

2D-PAGE 电泳和质谱分析筛选鼻咽癌中 NESG1 调控蛋白

2D-PAGE Electrophoresis and Mass Spectrography Screening for NESG1-Regulated Protein in NPC

FANG Wei-yi, JIANG Qing-ping, LIU Zhen

方唯意¹, 江庆萍², 刘真^{1,3}

(1.南方医科大学肿瘤研究所, 广东 广州 510515;

2.广州医学院第三附属医院, 广东 广州 510150;

3.广州医学院病理教研室, 广东 广州 510182)

摘要: [目的] 利用蛋白质组学筛选抑癌候选基因 NESG1 在鼻咽癌中可能调控蛋白。[方法] 提取 NESG1 稳定高表达的鼻咽癌 3D8 和对照鼻咽癌 C6 细胞蛋白, 并采用双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 技术进行有效分离, 图像扫描后获得高分辨率的 2D-PAGE 图谱。选用差异蛋白质组学技术筛选差异蛋白位点, 然后用肽质量指纹谱 (PMF) 和数据库检索技术给予鉴定。荧光定量 PCR 和 Western Blot 验证差异基因表达水平。[结果] 质谱分析显示, PKM2、ERO1L 和 BCAS2 在 NESG1 过表达的 3D8 细胞中表达下调, 其下调倍数分别为 -5.25、-3.65 和 -4.52 倍。荧光定量 PCR 在 mRNA 水平验证了 PKM2、ERO1L 和 BCAS2 (-3.65、-3.42 和 -4.55 倍) 以及 Western Blot 在蛋白水平验证了 PKM2 和 ERO1L 蛋白在 3D8 细胞中表达下调。[结论] PKM2、ERO1L 和 BCAS2 可能是 NESG1 调控的靶基因, 参与了 NESG1 介导的鼻咽癌生长抑制。

关键词: 鼻咽癌; NESG1; 蛋白质组学; 双向凝胶电泳

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-0242(2012)07-0525-04

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是恶性程度较高的肿瘤, 病理类型绝大多数是鼻咽低分化鳞状细胞癌。NPC 具有独特的流行病学特征, 高发于中国南方和东南亚等地区和国家。流行病学调查显示, 鼻咽癌的发生涉及到遗传倾向性和环境致癌因素, 很可能是遗传易感性个体, 接受了致癌物的作用而发生的。EB 病毒、化学致癌物和胚性击中构成了 NPC 的主要病因, 导致癌基因过表达及抑癌基因表达下调或表达缺失^[1], 鼻咽黏膜上皮经过癌前病变, 最终发生鼻咽癌。

我们前期研究表明, NESG1 在鼻咽癌发病过程中表达下调, 并作为一个不利的因素促进了鼻咽癌的发生发展以及淋巴结转移^[2-4]。初步的机制分析显示, 其主要通过调节 p21、CCNA1 和 MAPK 通路相关基因表达来参与调控鼻咽癌生长。由于 NESG1 研

究处于初始阶段, 其导致鼻咽癌发病机理远未阐明。本研究我们采用蛋白质组学技术分析 NESG1 所调控的蛋白, 以期进一步理解 NESG1 作为抑癌基因参与鼻咽癌发病过程奠定新的基础。

1 材料与方法

1.1 NESG1 过表达 3D8 细胞和对照鼻咽癌细胞 C6 2D 电泳分离^[5]

1.1.1 细胞培养

慢病毒介导的 NESG1 过表达 3D8 细胞和对照空载鼻咽癌细胞 C6^[2-4] 已经被建立, 用含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。

1.1.2 蛋白质样品制备

细胞培养至对数生长期, 弃去培养基, 预冷 PBS 冲洗 3 次, 用细胞刮刀轻轻刮净细胞, 离心收集。细

收稿日期: 2012-04-09; 修回日期: 2012-05-15

基金项目: 国家自然科学基金 (81071632); 广州市珠江科技新星计划 (2011J2200009); 广东省育苗工程计划 (LYM11102)

通讯作者: 刘真, E-mail: narcissus_jane@163.com

胞沉淀中加入适量的裂解液(含 7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 20mmol/L Tris, 65mmol/L DTT, 0.2%Bio-Lyte3/10 两性电解质和 1mmol/L 苯甲磺酰氟), 超声处理后, 4℃ 15 000g 离心 60min, 改良 Bradford 法测量蛋白质浓度, 上清储存于-80℃冰箱备用。

1.1.3 双向电泳

按照 Protean IEF Cell 操作说明进行。细胞总蛋白(500 μg)与泡胀液混合至总体积 350μl, 室温被动泡胀 16h 左右, 等电聚焦设置为: 30V 12h, 500V 1h, 1 000V 1h, 8 000 V 10h, 完毕后分别在含 1%DTT 的平衡液 I 和含 2.5%碘乙酰胺的平衡液 II 中各平衡 15min, 第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)采用浓度为 13%的均一胶, 起始电流 12mA, 30min 后 48mA 至溴酚蓝到底, 电泳后用考马斯亮蓝 G-250 进行染色。

1.1.4 凝胶成像及图像分析

利用 UMAXPowerLook 1100 透射扫描仪获取图像, 用 PDQuest7.1 软件包进行图像分析, 选取表达量差异 1.5 倍以上的点作为后续质谱分析的候选蛋白质点。

1.2 差异蛋白质点的质谱鉴定^[5]

1.2.1 胶内酶切及质谱鉴定

将考马斯亮蓝染色后凝胶中的差异蛋白质点切成 1mm²~2mm² 大小的胶块, 用含 500ml/L 乙腈的 25mmol/L 碳酸氢铵溶液浸泡胶片, 振荡 20min, 弃去溶液, 用真空离心干燥机 SpeedVac (Sevant) 干燥 50min, 使胶片完全脱水, 加入 3~10μl 20mg/L 胰酶, 待酶液完全吸收后补充适量 25mmol/L 碳酸氢铵缓冲液, 37℃孵育 16h。酶解肽段先以 5%三氟乙酸萃取 1h, 再以 2.5%三氟乙酸-50%乙腈萃取 1h, 两者混合于 EP 管中真空冻干。取 1μl 萃取液与 1μl 基质 (α-萘基-4-羟基肉桂酸溶于 1ml/L 三氟乙酸, 500ml/L 乙腈的饱和溶液)混合, 点板进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-TOF (ABI4700)分析。

1.2.2 数据库检索

使用国际互联网上的蛋白质数据库 IPI_human_v3.49 database 提供的检索程序进行检索, 匹配肽段超过 4 个、MASCOT 得分大于 63 分的蛋白质认为有统计学意义。

1.2.3 RNA 提取和荧光定量 PCR

采用 Trizol 试剂提供的标准步骤提取两种细胞的总 RNA。总 RNA 随即被逆转录成 cDNA, 反应条件: 总 RNA 1μg 与 2μl dNTP mix(10mM)和 2μl oligo (dT)18(0.5μg/μl)及无 RNA 酶的去离子水共 13.5μl 混匀, 离心。70℃变性 5min, 室温静置 2min。然后依次添加 5×Buffer 4μl, 0.1M DTT 1μl, RNase inhibitor (40U/μl)0.5μl, 逆转录酶 (200U/μl)1μl, 混匀, 离心, 放入 42℃水浴中反应 1h, 95℃灭活 5min。-20℃冷冻备用。看家基因 ARF5 作对照。引物由上海博亚公司合成 (见表 1)。实时荧光定量 PCR 反应体系为 SYBR Premix Ex (2×)10μl、上下游引物 (10μmol)各 0.4μl、ROX Reference Dye II (50×)0.4μl、cDNA 模板 1μl 和灭菌去离子水 7.8μl 共 20μl。反应条件: 94℃变性 2min; 94℃变性 10s; 57℃退火 10s, 72℃延伸 15s, 45 个循环; 最后, 产物在 72℃延伸 5min, 溶解曲线分析。实验重复 3 次。

1.2.4 蛋白质印迹

收集对数生长期细胞 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白质, 取等量蛋白进行分析, 以 β-actin 作内参照 (购自 Santa Cruz, Inc), PKM2 抗体购自 Epitomics, Inc; ERO1L 购自 Cell Signaling Technology, Inc。先在 5%聚丙烯酰胺浓缩胶中 60V 电泳至分离胶, 后在 8%聚丙烯酰胺分离胶中 100V 继续电泳直至溴酚蓝到底, 湿转法转移至 PVDF 膜, 电流 100mA 2h, 后用 5%TBSA 脱脂奶粉封闭 2h, 加入 PKM2 (1:500), ERO1L(1:1000)抗体反应过夜, ECL 化学发光检测, 显色试剂盒购自 Pierce 公司。

2 结 果

2.1 C6 和 3D8 细胞株的 2-DE 差异分析

先采用 pH3-10NL 的 IPG 胶条对两细胞株总蛋白进行双向电泳分离, 经过考马斯亮蓝染色和 PDQuest7.1 软件包分析后, 发现一些蛋白质点的表达水平明显改变。选取 3 个差异表达蛋白质点进行质谱分析见图 1(局部放大位点)。

2.2 差异蛋白质点的 MALDI-TOF 质谱及肽指纹图谱鉴定

用刀片切取 3 个差异蛋白质点进行胶内酶解和 MALDI-TOF 质谱分析, 结合数据库检索成功鉴定了

表 1 差异表达基因引物序列

基因	上游引物	下游引物	扩增长度
PKM2	5'CAGCCATGTCGAAGCCCAT3'	5'ATCGGGAAGCTGGGCAATG3'	174bp
ERO1L	5'ACCATTCTTCGAGCGCCAG3'	5'GCAGTCCCAAACCTGAGT3'	276bp
BCAS2	5'GGCTGGAGAGTTGTGGTGG3'	5'TGCTTGTGAGCAGCCAGTC3'	214bp

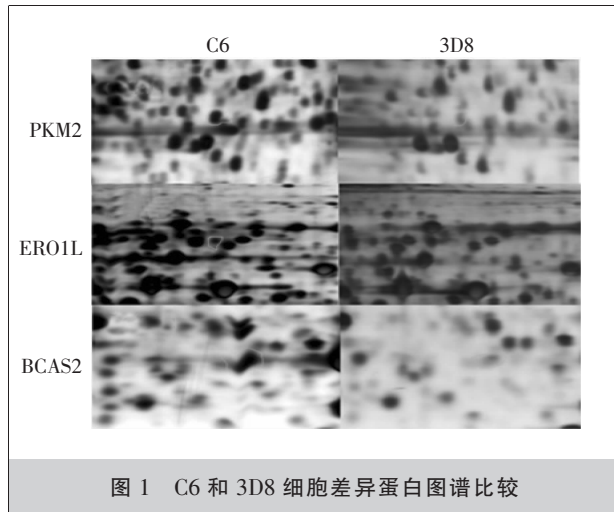


图 1 C6 和 3D8 细胞差异蛋白图谱比较

表 2 蛋白质组筛选差异蛋白

差异蛋白	蛋白名称	3D8 蛋白中 下调倍数
PKM2	Pyruvate kinase, muscle	-5.25
ERO1L	Homo sapiens, ERO1-like	-3.65
BCAS2	Breast carcinoma amplified, sequence 2	-4.52

这些差异蛋白质点为 3 种蛋白质(表 2)。这 3 个差异候选差异蛋白中, 都是在 NESG1 过表达的 3D8 细胞中表达下调, 包括了 PKM2、ERO1L 和 BCAS2 蛋白, 其差异下调倍数分别为-5.25、-3.65 和-4.52 倍, 表明 PKM2、ERO1L 和 BCAS2 是 NESG1 潜在调控蛋白。

2.3 RT-PCR 验证 mRNA 水平表达

对质谱所鉴定的 PKM2、ERO1L 和 BCAS2 差异候选蛋白在 3D8 和 C6 细胞中进行了荧光定量 RT-PCR 验证 mRNA 水平表达, ARF5 基因作为内参照。结果显示, 相比于对照 C6 细胞, PKM2、ERO1L 和 BCAS2 在 NESG1 过表达的 3D8 鼻咽癌细胞中均表达下调, 其下调倍数分别为-3.65、-3.42 和-4.55 倍, 这与蛋白质组的分析结果基本一致(图 2)。

2.4 蛋白质印迹验证蛋白质水平表达

利用 Western Blot 验证 3D8 和 C6 细胞间 PKM2 和 ERO1L 表达水平的变化, β -actin 作为内对

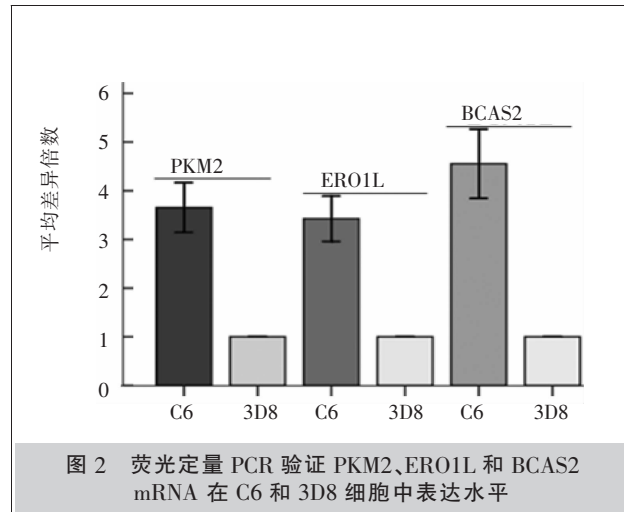


图 2 荧光定量 PCR 验证 PKM2、ERO1L 和 BCAS2 mRNA 在 C6 和 3D8 细胞中表达水平

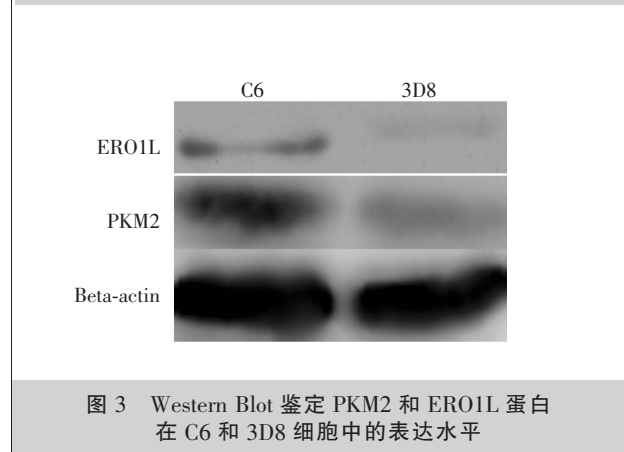


图 3 Western Blot 鉴定 PKM2 和 ERO1L 蛋白在 C6 和 3D8 细胞中的表达水平

照。结果显示, 与对照细胞 C6 相比, 在 NESG1 过表达的 3D8 鼻咽癌细胞中, PKM2 和 ERO1L 表达下调(图 3), 下调倍数分别为-2.56 和-6.45 倍, 这也与双向电泳分析结果基本一致。

3 讨论

鼻咽癌发病是一个多阶段、多途径、多机制的过程, 涉及大量相关基因的参与。NESG1 基因是 1999 年姚开泰教授领导的本课题组发现和克隆的一个新基因^[6]。2005 年, 我们重新克隆该序列发现该基因序列存在 2 个错误位点, 影响了蛋白质编码序列。随

后,我们校正了该基因,并初步发现该基因在鼻咽癌中表达下调。进一步的研究主要针对该基因在鼻咽癌中的表达情况、功能、初步的分子机制以及该基因在鼻咽癌中表达下调是否存在启动子甲基化情况进行了研究。我们的结果显示,NESG1在鼻咽癌中表达明显下调,过表达的NESG1和抑制NESG1表达后能分别抑制和恢复鼻咽癌细胞增殖、游走和侵袭能力,并参与细胞周期的调控。分子机制分析显示,NESG1能通过参与调控细胞周期因子p21和CCNA1的表达,从而影响细胞周期的进展。此外,我们还发现,NESG1基因还可以调节MAPK通路相关基因表达影响鼻咽癌细胞生物学功能的改变^[2,3]。

在本次研究中,为了进一步明确NESG1在鼻咽癌中的调控作用机制,我们利用蛋白组学技术分析了NESG1在鼻咽癌细胞中所调控的蛋白因子。在经2D-PAGE电泳分离和质谱鉴定后,我们在NESG1过表达的3D8鼻咽癌细胞中发现了3个下调的基因,分别是PKM2、ERO1L和BCAS2。实时荧光定量PCR和Western Blot进一步确证了PKM2、ERO1L和BCAS2 mRNA表达水平(-3.65、-3.42和-4.55倍)以及PKM2和ERO1L蛋白在3D8细胞中表达下调,结果基本上与蛋白质组水平检测结果一致,表明这3个基因是NESG1在鼻咽癌中的调控基因。

PKM2在肿瘤细胞中表达可以促进有氧(糖)酵解,导致肿瘤细胞有选择生长优势,因此PKM2可能是肿瘤治疗中一个较好的靶标。SiRNA沉默PKM2基因表达导致肿瘤细胞生存率降低,凋亡发生水平增高,但对成纤维细胞和内皮细胞影响很小或者没有影响^[7]。在胶质瘤中,miRNA-326能诱导细胞发生凋亡以及降低细胞代谢活性,其主要机制是通过直接靶击抑制PKM2基因表达而发挥作用^[8]。此外,新的研究发现,PKM2参与了 β -catenin调节,其在EGFR激活的情况下能促进 β -catenin核转位激活,从而促进细胞增殖和肿瘤的发生^[9]。在人类肿瘤发生过程中,ERO1L的表达水平通常特异的在缺氧环境中表达上调,同时伴随着具有促进血管生成和细胞生长能力的VEGF基因表达水平升高。利用siRNA抑制ERO1L表达后,VEGF的表达水平也随之下调。ERO1L在缺氧环境下能促进VEGF表达的这种能力体现了其在肿瘤发生发展的重要作用^[9]。BCAS2基因称为乳腺癌扩增序列2,其定位在

1p13.3~21,在原发性乳腺癌,该区域常发生扩增^[10]。过表达的BCAS2基因促进雌激素受体介导的转录,增加乳腺癌发病的机会^[11]。此外,BCAS2基因能负性调控肿瘤抑制基因p53的表达,从而促进肿瘤生长^[12]。综上所述,以上3个基因在肿瘤发生发展过程中都发挥促进的作用,具有潜在癌基因的功能。我们前期的研究表明NESG1在鼻咽癌中具有抑癌基因的作用,而在本次研究中,我们通过蛋白组学技术发现过表达的NESG1基因在鼻咽癌中下调潜在癌基因PKM2、ERO1L和BCAS2表达,进一步表明了NESG1作为抑癌候选基因参与了鼻咽癌发病过程。

参考文献:

- [1] 江庆萍,刘少颜,何秀芳,等.鼻咽癌中MAP3K5和Epstein-Barr病毒编码的miR-BART22表达的关系及意义[J].南方医科大学学报,2011,31(7):1146-1149.
- [2] Liu Z, Li X, He X, et al. Decreased expression of upregulated NESG1 in nasopharyngeal carcinoma: its potential role and preliminarily functional mechanism [J]. Int J Cancer, 2011, 128(11):2562-2571.
- [3] Liu Z, Luo WR, Zhou Y, et al. Potential tumor suppressor NESG1 as an unfavorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma[J]. Plos One, 2011, 6(11): e27887.
- [4] 刘真,甄艳,于晓黎,等.人NESG1基因慢病毒载体的构建及其在293FT细胞中的表达[J].南方医科大学学报,2011,31(1):65-68.
- [5] 赵亮,刘莉,王爽,等.采用蛋白质组学技术筛选大肠癌转移相关蛋白[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(5):485-491.
- [6] Li Z, Yao K, Cao Y. Molecular cloning of a novel tissue-specific gene from human nasopharyngeal epithelium[J]. Gene, 1999, 237(1):235-240.
- [7] Goldberg MS, Sharp PA. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression[J]. J Exp Med, 2012, 209(2):217-224.
- [8] Kefas B, Comeau L, Erdle N, et al. Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells [J]. Neuro Oncol, 2010, 2(11):1102-1112.
- [9] Yang W, Xia Y, Ji H, et al. Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation [J]. Nature, 2011, 480(7375):118-122.
- [10] May D, Itin A, Gal O, et al. ERO1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(6):1011-1020.
- [11] Maass N, Rösel F, Schem C, et al. Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer[J]. Cancer Lett, 2002, 185(2):219-223.
- [12] Qi C, Zhu YT, Chang J, et al. Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(2):393-398.
- [13] Kuo PC, Tsao YP, Chang HW, et al. Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor[J]. Cancer Res, 2009, 69(23):8877-8885.