

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200426108

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

文蛤活性多肽对肝癌细胞 SMMC-7721 效应的
差异蛋白质组研究

Proteomic Analysis of Cellular Response to Anti-peptide from
Meretrix meretrix Linnaeus in hepatocarcinoma SMMC-7721 Cells

贺 量

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 5 月 25 日

论文答辩时间: 2007 年 6 月 29 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 李琪福

评 阅 人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2007 年 6 月 30 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 ()，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 2007 年 6 月 30 日

导师签名:

日期: 2007 年 6 月 30 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
1 前言	
1.1 文蛤简介.....	3
1.2 文蛤活性物质的研究.....	4
1.2.1 免疫活性.....	4
1.2.2 文蛤提取物降糖、降血脂、抗氧化活性.....	4
1.2.3 文蛤提取物抗癌活性研究.....	5
1.3 蛋白质组起源.....	6
1.4 蛋白质组的研究策略.....	7
1.5 蛋白组相关技术.....	8
1.5.1 蛋白质分离技术.....	8
1.5.1.1 蛋白样品制备.....	9
1.5.1.2 IEF 等电聚焦(isoelectricfocusing,IEF)	11
1.5.1.3 SDS-PAGE 电泳.....	12
1.5.1.4 电泳显影技术.....	13
1.5.2 2-DE 分析软件.....	14
1.5.3 质谱技术.....	15
1.5.4 生物信息学.....	18
1.5.5 其它技术.....	19
1.6 蛋白质与肝癌.....	19
1.6.1 肝癌概述.....	19
1.6.2 蛋白质组在肝癌研究中的应用.....	20
1.7 论文研究意义.....	22
2 材料试剂与仪器	

2.1 材料	24
2.2 试剂	24
2.3 仪器	25
2.4 试剂配制	25
3 方法	
3.1 抗癌多肽的初步分离	28
3.2 细胞培养和文蛤多肽的处理	28
3.3 形态结构观察	29
3.4 样品处理	29
3.5 第一向等电聚焦胶电泳(IEF)	29
3.6 第二向 SDS-PAGE 电泳	29
3.7 银染色	30
3.8 考马斯亮蓝 G-250 染色	30
3.9 扫描和图象处理	30
3.10 蛋白质胶内酶切 1	30
3.11 蛋白质胶内酶切 2	31
3.12 质谱结果检索	31
4 结果	
4.1 文蛤抗癌多肽的初步纯化	32
4.2 细胞形态观察	33
4.3 双向电泳条件的建立	34
4.3.1 样品的制备	34
4.3.2 等电聚焦	35
4.3.3 银染条件	35
4.3.4 第二向 SDS-PAGE	38
4.3.5 胶内酶解方案的优化	40
4.4 肝癌差异蛋白分析	40
4.5 差异点质谱分析结果	43

5 讨论

5.1 文蛤抗癌活性多肽对肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用..... 47

5.2 文蛤活性多肽作用肝癌细胞 SMMC-7721 后蛋白质的差异表达分析..... 47

5.3 多肽作用机制的推测..... 51

5.3.1 未折叠蛋白反应(UPR)诱导的细胞凋亡..... 51

5.3.2 β 微管蛋白的修饰作用..... 52

6 参考文献..... 54

7 致谢..... 63

8 发表论文..... 64

Contents

Chinese Abstract	1
English Abstract	2
1 Preface	
1.1 Brief introduction of <i>Meretrix Meretrix Linnaeus</i>	3
1.2 Research of active extract from <i>Meretrix Meretrix Linnaeus</i>	4
1.2.1 Immunocompetence of extract from <i>Meretrix Meretrix Linnaeus</i>	4
1.2.2 Hypoglycemic Active, blood lipid-lowering Active and resistance to oxidation of extract from <i>Meretrix Meretrix Linnaeus</i>	4
1.2.3 Anticancer active of extract from <i>Meretrix Meretrix Linnaeus</i>	5
1.3 Origin of proteome	6
1.4 Study tactics of proteomic	7
1.5 Relative technology of proteomic	8
1.5.1 Technique of saperating proteins.....	8
1.5.1.1 Sample Preparation.....	9
1.5.1.2 Isoelectricfocusing.....	11
1.5.1.3 SDS-PAGE.....	12
1.5.1.4 Protein detection.....	13
1.5.2 Computer assisted 2-D image analysis.....	14
1.5.3 Protein identification by MS analysis.....	15
1.5.4 Bioinformatics.....	18
1.5.5 Other relative technique.....	19
1.6 Application of proteomics in study of liver cancer	20
1.6.1 Introduction of liver cancer.....	20
1.6.2 Study of cancer by using proteomics.....	21
1.7 Significance of this Research	23
2 Material, Reagent and Instrument	

2.1 Material	24
2.2 Reagent	24
2.3 Instrument	25
2.4 Reagent confection	25
3. Method	
3.1 Purification of anti-cancer peptide from <i>Meretrix meretrix Linnaeu</i>	28
3.2 Cultivation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells	28
3.3 Observation of cells morphology	29
3.4 Sample preparation	29
3.5 First dimension: IEF	29
3.6 Second dimension: SDS-PAGE	29
3.7 Silver-staining	30
3.8 Coomassie brilliant blue staining	30
3.9 Scan and computer assisted 2-D image analysis	30
3.10 Protein digest in gel 1	30
3.11 Protein digest in gel 2	31
3.12 Identification of proteins by searching 2D database	31
4. Results	
4.1 Purification of anti-cancer peptide from <i>Meretrix meretrix Linnaeu</i>	32
4.2 Change of morphology of cell treated with anti-cancer peptide from <i>Meretrix meretrix Linnaeu</i>	33
4.3 Establishment of two-dimensional electrophoresis for proteomics	34
4.3.1 Sample preparation	34
4.3.2 Isoelectric focusing	35
4.3.3 Silver-staining	35
4.3.4 Second dimension: SDS-PAGE	38
4.3.5 Optimization of protocol for protein digest in gel	40
4.4 Computer assisted 2-D image analysis	40
4.5 Identification of proteins	43

5. Discussion

5.1 Inhibition of SMMC-7721 cell proliferation by anti-cancer peptide of <i>Meretrix meretrix</i> Linnaeu.	47
5.2 An analysis of differentially expressed protein	47
5.3 Conjecture of anti-cancer mechanism.	51
5.3.1 UPR induce cell apoptosis.	51
5.3.2 Modification of β tubulin.	52
6 Reference.	54
7 Acknowledgement.	63
8 Papers.	64

摘 要

文蛤(学名: *Meretrix Meretrix Linnaeus* , 英文名: Hard clam) 不仅肉质鲜美、营养丰富, 而且具有很高的药用价值。据报道文蛤具有抗癌、降血糖、降血脂和抗氧化等活性。许多研究者已对文蛤抗癌活性做了研究, 证实文蛤提取物具有较强的抗癌活性。

将文蛤肉匀浆、抽提, 并通过 G-25 凝胶层析柱分离, 得到具有抑癌活性的组分, 初步判断为肽类物质。该组分在浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时对肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制率能达到 50.6%。通过光学显微镜观察, 可以发现肝癌细胞在文蛤提取物作用后形态发生很大变化。

利用蛋白质组学手段研究文蛤活性多肽对肝癌细胞的作用有助于更好地研究该物质抑制肝癌细胞的机制, 为后续的研究提供理论基础。

通过双向电泳技术的建立以及初步优化对一些环节如样品处理的方法、上样量的选择、电泳参数的设置、凝胶浓度和 SDS 凝胶电泳染色方法等进行了优化得到了分辨率较好的肝癌细胞 SMMC-7721 的蛋白图谱。进一步通过 2D 软件分析图谱, 确定差异点。进行胶内酶解并对酶解条件进行了优化。利用 MALDI-TOF 质谱仪进行质谱分析。最后利用质谱数据在网上进行检索鉴定差异蛋白质。

通过图谱分析找到 136 个差异蛋白其中 96 个蛋白表达下调, 40 个蛋白表达上调。对其中差异较明显的点进行了鉴定, 最终鉴定出 10 种差异蛋白。其中 6 个蛋白表达下调, 3 个蛋白表达上调。另有一个蛋白等电点发生了变化。这些差异蛋白中有分子伴侣蛋白、细胞骨架蛋白、锌指蛋白、代谢相关蛋白、调控蛋白等。可见细胞从骨架到代谢都发生了变化。我们对差异点的功能进行了探讨, 并提出了文蛤活性物质抑制细胞的可能途径。

该论文为课题组以后进一步研究文蛤活性多肽抑癌作用的机理提供了理论参考。

关键词: 文蛤; 抗癌多肽; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 蛋白质组

Abstract

Meretrix meretrix Linnaeus is smooth-shelled marine mussels. It not only is delicious but has medicinal properties. Some researchers have reported that *Meretrix meretrix Linnaeus* can lower blood sugar and lipid. It is also resistant to oxidation and has immunocompetence. Now more and more researchers are interesting in study of anticancer active of extract from *Meretrix meretrix Linnaeus*.

We purified the extract of *Meretrix meretrix Linnaeus* and obtained an anticancer component. The methods include grinding the meat of *Meretrix meretrix Linnaeus*, extracting by using organic solvents and purification by Sephadex G-25. The component obtained can inhibit cell proliferation markedly. The inhibitory rate on the cell growth was determined to be 50.6%, after cells were treated by 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of the component. The morphology of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells was observed by light microscope. It can be observed that morphology of cells have changed greatly.

Studying the effect of the anticancer peptide of *Meretrix meretrix Linnaeus* on hepatocarcinoma SMMC-7721 cells by using proteomics method is help to study anticancer mechanism.

Two-dimensional gel (2-DE) electrophoresis has recently become the preferred method for proteomics and advanced the utility of proteomics in drug discovery process. In this article we established 2-DE technique successfully by optimizing a series of factors, such as sample preparation, electrophoresis parameters, gel's concentrations and so on.

2-DE patterns were obtained and these patterns were analyzed by using 2-DE software-melanie 4. Protein digest by trypsin in gel and MALDI-TOF analysis were carried out in the proper order. Then identify differential expressed proteins by searching protein database.

About 136 of the differential expressed proteins were found on two patterns. One is the control cells proteins pattern, the other is cells treated with anticancer peptide of *Meretrix meretrix Linnaeus* proteins pattern. There are 96 down-regulated proteins and 40 up-regulated proteins after cell treated with anticancer peptide. We choose some proteins which changed markedly and identified them by MS. Finally 10 proteins were identified successfully. 6 of proteins are down-regulated proteins, and 3 of proteins are up-regulated proteins and 1 protein whose pI was changed. These proteins include cytoskeletal protein, zinc finger protein, pressure elicit protein and so on. Discuss functions of these proteins and make hypotheses of the mechanism of inhibiting cell proliferation.

This research will be useful to further study of the effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the SMMC-7721 cells.

Key words: Mercenaria; anticancer peptide; hepatocarcinoma SMMC-7721 cells; proteomics

1 前言

1.1 文蛤简介

文蛤学名：*Meretrix Meretrix Linnaeus*，英文名：Hard clam。又名花蛤(《梦溪笔谈》)、黄蛤(《现代实用中药》)、圆蛤(《药材资料汇编》)、白利壳(《中药志》)，属软体动物门、双壳纲、真瓣鳃目、帘蛤科、文蛤属。其贝壳略呈三角形，壳质坚厚，两壳大小相等，腹缘呈圆形(图1)。壳面膨胀光滑釉质，花纹丰富美观，蛤肉光白如玉。文蛤足扁平如舌状，很象古代兵器中的“月斧”，故又有“月斧”之称。喜生活在淡水注入的内湾及河口附近的细沙质海滩^[1]，是我国滩涂传统养殖的主要贝类之一。文蛤地理分布较广，是中国，朝鲜，日本常见的经济贝类。我国沿海自南至北都有文蛤的足迹，具有面广量大，食物链短，养殖成本低，投资见效快等优点。也是我国大宗出口的鲜活水产品。其中辽宁省的蛤蜊岗和江苏省沿海资源尤为丰富。有些海区形成最优势的种群，资源量很大。



图1 文蛤

Fig.1 *Meretrix Meretrix Linnaeus*

文蛤肉嫩味鲜，营养丰富，素有“天下第一鲜”之称，是贝类海鲜中的上品。其含有蛋白质 10%，脂肪 1.2%，碳水化合物 2.5%，还含有人体易吸收的各种氨基

酸和维生素及钙、钾、镁、磷、铁等多种人体必需的矿物质^[2]，唐代时曾为皇宫海珍贡品。是我国的传统食品。

1.2 文蛤活性物质的研究

文蛤不仅肉质鲜美、营养丰富，而且具有很高的食疗药用价值。李时珍的《本草纲目》上说，它能治“疮、疖肿毒，消积块，解酒毒”等病。《神农本草经》中记载“文蛤主治恶疮”。清代汪昂的《本草备要》中也有文蛤除瘤的记载。文蛤还可用于牛磺酸的提取。

文蛤作为传统中药，蛤壳具有清热，利湿，化痰，散结之功效，用作病毒感染治疗的辅助药物。蛤软体部分含有大量的氨基酸，蛋白质和丰富的维生素，还含有一定量的多糖及核酸，矿物质和微量元素，特别是组氨酸和精氨酸含量较高，多食可防治慢性气管炎，淋巴结核，胃和十二指肠溃疡等疾病。文蛤肉具有抗突变降血糖作用，文蛤多糖具有抗癌免疫活性。有资料表明，文蛤提取物对动物移植性肿瘤有抑制作用，临床用于肺癌，肝癌，胃癌等有一定疗效^[3,4]。

1.2.1 免疫活性

文蛤具有调节免疫的作用。已有报道将文蛤肉的水解液连续注射小鼠，7天后可使小鼠胸腺重量明显增加，血清的溶血素抗体显著增多，网状内皮系统的吞噬功能和绵羊红细胞(SRBC) 导致的迟发型超敏反应受到抑制，表明了文蛤肉水解液对免疫系统的不同环节影响不同^[5]。也有报道，文蛤提取物具有双向免疫调节功能^[6]，并且其中起免疫调节作用的主要成分是多糖。文蛤肉冷提取物能够促进小鼠抗 SRBC 抗全体生成能力，体外给药明显提高小鼠脾淋巴细胞增殖反应，并有一定的剂量依赖关系，说明文蛤肉能够增强小鼠体液免疫和细胞免疫功能。另据报道文蛤多糖对于环磷酰胺造成的小鼠免疫功能损伤也有显著的对抗作用。

1.2.2 文蛤提取物降糖、降血脂、抗氧化活性

文蛤提取物还具有降糖、降血脂、抗氧化等作用。《神农本草经》及历代本草和医书大都有记载。味咸、性寒，功能止消渴、消化热痰、利湿等^[7]。消渴临床

特征为血糖高及糖尿，常并发脂代谢紊乱，这与现代医学中的糖尿病相似。

据报道文蛤肉水煎剂对糖尿病小鼠具有治疗作用。高血脂与心血管疾病的发病有着密切的关系^[8]，血清中高胆固醇(TC) 及甘油三酯(TG) 能引起动脉粥样硬化，冠心病等心血管疾病。而血浆中的高密度脂蛋白(HDL) 可促进TG水解，将外周组织中沉积的TC 载出，移到肝脏被代谢，因此HDL 被认为是一种抗动脉硬化的脂蛋白，冠心病的保护因子^[9]。

文蛤酸解液口服给药，能抑制食物性高脂血症大白鼠及鹌鹑血清中的TG、TC 升高，提高HDL 2C 的含量，同时降低肝脏中TG 和TC 的含量，显示其具有较好的降血脂及抗脂肪肝作用^[10]。此外文蛤提取物对正常及高脂血症的鹌鹑的血液粘度也有明显的降低作用^[11]。

文蛤中富含的牛磺酸能够降低血压，增加心肌细胞对钙的结合能力，抗脉搏不整。文蛤还有抗氧化抗衰老的作用。SOD 活力高低与衰老、肿瘤、炎症和心血管病等有密切关系，血清丙二醛(MDA) 水平高低则间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。文蛤肉冷提取物能显著降低老年小鼠血清脂质过氧化物MDA 含量，同时提高血清T-SOD 活力，表明其具有一定的抗衰老作用^[12]。文蛤中富含DHA (二十二碳六烯酸)，DHA 能抑制脑的细胞老化，促进脑细胞分裂、增殖、突起的生长和神经网络的形成。从而使脑容量增加，处理信息速度加快。文蛤肉还能延长小鼠20℃水温下的游泳时间，具有较强的抗应激作用，增强机体的生理活力。另有报道证明文蛤肉的酶解液有显著的抗氧化活性，具有清除氧自由基的能力^[13]。

1.2.3 文蛤提取物抗癌活性研究

近代对于文蛤中含有抗癌物质的报道始于Schmeer 1964 年提出了文蛤中既含有肿瘤抑制因子，也含有肿瘤促进因子。通过适当的提取方法，得到肿瘤抑制因子，对小鼠S2180 肉瘤有显著的抑制作用，且对小鼠无毒性。他将这一活性物质称为“蛤素”(M ercenene)，在对蛤素成分进一步的探讨中，指出其可能是分子量小于10 000 的多肽类物质——糖肽或小分子的核蛋白^[14]，在文蛤体内的含量随季节而呈规律性变化^[15]，对贴壁培养Hela 细胞也有着较强的抑制及杀伤作用。也有报道指出文蛤中的抗癌因子并不全由小分子物质组成，其中一种从蛤肝中提取的分

子量为76 000 的蛋白质也有肿瘤抑制作用^[16]。

目前国内也有许多有关文蛤提取物抗肿瘤的报道。上海市第二人民医院提取文蛤中的不同蛋白成分，处理生瘤小鼠，均能抑制小鼠肿瘤的生长，在此基础上，进一步将提取物制成药片，用于临床，对于控制肿瘤患者症状，延长存活时间起到了一定的作用^[17]。

窦昌贵等^[18] 发现文蛤多糖可显著抑制小鼠S180 实体瘤的瘤重，并具有增强机体器官免疫和体液免疫功能。吴杰连^[19]等分离出从文蛤中提取出来的糖肽命名为MGP₀₅₀₁，首次系统报道了MGP₀₅₀₁ 的体外抗癌活性。与其它海洋贝类的糖蛋白和多糖所不同，MGP₀₅₀₁有较强的体外抗肿瘤活性，并有较好的温度稳定性，而多数贝类糖蛋白和多糖在体外不表现抗癌活性或者活性较低。MGP₀₅₀₁的体外活性表明能有效抑制肿瘤细胞的粘附。

另有报道，从文蛤中提取的核酸对动物移植性肿瘤有较好的抑制效果。同时，文蛤核酸对荷瘤动物有促进白细胞系统的作用。这不仅通过给药组与对照组相比，有升高外周血白细胞总数和增加脾脏重量的效应，而且文蛤核酸还能使荷瘤动物外周血的淋巴细胞百分率更接近正常值。从文蛤核酸对荷瘤动物巨噬细胞系统的影响也可以看出，它不仅能提高巨噬细胞的吞噬百分率，而且对每个细胞的吞噬能力也有明显的提高。这些结果都表明，文蛤核酸具有促进对肿瘤的免疫作用。

本实验室也进行了文蛤提取物抗癌活性的研究^[20]。获得了具有抗癌活性的多肽。进一步研究表明，该多肽对胃癌、肝癌等均有较好的抑制作用。目前正在进行进一步的研究。

1.3 蛋白质组起源

大规模、高通量 DNA 测序技术的出现使得人类基因组计划(the human genome project, HGP)得以顺利实施。人类基因组计划的实施及向功能基因组学的过渡，很快改变了整个生物学研究的面貌，生命科学研究进入了规模化、工厂化的新时代。然而，蛋白质才是生命活动的直接执行者、体现者，每一种生命运动形式都是特定蛋白质群体在特定的时间和空间出现，并发挥特定功能的结果。蛋白质自身特定的活动规律，通常无法直接从基因组的信息中反映出来。这是因为基因组是均一的，在同一生物个体的不同细胞中基本相同，比较稳定而不易改变。蛋白

质组则具有多样性,同一生物个体的不同细胞中所含蛋白质的种类和数量都不相同,而且它还在不断地改变着,即使是同一种细胞,在不同时期或在不同环境条件下,其蛋白质组分也在不断地发生着变化。更重要的是,DNA 和 RNA 的序列并不能准确反应蛋白质的表达、修饰及相互作用等生命科学的重要问题。分子生物学发展初期的一个知名的信条是一个基因一个蛋白质。但后来已证实这是不正确的,1 个基因可以产生出多于 1 个蛋白质。越是较高等的细胞,这种数量上的差异越明显。据估计,在 *E.coli* 1 个基因可编码 1.3 个蛋白;*S.cerevisiae* 1 个基因可编码 3 个蛋白;人的 1 个基因大约可编码 10 种蛋白^[21]。这是由于 1 个基因可经过基因内重组或在转录中经过不同的剪接翻译成不同的蛋白质,而蛋白质在合成之后又可能进行不同的翻译后修饰,包括磷酸化、糖基化、硫基化、酰基化、甲基化等。此外在基因组水平上无法也获知蛋白质的结构形成、转运定位、蛋白质与蛋白质相互作用等活动。因此要真正阐释生命的奥秘,就需要对蛋白质进行大规模的全面研究,这就是蛋白质组学的目标和任务。

蛋白质组的概念最早是在 1994 年由澳大利亚科学家 Williams 和 Wilkins 等首先提出的^[22]。

蛋白质组 Proteome 源于 Protein 与 Genome 两词的杂合,即细胞或组织或机体在特定时间和空间上表达的所有蛋白质。这个概念的提出标志着一个新的学科——蛋白质组学(proteomics)的诞生。蛋白质组学以蛋白质组为研究对象,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,在整体水平上研究蛋白质的组成与调控的活动规律。

1.4 蛋白质组的研究策略

蛋白质组学一经出现,就有两种研究策略。一种可称为“穷尽法”(或“竭泽法”),即采用高通量的蛋白质组研究技术,试图查清生物体内一切蛋白质,这种观点从大规模、系统性的角度来看待蛋白质组学,也更符合蛋白质组学的本质。这种策略一度吸引了大量研究者的热情美国和其他一些国家的政府和一些大公司投入了巨额资金,进行蛋白质组学研究。但是蛋白质组的提出很大程度上是基因组研究观念上和逻辑上的延伸,这与当初基因组的提出有明显的差别。基因组研究的发端和升温,是由于大规模基因组测序技术的实现和其后高通量的基因芯片技术的发展

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库