

大肠癌细胞辐射敏感相关蛋白的初步筛选

邢春根, 杨晓东*, 周丽英, 吴永友, 戴宏, 吕孝东, 龚巍

(苏州大学附属第二医院 普外科, 江苏 苏州 215004)

摘要:人大肠癌细胞 LOVO 和 SW480 细胞具有不同的辐射敏感性。用直线加速器分别予以 0、2、4、6 Gy X射线照射,然后运用 SELDI-TOF 蛋白质芯片技术测定照射后 24 h 细胞的蛋白质谱,分析两株细胞间在不同照射剂量后的蛋白质表达情况,通过 Swiss-Prot 数据库搜索初步筛选出可能与大肠癌细胞辐射敏感性相关的几种蛋白:GADD45B、Thioredoxin、Metallothionein 1(MT1)。结果表明:大肠癌辐射敏感性的预测能够从蛋白质水平来体现,而 SELDI-TOF 蛋白质芯片技术可从蛋白质水平预测人大肠癌细胞辐射敏感性,为临床大肠癌患者的个体化放疗提供选择依据。

关键词:大肠癌细胞;辐射敏感性;蛋白组学

中图分类号:R735.34

文献标志码:A

文章编号:1000-6931(2008)06-0512-05

Preliminary Screening of Radiosensitivity-Associated Proteins in Colorectal Cancer Cells

XING Chun-gen, YANG Xiao-dong*, ZHOU Li-ying, WU Yong-you,
DAI Hong, LU Xiao-dong, GONG Wei

(The Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, China)

Abstract: Two human colorectal cancer cell lines with different degrees of radiosensitivity, LOVO and SW480, were received a succession of 0, 2, 4, and 6 Gy X-ray radiation. Then, in 24 h after radiation, the protein spectra of each cell line were measured by SELDI-TOF protein chip so that we could get the differentiated protein expressions of each cell line after different radiation doses. And the differentially-expressed protein peaks showing gradient change in a dose-dependent manner of the two cell lines were detected. Finally, GADD45B, Thioredoxin and Metallothionein 1 (MT1) were screened out through Swiss-Prot database as proteins highly related with radiosensitivity in colorectal cancer. The result shows that radiosensitivity in colorectal cancer can be predicted at protein level and SELDI-TOF protein chip can be used to predict radiosensitivity in colorectal cancer at protein level, thus providing ample choices for individualized radiotherapy.

Key words: colorectal cancer cell; radiosensitivity; proteomics

收稿日期:2007-08-20;修回日期:2007-11-30

基金项目:国家卫生部资助项目(wkj20062027)

作者简介:邢春根(1965—),男,江苏高淳人,教授,主任医师,胃肠道肿瘤临床与实验研究专业

* 通讯作者:杨晓东(1978—),男,江苏苏州人,医学硕士,wjyxd@163.com

肿瘤细胞内在的辐射敏感性对肿瘤的综合治疗有很大影响,因此,细胞内在辐射敏感性一直是放射生物学和肿瘤学研究中的焦点问题。放射治疗是大肠癌综合治疗的重要组成部分,然而,因肿瘤细胞内在辐射敏感性的不同,在同样的放射治疗条件下,治疗效果存在显著差异。蛋白质作为生命活动的“执行者”,参与了DNA合成、基因转录激活、蛋白质翻译、修饰和定位以及信息传导等重要生物过程,在辐射效应分子机制中发挥着重要作用。因此,蛋白质研究将比基因组方法提供更多的分子和临床交互性。然而,蛋白质研究不能局限于生命活动中某一种或某几种蛋白质,大规模、全方位的蛋白质研究势在必行。蛋白质组学主要研究细胞内所有蛋白质在生命过程中的表达、蛋白质之间的相互作用、翻译后的各种修饰等。F. M. Smith等^[1]认为,血清蛋白组学分析在直肠癌放疗中可以预测早期放疗反应,并且将在直肠癌的综合治疗及临床实验中发挥重要的作用。通过研究不同治疗水平、不同阶段的蛋白质谱变化,将更有助于临床大肠癌辐射敏感性的预测。

本实验采用 SELDI-TOF 蛋白质芯片对不同辐射剂量的两株大肠癌细胞进行质谱鉴定,通过 Swiss-Prot 数据库搜索筛选可能与大肠癌辐射敏感性相关的蛋白质,探讨蛋白质芯片技术预测肿瘤辐射敏感性的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RPMI1640 培养液,美国 GibcoBRL公司;F12 培养液,美国 GibcoBRL公司;小牛血清,杭州四季青生物工程公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程公司;胰蛋白酶,华美生物工程公司。

1.1.2 细胞系 人大肠癌细胞系 SW480、LOVO均由中国科学院上海细胞研究所提供。

1.1.3 仪器 直线加速器,飞利浦 SL-18 型;PBS-II 蛋白芯片阅读机、CM10 蛋白芯片,美国 CIPHERGEN Biosystems 公司;CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司;倒置显微镜,日本 Olympus 公司;低温高速离心机,美国 Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

培养不同大肠癌细胞,分别对其进行不同剂量的照射。培养 24 h 后收集,将细胞进行裂解,紫外分光光度计测定调整蛋白质浓度,将蛋白质芯片进行预处理后进行 Spa 点样,上芯片阅读机检测蛋白质谱。

1.2.1 SW480 细胞、LOVO 细胞培养 采用静置贴壁法,SW480 细胞系在含有 20% 小牛血清的 1640 完全培养液中生长,LOVO 细胞系在含有 20% 胎牛血清的 F12 完全培养液中生长,加入双抗,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。进入对数生长期后,估计细胞生长基本铺满瓶底,设 0、2、4、6 Gy 4 个剂量点,用直线加速器 6 MV X 射线照射,射野大小为 12 cm × 5 cm,剂量率为 195 Gy/min。室温照射,培养皿上垫 1.5 cm 厚的补偿块。照射后 24 h,收集细胞。

1.2.2 蛋白浓度的测定(BIO-RAD DC protein assay kit 方法) 在保存好的样品中依次加入 4 μL 抑制剂、300 μL 裂解液,于 4 °C 下振荡 30 min 后在 4 °C、10 000~20 000 r/min 下离心 30 min,同时用标准蛋白配置浓度分别为 3、1.5、1.0、0.5、0.25 g/L 标准瓶。将 10 μL DC Regent S 加至 500 μL DC Regent A 中制成 Regent A'。离心后,分别取 5 μL 上清液和 5 μL 各标准液,于 Clean 振荡后分别加入 5 μL RC Regent I,振荡后室温放置 1 min。再分别加入 5 μL RC Regent II,振荡后,15 000 r/min 下离心 3~5 min,去上清液,分别加入 Regent A' 25.4 μL,室温放置 5 min,再加入 DC Regent B 5 μL,室温放置 15 min。然后,用紫外分光光度计测定蛋白质浓度。

1.2.3 蛋白芯片检测 在取得的上清液中加入裂解液,调至浓度为 5 g/L,继用醋酸钠稀释浓度至 2 g/L。将芯片 A~H 每点用 50 mmol/L 醋酸钠,振荡室温下孵育 5 min,重复 2 次;用去离子水振荡洗涤 2 次。芯片 A~H 每点加入样品 100 μL,4 °C 振荡 1 h。甩去孔中液体,用 HPLC 水振荡洗涤 3 次,每次 5 min,自然干燥后,每孔各加 0.5 μL,Spa 2 次,芯片表面干燥后,用 PBS-II 蛋白质芯片阅读机读取数据。检测芯片时,蛋白质芯片阅读机设置如下:激光强度,195;检测敏感度,7;优化分子量范围,2~30 kD;最高分子量,100 kD。采用 Protein

Chip 3.2.0 版分析软件自动收集和处理数据。

2 结果

2.1 两株大肠癌细胞的蛋白质峰与质荷比

1) 将 SW480 细胞与 LOVO 细胞对照的原始蛋白质指纹图谱标准化后,在 0 ~ 55 000 kD 范围内聚类和峰值分析后选出 98 个质荷比峰,结果示于图 1。

2) 通过 Protein Chip 3.2.0 软件分析后获得两者表达有差异的蛋白质峰的平均质荷比 m/Z 。LOVO 细胞在平均质荷比为 3 366.87 的蛋白质峰值比 SW480 细胞的高,在平均质荷比为 4 743.52、6 077.43、7 259.53、9 155.45 的蛋白质峰值比 SW480 细胞的低。随辐射剂量变化的蛋白质峰的平均质荷比为 2 478.24、4 521.30、5 383.82、5 655.29、7 472.21、8 454.03、11 610.70、15 829.02、17 859.47。

2.2 两株大肠癌细胞的蛋白质峰值与辐射剂量的相关性

随着辐射剂量的增加,细胞内与辐射敏感相关蛋白质的变化使所在的蛋白质峰出现相应的变化。

1) LOVO 细胞在平均质荷比分别为 2 478.24、4 521.30、5 383.82、8 454.03、11 610.70 的蛋白质峰值随辐射剂量增加呈梯度下降。

2) SW480 细胞在平均质荷比分别为 5 655.29、7472.21 的蛋白质峰值随辐射剂量

增加呈梯度递增,在平均质荷比分别为 15 829.02、17 859.47 的蛋白质峰值随辐射剂量增加呈梯度下降。

2.3 辐射敏感相关蛋白的初步筛选

通过 Swiss-Prot 数据库搜索,初步发现 3 个可能与辐射敏感性相关的蛋白质:硫氧还蛋白(Thioredoxin)、金属硫蛋白(Metallothionein1, MT1)、生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白(GADD45B)。蛋白质功能信息列于表 1。

表 1 蛋白质功能信息表

Table 1 Function message of protein

蛋白质	基因	功能
生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 GADD45 Beta	GADD45B	参与调节生长和凋亡。介导活化的应激反应 MTK1/MEKK4 MAPKKK
硫氧还蛋白 Thioredoxin	TXN	参加各种氧化还原反应,通过可逆氧化,其活性中心二硫-二硫化物和催化二硫-二硫化物交换反应
金属硫蛋白 Metallothionein-1F	MT1F	高含量半胱氨酸残滓约束各种重金属,这些蛋白质通过重金属及糖皮质激素转录调控
金属硫蛋白 Metallothionein-1L	MT1L	高含量半胱氨酸残滓约束各种重金属,这些蛋白质通过重金属及糖皮质激素转录调控
金属硫蛋白 Metallothionein-1X	MT1X	高含量半胱氨酸残滓约束各种重金属,这些蛋白质通过重金属及糖皮质激素转录调控

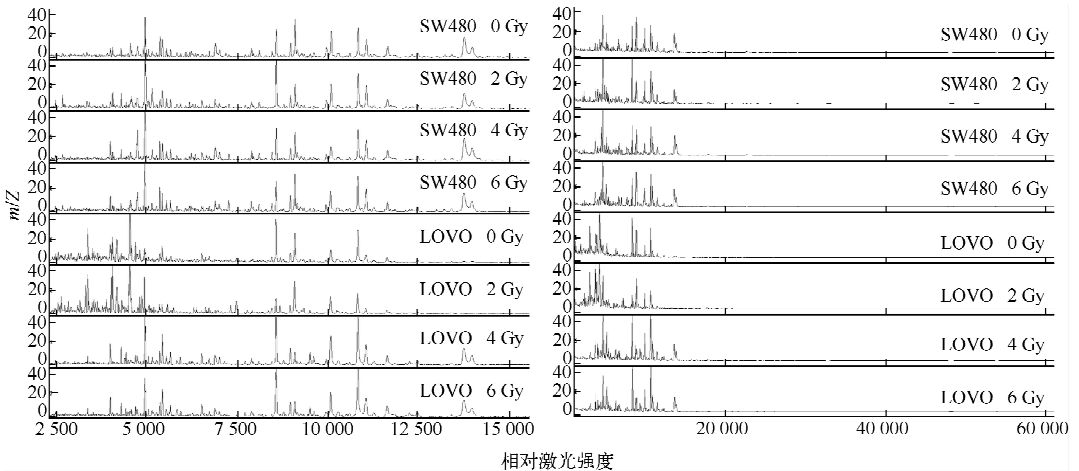


图 1 SW480 细胞与 LOVO 细胞差异蛋白质的原始质谱

Fig. 1 Protein peaks and m/Z values of SW480 and LOVO cell lines

3 讨论

近年来,蛋白质组技术发展迅速,通过鉴别有关的蛋白质组,为阐明肿瘤发生发展的机制、开发新的诊断和治疗途径提供了新的机遇。蛋白组学的发展形成了对癌症发生发展的空前理解,同时也对蛋白水平研究肿瘤的辐射敏感性提供了广阔的前景。在大肠癌放疗敏感性或放射抵抗的研究中,蛋白组学提供了比基因研究方法更多的分子-临床交互性。放射敏感性的变化不是某一个蛋白发生变化所致,而是组织或细胞内大量蛋白质所形成的复杂网络变化所致,是由各因素相互作用导致的。单独研究某一个蛋白质或某一方面,必定不能完全阐明放射增敏机制。而蛋白组学无疑为我们提供了这样的一个平台。

蛋白质组并非静止的,会因为基因结构的变化以及环境的刺激不断发生变化。另外,许多蛋白质还要进行翻译后修饰,如糖基化和磷酸化等,均会造成它们的波动^[2]。因此,大规模、全方位的蛋白质研究势在必行。在肿瘤辐射敏感性的研究方面,早在1992年,P. Ramsamoj 等^[3]已把蛋白组学相关方法应用到头颈部鳞癌细胞的研究中,用于鉴定不同表达的蛋白质,作为辐射敏感或辐射抵抗相关分子标记物。但当时的技术水平相对落后,不仅灵敏度不高,而且没有先进的蛋白质鉴定技术和生物信息学技术,因此,蛋白质鉴定困难,信息分析繁琐。近年来,在肝癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌等恶性肿瘤的蛋白组学研究中,鉴定了一批肿瘤相关的蛋白质,为恶性肿瘤的早期诊断、疗效检测和预后判断提供了可靠的实验依据。蛋白组学技术在乳腺癌,恶性黑色素瘤细胞的药物敏感性的研究中已展现出其优势,获得了较为理想的结果^[4-5]。A. S. Allal^[6]认为,成熟蛋白质在辐射敏感和辐射抵抗的分子机制中发挥重要的作用,他直接从接受放射治疗的肿瘤病人取得活检标本,用双向凝胶电泳(2-DE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)研究了辐射相关的蛋白质,这一结果为大肠癌辐射敏感性的继续研究提供了一个实验基础。

在以往的实验中,我们通过 SF₂ 检测和 FISH 技术证实了 LOVO 细胞与 SW480 细胞

的辐射敏感性存在差异,LOVO 细胞的辐射敏感性明显高于 SW480 细胞。本实验中,我们继续以 LOVO 细胞和 SW480 细胞作为实验对象,通过 Swiss-Prot 数据库搜索,我们初步认定可能与肿瘤细胞辐射敏感性相关的蛋白质有 GADD45B, Thioredoxin 和 Metallothionein (MT1) (包括 MT1F、MT1L、MT1X)。GADD45 为生长抑制和 DNA 损伤诱导因子(包括 GADD45A, GADD45B),是一种细胞周期调节蛋白质,能够诱导肿瘤细胞凋亡。有文献报道,当 DNA 受到辐射损伤后,GADD45 表达增强,诱导受损细胞停滞于 G1 期,抑制细胞进入 S 期进行 DNA 复制及细胞增殖,同时激活细胞的核酸切除修复功能^[7]。在肿瘤细胞接受放射治疗的过程中,细胞缺氧、内在的辐射敏感性和细胞增殖对治疗效果有重要影响^[8]。Thioredoxin 蛋白是一种具有生长因子活性的氧化还原蛋白,通过调节一些细胞生长相关的蛋白质的活性来促进肿瘤细胞的增殖^[9],并在辐射防护中具有重要作用^[10]。Metallothionein 1(MT1)是一种金属硫蛋白,研究证实,MT1 能够通过调节细胞周期来促进肿瘤细胞的增殖^[11],在抗肿瘤药物的抗药性方面也有重要作用,特别是 MT1X^[12]。在实验中,各放射剂量点,GADD45B 在 SW480 细胞中的蛋白质丰度高于 LOVO 细胞;Thioredoxin 蛋白与 MT1X、MT1L、MT1F 蛋白通过质谱鉴定,在 SW480 细胞的蛋白质丰度高于 LOVO 细胞。当然,初筛的蛋白质包括未知蛋白质还需要相关研究进一步来鉴定、验证,且图谱中的峰高与蛋白质丰度之间的关系并非均呈线性,实验结果更需大样本量实验来进一步求证。本实验结果提示,SELDI-TOF 蛋白芯片技术是肿瘤辐射敏感性研究新的、科学的、可靠的、敏感的预测方法,它能帮助我们更为精确地从蛋白质水平体现出肿瘤辐射敏感性的状态。初步筛选的辐射敏感性相关蛋白质通过大样本实验及临床实践的验证,可用以绘制大肠癌辐射敏感性诊断性蛋白质指纹图谱,为临床大肠癌个体化放疗的制定提供重要参考。蛋白组学分析在在筛选和监督肿瘤放化疗反应方面表现出强大的潜力,目前尚未见关于评价蛋白组方法预测直肠癌放疗反应方面的研究。

SELDI-TOF 蛋白芯片技术用于人肿瘤细胞系辐射敏感性的研究,具有快速、高通量、高灵敏的特点,特别是对低丰度蛋白具有较高的捕获效果。但临床常规应用不但取决于蛋白质分析技术本身的发展,同时还要符合临床实验室诊断的标准。随着研究的不断深入,有望成功绘制结肠直肠癌辐射敏感性的蛋白质指纹图谱,实现结肠直肠癌患者的个体化治疗。

参考文献:

- [1] SMITH F M, GALLAGHER W M, FOX E, et al. Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy[J]. *Ann Surg*, 2007, 245(2): 259-266.
- [2] STEIN R C, ZVEHBIL M J. The application of 2D gel-based proteomics methods to the study of breast cancer[J]. *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7: 385-393.
- [3] RAMSAMOOJ P, KASID U, ANATOLY D, et al. Differential expression of proteins in radioresistant and squamous carcinoma cells[J]. *Natl Cancer Inst*, 1992, 84: 622-628.
- [4] LEE S C, TAN P, WATSON M, et al. Tumor genomics and proteomics and drug pharmacokinetics in predicting chemotherapy response in breast cancer[J]. *Clin Oncol*, 2005, 23 (Suppl.): 3 009.
- [5] SINHA P, POLAND J, KOHL S, et al. Study of the development of chemoresistance in melanoma cell lines using proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24: 2 386-2 404.
- [6] ALLAL A S, KAHNE T, ALEXANDRA K, et al. Radioresistance-related proteins in rectal cancer[J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2 261-2 269.
- [7] SMITH M L, FOMACE A J, Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis[J]. *Mutat Res*, 1996, 340: 109-124.
- [8] POLLACK A, DESILVIO M, KHOR L Y, et al. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation therapy oncology group trial 92-02 [J]. *Clin Oncol*, 2004, 22: 2 133-2 140.
- [9] GALLEGOS A, GASDASKA J R, TAYLOR C W, et al. Transfection with human thioredoxin increases cell proliferation and a dominant-negative mutant thioredoxin reverses the transformed phenotype of human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(24): 5 756-5 770.
- [10] WEISS J F, LANDAUER M R. Radioprotection by antioxidants[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 899: 44.
- [11] NAGEL W W, VALLEE B L. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells[J]. *PNAS*, 1995, 92: 579.
- [12] CHUN J H, KIM H K, KIM E. Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 4 703-4 706.