

人胃癌细胞环氧合酶-2 表达的蛋白质组双向凝胶电泳分析

高 飞, 潘阳林, 麻树人, 孙立军, 梁 洁, 吴开春

高飞, 潘阳林, 孙立军, 梁洁, 吴开春, 中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化疾病研究所 陕西省西安市 710033

麻树人, 沈阳军区总医院消化内镜中心 辽宁省沈阳市 110015

高飞, 男, 1976-12-01 生, 辽宁省沈阳人, 汉族. 第四军医大学西京医院全军消化疾病研究所, 医师. 主要从事胃癌的基础研究工作.

国家自然科学基金资助课题, No. 39870320

通讯作者: 吴开春, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化疾病研究所. kaicwu@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375230 传真: 029-83375221

收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-26

Proteomic analysis of human gastric carcinoma cells with different levels of COX-2 by two-dimensional electrophoresis

Fei Gao, Yang-Lin Pan, Shu-Ren Ma, Li-Jun Sun, Jie Liang, Kai-Chun Wu

Fei Gao, Yang-Lin Pan, Li-Jun Sun, Jie Liang, Kai-Chun Wu, Chinese PLA Institute of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi Province, China

Shu-Ren Ma, Center of Digestive Endoscopy, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110015, Liaoning Provinces China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.39870320

Correspondence to: Kai-Chun Wu, Chinese PLA Institute of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi Province, China. kaicwu@fmmu.edu.cn

Received: 2005-01-17 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: To establish and optimize the methods for proteome research, and to comparatively analyze the proteomes of human SGC7901-asCOX2 cells and SGC7901-pcDNA cells.

METHODS: A series of methods, including immobilized pH gradient two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE), silver staining, and Melanie 3 2-D analysis software, were used to analyze the difference of protein expression between SGC7901-asCOX2 cells and SGC7901-pcDNA cells.

RESULTS: The 2DE pattern with good resolution and reproducibility was obtained. After silver staining, the 2DE image was analyzed by Melanie 3 2-D software. The results showed that 6 protein spots were exclusively detected in SGC7901-pcDNA cells, and 4 spots were detected in SGC7901-asCOX2 cells. Compared to SGC7901-pcDNA cells, there were 10 protein spots downregulated in SGC7901-asCOX2, and 6 protein spots upregulated.

CONCLUSION: There is a significant difference between proteomes of human gastric SGC7901-asCOX2 cells and SGC7901-pcDNA cells.

Key Words: Proteome; Gastric carcinoma; COX-2; Two-dimensional electrophoresis

Gao F, Pan YL, Ma SR, Sun LJ, Liang J, Wu KC. Proteomic analysis of human gastric carcinoma cells with different levels of COX-2 by two-dimensional electrophoresis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(7):840-843

摘要

目的: 建立和优化胃癌蛋白质组研究的方法系统, 并分析人胃癌细胞 SGC7901-asCOX2 及 SGC7901-pcDNA(用 COX-2 反义重组质粒及空载体分别转染胃癌细胞系 SGC7901 得到的两个细胞系)表达的蛋白质组, 并建立二者之间的差异表达谱。

方法: 用固相 pH 梯度双向凝胶电泳分离 SGC7901-asCOX2 及 SGC7901-pcDNA 细胞总蛋白, 银染显色, Melanie3 2-D 软件分析两种细胞蛋白质组的表达差异。

结果: 获得了分辨率和重复性均较好的双向电泳银染图谱。图像分析发现 6 个蛋白点只在 SGC7901-pcDNA 细胞中检测到表达, 4 个点只在 SGC7901-asCOX2 细胞中检测到表达。与 SGC7901-pcDNA 细胞相比, 在 SGC7901-asCOX2 细胞中有 10 个蛋白质点表达下调, 6 个蛋白点表达上调。

结论: 人胃癌细胞 SGC7901-asCOX2 及 SGC7901-pcDNA 表达的蛋白质组有明显差异。

关键词: 蛋白质组; 胃癌; 环氧合酶-2; 双向凝胶电泳

高飞, 潘阳林, 麻树人, 孙立军, 梁洁, 吴开春. 人胃癌细胞环氧合酶-2 表达的蛋白质组双向凝胶电泳分析. 世界华人消化杂志 2005;13(7):840-843
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/840.asp>

0 引言

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在多数胃癌组织及细胞系中表达异常增高^[1-5], 而抑制 COX-2 的活性可使胃癌细胞的增生受抑制^[6-10], 凋亡增加, 其机制不详^[11-13]. 蛋白质组学研究能够全貌性对比不同 COX-2 表达水平细胞的蛋白质表达差异, 是查找特征

性功能蛋白质和标志物的有力手段^[14-17]. SGC7901-pcDNA和SGC7901-asCOX2是本研究所分别用空载体和COX-2反义载体转染SGC7901细胞而衍生的两个细胞系,SGC7901-asCOX2中COX-2的表达水平比SGC7901-pcDNA低.以这两个细胞系为模型,我们拟建立和优化胃癌蛋白质组研究的方法系统,用双向凝胶电泳技术分离细胞总蛋白,采用图像分析软件对数字化电泳图谱进行分析比对,以期建立两种蛋白质差异表达谱,为差异蛋白的进一步筛选鉴定胃癌细胞中介导COX-2作用的蛋白质分子奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901-asCOX2及SGC7901-pcDNA细胞由本研究所保存提供、用100 mL/L小牛血清+RPMI1640培养液进行传代培养.小牛血清、RPMI1640培养基为Gibco公司产品;二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺、SDS均为Sigma公司产品;固相pH梯度干胶条(pH4-7L, 13 cm)、immobilized pH gradient(IPG)缓冲液(pH4-7L)、低分子质量标准蛋白Marker均为Amersham Pharmacia公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素(urea)、甘氨酸、溴酚蓝、Tris、过硫酸铵、TEMED、3-(cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulphonate(CHAPS)均为Promega公司产品;无水碳酸钠、乙酸、甲醇、硝酸银、甲醛、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、乙酸钠为国产分析纯;所有溶液均用去离子水配制.

1.2 方法 用含100 mL/L小牛血清的培养基复苏人SGC7901-asCOX2及SGC7901-pcDNA细胞,收集 1×10^7 对数生长期细胞,加入细胞裂解液200 μL (7 mol/L urea+2 mol/L 硫脲+40 g/L CHAPS+两性电解质5 g/L +PMSF 1mmol/L+DTT 15 mmol/L).充分混合并用22号注射器抽吸溶液,4℃静置30 min,再反复抽吸1-2 min,12 000 g 4℃离心15-20 min,收集上清并用Bradford法测定蛋白浓度,其余上清液冻存于-70℃.第一相固相pH梯度等电聚焦主要按Gorg *et al*^[18]的方法和IPGphorTM等电聚焦系统指南进行.细胞总蛋白提取物(50 μg)+250 μL 溶胀液(8 mol/L urea+5 g/L CHAPS+痕量溴酚蓝)+5 g/L IPG buffer (pH4-7L)+2 g/L DTT充分混合,室温静置1 h后加入IPGstrip持胶槽,将IPG干胶条去保护膜胶面朝下,轻轻置入持胶槽中,驱除气泡,覆盖一层矿物油,盖好持胶槽盖子,置于IPGphor等电聚焦仪的电极板上,水化和聚焦在20℃自动进行,总电压时间积为22 000 Vh,其中水化在30 V低电压进行14 h,然后经过200 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h,最后稳定在8 000 V下进行2.5 h.等电聚焦结束后,迅

速取出带样品的IPG胶条并用少量去离子水冲掉胶条上矿物油,分别于平衡液A(50 mmol/L Tris-HCl pH8.8 +6 mol/L urea +300 mL/L甘油+20 g/L SDS+10 g/L DTT+痕量溴酚蓝)10 mL和平衡液B(50 mmol/L Tris-HCl pH8.8 +6 mol/L urea +300 mL/L甘油+20 g/L SDS+25 g/L 碘乙酰胺+痕量溴酚蓝)10 mL中各平衡12 min.将平衡后的IPG胶条移至1.0 mm厚的100 g/L的均匀分离胶的上端,并在其阴极一端的外侧加上SDS标准蛋白质,排净气泡后用10 g/L琼脂糖封固,冰袋降温,先用20 mA/2块胶恒流电泳,待溴酚蓝迁移至分离胶的界面时换用40 mA/2块胶恒流电泳直至溴酚蓝到达距胶底边约2 cm处停止电泳.按Yan *et al*^[19]方法进行银染.其基本过程依次是:100 mL/L冰乙酸+400 mL/L乙醇固定90 min;300 mL/L乙醇+2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ +68 g/L 乙酸钠敏化30 min;去离子水洗3次,每次5 min;2.5 g/L AgNO_3 染色20 min;去离子水洗2次,每次1 min;25 g/L Na_2CO_3 +74 mg/L 甲醛显影至斑点清晰为止,约5-10 min;加入14.6 g/L EDTA- $\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 终止10 min;去离子水洗3次,每次5 min;用10 mL/L冰乙酸于4℃保存.银染显色的凝胶通过GelDoc 2000凝胶成像系统获取图像,用Melanie3 2-D分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配、量化获取斑点位置坐标等分析^[20].

2 结果

2.1 双向凝胶电泳图谱 在相似条件下分别对来自SGC7901-asCOX2及SGC7901-pcDNA的总蛋白样品重复进行了3次双向电泳,从肉眼观察发现同样品的3次双向电泳图谱基本一致.从左到右等电点降低,从上往下分子质量降低.从图1可以看到,左右两侧斑点较少,中间斑点数目相对集中.蛋白质相对分子质量主要集中在 M_r 20 000- M_r 100 000之间,大于 M_r 100 000和小于 M_r 20 000的蛋白质分子很少.各染色深浅和面积差异很大,示意蛋白质质量各不相同(图1).

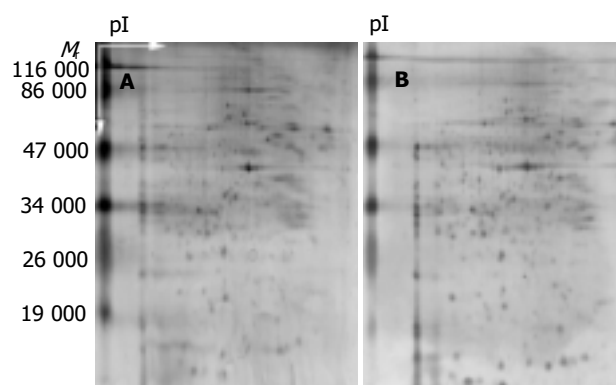


图1 人胃癌细胞系双向凝胶电泳图谱(银染). A:SGC7901-asCOX2; B:SGC7901-pcDNA.

2.2 双向凝胶电泳图谱 人SGC7901-asCOX2及SGC7901-pcDNA细胞总蛋白质点数分别为745和727(图1),并以其中一块胶为参考胶进行2块胶间的斑点匹配,其匹配的点数为526,匹配率为70.6%.图像分析发现6个蛋白质点只在SGC7901-pcDNA细胞中检测到表达,4个点只在SGC7901-asCOX2细胞中检测到表达.与SGC7901-pcDNA细胞相比,在SGC7901-asCOX2细胞中有10个蛋白质点表达下调,6个蛋白质点表达上调.表1,2分别给出了两种细胞缺失、新增以及蛋白表达量有变化的部分蛋白质斑点.

表1 仅在SGC7901-pcDNA细胞和SGC7901-asCOX2细胞中表达的蛋白质

细胞	蛋白点 ID	等电点(pI)	M_r
SGC7901-pcDNA	104	4.97	67 220
SGC7901-pcDNA	380	5.29	40 100
SGC7901-pcDNA	403	5.31	39 600
SGC7901-pcDNA	539	5.40	31 200
SGC7901-pcDNA	589	5.45	27 500
SGC7901-pcDNA	611	5.44	25 000
SGC7901-asCOX2	563	4.48	29 200
SGC7901-asCOX2	622	5.41	23 100
SGC7901-asCOX2	624	5.11	21 900
SGC7901-asCOX2	722	4.88	11 400

表2 SGC7901-pcDNA细胞和SGC7901-asCOX2细胞中表达较高的蛋白质

细胞	蛋白点 ID	等电点(pI)	M_r
SGC7901-pcDNA	65	6.10	80 300
SGC7901-pcDNA	268	5.96	48 600
SGC7901-pcDNA	303	6.90	47 200
SGC7901-pcDNA	369	5.92	41 500
SGC7901-pcDNA	401	5.42	39 800
SGC7901-pcDNA	498	5.37	35 100
SGC7901-pcDNA	533	6.20	32 200
SGC7901-pcDNA	587	5.53	28 800
SGC7901-pcDNA	607	5.50	26 400
SGC7901-pcDNA	738	5.21	13 300
SGC7901-asCOX2	123	5.23	50 700
SGC7901-asCOX2	219	5.69	47 900
SGC7901-asCOX2	468	5.65	35 900
SGC7901-asCOX2	526	5.51	33 700
SGC7901-asCOX2	584	6.23	26 500
SGC7901-asCOX2	635	5.43	20 400

3 讨论

我们采用Amersham Pharmacia公司新的水平等电聚焦系统IPGphor进行第一向等电聚焦,由于最高电

压可达8 000 V,大大缩短了聚焦时间,采用胶内加样方法,IPG干胶条重泡涨和等电聚焦在同一个持胶槽中一步完成,同样可获得高分辨的双向电泳图谱.我们最初在裂解液中使用40 mmol/L Tris以维持碱性环境,这种碱性环境能够抑制蛋白酶裂解蛋白质的活性^[21],在等电聚焦的电泳中我们发现40 mmol/L Tris常常导致较高的电流强度,故电压常不能上升到8 000 V,且横条纹较多.而有报道,在裂解液中加入CHAPS对大部分蛋白酶均有较强烈的抑制作用^[22].因此,我们在裂解液中使用了40 g/L CHAPS,结果发现电压可以上升到8 000 V并稳态聚焦,减少了盐离子造成的横条纹的产生,提高了电泳图谱的质量.蛋白质斑点较为密集的区域,蛋白质斑点互相融合,高丰度蛋白常常掩盖了低丰度蛋白,宽范围IPG干胶条(pH3-10)常不能得到满意的分辨率.因此,可以根据需要选择较窄范围的IPG干胶条使准确检测和分析低丰度蛋白成为可能,而低丰度蛋白质常常在生物学过程中起着极为重要的调节作用^[23-24].有关IPG-DALT系统的双向电泳技术条件Gorg *et al*^[25]和俞利荣 *et al*^[26]有较详细的论述,我们的实验表明,对13 cm长pH=4-7的IPG胶条,分析型双向电泳上样35-60 μ g可获得分辨率很好的图谱,电泳时间明显缩短,上样量大于100 μ g已不适于银染检测,靠得很近的蛋白点不能分辨.银染法是一种能够衔接质谱的染色方法^[27],在差异蛋白点得到确证后即可通过质谱加以鉴定.

我们采用的细胞模型是SGC7901-asCOX2和SGC7901-pcDNA,是本研究所用COX-2反义重组质粒及空载体分别转染人胃癌细胞系SGC7901所获得的细胞株,通过RT-PCR,免疫组化和Western Blot等技术均证明SGC7901-asCOX2中COX-2的表达明显低于SGC7901-pcDNA和亲本细胞系SGC7901,提示SGC7901-asCOX2及SGC7901-pcDNA这一对细胞模型可有效的用于COX-2的功能研究^[28],获得了SGC7901-asCOX2和SGC7901-pcDNA两株细胞系较好的双向电泳图谱.软件初步分析了部分差异表达蛋白点,发现两蛋白质谱的差异主要表现在双向电泳图谱的增减以及染色的深浅上,提示两种细胞蛋白质发生了质(蛋白质点的缺失、增加以及位置改变等)和量(蛋白质点染色的深浅)的变化,这种变化可能由以下几种因素引起:首先COX-2表达增强了部分蛋白质的表达,表现为SGC7901-pcDNA细胞所特有和部分含量增加的蛋白质点.其次,COX-2的表达降低了部分蛋白质的表达,表现为SGC7901-asCOX2细胞所特有和部分含量增加的蛋白质点.另外,COX-2所特有的蛋白质可能参与了某些蛋白质的合成和修饰.

总之,通过比较双向电泳图谱,初步建立了胃

癌蛋白质组研究的方法系统并筛选出许多 SGC7901-asCOX2 细胞和 SGC7901-pcDNA 细胞蛋白差异点. 进一步结合肽质量指纹图谱^[29]和氨基酸序列分析^[30-31]等手段鉴定差异蛋白,了解有关蛋白质在胃癌发生中的作用以及 COX-2 的作用机制将是后继主要工作.

4 参考文献

- 1 李玲,吴开春,聂永战,吴汉平,王春梅,樊代明.人胃癌细胞系环氧合酶的表达、分布及其意义. *中华消化杂志* 2000;20:374-377
- 2 罗玉琴,吴开春,孙安华,潘伯荣,张学庸,樊代明.浅表性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中 COX-1、COX-2、iNOS 表达的意义. *中华消化杂志* 2000;20:223-226
- 3 To KF, Chan FK, Cheng AS, Lee TL, Ng YP, Sung JJ. Up-regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in human gastric ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:25-34
- 4 Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkkilä S, Harkonen M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1923-1931
- 5 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-138
- 6 Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase-2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5292-5297
- 7 徐美虹,吴开春,吴汉平,么立萍,樊代明.非甾体类抗炎药对胃癌细胞增生的抑制作用. *中华消化杂志* 2002;22:199-202
- 8 Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Müller-Decker K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7629-7634
- 9 Müller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12483-12488
- 10 唐保东,胡品津,曾志荣,林汉良,何瑶.特异性环氧合酶-2抑制剂预防胃癌的实验研究. *中华消化杂志* 2004;24:158-161
- 11 徐美虹,吴开春,吴汉平,么立萍,樊代明.尼美舒利对胃癌抑制作用的实验研究. *解放军医学杂志* 2003;28:246-248
- 12 刘纯伦,唐承薇,万学红,王春晖,周旭春.选择性环氧合酶-2抑制剂对胃癌细胞生长的影响. *四川大学学报·医学版* 2003;34:480-483
- 13 孙波,吴云林,张学军,王升年,贺恒益,乔敏敏,章永平,钟捷.舒林酸抑制人胃癌细胞增生及诱导凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:997-1002
- 14 Dierick JF, Dieu M, Remacle J, Raes M, Roepstorff P, Toussaint O. Proteomics in experimental gerontology. *Exp Gerontol* 2002;37:721-734
- 15 Schoneich C. Proteomics in gerontological research. *Exp Gerontol* 2003;38:473-481
- 16 李峰,关勇军,陈主初.蛋白质组学及其在肿瘤研究中的应用. *生物化学与生物物理进展* 2001;28:164-167
- 17 Petricoin EF, Ornstein DK, Liotta LA. Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. *Urol Oncol* 2004;22:322-328
- 18 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-1053
- 19 Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:3666-3672
- 20 詹显全,陈主初.蛋白质组中蛋白质鉴定技术的研究近况. *国外医学·分子生物学分册* 2002;24:129-133
- 21 兰彦,钱小红,王阁,李勇,罗凌,柳正良,贺福初.蛋白质组分析中蛋白质分步提取方法的建立. *生物化学与生物物理进展* 2001;28:415-418
- 22 Castellanos-Serra L, Paz-Lago D. Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments. *Electrophoresis* 2002;23:1745-1753
- 23 Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, Walsh BJ, Bryson WG, Williams KL. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 1998;19:845-851
- 24 Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-127
- 25 Gorg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): The state of the art and controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 1995;16:1079-1086
- 26 俞利荣,王楠,吴高德,徐永华,夏其昌.人肝癌细胞系 BEL-7404T 和正常肝细胞系 L-02 表达的蛋白质组双向凝胶电泳分析. *科学通报* 2000;45:170-178
- 27 姜楠,霍海如,姜廷良.蛋白质组检测技术进展. *国外医学·卫生学分册* 2004;31:55-58
- 28 吴汉平,吴开春,么立萍,徐美虹,樊代明.环氧合酶-2 反义核酸抑制胃癌细胞的恶性表型. *中华内科杂志* 2002;41:534-537
- 29 应万涛,焦丽燕,钱小红.生物质谱与蛋白质组学. *生物技术通讯* 2004;15:259-262
- 30 王贤纯,梁宋平.电喷雾串联质谱图的叠合与多肽序列分析. *生物化学与生物物理学报* 2001;33:665-670
- 31 成海平,钱小红.蛋白质组研究的技术体系及其进展. *生物化学与生物物理进展* 2000;27:584-588

编辑 潘伯荣 审读 张海宁