

## 原肌球蛋白、波形纤维蛋白和热休克蛋白 70 在肝癌转移亚细胞中表达上调

叶丽虹<sup>1)</sup>\*, 秦宵然<sup>1)</sup>, 张晓东<sup>1)</sup>\*, 齐众<sup>2)</sup>, 钱令嘉<sup>3)</sup>,  
侯志波<sup>2)</sup>, 王洪辉<sup>1)</sup>, 徐少峰<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>南开大学生命科学学院, 天津 300071; <sup>2)</sup>香港科技大学生物化学系, 香港;

<sup>3)</sup>军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

**摘要** 建立并应用人 H7402 肝癌细胞 SCID 鼠肿瘤转移模型, 从转移肺组织经原代细胞培养, 筛选并建立转移亚细胞系 M-H7402, 进而运用蛋白质组学技术筛选肿瘤转移相关蛋白. 通过二维电泳技术检测, 比较 M-H7402 细胞和亲本 H7402 细胞的总蛋白, 从多个差异蛋白质点中选择出 3 个在 M-H7402 细胞中表达明显上调的蛋白质点进行 ESI-QUAD-TOF 质谱分析, 并在 MSDB 公共蛋白质数据库中进行同源比较和分析鉴定. 初步确定这 3 个蛋白质分别为原肌球蛋白(tropomyosin), 波形纤维蛋白(vimentin)和热休克蛋白 70(heat shock 70 protein, HSP70). 这些蛋白质参与细胞骨架构成、蛋白质折叠和蛋白质相互作用等许多正常生理活动, 并有报道原肌球蛋白和波形纤维蛋白与肿瘤转移有关. 利用蛋白质组学方法发现, 在肝癌转移亚细胞 M-H7402 中, 原肌球蛋白、波形纤维蛋白和热休克蛋白 70 表达明显上调, 进一步揭示它们在肿瘤转移中具有重要的作用.

**关键词** 肝癌, 蛋白质组学, 肿瘤转移相关蛋白, 原肌球蛋白, 波形纤维蛋白, 热休克蛋白 70

**中图分类号** R364.7

### Proteomics Analysis of Differentially Expressed Tropomyosin, Vimentin and HSP 70 in Highly Metastatic Sub-line of Human Hepatoma Cells

YE Li-Hong<sup>1)</sup>\*, QIN Xiao-Ran<sup>1)</sup>, ZHANG Xiao-Dong<sup>1)</sup>\*, QI Rober Zhong<sup>2)</sup>, QIAN Ling-Jia<sup>3)</sup>,  
HOU Zhi-Bo<sup>2)</sup>, WANG Hong-Hui<sup>1)</sup>, XU Shao-Feng<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

<sup>2)</sup> Department of Biochemistry, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China;

<sup>3)</sup> Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China

**Abstract** Metastasis is the most insidious incidence of cancers. However, little is known about the molecular mechanism of tumor metastasis. A highly metastatic sub-line of H7402 hepatoma cells (termed M-H7402) was developed through screening from the lung tissue of severe combined immunodeficiency (SCID) mice injected with H7402 cells by primary cell culture. M-H7402 cell line was selected as an experimental model. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry are combined to approach the protein profiles associated with tumor metastasis between H7402 and M-H7402 cell lines. Image analysis of Coomassie brilliant blue stained two-dimensional gels revealed that three protein spots showed significantly quantities variation. These candidate proteins were detected by ESI-QUAD-TOF mass spectrometer analysis, and searched in a publicly

收稿日期: 2004-06-14, 接受日期: 2004-09-07

国家自然科学基金资助项目 (No. 30370338), 天津市自然科学基金资助项目 (No. 013616211)

\* 联系人 Tel: (022) 23506830, Fax: (022) 23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

Received: June 14, 2004; Accepted: September 7, 2004

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370338) and Tianjin Natural Science Foundation (No. 013616211)

\* Corresponding author Tel: (022) 23506830, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

available MSDB database using peptide mass fingerprinting (PMF). The results showed that they were tropomyosin, vimentin and heat shock protein 70 (HSP70), respectively. It was reported that these proteins were involved in the normal physiological activities, such as composing cytoskeleton, protein folding and protein interaction, etc. Recent study demonstrated that tropomyosin is an essential filament protein and vimentin expression coincides with cellular growth and cell cycle progression as well; while certain tumor cell lines express HSP-70 on cell surface. The up-regulation of tropomyosin, vimentin and heat shock protein 70 were found in M-H7402 cells, suggesting that the proteins were involved in tumor metastasis.

**Key words** hepatoma, proteomics, proteins associated with metastasis, tropomyosin, vimentin, heat shock protein 70

肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>. 应用蛋白质组学技术研究肿瘤转移是当今肿瘤研究的热点,旨在从蛋白质水平直接寻找肿瘤转移相关蛋白,从而阐明肿瘤转移的分子机制,并有助于进一步发现肿瘤转移的特异性标志物,可为抗肿瘤转移药物提供作用靶点. 目前,蛋白质组学研究几乎已在各种人类肿瘤组织或细胞系中开展进行,并已取得了一定的成果<sup>[2-4]</sup>. 本研究室建立了 SCID (severe combined immunodeficiency, SCID) H7402 人肝癌细胞动物转移模型,从转移组织中筛选和建立了转移亚细胞系 M-H7402,并进行了生物学特性的鉴定等研究<sup>[5]</sup>. 在建立上述肝癌转移亚细胞系的基础上,本研究采用二维电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 和质谱分析技术,将 H7402 肝癌细胞与 M-H7402 转移亚细胞进行比较,旨在从肝癌细胞中筛选出肿瘤转移相关蛋白.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** H7402 人肝癌细胞系购于北京大学医学部; M-H7402 肝癌转移亚细胞系通过将 H7402 细胞接种 SCID 鼠,从转移肺组织中经原代细胞培养筛选而获得.

**1.1.2 试剂** 尿素、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、Tris 碱、TEMED、Drystrip Cover fluid 和 IPG strip pH 3~10 均购于 Pharmacia Biotech; CHAPS、甘油和 SDS 购于 Amresco; DTT 为 Promega 产品, IAA 为 Acros Organics 产品,甘氨酸为 Sigma 产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 采用 RPMI1640 培养基培养 H7402 和 M-H7402 细胞,其中含有 10% 胎牛血清,青霉素 100 U/ml 和硫酸链霉素 100 U/ml,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养.

**1.2.2 样品制备** 分别取在对数生长期的 H7402 及 M-H7402 细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入适量

0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞,然后用预冷的 PBS 洗 3 次,4 000 r/min,4℃ 离心 10 min,收集细胞. 加入适量细胞裂解液 (8 mol/L 尿素,4% CHAPS,2% Pharmalyte 3-10) 并加入 Protease Inhibitor Cocktail,室温下作用 30 min. 13 000 r/min,4℃ 离心 15 min,取上清,转入新的 Eppendorf 管中,-70℃ 保存.

**1.2.3 蛋白质浓度测定** 以考马斯亮蓝染色法和 Bradford 方法测定蛋白样品浓度,用结晶牛血清白蛋白 (BSA) 作标准蛋白浓度曲线<sup>[6]</sup>.

**1.2.4 等电聚焦电泳** 采用 pH 3~10 的 IPG 胶条对蛋白样品进行等电聚焦电泳. 分别取 H7402 细胞和 M-H7402 细胞的蛋白样品,与重泡胀液 (8 mol/L 尿素,2% CHAPS,0.5% IPG 缓冲液,0.002% 溴酚蓝) 混合,混匀放入持胶槽,然后将 IPG (pH 3~10) 胶条放于持胶槽中,将样品溶液从正极到负极均匀铺展,在加样后的胶条上覆盖一层 IPG 覆盖液. 重泡胀 0 V,2 h; 然后 30 V,10 h; 初始化时 IEF 500 V,1 h; 最后 1000 V,1 h; 达到稳定态后 IEF,8 000 V,7 h.

**1.2.5 二维 SDS-PAGE** 一向 IPG IEF 结束后,胶条于平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L 尿素,30% 甘油,2% SDS,20 mmol/L DTT,0.002% 溴酚蓝) 中,在摇床上温育 15 min. 胶条于平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L 尿素,30% 甘油,2% SDS,100 mmol/L 碘乙酰胺,0.002% 溴酚蓝) 中,在摇床上温育 15 min. 取出 IPG 胶条,用二维电泳缓冲液 (25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,0.1% SDS) 洗去多余的平衡液,将胶条转移至 12.5% SDS-PAGE 表面上进行二维电泳,30 mA,30 min; 在 60 mA 稳流条件下电泳,直到指示剂抵胶底时结束电泳. 0.1% 考马斯亮蓝染液对聚丙烯酰胺凝胶进行染色. 将凝胶放入脱色液中于摇床上脱色.

**1.2.6 二维胶分析及质谱分析** 对比分析 SDS-PAGE 胶,从 SDS-PAGE 胶中切下差异表达的蛋白质点,经脱水、还原、烷基化和脱色处理后,采用胰酶原位消化胶块,提取消化得到的肽段,利用 ESF-QUAD-

TOF 质谱仪 (QSTAR, PE Sciex) 分析, 然后在蛋白质数据库 MSDB 中比对质谱分析得到的肽序列标签以确定为何种蛋白。

## 2 结果

### 2.1 样品的等电聚焦和 2-D 电泳

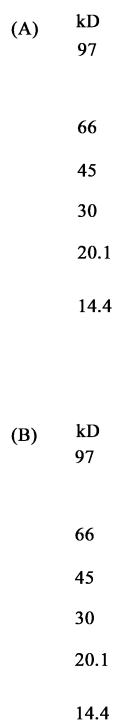
H7402 细胞和 M-H7402 细胞蛋白样品经等电聚焦和二维 SDS-PAGE 分离后, 经考马斯亮蓝 R250 染色和脱色处理, 比较 M-H7402 细胞和亲本 H7402 细胞的总蛋白, 在凝胶上发现了一些明显差异的蛋白质点, 对在 M-H7402 细胞中明显上调表达的 3 个蛋白质点, 分别记为 MP1、MP2 和 MP3 (Fig. 1)。

### 2.2 差异表达蛋白质点的质谱分析

利用 ESI-QUAD-TOF 质谱仪分析上述 3 个差异表达的蛋白质点。在蛋白质数据库 MSDB (WWW.matrixscience.com) 中比对质谱得到的肽序列标签, 发现与 MP1 匹配的蛋白质为原肌球蛋白 (tropomyosin) (Fig 2 A), 匹配分数为 209; 与 MP2 匹配的蛋白质为波形纤维蛋白 (vimentin) (Fig 2 B), 匹配分数为 108; 与 MP3 匹配的蛋白质为热休克蛋白 (heat shock 70 kD protein, HSP70) (Fig 2 C), 匹配分数为 60。3 个蛋白质在 NCB 数据库中蛋白质编号, 在 MSDB 数据库中 ID、所匹配的肽片段数、等电点 (pI)、分子量 (mass) 和匹配分数 (intensity matched) 见 Table 1。

**Table 1** Identification of three proteins by mass spectrum

Spot No.	NCBI protein No.	MSDB ID	Peptides matched	pI	Mass	Total score	Protein name
MP1	CAA28258	S11390	4	4.75	28185	209	Tropomyosin
MP2	P08670	AAB47721	3	5.00	51260	108	Vimentin
MP3	NP_068814	Q961S6	3	6.74	70294	60	HSP70



**Fig. 1** Identification of different proteins from total proteins by two dimensional electrophoresis (2-DE) (pH 3 ~ 10), comparing M-H7402 cells(A) with H7402 cells(B)

In the gel three remarkable high expressed protein spots were found in M-H7402 cells, which were termed MP1, MP2 and MP3, respectively.

The right pictures were the amplification of the left pictures

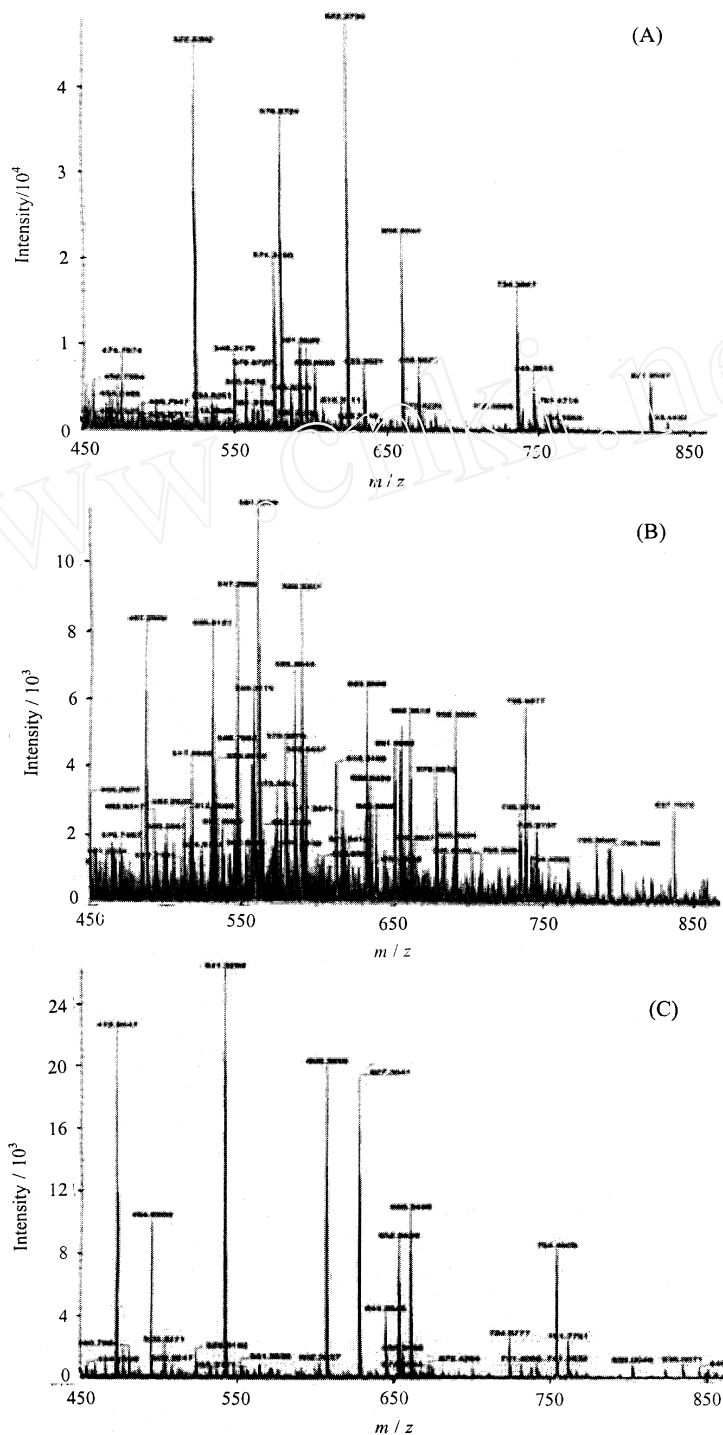


Fig.2 The three spots of candidate proteins were detected by ESI-QUAD-TOF mass spectrometer analysis. The samples were identified by searching in a publicly available MSDB database using peptide mass fingerprinting (PMF). The analysis showed that they are tropomyosin (A), vimentin (B) and heat shock 70 protein (C), respectively.

### 3 讨论

随着人类基因序列测序的完成,应用质谱技术和引入生物信息学,使蛋白质组学的研究获得了飞速发展,成为肿瘤转移研究的重要手段.对于阐明肿

瘤转移的分子机理,从在蛋白质水平进行研究与在基因水平进行研究相比,前者更能真实地反应肿瘤转移相关基因的作用.本实验室成功地建立了肝癌转移亚克隆细胞系 M-H7402,与其亲本细胞 H7402 形成了配对关系,并且初步研究的结果证明,肝癌转

移亚细胞系 M-H7402 具有高转移倾向<sup>[5]</sup>. 在此基础上,本研究应用蛋白质组学技术对肝癌转移亚克隆和亲本细胞进行比较,拟从蛋白质水平上筛选肿瘤转移相关蛋白. 运用二维电泳技术研究发现,有多个差异表达的蛋白,对其中 3 个在 M-H7402 细胞表达明显上调的蛋白质点进行了 ESF-QUAD-TOF 质谱仪分析,与蛋白数据库比较后确认这三个蛋白质分别为原肌球蛋白(tropomyosin)、波形纤维蛋白(vimentin)和热休克蛋白 70(heat shock 70 protein, HSP70). 进一步应用免疫印记和免疫组化等方法在 M-H7402 和 H7402 肝癌细胞及病人肝癌组织中检测原肌球蛋白、波形纤维蛋白和热休克蛋白 70 的过表达,对进一步阐明它们在肝癌细胞转移中的作用和意义具有重要价值.

原肌球蛋白在细胞移动、形态发生和胞浆移动中调节肌动蛋白丝的动态变化. 肿瘤转移过程是多因素综合作用的结果,在肿瘤细胞转移过程中,癌细胞首先从肿瘤组织中脱离下来,这一过程与细胞的运动是分不开的. 因此,原肌球蛋白可能参与肿瘤和肿瘤转移过程. Hughes<sup>[7]</sup>等报道,原肌球蛋白可能参与星型胶质细胞的分裂,在星型胶质细胞瘤中发现有大量的原肌球蛋白表达. Franzen<sup>[8]</sup>和 Raval<sup>[9]</sup>等发现原肌球蛋白在乳腺癌中有高表达,原肌球蛋白 1(TM1)也可作为一个新的乳腺癌诊断标志物. 此外,有报道认为 TM1 和 TM2 与膀胱癌有关<sup>[10]</sup>. Jiang<sup>[11]</sup>等应用蛋白质组学技术比较了肺癌高转移和低转移倾向细胞(PLA801D/PLA801C),发现原肌球蛋白在高转移肺癌细胞中表达上调. Takenaga<sup>[12]</sup>等研究发现原肌球蛋白的一个异构体在低转移倾向的肺癌细胞(D6)中的合成降低,高转移倾向的肺癌细胞(P29)相对增高,认为原肌球蛋白与肿瘤转移有关. 本研究发现,在高转移倾向的肝癌细胞 M-H7402 中原肌球蛋白的表达量高于亲本细胞,与上述文献报道的结果一致.

波形纤维蛋白为细胞骨架成分,广泛存在于间充质细胞及中胚层来源的细胞中,一端与核膜相连,另一端与细胞表面处的桥粒或半桥粒相连,将细胞核和细胞器维持在特定的空间,主要起支撑作用. 最近, Hu<sup>[13]</sup>等应用 cDNA 微阵列和免疫组化方法发现,在肝癌细胞和肝癌组织中波形纤维蛋白呈过表达,认为波形纤维蛋白与肝癌细胞转移具有密切的关系. 本实验应用蛋白质组学技术研究发现,在高转移倾向的肝癌细胞中波形纤维蛋白表达上调,与上述文献报道的结果是一致的.

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)作为一种分子伴侣,具有广泛的生物学功能. 热休克蛋白(HSP)在蛋白质相互作用中起重要作用,如蛋白质折叠、构象以及阻止错误蛋白质的聚集等. HSP 家族可与逆转录蛋白、甾类激素受体、蛋白激酶、细胞骨架蛋白和癌基因产物等多种功能蛋白质相结合而调节其功能状态. 根据 HSPs 同源程度和分子量的大小,可分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、小分子 HSP 和泛素等几个成员. 关于 HSP 家族成员与人肝细胞癌等肿瘤相关性的研究报道主要为 HSP70,它在多种肿瘤中呈高表达,在保护多种应激条件的细胞死亡中具有重要作用<sup>[14-17]</sup>. 目前,尚未见有关 HSP70 蛋白与肿瘤转移的相关报道.

本研究发现,与其亲本 H7402 细胞相比,在具有转移倾向的肝癌转移亚细胞系 M-H7402 中原肌球蛋白、波形纤维蛋白和热休克蛋白 70 的表达上调,进一步揭示它们与肝癌细胞转移有密切的关系. 同时表明,这种具有不同转移能力的配对肝癌细胞对于筛选和分离肿瘤转移相关蛋白具有很好的应用价值.

## 参考文献 (References)

- 1 Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics*, 2001, 1 (10): 1295 ~ 1302
- 2 Ornstein D K, Petricoin E F 3rd. Proteomics to diagnose human tumors and provide prognostic information. *Oncology (Huntingt)*, 2004, 18 (4): 521 ~ 529; discussion 529 ~ 532
- 3 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405 (6788): 837 ~ 846
- 4 谭琛, 李江, 王洁如, 张小梅, 曹莉, 梁宋平, 李桂源. NAG7 基因转染 HNE1 细胞后下调蛋白质的鉴定及其意义. *中国生物化学与分子生物学报* (Tan Chen, Li Jiang, Wang Jie, Zang Xiao-mei, Cao Li, Liang Song-ping, Li Gui-yuan. Identification and significance of down regulated proteins in HNE1 cells transfected with NAG7. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, 17 (6): 687 ~ 692
- 5 叶丽虹, 秦宵然, 张晓东, 王洪辉, 蒋斯明, 王长晔, 吴晶辉, 朱惠芳, 赵轼轩, 蔡兵. 应用 SCID 鼠筛选肝癌转移性亚克隆及 M-H7402 亚细胞系的建立. *南开大学学报(自然科学版)*. (Ye Li-hong, Qin Xiao-ran, Zhang Xiao-dong, Wang Hong-hui, Jiang Si-ming, Wang Chang-ye, Wu Jing-hui, Zhu Hui-fang, Zhao Shi-xuan, Cai Bing. Screening of human metastatic hepatoma Cells by SCID mice and establishment of the M-H7402 cell line. *Acta Sci Natur Univ Nankaiensis*), 2004, 37 (3): 120 ~ 124
- 6 Ye L-H, Kishi H, Nakamura A, Okagaki T, Tanaka T, Oiwa K, Kohama K. Myosin light chain kinase of smooth muscle stimulates myosin ATPase activity without phosphorylating myosin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6666 ~ 6671
- 7 Hughes J A, Cooke-Yarborough C M, Chadwick N C, Schevzov G,

- Arbuckle S M, Gunning P, Weinberger R P. High-molecular-weight tropomyosins localize to the contractile rings of dividing CNS cells but are absent from malignant pediatric and adult CNS tumors. *Glia*, 2003, **42** (1): 25 ~ 35
- 8 Franzen B, Linder S, Uryu K, Alaiya A A, Hirano T, Kato H, Auer G. Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions. *Br J Cancer*, 1996, **73** (7): 909 ~ 913
- 9 Raval G N, Bharadwaj S, Levine E A, Willingham M C, Geary R L, Kute T, Prasad G L. Loss of expression of tropomyosin I, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. *Oncogene*, 2003, **22** (40): 6194 ~ 6203
- 10 Pawlak G, McCarvey T W, Nguyen T B, Tomaszewski J E, Puthiyaveetil R, Malkowicz S B, Helfman D M. Alterations in tropomyosin isoform expression in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Cancer*, 2004, **110** (3): 368 ~ 373
- 11 Jiang D F, Ying W T, Lu Y L, Zhai Y, Liu W L, Zhu Y P, Qiu Z Y, Qian X H, He F C. Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics*, 2003, **3**: 724 ~ 737
- 12 Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Differential expression of a tropomyosin isoform in low- and high-metastatic lewis lung carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1988, **8** (9): 3934 ~ 3937
- 13 Hu L, Lau S H, Tzang C H, Wen J M, Wang W, Xie D, Huang M, Wang Y, Wu M C, Huang J F, Zeng W F, Sham J S, Yang M, Guan X Y. Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*, 2004, **23** (1): 298 ~ 302
- 14 张杰, 张宁, 芮静安, 叶大雄, 雷道年, 刘军建, 金城, 周柔丽. 人肝细胞癌及其配对非癌肝组织、正常肝组织中热休克蛋白 Hsp90 基因 mRNA 水平的分析. *中国生物化学与分子生物学报* (Zhang Jie, Zhang Ning, Rui Jing-An, Ye Da-Xiong, Lei Dao-Nian, Liu Jun-Jian, Jin Cheng, Zhou Rou-Li. Quantitative analysis of hsp90 mRNA in normal liver, human hepatocellular carcinoma and paired non-cancerous liver tissues. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17** (3): 386 ~ 390
- 15 Raynes D A, Graner M W, Bagatell R, McLellan C, Guerriero V. Increased expression of the Hsp70 cochaperone HspBP1 in tumors. *Tumour Biol*, 2003, **24** (6): 281 ~ 285
- 16 Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett*, 2003, **198** (2): 219 ~ 228
- 17 Yang W L, Nair D G, Makizumi R, Gallos G, Ye X, Sharma R R, Ravikumar T S. Heat shock protein 70 is induced in mouse human colon tumor xenografts after sublethal radiofrequency ablation. *Ann Surg Oncol*, 2004, **11** (4): 399 ~ 406