运用定量磷酸化蛋白质组学解析化疗药物处理后HCT116细胞中关键磷酸化信号通路

Todd Mullis[1]*, Andrew Lee[2], Rebekah Woolsey[3], David Quilici[3], Qian Wang[1]

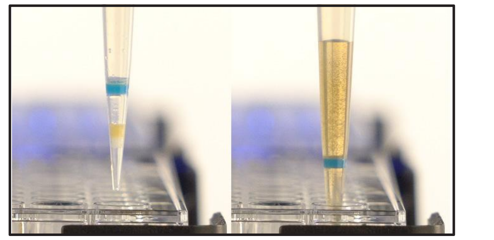
[1]University of South Carolina, Department of Chemistry and Biochemistry, Columbia, SC; [2]Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc, Irmo, SC

[3]Mitch Hitchcock, Ph.D. Nevada Proteomics Center, 1664 N Virginia Street MS 0330, Reno, NV 89557

简介

我们此前开发了一种基于自动化液体处理系统和 IMCStips® 的自动化磷酸化肽段富集方法。运用该方法，我们从未经预分级的细胞消化液中鉴定出近10,000 个磷酸化肽段。本研究将该自动化方法应用于探究胸苷酸合成酶抑制剂5-氟尿嘧啶（5-FU）对结直肠癌（CRC）常用细胞系 HCT116 的作用机制。作为临床一线广谱抗癌药物，5-FU 的先天性/获得性耐药问题已被广泛报道[1,2]。

当前亟需发现两类关键靶点：一是提升药物疗效的新作用靶点，二是可预测患者药物敏感性的预后标志物。本研究通过自动化样本制备结合比较磷酸化蛋白质组学分析，首次系统解析了 5-FU 处理的 HCT116 细胞差异磷酸化事件。研究成果不仅能绘制关键信号转导通路图谱，更能监测与耐药性相关的细胞事件，为新型靶点发现和临床疗效预测提供理论依据。



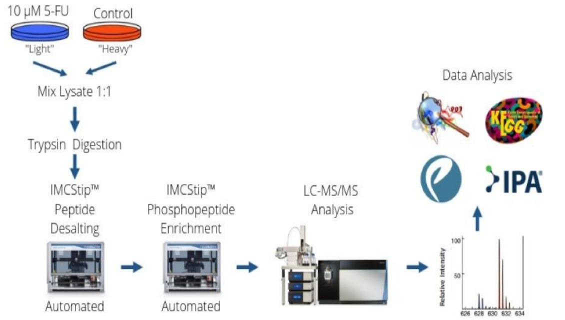
材料和方法

HCT116细胞培养于含15 mM HEPES和10%胎牛血清的Gibco™ DMEM/F-12培养基中。新鲜复苏的细胞在汇合度达80-90%时，采用胰蛋白酶/EDTA消化传代。完成五次传代后，分别用不同浓度5-FU处理48小时，并通过Promega™ CellTiter-Blue™细胞活力检测法评估细胞活性。
实验采用细胞培养稳定同位素标记技术（SILAC）对HCT116细胞进行同位素标记：细胞培养于含10%透析胎牛血清的Thermo Scientific™ DMEM:F-12培养基中，质谱检测证实重标氨基酸（^{13}C L-Lysine and ^{13}C ^{15}N L-Arginine）掺入率>95%。完成标记后，"轻标"细胞组用10 μM 5-FU处理，"重标"细胞组用0.05% DMSO处理48小时。
细胞裂解采用含蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液。通过BCA法测定蛋白浓度后，按1:1比例混合两组蛋白裂解液。蛋白样品先后经10 mM TCEP（56℃还原30分钟）和 25 mM 碘乙酰胺（室温避光烷基化30分钟）处理，随后以1:50（酶:蛋白）比例加入胰蛋白酶，37℃消化过夜。
自动化样本处理采用 Hamilton Robotics公司的Microlab® STAR™系统：磷酸化肽段富集前，先使用 5 mg RP 树脂 300 μL IMCStips® 脱盐，再分别采用10 mg PolyTi 或 5 mg ZrO_2 300 μL IMCStips®进行富集。

- Mass spectrometer..................Orbitrap Fusion, Thermo Scientific
- Liquid chromatography..........Ultimate 3000 RSLCnano, Thermo Scientific
- Mobile phase B........................0.1% formic acid in acetonitrile
- LC gradient............................2% - 90% B for 180 min
- Analytical column.................40-cm in-house packed column with 1.8 μm Sepax GP-C18 (120Å, Sepax Technologies, Newark, DE).
- Column oven temperature...50°C

在全局磷酸化肽段鉴定方面，我们采用Orbitrap Fusion质谱仪联用UltiMate 3000 RSLCnano系统进行分析。质谱采集设置为数据依赖性模式（Top Speed），动态排除时间60秒，质量容差10 ppm。使用Proteome Discoverer v2.2（Thermo Scientific）中的Sequest HT算法，结合人类UniProt蛋白质FASTA数据库（2017年3月版，20,119条序列）进行数据检索，具体参数如下：

- 仪器类型：FT-trap
- 母离子质量容差：10 ppm
- 碎片离子质量容差：0.6 Da（单同位素）
- 可变修饰：甲硫氨酸氧化（+15.995 Da）、丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸磷酸化（+79.966 Da）
- 固定修饰：半胱氨酸氨基甲酰甲基化（+57.021 Da）



方案1. 基于SILAC技术的5-FU处理HCT116细胞的蛋白质组学与磷酸化蛋白质组学分析实验流程。该工作流程整合了自动化脱盐与磷酸化肽段富集步骤，可显著减少样本制备所需的人工操作时间。

在SILAC定量分析中，以重标细胞组作为对照。最终数据通过Ingenuity Pathway Analysis软件进行通路分析，样本制备与分析全流程示意图见方案1。

结果

我们通过测定48小时处理的半数生长抑制浓度（GI50），建立了HCT116细胞5-FU处理的内部实验体系。采用1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100、200、400及800 μM梯度浓度的5-FU处理HCT116细胞48小时后，通过CTB法检测各浓度组的相对细胞活性（表1）。基于CTB检测数据点构建Monod方程计算GI50值（图1），确定本实验所用HCT116细胞系的GI50为42 μM。既往研究报道该细胞系对5-FU的GI50范围为0.5-77 μM[3,4]，本研究最终选择理论生长抑制率为35%的10 μM 5-FU作为处理浓度，并应用于后续基于SILAC的定量磷酸化蛋白质组学分析。

$$RFU_{[5\text{-}FU]} = RFUo \times \frac{\quad}{[5\text{-}FU]}$$

Table 1

[5-FU], μM	590 nm, RFU	Percent Inhibition, %
0	3470.7	0%
1.5625	3379.3	3%
3.125	2689.8	22%
6.25	2488.2	28%
12.5	2012.6	42%
25	1660.7	52%
50	1586.9	54%
100	1434.2	59%
200	1469.0	58%
400	1491.6	57%
800	885.9	74%

HCT116 细胞经指定浓度 5-FU 处理 48 小时后的相对生长抑制率（基于 CTB 法检测结果计算）。以 0 μM 5-FU处理组为对照（设定为 0% 抑制基准），计算各浓度组的抑制百分比。

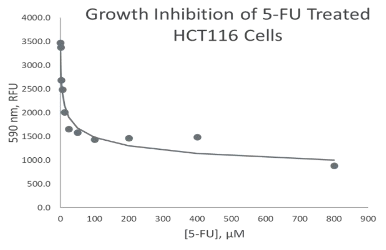


图1. HCT116细胞经不同浓度5-FU处理后的细胞活性曲线。细胞活性通过CTB试剂孵育后590 nm处的相对荧光单位（RFU）值进行定量，图中趋势线基于CTB检测的590 nm RFU值通过Monod方程拟合生成。

在前期研究中，我们基于Hamilton Microlab® STAR™平台开发了IMCStips®全自动脱盐与磷酸化肽段富集方法，仅需200 μg HCT116细胞裂解液（无需分级）即可鉴定超过10,000个磷酸化肽段。本概念验证研究采用该自动化方法处理200 μg 1:1混合的重标/轻标细胞裂解液，通过脱盐和磷酸化肽段富集定量分析5-FU处理的HCT116细胞蛋白质表达变化。
具体实验设计如下：
1. 脱盐处理：8份样本均采用RP IMCStips®脱盐，其中2份脱盐后样本直接真空干燥（作为非富集对照），剩余6份进行磷酸化肽段富集
2. 富集方案：3份采用PolyTi IMCStips®，3份采用ZrO_2 IMCStips®

（注：基于前期研究发现的两种树脂富集偏好性差异，本研究同时采用PolyTi和ZrO_2树脂以确保磷酸化修饰谱的全面覆盖）
分析结果显示，所有样本共鉴定到5,985种独特蛋白质和67,250条独特肽段。在磷酸化肽段富集样本中：
1. PolyTi IMCStips®组　平均鉴定磷酸化肽段数量：10,465条，平均富集特异性：85%
2. ZrO_2 IMCStips®组　平均鉴定磷酸化肽段数量：8,351条，平均富集特异性：90%

值得注意的是，仅经 RP IMCStips® 脱盐处理的非富集样本中磷酸化肽段鉴定数极低，这一结果凸显了磷酸化肽段富集步骤的必要性。

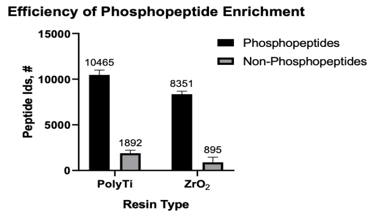


图2. PolyTi与ZrO_2树脂鉴定磷酸化肽段与非磷酸化肽段总量的对比分析。所有样本均采用IMCStips®通过全自动磷酸化肽段富集方法进行处理（n=3）

此外，我们通过绘制生物化学重复样本的肽段倍数变化比值（图3），系统评估了非富集样本与富集样本定量结果的重复性。基于皮尔逊相关性分析：
1. 重复样本相关性：
- RP组（非富集）：r=0.88
- PolyTi组：r=0.80
- ZrO_2组：r=0.78

2. 方法学可靠性：
上述高相关性系数（r>0.78）表明，本研究的样本制备与分析流程能够产生高度重复的定量蛋白质组学及磷酸化蛋白质组学数据。

Table 2

Sample	Resin	Protein Ids, #	Peptide Ids, #	Phosphopeptide Ids, #	Phosphopeptide Specificty, %	Quantified Proteins, #	Quantified Peptides, #
1	RP	4200	38423	260	1%	3490	19785
2	RP	4132	36539	234	1%	2838	18911
3	PolyTi	2886	12598	11156	89%	2458	6788
4	PolyTi	2879	12388	10365	84%	2195	6678
5	PolyTi	2835	12085	9874	82%	2221	6422
6	ZrO_2	2395	9012	8489	94%	1842	4919
7	ZrO_2	2483	9589	7895	82%	1835	5175
8	ZrO_2	2407	9138	8670	95%	1862	4921

对8份样本生成的质谱数据总结：分析了 8 份 200 μg、轻重标记比例 1:1 的 HCT116 细胞消化样本。使用反相（RP）树脂制备的样本未进行磷酸肽富集，而采用 PolyTi（聚钛）或 ZrO_2（二氧化锆）制备的样本则进行了磷酸肽富集。

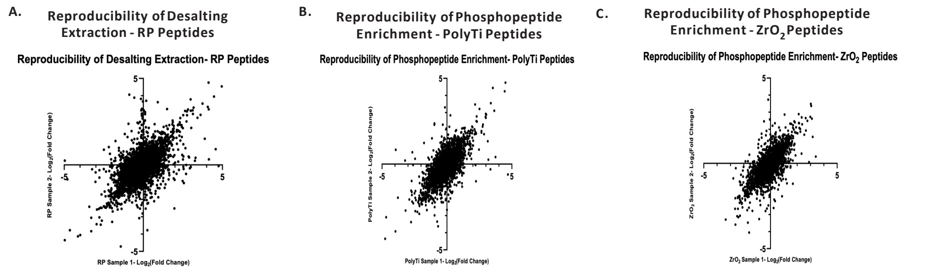
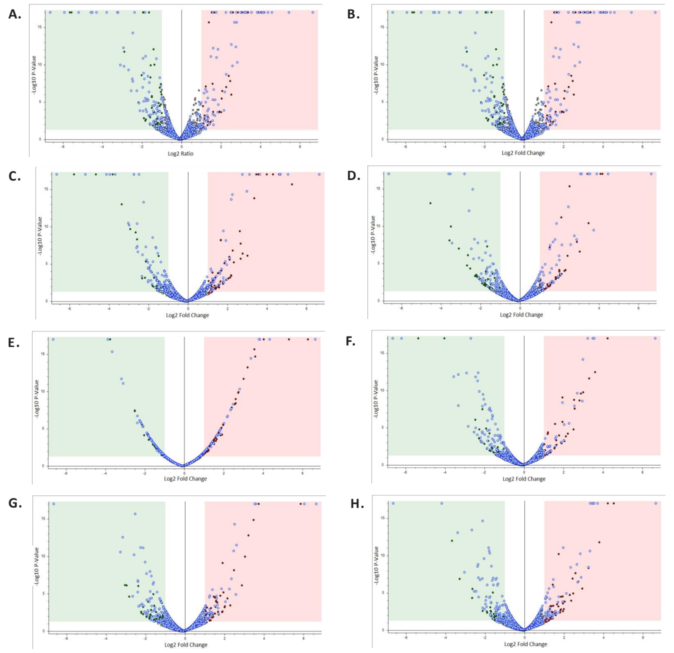


图3. 肽段倍数变化比率（log2）的对比分析，对200 μg 1:1混合SILAC样本的两组生化重复实验进行比较，样本分别通过以下方式制备：
(A) 使用RP IMCStips®进行脱盐提取；(B) 使用RP IMCStips®脱盐提取后，再用PolyTi IMCStips®进行磷酸肽富集；(C) 使用RP IMCStips®脱盐提取后，再用ZrO2 IMCStips®进行磷酸肽富集。Pearson相关性分析显示，三组实验的R值分别为0.88、0.80和0.78（P值均<0.00001）。



基于计算得到的倍数变化比率，我们进一步测定了每组样本中"显著"减少或增加的蛋白质数量。判定标准为：若某蛋白质的倍数变化比率大于2（显著增加）或小于0.5（显著减少），且计算p值≤0.05，则视为具有显著性差异。

- **未富集样本：**平均685±6个蛋白质显著减少，523±18个蛋白质显著增加
- **磷酸肽富集样本：**平均659±20个蛋白质显著减少，576±27个蛋白质显著增加

此外，我们为每组样本绘制了火山图（Volcano plots），以展示蛋白质倍数变化的整体分布情况。

图4. 各样本定量蛋白质的火山图分析
火山图基于蛋白质的倍数变化及其对应的p值绘制。
(A) RP样本1：显著减少蛋白质679个，显著增加505个
(B) RP样本2：显著减少690个，显著增加541个
(C) PolyTi样本1：显著减少657个，显著增加576个
(D) PolyTi样本2：显著减少645个，显著增加605个
(E) PolyTi样本3：显著减少701个，显著增加606个
(F) ZrO2样本1：显著减少660个，显著增加531个
(G) ZrO2样本2：显著减少640个，显著增加553个
(H) ZrO2样本3：显著减少652个，显著增加584个

为进一步明确数据的生物学意义，我们采用Ingenuity Pathway Analysis（IPA）软件进行分析。在这项概念验证研究中，我们重点分析了磷酸肽富集数据集，以解析5-FU处理影响的磷酸化信号通路。通过IPA对磷酸肽富集样本的蛋白表达倍数变化数据进行通路分析（图5）。

分析结果显示，EIF2信号通路受到显著抑制。该通路通常调控细胞生长与增殖。研究表明，在应激反应和氨基酸匮乏状态下，eIF2α的磷酸化可抑制翻译起始过程，进而阻碍细胞生长[1,5,6]。本数据集中发现EIF2通路中激酶（如PI3K、AKT、c-RAF等生长因子相关激酶）集体下调，这可能是细胞应对应激反应的表现（图6）。

此外，我们通过毒性通路列表（Tox List）分析了数据集中富集的毒性相关通路（图7）。NRF2介导的氧化应激响应通路呈现激活状态。已有研究证实，由于活性氧簇（ROS）增加，该通路是细胞响应5-FU处理的主要通路[7]。值得注意的是，NRF2的上调可能导致5-FU耐药性，而磷酸化修饰被认为是调控NRF2及其相关蛋白激活的关键机制[8]。

本数据集还检测到p53信号通路的变化。最新研究表明，p53通路在介导5-FU诱导的细胞死亡中起核心作用。在5-FU耐药细胞中，WNT信号通路可通过抑制p53通路来阻断细胞死亡应答[2]

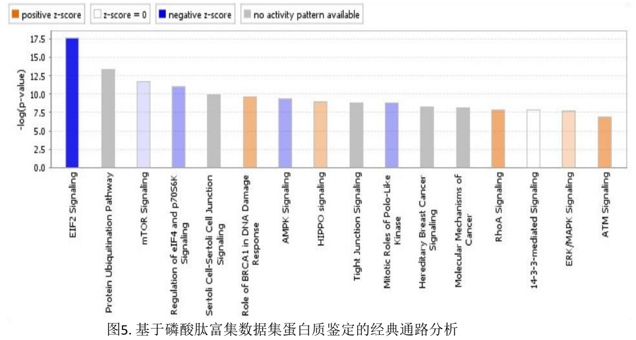


图5. 基于磷酸肽富集数据集蛋白质鉴定的经典通路分析
（注：p值表示分子与特定通路随机关联的概率，本数据集设定-log(p值)阈值为5；正z值表示通路激活，负z值表示通路抑制）

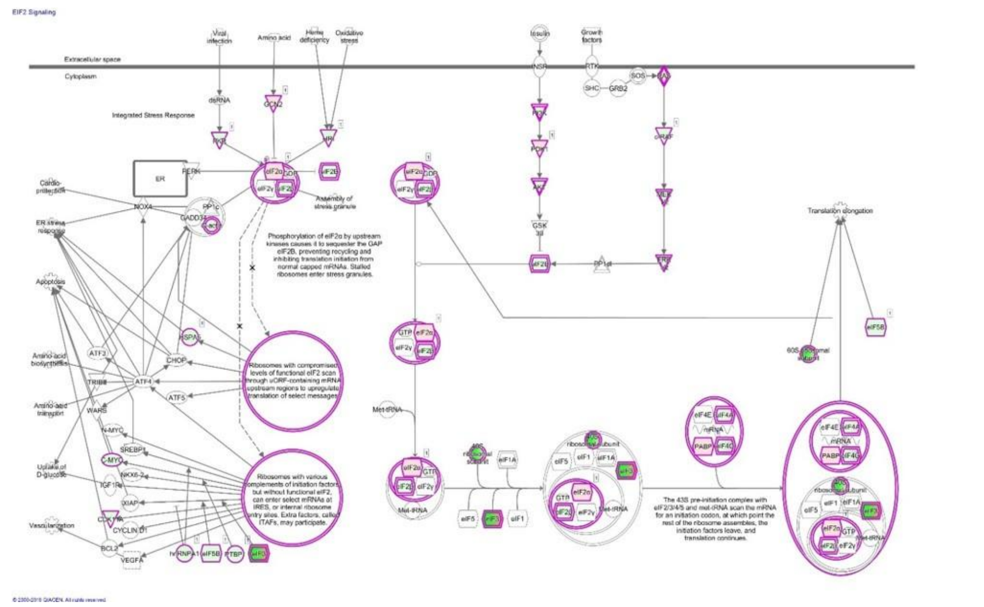


图6. 磷酸肽富集样本组中鉴定和定量的EIF2信号通路蛋白
（该通路z值为-2.46，表明EIF2信号通路受到抑制；紫色条带标记的分子表示该蛋白在数据集中被成功鉴定）

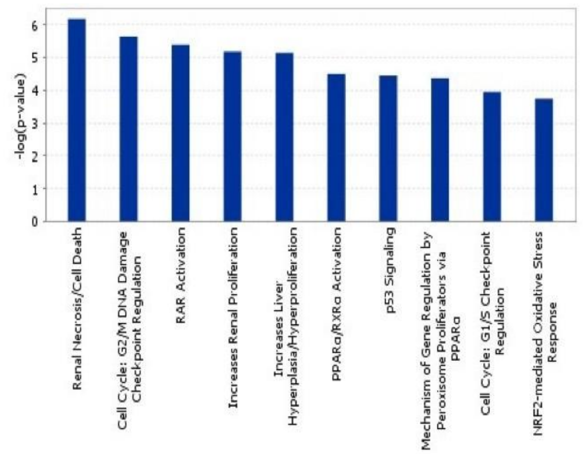


图7. IPA软件基于磷酸肽富集数据集分子生成的毒性通路列表（注：p值表示分子与特定通路随机关联的概率，本数据集设定-log(p值)阈值为3）

通过对磷酸肽富集数据集进行进一步筛选（选择在所有磷酸肽样本中均被鉴定、且倍数变化>2或<0.5的蛋白质），共鉴定出22个目标蛋白，其中11个蛋白表达上调（倍数变化>2），11个蛋白表达下调（倍数变化<0.5）（表3）。

值得注意的是，核纤层蛋白B1（Lamin-B1）近期被报道与结肠癌患者不良预后相关——该蛋白的过表达会增强有丝分裂灾难，帮助癌细胞逃避凋亡[9]。此外，DNA合成关键酶脱氧胞苷激酶（deoxycytidine kinase）的上调已被证实与5-FU敏感性显著相关，可作为该药物治疗的潜在预后标志物[10]。

Table 3

Uniprot Id	Protein Description	Average Fold Change	Phospho-Site(s)
Q8IV50	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containg protein 2	100.00	S24
Q9Y285	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	100.00	S301
Q8N6N3	UPF0690 protein C1orf52	11.91	T155
Q92878	DNA repair protein RAD50	9.77	S635;T690
Q92547	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	5.46	S350; S888
P27707	Deoxycytidine kinase	4.35	S74
Q8N4S0	Coiled-coil domain-containing protein 82	4.03	S282
O14545	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	3.50	S327; S415
Q8WWA1	Transmembrane protein 40	2.88	S141
Q08174	Protocadherin-1	2.78	S962; S984
Q9Y6W5	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	2.35	S293
Q5VTL8	Pre-mRNA-splicing factor 38B	0.44	S529
Q5JVS0	Intracelluar hyaluronan-binding protein 4	0.36	S108
P22234	Multifunctional protein 4	0.31	S27
O43583	Density-regulated protein	0.30	S73
Q6AI08	HEAT repeat-containing protein 6	0.30	S337; S643
Q15717	ELAV-like protein 1	0.29	S202
Q9UKX7	Nuclear pore complex protein Nup50	0.28	S296
P20700	Lamin-B1	0.26	S23; S391; T575
Q9H910	Hematological and neurological expressed 1-like protein	0.24	S97
Q9UN79	Transcription factor SOX-13	0.01	S334
Q86U06	Portable RNA-binding protein 23	0.01	S149

本研究结果表明：基于SILAC技术的磷酸化蛋白质组学研究不仅能解析药物作用机制，还能筛选出可作为药物敏感性/耐药性预后标志物的磷酸化蛋白。在后续研究中，我们计划在现有广谱磷酸肽（丝氨酸/苏氨酸磷酸化肽段）富集基础上，增加酪氨酸磷酸化肽段的特异性富集，以扩充数据集。

CONCLUSION

在这项概念验证研究中，我们采用成熟的自动化脱盐及磷酸肽富集方法，对5-FU处理的HCT116细胞进行了基于SILAC技术的磷酸化蛋白质组学研究。研究共鉴定到5,985种独特蛋白质和67,250条独特多肽。

通过质谱分析，我们量化了化疗药物处理后磷酸化蛋白的倍数变化，并将这些变化与生物信号通路的改变相关联。特别值得注意的是，在所有磷酸肽富集样本中均检测到22个响应5-FU处理而显著上调或下调的磷酸化蛋白。这些蛋白可作为潜在的药物靶点或5-FU治疗预后标志物进行深入研究。

（注：本研究首次将自动化样本处理技术与SILAC标记策略相结合，为化疗药物作用机制研究提供了新思路）

REFERENCES

1. R. B. Hamanaka, B. S. Bennett, S. B. Cullinan and J. A. Diehl, *Mol Biol Cell*, 2005, **16**, 5493-5501.
2. L. He, H. Zhu, S. Zhou, T. Wu, H. Wu, H. Yang, H. Mao, C. SekharKathera, A. Janardhan, A. M. Edick, A. Zhang, Z. Hu, F. Pan and Z. Guo, *Exp Mol Med*, 2018, **50**, 101.
3. K. Bracht, A. M. Nicholls, Y. Liu and W. F. Bodmer, *Br J Cancer*, 2010, **103**, 340-346.
4. P. M. De Angelis, D. H. Svendsrud, K. L. Kravik and T. Stokke, *Mol Cancer*, 2006, **5**, 20.
5. D. Zhou, L. R. Palam, L. Jiang, J. Narasimhan, K. A. Staschke and R. C. Wek, *J Biol Chem*, 2008, **283**, 7064-7073.
6. C. Kaehler, J. Isensee, T. Hucho, H. Lehrach and S. Krobitsch, *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**, 6436-6447.
7. U. Ozer, K. W. Barbour, S. A. Clinton and F. G. Berger, *Mol Pharmacol*, 2015, **88**, 970-981.
8. A. Giudice, C. Arra and M. C. Turco, *Methods Mol Biol*, 2010, **647**, 37-74.
9. M. Izdebska, M. Gagat and A. Grzanka, *Int J Oncol*, 2018, **52**, 89-102.
10. F. McAllister, et al., *Cancer Biol Ther*, 2014, **15**, 688-698.

*Contact: Todd Mullis –mullist@email.sc.edu

Artwork and layout created by IMCS, Inc.

©2019 IMCS, Inc. All rights reserved. IMCStips is a registered trademark of Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc.

Interested in more information about my poster?

Scan the QR code. I will follow up with you by email after the conference.