

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.008

## 差异凝胶电泳筛选人骨肉瘤细胞多药耐药相关蛋白

孙大辉,张德宝,谷贵山\*(吉林大学第一医院 骨关节一科,长春 130021)

[摘要] 目的:应用差异凝胶电泳分析骨肉瘤多药耐药细胞株与亲本细胞株蛋白质表达的差别,筛查骨肉瘤细胞多药耐药相关蛋白。方法:以小剂量多柔比星(doxorubicin, DXR)诱导人骨肉瘤细胞株 MG-63,建立骨肉瘤多药耐药细胞株 MG-63/DXR100。以差异凝胶电泳分离两组细胞中的全部蛋白质,应用图像扫描和 DeCyder 软件分析差异(表达增加或减少 > 30%)表达的蛋白质点,对其进行质谱鉴定,并在 Mascot 数据库中检索。结果:共检测到明显差异表达的蛋白质点 30 个,选择其中 18 个点进行质谱鉴定,有 5 个蛋白质点鉴定成功,它们分别是与肿瘤细胞转移相关的基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinases 1, MMP1)、具有解毒功能的乙醇脱氢酶 6(alcohol dehydrogenase 6, ADH6)、属于抑癌基因的 FERM 域结合蛋白 3(FERM domain containing protein 3, FRMD3),以及两个分别由 128 和 300 个氨基酸残基构成的未知蛋白。MMP1、ADH6 和 2 种未知蛋白在耐药细胞表达显著高于非耐药细胞组,而 FRMD3 表达显著显著低于非耐药细胞。结论:通过差异凝胶电泳筛查到, MMP1、ADH6、FRMD3 及 2 种未知蛋白质在骨肉瘤细胞的多药耐药细胞和非耐药细胞中差异表达,它们可能参与骨肉瘤细胞的多药耐药机制。

[关键词] 差异凝胶电泳;骨肉瘤细胞;多药耐药;基质金属蛋白酶 1;乙醇脱氢酶 6;FERM 域结合蛋白 3

[中图分类号] R738.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0440-04

## Human osteosarcoma multidrug resistance-related protein identified by differential in-gel electrophoresis

SUN Da-hui, ZHANG De-bao, GU Gui-shan\*(First Department of Bone and Joint Surgery, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the differential protein expression between multidrug-resistant human osteosarcoma MG-63/DXR100 and its parental cell line by differential in-gel electrophoresis, so as to lay a foundation for exploring the mechanism of multidrug resistance(MDR) of osteosarcoma. **Methods:** Multidrug-resistant clone of human osteosarcoma MG-63 was established by stepwise exposure to increasing doses of doxorubicin(DXR). The total proteins of the above two cell lines were separated with two-dimensional electrophoresis. The proteins of differential expression (increased or decreased by more than 30%) were analyzed with image scanning and DeCyder software. Then they were identified in MALDI-TOF Pro and Mascot database. **Results:** Thirty proteins with differential expression were identified by proteomic analysis, and 18 of them were further identified by MALDI-TOF Pro. Five protein spots were successfully identified: matrix metalloproteinases 1 (MMP1) related with tumor cell metastasis, alcohol dehydrogenase (ADH6) with function of detoxication, FERM domain containing protein 3 (FRMD3) which belongs to anti-oncogenes and two agnoproteins composed of 128 and 300 amino acid residues. MMP1, ADH6 and the two agnoproteins were over-expressed in MG-63/DXR100 group, and FRMD3 expression was lower than that in the MG-63 group. **Conclusion:** Five proteins including MMP1, ADH6, FRMD3 and two agnoproteins have been found abnormally expressed in MDR osteosarcoma cells by differential in-gel electrophoresis; they might participate in MDR of osteosarcoma.

[Key words] differential in-gel electrophoresis; osteosarcoma cell; multidrug resistance; matrix metalloproteinase 1; alcohol dehydrogenase 6; FERM domain containing protein 3

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 440-443]

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对某一抗肿瘤药物出现耐药的同时,对结构不同、作用方式不同的其他抗肿瘤药物产生交叉耐药,是导致肿瘤化疗失败的一个重要原因。大量研

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30772210)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772210)

[作者简介] 孙大辉(1971-),男,吉林省长春市人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事骨肿瘤基础和临床研究

\* Corresponding author. E-mail: guguishan@sina.com

究<sup>[1-2]</sup>表明,骨肉瘤多药耐药与 P-糖蛋白( permeability glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白( multidrug resistance associated protein, MRP)、谷胱甘肽 S 转移酶( glutathione S-transferase, GST)、DNA 拓扑异构酶 II( topoisomerase II, Topo II )等高表达有关。但是以上机制还不能完全解释多药耐药现象,有必要进行更深入的研究。差异蛋白质组学技术(核心技术为差异凝胶电泳)是一种高通量、高分辨率筛选未知蛋白的方法,使研究者可以在整体水平上揭示细胞内蛋白质组成及其动态变化规律。本研究应用差异凝胶电泳的方法对骨肉瘤多药耐药细胞及亲本细胞蛋白质组进行比较,为探讨骨肉瘤多药耐药机制寻找新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人骨肉瘤细胞株 MG-63 购自上海中国科学院细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

小牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自 Amresco 公司。尿素( urea)、硫脲( thiourea)、三羟甲基氨基甲烷( tris)、3-[(3-胆酰胺丙基)-乙二胺]-1-丙磺酸( CHAPS)、CyDye 荧光标记物( Cy2, Cy3, Cy5)、二甲基甲酰胺( DMF)、赖氨酸( lysine)、二硫苏糖醇( DTT)、24 cm 固相 pH 梯度干胶条、IPG 胶条覆盖油、IPG 缓冲液、甘油( glycerol)、十二烷基磺酸钠( SDS)、碘乙酰胺( IAA)、丙烯酰胺( acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺( N, N'-methylenebisacrylamide)、过硫酸铵( APS)、TEMED( 四甲基乙二胺)、甘氨酸( glycine)、琼脂糖、蛋白酶抑制剂、核酸酶、胰蛋白酶( trypsin, 色谱纯)、三氟乙酸( TFA)、乙腈( ACN)、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( CCA)、分子量 Marker、PhastGel Blue、Clean-up 试剂盒、2D Quant 定量试剂盒等均购自 Amersham bioscience 公司。其他常用试剂为国产试剂。多柔比星( doxorubicin, DXR) 购自汕头明治医药有限公司( 批号 20061230)。

Ettan IPGphor II 等电聚焦电泳仪、Ettan DALT Six 电泳系统、Typhoon 9400 系列多功能激光扫描成像系统、凝胶图像扫描仪( ImageScanner)、DeCyder 差异分析软件、Ettan picker 切胶仪、Ettan digester 酶切仪、Ettan spotter 点样仪和 Ettan MALDI-TOF pro 质谱仪均为 Amersham biosciences 公司产品。

### 1.3 骨肉瘤多药耐药细胞株的建立

骨肉瘤细胞 MG-63 经小剂量多柔比星 6 个月

诱导<sup>[3]</sup>,建立了能在 100 ng/ml 多柔比星中稳定生长的耐药细胞株 MG-63/DXR100。MG-63/DXR100 对多柔比星高度耐药,耐药指数达 45 倍,同时也对甲氨蝶呤、长春新碱、环磷酰胺均呈现不同程度交叉耐药,免疫细胞化学及 RT-PCR 方法证实耐药细胞中 P-gp 和 MRP3 阳性表达<sup>[4]</sup>。

### 1.4 分析胶的制备

收集细胞,提取蛋白质,Clean-up 除盐,调 pH 值达 8.5,蛋白质定量,分多药耐药细胞组 MG-63/DXR100 和非耐药细胞组 MG-63,各取 50  $\mu$ g 分别以 Cy3、Cy5 标记,内标组各取 25  $\mu$ g 以 Cy2 标记。在 Ettan IPGphor II 等电聚焦电泳仪上进行水平等电聚焦电泳,选用 24 cm、pH 3~10 固相胶条。水平电泳结束后,经两步平衡后将 IPG 胶条转移至 12.5% 的 SDS-PAGE 进行垂直电泳。

### 1.5 凝胶图像扫描与分析

垂直电泳结束后,用 Typhoon9400 激光扫描仪在荧光模式下进行 Cy2、Cy3、Cy5 成像扫描,得到双向电泳图像。分析胶制备实验重复 4 次,在 DeCyder-DIA 软件中进行成组成像的胶内检测,最多点成像的胶被自动识别为 Master 胶,所有其他胶的成像均与 Master 胶进行匹配。蛋白点的确认、匹配、统计学分析均在 DeCyder-BVA 软件中进行。DeCyder-BVA 软件中应用 *t* 检验,蛋白质含量升高或降低大于 30% 被认为有差异, $P < 0.05$  具有统计学意义。

### 1.6 制备胶的制备

多药耐药细胞组 MG-63/DXR100 和非耐药细胞组 MG-63 各取 600  $\mu$ g 蛋白,进行制备胶双向电泳。电泳后固定过夜,考马斯亮蓝染色,图像扫描。

### 1.7 差异表达点的质谱鉴定

将制备胶与分析胶进行比较,切取制备胶上与分析胶上差异表达点相匹配的蛋白斑点,然后进行酶切、点样。在 MALDI-TOF pro 质谱仪上进行蛋白质肽质量指纹谱分析。将质谱仪分析后的肽质量指纹谱数据输入 Mascot 蛋白质数据库检索。期望值(错误鉴定的概率)小于 0.05 具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 分析胶图像扫描及分析结果

提取亲本骨肉瘤细胞和耐药骨肉瘤细胞蛋白进行 Cy3、Cy5 标记,通过等点聚焦电泳和 SDS-PAGE 垂直电泳,获得分析胶。分析胶在 Typhoon9400 激光扫描仪上成像扫描,在 DeCyder-DIA 软件中进行成组成像的胶内检测,最多点成像的胶被自动识别为 Master 胶,所有其他胶的成像均与 Master 胶进行

匹配。蛋白点的确认、匹配、统计学分析均在 DeCyder-BVA 软件中进行。DeCyder-BVA 软件中应用 *t* 检验,蛋白质含量升高或降低大于 30% 被认为有差异。结果共检测到差异有统计学意义的蛋白点 30 个(图 1)。选择比较典型的 18 个点进行质谱鉴定。



图 1 分析胶图像扫描及分析结果  
Fig. 1 Image of analyzed gel

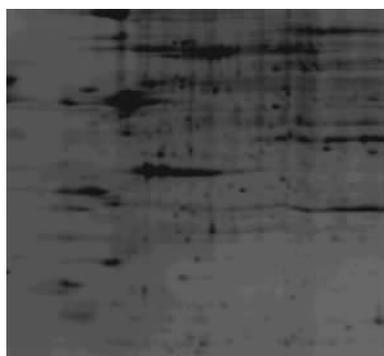


图 2 耐药细胞组制备胶图像扫描结果  
Fig. 2 Image of prepared gel in MDR group

2.2 制备胶匹配与质谱鉴定结果

将 MG-63/DXR100 和 GM63 细胞蛋白进行双向电泳,获得制备胶。多药耐药 MG-63/DXR100 细胞的制备胶见图 2。切取制备胶上与分析胶匹配的蛋白质点,进行酶切、点样、质谱鉴定,所得到的质荷比在 Mascot 数据库中进行比对。共有 5 个蛋白点鉴定成功,它们分别是金属蛋白酶 1( matrix metalloproteinases 1, MMP1 )、乙醇脱氢酶 6( alcohol dehydrogenase 6, ADH6 )、FERM 域结合蛋白 3( FERM domain containing protein 3, FRMD3 )和 2 种未知蛋白。其中基质金属蛋白酶 1 在多药耐药组的表达为非耐药组的 1.39 倍;ADH6 和 2 种未知蛋白质表达量明显升高,FRMD3 蛋白表达量明显降低。经质谱鉴定得到的肽指纹图谱如图 3 所示。将其质荷比值输入

Mascot 数据库检索,结果如图 4 所示,得分 70 分,序列覆盖率为 41%,期望值为 0.022。

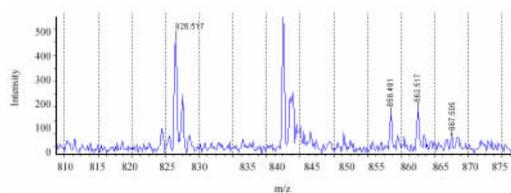


图 3 MMP1 的肽指纹图谱  
Fig. 3 Peptide finger printing of MMP1

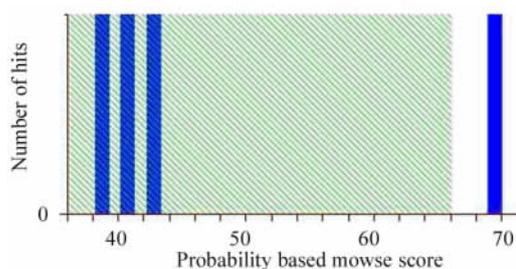


图 4 MMP1 在数据库中比对结果  
Fig. 4 Comparison of MMP1 in database

ADH6 的可能性分析如图 5 和图 6 所示:得分 81 分,序列覆盖率 23%,期望值为 0.0013。另外 2 个未知蛋白质,是根据人类基因组的 cDNA 推测出的多肽,它们在 NCBI 数据库中分别为 gi:51476713 和 gi:18027360,分别有 128 和 300 个氨基酸组成。

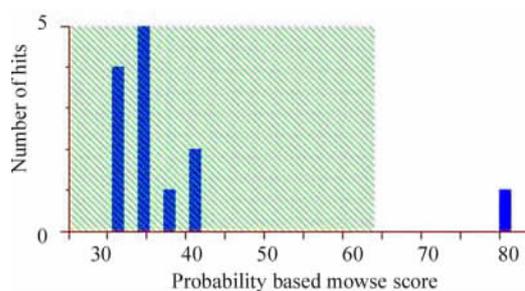


图 5 ADH6 在数据库中比对结果  
Fig. 5 Comparison of ADH6 in database

```

1  MSTTGQVIRC  KAAILWKPGA  PFSIEEVEVA  PPKAKEVRK  VVATGLCGTE
51  MKVLGSKHLD  LLYPTILGHE  GAGIVESIGE  GVSTVKPGDK  VITLFLPCCG
101  ECTSCLNSEG  NFCIQFKQSK  TQLNSDGTSR  FTCKRGRSIYH  FGNTSTFCEY
151  TVIREISVAK  IDAVAPLEKV  CLISCGFSTG  FGAAINTAKV  TPGSTCAVFG
201  LGGVGLSVVH  GCKAAGAARI  IGVVDYHKEF  KKAQELGATE  CLNPQDLKPK
251  IQEVLFDMTD  AGIDFCFEAI  GNLDVLAAL  ASCNESYGVC  VVVGVLPA5V
301  QLKISGQLFF  SGRSLKGSVF  G6WKSQRHIP  KLVADYMAEK  LNLDP LIHTH
351  LNLDKINEAV  ELMKTKGW

```

图 6 ADH6 序列在数据库中比对结果  
Fig. 6 Comparison of ADH6 sequence in database

### 3 讨论

蛋白质组学是后基因组时代产生的一门新兴学科,是从整体角度分析细胞内蛋白质组成成分的动态变化,了解蛋白质之间的相互作用和相互联系,揭示蛋白质功能和在生命活动中的作用。差异蛋白质组学是筛选肿瘤耐药相关蛋白非常有用的方法,其核心技术是差异凝胶电泳。易红<sup>[5]</sup>采用差异蛋白质组学技术成功筛选了胃癌耐药蛋白 sorcin,反义核酸抑制其表达能逆转胃癌细胞对长春新碱的耐药性,证实它在胃癌细胞耐药中发挥重要作用。本实验以骨肉瘤多药耐药细胞株和非耐药细胞株为研究对象,采用差异凝胶电泳技术比较两种细胞蛋白质谱的差别,试图寻找与骨肉瘤多药耐药相关的蛋白质。实验结果共发现 30 个蛋白表达差异点(增高或降低超过 30%),成功鉴定 5 个蛋白质点: MMP1、ADH6、FRMD3 和两个未知蛋白质(分别由 128 和 300 个氨基酸残基组成)。这些蛋白与细胞内解毒、肿瘤细胞转移及抑癌基因等功能密切相关,它们可能参与了骨肉瘤多药耐药的发生。

其中的 MMP1 在肿瘤转移中发挥重要作用。许多肿瘤组织中有 MMP1 的过表达,与侵袭转移和不良预后相关。Shiozawa<sup>[6]</sup>应用免疫组化法分析了 20 个直肠腺瘤,未检测到 MMP1 的表达,而在 142 例直肠腺癌(27 例黏膜内癌,115 例侵袭性癌)中, MMP1 表达率为 76.1%;此外, MMP1 在黏膜内癌的表达弱于在侵袭性癌中的表达( $P < 0.01$ );在 115 例侵袭性癌中, MMP1 的免疫反应性与肿瘤侵袭深度、肿瘤生长行为、淋巴侵犯、静脉侵犯和淋巴结转移、肝转移显著相关。

国内外关于 MMPs 与骨肉瘤转移和预后的关系,则是对 MMP2 和 MMP9 研究得比较多,对 MMP1 研究得比较少:王太平<sup>[6]</sup>的免疫组化结果提示,骨恶性肿瘤 MMP1 的阳性率明显高于良性的骨软骨瘤,组织学分级 I 级和无原发灶转移的骨恶性肿瘤 MMP1 阳性率明显低于组织学分级 III 级和有原发灶外转移病例。Yuan<sup>[8]</sup>利用 RNAi 技术沉默骨肉瘤细胞株 JJ012 中 MMP1 基因的表达,结果显示 MMP1 基因抑制能降低 JJ012 细胞的转移能力。

近年来,有研究证实肿瘤细胞的耐药性能增加其侵袭和转移能力。某些化疗药物应用过程中,肿瘤出现化疗耐受后疾病进程明显加快,其原因可能与耐药后肿瘤的侵袭、转移增加相关。骨肉瘤的多药耐药表型与转移特性密切相关,多药耐药的骨肉瘤更容易发生远处转移<sup>[9-10]</sup>。本实验结果提示,骨

肉瘤多药耐药细胞组较亲本细胞组 MMP1 表达增高,这可能与多药耐药的骨肉瘤细胞转移性更强有关。下一步的研究本课题组可以利用骨肉瘤及其耐药细胞的裸鼠模型,在体探讨耐药细胞是否比亲本细胞更容易发生远处转移,以及 MMP1 如何在骨肉瘤多药耐药及转移中发挥作用。

其中的 ADH6 乙醇脱氢酶家族具有氧化还原酶的特性。ADH6 同工酶不只局限在肝脏,除了乙醇氧化外还可能其他的功能。Larroy<sup>[11]</sup>克隆出酵母菌的 ADH6 蛋白并成功测得了它的生物学特性,这种酶表现出对 NADPH 严格的特异性,具有对大量长链脂肪族底物的高氧化活性,对醛类要比相应醇类的催化活性高 50 ~ 12 000 倍,而对酮体、次级醇或是临近的二元醇没有作用。ADH6 cDNA 全长在大肠杆菌/兔网织红细胞翻译系统中表达,产生的蛋白质等电点是 8.6,最适 pH 是 10,对苯甲醇较乙醇和丙醇有较低的  $K_m$  值。这些特性与存在于胃组织中的  $\mu$ -ADH 亚基相适应,表明 ADH6 基因很可能编码  $\mu$ -ADH 亚基。由  $\mu$ -ADH 亚基构成的第四类 ADH 除了参与乙醇和其他醇类代谢外,还参与脂质过氧化过程产生的醛类物质的清除以及视黄醇类物质的代谢<sup>[12]</sup>。此外,所有的 ADH 系统可以被看作是醇类和醛类的解毒系统,那么它也可能对化疗药物(如多柔比星)或其中间产物起到解毒作用,这类类似于谷胱甘肽转移酶、金属硫蛋白等在多药耐药中的作用。ADH6 是否参与骨肉瘤耐药过程以及如何发挥作用还需要进一步研究。

FRMD3 是最近发现的一种抑癌基因,是 4.1 超家族蛋白成员之一。4.1 超家族蛋白成员共同含有一个高度保守的 FERM 结构域,即一个 30 000 的 N 末端膜结合域<sup>[13]</sup>。本实验中 FRMD3 在多药耐药组的表达明显低于非耐药细胞组,推测作为抑癌基因之一的 FRMD3 失活可能是多药耐药发生机制之一,这类似于抑癌基因 P53 突变在肿瘤多药耐药中的作用。当 P53 基因发生缺失、突变导致表达异常时,这种突变型 P53 就失去了抑制细胞增殖的作用,使化疗药物所诱发的细胞凋亡受抑制,以致肿瘤细胞对化疗药物的耐受显著增强,使肿瘤细胞产生多药耐药。因此有希望通过增强 FRMD3 表达、促进凋亡的发生来逆转骨肉瘤多药耐药。

### [参考文献]

- [1] 徐迎春,林玉梅,张凤春. MDR 基因异常表达与淋巴系统恶性肿瘤化疗反应的相关性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006, 28(5): 353-356. (下转第 450 页)