

体外培养的不同亚型肺癌细胞株差异蛋白的初步分析*

夏 梁 蔡伟丽 张丽娟 孙一娜 肖雪媛 何大澄**

(北京师范大学生命科学学院细胞所, 高等学校蛋白质组学研究院 北京 100875)

摘 要 分析体外培养的不同亚型肺癌细胞株蛋白质表达差异, 筛选肺癌细胞的标志蛋白并与肺癌病人血清中的标志蛋白进行对比分析。采用 SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 蛋白质芯片技术检测了三种肺癌细胞株 A549 (肺癌)、Calu-6 (腺癌) 和 PG (大细胞癌) 以及人胚肺二倍体成纤维细胞 (2BS) 的蛋白质谱。结果显示与 2BS 细胞比较, 肺癌细胞有 24 个蛋白质表达发生明显改变。

关键词 蛋白质芯片 肺癌细胞株 差异蛋白

肺癌为当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一。我国许多大城市近 30 年来肺癌发病率明显上升, 已占常见恶性肿瘤的首位。依据病理改变将肺癌分成两类: 非小细胞肺癌和小细胞肺癌, 非小细胞肺癌包括腺癌、鳞癌和大细胞肺癌。肺癌的临床诊断主要依据影像学, 但确诊仍需组织病理^{1,2}。绝大多数肺癌病人都在疾病的晚期或发生转移时才发现或确诊。因此, 探索和建立一种简单、快速、敏感性高和特异性强的早期诊断技术已成为临床医学上的迫切需要。

任何肿瘤在出现病理变化之前, 细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有相应的改变。这些改变的成分或其代谢产物可能会释放入血。从理论上说, 通过比较肿瘤细胞或病人血清与正常细胞或正常人血清中的差异蛋白质谱, 就可能筛选出肿瘤相关的标志分子 (Biomarker)。当然这种筛选是高通量的, 用以前常规的方法是难以做到的。蛋白质组学的开展和研究及其新兴技术的出现使这种大规模的筛选成为可能; 同时也给临床疾病诊断, 尤其是肿瘤诊断开辟一个全新的分子诊断技术时期。目前蛋白质组学研究的主要技术是双向电泳和质谱等技术。但是, 一些新技术也相继出现, 例如 SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 蛋白质芯片技术³。它具有快速、简单、敏感、样本用量少等优点。截止至 2001 年中期, 用 SELDI 蛋白芯片技术所做的疾病生物标志筛选工作还罕有报道。但 2001 年底

以来, 已陆续报道采用 SELDI 蛋白质芯片技术从膀胱癌和卵巢癌病人的血清中分别筛选出膀胱癌的标志分子和卵巢癌的标志分子^{4,5}。从上述报道可以看出, 虽然蛋白质芯片技术被人们采用不久, 但它已成为蛋白质组学研究的主要技术之一, 尤其在标志分子筛选方面尤为适合。

我们前期工作中已经从肺癌病人的血清中筛选出了 15 个标志分子 (Biomarker)⁶, 为了进一步确认这些标志分子的来源及其与肺癌发生的关系, 本文利用 SELDI 蛋白质芯片技术分析了体外培养的肺癌细胞株与正常肺细胞的蛋白质谱, 通过与肺癌血清的标志蛋白做对比分析, 筛选出肺癌细胞的标志蛋白。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及芯片 己脒、三氟乙酸、尿素、蛋白酶抑制剂、HEPES、Tris、CHAPS 和 OGP 均购自 Sigma 公司。蛋白芯片: IMAC3 蛋白质芯片、WCX2 蛋白质芯片和阴离子交换柱 (Hyper Q DF) 购于美国 Ciphergen 公司。

1.1.2 标本来源 肺癌细胞株 (A549) 大细胞肺癌细胞株 (PG) 为北京师范大学细胞所保存, 肺腺癌细胞株 (Calu-6) 由北京市肿瘤防治研究所张志谦教授赠送。人胚肺二倍体成纤维细胞 (2BS) 购于北京生物制品所, 本实验所用的是第 22 代 2BS 细胞。

1.1.3 蛋白质芯片阅读机 蛋白质芯片阅读机

* 教育部科学技术重点 (批准号: 272006) 资助项; 国家自然科学基金 (批准号: 30370712) 资助项目; 国家“863” (批准号: 2002AA232031) 资助项目

** 联系人, 北京师范大学细胞生物学研究所 62208439 dhe@bnu.edu.cn

(美国 CIPHERGEN 公司生产, PBSII - C 型) 是基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的原理。它可以检测 1000Da 小分子物质以及多肽, 也可检测 500kDa 以下的大分子。

1.1.4 蛋白质芯片 本实验采用两种化学修饰的蛋白质芯片, IMAC3(固定金属亲和芯片) 芯片表面结合有亚硝基, 它可以螯合金属离子(如 Cu, Ni, Ga 等), 加到芯片表面结合点上的蛋白质通过半胱氨酸和色氨酸位点上的磷酸化氨基酸等与金属离子结合。WCX2(弱阳离子交换芯片) 芯片其表面结合有弱型阴离子羧基, 可以和被分析物表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸) 而捕获蛋白。

1.2 方法

1.2.1 细胞总蛋白的提取 A549、Galv - 6、PG 和 2BS 细胞采用含有 10% 血清的 1640 培养基培养, 细胞长成单层后, 用细胞刷刮取细胞, 冷 PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液(8M Urea, 4% CHAPS, 40mM Tris - HCl PH7.4, 1 μ g/mL 的 Leupeptin 和 Aprotinin, 0.1mM PMSF), 静置 30min, 14000rpm 离心 20min, 取少量上清用 BCA 蛋白定量试剂盒的微量测试法测定总蛋白浓度, 其余上清分装 - 80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 水化阴离子交换柱 阴离子交换柱用 5 倍柱床体积的 Tris - HCl(50mol/L, pH9) 洗 3 次, 并将上述处理过的柱子储存在 0.8mL 的缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日使用。

1.2.3 上样和洗脱 用 1mol/L 尿素调节细胞的蛋白浓度至 2mg/mL。取 200 μ L 滴加到阴离子交换柱柱床上面, 1100g/min 振荡 20min。

1.2.4 样品的收集 阴离子交换柱采用梯度 pH 洗脱液(pH9, pH7, pH5, pH4) 洗脱, 以获得不同 pH 的流出液组分。用 pH9 洗脱液洗脱获得的流出液称为组分 1; pH7 洗脱液洗脱获得的流出液称为组分 2。以此类推, 用 pH5, pH4 洗脱柱床, 获得组分 3、组分 4。每个组分将分别采用 IMAC3 和 WCX2 芯片检测, 每个组分至少在两个以上的同种芯片上检测, 以检测同一种芯片之间的组间差异。

1.2.5 IMAC3 蛋白芯片实验步骤 在 IMAC3 蛋白芯片 8 个点(A ~ H) 的表面加 10 μ L 100mmol/L CuSO₄, 置入湿盒内孵育 15min, 吸去剩余的 CuSO₄, 加 5 μ L 结合缓冲液(100mmol/L NaCl, pH7) 与芯片各

点上, 孵育 5min, 吸去芯片各点上的液体, 将芯片安装于 Bioprocessor 上, 每点分别加 20 μ L 不同组分的流出液和 80 μ L 结合缓冲液, 振荡孵育 30min, 弃掉液体, 各点用 200 μ L 洗脱缓冲液(100mmol/L NaCl, pH7) 洗涤 2 次, 每次 5min, 卸去 bioprocessor, 取出芯片用 M-Q 水洗涤 2 次, 待芯片表面自然晾干后, 各点加两次 0.5 μ L SPA, 芯片表面干后, 用蛋白质芯片阅读机(PBSII - C 型) 进行蛋白质谱分析。

1.2.6 WCX - 2 蛋白芯片实验步骤 用 5 μ L 10mmol/L HCl 预处理 WCX - 2 蛋白芯片上 A - H 点 10min, 用 M - Q 水洗芯片 3 次, 将芯片安装于 bioprocessor 上, 芯片 A - H 点加 150 μ L 结合缓冲液(100mmol/L 乙酸钠, pH4.0), 振荡室温下孵育 5min, 弃掉液体, 每点分别加 10 μ L 不同组分流液和 90 μ L 结合缓冲液, 振荡孵育 30min, 弃掉液体, 用 150 μ L 洗脱缓冲液(100mmol/L 乙酸钠, pH4.0) 洗涤芯片 2 次, 每次 5min, 卸去 bioprocessor, 芯片用 M - Q 水洗涤 2 次, 待芯片表面自然晾干后, 各点加两次 0.5 μ L SPA, 芯片表面干后, 用蛋白质芯片阅读机(PBSII - C 型) 进行蛋白质谱分析。

1.2.7 数据采集和结果分析 蛋白质芯片采用蛋白质芯片阅读机 PBSII - C 型读取数据。仪器每天用标准多肽(Peptide all in one) 和低于 200000Da 的蛋白质标准分子(protein all in one) 校正, 系统的质量偏差为 0.1%。检测芯片时蛋白质芯片阅读机设置如下: 激光强度 230、检测敏感度 8, 优化分子量范围 3000 ~ 50000Da, 最高分子量 200000Da, 每个样品收集 50 个点, 采用 Ciphergen Proteinchip 3.0.2 版本的分析软件自动采集数据。两个蛋白质峰比较时, 标志蛋白定义为蛋白质峰强度相差 1 倍以上。

2 结果

2.1 肺癌细胞与正常肺细胞之间存在稳定的蛋白质表达差异

采用 PBSII - C 型蛋白质芯片阅读机自动收集数据, 设有意义峰的信噪比(signal/noise) 为 3。实验结果表明与正常肺细胞 2BS 相比, 两种芯片平均捕获 412 个蛋白峰, 其中有 24 个蛋白质在肺癌细胞(A549、Galv - 6 和 PG) 中出现明显的变化(见图 1), 有 10 个标志蛋白在肺癌细胞中高表达, 14 个标志蛋白在肺癌细胞中低表达(见表 1)。有趣的是在上述差异蛋白中有 2 个标志蛋白 4353Da 和 4873Da 可

被 WCX2 和 IMAC - Cu 芯片共同捕获(见图 2)。令人感到兴奋的是与对照细胞相比,有 2 个标志蛋白 4353Da 和 15120Da 在 WCX - 2 芯片上被捕获(见图 3),其结果与我们从肺癌血清中筛选出的标志蛋白结果一致,即 4353Da 在肺癌细胞中高表达;15120Da 在肺癌细胞中低表达。

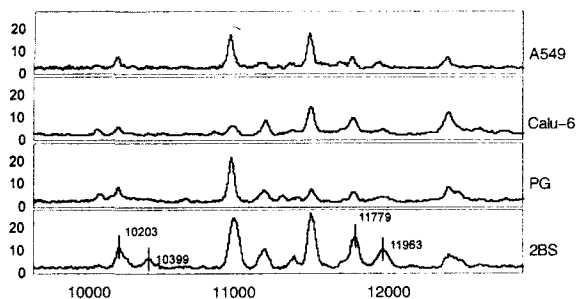


图 1 WCX2 芯片上 10000 - 13000Da 区段分子量的 SELDI 图谱

横坐标表示分子量,纵坐标表示蛋白质峰的高度。谱图从上至下依次为 A549 细胞、Calu - 6 细胞、PG 细胞和 2BS 细胞。标记的峰是在正常肺细胞株中高表达的差异蛋白。

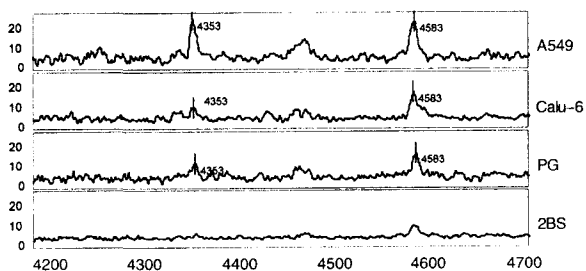


图 2 在 IMAC - Cu 芯片上 4200Da - 4700Da 区段的蛋白质质谱图

横坐标表示分子量,纵坐标表示蛋白质峰的高度。谱图从上至下依次为 A549 细胞、Calu - 6 细胞、PG 细胞和 2BS 细胞。标记的峰是与肺癌病人血清中高表达相一致的标志蛋白。

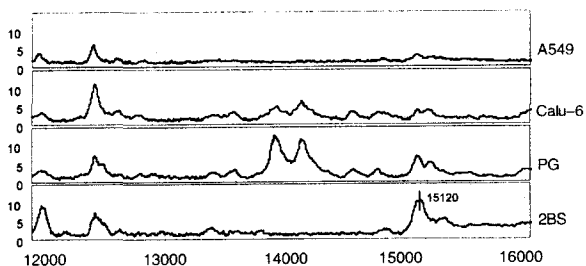


图 3 在 WCX2 芯片上部分蛋白质质谱图

横坐标表示分子量,纵坐标表示蛋白质峰的高度。谱图从上至下依次为 A549 细胞、Calu - 6 细胞、PG 细胞和 2BS 细胞。标记的峰是与肺癌病人血清中低表达相一致的标志蛋白。

表 1 三种肺癌细胞株与正常肺细胞株共同的差异蛋白

标志蛋白	WCX2	IMAC-Cu	标志蛋白	WCX2	IMAC-Cu
↑	3035Da	4353Da*	↓	5449Da	2772Da
↑	4156Da	4583Da	↓	8306Da	2958Da
↑	4353Da*	4754Da	↓	10203Da	3142Da
↑	4873Da*	4873Da*	↓	10399Da	4036Da
↑	5746Da	5080Da	↓	11779Da	7848Da
↑	8297Da		↓	11963Da	8299Da
↑	8692Da		↓	15120Da	8616Da

“↑”表示在肺癌细胞中高表达的标志蛋白;“↓”表示在肺癌细胞中低表达的标志蛋白;

“*”表示在 WCX2 和 IMAC - Cu 芯片上均出现的标志蛋白

2.2 不同亚型肺癌细胞的蛋白质表达差异

除去与正常细胞的共同差异蛋白,3 种肺癌细胞株蛋白质谱相比时,有 6 个标志蛋白 6455Da、6719Da、8508Da、10625Da、12893Da 和 16979Da 只在 PG 癌细胞中表达(见图 4);而 4161Da、4699Da 和 4985Da 三个标志蛋白只在 Calu - 6 癌细胞中表达(见图 5)。

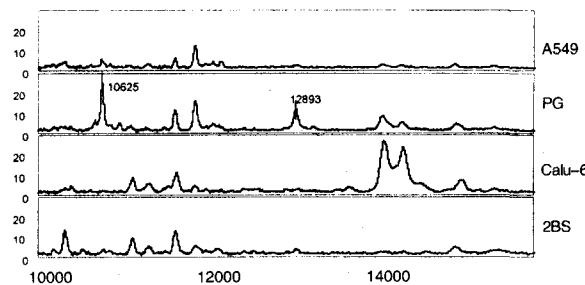


图 4 WCX2 芯片上 10000 - 14000Da 区段上的 SELDI 图谱

横坐标表示分子量,纵坐标表示蛋白质峰的高度。标记的峰是只在 PG 癌细胞中高表达的标志蛋白。

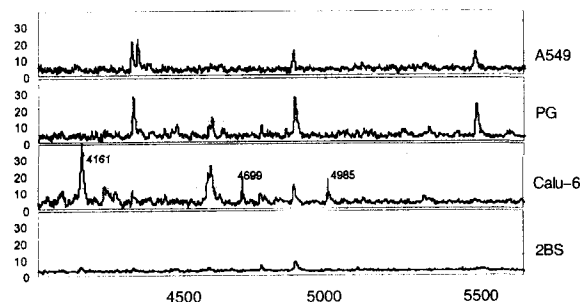


图 5 IMAC - 3 芯片上 4000 - 5500Da 区段上的 SELDI 图谱

横坐标表示分子量,纵坐标表示蛋白质峰的高度。标记的峰是只在 Calu - 6 癌细胞中高表达的标志蛋白。

3 讨论

肺癌在我国是最常见的恶性肿瘤之一,且发病

率有逐年上升的趋势。虽然在常见肿瘤标志物中肺癌标记物最多,其中包括蛋白质、内分泌物质、酶、肽类和各种抗原物质。但总的来说均缺乏特异性,只能作为观察病情变化的参考指标⁷。因此寻找和研究肺癌特异性强、敏感性高的标志分子作为肺癌的早期诊断或预警显得尤为重要。

众所周知,血清中蛋白部分来源于组织细胞的分泌和代谢。绝大部分组织细胞发生病理改变时,其细胞内改变的成分包括肽类、蛋白质、酶类和代谢产物等可分泌到血液中,如肝癌可在血清中检测甲胎蛋白,卵巢癌可在血清中检测 CA125 抗原,前列腺癌可在血清中检测 PSA 抗原。但目前临床所用的血清学检测指标其特异性和敏感性均较低,很难单独使用或在疾病早期做出诊断。我们在前期工作中已经从肺癌病人血清中筛选出 15 个标志蛋白,其敏感性和特异性均超过 90%。为了确认我们从血清中筛选的 15 个肺癌标志蛋白的组织特异性,同时寻找不同亚型肺癌细胞的差异蛋白,本实验选用体外培养的肺癌细胞株为实验材料,初步筛查肺癌细胞的标志蛋白。

体外培养的肿瘤细胞株虽然不能完全反应体内肿瘤细胞的生长状态和生物学特性。但它具有细胞成分单一、均质性好和实验条件容易控制等优点。尤其在对比性研究时,可避免由组织细胞成分复杂、细胞异质性高等缺点造成的结果不真实和不可靠。本研究采用 SELDI 蛋白质芯片技术检测了肺癌细胞与正常肺细胞的蛋白质谱变化。为了增加实验结果的可靠性,避免由于细胞类型不同所造成的差异蛋白误选,我们选用了 3 种不同类型细胞来源的体外培养的肺癌细胞株(A549、Calu-6 和 PG)与正常肺细胞蛋白质谱进行比较。确认 3 种肺癌细胞株与正常肺细胞株共同的差异蛋白作为肺癌细胞的标志蛋白。结果发现与正常肺细胞株相比,有 24 个标志蛋白在 3 种肺癌细胞株中均发生了明显的改变,其中有 10 个标志蛋白在肺癌细胞中表达增高,有 14 个标志蛋白在肺癌细胞中表达降低。其中有 2 个标志蛋白 4353Da 和 4873Da 可被 WCX-2 和 IMAC-Cu 两种芯片共同捕获。根据芯片表面修饰的特性,4353Da 和 4873Da 两个标志蛋白可能是磷酸化蛋白或具有磷酸化位点的肽。令人感到振奋的是本实验筛选出的肺癌标志蛋白中,有两个标志蛋白与我们从肺癌病人血清中筛

选出的标志分子结果一致,即 4353Da 标志蛋白在肺癌病人血清和肺癌细胞株中均表达增高;15120Da 标志蛋白的表达则相反。从上述结果可以推断肺癌在发生和发展的过程中,其细胞内的蛋白质变化可以反应到血清中;可从体外培养的肺癌细胞株中筛选出部分与肺癌病人血清相一致的标志蛋白。当然并非所有肺癌细胞内发生改变的蛋白都可在血清中被检测出来。有些改变的蛋白可能只存在于细胞内而不分泌或代谢到细胞外,这部分蛋白可能是与癌症的发病密切相关功能蛋白和调节蛋白。本实验的结果也为上述推断提供了直接和有力的证据。另外我们也比较了 3 种肺癌细胞株的蛋白质谱差异,结果发现有 3 个标志蛋白只在 PG 细胞株中高表达,3 个标志蛋白在 A549 和 Calu-6 细胞株中高表达。由此可见,不同亚型的肺癌细胞株也具有特异的差异蛋白。这些结果对我们从血清或组织标本中筛选和鉴定肺癌亚型之间的标志蛋白有重要意义。目前我们正采用激光显微切割仪(Laser Capture Microdissection; LCM)和 SELDI 技术从不同亚型的肺癌病人组织中进一步筛选肺癌差异蛋白,通过与已筛选的肺癌标志蛋白的比较分析,确认肺癌的标志蛋白和功能蛋白。为临床肺癌的分子诊断提供新的思路,以期使肺癌亚型的血清学诊断成为可能。

参考文献

- 1 Tran, Y. K., Bögl, O., Gorse, K. M., Wieland, I., Green, M. R., and Newsham, I. F. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Research*, 1999, 59: 35 ~ 43
- 2 Wang, K. K., Liu, N., Radulovich, N., et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 2002, 21 (49): 7598 ~ 604
- 3 何大澄,肖雪媛. SELDI 蛋白质芯片技术在蛋白质组学中的应用, *现代仪器*, 2002, 8(1): 1 ~ 4
- 4 Adam, B., L., Qu, Y., Davis, J., et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Research*, 2002, 62: 3609 ~ 3614
- 5 Petricoin III, E., F., Ardekani, A., M., Hitt, B., et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *The Lancet*, 2002, 359: 572 ~ 577
- 6 XIAO Xueyuan, WEI Xiuping, HE Dacheng (2003). Proteomics approaches to biomarker discovery in lung cancers by SELDI Technology. *China of Sciences*, 46(5): 31 ~ 537
- 7 李佩文. 肺癌综合诊疗学, 北京: 中国中医药出版社, 2001

(上转第 12 页)

- rated peptide mixtures. *Anal. Chem.*, 1996, 68: 527 ~ 533
- 21 Steen H, Kuster B, Fernandez M, et al. Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 1031 ~ 1039
- 22 Hinsby A M, Olsen J V, Bennett K L, et al. Signaling initiated by overexpression of the fibroblast growth factor receptor - I investigated by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2003, 2 (1): 29 ~ 36
- 23 Kjeldsen F, Haselmamm K F, Budnik B A, et al. Complete characterization of post - translational modification sites in the bovine milk protein PP3 by tandem mass spectrometry with electron - capture dissociation as the last stage. *Anal. Chem.* 2003, 75 (10): 355 ~ 361
- 24 Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, et al. Ageneric purification method for protein complex characterization and protein exploration. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17: 1030 ~ 1032
- 25 Gavin A C, Bosche M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, 415: 141 ~ 147
- 26 Elson R W, Nedelkov D, Tubbs K J. Biosensor chip mass spectrometry: A chip - based proteomics approach. *Electrophoresis*, 2000, 21: 155 ~ 1163
- 27 何大澄, 肖雪媛. SELDI 蛋白质芯片技术在蛋白质组学中的应用. *现代仪器*, 2002, 8 (1): 1 ~ 4

Applications of biological mass spectrometry in proteomics studies

Huang Lingyun Zhao Heping Ding Qingxue He Dacheng

(Universities' Confederated Institute of Proteomics, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract This article briefly reviewed the development of biological mass spectrometry and its applications in proteomics studies.

Key words Biological mass spectrometry Proteome Application

(下接第 16 页)

The preliminary analysis of distinct proteins for different subtypes of lung cancer cells lines *

Xia Liang Cai Weili Zhang Lijuan Sun Yina Xiao Xueyuan He Dacheng * *

(Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Universities' Confederated Institute of Proteomics, Beijing 100875)

Abstract Discovered the common biomarkers in lung cancer cell lines and detected the distinct proteins for different subtypes of lung cancer cell lines. Applied SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) proteinchip technique to detect three kinds of lung cancer cell lines; A549 and Calu - 6 (adenocarcinoma), and PG (large cell lung cancer) and human embryonic lung diploid fibroblast (2BS). Anion - exchange columns were used to fractionate the total protein of these cells with 4 designated pH washing solutions. Two different types of protein chip arrays, IMAC - Cu and WCX2, were used. protein chips were examined in PBSII - C Protein Chip Reader (CIPHERGEN Biosystem Inc) and the protein profiling was analyzed by Proteinchip Software 3.0.2. The results revealed twenty four peaks had significant difference between lung cancer cells and 2BS cells, ten of which were up - regulated in lung cancer cells, and the others were down - regulated. The results suggest that there are same distinct proteins in protein profiling between different subtypes of lung cancer cells and normal lung cells, and the protein expression of different types of lung cancer cells is different.

Key words Proteinchip array system Lung cancer cell lines Distinct Proteins