

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0212-08

辐射致癌相关蛋白质的筛选及其表达

崔建国, 蔡建明*, 高 福, 赵 芳, 董俊瑞, 李百龙(第二军医大学 海军医学系 放射医学教研室, 上海 200433)

[摘 要] 目的: 通过建立辐射致癌的细胞模型, 应用蛋白质组学技术观察辐射癌变细胞和正常细胞间的差异蛋白表达谱, 以期获得辐射致癌相关蛋白。**方法:** 选取永生化的支气管上皮细胞株(BEAS-2B), 利用 γ 射线照射诱导癌变, 建立辐射致癌的细胞模型。应用二维凝胶电泳技术, 筛选癌变细胞和正常细胞间的差异表达蛋白点并进行质谱鉴定分析。通过实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 技术对其中 4 个蛋白(ENO1、Prx I、Dyrk2 和 GPX1)在辐射致癌不同阶段的表达情况进行分析。**结果:** 在辐射癌变细胞和正常细胞间共得到差异表达蛋白点 59 个, 其中 14 个点仅在癌变细胞中表达, 15 个点仅在正常细胞中表达, 23 个点在癌变细胞中表达降低, 7 个点在癌变细胞中表达升高。通过质谱分析, 共有 26 个蛋白质点得到鉴定, 主要包括一些参与细胞代谢、增殖、分化的酶类、信号调控蛋白、DNA 结合蛋白以及一些细胞结构蛋白、少数功能不明的蛋白及肽段, 其中 ENO1 和 Prx I 随辐射癌变的进展而升高, Dyrk2 和 GPX1 随辐射癌变的进展而降低。**结论:** 应用二维电泳技术获得了辐射致癌差异表达蛋白谱, 筛选和鉴定了与辐射致癌相关的差异表达蛋白, 并分析部分差异蛋白在辐射致癌不同阶段的表达情况。研究结果为阐明辐射致癌机制提供了实验依据。

[关键词] 辐射致癌; 差异表达蛋白; 蛋白质组学; 二维凝胶电泳**[中图分类号]** R730.231 **[文献标志码]** A

Proteomic analysis of proteins associated with radiation-induced carcinogenesis

CUI Jian-guo, CAI Jian-ming*, GAO Fu, ZHAO Fang, DONG Jun-rui, LI Bai-long (Department of Radiomedicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To establish a cell model of radiation-induced carcinogenesis and to observe the different protein profile between radiation-induced cancer cells and normal cells by proteomic method, so as to obtain proteins associated to radiation-induced carcinogenesis. **Methods:** Immortalized human bronchial epithelial cell line BEAS-2B was radiated with γ ray to established radiation-induced carcinogenesis cell model. Two-dimensional (2D) electrophoresis was employed to identify the altered protein profile between radiation-induced cancer cells (BR₂₂P₅₀) and normal cells (BNP₅₀). The differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry; the expression of 4 differentially expressed proteins (ENO1, Prx I, Dyrk2 and GPX1) was analyzed by fluorescent RT-PCR and Western blotting at different phases of carcinogenesis. **Results:** Totally 59 protein spots were found to be differentially expressed between BR₂₂P₅₀ and BNP₅₀ cells, with 14 only expressed in BR₂₂P₅₀ cells, 15 only expressed in BNP₅₀. For the other 30 spots, 7 spots were highly expressed and 23 spots were lowly expressed in BR₂₂P₅₀ cells. Using MALDI-TOF MS technology, 26 spots were identified by PMF, including enzymes, structure proteins, cell signal proteins, binding proteins, metabolism related proteins, some unknown function proteins and ploy-peptides. RT-PCR and Western blotting showed that expression of ENO1 and Prx I were increased and of Dyrk2 and GPX1 were decreased with the advancement of radiation carcinogenesis. **Conclusion:** 2D electrophoresis is effective in identifying the protein expression profiles between BR₂₂P₅₀ and BNP₅₀ cells. Some differentially expressed proteins have been analyzed during the development of radiation carcinogenesis. This study may provide a novel clue to probe the mechanism of radiation carcinogenesis.

[Key words] radiation carcinogenesis; differentially expressed proteins; proteome; two-dimensional gel electrophoresis

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 212-219]

电离辐射引发的肿瘤是最严重的辐射远后效应之一。目前辐射致癌的发生、发展过程及机制仍不明确。癌症的发生是一个复杂的过程, 大量的基因和活性蛋白牵涉其中, 仅仅对单个基因和蛋白质的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370359)。Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30370359)

[作者简介] 崔建国(1977. 6 -), 男, 天津市人, 博士, 讲师, 主要从事辐射致癌机制的研究; E-mail: mustardecc@yahoo. com. cn

* Corresponding author. E-mail: cjm882003@yahoo. com. cn

变化进行研究,得到的多是孤立的结果,具有一定的局限性,无法深刻和全面地了解肿瘤的发生机制。因此,对正常细胞与辐射恶变细胞间差异蛋白表达谱的研究十分必要,将有助于对辐射致癌机制的理解和阐释。目前对辐射诱导癌变细胞差异表达蛋白谱的研究较少。钱晓红等^[1]曾对 α 粒子照射诱导癌变的人支气管上皮细胞 BEP-2D 的蛋白表达谱进行了观察,但对 γ 射线引发肿瘤的蛋白谱相关研究尚未见报道。本研究通过建立 γ 射线诱导癌变的细胞模型,应用蛋白质组学技术观察辐射癌变细胞和正常细胞的差异蛋白表达谱,并对部分差异表达蛋白在辐射癌变不同阶段表达情况进行了观察。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞株

无血清培养液(LHC-8)购自美国 Biosource 公司。ReadyPrep Protein Extraction Kit、ReadPrep 2-D Cleanup Kit、100 \times Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 购自美国 Bio-Rad 公司。Immobiline DryStrip pH 3~10 NL 13 cm 购自 Amersham 公司。TaKaRa Ex TaqTM Hot Start Version、TaKaRa TaqTM、ExScript RT reagent Kit 均购自大连 Takara 公司。Nucleospin RNA Purification Kit 购自美国 Clontech 公司。山羊源多克隆抗 Prx 1 抗体、抗 GPX 1 抗体、抗 Dyrk2 抗体均购自 Santa Cruz 公司。小鼠源单克隆抗 ENO 1 抗体购自 Abnova 公司。小鼠源单克隆抗 β -actin 抗体购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗和羊抗鼠二抗购自 QED Bioscience 公司。裸鼠为 BALB/c Nu 品系,4~8 周龄,雌雄各半,购自上海实验动物中心[合格证号为 SCXK(沪 2003-003)]。

1.2 辐射致癌细胞模型的建立

1.2.1 细胞培养、诱导及命名 选取 SV40 病毒感染的永生化的人支气管上皮细胞株(BEAS-2B),LHC-8 无血清培养液 37 $^{\circ}$ C 培养。 γ 射线分 3 次进行照射诱导癌变:细胞贴壁后 40 h 进行第 1 次照射,吸收剂量 6 Gy,吸收剂量率 0.44 Gy/min;传代至第 10 代进行第 2 次照射,吸收剂量 8 Gy;继续传代至第 19 代进行第 3 次照射,吸收剂量为 8 Gy,此时细胞记为 P₀代,总照射剂量为 22 Gy。

细胞命名式为 BN(R_n)P_m: B 表示细胞来源于 BEAS-2B 细胞株;N 代表正常对照细胞;R 表示 γ 射线照射后的细胞;n 为接受 γ 射线照射的总剂量(对照组正常细胞无 n);m 代表细胞代数。如 BNP₃₅代表正常第 35 代 BEAS-2B 细胞,BR₂₂P₄₀则代表 22 Gy γ 射线照射后第 40 代 BEAS-2B 细胞,依此类推。

1.2.2 细胞恶性程度鉴定 细胞恶性程度利用平板克隆形成实验、血清抗性实验、软琼脂克隆形成实验、裸鼠致瘤实验进行鉴定。辐照后细胞分别在第 35 代、第 45 代、第 50 代和第 60 代时进行裸鼠致瘤实验,移植细胞总数约 1 \times 10⁷/次,每次移植动物数为 6~8 只。细胞接种于裸鼠颈背部皮下,SPF 级喂养,连续观察 50 d 以上。本部分工作由本教研室高福博士完成,细胞辐照后培养至第 50 代(BR₂₂P₅₀)时证实发生癌变,免疫组化表明瘤内细胞为人上皮细胞来源,该细胞系可作为后续实验细胞模型使用。

1.3 细胞蛋白质双向电泳分析

1.3.1 蛋白样品制备 经细胞计数后,取 5 \times 10⁷对数生长期的 BNP₅₀和 BR₂₂P₅₀细胞,冰 PBS 缓冲液冲洗 2 遍,加入 Rehydration/Sample Buffer(Bio-Rad, USA) 1 ml,细胞刮刀抽提细胞蛋白质。超声裂解核酸片段 30 s \times 3 次,冰上操作。16 000 \times g 18~20 $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清。改良 Bradford 法测定样品蛋白浓度后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 双向电泳、凝胶成像及图像分析 细胞总蛋白(500 μ g)与含 1% TBP 的重水化液混合至总体积 250 μ l,室温下被动水化 16 h。等电聚焦设置:300 V 3 h,3 500 V 8.5 h。一向 IEF 结束后在含 1% DTT 的平衡液 I 和含 2.5% 碘乙酰胺的平衡液 II 中分别平衡 15 min。第二向电泳采用 12% 的均一胶,5 mA 泳动 45 min,20 mA 直至溴酚蓝泳动至胶底部。电泳后银染显色。每组样品重复 3 次电泳。

利用 ChemiImage 5500 CCD 成像系统进行灰度扫描成像(300DPI,8bits),用 Image Master Platinum 5.0 图像分析软件对 BNP₅₀和 BR₂₂P₅₀细胞总蛋白进行差异点分析,选取表达量差异 2 倍以上的点作为后续质谱分析的候选点。

1.4 表达差异蛋白的质谱分析

选取部分差异蛋白点,利用 MALDI-TOF MS 对蛋白点进行肽指纹谱(PMF)鉴定。

1.4.1 胶内酶切及质谱鉴定 将胶块切碎,加入 200 μ l 脱银液(100 mmol/L 铁氰化钾和 30 mmol/L 硫代硫酸钠按 2:1 混和),放置 2~3 min。500 μ l 超纯水洗 3 次。加入 100 mmol/L 碳酸氢氨与乙腈按 1:1 混合的溶液室温振摇 15 min,弃上清。加入 50 μ l 乙腈使胶脱水。重复 1~3 次,弃上清,真空干燥 10 min。加入 20 μ l 的胰蛋白酶溶液(20 ng/ μ l Trypsin in 50 mmol/L NH₄HCO₃),37 $^{\circ}$ C 过夜。加入 5% 三氟乙酸,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后加入 2.5% 三氟乙酸/50% 乙腈,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。将 2 次收集液体移至离心管中,真空离心干燥。新鲜配制 10 mg/ml 的

α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)基质液,将基质液与样品溶液按1:3混合。将1 μ l 基质和样品混合液点于靶上,让靶自然干燥后将靶装入质谱仪进行质谱分析。

1.4.2 数据库检索 获得的混合物肽片段质量数据通过 Mascot 搜索引擎(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)或者 MS-Fit 搜索引擎(<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) 在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)或 Swiss-prot(<http://au.expasy.org/sprot/>)数据库中进行检索。检索的参数为:设定3种可能的修饰:Carbamidomethyl(C), Oxidation(M)和 Pyro-glu(N-term E);最大允许肽质量误差为2000,每个肽允许有1个不完全裂解位点,蛋白质的分子量范围为1000~100000。

1.5 辐射致癌不同阶段部分蛋白质表达分析

1.5.1 Western blotting 分析 分别抽提正常细胞(BNP₅₀)、辐射急性期细胞(BR₆P₁)、辐射癌变早期细胞(BR₂₂P₂₀)、辐射癌变中期细胞(BR₂₂P₃₅)和辐射癌变细胞(BR₂₂P₅₀)总蛋白,以 β -actin为内参,进行Western blotting分析。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳参照《分子克隆实验指南》(第2版)的方法操作。

1.5.2 荧光定量PCR分析 利用Taqman法进行荧光定量PCR。分别抽提BNP₅₀、BR₆P₁、BR₂₂P₂₀、BR₂₂P₃₅、BR₂₂P₅₀细胞总RNA。反转录后分别对 β -actin、Prx I、ENO1、GPX1、Dyrk2进行cDNA片段扩增(扩增用外引物序列见表1)。扩增产物1%琼脂糖电泳分离后进行胶回收纯化。纯化产物利用pMD18-T载体在DH5 α 大肠杆菌中进行克隆。克隆成功后,抽提质粒送交上海博亚生物科技公司测序,确定插入序列的准确性。质粒样品经核酸定量得到其D₂₆₀值,根据公式算出:质粒浓度(ng/ μ l) = $D_{260} \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times \text{稀释终体积} (\text{ml}) \times 1000 / \text{稀释时加入的原始溶液体积} (\mu\text{l})$ 。再通过公式:质粒拷贝数(Copy/ μ l) = $\text{质粒浓度} (\text{ng}/\mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{14} / 660 \times \text{碱基数} (\text{载体的} + \text{插入片段的})$,换算成Copy/ μ l。用无RNA酶水稀释成 1×10^9 Copy/ μ l,并按1:10梯度稀释得到不同的标准Copy模板液, 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 ,于-80℃保存。利用ABI 7700 Sequence Detector进行定量PCR,定量试剂盒购自TaKaRa公司,反应体系为0.2 ml。每次检测设置3个NTC(No Template Control)。把制备好的标准曲线样品和待测样品加入同一块96

孔板中,每个样品进行3个平行样实验,PCR程序如下:50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s共50个循环。PCR结束后根据标准品Ct值绘制拷贝数标准曲线(荧光定量PCR内引物及Taqman探针序列见表1),根据此曲线计算出检测样品的质粒拷贝数(Copy/ μ l)。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS统计软件包对实验数据进行单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 辐射致癌细胞总蛋白差异表达谱

正常对照组最后共得到(1102 \pm 29)个蛋白点,癌变组最后共得到(1058 \pm 33)个蛋白点,实验组与癌变组比较,共得到877个匹配蛋白点,点匹配率分别为79.58%和82.89%(图1)。经过比对,两组凝胶共找到可信差异表达蛋白点59个。其中有14个蛋白点仅在BR₂₂P₅₀细胞中表达,15个蛋白点仅在BNP₅₀细胞中表达,另有30个点为两组细胞表达量有明显差异(2倍以上)的蛋白点($P < 0.05$),其中23个蛋白点在BR₂₂P₅₀细胞中表达降低,7个在BR₂₂P₅₀细胞中表达升高。

对所有仅在一组细胞中表达的蛋白点和部分差异表达的蛋白点利用MALDI-TOF MS技术进行了肽指纹谱(PMF)鉴定,最后共有26个蛋白质点得到了鉴定(表2)。在得到鉴定的蛋白质点中,Dyrk2和GPX1仅在BNP₅₀中表达,ENO1和Prx I仅在BR₂₂P₅₀中表达(图2)。

2.2 Western blotting 检测辐射对细胞癌变过程中各种蛋白表达的影响

Western blotting分析发现,蛋白ENO1在辐射癌变和辐射癌变中期细胞中表达明显高于正常组、辐射急性期和辐射癌变早期细胞($P < 0.01$);蛋白Prx I的表达量随着辐射剂量的增加和照后时间的延长而增加,其在正常细胞中的表达量很小,辐射癌变后表达量明显增加,两者之间存在明显差异($P < 0.01$);蛋白Dyrk2在辐射癌变各期细胞中表达量明显低于正常细胞和辐射急性期细胞($P < 0.01$);蛋白GPX1在正常细胞和辐射急性期细胞中表达量明显高于辐射癌变各期细胞($P < 0.01$),同时在癌变早期细胞中的表达量高于癌变中期和辐射癌变组细胞($P < 0.01$,图3,4)。

2.3 荧光定量PCR检测辐射对细胞癌变过程中mRNA表达的影响

荧光定量 PCR 检测显示, ENO1 的 mRNA 拷贝数由正常组细胞至辐射癌变组细胞间逐渐上升,且各组之间存在统计学差异 ($P < 0.05$); 其中辐射癌变组细胞与除辐射癌变中期细胞外的各组细胞间差异明显 ($P < 0.01$)。Prx 1 的 mRNA 拷贝数随着辐射剂量的增加和照后时间的延长而增加,除辐射癌变组和辐射癌变中期细胞间无显著差异外 ($P > 0.05$),其余各组间差异显著 ($P < 0.01$)。Dyrk2 的 mRNA 拷贝数随着辐射剂量的增加和照后时间的延长而减少,除辐射癌变组和辐射癌变中期细胞间无显著差异外 ($P > 0.05$),其余各组间差异显著 ($P < 0.01$)。

GPX1 的 mRNA 拷贝数由正常组细胞至辐射癌变组细胞间逐渐降低,除辐射癌变组细胞与癌变中

期细胞间无明显差异 ($P > 0.05$) 外,其余各组之间存在显著统计学差异 ($P < 0.01$, 表 3、图 5)。

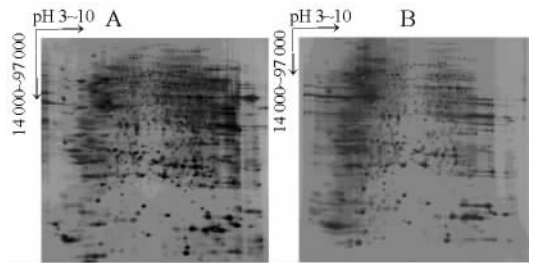


图 1 双向凝胶蛋白电泳检测辐射对 BNP_{50} (A) 和 $BR_{22}P_{50}$ (B) 细胞总蛋白表达的影响

Fig. 1 Expression profiles of proteins in BNP_{50} (A) and $BR_{22}P_{50}$ (B) cells as detected by 2D electrophoresis

表 1 荧光定量 PCR 内引物及 Taqman 探针序列

Tab. 1 Primers and Taqman probes of each genes for PCR analysis

Name		Nucleic acid sequence	Length	Tm(t/°C)	GC(%)
Human β -actin	Outer primer	Sense: TCACCATGGATGATGATATCGC	22	59	45
		Antisense: CATTGTAGAAGGTGTGGTGCCA	22	59	50
	Inner primer	Sense: CCGTCTTCCCCTCCATCG	18	59	67
		Antisense: GTCCCACTTGGTGACGATGC	20	59	60
	Taqman probe	FAM-CCAGGGCGTGATGGTGGGCAT-TAMRA	21	60	67
Dyrk2	Outer primer	Sense: TGCTTGGATGCTTTGCACAA	20	60	45
		Antisense: CCCGTCAGGAGCTCTGCTAA	20	59	60
	Inner primer	Sense: ACTGTGACCTTAAGCCCAGAAC	23	60	52
		Antisense: CCAAGGATCACTTCTGGAGCC	21	60	57
	Taqman probe	FAM-TCCAGTTGTTACGAGCATCAGCGTGTCT-TAMRA	28	68	50
ENO1	Outer primer	Sense: AGATCCCTTTGACCAGGATGAC	22	58	50
		Antisense: TCAATTCTGAGGAGCTGTTGTAC	24	58	46
	Inner primer	Sense: ACTGTGACCTTAAGCCCAGAAC	19	58	58
		Antisense: CCAAGGATCACTTCTGGAGCC	18	58	61
	Taqman probe	FAM-CTGCAACTGCCTCCTGCTCAAAGTCA-TAMRA	26	68	54
GPX1	Outer primer	Sense: CGAAGAGATTCTGAATTCCTCA	23	58	43
		Antisense: TGTTCCTCCCTCGTAGGTTAGAG	24	59	50
	Inner primer	Sense: CCGACCCCAAGCTCATCA	18	59	61
		Antisense: CTTCTCAAAGTTCAGGCAACA	22	58	45
	Taqman probe	FAM-1CTGCTCTCCGGTGTGTCGCAACG -TAMRA	23	70	65
Prx I	Outer primer	Sense: GCAGAAGAATTTAAGAACTCAACTGC	27	59	37
		Antisense: TGTTCCTCCCTCGTAGGTTAGAG	23	58	43
	Inner primer	Sense: CTGGACCCATGAACATTC	20	59	55
		Antisense: AAGACCCATAATCCTGAGCAA	22	59	45
	Taqman probe	FAM- TTGGTATCAGACCCGAAGCGCACC -TAMRA	24	69	58

3 讨论

辐射诱导细胞恶变及肿瘤的发生是一个极为复杂

的过程,与多种功能蛋白的表达有关。但究竟哪些蛋白表达的变化与辐射致癌关系密切,以及它们在整个辐射诱导细胞癌变中起什么样的作用目前尚不清楚。

表 2 BNP₅₀ and BR₂₂P₅₀ 细胞间经 MALDI-TOF MS 鉴定的差异表达蛋白点Tab. 2 Identification of proteins differentially expressed between BNP₅₀ and BR₂₂P₅₀ cells using MALDI-TOF MS

No.	AC	ID	Description	Matched peptides	Theoretical (pL/Mr)	Sequence coverage(%)
1885	NP_002801	gi 5292161	Proteasome 26S non-ATPase subunit 4 isoform 1	15	4.68/40 711	41
2006	Q03154	ACY1_HUMAN	<i>N</i> -acyl- <i>L</i> -amino-acid amidohydrolase	14	5.77/45 856	34
2118	AAH25372	gi 19263471	Calponin 3	20	5.69/36 391	55
2152	AAV38549	gi 54696354	Protein phosphatase 1, Catalytic subunit, beta isoform	18	5.84/37 147	51
2411	Q9UQB9	AURKC_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase 13	6	8.96/35 569	25
2488	AAH21166	gi 39644728	ENO1 protein	11	5.87/28 901	39
2492	O43182	RHG06_HUMAN	Rho-GTPase-activating protein 6 (Rho-type GTPase-activating protein RhoGAPX-1)	9	7.00/105 908	17
2549	NP_859047	gi 32455264	Peroxiredoxin 1	12	8.27/22 096	43
2674	P05092	CYPH_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	6	7.82/17 881	49
2679	NP_006089	gi 5174447	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	9	7.60/35 055	19
2708	1NUE_F	gi 1421614	Chain F, Nucleoside triphosphate, Nucleoside diphosphate Mol_id: 1; Molecule: Nucleoside diphosphate kinase; Chain: A, B, C, D, E, F; Ec: 2.7.4.6	10	8.55/17 156	59
2166	Q13523	PRP4B_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog (EC 2.7.1.37) (PRP4 pre-mRNA processing facto	6	10.26/116 902	8
2350	P62140	PP1B_HUMAN	Serine/threonine protein phosphatase PPI-beta catalytic subunit (EC 3.1.3.16) (PP-1B)	6	5.84/37 163	27
2420	XP_372970	gi 41191527	PREDICTED: Similar to ENSA	5	9.08/18 293	32
2623	Q9Y4A5T	RRAP_HUMAN	Transformation/transcription domain-associated protein (350/400 kDa PCAF-associated factor)	40	8.49/437 304	11
2696	AAC50391	gi 1215669	JTV-1	8	7.64/34 445	21
2701	AAA36578	gi 337459	Small nuclear ribonucleoprotein particle(SmB)	7	10.89/22 950	25
2756	P07203	GPX1_HUMAN	Glutathione peroxidase 1 (EC 1.11.1.9) (GSHPx-1) (cellular glutathione peroxidase)	8	6.15/21 885	59
2919	P55145	ARMET_HUMAN	ARMET protein precursor (arginine-rich protein)	11	8.70/20 244	41
2935	NP_996888	gi 46877102	Upstream stimulatory factor 1 isoform 2	6	5.89/27 356	17
2940	CAA70418	gi 1666066	Dyrk2(dual-specificity tyrosine- (Y)- phosphorylation regulated kinase 2)	7	9.61/22 875	31
2982	AAH67487	gi 45767717	H2B histone family, member E	9	10.39/14 080	58
2226	P36952	MAPS_HUMAN	Serpin B5 precursor (protease inhibitor 5)	11	5.72/42 138	40
2243	Q15019	SEPT2_HUMAN	Septin 2 (NEDD5 protein homolog)	15	6.15/41 461	48
2686	P62826	RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran) (Ras-like protein TC4) (androgen receptor-ass	14	7.01/24 408	48
2882	CAA80853	gi 854189	Tropomyosin isoform	12	4.89/28 403	41

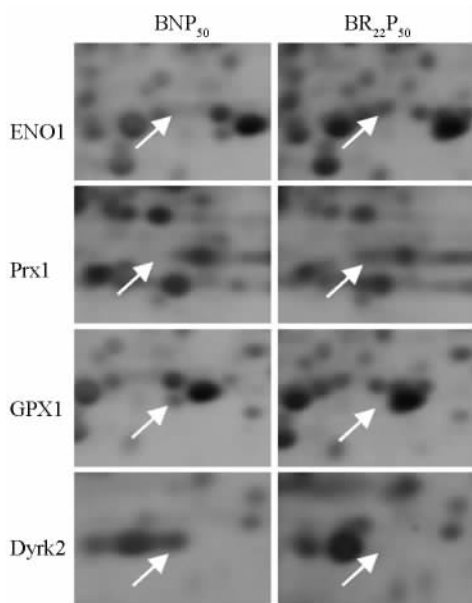


图2 辐射前后细胞 BNP₅₀ 和 BR₂₂P₅₀ 蛋白表达的差异点

Fig. 2 Differentially expressed proteins between BNP₅₀ and BR₂₂P₅₀ cells before and after radiation

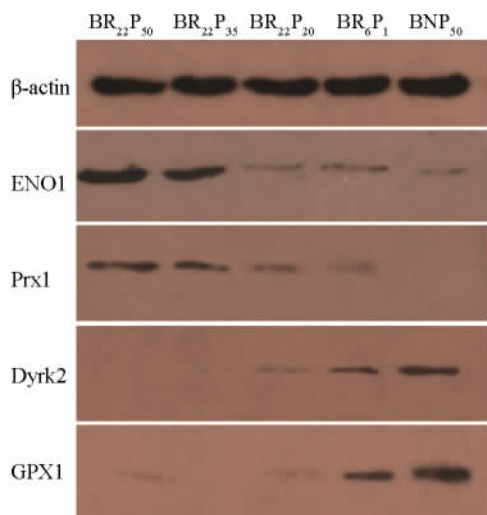


图3 蛋白 ENO1, Prx I, Dyrk2 和 GPX1 在辐射致癌不同阶段的表达水平

Fig. 3 Expression of ENO1, Prx I, Dyrk2 and GPX1 proteins in different phases of radiation-induced carcinogenesis detected by Western blotting

BNP₅₀: Control group; BR₆P₁: Acute stage of radiation; BR₂₂P₂₀: Earlier stage of radiation induced carcinogenesis; BR₂₂P₃₅: Middle stage of radiation induced carcinogenesis; BR₂₂P₅₀: Advanced stage of radiation induced carcinogenesis

本研究利用二维凝胶电泳技术分析辐射癌变细胞和正常细胞间的差异表达蛋白,共发现 59 个差异蛋白表达点,并通过质谱分析对其中 26 个点进行

了鉴定。考虑到肿瘤的发生牵涉到细胞诸多方面的功能改变,主要包括细胞的代谢、信号转导及调控、氧自由基的清除及损伤修复等^[2],所以本实验选取了参与细胞代谢的 ENO1、参与磷酸化调控的 Dyrk2、参与氧自由基清除的 GPX1 以及与辐射关系密切的 Prx I 进行研究,观察它们在辐射致癌不同阶段的变化情况。

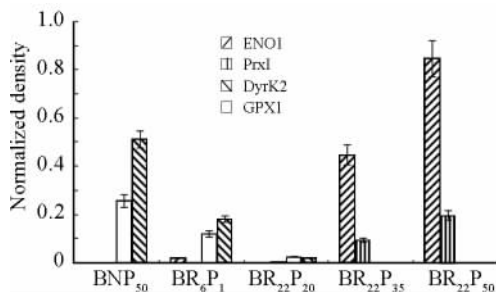


图4 蛋白 ENO1, Prx I, Dyrk2 和 GPX1 在辐射致癌不同阶段的表达水平

Fig. 4 Expression level of ENO1, Prx I, Dyrk2 and GPX1 proteins in different phases of radiation-induced carcinogenesis

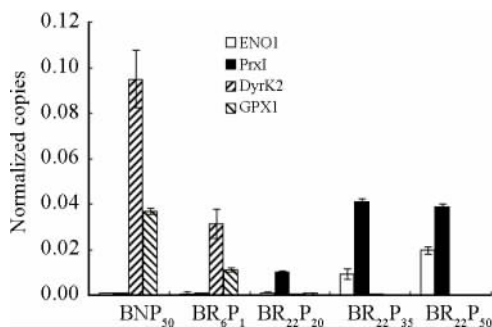


图5 ENO1, Prx I, Dyrk2 和 GPX1 的 mRNA 在辐射致癌不同阶段的标准拷贝数

Fig. 5 Normalized mRNA copies of ENO1, Prx I, Dyrk2 and GPX1 in different phases of carcinogenesis induced by γ -ray

Normalized mRNA copies: mRNA of examined protein/mRNA of β -actin

GPX1 是一种含硒抗氧化酶,在细胞中主要作用是通过还原性谷胱甘肽催化还原过氧化物和有机过氧化氢物,从而保护细胞和其他如 DNA、蛋白及脂质体等敏感生物分子免受氧自由基的损伤^[3-4]。近期研究发现硒元素可以降低很多肿瘤的发生率,体内硒元素的水平与结肠癌的发病率呈显著负相关,饮食补充硒元素可降低结直肠癌的发病率^[5]。体内硒元素主要以含硒蛋白的形式存在,GPX1 是硒元素的一种主要存在形式^[6-7]。另有报道,硒元素

的抗癌作用可能主要由 GPX1 介导产生,在很多头颈部、肺部及乳腺的肿瘤中可发现 GPX1 基因发生等位缺失;另外在一些肿瘤中还发现 GPX1 的第 198 密码子发生突变,由原来的脯氨酸改变为亮氨酸,这一改变引起 GPX1 的活性下降,提示 GPX1 的活性可能与部分肿瘤的发生和发展密切相关^[8-9]。本课题

发现辐射癌变细胞中 GPX1 的表达量较正常细胞明显降低。相关研究也发现,在正常组织与肿瘤组织交界处的过渡型细胞中观察到 GPX1 的表达缺失^[10]。提示 GPX1 的表达缺失可能是肿瘤发生的早期事件,GPX1 的改变可能与辐射诱导癌变的启动密切相关。

表 3 部分表达差异蛋白在辐射致癌不同阶段的 Ct 值和 mRNA 拷贝数

Tab. 3 Ct and mRNA copies of some differentially expressed proteins in different phases of radiation-induced carcinogenesis

Protein		BNP ₅₀	BR ₆ P ₁	BR ₂₂ P ₂₀	BR ₂₂ P ₃₅	BR ₂₂ P ₅₀
β-actin	Ct	20.22 ± 0.074	19.529 ± 0.148	19.215 ± 0.149	19.194 ± 0.108	19.01 ± 0.124
	mRNA	192 586.570	304 277.004	374 572.018	379 815.113	429 009.673
(Copy · μl ⁻¹)						
ENO1	Ct	32.638 ± 0.231	32.555 ± 0.14	31.526 ± 0.237	28.364 ± 0.399	27.015 ± 0.108
	Normalized mRNA *	(9.71 ± 1.52) × 10 ⁻⁴	(6.64 ± 6.19) × 10 ⁻⁴	(10.60 ± 1.69) × 10 ⁻⁴	(9.04 ± 2.26) × 10 ⁻³	(19.60 ± 1.40) × 10 ⁻³
Prx I	Ct	33.195 ± 0.175	32.048 ± 0.023	28.54 ± 0.068	26.512 ± 0.059	26.418 ± 0.051
	Normalized mRNA	(8.12 ± 1.01) × 10 ⁻⁴	(113.00 ± 1.79) × 10 ⁻⁵	(103.00 ± 4.76) × 10 ⁻⁴	(40.80 ± 1.64) × 10 ⁻³	(38.60 ± 1.36) × 10 ⁻³
Dyrk2	Ct	25.008 ± 0.433	25.906 ± 0.313	31.159 ± 0.142	32.33 ± 0.163	33.057 ± 0.171
	Normalized mRNA	(9.49 ± 2.75) × 10 ⁻²	(31.40 ± 6.50) × 10 ⁻³	(61.90 ± 6.17) × 10 ⁻⁵	(26.70 ± 3.03) × 10 ⁻⁵	(14.20 ± 1.70) × 10 ⁻⁵
GPX1	Ct	27.003 ± 0.055	28.074 ± 0.115	31.474 ± 0.077	34.038 ± 0.441	34.606 ± 0.08
	Normalized mRNA	(36.70 ± 1.39) × 10 ⁻³	(111.00 ± 8.69) × 10 ⁻⁴	(87.40 ± 4.70) × 10 ⁻⁵	(14.50 ± 5.80) × 10 ⁻⁵	(88.80 ± 4.86) × 10 ⁻⁶

* Normalized mRNA: mRNA of examined protein/mRNA of β-actin

ENO1 是参与糖酵解过程的一种催化酶,其主要催化 2-磷酸甘油酸向磷酸烯醇丙酮酸的转化。ENO1 的基因序列定位于染色体 1p36.2 区,此基因还同时编码一个 37 000 的蛋白 Myc-binding protein-1(MBP-1)^[11]。目前对 ENO1 在肿瘤中表达的研究结果不一致,有研究表明 ENO1 及其同基因表达产物 MBP-1 可以负向调控 *c-myc* 的表达,对肿瘤的发生有抑制作用,外源性引入 ENO1 序列可引起成神经细胞瘤发生凋亡^[12-13]。在部分肿瘤中 ENO1 的表达降低,与其肿瘤抑制功能的预测相符。但又有部分研究结果与其相反,Racz 等^[14]研究发现在人鳞状上皮细胞肺癌中 ENO1 基因扩增明显增高,Zhang 等^[15]观察发现 ENO1 蛋白的表达量在乳腺癌细胞中表达升高。ENO1 在辐射致癌过程中的作用需进一步进行研究。

Prx I 是一种过氧化物酶,属于 Peroxiredoxin 抗氧化蛋白家族。Prx I 的抗氧化与自由基清除作用

主要通过硫氧还蛋白还原过氧化物或超氧化物,在消除代谢产生的过氧化物中具有重要作用。另外,该蛋白还与细胞增殖密切相关,可以促进多种细胞的增值与分化^[16]。有研究表明 Prx I 是一个辐射诱导蛋白,在辐射引起的氧化应急条件下其表达显著增高,并且其表达水平与辐射的剂量和照射后时间呈正相关^[17],抑制 Prx I 的表达可使哺乳动物细胞的辐射敏感性显著提高^[18]。另外,Prx I 被发现高表达于很多恶性肿瘤细胞,尤其是肺癌细胞中^[19-20]。Chen 等^[21]研究发现,抑制 Prx I 在肺癌细胞中的表达导致肺癌细胞增值缓慢且对辐射抗性降低。本实验同样观察到 Prx I 在辐射诱导癌变的人支气管上皮细胞中表达明显升高。因此提示 Prx I 可能在促进肿瘤细胞的增值、发展以及提高肿瘤细胞辐射抗性方面起重要作用。

Dyrk2 是 Dyrk 蛋白家族(Dual-Specificity Tyrosine-(Y)-Phosphorylation Regulated Kinase

family)的一个成员。该蛋白激酶家族对蛋白质丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸片断均具有磷酸化活性,这是它们有别于其它蛋白激酶的特点^[22]。有研究发现在肺及胃肠道的腺癌细胞中 Dyrk2 的蛋白和 mRNA 表达量均明显升高。Park 等^[23]发现利用抗癌剂 8-Cl-cAMP 处理成神经瘤细胞后导致 Dyrk2 的 mRNA 表达量下降。本实验发现在辐射诱导癌变的人支气管上皮细胞中 Dyrk2 的表达量明显下降,与上述研究的结果相反。因此,Dyrk2 在辐射致癌的发生和发展中所扮演的角色还不明确,需更多实验进行观察。

[参 考 文 献]

- [1] Ying W, Zhang K, Qian X, *et al.* Proteome analysis on an early transformed human bronchial epithelial cell line, BEP2D, after alpha-particle irradiation[J]. *Proteomics*, 2003, 3(1): 64-72.
- [2] Shibuya M. Molecular mechanism of carcinogenesis[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1993, 20(5): 677-683.
- [3] Demura Y, Ameshima S, Ishizaki T, *et al.* Glutathione peroxidase [J]. *Nippon Rinsho*, 1999, 57 (Suppl): 448-450.
- [4] Doroshow JH, Akman S, Chu FF, *et al.* Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones[J]. *Pharmacol Ther*, 1990, 47(3): 359-370.
- [5] Finley JW, Davis CD. Selenium (Se) from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis[J]. *Biofactors*, 2001, 14(1-4): 191-196.
- [6] Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 262: 145-158.
- [7] Michelson AM. Selenium glutathione peroxidase: some aspects in man[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1998, 17(3-4): 233-239.
- [8] Jefferies S, Kote-Jarai Z, Goldgar D, *et al.* Association between polymorphisms of the GPX1 gene and second primary tumours after index squamous cell cancer of the head and neck[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(5): 455-461.
- [9] Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, *et al.* Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant[J]. *J Urol*, 2004, 172(2): 728-732.
- [10] Hu Y, Benya RV, Carroll RE, *et al.* Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer [J]. *J Nutr*, 2005, 135(12 Suppl): S3021- S3024.
- [11] Subramanian A, Miller DM. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5958-5965.
- [12] Feo S, Arcuri D, Piddini E, *et al.* ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)[J]. *FEBS Lett*, 2000, 473(1): 47-52.
- [13] Ejeskar K, Krona C, Caren H, *et al.* Introduction of *in vitro* transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death [J]. *BMC Cancer*, 2005, 16(5): 161.
- [14] Racz A, Brass N, Hofer M, *et al.* Gene amplification at chromosome 1pter-p33 including the genes PAX7 and ENO1 in squamous cell lung carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(1): 67-73.
- [15] Zhang D, Tai LK, Wong LL, *et al.* Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(11): 1686-1696.
- [16] Prosperi MT, Ferbus D, Karczinski I, *et al.* A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(15): 11050-11056.
- [17] Chen WC, McBride WH, Iwamoto KS, *et al.* Induction of radioprotective peroxiredoxin-I by ionizing irradiation[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 70(6): 794-798.
- [18] Zhang B, Su Y, Ai G, *et al.* Involvement of peroxiredoxin I in protecting cells from radiation-induced death[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2005, 46(3): 305-312.
- [19] Lehtonen ST, Svensk AM, Soini Y, *et al.* Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(4): 514-521.
- [20] Park JH, Kim YS, Lee HL, *et al.* Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung[J]. *Respirology*, 2006, 11(3): 269-275.
- [21] Chen MF, Keng PC, Shau H, *et al.* Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 64(2): 581-591.
- [22] Becker W, Joost HG. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1999, 62: 1-17.
- [23] Park GH, Choe J, Choo HJ, *et al.* Genome-wide expression profiling of 8-chloroadenosine- and 8-chloro-cAMP-treated human neuroblastoma cells using radioactive human cDNA microarray[J]. *Exp Mol Med*, 2002, 34(3): 184-193.

[收稿日期] 2006 - 12 - 28

[修回日期] 2007 - 04 - 25

[本文编辑] 郁晓路