

人肺腺癌细胞 A549 放射前后蛋白质组测定及分析

李香兰¹ 常金¹ 胡洪涛¹ 尤庆山^{1*} 马玉彦²(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,¹放疗科,²肿瘤研究所, 哈尔滨 150081)

摘要 筛选了人肺腺癌细胞 A549 放射前后的差异蛋白质,并探讨了其在放射中的作用。用双向凝胶电泳对人肺腺癌细胞 A549 放射前后的蛋白质谱进行分析,寻找差异蛋白质,并用 MALDI-TOF-MS 进行蛋白质鉴定。检测出 25 个差异蛋白质点,对其中差异 2 倍以上的 7 个蛋白质点用 MALDI-TOF-MS 鉴定,鉴定出锰超氧化物歧化酶 B 亚型前体、角蛋白 8、角蛋白 9、dystrobrevin、不均一核糖核蛋白 1 (HNRPH1)、烯醇化酶 1 等 6 种蛋白质。用双向凝胶电泳筛选细胞系放射前后差异蛋白质,筛选的蛋白质与抗氧化、辐射防护、信号转导、RNA 加工和转运、能量代谢及细胞凋亡有关,对于揭示放射的分子机制有一定的意义。

关键词 肺癌;放射治疗;差异蛋白质;双向凝胶电泳;人肺腺癌细胞 A549

肺癌是一种发病率与死亡率逐年上升的恶性肿瘤,其治疗效果与早期发现、早期诊断、早期治疗以及采取个性化的治疗息息相关。近几年,随着放射物理和放射生物学的发展,使局部高剂量成为可能,并且采用放化结合的综合治疗,使肺癌的治疗疗效有了较大改善。但是,由于肺癌病人就诊时绝大多数属于中晚期,使其生存期仍较低。目前对肺癌预后的判断仅依赖于病期、病理类型及病人的一般状况等,缺乏能够确切判定预后及治疗疗效的分子生物学指标,从而难以做到真正的个性化的治疗。另外,对于放射治疗的作用机制国内外学者从基因组学角度做了很多的研究工作,但是蛋白质才是生命活动的最终执行体,只有从蛋白质水平揭示放射治疗的分子机制,才能更好地对病人采取针对性的治疗,这正是目前放射治疗研究的热点问题。本实验对人肺腺癌细胞 A549 放射前后的蛋白质组进行测定及分析,寻找差异蛋白质,为进一步研究放射治疗的分子机制及寻找与放射敏感性相关蛋白提供线索。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肺腺癌细胞株 A549 由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所提供。

1.2 试剂

二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、双向凝胶电泳标准蛋白质、甲苯磺酰-苯丙氨酰-氯甲烷处理的胰蛋白酶(TPCK-trypsin)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、三氟乙酸(TFA)、乙腈和基质 α -氰基-4-羟基肉桂

酸(CCA)购自 Sigma 公司(美国),固相 pH 梯度干胶条(pH 3-10 L, 13 cm)、IPG 缓冲液(pH 3-10 L)、两性电解质(pharmalyte, pH 3-10 L)、覆盖液和尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris、CHAPS 购自 Amersham Bioscience 公司(美国)。无水乙醇购自上海振兴化工厂,乙酸购自国药集团化学试剂有限公司,戊二醛购自上海凌峰化学试剂有限公司,5 mol/L NaOH、氨水购自新桥化学试剂厂,AgNO₃购自上海化学试剂有限公司,1% 柠檬酸、37% 甲醛购自上海试剂一厂。10% 胎牛血清产自中国医学科学院生物工程研究所,高糖 DMEM 培养液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

Ettan IPGphor 等电聚焦仪, Hofer SE 600 垂直电泳槽, UMax Powerlook 2110XL 扫描仪, IMAGE-MASTER™ 分析软件为 GE Amersham 公司(美国)产品; Bruker-Daltonics AutoFlex TOF-TOF LIFT Mass Spectrometer(德国 BRUKER)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 A549 细胞株用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养,细胞融合达 80% 以上,按 1:2 传代,继续用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养,细胞融合达 80% 以上,处理细胞。

1.4.2 细胞的处理 将处于指数生长期的细胞分成两组(对照组和放射组),对照组不进行放射直接收集;放射组用直线加速器,6 MV 能量,2 Gy/min 剂量

收稿日期: 2008-06-05 接受日期: 2008-07-18

* 通讯作者: Tel: 0451-86298535, E-mail: youqs@sina.com

率,表面覆1 cm组织填充物,进行6 Gy照射,照射6 h后收集细胞。

1.4.3 细胞总蛋白质组的提取(两组样品,每组一盘细胞) 倒出细胞培养液,加入预冷的PBS进行清洗,重复3遍。用细胞刮刀刮取细胞至EP管中,1 000 r/min,离心后去上清液,重复两次,用微型取样器将PBS彻底吸出后将细胞进行裂解。加入200 μ l裂解缓冲液(9.5 mol/L尿素,4% CHAPS,65 mmol/L DTT,0.2% carrier ampholyte (3~10 L),罗氏cocktail酶抑制剂),裂解液震荡均匀,超声破碎细胞(80 W,5次,每次10 s,间隔15 s,冰上完成)。整个过程冰浴进行。离心,14 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,60 min,取上清液用Bio-Rad protein assay reagent法定量,分装成100 μ g一管,置于500 μ l离心管中,低温保存(-80 $^{\circ}$ C)。

1.4.4 双向凝胶电泳 蛋白质提取物(100 μ g)与水化液(8 mol/L尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,18 mmol/L DTT,0.5% IPG缓冲液)充分混合,上样总体积为450 μ l。IPG胶条为13 cm pH 3~10 L,30 V水化12 h后依次经500 V 1 h,1 000 V 1 h,8 000 V 8 h,500 V 4 h进行等电聚焦,水化和聚焦均在20 $^{\circ}$ C进行。等电聚焦后,迅速取出IPG胶条分别于10 ml平衡A液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mmol/L尿素,30%甘油,1% SDS,0.2% DTT)和10 ml平衡B液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mmol/L尿素,30%甘油,1% SDS,3%碘乙酰胺)中各平衡15 min。平衡后的IPG胶条转移至12.5%的SDS-PAGE胶上端进行第二向垂直电泳。电泳条件为15 mA/胶电泳30 min,随后以30 mA/胶恒功率电泳,直至溴酚蓝指示线到达凝胶底边0.5 cm处终止电泳。电泳后对所得到的2D-PAGE胶进行戊二醛银染^[1](5%戊二醛,AgNO₃,1%柠檬酸,37%甲醛),双蒸水脱色至背景清晰,其间换水数次,每个样品重复3次。应用UMax Powerlook 2110XL扫描仪对银染的2-DE胶扫描,获得蛋白质谱。用IMAGEMASTER™进行分析,寻找差异蛋白质点。

1.4.5 A549放射前后差异蛋白质点MALDI-TOF-MS分析 用手术刀片切下胶上目标条带,置于EP管中(胶块切成约1 mm³大小),同时切下空的胶块作对照。取30~50 μ l 30 mmol/L K₃Fe(CN)₆:100 mmol/L Na₂S₂O₃=1:1(体积比)加入胶块内,洗至蛋白质点棕色消失,去除上清液,立刻加200 μ l水终止反应,10 min,去除上清液,再加入100 μ l 100 mmol/L NH₄HCO₃,静置20 min,去除上清液,冻干。冻干后,

各加入5 μ l 2.5~10 ng/ μ l胰蛋白酶溶液,置于4 $^{\circ}$ C冰箱30~60 s,使胶块充分吸胀(12.5 ng基于银染一块胶100 μ g的上样量,酶与被分析蛋白质质量比一般为1:20~1:100)。再加入20~30 μ l左右25 mmol/L NH₄HCO₃缓冲液(无胰蛋白酶),pH 7.8~8.0(Promega)。37 $^{\circ}$ C反应过夜,20 h左右,吸出酶解液,转移至新EP管中,原管加入100 μ l 60% ACN/0.1% TFA,超声15 min,吸出溶液,并入前次溶液,冻干。冻干后的酶解样品,用5 μ l 1%甲酸溶解,然后振荡,离心。取2 μ l样品,直接点在AnchorChip样品板上。让溶剂自然挥发。取0.5 μ l CHCA溶液(AnchorChip CHCA:30% H₂O,70% ACN的饱和CHCA溶液,用30% H₂O,70% ACN的溶剂稀释到原来的1/6),点到样品上,让溶剂自然挥发。取1.5 μ l 10 mmol/L的柠檬酸铵溶液点到样品上,1 min后,将柠檬酸铵溶液从样品表面吸去。将样品板送入质谱仪。打开FlexControl软件,选择Pepmix方法,获取PMF图谱,并将PMF图片转移到FlexAnalysis软件,标峰完后将数据转移到MSTOOLS程序,进行数据库搜索。MALDI-TOF-MS质谱仪采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压20 kV,反射电压23 kV,获得肽质量指纹图谱。

1.4.6 数据库查询 采用Matrix Science(<http://www.matrixscience.com>)的Mascot软件搜索NCBI nr数据库,搜索条件为:肽片段质量最大误差控制在0.5 Da,酶解片段不完全选择为1个,物种来源为哺乳类,离子选择MH⁺和单一同位素,固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化,可变修饰为蛋氨酸氧化。

2 结果

2.1 A549细胞放射前后两组细胞总蛋白2-DE图谱分析

应用IMAGEMASTER™软件分析双向电泳图,A549放射前三块凝胶上检测到平均2 485个蛋白质点,放射后胶上检测到平均2 477个蛋白质点,同一组样品的胶之间匹配度为80%~95%,两个样品胶的差异蛋白质点(1.5倍以上)有25个,其中表达相差2倍以上的7个蛋白质点进行胶内酶切,做MALDI-TOF-MS进行蛋白质鉴定(图1,表1)。

2.2 差异蛋白质点的MALDI-TOF-MS肽质量指纹图分析及数据库检索结果

对A549放射前后差异2倍以上的蛋白质点进行胶内酶解、MALDI-TOF-MS肽质量指纹图谱分析,

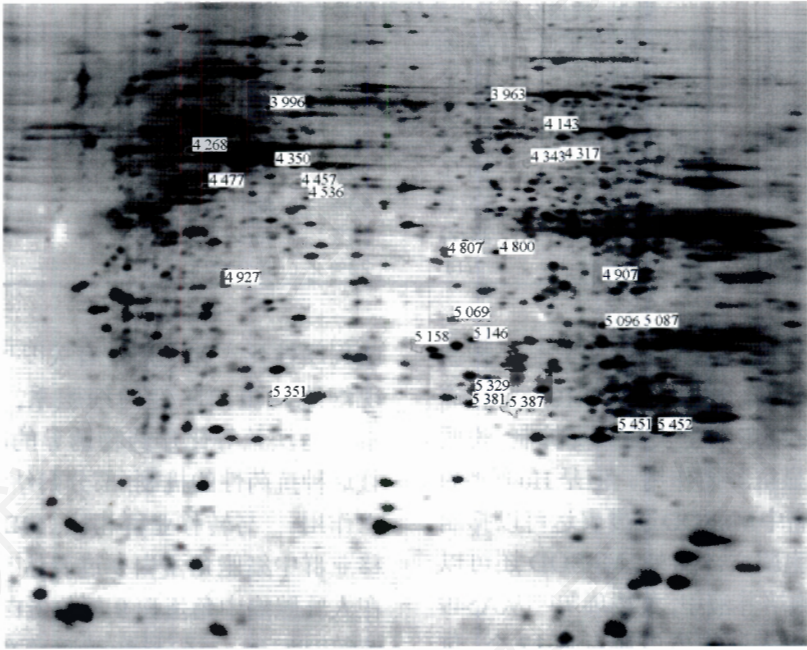


图1 A549 细胞放射前后差异蛋白质点位置图

共获得了 7 张肽质量指纹图(PMF)。利用 Matrix Science 的 Mascot 查询软件搜索 NCBI 数据库, 发现有统计学意义的蛋白质结果共 6 个(表 2)。

3 讨论

肿瘤细胞的生命活动是一个复杂的过程, 需要有多种基因、多种蛋白质的共同参与, 才能成功地完成其增殖、侵袭。而蛋白质是生命活动的最终执行体, 只有了解了放射所引起的肿瘤细胞的蛋白质的变化, 才能确定其对放射发生的反应, 对差异蛋白质的功能进行研究证实, 从而寻找与预后及放射敏感性相关的蛋白质。

蛋白质组学的目的就是从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分, 表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间的相互作用与联系, 揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律^[2]。传统的蛋白质研究注重研究单一蛋白质, 而蛋白质组学注重研究参与特定生理或病理状态的所有蛋白质种类及其与周围环境(分子)的关系。这为我们研究肿瘤的早期诊断问题及个性化的治疗、治疗疗效及预后的判定提供了新的研究方法。

本实验检测出锰超氧化物歧化酶 B 亚型前体(manganese superoxide dismutase isoform B precursor, MnSOD isoform B precursor)、角蛋白 8 (keratin 8)、角蛋白 9 (keratin 9)、dystrobrevin、不均一核糖核蛋白 H1 (HNRPH1)、烯醇酶化 1 (enolase 1)等 6 种

表 1 A549 细胞放射前后 2-DE 差异蛋白质表达

序号	差异点编号	放射前表达强度	放射后表达强度
1	5 452	0.136±0.002	0.220±0.007
2	5 451	0.059±0.002	0.101±0.004
3	5 387	0.031±0.001	0.016±0.003
4	5 381	0.125±0.014	0.051±0.022
5	5 351*	0.013±0.006	0.029±0.004
6	5 329	0.065±0.006	0.020±0.016
7	5 158	0.012±0.003	0.027±0.003
8	5 146	0.762±0.004	0.036±0.009
9	5 096	0.028±0.008	0.062±0.007
10	5 087	0.106±0.021	0.277±0.040
11	5 069	0.031±0.003	0.013±0.003
12	4 927*	0.006±0.002	0.018±0.002
13	4 907*	0.004±0.002	0.033±0.016
14	4 807	0.013±0.002	0.033±0.004
15	4 800	0.023±0.002	0.053±0.005
16	4 536*	0.009±0.001	0.021±0.001
17	4 477	0.010±0.003	0.032±0.005
18	4 457*	0.007±0.002	0.022±0.002
19	4 350	0.040±0.002	0.076±0.010
20	4 343*	0.025±0.005	0.008±3.58E-04
21	4 317	0.041±0.009	0.016±0.002
22	4 268	0.014±0.006	0.027±0.004
23	4 143*	0.037±0.009	0.004±0.005
24	3 996	0.020±0.002	0.037±0.003
25	3 963	0.037±0.001	0.030±0.004

* 放射前后表达强度变化 2 倍以上蛋白质点。

蛋白质在放射前后发生了显著的变化。目前认为 MnSOD 与放射密切相关, 大量的体外和体内试验证实 MnSOD 对正常组织有保护作用^[3-5], 它可以抑制正常组织细胞对电离辐射诱导的凋亡^[6,7]。而 MnSOD

表 2 质谱分析及生物信息学检索鉴定的蛋白质

序号	样品编号	蛋白质编号	相对分子量 / 等电点	匹配肽段	覆盖率	蛋白质名称	功能
1	5 351	gil67 782 309	20 882/8.36	5/22	26%	锰超氧化物歧化酶 B 亚型前体	抗氧化
2	4 907	gil453 155	62 178/5.14	7/21	17%	角蛋白 9	细胞骨架
3	4 927	gil119 621 727	38 354/5.09	6/15	18%	α -dystrobrevin, isoform CRA_d	信号转导?
4	4 343	gil48 145 673	49 384/5.79	9/21	27%	HNRPH1	RNA 加工和转运
5	4 143	gil4 503 571	47 481/7.01	15/26	43%	烯醇化酶 1	能量代谢
6	4 536	gil55 956 899	62 255/5.14	11/21	28%	角蛋白 9	细胞骨架
7	4 457	gil62 913 980	41 083/4.94	7/11	22%	角蛋白 8	细胞骨架

对肿瘤细胞的作用有分歧,周锐^[8]等认为它是一种新兴的肿瘤抑制剂,用腺病毒介导 MnSOD 转染肺腺癌细胞 A549,发现 A549 细胞的生长明显受抑制,说明 MnSOD 对 A549 有明显抗肿瘤作用。但是 Hu 等^[9]的研究结果显示在食管癌中 MnSOD 过度表达可以抑制化疗药物诱导的癌细胞凋亡。另外, MnSOD 还可以被肿瘤细胞分泌到细胞培养液中,黄凌瑾等^[10]从 A549 细胞培养上清中测定出人属的蛋白质点有 17 个,包括 α 肌动蛋白、 γ 肌动蛋白、 α 烯醇化酶(ENO1)、MnSOD、谷胱甘肽 S 转移酶 P (GSTP1-1)、dihydrodiol dehydrogenase 2 (DDH)、磷酸甘油酸变位酶 1 (PGAM1)、葡萄糖依赖性胰岛素释放肽受体(GIPR)、肽基脯氨基顺反异构酶(PPIA)、磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)、蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5)、peroxiredoxin 1 (PDXI)、galectin-1 及专利蛋白 WO0222660 等,该研究为非小细胞肺癌早期诊断标志物的筛选提供了新的方法和候选分子。本实验中 MnSOD 在放射后表达升高,其作用是保护肿瘤细胞对放射发生抵抗,还是为了抑制肿瘤细胞的生长,需进一步研究其与剂量、时间的关系,从而明确其作用。

而角蛋白 8、角蛋白 9、dystrobrevin、HNRPH1、烯醇化酶 1 在放射所引起的反应中的具体作用还未明确。文献报告显示^[9], α 烯醇酶的主要功能有调控缺氧诱导因子、核呼吸因子,参与糖分解酶的调控。研究表明^[11],多种核内不均一核糖蛋白活跃于各种不同的 RNP 复合体中,在转录调节、前体 mRNA 剪接、mRNA 输出、mRNA 降解等多种生物过程中担当重要角色。Dystrobrevin 是种细胞骨架蛋白,dystrobrevin 位于胞浆内,是 dystrophin-糖蛋白复合物(dystrophin associated protein glycoproteincomplex, DAPC)重要组成成分,研究表明^[12],神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric-oxide synthase, nNOS)通过 α -dystrobrevin 与 DAPC 相连,在发生 Duchenne 型肌营养不良的肌纤维膜中 nNOS 缺失,提示 DAPC 可能具有传递信号的能力。而角蛋白 8 与信号转导、细

胞程序性死亡和成瘤性有关^[13,14]。Anderson 等^[15]发现细胞角蛋白阳性的细胞系,对米托蒽醌、阿霉素、马法兰等化疗药物诱导的凋亡具有抵抗性,并且这种抗药性的机制,部分归结于细胞角蛋白的抗凋亡作用。与转移亚群相比,MDA-MB435 细胞非转移亚群中细胞角蛋白 9 过表达^[16]。Larkin 等^[17]发现,在人乳腺癌中角蛋白 9 与角蛋白 6B 形成复合体。李荣等^[18]发现,三尖杉酯碱诱导 K562 细胞凋亡时,角蛋白 9 的表达上调。

鉴定出的蛋白质要应用于临床还是一个长久的研究过程,并且目前最常用于蛋白质分离和鉴定的双向凝胶电泳和 MALDI-TOF-MS 仍存在着局限性,我们尚需对初步鉴定的蛋白质进行验证。但这为我们进一步研究其在放射过程中的作用机制,从而从蛋白质水平诠释放射的作用打下了基础。

感谢中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所蛋白质组研究分析中心提供实验平台和在实验完成过程中给予的指导和帮助!

参考文献(References)

[1] 夏其昌等. 蛋白质化学与蛋白质组学, 2004, 4: 284
[2] van Wijk KJ. *Plant Physiol*, 2001, 126: 501
[3] 梁利波等. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25: 17
[4] Epperly MW *et al. Biol Blood Marrow Transplant*, 2002, 8: 175
[5] Epperly MW *et al. Gene Ther*, 2000, 7: 1011
[6] 孙 娟等. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30: 26
[7] Zwacka RM *et al. Hum Gene Ther*, 1998, 9: 1381
[8] 周 锐等. *中国现代医学杂志*, 2004, 14: 58
[9] Hu Hai *et al, Chin Med J*, 2007, 120: 2092
[10] 黄凌瑾等. *癌症*, 2006, 25: 1361
[11] 黄 嘉等. *细胞生物学杂志*, 2004, 26: 377
[12] Bredt DS. *J Cell Sci*, 2003, 116: 9
[13] Oshima RG *et al. Cancer Metastasis Rev*, 1996, 15: 445
[14] 李 涛等. *现代泌尿外科杂志*, 2005, 10: 75
[15] Anderson JM *et al. Clin Cancer Res*, 1996, 2: 97
[16] Sloan DD *et al. Am J Pathol*, 2004, 164: 315
[17] Larkin A *et al. J Immunol Methods*, 2005, 303: 53
[18] 李 荣等. *中华血液学杂志*, 2004, 25: 323

Detection and Analysis of Proteomic Patterns of Human Adenocarcinoma Cell Lung Cancer A549 Treated with Radiation

Xiang-Lan Li¹, Jin Chang¹, Hong-Tao Hu¹, Qing-Shan You*, Yu-Yan Ma²

(¹Department of Radiation Oncology, ²Tumor Institute, Tumor Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract To screen differential expression protein of human lung adenocarcinoma cell A549 treated with radiation and to discuss the role of these proteins. Differential expression protein in A549 cell treated with radiation were screened by 2D-PAGE and identified by MALDI-TOF-MS. Twenty-five differential expression protein spots were found in A549 cell treated with radiation by 2D-PAGE, and the six proteins (manganese superoxide dismutase isoform B precursor, keratin 9, dystrobrevin, HNRPH1, enolase 1, keratin 8) were identified by MALDI-TOF-MS. The differential expression protein between the treated with radiation by 2D-PAGE relate to antioxidation, radioprotection, signal transmission, RNA processing and transferring, cell apoptosis. It is possibly significance for explaining molecule mechanism of the responds of cell to radiation.

Key words lung cancer; radiotherapy; differential expression protein; 2D-PAGE; human lung cancer cell A549

Received: June 5, 2008

Accepted: July 18, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-451-86298535, E-mail: youqs@sina.com

The Anatomical Record 征稿简则

被美国《科学引文索引》(Science Citation Index, SCI)收录的 *The Anatomical Record* (AR) 是一本具有百年历史的、在美国本土出版的老牌生物医学月刊杂志。

近年来, AR 开始关注中国学者的投稿, 并欢迎来自中国高水平的论文。为此, AR 主编、犹他大学教授 Kurt H. Albertine 博士专程访华, 聘请浙江大学基础医学院李继承教授为 AR 副主编, 负责中国区的征稿、组稿、审稿、指定稿件评审人和稿件录用等。

AR 优先发表细胞和分子生物学论著, 尤其欢迎: (1) 细胞和分子生物学在形态学和功能学方面的新发现; (2) 由于基因缺损、活化、过度表达等对于细胞、组织和器官结构造成的形态学的新发现和功能改变; (3) 通过影像模式做出的新发现、新进展等稿件。

AR 不收版面费及彩版费, 稿件刊出率为 30%~45%, 编辑部从收到作者来稿到决定录用或退稿最快时间为一个月。来稿具体要求请参阅 *The Anatomical Record* 网页: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/grouphome/ForAuthors.html>。

来稿请以网上投稿的方式提交。首先请在以下网页免费建立个人账号: <http://mc.manuscriptcentral.com/ar-wiley>

AR 目前正在组稿编辑淋巴学(lymphology)专刊和干细胞(stem cells)专刊(论文要求与 AR 以往各期一致), 并定于 2008 年 11 月 14 日~16 日召开征稿讨论会, 专刊预期于 2009 年出版, 热诚欢迎相关内容的来稿。具体通知可参见 www.zjscb.org。

鉴于部分中国作者英语写作水平有限, 不能及时将科研成果发表于国际期刊, AR 中国区办公室决定, 组织精通中英双语的留美专家、学者, 帮助英语写作困难的作者将论文整理并翻译成适合发表的英文论文, 推荐给 AR 发表。

The Anatomical Record 中国区办公室地址: 浙江大学医学院 56 号信箱, 邮编 310058; 电话: 0571-88208153; 传真: 0571-88208094; E-mail: anatomicalrecord@zju.edu.cn。

The Anatomical Record 中国区办公室

2008 年 6 月