技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1859-04

宫颈永生化细胞和癌细胞的胞浆差异蛋白组学研究

宋大萍[1],赵 涌[2]

(1.绵阳市第三人民医院病理科,绵阳 621000;2.重庆医科大学基础学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:对 HPV-16 阳性的 H8 细胞株(宫颈上皮永生化细胞)和 Caski 细胞株(宫颈癌细胞)胞浆蛋白进行双向电泳和质谱分析,寻找与宫颈癌相关的特异性差异蛋白质。方法:采用双向凝胶电泳(2-dimensronal gel electrophoresis, 2-DE)和基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry,MALDI-TOF-MS/MS)以及 SWISS-PROT 数据库,对 H8 和 Caski 细胞胞浆蛋白进行比较,找出差异蛋白质。结果:通过对宫颈永生化细胞和癌细胞胞浆蛋白 2-DE 图谱比较和质谱分析,初步鉴定出 6 个差异蛋白,它们分别为 STK3、TRAF5、S100P、IKKb、CDK6、TAF2,其中S100P、IKKb、CDK6、TAF2、TRAF5 这 5 种蛋白质在宫颈癌细胞胞浆中高表达,STK3 蛋白质在宫颈癌细胞胞浆中表达缺失。结论:初步发现 STK3、TRAF5、S100P、IKKb、CDK6、TAF2 蛋白质在宫颈癌前病变和宫颈癌细胞胞浆中存在差异表达,通过对其功能的了解研究为宫颈癌前病变向癌转变机制的探讨、特异性肿瘤标志物的寻找提供实验依据。

【关键词】H8 细胞;Caski 细胞;差异蛋白质;2-DE;基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱

【中国图书分类法分类号】R361⁺.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-19

Comparative proteomics analysis of cytoplasmic proteins of immortalized cervical cell and cervical cancer cell

SONG Da-ping, et al

(*Department of Pathology, the Third People's Hospital of Mianyang*)

【Abstract】*Objective*: To identify differentially expressed protein spots of cytoplasm from H8 cells(human immortalized endocervical cell) and Caski (cervical cancer cell) associated with cervical carcinogenesis by two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. *Methods*: The cytoplasmic proteins of H8 cell and Caski cell were separated by means of two-dimensional gel electrophoresis, then the selected differential protein spots were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and SWISS-PROT database. *Results*: 6 differentially expressed protein spots were successfully identified, among which, S100P, IKKb (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta), CDK6 (Cell division protein kinase 6), TAF2 (Transcription initiation factor TFIID subunit 2), TRAF5 (TNF receptor-associated factor 5) were significantly up-regulated in cytoplasmic proteins in Caski cell. STK3 (Serine/threonine-protein kinase 3) deletion was found in cytoplasmic proteins in Caski cell. *Conclusion*: The differential expressions of proteins of cytoplasm may be valuable for studying mechanisms of cervical carcinogenesis, or as diagnostic markers and therapeutic targets for cervical cancer.

【Key words】H8 cell; Caski cell; Comparative proteomics; Two-dimensional gel electrophoresis; MALDI-TOF-MS

宫颈癌是我国最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,在世界范围内其发病率位居妇女恶性肿瘤的第 2 位,研究表明人类乳头状瘤病毒与宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的发生密切相关[1]。但宫颈癌前病变与癌之间的关键性差异蛋白质组及癌变机制至今仍不清楚。目前差异蛋白质组学是蛋白质组学研究的一个最为主要内容,它主要运用双向电泳和基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱技术来寻找筛选出差异蛋白质进行研究,以明确其在癌变过程中所起的作用,为探索癌变机制奠定基础[2,3]。本实验旨在研究宫颈永生化细胞和癌细胞胞浆之间的差异蛋白质,为宫颈癌及癌前病变的诊断、癌变机制的探讨以及特异性肿瘤标志物的研究提供依据。

作者介绍:宋大萍(1978-),女,主治医师,硕士,
研究方向:宫颈癌前及癌变的蛋白质组学。

通讯作者:赵 涌,男,教授,E-mail:Blysol@163.com。

1　材料与方法

1.1　材料

主要试剂和仪器：亚细胞结构蛋白质提取试剂盒（Proteo extract subcellular proteome extraction kit）购于德国默克生物制剂公司，胰酶购于 Promega，聚丙烯酰胺（Acr）、三羟甲基氨基乙烷（Tris）、甘氨酸、尿素、十二烷基磺酸钠（SDS）、硝酸银、低熔点琼脂糖、四甲基乙二胺（TEMED）、二硫苏糖醇（DTT）、碘乙酰胺、过硫酸铵（AP）、CHAPS 购自上海生工（Sagon）、乙腈、三氟乙酸购于 Sigma 公司。线性固相 pH 梯度预制胶条（pH3~10，18 cm）、两性电解质购于美国安玛西亚公司。双向电泳仪购于美国安玛西亚公司，MALDI-TOF 质谱仪（美国 ABI 公司），TC2323CO_2 培养箱（美国 SL 公司），SWISS-PROT 数据库，5417R 高速离心机（德国 Eppendorf 公司），Amer sham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统及 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件（Amersham pharmacia 公司产品）。

H8 细胞（宫颈上皮永生化细胞株）源于中国医学科学院协和医科大学基础研究所。

Caski 细胞（宫颈癌细胞株）从重庆医科大学分子生物教研室获得。

1.2　方法

1.2.1　样品制备　将 H8 细胞和 Caski 细胞置于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中，待细胞数达到 3×10^6 个时收集细胞，然后加入 *Buffer* Ⅰ和 Cocktail 蛋白酶 1 ml，放在冰上 10 min 后吸出所有液体，其为胞浆蛋白质，然后进行蛋白质定量。

1.2.2　双向凝胶电泳分离和图像分析　参照 Gorg A 等的方法[4]和安玛西亚等电聚焦系统操作指南进行。胶条为 18 cm，pH 值 3~10，第 1 向等电聚焦电泳程序如下：①被动水化 12 h；② 200 V/1 h，step and hold，除盐；③500 V/1 h，step and hold，除盐；④1 000 V/5 h，step and hold，除盐；⑤ 8 000 V/4.5 h，step and hold，升压；⑥ 10 000 V/2.5 h，step and hold，聚焦。第 2 向 SDS-PAGE 垂直电泳，条件如下：以恒功率方式：5 W、1 h；17 W、7 h，直至溴酚蓝迁移至凝胶底边停止电泳，进行硝酸银染色。然后对电泳凝胶进行扫描，获取图像，运用 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件进行分析，找出较大的胞浆差异蛋白点。

1.2.3　质谱分析和数据库检索　将确定的差异蛋白质斑点经过切胶、脱色等后进行酶切，加入 10 μl 胰酶消化液（20 ng/μl），4℃冰箱中放置 45 min 左右，待酶液完全被吸收，在加入 30 μl 覆盖液（10%ACN 和 60 mmol/L 碳酸氢铵），37℃酶解过夜。将酶解后上清夜吸出于另一 EP 管中，然后再将剩下的用萃取液（50%CAN/5%TFA）在 37℃水浴箱萃取 2 次，每次 1 h，将 3 次的提取液混合，真空离心抽干。进行质谱点样，然后转移至 MALDI-TOF-MS 对肽段进行质谱分析。利用 NCBI、Swiss-Port 数据库寻找匹配的相关蛋白质，并查询其功能。

2　结　果

2.1　双向电泳图谱

经双向电泳及银染后获得 H8 和 Caski 的胞浆蛋白质双向电泳图谱（图 1、2）。

2.2　差异蛋白质及其 MALDT-TOF-MS-PMF 分析

通过对电泳结果进行图像和数据的统计分析，结合肉眼观察比较，选取 8 个差异较大的蛋白点进行肽质量指纹图谱鉴定。对所获得的图谱用搜索 Mascot 进行数据库查询，再结合电泳图上对应的等电点、分子量、匹配肽段的多少和序列覆盖率等进行综合分析，现初步鉴定出 6 个胞浆蛋白点，分别为 STK3、TRAF5、S100P、IKKb、CDK6、TAF2。

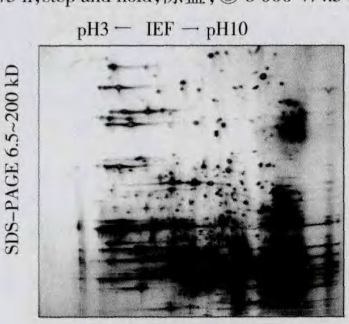


图 1　H8 胞浆蛋白质图

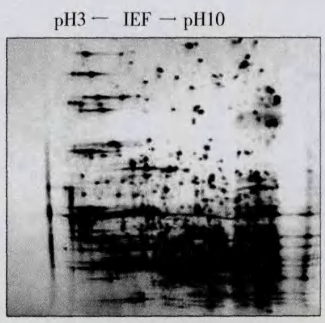


图 2　Caski 胞浆蛋白质图

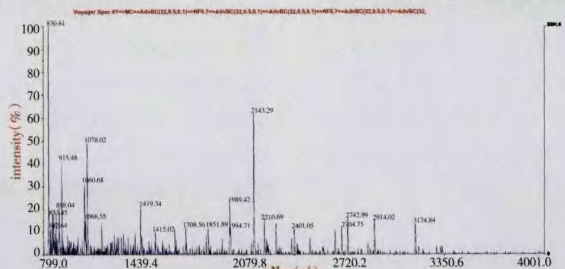


图 3　MALDI-TOF-MS 分析电泳凝胶上 4 号蛋白质点所得的典型肽质量图谱

表 1 H8 和 Caski 细胞的 6 种胞浆差异蛋白

蛋白点	蛋白质名称	表达情况	Mr/kD	PI	序列覆盖率(%)
1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3-Serine/threonine-protein kinase 3	缺失*	56.2	5.12	20
2	肿瘤坏死因子受体相关因子 5-TNF receptor-associated factor 5	上调▲	64.3	7.26	16
3	S100P	上调	10.4	4.75	50
4	Ikkb- Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	上调	86.5	5.58	16
5	细胞周期素依赖性蛋白激酶 6-Cell division protein kinase 6	上调	36.9	6.02	27
6	TAF2-Transcription initiation factor TFIID subunit 2	上调	136.8	8.45	20

* 表示在 Caski 细胞胞浆中蛋白质表达缺失；▲表示在 Caski 细胞胞浆中蛋白质表达上调

3 讨 论

蛋白质组学的研究在于它能从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质成分、表达水平与修饰状态[5]。本研究运用差异蛋白质组学的方法，对 H8 和 Caski 细胞的胞浆蛋白质进行差异比较，从中鉴定出 6 种蛋白差异表达，5 种蛋白质在宫颈癌细胞胞浆中表达上调，1 种在宫颈癌中表达缺失。它们分别为：

(1)丝氨酸/苏氨酸激酶(Serine/threonine-protein kinase，STK)是一大类特异地催化蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化的激酶家族，参与多种信号导过程。其中 STK3 可能与激活细胞调亡激酶有关，进一步使 capase 降解，从而导致核浓缩、DNA 断裂，导致细胞凋亡。STK3 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶通过促进肿瘤坏死因子 -α 诱导的 JNK/p38 激活从而使肝癌细胞凋亡[6]。该蛋白在宫颈永生化细胞胞浆中高表达，而在癌细胞浆中表达缺失可能与此有关，具体机制有待进一步研究。

(2)肿瘤坏死因子受体相关因子(Tumor necrosis factor receptor-associated factor，TRAF)是 TNFR 家族成员胞浆区关联的信号转导蛋白，TRAF 可以与 TNFR 和 LTβ-R 直接以高亲和力结合，激活 TNF 从而参与细胞凋亡[7]。近有报道肿瘤坏死因子受体相关因子 -2(TRAF2)在炎症性肠病(如溃疡性结肠炎等)显著增高[8]。TRAF5 能与 CD40 胞浆段结合介导相关信号的转导，从而激活转录因子 NF-κB，抑制细胞凋亡，而 CD40 在很多肿瘤(肺癌，胃癌，肠癌)中都高表达[9,10]，它与 TRAF5 结合通过信息传导通路促进肿瘤的发生。TRAF5 在宫颈癌中高表达可能也是通过此途径促进肿瘤生长。

(3)S100P 蛋白是钙结合蛋白 S100 家族成员，S100 蛋白家族的不同分子具有广泛的生物学活性，在细胞增殖、分化、肌肉收缩、基因表达、分泌及细胞凋亡中发挥重要作用，其功能异常也可以导致不同的疾病[11-13]。新近研究发现 S100P 蛋白在多种肿瘤组织中都高表达，它与促进肿瘤的转移和侵袭、肿瘤的发生发展密切相关[14]。研究发现 S100P 与膀胱移行细胞癌、胰腺癌和直肠癌的发生、分化、远处转移有关，S100P 通过其受体影响胞外信号调节蛋白激酶 1/2 信号转导通路来发挥促细胞增殖和迁移功能的[15]，本研究中 S100P 在宫颈癌组织中异常高表达，说明它可能参与了宫颈癌的发生和发展过程。

(4)IKKb(Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta)是 NF-κB 的激活剂，炎症中 IKKb 影响肿瘤的发生和发展[16]。在肿瘤实质中，炎症通过 IKKb/NF-κB 途径抑制细胞凋亡，加快细胞周期，促进肿瘤的发生。在肿瘤间质中，炎症通过 IKKb/NF-κB 途径产生细胞因子和化学因子，作为肿瘤生长因子，刺激肿瘤生长[17]。研究表明这种蛋白也是通过激活 NF-κB 在宫颈癌的发生发展中扮演重要的角色。

(5)细胞周期素依赖性蛋白激酶(Cell division protein kinase 6，CDK6)在细胞周期调控起着重要作用，细胞生长主要调节子，研究表明 CDK6 的激活，能缩短 G_1 期，造成细胞周期调节失控和细胞异常增殖，导致肿瘤的发生。文献报道 CDK6 的异常高表达在胃癌、肝癌的发生、发展过程中发挥重要作用[18,19]。近有报道 CDK6 在 NK/T 细胞淋巴瘤高表达，参与了淋巴瘤的发生与发展[20]。目前我们研究发现 CDK6 在宫颈癌细胞的细胞核蛋白中同时也呈高表达，这也帮助证明 CDK6 的过度表达与宫颈癌的发生、增殖密切相关。

(6)TAF2(Transcription initiation factor TFIID subunit 2)是 TBP 协同因子中的一种，是基因转录调控的辅助因子，它的作用是通过与多种转录调控因子(激活物或阻遏物)的转录调控结构域结合，而介导转录激活或抑制。有报道表明TAM 在体外可以杀伤 ER 阳性的乳腺癌细胞可能与抑制 TAF2 功能有关，其在宫颈癌中的作用有待进一步研究。

综上所述，本实验通过差异蛋白质组学研究发现了 H8 和 Caski 细胞胞浆的 6 种差异蛋白，其中 S100P、IKKb、CDK6、TAF2、TRAF5 这 5 种蛋白质在 Caski 细胞胞浆中高表达，可能与促进细胞增殖、分化，抑制细胞凋亡，加快细胞周期造成细胞周期调节失控和细胞异常增殖有关，从而导致肿瘤的发生。而 STK3 蛋白质在 Caski 细胞胞浆中表达缺失可能与该蛋白质促进细胞凋亡过程相关，从而抑制肿瘤形成。从宫颈癌前病变到宫颈癌是一个复杂的、多步骤的、多因素的过程，宫颈鳞状上皮永生化细胞和癌细胞胞浆蛋白差异表达及鉴定分析为阐明宫颈癌发病及生长的有关机制提供了实验依据，也为宫颈癌潜在的新的分子标记和新的药物靶点筛选提供了参考。同时目前我们的研究还是一个初步的探讨，我们后期将会通过 PT-PCR、Westen blot、质粒重组转染、动物体内实验来进一步研究以便更加明确癌变相关机制，为肿瘤研

究提供重要的理论依据。

参 考 文 献

[1] Haie-Meder C, Crevoisier R, Fondrinier E, et al.Concomitant chemoradiation in patients with cervix cancer [J]. Bull Cancer, 2005, 92(12): 1032-1038.

[2] Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology[J].Proteomics, 2001, 1(10): 1295-1302.

[3] Bichsel V E, Liotta L A.Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling[J].Cancer J, 2001, 7(1): 69-78.

[4] Anderson N.Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words [J].Electrophoresis, 1998, 19(11): 1853-1861.

[5] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al.A current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J].Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.

[6] 李湘竑,汪 谦,罗 燕,等.丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶对肝癌细胞凋亡的促进作用[J].中华实验外科杂志,2006,23(1):55-56.

[7] Xu D M.Tumor necrosis factor receptor-associated factor2(TRAF2) in TNF signaling[J].Yunnan University J(Natural Sciences Edition), 2003, 1:243-246.

[8] 沈 骏,冉志华,童锦禄,等.血浆肿瘤坏死因子受体相关因子-2 升高与炎症性肠病内镜下疾病活动性的相关性分析[J].医学临床研究,2010,27(2): 212-214.

[9] Li Z, Wu Y G, Chen T B, et al. Expression of CD40 in colon cancer and its biological significance[J]. Tumor, 2009, 29(11): 1082-1085.

[10] 黄循波,袁建明,王天翔,等.血清 CD40 和 CD40L 的检测在胃癌病人中的表达[J].外科理论与实践,2010,15(1): 44-46.

[11] Ruse M, Lambert A, Robinson N, et al.S100A7, S100A10, and S100A11 are transglutam inase substrates[J].Biochemistry, 2001, 40(10): 3167-3173.

[12] Fung L F, Lo A K, Yuen D W, et al. Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Life Sci, 2000, 67(8): 923-936.

[13] Chaurand P, DaGue B B, Pearsall R S, et al.Profiling p roteins from azoxymethane2induced colon tumors at the molecular level by matrixassisted laser desorp tion/ionization mass spectrometry[J].Proteomics, 2001, 1(10): 1320-1326.

[14] 陈琳磊,董 辉,袁 洪,等.钙结合蛋白 S100P 与肿瘤关系的研究进展[J].广东医学,2009,30(5):813-815.

[15] 谢 宇,杨罗艳,江勃年,等.S100P 在膀胱移行细胞癌中的表达与意义[J].医学临床研究,2009,26(9):1651-1653.

[16] Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin D C, et al. Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor-κB in breast cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(9): 3810-3818.

[17] 钟雪云,林琛莅,秦艳芳,等.IKKb 在炎症与肿瘤中的作用[J].中国病理生理杂志,2005,21(10):2065-2068.

[18] JIANG Ke-wei, WANG S, YE Y J, et al.Prognostic value of cyclin D1 and CDK6 expression in patients with gastric carcinoma[J].Chinese Journal of General Surgery, 2005, 20(12): 800-802.

[19] 郑美蓉,阮庆大,程 玲,等.CyclinD1、CyclinE、CDK6 在原发性肝细胞癌中的表达[J].临床肝胆病杂志,2006,22(01):49-51.

[20] 姜余梅,杨 晶,杨 琨,等.NK/T 细胞淋巴瘤中 CDK6 的表达及意义[J].山东医药,2009,39(49): 77.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132