

文章编号: 1007-4627(2008)02-0148-06

重离子辐照对人肝癌 HepG2 细胞蛋白质组图谱的影响*

吴庆丰^{1,2}, 李 强^{1, #}, 金晓东^{1, 2}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 分别制备经 1 Gy C 离子辐照和未经辐照人肝癌 HepG2 细胞的总蛋白样品, 采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术进行蛋白分离, 用 ImageMaster 2D 双向电泳凝胶图像分析软件分析数字化图谱。结果显示, 差异表达的蛋白质点为 17 个, 其中 1 个仅在未经 C 离子辐照的 HepG2 细胞中表达, 8 个蛋白质点在辐照后的细胞中表达上调, 8 个蛋白质点在辐照后的细胞中表达下调。建立了重复性较好和分辨率较高的分离 HepG2 细胞总蛋白的双向电泳技术。实验结果表明, C 离子辐照 HepG2 细胞后其蛋白质组发生了改变。

关键词: HepG2 人肝癌细胞; 重离子辐照; 蛋白质组; 双向凝胶电泳

中图分类号: Q51; Q69 **文献标识码:** A

1 引言

传统观念认为, 辐照生物学效应只在细胞核受到直接照射的细胞中产生, 但旁观者效应的研究对“辐射诱导的原发 DNA 损伤是产生各种生物效应的根本原因”提出了挑战^[1]。近 20 年来, 放射生物学研究发现, 当少数细胞受到射线靶向辐照时, 没有受到直接辐照的邻近细胞也能表现出类似于直接受到放射细胞的损伤效应。即使不相邻的细胞通过共培养转移实验, 即用受辐照细胞的培养基来培养未受照射的细胞, 未受辐照的细胞也可产生生物学效应。不仅如此, 仅通过照射细胞质就可以引起细胞核的突变^[1, 2]。旁观者效应的研究提示辐射损伤效应可能是多种因素共同作用的结果, 从整体角度研究辐照生物学效应显得非常必要。

重离子束在物理学和生物学上表现出高的传能线密度(LET)、倒转的深度剂量分布、高的相对生物学效应(RBE)、亚致死损伤修复小和治疗精确高等特点, 在肿瘤放射治疗上较传统射线具有无可比拟的优越性。随着重离子治癌研究的开展^[3], 对重离子辐照细胞生物学效应、辐射损伤和修复的分子机制以及旁观者效应的研究都具有重要的理论意义

和实际应用价值。目前, 对重离子辐照生物学效应的研究主要集中在基因(DNA)水平^[4, 5]。细胞内基因是遗传信息的载体, 蛋白质是基因表达的产物, 又是生命功能的直接执行者, 从蛋白质组(Proteome)水平研究细胞辐射损伤与修复的分子机制就更为直接, 蛋白质组学技术为从整体角度研究蛋白的变化提供了理想的平台。目前, 辐射与蛋白质组学结合的研究集中在采用低 LET 的 X 和 γ 射线的研究上^[6-8], 尚未见到利用蛋白质组技术研究重离子辐照生物学效应的报道。

蛋白质组学就是从整体角度分析研究细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间的相互作用与联系, 从而揭示生物学行为以及基因表达调控的新兴研究领域。目前, 对人类重要生命过程或人类重大疾病的蛋白质组研究通常采用比较蛋白质组学(Comparative proteomics)的研究方法^[9], 比较不同生理病理、处理前后或不同阶段的细胞中蛋白质的差异表达, 寻找相关的分子标记, 进而可以分析其发生、发展的可能机制, 为研究细胞对不同条件产生反应的分子机制提供线索。

* 收稿日期: 2007 - 08 - 27; 修改日期: 2007 - 09 - 30

* 基金项目: 中国科学院百人计划资助项目(O0506120BR0); 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA02Z499)

作者简介: 吴庆丰(1972-), 男(汉族), 甘肃文县人, 博士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: wuqf@impcas.ac.cn

通信联系人: 李 强, E-mail: Liqiang@impcas.ac.cn

本实验利用固相 pH 梯度 (immobilized pH gradients, 简称 IPGs) 双向凝胶电泳 (Two-dimensional gel electrophoresis, 简称 2-DE) 技术分离经 C 离子辐照和未经辐照人肝癌 HepG2 细胞的总蛋白, 并运用双向凝胶分析软件分析了其蛋白质表达谱的变化, 为重离子辐照癌细胞导致生物学效应的作用机理提供了有益的线索。

2 材料与方 法

2.1 主要试剂与仪器

小牛血清为兰州民海公司产品, RPMI1640 培养基为 Gibico 公司产品, 3-[3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸 (CHAPS) 和二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA) 为 Amresco 公司产品。IPGs 干胶条 (IPG strip pH3—pH10 L, 11 cm)、IPGs 缓冲液 (IPG buffer pH3—pH10)、覆盖液 (Strip Cover Fluid)、双向电泳单元和 ImageMaster 2D Elite 5.0 双向凝胶分析软件均为 GE Healthcare Bio-Sciences 公司产品。

2.2 细胞培养与 C 离子照射

人肝癌 HepG2 细胞系由中国科学院近代物理研究所医学物理实验室提供。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基进行传代培养。取对数生长期的 HepG2 细胞, 接种在 $\phi 35$ mm 培养皿中继续培养 24 h 后进行照射。重离子照射是在兰州重离子研究装置 (HIRFL) 的浅层肿瘤治疗终端上进行的, 本次实验采用的重离子束为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 能量为 68 MeV/u, 吸收剂量率约为 3—4 Gy/min, C 离子束在细胞样品处的 LET 为 35 keV/ μm , 细胞样品照射时的吸收剂量为 1 Gy, 所有细胞样品辐照均在室温下进行。辐照后, 继续培养细胞 36 h。

2.3 双向电泳及图像分析

2.3.1 总蛋白样品的制备

待细胞生长状况良好接近汇合时, 用细胞刮子刮取细胞, 预冷生理盐水洗涤 3 次, 加入细胞裂解液 (8 mol/l 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/l Tris-base, 2% IPG 缓冲液 pH3—pH10, 65 mmol/l DTT), 静置 30 min, 液氮反复冻融 3 次, 离心 (15 000 rpm, 60 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取少量上清用 Bradford 法测定总蛋白浓度, 其余上清分装冻存于 -80

$^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.3.2 第一向等电聚焦

等电聚焦 (isoelectric focusing, 简称 IEF) 主要按 Görg 等^[10]的方法和 GE Healthcare Bio-Sciences 公司双向电泳操作指南进行, 将 50 μg 细胞总蛋白加入重水化液 (8 mol/l, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH3—pH10, 18 mM DTT 0.002% 溴酚蓝) 至终体积 200 μl 。将蛋白与水化液充分混合后加入 IPGphor 水平电泳仪的持胶槽 (strip holder) 中, IPG 胶条胶面朝下放入持胶槽中, 均匀加上覆盖液, 编制 IPGphor IEF 程序进行重水化和 IEF 电泳, 重水化和聚焦参数: 水化 30 V, 12 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 2 h, 当总电压时间积达到 40 000 Vh 时停止 IEF。

2.3.3 平衡

IEF 结束后, 将聚焦好的胶条取出放入加有 DTT 的平衡液 I (50 mmol/l Tris-HCL pH8.8, 6 mmol/l 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝), 摇床上振荡 15 min, 弃去平衡液 I, 加入含有 IAA 的平衡液 II (50 mmol/l Tris-HCL pH8.8, 6 mmol/l 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 进行第二步平衡, 平衡 15 min。

2.3.4 第二向垂直 SDS-PAGE 垂直板电泳

将已平衡好的 IPG 胶条放置于 12.5% 的 1.5 mm 厚的凝胶顶端, 排除气泡, 加入分子质量标准蛋白, 用封胶琼脂糖封固胶条后电泳, 先以 10 mA 电泳 30 min, 使蛋白质从 IPG 胶条中泳出, 然后 30 mA 电泳 5 h 左右, 至溴酚蓝前沿到达胶板底部 1 cm 时停止电泳。

2.3.5 染色

采用胶体考马斯亮蓝染色法染色 (colloidal Coomassie G-250 staining)^[11]。胶板取下后立即置于固定液中固定 30 min 并用去离子水漂洗 4 次, 然后染色 2 h, 最后用去离子水脱色。

2.3.6 凝胶图像获取和图像分析

使用 LabScan 控制的 ImageScanner 以透射模式扫描凝胶图像, 亮度和对比度按默认设置, 分辨率为 300 dpi (dot per inch), 扫描图像与凝胶大小比例为 1:1。扫描后凝胶置凝胶保存液中保存。数字化的凝胶图像利用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 分析软件对图像进行强度校正、背景消减和点

检测，蛋白点匹配前选取蛋白点数多的一块凝胶建立参考胶。在进行蛋白质点表达变化时，蛋白点的量被定义为构成这个点的所有象素强度值的总和。为了准确地反映蛋白点量的变化将每个点的含量表示为体积百分含量，即一个蛋白点的量占该胶内所有蛋白点总量的百分数，也称相对含量。蛋白点分子量和等电点采用二维校正法(2D calibration)。

3 结果

经 C 离子辐照和未辐照(即对照)HepG2 细胞的双向电泳图谱如图 1 所示，两种情况下的图谱非

常相似。用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析，经过凝胶强度调节、背景消减后进行蛋白质点检测，每块胶约有 500 个以上的点被检测出来，但未辐照细胞蛋白的电泳图谱中蛋白质点较多，辐照后细胞的蛋白质点数有所减少，HepG2 细胞总蛋白的等电点在 pH3—pH10 都有分布，但主要集中在 pH4—pH8 之间，在酸性端 pH3—pH4 和碱性端 pH8—pH10 范围内只检测到少数蛋白质点。HepG2 细胞总蛋白的表观分子量主要分布在 14—168 kDa 之间，HepG2 蛋白 2-DE 图谱和其它文献报道相似^[12]，蛋白质种类还需进一步质谱鉴定。

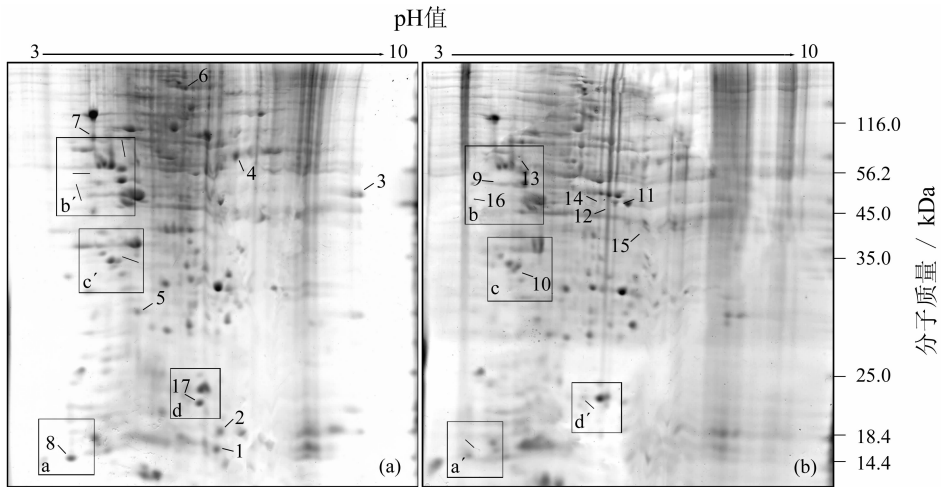


图 1 未受 C 离子辐照和受 C 离子辐照后 HepG2 细胞总蛋白的 2-DE 图谱

(a) 未受辐照 HepG2 细胞总蛋白的 2-DE 图谱，图谱中数字标记的点是辐照后表达下调的蛋白点，其中 17 为辐照后消失的蛋白点；(b) 受辐照后 HepG2 细胞总蛋白的 2-DE 图谱，图谱中数字标记的点表示辐照后表达上调的蛋白点。由方框围住的区域在图 2 中放大展示。

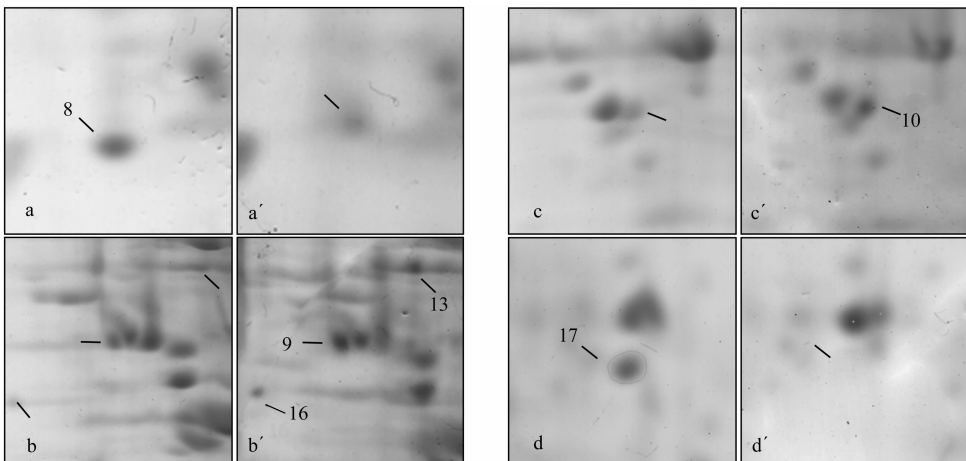


图 2 辐照后发生改变的部分蛋白质点放大图
a, a', b, b', c, c' 和 d, d' 分别对应于图 1 中框示区域。

本实验的基本目的是获得差异表达的蛋白质点，为了准确定量分析蛋白质组的改变，分析时进

行了 3 步操作: (1) 将未受辐照的 2-DE 图谱设置为参考胶, 其相对含量为 100%; (2) 对辐照前后的 2-DE 的胶中的蛋白质点进行全面的比较和匹配; (3) 蛋白点相对含量有 2 倍以上变化的蛋白质点定义为有意义的点。软件检测后经过蛋白质点自动匹配和手工确认, 通过 ImageMaster 软件搜索和数据统计分析, 发现差异表达的蛋白质点有 17 个, 这些差异蛋白质点有的是量(蛋白质点染色强度)的改

变, 有的是质(蛋白质点的增减)的改变。其中有 16 个点有 2 倍以上的表达量改变, 表达下调的蛋白质点有 8 个, 表达上调的点有 8 个。有 1 个点只在未辐照的 HepG2 细胞中检测到表达, 而在辐照后的细胞中未检测到。其中部分蛋白质点的放大图谱见图 2, 这些蛋白质点的等电点、分子量和相对含量见表 1 和表 2。

表 1 C 离子辐照后 HepG2 细胞中表达下调的蛋白点

编号	蛋白点索引号	等电点	分子量/kDa	相对含量(%)	
				未经辐照	经过辐照
1	1 642	5.997 25	15	0.502 853	0.011 076
2	1 633	6.055 1	17	0.623 081	0.023 286 2
3	1 508	8.129 48	50	0.483 361	0.025 021 5
4	1 433	6.286 5	66	1.062 5	0.071 006
5	1 604	4.823 69	29	0.180 673	0.020 396 4
6	1 186	5.542 7	165	0.294 328	0.064 503 2
7	1 383	4.176 31	85	0.472 178	0.175 261
8	1 645	3.845 73	14	0.920 205	0.381 701

表 2 C 离子辐照后 HepG2 细胞中表达上调和消失的蛋白点

编号	蛋白点索引号	等电点	分子量/kDa	相对含量(%)	
				未经辐照	经过辐照
9	1 488	3.809 92	54	0.006 663 58	0.157 576
10	1 581	4.550 96	34	0.185 86	0.507 242
11	1 512	5.994 49	49	0.223 291	0.709 714
12	1 497	5.848 48	52	0.164 671	0.569 898
13	1 389	4.542 7	85	0.081 151 4	0.391 626
14	1 496	5.584 02	52	0.041 020 8	0.299 942
15	1 540	6.289 26	44	0.043 707 7	0.357 917
16	1 448	4.256 2	62	0.658 878	1.367 98
17	1 620	5.749 31	20	0.662 041	0

4 讨论

电离辐射导致细胞损伤, 可以诱导细胞基因表达水平的改变, 某些基因受到损伤不表达或表达下调, 某些基因为抵抗辐射和修复损伤而激活表达或表达上调, 这些变化形成复杂的网络以应对电离辐射对细胞造成的损伤。由于存在 mRNA 出核、mRNA 定位、转录产物稳定性、翻译调节、蛋白质修饰和蛋白质降解等后加工调节机制, mRNA 水平

与蛋白质水平并没有很好的相关性。蛋白质是基因表达的产物又是生命功能的直接执行者, 从蛋白质组水平研究基因表达调控和辐射损伤生物学效应的分子机制显得更加直接。因此采用双向电泳技术分离经重离子辐照和未经辐照 HepG2 细胞的蛋白质, 从整体水平上定量分析了重离子辐照后细胞内蛋白质组表达的变化。细胞经重离子辐照后其蛋白质双向电泳图谱发生变化, 差异表达的蛋白质点与辐照后细胞的生化过程密切相关, 是放射损伤和修复的

主要蛋白质分子基础。

双向电泳涉及样品制备、等电聚焦、平衡、转移、SDS 电泳、染色和图象扫描分析多项环节，诸多环节中的系统误差和认为误差都会影响实验的重复性。为了获得重复性好和易于进行蛋白鉴定的差异表达蛋白，实验中除保证各实验步骤平行外，使用了新的胶体考马斯亮蓝染色方法。凝胶染色通常采用银染和考马斯亮蓝染色法，银染灵敏度高，达到 pg 级，但银染显色程度不易控制使重复性降低，同时银染与质谱鉴定的兼容性很差。考马斯亮蓝染色重复性好，与质谱兼容性好，但灵敏度较低，为 100 ng，而胶体考马斯亮蓝染色法即具有较高(2 ng)的灵敏度，具有与考马斯亮蓝染色法同样好的质谱兼容性，所以被称为绿色银染(blue silver)^[11]。蛋白质组学需要大规模处理数据的图像软件，虽然 ImageMaster 是一款全自动点检测、点匹配和数据分析的软件，但由于双向电泳图谱复杂，成对的凝胶都存在成百上千的蛋白点，软件可能将一些染色颗粒或气泡识别为蛋白点^[13]，因此在软件自动检测和匹配后，我们还是经过人工逐一确认和编辑，保证了点检测和匹配及数据分析可靠性。

通过对经 1 Gy C 离子辐照和未辐照人肝癌 HepG2 细胞蛋白质组数字化图谱的比较分析，发现有 17 个蛋白点发生了 2 倍以上的表达变化，这些差异表达的蛋白质非常有助于分析癌细胞响应重离子辐照的分子机制、评价重离子辐照杀伤癌细胞效果和损伤修复机制。实验中，使用了 pH3—pH10, 13 cm 的 IPG 胶条，HepG2 细胞蛋白双向电泳图谱表明其蛋白质主要集中在 pH4—pH8 之间，为了进一步探讨与重离子辐照相关的响应蛋白质，今后将使用 pH 范围更窄、长度更长的 IPG 胶条增加蛋白质分离的分辨率以发现更多低丰度表达的蛋白质，并结合生物质谱肽质量指纹图谱和氨基酸序列分析等手段对差异表达蛋白质进行鉴定，了解这些差异表达蛋白质在细胞响应重离子辐照中的

作用，进而开展重离子辐照损伤与修复、辐射诱导旁观者效应等方面的研究，为重离子治癌研究提供必要的基础数据。

参考文献 (References):

- [1] Wang Jufang, Li Wenjian. Nuclear Physics Review, 2004, **21**(1): 48(in Chinese).
(王菊芳, 李文建. 原子核物理评论, 2004, **21**(1): 48.)
- [2] Wang Zhongtang, Tang Xianmin, Li Baosheng. Journal of International Oncology, 2006, **33**(5): 344(in Chinese).
(王中堂, 唐宪民, 李宝生. 国际肿瘤学杂志, 2006, **33**(5): 344.)
- [3] Li Qiang. Advances in Space Research, 2007, **40**(4): 455.
- [4] Zhou Guangming, Li Wenjian, Feng Yan, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2003, **12**(5): 337(in Chinese).
(周光明, 李文建, 冯岩等. 激光生物学报, 2003, **12**(5): 337.)
- [5] Tu Zhenli, Shi Meixing. Journal of Microbiology, 2006, **26**(6): 19(in Chinese).
(屠振力, 施美星. 微生物杂志, 2006, **26**(6): 19.)
- [6] Rithidech Kanokporn Noy, Honikel Louise, Simon Sanford R. Experimental Hematology, 2007, **35**: 117.
- [7] Ma Zengchun, Tan Hongling, Xiao Chengrong. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, **30**(2): 397.
- [8] Tapioa Soile, Danescu-Mayera Joana, Asmussa Monika, *et al.* Mutation Research, 2005, **581**: 141.
- [9] Zhao Liang, Ding Yanqing. Journal of International Oncology, 2006, **33**(3): 164(in Chinese).
(赵亮, 丁彦青. 国际肿瘤学杂志, 2006, **33**(3): 164.)
- [10] Görg Angelika, Weiss Walter, Dunn Michael J. Proteomics, 2005, **5**(3): 826.
- [11] Candiano Giovanni, Bruschi Maurizio, Musante Luca, *et al.* Electrophoresis, 2004, **25**(9): 1 327.
- [12] Zhang Yan, Fan Xuegong, Chen Ren, *et al.* World Journal of Gastroenterology, 2005, **11**(22): 3 485.
- [13] Zhao Caifeng, Wang Jingqiang, Cao Mengliang, *et al.* Proteomics, 2005, **5**(4): 961.

Influence of Heavy Ion Irradiation on Proteome Profile of Human Hepatoma HepG2 Cells^{*}

WU Qing-feng^{1, 2}, LI Qiang^{1, #}, JIN Xiao-dong^{1, 2}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: To gain a better understanding of the molecular basis of the biological effects induced by heavy ion irradiation, total proteins extracted from human hepatoma HepG2 cells that un-irradiated and irradiated with an intermediate-energy carbon ion beam at 1 Gy were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) with immobilized pH gradients (IPGs). The 2-DE profiles were analyzed with the ImageMaster 2D software. More than 500 proteins spots were reproducibly detected on each gel and 17 were differentially expressed for the un-irradiated and irradiated cells. 1 protein was expressed only in the un-irradiated cells. 8 proteins were down-regulated and 8 proteins were up-regulated after the carbon ion irradiation. In this study, reproducible 2-DE profiles were established and some differential expressed proteins were detected. These basic data are very useful for the further study of heavy-ion biological effect.

Key words: HepG2 cell; heavy ion irradiation; proteome; two-dimensional gel electrophoresis

* **Received date:** 27 Aug. 2007; **Revised date:** 30 Sep. 2007

* **Foundation item:** Century Program of Chinese Academy of Sciences (O0506120BR0); National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (2006AA02Z499)

Corresponding author: Li Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn