

论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0866-04

人肺腺癌耐药细胞株 A549/CDDP 中相关泛素化蛋白质研究

秦霞¹, 邱宗荫², 邱峰¹, 粟林¹, 屈灿¹ (400016 重庆, 重庆医科大学: 附属第一医院药剂科¹, 药学院²)

[摘要] 目的 研究肺腺癌中与耐药相关的泛素化或类泛素化蛋白质及其与耐药的关系。方法 从经顺铂处理和未处理的 A549 细胞及其耐顺铂细胞株中分离泛素化、类泛素化蛋白质, 通过 1D SDS-PAGE 和 Chip HPLC-MS/MS 分析鉴别蛋白, Western blot 法验证质谱结果; MTT 法检测细胞对顺铂的耐药性。结果 鉴定出发生类泛素化修饰蛋白质-PKM2, 并发现其在耐药细胞株中低表达; 以蛋白酶体抑制剂 MG132 干预细胞后, PKM2 表达上调; CDDP 和 MG132 联合作用细胞后, 细胞耐药性下降。结论 细胞中 PKM2 表达水平与肿瘤细胞耐药程度呈负相关, PKM2 受蛋白质类泛素化修饰-SUMO 化修饰调节, 提示 PKM2 可能与肿瘤耐药的发生密切相关。

[关键词] A549 细胞; A549/CDDP 细胞; 丙酮酸激酶 M2; 肿瘤耐药; 泛素化; SUMO 化

[中图分类号] R734.2; R341; R966 **[文献标志码]** A

Ubiquitination-associated proteins in human lung adenocarcinoma cisplatin-resistant cell strain A549/CDDP

Qin Xia¹, Qiu Zongyin², Qiu Feng¹, Su Lin¹, Qu Can¹ (¹Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, ²College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** Post-translational modification of protein was the most important regulatory mechanism of cell protein in playing biological functions. This study aimed to research ubiquitination or neddylation associated proteins in tumor drug resistance. **Methods** We employed 1D SDS-PAGE and Chip HPLC-MS/MS to separate and identify ubiquitinated or neddylation associated proteins from the lysates of CDDP treated or untreated A549 and A549/CDDP cells. Western blotting and confocal laser scanning microscopy were used to validate those results. The sensitivity of cisplatin to cells was determined by MTT assay. **Results** A SUMO protein pyruvate kinase M2 (PKM2) was identified which located in the cytoplasm and nucleus. The expression of PKM2 was milder in the A549/CDDP cells than in A549 cells, but it was up-regulated when A549/CDDP cells were treated with proteasome inhibitors MG132. Drug resistance was decreased when the A549 and A549/CDDP cells were treated with CDDP combined with MG132. **Conclusion** The expression of PKM2 is negatively correlated with drug resistance in tumor cells. The expression of PKM2 is regulated by SUMO which was a neddylation modification, suggesting that PKM2 might be involved in the development of drug resistance.

[Key words] A549 cells; A549/CDDP cells; protein pyruvate kinase; tumor resistance; ubiquitination; SUMOylation

Supported by the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-036). Corresponding author: Qiu Feng, Tel: 86-23-68811793, E-mail: qiufeng.cn@gmail.com

肺癌是目前全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,化疗是恶性肿瘤综合治疗的重要手段,但是目前对有化疗指针肺癌患者的化疗有效率极低,化疗失败的主要原因是肿瘤细胞在化疗过程中逐渐产生了耐药

性。因此,肿瘤耐药已成为化疗的“治疗性瓶颈”(therapeutic glass ceiling)。肿瘤细胞对抗肿瘤药物耐药的原因较多,是多种机制共同作用的结果,其发生机制尚未完全阐明,这也是相关临床治疗未取得关键进展的重要原因^[1-2]。蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)在细胞各种功能的行使中发挥着重要作用。作为细胞功能调控的最重要手段之

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研重点项目(2011-1-036)

[通信作者] 邱峰,电话:(023)68811793, E-mail: qiufeng.cn@gmail.com

一,一种蛋白质常常同时存在着磷酸化、泛素化、甲基化、糖基化和乙酰化等多种修饰^[3-4]。蛋白质泛素化、类泛素化修饰是其中1种重要的可逆共价修饰过程,与许多疾病特别是肿瘤的发生、发展密切相关,认识细胞内蛋白质泛素化修饰过程,对于恶性肿瘤等多种疾病的临床治疗具有重要意义^[5]。本研究从经顺铂处理和未处理的A549细胞及其耐顺铂细胞株中分离泛素化、类泛素化蛋白质,通过1D SDS-PAGE和Chip HPLC-MS/MS分析鉴别出蛋白PKM2。通过Western blot、MTT法以及流式实验检测细胞耐药性变化,实验结果表明PKM2可能与肿瘤耐药的发生密切相关。

1 材料与方法

1.1 A549和A549/CDDP细胞株

人肺腺癌细胞株A549和人肺腺癌耐顺铂株A549/CDDP细胞购自上海锐聪实验室设备有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

顺铂(CDDP)、三肽基乙醛(MG132)(Sigma公司),RIPA裂解液(上海申能博彩生物技术有限公司),蛋白酶抑制剂混合物(Roche公司),N-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM)(Calbiochem公司),UbiQapture-QTM泛素化富集试剂盒(ENZO LifeSciences公司),兔抗人PKM2多克隆抗体(Abcam公司),GAPDH单克隆抗体(Sigma公司),HRP标记的羊抗兔IgG多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记的羊抗兔IgG多克隆抗体(北京鼎国生物技术有限责任公司),ECL化学发光试剂盒(Millipore公司),SDS-PAGE垂直电泳槽(Bio-Rad公司),MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,Sigma公司],二甲基亚砜(DMSO,Amresco公司),酶标仪(SLT公司),LSCM(莱卡公司)。

1.3 蛋白样品的制备

A549细胞和A549/CDDP细胞接种于6孔板(3×10^5 /孔),培养过夜,以CDDP($20 \mu\text{mol/L}$)作用48h,收集前12h换用含MG132($10 \mu\text{mol/L}$)的DMEM培养液培养过夜。以PBS洗涤2次,加入含蛋白酶抑制剂混合物和巯基蛋白酶抑制剂N-甲基顺丁烯二酰亚胺(NEM, 10 mmol/L)的改良RIPA裂解液,冰上裂解30min, $13\,000 \text{ r/min}$ 离心30min,吸取上清液,以Bradford法测定蛋白质含量,用UbiQapture-QTM从药物干预和未干预的A549细胞和A549/CDDP细胞裂解液中分离、富集泛素化、类泛素化蛋白质。

1.4 1D SDS-PAGE分离与质谱分析

对泛素化富集试剂盒获得的洗脱组分用SDS-PAGE(分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为6%)进行分离(加样 $30 \mu\text{l}$ /孔、 120 V 、2h),SDS-PAGE凝胶以考马斯亮蓝R-250染色,经图像扫描后,以Quantity One软件分析电泳分离结果。确定并切取了灰度值显著变化区域的电泳条带进行Chip HPLC-MS/MS分析,色谱条件:反相富集柱($5 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm}$, 5 mm)和Zorbax 300SB C18分析柱($150 \text{ mm} \times 0.075 \text{ mm}$, 3.5 mm);进样量:

$4 \mu\text{l}$,洗脱流动相:A液(0.1%甲酸水溶液)、B液(ACN-0.1%甲酸水溶液, $90:10$);双相梯度洗脱:2min内使B在A中的浓度由3%增加至15%(体积比),接着在70min内使B在A中的浓度由15%增加至55%(体积比);再生条件:依次以10倍于柱体积的90%B和5倍于柱体积的3%B进行柱再生。每1次分析的时间约为120min,流速为 $0.3 \mu\text{l/min}$ 。质谱条件:干燥气流速 4 L/min , $325 \text{ }^\circ\text{C}$,MS/MS扫描范围: $200 \sim 2\,000$ 。以Spectrum Mill MS Proteomics Workbench软件自动鉴定肽和蛋白质。数据库搜索参数设置:母离子质量允差 ± 2.5 ,片段离子质量允差 ± 0.7 ,最大漏切位点数为2,固定修饰模式为carbamidomethylation(C)修饰,可变修饰模式为oxidizedmethionine^[6]。

1.5 Western blot检测

A549细胞和A549/CDDP细胞分别经CDDP($20 \mu\text{mol/L}$)和MG132($10 \mu\text{mol/L}$)处理后作用后,提取细胞蛋白质,将含 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质样品液与Laemmli's上样缓冲液混合,煮沸5min后,10% SDS-PAGE凝胶电泳(120 V),半干转法将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转至PVDF膜,室温下用5%(质量体积比)脱脂奶粉封闭PVDF膜4h,加入封闭液稀释的兔抗人PKM2多克隆一抗($1:1\,000$ 稀释),以鼠抗GAPDH抗体为对照, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,TBST洗膜3次,加封闭液稀释的山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记的二抗($1:1\,000$),室温孵育2h,X线片曝光显影,并用Quantity One 4.5 tool进行光密度分析。

1.6 激光共聚焦显微镜观察

A549细胞和A549/CDDP细胞株分别接种于24孔板中,细胞贴壁过夜后,制作成细胞玻片,实验组用CDDP($20 \mu\text{mol/L}$)作用48h; $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 新鲜PBS清洗细胞,用4%多聚甲醛缓冲液室温固定20min,0.5%的Triton X-100于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 透膜15min。10%山羊血清封闭30min,加入封闭液稀释的鼠抗人PKM2一抗($1:1\,000$ 稀释), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,PBS清洗3次后加入封闭液稀释的FITC标记的兔抗鼠二抗($1:200$ 稀释), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育90min,PBS清洗后以50%甘油封片,激光共聚焦显微镜观察、照相。

1.7 细胞耐药性检测

将对数生长期细胞接种于96孔培养板(5×10^3 /孔),培养12h后,CDDP组加入不同浓度(10 、 20 、 40 、 80 、 $160 \mu\text{mol/L}$)的CDDP,联合用药组先用MG132预处理12h,再加入CDDP,对照组加入等体积培养基,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养48h,加入 5 mg/ml MTT $20 \mu\text{l}$ /孔,培养4h,加入DMSO $150 \mu\text{l}$ /孔,室温振荡10min,于 570 nm 测各孔光密度值。采用直线回归法计算药物作用的 IC_{50} 。抗药指数 $\text{RI} = \text{IC}_{50}(\text{A549/CDDP}) / \text{IC}_{50}(\text{A549})$ 。

1.8 统计学处理

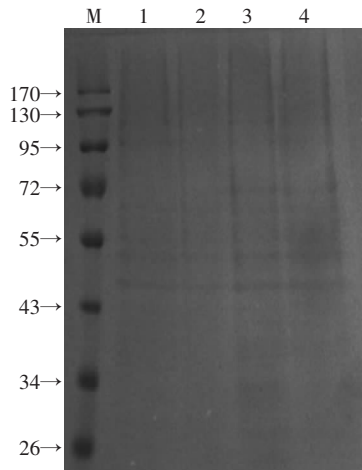
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 泛素化、类泛素化蛋白质的分离、富集和1D SDS-PAGE分离

1D SDS-PAGE分离泛素化和类泛素化蛋白的结果见图1。

Quantity One 软件分析结果表明 45~85 区间灰度值变化显著。



M: 标准; 1: A549 未经 CDDP 干预; 2: A549 使用 CDDP 干预; 3: A549/CDDP 未经 CDDP 干预; 4: A549/CDDP 使用 CDDP 干预

图1 A549 细胞和 A549/CDDP 细胞裂解液被洗脱组分的 1D SDS-PAGE 分离结果

电泳条带经质谱分析后,在数据库中进行分析数据检索,筛选出与肿瘤联系密切,在肿瘤代谢中具有关键作用的 M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinases M2, PKM2, 图 2)。PKM2 相对分子质量为 5 806.24,在细胞质和细胞核中均表达。

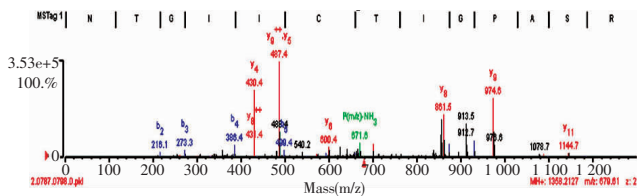
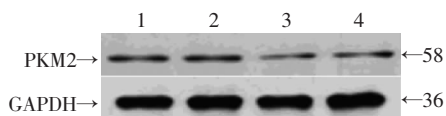


图2 PKM2 相关肽的 MS/MS 谱

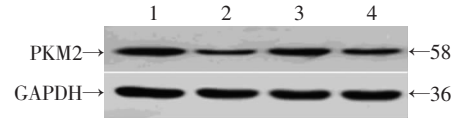
2.2 Western blot 检测 A549 和 A549/CDDP 细胞中 PKM2 的表达

Western blot 实验表明,在使用 CDDP 干预的 A549、A549/CDDP 细胞中均有 PKM2 表达,且干预前后表达变化均明显 ($P < 0.05$)。CDDP 处理前后,PKM2 在 A549 细胞中的表达均明显高于 A549/CDDP 细胞 ($P < 0.05$),A549 对照组相比从 (0.22 ± 0.02) 变化至 (0.12 ± 0.01) ,A549 加药组从 (0.20 ± 0.01) 变化至 (0.13 ± 0.01) ;CDDP 干预 A549 细胞后,PKM2 在 A549 细胞中的表达下调,在 A549/CDDP 中的表达稍上调 (图 3)。此外,蛋白酶体抑制剂 MG132 干预两株细胞后,PKM2 表达均上调,其中 A549 细胞干预前后表达变化明显 ($P < 0.05$),由 (0.29 ± 0.01) 上调至 (0.53 ± 0.01) ,见图 4。



1: A549 细胞未经 CDDP 干预; 2: A549 细胞使用 CDDP 干预; 3: A549/CDDP 细胞未经 CDDP 干预; 4: A549/CDDP 细胞使用 CDDP 干预

图3 Western blot 检测 CDDP 干预前后 A549 和 A549/CDDP 细胞中 PKM2 的表达

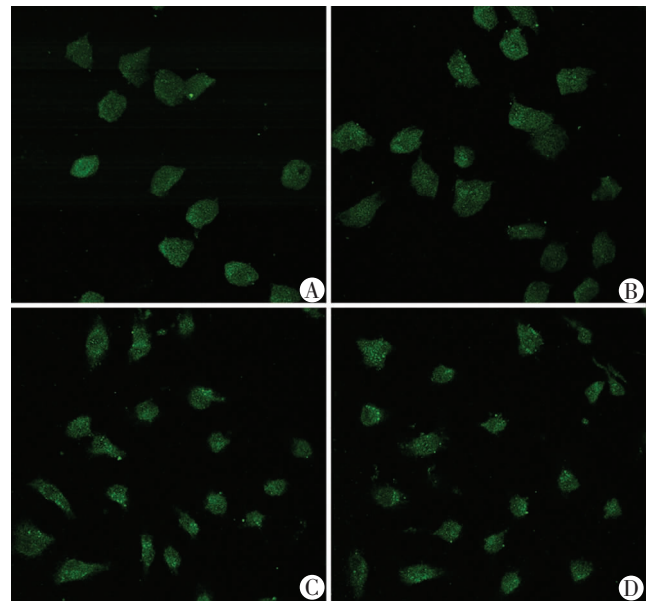


1: A549 细胞经 MG132 干预; 2: A549 细胞未使用 MG132 干预; 3: A549/CDDP 细胞经 MG132 干预; 4: A549/CDDP 细胞未使用 MG132 干预

图4 Western blot 检测 MG132 干预前后 A549 和 A549/CDDP 细胞中 PKM2 的表达

2.3 激光共聚焦显微镜观察 PKM2 在 A549 和 A549/CDDP 细胞中的表达差异及定位

PKM2 在 A549 和 A549/CDDP 细胞中主要定位于细胞质和细胞核,在细胞质中呈均匀分布,在胞膜上有局部聚集分布;在 MG132 作用后的 A549 和 A549/CDDP 细胞中的表达均上调 ($P < 0.05$, 图 5)。



A: A549 细胞经 MG132 干预; B: A549 细胞未使用 MG132 干预; C: A549/CDDP 细胞经 MG132 干预; D: A549/CDDP 细胞未使用 MG132 干预

图5 激光共聚焦显微镜观察 PKM2 在细胞中的表达差异和定位 (FITC $\times 400$)

2.4 MTT 检测细胞耐药性

A549 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(12.23 \pm 0.43) \mu\text{mol/L}$, A549/CDDP 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(91.23 \pm 1.17) \mu\text{mol/L}$,耐药倍数为 7.45 倍。在联合使用 MG132 和 CDDP 作用后,A549 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(9.65 \pm 0.32) \mu\text{mol/L}$,A549/CDDP 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(53.27 \pm 1.68) \mu\text{mol/L}$,耐药倍数为 5.52 倍。说明蛋白酶体抑制剂 MG132 可增强 A549 细胞及其耐药株对 CDDP 的药物敏感性。

3 讨论

本研究针对肿瘤耐药,从人肺腺癌细胞株 A549

和耐顺铂细胞株 A549/CDDP 细胞裂解液中富集、纯化泛素化蛋白质,并从中筛选、鉴定出 PKM2。其在 A549/CDDP 细胞中的表达明显低于在 A549 细胞中的表达;CDDP 作用后,PKM2 在 A549/CDDP 细胞中的表达进一步下调,在 A549 细胞中的表达略上调。结合近期其他研究结果表明^[7-8],PKM2 的表达水平与肿瘤细胞耐药程度呈负相关,PKM2 在耐药肿瘤细胞株中低表达,并且抑制亲代细胞株中 PKM2 表达,也可使其对化疗药物的敏感性降低。PKM2 是糖酵解途径中丙酮酸激酶(pyruvate kinase,PK)的 4 个亚型之一,是在糖酵解途径的最后一步起催化作用的酶,PKM2 和肿瘤联系密切,是肿瘤代谢中最关键的酶之一^[9]。进一步使用蛋白酶体抑制剂三肽基乙醛(Z-Leu-Leu-Leu-CHO, MG132)干预 A549、A549/CDDP 细胞株后,细胞中 PKM2 表达量上调,细胞对抗肿瘤药物敏感性提高,MG132 与 CDDP 联合作用细胞后,可分别使两细胞株对抗肿瘤药物的敏感性显著提高。由于 MG132 是一种可逆的醛基肽类特异性蛋白酶体抑制剂,它能阻止 26S 蛋白酶体对泛素化靶蛋白的降解,抑制泛素-蛋白酶体通路所介导的蛋白质降解,调节细胞内凋亡信号传导通路,影响细胞周期进程和诱导细胞凋亡^[10]。本实验结果表明 PKM2 很可能经由泛素化或类泛素化修饰调节。

Garcia-Gonzalo 等^[11-12]使用基于抗 HERC1(HECT and RCC1-like domain 1)多克隆抗体的免疫亲和技术,研究了 HERC1 与 PKM2 间的相互作用,结果 PKM2 未与 HERC1 相互作用,而 HERC1 是一种含 HECT 结构域家族的 E3 泛素连接酶,提示 PKM2 未经泛素化修饰。但在本研究中,从富集、纯化的泛素化、类泛素蛋白样品中分离获得了 PKM2,提示 PKM2 很可能经过了泛素化或类泛素化修饰。这主要是由于本研究考虑到细胞中的泛素化、类泛素蛋白质具有不均一性和相对丰度低的特性采用了基于泛素结合结构域(Ub binding domain,UBD)识别的亲纯化技术进行分离和富集;与免疫亲和技术不同,该技术是通过连接在基质上的 UBD 识别各种不同的泛素、类泛素修饰类型并与其结合^[5]。而 Spoden 等^[13]也发现,PKM2 可发生 SUMO 化修饰,SUMO 化修饰是一种类泛素化修饰,可被 UBD 所识别,而不被泛素化蛋白特异性的免疫亲和识别。SUMO 是一种结构上与泛素相似的小分子,它参与蛋白质翻译后修饰。SUMO 化循环与泛素化循环过程相似,但 SUMO 化修饰具有与泛素化修饰截然不同的功能,它主要介导靶蛋白的定位和功能调节过程。SUMO 化修饰参与基因转录调节、DNA 损伤修复及基

因组稳定性调节、离子通道功能调节以及生物节律的调节等。

综上所述,PKM2 与肿瘤耐药具有密切关系,其表达水平与肿瘤细胞耐药程度呈负相关。细胞中 PKM2 的表达受蛋白质 SUMO 化修饰调节。蛋白质翻译后修饰是细胞蛋白质发挥生物学功能的重要调节机制之一,参与细胞转录、蛋白质降解和细胞凋亡等多种生理过程。SUMO 化修饰主要参与基因转录调节、DNA 损伤修复及基因组稳定性调节、离子通道功能调节以及生物节律的调节等,可能与肿瘤耐药的发生具有密切关系。

参考文献:

- [1] Foo J, Michor F. Evolution of resistance to anti-cancer therapy during general dosing schedules[J]. *J Theor Biol*, 2010, 263(2): 179 - 188.
- [2] Triller N, Korosec P, Kern I, et al. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease[J]. *Lung Cancer*, 2006, 54(2): 235 - 240.
- [3] Yang X J. Multisite protein modification and intramolecular signaling[J]. *Oncogene*, 2005, 24(10): 1653 - 1662.
- [4] Kannicht C. Post-translational Modifications of Proteins-Tools for Functional Proteomics[M]. 2nd ed. Totowa; Humana Press, 2008: 109 - 131.
- [5] Hjerpe R, Rodriguez M S. Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 5): 823 - 827.
- [6] 邱峰, 郑姣妮, 邱宗茵. 双向电泳结合 MDLC-MS/MS 法分析阿替洛尔对映异构体作用后的血管平滑肌细胞差异表达蛋白[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(4): 345 - 348.
- [7] Guo W, Zhang Y, Chen T, et al. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(1): 65 - 72.
- [8] 曹立明, 胡成平. 人肺腺癌 A549 及 A549/DDP 细胞株差异蛋白质组学分析[J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(6): 621 - 625.
- [9] 厉明, 梅同华. 肺癌新标志——肿瘤 M2 型丙酮酸激酶[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(5): 446 - 447, 450.
- [10] 饶敏, 张淑玲, 熊莉娟. 蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. *医学分子生物学杂志*, 2005, 2(4): 298 - 301.
- [11] Garcia-Gonzalo F R, Cruz C, Munoz P, et al. Interaction between HERC1 and M2-type pyruvate kinase[J]. *FEBS Lett*, 2003, 539(1/3): 78 - 84.
- [12] 杨东叶, 刘凯于, 余泽华. 泛素连接酶 E3[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(3): 281 - 285.
- [13] Spoden G A, Morandell D, Ehehalt D, et al. The SUMO-E3 ligase PIAS3 targets pyruvate kinase M2[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(2): 293 - 302.

(收稿:2011-11-04;修回:2011-12-21)

(编辑 邓强庭)