

应用蛋白质组学和 RNAi 技术筛选 鼻咽癌细胞中 p53 功能相关蛋白质*

孙 懿^{1,2)} 易 红¹⁾ 杨轶轩¹⁾ 张鹏飞¹⁾ 李茂玉¹⁾
李建玲¹⁾ 杨 芳^{1,2)} 肖志强^{1)**} 陈主初^{1,2)**}

¹⁾中南大学湘雅医院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)

摘要 为了阐明鼻咽癌中高表达的 p53 蛋白聚集与失活的机制, 高通量地检测与 p53 功能相关的蛋白质, 首先采用 RNA 干扰(RNAi)技术稳定沉默鼻咽癌细胞系 CNE2 的 p53 基因表达, 然后用蛋白质组技术研究稳定沉默该基因对鼻咽癌蛋白质表达谱的影响. 通过对稳定干扰 p53 基因后鼻咽癌细胞系 CNE2 的蛋白质表达谱改变的研究, 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析和电喷雾串联质谱(ESI-Q-TOF-MS)验证鉴定了 22 个差异表达蛋白质. 在这些差异表达蛋白质中, 有些是已经报道的 p53 功能相关蛋白质, 如热休克蛋白 27(HSP27)、异质性胞核核糖核蛋白 K(hnRNPK)、14-3-3 σ 等, 其他可能是新的 p53 功能相关蛋白质, 如 eIF4B、TPT1、hnRNPH3、SFRS1 等. 部分差异表达蛋白质如 HSP27、14-3-3 σ 和 GRP75 经蛋白质印迹分析技术进行了验证, 同时 pcDNA3.1-FLAG-p53 质粒转染 CNE2 细胞引起了 HSP27、14-3-3 σ 表达下调, GRP75 表达上调. 在鼻咽癌细胞中鉴定的 22 个差异表达蛋白质大致可以分为 5 类, 包括信号传导相关蛋白质、分子伴侣、与转录和翻译相关蛋白质、代谢相关蛋白和细胞结构相关蛋白质, 涉及到细胞周期的调控、分子基因表达调控、细胞黏附、细胞代谢等众多事件, 它们可能作为 p53 功能相关蛋白质, 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, 蛋白质组学, RNA 干扰, 双向电泳, MALDI-TOF-MS, ESI-Q-TOF

学科分类号 R739.62

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是常见的恶性肿瘤之一, 好发于东南亚地区及我国南方各省市. 病因学研究表明, 鼻咽癌的发生与 EB 病毒感染、遗传易感性、饮食习惯及某些环境理化因素有关, 是多基因、多途径、多阶段改变的病理过程, 为多基因多阶段侵袭性疾病^[1].

p53 基因是极为重要的抑瘤基因, 具有阻滞细胞周期、启动细胞凋亡、维持基因组稳定性的作用^[2]. 50%以上人类肿瘤的发生存在 p53 基因高频率突变失活, 但在鼻咽癌中 p53 基因突变频率低于 10%. 大量的研究显示: 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(overexpression)或称为聚集(accumulation)^[3~5]. 近年来研究认为, 在鼻咽癌细胞中过表达的 p53 蛋白功能可能异常或失活, 从而不能发挥阻滞细胞周期和

诱导凋亡的生物学作用. 由于鼻咽癌中 p53 突变率小, 因此极有可能是细胞蛋白或病毒蛋白与其结合后使其在鼻咽癌中聚集与失活. 有研究发现, 高表达的细胞瘤基因蛋白 MDM2 与 p53 结合抑制 p53 蛋白的转录活性, 加速 p53 蛋白泛素化和降解, 导致 p53 功能失活^[6]. 胡巍等^[7]采用 p53 免疫共沉淀结

* 国家重点基础研究发展规划项目(973) (2002CB513100, 2001CB510207), 教育部跨世纪优秀人才基金项目(教育部科技函[2002] 48 号), 国家自然科学基金项目(30000028, 30240056, 30370642), 湖南省科技厅重大和重点科研项目(04XK1001, 05SK1004-1)和湖南省卫生厅重点科研项目(Z02-04)资助.

** 通讯联系人.

肖志强. Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327332,

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

陈主初. Tel: 0731-4805447, Fax: 0731-4327321,

E-mail: tcbl@xysm.net

收稿日期: 2007-01-16, 接受日期: 2007-02-28

合电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)分析从鼻咽癌细胞的总蛋白质中鉴定了 9 个 p53 结合蛋白, 包括 GRP-78、GRP-75、GRP-94、核纤层蛋白 A/C、DNA 复制准许因子 /MCM3 蛋白、蛋白激酶 C (PKC) 等, 它们可能作为 p53 相互作用蛋白, 与鼻咽癌中 p53 蛋白的聚集有着密切的联系. 热休克蛋白如 HSP-70 和 HSP-90 家族成员可与 p53 蛋白结合导致 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^[8,9]. 另外有研究报道, 鼻咽癌的发生与 EB 病毒感染关系密切, EB 病毒感染与 p53 蛋白过表达 / 集聚呈正相关, EB 病毒的一些基因产物 BZLF1、EBNA-5、EBNA-1、EBNA-2、LMP_s 甚至 EBER_s 可与野生型 p53 蛋白稳定结合, p53 蛋白半衰期延长, 导致 p53 蛋白在鼻咽癌中过表达 / 集聚^[10~13]. 可见鼻咽癌中 p53 蛋白聚集与失活的机制是十分复杂的, 对此进行进一步的深入研究已成为国内外科工作者重要的课题.

蛋白质组学以生命功能执行者——蛋白质为研究主体, 动态、整体、定量地分析细胞蛋白质种类、表达水平和修饰的变化, 从生命本质的层次上研究生命活动的规律以及重要的生理与病理现象^[14]. 蛋白质组学的出现及其研究方法与技术的不断完善和发展, 为从蛋白质整体水平上筛选鼻咽癌中 p53 功能相关的蛋白质分子, 以进一步研究 p53 在鼻咽癌中的作用机制提供了新的工具. 另一方面, RNA 干扰(RNAi)技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达^[15], 为此, 本研究首先采用 RNAi 技术稳定沉默鼻咽癌细胞系 CNE2 的 p53 基因的表达, 然后用蛋白质组学技术高通量的分离、鉴定 p53 沉默鼻咽癌细胞株 CNE2sip53 与稳定转染空白载体的对照鼻咽癌细胞株细胞 CNE2/pSUPER 中差异表达的蛋白质, 并对部分差异表达蛋白质的表达水平进行了验证, 以寻找与 p53 基因功能相关的蛋白质, 为阐明鼻咽癌中 p53 蛋白聚集及失活的机制提供新线索.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. 低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞系 CNE2 由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所保存. 用含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养液进行传代培养.

1.1.2 RNA 干扰体系. pSUPER 载体由李延博士

(University of Texas MD. Anderson Cancer Center, USA) 惠赠. pSUPER 载体是使用 H1 RNA polymerase III promoter 针对人类细胞设计用来表现 siRNA 的载体. 针对 p53 基因(GenBank accession number_AH007667) 靶序列设计的 1 对寡聚脱氧核苷酸链(oligo) 序列如下: sip53a, 5' gatccccGACTCCAGTGGTAATCTACTtcaagagaGTAGATTACCAC TGGAGTCtttttgaaa 3'; sip53s, 5' agctttt ccaaaaa-GACTCCAGTGGTAATCTACTctcttgaaGTAGATTACCAGTGGAGTCggg 3'^[16]. 序列各 64 nt, 其中一段 19 nt 的编码序列同特异的靶基因 p53 同源, 另一段 19 nt 的序列与其反义互补, 中间由短的 9 nt 茎环结构相隔, 单链两端为 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点, 能直接与经 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切的 pSUPER 载体连接. 这 2 条寡核苷酸由 TakaRa 公司合成. 另外, pcDNA3.1-FLAG 以及 pcDNA3.1-FLAG-p53 质粒由曾平耀博士(The Wistar Institute, philadelphia PA, USA) 惠赠.

1.1.3 试剂. 丙烯酰胺、甲叉 - 双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、超纯尿素、CHAPS、IPG 缓冲液(pH 4~7)、24 cm 固相化 pH 4~7 梯度干胶条和覆盖液购自 Amersham Pharmacia 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈和 CCA 购自 Sigma 公司. 鼠抗人 β -Actin 购自 Sigma 公司; 鼠抗人 p53、HSP27 和 GRP75 单克隆抗体, 羊抗人 14-3-3 σ , 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗, 以及兔抗羊二抗购自美国 Santa Cruz 公司; SYBR Green I 混合染料购自 TaKaRa 公司.

1.1.4 仪器: IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪系 Amersham Biosciences 公司产品; Applied Biosystem Voyager-DE STR Biospectrometry™ Workstation System 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪系 ABI 公司产品; Q-TOF micro™ 电喷雾串联质谱系英国 Micromass 公司产品; LightCycler System 荧光 PCR 仪系德国 Roche 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组 pSUPER/sip53 质粒的构建. 将合成的寡核苷酸退火后与用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的 pSUPER 载体连接. 转化感受态细胞及克隆扩增后, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定重组质粒, 并进一步

测序鉴定。

1.2.2 建立 pSUPER/sip53 稳定表达系 CNE2sip53. 在 6 孔板中, 每孔接种 2×10^5 个 CNE2 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 80% 汇合期, 将重组 pSUPER/sip53 质粒 DNA 或者 pSUPER 载体和脂质体混合, 加到细胞中培养 12 h 后, 用 PBS 溶液洗涤转染中的细胞后, 加入完全培养基继续培养. 细胞转染 48 h 后, 用含 2 mg/L Puromycin 的选择性培养基培养, 14 天后挑单个克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系 CNE2sip53-1, CNE2sip53-2 和 CNE2/pSUPER.

1.2.3 阳性克隆实时 RT-PCR 验证. 收集对数生长期的 CNE2sip53-1, CNE2sip53-2 和 CNE2/pSUPER 细胞, 按 Trizol 说明书提取总 RNA, 2 μ g 总 RNA 用 A3500 逆转录试剂盒(Promega 公司)合成 cDNA. 荧光定量 PCR 引物应用 primer 5.0 进行设计, p53s, 5' CCT CCTCAGCATCTTAT-CCG 3'; p53a, 5' CAGCCTGGGCATCCTTG 3'; GAPDHs, 5' GTCAGTGGTGGACCTGACCT 3'; GAPDHs, 5' TGAGGAGGGGAGATTCACTG 3'. 20 μ l 实时定量(Real-time quantitative) RT-PCR 反应体系包括 2 μ l cDNA, 2 μ l 的 SYBR Green 1 混合染料, 0.5 μ l 的 10 μ mol/L PCR 上游引物, 0.5 μ l 的 10 μ mol/L PCR 下游引物, 1 μ l 的 25 mmol/L 氯化镁和 14 μ l 去离子水. 荧光 PCR 仪反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 4 s, 52 $^{\circ}$ C(扩增 p53)或者 55 $^{\circ}$ C(扩增 GAPDH)20 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 重复 40~50 个循环; 60 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C 绘制溶解曲线. 实验结果自动以 CT 值给出, 相对表达量计算按照 Livak 等^[17] $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法进行计算. 实验至少重复 3 次.

1.2.4 阳性克隆蛋白质印迹鉴定. 收集对数生长期的 CNE2sip53-1, CNE2sip53-2 和 CNE2/pSUPER 细胞, PBS 充分清洗后加入预冷的细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L PMSF, 2.5 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP-40, 5 mg/L of aprotinin, pepstatin A 和 leupeptin 1)冰上裂解 40 min. 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 15 min, 取上清即为细胞总蛋白. Bradford 方法测定蛋白质浓度后, 将上清 500 μ g 总蛋白进行 12.5% SDS-PAGE 分离, 蛋白质转移至硝酸纤维膜上, 印迹膜 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:1 000 稀释的鼠抗人 p53 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤 3

次, 每次 10 min. 1:2 000 稀释的羊抗鼠二抗室温温育 1 h 时, PBS 洗涤 3 次, ECL 试剂发光及显影. 以 β -Actin 为内参照. 实验至少重复 3 次.

1.2.5 双向凝胶电泳. 用细胞刮收集对数生长期 CNE2sip53 (即 CNE2sip53-1) 和 CNE2/pSUPER 细胞, 加入细胞裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 100 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2% Pharmalyte, 1 g/L DNase I)裂解 2 h, 低温离心机 12 000 r/min 离心 45 min 后取上清用蛋白质定量试剂盒 2D Quantification kit (Amersham Biosciences)测定蛋白质浓度, 其余分装置-80 $^{\circ}$ C 冻存储用. 细胞总蛋白 1.2 mg 与水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH 4~7, 痕量溴酚蓝)混合, 上样总体积 450 μ l. 30 V 水化 14 h 后经 500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦. 等电聚焦后分别于 10 ml 平衡 A 液(6 mmol/L 尿素, 2% SDS, 30% 甘油, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和 10 ml 平衡 B 液(6 mmol/L 尿素, 2% SDS, 30% 甘油, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)各平衡 15 min. 平衡后的 IPG 胶条转移至 12% 0.75 mm SDS-PAGE 胶上端进行第二向垂直电泳. 考马斯亮蓝染色参照“Blue silver”染色方法^[18].

1.2.6 图像分析. 应用 Imagescanner 扫描仪对考马斯亮蓝染色的 2-DE 胶扫描. 对 CNE2sip53 及 CNE2/pSUPER 每株细胞的 3 张双向电泳图, 使用 PDQuest 2-DE 软件进行匹配成组, 组间比较并选取 2 倍以上变化的蛋白质点为干扰与对照组差异表达的蛋白质分子.

1.2.7 差异蛋白质点 MALDI-TOF-MS 分析. 切割蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 50% 乙腈和 50 mmol 碳酸氢铵脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 40 min, 37 $^{\circ}$ C 酶解 12 h, 30 μ l 萃取液(100% 乙腈与 5% 三氟乙酸 1:1)萃取 60 min, 重复 2 次. 将萃取液收集于 0.5 ml EP 管冷冻浓缩至约 10 μ l, 取 0.5 μ l 样品与 1 μ l 基质液 CCA 混合, 点样于不锈钢板. MALDI-TOF-MS 质谱仪采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压 20 000 V, 反射电压比 1.12, N2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自降解峰

m/z 842.50 和 m/z 2211.10 作为内校正, 获得肽质量指纹图谱. Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定差异表达蛋白质.

1.2.8 差异蛋白质点电喷雾串联质谱(ESI-Q-TOF)分析验证. 为保证蛋白质点鉴定结果的准确性, 所有样品均进行 ESI-Q-TOF 分析, 对部分肽片段测序, 得到相应的肽序列标签. 所有测定均在正离子方式下进行. 雾化气体为氮气, 碰撞气体为氩气. 源温 80℃, 锥孔电压 50 V, TOF 加速电压为 0.2 kV, MCP 检测器电压为 2.7 kV, LC-ESI-MS/MS 自动分析时, 毛细管电压为 3 000 V. 测定结果仪器以 peaklist 文件形式给出, 通过 Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质点, 并得到部分肽片段测序.

1.2.9 蛋白质印迹验证差异蛋白质点表达水平. 方法同前所述, 1 : 1 000 稀释的鼠抗人 HSP27、GRP75 或羊抗人 14-3-3 σ 一抗室温温育 1 h. 实验至少重复 3 次.

1.2.10 pcDNA3.1-FLAG-p53 转染 CNE2 细胞. 在 6 孔板中, 每孔接种 2×10^5 个 CNE2 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 80% 汇合期, 将 pcDNA3.1-FLAG-p53 质粒 DNA 或者 pcDNA3.1-FLAG 载体和

脂质体混合, 加到细胞中培养 6 h 后, 换完全培养基继续培养, 转染 36 h 后收集细胞进行蛋白质印迹分析差异蛋白质 HSP27、14-3-3 σ 和 GRP75 的表达水平.

2 结 果

2.1 pSUPER/sip53 重组体转染、克隆筛选与鉴定

采用脂质体转染技术将 pSUPER/sip53 的真核表达载体导入 CNE2 细胞中, 经 Puromycin 筛选, 挑选抗性克隆扩大培养, 建立稳定的转染细胞系. 用 Real-time quantitative RT-PCR 技术以及蛋白质印迹分析进行了验证, 挑选出稳定干扰 p53 的鼻咽癌细胞系. 实验结果显示 2 株干扰效果较好的细胞系: 在干扰组 CNE2sip53 细胞中, p53 mRNA 的表达被显著的抑制表达下调, 其中 CNE2sip53-1 细胞 p53 mRNA 的表达下调达 99.9%, CNE2sip53-2 表达下调达 97.5% (图 1), p53 蛋白的表达几乎被完全抑制(图 2). 由此证实, 经过稳定转染 siRNA 载体, 得到了能持续表达 p53siRNA 的 CNE2 细胞系, 本研究将 CNE2sip53-1 细胞株命名为 CNE2sip53.

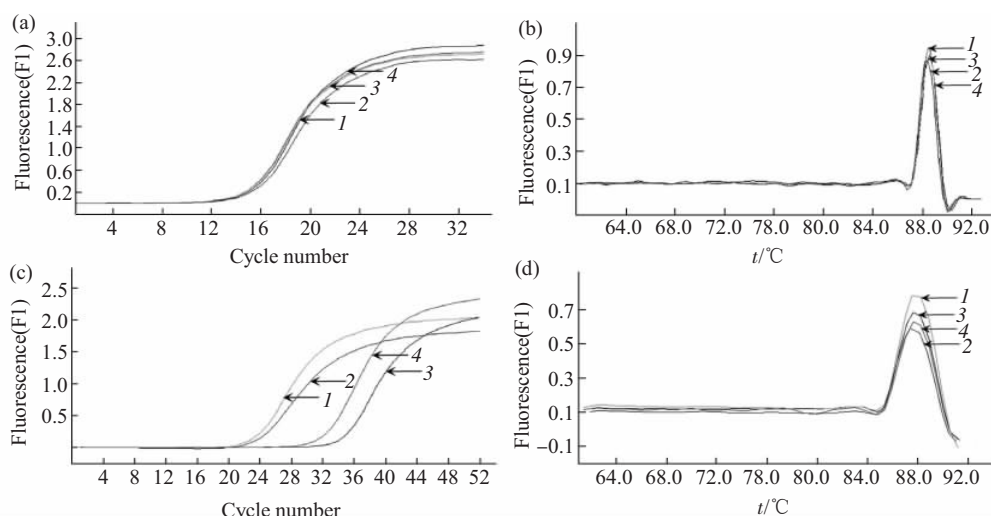


Fig. 1 Representative real-time quantitative RT-PCR analysis for p53 mRNA level

The mRNA expression level of p53 gene was examined and was normalized to that of GAPDH. (a) Graph showed that mRNA levels of p53 significantly decreased in the CNE2sip53-1 and CNE2sip53-2 cell lines. (c) Graph showed that mRNA level of GAPDH among CNE2, CNE2/pSUPER, CNE2sip53-1, CNE2sip53-2 had very little difference. (b) and (d) Graphs showed the melting curve of representative PCR products of p53 and GAPDH respectively. 1: CNE2; 2: CNE2/pSUPER; 3: CNE2 sip53-1; 4: CNE2 sip53-2.

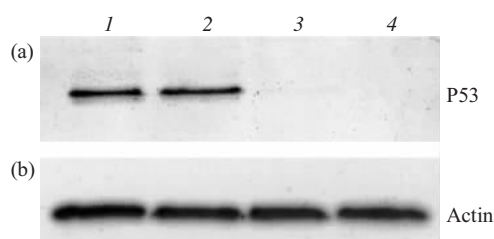


Fig. 2 Western blot detection of p53 expression

(a) Stable expression of p53 siRNA in CNE2sip53-1 (lane 3) and CNE2sip53-2 (lane 4) induced a marked reduction in p53 synthesis. (b) The second blot was probed with anti- β -Actin antibody to control for protein loading. 1: CNE2; 2: CNE2/pSUPER; 3: CNE2sip53-1; 4: CNE2sip53-2.

2.2 双向凝胶电泳图谱的建立

建立了分辨率较高, 重复性较好的细胞蛋白质双向凝胶电泳图谱, 应用 PDQuest 2DE 软件分析 CNE2/pSUPER 和 CNE2sip53 双向电泳图, 分别可检测到大约 1 100 个蛋白质点, 经成组比较共计有 22 个明显差异表达的蛋白质点. 与对照组 CNE2/pSUPER 细胞系相比, 在 CNE2sip53 细胞系中有 13 个点如 8, 14, 19, 21 等表达上调, 而 9 个点包括 7, 15, 16 等表达下调. 其典型的 CNE2/pSUPER 和 CNE2sip53 双向电泳图见图 3a. 图 3b 示局部放大的部分差异表达的蛋白质点.

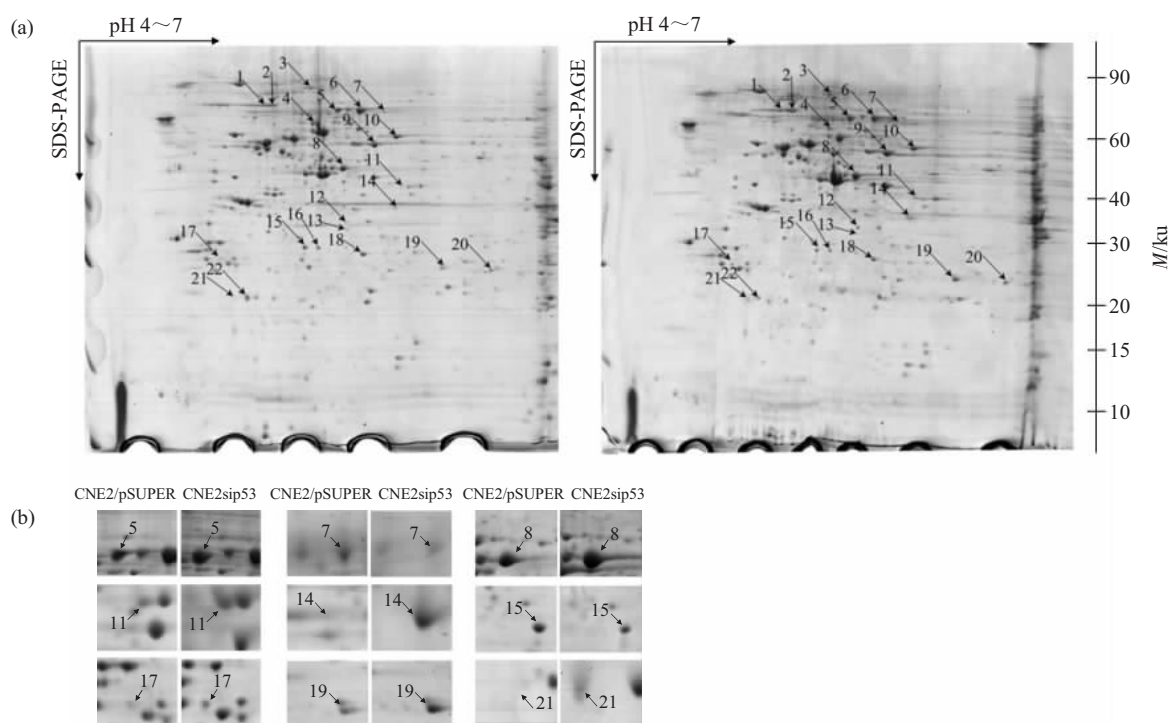


Fig. 3 Representative 2-DE maps of CNE2/pSUPER and CNE2sip53

(a) 22 differential expression proteins spots marked with arrows were identified using both MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS (Table 2). (b) Close-up image of partial differential expression protein spots between CNE2/pSUPER and CNE2sip53.

2.3 差异蛋白质点的质谱鉴定

22 个差异蛋白质点经酶解, 经 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析及 ESI-Q-TOF 肽序列标签验证全部得以鉴定, 其中 8 号 cytokeratin 18 蛋白鉴定见图 4 和图 5. 8 号蛋白的肽质量指纹图谱检索 SwissProt 数据库提示为 cytokeratin 18 蛋白, 经 ESI-Q-TOF 验证, 来自 8 号蛋白的肽片段 m/z 2 854.47 被鉴定为 SLGSVQAPSYGARPVSSAAS VYAGAGGSGSR 为 cytokeratin 18 蛋白氨基酸序列的一部分. 22 个明显差异表达的蛋白质点的详细名

称见表 2. 这些蛋白质根据数据库查询的功能大致可以分为 5 类: 信号传导相关蛋白质, 分子伴侣, 与转录和翻译相关蛋白质, 代谢相关蛋白和细胞结构相关蛋白质 (表 2).

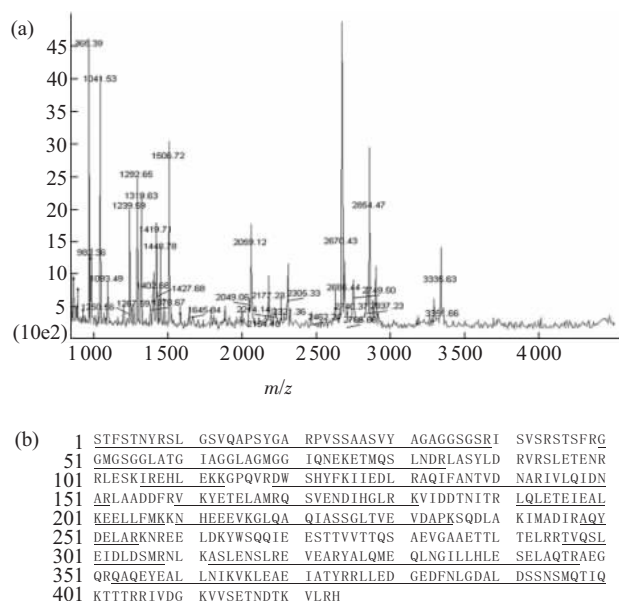
2.4 差异蛋白质点的表达水平验证

为了进一步验证比较蛋白质组学研究的结果, 我们应用蛋白质印迹检测了部分蛋白质在细胞中的表达水平. 图 6 显示蛋白质印迹分析 HSP27、14-3-3 σ 蛋白表达上调, GRP75 表达下调与蛋白质组学分析结果一致.

Table 2 MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS identified proteins in CNE2/pSUPER vs. CNE2sip53 comparison

Spot No.	Accession number	Protein name	% Cov ¹⁾	Score ¹⁾	Mass/u	pI	CNE2sip53 vs. CNE2/pSUPER		Function
							Av.ratio	p-value	
1	A29821	dnaK-type molecular chaperone precursor (GRP78) HSPA5	39	252	72 185	5.03	2.10	0.001	Chaperone
2	A29821	dnaK-type molecular chaperone precursor (GRP78) HSPA5	43	211	72 185	5.03	2.35	0.001	Chaperone
3	T02243	Probable transitional endoplasmic reticulum ATPase	50	242	89 950	5.14	2.13	0.002	Metabolism
4	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	57	189	51 230	5.39	0.38	0.002	Signal transduction
5	Q53HF2	Heat shock 70 ku protein 9B precursor	40	161	73 920	5.87	2.33	0.001	Chaperone
6	AAA67526	GRP75	44	204	74 019	5.97	0.50	0.001	Chaperone
7	S12566	Translation initiation factor eIF4B	22	72	69 240	5.49	0.43	0.010	Transcription & translation
8	P05783	Cytokeratin 18	67	275	47 305	5.27	2.08	0.008	Cytoskeleton
9	Q6P4C7	Cytokeratin 8	69	216	55 874	5.62	2.74	0.027	Cytoskeleton
10	S68363	Protein disulfide-isomerase ER60 precursor	49	165	57 146	5.98	2.01	0.037	Metabolism
11	P05388	Ribosomal protein P0	33	135	34 424	5.42	2.87	0.010	Signal transduction
12	Q15181	Inorganic pyrophosphatase	37	69	33 095	5.54	3.01	0.001	Metabolism
13	P02647	Crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A- I	39	71	28 061	5.27	0.47	0.003	Metabolism
14	P07195-00-09-00	(LDHB_HUMAN) splice isoform displayed	35	79	36 655	5.72	3.51	0.013	Metabolism
15	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (SFRS1) protein	50	82	22 560	7.72	0.31	0.001	Signal transduction
16	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (SFRS1) protein	50	94	22 560	7.72	0.34	0.001	Signal transduction
17	P31947	14-3-3 protein sigma (Stratifin) (Epithelial cell marker protein 1)	60	137	27 871	4.68	2.55	0.002	Signal transduction
18	P35232	Prohibitin	84	240	29 859	5.57	0.48	0.001	Signal transduction
19	E980237	Heat shock protein27	78	122	22 427	7.83	2.5	0.001	Chaperone
20	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3)	51	110	31 505	6.76	2.01	0.004	Signal transduction
21	O43169	Cytochrome b5	49	75	16 436	4.78	2.21	0.009	Metabolism
22	Q5W0H4	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	59	125	21 626	5.34	0.48	0.020	Transcription & translation

Differentially labelled proteins from 2D analysis were identified by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting and ESI-Q-TOF-MS. The % coverage of analysed peptides, the score from Mascot searches, the mass and pI (from the database) and Swiss-Prot accession number are shown for each protein. Proteins displaying an average fold-difference of ≥ 2 fold up (+) or down (–) regulation between pairs of conditions where $P < 0.05$. ¹⁾ MALDI-TOF result of % coverage of analysed and the score from Mascot searches.



CNE2细胞后表达水平的改变.图7显示蛋白质印迹分析与CNE2和转染pcDNA3.1-FLAG载体相比,pcDNA3.1-FLAG-p53转染CNE2细胞引起p53表达显著增加,同时HSP27、14-3-3 σ 蛋白表达下调,GRP75表达上调,与p53被稳定干扰后蛋白质表达水平的变化正好相反,进一步说明它们确实是p53功能相关蛋白质.

3 讨 论

蛋白质组是指“一个细胞或一个组织基因组所表达的全部蛋白质”.蛋白质组学是指应用各种技术手段来研究蛋白质组的一门学科,其目的是从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分,了解蛋白质之间的相互作用和相互联系,揭示蛋白质功能和细胞生命活动规律^[14].由于蛋白质是细胞和组织的生命现象和生理活动的主要执行者,应用蛋白质组学的技术筛选p53功能相关的蛋白质有着重要的价值,它是一种新的尝试.本研究采用RNA干扰(RNAi)技术建立了稳定沉默p53基因的鼻咽癌细胞系CNE2sip53,用蛋白质组学技术分离、鉴定CNE2sip53细胞与稳定转染空白载体的对照鼻咽癌细胞株细胞CNE2/pSUPER中差异表达的蛋白质,成功地鉴定出22种p53功能相关的蛋白质,其中有14种蛋白质包括HSP27,14-3-3 σ ,GRP78,HSP70等在CNE2sip53中表达上调,8种蛋白质包括hnRNP K,eIF4B,TPT1等在CNE2sip53中表达下调.其中eIF4B,TPT1,hnRNP H3,SFRS1是首次报道可能与p53功能相关的蛋白质.为探讨鼻咽癌中过表达的p53蛋白聚集及失活的机制提供了重要依据和线索.

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是生物体(或离体培养的细胞)在不良环境因素或者其他因素如感染、恶性肿瘤作用下诱导产生的具有高度保守性的应激蛋白,与肿瘤的发生、发展、肿瘤免疫以及机体对肿瘤治疗药物耐药性的发生和肿瘤的预后等都有密切关系^[19].Wu和Taira等^[20,21]的研究表明,p53可以通过与CCAAT结合因子(CBF)来抑制HSP70的基因转录.Wadhwa等^[9]实验证明,mot-2/mthsp70/GRP75能结合在p53蛋白C端312~352氨基酸残基部位,有多个结合位点,使野生型p53失去了对转化细胞的抑制作用,导致细胞恶性转化,从而使得转化细胞永久性增殖.同时有研究发现,HSPs通过影响细胞增殖过程必需的蛋白质构象而参与细胞周期.在神经母细胞瘤、乳

腺癌、结肠癌、视网膜母细胞瘤等肿瘤中都发现HSPs能够与p53聚合在一起形成复合体,延长p53蛋白的半衰期,从而增加了p53的稳定性导致p53的积聚和功能失活^[9,22,23].本研究发现HSP27,HSP70等HSPs在CNE2sip53中的高表达,可能与失去p53的转录抑制有关,它们作为分子伴侣,可能在鼻咽癌细胞不断增殖过程中协助蛋白质的合成和稳定,帮助其适应或耐受不利的生长环境,有利于鼻咽癌细胞的生存和增殖.再者,本研究将野生型p53转染鼻咽癌CNE2细胞后引起HSP27表达下调以及GRP75表达上调,证明它们确实作为p53功能相关蛋白质,在鼻咽癌中可能通过与p53蛋白相互作用或者改变自身构象来协调p53构象的平衡,保护p53免受蛋白酶的降解,使p53在胞质半衰期延长,同时通过参与p53的胞质装配、核转运来调控p53功能^[24],在鼻咽癌中p53蛋白聚集及失活发挥重要的作用.

与信号转导相关的蛋白质核内不均一核糖核蛋白K(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP K)在CNE2sip53中低表达,14-3-3 σ 蛋白在CNE2sip53中高表达.hnRNP K是一种进化高度保守的核内RNA结合蛋白,参与从染色体的再塑,转录调节,前体mRNA剪接到mRNA输出等多种生物过程,从而进行基因表达调控^[25].研究发现,hnRNP K作为DNA损伤引起的p53转录辅激活因子,通过增强c-myc,EGR和BRCA1基因的表达,在DNA损伤引起的p53依赖的细胞周期俘获中起着重要的作用^[26].14-3-3 σ 蛋白可被 γ 射线和其他DNA损伤试剂强烈诱导,是通过结合和分离磷酸化蛋白来调节细胞活性的蛋白质家族中的一员.其诱导作用可通过位于转录起始位点上游1.8 kb的p53应答元件介导,当14-3-3 σ 活化和表达增加后,使胞质中CDK1/cyclinB1复合物(促使细胞周期从G2期向M期过渡)分离,从而阻断CDC2和CDK1的相互作用并阻止细胞进入有丝分裂,使p53通过14-3-3 σ 完成对G2/M期调控^[27,28].本研究中与转录和翻译相关蛋白质真核起始因子4B(eukaryotic initiation factor 4B, eIF4B)在CNE2sip53中低表达.eIF4B能促进eIF4A和eIF4F翻译激活中RNA依赖的ATP水解活性和ATP依赖的RNA解旋活性^[29].研究报道,p53的激活引起caspase非依赖蛋白的表达下调,同时可引起作为凋亡细胞水解底物和蛋白质合成中其重要作用的eIF4GI和eIF4B裂解^[30].但文献中尚未见报道

14-3-3 σ 、hnRNPK 和 eIF4B 在鼻咽癌中与 p53 功能相关, 它们在鼻咽癌中可能作为新的 p53 功能相关的蛋白质, 为鼻咽癌 p53 蛋白聚集及失活的机制提供了重要线索, 其机理和意义有必要进一步研究。

此外, 本研究识别的 p53 功能相关蛋白质还有与代谢相关蛋白, 如细胞色素 b5 (Cytochrome b5, CYTb5), 无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase)和过渡型内质网 ATP 酶(transitional endoplasmic reticulum ATPase)等, 细胞结构相关蛋白质, 如细胞角蛋白 8 (cytokeratin 8), 细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18). 研究显示, CK8 和 CK18 为骨架蛋白的一部分, 是单层上皮的标志角蛋白, 作为细胞中间丝的主要组成, 有骨架功能和信息功能, 在调节肿瘤细胞的侵袭和转移过程中发挥重要作用^[3]. 但是上述蛋白在鼻咽癌研究的文献中未见报道与 p53 功能相关, 这些新的 p53 功能相关蛋白质与鼻咽癌中高表达的 p53 的关系有待进一步研究。

在本研究中, 运用 RNAi 技术稳定特异性剔除鼻咽癌细胞中 p53 基因的表达, 建立了 CNE2/pSUPER 及 CNE2sip53 细胞的双向电泳图谱, 高通量地识别并鉴定了 2 种细胞之间的 22 个差异蛋白质, 应用蛋白质印迹验证了部分差异蛋白 HSP27、14-3-3 σ 和 GRP75 的表达水平, 并用瞬时转染 p53 进一步证实它们与鼻咽癌细胞中 p53 功能相关. 这些资料为揭示鼻咽癌中可能存在的新的 p53 信号通路以及为研究 p53 蛋白聚集及失活提供了新线索。

参 考 文 献

- Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 2005, **365** (9476): 2041~2054
- Oren M. Decision making by p53: Life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 2003, **10** (4): 431~442
- Sheu L F, Chen A, Meng C L, *et al.* Analysis of bcl-2 expression in normal, inflamed, dysplastic nasopharyngeal epithelia, and nasopharyngeal carcinoma: Association with p53 expression. *Hum Pathol*, 1997, **28** (5): 556~562
- Porter M J, Field J K, Lee J C, *et al.* Detection of the tumor suppressor gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res*, 1994, **14** (B): 1357~1360
- Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P, *et al.* p53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J Pathol*, 1993, **170** (4): 457~461
- Midgley C A, Lane D P. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*, 1997, **15** (10): 1179~1189
- 胡巍, 肖志强, 陈主初, 等. 鼻咽癌细胞中 p53 相互作用蛋白的分离和鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (7): 623~634
- Hu W, Xiao Z Q, Chen Z C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (7): 623~634
- Davidoff A M, Iglehart J D, Marks J R. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (8): 3439~3442
- 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
- 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 Virol*, 1995, **69** (3): 1851~1859
- Szekely L, Selivanova G, Magnusson K P. EBNA-5, an Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (12): 5455~5459
- Mausser A, Saito S, Appella E. The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 regulates p53 function through multiple mechanisms. *J Virol*, 2002, **76** (24): 12503~12512
- Shi W, Patak I, Mac Millan C, *et al.* Molecular pathology parameters in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2002, **94** (7): 1997~2006
- Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, **13** (1): 19~50
- Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494~498
- Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550~553
- Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C} (T). *Methods*, 2001, **25** (4): 402~408
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, **25** (9): 1327~1333
- Samali A, Cotter T G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*, 1996, **223** (1): 163~170
- Wu G, Osada M, Guo Z, *et al.* DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res*, 2005, **65** (3): 758~766
- Taira T, Sawai M, Ikeda M, *et al.* Cell cycle-dependent switch of up-and downregulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem*, 1999, **274** (34): 24270~24279
- Zylicz M, King F W, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J*, 2001, **20** (17): 4634~4638
- Wadhwa R, Takano S, Robert M, *et al.* Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, an hsp70 family member. *J Biol Chem*, 1998, **273** (45): 29586~29591
- Iwaya K, Tsuda H, Fujita S, *et al.* Natural state of mutant p53 protein and heat shock protein 70 in breast cancer. *Lab Invest*, 1995, **72** (6): 707~714

- 25 Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J. hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*, 2004, **26** (6): 629~638
- 26 Moumen A, Masterson P, O'Connor M J, *et al.* hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*, 2005, **123** (6): 1065~1078
- 27 Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, *et al.* 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1997, **1**: 3~11
- 28 Chan T A, Hermeding H, Lengauer C, *et al.* 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 1999, **401** (6753): 616~620
- 29 Rogers Jr G W, Richter N J, Lima W F, *et al.* Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem*, 2001, **276** (33): 30914~30922
- 30 Constantinou C, Bushell M, Jeffrey I W, *et al.* p53-induced inhibition of protein synthesis is independent of apoptosis. *Eur J Biochem*. 2003, **270** (15): 3122~3132
- 31 Chu Y W, Seflor E A, Romer L H, *et al.* Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol*, 1996, **148** (1): 63~69

Identification of Proteins Associated With p53 in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line CNE2 by Proteomics and RNAi Techniques*

SUN Yi^{1,2}, YI Hong¹, YANG Yi-Xuan¹, ZHANG Peng-Fei¹, LI Mao-Yu¹,

LI Jian-Ling¹, Yang Fang^{1,2}, XIAO Zhi-Qiang¹**, CHEN Zhu-Chu^{1,2}**

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

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

Abstract In order to elucidate the mechanisms of p53 overexpression in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and detect proteins associated with the function of p53 in high throughput screening, p53 which knockdown human NPC CNE2 cell line (CNE2sip53) were successfully established by using stable RNA interference (RNAi). Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to separate the total proteins of CNE2sip53 and its control cell line CNE2/pSUPER, and PDQuest software was applied to analyze 2-DE images. Twenty-two differential protein spots were identified by both MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS, some of which are known to be associated with the p53 function (HSP27, hnRNP K, 14-3-3 σ etc.) , and others may be novel proteins associated with p53 function (eIF4B, TPT1, hnRNP H3, SFRS1 etc.). Furthermore, the differential expression levels of the partial proteins (HSP27, 14-3-3 σ , GRP75) were confirmed by Western blot analysis and compared with CNE2 and CNE2 cells transfected with pcDNA3.1-FLAG, CNE2 cells transfected with pcDNA3.1-FLAG-p53 had obvious down-regulations of HSP27 and 14-3-3 σ , and an up-regulation of GRP75. The 22 differentially expressed proteins could be divided into five groups based on their functions: signal transduction, chaperone, transcription and translation, metabolism and cytoskeleton, which were involved in cell cycle, the transcription regulation, cell adherence, cellular metabolism and so on. The data suggest that these differential proteins may be associated with the function of p53 in NPC, and will be valuable for further to study the mechanisms of p53 overexpression and inactivation in NPC.

Key words p53, nasopharyngeal carcinoma, proteomics analysis, RNAi, two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-MS, ESI-Q-TOF-MS

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (973)(2001CB510207), Outstanding Scholars of New Era from Ministry of Education of China (2002-48), The National Natural Science Foundation of China (30000028, 30240056, 30370642), Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan, China (04XK1001-1, 05SK1004-1) and Key Research Program from Public Health Bureau of Hunan Province, China (Z02-04).

**Co-corresponding author .

XIAO Zhi-Qiang. Tel: 86-731-4327239, Fax: 86-731-4327332, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

CHEN Zhu-Chu. Tel: 86-731-4805447, Fax: 86-731-4327321, E-mail: tcb1@xysm.net

Received: January 16, 2007 Accepted: February 28, 2007