

针对胸苷酸抑制剂对结肠癌细胞系作用时间的自动化样本制备分析

Todd Mullis¹ • William Murphy^{1*} • Rebekah Woolsey² • David Quilici² • L. Andrew Lee¹ • Qian Wang³

¹Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc, Irmo, SC; ²Mitch Hitchcock, Ph.D. Nevada Proteomics Center, Reno, NV; ³University of South Carolina, Department of Chemistry and Biochemistry, Columbia, SC

引言



化学治疗药物（如胸苷酸合成酶抑制剂）是结直肠癌的一线治疗方案。然而，化疗耐药性已成为结直肠癌治疗中的主要难题。目前，研究界正致力于寻找预测化疗耐药性的生物标志物，并探索联合治疗的新靶点以提升整体疗效。本研究旨在运用我们已建立的磷酸肽富集方案及基于质谱的定量分析方法，探究胸苷酸合成酶敏感细胞与耐药细胞在 5-氟-2'-脱氧尿苷单磷酸与亚叶酸联合处理下磷酸化蛋白质组的变化规律。通过自动化磷酸肽提取方法，我们发现处理半小时内即可观察到稳定重现的早期磷酸化变化。

方法

将 HCT116 细胞和 HCT116/200 细胞培养于含 15 mM HEPES 和 10% 胎牛血清的 Gibco™ DMEM/F-12 培养基中。细胞汇合度达 80-90% 时通过胰蛋白酶/EDTA 处理进行传代。在药物处理前，细胞需至少传代 5 次。实验分别使用 10 μM 5-氟-2'-脱氧尿苷-5'-单磷酸 (5-FdUMP) 与 10 μM 亚叶酸 (LV)，或 10 μM 5-FdUMP、10 μM LV 及 10 μM 胸苷 (Thy) 处理细胞 24 小时。处理 24 小时后，采用 Promega™ CellTiter-Blue™ 细胞活力检测法测定细胞存活率。

采用细胞培养条件下稳定同位素氨基酸标记技术 (SILAC) 对 HCT116 及 HCT116/200 细胞进行标记。细胞培养于含 10% 透析胎牛血清的 Thermo Scientific™ DMEM/F-12 培养基中。经质谱验证：¹³C₆ L-赖氨酸和 ¹⁵N₄ L-精氨酸的标记效率 ≥ 95%。未标记细胞使用含 0.05% DMSO 的 10 μM 5-FdUMP 与 10 μM LV，或 10 μM 5-FdUMP、10 μM LV 及 10 μM Thy 进行处理；同位素标记细胞则用 0.05% DMSO 处理相应时间。处理后，细胞用冷的 1×PBS 洗涤三次，通过刮取方式收集细胞，并于 500×g 离心 5 分钟获得细胞沉淀。细胞沉淀保存于 -80°C 直至后续处理。

使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液裂解细胞。采用二喹喎甲酸法测定蛋白浓度。将裂解液按 1:1 比例混合，加入 10 mM TCEP 于 56°C 还原 30 分钟，随后在室温避光条件下用 25 mM 碘乙酰胺烷基化处理 30 分钟。还原烷基化后，以 1:50 的酶蛋白比例加入胰蛋白酶，于 37°C 酶解过夜。自动化样本处理采用 Hamilton Robotics 公司的 Microlab® STAR™ 系统。在 PolyTi IMCStips® 磷酸肽富集前，使用 RP IMCStips® 进行脱盐处理。具体样本制备与分析流程详见方案 1。

采用 Thermo Orbitrap Fusion 质谱仪联用 UltiMate 3000 RSLCnano 系统进行全局磷酸肽鉴定。质谱以数据依赖型模式运行，采用最高采集速度。动态排除时间设为 60 秒，质量容差为 10 ppm。使用 Proteome Discoverer v2.2 软件中的 Sequest HT 算法，结合人类 UniProt 蛋白 FASTA 数据库进行谱图检索。检索参数如下：仪器参数设为 FT-trap，母离子质量容差 10 ppm，碎片离子质量容差 0.6 Da；可变修饰包括甲硫氨酸氧化 (+15.995 Da) 及丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸磷酸化 (+79.966 Da)；固定修饰为半胱氨酸氨基甲酰甲基化 (+57.021 Da)。SILAC 定量以重标细胞作为对照，通过 Proteome Discoverer 计算各时间点样本中轻标与重标（处理与未处理）磷酸化蛋白的倍数变化。设定倍数变化截断值为 ≥ 2 或 ≤ 0.5，据此识别各时间点及各处理类型中符合标准的蛋白。

采用 R 语言软件包 KSEAapp 进行激酶富集分析（源代码及文档可从 GitHub 获取：https://github.com/casecp/KSEAapp）。KSEA 通过整合 PhosphoSitePlus 和 NetworKin 等公共磷酸化位点数据库，根据定量磷酸化蛋白质组数据计算激酶活性得分，以确定最可能与药物早期响应相关的激酶。该软件可输出基于 z 得分和 p 值的激酶条形图，并显示数据集中识别的激酶-底物关联信息^[1]。KSEA 分析同时使用 PhosphoSitePlus 和 NetworKin 数据库，设定每个激酶的最小底物数量阈值为 5，p 值截断值为 0.05。

采用 GraphPad Prism 8 软件进行图表绘制、统计学分析及热图生成。研究示意图及流程图使用 Biorender 平台绘制。

结果与讨论

用 10 μM 5-FdUMP 和 10 μM LV 处理 HCT116 和 HCT116/200 两种细胞系。HCT116/200 细胞过度表达 TS，对传统的 TS 抑制剂治疗具有耐药性，而 HCT116 细胞对该治疗敏感^[2]。如在 HCT116 细胞活力图（图 1A）中所示，当补充胸腺嘧啶可绕过胸腺嘧啶缺乏应急响应，避免细胞死亡时，即确认了 TS 受到抑制。相比之下，HCT116/200 细胞不受处理影响。经处理的 HCT116 细胞存活率下降至 57.2 ± 1.0%。

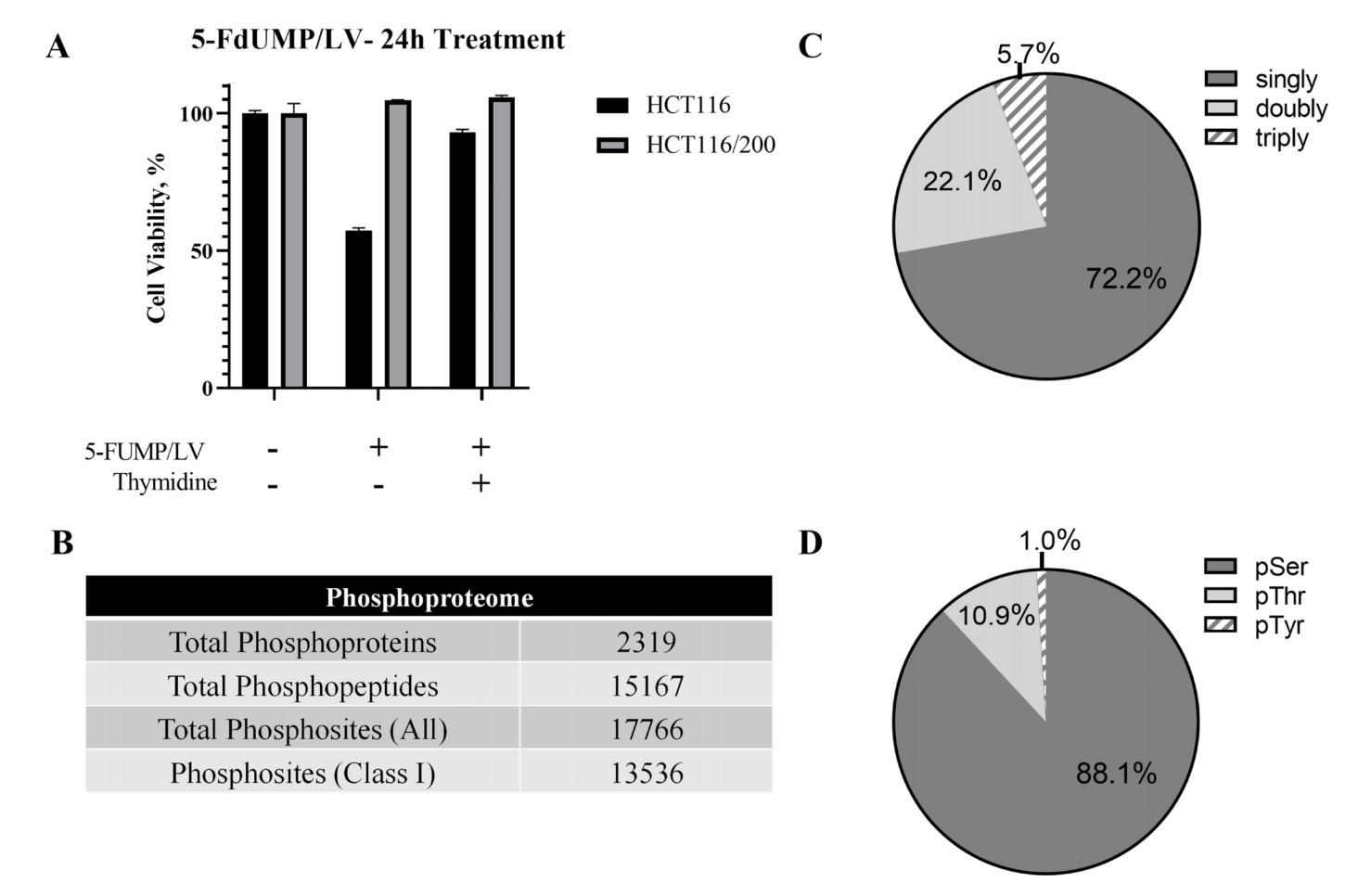


图1. 两种细胞系的处理及后续质谱分析。

A) HCT116 和 HCT116/200 细胞在未处理及使用 10 μM 5-FdUMP/LV 或 10 μM 5-FdUMP/LV/THY 处理 24 小时后的细胞活力 (n = 3，数据表示为均值 ± 标准差)。B) 质谱分析中鉴定到的磷酸化蛋白、磷酸化肽段、总磷酸化位点及 Class I 磷酸化位点的数量。C) 磷酸化肽段中单磷酸化、双磷酸化和三磷酸化肽段的百分比分布。D) 所有 18 个样品中磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸的百分比分布。样品分别采集自不同时间点 (0.5、1、2、8、24、48 小时) 以及不同处理类型 (5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞、5-FdUMP/LV 处理的 HCT116/200 细胞、5-FdUMP/LV/THY 处理的 HCT116 细胞)，共计 18 个不同样品。

基于 SILAC 的时序样品磷酸化蛋白质组学分析中，共鉴定到磷酸化蛋白 2,319 个，磷酸化肽段 15,167 条，特异性为 85%（图 1B）。类磷酸化位点（定义为定位至特定氨基酸的概率不低于 75%，且定位概率分数差 ≥ 5 的磷酸化位点）总数为 13,536 个。其中单磷酸化肽段 10,944 条（72.2%），双磷酸化肽段 3,351 条（22.1%），三磷酸化肽段 872 条（5.7%）（图 1C）。该结果与我们此前发表的采用 PolyTi IMCStips 富集样品的磷酸化蛋白质组数据一致^[3]。磷酸化丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点数分别为 11,919 个（88%）、1,478 个（11%）及 139 个（1.0%）（图 1D）。这一磷酸化丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸的比例符合文献报道值，很可能反映了各类磷酸化位点的自然丰度分布，但也可能存在纯化方法偏好性^[4]。

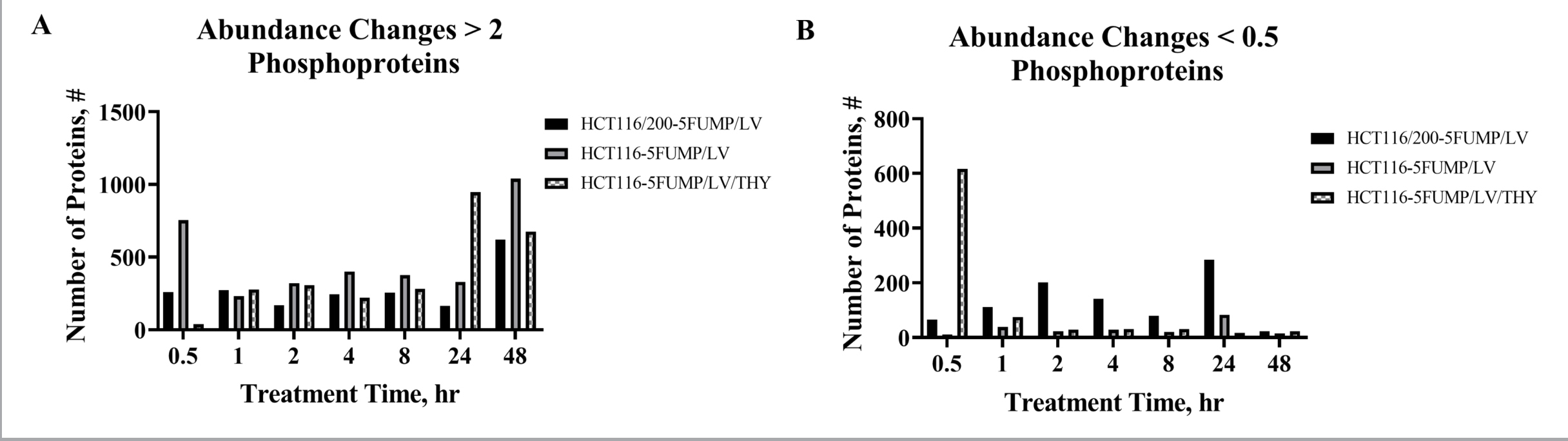


图2. 基于 SILAC 的 TS 抑制剂时序样品定量数据。A) 柱状图展示不同处理类型及不同处理时间下丰度比大于 2 的磷酸化蛋白数量。B) 丰度比小于 0.5 的磷酸化蛋白数量。样品采集自不同时间点 (0.5、1、2、8、24、48 小时) 及不同处理类型 (5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞、5-FdUMP/LV 处理的 HCT116/200 细胞、5-FdUMP/LV/THY 处理的 HCT116 细胞)，共计 18 个不同样品。

在 0.5 小时时间点，与 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116/200 细胞 (259 个) 及 5-FdUMP/LV/THY 处理的 HCT116 细胞 (38 个) 相比，我们在 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 样品中鉴定到更多表达量变化 ≥ 2 倍的蛋白 (754 个)（图 2A、B）。5-FdUMP/LV 处理引发的早期细胞应答超出预期，且不同细胞的应答差异快速显现，而胸腺嘧啶的存在可阻断此类应答。对 TS 抑制剂耐药的细胞虽也出现早期应答，但其磷酸化蛋白质组的变化程度显著低于 TS 敏感细胞。

对 HCT116 细胞进行 5-FdUMP/LV (0.5 小时处理) 的三次重复实验显示：各样品平均鉴定蛋白数为 2,018 ± 26 个，平均磷酸化肽段数为 5,334 ± 249 条，平均磷酸化肽段特异性为 85 ± 2%（图 3A）。基于该重复数据集，我们鉴定到表达变化倍数 ≥ 2 的磷酸化蛋白 394 个，而表达变化倍数 ≤ 0.5 的磷酸化蛋白仅 5 个（图 3B）。

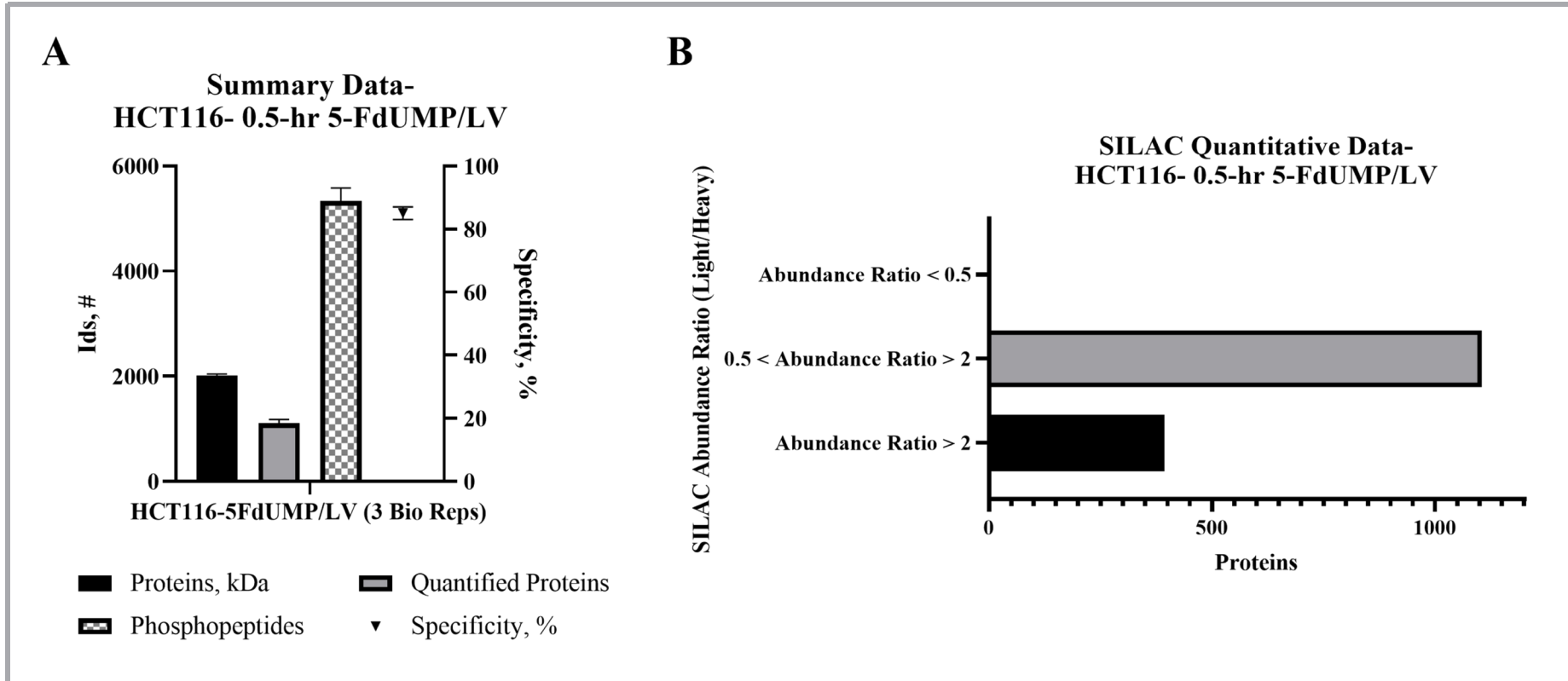


图3. 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 样品三次重复实验数据。A) 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞样品 (n=3) 的磷酸化蛋白质组学数据汇总。包括蛋白质鉴定数、磷酸化肽段鉴定数、定量蛋白质数及磷酸化肽段特异性。各样品平均鉴定蛋白数为 2,018 ± 26 个，平均磷酸化肽段数为 5,334 ± 249 条，平均磷酸化肽段特异性为 85 ± 2%。B) 基于 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞样品 (n=3) 计算的丰度比 (均值 ± 标准差)。

对 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞三次重复实验数据集进行激酶底物富集分析 (KSEA)，结果显示 CDK2、CDK1、CDK4 及丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8) 的计算 z 分数最高，分别为 5.00、3.84、3.05 和 3.03，相应 p 值均小于 0.05。核糖体蛋白 S6 激酶 B1 (RPS6KB1) 与核糖体蛋白 S6 激酶 A1 (RPS6KA1) 的计算 z 分数最低，分别为 -2.52 和 -3.23，相应 p 值亦小于 0.05（图 4A）。值得注意的是，KSEA 软件会对整个数据集的倍数变化数据进行标准化处理，使得最终获得的激酶 z 分数具有数据集相对性。通过绘制计算所得 z 分数最高和最低激酶的底物组点图可见，CDK2 与 CDK1 底物组内底物的平均 log₂ FC 为 1.14，而 RPS6KB1 与 RPS6KA1 底物组内底物的平均 log₂ FC 为 0.13（图 4B）。

基于不同激酶底物组内特定底物 log₂ FC 的热图分析（图 5），在 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞中，CDK1 底物组、CDK2 底物组和 MAPK 家族底物组的响应程度位列前三。

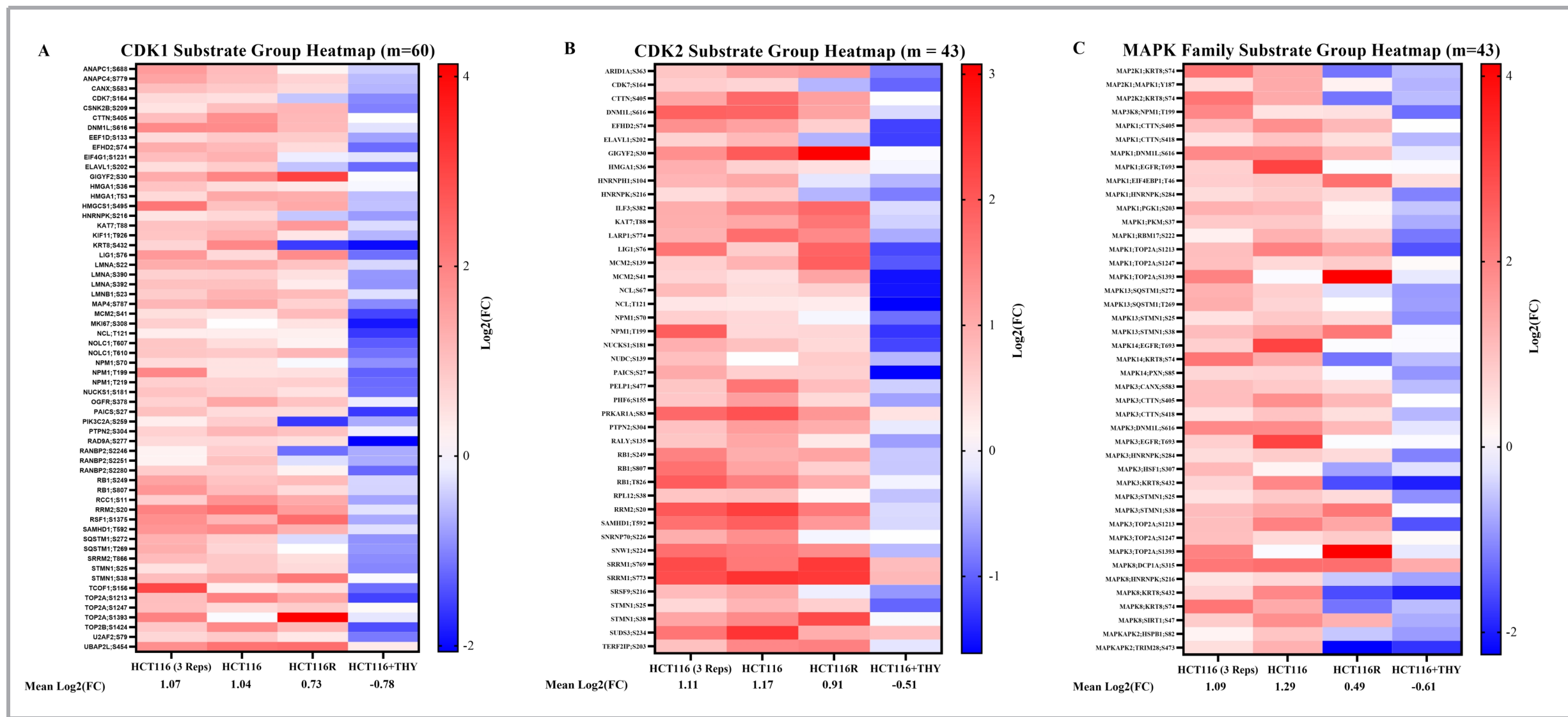


图5. 使用 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116、HCT116/200 及 HCT116+THY 样品数据生成的热图。A) 0.5 小时时间点各样品组 CDK1 底物组的热图。各样品组计算了该底物组的平均 log₂ FC。B) 0.5 小时时间点各样品组 CDK2 底物组的热图。各样品组计算了该底物组的平均 log₂ FC。C) 0.5 小时时间点各样品组 MAPK 家族 (MAP2K1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK1, MAPK3, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MAPKAPK2) 底物组的热图。各样品组计算了该底物组的平均 log₂ FC。

通过对比 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116 细胞样品与 0.5 小时 5-FdUMP/LV 处理的 HCT116/200 细胞样品的热图可见，各底物组的平均倍数变化略有降低；而 0.5 小时 5-FdUMP/LV/THY 处理的 HCT116 细胞样品热图显示，各底物组的平均倍数变化进一步下降（图 5）。

既往研究表明，CDK1、CDK2 及 MAPK 家族中的多种激酶均参与对 TS 抑制的响应，但这些响应通常出现在细胞接受处理 24-72 小时

后，而非 0.5 小时。据我们所知，本研究首次揭示了 TS 抑制引发的早期磷酸化响应事件。从这些底物组中筛选出的特定蛋白，可用于建立针对特异性磷酸化肽段的定量分析方法，以评估细胞对 TS 抑制剂的敏感性（表 1）。这份“Top 20”磷酸化蛋白列表可作为临床筛查工具，在治疗前预判患者对 TS 抑制剂治疗的敏感性，从而指导治疗方案选择——确定 TS 抑制剂治疗是否有效，或是否需要采用替代治疗方案。

表1. 在 0.5 小时时间点 5-FdUMP/LV 处理表现出差异响应的、来自 CDK1、CDK2 或 MAPK 家族底物组的 Top 20 磷酸化蛋白。

Protein	Description	Phosphosite	Log ₂ (Fold Change) Data			
			HCT116 (3 Reps)	HCT116	HCT116R	HCT116+THY
DNM1L	Dynamin-1-like protein	S616	1.910	1.868	1.122	-0.236
PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	S83	1.812	2.096	1.267	0.343
SAMHD1	SAM And HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate	T592	1.712	1.922	1.234	-0.249
EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2	S74	1.334	1.125	0.568	-1.204
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	S203	1.256	1.159	0.148	-0.527
MAP4	Microtubule-associated protein 4	S787	1.176	1.405	0.737	-0.949
EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	S1231	1.063	1.267	-0.146	-0.241
LMNA	Prelamin-A/C	S392	1.009	1.018	0.324	-0.869
KAT7	Histone acetyltransferase KAT7	T88	0.976	1.051	1.642	-0.295
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	S104	0.883	1.044	-0.160	-0.468
PKM	Pyruvate kinase PKM	S37	0.869	0.888	0.305	-0.730
RANBP2	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	S2280	0.833	0.809	0.200	-1.228
SRSF9	Serine/arginine-rich splicing factor 9	S216	0.816	1.038	-0.108	-0.667
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	T46	0.807	0.923	2.314	0.543
RPL12	60S ribosomal protein L12	S38	0.691	0.759	0.088	-0.390
PXN	Paxillin	S85	0.660	0.707	-0.037	-0.935
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7	S164	0.596	0.509	-0.480	-0.969
NPM1	Nucleophosmin	S70	0.581	0.447	-0.063	-0.911
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	S41	0.530	0.377	1.092	-1.510
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	S216	0.425	0.642	-0.476	-0.824

结论

TS 抑制剂耐药性是癌症治疗中的一个主要难题。为了解先天性及获得性耐药产生的机制，本探索性研究检测了细胞响应 5-FdUMP/LV 处理时发生的早期磷酸化事件。通过使用 IMCStips® 进行自动化磷酸化富集，我们获得了可重复的实验数据，推动了对结直肠癌细胞如何响应 TS 抑制剂治疗的现有认知。研究观察到细胞在给药半小时内即出现磷酸化蛋白质组变化，且重复样本验证了这些变化。CDK1、CDK2 及 MAPK 家族底物组在 TS 抑制剂敏感细胞、耐药细胞以及经胸腺嘧啶挽救的细胞中表现出显著差异。

利益冲突声明

本项目获得 Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc (IMCS) 的部分资金支持。L. Andrew Lee 与 Qian Wang 持有 IMCS 公司股权。

REFERENCES

- Casado, P.; Rodriguez-Prados, J. C.; Cosulich, S. C.; Guichard, S.; Vanhaesebroeck, B.; Joel, S.; Cutilas, P. R., Kinase-substrate enrichment analysis provides insights into the heterogeneity of signaling pathway activation in leukemia cells. *Sci. Signal* **2013**, 6 (268), rs6.
- Ozer, U.; Barbour, K. W.; Clinton, S. A.; Berger, F. G., Oxidative Stress and Response to Thymidylate Synthase-Targeted Antimetabolites. *Mol. Pharmacol.* **2015**, 88 (6), 970-81.
- Mullis, B. T.; Hwang, S.; Lee, L. A.; Iluk, A.; Woolsey, R.; Quilici, D.; Wang, Q., Automating Complex, Multistep Processes on a Single Robotic Platform to Generate Reproducible Phosphoproteomic Data. *SLAS Discov.* **2020**, 25 (3), 277-286.
- Riley, N. M.; Coon, J. J., Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. *Analytical Chemistry* **2016**, 88 (1), 74-94.
- Du, Z.; Lowly, C. M., Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* **2018**, 17 (1), 58.

*presenting author contact:
bill.murphy@imcstips.com



DOWNLOAD POSTER

Use this QR code to get access to this poster online.