

胃癌相关新蛋白 Raf 激酶抑制蛋白 相互作用蛋白质的鉴定*

谷 欢 严 璐 李 佳 张桂英**

(中南大学湘雅医院消化内科, 长沙 410008)

摘要 Raf 激酶抑制蛋白(RKIP)的异常表达在胃癌的发生发展中起重要的作用, 为了阐明其作用机制, 应用脂质体将 RKIP-3xFLAG-pcDNA3.1 质粒转染至 SGC7901 细胞, 建立 RKIP-3xFLAG 高表达的 SGC7901 细胞; 并利用 3xFLAG 标签的亲和层析技术联合质谱分析, 分离、鉴定与 RKIP 相互作用的蛋白质, 并应用免疫共沉淀联合 Western-blot 进一步验证质谱结果. 共鉴定出 66 个 RKIP 相互作用蛋白质, 功能分类包括蛋白质代谢酶类、生物氧化相关酶类, 细胞骨架蛋白、分子伴侣、信号转导相关蛋白、酶解相关蛋白等. 并首次证实 14-3-3 蛋白与 RKIP 存在相互作用. 为阐明 RKIP 在胃癌发生发展中的作用机制提供了重要的线索, 为胃癌的早期诊治及预后监测提供了新的靶点.

关键词 胃癌, RKIP, 亲和纯化, 蛋白质组学, 14-3-3 蛋白
学科分类号 R57, R735

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00260

胃癌(gastric cancer, GC)是目前世界上发病率第 4 位的肿瘤, 居消化道恶性肿瘤发病率及病死率的第 2 位^[1-2]. 全世界每年有 75 万患者死于胃癌, 我国每年有 16 万人死于胃癌. 迄今为止, 胃癌的发病机制仍然不清楚. 在胃癌的防治中胃癌早期诊断、复发转移预测和预后评估具有重要作用. 寻找新的肿瘤标志物及基因治疗靶点成为当务之急.

Raf 激酶抑制蛋白 (Raf kinase inhibitor protein, RKIP)是一种高度保守、广泛表达、具有多种生理与病理功能的小分子胞浆蛋白. RKIP 又名 PEBP1 (磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1), 近期研究^[3-6]发现, 其表达下调或缺失在多种肿瘤发生发展中具有重要的作用, 因此 RKIP 在恶性肿瘤中的作用机制已经成为肿瘤领域一个新的研究热点. 我们前期研究中, 首次鉴定发现 RKIP 在良性胃黏膜组织中呈高表达, 在胃癌组织中明显下调. 我们针对差异蛋白的临床病理意义研究结果提示, RKIP 蛋白对胃癌组织分化有调节作用, 参与了胃癌的浸润、转移过程. 随着 TNM 分期的提高, RKIP 表达阳性率逐渐降低, 与临床分期呈负相关, 说明 RKIP 蛋白失表达有可能是影响胃癌进展过程的重要因素^[7]. 近

年来的研究发现, RKIP 可能在肿瘤发生发展中具有重要的作用^[8-11]. 但是 RKIP 在胃癌发病和转移中的具体作用及其机制目前国内外均未见报道.

目前研究认为细胞中绝大多数酶的功能和调控过程是以蛋白质复合体或蛋白质网络协同作用实现的, 蛋白质的相互作用是目前研究的热点. 因此我们拟在前期研究的基础上, 应用亲和纯化耦联质谱技术为主的靶向蛋白质组学技术分离、鉴定胃癌 SGC7901 细胞中 RKIP 相互作用蛋白, 从而初步研究 RKIP 抑制胃癌的发生发展的分子机理, 为胃癌的早期诊断、预后监测以及靶向基因治疗提供依据和新的线索.

功能蛋白质组学是目前肿瘤研究中的一个热点, 基于生物化学、分子生物学、微生物学、生物

* 国家自然科学基金面上项目(81072038), 湖南省发展改革委员会项目(湘发改高技[2010]1060 号)和湖南省科技厅项目(2009JT1010)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-84327282, E-mail: guiyinzhang@hotmail.com

收稿日期: 2011-06-09, 接受日期: 2011-08-22

物理学和生物信息学的知识和技术, 已经建立了多种研究蛋白质相互作用的方法. 目前功能蛋白质组学正经历着 3 个递进阶段: 鉴定与目的蛋白质有相互作用的所有可能的蛋白质; 在与目的蛋白有相互作用的蛋白质已被鉴定出来的前提下, 在尽可能接近自然条件下确定目的蛋白与其相关作用蛋白质间的相互作用对其功能的影响; 鉴定出调节目的蛋白与其相关作用蛋白质间相互作用的关键因子以准确解释蛋白质相互作用. 这些方法各有所长, 且由于蛋白质相互作用的研究容易出现假阳性和假阴性的结果, 所以同时选择两种以上的研究方法进行研究结果的验证是十分必要的^[2].

我们在应用了 FLAG Pull-down 耦联质谱技术分离、鉴定出 RKIP 相互作用蛋白后, 进一步应用免疫共沉淀联合 Western blot 技术验证部分 RKIP 相互作用蛋白.

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌 SGC7901 细胞购自中南大学卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液进行传代培养. RPMI-1640 培养液、小牛血清、Trizol 购自 Gibco 公司, Lipofectamine™2000 购自 Invitrogene 公司, PCR 产物胶回收及质粒提取试剂盒、RT-PCR kit、primeSTART™ HSDNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司, 限制性内切酶 *Bgl* II、*Xba* I 和 *Bam*HI、pGEM-T 载体、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司. FLAG 一抗和鼠二抗及 DMSO 为 Sigma 公司产品, RKIP 一抗及兔二抗购自 Santa Cruz 公司.

1.2 质粒构建

根据 Sigma 公司的 p3xFLAG-CMV-14 载体上对应序列合成 3xFLAG; PCR 扩增 RKIP CDS 区, 同时引入 3xFLAG 标签; 用 *Hind* III 和 *Xho* I 将 RKIP-3xFLAG 的 PCR 片段及目的载体 pCDNA3.1(+) 双酶切, 然后进行连接. 酶切、测序等鉴定重组质粒; 测序正确的质粒转化至感受态大肠杆菌, 扩增并大量提取质粒.

1.3 融合蛋白的表达与纯化

复苏 SGC7901 细胞, 待细胞生长至对数生长期时, 将细胞接种于 15 cm² 的细胞培养皿中, 当细胞长至 90% 融合率时, 用于转染, 设为转染融合载体 pcDNA3.1-RKIP-3xFLAG 组(融合载体组), 转染空载体 FLAG-pcDNA3.1 组(空白载体对照组)

及未转染质粒的空白对照组, 按照脂质体 Lipofectamine™2000 说明书的操作步骤进行转染, 转染 48 h 后, 收集细胞用 RT-PCR 及 Western blotting 验证 RKIP 的 mRNA 及蛋白质表达水平.

1.4 FLAG 标签亲和纯化

将融合载体转染组(转染质粒 pcDNA3.1-RKIP-3xFLAG 组)及对照组(空白载体组、空白对照组)的细胞蛋白质均按照 anti-FLAG M2 磁珠说明书上的操作步骤进行蛋白质提纯: 用一干净的 Tip 取适量体积亲和磁珠于干净离心管中, 8 000 r/min 离心 30 s 并让其自然沉淀约 2 min, 弃上清; 随后用相当于 20 倍磁珠体积的 TBS 溶液将上述沉积物清洗 2 遍, 弃上清; 再用 0.1 mol/L 甘氨酸 HCl (pH 3.5) 将上述磁珠洗 1 遍(两者混合不超过 20 min), 弃上清, 并用 TBS 清洗 3 遍; 将适量的蛋白质样品(裂解时已加蛋白酶抑制剂)与磁珠轻轻混匀, 4℃ 缓慢摇晃孵育过夜; 过夜后 4℃、8 000 r/min 将上述混合物离心 30 s, 小心弃上清; 预冷的 TBS 液清洗混合物 3 遍, 弃上清. 各个样品中分别加入 20 μl 2×上样缓冲液(125 mmol/L Tris HCl, pH6.8; 4% SDS, 20% 甘油, 0.004% 溴酚蓝); 沸水浴煮蛋白质样品 3 min; 5 000 r/min, 30 s, 低温保存备用.

1.5 质谱分析

取纯化后的融合蛋白质样品经洗脱、浓缩, 再经过 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色后, 按照凝胶上实验组和对照组相对应的条带, 将胶条平行切割成 14 对对应的条带, 置于 EP 管中捣碎成细小颗粒状, 再经脱色、还原和烷基化、酶解、样品萃取, 制备成待检测质谱样本, -20℃ 保存备用. 电喷雾电离串联质谱仪(ESI-Q-TOF-MS)对蛋白质的鉴定可直接利用肽段的碎片信息(peptide fragmentation fingerprinting, PFF)或基于肽序列标签(peptide sequence tag, PST), 每个质谱样本的测定结果中包含了若干蛋白质信息. 具体操作及参数如下:

质谱仪为英国 Micromass 公司的电喷雾 - 四极杆 - 飞行时间串联质谱 Micro Q-TOF, 配备有毛细管液相色谱仪和纳升喷雾源(nanoelectrospray ionization source). 所有测定均在正离子模式下进行. 为了进行在线 LC/MS 分析, Waters 毛细管液相色谱仪(CapLC)系统耦联于质谱仪之前进行肽段的纯化与分离. 样品通过 Waters CapLC Autosampler 以 30 μl/min 的流速上样于前柱进行浓缩和快速除盐, 分析柱用以下梯度进行梯度洗脱: 5~65 min

乙腈浓度(B液)从5%上升至50%, 65~75 min 乙腈浓度保持在95%, 流速200 nl/min. MS/MS谱采集采用数据依赖模式(data-dependent mode), 当4个前体离子超过阈值7 counts/s (cps)时则被选为母离子进行MS/MS分析扫描. 质谱仪用Glu-fib的串联碎片校正, 质量误差为 ± 0.1 Da. 雾化气为氮气, 碰撞气为氩气, 源温为80℃, 锥孔电压为45 V, 质量扫描范围400~2 200 u. MCP检测器电压为2 700 V. 当进行CapLC-ESI-MS/MS全自动分析时, 毛细管电压为3 000 V. 分离后的肽段直接进入离子源, 对于每一个强度超过阈值(5 cps)的肽段都自动进行MS/MS测定. 测定结果以peaklist文件形式给出.

1.6 生物信息学

ESI-Q-TOF质谱图解谱采用MicroMass公司的MassLynx软件进行, 从原始MS/MS谱中产生PKL格式的数据文件. 利用MatrixScience公司的站点查询, 网址是http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS. 数据库检索参数为: 数据库选择为Swiss-prot或NCBI nr数据库, 物种分类(Taxonomy)选择为人(Human), 酶选择为Trypsin, 允许的未酶切位点选择为1, 固定修饰(Fixed modifications)选择为碘乙酰胺 Carbamidomethyl(C)修饰, 可变修饰选甲硫氨酸氧化 Oxidation (M), MS/MS容差选择为0.3 Da, 肽片段电荷数选择为1+, 2+或3+, 选择Monoisotopic, 数据文件Data File选择为相应的PKL格式的源数据, 数据格式Data format选择为Micromass (PKL)格式, Instrument选择为(ESI-QUAD-TOF). Mascot数据库查询打分算法是一种基于概率的算法, 以Score0.05、Score0.01分别表示 $p=0.05$ 、0.01时Score值, 蛋白质鉴定标准采用2个和2个以上肽段匹配且得分大于Score 0.05, 或单肽段匹配且得分大于Score 0.01.

1.7 免疫共沉淀联合 Western-blot 验证

在含1.5 mg细胞总蛋白质的1 ml抽提缓冲液中, 加入5 μ l 非免疫兔血清和50 μ l protein G-sepharose 4B珠子, 40℃振荡2 h, 5 000 r/min离心3 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20 μ g兔抗人RKIP抗体和50 μ l protein G-sepharose 4B珠子, 40℃振荡3 h; 5 000 r/min离心3 min去上清、保留珠子, TBST缓冲液洗涤含免疫复合物的珠子3次, 每次

3 min, 5 000 r/min离心收集珠子. 以非免疫IgY抗体取代RKIP抗体作为对照. 0 μ g总蛋白进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 100 V电泳2 h左右. Bio-Rad装置100 V电转移1 h使蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜. 印迹膜用封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液)室温封闭2 h. 印迹膜与第一抗体室温孵育2 h或4℃孵育过夜, 然后TBST缓冲液洗膜3次, 每次10 min. 将膜与HRP标记的第二抗体室温孵育1 h, TBST缓冲液洗膜3次, 每次10 min. ECL试剂发光、显影和定影. 用非免疫IgY抗体取代RKIP抗体进行免疫共沉淀作为阴性对照, 实验重复3次.

2 结 果

2.1 表达载体的构建

以pCDNA3.1-RKIP为模板, PCR扩增RKIP CDS区片段, 同时引入3xFLAG标签, 扩增后将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 如图1a所示, 得到约600 bp条带. 回收RKIP-3xFLAG条带. 用Hind III和Xho I将RKIP-3xFLAG的PCR片段及目的载体pCDNA3.1(+)-双酶切, 然后进行连接. 鉴定结果如图1b, 由图1可知, 该克隆为正确克隆.

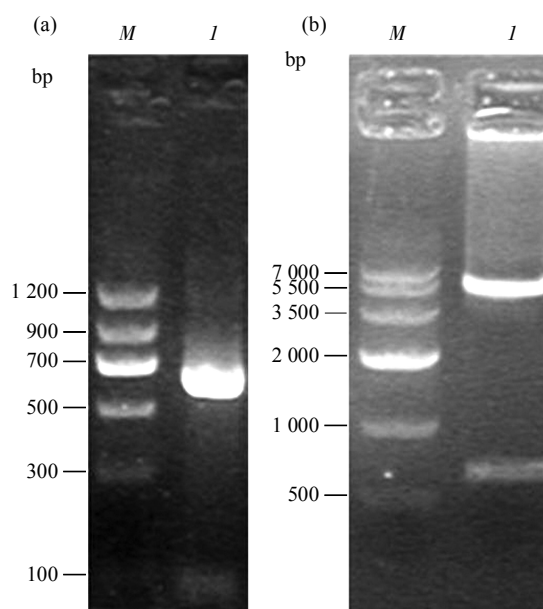


Fig. 1 Electrophoretogram of PCR and restriction enzyme digestion during construction of pCDNA3.1-RKIP-3xFLAG

(a) M: Marker II, I: Amplification of RKIP-3xFLAG expression cassette from pCDNA3.1-RKIP-3xFLAG by PCR. (b) M: Marker IV, I: Digested products of pCDNA3.1-RKIP-3xFLAG by Hind III and Xho I.

将酶切鉴定正确的 pCDNA3.1-RKIP-3xFLAG 送去测序, 测序对比结果显示扩增出的 RKIP 基因片段序列完全正确.

2.2 亲和纯化 RKIP 融合蛋白

将空白对照组(未转染质粒的 SGC7901 细胞)、空载体组(转染空载体 FLAG-pcDNA3.1 的 SGC7901 细胞)及融合载体组(转染融合载体 pcDNA3.1-RKIP-3xFLAG 的 SGC7901 细胞)细胞提取的蛋白质样品, 用 anti-flag M2 亲和磁珠亲和纯化后, 大部分样品经洗脱、浓缩, 再用 10% SDS-PAGE 分离完毕后考马斯亮蓝 R-250 染色, 每种样品电泳分离胶相平行切割, 均切成 14 个条带, 并做好标记, 考马斯亮蓝 R-250 染色结果如图 2a 所示;

把实验中所剩余的样品做 Western blotting 检测, 验证亲和纯化的效果和可靠性. 结果证明在实验过程中实验组及对照组样品没有交叉污染, 只有 RKIP-3xFLAG 组检测出 RKIP-FLAG 表达, 实验结果可靠, 实验重复 3 遍(图 2b).

2.3 RKIP 相互作用蛋白质谱分析

样品经 1D-SDS- PAGE 分离后用考马斯亮蓝 R-250 染色, 切下特异的条带, 经胶内酶切等处理, 最后经 ESI-Q-TOF-MS 鉴定, 测定结果仪器以 peaklist 文件形式给出, 每个文件包含若干蛋白质信息, 利用 Mascot 查询软件搜索 Swiss-prot 或 NCBI nr 数据库, 对搜索结果按 Mascot 分数、匹配的片段数和覆盖率等进行综合考虑判定搜索结果. 图 3 和图 4 所示为实验组中鉴定的可能与 RKIP 相关的蛋白质: 14-3-3 蛋白质谱图及 Mascot 搜索结果. 本研究鉴定出与其相关的蛋白质共 66 个, 功能分类包括蛋白质代谢酶类、生物氧化相关酶类, 细胞骨架蛋白、分子伴侣、信号转导相关蛋白、酶解相关蛋白等(表 1). 实验共重复 3 次, 实验组中出现而对照组中未鉴定出的蛋白质入选. 其中 3 次

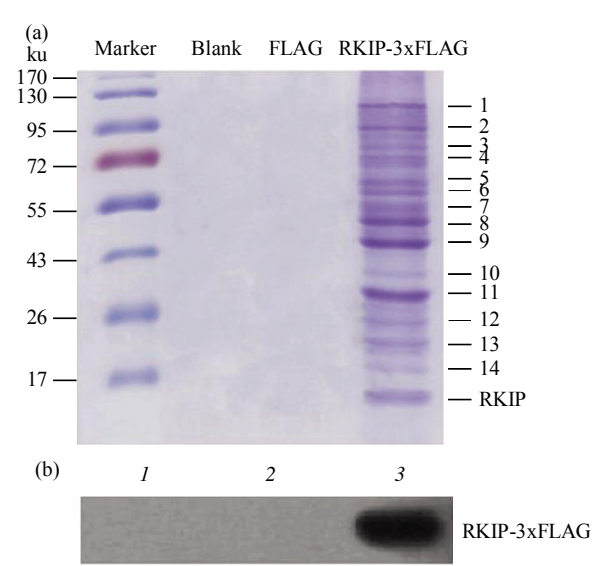


Fig. 2 RKIP-FLAG M2 affinity gel immunoprecipitation

(a) After the affinity magnetic bead based purification, with anti-flag M2, of total protein from the cells, the protein sample was pre-separated by 1D-SDS-PAGE using a 10% acrylamide gel. The clear protein channels ($n = 14$) were separated in the experimental group. Blank: The blank control group; FLAG: The 3xFLAG-pcDNA3.1 group (blank carrier group); RKIP-3xFLAG: The pcDNA3.1-RKIP-3xFLAG group (fusion carrier group). (b) The uses of Western blotting to test RKIP-FLAG expression in different groups of affinity purified cells. After the affinity magnetic bead based purification, with anti-flag M2, of total protein from the cells, RKIP-FLAG expression was detected in only the RKIP-FLAG fusion carrier transfection group, whereas no RKIP-FLAG expression was detected in the empty carrier and control groups. 1: The blank control group(SGC7901); 2: Blank carrier group (SGC7901-3xFLAG); 3: Fusion carrier group(SGC7901-RKIP-3xFLAG).

实验均鉴定出的有 14-3-3、Keratin、Filamin、Tubulin、GSTP1、HSP90、DHX9、Actin、HYOU1、Vimentin 等.

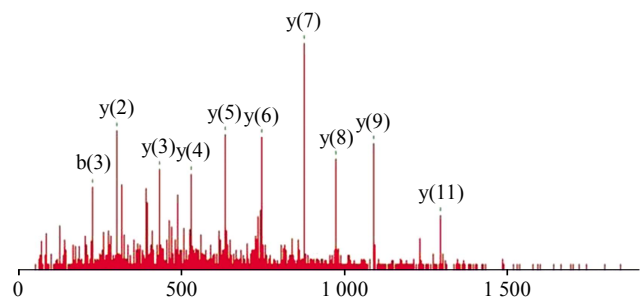


Fig. 3 Part of amino acid sequence diagram for 14-3-3

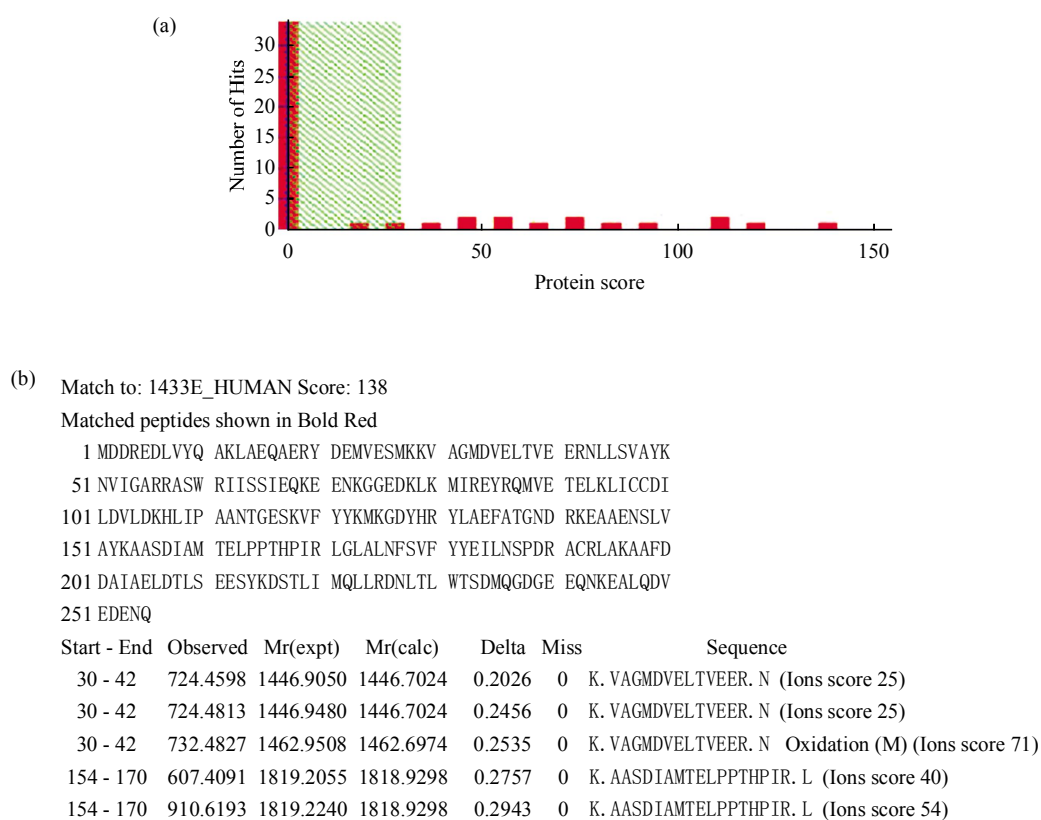


Fig. 4 The result of Mascot for 14-3-3

(a) Control score schemes. x axis and y axis control score for the number of points for matching, beyond the shadow district says get positive identification ($P < 0.05$), group 3 channel control protein in the highest scoring is 138, identification of the results 14-3-3. (b) 14-3-3 protein Sequence, identified by tandem mass spectrometry analysis peptide fragments get amino acid residues, sequences (Sequence). ESI-Q-TOF analysis showed that, from the protein peptide fragments for the sequence of amino acid sequence is part of the 14-3-3 protein bits of amino acid sequence.

Table 1 RKIP-interacted proteins identified with ESI-Q-TOF MS/MS

Uniport ID	Protein name	Protein mass/u	Score	Matching peptides	Protein function
I. Metabolic enzymes					
P53618	Coatomer subunit beta	108 241	89	3	Mediate biosynthetic protein transport
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58 470	604	40	Glycolytic enzyme
P00966	Argininosuccinate synthase	46 791	142	6	ATP binding
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	44 992	102	3	Glycolytic enzyme
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	68 180	56	2	Function of light chain amino-acid transporters
P06733	Alpha-enolase	47 481	517	25	Multifunctional enzyme
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36 201	769	80	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and nitrosylase activities
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	36 900	74	5	L-Lactate dehydrogenase activity

Continued

Uniport ID	Protein name	Protein mass/u	Score	Matching peptides	Protein function
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	36 950	43	4	L-Lactate dehydrogenase activity
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35 937	49	3	L-Malate dehydrogenase activity
P46940	Ras GTPase-activating-like protein	189 761	55	3	Promote neurite outgrowth
P68104	Elongation factor 1- α 1	50 451	190	11	Protein biosynthesis
P02786	Transferrin receptor protein 1	85 274	74	3	Molecular transducer activity
II. Molecular chaperone					
P14625	Endoplasmic	92 696	192	18	Molecular chaperone ATPase activity
P07900	Heat shock protein HSP 90- α	85 006	280	24	Stress related, chaperone
P08238	Heat shock protein HSP 90- β	83 554	276	25	Stress related, chaperone
P11142	Heat shock cognate 71 ku protein	71 082	398	16	Stress related, chaperone
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	73 920	253	7	Related with cellular proliferation and aging
P10809	60 ku heat shock protein	61 187	723	22	Stress related, chaperone
P53992	Protein transport protein Sec24C	119 789	61	5	Component of the COPII coat
P50454	Serpin H1	46 525	133	3	Chaperone in the biosynthetic pathway of collagen
III. Biological oxidation-related proteins					
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	27 248	78	3	Voltage-gated chloride channel activity, redox-regulated
Q06830	Peroxiredoxin-1	22 324	51	7	Redox regulation
IV. Signal transduction					
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	71 184	63	2	mRNA processing, ribonucleoprotein
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45 985	110	2	mRNA processing, ribonucleoprotein
P04083	Annexin A1	38 918	454	24	Signal transduction, calcium ion binding
P12429	Annexin A3	36 524	53	4	Signal transduction, calcium ion binding
P08758	Annexin A5	35 971	50	10	Signal transduction, calcium ion binding
P62258	14-3-3 protein epsilon	29 326	136	6	Anti-apoptosis, signal transduction, transcription factor binding
P23396	40S ribosomal protein S3	26 842	122	9	NF- κ B binding
Q99623	Prohibitin-2	33 276	38	5	Mediate transcriptional repression
V. Cytoskeleton-related proteins					
O75369	Filamin-B	280 157	91	1	Connects cell membrane constituents to the actin cytoskeleton
P21333	Filamin-A	283 301	91	3	Actin binding
P18206	Vinculin	124 292	668	30	Actin filament-binding protein
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	66 170	89	4	Cytoskeleton of intermediate filaments
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	53 671	156	11	Cytoskeleton of intermediate filaments
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	48 361	221	10	Cytoskeleton of intermediate filaments
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	48 029	547	35	Cytoskeleton of intermediate filaments
Q15149	Plectin	533 462	73	11	Actin binding
P35579	Myosin-9	227 646	62	10	Play a role in cytokinesis, secretion
P68371	Tubulin β -2C chain	50 255	245	19	The major constituent of microtubules
P07437	Tubulin β chain	50 095	309	25	The major constituent of microtubules
P60709	Actin, cytoplasmic 1	42 058	617	36	Involved in various types of cell motility

Continued

Uniport ID	Protein name	Protein mass/u	Score	Matching peptides	Protein function
P52907	F-actin-capping protein subunit α -1	33 073	61	3	Acting binding
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	39 851	141	7	Acting binding
P08670	Vimentin	53 619	574	17	Cell motility, structural constituent of cytoskeleton
Q9NYL9	Tropomodulin-3	39 741	85	9	Acting binding
VI. Protease-related proteins					
P53396	ATP-citrate synthase	121 674	225	7	Enzyme regulator activity
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89 950	42	3	Necessary for the formation of transitional endoplasmic reticulum
Q08J23	tRNA(cytosine-5-)-methyl transferase	87 214	78	2	RNA methyltransferase
P06576	ATP synthase subunit α , mitochondrial	59 828	158	9	Mitochondrial membrane ATP synthase
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	46 357	169	7	ATP-dependent RNA helicase
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	103 895	117	3	Involved in proteolytic events essential for cell growth and viability
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor β	51 095	78	3	Rad GDP-dissociation inhibitor activity
P42330	Aldo-keto reductase family 1 member C3	37 229	35	2	Aldo-keto reductase activity
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit β -2-like 1	35 511	112	3	Up-regulation of the activity of kinases
P61289	Proteasome activator complex subunit 3	29 602	77	2	Endopeptidase activator activity
P09211	Glutathione S-transferase P	23 569	56	30	Glutathione transferase activity
P13639	Elongation factor 2	96 246	240	9	Catalyzes the GTP-dependent ribosomal translocation
Q15029	Small nuclear ribonucleoprotein component	110 336	130	6	Component of the U5 snRNP complex
P10696	Alkaline phosphatase, placental-like	57 626	140	8	Alkaline phosphatase activity
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	27 134	108	3	Mitochondrial tRNA maturation
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	142 181	264	12	Transcriptional activator
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	145 718	94	9	Isoleucine-tRNA ligase activity
P26640	Valyl-tRNA synthetase	141 642	78	4	ATP binding

The obtained MS/MS data were used to identify the proteins with Mascot software to search the Swiss-Prot or the NCBI nr database. The proteins that only appeared in the experimental group were chosen.

2.4 免疫共沉淀联合 Western blot 鉴定 RKIP 与 14-3-3 相互作用

目前, 鲜有关于 RKIP 的蛋白质组学研究, 我们对本次实验所得的 66 个蛋白质在相互作用蛋白质数据库 (MiMI、Functional lineage network 及 Predictome 数据库) 进行检索, 发现在这 3 个数据库中均与 RKIP 存在密切关系的蛋白质有: 14-3-3, HSP90, Keratin 8, IQGAP1, MYH9, CLH1, PLEC1, EF2 等. 而且在我们的前期实验中发现 14-3-3 为胃癌细胞与正常胃黏膜细胞的差异表达蛋白. 因此为进一步验证其与 RKIP 是否存在相互作用, 为下

一步研究它们之间的相互作用机制及对胃癌的发生发展的作用打下基础, 采用免疫共沉淀和 Western blotting 方法检测相互作用蛋白 14-3-3 是否与 RKIP 结合, 即采用 RKIP 抗体与 SGC7901 细胞总蛋白进行免疫共沉淀, SDS-PAGE 分离免疫复合物, 电转移至 PVDF 膜上, 再采用抗 14-3-3 抗体 Western blotting 检测免疫复合物中有无 14-3-3 蛋白存在. 用非免疫 IgY 抗体取代 RKIP 抗体进行免疫共沉淀作为阴性对照, 实验重复 3 次. 结果如图 5 所示, 在 RKIP 免疫复合物检测到 14-3-3 蛋白的表达.

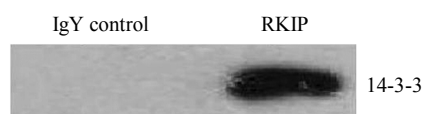


Fig. 5 The validation of RKIP-interaction proteins with immunoprecipitation and Western blotting

The proteins were immunoprecipitated, with RKIP antibody, from the total protein extracts of SGC7901 cells and detected by Western blotting with antibodies against 14-3-3. Non-immune IgY antibodies were used to replace RKIP antibodies as negative controls (3x).

3 讨 论

胃癌是一种多基因参与、多阶段的复杂疾病,其发病机制、早期诊断及治疗一直是胃癌研究者和临床医生所面临的主要挑战。我国是胃癌高发国之一,因病变部位隐匿、早期症状不明显,绝大多数胃癌患者就诊时已处于中晚期,严重影响其治疗效果和预后。综合多种研究手段,从不同层次如基因组、转录组、蛋白质组、甚至代谢组等研究胃癌已成为共识。这些研究领域的交叉所呈现出的系统生物学模式,将能更好地阐明胃癌的发生、发展及转移机制,有利于解决胃癌的早期诊断和靶向治疗问题^[13]。本实验目的就是利用高效的 3xflag 标签标记目的蛋白并纯化融合蛋白复合体,获得可靠的相互作用蛋白质,筛选鉴定与 RKIP 有相互作用的蛋白质。期待能为更深入地研究胃癌的发病机制、临床诊断与治疗提供新的方法和思路。

采用 3xFLAG 磁珠洗脱纯化 RKIP 蛋白复合体,将裂解的总蛋白样品经过 1D-SDS-PAGE 预分离,然后结合 ESI-Q-TOF-MS 质谱分析,共筛选出 66 个可能与 RKIP 相关的蛋白质。为确保筛选到的蛋白质真正与 RKIP 存在相互作用,本部分用 RKIP 抗体与 SGC7901 细胞总蛋白质进行免疫共沉淀,得到 RKIP 免疫复合物,接着用 Western blotting 对部分蛋白质进行了验证。在我们的验证结果中,SGC7901 细胞中 RKIP 蛋白的免疫复合物中 14-3-3 蛋白呈阳性表达,提示此蛋白质与 RKIP 存在相互作用,这和质谱鉴定的结果一致。

近年来研究发现,RKIP 能抑制 Raf-1 介导的 MEK 的磷酸化和活化,抑制 MAPK 信号传导通路,并参与对 G 蛋白耦联受体信号通路和 NF- κ B 信号通路的调控^[14]。而这些信号通路在细胞生长、

增殖、分化和肿瘤发生过程中发挥重要的调节作用,强烈提示 RKIP 的异常表达与肿瘤的发生发展有关。

在众多信号转导通路中,MAPKs 通路在炎症信号转导、细胞凋亡、肿瘤细胞增殖以及参与调控体内多种物质代谢过程中起极其重要的作用。其最主要的一条信号转导通路激活路径大致为:多种生长因子→Ras 的激活→Ras 募集 Raf-1 并将其由胞浆转移至胞膜,完成对 Raf-1 的激活→激活 MEK1/2→ERK 磷酸化而被激活,并由胞浆转移至胞核→启动 AP-1 等核转录因子→调节细胞的有丝分裂、分化。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是 MAPK 家族中的一员,它的信号传递途径 Ras/raf/MEK/ERK 是涉及调节细胞生长、发育及分裂的信号网络的核心。有丝分裂原刺激后部分磷酸化后的 ERK 能像细胞核转位,并具有调控转录活性的能力^[15]。ERK 是所有 MAPKs 家族成员中最早被认识,而且是最具特征性的。ERK 被公认是一种增殖、转化和分化的 MAPKs^[16]。前面提到 RKIP 能抑制 Raf-1 介导的 MEK 的磷酸化和活化,抑制 Raf/MEK/ERK 信号转导通路^[14]。所以我们推断 RKIP 亦可以通过与其相互作用蛋白相结合并以某些机制,对 MAPK 信号通路产生影响。

14-3-3 蛋白家族广泛地参与对人类肿瘤细胞(尤其是消化系统肿瘤)生长、生存、扩散、迁移、细胞周期、细胞凋亡和细胞信号通路的调控。14-3-3 信号蛋白质是一组高度保守,分布十分广泛的多功能真核生物胞浆蛋白质。14-3-3 蛋白与癌基因或原癌基因产物结合参与细胞信号传导,在 Raf-Ras-MAP 激酶信号传导中发挥调节作用,直接影响磷脂酶活性及 Ca^{2+} 有关的信号传导,与 T 细胞活化增殖,细胞凋亡有关^[17]。在 Cos7 细胞中表达一个特异抑制 14-3-3 与其他蛋白质之间相互作用的多肽就可以诱发细胞的凋亡^[18],表明细胞内源性 14-3-3 蛋白与其他蛋白质间的相互作用其总的结果是对抗凋亡的。目前的大多数研究结果认为在 14-3-3 蛋白家族中 14-3-3 σ 具有肿瘤抑制活性,而其他亚型则具有肿瘤促进活性作用。然而,有关 7 个 14-3-3 蛋白亚型之间的功能差异,14-3-3 蛋白与其结合蛋白的精确作用点及其作用机制,与其他肿瘤相关基因的关系等问题仍不甚明了。

本研究发现,RKIP 与 14-3-3 存在相互作用,且它们均可在 Raf-Ras-MAP 激酶信号传导中发挥

调节作用, 故推测它们之间通过相互作用促进该通路的信号传导, 从而对抗凋亡, 在胃癌的发生发展中起作用. 我们还在进行更深入的研究探讨其具体的作用机制.

参 考 文 献

- [1] Katherine D C, Alfred I N. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(3): 354-362
- [2] Fox J G, Wang T C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*, 2007, **117**(1): 60-69
- [3] Fu Z, Smith P C, Zhang L, *et al.* Effects of raf kinase inhibitor on tumor expression cancer. *Int J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**(12): 878-889
- [4] Keller E T, Fu Z, Brennan M. The biology of a prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein. *J Cell Biochem*, 2005, **94**(2): 273-278
- [5] Hagan S, AlMulla F, Mallon E, *et al.* Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(20): 7392-7397
- [6] Schuierer M M, Heilmeier U, Boettcher A, *et al.* Induction of Raf kinase inhibitor protein contributes to macrophage differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**(4): 1083-1087
- [7] 张志强, 张桂英, 李茂玉, 等. 胃癌组织中 Raf 激酶抑制蛋白的表达及临床意义. *中华消化杂志*, 2009, **29**(5): 312-316
Zhang Z Q, Zhang G Y, Li M Y, *et al.* *Clin J Dig*, 2009, **29**(5): 312-316
- [8] 韩海勃, 张志谦, 赵 威. RKIP 蛋白在多个肺癌细胞系中的表达下调. *基础医学与临床*, 2007, **27**(8): 849-852
Han H B, Zhang Z Q, Zhao W. *Basic and Clinical Medicine*, 2007, **27**(8): 849-852
- [9] Zlobec I, Baker K, Minoo P, *et al.* Node-negative colorectal cancer at high risk of distant metastasis identified by combined analysis of lymph node status, vascular invasion, and raf-1 kinase inhibitor protein expression. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(1): 143-148
- [10] Baritaki S, Katsman A, Chatterjee D, *et al.* Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J Immunol*, 2007, **179**(8): 5441-5453
- [11] 陈 彦, 李 君, 易 红, 等. RKIP 低表达与鼻咽癌侵袭转移和 NF- κ B 信号通路活化相关. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(7): 880-889
Chen Y, Li J, Yi H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(7): 880-889
- [12] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, **422**(6928): 198-207
- [13] Shekhouh A R, Thompson C C, Prime W, *et al.* Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics*, 2003, **3**(10): 1988-2001
- [14] Adlard P A, Bush A I. Metals and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2006, **10**(2-3): 145-163
- [15] Tang N, Tomatore P, Weinberger S R. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev*, 2004, **23**(1): 34-44
- [16] He Q Y, Cheung Y H, Leung S Y, *et al.* Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics*, 2004, **4**(10): 3276-3287
- [17] Thorson J A, Yu L W, Hsu A L, *et al.* 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(9): 529-538
- [18] Kuramitsu Y, Baron B, Yoshino S, *et al.* Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-3-3 sigma protein in human scirrhous-type gastric carcinoma cells. *Anticancer Res*, 2010, **30**(11): 4459-4465

Characterization of Interaction Proteins for Gastric Cancer Related Novel Protein RKIP*

GU Huan, YAN Lu, LI Jia, ZHANG Gui-Ying**

(Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract Gastric cancer (GC) seriously impacts on human health with high incidence and mortality rate in the world. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) that was discovered in our previous studies is down-regulated in GC, which is associated with the occurrence, differentiation, invasion, and metastasis of GC. In order to investigate the molecular mechanisms and biological functions of RKIP in the occurrence and metastasis of GC, the fusion expression plasmid pcDNA3.1-RKIP-3xFLAG was transiently transfected into SGC7901 cells with liposome-mediated approach, the RKIP fusion proteins were purified with 3xFLAG tag affinity chromatography, and the RKIP-interacted proteins were identified with electrospray ionization-Quadrupole-time of flight (ESI-Q-TOF) tandem mass spectrometry (MS/MS). A total of 66 RKIP-interacted proteins were MS/MS-identified. The MS/MS-characterized components of the existing interaction complex (RKIP and 14-3-3) were confirmed with Western blotting in combination with co-immunoprecipitation. It is the first time to discover the interaction of RKIP with 14-3-3. This preliminary study on the molecular mechanisms that how RKIP inhibits the occurrence and development of GC provides novel clues for the early-stage diagnosis, prognosis monitoring, and targeted gene therapy of GC.

Key words gastric cancer, Raf kinase inhibitor protein (RKIP), affinity chromatography, proteomics, 14-3-3 proteins

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00260

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81072038), Development and Reform Commission of Hunan Province([2010]1060) and China Hunan Provincial Science and Technology Department (2009JT1010).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84327282, E-mail: guiyingzhang@hotmail.com

Received: June 9, 2011 Accepted: August 22, 2011