

应用磷酸化蛋白质组学方法初步研究 喉癌相关基因 LCRG1 的功能*

章晓鹏^{1,2)} 肖志强¹⁾ 李 萃¹⁾ 李建玲¹⁾ 余艳辉²⁾
欧阳咏梅²⁾ 冯雪萍¹⁾ 张鹏飞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⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 mRNA 差异显示技术克隆的喉癌相关基因 LCRG1, 对不表达该基因的喉癌细胞系 (Hep-2) 的生长具有明显抑制作用. 软件分析推测, LCRG1 可能在细胞信号传导中发挥作用. 为进一步地研究 LCRG1 的功能, 应用 RT-PCR 和平板克隆形成实验证实, 经多次传代的 Hep-2/LCRG1 细胞, 仍表达 LCRG1, 且 LCRG1 具有显著的抑制细胞增殖的能力. 抽提 Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+)-细胞系总蛋白质, 应用固相 pH 梯度 (IPG) 双向凝胶电泳 (2DGE), 结合抗酪氨酸磷酸化抗体的免疫印迹和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS), 鉴定酪氨酸磷酸化的蛋白质. 得到了分辨率较高、重复性较好的 Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+)-细胞系的总蛋白质双向凝胶电泳图谱; 结合免疫印迹反应、软件分析和质谱技术识别并鉴定了 13 个差异反应的酪氨酸磷酸化的蛋白质. 这些蛋白质参与了细胞信号传导和细胞代谢等过程. 推测 LCRG1 可能是通过调节这些蛋白质的酪氨酸磷酸化、去磷酸化状态, 参与细胞增殖、代谢和凋亡等过程的调控, 而发挥抑瘤作用. 这为全面、真实地揭示 LCRG1 抑瘤作用的分子机理提供了新思路.

关键词 LCRG1 基因, Hep-2/LCRG1 细胞系, Hep-2/pcDNA3.1(+)-细胞系, 双向凝胶电泳, MALDI-TOF-MS, 免疫印迹, 酪氨酸磷酸化蛋白质, 蛋白质印迹

学科分类号 R739.6, Q51

喉癌在头颈部恶性肿瘤中的发病率较高, 它的发生、发展是一个多阶段、多步骤的过程, 与多个基因的表达调控改变相关. 我室利用 mRNA 差异显示技术, 克隆了一个位于喉癌高频率杂合性丢失区域 (17q12~17q21.1) 的候选肿瘤抑制基因 LCRG1 (GenBank 登录号为 AF268387)^[1-3]. 通过构建重组表达载体 pcDNA3.1(+)-LCRG1, 将 LCRG1 转染 Hep-2 喉癌细胞系, 发现该基因对细胞的生长具有明显的抑制作用^[4,5]. 通过软件分析发现, 其有三个蛋白激酶 C 的磷酸化位点、一个酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点. 因此, 推测 LCRG1 可能通过参与信号传导的过程发挥抑制肿瘤生长的作用.

蛋白质的磷酸化和去磷酸化调节着几乎所有的生命活动过程. 酪氨酸磷酸化和去磷酸化这一可逆过程参与了高等真核生物细胞信号传导、细胞分化和细胞生长等重要过程. 激活受体酪氨酸激酶可以使酪氨酸磷酸化, 从而激活下游的信号传导通路. 受体酪氨酸激酶可以激活如 RAS-MAPK 和 TGF- β 信号传导通路, 从而参与肿瘤发生和发展的过程^[6].

因而, 发现和鉴定受 LCRG1 调控的磷酸化蛋白质, 将有助于进一步阐述 LCRG1 的抑瘤机制.

本研究应用细胞平板克隆实验, 分析了 Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+)-细胞系的生物学特性. 同时, 应用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术分离 Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+)-细胞系的总蛋白质, 得到了对应组的制备胶和分析胶. 将分析胶得到的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上, 结合抗酪氨酸磷酸化抗体的免疫印迹方法, 以期检测出酪氨酸磷酸化蛋白质. 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 及数据库搜索对酪氨酸磷酸化的蛋白质进行鉴定. 再根据 SWISS

*国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB510207), 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 (教育部科技函 [2002] 48), 湖南省科技厅重大科技专项 (04XK1001), 湖南省科技厅重点科研项目 (02SSY2001-1) 和湖南省卫生厅重点科研项目 (Z02-04).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327332, E-mail: tcbl@xyssm.net

收稿日期: 2004-12-21, 接受日期: 2005-03-28

PROT数据库的注释及文献资料,对鉴定出来的磷酸化蛋白质进行了亚细胞定位和功能分类,以期全面、真实地揭示LCRG1抑癌作用的分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. Hep-2/LCRG1、Hep-2/pcDNA3.1(+)细胞由本室建株; Hep-2细胞购自ATCC公司。

1.1.2 主要试剂. Taq DNA聚合酶、逆转录试剂盒(Promega公司); TRIzol™总RNA抽提试剂(GIBCOBRL公司); 引物合成(上海博亚生物技术有限公司); 硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、氯化钙(CaCl_2)、铁氰化钾 $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲-酮-胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)、三氟乙酸(TFA)、基质a-氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)、钒酸钠(Na_3VO_4)、leupeptin、aprotinin、phosphatase inhibitor cocktail 1、phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma公司); 乙腈(Fisher公司); 固相pH梯度干胶条(IPGstrip pH3-10L, 13 cm)、IPG缓冲液(pH 3~10L)、两性电解质(pharmalyte, pH 3~10)、尿素、2-D定量试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗、硝酸纤维素膜、高敏胶片(Hyperfilm™)、ECL蛋白质印迹检测试剂盒(Amershan Pharmacia公司); 抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体4G10(Upstate公司)。所有溶液均用双蒸水配制。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 鉴定高表达LCRG1的Hep-2细胞. 依据TRIzol说明书操作,抽提细胞总RNA。取2 μg RNA样品,加1 μl Oligo(dT)₁₅ (0.5 g/L), 65℃变性10 min,冰上骤冷后加入10 × 逆转录缓冲液2 μl , 25 mmol/L MgCl_2 4 μl , 10 mmol/L dNTP 2 μl , RNasin 0.5 μl (40 U/ μl), AMV 酶 0.75 μl (25 U/ μl), 无RNA酶水补至总体积20 μl 。42℃反应60 min, 95℃灭活5 min,冰上骤冷。取逆转录产物2 μl 进行PCR反应。30 μl 反应体系包括: 1 × PCR缓冲液, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTP, LCRG1上、下游引物各0.5 $\mu\text{mol/L}$, Taq酶2U。94℃预变性5 min后, 94℃45 s, 52℃45 s, 72℃60 s, 32个循环; 72℃延伸10 min。产物1%琼脂糖凝胶电泳检测。扩增LCRG1cDNA序列的引物: V_LF为5' CG GGA TCC ATC GCG CGA CTC GTG GCA GTG 3', V_LR为5' GC TCT AGA GCA AAT TAC ATA CTC ATA CC 3', 扩增产物大小为

896 bp。

1.2.2 细胞平板克隆形成实验. 取对数生长期的细胞用胰酶消化后计数,六孔板接种,每孔细胞数为500个。37℃、5% CO_2 培养2周,弃去培养基,甲醇固定,0.4%结晶紫染色,镜下计数含50个细胞以上的克隆数。然后按公式计算克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%。应用统计学软件SPSS10.0分析各组细胞的集落形成数和集落形成率。

1.2.3 细胞总蛋白质的抽提. 培养细胞传代后24 h,先用冰预冷的1×PBS洗2次,再用细胞刮子轻轻地刮下贴壁细胞,1 000 g离心10 min (×2次)收集细胞。大约 1×10^7 个细胞,加入200 μl 裂解液(7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、2% NP-40、1% Triton X-100、65 mmol/L DTT、5 mmol/L PMSF、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、2% pharmalyte (pH 3~10)、25 mg/L DNase I、7 mg/L RNase A、20 mg/L aprotinin、20 mg/L leupeptin、2 mmol/L Na_3VO_4 、phosphatase inhibitor cocktail 1和phosphatase inhibitor cocktail 2),室温下裂解1 h,平均每隔5 min漩涡1次。4℃,12 000 r/min离心40 min,吸取上清,参照2-D定量试剂盒说明书对总蛋白质浓度进行检测。浓度测定后,立刻进行一向等电聚焦。

1.2.4 固相pH梯度双向凝胶电泳. 为便于鉴定检测出的磷酸化蛋白质,每组样品平行进行两块胶的2DGE。一份作为制备胶(300 μg 的蛋白质用于银染胶),一份作为分析胶(600 μg 蛋白质用于分析胶)。2DGE主要按IPGphor等电聚焦系统指南和Gorg等^[7]的方法进行。一向(pH 3~10L, 130 mm × 3 mm × 0.5 mm)参数如下: 30 V低电压水化12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h,最后8 000 V等电聚焦3 h。等电聚焦结束后,分别将胶条进行两次平衡,然后转移胶条至12.5%的0.75 mm厚的凝胶上端,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。二向在15℃,衡功率的条件下进行,先以2.5 W/胶电泳30 min,而后17 W/胶电泳约5 h,直至溴酚蓝指示线到达凝胶底边处。用改良的银染方法^[8]对电泳得到的制备胶进行染色。

1.2.5 蛋白质印迹分析. 用TE70半干转印仪0.8 mA/cm²电转移分析胶上分离的蛋白质到硝酸纤维素滤膜上。TBS-0.1% Tween-20溶解的1% BSA室温封闭1 h,抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体(4G10) 1:1 000稀释于含1% BSA的TBS-0.1% Tween-20

溶液中, 4℃孵育过夜. 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1:2 500, 室温孵育 1.5 h. ECL 检测、曝光、显影; 获得蛋白质印迹图谱.

1.2.6 凝胶图像分析. 通过 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件对制备胶以及蛋白质印迹图谱进行扫描获取图像. 利用 Discovery Series™ PDQuest 2-DE 胶分析软件对图像进行点检测、匹配等分析. 所有数据的统计分析在 SPSS10.0 软件上进行.

1.2.7 MALDI-TOF-MS. 选取感兴趣的蛋白质点, 另选取在两块胶上认为匹配的点以及空白胶(溴酚蓝以外的胶)作为对照, 切下的蛋白质点置于 Eppendorf 管中, 用 100 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和 30 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) 进行脱色, 然后用 100 mmol/L NH_4HCO_3 、10 mmol/L DTT 于 57℃ 还原 1 h, 再在暗处用 100 mmol/L NH_4HCO_3 、55 mmol/L 碘乙酰胺烷基化 30 min, 冻干后加入 40 mmol/L NH_4HCO_3 、9% CAN 和 20 mg/L Trypsin, 37℃ 酶解 16 h. 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清用 Millipore 公司 ZIPTIP™C18 微柱进行脱盐后与 CCA 基质液混和, 轻微涡旋后均匀点样 1 μl 于不锈钢点样板上, 空气中自然风干待分析. 将制备好的点样板置于 Applied Biosystems Voyager System 4307 MALDI-TOF-MS 仪上进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压为 20 000 V, 反射电压比为 1.12, N_2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 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动降解离子峰作为内部标准校正, 获取了肽质量指纹图.

1.2.8 Database 搜索和磷酸化位点预测. 应用在线软件 Mascot Distiller (<http://www.matrixscience.com>) (MSDB or NCBI 数据库) 进行搜寻. 搜寻参数如下: 肽质量指纹图中的肽片段质量选择在 1 000~3 000 u 范围, 可耐受的精确程度为 $\pm 2 \times 10^{-4}$, 每个肽允许有一个不完全裂解位点, 最少匹配肽片段数为 4, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-cys), 可变修饰为 oxidation (M), 物种来源选择全种, 离子选择 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 模式为 Monoisotopic. 蛋白质分数高于 75 分认为有显著性差异 ($P < 0.05$). 另外, 对于已经鉴定的蛋白质点应用在线软件 NetPhos WWW server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 对酪氨酸磷酸化的位点进行预测.

2 结 果

2.1 RT-PCR 鉴定高表达 LCRG1 的 Hep-2 细胞

以 A549 细胞为阳性对照, 重组质粒 pcDNA3.1(+)/LCRG1 转染 Hep-2 细胞抗性克隆经 RT-PCR 鉴定, 发现 8 号、9 号、10 号、14 号和 17 号克隆为 LCRG1cDNA 高表达, 选择 10 号 (lane 6) 克隆为实验对象.

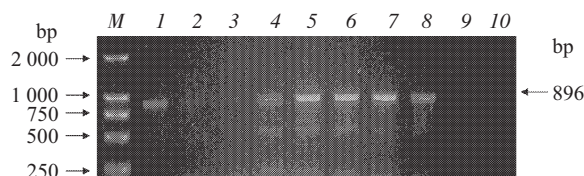


Fig.1 RT-PCR analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) /LCRG1 transfected Hep-2 anti colonies

M: DL2 000 marker(2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp); 1: positive control A549 cell line; 2~8: anti colonies of Hep-2 cells transfected with pcDNA3.1(+)/LCRG1(number 5, 7, 8, 9, 10, 14, 17), 6 (number 10): as the experimental cells for the highest expressed LCRG1 cDNA; 9: Hep-2/pcDNA3.1(+) cell line; 10: negative control.

2.2 细胞平板克隆形成实验

以空白组 Hep-2 细胞、Hep-2/pcDNA3.1(+) 细胞为对照, 接种 Hep-2/LCRG1 细胞于六孔板中. 从图 2 和表 1 结果发现, Hep-2/LCRG1 组(图 2a)与载体对照组(图 2b)和空白对照组(图 2c)比较均具有明显差异 ($P < 0.01$), 两个对照组间无显著性差异. 说明: Hep-2/LCRG1 细胞的增殖能力比对照组显著降低, LCRG1 具有抑制 Hep-2 细胞增殖的作用.

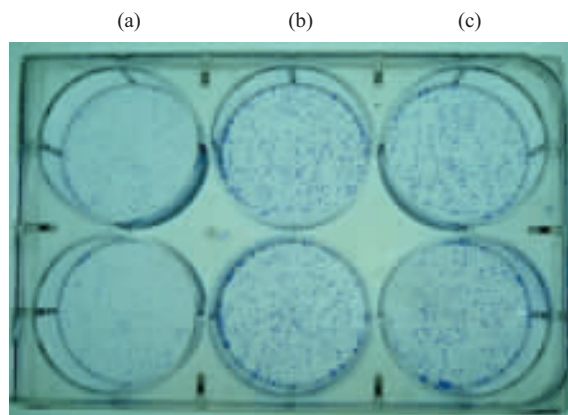


Fig.2 The colony efficiency of Hep-2/LCRG1 (a), Hep-2/pcDNA3.1(+) (b) and Hep-2 (c) cell lines

Table 1 The colony efficiency of cell lines		
Groups	Colony forming number	Colony forming rate/%
Hep-2/LCRG1	174±9	34.6
Hep-2/pcDNA3.1(+)	439±16	87.8
Hep-2	458±10	91.6

$P < 0.01$.

2.3 制备胶蛋白质谱、分析酪氨酸磷酸化蛋白质点的分析

Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+)细胞系，每组平行进行两块胶的双向凝胶电泳. 其中一块作为制备胶，另一块作为分析胶. 制备胶经银染留做分析和鉴定；分析胶分离的蛋白质经电转移至硝酸纤维素膜上，然后与抗酪氨酸磷酸化的抗体孵育，以检测酪氨酸磷酸化的蛋白质. 采用 Imagescanner 扫描仪扫描银染制备胶以及蛋白质印迹图谱获取图像. 图 3 为两组细胞的银染图，图 4 为免疫印迹之后的两组细胞的蛋白质印迹图谱. 应用 PDQuest 7.1 软件对两组细胞蛋白质印迹图谱进行分析，寻找差异反应蛋白质点. 在这些差异表达的蛋白质点中，有仅仅在 Hep-2/LCRG1 组中表达的，如 spot 24 等，有仅仅在 Hep-2/pcDNA3.1(+)组表达的,如 spot 17、19、28 等. 其余的反应蛋白质点是在两组细胞中均有表达，但是酪氨酸磷酸化表达水平不一致. 将这些差异反应的蛋白质点进行比较分析发现，在转染 LCRG1 组中表达水平增加的点，如 spot 1、2、3、4、12、14 等；表达水平降低的点，如 spot 30、31、32 等.

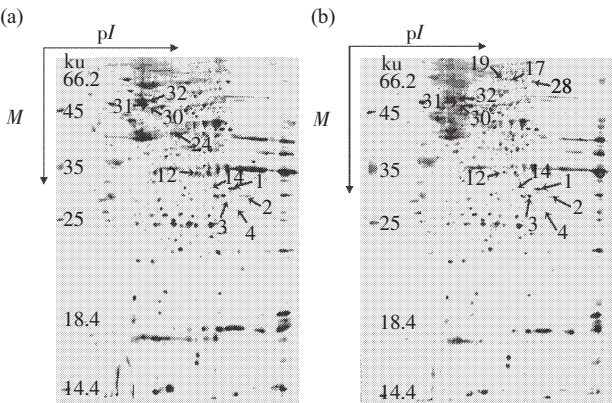


Fig.3 2-D gel proteins separation of Hep-2/LCRG1 (a) and Hep-2/pcDNA3.1 (+) (b) cell lines as visualized by silver staining

The spots marked with arrow were analyzed by MALDI-TOF-MS.

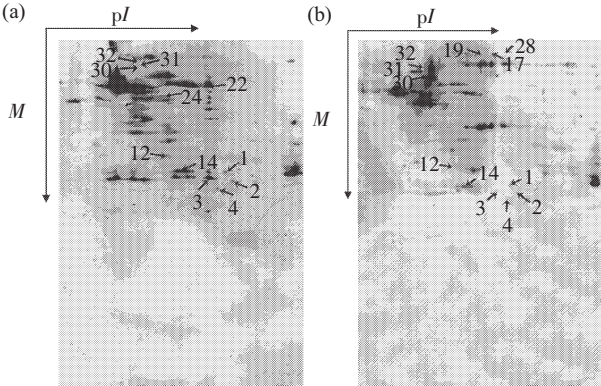


Fig.4 Western blot imaging films of proteins detected with anti-phosphotyrosine antibody in Hep-2/LCRG1 (a) and Hep-2/pcDNA3.1 (+) (b) cell lines

The spots marked with arrow were analyzed by MALDI-TOF-MS.

2.4 MALDI-TOF-MS 鉴定、Database 搜索和磷酸化位点预测

切取分析胶上的相应反应蛋白质点，经胶内原位酶解后进行 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图测定，并以酶自动降解峰进行校正. 为研究质谱鉴定结果的准确性，在两组各自两张制备胶上选取相互匹配的点 (spot 1) 进行质谱分析，搜索数据库后发现均为电压依赖性离子通道 2 (voltage-dependent anion channel 2, VDAC2). 图 5 为该点的肽质量指纹图，该图质量较高，峰信号较强，以 $m/z=1\ 000\sim 2\ 500$ 间的片段峰较多，信噪比高. 搜索数据库选用

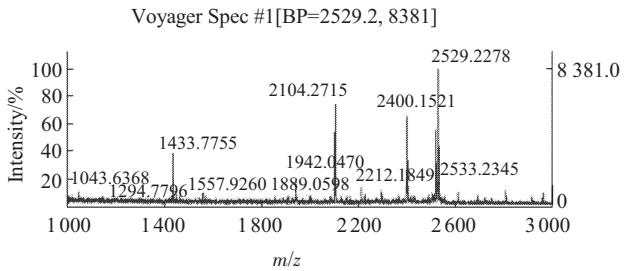


Fig.5 A representative peptide mass fingerprinting of spot 1 using MALDI-TOF-MS analysis

Mascot 软件，利用 Mascot Distiller 通过 Mascot 查询软件搜索 MSDB 以及 NCBI 数据库，以全物种为搜索范畴，搜索结果见图 6 和图 7. 图 6 所示搜索出来的蛋白质 VDAC2 得分超过 75 分，说明鉴定结果可靠. 所鉴定的 13 个蛋白质得分均超过 75 分，认为结果可靠 ($P < 0.05$). 图 7 为 VDAC2 蛋白的详细信息，包括氨基酸序列、覆盖率和匹配的肽

片段等. 同时, 我们利用在线软件 NetPhos WWW server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 对搜索出的蛋白质进行酪氨酸磷酸化位点的预测, 每一个证实的酪氨酸磷酸化的蛋白质均有至少 1 个酪氨酸磷酸化位点. 我们总共鉴定了 13 个差异反应蛋白质. 表 2 显示的为所鉴定的差异反应蛋白质点的匹配片段数、登陆号、蛋白质名称、等电点、分子量、氨基酸序列的覆盖率以及预测的酪氨酸磷酸化位点数.

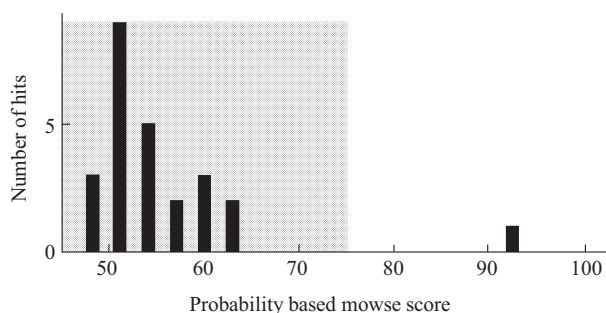


Fig.6 Database query result and score of spot 1 using software of Mascot (92 score)

Ions score is $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 75 are significant ($P < 0.05$). Top Score: 92 for Q7L3J5, VDACC2 protein.- Homo sapiens (Human).

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 27

Number of mass values matched: 9

Sequence coverage: 45%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MCIPPSYADL GKAARDIFNK GFGFGLVKLD VKTK**SCSGVE FSTSGSSNTD**
 51 **TGK**VTGTLET KYK**WCEYGLT FTEK**WNTDNT LGTEIAIEDQ ICQGLKLTFD
 101 **TTFSPNTGKK** SGKIKSSYKR ECINLGCDVD FDFAGPAIHG SAVFGYEGWL
 151 AGYQMTFDSA KSKLTRNNFA VGYR**TGDFQL HTNVNDGTEF GGSIIYQK**VCE
 201 **DLDTSVNLAW TSGTNCTRF**G IAAKYQLDPT ASISAK**VNNS SLIGVGYTQT**
 251 **LRPGVK**LTLA ALVDGKSINA GGHKVGLALE LEA

Start ~ End	Observed	<i>M</i> (expt)	<i>M</i> (calc)	Delta	Miss	Sequence
35 ~ 53	1907.93	1906.92	1906.79	0.13	0	SCSGVEFSTSGSSNTDTGK
64 ~ 74	1433.76	1432.75	1432.63	0.11	0	WCEYGLTFTEK
75 ~ 96	2519.27	2518.26	2518.20	0.06	0	WNTDNTLGTEIAIEDQICQGLK
97 ~ 109	1428.83	1427.82	1427.69	0.13	0	LTFDITTFSPNTGK
97 ~ 110	1556.90	1555.89	1555.79	0.10	1	LTFDITTFSPNTGKK
175 ~ 197	2527.85	2526.85	2527.16	-0.31	0	TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIIYQK
175 ~ 197	2528.23	2527.22	2527.16	0.06	0	TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIIYQK
198 ~ 218	2399.14	2398.13	2398.05	0.08	0	VCEDLDTSVNLAWTSGTNCTR
237 ~ 256	2103.26	2102.25	2102.15	0.11	0	VNNSSLIGVGYTQTLRPGVK

Fig.7 The body of the report contains a tabular summary of database query results and the best matching proteins spot 1 (VDACC2)

Start-End: inclusive numbering of the residues, starting with 1 for the N-terminal residue of the intact protein; Observed: experimental m/z value; M (expt): experimental m/z transformed to a relative molecular mass; M (calc): relative molecular mass calculated from the matched peptide sequence; Delta: difference (error) between the experimental and calculated masses; Miss: number of missed cleavage sites; Sequence: sequence of the peptide in 1-letter code.

Table 2 Identified reactive protein spots of Hep-2/LCRG1 and Hep-2/pcDNA3.1 (+) cell lines using phosphoproteomics method

Spot	Peptide matches	AC	Description	pI	M	Coverage	Sites
1	9/27	Q7L3J5	VDAC2 protein.- Homo sapiens (Human)	6.81	30849	45%	2
2	14/38	A33928	GTP-binding protein beta chain homolog	7.60	35511	71%	1
3	7/20	1EFVA	Electron transfer flavoprotein cofactors fad l and amp l are non-covalently bound, chain A - human	6.25	33030	35%	2
4	8/19	Q96GL2	PTGES2 protein (Fragment).- Homo sapiens (Human)	9.2	41347	25%	1
12	8/23	gil4502101	Annexin I ; annexin I (lipocortin I); lipocortin I [Homo sapiens]	6.57	38918	36%	3
14	7/31	THTR_HUMAN	Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (Rhodanese).- Homo sapiens (Human)	6.83	33505	46%	1
17	12/28	FUB1_HUMAN	Far upstream element binding protein 1 (FUSE binding protein 1) (FBP) (DNA helicase V) (HDH V).- Homo sapiens (Human).	7.18	67603	23%	4
19	15/26	A54847	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.2) - human	6.42	77408	35%	4
24	36/130	P00740	FA9_HUMAN_1, CHAIN 1: Coagulation factor IX. - Homo sapiens (Human).	5.20	46548.21	41.4%	5
28	9/17	A33616	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L) (P/OKcl.14)- human	6.65	60719	24%	11
30	8/27	CAA52882	Keratin, type II cytoskeletal 8	5.52	53671	28%	7
31	8/18	K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7 (cytokeratin 7) (K 7) (CK 7) (Sarcolectin).- Homo sapiens (Human)	5.50	51312	23%	2
32	7/14	JC5704	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ER60 precursor - human	5.98	57160	60%	8

2.5 蛋白质功能分类

对初步鉴定的蛋白质通过查询 Expasy，按其功能注释及相应的参考文献进行初步分类，主要分为 7 类，占较大比例的为以下几类蛋白质：a. 信号传导蛋白：GTP 结合蛋白、VDAC2、annexin I 等；b. 维持细胞骨架结构的蛋白质：角蛋白 7、角蛋白 8 等；c. 细胞代谢相关的酶类：硫代硫酸转硫酶、蛋白质二硫化物异构酶 A3 等。同时，利用 Expasy 信息对这些反应蛋白质进行了亚细胞定位。表 3 为初步鉴定的各类蛋白质的功能分类及其在细胞中的定位。

3 讨 论

我们先对 Hep-2/LCRG1 和 Hep-2/pcDNA3.1(+) 细胞进行 RT-PCR 验证，证实转染组细胞确实有 LCRG1 的表达。同时，进行了平板克隆形成实验，发现 Hep-2/LCRG1 细胞系平板克隆数较 Hep-2/pcDNA3.1(+) 细胞组和 Hep-2 组的平板克隆数明显减少，具有显著性差异 ($P < 0.01$)，说明

Table 3 The characterized functions and subcellular locations of the identified differential expressed tyrosine-phosphorylated proteins

Function category	Subcellular location
1. Cellular signal proteins	
Annexin I	Cytoplasmic
Far upstream element binding protein 1	Nuclear (probable)
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Cytoplasmic
GTP-binding protein	
VDAC2	Mitochondria and plasma membrane
2. Metabolic enzymes	
Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	Endoplasmic reticulum lumen(by similarity)
Thiosulfate sulfurtransferase	Mitochondrial matrix
3. Electron transfer proteins	
Electron transfer flavoprotein	Mitochondrial matrix
4. RNA binding proteins	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Nuclear, nucleoplasm
5. Cellular structure and mobility proteins	
Keratin, type II cytoskeletal 7	
Keratin, type II cytoskeletal 8	
6. Blood coagulation proteins	
FA9_HUMAN, Coagulation factor IX [Precursor]	Secreted
7. Unknown function proteins	
PTGES2 protein	

LCRG1具有体外抑制Hep-2细胞增殖的作用.同时,我们也重复了软琼脂集落形成实验和裸鼠成瘤实验,说明LCRG1具有体内/外抑制细胞生长和增殖的作用,与以往的结果相符(资料未显示).以上资料说明经多次传代后LCRG1基因仍然具有一定的抑瘤功能.因此,我们用该两组细胞进行下面的实验.

由于磷酸化是一个动力学的过程.不同时间点蛋白质的磷酸化和去磷酸化的状态可能不同.为了使实验结果更能反应同一水平下的磷酸化状态,我们尽可能地抽提传代24h后基本上同一个时间点的细胞总蛋白质.由于实验目的是要抽提尽可能多的磷酸化蛋白质,必须避免抽提过程中发生的磷酸化或去磷酸化作用.因此,裂解液中必须要加入一定浓度的酶抑制剂,而且要有足够的裂解强度.在此,我们在原有的细胞裂解液配方的基础上,加入了两性电解质和一些蛋白酶的抑制剂.两性电解质(pharmalyte)可以通过电荷与电荷的相互作用减少蛋白质聚合来增加其溶解性,同时可以稳定蛋白质的等电点,提高IPG胶条在IEF方向的结果. Leupeptin和aprotinin是蛋白酶的抑制剂.钒酸钠(Na_3VO_4)是酪氨酸磷酸酶的强抑制剂. Phosphatase inhibitor cocktail 1主要抑制左旋碱性磷酸酶和苏氨酸、丝氨酸蛋白磷酸酶. Phosphatase inhibitor cocktail 2具有抑制酸性、碱性磷酸酶和酪氨酸蛋白磷酸酶的作用^[9].

通过对Hep-2/LCRG1和Hep-2/pcDNA3.1(+)细胞系的总蛋白质进行双向凝胶电泳分离,免疫印迹以及应用PDQuest软件分析,识别了酪氨酸磷酸化蛋白质.再利用MALDI-TOF-MS及数据库搜索对酪氨酸磷酸化的蛋白质进行鉴定.在初步鉴定的13个差异酪氨酸磷酸化蛋白质点中,大部分是与信号传导相关的蛋白质,如:GMP合成酶(19号点)、GTP结合蛋白 β 亚单位(2号点)、VDAC2(1号点)等. GMP合成酶、GTP结合蛋白 β 亚单位和VDAC2在两组细胞中的蛋白质表达水平一致.但是,GMP合成酶仅在Hep-2/pcDNA3.1(+)组中存在酪氨酸磷酸化,而GTP结合蛋白 β 亚单位和VDAC2的酪氨酸磷酸化的水平在Hep-2/LCRG1组较Hep-2/pcDNA3.1(+)组明显增强.

G蛋白(GTP结合蛋白)是需要结合三磷酸鸟苷酸(GTP)后才能发挥功能的蛋白质. G蛋白由 α 、 β 和 γ 三个亚单位共同构成,其中 β 亚单位参与了一些疾病的信号传导过程^[10-12]. Navakauskiene等^[13]

的研究结果显示,在etoposide或类维生素A酸(retinoic acid, RA)作用下,HL-60细胞发生凋亡,细胞中的G蛋白发生酪氨酸磷酸化,认为磷酸化修饰的G蛋白通过参与信号传导通路的调节,从而促进细胞凋亡. GMP合成酶(GMP synthase)通过参与鸟嘌呤核苷酸的从头合成,提供GTP并参与细胞的分化^[14]. 因此我们推测,在LCRG1基因的作用下,GTP结合蛋白 β 亚单位同源物可能通过磷酸化酪氨酸残基,参与信号传导通路的调节,从而抑制喉癌细胞的生长. GMP合成酶是否通过发生去磷酸化,调控GTP的合成,影响G蛋白的功能还有待于进一步阐明.

VDAC是位于胞浆膜上小的穿孔蛋白,与Bax、Bak和Bcl-x(L)等作用后,改变细胞外膜的通透性,在细胞凋亡信号的传导过程中发挥着重要的作用. Bax可增强含VDAC的线粒体释放细胞色素c,而Bcl-2抑制含VDAC的线粒体释放细胞色素c^[15,16]. 在凋亡的早期阶段,VDAC通过调控线粒体细胞色素c的释放,从而促进caspases通路的激活^[17-20]. 有研究表明,低氧诱导细胞发生凋亡的过程中,VDAC2蛋白发生酪氨酸磷酸化^[21]. 由此我们推测,LCRG1可能通过调节VDAC2蛋白的酪氨酸磷酸化水平,促进细胞凋亡,从而发挥抑瘤作用.

此外,角蛋白7、8在Hep-2/pcDNA3.1(+)细胞系中酪氨酸磷酸化水平较Hep-2/LCRG1组水平增强. 目前一些研究表明,角蛋白的酪氨酸磷酸化在调控细胞信号传导通路和细胞凋亡中也发挥了一定的作用. 过钒酸盐(pervanadate, PV)是酪氨酸磷酸酶的抑制剂, Feng等^[22]的研究结果提示, PV可以通过启动MAPK的激酶调节通路,使角蛋白8发生酪氨酸磷酸化修饰,从而调控细胞的生长和凋亡信号. 在凝血酶的作用下,可以增加角蛋白的酪氨酸磷酸化水平,这对于维持细胞骨架结构发挥一定的作用^[23]. Kirchner等^[24]通过实验证实,成人胃癌组织中角蛋白7呈阳性表达的去分化细胞与胃癌的形成密切相关. 因此,LCRG1可能通过抑制角蛋白7和8的酪氨酸磷酸化水平,促进细胞凋亡,从而抑制喉癌细胞的生长、增殖.

以上资料显示,LCRG1可能通过去磷酸化GMP合成酶和角蛋白7、8等蛋白质的酪氨酸残基,和磷酸化GTP结合蛋白 β 亚单位、VDAC2等蛋白质的酪氨酸残基,调节细胞的生长、分化、凋亡和肿瘤的形成,从而发挥抑制Hep-2细胞生长的

作用. 总之, 我们还需要对蛋白质的酪氨酸磷酸化位点进行准确鉴定, 并通过蛋白质印迹对差异表达的酪氨酸磷酸化蛋白质进行验证.

参考文献

- Li Y, Chen Z. Molecular cloning and characterization of LCRG1 a novel gene localized to the tumor suppressor locus D17S800-D17S930. *Cancer Lett*, 2004, **209** (1):75~85
- 李友军, 谢海龙, 陈主初, 等. 喉癌相关基因 LCRG1 的克隆和表达分析. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (3): 315~319
Li Y J, Xie H L, Chen Z C, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2001, **33** (3): 315~319
- 李友军, 田芳, 陈主初, 等. 喉癌差异表达 cDNA 序列的分离与初步鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (2): 153~157
Li Y J, Tian F, Chen Z C, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2000, **32** (2):153~157
- 李友军, 关勇军, 陈主初, 等. 喉癌相关基因 LCRG1 蛋白的细胞亚定位及生物学特性研究. *癌症*, 2001, **20** (9): 911~915
Li Y J, Guan Y J, Chen Z C, *et al.* *Chin J Cancer*, 2001, **20** (9): 911~915
- Li Y J, Zhang X P, Chen Z C, *et al.* LCRG1 suppresses tumor growth *in vivo* by liposome-mediated gene transfer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2002, **14** (2): 113~117
- Sherr C J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*, 2000, **60** (14): 3689~3695
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1037~1053
- Zhan X, Desiderio D M. A reference map of a human pituitary adenoma proteome. *Proteomics*, 2003, **3** (5): 699~713
- Soskic V, Gorlach M, Poznanovic S, *et al.* Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Biochemistry*, 1999, **38** (6):1757~1764
- Wehr T A, Duncan W C Jr, Sher L, *et al.* A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2001, **58** (12): 108~1114
- Willeit M, Praschak-Rieder N, Neumeister A, *et al.* A polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter promoter gene is associated with DSM-IV depression subtypes in seasonal affective disorder. *Mol Psychiatry*, 2003, **8** (11): 42~946
- Willeit M, Praschak-Rieder N, Zill P, *et al.* C825T polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with seasonal affective disorder. *Biol Psychiatry*, 2003, **54** (7): 82~86
- Navakauskiene R, Treigyte G, Gineitis A, *et al.* Identification of apoptotic tyrosine-phosphorylated proteins after etoposide or retinoic acid treatment. *Proteomics*, 2004, **4** (4): 1029~1041
- Hirst M, Haliday E, Nakamura J, *et al.* Human GMP synthetase. Protein purification, cloning, and functional expression of cDNA. *J Biol Chem*, 1994, **269** (38): 23830~23837
- Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999, **13** (15): 1899~1911
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999, **399** (6735):483~487
- Petit P X, Susin S A, Zamzami N, *et al.* Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*, 1996, **396** (1):7~13
- Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5381): 1309~1312
- Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1241** (2): 139~176
- Liu X, Kim C N, Yang J, *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, **86** (1): 147~157
- Liberatori S, Canas B, Tani C, *et al.* Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. *Proteomics*, 2004, **4** (5): 1335~1340
- Feng L, Zhou X, Liao J, *et al.* Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Cell Sci*, 1999, **112** (Pt 13): 2081~2090
- Marcus K, Moebius J, Meyer H E. Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. *Anal Bio Chem*, 2003, **376** (7): 973~993
- Kirchner T, Muller S, Hattori T, *et al.* Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Arch*, 2001, **439** (4): 512~522

Preliminary Function Study of Laryngeal Carcinoma Related Gene LCRG1 Using Phosphorproteomics Methods*

ZHANG Xiao-Peng^{1,2}, XIAO Zhi-Qiang¹, LI Cui¹, LI Jian-Ling¹, YU Yan-Hui²,

OYANG Yong-Mei², FENG Xue-Ping¹, ZHANG Peng-Fei¹, CHEN Zhu-Chu^{1,2}**

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

²Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Laryngeal carcinoma related gene LCRG1, cloned by the laboratory using mRNA differential display, has the suppressive function to none expression LCRG1 Hep-2 cell line. Bioinformatics analysis using software showed LCRG1 may play function in cellular signal transduction. In order to further elucidate the function of LCRG1, RT-PCR and colony efficiency were used to identify whether LCRG1 expressed and had the tumor suppressive function in incubated Hep-2/LCRG1 cell lines. The results suggested LCRG1 was expressed in Hep-2/LCRG1 cell lines and had the significant suppressive proliferation ability. Hence, the total proteins of Hep-2/LCRG1 and Hep-2/pcDNA3.1 (+) cell lines were separated by immobilized pH gradient (IPG)-based two-dimensional gel electrophoresis (2DGE), coupled with anti-tyrosine phosphorylated antibody immunoblotting and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) identifying tyrosine-phosphorylated proteins. The well-resolved, reproducible 2DGE patterns of Hep-2/LCRG1 and Hep-2/pcDNA3.1 (+) cell lines were established and 13 differential tyrosine-phosphorylated proteins were identified using immunoblotting, analysis software and MALDI-TOF-MS methods. These proteins were involved in the signal transduction and cell cycle. So it was speculated that LCRG1 may be involved in the processes of cellular proliferation, metabolic pathways and apoptosis etc. and play tumor suppressive functions through regulating the phosphorylation/ dephosphorylation status of these proteins. These data will be helpful to elucidate the molecular mechanism of LCRG1 tumor suppressive function.

Key words LCRG1 gene, Hep-2/LCRG1 cell line, Hep-2/pcDNA3.1 (+) cell line, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, immunoblotting, tyrosine-phosphorylated proteins, Western blot imaging films

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510207), The National Natural Sciences Foundation of China (30000028, 30240056, 30370642), Outstanding Scholars of New Era from Ministry of Education of China ([2002]48), Key Science and Technology Expert Program From Science and Technology Committee of Hunan (04XK1001), Key Research Program From Science and Technology Committee of Hunan (02SSY2001-1) and Key Research Program From Public Health Bureau of Hunan Province (Z02-04).

**Corresponding author. Tel: 86-731-4327239, Fax: 86-731-4327332, E-mail: tcbl@xysm.net

Received: December 21, 2004 Accepted: March 28, 2005