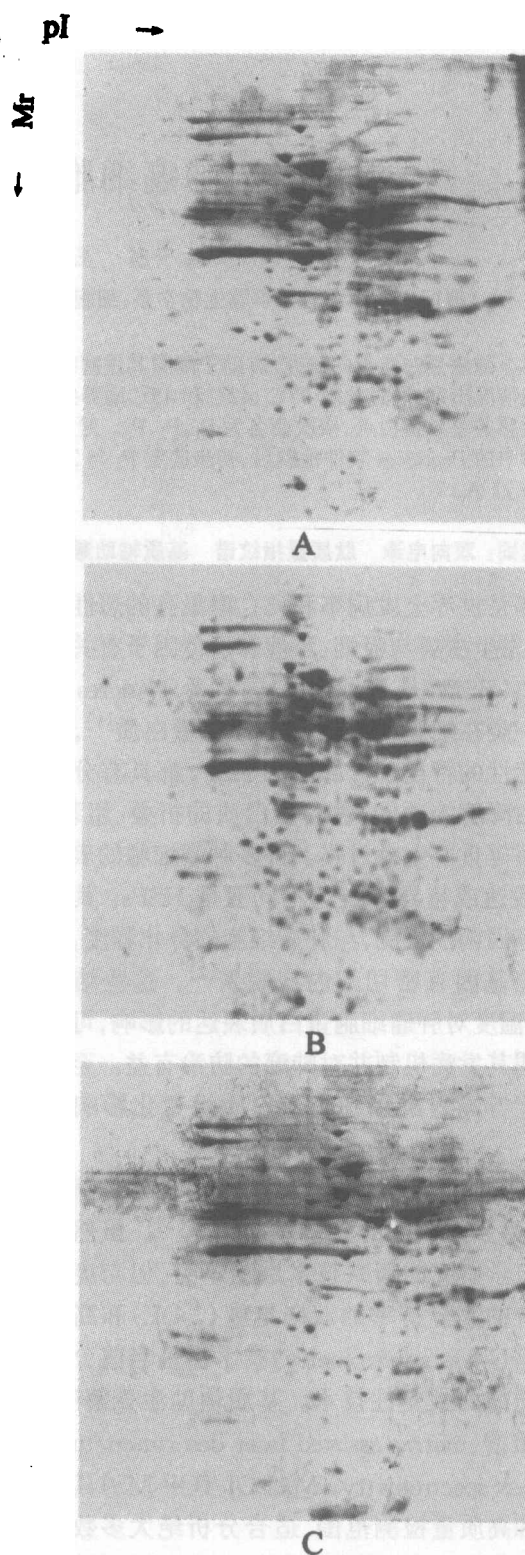


图 1 不同温度下人肺癌细胞系 A549 总蛋白质双向电泳图谱

A. 37°C B. 42°C C. 45°C

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis map of human lung cancer cell line A549 whole proteins at different temperature (IEF at pH 3-10; marker at 15-250 kD)

A. 37°C B. 42°C C. 45°C

对 3 种温度下的人肺癌细胞系 A549 总蛋白的双向电泳图谱进行比较,从中发现了 3 个差别较明显的差异蛋白点,分别命名为 P₁ (34kD)、P₂ (23kD)、P₃ (37kD)。如图 2 所示, P₁ 随温度上升而逐渐消失; P₂ 在 42℃ 和 45℃ 时才出现; P₃ 随着温度的升高,其表达量有较明显的增加,在 45℃ 下其表达最强,点也最清楚。对获得的差异蛋白点应用双向图谱分析软件 Genomic Solutions Investigator HT Analyzer (version 2.02) 分析其相对含量的差异,结果如图 2 中的柱形图所示。

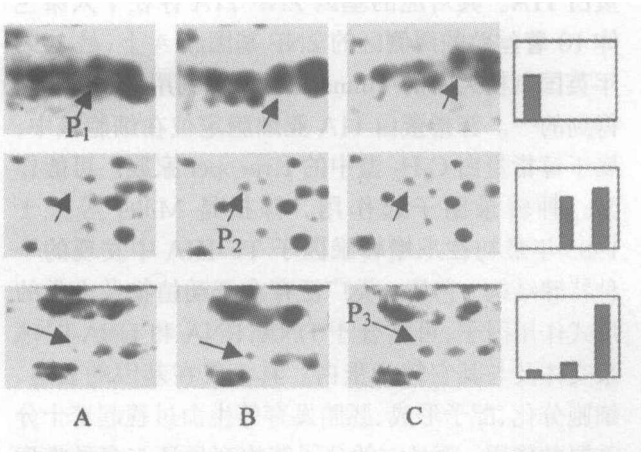


图 2 不同温度诱导下的差异蛋白质点的放大图谱
A. 37℃ B. 42℃ C. 45℃

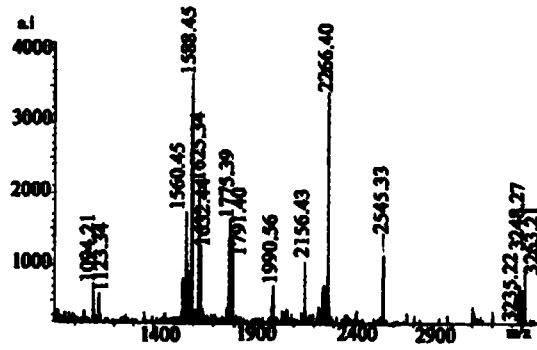
Fig.2 The comparison of temperature-sensitive proteins at 37℃, 42℃, 45℃
A. 37℃ B. 42℃ C. 45℃

2.2 MALDI-TOF 肽质量指纹谱分析

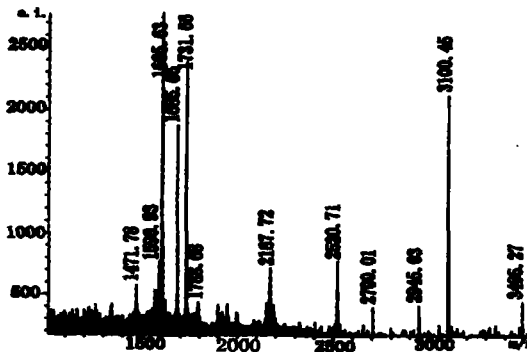
对 3 个差异蛋白点进行 MALDI-TOF 质谱分析,得到各自的肽质量指纹图谱,如图 3 所示。从图中可以看出,得到的三个肽质量指纹图谱信号都较强且基线平稳,适合于下一步的数据库检索鉴定。

根据获得的肽指纹谱数据和分子量范围及其他一些参数,通过 Peptident 软件查询 SWISS-PROT 数据库中与之匹配的蛋白质,搜索结果如表 1、2 所示。

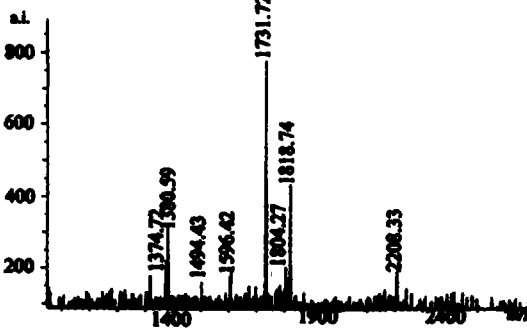
由搜索结果可以看出, P₂ 未搜索到与之相匹配的蛋白质; P₁ 搜索到了 2 种蛋白质与之相匹配,分别为醛酮还原酶家族 1 成员 B10 (Aldo-keto reduc-



A



B



C

图 3 不同温度下人肺癌细胞 A549 2-DE 图谱中差异蛋白点的肽质量指纹图谱
A. P₁ B. P₂ C. P₃

Fig.3 PMF of the temperature-sensitive proteins in 2-DE map of human lung cancer line A549 at different temperature
A. P₁ B. P₂ C. P₃

表 1 P₁ 在数据库中的搜索结果
Table 1 Database searching result of P₁

Score	# peptide matches	AC	ID	Description	pI	Mw
0.29	4	060218	AKBA_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member B10 (EC 1.1.1.-)	7.12	36020.56
0.29	4	P15121	ALDR_HUMAN	Aldose reductase (EC 1.1.1.21) (AR)	6.55	35722

表 2 P₃ 在数据库中的搜索结果
Table 2 Database searching result of P₃

Score	# peptide matches	AC	ID	Description	pI	Mw
0.50	4	P17013	Z11A_HUMAN	Zinc finger protein 11A (Fragments)	undefined	undefined

tase family 1 member B10)和醛糖还原酶(Aldose reductase);P₃ 搜索到了 1 种蛋白质与之相匹配,为锌指蛋白 11A(Zinc finger protein 11A/Zinc finger protein KOX2)。

3 讨论

采用蛋白质组学技术研究蛋白质表达谱的差异,可以从质和量两个方面进行比较,前者为有和无的关系,后者为多和少的关系。本文主要从质的方面来研究人肺癌细胞在不同温度培养条件下蛋白质表达的变化情况。结果发现了三个差异蛋白点,分别命名为 P₁、P₂、P₃。

P₁ 搜索到 2 种蛋白质与之相匹配,分别为醛酮还原酶家族 1 成员 B10(Aldo-keto reductase family 1 member B10,)和醛(糖)还原酶(Aldose reductase, AR),二者都属于醛酮还原酶家族,广泛存在于多种组织细胞中,前者也叫醛还原酶相关蛋白(ARP),两者分子量仅相差 298 Da。Scuric Z. 等发现 ARP 在人肝癌细胞中过量表达^[5]。本实验中观察到了 P₁ 随温度的升高而逐渐消失的情况,说明这是一种温度敏感型的蛋白质,在高于正常的培养温度下,其表达明显下调,在 45℃ 下完全消失。

P₂ 未搜索到与之相匹配的蛋白质。生物细胞在受热或其它理化因素(如辐射、重金属离子、感染、缺氧等)的作用下可以启动热休克蛋白基因,选择性的合成高度保守的热休克蛋白。只有在使细胞群体中的 26.5% - 44.5% 细胞死亡的刺激下才能诱导细胞发生应激反应,而人体肿瘤细胞置于高于正常温度 4 - 8℃ 时会导致死亡,因此本文选择了一个从正常体温 37℃ 到高温 45℃ 之间的温度梯度来处理人肺癌细胞。P₂ 为在 42℃ 及 45℃ 下新出现的蛋白质,与细胞热休克蛋白质有较密切的联系。本实验虽然得到其肽质量指纹谱,但未在数据库中搜索到与之相匹配的蛋白质,虽然我们对其在其它两个数据库(<http://prospector.ucsf.edu> 和 <http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html>)中也进行了搜索,但均未获得符合要求的蛋白质。可能库中尚未存在此种蛋白质,另一方面,随着蛋白质组数据库的飞速壮大,对解决这一问题将产

生有益的帮助。在目前的条件下,可通过部分测序如源后衰变(post-source decay, PSD)或碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)及氨基酸组分分析等技术对该蛋白质点进行进一步的研究。

P₃ 搜索到了一种蛋白质与之相匹配,即为锌指蛋白 11A。其对应的基因 ZNF 11A 存在于人染色体 10 着丝粒的两侧区的 ZNF 基因簇 A 上,是 1993 年英国剑桥大学的 Tunnacliffe A 等利用 YACs 克隆得到的^[6]。锌指蛋白 11A 亚细胞定位在细胞核中,属于锌指蛋白 C₂H₂ 型中的 Krueppel 家族。可能作为一种转录因子起作用。锌指是 Miller 等人于 1985 年最初在爪蟾转录因子 TF-III_A 中发现的一种特殊结构,它是一类广泛存在于动植物及人类的反式作用因子,可结合于 DNA, RNA 和 DNA-RNA 杂交体及与其它锌指蛋白。其不仅在基因的表达、细胞分化、配子形成、胚胎发育等生命过程起着十分重要的作用,而且它的分子结构变异还与多种疾病以及肿瘤相关^[8]。许多癌基因、原癌基因和肿瘤抑制基因编码的 DNA 结合蛋白,也具有典型的锌指结构序列。本实验中观察到了锌指蛋白 11A 的表达量随温度升高而明显增加,提示它与热应激反应有关,可能是作为一种组成性的热休克蛋白起作用。

恶性肿瘤是一种多基因参与的复杂疾病。采用蛋白质组学技术,从质和量的水平上考察肿瘤发生过程中蛋白质种类和数量的改变,有助于研究其发病机制,找到肿瘤诊断和预后的特异性标志物以及药物治疗的新靶点。本文从研究人肺癌细胞热休克蛋白表达情况的角度出发,虽然未鉴定出已知的热休克蛋白,但发现了 3 种差异明显的蛋白质,可认为其为与温度敏感有关的蛋白质。P₃ 为量的水平上变化明显的差异蛋白,而 P₁ 和 P₂ 则为此动态变化过程中变化更为明显的差异蛋白。有趣的是,我们发现了可能存在的肿瘤细胞热休克新蛋白(P₂),同时也发现了原先并未证实的与温度有关的蛋白质(P₁ 和 P₃)。更重要的是,既发现了随温度升高而出现的蛋白(P₃),又发现了随温度的升高而逐渐消失的蛋白(P₁)。前已提到,ARP(P₁)在肝癌细胞中的过量表达^[5],锌指蛋白 11A(P₃)的分子结构变异还与多种疾病以及肿瘤相关^[8]。业已证明,热疗法是

一种可以有选择性地杀死肿瘤细胞而副作用较放疗、化疗小得多的肿瘤治疗方法^[9], 本文结果为阐明其分子机制提供了初步实验依据。

参 考 文 献

- [1] Tissieres, A. and A. K. Mitchell, 1974, Some new proteins induced by temperature shk in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.*, **84**:389-398.
- [2] 高雅娟, 2000, 热休克蛋白与肿瘤免疫。国外医学免疫学分册, **23**(5):290-293。
- [3] 吴谋胜、彭宣宪, 2002, 微生物蛋白质组学研究进展。微生物学报, **42**(2):251-254。
- [4] 夏其昌, 1997, 《蛋白质化学研究技术与进展》。北京: 科学出版社。
- [5] Scuric, Z., S. C. Stain, W. F. Anderson and J. - J. Hwang, 1998, New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatellular carcinoma. *Hepatology*, **27**:943-950.
- [6] Tunnaclyffe, A., L. Liu, J. K. Moore, M. A. Leversha, M. S. Jackson, L. Papi, M. A. Ferguson-Smith, H. J. Thiesen and B. A. Ponder, 1993, Duplicated KOX zinc finger gene clusters flank the centromere of human chromosome 10: evidence for a pericentric inversion during primate evolution. *Nucleic. Acids Res.*, **21**:1409-1417.
- [7] 厉建中、李坚、傅继梁, 2001, 锌指蛋白基因 ZNF 191。生命的化学, **21**(2):116-118。
- [8] Kerckaert, J. P., C. Deweindt and H. Tilly, 1994, LAZ3, a novel zinc finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocation in human lymphomas. *Nature Genet.*, **5**:66-70.
- [9] 刘静、张学学、卢文强、王存诚, 1998, 肿瘤热疗中探针加热下组织温度场演化规律的研究。清华大学学报(自然科学版), **38**(7):86-89。

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE PROTEIN EXPRESSION OF HUMAN LUNG CANCER CELL LINE A549

CHEN Zi Jun WANG San Ying CHEN Jing An PENG Xuan Xian

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT The study on proteome of human cancer is helpful to explain its pathogenesis and make good effect on its prevention and cure. We compared the 2-DE maps of whole proteins of human lung cancer line A549 at 37°C, 42°C and 45°C for the purpose of studying the expression of its heat shock proteins. Three temperature-sensitive differential spots were obtained and named as P₁, P₂, P₃, respectively. Analyzed by MALDI-TOF-MS and Peptident software searched in the SWISS-PROT database, the three differential proteins were elementarily identified. P₁ matches with two proteins belong to the Aldo-keto reductase family, P₂ may be a new protein and P₃ is Zinc finger protein 11A.

Key words: two-dimensional electrophoresis. PMF. MALDI-TOF mass spectrometry. human lung cancer cell. heat shock protein