

双向凝胶电泳 - 飞行时间质谱法分析促癌剂 TPA 诱导 NIH3T3 细胞表达变化的蛋白质

江培洲¹, 甘明², 沈新明¹, 黄华¹, 李欣¹, 姚开泰¹

(1. 第一军医大学肿瘤研究所, 广东广州 510515; 2. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】寻找并鉴定在 TPA 处理后小鼠成纤维细胞 NIH3T3 中表达发生变化的蛋白质, 为阐明 TPA 在诱导细胞发生生物学变化的作用机制提供线索。【方法】用 TPA 刺激 NIH3T3 细胞, 分别提取实验组和对照组的 NIH3T3 细胞的总蛋白质, 通过聚丙烯酰胺凝胶双向电泳, 硝酸银染色后用软件分析寻找差异表达的蛋白质, 并对差异蛋白质进行质谱鉴定。【结果】软件分析显示 TPA 处理后的 NIH3T3 细胞中有明显的差异表达蛋白质, 质谱鉴定表明 TPA 处理后, 表达上调的蛋白质有线粒体基质蛋白 P1 前体、微管蛋白 beta-5 链; TPA 处理后明显表达下调的蛋白质有 galectin-1、N-myc 下游调节基因 1 蛋白。【结论】TPA 刺激 NIH3T3 细胞后可以下调生长抑制基因的表达, 同时上调与细胞增生相关基因的表达。因此, 促癌剂 TPA 可能对 NIH3T3 细胞有促进增生的作用。

关键词: 蛋白质组学; 聚丙烯酰胺双向凝胶电泳; TPA; 基因表达; 质谱

中图分类号: Q26, Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0024-05

Analysis of Proteins with Altered Expression Induced by Tumor Promoter TPA in NIH3T3 Cells by Two-Dimensional Electrophoresis and MALDI-TOF-Mass Spectrometry

JIANG Pei-zhou¹, GAN Ming², SHEN Xin-ming¹, HUANG Hua¹, LI Xin¹, YAO Kai-tai¹

(1. Cancer Research Institute, The First Military Medical University, Guangzhou 510515 China;

2. Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 Phorbol ester-TPA, which is closely associated with tumorigenesis as a promoter, can induce complicate biological changes in cells by unknown mechanism. The aim of this study was to find out and identify the proteins with altered expression in mouse fibroblast-NIH3T3 cells after TPA treatment, and provide clues to clarify the molecular mechanism of biological changes induced by TPA. 【Method】 The total proteins were extracted from NIH3T3 cells of experiment group and control group, and the proteins with altered expression were detected by analysis with software following 2-D PAGE and silver staining. Then those different proteins were identified by mass spectrometry. 【Result】 There were obviously some proteins with altered expression in NIH3T3 cells after TPA treatment. Identification by mass spectrometry showed that TPA can upregulate the expression of proteins--“mitochondrial matrix protein p1 precursor” and “tubulin beta-5 chain”, and downregulate the expression of proteins--“galectin - 1” and “NDRG1”. 【Conclusion】 TPA can induce NIH3T3 cells to

收稿日期: 2003-05-14

基金项目: 广东省十五攻关项目基金资助项目(A1080201); 国家 973 科研基金资助项目(2001CB510208)

作者简介: 江培洲(1975-), 男, 江西九江人, 博士, 讲师. E-mail: JPZGMDXX@hotmail.com

downregulate the expression of growth inhibition genes, and upregulate the expression of some genes associated with proliferation. The treatment with tumor promoter TPA can contribute to proliferation of NIH3T3 cells.

Key words: proteomics; 2-D polyacrylamide gel electrophoresis; 4-O-methyl-12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA); gene expression; mass spectrometry.

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(1): 24-28, 62]

伏波醇酯 TPA(4-O-methyl-12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate)是从巴豆油中提取的一种酯类化合物,在体外能抑制细胞生长^[1]和诱导白血病细胞的分化^[2],此外,它还能增强细胞对病毒的易感性^[3,4]并且作为促癌剂被研究者们广泛地用于癌症的研究中^[5],但其作用机制至今尚未阐明。以往研究 TPA 的作用仅针对信号传导的某些途径^[6-8]。最近有人用微阵列(microarray)^[9]技术分析了 TPA 对细胞作用前后的基因表达谱差异,但生物体功能的主要执行者是蛋白质,核酸水平的改变不能完全反映细胞内蛋白质的变化情况,在蛋白质水平进行生物性能研究能更准确阐明细胞内各种变化机制。因此,我们运用蛋白质组学方法寻找 TPA 作用前后细胞差异表达的蛋白质,为明确其诱导细胞生物学变化的机制提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 蛋白质抽提试剂盒、BCA 试剂盒、固相 pH 梯度干胶条(pH4~7,17cm)、泡胀液均为美国 BioRad 公司产品,二硫代苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPA 及基质(α -胍基-4-羟基肉桂酸)均为 Sigma 公司产品,乙腈(ACN)购自 Fisher 公司,三氟醋酸(TFA)购自 Fluka 公司,胰蛋白酶(trypsin, modified, sequencing grade)购自 Boehringer 公司。

1.1.2 实验细胞 NIH3T3 细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。

1.1.3 主要仪器 IPG 等电聚焦仪(Biorad 公司)、垂直板电泳槽(北京六一公司)、真空离心干燥机 SpeedVac (Savant)、M@LDI R 型飞行时间质谱仪(Micromass 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞处理 NIH3T3 细胞用完全培养基 DMEM + 100 mL/L 小牛血清 + 双抗(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素),置于 37 °C 二氧化碳培养

箱培养,当所有细胞接近满瓶时消化,全部混匀后等份分瓶并分成实验组和对照组两组。当培养接近 60% 面积,实验组加入 8 nmol/L 的 TPA 溶液(溶质为 TPA,溶剂为 DMSO(dimethyl sulfoxide)),对照组加入等体积的 DMSO,共同培养 24 h。

1.2.2 蛋白质提取 按蛋白质抽提试剂盒操作说明,分别抽提实验组即经 TPA 处理和对照组即未经 TPA 处理的 NIH3T3 细胞总蛋白质。按 BCA 试剂盒操作说明分别测出各组蛋白质的浓度,两组细胞蛋白质各取 400 μ g 分别上样。

1.2.3 双向凝胶电泳 按照 PROTEAN IEF CELL 操作说明进行。细胞总蛋白与泡胀液混合至总体积 300 μ L 后注入 IPG 胶条泡胀槽中,上面覆盖 IPG 胶条,置于室温泡胀 12 h 左右。待 IPG 完全吸收溶液后转入:①等电聚焦仪上进行第一向等电聚焦:500 V,30 min;5 000 V,3 h;10 000 Vh,80 000 V。等电聚焦结束后,依次置入 IPG 平衡液 I (6 mol/L Urea, 20 g/L DTT, 300 ml/L Glycerol, 0.05 mol/L Tris-HCl pH6.8, 20 g/L SDS, 痕量溴酚蓝)、平衡液 II (6 mol/L Urea, 25 g/L 碘乙酰胺, 300 mL/L Glycerol, 0.05 mol/L Tris-HCl pH6.8, 20 g/L SDS, 痕量溴酚蓝)中各 15 min。②第二向 SDS-PAGE 电泳按蛋白质电泳^[10]:制备 130 g/L 聚丙烯酰胺分离胶,将已平衡好的 IPG 胶条置于凝胶顶层,2.5 g/L 的琼脂糖封顶,按每块胶 20 mA 进行连续的 SDS-PAGE 恒流电泳。实验组与对照组同步进行以上 IPG 胶条泡胀及双向电泳步骤。实验在相同的条件下重复 3 次。

1.2.4 银染显色 400 mL/L 乙醇、100 mL/L 冰醋酸固定 1.5 h,68 g/L 醋酸钠、300 mL/L 乙醇、2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 浸泡 30 min,纯水漂洗 5 min \times 3 次,2 g/L AgNO_3 染色 20 min,纯水漂洗 1 min \times 2 次,25 g/L 无水碳酸钠、0.4 mL/L 甲醛显色 4 min,50 g/L 冰醋酸 10 min 终止反应,纯水漂洗 5 min \times 3 次,100 mL/L 甘油保存并摄像。

1.2.5 凝胶图象分析 用 Melani 凝胶分析软件比

较两种样品蛋白质电泳图谱,找出差异蛋白质点。

1.2.6 胶内酶切 将银染后凝胶中的蛋白质点切成 $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ 大小的胶块,用含 500 mL/L 乙腈, 25 mmol/L 碳酸氢铵的溶液 $50 \sim 100$ (L 浸泡胶片,振荡 20 min ,弃去溶液。用真空离心干燥机 SpeedVac (Savant) 干燥 20 min ,使胶片完全脱水,加入适量体积酶液 ($0.01 \mu\text{g}/(\mu\text{L})$,含 25 mmol/L NH_4HCO_3), 4°C 冰箱中放置 $20 \sim 30 \text{ min}$,待酶液完全被吸收,补充适量体积 25 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液, 37°C 保温 $16 \sim 18 \text{ h}$ 。

1.2.7 肽指纹图谱鉴定蛋白质 将上述酶切后的凝胶中加入 $10 \mu\text{L}$ 溶液 (1 mL/L 三氟醋酸, 500 mL/L 乙腈),超声提取 20 min ,取 $1 \mu\text{L}$ 提取液与 $1 \mu\text{L}$ 基质(α - 腈基 -4- 羟基肉桂酸溶于 1 mL/L 三氟醋酸、 500 mL/L 乙腈的饱和溶液)混合,点靶分析。质谱仪的氮激光波长 337 nm 。采用促肾上腺皮质激素片段 18-39 (ACTH) 作外标校正。将质谱所测肽质量指纹谱数据输入网络应用程序 PeptideIdent (<http://www.expasy.ch/tools/peptideident.html>) 或 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 进行检索。

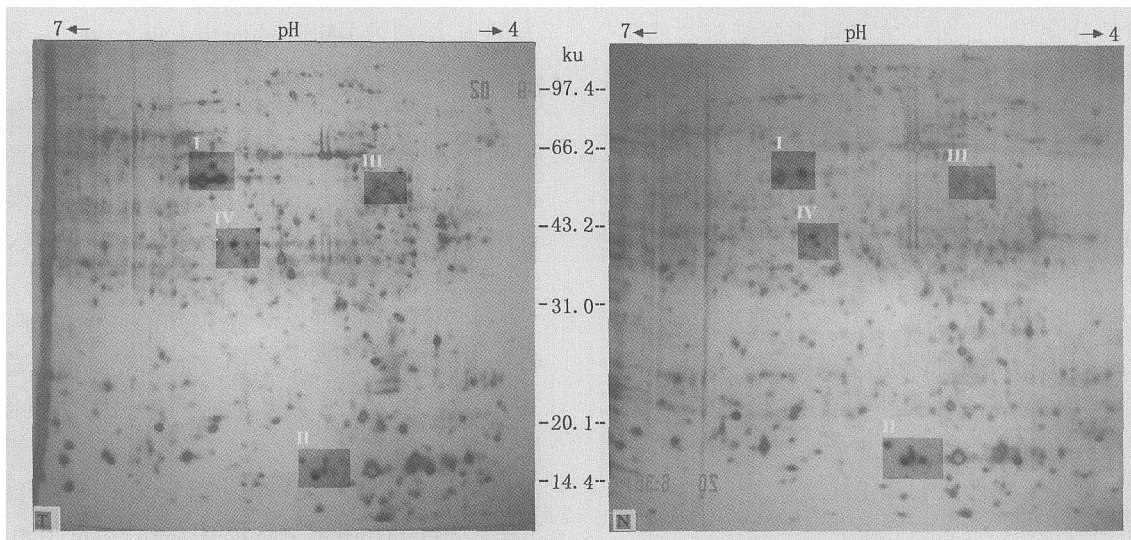


图 1 实验组与对照组蛋白质双向电泳图谱中差异蛋白质分布区域示意图

Fig. 1 The distribution of different proteins on 2D electrophoresis pattern of proteins extracted from experimental and control cells

The left was protein expression pattern of the experimental cells, the right was that of the control cells, and the corresponding shadow area marked with I, II, III, IV showed the location of protein spots with altered expression which were identified successfully by mass spectrometry subsequently

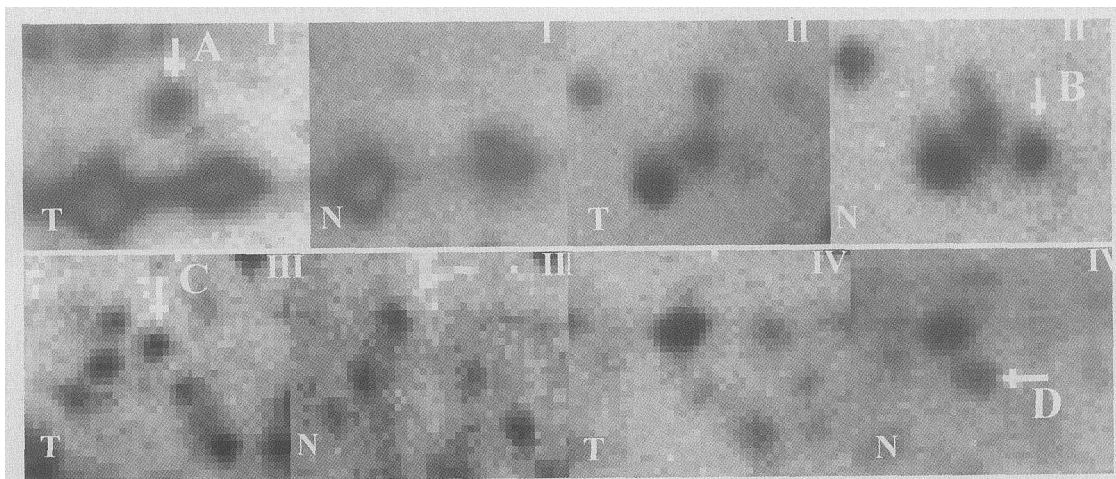


图 2 凝胶图象中差异蛋白质放大示意图

Fig. 2 The different proteins in amplified maps

The 8 small figures above contrasted, amplified the corresponding shadow area in figure 1, and showed four different proteins which were marked as A, B, C, D with white arrows pointing respectively. Figures from experimental and control groups were labeled with letter "T" and "N" at lower left corner respectively

2 结果

2.1 双向电泳图谱及差异蛋白质分析

利用软件分析双向电泳后的 2 组凝胶银染图谱, 寻找出实验组与对照组之间一些明显有差异表达的蛋白质点(图 1, 图 2)。

2.2 差异蛋白质的质谱鉴定

应用 MALDI-TOF-MS 方法对上述差异蛋白质

进行鉴定, 获得肽指纹图谱。与蛋白质数据库匹配鉴定出差异常蛋白质。按图 2 中各差异蛋白质的标注, 蛋白质 A、C 在 TPA 处理后的细胞中表达上调, 分别为“mitochondrial matrix protein p1 precursor”和“tubulin beta-5 chain”; 蛋白质 B、D 在 TPA 处理后的细胞中表达下调, 分别为“galectin-1”和“NDRG1 protein”。图 3 为差异蛋白 A 的质谱分析表及肽指纹图谱。其余蛋白质鉴定见表 1。

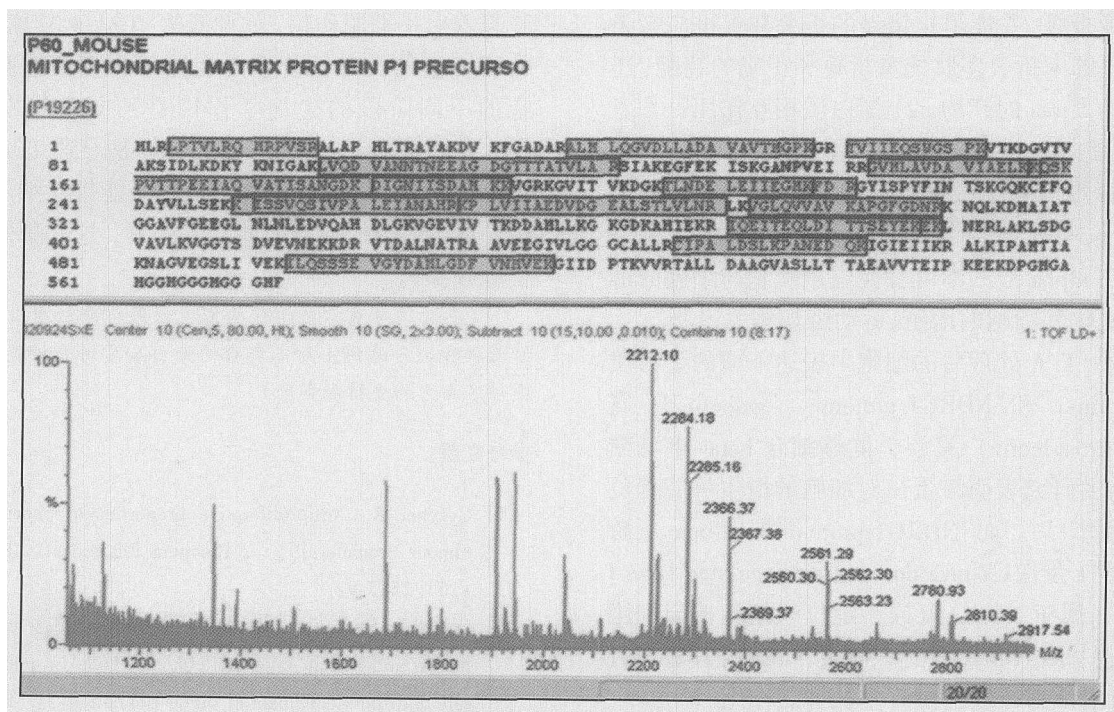


图 3 差异蛋白质点 A 的质谱分析图

Fig. 3 The analysis of protein spot A in figure 2 by mass spectrometry

表 1 MADI-TOF-MS 鉴定 NIH3T3 细胞经 TPA 处理后产生差异表达的蛋白质

Table 1 MADI-TOF-MS identification of proteins with altered expression in NIH3T3 cells after TPA treatment

Spot	Accession NO	Match	Coverage (%)	<i>M_r</i>	pI	Description
A	P19226	25	41.71	60937	6.1	mitochondrial matrix protein P1 precursor
B	P16045	9	70.90	14716	5.4	galectin-1
C	P05218	25	59.68	49652	4.8	tubulin beta-5 chain
D	Q62433	15	34.77	42990	6.0	ndrg1 protein

Accession No: the accession number of protein in database. Coverage (%): the percentage of coverage sequence to whole sequence, Description: the name of the protein, Match: the number of peptides matched with database, *M_r*: relative molecular mass, pI: iso-electric point, Spot-the symbol of different protein spot in this papers

3 讨论

长期以来, TPA 除了在临床用于治疗白血病外, 还一直作为由多环芳香烃启动的小鼠皮肤的肿瘤促进剂^[5]; 此外, TPA 还能促进鼻咽癌相关病毒

(Epstein-Barr 病毒)对细胞的感染^[3,4]。这表明 TPA 作用细胞后引起的信号调控既能诱导细胞分化也能诱导细胞转化, 因此, 其在癌症发生发展中的作用比较复杂, 准确了解 TPA 生物学作用的分子机制对阐明其引起细胞分化及转化的机理有重要意义。

本研究用双向电泳方法显示了 NIH3T3 细胞经 TPA 处理和未经 TPA 处理的蛋白质表达谱,并用质谱鉴定了软件分析所寻找的一些差异蛋白质。结果表明,线粒体基质蛋白 P1 前体 (mitochondrial matrix protein p1 precursor) 和微管蛋白 beta-5 链 (tubulin beta-5 chain) 在 TPA 处理后明显表达上调。线粒体基质蛋白 P1 前体属于分子伴侣 HSP60 家族,定位于线粒体基质,在往线粒体内输入的蛋白质和大分子装配中发挥作用。它有助于输入蛋白质的正确折叠,并能阻止错误的折叠和促进应激条件下产生的未折叠多肽的重折叠和正确的装配,还能与癌基因 ras 的产物 p21 蛋白质相互作用^[11,12]。而微管蛋白 beta-5 链是微管蛋白的主要组成部分。微管蛋白属于微管蛋白家族,能够结合两个 GTP 分子,一个结合在 beta 链的可替换位点,另一个结合在 alpha 链的不可替换位点。它与细胞的形态结构变化和细胞的增殖、运动密切相关^[13,14]。

此外,TPA 处理后的细胞中表达下调的蛋白质有“galectin-1”和“NDRG1 protein”。“galectin-1”属于 galactin(s-lectin) 家族,能够结合 beta-半乳糖苷,目前的研究表明该蛋白对细胞的增生可能起负调节作用^[15-17]。而“NDRG1 protein”即 N-myc 下游调节基因 1 蛋白(N-myc downstream regulated gene 1 protein),属于 NDRG 家族,定位于细胞核与细胞质。当癌基因 N-myc 表达大幅度下调时,其表达会提高,目前认为该蛋白质有生长抑制作用^[18,19]。

本研究发现 TPA 处理 NIH3T3 细胞后,表达下调的蛋白质都对细胞的增生有抑制作用,或者可能通过调控癌基因 N-myc 表达引起 NDRG1 蛋白下调,或者可能通过结合半乳糖苷引起的某些下游信号途径,来抑制细胞生长;而表达上调的蛋白质则与蛋白质合成及细胞增生、形态变化等功能相关,我们推测,TPA 处理细胞后促进蛋白质合成,从而诱导了与蛋白质装配密切相关的分子伴侣“线粒体基质蛋白 P1 前体”表达上调,并且可能通过与癌基因 p21ras 作用引起细胞增殖反应,进而诱导了与分裂相关的微管蛋白高表达。

我们知道,在小鼠的皮肤成瘤实验研究中,用多环芳香烃刺激小鼠皮肤产生遗传改变后,不作任何处理,是不会发生肿瘤的,而经过 TPA 处理后,能在原位发生肿瘤;并且,如果小鼠皮肤不经多环芳香烃刺激而直接用 TPA 处理,亦不会发生肿瘤。这提示了 TPA 可能对遗传学上产生变异的细胞有

促进增生作用,而对正常的细胞没有该作用。本实验选用的 NIH3T3 细胞是来源于鼠的永生化纤维细胞,尽管不是肿瘤细胞,但其永生化特性表明该细胞在遗传特性上已经与正常细胞有很大的变异。结果显示在小鼠成纤维细胞 NIH3T3 系中,TPA 的处理能够下调生长抑制基因的表达,同时上调与细胞增生相关基因表达,进而可能促进细胞增生,这与前人的结果一致。但是,TPA 能诱导人白血病细胞分化和凋亡^[21]的报道又暗示了 TPA 对肿瘤细胞起着生长抑制作用。如此看来,TPA 对正常细胞,肿瘤细胞以及有显著遗传变异的非正常细胞等细胞的不同阶段的生物学作用是不同甚至截然相反。我们推测,某些遗传变异可能是导致 TPA 有如此复杂功能的根本原因。但是也不能排除细胞来源的物种、细胞的类型的差异等因素,这些都需更多实验来探讨。

(感谢军事医学科学院国家生物医学分析中心的钱小红教授和应万涛博士对本实验的蛋白质质谱分析鉴定工作提供了大力的支持和帮助)

参考文献:

- [1] Gescher A. Antiproliferative properties of phorbol ester tumour promoters[J]. *Biochem Pharmacol*, 1985, 34 (15):2587-92.
- [2] Lotem J, Sachs L. Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76(10):5158-62.
- [3] 贺智敏,陈主初,邵细芸,等. EB 病毒对人胚鼻咽上皮细胞的转化 [J]. *中华病理学杂志*, 1996, 25(1): 17-20.
- [4] 李宝民,纪志武,刘振声,等. Epstein-Barr 病毒诱导永生人上皮细胞恶性转化 [J]. *病毒学报*, 1998, 14 (2):133-8.
- [5] Slaga T J, Fischer S M, Nelson K, *et al.* Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77(6):3659-63.
- [6] Johnson K R, Becker K P, Facchinetti M M, *et al.* PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):35257-62.
- [7] Liu L, Schwartz B R, Tupper J, *et al.* The GTPase Rap1

(下转第 62 页 to page 62)

