

不同转移潜能的肝癌细胞系定量磷酸化蛋白质组学研究

衣泰龙^{1,2}, 田苗苗², 翟琳辉², 徐忠伟², 杨晓明^{1,2}, 徐平^{1,2}

摘要 目的 研究具有不同侵袭转移能力的肝癌细胞系的磷酸化蛋白质组的动态变化。方法 首先用含有重稳定同位素标记的精氨酸和赖氨酸的培养基对 MHCC97-L 进行重稳定同位素标记氨基酸的细胞培养 (SILAC); 用含有轻稳定同位素标记的精氨酸和赖氨酸的培养基对 MHCC97-H 进行 SILAC 标记。将完成标记的两种肝癌细胞系的蛋白质按照 1:1 混合, 并用 trypsin 进行溶液消化; 对消化得到的肽段进行除盐, 并通过固相金属离子亲和色谱 (IMAC) 的方法进行磷酸化肽段的富集。磷酸化肽段通过质谱进行检测, 并通过 MaxQuant 进行鉴定和定量。最后通过 Z 检验进行统计学分析, 并对差异调控的磷酸化肽对应的蛋白质进行基因本体 (GO) 分析和 STRING 网络分析。结果 最终鉴定了 918 个磷酸化肽段, 其中 806 个磷酸化肽段的磷酸化位点可以定位和定量。通过 Z 检验, 共得到了 91 个磷酸化修饰水平发生变化的肽段, 对应 25 个磷酸化蛋白质。通过对这 25 个蛋白质进行 GO 分析发现, 细胞骨架重塑过程中的蛋白质在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中磷酸化修饰形式严重失调。通过 STRING 分析发现, NES 和 PRKCA 处于网络的重要节点位置。结论 细胞骨架重塑这一生物学过程与肝癌侵袭转移能力密切相关; 参与细胞骨架重塑的 NES 蛋白和参与 MAPK 信号通路和黏合斑信号通路的 PRKCA 蛋白磷酸化修饰水平的变化是影响低转移潜能 MHCC97-L 细胞向高转移潜能细胞 MHCC97-H 变化的重要调控机制。

关键词 定量磷酸化蛋白质组学; SILAC; 固相金属离子亲和色谱; 肝癌细胞; 侵袭转移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1595-05

研究^[1]显示在肝癌转移过程中 RAF/MEK/ERK 与磷酸化相关的信号通路通常处于活化状态, 表明蛋白质的磷酸化修饰与肝癌的侵袭转移机制密切相关。因此深入研究肝癌的磷酸化蛋白质组对于揭示肝癌侵袭转移的调控机制十分重要。对于肝癌, 至今尚无基于稳定同位素标记氨基酸的细胞培养 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) 的高精度定量磷酸化蛋白质组学研究的报道。为了揭示肝癌侵袭转移过程中蛋白质磷酸化的调控规律, 该研究通过 SILAC 定量的方法研究了具有相同遗传背景的 MHCC97-L 和 MHCC97-H 两株细胞系的磷酸化蛋白质组学数据并分析两种细胞系之间差异调控的蛋白质, 旨在揭示肝癌侵袭转移过程中磷酸化蛋白质的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 MHCC97-L 和 MHCC97-H 由上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所刘坤培教授惠赠。细胞于液氮中保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 [¹³C₆¹⁵N₄] arginine (+0.010 008 3 ku) 和 [¹³C₆] lysine (+0.006 020 1 ku) 购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司; 碳酸氢铵 (NH₄HCO₃)、甲醇、乙腈 (ACN)、甲酸 (FA)、三氟乙酸 (TFA)、磷酸酶抑制剂 cocktail 2 和磷酸酶抑制剂 cocktail 3 购自美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂 cocktail 购自瑞士 Roche 公司; 尿素、碘乙酰胺和 Tris-HCl 购自美国 Amresco 公司; 透析胎牛血清购

2014-06-27 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) (编号: 2011CB910600); 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (编号: SS2012AA020502); 国家自然科学基金 (编号: 31070673); 北京市自然科学基金 (编号: 5112012)

作者单位: ¹安徽医科大学研究生院, 合肥 230032

²军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

作者简介: 衣泰龙, 男, 硕士研究生;

杨晓明, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xi-aomingyang@sina.com;

徐平, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xup-ingghy@gmail.com

adhesion, proliferation and differentiation. **Conclusion** Titanium disks of functional modification with RGD peptide have good biocompatibility, which could be used for developing the titanium implants and further to improve osseointegration.

Key words titanium; TiO₂ nanotubes; RGD peptide; dopamine; bone marrow stromal cells

自美国 Gibco 公司; SILAC DMEM 购自美国 Hyclone 公司; 质谱级 Trypsin 购自美国 Promega 公司; Ni-NTA Magnetic Agarose Beads 购自美国 QIAGEN GmbH 公司; 氯化钠 (NaCl) 购自中国北京化工厂; 焦磷酸钠、磷酸二氢钠、氟化钠、钒酸钠和磷酸甘油购自中国阿拉丁试剂有限公司; JY98-IIIDN 超声破碎仪购自中国宁波新芝生物科技有限公司; 超高压纳升级高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司; LTQ Orbitrap Velos 高精度质谱仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的 SILAC 培养 细胞分别培养于含有 10% 透析胎牛血清和 90% SILAC 的 DMEM 培养基中。精氨酸的浓度为 0.52 mmol/L, 赖氨酸的浓度为 0.48 mmol/L。MHCC97-L 培养于含有重标精氨酸和赖氨酸的培养基中。MHCC97-H 培养于含有轻标精氨酸和赖氨酸的培养基中。3 d 更换一次培养基。细胞长到 80% ~ 90% 融合时进行传代, 每次接种 15%。细胞进行 SILAC 高标记培养共需 13 代, 20 d。

1.2.2 磷酸化蛋白质的提取及 SILAC 标记效率的检测 细胞进行 SILAC 培养 20 d 后, 弃掉培养基, 用预冷的磷酸盐缓冲液清洗细胞两次。加入磷酸化蛋白质裂解液 (9 mol/L 尿素、30 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L 碘乙酰胺、5 mmol/L 焦磷酸钠、100 mmol/L 磷酸二氢钠、1 mmol/L 氟化钠、1 mmol/L 钒酸钠和磷酸甘油、1% 磷酸酶抑制剂 cocktail 2、1% 磷酸酶抑制剂 cocktail 3 和 10 ml 每片的蛋白酶抑制剂 cocktail, pH = 8.0) 并用细胞刮收集细胞。冰浴下超声破碎细胞, 功率 300 W, 工作 1 s, 间歇 5 s, 80 个循环。细胞破碎后 4 °C 13 300 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 分装后置于 -80 °C 冰箱贮存。

取重标 MHCC 97-L 细胞的蛋白质 5 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 待样品进入分离胶 0.5 cm 处停止电泳, 考马斯亮蓝 G250 染色。对目的条带切胶, 并进行 trypsin 的胶内消化^[2], 质谱检测, 计算 SILAC 重标的标记效率。

1.2.3 蛋白质组样品制备 轻标的 MHCC97-H 和重标的 MHCC97-L 各取 50 μ g 进行 1 : 1 混合。加入 DTT 至终浓度为 10 mmol/L, 室温孵育 30 min, 中和裂解液中过量的碘乙酰胺。用 50 mmol NH₄HCO₃ 稀释样品至尿素的终浓度为 1.6 mol/L。按照 try-

sin 与蛋白质为 1 : 100 的比例进行酶解消化, 37 °C 孵育过夜。参考 Zhai et al^[3] 的方法对样品进行脱盐。脱盐后真空干燥, 保存于 -20 °C, 备用。

1.2.4 磷酸化肽段的 IMAC 富集 取 10 μ l 5% 的固定化金属亲和层析 (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) beads, 用 20 μ l 超纯水清洗 3 次, 每次 3 min; 加入 20 μ l 100 mmol/L EDTA 孵育 1 h, 用超纯水洗 3 次; 加入 20 μ l 100 mmol/L FeCl₃ 孵育 1 h, 用超纯水洗 3 次; 用样品溶解液 (80% ACN, 0.1% TFA) 平衡 3 次, 每次 3 min; 将肽段溶解于 20 μ l 样品溶解液中并与活化的 beads 孵育 1 h; 孵育完成后用样品溶解液洗 5 次; 加入 20 μ l 洗脱液 (2.5% 氨水, 50% ACN) 孵育 10 min, 重复此步骤两次, 并收集洗脱液; 向收集的洗脱液中加入 40 μ l 中和液 (5% FA, 50% ACN) 中和样品; 真空干燥样品。

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。将样品用 6 μ l 的 1% FA 和 1% ACN 液溶解, 取 3 μ l 上样。流动相 A 为 0.1% FA 和 2% ACN 的水溶液; 流动相 B 为 0.1% FA 的 ACN 溶液。使用 60 min 梯度洗脱样品: 0 ~ 3 min, B 相由 0% 上升至 3%; 3 ~ 12 min, B 相从 3% 上升至 12%; 12 ~ 55 min, B 相从 12% 上升至 40%; 55 ~ 58 min, B 相从 40% 上升至 80%; 58 ~ 60 min, B 相维持 80%, 流动相流速为 0.3 μ l/min。洗脱肽段经由纳升级电喷雾离子源接口喷出, 进入 LTQ Orbitrap Velos 高分辨率质谱仪进行检测分析。质谱采用一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式, 通过碰撞诱导裂解模式进行离子的碎裂。一级质谱扫描范围是 300 ~ 1 600 m/z, 分辨率设置为 30 000; 自动增益控制设置为 10⁶。一价离子自动排除, 选取一级信号强度最高的 20 个离子进行二级质谱的碎裂分析, 碰撞归一化能量设置为 35%; 自动增益控制设置为 5 000; 最大离子注射时间为 25 ms, 动态排除设置为 30 s。

1.2.6 蛋白质的鉴定和定量分析 使用 MaxQuant (version 1.4.1.2) 搜索引擎对质谱产生的数据文件 (.raw) 进行搜索分析, 数据库采用从 UniProt 下载的人类蛋白质序列数据库 (Version: 201312)。搜库参数采用固定修饰为半胱氨酸的烷基化修饰, trypsin 特异性全酶切, 定量重标选取 Lys6 和 Arg10; 可变修饰为甲硫氨酸氧化修饰, 丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化修饰; 第 1 次搜库母离子质量误差为 20

ppm,第2次搜库母离子质量误差为6 ppm,子离子质量误差0.0005 ku,允许最大漏切位点数目为2,肽段长度≥6个氨基酸,肽段最大修饰数目为5。搜库结果采用Target-decoy策略进行过滤,并设定肽段和蛋白质鉴定FDR均小于1%。

1.3 统计学处理 通过Z检验,定量值的($\log_2 L/H$)的绝对值大于两倍SD值的磷酸化肽段作为差异肽段选取的标准($P < 0.05$)^[4]。

2 结果

2.1 标记效率的检测 基于代谢标记的SILAC定量方法采用通过计算轻重配对肽段离子在一级质谱中离子的相对强度进行比较,计算的比值就是定量结果。本研究通过选取内参蛋白Beta-ACT中的ACTG1DSYVGDEAQS K和DLYANTVLSGGTTMYP-GIADR肽段的轻重标配对离子比值计算赖氨酸和精氨酸的标记效率。通过计算,经过SILAC标记的MHCC97-L赖氨酸的标记效率为97.30%,精氨酸的标记效率为97.92%。见图1。

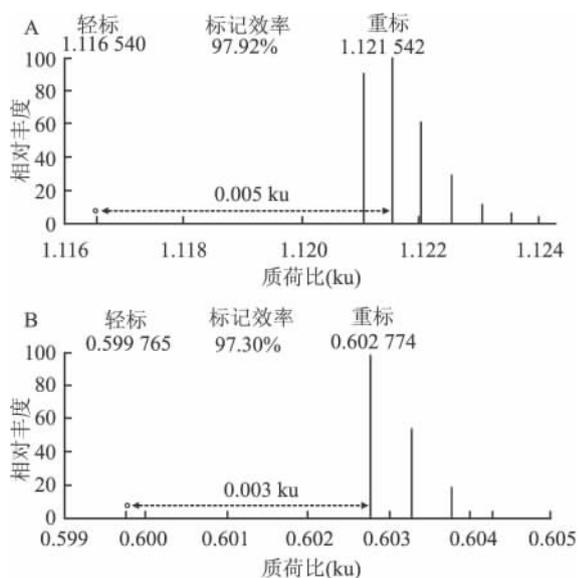


图1 蛋白质(Beta-ACT)中含有精氨酸的肽(A)和含有赖氨酸的肽段(B)的标记效率

A: DLYANTVLSGGTTMYPGIADR; B: DSYVGDEAQS K

2.2 定量磷酸化蛋白质组学 通过磷酸化肽段的IMAC富集和质谱检测,最终鉴定得到1160个肽段,其中磷酸化肽段918个,富集效率79%,918个磷酸化肽段中,806个磷酸化肽段可以进行定量;对这806个磷酸化肽段定量值校正值的对数($\log_2 L/H$)进行高斯分布的拟合,根据高斯分布计

算得到肽段分布的标准差(standard deviation,SD)为0.22。见图2。

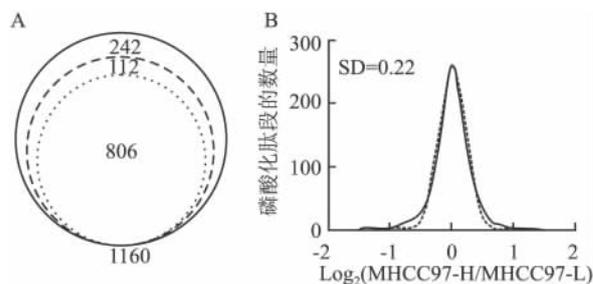


图2 磷酸化蛋白质组学的鉴定和定量结果以及MHCC97-L与MHCC97-H磷酸化蛋白质组学的定量分布

A: 质谱鉴定的肽段数量(○:鉴定的所有肽段数量;⊖:鉴定的磷酸化肽段数量;⊙:可定位且可定量的磷酸化肽段);B:可定位且可定量的磷酸化肽段的定量分布

2.3 差异调控的磷酸化肽段对应蛋白质的生物功能分析 与MHCC97-L相比,MHCC97-H共有91个肽段发生了变化,其中有46个磷酸化肽段的修饰水平上调,45个磷酸化肽段的修饰水平下调。对这91个肽段对应的25个蛋白质进行分析,发现在MHCC97-H中MARCKS第170位丝氨酸的磷酸化修饰形式比MHCC97-L中的多,而RRM2第1103位丝氨酸的磷酸化修饰形式在MHCC97-L中明显高于MHCC97-H。

对差异变化的磷酸化肽段对应的蛋白质进行基因本体(gene ontology,GO)分析,发现细胞骨架重塑、囊泡介导的转运和对雌性激素刺激的应激等生物过程在本研究中均得到富集,此外,本研究显示这些差异蛋白还参与了细胞移动、微管组装、染色体组装和去组装以及受体介导的内吞等众多与癌症发生过程密切相关的生物过程。见图3。

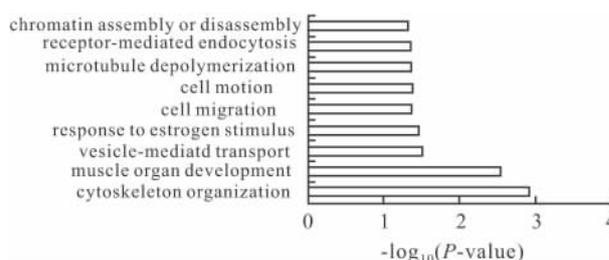


图3 MHCC97-L和MHCC97-H修饰水平发生变化的磷酸化蛋白质的生物进程分析

2.4 MHCC97-L和MHCC97-H中磷酸化蛋白质网络构建 通过STRING对鉴定到的磷酸化蛋白质

进行网络构建,发现在鉴定到的磷酸化蛋白质中 JUN、PRKCA、NES 和 SRRM1 处于同一个网络不同的节点位置,见图4。其中 PRKCA 处于网络最重要的位置。通过对节点蛋白质定量结果做进一步分析,发现与 MHCC97-L 相比,MHCC97-H 中蛋白质 PRKCA 的第 497 位的苏氨酸的磷酸化修饰水平增高 (pTFCGTPDYIAPEIIAYQPYGK: 97-L/97-H = 0.72),NES 第 471 和 680 位的丝氨酸修饰水平也增高 (ENQEPLRpSPEVGDEEALRPLTK: 97-L/97-H = 0.57; QEASTGQSPEDHASLAPPLpSPDHSSLEAK: 97-L/97-H = 0.60)。

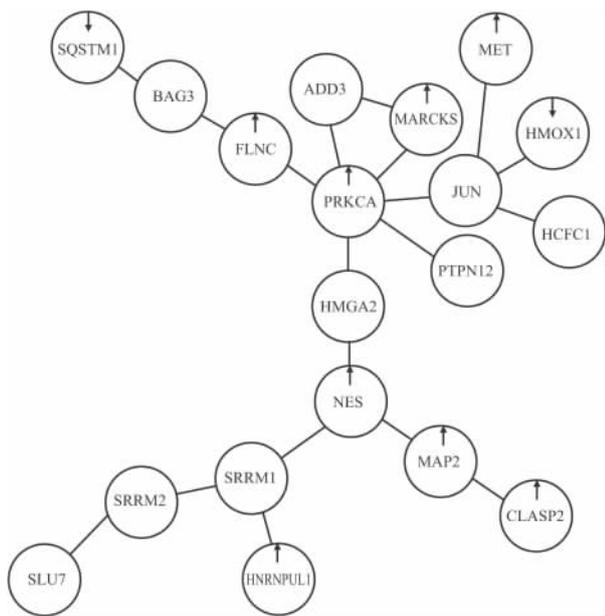


图4 MHCC97-L 和 MHCC97-H 鉴定到的磷酸化蛋白质相互作用网络图

○:97-H 与 97-L 相比磷酸化修饰水平无变化; ①:97-H 的磷酸化水平比 97-L 的磷酸化水平高; ②:97-H 的磷酸化水平比 97-L 的磷酸化水平低

3 讨论

磷酸化修饰是生物体内最常见的翻译后修饰形式之一,其蛋白质组学研究的方法已经趋于成熟。然而,肝癌相关的定量磷酸化蛋白质组学的研究目前还鲜有报道。本研究采用具有相同遗传背景但是具有不同侵袭转移能力的两个细胞系进行肝癌的磷酸化蛋白质组学研究。选取这两种肝癌细胞样品可以有效避免假阳性结果,保证了实验结果的有效性;通过精氨酸和赖氨酸双重 SILAC 标记细胞的方法解决了蛋白质酶切产生肽段过长的的问题,为磷酸化

肽段的鉴定提供了基础;本研究采用的 IMAC 方法对磷酸化肽段的富集可使富集效率达到 79%,为实现磷酸化肽段的鉴定提供了保障。

GO 分析显示,在选取的这两株肝癌细胞系中磷酸化修饰水平变化的蛋白质主要参与了细胞骨架、细胞迁移、染色体组装、对雌性激素的应激、囊泡介导的转运和受体介导的内吞等过程。其中参与细胞骨架重塑的磷酸化蛋白质在两株细胞系中的差异最明显,表明细胞骨架的重塑是引起 MHCC97-L 向 MHCC97-H 转移潜能提高的主要原因。

在肿瘤的发生、发展和侵袭转移过程中往往伴随着 PRKCA 的变化。然而 PRKCA 的磷酸化修饰形式在肝癌侵袭转移中的变化还未有文献报道。已有研究^[5]显示 PRKCA 的 Thr-497、Thr-638 和 Ser-657 磷酸化修饰是其活化所必需的。在本研究中 PRKCA 第 497 位的苏氨酸磷酸化的修饰量在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 细胞间存在显著性差异。STRING 网络分析表明,PRKCA 与参与细胞骨架组装的蛋白质 FLNC 和 MARCKS^[6]有相互作用,而后两种蛋白影响了细胞骨架的组装;此外,PRKCA 蛋白还可以与 JUN 蛋白有相互作用,而 JUN 蛋白的磷酸化间接影响了 MET,进而调控细胞的增殖转移;与血红素分解代谢的限速酶 HMOX1 蛋白的相互作用,可以降低细胞对凋亡的敏感性。因此推测 PRKCA 蛋白的磷酸化修饰的变化在肝癌细胞的迁移过程中起着重要的调控作用。但是由于实验的覆盖度不足,并没有完全覆盖 PRKCA 蛋白的 Thr-638 和 Ser-657 磷酸化修饰的肽段。

NES 作为肝脏干细胞和星状细胞的标志物通常会在肝癌中高表达^[7-8],并且该蛋白可以促进细胞的分裂。本研究通过比较该蛋白在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中的磷酸化肽段的修饰水平,发现 NES 蛋白的磷酸化修饰量在这两株细胞中存在明显变化。进一步的 STRING 网络分析显示,NES 与 MAP2 蛋白有相互作用,并位于 MAP2 参与调控微管组装途径的上游,此外,在该途径中 MAP2 及与 MAP2 相互作用的 CLASP2 蛋白的磷酸化修饰量与 NES 的磷酸化修饰量的变化趋势是一致的。因此,推测 NES 蛋白的磷酸化修饰量与 MHCC97-L 和 MHCC97-H 侵袭转移能力的不同有密切关系。

(感谢上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所刘银坤教授惠赠 MHCC97-L 和 MHCC97-H 细胞株。感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所

的汪迎春实验室和北京生命科学研究所的董梦秋实验室在磷酸化富集方面提供的支持和指导。)

参考文献

- [1] Gauthier A , Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update [J]. *Hepatol Res* ,2013 ,43 (2) : 147 - 54.
- [2] Xu P , Duong D M , Seyfried N T , et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation [J]. *Cell* ,2009 ,137(1) : 133 - 45.
- [3] Zhai L , Chang C , Li N , et al. Systematic research on the pre-treatment of peptides for quantitative proteomics using a C₁₈ micro-column [J]. *Proteomics* ,2013 ,13(15) : 2229 - 37.
- [4] Seyfried N T , Gozal Y M , Dammer E B , et al. Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains [J]. *Mol Cell Proteomics* ,2010 ,9(4) : 705 - 18.
- [5] Debata P R , Ranasinghe B , Berliner A , et al. Erk1/2-dependent phosphorylation of PKC alpha at threonine 638 in hippocampal 5-HT(1A) receptor-mediated signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 ,397(3) :401 - 6.
- [6] Kalwa H , Sartoretto J L , Martinelli R , et al. Central role for hydrogen peroxide in P2Y1 ADP receptor-mediated cellular responses in vascular endothelium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2014 ,111(9) : 3383 - 8.
- [7] Yang X R , Xu Y , Yu B , et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut* ,2010 ,59(7) : 953 - 62.
- [8] Luk J M , Burchard J , Zhang C , et al. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival [J]. *J Biol Chem* ,2011 ,286(35) : 30706 - 13.

Quantitative phosphoproteomics study of hepatocellular carcinoma cell lines with different metastatic potential

Yi Tailong^{1,2} , Tian Miaomiao² , Zhai Linhui² , et al

(¹Dept of Postgraduate , Anhui Medical University , Hefei 230032; ²Institute of Radiation Medicine , Academy of Military Medical Sciences , Beijing Proteome Research Center , State Key Laboratory of Proteomics , Beijing 102206)

Abstract Objective To study the phosphoproteome dynamic change of hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines with different invasion and metastasis potential. **Methods** MHCC97-L was cultured in medium containing heavy isotope labeled lysine and arginine by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). And MHCC97-H was cultured in medium containing light isotope labeled lysine and arginine. Proteins of completely labeled MHCC97-L and MHCC97-H were mixed at 1:1 ratio and digested by trypsin. Digested peptides were desalted and the phosphopeptides were enriched by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and analyzed by LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry). The MS data were processed using the MaxQuant software. Quantified phosphopeptides were filtered by Z-test for altered phosphopeptides. The proteins were analyzed by gene ontology (GO) biological processes and STRING protein-protein interaction. **Results** 918 phosphopeptides were identified ,806 of which could be localized and quantified. By means of Z-test ,91 phosphopeptides , which were corresponding to 25 phosphoproteins , altered between MHCC97-L and MHCC97-H. According to GO analysis , cytoskeleton organization seriously perturbed between these two cell lines. STRING protein-protein interaction indicated that NES and PRKCA were two key proteins. **Conclusion** Cytoskeleton organization dysfunction is closely related to invasion and metastasis between these two cell lines. Further analysis indicates that phosphorylation of NES and PRKCA , which is involved in cytoskeleton organization and MAPK signaling pathway separately , plays an important role during metastasis of HCC.

Key words quantitative phosphoproteomics; SILAC; immobilized metal ion affinity chromatography; hepatocellular carcinoma; invasion and metastasis