

# 采用蛋白质组学技术鉴定肝癌细胞株 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞的 hnRNPA2/B1 蛋白

白瑞霞<sup>1</sup>, 赵鹏伟<sup>2</sup>, 韩晓芳<sup>1</sup>, 谭艳<sup>1</sup>

(1. 内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特 010017;

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059)

**摘要:** [目的] 采用蛋白质组学技术鉴定肝癌细胞株 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞内的不均一性核糖核蛋白 A2/B1(hnRNPA2/B1)蛋白。[方法] 提取肝癌细胞株 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞的蛋白质, 采用双向电泳方法分离蛋白质, 应用图像扫描仪及质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析鉴定 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞表达的蛋白质。[结果] 采用双向电泳技术分离, 并用质谱成功鉴定出 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞的 hnRNPA2/B1。[结论] 肝癌细胞株 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞内的 hnRNPA2/B1 蛋白的成功鉴定, 为探讨其在肝癌细胞生长和增殖中的作用奠定了基础, 并为临床上肿瘤的治疗提供参考依据。

**关键词:** 肝肿瘤; HepG2; 蛋白质组学; hnRNPA2/B1 蛋白

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)07-0505-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B001

## Identification of hnRNPA2/B1 Protein in G<sub>1</sub> Phase from HepG2 Using Proteomics Technique

BAI Rui-xia<sup>1</sup>, ZHAO Peng-wei<sup>2</sup>, HAN Xiao-fang<sup>1</sup>, et al.

(1. Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China; 2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

**Abstract:** [Purpose] To identify hnRNPA2/B1 protein in G<sub>1</sub> phase from HepG2 by the proteomics methods. [Methods] G<sub>1</sub> phase Proteins of HepG2 cells were extracted and separated by two-dimensional electrophoresis, and the hnRNPA2/B1 proteins were identified by image scanner and MALDI-TOF-MS. [Results] HnRNPA2/B1 protein in G<sub>1</sub> phase from HepG2 was successfully separated and identified. [Conclusion] The hnRNPA2/B1 protein in G<sub>1</sub> phase from HepG2 is identified successfully. It can provide the basis of the treatment for tumor.

**Subject words:** liver neoplasms; HepG2; proteomics; hnRNPA2/B1 protein

不均一性核糖核蛋白 A2/B1(hnRNPA2/B1)是一种 RNA 结合蛋白, 调控 mRNA 前体的加工、剪接、成熟。hnRNPA2/B1 的过表达可能与细胞增生、肿瘤生成有关<sup>[1,2]</sup>。其可作为癌症早期诊断的分子标志物。本研究采用蛋白质组学技术检测肝癌细胞株 HepG2 的 G<sub>1</sub> 期细胞中的 hnRNPA2/B1 蛋白, 将有助于探讨 hnRNPA2/B1 在肝癌中的作用, 进一步深入了解肝癌与细胞周期失调之间的联系, 为研究肿瘤发病机制提供线索和依据。

**通讯作者:** 赵鹏伟, 讲师, 博士; 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古呼和浩特市新华大街 5 号 (010059); E-mail: pengwzhao@126.com。

**收稿日期:** 2013-01-07; **修回日期:** 2013-03-25

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2: 由解放军 304 医院提供; 蛋白质分子量标准: 14~97kD 购自 Amresco 公司; IPG 胶条 pH3~10 (13cm): 购自 GE Healthcare Bio-Sciences 公司; 其他常规试剂均购自 GE Healthcare Bio-Sciences 公司和 Sigma 公司。

### 1.2 主要仪器

双向电泳系统购自 GE Healthcare Bio-Sciences; 高速冷冻离心机购自 Sigma 公司; 超声波细胞粉碎仪 (JY96-II) 购自宁波科生仪器厂; 流式细胞仪

(FACScalibur) 购自美国 BD 公司。

1.3 细胞同步化

取对数生长期的 HepG2 细胞,加入含终浓度为 2.5mmol/L 的 TdR 培养 24h 后,细胞被阻断在 G<sub>1</sub> 期末,收集细胞,用 PBS 洗 2 次,按实验设计分装于不同培养瓶加入完全培养基进行培养,此时记为 0 时刻,于 24h 收集细胞。流式细胞术分析细胞周期。

1.4 样品制备

收集 1×10<sup>7</sup> 个样品细胞,用 PBS 洗细胞 3 次,加入裂解液,4℃ 20 000r/min 离心 20min。吸取上清即为细胞总蛋白。改良的 Bradford 法测蛋白浓度。

1.5 双向电泳(2-DE)

每根胶条上样量为 650μg,加入 IPG 胶槽中,移入 IPG 胶条。放入 IPGphor 仪器。一向等电聚焦结束后,胶条分别在含 1%DTT 和 4%碘乙酰胺的平衡液(50mmol/L Tris-HCl pH6.8、6mmol/L 尿素、30%甘油、2% SDS 和痕量溴酚蓝)中平衡 15min。垂直电泳在 Ettan DALT II 电泳槽中运行,电泳设置恒温 25℃,恒电流 15mA/gel 先运行 15min,后 20mA/gel,当运行溴酚蓝达到胶条的底线 1cm 时停止电泳。跑好的胶转到染色盒里固定 30min,摇床摇。考马斯亮蓝 G-250 染色液染色过夜,摇床摇。脱色液脱色至背景无色。

1.6 图形获取与分析

Imagine scanner 进行图像扫描,利用 Imagine master 软件对扫描得到的图像进行分析。

1.7 质谱与数据库查询

质谱鉴定在中国科学院北京基因组研究所完成。

1.8 统计学处理

流式细胞仪检测结果均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用

SPSS10.0 统计软件处理,采用 ANOVA 分析数据。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式细胞术检测结果

结果证实 24h 得到同步化的 G<sub>1</sub> 期细胞为 (75.24±0.17)%,12h 得到同步化的 G<sub>2</sub>/M 期细胞为 (63.62±2.82)%,与对照组相比均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )(Table 1, Figure 1)。

Table 1 The effect of TdR on cell cycle phase of synchronized hepatocarcinoma HepG2 cell( $\bar{x} \pm s$ , %)

|         | G <sub>1</sub> phase | G <sub>2</sub> /M phase |
|---------|----------------------|-------------------------|
| Control | 69.11±1.02           | 16.23±0.79              |
| 12h     | 19.20±1.50           | 63.62±2.82*             |
| 24h     | 75.24±0.17*          | 0.95±0.64               |

\*:compared with control,  $P < 0.05$ .

2.2 双向电泳(2-DE)结果图谱

经 GE 公司的 Imagine master 软件分析 3 张重复图谱后,G<sub>1</sub> 期共有可重复性的稳定点 335 个(Figure 2)。

2.3 鉴定G<sub>1</sub>期表达的蛋白质

用基质辅助激光解析电离—飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)分别对 2-DE 胶上选定的蛋白点进行肽指纹图谱分析。

在 G<sub>1</sub> 期稳定表达的 335 个点中,经 Mascot 搜索引擎(<http://www.matrixscience.com>)上进行数据解析,使用的数据库为 NCBI 蛋白质数据库。搜索物种(species search)为人。有 9 个点在 G<sub>1</sub> 期表达显著上调(Table 2)。

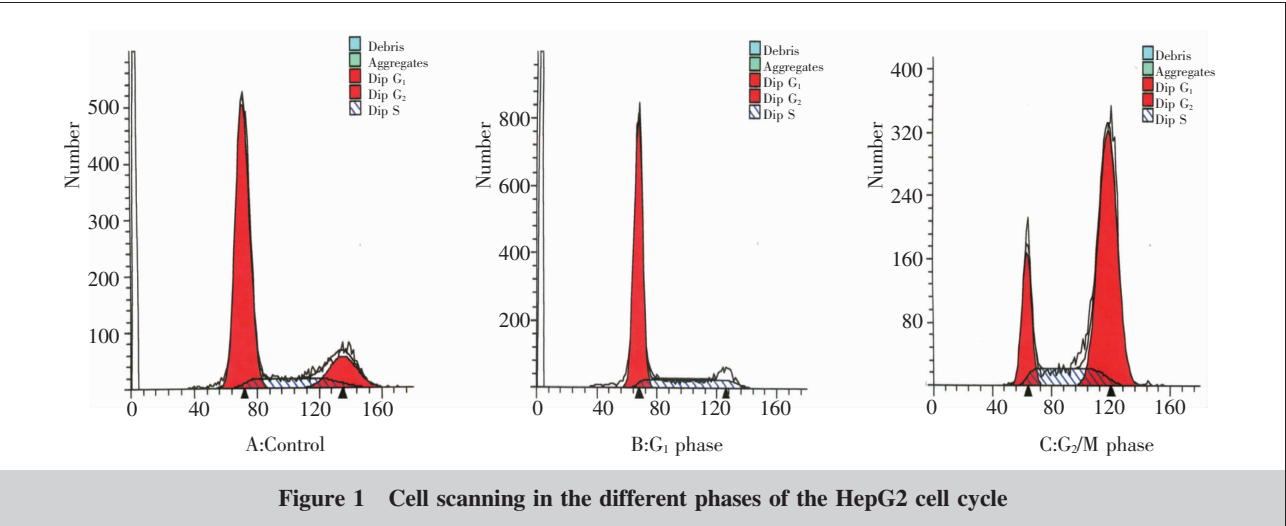


Figure 1 Cell scanning in the different phases of the HepG2 cell cycle

鉴定得到蛋白的相关信息,其中 97 号点 (Figure 3) 在 G<sub>1</sub> 期表达显著上调,蛋白序号 gil14043072,等电点 8.97,分子量 37.464×10<sup>3</sup>D,蛋白名称 hnRNP A2/B1。

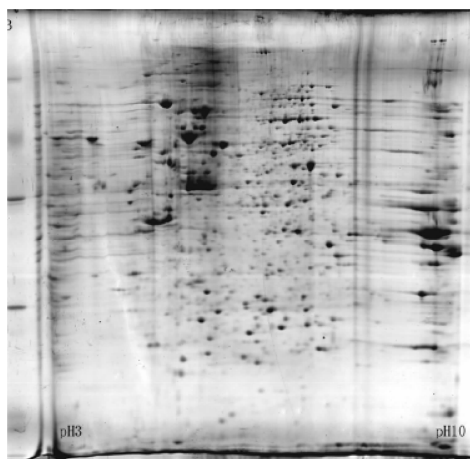


Figure 2 The 2-DE PAGE maps of G<sub>1</sub> phase

### 3 讨论

细胞和分子生物学研究已表明,肿瘤发生是一个多阶段的过程,可分为启动、促进、发展三个阶段<sup>[3]</sup>。启动和促进阶段细胞内部发生早期的基因改变,如果进行有效的干预是可逆转的;若未能被阻止,则进入发展阶段,肿瘤细胞进一步恶性化。肝癌是世界上流行最广的恶性肿瘤之一。但目前对其发病机制仍不明确,需寻找有效的肿瘤标志物用于高危人群的筛查、疾病的早期诊断、药物靶标的设计及癌变机理的研究<sup>[4,5]</sup>。最先是从基因水平进行研究,但随着人类基因组测序计划的完成,人们认识到仅仅通过 DNA 序列来解释生物功能是不可能的,要了解基因的全部信息,就必须深入研究基因表达的最终产物——蛋白质。于是对肝癌的研究进入了蛋白质组学阶段。

蛋白质组学直接以细胞内生理功能的执行者蛋白质为切入点,在整体水平上研究其组成与调控的

Table 2 Up-regulated significantly in G<sub>1</sub> phase

| Spot | Accession    | Score | pI   | Mr(×10 <sup>3</sup> ) | Coverage | Protein name                                                          |
|------|--------------|-------|------|-----------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------|
| 33   | gil73949729  | 117   | 4.38 | 10.662                | 93%      | similar to basic transcription factor 3 isoform 3 [Canis familiaris]  |
| 45   | gil73949729  | 83    | 4.38 | 10.662                | 89%      | similar to basic transcription factor 3 isoform 3 [Canis familiaris]  |
| 97   | gil14043072  | 164   | 8.97 | 37.464                | 62%      | hnRNP A2/B1 isoform B1                                                |
| 138  | gil113428470 | 68    | 9.04 | 72.790                | 29%      | similar to Zinc finger protein ZFP-36                                 |
| 167  | gil16878077  | 301   | 6.85 | 68.790                | 41%      | FUBP1 protein                                                         |
| 172  | gil61656607  | 141   | 4.77 | 92.567                | 27%      | tumor rejection antigen (gp96) 1                                      |
| 175  | gil3891601   | 146   | 8.46 | 15.041                | 62%      | chain A ,human platelet profiling complexed with the L-Pro 10 peptide |
| 187  | gil38679884  | 110   | 5.11 | 20.617                | 47%      | sorcin isoform b                                                      |
| 281  | gil7669492   | 142   | 8.57 | 36.201                | 61%      | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                              |

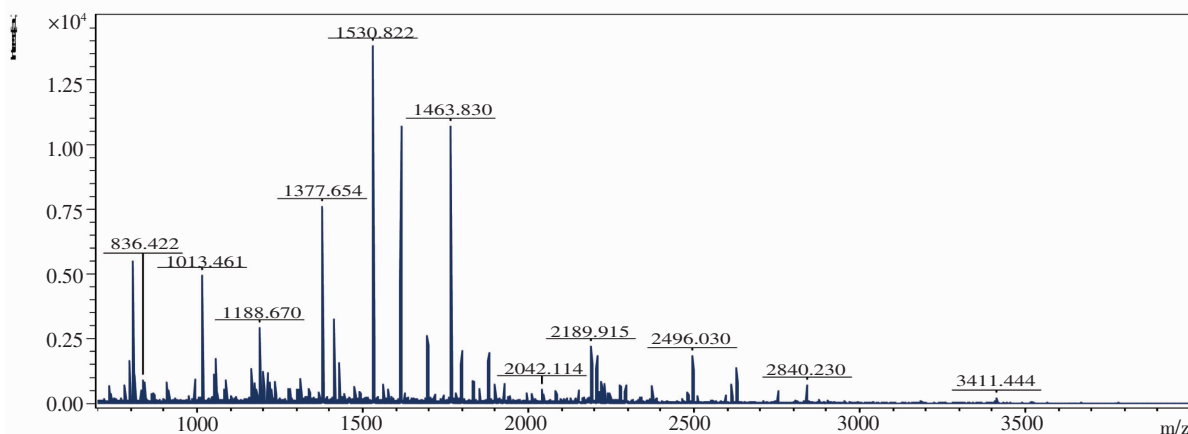


Figure 3 The MS/MS of 97

活动规律。它的主要技术是利用双向电泳分离蛋白,利用质谱等技术对它们进行鉴定,寻找在各种生理病理过程中的关键蛋白质,目前已成为生命科学中的研究热点<sup>[6,7]</sup>。

真核细胞中,一段基因要表达其编码的蛋白质,需首先转录合成 mRNA 前体,即不均一性 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA),经过加工剪接,才能成为成熟的 mRNA。这个过程在核内完成。mRNA 的加工是由特异性 RNA 结合蛋白调控的。hnRNP 即为一种核内的 RNA 结合蛋白。包括 hnRNP A、hnRNP B 和 hnRNP C 等,负责基因表达的转录后调控<sup>[8]</sup>。HnRNP A2/B1 是整个家族中的核心成员,参与一系列重要的细胞功能,如 mRNA 的剪接、mRNA 稳定性的调控、核胞质转运、调节正常细胞 mRNA 转录、转录后调控以及 DNA 复制与重组。它的异常表达可使转录翻译过程失去正常调控,导致癌的发生<sup>[9]</sup>。

近几年,许多研究发现 hnRNP A2/B1 不仅在肺癌组织中高表达,在乳腺癌、胰腺癌<sup>[9]</sup>、食道癌中也过表达。由此,对于 hnRNP A2/B1 蛋白及其家族在肿瘤发生中的作用开展了多方面的研究。有报道 hnRNP A2/B1 与端粒单链 DNA (single strand DNA, ssDNA) 相连,调节端粒的长度,参与端粒形成与稳定,保护端粒免受核酶降解,并激活端粒酶的活性<sup>[10]</sup>。另外, hnRNP 还可调控细胞周期。这些功能特性提示 hnRNP 在细胞增生和肿瘤形成中起到非常重要的作用。

蛋白质组学技术的发展为诊断早期肝癌提供了强有力的手段。hnRNP A2/B1 作为新的分子标志物有较高的预测价值。今后的研究重点是继续探讨 hnRNP A2/B1 及其家族在肿瘤发生发展中的作用机制,研究其在临床中的应用价值,提高肿瘤早期诊断的水平。因此,探讨 hnRNP A2/B1 与肝癌的关系及能否作为肝癌早期诊断的标志物具有重要意义。

## 参考文献:

[1] Lu SS, Pan QJ, Zhao LL, et al. Expression of EGFR, survivin and hnRNP A2/B1 in bronchial brushing cytology specimens and their significance in diagnosis of lung cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33(8): 621-625. [卢珊珊, 潘秦镜, 赵琳琳, 等. 表皮生长因子受体 survivin

和异质性细胞核糖核蛋白 A2/B1 在肺癌纤维支气管镜刷片细胞学诊断中的价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(8): 621-625.]

- [2] Wang X, Peng XD, Li G, et al. Cloning, ligation and expression of the variable region genes of the monoclonal antibody against human HnRNP A2/B1[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2004, 21(6): 548-551. [王霞, 彭晓东, 黎光, 等. 抗人核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 抗体可变区基因克隆、串联和表达[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(6): 548-551.]
- [3] Yang JJ, Cho LY, Ko KP, et al. Interaction effects between genes involved in the AKT signaling pathway and phytoestrogens in gastric carcinogenesis: a nested case-control study from the Korean Multi-Center Cancer Cohort[J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(11): 1617-1626.
- [4] Dong YD, Cui L, Peng CH, et al. Expression and clinical significance of HMGB1 in human liver cancer: knockdown inhibits tumor growth and metastasis in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 87-94.
- [5] Min L, Ji Y, Bakiri L, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(11): 1203-1211.
- [6] Gao S, Liu T, Li Y, et al. Understanding resistant germplasm-induced virulence variation through analysis of proteomics and suppression subtractive hybridization in a maize pathogen *Curvularia lunata* [J]. Proteomics, 2012, 12(23-24): 3524-3535.
- [7] Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 12(1): 1113-1116.
- [8] Majumder M, Yaman I, Gaccioli F, et al. The hnRNA-binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(10): 2899-2912.
- [9] Katsimpoula S, Patrinoou-Georgoula M, Makrilia N, et al. Overexpression of hnRNP A2/B1 in bronchoscopic specimens: a potential early detection marker in lung cancer[J]. Anticancer Res, 2009, 29(4): 1373-1382.
- [10] Foradori CD, Lund TD, Nagahara AH, et al. Corticotropin-releasing hormone heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) and immunoreactivity are induced in extrahypothalamic brain sites by kainic-acid-induced seizures and are modulated by estrogen[J]. Brain Res, 2007, 1164: 44-54.