技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1699-05

全反式维甲酸诱导 HL60 细胞分化前后蛋白表达差异分析

唐 薇[1],王伟佳[2],邱宗荫[1,2]

(1. 重庆医科大学药学院分析化学教研室;2. 重庆医科大学临床检验诊断学省部共建重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立全反式维甲酸(All trans-retinoic acid,ATRA)诱导 HL60 细胞向粒系分化的模型,研究采用改良双向电泳条件对分化前后的细胞全蛋白进行分离分析,寻找差异表达蛋白。方法:采用全反式维甲酸对 HL60 细胞进行诱导分化。通过 MTT、流式细胞技术分析细胞增殖情况和 CD11b 细胞表面分化抗原的表达,选择最适的药物浓度和诱导时间;再通过细胞化学染色对分化结果进行验证,构建分化模型。采用改良双向电泳分离技术对细胞全蛋白进行分离,运用 PDQuest 软件分析 HL60 细胞分化前后蛋白表达差异,并用基质辅助激光解吸 - 飞行时间质谱(MALDI-TOF)对差异蛋白点进行分析。结果:ATRA 明显抑制 HL60 细胞增殖,并随药物浓度的增加,抑制效果也越显著;2 μmol/L 的 ATRA 连续作用 HL60 细胞 5 d 即有 90%以上的细胞有粒系分化标志抗原 CD11b 的表达。细胞化学染色结果亦表明诱导后的 HL60 细胞向粒系分化。将分化前后的 HL60 细胞全蛋白经过改良双向电泳技术分离,PDQuest 软件比对,MAIDI-TOF 分析,发现有 25 个蛋白点仅在未分化凝胶谱中找到,有 15 个蛋白点仅在分化细胞蛋白表达谱中找到。其中有的是癌基因表达蛋白,有的是抑癌基因表达蛋白,还有的则参与凋亡过程等。结论:在选定的药物浓度和作用时间下,ATRA 可以诱导 HL60 细胞向粒系分化。改良双向电泳技术对药物作用前后细胞蛋白的分离,可发现不同于传统双向电泳分离所得的蛋白结果。

【关键词】HL60 细胞;双向电泳;全反式维甲酸;分化

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-26

Analysis of protein expression in retinoic acid-induced HL60 cells by modified two--dimensional electrophoresis

TANG Wei, et al

(*Department of Analytical Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the granulocyte-differentiation model of the HL60 cells which are treated with All-trans retinoic acid (ATRA), and to use the modified two-dimensional electrophoresis conditions to analyze the differences of protein expression between treated and untreated HL60 cells. *Methods*: HL60 cells were induced through treatment with All-trans retinoic acid (ATRA). For selection of the appropriate drug concentration and induction time, MTT and flow cytometry are used to detect the HL60cell proliferation and the expression of differentiation antigens CD11b respectively. Cellular chemical staining was used for the verification of the differentiation of the treated HL60 cells. The protein of HL60 cell lines could be separated by modified two-dimensional electrophoresis (2-DE). PDQuest software was used to analyze the different protein expression between treated and untreated HL60 cells. The protein was analyzed by matrix-assisted laser desorption - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). *Results*: ATRA could inhibit HL60 cell proliferation, and with the increase in drug concentration, the effect of inhibiting was more significant. Treated with 2 μ M ATRA for five days, there were more than 90% of HL60 cells expressing antigenCD11b. Cellular chemical staining also showed that ATRA could induce HL60 cells to granulocyte cells. By the analysis of modified 2-DE and PDQuest software, 25 protein spots was detected in untreated cells, while 15 protein spots was promoted Some of them were oncogene protein and suppressor gene protein, while some of others are involved in apoptosis. *Conclusion*: ATRA could induce HL60 cells to granulocyte cells in selected drug concentration and induction time. Using the modified two-dimensional electrophoresis conditions, different protein expression can be found from the traditional two-dimensional electrophoresis.

【Key words】HL60 cell line; Two-dimensional electrophoresis; All trans-retinoic acid; Differentiation

作者介绍:唐 薇(1983-),女,硕士,
研究方向:白血病细胞分化比较蛋白质组学研究。

通讯作者:邱宗荫,男,教授,E-mail: zongyin@sohu.com。

全反式维甲酸(All trans-retinoic acid,ATRA)是现在临床应用最为广泛的治疗白血病一线药物。HL60 细胞是目前体外研究白血病细胞分化的良好

模型。全反式维甲酸具有诱导 HL60 细胞向粒细胞系分化作用[1,2]。现在已有用传统双向电泳技术研究全反式维甲酸具有诱导 HL60 细胞向分化的蛋白表达谱差异的报道,但蛋白分离效果并不理想[3,4]。由于使用不同的电泳分离条件对细胞全蛋白的分辨率和重复性是不同的,分离所得蛋白也有所不同。我们希望通过改良以后的双向电泳技术,对 HL60 细胞分化前后的全蛋白进行分离分析,补充我们对 HL60 细胞向粒系分化相关蛋白的认识,为后续研究这些蛋白在诱导该细胞向粒系分化中的作用提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

HL60 细胞(中国科学院上海生命科学研究所);RPIM1640 培养基(美国 GIBCO 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);全反式维甲酸(ATRA)、二甲亚砜(DMSO)(Sigma 公司);尿素、3-[(3- 胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、过硫酸氨、碘乙酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)及 pH 3~10 IPG 胶条等(美国 Bio-Rad 公司);二硫苏糖醇(DTT)、甲叉双丙烯酰胺、硫脲(美国 Sangon 公司);β - 巯基乙醇(瑞士 Buchs 公司);DNA 酶,RNA 酶(日本 TAKARA 公司);蛋白酶抑制剂、NBT 染料 (辛创生物技术有限公司);CD11b 及其对照抗体(深圳晶美公司)。

1.2 不同药物浓度,不同时间作用 HL60 细胞增殖的检测

取对数生长期的人白血病细胞株 HL60 细胞 1×10^5 个 /ml,分别采用含 ATRA 终浓度为 1、2、3 μmol/L 的 1640 培养基培养。对照组除未加药物外,其余与处理组相同。处理组与对照组均设置 3 个重复孔,在 37℃、5%CO_2 条件下分别培养 24、48、72、96、120 h。每天取出 1 板,加入 MTT 20 μl,4 h 后,应用平板离心机 3 000r/min 离心 10 min,再加 150 μl 二甲亚砜显色 5 min,酶标仪 490 nm 测定吸光度。

1.3 不同浓度、不同时间诱导 HL60 细胞,细胞表面抗原 CD11b 的检测

取对数生长期的人白血病细胞株 HL60 细胞 1×10^6 个 /ml,分别用 1、2、3、4 μmol/L 的 ATRA 处理 5 d,收集细胞 1×10^7 个,PBS 洗涤 3 次,对照组除未用药物处理外,其余与处理组相同,然后上流式细胞仪检测 CD11b 的表达情况。

1.4 化学染色

收集对数生长期非药物处理 HL60 细胞和 2 μmol/L ATRA 作用 5 d 后的细胞各 1×10^7 个,PBS 洗涤 3 次, 离心涂片,参照教材《血液学检验试验指导》[5]分别对药物作用前后细胞进行瑞氏染色、NBT 染色试验,观察细胞形态。

1.5 细胞周期检测和凋亡检测

取对数生长期的人白血病 HL60 细胞,调整细胞数为 1×10^5 个 /ml,采用 2 μmol/L 的 ATRA 连续作用 5 d,离心收集,PBS 洗涤 3 次,70% 乙醇固定,以药物非处理组 HL60 细胞做对照,用流式细胞仪检测细胞周期。

同检测细胞周期方法收集细胞,PBS 洗涤 3 次,以药物非处理组 HL60 细胞做对照,应用 Annexin-V 凋亡检测试剂盒上流式细胞仪检测。

1.6 细胞超微结构的观察

同检测细胞周期方法收集细胞,PBS 洗涤 3 次,2 000 r/min 离心 20 min 收集细胞,加入预冷戊二醛固定,以药物非处理组 HL60 细胞做对照,透射电子显微镜观察细胞微形态。

1.7 优化后的双向电泳(Two-dimensimal electrophoresis,2-DE)分离药物作用前后 HL60 细胞全蛋白

采用优化后的双向电泳条件[6],分离 ATRA 作用前后的 HL60 细胞全蛋白。采用标准蛋白提取法提取的蛋白溶液加入适量裂解液(8 mol/L 尿素,2 mmol/L TBP,0.4 g/ml CHAPS,5 μl/ml Bio-lyte3~10,2 mol/L 硫脲,Mg^{2+} 激活的 20 μg/ml Dnase,5 μg/ml Rnase 和蛋白酶抑制剂 cocktail),冰上静置 30min,镜下无完整形态细胞,离心(15 000 r/min,4℃)60 min,吸取上清,做标准曲线定量后分装。上样前,取 200 μg 分装保存蛋白,用水化上样缓冲液补足上样量,上样总体积为 330 μl。上样前低温高速离心(15 000×g,20 min),取上清液线性加入聚焦盘中。采用 17 cm 非线性 IPG 胶条,升压聚焦条件 450 V 2 h、4 380 V 2 h、4 380 V 1 h 33 min。

取出聚焦好的 IPG 胶条,经 2 次平衡进行第二向 SDS-PAGE 电泳。采用银染法对分离蛋白点染色,PD-QUEST 软件分析蛋白点的表达差异情况。

1.8 差异蛋白点的基质辅助激光解吸-飞行时间质谱(MALDI-TOF)分析

从银染凝胶上精确挖出差异蛋白点,Hellman[7]优化的程序制备质谱分析用的样品。以 CH_3CN/5% TFA(1:1,v/v)制备 CHCA 饱和溶液,然后用 2 μl CH_3CN/5% TFA 水溶液(1/1,v/v)将肽混合物溶解并与 2 μl CHCA 饱和溶液混合。取 1 μl 样品/基质溶液点在样品板上,在室温、洁净条件下自然干燥 8 h 后再对进行质谱分析。

质谱分析条件:Voyager DE Pro 基质辅助激光解吸离子化—飞行时间质谱仪(美国 ABI 公司),反射模式,正离子谱测定,N2 激光源波长 337 nm,离子源加速电压 20 kV,脉冲宽度 3 ns,离子延迟时间 100 ns,Grid 75%,Guide Wire 0.003%,激光强度为 850 ~ 1 200 内部单位,质谱信号单次扫描累加 150 次。

以 MASCOT 搜索,选择 Swissprot、NCBInr 作为筛选数据库。

1.9 统计学分析

结果采用统计软件 SPSS 11.5 分析。均值间比较使用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同药物浓度作用后,HL60 细胞的增殖情况

不同浓度的 ATRA 均对 HL60 细胞的生长有抑制作用,并随浓度的增加,抑制作用也越显著,如图 1 所示。

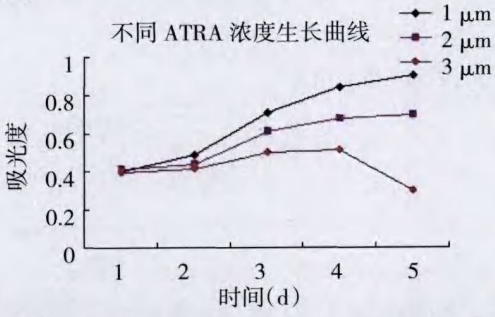
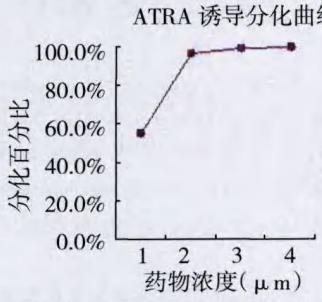


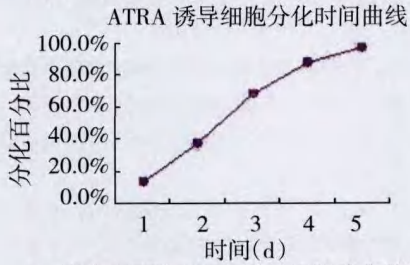
图 1 不同 ATRA 药物浓度下,HL60 的增殖曲线

2.2 不同药物浓度,不同时间诱导 HL60 细胞后,细胞表面分化抗原 CD11b 的表达情况

细胞表面分化抗原 CD11b 是当今公认的粒系分化标志,不同浓度药物对 HL-60 细胞的诱导 5 d 后 1 μmol/L ATRA 仅可使 HL60 细胞达到 50%左右的分化,2 μmol/L 以上的 ATRA 都可诱导 HL-60 细胞达到 90%以上的分化。由于较高药物浓度下,细胞死亡很多,无法进行后续试验,我们采用 2 μmol/LATRA 作为最佳诱导浓度,发现随时间的延长,分化细胞比例不断增加。5 d 后,分化率高达 90%以上。因此初步确定药物浓度 2 μmol/L,诱导时间 5 d 为最佳药物作用浓度和作用时间,如图 2 所示。



A. 不同浓度下 ATRA 诱导细胞分化曲线

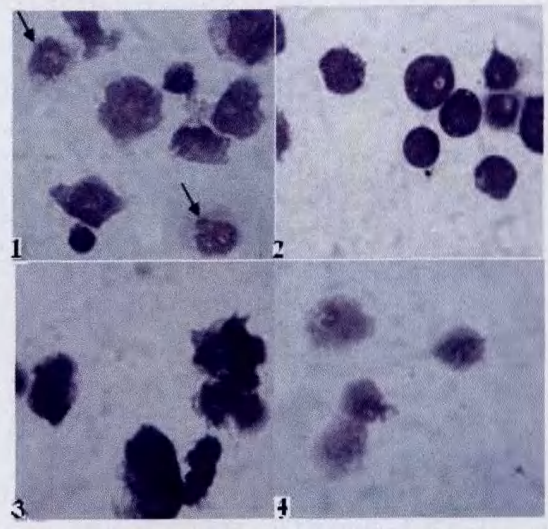


B. 不同时间下 ATRA 诱导细胞分化趋势

图 2 不同药物浓度、不同时间诱导 HL60 细胞后,细胞表面分化抗原 CD11b 的表达情况

2.3 细胞染色和形态学观察

瑞氏染色可见药物处理组明显的粒系分化细胞(箭头所指),胞核形态不规则,呈杆状或分叶状,边缘不整齐;非处理组则呈现胞浆深染,核仁明显,核浆比例大的幼稚状态。NBT 染色可见胞浆内含有蓝黑色沉积物的阳性细胞;对照组无此现象。以上结果表明在选定的药物作用条件下,ATRA 诱导 HL60 细胞向粒系分化模型构建成功(见图 3)。



1. ATRA 作用 HL60 细胞 5 d 后瑞氏染色,可见明显不规则的细胞核,胞浆淡染(如箭头所指);2. 非处理对照组 HL60 细胞的瑞氏染色,胞浆深染,染色质致密,核仁明显;3. ATRA 药物处理 HL60 细胞 NBT 染色,胞浆内含有蓝黑色沉积;4. 非处理组 HL60 细胞 NBT 染色呈阴性

图 3 ATRA 诱导 HL60 细胞分化前后的化学染色

2.4 细胞周期检测

采用流式细胞技术分析 2 μmol/L ATRA 作用 HL60 细胞 5 d 后周期的变化(表 1),可见药物作用后 G_0~G_1 期细胞明显增多,即出现了细胞 G_0~G_1 期阻滞。

2.5 细胞凋亡预测

采用流式技术对 2 μmol/L ATRA 作用 5 d 后的 HL60 细胞进行了初步凋亡验证,没有发现凋亡现象,为我们后续分化相关蛋白分离的奠定基础。

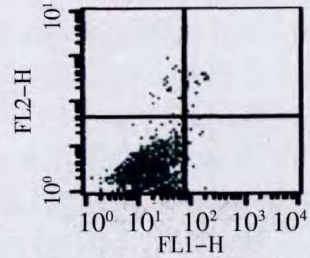


图 4 2 μmol/L 药物作用 5 d 后凋亡检测

2.6 细胞超微结构观察

见图 5。

2.7 2-DE 分离分析 ATRA 诱导分化前后 HL60 细胞全蛋白及 PQ-QUEST 软件分析结果

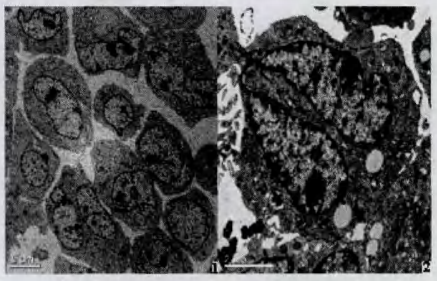
通过 PD-QUEST 软件对图谱蛋白点分析,得到非处理对照组蛋白点总数为(1 102±7.4)个, ATRA 处理组蛋白点总数为(988±11.3)个。在 ATRA 处理组与非处理对照组比较,有 40 个蛋白点在分化前后表达有差异, 其中有 25 个蛋白点在分化后表达下降,有 15 个在分化后表达增高。见图 6。

2.8 质谱分析

取 ATRA 处理组与非处理对照组之间的差异蛋白点,进行基质辅助激光解吸-飞行时间质谱分析。数据结果见表 2。

表 1 2 μmol/L ATRA 作用 HL60 细胞 5 d 后周期变化情况

样本	G_0~G_1 期	G_2~M	S 期(%)
HL60 细胞非处理组	29.72	9.35	60.93
HL60 细胞 ATRA 处理组	59.53	16.06	24.41



1.非药物处理对照组中,可见胞质内有散在粗面内质网,线粒体、高尔基复合体发达,多聚核糖体丰富,染色质均匀,核膜清晰且核仁明显,增生仍处活跃状态(×3 000);2.为 ATRA 处理组,可见胞浆中有嗜天青颗粒,异染色质密集,核浆比减小,细胞核呈分叶状,可见明显核带(×10 000)

图 5 非处理组和 ATRA 处理组 HL60 细胞超微结构

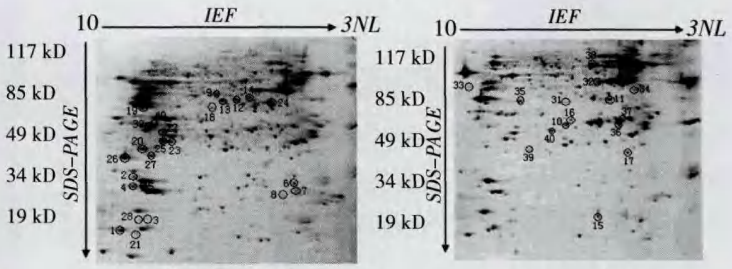


图 6 非处理组和 ATRA 处理组 HL60 细胞全蛋白分离情况

3 讨 论

我们对全反式维甲酸诱导 HL-60 细胞向粒系分化进行了较为全面模型构建。由于全反式维甲酸可对急性早幼粒白血病细胞产生诱导分化、生长抑制和凋亡的效应[8-10],所以必须建立 1 个确定的分化模型,降低生长抑制和凋亡带来的影响,以确保最后所得蛋白主要是与分化相关。所有实验结果均充分表明全反式维甲酸在选定的浓度和诱导时间内,对 HL-60 细胞具有明显的诱导分化作用,且该条件受生长抑制和凋亡的影响也较小。

改良双向电泳条件的建立,无论从重复性,还是分离度都明显优于传统的分离方法,为我们后续蛋白的分离及鉴定铺平了道路。

试验分析选取的 40 个蛋白差异点,其中有 15 个蛋白分化后表达增高,25 个蛋白分化后表达下降。数据搜索分析:其中包括了抑癌基因如:CUTL1, PRDX1 等;还有与肿瘤细胞分化相关蛋白,如 USF2 等;凋亡相关蛋白如:LGALS1、CFDP1、HTATIP 等;还有一些蛋白与细胞骨架或是蛋白磷酸化相关,也许在细胞分化中也起着不可忽视的作用。然而,蛋白是否分析正确,其表达是否存在差异,还是要通过免疫印迹(Western blotting)来验证。

参 考 文 献

[1] Breitman T R, Selonick S E, Collins S J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line(HL-60) by retinoic acid[J]. National Academy of Sciences, 1980, 77(5): 2936-2940.

[2] Meyer P A, Kleinschnitz C. Retinoic acid induced differentiation and commitment in HL-60 cells[J]. Environ Health Perspect, 1990, 88: 179-182.

[3] 牟芝蓉,吴王章,李晋涛. 双向电泳分析比较维甲酸诱导 HL60 细胞分化的蛋白表达差[J]. 第三军医大学学报, 2002, 10(24): 1153-1155.

[4] 陈春燕,贾继辉,潘祥林,等. 白血病细胞蛋白质组学研究技术体系的建立[J]. 山东大学学报, 2004, 42(1): 71-72, 76.

[5] 许文荣. 临床血液学和血液检验试验指导配套教材[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2004.10.

[6] 唐 薇,毛小琴,王伟佳,等. 人急性早幼粒 HL60 细胞双向电泳条件的优化[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(22): 2049-2052.

[7] Hellman U, Wemstedt C, Gonez J, et al. Non-decoloured in-gel digestion of coomassie blue-stained proteins[J]. Anal Biochem, 1995, 224(1): 451-455.

表 2 差异蛋白点的质谱分析的数据结果

	蛋白名称	等电点	分子量(Da)	变化趋势(↑↓)
1	THY-1	9.0	17 935	分化后↓
2	RODH	8.94	36 285	分化后↓
3	RGS1	8.3	22 631	分化后↓
4	GJB1	9.19	32 574	分化后↓
5	ARV1	8.59	31 602	分化后↓
6	CFDP1	4.8	33 593	分化后↓
7	YWHAE	4.63	29 326	分化后↓
8	CLIC1	5.09	27 248	分化后↓
9	TLE1	6.8	83 202	分化后↓
10	ERK6	6.0	41 941	分化后↑
11	HARP	5.1	51 188	分化后↓
12	AKT1	5.75	56 050	分化后↓
13	GNPAT	6.2	77 189	分化后↓
14	APLP1	5.54	72 815	分化后↓
15	LGALS1	5.34	15 048	分化后↑
16	CTRN2	5.98	42 381	分化后↑
17	TPM3	4.98	32 856	分化后↑
18	SLC25A23	6.85	52 573	分化后↓
19	HTATIP	8.74	59 286	分化后↓
20	ALDOA	8.3	39 851	分化后↓
21	NME2	8.52	17 401	分化后↓
22	PSAT1	7.56	40 796	分化后↓
23	P15RS	7.13	35 926	分化后↓
24	HAP1	4.7	75 515	分化后↑
25	RFPL3	7.43	36 275	分化后↓
26	MFNG	9.01	36 806	分化后↓
27	RAB36	8.05	36 813	分化后↓
28	PRDX1	8.27	22 324	分化后↓
29	ACADM	8.16	47 015	分化后↓
30	DEPDC6	8.29	46 750	分化后↓
31	GDF2	6.03	47 861	分化后↑
32	CUTL1	5.4	77 456	分化后↑
33	ADAD1	9.14	64 940	分化后↑
34	BRAP	5.08	61 874	分化后↑
35	RXRG	7.55	51 580	分化后↑
36	NUDCD3	5.16	40 854	分化后↑
37	USF2	5.0	36 955	分化后↑
38	HSPA4L	5.63	95 453	分化后↑
39	CLDN23	7.51	32 464	分化后↑
40	PTER	6.07	39 506	分化后↑

[8] 汪思应，郑 红，程 洁，等.全反式维甲酸诱导 HL60 细胞凋亡及相关信号途径的改变[J]. 安徽医科大学学报，2003，38(2)：88-91.

[9] Harris M N，Ozpolat B，Abdi F，et al. Comparative proteomic analysis of all-trans-retinoic acid treatment reveals systematic posttranscriptional control mechanisms in acute promyelocytic leukemia[J]. Blood，2004，104(5)：1314-1323.

[10] Kim D J，Bility M T，Billin A N，et al. PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation[J]. Cell Death and Differentiation，2006，13(1)：53-60.

（责任编辑：冉明会）