

鼻咽癌细胞中 p53 相互作用蛋白质的分离和鉴定*

胡 巍^{1,2)} 肖志强¹⁾ 陈主初^{1,2)}** 李建玲¹⁾ 张鹏飞¹⁾
冯雪萍¹⁾ 易 红¹⁾ 余艳辉²⁾ 唐新科³⁾ 刘清萍³⁾ 梁宋平³⁾

(¹⁾中南大学湘雅医院医学实验研究中心, 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;

²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; ³⁾湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要 鼻咽癌中 p53 基因突变罕见, 但绝大部分鼻咽癌中存在 p53 蛋白过表达/聚集且功能失活。然而, 到目前为止 p53 蛋白失活的机制仍然不清楚。为揭示鼻咽癌中 p53 蛋白功能失活的机制, 采用免疫共沉淀技术分别富集鼻咽癌细胞系 HNE1 和 HNE2 的 p53 结合蛋白, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对免疫沉淀复合物进行分离, 从胶中切取 p53 结合蛋白条带, 胶内酶解后进行电喷雾串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 分析, 得到相应的肽序列标签 (peptide sequence tags, PST), 通过搜索数据库在鼻咽癌细胞系中鉴定了 9 个 p53 结合蛋白。分别是热休克蛋白 70 (HSP70) 家族成员 GRP-78 和 GRP-75、HSP90 家族成员 GRP-94、核纤层蛋白 A/C (Lamin A/C)、 α -actinin 4、Ezrin/Cytovillin、DNA 复制准许因子/MCM3 蛋白 (DNA replication licensing factor/minichromosome maintenance 3 protein, MCM3)、CD98/4F2 heavy chain 和蛋白激酶 C (PKC)。并用免疫共沉淀和蛋白质印迹分析技术对 HNE₁ 细胞蛋白条带 3 鉴定的 p53 相互作用蛋白之一 HSP78 进行了验证。首次在鼻咽癌细胞中鉴定了 9 个 p53 结合蛋白, 为阐明鼻咽癌中 p53 蛋白聚集及失活的机制提供了重要依据和线索。

关键词 p53, 鼻咽癌, 免疫共沉淀, 液相色谱-电喷雾串联质谱, 相互作用蛋白, 蛋白质印迹

学科分类号 R739.62

p53 基因是一种具有阻滞细胞周期、启动细胞凋亡、维持基因组稳定性作用的、重要的抑癌基因。p53 基因突变与大多数人类肿瘤发生、发展有关, 至少 50% 以上的人类肿瘤存在 p53 基因高频率突变失活。但有趣的是, 鼻咽癌 (NPC) 中 p53 基因的突变情况不同于其他肿瘤, 在 NPC 中 p53 基因突变属少发事件, 突变频率低于 10%^[1, 2]。大量的研究显示^[3~8]: 60% 以上的鼻咽癌组织和几乎 100% 的鼻咽癌细胞株有 p53 蛋白过表达 (over-expression) 或称为聚集 (accumulation), 而且 p53 过表达/聚集与鼻咽癌组织增殖程度、血管密度、颅底浸润、颈部淋巴结转移、患者预后和 EB 病毒感染相关, 即 p53 过表达/聚集的鼻咽癌患者, 癌细胞增殖活跃、癌组织血管密度增加, 癌细胞易发生颅底浸润和颈部淋巴结转移, 病人预后较差, 癌组织往往存在 EB 病毒感染。这说明, 在鼻咽癌细胞中过表达/聚集的 p53 蛋白功能异常或失活, 不能发挥阻滞细胞周期和诱导凋亡的生物学作用。另外, 以腺病毒为载体将野生型 p53 基因导入鼻咽癌细胞株进行基因治疗研究亦发现, 外源 p53 基因过表达能抑制癌细胞生长、诱导癌细胞凋亡, 这亦说明, 鼻咽癌细胞中 p53 蛋白功能异常^[9]。

p53 蛋白功能失活的主要原因有 4 个^[10], 最常见的原因是 p53 基因点突变或缺失。其他 3 个

p53 蛋白功能失活的原因不涉及 p53 基因突变, 属于非遗传原因 (extragenic)。其一是细胞蛋白与野生型 p53 蛋白结合, 如 MDM2 瘤蛋白与 p53 结合后、加速 p53 蛋白泛素化和降解^[11]; 其二是野生型 p53 蛋白核外排 (nuclear exclusion), 即 p53 蛋白被分隔 (sequestration) 于细胞浆, 不能进入细胞核而发挥作用, 如热休克蛋白 70 (HSP-70) 和 HSP-90 家族成员可通过此种方式使 p53 蛋白功能失活^[12]; 其三是病毒蛋白与野生型 p53 蛋白结合, 如 SV40 大 T 抗原、HPV E6 蛋白、腺病毒 E1B 和 E4/F4 蛋白, 以及乙肝病毒 x 抗原 (HBx) 等与 p53 蛋白结合使之失活^[13]。

由于鼻咽癌中 p53 突变失活的可能性小, 因此极有可能是细胞蛋白或病毒蛋白与其结合后使其功能异常或失活。但至今尚未识别鉴定出鼻咽癌中 p53 的结合蛋白。为此, 本文以 p53 蛋白为诱饵, 先采用抗 p53 抗体免疫共沉淀, 从鼻咽癌细胞中

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB5102), 国家自然科学基金资助项目 (30000028, 30240056, 30370642), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金资助项目 (教技函 [2002] 48), 湖南省科技重点科研项目 (02SSY2001-1) 和湖南省卫生厅重点科研项目 (202-04)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4327325, Fax: 0731-4327332 E-mail: tcb1@xysm.net

收稿日期: 2004-01-16, 接受日期: 2004-02-28

的 p53 结合蛋白, 再采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术对含 p53 结合蛋白的复合物进行分离, 然后采用液相色谱-电喷雾串联质谱 (liquid chromatography-tandem electrospray mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS) 结合数据库查询鉴定 p53 结合蛋白, 试图阐明鼻咽癌中 p53 蛋白聚集及功能异常的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞: 鼻咽癌细胞系 HNE1 和 HNE2 由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所建立。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液进行传代培养。

1.1.2 试剂: 小牛血清、RPMI1640 培养基和蛋白质分子量标准为 Gibco BRL 产品; 兔抗人 p53 多克隆抗体、羊抗人 HSP78 多克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的兔抗羊 IgG 均为美国 Santa Cruz 公司产品; ECL 试剂盒、Protein G Sepharose 4B beads、Triton X-100、NP-40、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、Tris、SDS、银染和考马斯亮蓝 R-250 试剂盒均为 Pharmacia 公司产品; 碳酸氢胺 (NH_4HCO_3)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶 (TPCK-trypsin)、三氟乙酸 (TFA) 均为 Sigma 公司产品; 乙腈 (ACN) 为国产色谱纯。

1.1.3 仪器设备: SDS-PAGE 电泳仪 (Bio-Rad 公司), Q-TOFmicro™ (英国 Micromass 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 HNE1 和 HNE2 细胞, 加入抽提缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 1% Triton X-100, 10% 蛋白酶抑制剂混合物, 1% 磷酸化酶抑制剂 I, 1% 磷酸化酶抑制剂 II), 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, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 立即用于免疫共沉淀。

1.2.2 免疫共沉淀 p53 相关蛋白: 在含 2 mg 细胞总蛋白的 1 ml 抽提缓冲液中, 加入 1 μl 正常兔血清和 30 μl protein G-Sepharose 4B 珠子, 4℃、振荡 2 h, 9 000 r/min 离心 5 min 去除珠子以消除非特异结合蛋白, 保留上清。在上清液中加入 5 μl 兔抗人 p53 抗体和 30 μl protein G-Sepharose 4B 珠子, 4℃, 振荡过夜, 9 000 r/min 离心 5 min 去上清, 保留珠子。TBST 缓冲液洗涤含免疫复合物的珠子 4

次, 每次 5 min, 离心收集珠子。以 BSA 取代 p53 抗体作为对照。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳与凝胶染色: 加 30 μl 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液 (4% SDS, 125 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 4% β -巯基乙醇和 10% 甘油) 于含 protein G-Sepharose 4B 珠子的试管中, 煮沸 3 min。短暂离心后取上清进行 12.5% SDS-PAGE。电泳结束后, 考马斯亮蓝 R-250 和硝酸银试剂盒进行凝胶染色。实验重复 5 次。

1.2.4 质谱分析样品的制备: 从胶中切取分辨较好的 5 条蛋白质带, 置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 对经两种染色的蛋白质带分别进行脱色、还原、烷基化、酶解、萃取和脱盐等处理, 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: 制备好的样品在电喷雾串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 仪上进行分析。所有测定均在正离子方式下进行。质谱仪的校正用的是 PPG2000 串联质谱碎片校正的, 质量准确度小于 0.1 u。雾化气体为氮气, 碰撞气体为氩气。源温 80℃, 锥孔电压 50 V 左右。TOF 加速电压为 0.2 kV。MCP 检测器电压为 2.7 kV。当进行 LC-ESI-MS/MS 全自动分析时, 毛细管电压为 3 000 V。自动进样系统装备一个 C18 脱盐预柱 (长 5 mm, 内径 180 μm)。在进样后的前 3 min 通过预柱脱盐, 以后的时间通过梯度洗脱经 C18 毛细管柱 (75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$) 进行肽段分离, 分离后直接进入质谱仪, 仪器一级扫描范围为 400 ~ 1 600 u。一级和二级之间通过母离子强度和母离子电荷自动转换。进行 CID 的母离子单扫描强度域值设为 5 counts, 电荷条件设定为: 2、3、4, 同时满足以上两个条件的一级离子自动进行二级分析。一次分析离子的最大个数设定为 4, 间隔时间 0.1 s。二级分析 7.7 s 后转换为一级继续扫描。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 Mascot 查询 SWISSPROT, OWL 或 NCBI 即可对蛋白质进行鉴定。也可借助 Micromass 公司配备的专用软件 MASseq 直接推导出肽段序列, 再用推断的序列与肽段质量相结合, 查询数据库对蛋白质进行鉴定。

1.2.6 免疫共沉淀和蛋白质印迹分析验证 p53 结合蛋白: p53 抗体分别与 2 mg HNE1、HNE2 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素膜上。印迹膜在 5% 脱脂牛奶中 4℃ 封闭过夜;

在 1:1 000 稀释的羊抗人 HSP78 一抗中室温温育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 在 1:1 500 稀释的兔抗羊二抗中室温温育 2 h, PBS 洗涤 3 次, ECL 试剂发光、显影和定影. 未进行免疫共沉淀的 100 μ g HNE1 总蛋白凝胶同时电泳、转膜后进行蛋白质印迹分析作为对照.

2 结 果

2.1 免疫共沉淀和 SDS-PAGE 分析

抗 p53 抗体分别与鼻咽癌细胞系 HNE1 和 HNE2 的总蛋白质进行免疫共沉淀, 收集的免疫共

沉淀蛋白质复合物进行 SDS-PAGE 分离, 凝胶考马斯亮蓝染色和银染后结果如图 1 所示, 在 HNE1 和 HNE2 细胞中分别检测到 5 条分子质量相同的 p53 结合蛋白条带. 它们的分子质量分别为 100 ku、75 ku、72 ku、60 ku 和 25 ku 左右. 实验共重复 5 次, 所获结果一致.

2.2 p53 相关蛋白质谱分析

分别从电泳凝胶中切取分辨率较好的 5 条蛋白质带 (图 1). 经过脱色、还原、烷基化、酶解、萃取等处理, 样本冻干后入 HPLC 的 C18 毛细管柱进行梯度洗脱, 根据蛋白质疏水强弱对蛋白质进行分离, 分离后进入质谱分析, 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分析 (色谱峰见图 2), 获得部分多肽碎片离子的肽序列标签 (图 3).

2.3 数据库查询

仪器自动以 peaklist 文件形式给出 LC-ESI-MS/MS 测定结果, 通过 Mascot 软件查询 SWISSPROT, OWL 或 NCBI 数据库成功鉴定了 9 个蛋白质 (表 1). 其中 HNE1 和 HNE2 细胞的蛋白质条带 1 鉴定了 3 个蛋白质, 分别是 GRP-94, α -actinin 4 和 DNA 复制准许因子/MCM3 蛋白; 条带 3 鉴定了 3 个蛋白质, 在 HNE1 细胞为 GRP-78 和 Lamin A/C, 在 HNE2 细胞为 GRP-75 和 Lamin A/C; HNE1 和 HNE2 细胞的条带 4 鉴定了 3 个蛋白质, 分别是 CD98/4F2 heavy chain、PKC 和 Ezrin/Cytovillin. 但 HNE1 和 HNE2 细胞蛋白的条带 2 和条带 5 重复几次都未能搜出结果, 可能是蛋白量太小的缘故.

Fig. 1 Total proteins of nasopharyngeal carcinoma cells HNE1 and HNE2 were immunoprecipitated with anti-p53 antibodies, and immuno-complexes were resolved by SDS-PAGE

The SDS-PAGE were visualized by comas-staining (a) and silver-staining (b). A: Maker, B: HNE1 cell, C: HNE2 cell, D: BSA served as a control. The arrows with numbers indicate the positions of the protein bands that combined with p53 protein.

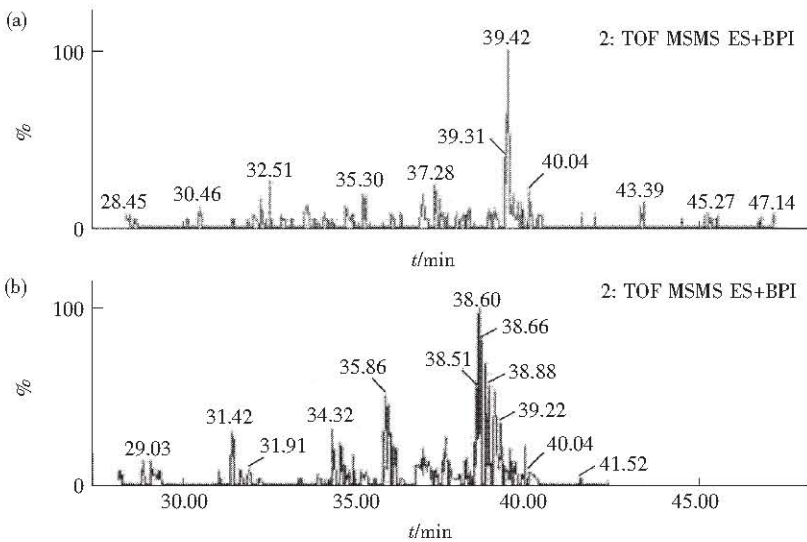


Fig. 2 HPLC peak that fit for the second ion detection condition

(a) was HPLC peak of the band 1 of p53 binding protein from HNE1 cell, (b) was HPLC peak of the standard protein.

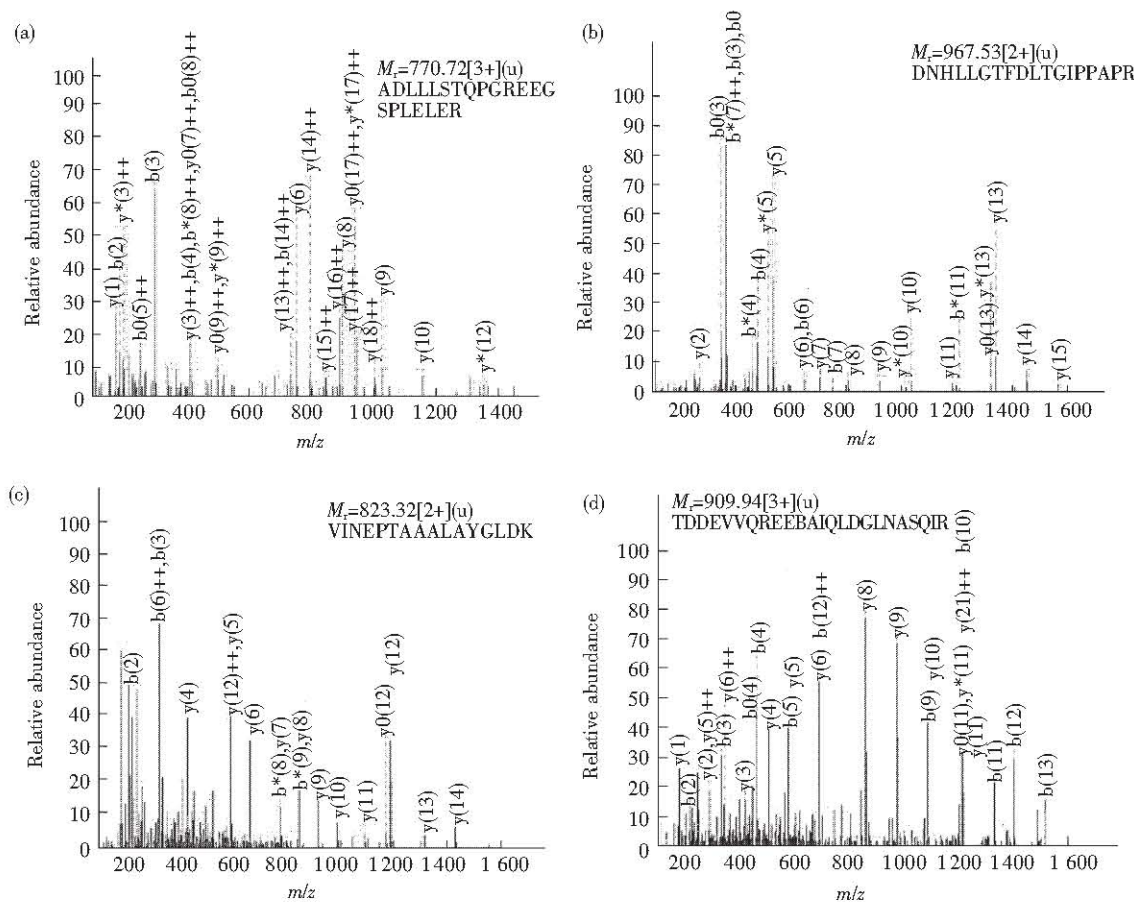


Fig. 3 Protein bands separated by SDS-PAGE were analyzed by LC-ESI-MS/MS (a) is peptide sequence tags of the triply ion at m/z 770. 72 of CD-98 protein in band 4, (b) is peptide sequence tags of the double ion at m/z 967. 53 of GRP-78 protein in band 3, (c) is peptide sequence tags of the double ion at m/z 823. 32 of GRP-75 protein in band 3, and (d) is peptide sequence tags of the triply ion at m/z 909. 04 of GRP-94 protein in band 1.

Table 1 Nine p53 binding proteins identified using peptide sequence tag by Mascot software searching

Protein band	Protein name	Accession No	Protein sequence	M/u	pI	Score/coverage
1(HNE1, HNE2)	GRP-94	P14625	GVVDSDDLPLNVSR	92 696	4. 76	589/16%
	Alpha-actinin 4	O43707	FAIQDISVEETSAK	105 405	5. 2	183/5%
	DNA replication licensing factor/MCM3	P25205	LLNNAFEELVAFQR	91 551	5. 53	109/5%
3(HNE1)	GRP-78	P11021	DNHLTGTFDLTGIPPAPR	72 402	5. 07	641/29%
3(HNE2)	GRP-75	P38646	VINEPTAAALAYGLDKSEDK	73 967	6. 03	972/30%
3(HNE1, HNE2)	Lamin A/C	P02545	TLEGELHDLRGQVAK	74 380	6. 57	114/9%
4(HNE1, HNE2)	Ezrin/Cytovillin	P15311	AKFYPEDVAELIQDITQK	69 339	5. 95	122/8%
	CD98 antigen/4F2 heavy chain	P08195	ADLLSTQPGREEGSPLELER	58 023	5. 2	150/10%
	Protein kinase C	P14314	SLEDQVEMLR	60 228	4. 34	49/6%

2.4 免疫共沉淀和蛋白质印迹验证 p53 结合蛋白质

抗人 p53 抗体分别与 HNE1、HNE2 细胞总蛋白免疫共沉淀, 免疫复合物电泳转膜后与抗人 HSP78 抗体进行蛋白质印迹分析. 结果显示: HNE1 蛋白条带 3 含 p53 结合蛋白质 HSP78, 未进行免疫共沉淀的 HNE1 总蛋白在相同位置 HSP78 亦为阳性, 而 HNE2 蛋白条带 3 无 p53 结合蛋白质 HSP78 (图 4). 这与 LC-ESI-MS/MS 分析鉴定的结果一致.

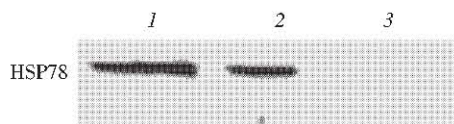


Fig. 4 Immunoprecipitation and Western blot analysis of p53 interacting protein HSP78

Lane 1 is HNE1 total proteins. Lane 2 is the protein complex of p53 antibody immunoprecipitation with HNE1 total proteins. Lane 3 is the protein complex of p53 antibody immunoprecipitation with HNE2 total proteins.

3 讨 论

本文应用免疫共沉淀与 LC-ESI-MS/MS 分析相结合的方法, 首次从两株鼻咽癌细胞株中鉴定了 9 个 p53 结合蛋白. 在鉴定的蛋白质中, 有的为已知的能与 p53 蛋白结合的蛋白质. 如 HSP-70 家族成员 GRP-78 和 GRP-75, 以及 HSP-90 家族成员 GRP-94. HSP-70 和 HSP-90 家族成员为分子伴侣、具有许多重要的生物学功能, 它们也称为细胞死亡和恶性转化的决定因子, 通过影响细胞周期关键调节蛋白质 (p53, pRB 和 p27) 的活性而发挥致癌作用^[12, 14, 15]. HSP-70 家族成员 GRP-75, GRP-78, HSP-70 可与 p53 稳定结合, 导致 p53 在细胞浆异常聚集、不能进入细胞核发挥作用, 并延长 p53 的半衰期^[12, 16]. 但至今尚未见鼻咽癌中 HSP-70 和 HSP-90 家族成员与 p53 蛋白结合的报道. 本文在鼻咽癌中识别 GRP-78、GRP-75 和 GRP-94 与 p53 蛋白结合, 这不仅为阐明鼻咽癌中 p53 聚集及失活的机制提供了实验依据, 而且为进一步通过分子遗传学技术恢复鼻咽癌中 p53 的活性、开展鼻咽癌基因治疗研究提供了重要线索.

本文鉴定的其他 p53 结合蛋白是文献中未见报道的新的 p53 结合蛋白, 其中有 3 个细胞骨架蛋白 (Lamin A/C、 α -actinin 4 和 Ezrin/Cytovillin) 和

PKC. 虽然这些细胞骨架蛋白与 p53 蛋白结合的意义目前尚不清楚, 但细胞骨架蛋白降解是细胞凋亡的关键事件之一^[17, 18], 因此它们是否影响 p53 蛋白诱导凋亡的功能有待澄清. PKC 是细胞生长和分化信号传导通路的关键激酶之一, 具有调节肿瘤细胞 p53 活性的作用, 但文献中尚未见在鼻咽癌细胞中 PKC 与 p53 蛋白结合的报道, 其机理和意义有必要进一步研究.

另外一个值得关注的新的 p53 结合蛋白是 DNA 复制准许因子 (DNA replication licensing factor), 或称为 MCM3 蛋白 (minichromosome maintenance 3 protein, MCM3), MCM3 蛋白在进化过程中高度保守, 从原核生物到人类均有该因子表达. MCM3 蛋白是细胞周期前复制物 (pre-replication complexes, pre-RC) 的关键成分之一, pre-RC 在晚 M1 期和 G1 期组装, 在 S 期被活化, 然后与 DNA 复制起始位点结合, 启动 DNA 的复制和延伸^[19, 20]. 文献报道 MCM3 蛋白在宫颈癌等肿瘤中高水平表达, 并能反映癌组织增殖程度^[21]. Schwab 等^[22]也报道, MCM3 蛋白降解与细胞凋亡有关. 因此, MCM3 蛋白是否影响鼻咽癌细胞中 p53 蛋白功能值得进一步研究.

本文识别的另外一个新的 p53 结合蛋白是 CD98/4F2 heavy chain, CD98 为跨膜糖蛋白, 由 80 ~ 85 ku 重链 (4F2 heavy chain) 和 40 ~ 45 ku 轻链组成, 大量的研究显示^[23], 活化的 CD98 具有促进细胞增生和转化的作用, 但是 CD98 位于细胞膜, 理论上应不能与位于胞浆和胞核中的 p53 结合, 因此 CD98 是否为 p53 的结合蛋白需进一步实验验证.

分析鉴定蛋白质相互作用的方法有许多, 如酵母双杂交, 生物传感芯片技术, 免疫共沉淀结合质谱分析法等^[24, 25]. 每种方法都有其优缺点, 如酵母双杂交是一种高通量的分析相互作用蛋白质的方法, 适用于大规模筛选相互作用蛋白. 应用质谱技术识别相互作用蛋白, 靶蛋白本身被作为诱饵 (bait) 去分离它的结合蛋白, 与酵母双杂交系统和蛋白质芯片技术比较, 该方法主要有如下优点: 完全加工、修饰和成熟的蛋白质被作为诱饵; 蛋白质的相互作用在接近生理条件下进行; 操作简单, 含多个蛋白质的复合物经过一步操作就能被鉴定^[24, 26]. 免疫共沉淀结合质谱分析研究蛋白质相互作用的一个重要步骤, 是对分离出来的微量蛋白质进行质谱鉴定. 目前主要有两种质谱分析技术用

于蛋白质的鉴定^[27]: ESI-MS/MS 和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flying mass spectrometry, MALDI-TOF-MS). MALDI-TOF-MS 鉴定蛋白质是依靠肽质量指纹图 (peptide mass fingerprinting, PMF) 来实现的, 因此要求待分析的蛋白质样品纯度较高, 而 SDS-PAGE 分离的蛋白质带往往含有 1 个以上的蛋白质, 因此 MALDI-TOF-MS 不大适合 SDS-PAGE 分离的蛋白质鉴定. 另外, 蛋白质分子通常存在翻译后修饰, 如糖基化、乙酰化和磷酸化等, 而 MALDI-TOF-MS 不能鉴定多肽侧链上的化学修饰, 也不能给出多肽序列, 只是依赖肽质量指纹图谱鉴定蛋白质, 因此, 鉴定结果准确性下降. 本文采用的 LC-ESI-MS/MS 鉴定蛋白质方法, 由于首先采用了液相色谱方法分离多肽片段, 因此样品不纯对分析影响较小, 另外该方法不仅可以准确地测定蛋白质和多肽的分子质量, 而且能够获得多肽序列标记和侧链化学修饰等数据, 因此蛋白质鉴定结果的准确性提高. 本文 5 次重复实验结果相同亦说明 LC-ESI-MS/MS 是研究蛋白质相互作用的一种好方法.

本文首次在鼻咽癌中鉴定了 9 个 p53 结合蛋白, 虽然它们的生物学意义仍然需要进一步验证, 但为阐明鼻咽癌中 p53 蛋白聚集及功能异常的原因提供了依据和新的线索.

参 考 文 献

- Sun Y, Hegamyer G, Cheng Y J, *et al.* An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (14): 6516 ~ 6520
- Chang K P, Hao S P, Lin S Y, *et al.* A lack of association between p53 mutations and recurrent nasopharyngeal carcinomas refractory to radiotherapy. *Laryngoscope*, 2002, **112** (11): 2015 ~ 2019
- Khair A, Sellami A, Sakka M, *et al.* Contrasted Frequencies of p53 accumulation in the two age group of north African nasopharyngeal carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 2000 **6** (10): 3932 ~ 3936
- Shi W, Pataki I, MacMillan C, *et al.* Molecular pathology parameters in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2002, **94** (7): 1997 ~ 2006
- 钟碧玲, 宗永生. 鼻咽癌中 p53 蛋白积聚对瘤细胞有丝分裂和凋亡的影响. *癌症*, 2000, **19** (5): 432 ~ 438
- Zhong B L, Zong Y S, Chin J *Cancer*, 2000, **19** (7): 432 ~ 438
- 郑美莲, 区宝祥, 龙江斌, 等. p53 蛋白积聚在鼻咽癌中的表达及其临床意义. *中国肿瘤临床*, 1999, **11** (7): 829 ~ 831
- Zhen M L, Qu B X, Long J B, *et al.* *Chin J Clin Oncol*, 1999, **11** (5): 829 ~ 831
- Murono S, Yoshizaki T, Park C S, *et al.* Association of Epstein-Barr virus infection with p53 protein accumulation but not bcl-2 protein in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*, 1999, **34** (5): 432 ~ 438
- Gulley M L, Burton M P, Allred D C, *et al.* Epstein-Barr virus infection is associated with p53 accumulation in nasopharyngeal carcinoma. *Human Pathology*, 1988, **29** (3): 252 ~ 259
- Weinrib L, Li J H, Donovan J, *et al.* Cisplatin chemotherapy plus adenoviral p53 gene therapy in EBV-positive and -negative nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Gene Therapy*, 2001, **8** (5): 352 ~ 360
- Pise-Masison C Y, Mahieux R, Jiang H, *et al.* Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 tax requires activation of the NF- κ B pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (10): 3377 ~ 3386
- Momand J, Zambetti G P, Olson D C, *et al.* The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 1992, **69** (7): 1237 ~ 1245
- Zylicz M, King F W, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J*, 2001, **20** (17): 4634 ~ 4638
- Truant R, Antunovic J, Greenbatt C, *et al.* Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virology*, 1995, **69** (3): 1851 ~ 1859
- Selkirk J K, Merrick B A, Stackhouse B L, *et al.* Multiple p53 protein isoforms and formation of oligomeric complexes with heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in the human mammary tumor, T47D, cell line. *Appl Theor Electrophor*, 1994, **4** (1): 11 ~ 18
- Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan M K, *et al.* Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res*, 2002, **274** (2): 246 ~ 253
- Wadhwa R, Takano S, Mitsui Y, *et al.* NIH 3T3 cells malignantly transformed by mot-2 show inactivation and cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *Cell Res*, 1999, **9** (4): 261 ~ 269
- Shen Z Y, Xu L Y, Li E M, *et al.* Ezrin, actin and cytoskeleton in apoptosis of esophageal epithelial cells induced by arsenic trioxide. *Int J Mol Med*, 2003, **12** (3): 341 ~ 347
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, 1996, **135** (6 pt 1): 1441 ~ 1455
- Chong J P, Mahbubani H M, Khoo C Y, *et al.* Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature*, 1995, **375** (6530): 418 ~ 421
- Labib K, Tercero J A, Diffley J F. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science*, 2000, **288** (5471): 1643 ~ 1647
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, *et al.* Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem*, 2003, **270** (6): 1089 ~ 1010
- Schwab B L, Leist M, Knipper R, *et al.* Selective proteolysis of the nuclear replication factor MCM3 in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1998, **238** (2): 415 ~ 421
- Rintoul R C, Buttery R C, Mackinnon A C, *et al.* Cross-linking CD98 promotes integrin-like signalling and anchorage-independent growth. *Mol Biol Cell*, 2002, **13** (8): 2841 ~ 2852
- Aebbersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, **422** (6928): 198 ~ 207
- 李 萃, 詹显全, 陈主初. 生物传感芯片质谱及其在蛋白质组研究中的作用. *生命的化学*, 2001, **21** (2): 153 ~ 155
- Li C, Zhan X Q, Chen Z C. *Chem Life*, 2001, **21** (2): 153 ~ 155
- Figeys D, Mcbroom L D, Moran M F. Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions. *Methods*, 2001, **24** (3): 230 ~ 239
- 詹显全, 陈主初. 蛋白质组中蛋白质鉴定技术的研究近况. *国外医学·分子生物学分册*, 2002, **24** (3): 129 ~ 130
- Zhan X Q, Chen Z C. *Foreign Medical Sciences Section of Molecular Biology*, 2002, **24** (3): 129 ~ 130

Separation and Identification of p53 Interacting Proteins From Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells*

HU Wei^{1,2)}, XIAO Zhi-Qiang¹⁾, CHEN Zhu-Chu^{1,2)} **, LI Jian-Ling¹⁾, ZHANG Peng-Fei¹⁾,
FENG Xue-Ping¹⁾, YI Hong¹⁾, YU Yan-Hui²⁾, TANG Xin-Ke³⁾, LIU Qing-Ping³⁾, LIANG Song-Ping³⁾

(¹⁾ Medical Research Center of Xiangya Hospital, Central South University, Key Laboratory of Cancer Proteomics of
Chinese Ministry of Health, Changsha 410008, China;

²⁾ Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

³⁾ College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract Although p53 gene mutation is a rare event in human nasopharyngeal carcinoma (NPC), over-expressed/accumulated p53 protein is dysfunction in most of NPC. However, till now the mechanism of p53 protein inactivation remains unclear. In order to elucidate the mechanisms of p53 inactivation, p53 interacting proteins in the human NPC HNE1 and HNE2 cells were separated and identified. p53 binding proteins were recovered by anti-p53 antibody immunoprecipitation with the total proteins from NPC HNE1 and HNE2 cells respectively. The recovered protein complexes were subjected to SDS-PAGE. The 5 separated protein bands were cut from the gel, in-gel digested and analyzed by LC-ESI-MS/MS. Then proteins were identified by peptide sequence tags (PST) and database searching, and were confirmed by immunoprecipitation and Western blot analysis. The results show that nine p53 binding proteins were identified, which were GRP-78 and GRP-75 of HSP 70 family members, GRP-94 of HSP 90 family members, laminA/C, Alpha-actinin 4, Ezrin/Cytovillin, DNA replication licensing factor/MCM3 protein, CD98/4F2 heavy chain and protein kinase C. It can be concluded that this study first time identified nine p53 binding proteins in NPC, which provide important clues to elucidate the mechanism of p53 over-expression and inactivation in NPC.

Key words p53, nasopharyngeal carcinoma, immunoprecipitation, LC-ESI-MS/MS, interacting proteins, Western blot

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB5102), The National Natural Science Foundation of China (30000028, 30240056, 30370642), Outstanding Scholars of New Era from Ministry of Education of China (2002-48), Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan (02SSY2001-1) and Key Research Program from Public Health Bureau of Hunan Province (202-04).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4327325, Fax: 86-731-4327332, E-mail: tcb1@xysm.net

Received: January 16, 2004 Accepted: February 28, 2004