DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.007

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0674-04

纳升电喷雾质谱鉴定维甲酸诱导HL60细胞分化相关蛋白质

牟芝蓉,吴玉章,李晋涛,周 伟,魏 斌 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 鉴定维甲酸诱导肿瘤细胞分化有关蛋白质。方法 双向电泳分离维甲酸诱导分化前后HL60细胞蛋白,PDQuest软件分析筛选分化肿瘤细胞特异表达的蛋白点,用纳升电喷雾质谱对酶解消化样品进行部分氨基酸的序列测定,数据库比较即可得知是已知或未知蛋白。结果 PDQuest分析全反式维甲酸(atRA)诱导分化前后HL60细胞蛋白双向电泳图谱,有许多蛋白表达水平有变化,我们对两个在分化细胞中明显表达的两个蛋白点进行了鉴定,质谱测序结合数据库检索表明两个蛋白点为同一种蛋白,即S100钙结合蛋白A9。结论 S100A9蛋白在atRA诱导的HL-60细胞表达。

关键词:双向电泳;维甲酸;HL60;纳升电喷雾质谱
中图法分类号:Q503;Q51 文献标识码:A

Identification of HL60 cell differentiation related proteins induced by atRA using nano-ESI-MS/MS

MU Zhi-rong, WU Yu-zhang, LI Jin-tao, ZHOU Wei, WEI Bin (Institute of Immunology, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the tumor cell differentiation related proteins induced by all-trans retinoic acid (atRA). Methods The protein expression profiles in HL-60 cells with and without atRA treatment were compared using two-dimensional electrophoresis (2-DE). Images were analyzed by PDQust 2-D analysis software. Peptide sequences were obtained by using nano-ESI-MS/MS. Protein spots in 2-DE were identified by comparing the obtained peptide sequence with data of database. Results PDQuest analysis revealed many varied protein spots on the 2-D gel patterns. nano-ESI-MS/MS and database searching confirmed that the 2 protein spots remarkably expressed in the differentiated cells were the same protein, namely S100 calcium-binding protein A9 (S100A9). It has been reported that S100A9 has a N-truncated isoform, which starts with the methionine (Met) at position 5. The molecular mass and pI of the N-truncated and full-length isoforms were consistent with those of the two different spots on our 2-DE map. Conclusion S100A9 is expressed in HL60 cells treated with atRA.

Key words: two-dimensional electrophoresis, all-trans retinoic acid, HL60, nano-ESI-MS/MS

近年来蛋白质组学研究成为目前生命科学研究的前沿和热点领域。从技术上来讲蛋白质组学(proteomics)研究技术包括对细胞内蛋白质高通量的分离和鉴定。分离技术主要是双向凝胶电泳,可同时分离胞内上千种蛋白质。虽然传统的蛋白鉴定技术如免疫印迹、化学测序等方法直接而准确,但由于速度慢、费用高、劳动强度大等因素难以作为高通量的鉴定方法。近年来质谱技术的革新极大地促进了质谱技术在生命科学研究中的应用,为双向电泳分离的胶内蛋白鉴定提供了快速而准确的检测方法。纳升电喷雾质谱(nano-ESI-MS/MS)是目前分析从双向电泳上分离得到的微量蛋白质的有力工具,蛋白质在胶上酶解后得到的酶切肽段样品1 μl,经被拉伸成超微孔点的玻璃或石英针孔喷雾而出,1 μl样品可以喷雾1 h或更长,这样在温和能量碰撞下可重复进行多次串联质谱实验。与在线数据库检索相连,可进行蛋白质快速鉴定。

诱导分化和/或凋亡疗法是一种新的肿瘤治疗方法,用全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, atRA)对急性早幼粒细胞白血病的治疗对该病可达92%~95%完全治愈率[1],故研究ATRA的作用机制是很有必要的。过去对atRA诱导基因表达变化的研究主要是用RT-PCR,差异显示或cDNA微阵列等基因水平的方法[2,3]。然而,转录产物并不能代表存在相应的功能蛋白[4],而且蛋白质的异构体和翻译后修饰也不能通过DNA的方法

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973")(2001CB510001)
Supported by the National Key Basic Research and Development of Plan of China ("973" Projects, 2001CB510001)
作者简介:牟芝蓉(1973-),女,重庆市人,博士,讲师,主要从事肿瘤免疫和蛋白质组学方面的研究。电话:(023)68752236-801, E-mail:mouzr@yahoo.com
收稿日期:2003-02-09;修回日期:2003-04-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

确定。鉴定 ATRA 诱导的这些蛋白有利于研究分化相关分子表达的信号途径, 有利于理解 atRA 作用机制。本研究利用纳升电喷雾质谱对 2D-E 分离的维甲酸诱导分化肿瘤细胞特异表达蛋白测序鉴定, 为进一步研究这些蛋白在肿瘤细胞分化中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

全反式维甲酸购自 Sigma 公司; NBT 为上海 SANGO 公司产品。尿素、SDS、甘氨酸、溴酚蓝、CHAPS、IPG 干胶条(pH 3-10L, pH 4-7L)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、过硫酸铵和 TEMED 均购自 Amersham Pharmacia 公司。碘乙酰胺为 Sigma 公司产品。测序级胰蛋白酶购自 Promega 公司。其余试剂为国产分析纯, 所有溶液均用纯水配制。

1.2　细胞培养和诱导分化

人急性早幼粒白血病细胞 HL60 由本校营养卫生学教研室糜漫天教授惠赠。细胞传代后培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中。分化细胞是用 2×10^{-7} mol/L 全反式维甲酸(atRA)处理 HL60 96 h 后的细胞。

1.3　双向电泳实验

实验方法基本同文献[5]所述。收集的细胞用样品裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 60 mmol/L DTT 和 0.8% IPG 缓冲液)处理后, DC Protein Assay(BIO RAD 公司)测定蛋白浓度。样品溶液用溶涨液(8 mol/L 尿素, 2% CHAPS, 60 mmol/L DTT 和 0.5% IPG 缓冲液)稀释。18 cm 线性 IPG 预制胶条(pH 3~10)在 IPGphor(Amersham Pharmacia)上进行第一向等电聚焦, 第二向 SDS-PAGE 采用 BIO-RAD 公司 XL PROTEIN CELL 电泳仪。电泳结束后用考马斯亮蓝染色。

1.4　图像采集和分析

ImageMaster VDS-CL(Amersham Pharmacia)对双向电泳凝胶扫描, 数字化图像文件运用 PDQuest 软件(BIO-RAD)分析。图像分析包括蛋白点的检测、背景扣除和点的匹配。蛋白匹配以未分化细胞的凝胶图像作为参考胶。

1.5　酶解消化及质谱鉴定

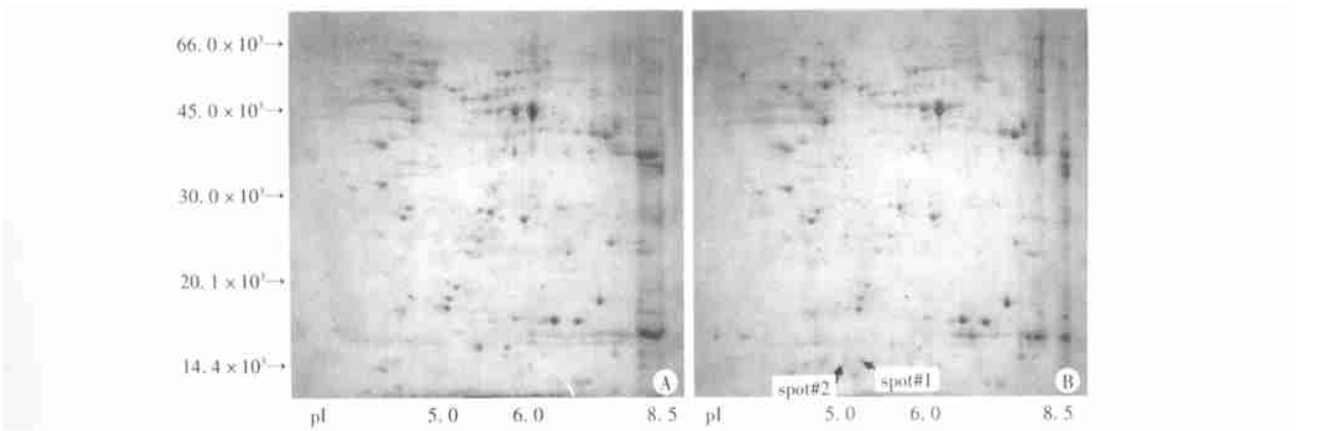
酶解消化: 将电泳染色后凝胶中的蛋白点切下, 用水清洗几次后用含 50% 乙腈, 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液浸泡胶片, 振荡 20 min 后弃去溶液, 重复 1~2 次至胶片中蓝色褪尽; 真空离心干燥使胶片完全脱水, 加入 5~10 μl 胰酶溶液(0.01 μg/μl, 含 25 mmol/L NH_4HCO_3), 待酶液完全吸收后补充 5~10 μl 25 mmol/L NH_4HCO_3, 37 ℃保温 15 h; 加 5% 50~100 μl 于 40 ℃保温 1 h, 吸出上清, 加入 2.5% TFA, 50% 乙腈 50~100 μl 于 30 ℃保温 1 h, 吸出上清, 合并上清液, 冷冻干燥。

质谱鉴定: ESI-Q-TOF-MS/MS 为英国 Micromass 公司的正交加速电喷雾串联质谱仪 Q-TOF2。配备毛细管液相色谱和纳升喷雾源。所有测定均在正离子方式下进行。质谱仪校正用 Glu-fib 串联质谱碎片校正, 质量准确度小于 0.1。雾化气为氮气, 碰撞气体为氩气。源温 80 ℃, 锥孔电压 50 V 左右。TOF 加速电压为 9.1 kV。MCP 检测器电压为 2.2 kV。当进行 nano-ESI-MS/MS 分析时, 毛细管电压为 800~1 000 V, 调节碰撞能量和碰撞气体的大小优化串联质谱图。图谱经 Micromass 的专用软件 MaxEnt3 处理后, 可用 Spectrum List 查询数据库通过 Mascot 查询 NCBI, SWISSPROT, OWL 等数据库, 也可借助 Micromass 的专用软件 MasSeq 直接推导出肽段序列。再用推断的序列或推断的序列结合肽段质量, 即肽序列标签查询数据库。镀金属钯的硼硅酸盐电喷雾针(palladium-coated borosilicate electrospray needle)(Protana, Odense, Denmark)是一次性的专用针。

2　结果

2.1　双向凝胶电泳结果

以未分化和分化的肿瘤细胞全蛋白为材料, 用 180 mm×0.5 mm×3 mm IPG 胶条(pH3-10)做第一向等电聚焦电泳, 双向电泳完成后用 PDQuest 软件分析, 分化细胞检测到 814 个蛋白点, 不匹配蛋白点多达 223 个。在分子量约 10×10^3, pI 4~5 区域有两个蛋白点在分化肿瘤细胞特异表达(图 1), 我们选择这两个蛋白点用于蛋白鉴定。



Two proteins indicated by arrows were expressed in the cells treated with atRA. These two spots were identified using nano-ESI-MS/MS analysis

图 1　**atRA 处理 HL60 细胞蛋白的 2D-E 图谱**　图中箭头所示分化细胞中表达而为分化细胞不表达的两个蛋白点, 这两个蛋白点将用于纳升电喷雾质谱测序鉴定。A: 维甲酸未处理 HL60 细胞; B: 2×10^{-7} mol/L 维甲酸处理 96 h 的 HL60 细胞

Fig 1　2-DE map of HL60 cells treated (A) without and (B) with 2×10^{-7} mol/L atRA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 质谱鉴定

刀片切下两个分化肿瘤细胞特异表达蛋白点，胰酶胶内消化，取 1 μl 酶切肽段样品进行 nano-ESI-MS/MS 分析，图 2A 为 1 号点酶解肽段的质谱图，选取了 5 个片段（m/z 503.32，728.40，904.53，790.45，879.96）做序列分析；图 2B 为 2 号点酶解肽段的质谱图，选取了 4 个片段（m/z 747.50，880.06，728.48，503.38）做序列分析。Micromass 的专用软件 MasSeq 直接推导出肽段序列。其它序列分析结果见表 1。

表 1 nano-ESI-MS/MS 分析及数据库检索结果

Tab 1 Results of nano-ESI-MS/MS analysis and database searching

No.	m/z	Mr(expt)	Mr(calc)	Amino acid sequence
1a	503.32	1 005.63	1 004.57	KDLQNFLK
1b	728.40	1 455.80	1 454.72	LGHPDTLNQGEFK
1c	790.45	1 579.90	1 578.80	ETIINTFHQYSVK
1d	879.96	1 758.92	1 757.81	VIEHIMEDLDTNADK
1e	904.53	1 807.03	1 805.93	NIETIINTFHQYSVK
2a	503.38	1 004.74	1 004.57	KDLQNFLK
2b	728.48	1 454.94	1 454.72	LGHPDTLNQGEFK
2c	747.50	1 491.98	1 491.74	NIETIINTFHQY
2d	880.06	1 758.10	1 757.81	VIEHIMEDLDTNADK

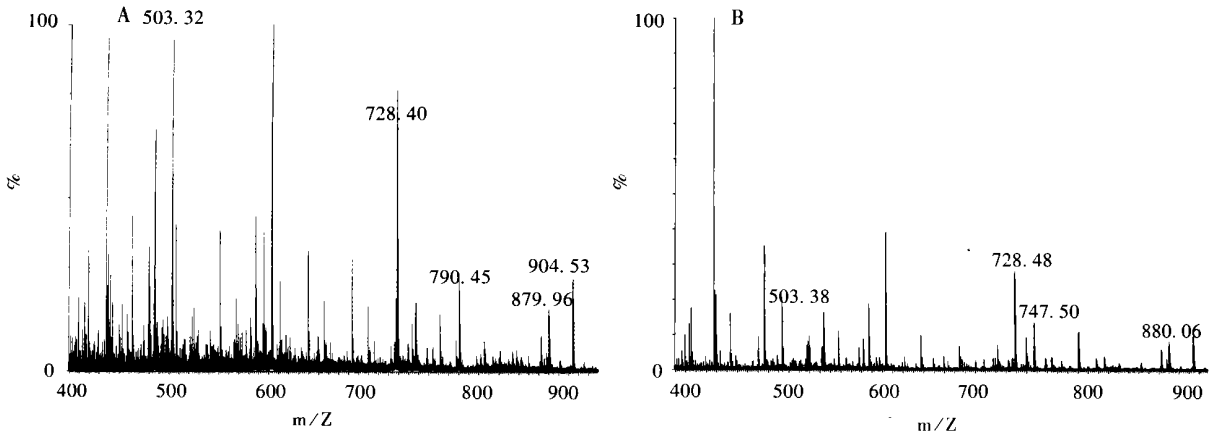


图 2 ATRA 诱导分化的 HL60 细胞中表达的两个蛋白的 nano-ESI-TOF-MS 质谱图（A，spot #1；B，spot #2） A 图的 5 个酶解片段（spot #1，m/z 503.32，728.40，904.53，790.45，879.96）和 B 图的 4 个酶解片段（spot #2，m/z 747.50，880.06，728.48，503.38）用于测序

Fig 2 nano-ESI-TOF-MS mass spectrometric analysis of the two proteins expressed in the HL60 cells treated with atRA (A: Spot 1; B: Spot 2) Five enzyme digested fragments (Spot 1, m/z 503.32, 728.40, 904.53, 790.45, 879.96) in A and four enzyme digested fragments (Spot 2, m/z 747.50, 880.06, 728.48, 503.38) were used for sequencing

2.3 数据库检索

经数据库检索，两个蛋白点为同一种蛋白 S100A9，即 S100 钙结合蛋白 A9（S100A9）。S100 A9 由 114 个氨基酸组成，理论分子量和 pI 分别为 13 234 和 5.71。匹配肽以下划线显示，覆盖率 44%。

1 MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD TLNQGEFKELVRKDLQNFLK
51 KENKNEKVIE HIMEDLDTNA DKQLSFEEFI MLMARLTWAS HEKMHEGDEG
101 PGHHHKPGLG EGTP

3 讨论

双向电泳分析 HL60 细胞蛋白，有两个蛋白点在 ATRA 处理细胞明显表达，而未处理细胞几乎没有表达。用纳升电喷雾质谱仪对胰酶消化的部分氨基酸片段测序鉴定，发现该两个蛋白点为同一蛋白 S100 钙结合蛋白 A9（S100A9）。用 RT-PCR 的方法证实 S100A9 在经 ATRA 处理 24 h 后的 HL60 表达，而未处理细胞中没有检测到。RT-PCR 产物 DNA 测序表明与数据库里的序列一致。

S100A9 属于 S100 蛋白家族，包含 114 个氨基酸，理论分子量和等电点分别为 13 234 和 5.71。为什么双向电泳图谱上明显不同的两个蛋白点为同一蛋白？是蛋白修饰还是异构体？以前的研究表明，由于翻译起始位点的不同（第 5 位的 Met）S1001A9 有一 N 端截断型异构体，翻译后修饰去掉第 5 位的 Met 并对第 6 位的 Ser 乙酰化，估计分子量为 12 690。全长型 S100A9 也缺少第一个 Met，第 2 位 Thr 乙酰化，估计分子量为 13 145[6]。这两个分子的 N 端乙酰化可能解释用 Edman 降解法分析 N 端氨基酸序列时没有出现色谱峰的原因。两种异构体的理论 pI（DNAStar 软件分析）与鉴定的两个蛋白点在 2D-E 上的等电点一致，因此认为全长型和 N 端截断型的 S100A9 蛋白在 ATRA 处理的 HL60 细胞中表达。

S100A9 与髓源细胞的分化有关，也表达在部分上皮细胞。虽然 S100A9 可能有多种功能，比如抑制酪蛋白激酶 I 和 II，与细胞骨架组分相互作用，发挥抗菌作用等等，但是该蛋白的准确功能仍不清楚[6]。而且通常认为 S100A9 特异性在髓源细胞和在急慢性炎症期的上皮细胞，比如风湿性关节炎或肉瘤。近期文献报道 S100A9 更宽的表达范围，包括结肠癌[7]，肺细胞腺

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

癌[8]，肾移植急性排斥前的血清[9]。更有意思的是S100A9，S100A8 和 S100A12 能诱导 HIV-1 长末端重复启动子活化[10]。这些研究表明S100A9 可能还有更多的功能。

参考文献：

[1] Wang Z Y, Chen Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia[J]. Lancet Oncol, 2000, 1: 101—106.

[2] Lee K H, Chang M Y, Ahn J I, *et al*. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(5): 1125—1133.

[3] Treeck O, Odani T, Itoh N, *et al*. Detection of increased icb-1 transcript levels in maturing HL-60 cells: a novel marker for granulocytic and monocytic *in vitro* differentiation[J]. Leuk Res, 2002, 26(8): 765—769.

[4] Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3-4): 553—537.

[5] 牟芝蓉，吴玉章，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异[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1153—1155.

[6] Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9)[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1448(2): 200—211.

[7] Stulik J, Koupilova K, Osterreicher J, *et al*. Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma[J]. Electrophoresis, 1999, 20(18): 3638—3646.

[8] Arai K, Teratani T, Nozawa R, *et al*. Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation[J]. Oncol Rep, 2001, 8(3): 591—596.

[9] Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, *et al*. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(9): 1947—1957.

[10] Ryckman C, Robichaud G A, Roy J, *et al*. HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory myeloid-related proteins in human $CD4^+$ T lymphocytes[J]. J Immunol, 2002, 169(6): 3307—3313.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)08-0677-01

个案与短篇

^{90}Sr-^{90}Y 敷贴治疗皮肤血管瘤的疗效分析

Therapeutic efficacy of ^{90}Sr-^{90}Y application for capillary hemangioma

史文杰，王新冕，陈向志 （解放军第 254 医院同位素室，天津 300142）

我院自 1997 年 9 月至 2003 年 9 月用放射性同位素^{90}Sr-^{90}Y 敷贴治疗皮肤血管瘤 76 例，获得较好疗效，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

76 例患者均来源于本院皮肤科门诊，男 29 例，女 47 例，年龄 0.2～69 岁；其中面颈部 41 例，四肢 24 例，躯干 7 例，其它 4 例；病灶范围最小 0.2 cm×0.3 cm，最大 5.7 cm×7 cm；血管瘤病理分类及年龄分组见表 1。

表 1 病变类型及年龄分组

病变类型	＜1 岁	1～6 岁	7～18 岁	＞18 岁
鲜红斑痣	1	3	2	1
草莓状血管瘤	13	34	10	3
海绵状血管瘤	1	4	2	2
合计	15	41	14	6

1.2 治疗方法

^{90}Sr-^{90}Y 敷贴器由中国原子能科学研究院生产，放射性面积 4.9 cm^2，表面剂量率 1.64 Gy/min。用 3 mm 厚橡皮垫屏蔽正常皮肤，治疗窗口直径较病灶大 3～5 mm；按照射野进行放射治疗，每野 1.5～2 Gy/次，每周 5 次，两周为一疗程；视治疗效果 4～6 周后行第 2 疗程。根据患者不同年龄、病变部位及面积给予不同剂量，乳儿略减。

1.3 疗效判断标准

痊愈：血管瘤完全消失，皮肤颜色恢复正常或局部遗留少许痕迹。有效：血管瘤停止生长，颜色不同程度变淡。无效：颜色无改变或仍在发展[11]。

1.4 统计学方法

应用 NOSA 软件处理，行 χ^2 检验。

2 结果

患者治疗后痊愈 53 例，占 69.7%；有效 18 例，占 23.7%；无效 5 例，占 6.6%。

不同年龄组患者痊愈率差异有显著性（表 2），年龄愈小疗效愈明显，婴幼儿一般仅需一个疗程就可痊愈，且发生色素沉着等现象消失早，不留痕迹；成人疗效较差，一般需 1～3 疗程。

（下转 681 页）

作者简介：史文杰（1978－），男，河北省滦南县人，医师，主要从事同位素诊断与治疗方面的研究。电话：(022)84683109

收稿日期：2003-11-26；修回日期：2004-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net