

◇ 药学研究 ◇

4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯对人胃癌 SGC-7901 细胞的磷酸化蛋白质组学研究

王佳丽¹, 夏 泉^{1,2}, 陈飞虎¹, 乔文豪¹, 张冬玲¹

摘要 目的 研究观察新型维甲酸衍生物 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(ATPR)作用于胃癌 SGC-7901 细胞后蛋白质的磷酸化情况来了解 ATPR 诱导分化作用的可能机制和作用靶点。方法 ATPR 作用于胃癌 SGC7901 细胞 48 h 后,收集并提取总蛋白,通过胰蛋白酶酶解, TiO₂ 磁珠法富集磷酸肽,高分辨率液质联用仪器检测磷酸肽,使用 Proteome Discoverer1.2 软件寻找差异的蛋白质和磷酸化位点,利用生物信息学网站和 DAVID、KEGG、IPA 软件,分析这些磷酸化蛋白质的功能及亚细胞定位等信息。结果 最终鉴定出 109 个蛋白质,其中 45 个磷酸化蛋白质,共有 121 个磷酸化位点,差异蛋白中有 15 个仅出现在 ATPR 组,20 个仅出现在正常组。DAVID 分析结果显示差异磷酸化的蛋白质参与调控细胞进程、生物进程、基因表达、细胞的代谢过程等;KEGG 分析结果显示差异磷酸化蛋白质主要有参与 ERBB 信号通路、RNA 的转运、内质网蛋白加工过程、p53 信号通路等。IPA 软件分析一些差异蛋白质之间的关联蛋白是泛素连接酶(UBC)。结论 ATPR 对胃癌细胞 SGC-7901 细胞诱导分化的机制可能是通过作用于多种蛋白质或基因,如肝癌衍生生长因子(HDGF)、钙蛋白酶抑制蛋白(CAST)、ATP 结合盒 G 亚族蛋白 4(ABCG4)和腺苷酸环化酶关联蛋白 1(CAP1)而发挥作用,并通过影响这些蛋白质的磷酸化从而实现 ATPR 对胃癌细胞的诱导分化作用。

关键词 ATPR; 人胃癌 SGC-7901 细胞; 诱导分化; 磷酸化蛋白质组学

中图分类号 R 341

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)11-1625-04

全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)作为常用诱导分化剂已广泛应用,在临床上主要用于急性早幼粒细胞白血病的治疗,其机制是能诱导肿瘤细胞分化成正常细胞或诱导肿瘤细胞凋亡,从而

达到治愈目的。临床发现维甲酸类药物有严重的综合征、耐药以及复发率高等缺陷,使得其应用受限。实验室以 ATRA 为先导化合物,对其进行结构修饰,再经过体外药效学筛选,发现 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate, ATPR)具有较强的抗肿瘤增殖和诱导分化活性,期望开发成为一种新型抗肿瘤药。该研究以人胃癌细胞株 SGC-7901 为研究对象,通过磷酸化蛋白质组学的方法,研究 ATPR 作用于胃癌细胞后蛋白质的表达变化,并找到作用靶点来解释其可能诱导分化作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与药物 SGC-7901 细胞株购自中科院上海细胞库。ATPR 由安徽医科大学药学院合成,纯度为 99.66%,以无水乙醇溶解配制成浓度为 2×10^{-2} mol/L 的贮存液, -20 °C 避光保存,见图 1。

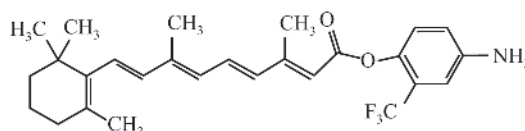


图 1 ATPR 的化学结构式

1.1.2 主要试剂与仪器 磷酸酶抑制剂(货号 88667)和去污剂去除树脂(货号 87778)购自美国 Pierce 公司; Trypsin(货号 V5280)购自美国 Promega 公司; 二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM)购自美国 Sigma 公司; 羟基乙酸和 25% 氨水溶液购自美国 Aladdin 公司; Strata-X 固相小柱(60 mg/3 ml)购自美国 Phenomenex 公司; TiO₂ Mag sepharose(货号 28-9440-10)购自英国 GE healthcare; BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司; 丙酮、乙腈、醋酸、甲酸、三氟乙酸为色谱级。酶标仪、ACCELA 600 Pump 液相色谱、傅立叶变换静电场轨道阱质谱(LTQ Orbitrap XL)、Xcalibur

2015-06-29 接收

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号: 2011ZX09401-021)

作者单位: ¹安徽医科大学药学院, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022

作者简介: 王佳丽, 女, 硕士研究生;

夏 泉, 男, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiaquan2010@163.com

2.1 工作站和 Proteome Discoverer 软件购自美国 Thermo 公司; 高速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和加药收集处理 胃癌 SGC-7901 细胞株为贴壁生长细胞株, 采用含 10% 小牛血清 (FCS) 的高糖 DMEM (青霉素 100 IU/ml 和链霉素 100 μ g/ml) 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中, 每 2 d 更换培养液 1 次, 取处于对数生长期的细胞进行实验。将其分为两组, ATPR 组: ATPR 药物终浓度为 1×10^{-6} mol/L; 正常组: 0.05% 无水乙醇的培养基, 孵育 48 h 后收集细胞。

1.2.2 磷酸化蛋白质组学样品制备 收集细胞, 加入 500 μ l 裂解液 (临用前加入 2 μ l 蛋白酶抑制剂与 5 μ l 磷酸酶抑制剂), 摇床震荡裂解约 15 min 后, 14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸出上清液, 总蛋白定量后取 1 mg 细胞总蛋白, 加入丙酮过夜沉淀。离心收集沉淀后加入 125 μ l 复溶液 (尿素 7 mol/L、硫脲 2 mol/L、CHAPS 65 mmol/L), 完全溶解后加入 875 μ l 50 mmol/L NH₄HCO₃ 混匀。蛋白溶解液加入 10 μ l 100 mmol/L 的 DTT, 50 $^{\circ}$ C 15 min; 加入 10 μ l 300 mmol/L 的 IAM, 避光放置 15 min, 加入 20 μ g 胰酶 (酶: 蛋白 = 1: 50) 于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅过夜孵育 17 h。使用去污剂去除树脂处理酶解液, 室温孵育 2 min 后, 1 000 r/min 离心 2 min, 收集液体脱盐处理。

1.2.3 脱盐 Strata-X 柱活化柱子和平衡后加载酶解液样品, Milli-Q 水洗柱子, 1 000 r/min 离心 2 min 去除残留水液。加入 2% 甲酸/98% 甲醇收集洗脱液, 真空浓缩仪旋转蒸发干燥。

1.2.4 磷酸肽的富集 (TiO₂ 磁珠法) 吸出 50 μ l 重悬的磁珠胶浆加入 500 μ l 结合缓冲液 (1 mol/L 羟基乙酸、80% 乙腈、5% TFA), 置于磁场中吸去液体; 脱盐后的样品加入 250 μ l 溶液, 加入磁珠内室温孵育 30 min 后, 吸去液体; 加入 500 μ l 结合缓冲液洗涤后吸去液体, 再加入 500 μ l 洗涤缓冲液并吸去液体; 加入 50 μ l 5% 氨水洗涤磁珠, 收集液体于真空浓缩仪干燥。

1.2.5 高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析 富集的磷酸化样品用 LC-MS/MS 检测。干燥样品溶解于 30 μ l 0.1% 甲酸, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 100% 乙腈溶液, 使用 180 min 梯度洗脱样品: 0 ~ 10 min, B 相为 10%; 10 ~ 110 min, B 相从 10% 上升至 40%; 110 ~ 140 min, B 相从

40% 上升至 95%; 140 ~ 165 min, B 相维持 95%; 165 ~ 170 min, A 相从 5% 上升至 90%; 170 ~ 180 min, A 相维持 90%。洗脱肽段经由纳升级电喷雾离子源接口喷出, 进入 LTQ Orbitrap XL 高分辨率质谱仪进行质谱分析。具体质谱条件如下: 采用数据依赖模式, 在正离子模式下进行扫描, 电喷雾电压: 3.8 kV; 离子传输毛细管温度为 200 $^{\circ}$ C; 质量扫描范围: 300 ~ 2 000; 一级质谱 Orbitrap 分辨率: 60 000; 10 个 LTQ 串级质谱扫描; 母离子窗口: 2 Da; 串级质谱碰撞归一化能量: 35; 中性离子丢失: 97.98、65.32、45.99、32.66。

1.2.6 磷酸化蛋白质的鉴定和生物信息学分析

通过 Proteome Discovery 1.2 软件对质谱产生的数据文件进行 Sequest 搜索, 数据库为人源的蛋白序列数据库, 来源于 ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/peptides/。检索参数如下: M/Z 为 350 ~ 5 000 Da, 母离子容忍度为 10 ppm, 碎片离子容忍度为 0.8 Da, 半胱氨酸的烷基化修饰 Carbamidomethyl/ + 57.021 Da (C) 为固定修饰, 甲硫氨酸的氧化 Oxidation/ + 15.995 Da (M) 为可变修饰, 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸上的磷酸化修饰 (Phospho/ + 79.966 Da, S、T、Y), 肽段和蛋白质鉴定 FDR 均小于 1%, 磷酸化肽段的过滤时选择肽段可信度为高。差异磷酸化蛋白质用 DAVID、KEGG 和 IPA 进行生物信息学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 质谱分离和鉴定效果的验证结果 在对总蛋白量为 1 mg 样品进行磷酸化蛋白质组学研究的的同时, 使用标准牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 验证酶解效果并事先饱和毛细管柱。BSA 经数据库比对, 肽段覆盖率达 51.56%, 得分值为 316, 说明分离效果较好, 可以用于后续的正式实验。

2.2 磷酸化蛋白质的鉴定结果 通过 TiO₂ 磁珠富集磷酸肽和质谱仪器进行鉴定, 鉴定出 45 个差异磷酸化蛋白质, 121 个磷酸化位点, 其中丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸位点分别为 81、34、6 个; 这些差异磷酸化蛋白质中有 15 个仅出现在 ATPR 组, 20 个蛋白质仅出现在正常组。肝癌衍生生长因子 (hepatoma-derived growth factor, HDGF)、钙蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin, CAST)、ATP 结合盒 G 亚族蛋白 4 (ATP-

binding cassette sub-family G member 4 (ABCG4) 和腺苷酸环化酶关联蛋白 1 (adenylyl cyclase-associated protein 1, CAP1) 的磷酸化发生变化,可能是 ATPR 作用后的结果,见图 2。

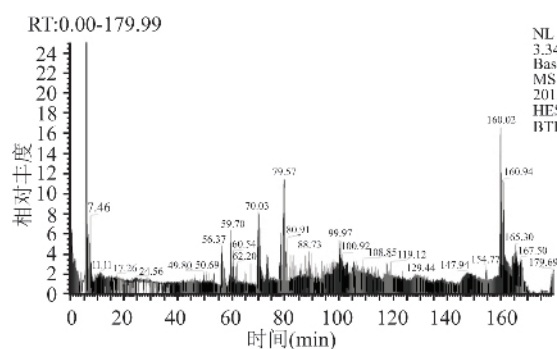


图2 毛细管色谱柱分离正常组的总离子流图

2.3 磷酸化蛋白质的功能分析 通过 DAVID 分析已鉴定的差异磷酸化蛋白质的生物进程、细胞组成及分子功能,这些蛋白质主要参与蛋白质和大分子的代谢过程、蛋白质的生物合成过程、基因表达等,并主要参与构成细胞核(22.2%)、细胞质(22.2%);经过分子功能分析,发现这些差异蛋白质主要参与蛋白质与核酸的连接。KEGG pathway 分析差异磷酸化蛋白质可能参与的信号通路,主要有 ERBB 信号通路、RNA 的降解、RNA 的转运、内质网蛋白加工过程、剪接体形成、p53 信号通路等,见图 3。

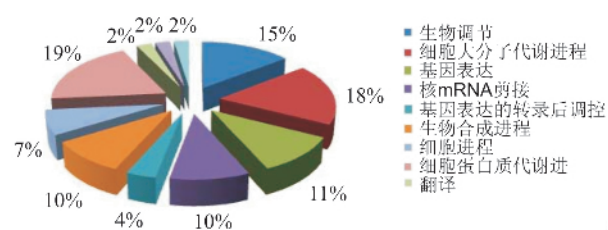


图3 差异磷酸化蛋白质的生物进程分析

2.4 磷酸化蛋白质的关联分析 IPA 软件分析差异蛋白质之间的关联性,发现泛素连接酶(ubiquitin ligase, UBC)成为了 CAST 与 CAP1、DNA 同源家族 C 蛋白 5 (dnaJ homolog subfamily C member 5, DNA-JC5) 与核帽连接蛋白 1 (nuclear cap-binding protein subunit 1, NCBP1)、结节蛋白(tuberin, TSC2)与 mRNA 脱帽增强蛋白 4 (enhancer of mRNA-decapping protein 4, EDC4) 之间的关联蛋白质,提示泛素连接酶参与了调节 RNA 和凋亡的各个过程,见图 4。

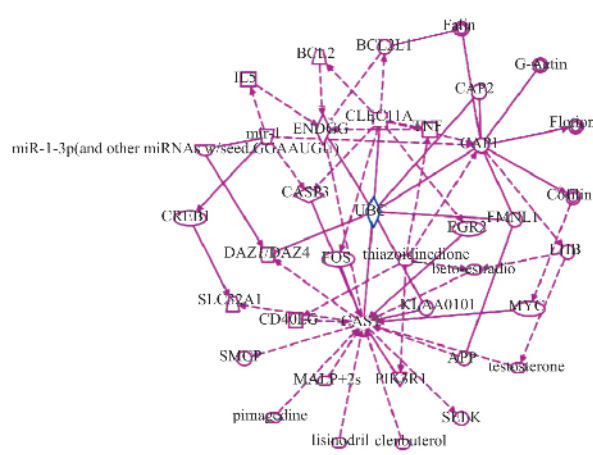


图4 CAST 与 CAP1 的关联图

3 讨论

课题组前期以 ATRA 为先导化合物设计合成了维甲酸衍生物 ATPR,并证实其对白血病^[1]、卵巢癌^[2]、乳腺癌^[3]等多种肿瘤细胞株具有良好的抑制增殖和诱导分化作用。磷酸化蛋白质组学技术在肿瘤的发生发展以及抗肿瘤作用机制研究中已广泛应用,蛋白质的磷酸化水平的变化更能反映蛋白质的表达变化。该研究是对 ATPR 作用于胃癌 SGC-7901 细胞后细胞内磷酸化蛋白质组学的研究,结果表明 HDGF、CAST、ABCG4 和 CAP1 发挥重要作用,并通过影响这些蛋白质的磷酸化从而实现 ATPR 对胃癌细胞的诱导分化作用。

HDGF 是 Nalamura et al^[4] 在人肝癌细胞系 (HuH-7) 无血清培养的上清液中分离得到的一种生长因子,具有一系列生物功能,在促进癌细胞增殖、侵袭、迁移等过程发挥重要作用,包括食管癌^[5]、肺癌^[6]、黑色素瘤^[7]等。临床病理学分析^[8]表明 HDGF 的高表达与乳腺癌、胰腺癌的预后差有联系。ABCG4 是 ATP 结合盒转运蛋白家族成员,张志培等^[9]发现 ABCG4 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中表达升高,并发现 ABCG4 有外排药物引起肿瘤耐药的可能性,可成为耐药的潜在靶点。本研究中 HDGF 和 ABCG4 仅在正常组出现磷酸化,可能是 ATPR 作用后抑制了它们的表达,从而可能减少耐药性的发生。CAP1 是细胞骨架蛋白,参与调节肌动蛋白细胞骨架。Hua et al^[10]发现, CAP1 在上皮卵巢癌细胞 EOC 细胞中高表达,敲除 CAP1 基因结果提示下调 CAP1 在肿瘤中的表达是治疗 EOC 的新的靶点。S307/309 位点发生磷酸

化对 CAP1 的活性具有调节作用。而本研究中 CAP1 磷酸化位点 S307 和 S309 仅在正常组中出现, 验证了 CAP1 在肿瘤细胞骨架中的调节作用。

参考文献

- [1] 陈慧慧, 陈飞虎, 徐 佼. c-myc、hTERT 在 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯诱导 NB4 细胞分化中的作用[J]. 安徽医科大学学报 2011, 46(3) : 235 - 40.
- [2] 吴繁荣, 洪凡青, 陈飞虎. 新型维甲酸衍生物 ATPR 对肿瘤细胞株 SKOV3 增殖及分化的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学 2013, 18(3) : 252 - 7.
- [3] 汪 楠, 陈飞虎, 葛金芳, 等. 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯对 MCF-7 细胞增殖和分化的影响及其机制研究[J]. 中国药理学通报 2013, 29(6) : 767 - 72.
- [4] Nalamura H, Izomoto Y, Kambe H, et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem*, 1994, 269(40) : 25143 - 9.
- [5] Liao F, Dong W, Fan L. Apoptosis of human colorectal carcinoma cells is induced by blocking hepatoma-derived growth factor[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(4) : 1219 - 26.
- [6] Meng J, Xie W, Cao L, et al. shRNA targeting HDGF suppressed cell growth and invasion of squamous cell lung cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(1) : 52 - 7.
- [7] Tsai H E, Wu J C, Kung M L, et al. Up-regulation of hepatoma-derived growth factor facilitates tumor progression in malignant melanoma[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3) : e59345.
- [8] Chen X, Yun J, Fei F, et al. Prognostic value of nuclear hepatoma-derived growth factor (HDGF) localization in patients with breast cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2012, 208(8) : 437 - 43.
- [9] 张志培, 周勇安, 徐 钊, 等. 非小细胞肺癌组织 ABCG4 表达与耐药的相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志 2009, 16(1) : 31 - 5.
- [10] Hua M, Yan S, Deng Y, et al. CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4) : 941 - 9.

The phosphoproteomics of the differentiation of 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate on human gastric cancer SGC-7901 cells

Wang Jiali¹, Xia Quan^{1, 2}, Chen Feihu¹, et al

(¹College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate levels of phosphorylation of protein when the new retinoid derivatives 4-Amino-2-Trifluoromethyl-Phenyl Retinate (ATPR) on gastric cancer SGC-7901 cells, which could help to understand the possible mechanism of differentiation, and found the targets by phosphoproteomics. **Methods** Gastric cancer SGC-7901 cells were incubated for 48 hours with ATPR, collected and extracted of total cell protein, digested by trypsin, phosphopeptides were enriched by TiO₂ beads and analyzed by LC-MS/MS. Used Proteome Discoverer1.2 to find different proteins and phosphosites. Bioinformatic was applied to analyze the function and subcellular localization of phosphorylated proteins to explain these different proteins by DAVID, KEGG, IPA software. **Results** We identified 109 proteins, including 45 phosphoproteins and 121 phosphosites by analysis of MS. 15 proteins appeared on the ATPR group and 20 proteins in the control group. DAVID analysis results displayed that different phosphoproteins were involved in regulating cellular process, biological process, gene expression, metabolic process and so on; the molecular functions of different phosphoproteins may include protein binding and nucleic acid binding. ERBB signaling pathway, RNA transport, Protein processing in endoplasmic reticulum, p53 signaling pathway were involved by KEGG analysis. IPA software results displayed that the ubiquitin ligase (UBC) became associated protein of several proteins. **Conclusion** ATPR can induce differentiation of gastric cancer cell SGC-7901, the mechanism may be the results of interaction of proteins or genes, such as HDGF, CAST, ABCG4 and CAP1, and regulate the phosphorylation of these proteins.

Key words ATPR; gastric cancer SGC-7901 cells; induced differentiation; phosphoproteomic