

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: B200226015

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

肿瘤细胞蛋白质组学研究：过表达 MKKs、  
抗肿瘤药物作用和对细菌应答  
的功能蛋白质组学

Proteomics on tumor cells: functional proteomics on  
overexpression of MKKs, mechanism of anti-tumor drug,  
and response to bacterium

张 国 林

指导教师姓名: 彭 宣 宪 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 30 日

论文答辩日期: 2006 年 8 月 8 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 林文雄 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2006 年 6 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士



## 目录

中文目录.....	1
英文目录.....	3
中文摘要.....	6
英文摘要.....	8
<b>第一章 前言</b> .....	<b>10</b>
1.1 蛋白质组、蛋白质组学及其发展历史.....	10
1.2 蛋白质组学分析技术体系及其研究进展.....	11
1.3 蛋白质组学在人类疾病研究中应用.....	24
1.4 肿瘤细胞蛋白质组学研究进展.....	26
1.5 肿瘤细胞信号转导通路.....	30
1.6 p62 研究进展.....	36
1.7 本论文研究的主要内容.....	41
<b>第二章 材料与方法</b> .....	<b>42</b>
2.1 材料.....	42
2.2 方法.....	48
<b>第三章 MAPK 信号转导通路 MAPK 激酶 (MKKs) 功能蛋白质组学</b>	
<b>研究</b> .....	<b>58</b>
<b>第一节 MAPK 激酶的功能蛋白质学研究</b> .....	<b>58</b>
3.1 引言.....	58
3.2 结果与分析.....	58
3.3 讨论.....	68
3.4 小结.....	71
<b>第二节 p38 MAPK 信号通路激酶功能蛋白质学研究</b> .....	<b>72</b>
3.5 引言.....	72
3.6 结果与分析.....	72
3.7 讨论.....	75
3.8 小结.....	81

<b>第四章 抗肿瘤药物对肿瘤细胞作用机制的蛋白质组学研究</b>	82
<b>第一节 HMBA 对人胃癌细胞 BGC-823 生长与分化作用的蛋白质组学研究</b>	82
4.1 引言	82
4.2 结果与分析	83
4.3 讨论	89
4.4 小结	90
<b>第二节 抗肿瘤药物表阿霉素 (Epirubicin) 诱导人肝癌细胞凋亡的分子机制以及 mRNA 结合蛋白 P62 在 EPI 诱导细胞凋亡过程中的作用研究</b>	91
4.5 引言	91
4.6 结果与分析	92
4.7 讨论	119
4.8 小结	138
<b>第五章 Raw 264.7 对大肠杆菌免疫应答的亚蛋白质组学研究</b>	139
5.1 前言	139
5.2 结果	139
5.3 讨论	143
5.4 小结	146
<b>致谢</b>	147
<b>参考文献</b>	148
<b>图表索引</b>	182
<b>缩略语及中英文对照</b>	185
<b>在学期间发表论文</b>	189

## TABLE OF CONTENT

<b>TABLE OF CONTENT (IN CHINESE)</b> .....	1
<b>TABLE OF CONTENT (IN ENGLISH)</b> .....	3
<b>ABSTRACT(IN CHINESE)</b> .....	6
<b>ABSTRACT(IN ENGLISH)</b> .....	8
<b>CHAPTER 1 Introduction</b> .....	10
1.1 Proteome, and proteomics and its development.....	10
1.2 Proteomics methodologies and their development .....	11
1.3 Application of proteomics in human diseases.....	24
1.4 Review of proteomics in cancer research .....	26
1.5 Signal transduction pathways of tumor cells.....	30
1.6 Update on study of p62, a mRNA binding protein .....	36
1.7 Research content of the thesis .....	41
<b>CHAPTER 2 Materials and methods</b> .....	42
2.1 Materials.....	42
2.2 Methods.....	48
<b>CHAPTER 3 Functional proteomics study on effects of overexpression of four MAPK kinases</b> .....	58
<b>Section I Comparative study of effect of four MAPK Kinases: MEK1E, MKK3b, MKK5D and MKK7D on 293T cells using functional proteomics approach</b> .....	58
3.1 Forward.....	58
3.2 Results and analysis.....	58
3.3 Discussion.....	68
3.4 Conclusion.....	71
<b>Section II Comparative study of effect of p38 pathway MKKs: p38<math>\alpha</math>, p38<math>\beta</math>, MK2 and PRAK on 293T cells using functional proteomics approach</b> .....	72

3.5 Forward.....	72
3.6 Results and analysis.....	72
3.7 Discussion.....	75
3.8 Conclusion.....	81
<b>CHAPTER 4 Proteomic study of molecular mechanism anticancer by drugs .....</b>	<b>82</b>
<b>Section I Applying proteomic methodologies to analyze the effect of hexamethylene bisacetamide (HMBA) on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma BGC-823 cells.....</b>	<b>82</b>
4.1 Forward.....	82
4.2 Results and analysis.....	83
4.3 Discussion.....	89
4.4 Conclusion.....	90
<b>Section II Functional proteomics study of anticancer mechanism of epirubicin and the role of mRNA binding protein p62 in the process of apoptosis induced by epirubicin.....</b>	<b>91</b>
4.5 Forward.....	91
4.6 Results and analysis.....	92
4.7 Discussion.....	119
4.8 Conclusion.....	138
<b>CHAPTER 5 Applying subproteomics methodies to study the immunoresponse of macrophage Raw 264.7 cells to EHEC O157 : H7-EDL933 bacterium.....</b>	<b>139</b>
5.1 Forward.....	139
5.2 Results and analysis.....	139
5.3 Discussion.....	143
5.4 Conncclusion.....	146
<b>ACKNOWLEDGEMENT.....</b>	<b>147</b>

<b>REFERENCES</b> .....	148
<b>LIST OF FIGURES AND TABLES</b> .....	182
<b>ABBREVIATIONS</b> .....	185
<b>PUBLICATIONS</b> .....	188

厦门大学博硕



## 摘 要

癌症的发生、发展涉及细胞内极其复杂的分子事件, 肿瘤防治实际上是对这些复杂的分子事件进行干预的过程。信号转导、诱导分化、凋亡、肿瘤免疫是当今肿瘤研究中最重要四个领域。蛋白质组学基础上的研究方法可以定量研究复杂的细胞蛋白质图谱表达变化以及蛋白质-蛋白质之间的相互作用, 可监控不同生理条件下的分子变化过程。本论文采用蛋白质组学和细胞与分子生物学方法较系统对上述问题进行了初步研究, 试图为进一步阐明该过程的分子机制提供基础。

采用比较蛋白质组学、流式细胞术、细胞形态学研究方法等在细胞和蛋白质水平上比较研究了四条主要 MAPK 信号通路的代表激酶 MEK1E、MKK3b、MKK5D 和 MKK7D 过表达对 293T 细胞的影响。结果发现, 转四种激酶基因细胞的形态变化相似, 但是细胞周期变化稍微不同, MKK3b 引起 293T 细胞 S 期停滞, 而其他的 3 种激酶则导致细胞 G<sub>2</sub> 期停滞。四种激酶共引起 293T 细胞 11 个蛋白质表达改变, 但各自的差异蛋白表达谱并不相同。在 11 个蛋白质中, 有 7 个为本论文首次发现与 MAPK 有关。同时, 还比较研究了 p38 信号通路中 p38 $\alpha$ 、 $\beta$  及其下游底物 MK2 和 PRAK 过表达对 293T 细胞的影响, 筛选鉴定了 13 个差异表达蛋白质, 这些蛋白质为本论文首次发现与 p38 信号通路有关。

采用功能蛋白质组学以及细胞分化分析技术研究了抗癌药物 HMBA 对胃癌细胞 BGC-823 的作用, 发现 5mM HMBA 可导致细胞分化, 并首次鉴定到 5 个 HMBA 诱导分化相关蛋白质。

采用亚蛋白质组学技术、Western-blot 技术和细胞凋亡分析技术定性定量地研究了表阿霉素 (EPI) 抗肝癌细胞的分子机制。结果发现, 10 $\mu$ g/mL EPI 显著诱导 SMMC-7721 和 HepG2 细胞发生凋亡。首先研究了 EPI 对 SMMC-7721 细胞总蛋白质表达的影响, 得到 11 个差异表达蛋白。其中有 3 个已经证明与阿霉素或 EPI 诱导细胞凋亡有关。这些蛋白质通过控制细胞骨架以及细胞核酸损伤而诱导 SMMC-7721 细胞凋亡。同时, 还采用亚蛋白质组学方法平行研究了 EPI 对 HepG2 细胞膜、核蛋白质表达的影响, 共鉴定到 18 个差异表达膜蛋白和 11 个差异表达核蛋白。在 29 个差异表达蛋白质中, 有 6 个蛋白质已经被证实是促凋亡蛋白质, 4 个蛋白质为抗凋亡蛋白质, 另外 19 个则为首次发现与细胞凋亡有关,

涉及的细胞生理功能广泛, 主要与细胞骨架、细胞生长代谢有关。这些结果表明, EPI 对两种肝癌细胞的作用机制十分相似, 都是通过打破细胞内促凋亡分子与抗凋亡分子之间的平衡使之发生凋亡而导致肝癌细胞死亡。但是, 两种细胞的发生变化的蛋白质并不完全一致, 提示具有细胞特异性。此外, 采用免疫组化技术和 Western-blot 技术研究发现在 EPI 诱导细胞凋亡过程中 p62 发生从细胞质到细胞核。这种移位说明 P62 很可能在 EPI 诱导细胞凋亡过程中发挥重要作用。

在国际上首次采用亚蛋白质组学方法研究了小鼠腹水瘤巨噬细胞对大肠杆菌的免疫应答过程中膜蛋白变化。结果发现, 大肠杆菌可引起细胞生长减慢, 并具有细胞毒。成功获得了 24 个免疫相关差异表达蛋白。其中 5 个蛋白质为免疫蛋白, 7 个蛋白参与细胞-细菌之间相互作用, 还有些蛋白质与细菌的细胞毒以及扰乱细胞骨架等有生理过程有关。这些结果为进一步阐明巨噬细胞对大肠杆菌的免疫应答机制具有重要价值。

关键词: 肿瘤细胞; 蛋白质组学; 信号转导.

### Abstract

It has come a realization of the complexity molecular events that lead to malignancy and progress of cancer, and therapy of cancer in fact means the interference with such process by anti-cancer drugs. Signal transduction, induction differentiation, apoptosis and tumor immunity are the most important four fields of tumor research. Proteomics-based approaches, which enable the quantitative investigation of both cellular protein expression levels and protein-protein interactions, promise to define the molecules controlling the process under different physiological conditions. In this thesis, proteomics approaches and cellular and molecular biological methods are applied to investigate signal transduction, induction differentiation, apoptosis and tumor immunity, hoping to elucidate the molecular mechanism of such processes.

Comparative proteomics approach, flow cytometry, and morphologic methods are used to study the effect of over-expressions of four MAPK kinases:MEK1E,MKK3b,MKK5D and MKK7D, which represent MKKs of the four main MAPK pathways, on 293T cells at cellular and protein levels. Our results show the similar morphologic change and different cell cycle arrest, in which MKK3b leads to the S phase accumulation, while the other three MKKs lead to the G<sub>2</sub> phase accumulation. Eleven differential expression proteins are screened and identified from 293T cells with four MKKs genes transfections. Of eleven proteins, seven proteins are firstly found to be involved in MKKs in my thesis. At the same time, this study also compares the effect of p38 $\alpha$ 、 $\beta$  and their substrates: MK2 and PRAK, and 13 differential expression proteins are identified to be associated with P38 signal pathway.

Functional proteomics approach and cellular differential analysis techniques are used to characterize the effect of HMBA on the BGC-823 cells, showing that 5mM HMBA can induce the differentiation of BGC-823 cells and firstly identify 5 differential expression proteins

Subproteomics approach combining with Western-blot and apoptosis analysis techniques is used to quantificational and qualitative study the molecular mechanism

of EPI anti liver cancer cells. Results suggest that 10  $\mu\text{g/mL}$  EPI noticeably induces apoptosis of SMMC-7721 and HepG2 cells. 11 differential expression proteins are identified from the whole proteome of SMMC-7721 cells, in which three have been testified to be involved in the apoptosis induced by EPI in previous studies, while the others are novel apoptosis-associated proteins found firstly in this thesis. Furthermore, these proteins may induce the apoptosis of SMMC 7721 cells though disturbing the cytoskeleton system and promoting DNA damage. While the apoptosis of HepG2 cells stimulated by EPI is also parallel studied with subproteomic approach, eighteen membranous proteins and eleven nuclear proteins are identified to be involved in apoptosis, in which, six are proapoptotic proteins, and four are antiapoptotic proteins, the other nineteen proteins are novel apoptosis-associated proteins which play the important role in extensive cellular events such as cytoskeleton, growth, metabolize and or so. Comparison shows that SMMC 7721 cells and HepG2 cells share similar apoptotic mechanism and undergo the marked apoptosis through breaking the balance between proapoptotic and antiapoptotic regulators of apoptosis pathways after EPI stimulation. However, their apoptosis-associated protein spectrum is different. In addition, P62, a mRNA binding protein, is found to translocate from cytoplasm to nuclei in both cell lines during the procession of apoptosis caused by EPI with immunohistochemistry and Western-blot. The translocation suggests that P62 play some important roles in the apoptosis induced by EPI.

In this thesis, subproteomics approach is firstly applied to investigate the change of membranous proteins of RAW 264.7, macrophage cell, in response to EHEC O157 : H7-EDL933. Cells death and growth arrest are observed after incubation with *E. coli* for 6 hours, and 24 differential membranous proteins are identified with proteomics approach, in which five are immuno-related proteins, and seven are involved in interaction between cells and bacterium, the others are involved in various process, which provides useful data for further understanding of a molecular mechanism of immunoresponse between cell and bacterium.

Key words: Tumor cells; proteomics; signaling transduction.

## 第一章 前言

### 1.1 蛋白质组、蛋白质组学及其发展历史

20 世纪 90 年代以人类基因组计划为核心的各种基因组工程产生了大量的基因序列。然而,如此海量的基因序列信息却远不足于阐明生物体复杂的生理功能。主要原因在于:(1)蛋白质是生命的直接体现者,而转录剪接、转录后修饰、翻译后修饰以及蛋白质亚细胞的定位不同都将导致一个基因编码多个蛋白质产物。人类基因组中 30,000 个基因可以编码 100,000 多个不同的蛋白质;(2)单纯的 DNA 密码子也不能提示蛋白质之间的互相作用以及蛋白质的功能;(3)基因序列难以回答蛋白质群体改变引起的细胞行为。这都需要在生命功能体现者——蛋白质水平上直接进行系统生物学研究。

蛋白质组的概念是由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 等人于 1995 年提出 [1]。蛋白质组概念是与基因组相对应的,"proteome"一词源于"protein"与"genome"的杂合。经过长期的争论和探讨,现在蛋白质组的最为大家接受的定义是:蛋白质组是一个空间和时间上动态变化着的整体,它指的是在特定的生理条件下,一个基因组、细胞或者组织表达的全部蛋白质。其中细胞整个一生所表达的蛋白质的总和成为功能蛋白质组,而基因组理论编码的蛋白质总和则成为结构蛋白质组。蛋白质组学(proteomics)就是在整体水平上研究蛋白质组的组成及其活动规律的一门新兴科学。研究不同时空发挥功能的特定蛋白质群,采用系统生物学策略整体、动态、高通量地研究蛋白质的作用模式、功能机制、调节控制以及蛋白质群体内相互作用,从而在蛋白质层次上揭示生命活动的基本规律。当前的蛋白质组学总体可以归为两类:一类是结构/表达蛋白质组学(structural/expression proteomics)。它着力于穷尽不同条件下,不同组织、细胞和体液的全部表达蛋白质,定量鉴定不同疾病状态下的蛋白质表达模式。这最符合蛋白质组学本义,在促进蛋白质组学技术体系发展和革新中起重要作用。另一类就是功能/细胞图谱蛋白质组学(functional/cell mapping proteomics)。功能蛋白质组和功能蛋白质组学概念分别由 Humphery-Smith 和我国学者创造性提出[2-3]。它致力于研究特定蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA/RNA 之间的相互作用以及翻译后修饰,蛋白质的亚细胞定位以及结构和功能,构建组成细胞内信号通路的复杂网络图。这是当前最为广泛的研究领域,也是蛋白质组学研究的最主要目标。它促进了蛋白

质组学研究策略的发展。

尽管蛋白质组学研究在上世纪末才兴起,但是它的技术体系积累却经历了近一个世纪的时间如表1-1[4-5]。

**表1-1 蛋白质组学技术体系发展历史**

1899年, 英国科学家Thompson首次描述了质谱技术;
1970年, 双向电泳(2D-PAGE)技术首次被用于分离大肠杆菌蛋白质;
1986年, 第一个蛋白质知识数据库Swiss-prot建立, 该数据库从1987年由欧洲研究所包括Geneva大学的医学生物化学系负责维护;
1988年, Tanaka与其合作者首先描述了基质辅助激光解吸离子化(MALDI)技术, 并利用该技术分析生物大分子;
1988年, 美国国立卫生研究院建立Entrez, 它成为大多数数据库包括蛋白质和遗传数据库的数据搜索和提取系统;
1989年, Fenn与其同事们将电喷射离子化技术应用于生物分子分析;
1989年, 肽指纹谱技术(PMF)建立并被用于快速、高效地鉴定凝胶电泳分离到的蛋白质, 但是由于需要专门的仪器而一直使用较少;
1992年, MALDI-MS技术基础上的相关仪器商品化, 加速肽指纹谱技术的发展;
1996年, 开始噬菌体病原蛋白质相互作用研究;
1999年, 同位素编码的亲标记技术被用于定量分析蛋白质中的混合物;
2001年, 一系列高度灵敏的检测技术出现, 包括差异凝胶二维电泳(DIGE), 它利用荧光标记、分离混合物中的蛋白质; 采用表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF)质谱和蛋白质阵列技术高通量地筛选血清蛋白诊断因子;
2001年, 全世界范围内人类蛋白质组组织(www.hupo.org)形成了协调、整合的蛋白质组研究;
2002年, Fenn和Tanaka分别由于发现电喷射离子化和MALDI而被授予诺贝尔奖;
2003年, 免疫去除技术(immunodepletion techniques)得以改进并常规化, 为低丰度蛋白质研究开启可道路;
2003至2006年, 先后构建病原菌、寄生虫和病毒等病原蛋白质相互作用网络图谱以及酵母、果蝇、蠕虫和人类细胞蛋白质相互作用网络。
2006, Tytus Bernas提出细胞组学(Cytoics)概念, 开辟了蛋白质组学研究的新领域。

自Bernas T. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006;5:2-13,和 Kanallaris M and Marshall GM *Med J Aust*, 2005;182:575-579.

## 1.2 蛋白质组学分析技术体系及其进展

蛋白质组学研究的技术体系主要包括3大技术: 采用凝胶或非凝胶方法从样品中分离蛋白质; 采用质谱与非质谱技术和生物信息学为核心的技术体系鉴定差异蛋白质。图1-1是个典型的蛋白质组学技术分析流程

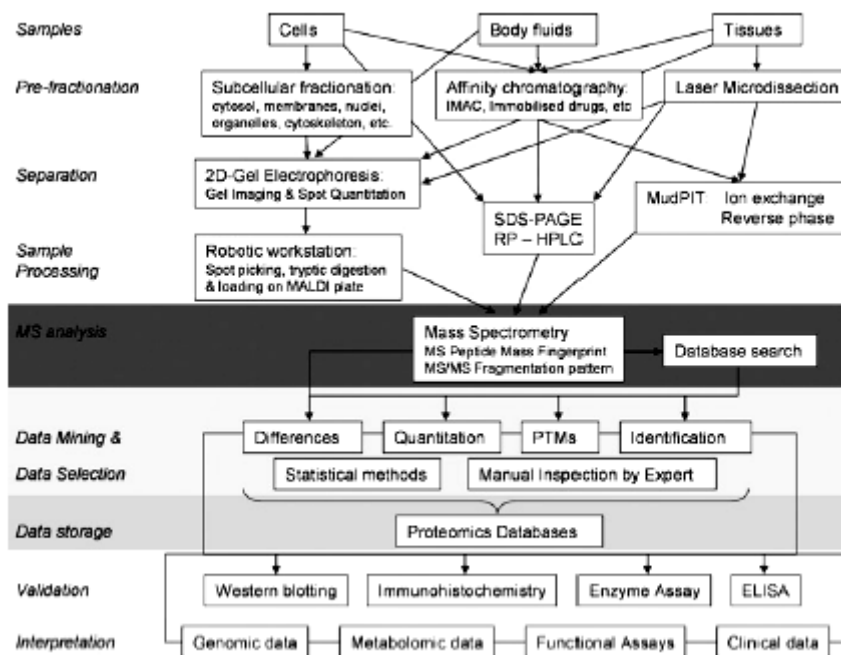


图 1-1 蛋白质组学研究基本流程

引自 Kolch W等 Clinical Science 2005; 108:369-383.

## 1.2.1 蛋白质组分离技术

初提的生物样品提取必须经过进一步分离才能进行后面的鉴定以及功能分析。当前对蛋白质组学分离技术主要分为两大类：双向凝胶电泳技术和非双向凝胶电泳技术

### 1.2.1.1 双向凝胶电泳基础上的蛋白质组分离技术平台

双向凝胶电泳技术（2-DE）是最主要的蛋白质组分离技术。1975年由 O’Farrell 创立[6]，它的第一向是根据蛋白质等电点进行聚焦分离（IEF），第二向是根据分子量大小用 SDS-PAGE 分离蛋白质。由于是对蛋白质两个相互独立的性质进行分离，所以 2-DE 是分辨率最高的一种高通量蛋白质分离技术，也是蛋白质组学研究中最主要最常规的分技术。采用 2-DE 可以在每块胶上分离 1500-3000 个蛋白点，这是当今所有二步分离方法中最为有效的方法。依靠放大胶技术增加 pH 范围，甚至可以分离 5000-11000 个蛋白点[7]。

30 多年来，人们在重复性和分辨率方面对 2-DE 进行了一系列的改良。其中最重要的一个改良是 Gorg 于 1998 年发展的宽范围固相 IPG 胶条，它不仅极

大地增加了 2-DE 的上样量、重复性和分辨率, 而且将碱性蛋白的分离范围扩大到 pH 12[8]。

2-DE 另一个具有重大意义的改良是二维差异凝胶电泳技术 (2D-DiGE) [9-11]。2D-DiGE 是一种多重分析技术, 在双向电泳前的蛋白质样品制备过程中, 分别用红色 (Cy3) 和绿色 (Cy5) 荧光染料共价标记样品。同时用蓝色 (Cy2) 荧光标记混合样品作为内标, 然后将 3 种荧光标记的样品混合在一起进行 2-DE 分离, 在 3 种不同波长下, 分别对 3 种样品显色。与普通的 2-DE 相比, 2D-DiGE 具有许多优点: 首先所有样品在同一块凝胶上分离, 避免了电泳条件不同而导致的差异, 极大程度上克服了 2-DE 的重复性差的问题; 其次它采用共同内标也提高了胶内比较效率; 第三在非常宽的浓度范围内, 荧光信号呈线性关系, 每个点都有自己的内标, 因而定量非常准确; 第四荧光染色的敏感性非常好, 相较银染, 它可与质谱完全兼容。2D-DiGE 在肿瘤蛋白质组学研究中被广泛应用, 是发现肿瘤细胞特异性分子和鉴别肿瘤标记物的重要工具。

亚细胞定位有助于阐释蛋白质的功能。将富集特定亚细胞结构的传统生物化学分级技术同质谱和生物信息学的高通量鉴定技术结合起来, 便产生了一个结合了细胞生物学和蛋白质组学的新策略即亚细胞蛋白质组学 (subcellular proteomics) [12]。亚细胞蛋白质组学是亚细胞结构水平上的蛋白质组学, 将传统的生物化学分级方法与蛋白质的综合鉴定相结合。这个策略不仅可以筛选未知基因产物, 而且还能够将这些基因产物以及其他性质不完全清楚的已知蛋白质共同定位到特定的亚细胞结构上。细胞的蛋白质组可能含有百万个不同种类的蛋白质, 因而任何额外的纯化步骤都将增加分离的蛋白数。对此, 电泳前亚细胞分级将是个可增加分离效率, 同时它还额外提供蛋白质的亚细胞定位信息。因而, 2-DE 与亚细胞分级的联合使用对绘制生物图象和疾病治疗非常有用。

激光捕获微切割技术 (laser capture microdissection LCM) 和 2-DE 联合使用可解决的生物组织尤其是肿瘤组织样品蛋白质分离中的异质性问题。组织样品许多不同类型的细胞混杂在一起, 获得足够的单纯细胞对于 2-DE 来说非常重要, 而常规手段很难获得足够量的纯细胞进行蛋白质组学分析。LCM 最近被应用到肿瘤蛋白质组研究中的一项新技术, 又称组织显微切割技术 (tissue microdissection) [13-14]。它是指将载有新鲜组织切片的载玻片放在显微镜下,



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩