

它莫西芬诱导乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的比较 蛋白质组学研究

娄雅欣^{1,2}, 钟丽君¹, 杨彬¹, 陈丽娜², 刘丹¹, 邹霞娟¹, 彭嘉柔¹

(1. 北京大学 医药卫生分析中心, 北京 100083; 2. 北京大学 人类疾病基因研究中心, 北京 100083)

自噬 (autophagy) 广泛存在于真核细胞, 贯穿于正常细胞生长发育和生理病理过程。自噬功能的变化与疾病密切相关。随着年龄增长自噬功能呈下降趋势, 这导致对健康有害的氧化的蛋白质累积, 加快衰老^[1]; 在肿瘤细胞中自噬明显减少, 这提示增强自噬能抑制肿瘤的发展^[2]; 在许多神经退行性病变中自噬功能增强, 例如亨廷顿病^[3]、震颤性麻痹^[4]和老年性痴呆^[5]等。因此, 对于自噬的研究近年来倍受关注, Science 杂志将自噬列为 2005 年科技领域 6 个研究热点之一。但是由于对自噬研究的时间不长, 人们对这一复杂的生命现象的认识还很不全面, 对自噬的起源、信号传导、分子调节机制以及自噬对细胞生存的影响等还需要大量深入和全面的研究。本研究比较它莫西芬诱导 MCF-7 自噬细胞与正常细胞的双向电泳图谱, 鉴定了 5 种差异表达蛋白, 为进一步探讨自噬的机制提供初步线索。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 它莫西芬 (Tamoxifen) 购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自 Hyclone。蛋白质定量试剂, 固相 pH 梯度 (IPG) 胶条, PROTEAN IEF Cell 等电聚焦电泳仪, PROTEAN II Xi Cell 垂直板电泳仪, 均为美国 Bio-Rad 公司产品。质谱分析系统为 Waters 公司的 Q-ToF Ultima Global 质谱仪。

1.2 蛋白样品的制备

MCF-7 细胞置于含 10 $\mu\text{mol/L}$ 它莫西芬的 DMEM 培养基中 (TAM 组), 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养, 诱导细胞发生自噬, 以正常培养的 MCF-7 细胞为对照 (DMEM 组)。3 d 后收获细胞、清洗、裂解、提取细胞总蛋白, 定量后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存。

1.3 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳实验参考 Bio-rad 公司提供的方法进行, 总蛋白上样量为 1 mg。凝胶图像扫描后, 采用 Imaging Master 2D Elite 5.0 软件进行比对分析。

1.4 质谱分析

分别筛选 TAM 组和 DMEM 组 MCF-7 细胞全蛋白质组中产生明显差异的蛋白质斑点, 经胰酶消化后, 进行 CapLC-ESI Q-TOF MS/MS 全自动分析。测定后的数据经 ProteinLynx 2.0 (Waters) 软件处理, 通过 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 查询 NCBI 数据库进行蛋白质鉴定。

2 结果与讨论

将 TAM 组和 DMEM 组细胞在相同条件下提取总蛋白, 进行 3 次双向凝胶电泳, 得到 TAM 组和 DMEM 组总蛋白的双向电泳图谱 (图 1)。应用图像分析软件对电泳图谱进行分析, 两者的蛋白质斑点数目分别为 668 \pm 99 和 550 \pm 97, 初步确定了 5 个显著差异蛋白, 其中 Spot 1, 2, 3 在 DMEM 组中表达上调, Spot 4, 5 在 TAM 组中表达上调, 切割差异表达蛋白质点, 进行 ESI Q-TOF MS/MS 检测, 通过数据库搜索, 确定 Spot 1, Spot 2 和 Spot 3 分别为 HSPA8 protein, ubiquitin-conjugating enzyme E2N, histone H2B; Spot 4 和 5 分别为 HNRPD protein, cofilin 2。本实验为研究自噬的机制提供了初步线索。

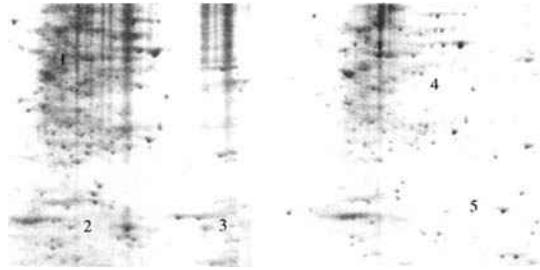


图1 DMEM与TAM组细胞总蛋白质的双向电泳图谱

参考文献:

- [1] DONATI A, CAVALLINI G, PARADISO C, et al. [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001, 56: 375 - 383
- [2] PAGLIN S, HOLLISTER T, DELOHERY T, et al. [J]. Histol Histopathol, 2003, 18: 715 - 726
- [3] MARX J. [J]. Science, 2005, 310: 43 - 45
- [4] ANGLADE P, VYAS S, JAVOY-AGID F, et al. [J]. Histol Histopathol, 1997, 12: 25 - 31
- [5] YU W H, CUERVO A M, KUMAR A, et al. [J]. J Cell Biol, 2005, 171: 87 - 98
- [6] DORN B R, DUNN W A JR, PROGULSKE-FOX A, et al. [J]. Cell Microbiol, 2002, 4: 1 - 10

Proteomics Analysis of Tamoxifen-induced Autophagic MCF-7 Cells

LOU Ya-xin^{1,2}, ZHONG Li-Jun¹, YANG Bin¹, CHEN Li-na²,
LIU Dan¹, ZOU Xia-juan¹, PENG Jia-rou¹

(1. Peking University Medical and Healthy Analytical Center, Beijing 100083, China;
2. Peking University Center for Human Disease Genomics, Beijing 100083, China)

Abstract: The differentially expressed proteins between normal and tamoxifen-induced autophagic MCF-7 cells were studied by 2-DE combining with mass spectrometric analysis. Totally, there were 668 ± 99 and 550 ± 97 protein spots detected in the 2-DE maps from normal and autophagic MCF-7 cells respectively, among which 5 changed protein spots were identified by the Q-TOF MS/MS and database search.

Key words: Proteomics; Two dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry; Autophagy

(上接第77页)

Analysis of Trimethyltin Chloride in Urine by GC - MS

WU Bang-hua, ZHANG Zhi-qin, WU Chuan, YUAN Xiao-lin, XIE Yu-xuan
(Guangdong Prevention & Treatment Center of Occupational Diseases, Guangzhou 510310, China)

Abstract: To study the detection method of trimethyltin chloride in urine. Extraction trimethyltin chloride in urine by ethyl acetate, and detection by capillary gas chromatography and mass spectrometry method (GC - MS). The linear range of trimethyltin chloride in the method was $0.776 - 19.4 \mu\text{g/mL}$, the correlation coefficient was 0.999 9, the lowest detection concentration was 0.01 mg/L. Relative standard deviation (RSD) was 4.4% - 8.6%, the recovery rates were 99.0% - 110.0%, sample could be save in -20°C at least one half year. The method was applicable to detect trimethyltin chloride in urine.

Key words: Gas chromatography; Mass spectrometry method; Urine; Trimethyltin chloride