

用于相对和绝对定量的等量异位标签-二维液相色谱- 串联质谱法分析雌二醇和血清剥夺对 乳腺癌细胞内蛋白质含量的影响

朱 镭¹, 倪国新¹, 张政希¹, 徐学敏^{1,2}, 胡晓芳², 李 伟^{1*}

(1. 上海交通大学系统生物医学研究院, 上海 200240; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 雌激素和血清中的激素及各种生长因子在乳腺癌的发生、发展过程中发挥着重要的作用。研究雌激素和血清对乳腺癌细胞中蛋白质组成和含量的影响对于阐明雌激素和血清对乳腺癌细胞影响的分子机理具有重要的意义。利用四重用于相对和绝对定量的等量异位标签(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)标记结合二维液相色谱-串联质谱(two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 2D-LC-MS/MS)对雌二醇(17 β -oestradiol, E2)和血清各自以及共同作用对MCF7乳腺癌细胞内蛋白质表达的影响进行了比较,共鉴定到置信度在95%以上的蛋白质576种,其中各组相对于正常培养组的细胞共找到26种差异在1倍以上的蛋白质,其中10种上调,16种下调。研究发现E2和血清可显著影响细胞内与蛋白质合成相关的蛋白质的水平。实验结果表明iTRAQ-LC-MS/MS是进行多个样品差异蛋白组比较的一种有效方法。

关键词 用于相对和绝对定量的等量异位标签(iTRAQ); 二维液相色谱-串联质谱; 雌激素; 血清剥夺; 乳腺癌细胞
中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)03-0270-09 栏目类别: 研究论文

Analysis of the effects of 17 β -oestradiol and serum deprivation on the contents of proteins in breast cancer cells by isobaric tags for relative and absolute quantification and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHU Lei¹, NI Guoxin¹, ZHANG Zhengxi¹, XU Xuemin^{1,2}, HU Xiaofang², LI Wei^{1*}

(1. Institute for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract : Estrogen, hormones and growth factors in serum play important roles in the carcinogenesis and development of breast cancer. The study of the effects of the above factors on protein components and their contents in breast cancer cells is necessary for understanding the molecular mechanisms. In this study, isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling coupled with two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS) was employed to compare the differential protein expressions in MCF7 cells upon 17 β -oestradiol (E2) stimulation or serum deprivation (SD) versus in normal conditions. A total of 576 proteins with the confidential level of $\geq 95\%$ were identified, 26 proteins among the 576 proteins were found to be differentially expressed after E2 stimulation or serum deprivation, and among them 10 proteins were up-regulated and 16 proteins were down-regulated by more than two folds. Interestingly, both E2 and serum significantly altered the level of proteins involved in protein synthesis. This demonstrated iTRAQ coupled LC-MS/MS is an efficient methodology in comparative proteomics.

Key words : isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ); two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS); estrogen; serum deprivation; breast cancer cells

* 通讯联系人: 李 伟, 博士, 副教授, 主要研究方向为蛋白质组学. Tel: (021) 34205885, E-mail: liwei@sjtu.edu.cn.

基金项目: 科技部重大基础研究计划项目(No. 2006CB0D0100).

收稿日期: 2008-09-22

二维液相色谱-串联质谱(2D-LC-MS/MS)定量蛋白质组学是研究生理和病理条件下细胞内外蛋白质含量变化的重要手段,也是目前筛选生物标志物和药物靶点的有效方法。目前最为常用的技术路线包括双向荧光差异凝胶电泳(DIGE)^[1]和稳定性同位素标记结合LC-MS/MS进行定量分析。常见的稳定性同位素标记方法包括SILAC(stable isotope labeling by amino acids in cell culture)体内代谢标记^[2]、ICAT(isotope-coded affinity tags)^[3]和iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantification,用于相对和绝对定量的等量异位标签)^[4]体外化学标记。近年来,在非标记状态下利用LC-MS进行相对定量的方法也取得了一些进展^[5,6]。这些方法各有优缺点,DIGE是在完整蛋白质水平上分离和比较蛋白质的表达,但对碱性较强的蛋白质分离以及对丰度较低的蛋白质检测和鉴定方面存在较大的局限性,且在进行多个样品分析时的重复性难以保证。SILAC只适合细胞培养条件下进行氨基酸掺入标记。ICAT只能用于含有半胱氨酸的多肽标记和两组样品间的比较。iTRAQ可高效率标记赖氨酸残基和N-末端的氨基,能同时进行4~8个样品的比较分析,因此在进行多个样品分析时具有明显的优势^[7-9]。

雌激素是乳腺上皮细胞生长分化的重要调节因子^[10]。它主要通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合来调节基因的转录,改变基因表达谱。病理条件下,雌激素水平升高是乳腺癌发生的高危因素之一,且对乳腺癌的发生和发展有促进作用^[11-13]。血清中含有细胞生长所需的多种激素和生长因子,如胰岛素、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、血小板生长因子(PDGF)等,它们在调节乳腺细胞的生理功能上也发挥着极为重要的作用^[14]。雌激素与各种激素和生长因子在信号通路上发生相互作用^[15-17],而这种相互作用必然引起细胞内蛋白质组成和含量的变化。以往在雌激素对乳腺癌细胞基因表达谱影响方面进行了大量的研究^[18,19]。鉴于蛋白质是细胞内基因功能的直接执行者,而细胞内的信使核糖核酸(mRNA)水平经常不能反映相应的蛋白质水平的变化^[20],本文利用四重iTRAQ标记结合2D-LC-MS/MS研究雌二醇(17 β -oestradiol, E2)和血清剥夺对ER阳性的MCF7乳腺癌细胞内蛋白质含量的影响。

1 实验部分

1.1 试剂

人乳腺癌细胞株MCF7(ER阳性)由上海市肿瘤研究所惠赠。RPMI-1640培养基干粉、胎牛血清

和胰蛋白酶购自Gibco公司。活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清为Hyclone公司的产品。17 β -雌二醇购自Sigma公司。蛋白质浓度检测试剂Dc Protein Assay购自美国Bio-Rad公司。iTRAQ Reagent Multi-Plex Kit购自美国Applied Biosystems公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与蛋白质的抽提

MCF7细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液在含5%CO₂的37℃培养箱中进行培养,用2.5 g/L的胰蛋白酶消化后传代。17 β -雌二醇用无水乙醇溶解后配制成1 g/L的储存液,于-80℃冰箱中保存备用。细胞传入4个10 cm培养皿中,待生长至约40%~50%聚合度时,对4个培养皿中的细胞分别进行如下处理:(1)对照组:用含10%活性炭/葡聚糖处理胎牛血清的RPMI-1640培养液培养;(2)10 nmol/L 17 β -雌二醇处理组:在含10%活性炭/葡聚糖处理胎牛血清的RPMI-1640培养液中加入17 β -雌二醇(终浓度为10 nmol/L);(3)血清剥夺(SD)组:在不含血清的RPMI-1640培养液中进行培养;(4)血清剥夺条件下10 nmol/L 17 β -雌二醇处理组:在不含血清的RPMI-1640培养液中加入17 β -雌二醇(终浓度为10 nmol/L)。

将上述各组细胞培养48 h后,收集细胞。清空培养皿中的培养液,于4℃下用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液清洗细胞3次,然后将各组细胞小心刮下,分别转入洁净的1.5 mL离心管中,离心后弃去上清液,然后每管中加入200 μ L碳酸氢三乙酰胺裂解液,悬浮混匀后用超声破碎仪处理3次,每次10 s。高速离心后收集上清液,采用Dc Protein Assay试剂测定蛋白质浓度。

1.2.2 蛋白质酶解与iTRAQ化学标记

每组样品取蛋白质80 μ g,分别置于洁净的微量离心管中,按iTRAQ标记试剂盒所提供的实验方案进行半胱氨酸的封闭、胰蛋白酶酶解和含m/z 114, 115, 116, 117报告基团的iTRAQ试剂标记,用基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱检验各组的标记情况后,混合标记好的4组样品。各组蛋白质样品如上重复标记两次并进行分析。

1.2.3 液相色谱-串联质谱分析

对标记好的混合多肽进行真空干燥除去有机溶剂,用1 mL上样缓冲液(10 mmol/L KH₂PO₄, pH 3.0)稀释后加载到PolySulfoethyl A强阳离子交换柱(0.32 mm \times 50 mm 5 μ m 20 nm, PolyLC Inc.)上,用1 mL上样缓冲液洗去裂解和标记过程中使用的TCEP(tris(2-carboxyethyl)phosphine), SDS(sodium dodecyl sulfate), CaCl₂和iTRAQ试剂

后,用含有 10,20,30,40,50,60,80,100,300 和 500 mmol/L KCl 的上样缓冲液步进式洗脱柱上吸附的多肽,并分步收集洗脱下来的多肽(每个馏分约 500 μL),最后用离心式真空干燥装置抽干。

干燥后的多肽样品用 100 μL 含 0.1% 甲酸的 2% 乙腈水溶液溶解后,用反相纳升级液相色谱-电喷雾串联质谱仪分析。毛细管液相色谱分离在 HP1200 系统(美国 Agilent 公司)进行,每份样品上样 40 μL 至富集柱(0.3 mm \times 5 mm,5 μm ,Michrom BioResources, Inc.)上,用缓冲液 A(0.1% 甲酸)以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速脱盐 10 min,然后在线切换到反相 C18 分离柱(50 mm \times 75 μm ,粒度为 3.5 μm ,孔径为 30 nm,Zorbax 300SB C-18,Agilent 公司)上,用缓冲液 A 和缓冲液 B(90% 乙腈-0.1% 甲酸)在 250 nL/min 流速下梯度洗脱(2% B $\xrightarrow{2 \text{ min}}$ 10% B $\xrightarrow{80 \text{ min}}$ 50% B)以洗脱多肽。

对反相色谱柱洗脱出的多肽通过在线连接的 QStar XL MS/MS 系统(美国 Applied Biosystems 公司)进行串联质谱分析。分析在信息依赖性获取模式(information dependent acquisition mode, IDA)下进行。在 IDA 模式下,先在 m/z 350 ~ 1700 范围进行一次全扫描,然后选择其中离子强度最高的 4 个离子峰进行二级离子扫描。子离子谱图在 m/z 100 ~ 2000 范围内累加 2 s,Q2 设置为增强所有离子模式,动态排除采用 $\pm 0.015\%$ (150 ppm)的容许范围,排除时间设定为 2 min。

1.2.4 数据处理

将 Analyst[®] QS1.1 软件采集到的质谱分析数

据导入基于 Paragon 算法^[21]的 ProteinPilot 2.0 软件(Applied Biosystems 公司)并通过 IPI 数据库(IPI_HUMAN335.fasta)进行检索鉴定蛋白,报告置信度在 95%(ProtScore ≥ 1.3)以上的蛋白质,同时用 m/z 114,115,116,117 报告离子的峰面积积分进行相对定量分析,以 m/z 114 的峰面积(A_{114})为对照,计算 A_{115}/A_{114} , A_{116}/A_{114} , A_{117}/A_{114} 的比值,选择 $P \leq 0.05$ 的结果进行报告,上样误差通过软件自带的统计学偏畸值校正(bias correction)功能进行归一化处理。对有一个以上高置信度($\geq 99\%$)唯一多肽匹配的蛋白质不再进行人工确认,对不含高置信度($\geq 99\%$)唯一多肽匹配的蛋白质用手工方法对 MS/MS 图谱碎片离子进行检查确认。

2 结果与讨论

2.1 结果

根据两次实验结果统计,发现相对定量分析比值的最大误差范围为 $\pm 30\%$,这与以往国外报道的误差范围接近^[22]。通过 iTRAQ-LC-MS/MS 分析,以报告离子为 m/z 114 的不含 E2 血清培养组为对照,共有 5 种蛋白质在含 E2 的血清培养组中上调,4 种蛋白质下调;在无血清培养组中有 4 种蛋白质上调,5 种蛋白质下调;在含 E2 的无血清培养基培养组中有 7 种蛋白质上调,11 种蛋白质下调。这里选取两次重复分析的数据,将各组中任何一组与对照组相比上调或下调 1 倍以上的蛋白质汇总于表 1,可看出 10 种蛋白质上调,16 种蛋白质下调。用于蛋白质相对定量的多肽及其定量标准偏差见表 2。

表 1 各实验组与对照组之间有显著表达差异的蛋白质

Table 1 Differentially expressed proteins from experimental groups compared with control group

IPI identifier	Peptide number ¹⁾		Coverage ²⁾ /%		Protein name	A_{115}/A_{114} ³⁾		A_{116}/A_{114} ⁴⁾		A_{117}/A_{114} ⁵⁾	
	a	b	a	b		a	b	a	b	a	b
IPI00182533.5	2	3	10.9	16.8	60S ribosomal protein L28 (RPL28)	2.76	2.57	3.50	3.29	2.65	2.55
IPI00025491.1	6	7	18.2	20.0	eukaryotic initiation factor 4A-I (EIF4A1)	2.22	1.87	0.62	0.59	2.50	2.41
IPI00017617.1	5	4	12.2	11.0	probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (DDX5)	2.16	2.25	1.57	1.63	2.20	2.01
IPI00025874.2	4	3	9.6	7.1	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 67 kDa subunit precursor (RPN1)	2.04	1.76	2.05	1.45	2.45	1.87
IPI00414676.6	9	10	38.3	45.3	heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)	2.00	1.94	1.11	1.43	1.73	2.15
IPI00012102.1	2	2	3.3	9.6	N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor (GNS)	0.49	0.47	0.44	0.58	0.35	0.42
IPI00169276.1	5	3	12.1	10.9	trypsinogen C	0.48	0.55	1.16	1.53	0.61	0.78
IPI00011694.1	4	5	17.4	23.1	trypsin-1 precursor (PRSS1)	0.40	0.35	1.25	1.32	0.62	0.67
IPI00012202.1	1	2	3.2	9.6	methylosome protein 50 (WDR77)	0.34	0.35	1.09	1.15	0.48	0.50
IPI00220327.3	9	8	29.5	24.2	keratin , type II cytoskeletal 1 (KRT1)	0.92	1.00	2.33	2.63	1.08	1.18
IPI00386621.1	2	2	30.6	31.6	CALM3 protein (CALM3)	0.79	0.88	2.09	1.93	1.88	1.91
IPI00216691.5	6	7	68.1	70.0	profilin-1 (PFN1)	1.03	1.03	0.49	0.51	0.89	0.97
IPI00788802.1	10	10	22.8	23.6	transketolase variant (fragment) (TKT)	0.92	0.91	0.48	0.45	0.75	0.82
IPI00419258.4	12	12	47.9	49.1	high mobility group protein B1 (HMGB1)	1.13	1.06	0.45	0.47	0.68	0.78

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

IPI identifier	Peptide number ¹⁾		Coverage ²⁾ /%		Protein name	A_{115}/A_{114} ³⁾		A_{116}/A_{114} ⁴⁾		A_{117}/A_{114} ⁵⁾	
	a	b	a	b		a	b	a	b	a	b
IPI00026087.1	3	3	18.0	15.9	barrier-to-autointegration factor (BANF1)	0.68	0.61	0.41	0.48	0.17	0.15
IPI00008529.1	2	2	17.4	10.4	60S acidic ribosomal protein P2 (RPLP2)	1.52	1.49	1.54	1.56	2.88	2.93
IPI00550900.1	3	1	13.4	7.6	translationally-controlled tumor protein (TPT1)	1.50	1.39	1.37	1.22	2.19	1.97
IPI00746438.2	4	3	24.3	19.2	isoform 2 of 60S ribosomal protein L11 (RPL11)	1.60	1.50	1.08	0.91	2.02	1.55
IPI00644055.1	3	3	6.1	3.0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 1 (HNRNPR)	0.79	0.75	1.13	1.17	0.50	0.51
IPI00291006.1	17	15	65.4	62.4	malate dehydrogenase , mitochondrial precursor (MDH2)	0.57	0.56	1.00	1.05	0.50	0.53
IPI00759493.3	4	4	13.3	5.5	succinate-CoA ligase , GDP-forming , alpha subunit (SUCLG1)	0.66	0.53	0.87	1.08	0.48	0.68
IPI00658109.1	7	6	24.9	22.5	creatine kinase , ubiquitous mitochondrial precursor (CKMT1B ; CKMT1A)	0.58	0.58	0.88	0.90	0.47	0.51
IPI00413671.1	1	1	1.3	0.9	isoform 2 of Bcl-2-associated transcription factor 1 (BCLAF1)	0.68	0.66	1.13	1.15	0.46	0.47
IPI00453473.6	14	17	62.1	63.0	histone H4A (H4A)	0.74	0.74	1.18	1.23	0.46	0.52
IPI00008603.1	3	4	14.9	43.5	actin , aortic smooth muscle (ACTA2)	0.81	0.72	0.57	0.57	0.40	0.29
IPI00741756.1	3	4	16.7	30.0	similar to Nonhistone chromosomal protein HMG-17 (HMGN2P7)	0.58	0.65	0.84	1.12	0.24	0.32

1) peptide number : unique peptide identified. 2) coverage : coverage based on peptide sequences with confidence level $\geq 95\%$. 3) for 17 β -oestradiol (E2) treatment group versus control group. 4) for serum deprivation (SD) group versus control group. 5) for SD + E2 treatment group versus control group. a and b : two parallel tests.

表 2 用于蛋白质相对定量的不同多肽间的标准偏差 *

Table 2 Standard deviations among different peptides used for relative protein quantification *

IPI identifier	Protein name	Peptide number	Peptide sequence	Standard deviations		
				A_{115}/A_{114}	A_{116}/A_{114}	A_{117}/A_{114}
IPI00182533.5	60S ribosomal protein L28 (RPL28)	2		3.11 \pm 0.68	3.50	2.65
			GVVVVIK	3.59	3.50	
			NCSSFLIK	2.63		2.65
IPI00025491.1	eukaryotic initiation factor 4A-I (EIF4A1)	6		2.13 \pm 0.85	0.62 \pm 0.04	2.36 \pm 0.31
			AILPCIK	2.78	0.66	
			ATQALVLPTR	1.28		2.40
			KEELTLEGIR	1.05		1.92
			TATFAISILQQIELDLK	1.85		2.44
			VFDMLNR	2.93		
IPI00017617.1	probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (DDX5)	5		2.21 \pm 0.39	1.63 \pm 0.22	2.21 \pm 0.32
			DWVLNEFK	2.74		2.46
			KKWNLDELPK	1.77		
IPI00025874.2	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyl-transferase 67 kDa subunit precursor (RPN1)	4		2.32 \pm 0.96	2.31 \pm 1.21	2.44 \pm 0.97
			FFTVK	1.85	3.17	2.87
			IDHILDAL	3.70		
			LAHLGVQVK	1.51	1.45	1.33
			TVDLSSHLAK	2.23		3.13
IPI00414676.6	heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)	9		2.31 \pm 0.81	0.75 \pm 0.12	1.97 \pm 0.90
			AKFENLCKLMKEILDKKVEK	1.96	0.63	1.17
			HLEINPDHPIVETLR	1.96		1.82
			GFEVVYMTPEIDYCVQQLK	1.13	0.75	1.11
			HLEINPDHPIVETLR	3.12		
			HSQFIGYPITLYLEK	1.82		1.82
KHLEINPDHPIVETLR			1.50		3.84	

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

IPI identifier	Protein name	Peptide number	Peptide sequence	Standard deviations		
				A_{115}/A_{114}	A_{116}/A_{114}	A_{117}/A_{114}
IPI00012102.1	<i>N</i> -acetylglucosamine-6-sulfatase precursor (GNS)	2	RAPFDLFENK	3.32	0.87	1.84
			SIYYITGESK	2.73		1.48
			YHTSQSGDEMTSLSEYVSR	3.24		2.64
IPI00169276.1	trypsinogen C	5	AFQNVFAPR	0.47	0.78	0.62
			NFNIHGNTK	0.50	0.14	0.16
			HPKYNRITLNNDIMLIK	0.38	0.87	0.34
IPI00011694.1	trypsin-1 precursor (PRSS1)	4	ITLNNDIMLIK	0.56	1.73	1.27
			IVGGYTCEENSV	0.42	1.93	1.10
			KYNRITLNNDIMLIK	0.38	0.81	0.35
			RHPKYNRITLNNDIMLIK	0.56	0.86	0.36
			RHPQYDRKTLNNDIMLIK	0.26	0.76	0.28
IPI00012202.1	methylosome protein 50 (WDR77)	1	QVSLNSGY	0.54	1.32	1.02
			NKPGVYTK	0.37	1.50	0.79
IPI00220327.3	keratin , type II cytoskeletal 1 (KRT1)	9	HPQYDRKTLNNDIMLIK	0.30	1.00	0.35
			SSGTQAVSGSK	0.35	1.12	0.51
			AEAESLYQSK	1.06	2.33	0.75
IPI00386621.1	CALM3 protein (CALM3)	2	LNDLEDALQQAK	1.04		
			SKAEAESLYQSK	1.64	1.78	
			SLDLDLSIAEVK	0.83	1.98	0.70
			SLNNQFASFIDK	1.20		
			SLNNQFASFIDKVR	0.96	1.80	
			WELLQQVDTSTR	1.07	3.59	1.11
			YEELQITAGR	0.76	1.26	
			FLEQQNQVLQTKWELL-QQVDTSTR	0.98		
			ADQLTEEQIAEFK			1.72
IPI00216691.5	profilin-1 (PFN1)	6	EAFSLFDK	0.79	2.09	1.92
			CYEMASHLR	1.44	0.63	1.41
			DSPSVWAAVPGK	0.98	1.05	1.12
			EGVHGGLINKK	1.01	0.35	0.55
			SSFYVNGLTGGQK	0.98	0.42	0.80
			TFVNITPAEVGVLVGK	1.05	0.52	1.30
IPI00788802.1	transketolase variant (fragment)(TKT)	10	TLVLLMGK	1.27	0.38	1.34
			VLDPFTIKPLDR	1.09		0.31
			TVPFCSTFAAFFTR	0.93	0.36	0.84
			TSRPENAIHNNNEDFQVGQAK	0.76		0.59
			SKDDQVTVIGAGVTLHE-ALAAAELLKK	0.68	0.45	0.28
			NSTFSEIFKK	0.98	0.44	0.59
			NSTFSEIFK	0.69	0.71	
			KISSDLDGHPVPK	1.01		
			IALDGDTK	0.97	0.45	1.14
			HQPTAIIAK	1.01	0.46	1.02
IPI00419258.4	high mobility group protein B1 (HMGB1)	12	ESWHGKPLPK	0.88		0.59
			FKDPNAPK	1.63		
			GEHPGLSIGDVAK	0.63		0.74
			GKFEDMAK	1.14	0.55	0.94

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

IPI identifier	Protein name	Peptide number	Peptide sequence	Standard deviations		
				A_{115}/A_{114}	A_{116}/A_{114}	A_{117}/A_{114}
			HPDASVNFSEFSK	1.31	0.64	
			IKGEHPGLSIGDVAKKLGE-	0.94	0.19	0.05
			MWNNTAADDK			
			KFKDPNAPK	2.27		
			KHPDASVNFSEFSK	1.16	0.57	0.94
			KHPDASVNFSEFSKK	0.98	0.17	0.20
			KKHPDASVNFSEFSKK	0.91	0.13	0.06
			KLGEMWNNTAADDK	1.17	1.14	
			RPPSAFFLFCSEYRPK	1.40	0.53	0.99
			TYIPPKGETK			1.37
IPI00026087.1	barrier-to-autointegration factor (BANF1)	3		0.85 ± 0.34	0.47 ± 0.22	0.37 ± 0.50
			AYVVLGQFLVLK	1.24		0.95
			GFDKAYVVLGQFLVLK	0.61	0.62	0.13
			KDEDLFWELKDTCGANAK	0.68	0.32	0.04
IPI00008529.1	60S acidic ribosomal protein P2 (RPLP2)	2		1.54 ± 0.33	1.55 ± 0.29	2.95 ± 0.42
			NIEDVIAQGIGK	1.77	1.34	2.66
			VISELNGK	1.30	1.75	3.25
IPI00550900.1	translationally-controlled tumor protein (TPT1)	3		1.54 ± 0.39	1.37 ± 0.00	2.16 ± 0.44
			EIADGLCLEVEGK	1.11		2.55
			MIFFK	1.65	1.37	2.24
			MIYR	1.86	1.37	1.68
IPI00746438.2	isoform 2 of 60S ribosomal protein L11 (RPL11)	4		1.79 ± 0.41	1.08	1.67 ± 0.74
			TGCIGAK	2.36		
			VLEQLTGQTPVFSK	1.37	1.08	1.14
			WFQQK	1.69		
			YDGILPGK	1.76		2.19
IPI00644055.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 1 (HNRNPR)	3		0.82 ± 0.11	1.26 ± 0.37	0.51 ± 0.01
			GAPLPPRGRSRGRRGGP		1.69	
			GYAFITFCGK	0.90	1.04	0.52
			LKDYAFVHFEDR	0.75	1.06	0.51
IPI00291006.1	malate dehydrogenase , mitochondrial precursor (MDH2)	17		0.62 ± 0.19	1.18 ± 0.44	0.58 ± 0.24
			STPLLLGK	1.12	1.76	
			GCDVVVIPAGVPR	0.91	1.55	0.83
			SQETECTYFSTPLLLGK	0.79	0.22	
			MISDAIPELK	0.70	1.34	0.76
			EGVVECSFVK	0.68	1.22	0.71
			VNVPVIGGHAGK	0.62	1.04	0.61
			IQEAGTEVVK	0.60	1.21	0.66
			AGAGSATLSMAYAGAR	0.60	0.64	0.37
			AKVAVLGASGGIGQPLSLLLK	0.59		0.37
			IFGVTTLDIVR	0.57		0.81
			VDFPQDQLTALTGR	0.55	1.26	0.54
			TIPLISQCTPK	0.55	0.66	0.14
			ANTFVAELK	0.53	1.07	0.62
			FVFSLVDAMNGK	0.48	1.46	0.66
			GYLGPQLPDCLK	0.48	1.33	0.60
			HGVYNPNKIFGVTTLDIVR	0.46		0.09
			VAVLGASGGIGQPLSLLLK	0.32	1.84	0.91
IPI00759493.3	succinate-CoA ligase , GDP-forming , alpha subunit (SUCLG1)	4		0.64 ± 0.18	1.04 ± 0.27	0.54 ± 0.08
			GGQTHLGLPVFNTVK	0.67	1.26	
			IGIMPGHIHK	0.88	0.65	0.48
			IICQGFTGK	0.47	1.14	0.50
			MGHAGAHAGGK	0.55	1.13	0.63
IPI00658109.1	creatine kinase , ubiquitous mitochondrial precursor (CKMT1B ; CKMT1A)	7		0.62 ± 0.15	1.02 ± 0.26	0.62 ± 0.25
			AGVHIKLPPLSK	0.47	0.49	0.19
			GIWHNNEK	0.53	1.06	0.56

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

IPI identifier	Protein name	Peptide number	Peptide sequence	Standard deviations		
				A_{115}/A_{114}	A_{116}/A_{114}	A_{117}/A_{114}
			GLSLPPACTR	0.67	1.29	0.71
			GWEFMWNER	0.87	1.09	0.84
			IPTPVIHTK	0.50	0.90	0.49
			SFLI WVNEEDHTR	0.75	1.14	0.94
			VVVDALSGLK	0.57	1.18	0.59
IPI00413671.1	isoform 2 of Bcl-2-associated transcription factor 1 (BCLAF1)	1	RGRGRGTFQGRGR	0.65	1.12	0.46
IPI00453473.6	histone H4A	14		0.90 ± 0.22	1.31 ± 0.72	0.54 ± 0.42
			KTVTAMDVVY	1.37		1.54
			DAVTYTEHAK	1.12		
			ISGLIYEETR	1.11		
			RDNIQGITKPAIR	1.07	1.61	0.59
			TVTAMDVVYALK	1.03	2.64	
			TVTAMDVVYALKR	0.89	1.08	0.38
			DNIQGITKPAIR	0.85	1.23	0.69
			GVLKVFLENVIRDAVTYTEHAK	0.83	1.25	0.18
			GVLKVFLENVIR	0.82		0.66
			RKTVTAMDVVYALKR	0.81	0.11	
			RISGLIYEETR	0.79	1.11	0.39
			KTVTAMDVVYALK	0.69	2.23	
			KTVTAMDVVYALKR	0.63	0.78	0.17
			GVLKVFLENVIRDAVTY	0.55	1.03	0.31
IPI00008603.1	actin , aortic smooth muscle (ACTA2)	3		0.91 ± 0.26	0.53 ± 0.18	0.22 ± 0.28
			GILTLKYPIEHGIITNWDDMEK	0.79	0.40	0.03
			GILTLKYPIEHGIITNWDDM-	1.21		
			EKIWHHSFYNELR			
			LCYVALDFENEMA-	0.74	0.66	0.42
			TAASSSSLEK			
IPI00741756.1	similar to nonhistone chromosomal protein HMG-17 (HMG2P7)	3		0.56 ± 0.13	0.59 ± 0.38	0.14 ± 0.08
			LSAKPAPPKPEPK	0.64	0.78	0.18
			LSAKPAPPKPEPKPK	0.41	0.16	0.05
			PAPPKPEPKPK	0.64	0.85	0.19

* The data in the table were obtained from test a in Table 1. The ratio without standard deviation is derived from single peptide identification (confidence ≥ 95%). The standard deviations are calculated using the arithmetic averaging method.

选择变化较大且功能较重要的蛋白质的多肽 (置信度 99%) ,对 iTRAQ-LC-MS/MS 半定量分析的代表性结果进行报告。从图 1 和图 2 中可看出 , iTRAQ-LC-MS/MS 可在获取多肽碎片离子信息的同时 ,通过 iTRAQ 报告离子的强度比较获取各样品组中相同多肽前体的相对定量信息。

2.2 讨论

雌激素和血清中的激素以及各种生长因子在调解乳腺细胞的生理和病理活动方面发挥着极为重要的作用 ,本研究利用 iTRAQ-LC-MS/MS 方法对 E2 和血清对 MCF7 乳腺癌细胞系内各种蛋白质含量的影响进行了系统研究。结果发现 ,E2 在正常血清培养和无血清培养的条件下 ,对 MCF7 细胞内的绝大部分蛋白质的影响趋势是一致的。E2 可显著提高细胞内多种核糖体蛋白质的含量 ,提示细胞内的

蛋白质合成加强。血清剥夺引起细胞内真核翻译起始蛋白 EIF4A1 的含量明显降低 ,这可能是细胞在应对营养来源降低时的一种自身保护反应。有趣的是在血清剥夺状态下加入雌激素在某种程度上能够拮抗血清剥夺引起的上述效应。E2 在正常培养和血清剥夺条件下 ,明显降低 SUCLG1 和 CKMT1 的水平 ,提示细胞内三磷酸腺苷 (ATP)和磷酸肌酸等高能分子的合成代谢减弱。过去的研究已经证明 , E2 是促进乳腺癌细胞生长的重要的有丝分裂原 ,而血清剥夺有抑制细胞进入细胞周期的作用^[23]。本研究发现 E2 可下调细胞内钙调素的水平 ,而血清剥夺可明显上调钙调素的含量。钙调素已被证明在 MCF7 细胞中可介导表皮生长因子引起的 Akt 蛋白激酶激活 ,而 Akt 是与肿瘤发生和发展密切相关的信号分子^[24]。在 Ca²⁺ 存在的条件下 ,钙调素还可

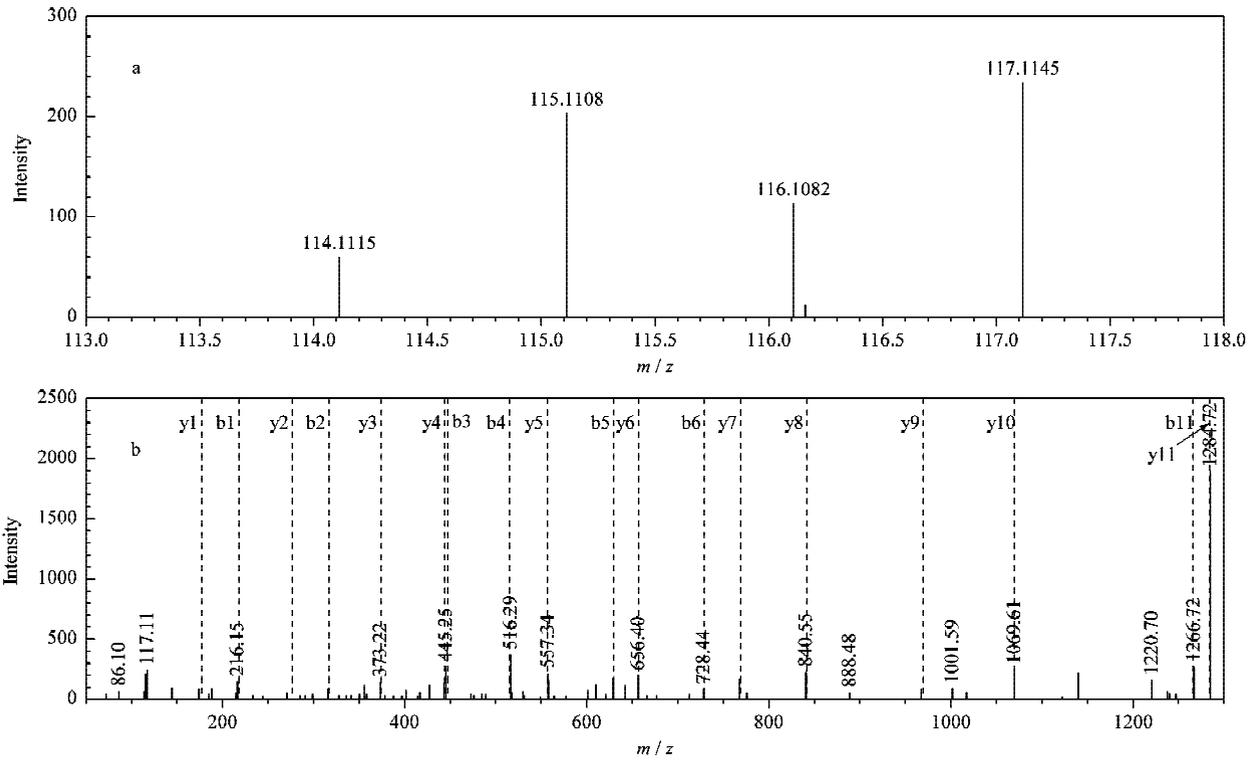


图 1 EIF4A1 蛋白多肽(ATQALVLAPTR)的鉴定和相对定量质谱图

Fig. 1 Mass spectra for the identification and relative quantification of a peptide (ATQALVLAPTR) from EIF4A1 protein
 a. The ion intensities of reporter ions m/z 114, 115, 116 and 117 represent the relative abundances of the peptides in control group, 17 β -oestradiol (E2) treatment group, serum deprivation (SD) group, and SD + E2 treatment group, respectively. b. product ion series detected after collision induced dissociation.

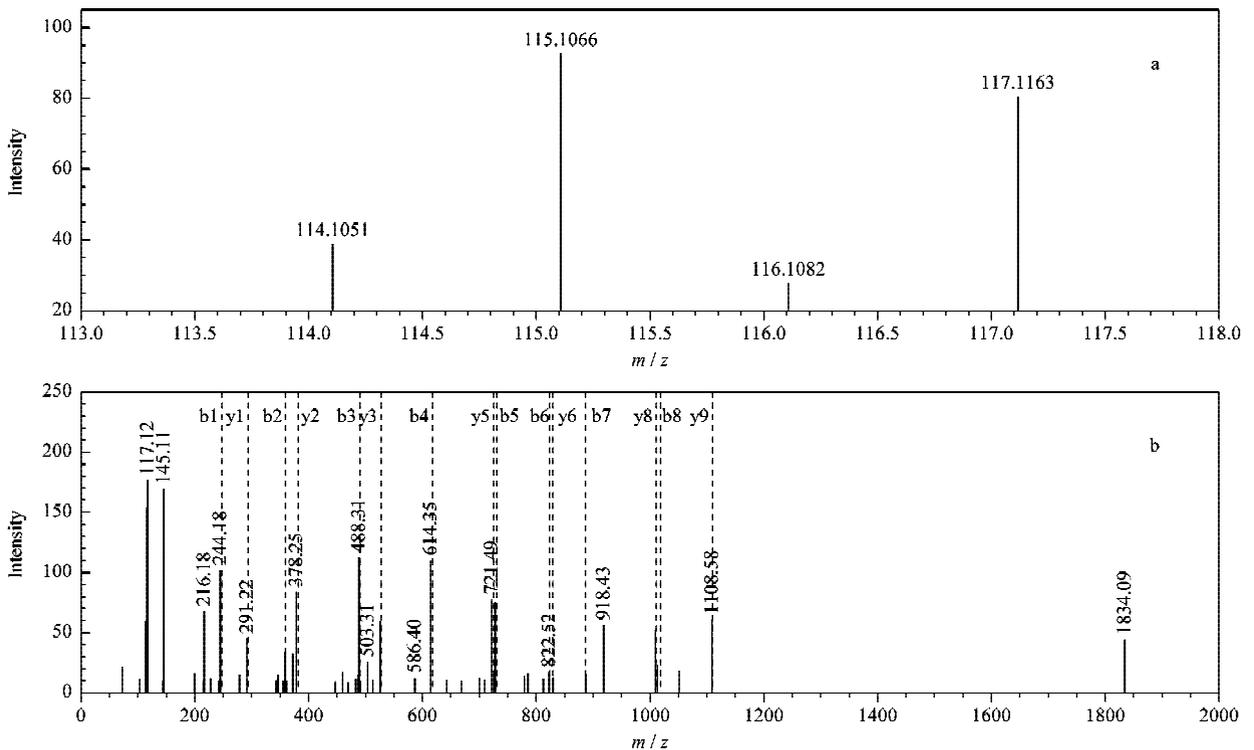


图 2 60S 核糖体蛋白 L11 多肽(VLEQLTGQTPVFSK)的鉴定和相对定量质谱图

Fig. 2 Mass spectra for identification and relative quantification of a peptide (VLEQLTGQTPVFSK) from 60S ribosomal protein L11

a. The ion intensities of reporter ions m/z 114, 115, 116 and 117 represent the relative abundances of the peptides in control group, 17 β -oestradiol (E2) treatment group, serum deprivation (SD) group, and SD + E2 treatment group, respectively. b. product ion series detected after collision induced dissociation.

以与雌激素受体 α ($ER\alpha$) 结合并调节 $ER\alpha$ 的反式激活活性, 钙调素与 $ER\alpha$ 复合体的形成异常在乳腺癌的病理过程中发挥着重要的作用^[25]。角质蛋白 (keratin) 是重要的胞浆细胞的骨架蛋白。本研究发现血清剥夺可以将细胞内 KRT1(keratin, type II cytoskeletal 1) 的含量提高 1 倍以上, 而在正常培养条件下和血清剥夺条件下加入 E2 均未发生明显变化。这一现象的机理和生物学意义还有待进一步探讨。ACTA2(actin, aortic smooth muscle) 是与癌细胞运动和侵袭密切相关的蛋白质。本研究发现血清剥夺可明显降低细胞内 ACTA2 的含量。以往有报道证明 ACTA2 基因的表达受细胞外 β_1 型转化生长因子(transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 的调节^[26], 而血清是体外培养条件下 TGF- β_1 的主要来源, 因此血清剥夺后 ACTA2 的含量降低与上述报道相吻合, 这对在蛋白质水平上了解 E2 和血清对 ER 阳性的乳腺癌细胞产生的生物学效应的分子机理具有重要的意义。

3 结论

本研究证明 iTRAQ-LC-MS/MS 是一种高通量研究不同生理或病理状态下细胞内蛋白质组成和含量变化的良好手段。该法由于采用体外化学标记, 因此适用于所有生物样品。另外, 由于各组样品在同一分析过程中完成, 因此不仅能有效消除仪器分析的批间误差而且可在较少的分析过程中获得大量的比较蛋白质组学数据。这种技术路线适用于系统研究不同状态下和不同来源生物组织和细胞中蛋白质表达的差异, 并可通过各组平行分析数据的比较获取多变量(如本研究中血清与 E2) 生物学效应间的相互关系。

参考文献:

- [1] Unlü M, Morgan M E, Minden J S. Electrophoresis, 1997, 18(11): 2 071
- [2] Ong S E, Blagojev B, Kratchmarova I, et al. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(5): 376
- [3] Gygi S P, Rist B, Gerber S A, et al. Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 994
- [4] DeSouza L, Diehl G, Rodrigues M J, et al. J Proteome Res, 2005, 4(2): 77
- [5] Levin Y, Schwarz E, Wang L, et al. J Sep Sci, 2007, 30(14): 2 198
- [6] Li X, Jiang X N, Zou H F. Chinese Journal of Chromatography (厉欣, 江新宁, 邹汉法. 色谱), 2008, 26(2): 189
- [7] Quaglia M, Pritchard C, Hall Z, et al. Anal Biochem, 2008, 379(2): 164
- [8] Hardt M, Witkowska H E, Webb S, et al. Anal Chem, 2005, 77(15): 4 947
- [9] Phanstiel D, Zhang Y, Marto J A, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 2008, 19(9): 1 255
- [10] Russo J, Ao X, Grill C, et al. Breast Cancer Res Treat, 1999, 53(3): 217
- [11] Zumoff B. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(1): 30
- [12] Key T, Appleby P, Barnes I, et al. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(8): 606
- [13] Santen R J. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(7): 3 007
- [14] Egeblad M, Jäättelä M. Int J Cancer, 2000, 86(5): 617
- [15] Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Science, 1995, 270(5 241): 1 491
- [16] Johnson M R, Valentine C, Basilico C, et al. Oncogene, 1998, 16(20): 2 647
- [17] Finlay G A, Hunter D S, Walker C L, et al. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 285(2): C409
- [18] Gadal F, Starzec A, Bozic C, et al. J Mol Endocrinol, 2005, 34(1): 61
- [19] Stender J D, Frasor J, Komm B, et al. Mol Endocrinol, 2007, 21(9): 2 112
- [20] Chen G, Gharib T G, Huang C C, et al. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(4): 304
- [21] Shilov I V, Seymour S L, Patel A A, et al. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(9): 1 638
- [22] Gan C S, Chong P K, Pham T K, et al. J Proteome Res, 2007, 6(2): 821
- [23] Liu H, Adler A S, Segal E, et al. PLoS Genet, 2007, 3(6): e91
- [24] Li L, Sacks D B. Mol Cell Endocrinol, 2007, 19(3): 439
- [25] Gallo D, Jacquot Y, Laurent G, et al. Mol Cell Endocrinol, 2008, 291(1/2): 20
- [26] Casey T M, Eneman J, Crocker A, et al. Breast Cancer Res Treat, 2008, 110(1): 39