技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-1221-03

肝癌细胞中热休克蛋白 27 相互作用蛋白的分离和鉴定

孙雪峰,何 松

(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:筛选肝癌中热休克蛋白 27(Heat shock protein,HSP27)相互作用蛋白。方法:采用免疫共沉淀技术富集肝癌 HepG2.2215 细胞的 HSP27 结合蛋白,直接酶解后进行液相色谱 - 电喷雾离子阱串联质谱分析(LC-ESI-IT MS/MS),通过相应的肽序列标签(Peptide sequence tags,PST)在 SWISS PROT 数据库中搜索蛋白质。并用免疫共沉淀和蛋白质印迹分析技术对所鉴定的 HSP27 相互作用蛋白之一 HSP90 进行了验证。结果:通过搜索数据库在肝癌细胞系中首次鉴定了 12 个 HSP27 结合蛋白,分别是 HSP90、HSP70、特异性下调葡萄糖调节蛋白 78(GRP-78)、赖氨酰羟化酶(Lysyl hydroxylase)、细胞角蛋白 9(Keratin 9)、细胞角蛋白 10(Keratin 10)和细胞角蛋白 1(Keratin 1)。所鉴定的 7 个结合蛋白可以划分为 3 个作用范畴,分别是:分子伴侣、细胞骨架组织和代谢酶类。结论:HSP27 在肝癌组织中参与了相关蛋白的调节,通过与一些多肽或小分子蛋白质的相互作用,而参与调控肿瘤发生发展。

【关键词】热休克蛋白 27;肝癌;免疫共沉淀;液相色谱 - 电喷雾离子阱质谱;蛋白质印迹

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-09

Separation and identification of hsp27 interacting proteins from human hepatocellular carcinoma cells

SUN Xue-feng, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To find out heat shock protein HSP27 interacting proteins in the hepatocellular carcinoma(HCC). *Methods*: HSP27 interacting proteins in the human HCC HepG2.2215 cells were seperated and identified. HSP27 binding proteins were recovered by antiHSP27 antibody immunoprecipitation with the total proteins from HCC HepG2.2215 cells. After in-solution digested and analyzed by LC-ESI-ITMS/MS, the recovered protein complexes were identified by peptide sequence tags (PST) and database searching, and were confimed by immunoprecipitation and Western blot analysis. *Results*: Seven HSP27 binding proteins were firstly identified by database searching, which were HSP90, GRP-78 and HSP70 of HSP70 family members, lysyl hydroxylase, Keratin 9, Keratin 10, Keratin 1. The identified seven HSP27-interacting proteins by IP coupled with MS could be classified into three functional categories based on their functions: chaperones, cytoskeleton organization, metabolic enzymes. *Conclusion*: HSP27 in HCC is a related proteins involved in the regulation, by interacting with some peptides, or small molecule protein to control the tumor development.

【Key words】HSP27; Hepatocellular carcinoma; Co-immunoprecipitation; LC-ESI-IT MS/MS; Western blot

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在我国,大多数肝癌患者都与 B 型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)或 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)感染后的慢性肝脏疾病有关。HBV 或 HCV 感染所引起的慢性肝脏炎症和纤维化过程可以通过诱导热休克蛋白产生来加速肝细胞癌形成。肿瘤蛋白质组学研究也进一步证实肝癌组织较癌旁组织高表达热休克蛋白 27(Heat shock protein,HSP27)。Joo M 等人的研究发现 HSP27 在肝癌细胞的胞浆和胞核中高表达而在新生的肝细胞中低表达或不表达,表明 HSP27 可能在肝癌形成中起到极为重要的作用[1-4]。因此,对肿瘤相关的蛋白质复合体的研究,对理解肿瘤发生、发展的致病机理,找到合适的检测或治疗的靶标蛋白,甚至发现新的治疗药物,均具有非常重要的意义[5]。而肝癌中 HSP27 相互作用复合体至今未见报导。为此,本文采用抗 HSP27 抗体免疫共沉淀技术,从肝癌细胞中分离 HSP27 相互作用蛋白质,酶解后进行液相色谱 - 电喷雾离子阱串联质谱分析(LC-ESI-ITMS/MS),以进一步鉴定 HSP27 结合蛋白来阐明肝癌中 HSP27 相互作用蛋白的结构。

作者介绍:孙雪峰(1983-),女,硕士,

研究方向:肝癌的靶标蛋白。

通讯作者:何 松,男,教授,E-mail:hedoctor65@sina.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 肝癌细胞系 HepG2 .2215 由重庆医科大学肝细胞研究所保存。用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液进行传代培养。

1.1.2 试剂 兔抗人 HSP27 多克隆抗体、兔抗人 HSP90 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 均为美国 Avivasys 公司产品;免疫共沉淀试剂盒(M-PER 蛋白提取液、Antibody Coupling Gel、5M Sodium Cyanoborohydride、Coupling Buffer、Quenching Buffer、Wash Solution、Co-IP Buffer、Elution Buffer、BSA control)、GelCode 染色试剂盒、ECL 试剂盒、溶液内酶解试剂盒均为美国 PIERCE 公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、SDS、TEMED、过硫酸铵为美国 Sigma 公司产品。

1.1.3 仪器设备 Agilent 6330 Ion Trap 质谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞蛋白抽提 分别收集对数生长期的 HepG2.2215 细胞,加入 M-PER 蛋白提取液,冰上裂解 30 min,12 000 r/min、4℃离心 15 min 去除细胞碎片,吸取上清液,即为细胞总蛋白,测定浓度后用于免疫共沉淀。

1.2.2 HSP27 结合蛋白抗体结合柱的制备 应用免疫共沉淀试剂盒中的 Handee 管加入 100 μl Antibody Coupling Gel 4℃离心 5 min,去上清,加入 400 μl Coupling Buffer,离心,去上清。将兔抗人 HSP27 多克隆抗体 500 μg 加入含 Coupling Gel 的 Handee 管中,再加入 5 μl 的 5 mol/L Sodium Cyanoborohydride,4℃振荡过夜。9 000 r/min 离心 5 min 去上清,用 Coupling Buffer 和 Quenching Buffer 先后各洗涤含免疫复合物的柱子 1 次。在抗体结合柱中加入 Quenching Buffer 400 μl 和 4 μl 的 5 mol/L Sodium Cyanoborohydride, 振荡 30 min 后离心。Wash Solution 洗涤免疫复合物柱子 4 次,Coupling Buffer 洗涤 2 次后, 加入 Coupling Buffer 并保存免疫复合物柱子于 4℃。以免疫共沉淀试剂盒中 BSA 代替兔抗人 HSP27 多克隆抗体作为阴性对照。

1.2.3 免疫共沉淀 HSP27 相关蛋白 将含 2 mg 细胞总蛋白的 1 ml 细胞抽提液加入到所制备好的 HSP27 免疫复合物柱子中,4℃振荡过夜。用 Co-IP Buffer 洗涤含免疫复合物的柱子 3 次后, 用 100 μl Elution Buffer 洗涤 HSP27 免疫复合物柱,收集洗脱液即为 HSP27 相互作用蛋白复合物。

1.2.4 质谱分析样品的制备 将洗脱液样品置于真空冷冻仪中 -20℃冻干,超纯水重溶后转移至 1.5 ml Eppendorf 管中,按照溶液内酶解试剂盒说明进行还原、烷基化、酶解、萃取和 C18 脱盐处理后,将制备好的样品用于质谱分析。

1.2.5 质谱分析和数据库查询 将制备好的样品在电喷雾离子阱仪上进行分析。以 ES tuning mix (G2431A, Agilent)进行校正。色谱条件:C18 色谱柱 150 mm × 2 mm,5 m;流动相为甲醇 - 甲酸(80:20)水溶液;流速 0.2 ml/min;室温洗脱;进样量 20 μl。质谱条件:ESI 离子源 模式:Std/Enhanced;正离子方式检测,扫描范围 m/z 300~2 200;离子源喷射电压 4.5 kV;毛细管电压 45 V;干燥气体温度 325℃,干燥气流速:4.00 L/min;倍增器电压:1 429 V;碰撞气体为氮气(He),雾化气体为氮气(N_2);自动进样器直接进样,采用全扫描一级质谱(Full scan)及其源内碰撞诱导解离(Source collision induced dissociation, source, CID)、全扫描二级质谱(Full scan, MS)方式进行测定。根据 y 和 b 系列离子来推断氨基酸序列。碰撞能量根据肽段电荷和质量范围的不同而异。测定结果仪器自动以 peaklist 文件形式给出, 通过 Auto MS 自动分析软件查询 SWISS PROT 数据库鉴定蛋白质。

1.2.6 免疫共沉淀和 Western-blot 分析验证 HSP27 结合蛋白 HSP27 抗体与对照 BSA 分别和 2 mg HepG2.2215 细胞总蛋白进行免疫共沉淀,收集的蛋白质复合物进行 12.5% SDS-PAGE 分离,胶中蛋白质电转移至硝酸纤维膜上。印迹膜在 5%脱脂牛奶中 4℃封闭过夜;在 1:1 000 稀释的兔抗人 HSP90 一抗中室温温育 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min;在 1:500 稀释的羊抗兔二抗中室温温育 2 h,PBS 洗涤 3 次,ECL 试剂发光、显影、定影。

2 结 果

2.1 免疫共沉淀和 HSP27 相关蛋白质谱分析

收集的免疫共沉淀蛋白质复合物,经过还原、烷基化、酶解、萃取和脱盐处理,样本冻干后以 Coupling Buffer 复溶,通过 C18 色谱柱进行梯度洗脱,根据蛋白质疏水强弱对蛋白质进行分离后进入质谱分析。图 1 为经 RP HPLC 分离后的一个肽段的一级离子质谱图。对同时达到母离子强度和母离子电荷标准的一级离子进行二级质谱分析,图 2 为一个代表性肽序列标签(MH+ 1 081.502 7、m/z 541.27、z:2)的 MS/MS 质谱图。

2.2 数据库查询

仪器自动以 peaklist 文件形式给出 LC-ESI-IT MS/MS 测定结果,通过软件查询 SWISSPROT 数据库,在 BSA 对照中未鉴定到蛋白, 在 HSP27 免疫复合物中成功鉴定了 HSP27 及其 7 个结合蛋白质(表 1)。分别是热休克蛋白 90、热休克蛋白 70 和 GRP-78、细胞角蛋白 9、细胞角蛋白 10 和细胞角蛋白 1。实验共重复 3 次,所获结果一致。

2.3 免疫共沉淀和 Western blot 分析验证 HSP27 结合蛋白质

抗人 HSP27 抗体与对照 BSA 分别和 HepG2.2215 细胞总蛋白进行免疫共沉淀,免疫复合物电泳转膜后与抗人 HSP90 抗体进行 Western blot 分析。结果显示:HSP90 仅在 HSP27 免疫共沉淀复合物中检测到,而在对照 BSA 未检测到。这与 LC-ESI-ITMS/MS 分析鉴定的结果一致(图 3)。

3 讨 论

HSPs 通过抑制细胞凋亡机制中的关键效应器,包括凋亡体(Apoptosome)、半胱天冬酶(Caspase)活化的复合体和凋亡诱导因子来维持癌细胞无限增殖。HSP90、HSP70 可以抑制细胞色素 C 和 TNF- 介导细胞凋亡发挥抗凋亡影响;抑制 bax 异位到线粒体,使细胞释放细胞色素 C,形成凋亡小体并抑制 caspase 启动因子的激活;可以调节凋亡级联反应 JNK, NF-kappa B 和 Akt 信号通路[6,7];也可以通过保持 RIP 和 Akt 的平衡,并调节 NF-kappa B 来抑制凋亡[8-10]。GRP-78 则作为

表 1 串联质谱分析鉴定的 HSP27 相互作用蛋白

序列号	蛋白名称	试验重复次数	序列覆盖率(%)	肽段匹配率
P07900	Heat shock protein HSP 90	3	13	132.80
P04792	Heat shock protein HSP 27	3	26	168.90
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	3	17	149.54
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	3	14	126.69
P04264	Keratin 1	3	19	158.20
P13645	Keratin 10	3	17	150.24
P35527	Keratin 9	3	23	140.58
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	3	13	125.00

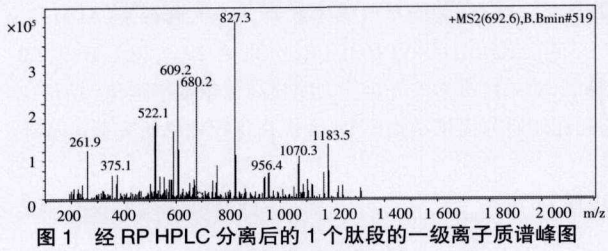
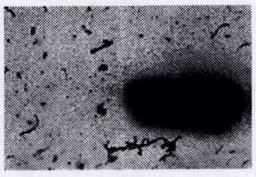


图 1 经 RP HPLC 分离后的 1 个肽段的一级离子质谱峰图



在 HSP27 免疫共沉淀复合物中验证出 HSP90,对照 BSA 为阴性

图 3 免疫印迹验证结果

一种细胞凋亡调节剂,保护宿主细胞抵抗细胞凋亡。Lim SO[11]发现 GRP-78 在逐步进展 HBV 相关性肝癌中发挥重要作用,可以作为 HBV 相关性肝癌的重要预后标志,极大程度上代表了血管侵袭和肝内转移。

有研究表明体内抗癌部件的受损会导致和造成 HSP27 重新分配,并在癌细胞中过度表达。因此,HSP27 可能在受到体内、外各种应激作用下,与细胞骨架组织相互作用,表达增加的 HSP27 可保护癌细胞免受应激产生的损伤。角蛋白作为重要细胞骨架参与到细胞内信号转导通路。比如,防御应激、伤口修复和凋亡[12]。

赖氨酰羟化酶(Lysyl hydroxylase,LH)是一种转录后酶,LH 的 N 末端的葡糖基转移酶活性,对细胞行为、增殖生长和死亡具有重要作用,而且是可逆的,尤其在细胞外间隙,增长停滞更为明显。基于此,可将 LH 作为一种治疗癌症等疾病的可能靶点,应用于未来的临床治疗中[13]。

本文首次在 HCC 中鉴定了 7 个 HSP27 结合蛋白,虽然他们的生物学意义及具体的分子致瘤机理还需进一步验证,但为阐明 HSP27 与肝癌相关性的基础与临床研究提供了一定的依据。

参 考 文 献

[1] Luk J M, Lam C T, Siu A F, et al.Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27,Hsp70,GRP78) up-regulation and their associated prognostic values[J].Proteomics,2006,6(3):1049-1057.

[2] Sun W, Xing B, Sun Y,et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis:novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues[J].Mol Cell Proteomics,2007,6(10):1798-1808.

[3] King K L,Li A F,Chau G Y,et al.Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival[J].Cancer,2000,88(11):2464-2470.

[4] Joo M,Chi J G,Lee H.Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma[J].J Korean Med Sci,2005,20(5):829-834.

[5] 蒋代凤,邱宗荫,李 兴,等.肝癌细胞线粒体蛋白的MALDI-TOF 质谱鉴定方法研究[J].重庆医科大学学报,2005,30(4):485-488.

[6] Arya R,Mallik M,Lakhotia S C.Heat shock genes-integrating cell survival and death[J].J Biosci,2007,32(3):595-610.

[7] Havasi A,Li Z,Wang Z,et al. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism[J].J Biol Chem,2008,283(18):12305-12313.

[8] Darimont B D.The Hsp90 chaperone complex-A poteitial target for cancer therapy[J]. World J Gastroenterol,1999,5(3):195-198.

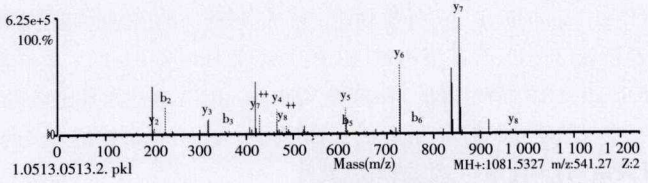
[9] Liu X L,Xiao B,Yu Z C,et al. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distribution and increase drug sensitivity of tumor cells[J].World J Gastroenterol,1999,5(3):199-208.

[10] Lu A L, Xu C S. Effects of heat shock on change of HSC70/HSP68, acid and alkaline phosphatases before and after rat partial hepatectomy[J]. World J Gastroenterol,2000,6(5):730-733.

[11] Lim S O,Park S G,Yoo J H,et al.Expression of heat shock proteins (HSP27,HSP60,HSP70,HSP90,GRP78,GRP94) in hepatitis B virus-rela ted hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules[J].World J Gastroenterol,2005,11(14):2072-2079.

[12] Moll R,Divo M,Langbein L.The human keratins:biology and pathology[J]. Histochem Cell Biol,2008,129(6):705-733.

[13] Salo A M,Wang C,Sipilä L,et al. Lysyl hydroxylase 3 (LH3) modifies proteins in the extracellular space,a novel mechanism for matrix remodeling[J].J Cell Physiol,2006,207(3):644-653.



Heat shock protein70[Homo sapiens]经数据库搜索证实是 HSP70 的一部分序列

图 2 多肽离子(m/z 541.27,z:2)ATAGDTHL GGEDFDNR 的 MS/MS 质谱图

(责任编辑:冉明会)