

文蛤抗癌多肽抑制肝癌细胞 SMMC-7721 差异蛋白质组分析

贺量¹, 范成成¹, 康劲翮¹, 张剑¹,
冷波¹, 石艳¹, 李文岗², 陈清西^{*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建医科大学附属厦门第一医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 为了研究文蛤抗癌多肽对肝癌细胞抑制作用的蛋白表达差异, 寻找并鉴定差异蛋白质, 探讨多肽抑制肝癌细胞的作用机理, 本文通过双向电泳、考马斯亮蓝染色、Merkle 4 双向软件分析、质谱技术 (MALDI-TOF-MS) 和数据库检索分析多肽作用 SMMC-7721 后的差异蛋白质。利用差异蛋白质组方法分析了抗癌多肽对肝癌细胞 SMMC-7721 抑制后的蛋白变化, 找到差异点并进行了质谱鉴定 (MALDI-TOF-MS)。结果表明, 通过对差异蛋白功能的分析, 推测抗癌多肽可能引起了肝癌细胞的凋亡, 为进一步的抗癌多肽抑制肝癌细胞作用的研究提供了理论基础。

关键词: 肝癌; 蛋白质组; 质谱

中图分类号: Q 516

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0083-04

文蛤肉质鲜美, 营养丰富, 且有极高的药用价值。据报道文蛤具有清热利湿、化痰、散结的功效, 对肝癌、肺癌、胃癌、甲状腺肿等也有明显的抑制作用。文蛤抗癌多肽是从文蛤中提取的抗癌物质对多种癌细胞具有抑制效应, 如肝癌细胞 SMMC-7721, 胃癌细胞 BGC-823 黑色素瘤细胞等。本实验室已报道过文蛤抗癌多肽对胃癌细胞 BGC-823 的抑制效应^[1]。抗癌多肽对肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制效果也非常强, 细胞效应实验结果表明, 其对肝癌细胞有较强的抑制作用, 当多肽浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率达到 50.6%。文蛤抗癌多肽是从文蛤中提取的天然产物, 具有良好的药物开发前景。研究其抑制肝癌细胞的分子机理有助于治疗肝癌药物的开发研究。蛋白质组学的兴起为研究抗癌多肽抑制癌细胞的机理提供了很好的技术平台。本文利用蛋白质组学技术初步研究了多肽抑制肝癌细胞的作用机理, 为抗癌多肽抑制肝癌细胞的理论研究及药物的开发研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

肝癌细胞株 SMMC-7721 购自上海细胞所细胞库, 由厦门大学生命科学学院细胞生物学实验室培养传代。实验组为加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的文蛤多肽处理 1.5 d。超纯尿素 (urea), 丙烯酰胺 (acrylamide), 甲叉-双丙烯酰胺 (N, N'-methylenebisacrylamide) 购自 BDASIA, Triton X-100 购自华美公司。十二烷基磺酸钠 (SDS), 二硫苏糖醇 (DTT), CHAPS, 四甲基乙二胺 (TEMED) 和过硫酸铵购自上海生工。低熔点琼脂糖购自 BIO BASIC 公司。两性电解质 (Ampholine) pH 5-8 购自 Amersham Bioscience 公司。HCCA 购自 Fluka 公司。考马斯亮蓝 G250 购自 Sigma 公司。其它试剂均是国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

经过传代培养的肝癌细胞 SMMC-7721 用裂解液^[2], 直接裂解, 裂解情况在显微镜下观察。将制备的细胞裂解悬液转移到 1 mL 离心管中, 室温震荡 1 h, 置于 15 $^{\circ}\text{C}$ 以 15 000 g 离心 1 h。离心后取上清分装保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。制备的样品用 Bradford 法测蛋白浓度^[3]。

1.2.2 第一向等电聚焦胶电泳 (IEF)

自制胶条采用 pH 范围在 3~10 和 5~8 的两性电解质载体混合, 具体方法见文献 [4]。电泳结束后将胶条取出平衡 30 min, 转移到二向进行 SDS-PAGE。

1.2.3 第二向 SDS-PAGE 电泳

采用不连续 SDS-PAGE 12.5% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 用水饱和的正丁醇封胶。将胶条转移后用 0.5%

收稿日期: 2008-08-15

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20063021), 厦门市卫生局资助项目 (WSK0602) 和厦门大学科技创新工程基金 (XDKJCX20043001) 资助

* 通讯作者: chengq@xmu.edu.cn

的低熔点琼脂糖溶解到平衡液中作为固胶液固定. 电泳采用恒流每块胶在浓缩胶时为 10 mA, 当进入分离胶后加大到每板 20 mA. 待溴酚蓝跑到离胶底边缘 1 cm 处停止电泳, 取胶进行染色.

1.2.4 染色及扫描

采用胶体染色检测, 凝胶放入固定液中固定 2 h 在 G250 染色液中染色 24~48 h. 脱色及终止. 试剂及步骤参看文献. 凝胶用 powerlook III 扫描仪进行扫描, 对照组及实验组样品均重复 3 次. 扫描结果用 melanie 4 双向电泳分析软件分析. 对图像进行光滑处理, 背景消减, 斑点检测, 匹配等操作. 以蛋白点的相对体积作为参考因素, 相对体积相差两倍的点作为差异点.

1.2.5 差异蛋白质点的肽质量指纹分析

将选取的差异蛋白质点在图像上做好标记. 用枪头将考染蛋白点切下置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 用含 50% CH₃CN 和 50 mmol/L NH₄HCO₃ 的溶液进行脱色. 重复 3 次直至胶粒无色. 去上清加入 100% CH₃CN 溶液脱水重复 3 次. 胶粒真空离心干燥, 加入 60~70 μL DTT, 57℃ 置于恒温水浴锅 1 h. 去上清加入 40 μL 碘乙酰氨进行烷基化, 避光 1 h 吸出上清液, 加入 50% CH₃CN 和 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液反复吸涨 3 次, 加入 100% CH₃CN 脱水 3 次. 胶粒真空离心干燥. 加入 5~8 μL 胰蛋白酶液, 0℃ 冰盒中放置 30 min 待酶液完全被吸收, 补充 25 mmol/L NH₄HCO₃ 5~8 μL, 37℃ 保温 6~15 h 将萃取液吸出加入到另一 Eppendorf 管中保存, 向含有胶粒的 Eppendorf 管中加入 25 mmol/L NH₄HCO₃ 振荡室温放置 10 min 重复一次, 上清液吸出合并. 加入 5% 三氟乙酸 (TFA) 50% CH₃CN 溶液, 振荡, 室温放置 10 min 重复一次, 与上述萃取液合并. 加入 100% CH₃CN, 振荡, 室温 5 min 重复一次合并上清. 合并以上 6 步萃取液, 真空离心干燥直

至管中无液体. 加入 0.5% TFA 40% CH₃CN 溶液 2 μL 溶解, 取 1 μL 溶解液与 1 μL 饱和基质 α-氰基肉桂酸 (HCCA) 混匀. 用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 进行分析, 获得肽质量指纹图谱.

1.2.6 质谱结果检索

通过搜索引擎 Mascot 进行查询. 查询参数: 物种选择人类 [Homo sapiens (human)]; 胰蛋白酶水解; 漏切位点选择为 1; 固定修饰选择 Carbanilmethyl (C), 可变修饰选择 Oxidation (M); 肽片段相对分子质量误差 ±1u 质量类型 MH⁺ 和单同位素. 进行查询时, 对照杂峰表对干扰峰进行去除, 查询结果以分值表示. 分值大于阈值 (p < 0.05) 时认为匹配结果可信, 结合不同数据库的查询结果最终确定匹配结果.

2 结果与分析

对照组与实验组细胞蛋白样品分别进行了 3 次电泳, 图谱比较稳定, 重复性较好. 蛋白质的分布非常相似, 大部分蛋白点分布在以 pH 4~10 和 Mr 20~97 ku 范围内. 利用 O'Farrell 的方法^[2] 制备蛋白样品使碱性蛋白得到了较好的分离, 提高了碱性端蛋白的分辨率. 但由于 DTT 作为蛋白还原剂使用, 使得碱性端的条纹多于酸性端. 虽然一定程度上影响了碱性端蛋白的分辨, 但就目前来说 DTT 仍然是较理想的, 也是使用最普遍的还原剂. 利用 melanie 4 蛋白图谱分析软件的识别的斑点数分别为: 对照组蛋白图谱斑点为 725 ± 36 实验组图谱蛋白数为 657 ± 10 通过蛋白图谱分析软件分析观察, 确定了 136 个差异点. 对比对照组图谱, 经文蛤抗癌多肽作用后的蛋白图谱有 96 个蛋白点表达下调, 40 个蛋白点表达上调, 如图 1 所示.

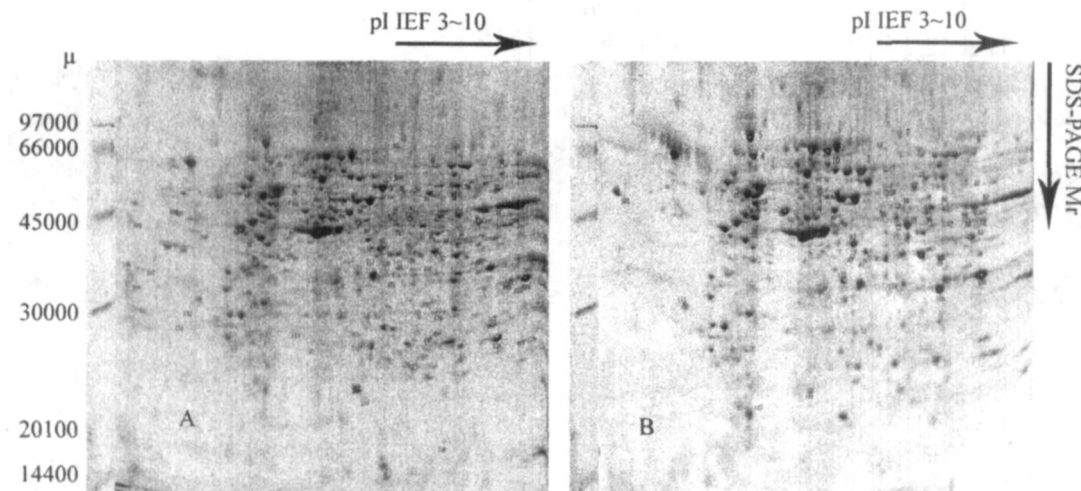


图 1 文蛤抗癌多肽作用肝癌细胞 SMMC-7721 双向电泳图谱 (考染)
A. 未经多肽处理的细胞蛋白图谱; B. 多肽处理后细胞蛋白图谱

Fig. 1. Coomassie blue-stained 2-DE gels loaded with Anti-cancer peptide from the *Mercenaria* SMMC-7721 cell extracts

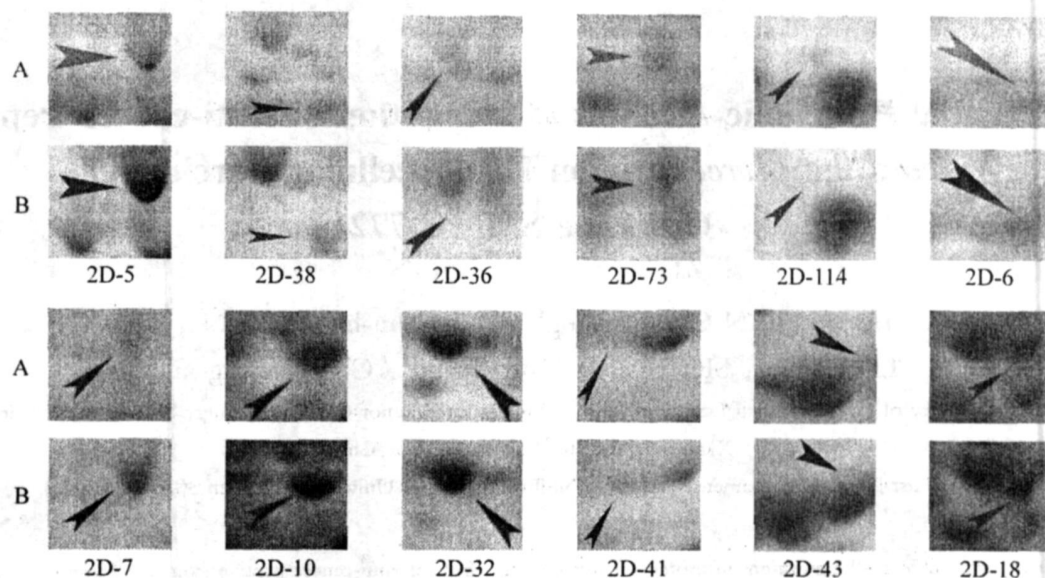


图 2 文蛤抗癌多肽作用肝癌细胞 SMMC-7721 前后的差异点
A. 对照蛋白点; B. 多肽作用后蛋白点

Fig. 2 Differential proteins between SMMC-7721 and SMMC-7721 treated with anti-peptide
A. proteins of SMMC-7721; B. proteins of SMMC-7721 treated with anti-peptide

图 2 为通过对比找到的部分差异点, 通过软件分析计算出相应点的相对体积, 相对体积均相差两倍以上。考虑到样品的上样量、凝胶的染色、染色后的扫描以及对图像处理等许多因素的影响, 所得到的凝胶图谱间不可能完全一致, 即使相同表达量的蛋白在凝胶上也会有深浅的差异。而有些差异较小的点通过肉眼观察不能准确分辨。因此, 需结合凝胶分析软件的分析结果判断差异点。我们目前使用的方法是通过比较两个点的相对体积 (% vol), 即该点转换成体积后的值与该图谱总的点的体积之和的比值。相对体积相差 2 倍以上的点经重复比较确认后确定为差异点。通过软件将点的 vol(体积)值换算成相对值 (% vol)可以更准确反映出该蛋白的表达量, 消除了因上样量或染色的一致引起的误差。目前的主流软件均将 % vol 作为评价蛋白差异的可靠标准。而 % OD 则不能作为参考标准。

将差异点用枪头取出, 进行胶内酶解, 质谱 (MALDI-TOF) 鉴定。得到肽指纹图谱及数据, 对照标准表去除杂质峰、胰酶内切峰和基质峰, 通过 mascot 搜索系统检索 NCBI MSDB, SwissProt 等数据库鉴定蛋白质。鉴定结果以分数表示, 当分数超过阈值 ($p < 0$ 。

05) 表示鉴定结果可信。差异蛋白的鉴定结果显示, 经文蛤抗癌多肽作用肝癌细胞后产生的差异蛋白有与信号转导有关的蛋白 ROR2 蛋白, 细胞应急蛋白 GRP78 等, 可推测文蛤多肽可能是通过引起细胞的凋亡从而达到抑制细胞的生长。

参考文献:

- [1] Leng B, Liu X, Di Chen Q, X. Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BGC-823 cells and several enzymes [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1187-1190
- [2] O' Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. J Bio Chem, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [3] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [4] 贺量, 冷波, 康劲翻, 等. 胃癌细胞 SGC-72901 双向电泳系统的建立及优化 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45 (Sup): 149-151
- [5] Morishina N, Nakanishi K. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 50375-50381.

Differential Proteomic Analysis of Inhibition of Anti-cancer Peptide from the *Mercenaria* on Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721

HE Liang¹, FAN Cheng-cheng¹, KANG Jir-he¹, ZHANG Jian¹,
LENG Bo¹, SHI Yan¹, LIW en-gang², CHEN Qing-xi^{1*}

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

2. The First Hospital of Xiamen Attached to the Fujian Medical University, Xiamen 361004, China)

Abstract To research differential expressions of proteins in response to effect of Anti-cancer peptide from the *Mercenaria* on hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and discuss the mechanism of effect of anti-cancer peptide. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis-coomassie brilliant blue staining, melanie 4.2DE software analysis, peptide mass fingerprinting based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) were used to analyze differential proteins between SMMC-7721 and SMMC-7721 treated with anti-peptide. Differential proteins were identified. Some of them were signal transduction proteins such as Ras-related protein M-Ras and ROR2, ER-elicited response protein GRP78, TCP-1-beta and PDIA5, nucleus lamina protein Lamina A and other proteins such as alpha 1 type X III collagen isoform 4, Alpha-enolase and Zinc finger protein 57. Function of these differential proteins shows that the anti-peptide may induce SMMC-7721 cell line to apoptosis. The research will be useful to further study of the effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the SMMC-7721 cells.

Key words SMMC-7721; proteomic mass