

· 基础研究 ·

人胃癌细胞中 HSP27 高表达与长春新碱耐药的关系

孙雪峰¹, 朱易凡², 杨轶轩³, 何松^{3△}

(1. 重庆三峡中心医院消化内科, 重庆万州 404000; 2. 中山大学附属第一医院普通外科, 广州 510080; 3. 重庆医科大学附属第二医院消化科 400010)

摘要:目的 探讨长春新碱耐药的人类胃癌细胞株 SGC7901/VCR 发生多药耐受(MDR)的机制。方法 采用比较蛋白质组学方法、反义寡核苷酸(ASOs)抑制法、质谱分析(MS)和免疫共沉淀(IP)法,对长春新碱耐药的 SGC7901/VCR 细胞系及其母细胞系 SGC7901 的总蛋白提取物进行测定,分析热休克蛋白 27(HSP27)与 MDR 的关系,并对 HSP27 的相互作用组进行综合研究。结果 HSP27 作为一种与 MDR 相关的蛋白得到鉴定,并鉴定出 25 种 HSP27 相互作用蛋白。HSP27 ASOs 对 HSP27 表达的抑制可加强 SGC7901/VCR 对长春新碱和阿霉素的化疗敏感性。结论 胃癌中 HSP27 与长春新碱耐受机制相关。

关键词:多药耐受;胃肿瘤;长春新碱;质谱分析法;免疫共沉淀

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)30-3194-04

The correlation between vincristine resistance and increased expression of HSP27 in human gastric cancer cell lines

Sun Xuefeng¹, Zhu Yifan², Yang Yixuan³, He Song^{3△}

(1. Department of Gastroenterology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Wanzhou, Chongqing 404000; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080; 3. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms of multidrug resistance(MDR) in vincristine(VCR)-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR. **Methods** Total protein extracts from VCR-resistant SGC7901/VCR and its parental cell line SGC7901 were tested by comparative proteomics. The association of heat shock protein 27 (HSP27), one of the highly expressed proteins in SGC7901/VCR, with MDR was analyzed using antisense oligonucleotides(ASOs) inhibition. A comprehensive interactome map of HSP27 was investigated by coimmunoprecipitation(IP) coupled with MS. **Results** HSP27 was identified as a protein showing increased expression in SGC7901/VCR. The suppression of HSP27 expression by HSP27 ASOs could enhance vincristine and adriamycin chemosensitivity in SGC7901/VCR. Identified 25 HSP27-interacting proteins by IP coupled with MS could be classified into eight categories based on their functions, which correspond to the reported functions of HSP27 with MDR. **Conclusion** HSP27 is relative to the mechanisms of multidrug resistance in gastric cancer.

Key words: multidrug resistance; gastric neoplasms; vincristine; mass spectrometry; coimmunoprecipitation

胃癌细胞的多药耐药(MDR)是胃癌患者化疗失败的主要原因^[1-5]。长春新碱耐药型细胞系 SGC7901/VCR 源自于人类胃癌细胞系 SGC7901,通过在体外使用长春新碱逐步筛选而获得,对顺铂、依托泊苷、丝裂霉素 C 及 5-氟尿嘧啶(5-FU)等其他抗肿瘤药物呈交叉耐药,是一个广泛使用的 MDR 细胞模型。本研究通过对 SGC7901/VCR 的研究,进一步了解胃癌 MDR 的分子生物学机制,期待能为胃癌患者提供更有有效的治疗手段。

1 材料与方

1.1 细胞系 长春新碱 MDR 人类胃癌细胞系 SGC7901/VCR 及其母细胞系 SGC7901,由第四军医大学的樊代明院士赠送。

1.2 主要试剂及仪器 IPG 干胶条、考马斯亮蓝 G-250、三 Tris Base、SDS、PVDF 膜、ECL 购自 Amersham Biosciences。HSP27、HSP90、ACTIN 的单克隆或多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology,双向电泳系统、图像扫描器、电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱仪(ESI-Q-TOF-MS)购自 Micromass

公司。

1.3 双向凝胶电泳 用裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,100 mmol/L DTT,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,2% 载体两性电解质,1 mg/mL 脱氧核糖核酸酶 I,1 mmol/L Na₃VO₄ 和 1 mmol/L PMSF),使细胞裂解。将细胞裂解液 4 ℃、15 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,测定总蛋白浓度。水化液(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,0.2% DTT,0.5% (v/v) pH 3~10 的 IPG 缓冲液,微量溴酚兰)将 500 μg 蛋白样品稀释至 450 μL,加样至 IPG 胶条上,然后 30 V 水化 24 h。IEF 参数为:500 V 聚焦 1 h,1 000 V 聚焦 1 h,8 000 V 聚焦 8.5 h,总计 68 kWh。聚焦后 IPG 胶条使用平衡溶液(含 6 mol/L 尿素,2% SDS,30% 甘油,pH 8.8 的 50 mmol/L Tri-HCL,1% 的 DTT)平衡 15 min,之后用同样的溶液(只是用 2.5% 碘乙酰胺代替上述溶液中的 DTT)再平衡 15 min。之后 IPGphor, Ettan DALT II 系统进行第二向 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后 G-250 对双向电泳的凝胶进行染色,PDQuest 系统加以分析^[6]。

1.4 ESI-Q-TOF-MS 分析^[7] 剪下不同的蛋白质点迹和蛋白

△ 通讯作者, Tel:13808336120; E-mail: hedoctor@sina.com.

表 1 ESI-Q-TOF-MS 鉴定出的差异表达蛋白质有 100 mmol/L NH₄HCO₃ 的 50%

点迹	收录号 ^a	蛋白质名称	相对分子质量	pI	在 SGC7901/VCR 中的表达	功能
1	P11142	HSP 同源蛋白 71 kDa	71 082	3.57	↓ ^b	分子伴侣
2	P48643	T-复合物蛋白, epsilon 亚基	60 100	5.45	↓	分子伴侣
3	O75874	NADP-依赖性异柠檬酸脱氢酶	46 944	6.34	↑ ^b	代谢
4	P50213	异柠檬酸脱氢(NAD) _α 前体	40 022	6.47	↓	代谢
5	Q15181	无机焦磷酸酶	35 962	5.95	↑	代谢
6	Q96E17	HSP27	22 427	7.83	↑	分子伴侣
7	Q96E17	HSP27	22 427	7.83	↑	分子伴侣
8	Q96E17	HSP27	22 427	7.83	↑	分子伴侣
9	Q30626	Sorcin	20 617	5.11	↑	钙结合

a:Swiss-Prot 号;b:↑表示与 SGC7901 相比,SGC7901/VCR 有大于或等于 2 倍的增加。↓表示与 SGC7901 相比,SGC7901/VCR 有大于或等于 2 倍的下降。

质条带,使用含乙腈的新配制溶液使之脱色,之后真空离心干燥。干燥后的凝胶块用 10 μL 胰酶溶液(含 40 mmol/L NH₄HCO₃ 的 9%ACN 溶液和 20 μg/mL 蛋白质组级别的胰酶)在 37 °C 下孵育 10~12 h。使用 Millipore Zip Tip C¹⁸ 纯化多肽混合物。将经过纯化的多肽混合物加样 LC/MS,DDA 模式进行质谱分析。质谱检测的参数:毛细管电压为 3 000 V,进样锥电压为 45 V,源温度为 80 °C,碰撞气体背压为 15 psi。

1.5 数据库分析 将 MS/MS 产生的 PKL 格式的文件录入 Mascot 搜索引擎中。搜索参数按如下设置:质量容许误差为±1.0道尔顿;MS/MS 容许误差为±0.5 道尔顿;可允许有一个没有计数的剪切位点;固定修饰为半胱氨酸;可变修饰选择为氧化;数据格式选择为 Micromass PKL 格式;工具选择为 ESI-Q-TOF。

1.6 Western blot 检测 使用裂解液(含 50 mmol/L Tris,pH 7.4,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L MgCl₂,2.5 mmol/L Na₃VO₄,1 mmol/L PMSF,2.5 mmol/L EDTA,0.5% Triton X-100,0.5% NP-40)在 4 °C 下将细胞裂解 30 min,收取上清液,测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 电泳后,将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉的 TBS 缓冲液(20 mmol/L Tris,pH 7.6,100 mmol/L NaCl,0.5%的 Tween-20)阻断过夜。然后在室温下一抗溶液(5%脱脂奶粉的 TBS 缓冲液以 1:1 500~1:2 000 比例稀释)孵育 3 h。二抗溶液(1:3 000 稀释)在室温下孵育 1 h。TBS-T 3 次洗脱后,ECL 系统检测。所有的 Western blot 检测均重复 3 次。

1.7 将 HSP27 的反义寡核苷酸链(ASO)导入细胞 所使用的 HSP27 的 ASO 对应 HSP27 的反义起始位置(5'-GGG ACG CGG CGC TCG GTC AT-3')^[8],错义 ASO 为对照(5'-CAG CGC TGA CAA CAG TTT CAT-3')。转染前 1 d,将 SGC7901/VCR 细胞接种在 6 孔板和 96 孔板中,细胞密度为 10⁵ 个/mL。当细胞呈 30%~50%融合时,50 nmol/L HSP27 ASO 或错义 ASO 转染细胞。HSP27 ASO 或错义 ASO 转染 SGC7901/VCR 细胞共 2 d,转染结束时,用不同浓度的长春新碱或阿霉素孵育细胞 24 h。Western blot 分析测定 HSP27 的表达水平,MTT 检查 SGC7901/VCR 的细胞活性。

1.8 免疫共沉淀(IP) 4 °C 下将细胞在免疫共沉淀缓冲液中

(含 20 mmol/L Tris,pH 7.4,100 mmol/L 的 NaCl,1% NP-40,0.5 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L Na₃VO₄,0.5 mmol/L PMSF)孵育 30 min 使细胞裂解。收集上清液,进行免疫共沉淀。首先使用非免疫血清对 1 500 μg 总蛋白进行预清除。接着,将 20 μg HSP27 抗体与预清除的上清液在 4 °C 下共孵育 3 h。然后加入 100 μL protein-G 琼脂糖珠子,继续孵育 1 h。离心 30 s 后,TBS-T 缓冲液洗 3 次,用 0.1 M 的氨基乙酸(pH =3)洗脱免疫复合物。SDS-PAGE 电泳后考马斯亮兰 R-250 染色,条带胰酶消化,进行质谱分析。

2 结 果

2.1 差异表达蛋白质的鉴定 通过双向电泳,将 SGC7901/VCR 细胞株及其对应细胞株 SGC7901 的总蛋白进行差异展示(图 1)。与 SGC7901 相比,SGC7901/VCR 中 20 kDa 大小连续 3 个点的表达显著性上调(表 1)。ESI-Q-TOF-MS 分析,并结合数据库检索。3 个点均鉴定为热休克蛋白 27(HSP27)。图 2 显示了代表性的 MS/MS 结果。从 y-片段电子系列中的质量差异中,鉴定出 m/z 值为 974.327 0 多肽片段的氨基酸序列为 GPSWDPFDRWYPHSR,该序列是 HSP27 序列的一部分。

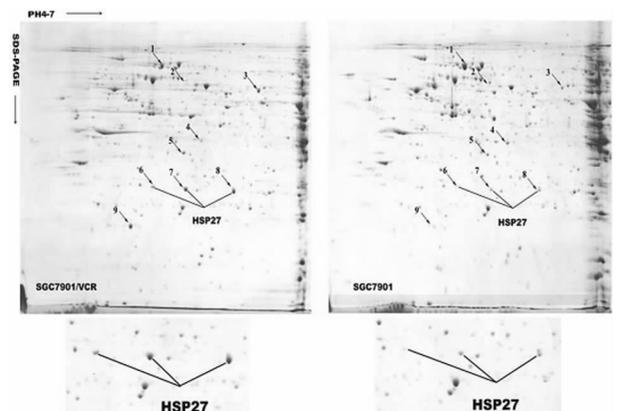


图 1 SGC7901 长春新碱耐药的 SGC7901/VCR 细胞系的双向电泳图

2.2 HSP27 与 MDR 的关系 Western blot 分析显示 HSP27 ASO 转染后 HSP27 的表达显著下降,错义 ASO 转染后,其

HSP27 表达没有变化(图 3A)。在 HSP27 ASO 转染后,与不同浓度的长春新碱和阿霉素共同孵育 24 h,SGC7901/VCR 对长春新碱和阿霉素的化疗敏感性增强,细胞活性显著降低(图 3B)。

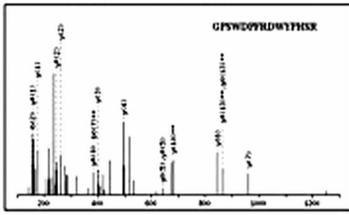
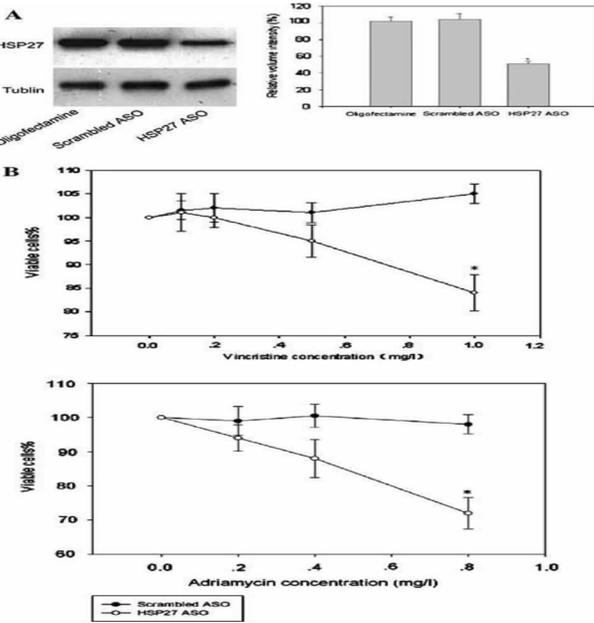


Table with 15 columns: #, b, b**, b*, b**, b*, Seq, y, y**, y*, y**, y*, y*, y*, #. It lists 15 protein identifications with their corresponding sequence and fragmentation patterns.

heat shock protein 27 [Homo sapiens]

1 MTEKAVPFLS LKPEKQPTK DMTPEKSLD GAKLPLPE ERSKQLGSS
51 VQGVYPLFP ALTESPFTL PITSKALSD LSSQSEIFE TIDKPVSLD
101 VNRKAPVLLI VNTDQVFL TQKEDSDQK DQYISKPTK KTLTPVQVQ
151 TQSSSLSPF GILVLAPEP ELATVSEIIT IPIVTEKALQ LGGKSKLIR

图 2 蛋白的 ESI-Q-TOF-MS 分析结果



A: HSP27 ASO 转染 SGC7901/VCR 细胞显著抑制了 HSP27 蛋白表达水平;B: HSP27 ASO 转染 SGC7901/VCR 细胞增强了长春新碱和阿霉素的化疗敏感性。试验重复 3 次。*: P ≤ 0.05。Oligofectamine 组仅用转染因子 oligofectamine 转染细胞。

图 3 HSP27 ASO 转染 SGC7901/VCR 对长春新碱和阿霉素化疗敏感性的作用

2.3 HSP27 相互作用蛋白的鉴定 通过免疫沉淀和质谱分析,在 HSP 复合物中共鉴定出 25 种蛋白。根据蛋白质的功能,鉴定出的蛋白质可分为 8 个功能种类:细胞骨架、分子伴侣、代谢酶、信号传导相关蛋白、核糖体蛋白、DNA 修复蛋白、

转录翻译蛋白以及 RNA 加工蛋白,这些功能与 HSP27 复合物的功能有很好的相关性。

2.4 HSP27 相互作用蛋白的确认 通过 IP 和 Western blot 分析证实 β-catenin、HSP90 和 Actin 与 HSP27 相互作用(图 4),在 IgY 阴性对照中则未检测到。

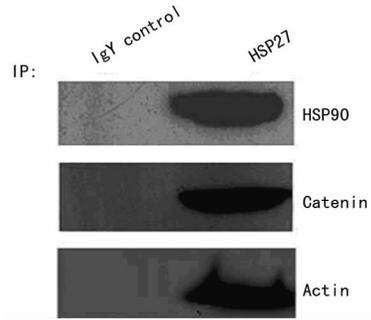


图 4 Western blot 验证 HSP27 的相互作用蛋白

3 讨论

本研究发现,在长春新碱 MDR 的胃癌细胞系 SGC7901/VCR 及其母细胞系 SGC7901 之间,HSP27 有显著性的差异表达。当 SGC7901/VCR 中的 HSP27 的过表达受到 HSP27 ASO 的抑制时,细胞对长春新碱和阿霉素的敏感性增加。这明确显示 HSP27 在 SGC7901/VCR 的过表达和 SGC7901/VCR 多药耐受表型相关。

作者进一步鉴定了 25 种与 HSP27 相互作用的蛋白,并免疫共沉淀确认了 β-catenin、Actin 及 HSP90 与 HSP27 的相互作用。这提示 HSP27 与细胞骨架蛋白(如肌动蛋白,肌动蛋白-类蛋白)形成一种复合物,参与肌动蛋白的动力学调节,防止细胞骨架因为多种应激因素而解离[9]。细胞骨架的解离是化疗药物造成细胞损伤早期的和核心的事件。化疗药物造成细胞损伤后,在细胞骨架重组期间,HSP27 能与细胞骨架相互作用,而 HSP27 高表达进一步促进细胞细胞骨架的重组,从而逃避化疗药物杀伤。

本研究发现核糖体蛋白(包括核糖体蛋白 P0 和核磷蛋白)与 HSP27 相互作用。核磷蛋白是一种多功能蛋白,在细胞周期中,可穿梭于细胞核与细胞质之间。有学者猜测其穿梭能力与其分子伴侣活性有关[10-12],从而在细胞分化、凋亡的过程中,发挥重要的调节作用。核磷蛋白参与肿瘤的多药耐受表型,很可能是通过抑制细胞凋亡来实现[13]。本研究表明了 HSP27 与核磷蛋白形成复合物,并导致耐药的直接证据。

另外,与 HSP27 相互作用的一些蛋白,也参与调节细胞的增殖和分化。在这些蛋白中,β-catenin 是经典 Wnt 信号通路中的关键组成成分[14-15]。β-catenin 能与 α-catenin 及 E-cadherin 相互作用,激活经典 Wnt 信号通路,导致干细胞存活及肿瘤产生。

本研究证实了在胃癌细胞 SGC7901/VCR 中,细胞 MDR 与 HSP27 的高表达相关,并且提供了 HSP27 与 MDR 机制紧密相关的证据。但是,HSP27 在肿瘤长春新碱耐药中的作用机制仍有难以理解之处。可能与 HSP27 还参与细胞信号转导、细胞增殖分化等更为复杂的过程有关。

参考文献:

[1] Gottesman MM,Fojo T,Bates SE. Multidrug resistance in

- cancer; role of ATP-dependent transporters[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 48-58.
- [2] 郭剑伟, 李杰. 胃癌的化疗耐药性研究进展[J]. *复旦学报: 医学版*, 2002, 29(4): 323-325.
- [3] 桂贤, 刘会敏. 肿瘤多药耐药发生机制的研究进展[J]. *上海医学*, 2005, 28(2): 161-164.
- [4] Yeh KH, Chen CL, Shun CT, et al. Relatively low expression of multidrug resistance-1 (MDR-1) and its possible clinical implication in gastric cancers[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1998, 26(4): 274-278.
- [5] Fujii H, Tanigawa N, Muraoka R, et al. Clinical significance of multidrug resistance and P-glycoprotein expression in patients with gastric carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 1995, 58(1): 63-69.
- [6] Candiano G, Bruschi M, Musante L. Blue silver; a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [7] Yang YX, Xiao ZQ, Chen ZC, et al. Proteome analysis of multidrug resistance in vincristine-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR[J]. *Proteomics*, 2006, 6(6): 2009-2021.
- [8] Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, et al. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 11083-11093.
- [9] Kampinga HH, Henning RH, van Gelder IC, et al. Heat shock proteins and atrial fibrillation[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2007, 12(2): 97-100.
- [10] Wu MH, Chang JH, Chou CC, et al. Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(3): 297-305.
- [11] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(7): 493-505.
- [12] Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer[J]. *Cancer Detect Prev*, 2006, 30(6): 481-490.
- [13] Li J, Zhang X, Sejas DP, et al. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(12): 1415-1423.
- [14] Tepera SB, McCrea PD, Rosen JM. A beta-catenin survival signal is required for normal lobular development in the mammary gland[J]. *J Cell*, 2003, 116(6): 1137-1149.
- [15] Daniels DL, Spink K, Weis WI. Beta-catenin: molecular plasticity and drug design[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(11): 672-678.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-04-21)

(上接第 3193 页)

- 究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(2): 199-201.
- [2] 聂晶, 杜亮, 黄燮南, 等. 天麻素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *华西药学杂志*, 2010, 25(4): 423-425.
- [3] 杨彦玲, 朱文侠, 陈雅慧, 等. 促红细胞生成素对脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(2): 152-153.
- [4] Kumral A, Gene S, Ozer E, et al. Erythropoietin downregulates bax and DP5 pro-apoptotic gene expression in neonatal hypoxia-ischemic brain injury[J]. *Biol Neonate*, 2005, 89(3): 205-210.
- [5] 吴松笛, 耿晓英, 丁桃英, 等. 改良线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2006, 35(10): 1316-1318.
- [6] Gonzalez FF, Mc Quillen P, Mu D, et al. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke[J]. *Dev Neuro Sci*, 2007, 29(3): 321-323.
- [7] 李昌植. 栓线法制备 MCAO 模型大鼠研究进展[J]. *中国医学研究与临床*, 2007, 5(11): 59-63.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学*[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 214-234.
- [9] Panwalkar A, Verstovsek S. Nuclear factor-kappa B modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies[J]. *Cancer*, 2004, 100(8): 1578-1589.
- [10] 郭东琳, 周红. NF- κ B 在蛋白酶激活受体介导的信号通路中的作用研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(6): 453-454.

(收稿日期: 2012-03-17 修回日期: 2012-05-23)

钓鱼岛, 中国的岛!