

利用化学蛋白组学方法分析小鼠肝中氨甲蝶呤相互作用蛋白质

于晓明^{1,2}, 张丽华², 张玉奎²

(1. 东南大学医学院生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210009; 2. 中国科学院大连化学物理研究所
高效分离与表征实验室, 辽宁 大连 116021)

摘要: **目的** 利用基于亲和色谱的化学蛋白组学方法分析小鼠肝组织匀浆液中与氨甲蝶呤相互作用蛋白, 探讨氨甲蝶呤的作用机制。 **方法** 以键合氨甲蝶呤的琼脂糖凝胶作为亲和材料, 从小鼠肝组织匀浆液中亲和富集与氨甲蝶呤相互作用蛋白, 采用含有吐温-20 的缓冲液洗涤凝胶, 去除凝胶表面非特异吸附蛋白, 采用高浓度盐洗脱凝胶亲和富集蛋白, 对洗脱蛋白进行胰蛋白酶酶解, 酶解产物进行 HPLC/MS 分析和数据库搜索。 **结果** 对洗脱样品进行 SDS-PAGE 分析结果表明键合氨甲蝶呤的琼脂糖凝胶可以富集小鼠肝组织中与氨甲蝶呤相互作用蛋白。对洗脱样品酶解产物进行质谱分析鉴定了同型半胱氨酸水解酶等 23 种蛋白。 **结论** 基于亲和色谱的化学蛋白组学方法是一种快速、有效的发现药物相互作用蛋白的方法。

关键词: 氨甲蝶呤; 化学蛋白质组学; 靶点分析

中图分类号: R318.08 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)02-0284-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.027

氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX) 是一种叶酸拮抗剂, 最初被用于恶性肿瘤治疗^[1], 目前临床上常用于急性白血病、尤其是急性淋巴细胞性白血病的维持治疗^[2-4], 对头颈部肿瘤、乳腺癌、肺癌及盆腔肿瘤也有一定疗效。MTX 也可以作为抗炎和免疫抑制剂用于其他非肿瘤疾病的治疗。MTX 于 20 世纪 50 年代作为“改变病情抗风湿药物” (disease modifying antirheumatic drug, DMARD) 被用于类风湿关节炎治疗, 目前是类风湿关节炎治疗的一线药物。但有 1/3 类风湿关节炎患者对氨甲蝶呤治疗不敏感, 而且骨髓抑制、肝细胞毒性等毒性作用在一定程度上限制了其应用^[5-7]。MTX 也是治疗中度至重度银屑病的一线药物, 但同样存在患者间反应性的差异和急性骨髓抑制、胃肠道反应及肝细胞毒性等作用^[8-9]。作为抗炎和免疫抑制剂, MTX 也被用于溃疡性结肠炎、以及多肌炎、皮炎、多发性肉芽肿等自身免疫性疾病的治疗和急性移植抗宿主疾病的预防性治疗^[10-11]。MTX 治疗效果明显, 但对其作用机制仍不清楚。因此, 研究 MTX 细胞内作用靶点对于阐明其作用机制和毒性以及毒理具有重要意义, 可以帮助增加有效性, 减少毒性, 实现个体化治疗。

化学蛋白组学是利用化合物标记或富集细胞或组织内与化合物有亲和作用的蛋白质组, 再利用质谱对被标记或富集的蛋白质进行鉴定。基于亲和色谱的化学蛋白组学方法是通过固载小分子化合物的亲和色谱法纯化与化合物特异结合的蛋白质, 再通过质谱对蛋白质进行分析和鉴定, 其过程是将化合物通过间隔臂固载于固相载体表面, 再利用此基质亲和富集细胞裂解液或组织匀浆液中相互作用的蛋白, 对得到的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离和质谱分析鉴定^[12]。上述化学蛋白组学方法已用于信号转导通路中蛋白激酶抑制剂的细胞内蛋白靶点分析和 cAMP, cGMP 及磷脂酰肌醇等第二信使分子的下游转导通路研究^[13-15]。本文利用化学蛋白组学的原理和方法, 以键合 MTX 的琼脂糖凝胶为亲和材料, 富集小鼠肝组织内与其相互作用的蛋白, 利用质谱对富集的蛋白质组进行分析和鉴定, 研究 MTX 细胞内相互作用蛋白靶点, 从而为进一步研究其作用机制和毒理提供实验线索和依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

MTX-琼脂糖凝胶、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonfyl fluoride, PMSF)、胰蛋白酶、尿素、二硫苏糖醇、碘乙酸均购自于 Sigma 公司, 其余试剂均为分析纯或色谱纯。

作者简介: 于晓明 (1976 -), 女, 博士, 讲师, 主要从事药物蛋白相互作用分析研究, E-mail: yuxiaoming2002169@yahoo.com.cn, Tel: (025)83272545。

通讯作者: 张丽华, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

1.2 仪器

FS-2 型高速匀浆器购自北京科思佳公司,离心超滤管购自于 Millipore, LC-20AD 高效液相色谱仪为 SHIMADZU 产品,LCQ 离子阱质谱仪为 Thermo 公司出品,反相液相色谱 C_{18} 微柱 ($5 \mu\text{m}$, 200 \AA , 直径 $300 \mu\text{m} \times 50 \text{ mm}$) 购自于依利特公司。

1.3 小鼠肝组织匀浆液样品制备

取小鼠肝 3 g , 剪碎, 以 $\text{PBS } 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH } 7.4$) 清洗 3 次去除组织含有的血液成分, 加 3 ml PBS (含有 $\text{PMSF } 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 匀浆液, 匀浆 5 min , $12\ 000 \times g$ 离心 30 min , 取上清备用。

1.4 匀浆样品与氨甲蝶呤-琼脂糖凝胶相互作用分析

取 0.1 ml 键合 MTX 的琼脂糖凝胶分别装入 2 个离心管内, 以 $\text{PBS } 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH } 7.4$) 进行清洗。取 $500 \mu\text{l}$ 肝组织匀浆液加入离心管内, 与凝胶于室温反应 1 h , 以 $1 \text{ ml } 0.1\%$ PBST (PBS 中含有 0.1% 吐温-20) 清洗凝胶去除凝胶表面非特异吸附蛋白, 共洗涤 10 次。收集最后一次洗脱液 (PBST 洗脱液) 进行 SDS-PAGE 分析。以 $\text{NaCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 洗脱结合于 MTX-琼脂糖凝胶表面的蛋白, 收集样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 SDS-PAGE 检测洗脱样品蛋白

对 PBST 洗脱液, $\text{NaCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 洗脱液中的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 采用银染法对凝胶进行染色处理。

1.6 样品除盐

将亲和富集的蛋白样品溶液装入截留分子量 3000 u 的超滤离心管, 以 $12\ 000 \times g$ 超滤浓缩 15 min 至溶液体积为 0.2 ml , 再加入 1 ml $\text{Tris-HCl } 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH } 8.4$), 以上述条件超滤浓缩至 0.2 ml , 如此重复超滤浓缩 3 次进行溶液置换。

1.7 蛋白酶解

将洗脱的蛋白样品溶解于终浓度 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素中, 加入二硫苏糖醇进行还原, 56°C 反应 40 min , 再加入碘乙酸, 室温反应 40 min 。以 $\text{Tris-HCl } (\text{pH } 8.5) 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀释至尿素浓度为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后加胰蛋白酶于 37°C 酶解 24 h 。

1.8 $\mu\text{RPLC-ESI-MS/MS}$ 分析

$\mu\text{RPLC-ESI-MS/MS}$ 分析条件如下所示。流动相 A 为 98% 水 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 98% 乙腈 (ACN, 含 0.1% 甲酸)。其分离梯度如下: $0 \text{ min}, 0\% \text{ B}$; $110 \text{ min}, 40\% \text{ B}$; $110.1 \text{ min}, 80\% \text{ B}$; $130 \text{ min}, 80\% \text{ B}$; 流速, $5.0 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ 。上样体积为 $100 \mu\text{l}$, 上样及除盐时间为 40 min 。

LCQ 仪器采用正离子模式, 加热毛细管温度为

150°C , 喷雾电压为 3.0 kV , MS/MS 扫描碰撞能量为 35% 。总离子流色谱图质量范围为质荷比 (m/z) $400 \sim 2000$ 。 MS/MS 谱图采用数据依赖模式, 并且针对全扫描中前三个最高峰进行 MS/MS 扫描。 MS/MS 数据采用基于 SEQUEST 算法的 BioWorks (版本号 3.1) 软件检索。检索参数设置如下: 数据库, *ipi Mouse V* 蛋白质数据库; 胰蛋白酶完全酶切, 允许最大两个漏切位点; 母离子的质量容忍度为 2 u ; 碎片离子的质量容忍度为 1 u 。

2 结果

2.1 亲和富集蛋白样品分析

亲和富集蛋白样品的 SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示, 可以看出 PBST 洗脱样品中几乎不含有蛋白 (泳道 2), $\text{NaCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 洗脱样品蛋白含量明显高于 PBST 洗脱样品 (泳道 1), 说明 $\text{NaCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以使保留于 MTX-琼脂糖凝胶上的蛋白解离被洗脱。

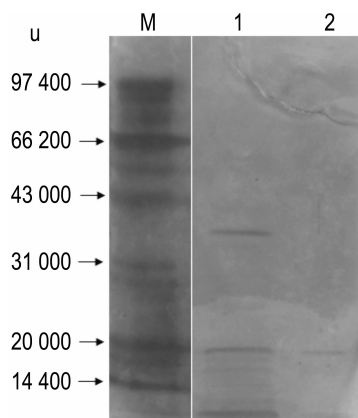


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of eluents from methotrexate-agarose after incubation of liver homogenate with the agarose beads. M: marker; lane 1: $\text{NaCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ eluent; lane 2: PBST eluent.

2.2 亲和富集蛋白 $\mu\text{RPLC-ESI-MS/MS}$ 分析

将亲和收集得到的蛋白样品进行超滤浓缩和溶液置换后以胰蛋白酶酶解蛋白样品, 酶解产物进行 $\mu\text{RPLC-ESI-MS/MS}$ 分析, 结果如图 2 所示。通过检索数据库鉴定样品中蛋白种类如表 1 所示。在鉴定得到的蛋白质中经过 2 个肽段鉴定的蛋白为 9 个, 其余蛋白为 1 个肽段鉴定。对得到的蛋白初步分类包括: 代谢相关酶类 (其中与一碳单位和叶酸代谢有关的有甲酰四氢叶酸脱氢酶、蛋氨酸合成酶、S-腺苷同型半胱氨酸水解酶)、细胞骨架相关蛋白、肿瘤相关蛋白、与基因转录、翻译相关蛋白及其他功能蛋白等。

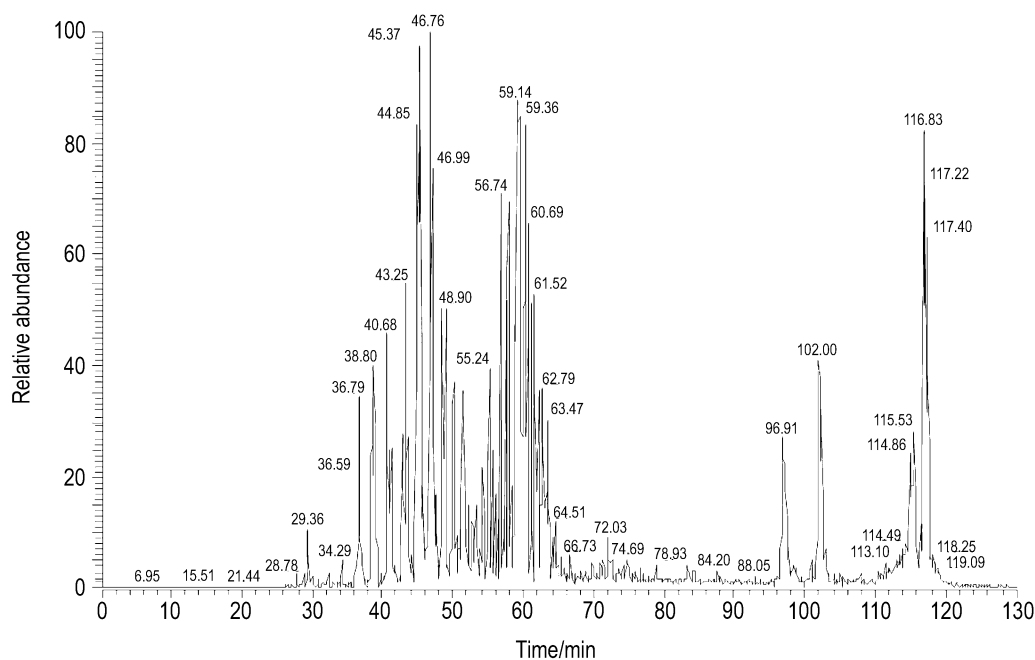


Fig. 2 μ HPLC analysis of trypsin digests of proteins eluted by NaCl.

Tab. 1 Protein identification by μ HPLC-ESI-MS/MS analysis

No	Protein
1	formyltetrahydrofolate dehydrogenase
2	put. beta-actin (aa 27 - 375)
3	APEH _ MOUSE Acylamino-acid-releasing enzyme (AARE)
4	interferon-inducible protein 10 (IP-10) receptor
5	betaine-homocysteine methyltransferase
6	S-adenosylhomocysteine hydrolase
7	keratin 6 alpha
8	similar to ribosomal protein L30
9	Apeh protein
10	Nsep1 protein
11	keratin complex 2, basic, gene 17
12	keratin complex 2, basic, gene 1
13	arginase 1, liver
14	similar to Ahcy protein
15	valosin containing protein; transitional endoplasmic reticulum ATPase
16	similar to carbamoyl-phosphate synthase
17	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)
18	trypsinogen 9
19	trypsin 3
20	Nsap11-pending protein
21	tubulin alpha 8
22	Tubb2 protein
23	plasminogen activator inhibitor-2

3 讨论

利用以键合化合物为配基的亲材料富集相互作用蛋白是研究化合物细胞内蛋白靶点的常用方法,基于亲和富集的化学蛋白组学方法即利用亲和材料首先富集捕获与配基相互作用的蛋白,再利用高通量质谱分析方法对蛋白质进行鉴定。亲和富集蛋白的第一步就是准备亲和色谱材料,琼脂糖凝胶是一种常用的凝胶层析介质,具有亲水性、大孔性、非特异性吸附少等优点,在分离生物大分子和基因工程产品下游工艺等领域具有广泛的用途。本文采用的亲和介质材料是键合 MTX 的琼脂糖凝胶,通过化学键合方法使 MTX 固载于凝胶表面,并在药物分子与凝胶表面引入了适当长度间隔臂,从而减少可能存在的空间位阻效应对药物配基与靶蛋白相互作用的影响。

针对鉴定的蛋白,与 MTX 治疗类风湿关节炎的作用机制可能相关、值得进一步关注和研究的蛋白包括: S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase, SAHH)、蛋氨酸合成酶(betaine-homocysteine methyltransferase)、干扰素诱导蛋白 10 受体(interferon-inducible protein 10)等。SAHH 是细胞内广泛存在的一种酶,它催化 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, AdoHcy)水解生成腺苷和同型半胱氨酸,直接影响细胞内 AdoHcy、腺苷和同型半胱氨酸水平。有文献报道类风湿关节炎患者使用 MTX 后血液同

型半胱氨酸水平升高^[16-18],提示 MTX 可能与 AdoHcy 水解酶相互作用,影响体内同型半胱氨酸水平。关于 MTX 治疗类风湿关节炎的一个机制是通过增加体内腺苷含量介导的,如使用 MTX 处理成纤维细胞和上皮细胞可以使细胞外腺苷水平增加^[19]。目前研究认为 MTX 影响腺苷代谢的分子机制为 MTX 抑制 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAR) 转甲酰酶,使细胞内 AICAR 水平升高,进而抑制 AMP 脱氨酶和腺苷脱氨酶,从而促进 AMP 转化生成腺苷^[20]。本文结果提示 MTX 可能与 SAHH 相互作用,直接影响细胞内腺苷水平。AdoHcy 是依赖 S-腺苷甲硫氨酸的转甲基酶的强效抑制剂^[21],SAHH 已被选择作为多种新药研发的重要靶点,如免疫抑制剂、抗病毒药、防治动脉粥样硬化和阿尔茨海默病药物。目前还没有报道 MTX 与 SAHH 相互作用。所以,本实验结果为进一步研究 MTX 治疗类风湿关节炎的分子机制及了解 SAHH 的功能提供了新的实验线索。

蛋氨酸合成酶催化同型半胱氨酸甲基化生成蛋氨酸,由甲基四氢叶酸提供甲基。使用大剂量 MTX 化疗治疗原发性中枢神经系统淋巴瘤时,中枢神经系统白质的改变是化疗的典型副作用。而 S-腺苷蛋氨酸是形成中枢神经髓鞘的必需物质,所以可以推论 MTX 与 AdoHcy 水解酶和蛋氨酸合成酶相互作用,继而影响蛋氨酸代谢可能是其诱发中枢神经系统白质改变的一个机制。

干扰素诱导蛋白 10 受体是由 7 个跨膜亚单位组成的膜结合分子,属于 G 蛋白偶联受体超家族。干扰素诱导蛋白 10 与受体相互作用,通过一系列信号转导途径介导免疫细胞的迁移、活化,参与多种疾病包括类风湿性关节炎的发生。MTX 从 20 世纪 50 年代开始被试用治疗类风湿关节炎,取得良好疗效。到目前 MTX 已经被作为治疗类风湿关节炎的首选,然而它的作用机制还不是很明确。本实验结果提示,干扰素诱导蛋白 10 受体很可能是 MTX 治疗类风湿关节炎的一个新的蛋白靶点。综上所述,本文利用化学蛋白组学的原理和方法,以键合 MTX 的琼脂糖凝胶为亲和材料,利用液相色谱与质谱联用鉴定了小鼠肝组织内与 MTX 相互作用的潜在蛋白靶点,为进一步研究 MTX 作用机制和毒理提供了实验线索和依据。

参考文献:

[1] Farber S, Toch E, Manning-Sears E, Pinkel D. *Advances*

in chemotherapy of cancer in man[M] // Greenstein HA, ed. *Advances in Cancer Research*. New York: New York Academic Press, 1956:2-73.

- [2] Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, et al. Acute lymphoblastic leukemia[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002;162-192.
- [3] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2006, **354**(2):166-178.
- [4] Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, et al. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival[J]. *Haematologica*, 2009, **94**(10):1391-1398.
- [5] O'Dell JR. Methotrexate, leflunomide and combination therapies [M] // Harris E Jr, Budd R, Firestein G, Genovese M, Sergent J, Ruddy S, et al. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders; 2005:900-919.
- [6] Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, **46**(10):1520-1524.
- [7] Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN, et al. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis[J]. *N Engl J Med*, 1985, **312**(13):818-822.
- [8] Hausteil UF, Rytter M. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2000, **14**(5):382-388.
- [9] Roenigk HH Jr, Auerbach R, Maibach H, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate in psoriasis: consensus conference[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, **38**(3):478-485.
- [10] Weiss B, Lerner A, Shapiro R, Broide E, Levine A, Fradkin A, et al. Methotrexate treatment in pediatric Crohn disease patients intolerant or resistant to purine analogues [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009, **48**(5):526-530.
- [11] Herfarth HH, Osterman MT, Isaacs KL, Lewis JD, Sands BE. Efficacy of methotrexate in ulcerative colitis: failure or promise[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, **16**(8):1421-1430.
- [12] Katayama H, Oda Y. Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, **855**(1):21-27.
- [13] Castoreno AB, Eggert US. Small molecule probes of cellular pathways and networks[J]. *ACS Chem Biol*, 2011, **6**(1):86-94.
- [14] Lomenick B, Olsen RW, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules[J]. *ACS Chem Biol*, 2011, **6**(1):34-46.
- [15] Sato S, Murata A, Shirakawa T, Uesugi M. Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies [J]. *Chem Biol*, 2010, **17**(6):616-623.
- [16] van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ,

- Thomas CM, *et al.* Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology* (Oxford), 2002, **41**(6):658-665.
- [17] Slot O. Changes in plasma homocysteine in arthritis patients starting treatment with low-dose methotrexate subsequently supplemented with folic acid[J]. *Scand J Rheumatol*, 2001, **30**(5):305-307.
- [18] Hoekstra M, Haagsma CJ, Doelman CJ, van de Laar MA. Intermittent rises in plasma homocysteine in patients with rheumatoid arthritis treated with higher dose methotrexate [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, **64**(1):141-143.
- [19] Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(6):2441-2445.
- [20] Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans *in vivo* [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, **65**(4):465-470.
- [21] Kloor D, Osswald H. S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, **25**(6):294-297.

Identification of methotrexate interacting proteins in the mouse liver by chemical proteomics approach based on affinity chromatography

YU Xiao-ming^{1,2}, ZHANG Li-hua², ZHANG Yu-kui²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To identify the protein targets of methotrexate and to provide some clues to its pharmaceutical effects and toxicity. **METHODS** The methotrexate-immobilized agarose bead was used as the affinity matrix. Interacting proteins were pulled down by affinity chromatography method. The nonspecific proteins were washed away with large volumes of PBST and the retained proteins were eluted by 1 mol·L⁻¹ NaCl. An ultra-filtration tube with the cut-off of 3000 u was used to desalt the eluent and replace the buffer to 50 mmol·L⁻¹ Tris (pH 8.5). The desalted protein samples were digested with trypsin and the digests were analyzed by HPLC/MS. **RESULTS** SDS-PAGE analysis revealed no proteins in the PBST eluent. While the eluent with 1 mol·L⁻¹ NaCl contained large quantities of proteins. HPLC/MS analysis identified 23 proteins including formyltetrahydrofolate dehydrogenase and S-adenosylhomocysteine, some of which are known as methotrexate interacting proteins. **CONCLUSION** The chemical proteomics approach is effective for investigating the potential targets of drugs, and the discovery of new target proteins will shed light on the mechanisms that underline the pharmaceutical actions and side effects of drugs.

Key words: methotrexate; chemical proteomics; target identification

Corresponding author: ZHANG Li-hua, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

(收稿日期: 2012-10-16 接受日期: 2012-12-18)

(本文编辑: 乔虹)