

采用比较蛋白质组学方法研究 p38 β 激酶对 293T 细胞蛋白质表达的影响

张国林, 王三英*

(厦门大学生命科学院 生物学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用比较蛋白质组学方法研究了过表达 p38 信号通路激酶 p38 β 对人类肿瘤细胞 293T 细胞蛋白质表达的影响, 利用双向电泳和质谱技术分离鉴定了 13 个差异表达蛋白质. 这些差异蛋白的分布从细胞质膜到核, 其功能涉及核酸、蛋白质、糖脂类分子的转录、合成和成熟, 细胞物质跨膜运输, 细胞周期调控以及细胞防御等. 文献分析并没有发现上述鉴定的差异表达蛋白是 p38 β 激酶现有直接底物的证据, 提示其可能为新的 p38 β 激酶相关蛋白. 这些结果表明, 比较蛋白质组学方法是寻找激酶新靶标的一种有效工具.

关键词: 比较蛋白质组学; 信号传导; p38 β 激酶; 胸腺肿瘤细胞

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005) Sup-0123-05

信号传导通路可介导生物体中许多细胞生物学反应, 是驱动细胞形态, 细胞分裂, 细胞黏附, 细胞分化与凋亡等各种细胞行为改变的主要动力. 生物化学, 分子生物学, 遗传学等研究方法相继应用于信号传导通路的研究. 然而, 哺乳动物尤其是人类细胞信号通路极其复杂, 利用传统的研究方法很难对特定信号相关事件进行直接的或定量的功能分析. 大多数研究都利用特定 mRNA 或蛋白质的激活或突变去了解整个通路. 但是, 这些研究中所应用的蛋白质或 mRNA 都是必须是利用现有的信号模式或可利用的载体得来. 随着人类基因组测序工作的完成以及质谱技术的不断改进, 新近发展起来的蛋白质组学可以在整体水平上高通量地研究细胞蛋白质表达谱的变化^[1,2]. 而作为组成信号通路的主要成分, 各种激酶往往只修饰高丰度的蛋白质, 蛋白质组学能够通过分析不同激酶模块所代表的蛋白质产生不同的蛋白质组“足迹”^[3]. 因此, 采用蛋白质组学技术可望从整体水平上高通量地筛选信号传导通路中的有关分子.

P38 有丝分裂原激活的蛋白激酶信号传导途径是一个最基本的有丝分裂原激活的蛋白激酶信号传导通路^[4]. 在肿瘤细胞分化, 细胞生存以及凋亡等细胞生命过程中起重要作用. 本实验研究了过表达 p38 β 对人类胸腺肿瘤细胞(293T)蛋白质组的影响, 以期发现新信

号通路相关蛋白质.

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris-base、DTT、CHAPS、TEMED、过硫酸氨、超纯尿素、二硫苏糖醇、十二烷基硫酸钠、考马斯亮蓝 R-250 均为上海生工产品.

碘乙酰胺(ICH₂CONH₂)为美国 Sigma 公司产品, 三氟乙酸(TFA)为日本东京化成工业株式会社产品; 乙腈(ACN)为国产色谱纯; 胰蛋白酶(trypsin)为 Promega 公司产品. 两性载体电解质、甘氨酸购自北京经科试剂公司. 其他试剂均为国产分析纯试剂. 圆盘电泳槽, 双垂直电泳槽, 高压稳压稳流电源, 均购自北京六一仪器厂; 真空离心机购自华粤仪器有限公司; Reflex MALDI-TOF 质谱仪为 Bruker 公司产品.

1.2 质粒提取

质粒由美国 Scripps 研究所韩家淮教授实验室构建, 将 DNA p38 β 克隆进 pcDNA3.0 载体得到融合质粒 DNA. 参照 J. 萨姆布鲁克等著《分子克隆实验指南(第 3 版)》SDS 碱裂解法小量制备质粒 DNA 法提取并纯化质粒 DNA, 紫外分光法定量, 4℃储存备用.

1.3 细胞培养与基因转染

依照 ROCHE 公司 DOSPER 脂质体转染试剂说明书进行操作.

1.4 双向电泳

1) 细胞总蛋白提取

收稿日期: 2005-03-08

基金项目: 福建省自然科学基金(C0210003)资助

作者简介: 张国林(1972-), 男, 博士研究生.

* 通讯作者: wangpeng@xmu.edu.cn

转染 48 h 后的细胞用预冷的 PBS 漂洗 3 次, 用细胞刮取细胞到离心管, PBS 漂洗后, 加裂解液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、65 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L EDTA、2% amphylate), 于 -70°C 反复冻溶 3~4 次, 4°C 15 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 分装保存在 -70°C 备用.

2) IEF 与 SDS-PAGE

参照文献[5]灌制 12 cm, pH3~9.5 管状胶条, 预电泳: 200 V $\times$ 30 min, 300 V $\times$ 45 min, 400 V $\times$ 90 min, 上样 200 μg /管, 400 V 电泳 13 h, 800 V 电泳 1 h, 1 000 V 电泳 3 h 后脱胶, 平衡 15 min. 放置于 4.8%~12.5% 不连续 SDS 胶顶端, 90 V 电泳至分离胶处为 180 V 后继续电泳至溴酚蓝达距底线 0.5 cm 处停止电泳. 考马斯亮蓝染色, 扫描.

1.5 图象分析

用双向电泳分析软件 Genomic Solutions Investigator HT Analyzer version 2.02 对双向电泳图谱进行定量分析, 并进一步比较对照图谱与基因转染后的细胞蛋白图谱, 确定差异点.

1.6 原位消化与质谱分析

1) 蛋白点原位消化与萃取

参照文献[5], 从凝胶挖取上述差异点, 用 50% 乙腈的碳酸氢氨溶液脱色, 10 mmol/L DTT 的碳酸氢氨溶液 57°C 还原, 55 mmol/L 碘乙酰胺碳酸氢氨溶液室温避光烷基化, 100% 乙腈脱水, 12.5 ng/ μL 胰酶 37°C 消化, 分别用 20 mmol/L 碳酸氢氨溶液, 5% TFA 的 50% 乙腈和 100% 乙腈, 萃取, 离心收取, 合并所有上清液, 真空离心干燥. 用 0.1% TFA 溶液溶解, 与基质 HCCA 混合后点样, 送质谱仪.

2) 质谱分析

质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM III MALDI-TOF 质谱仪进行分析, 反射模式, 离子源加速电压 1 为 20 kv, 加速电压 2 为 23 kv, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 2 000 ns, 真空度 1.9×10^{-5} Pa, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 并用标准 Marker 峰作为外标校正质谱峰, 正离子谱测定, 获得肽质量指纹图谱.

1.7 数据库查询

通过 ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptident 软件(<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>)进行查询.

2 结 果

2.1 p38 β 激酶对 293T 细胞蛋白质组的影响

将激酶基因转入 293T 细胞并继续培养 48 h 后, 提取并用双向电泳分离转染后 293T 细胞的总蛋白, 得到图谱(图 1). 每次实验至少重复 3 次, 不同批次实验之间凝胶蛋白点匹配率达 95% 以上. 经双向电泳分析软件 Genomic Solutions Investigator HT Analyzer version 2.02 分析, 每张凝胶上大约有 500 个蛋白点. 进一步比较各种转染后细胞与对照组细胞的蛋白质图谱, 共得到 13 个差异蛋白, 用数字标记如图 1、2. 进一步利用基质辅助激光解析飞行时间质谱鉴定这 13 个差异点, 结果如表 1 所示.

过表达 p38 β 共引起 293T 细胞的 13 种蛋白表达发生变化. 其中 ADP 核糖基化样因子蛋白 1 和 SSX5 蛋白在 p38 β 转染细胞中表达上调, 而线粒体鸟氨酸转运子 2, 双同源盒 3, 甲状腺受体相互作用蛋白 11, 细胞周期蛋白 C, A-乳白蛋白前体, 外体复合物外核酶

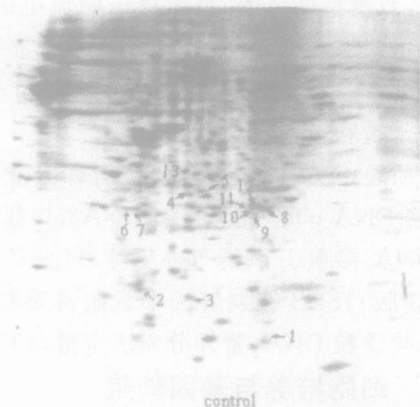


图 1 肿瘤细胞总蛋白质组的双向电泳图谱

图谱用考马斯亮蓝染色, 每张凝胶大约有 500 个点. Control 代表对照组, p38 β 代表实验组. 差异蛋白质用数字分别标记

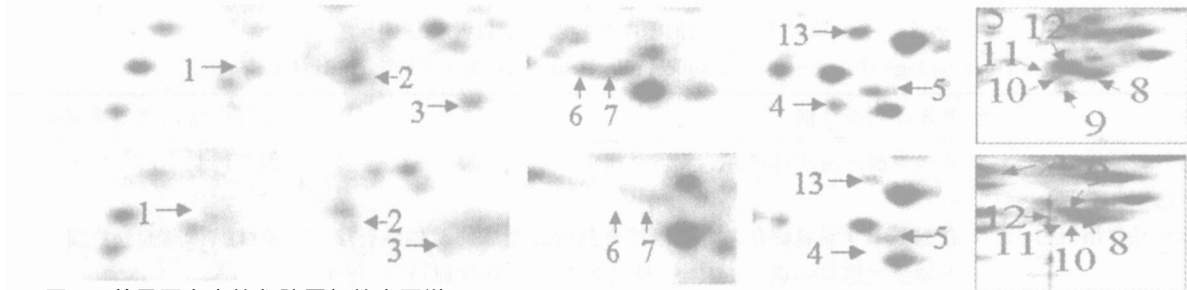


图 2 差异蛋白点的凝胶局部放大图谱
利用软件分析得到共 13 个差异表达蛋白质, 这些蛋白质均以数字标记, Control 代表对照组, p38 β 代表实验组. 所有标记跟图 1 完全对应

Fig. 2 Enlarged portions of the thirteen protein profiles in the region of proteins that changed their expression levels in 293T cells transfected with p38 β

表 1 利用肽指纹谱在数据库中查询鉴定了 13 种蛋白质

Tab. 1 Proteins identified by peptide mass fingerprinting, Protein spot numbers correspond to those indicated in Fig. 1, 2

编号	MS 消化索引	登陆号	蛋白质分子量 (Da) / 等电点	序列覆盖率/ %	蛋白质名称
1	39361	Q9BXI2	32581/ 9. 2	11. 0	线粒体鸟氨酸转运子 2
2	1350762	6912344	19402/ 11. 2	29. 0	双同源盒 3
3	94101	Q15643	21952/ 9. 9	42. 0	甲状腺受体相互作用蛋白 11(TRIP-11)
4	1241	Q15834	22121/ 5. 1	40. 0	Delta α 相互作用蛋白 A
5	542110	11042056	33243/ 6. 9	13. 0	细胞周期蛋白 C
6	97888	Q16890	22449/ 5. 5	18. 0	肿瘤蛋白 D53
7	78343	P00709	16225/ 4. 8	40. 0	α -乳白蛋白前体
8	8336	P40616	20418/ 5. 6	20. 0	ADP-核糖基化因子样蛋白 1
9	97989	Q13868	32789/ 7. 1	19. 0	外体复合物外核酶 RRP4
10	36782	O00258	19780/ 9. 7	41. 0	富色氨酸蛋白
11	54034	P07203	21899/ 6. 1	18. 0	谷胱甘肽过氧化酶
12	126742	O60225	21629/ 9. 5	26. 0	SSX5 蛋白
13	29824	P00387	21629/ 9. 5	24. 0	NADH-细胞色素 b5 还原酶

注: Protein MW (Da) /pI 是指理论的等电点和分子量.

RRP4 和 NADH- 细胞色素 b5 还原酶共 7 种蛋白质则在 p38 β 转染细胞中表达下调. 与此同时, 4 种蛋白质: Delta α 相互作用蛋白 A, 肿瘤蛋白 D53, Tryptophan-rich protein 和 Glutathione peroxidase 在转染后的 293T 细胞中消失.

2.2 13 种差异表达蛋白质的细胞定位以及基本生物学功能

根据已发表的相关文献, 我们将 13 种差异表达蛋白质细胞定位和基本生物学功能总结分析如表 2 所示. 其中 4 种为核蛋白, 8 种为胞质胞浆或膜蛋白, 另外, 有 1 种为分泌蛋白. p38 β 过表达引起变化的蛋白质跟多种细胞功能相关. 线粒体鸟氨酸转运子 2, 参与线粒体分子跨膜运输; 甲状腺受体相互作用蛋白 11, SSX5 蛋白, 外体复合物外核酶 RRP4, Delta α 相互作用

蛋白 A, α -乳白蛋白前体, NADH-细胞色素 b5 还原酶等分别跟核酸, 蛋白质, 糖类, 脂类分子合成, 转录以及成熟有关; 细胞周期蛋白 C 参与细胞周期调节. 此外, 甲状腺受体相互作用蛋白 11, Delta α 相互作用蛋白 A, ADP-核糖基化因子样蛋白 1, α -乳白蛋白前体, 谷胱甘肽过氧化酶等则参与细胞结构维持, 细胞防御^[6, 7].

3 讨 论

P38 MAPKs 是 MAPK 超家族中的一个非常保守的亚族. 自从 1994 年韩家淮首次克隆了 p38 的序列以来, 迄今已经克隆并鉴定了有 4 个 P38 激酶亚型分别为 p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ . 其中 p38 α 和 p38 β 的功能也最为重要. 4 种 p38 激酶亚型具有不同的组织分

表 2 13 种差异表达蛋白的基本生物学功能以及亚细胞定位

Tab. 2 Basic biological functions and subcellular locations of proteins identified as Table. 1

蛋白质名称	基本生物学功能	亚细胞定位或所属家族
线粒体鸟氨酸转运子 2	将鸟氨酸从胞浆运送到线粒体基质中	线粒内膜
双同源盒蛋白 3	-	核
甲状腺受体相互作用蛋白 11	在三碘甲状腺氨酸存在时可以结合到胸腺受体的配体结合区, 并增强胸腺受体调节的转录, 是高尔基体自身抗原; 很可能跟维持高尔基体顺面结构有关	高尔基体顺面外周膜
Delta-相互作用蛋白 A	跟滤过性毒菌引起的磷酸化蛋白肝炎 delta 抗原相互作用, 从而抑制 HDV 在完整的肝细胞中复制	在肝脏中表达
细胞周期蛋白 C	细胞周期进展调节子	属于细胞周期蛋白家族
肿瘤蛋白 D53	与同家族其他成员一起形成同型或异型二聚体	属于 TPD52 家族
α-乳白蛋白前体	乳糖合成酶的调节亚单位, 可改变乳腺中 galactosyltransferase 底物的特异性, 跟糖蛋白的寡糖链形成有关	分泌蛋白
ADP-核糖基化因子样蛋白 1	激活磷脂酶 D 和霍乱毒素的磷脂和 GTP 酶依赖的活性	属 GTP 酶超家族 Arf 家族
外体复合物外核酶 RRP4	属于外体, 具有 3'-5' 外核酶活性, 跟 7S 前体 rRNA 剪切为成熟 5.8S rRNA 有关. 此外它也跟 GTP 酶 Ran 有关.	核
富色氨酸蛋白	-	核
谷胱甘肽过氧化酶	保护红血球中血红素免受氧化伤害	胞浆
SSX5 蛋白	转录调节子	核
NADH-细胞色素 b5 还原酶	跟脂肪酸的去饱和和延长, 胆固醇生物合成, 药物代谢和红血球中高铁血红蛋白的减少有关	内质网的胞浆侧和线粒体外膜

“ - ”表示不完全确定.

布, 激酶活性调节和磷酸化下游底物的能力.

P 38 信号级联的各级激酶或底物都是通过磷酸化自身的转激活区来激活和传递信号的. 一般来说, 一条完整信号传递途径包括外界刺激-MAP4K-MAP3K-MAP2K-P38 MAPK-底物-基因转录与蛋白质表达-细胞生物学功能. 它涉及到许多细胞部位以及大量的底物分子. 对于 p38 MAPK 而言, 它主要是将上游 MKK3 和 MKK6 负载的信号传递给下游的底物. 在最近的研究中, 利用传统的研究方法鉴定了许多 p38 MAPK 底物包括激酶, 酶以及转录因子等, 这些底物构成了 p38 MAPK 下游非常复杂多样的分枝通路.

许多生物化学和遗传学实验证据表明, p38 激酶的活性跟疾病的发生, 发展有关. 而信号传导是肿瘤防治研究的重要课题. p38 信号传导通路的激活在肿瘤细胞抵抗药物, 肿瘤治疗中都起到非常重要的作用. 一些 p38 激酶抑制子已经成为疾病和肿瘤治疗的重要临床药物^[8].

由于信号通路的固有复杂性, 当前, 仅对 p38α 研究最多, 了解最为深入. 然而, p38β 相对研究较少. 只有少数分子如 PRAK 等被鉴定为其下游的底物^[2]. 这在较大程度上阻碍了人们对该激酶在信号通路中作用

机制的理解和应用.

功能蛋白质组学方法可在整体水平上探讨肿瘤细胞的诱导分化, 凋亡等分子机制, 本实验室具备了较为成熟的肿瘤细胞和免疫蛋白质组学技术基础^[9, 10]. 我们采用比较蛋白质组学方法筛选过量表达 p38β 后人类. 胸腺肿瘤细胞蛋白质表达谱的变化, 结果得到了 13 个差异表达蛋白质如图 1. 这些蛋白质在过量表达 p38β 激酶基因作用下表达变化差异较大, 分别表现为表达上调, 下调和完全抑制.

在这 13 个蛋白质中, 绝大多数蛋白质为新发现的 p38β 激酶相关蛋白质. 尽管本文没有进一步的实验证据说明其与 p38β 的直接相互作用, 但是可以认为它们是 p38β 激酶修饰的候选靶标. 差异蛋白质的细胞定位和功能分析结果(表 2)表明, p38β 能够引起包括外分泌、细胞浆(细胞器)、细胞膜、细胞核等几乎所有部位的蛋白质表达改变. 这些蛋白质分子参与从分子到细胞器, 直至整个细胞等多层次的细胞生物学行为.

总之, 本实验表明比较蛋白质组学是在系统和整体水平上研究信号传导通路的激酶作用机制的有效工具, 它通过解剖不同信号模块的蛋白质组“足迹”, 鉴定细微的蛋白质表达差别, 从而为准确认识和理解信号传导通路激酶中涉及的蛋白质表达变化提供强有力的

手段.

同时, 我们还应当明白, 利用蛋白质组学研究信号传导仍然面临许多问题和困难. 比如当前的蛋白质组技术对低丰度蛋白的检测能力还十分有限, 对一些分子量太小, 太大, 偏酸和偏碱的激酶相关蛋白分子分离鉴定仍然是一个挑战.

参考文献:

- [1] 陈子, 王三英, 陈晋安, 等. 温度对人肺癌细胞 A549 蛋白质表达的影响[J]. 实验生物学报, 2002, 35(3): 179–183.
- [2] 王三英, 吴谋胜, 陈晋安, 等. 嗜水气单胞菌蛋白质分子解剖图谱的初步建立[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(2): 139–143.
- [3] Resing K A. Analysis of signaling pathways using functional proteomics[J]. ANN. N. Y. Acad. Sci., 2002, 971: 608–614.
- [4] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiological Reviews, 2001, 81(2): 808–860.
- [5] Guolin Z, Guizhong W, Sanying W, et al. Applying pro-

teomic methodologies to analyze the effect of hexamethylene bisacetamide (H MBA) on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma BG-823 cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2004, 36: 1 613–1 623.

- [6] www.expasy.org/UniProtKB/Swiss-Prot entry.
- [7] Hong J X, Lee F J S, Patton W A, et al. Phospholipid and GTP dependent activation of cholera toxin and phospholipase D by human ADP-ribosylation factor like protein 1 (HARL1)[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(25): 15 872–15 876.
- [8] Lee J C, Kumar S, Griswold D E, et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy [J]. Immunopharmacology, 2000, 47: 185–201.
- [9] Chen Z J, Peng B, Wang S Y, et al. Rapid screening of highly efficient vaccine candidates by immunoproteomics [J]. Proteomics, 2004, 4(10): 3 203–3 213.
- [10] Shi P, Huang Z W, Wang S Y, et al. Effects of ATRA on expression of mRNA binding protein p62 in human gastric cancer cells[J]. Cell Biology International, 2005, 29(2): 127–131.

Applying Comparative Proteomics Method to Study the Effect of p38 β on the Expression of Proteins in Human Thymus Tumor 293T Cells

ZHANG Guo-lin, WANG Sang-ying*

(Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The aim of the present study was to clarify the effect of p38 β overexpression, a subtype of p38 MAP kinase, on the expression of proteins in human tumor cells for screening of its pathway-related proteins. Comparative proteomics methodologies were applied to screen the change of the expression of proteins in the human thymus tumor 293T cells responding to the overexpression of p38 β kinase gene. Furthermore, the basic biological function and subcellular location of these changed proteins were analyzed by bioinformatics. 13 differential expression proteins caused by the overexpression of p38 β kinase gene were respectively separated and identified with two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. The results show that these 13 proteins range from cellular membrane to cellular nuclear and take part in the cellular molecule synthesis, cellular transport across membrane and the regulation of the cell cycle. Bioinformatics analysis indicated that there was no the evidence that these proteins were the indirect substrates of p38 β , suggesting that they would be novel related proteins of p38 β . The current study suggests that comparative proteomics technique is an powerful tool to screen new target of kinase, which provides a clue to insight into the events of signaling transduction in human tumor cells.

Key words: comparative proteomics; signaling transduction; p38 β MAP kinase; human thymus tumor cells