

## • 基础研究论著 •

## 白藜芦醇诱导 HL-60 细胞凋亡的磷酸化蛋白质组研究\*

何顺华<sup>1</sup>, 祁婷婷<sup>2#</sup>, 张青<sup>3</sup>, 严丁旻<sup>2</sup>, 刘峰<sup>3</sup>, 李冠武<sup>2△</sup>

(1. 浙江省海宁市人民医院妇产科, 浙江海宁 314408; 2. 汕头大学医学院生物化学教研室, 肿瘤分子生物学开放实验室, 广东汕头 515041; 3. 汕头大学医学院第二附属医院血液科, 广东汕头 515041)

**摘要:**目的 通过鉴定参与白藜芦醇(RSV)诱导人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞凋亡的磷酸化蛋白质, 了解介导白藜芦醇诱导 HL-60 细胞的凋亡机制。方法 以一定浓度的 RSV 作用 HL-60 细胞一定时段后, 富集磷酸化蛋白质, 通过双向电泳(2-DE)分离, 质谱分析鉴定差异蛋白。结果 以 100  $\mu\text{mol/L}$  RSV 处理 HL-60 细胞 12 h, 2-DE 显示同对照组比较, 其磷酸化蛋白质有明显变化, 经过质谱鉴定后, 这些蛋白质大部分为内质网及蛋白质折叠相关蛋白。结论 内质网及蛋白质折叠可能参与了 RSV 诱导 HL-60 细胞凋亡机制。

**关键词:**白藜芦醇; HL-60; 磷酸化蛋白; 内质网; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1348-03

## A study of phosphorylated proteome of resveratrol-induced HL60 cellular apoptosis\*

He Shunhua<sup>1</sup>, Qi Tingting<sup>2#</sup>, Zhang Qing<sup>3</sup>, Yan Dingmin<sup>2</sup>, Liu Feng<sup>3</sup>, Li Guanwu<sup>2△</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Haining People's Hospital, Haining, Zhejiang 314408, China; 2. Department of Biochemistry, Open Laboratory of Tumor Molecular Biology, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China; 3. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China)

**Abstract: Objective** To understand the mechanism of resveratrol (RSV)-induced HL60 cellular apoptosis through identifying the phosphorylated proteins involved. **Methods** HL60 cells were treated with RSV of a certain concentration for a certain amount of time. Enriched phosphorylated protein were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and the differential proteins were identified by mass spectrometry. **Results** Treated HL60 cells with 100  $\mu\text{mol/L}$  RSV, 2-DE showed that the phosphorylated proteins in cells had changed markedly when compared to that in control group, and the majority of the proteins were endoplasmic reticulum and protein folding-associated proteins. **Conclusion** Endoplasmic reticulum and protein folding may participate the mechanism of RSV-induced HL60 cellular apoptosis.

**Key words:** resveratrol; HL-60; phosphorylated protein; endoplasmic reticulum; apoptosis

白藜芦醇(RSV)是一种植物抗毒素, 主要存在于葡萄、藜芦、虎杖等植物中的多酚类化合物, 化学名称为 3,4,5-三羟基苯二烯。研究发现白藜芦醇具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗癌、抗衰老等重要生物学作用<sup>[1-3]</sup>。近年来 RSV 的抗肿瘤作用已成为研究热点。不同的细胞, RSV 诱导细胞凋亡的机制也不尽相同, 本课题组曾报道 RSV 能够诱导 HL-60 细胞凋亡, 且这种作用呈时间和剂量双依赖性, 其机制与活性氧(ROS)的产生有关<sup>[4]</sup>。但是 ROS 的产生是否是 RSV 诱导 HL-60 细胞凋亡的惟一原因尚不明确, 本课题组通过阻断 ROS 的产生, 结果发现细胞凋亡并未完全抑制。因此推测, 除 ROS 激活线粒体凋亡通路外, 应该还有其他途径参与了 RSV 的抗肿瘤作用。为此, 本研究将通过蛋白组学方法研究 RSV 处理对 HL-60 细胞全部磷酸化蛋白质的影响, 试图初步了解 RSV 诱导人 HL-60 细胞凋亡的其他机制。

## 1 材料与方

1.1 材料 人早幼粒白血病细胞 HL-60 细胞株(本室保种)。

1.2 仪器与试剂 双向电泳裂解液、水化液、电泳缓冲液、细胞刮子, 样品混合器(Hula Mixer)、磁力架、离心机、电泳仪、水化盘、聚焦槽及垂直电泳仪(伯乐公司, 美国)、IPG 预制胶条

(伯乐公司, 美国)、磷酸化蛋白质富集试剂盒(BD 公司)、脱色摇床。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞裂解 准备两皿(直径为 15 cm)处于对数生长期的 HL-60 细胞, 一皿细胞加入白藜芦醇, 使其 RSV 的终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 另一皿细胞做对照。培养 12 h 后收集细胞; 将细胞悬液放入事先称重好的离心管中, 以 500 g/min 速度离心 10 min 后, 弃上清液, 然后用冷 PBS 洗细胞 3 次, 每次以 500 g/min, 10 min 离心, 弃上清液; 将离心管再次离心, 500 g/min, 2 min, 离心后吸尽多余的液体, 连管、细胞一起称质量, 确定收集到的细胞的质量; 将收集到的细胞放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存至少 2 h; 将细胞从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出, 待细胞复温后用缓冲液 A 重悬细胞, 大约 30  $\mu\text{L}/\text{mg}$ , 根据细胞的质量, 确定需要缓冲液 A 的体积; 将细胞吹打均匀后, 上下颠倒悬液 20 次左右; 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育细胞悬液 10 min, 大约每分钟将离心管颠倒 1 次, 10 min 后将细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中。10 000 g/min 离心 20 min, 以沉淀没有溶解的物质。

1.3.2 亲和层析柱分离富集磷酸化蛋白质 将上清液转移至另一干净管中, 此上清液即为总蛋白; 分出一部分蛋白样品用

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172089); 广东省大学生创新实验资助项目(杰创 1056010013)。作者简介: 何顺华, 女, 医师, 主要从事血液及妇产科肿瘤研究。 # 并列第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: gwli@stu.edu.cn。

作测蛋白浓度和其他用处,另一部分用来提取磷酸化蛋白;提前将亲和柱置于室温;将亲和柱上下帽去除,使储存液排除;用蒸馏水(大约 5 mL)洗柱;用缓冲液 A 5 mL 平衡亲和柱直至流出液 pH 值小于 6.0;盖上底帽;将蛋白样品上柱(蛋白样品总量不要大于 8 mg,最好为 4 mg,一次不要超过 5 mL);盖上顶帽,将柱放在 4 ℃ 摇床上轻摇 20 min;将柱竖立放置 5 min;将亲和柱底帽和顶帽打开,使没有吸附的物质流出,用离心管收集这些流出的液体(这些为非磷酸化蛋白)。收集后-20 ℃ 保存;用缓冲液 A 洗柱 4 次,每次 5 mL;加 1 mL 缓冲液 B 洗柱,4 ℃ 冰上收集洗脱液,此洗脱液即为磷酸化蛋白。用缓冲液 B 重复洗柱 3 次,洗脱液均要收集。

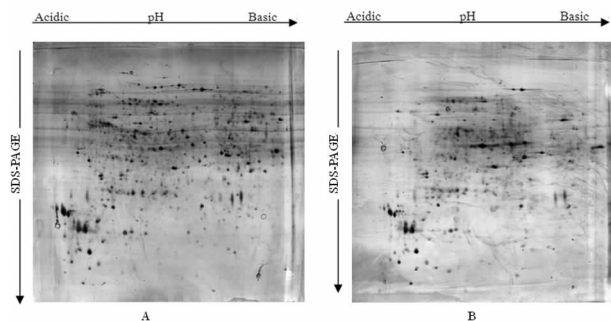
**1.3.3 蛋白样品除盐** 由于收集到的磷酸化蛋白往往会浓度太低,我们采用超滤法浓缩蛋白,达到提高蛋白浓度和脱盐的作用。将上一步得到的磷酸化蛋白加入到超滤管中,以 7 000 g/min,低温高速离心 40 min,离心结束后,加入适量的裂解液溶解蛋白,将溶解好的蛋白溶液吸出转移至另一干净的 EP 管中,取适量样品 BCA 法进行蛋白浓度测定。

**1.3.4 双向电泳及质谱测定** 水化:室温溶解 400 μL 水化液(不含 DTT,不含 Pharmalyte 3~10)中加入 4 μL DTT(4 mol/L),2 μL Pharmalyte 3~10,充分混匀。样品液测得蛋白浓度后,取 50 μg 的样品,用混匀的水化液补到 125 μL。根据胶条长度,沿着水化盘中槽线性加入样品。去除预制 IPG 胶条上的保护层,胶面朝下置于水化盘中的样品溶液上,避免产生气泡,然后覆盖 3 mL 矿物油。第一向等电聚焦:胶条水化 12~16 h 后,将其转移至聚焦盘中,使得胶条的正极对应于聚焦盘的正极。为确保胶条与电极紧密接触,7 cm 胶条要用干净的滤纸做盐桥放到两极,胶条的胶面朝下搭在盐桥上,覆盖 3 mL 矿物油,对好正、负极,盖上盖子。设置 7 cm 的胶条等电聚焦程序为:100 V 5 min;500 V 1 h;1000 V 1 h;8 000 V,55 000 V 数小时;2 000 V 24 h;温度设置 18~20 ℃ 为宜。第二向 SDS-PAGE 电泳:聚焦结束的胶条,分别用平衡缓冲液 I 和 II 平衡。然后将胶条放置 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)的上方加入已加热溶解的低熔点琼脂糖封胶液,完全凝固后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后银染,扫描分析后(Biorad 的 PDquest 7.0 双向电泳分析软件),切 2 倍以上差异的点做质谱分析。

**2 结 果**

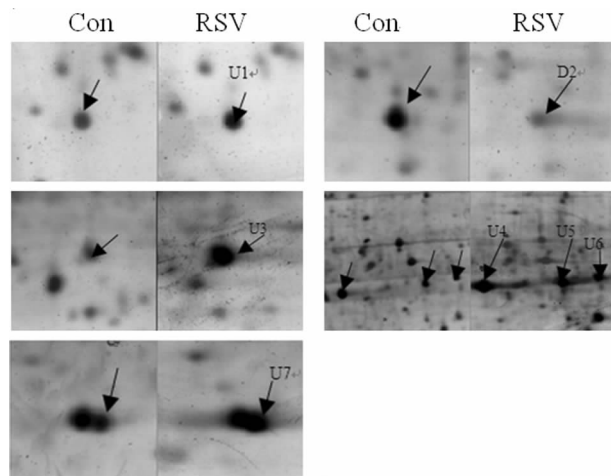
**2.1 双向电泳分离磷酸化蛋白质** 本实验利用双向电泳技术,根据蛋白质的等电点和相对分子质量的差异,将对照组 HL-60 细胞和 100 μmol/L RSV、12 h 处理的 HL-60 细胞提取到的磷酸化蛋白进行双向电泳,通过一向等电聚焦和二向 SDS-PAGE 后,各蛋白点分离开来。凝胶银染后凝胶扫描仪扫描。用 PDQuest 双向电泳软件分析得到差异表达的蛋白。得到对照组和 RSV 处理组蛋白点数分别为 243 个和 197 个,差异表达的蛋白质点数为 13 个(差异蛋白点未一一标出,其中选取部分放大),见图 1、2。

**2.2 差异蛋白点的质谱鉴定分析** 在蛋白质水平,蛋白质组学对细胞提供了正常、非正常阶段细胞在生理学上的进展、途径甚至网络。通过采用 2-DE 及质谱技术对检测到的 HL-60 细胞内的磷酸化蛋白,用 PDQuest 双向电泳软件分析得到差异表达的蛋白。图 2 中分别列举了部分差异点的局部放大图。选取部分分辨清楚的差异点经过酶切,质谱鉴定了部分蛋白质,从 NCBI 蛋白质数据库中搜索其主要功能,见表 1。



A:对照组;B:RSV 处理组。

图 1 对照组与 RSV 处理组的磷酸化蛋白双向电泳图谱



Con:对照组;RSV:白藜芦醇处理组;U:表达上调的蛋白;D:表达下降的蛋白。

图 2 对照组与 RSV 处理后的磷酸化蛋白质点局部放大图

表 1 鉴定双向电泳后质谱检测的两组差异磷酸化蛋白的名称和功能

鉴定蛋白点	中文名称与作用
nucleophosmin	核磷蛋白,核糖体蛋白的组装和运输与肿瘤抑制因子 ARF 的调节
PMSA5	蛋白酶体,对 MHC I 肽段的加工处理作用
ER-60 protease	ER-60 蛋白酶,是来自内质网降解了的保守蛋白,与蛋白质的折叠有关
Phospholipase C-alpha	磷脂酶 C,胞浆膜上一个关键酶,作用于 PIP2 产生三磷酸肌醇和二酰基甘油
ER-60 protease	ER-60 蛋白酶,是来自内质网降解了的保守蛋白,与蛋白质的折叠有关
ER-60 protease	ER-60 蛋白酶,是来自内质网降解了的保守蛋白,与蛋白质的折叠有关
CCT2	伴侣蛋白含 TCP1,亚基 2,具有调控细胞周期、参与蛋白折叠等功能

**3 讨 论**

蛋白质是生命活动的执行者,任何一个生命活动的变化最终会在蛋白质水平上发生变化。蛋白质组学应用各种技术手段包括 2-DE、质谱分析等来研究蛋白质组的一门学科,是指从整体角度分析细胞内蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态变化情况,进而了解蛋白质之间的相互作用与联系,揭示蛋白质功能。近年来蛋白质组学技术在疾病研究中得到了广泛应用,其中“差异”蛋白质组学是目前蛋白质组学研究中技术上可行性较强的主要途径,双向电泳是蛋白质组学的核心技术<sup>[5]</sup>,是

惟一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分选技术,具有检测方法简便、快速,分辨率高和重复性好等优点。

在本实验中,笔者利用 2-DE 及其相应的 PDQuest 软件,将对照组 HL-60 细胞和 100  $\mu\text{mol/L}$  RSV 处理 12 h 后的 HL-60 细胞提取磷酸化蛋白点进行比对,得到对照组和白藜芦醇处理组蛋白点数分别为 243 个和 197 个,差异表达的蛋白质点数为 13 个。选取部分分辨清楚的差异点经过酶切,质谱鉴定了部分蛋白质,从 NCBI 蛋白质数据库中搜索其主要功能。一为核磷蛋白(nucleophosmin),是一种广泛表达的核蛋白,它穿梭于胞浆和细胞核之间,具有多种生物学功能,如核糖体蛋白的组装和运输,中心体折叠的操控,还有一个很重要的功能,肿瘤抑制因子 ARF 的调节。ER-60 蛋白酶是来自内质网降解了的内质网保守蛋白,具有半胱氨酸蛋白酶活性;带负电荷的磷脂类、磷脂酰肌醇等能够抑制 ER-60 蛋白酶对 ER-60 蛋白的降解。研究发现,ER-60 与蛋白质的折叠有关; CCT2 为伴侣蛋白含 TCP1,亚基 2,分布在细胞质,能够与核苷酸、ATP、未折叠蛋白等结合,具有调控细胞周期,参与蛋白折叠等功能;从这些蛋白质的功能可以看到,它们有一个共同点,就是都与蛋白质的折叠有关。在 ER 上,伴侣分子辅助的多肽折叠与修饰使蛋白获得成熟的转变。ER 内环境的稳定和有条不紊的信号调控是蛋白质正确折叠的关键,当有刺激使 ER 正确折叠蛋白的能力被削弱时,应激信号能通过 ER 膜传递到细胞核中,继而引起一系列特定的靶基因转录上调和蛋白质翻译水平下调,一种高度保守的未折叠蛋白反应(UPR)信号传导通路被激活<sup>[6]</sup>。UPR 通过阻止普通蛋白的合成,同时上调 ER 残存伴侣蛋白或其他通路的调节成分,确保 ER 蛋白高效率地折叠。但是如果刺激得不到缓解,UPR 最终激发凋亡。另外,UPR 信号途径被激活后可以活化 UPR 受体,可以导致 Chop/GADD153 的活化,当其高表达能影响 ER 蛋白的折叠功能,并引起细胞周期停滞及 DNA 损伤,使细胞发生凋亡<sup>[7]</sup>。

内质网蛋白质复杂的功能和折叠信号途径为本研究白藜芦醇诱导肿瘤细胞凋亡的机制提供了一个新的思路。同时通过双向电泳我们也发现了另外一些差异蛋白,如抑制素、磷脂酶 C- $\alpha$  等蛋白有明显的表达差异,这些蛋白均与凋亡诱导相关,这为后续研究白藜芦醇诱导肿瘤细胞凋亡的机制提供了重要线索。

## 参考文献

- [1] Su JL, Lin MT, Hong CC, et al. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells[J]. *Carcinogenesis* vol, 2005, 26(1): 1-10.
  - [2] Stervbo U, Vang O, Bonnesen C, et al. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells[J]. *Cell Prolif*, 2006, 39(6): 479-493.
  - [3] Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 Modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(6): 1-14.
  - [4] 常丽君,何顺华,吴睿,等.超氧阴离子参与白藜芦醇诱导的人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞凋亡[J]. *汕头大学医学院学报*, 2011, 24(3): 129-134.
  - [5] Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, et al. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 9(1): 683-695.
  - [6] Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 186-194.
  - [7] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- (收稿日期: 2013-04-10)
- 
- (上接第 1347 页)
- Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity[J]. *Mol Cell*, 2011, 41(6): 672-681.
- [11] Schmid S, Hugel T. Regulatory posttranslational modifications in hsp90 can be compensated by cochaperone aha1[J]. *Mol Cell*, 2011, 41(6): 619-620.
  - [12] Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, et al. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(1): 155-169.
  - [13] Liu Y, Rusinol A, Sinensky M, et al. DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 22): 4644-4649.
  - [14] Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, et al. Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(11/12): 777-783.
  - [15] Lee CH, Park JH, Choi JH, et al. Heat shock protein 90 and its cochaperone, p23, are markedly increased in the aged gerbil hippocampus[J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(9): 768-772.
  - [16] Bostock CV, Soiza RL, Whalley LJ. Genetic determinants of ageing processes and diseases in later life[J]. *Maturitas*, 2009, 62(3): 225-229.
  - [17] Melcer S, Hezroni H, Rand E, et al. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 910.
  - [18] Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 238-246.
  - [19] Lotz GP, Lin H, Harst A, et al. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17228-17235.
  - [20] Haruta M, Sussman MR. The effect of a genetically reduced plasma membrane proton motive force on vegetative growth of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(3): 1158-1171.
  - [21] Chua CS, Low H, Lehming N, et al. Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 233-245.
- (收稿日期: 2013-04-08)