

张凡, 胡嘉琦, 敖慧娟, 等. MDCK 细胞成瘤相关蛋白的筛选及验证[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(10): 2009-2017.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.10.014

MDCK 细胞成瘤相关蛋白的筛选及验证

张凡^{1,2,3,4}, 胡嘉琦⁴, 敖慧娟^{1,2,3,4}, 李睿^{1,2,3,4}, 蓝雯琳⁴, 谈笑⁴, 乔自林^{1,2,3,5},
杨琨^{1,2,3,4}

(1.西北民族大学细胞基质疫苗关键技术与产业化教育部工程研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2.西北民族大学甘肃省动物细胞技术创新中心, 甘肃 兰州 730030; 3.西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030; 4.西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030; 5.甘肃省生物工程材料工程研究中心, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 为明确 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞成瘤机制, 本研究基于数据非依赖性采集质谱 (DIA-MS) 技术, 以非成瘤性 MDCK 细胞与高成瘤性 MDCK 细胞为供试材料, 分析不同成瘤性 MDCK 细胞的蛋白质表达差异。结果表明, 非成瘤性 MDCK 细胞与高成瘤性 MDCK 细胞中共鉴定到 11 359 个蛋白质, 其中差异倍数 (FC) > 1.5 且校正 $P < 0.05$ 的差异蛋白质数量为 163 个。非成瘤性 MDCK 细胞中 93 个差异蛋白质上调表达, 70 个差异蛋白质下调表达。差异蛋白质主要参与蛋白质磷酸化、胞内信号转导及肽酶活性负调控, 且功能富集于细胞外空间。2 个成瘤关键蛋白质双皮质素样激酶 1 (*DCLK1*) 和组织因子通路抑制因子 2 (TFPI2) 的实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 结果显示, 非成瘤性 MDCK 细胞中, *DCLK1* 基因相对表达水平极显著低于成瘤性 MDCK 细胞, *TFPI2* 基因相对表达水平极显著高于成瘤性 MDCK 细胞。本研究结果为 MDCK 细胞成瘤机制及肿瘤标志物筛选提供了潜在分子调控靶点。

关键词: MDCK 细胞; 数据非依赖性采集质谱 (DIA-MS); 成瘤性; 双皮质素样激酶 1 (*DCLK1*); 组织因子途径抑制剂 2 (TFPI2)

中图分类号: Q942.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)10-2009-09

Screening and verification of tumor-associated proteins in MDCK cells

ZHANG Fan^{1,2,3,4}, HU Jiaqi⁴, AO Huijuan^{1,2,3,4}, LI Rui^{1,2,3,4}, LAN Wenlin⁴, TAN Xiao⁴,
QIAO Zilin^{1,2,3,5}, YANG Kun^{1,2,3,4}

(1. Engineering Research Center of Key Technology and Industrialization of Cell Matrix Vaccine of Ministry of Education, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Tech Innovation Center of Animal Cell, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 3. Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 4. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 5. Gansu Provincial Bioengineering Materials Engineering Research Center, Lanzhou 730030, China)

收稿日期: 2025-04-11

基金项目: 甘肃省青年人才项目 (2025QNGR63); 甘肃省高等学校教师创新基金项目 (2023B-055); 兰州市青年科技人才创新基金项目 (2023-QN-70); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (31920250051, 31920250071)

作者简介: 张凡 (2002-), 男, 湖南张家界人, 硕士研究生, 主要从事生物工程研究。 (Tel) 15174462439; (E-mail) 2495458049@qq.com

通讯作者: 杨琨, (E-mail) 186152592@xbmu.edu.cn

Abstract: In order to clarify the tumorigenic mechanism of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, based on data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) technology, non-tumorigenic MDCK cells and highly tumorigenic MDCK cells were used as test materials in this study to analyze the protein expression differences of different tumorigenic MDCK cells. The results showed that a total of 11 359 proteins were identified in non-tumorigenic MDCK cells and highly tumorigenic MDCK cells, of which

the number of differentially expressed proteins with fold change (FC) >1.5 and corrected $P<0.05$ was 163. In non-tumorigenic MDCK cells, 93 differentially expressed proteins were up-regulated and 70 differentially expressed proteins were down-regulated. Differentially expressed proteins were mainly involved in protein phosphorylation, intracellular signal transduction and negative regulation of peptidase activity, and their functions were enriched in extracellular space. Results of real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot analysis of two key tumorigenic proteins, doublecortin-like kinase 1 (*DCLK1*) and tissue factor pathway inhibitor 2 (*TFPI2*) showed that the relative expression level of *DCLK1* gene in non-tumorigenic MDCK cells was highly significantly lower than that in tumorigenic MDCK cells, and the relative expression level of *TFPI2* gene was highly significantly higher than that in tumorigenic MDCK cells. The results of this study provide potential molecular regulatory targets for the tumorigenic mechanism of MDCK cells and the screening of tumor markers.

Key words: MDCK cell; data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS); tumorigenic; doublecortin-like kinase 1 (*DCLK1*); tissue factor pathway inhibitor 2 (*TFPI2*)

MDCK 细胞系是由 Madin 和 Darby 于 1958 年从美国雌性可卡犬的肾脏中提取的上皮样细胞而建立的,通常以贴壁方式生长。MDCK 细胞系具有病毒感染效率高、增殖迅速、抗性强的适应无血清生长条件等特点,被认为是生产甲型流感病毒疫苗和乙型流感病毒疫苗^[1-3]最合适的细胞系之一。然而,由于 MDCK 细胞的成瘤性,用其生产的疫苗安全性一直存在着争议^[4-5]。因此,开发非成瘤性 MDCK 细胞系对疫苗生产具有双重优势:一方面可有效降低下游纯化工艺的复杂度,另一方面能从源头上消除疫苗生产用细胞系的潜在成瘤风险。这种基于细胞基质安全性的技术突破,对于提升流感疫苗的生物安全性和临床应用可靠性具有重要意义。乔自林等^[6]通过单细胞克隆培养与多轮筛选,成功获得两株遗传稳定的无成瘤性 MDCK 细胞(MDCK-CL09, MDCK-CL35)。经连续传代培养验证,两株细胞均可稳定传代 50 次以上,且染色体数目及结构均保持正常^[7]。持续观察接种高剂量非成瘤性 MDCK 细胞的裸鼠 12 周,发现试验动物均未出现肿瘤结节,病理检测亦未见异常增殖现象,说明非成瘤性 MDCK 细胞系具有较高的安全性^[8]。高成瘤性细胞系(MDCK-W73)的高通量分析结果表明,这些细胞中多个常见肿瘤相关通路能被特定的靶基因激活。如 *lncRNA MSTRG.1056.2* 直接调控人表皮生长因子受体 3 (*ERBB3*) 激活 PI3K-Akt 通路,促进肿瘤发生^[9]。

蛋白质组学能大规模地鉴定和量化特定样品中蛋白的表达水平、翻译后修饰、蛋白-蛋白相互作用等特征,是生物学和临床医学的有效分析工具^[10]。近年来,质谱仪和生物信息学的技术革新促进了数据非依赖性采集(DIA)技术^[11]的发展。DIA 是一种质谱技术,可用于蛋白质鉴定和复杂蛋白质样品的定量,具有定量一致性、准确性和可重复性,可以

进行定量优化和蛋白质水解动态扩增^[12-13]。将 DIA 技术和定量交联质谱(QCLMS)技术相结合(DIA-QCLMS)可以检测复杂混合物中交联肽的变化量^[14]。DIA 与从头合成测序技术(DeepNovo-DIA)结合可以鉴定人类抗体和抗原中的新肽^[15]。然而,目前基于 DIA 技术的不同致瘤 MDCK 细胞的蛋白质组学研究分析尚未得到开展。

因此,本研究利用 DIA 技术检测不同成瘤性 MDCK 细胞中的差异表达蛋白,并筛选 MDCK 细胞中稳定存在的两种潜在成瘤性生物标志物。随后,利用 RT-qPCR 和蛋白质免疫印迹(Western blot)验证相关因子在不同成瘤性 MDCK 细胞中的表达差异,为进一步探索 MDCK 细胞成瘤性的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

高成瘤性 MDCK 细胞 MDCK-A、MDCK-B 和 MDCK-C 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。非成瘤性 MDCK 细胞 MDCK-CA005、MDCK-CB057、MDCK-CC066 均为西北民族大学生物工程与技术国家重点实验室克隆保存。分别取 1 mL 冷冻的高成瘤性与非成瘤性 MDCK 细胞,与 5 mL 10% NBS/DMEM 培养基(兰州民海生物工程有限公司产品)混合后,于 T25 方瓶中进行复苏 10 min。然后在细胞培养箱中于 37 °C 进行继代培养,共培养 40 代,每代培养 2 d。继代培养后的细胞悬液(每 1 mL 含 MDCK 细胞数量 5×10^7 个)通过皮下注射的方式注射至 8 周龄免疫缺陷雌性 BALB/c 裸鼠(购于北京活力河实验动物科技有限公司)腋下,每只裸鼠注射 200 μ L,每种细胞悬液注射 10 只,用以评估 MDCK 细胞的成瘤潜能。分别以 HeLa 细胞和 MRC-5 细胞(甘肃省动物细胞技术

创新中心提供)作为阳性对照和阴性对照。成瘤潜能评估参照文献[16]进行。注射6周后对小鼠注射部位及心、肺、肝、脾、肾、脑、淋巴结等组织进行宏观和微观检查,统计各处理裸鼠的成瘤情况。试验动物护理参照文献[17]进行。西北民族大学动物试验批准号为xbmu-sm-202240。

1.2 不同成瘤性 MDCK 细胞的蛋白质样品制备

取不同成瘤性 MDCK 细胞样品 40 μL (细胞数量为 2×10^6) 分别加入 500 μL 细胞裂解液 [含 7 mol/L 尿素、2% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.1% 苯基甲基磺酰氟 (PMSF)、65 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)] 并用超声波裂解 10 min。裂解液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。用二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白质含量。取 50 μg 定量总蛋白, 用上述裂解液稀释, 定容至 50 μL 。然后加入 1 μL 1 mol/L DTT, 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 以还原二硫键。再加入 5 μL 1 mol/L 碘乙酰胺 (IAA), 室温避光 1 h, 然后加入 300 μL 80% 丙酮沉淀 2 h, 再用 50 μL 胰蛋白酶 (美国 Promega 公司产品) 消化沉淀 16 h, 得到不同成瘤性 MDCK 细胞的蛋白质样品。

1.3 光谱数据库建立

1.3.1 蛋白质样品肽段分离 蛋白质样品中所有肽混合物在缓冲液 A (20 mmol/L 氨水, pH 值 10.0) 中重新溶解, 然后利用 XBridge C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250.0 mm)、Ultimate 3000 系统 (美国 ThermoFisher Scientific 公司产品) 和高 pH 线性梯度分离器进行肽分离。高 pH 线性梯度分离器使用 pH 值 10.0 的 80% 乙腈为 B 相, 5% 到 45% 的线性梯度, 持续 40 min。色谱柱流速 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 DDA (数据依赖采集) 模式 LC-MS/MS 分析

将胰蛋白酶消化后的多肽 (蛋白样品) 经脱盐和冻干处理后, 溶解于 0.1% 甲酸水溶液中, 采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 进行分析。系统由 Orbitrap Lumos 质谱仪 (美国 ThermoFisher Scientific 公司产品)、EASY-L 1200 系统串联而成。分析柱为 Acclaim PepMap C18 分析柱 (75 μm \times 25 cm)。上样量设定为 3 μL , 采用 120 min 的梯度洗脱程序, 其中缓冲液 B (含 0.1% 甲酸的乙腈溶液) 的比例从 5% 逐步提升至 35%。在梯度洗脱过程中, 柱流量恒定 200 nL/min, 电喷雾电压 2 kV。Orbitrap Lumos 质谱仪采用数据依赖采集模式, 可在全扫描 (MS) 和二级质谱 (MS/MS) 模式中切换。其参数如下: 全扫描

(MS) 质荷比 (m/z) 范围 350~1 500, 分辨率 120 000, 自动增益控制 (AGC) 目标值设为 4×10^5 , 最长进样时间 50 ms。MS/MS 模式分辨率 15 000, AGC 目标值设为 1×10^5 , 最长进样时间 35 ms。

1.3.3 蛋白质组学分析 采用 Spectronaut X 平台 (瑞士 Biognosys 公司产品) 和 Uniprot 数据库对 DDA 模式下采集的 LC-MS/MS 原始数据进行检索。分析中引入测序文库污染物数据库进行联合检索, 用于评估样本潜在污染程度及验证胰蛋白酶酶切效率。检索参数设定为: 固定修饰选择半胱氨酸氨基甲酰化, 可变修饰包含蛋氨酸氧化。检索在前体离子与肽段水平上进行, 错误发现率 (FDR) 设定为 1%。

1.3.4 数据非依赖采集 (DIA) 模式 LC-MS/MS 分析

将 50 μg 的酶解肽段样品经 30 μL 溶剂 0.1% 甲酸水溶液重悬后, 取 9 μL 上清液与 1 μL 10 倍稀释的 iRT 标准肽混合, 利用 Orbitrap Lumos 质谱仪与 EASY-L 1200 液相系统 (美国 ThermoFisher Scientific 公司产品) 进行液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析。色谱分离采用 Acclaim PepMap C18 分析柱 (75 μm \times 25 cm), 以 200 nL/min 流速进行 120 min 梯度洗脱, B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度为 5%~35%, 进样电压为 2 kV。全扫描模式 (MS1) 的质谱采集参数设置为质荷比 (m/z) 350~1 500, 分辨率 120 000, 自动增益控制 (AGC) 目标值设为 4×10^6 , 最大注入时间 50 ms; HCD-MS/MS 模式 (MS2) 的质谱采集参数设置为: 高能碰撞解离方式, 分辨率 30 000, AGC 目标值设为 1×10^6 , 碰撞能量 32%, 附加 5% 能量补偿; 设置 60 个重叠窗口 [质荷比 (m/z) 1 窗口重叠] 进行数据非依赖采集。

1.3.5 蛋白质定性鉴定 利用 Pulsar 软件, 基于 DIA 模式采集的 LC-MS/MS 原始数据, 对 UniProt 数据库进行检索, 并设置肽段前兆阈值 (Precursor threshold) 错误发现率 (FDR) 为 1.0% 及蛋白阈值 (Protein threshold) FDR 为 1.0% 进行蛋白质定性鉴定。

1.3.6 蛋白质定量和蛋白质差异分析 利用 Pulsar 软件中的局部归一化方法对 DIA-MS 采集的肽段信号峰整体强度进行归一化处理。选择 FDR 小于 1.0% 的 MS1 肽段前 3 个峰区平均值作为蛋白质定量标准。利用 Perseus 软件, 根据 $|FC| > 1.5$ 且校正后 P 值 < 0.05 (FC 为差异倍数, P 为差异概率), 筛选不同处理差异表达蛋白质。

1.3.7 差异表达蛋白质功能富集分析 利用 DA-

VID 软件和 STRING 软件,对不同处理差异表达蛋白质进行基因本体论(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析和蛋白相互作用网络分析,以阐明相关蛋白质功能及生物学意义。

1.4 关键蛋白实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)验证

利用 TRIzol 试剂从 MDCK 成瘤细胞和 MDCK 无瘤细胞中分离总 RNA,使用 EVO M-MLV 逆转录试剂盒(湖南逸琪生物科技有限公司)生成 cDNA。以获得的 cDNA 为 RT-qPCR 模板,以 β -Actin 为内参基因,利用 Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 仪(伯乐生物科技有限公司产品)进行 RT-qPCR。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。熔解曲线分析程序为 65 °C 5 s 和 95 °C 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对表达量计算。引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

引物名称	序列(5'→3')
TFPI2-F	GCAACGCCAACAACCTTCGA
TFPI2-R	TGTGACAACCGCCAGATAGG
DCLK1-F	TTTGATGAGCGGGATAAGGC
DCLK1-R	TGTGCGGGTTCGGTAGAAG
β -Actin-F	GTCACCAACTGGGACGACATG
β -Actin-R	TGGCTGGGGTGTGAAAGTC

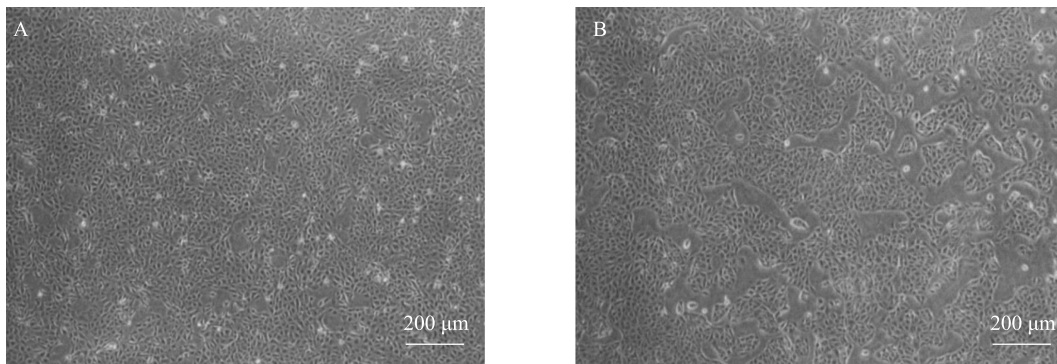
1.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)分析

将 20 μ g 总蛋白进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。然后将蛋白质转移到 0.45 μ m 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,以抗- β -actin(北京博奥森生物技术有限公司产品)为内参蛋白,用抗-DCLK1(英国 Abcam 公司产品)、抗-TFPI2(英国 Abcam 公司产品)检测目的蛋白表达水平,验证上样量一致性。随后将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司产品)室温孵育 1 h。经 TBST 缓冲液充分洗涤后,使用增强化学发光(ECL)试剂孵育膜,并利用伯乐 ChemiDoc MP 全能型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司产品)检测蛋白质信号^[18]。

2 结果与分析

2.1 高成瘤性和非成瘤性 MDCK 细胞形态特征

光学显微镜下,高成瘤性(MDCK-A)和非成瘤性 MDCK 细胞(MDCK-CA005)的形态学特征如图 1 所示。从图中可以看出,高成瘤性(MDCK-A)和非成瘤性 MDCK 细胞(MDCK-CA005)均形成单层紧密排列的细胞层,具有典型的“铺路石样”结构,细胞间连接紧密,边界清晰。与高成瘤性 MDCK 细胞相比,非成瘤性 MDCK 细胞更容易形成聚团,边界更为明显。



A:高成瘤性细胞(MDCK-A);B:非成瘤性 MDCK 细胞(MDCK-CA005)。

图 1 高成瘤性 MDCK 细胞和非成瘤性 MDCK 细胞形态特征(40 \times)

Fig.1 Morphological characteristics of highly tumorigenic MDCK cells and non-tumorigenic MDCK cells (40 \times)

2.2 MDCK 细胞系的成瘤性评估

裸鼠荷瘤试验结果如表 2 所示。高成瘤性 MDCK 细胞 MDCK-A、MDCK-B、MDCK-C 表现出显著的成瘤能力,成瘤率分别为 80%、100% 和 90%;而接种

非成瘤性 MDCK 细胞 MDCK-CA005、MDCK-CB057、MDCK-CC066 的裸鼠均未观察到肿瘤形成。阳性对照(HeLa 细胞)成瘤率为 100%,阴性对照(MRC-5 细胞)成瘤率为 0,上述结果说明本试验结果是可靠的。

表 2 MDCK 细胞系的成瘤性试验结果

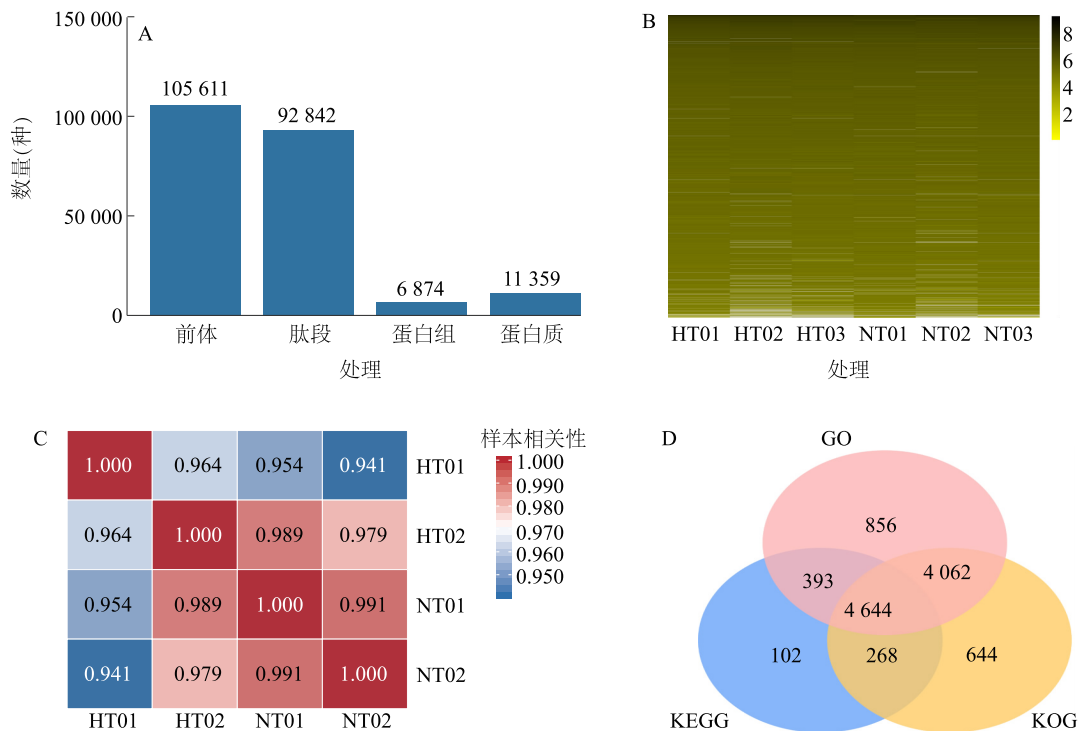
Table 2 Tumorigenicity test results in MDCK cell lines

处理	接种裸鼠数量 (只)	成瘤裸鼠数量 (只)	成瘤率 (%)
MDCK-A	10	8	80
MDCK-B	10	10	100
MDCK-C	10	9	90
MDCK-CA005	10	0	0
MDCK-CB057	10	0	0
MDCK-CC066	10	0	0
HeLa	10	10	100
MRC-5	10	0	0

2.3 不同处理蛋白质鉴定

通过 DDA (数据依赖采集) 分析共鉴定得到 14 717 种蛋白质的谱库。基于该谱库对数据非依赖采集 (DIA) 数据进行检索, 以肽段和蛋白质水平错误发现率 (*FDR*) 均低于 1.0% 为阈值, 共鉴定到

92 842 条独特肽段和 11 359 个蛋白质 (图 2A)。进一步选择 *FDR* 低于 1.0% 且信号强度最高的前 3 个 MS1 肽段峰面积进行蛋白质定量, 共成功对 10 969 个高可信度蛋白质进行定量分析。不同成瘤性 MDCK 细胞的蛋白质表达热图显示其表达模式存在明显差异 (图 2B)。为评估 DIA-MS 定量流程的稳定性与重复性, 本研究计算了所有样本间的皮尔逊相关系数。如图 2C 所示, 组内技术重复间相关性系数均高于 0.980, 证明了从样品制备到质谱检测整个流程的高度重复性和稳定性。此外, 组间相关性 (约 0.940~0.960) 虽为高度正相关, 但显著低于组内相关性, 这清晰地表明了两组细胞在蛋白质表达水平上存在系统的生物学差异。随后进一步采用 GO、KEGG 和 KOG 3 个数据库对上述 10 969 个蛋白质进行功能注释, 结果如图 2D 所示。从图中可以看出, 3 个数据库都鉴定到的蛋白质有 4 644 个, GO、KEGG 和 KOG 数据库独立鉴定到的蛋白质分别有 856 个、102 个、644 个。



A: 蛋白质鉴定结果统计图; B: 所有蛋白质的定量热图; C: 不同成瘤性 MDCK 细胞样本间的皮尔逊相关性矩阵; D: GO、KEGG、COG/KOG 数据库鉴定得到的蛋白质维恩图。HT01、HT02、HT03 分别为 MOCK-A、MOCK-B、MOCK-C 细胞样本; NT01、NT02、NT03 分别为 MOCK-CA005、MOCK-CB057、MOCK-CC066 细胞样本。

图 2 蛋白质定量定性分析

Fig.2 Quantitative and qualitative analysis of proteins

2.4 不同成瘤性 MDCK 细胞差异蛋白的生物信息学分析

通过筛选,本研究共鉴定到 163 个显著差异表达蛋白质,其中 93 个蛋白质在非成瘤性 MDCK 细胞中呈特异性高表达,70 个蛋白质呈低表达(图 3A)。双皮质素样激酶 1(*DCLK1*)和组织因子途径抑制剂 2(TFPI2)作为关键候选蛋白质,分别位于火山图的下调与上调区域(图 3B)。差异蛋白基因本体论(GO)功能富集结果如图 3C 所示。从图中可以看出,成瘤性差异表达相关蛋白显著富集在细胞进程、单细胞生物进程及代谢进程等生物学过程,细胞、细胞部分及细胞器等细胞组分及结合、活性等分子功能。KEGG 代谢通路富集结果如图 3D 所示。从图中可以看出,与高成瘤性 MDCK 细胞相比,非成瘤性 MDCK 细胞主要富集在癌症中的胆碱代谢、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、丁酸代谢、甘油酯代谢及 *D*-谷氨酰胺代谢等途径。同时,差异蛋白显著关联于肿瘤相关 microRNA 调控、膀胱癌发生机制,以及心肌疾病相关通路(如病毒性心肌炎、扩张型/肥厚型心肌病)和心肌细胞肾上腺素能信号传导。基于 STRING 等蛋白质互作数据库,对筛选的 50 个核心蛋白进行蛋白质互作网络构建,结果如图 3E 所示。*DCLK1* 和 TFPI2 作为关键节点,与多个差异蛋白形成相互作用。*DCLK1* 可能通过连接信号转导相关蛋白(如激酶或磷酸化酶)参与成瘤调控;TFPI2 与细胞外基质(ECM)或蛋白酶抑制相关的蛋白质存在相互作用,说明 TFPI2 蛋白可能通过维持 ECM 稳定来抑制肿瘤发展。蛋白质互作网络揭示了差异蛋白间的多层次调控关系,为阐明肿瘤形成与调控机制提供了重要线索。

2.5 不同成瘤性 MDCK 细胞中 *DCLK1* 和 TFPI2 蛋白表达差异验证

不同成瘤性 MDCK 细胞中 *DCLK1* 和 TFPI2 基因的相对表达水平如图 4A 所示。从图中可以看出,非成瘤性 MDCK 细胞中,*DCLK1* 的 mRNA 相对表达水平极显著低于高成瘤性 MDCK 细胞,而 TFPI2 的 mRNA 相对表达水平极显著高于高成瘤性 MDCK 细胞。蛋白质免疫印迹(Western blot)结果显示,非成瘤性 MDCK 细胞中,*DCLK1* 蛋白相对表达水平极显著低于高成瘤性 MDCK 细胞,而 TFPI2 蛋白的相对表达水平显著高于高成瘤性 MDCK 细胞(图 4B)。因此,选择 *DCLK1* 作为影响 MDCK 细胞成瘤性的靶点,更有利于阐明 MDCK 细胞的成瘤

机制。

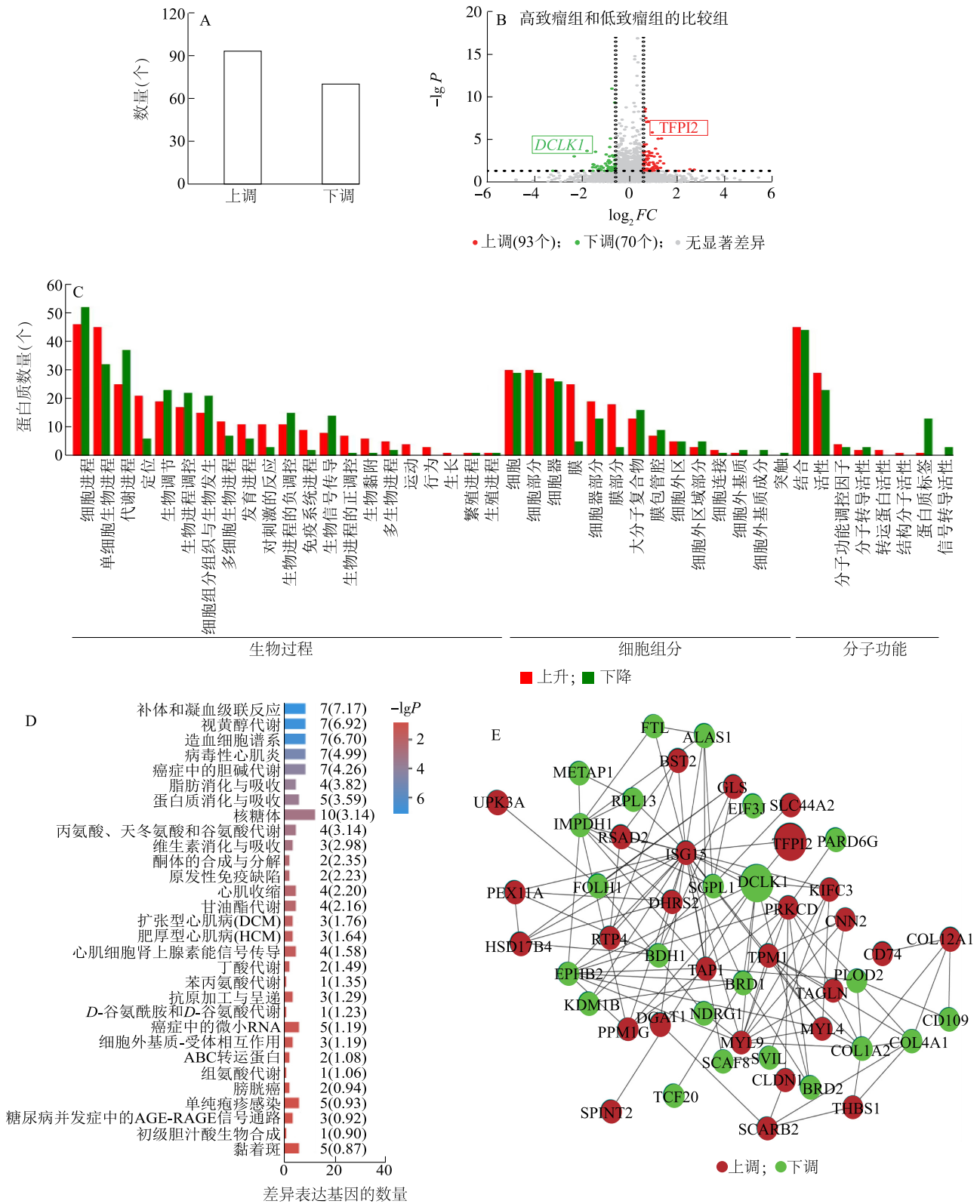
3 讨论

肿瘤相关蛋白主要参与肿瘤细胞形成、异种移植肿瘤生长和血管生成^[19]、细胞迁移和侵袭^[20]、肿瘤转移^[21]。因此,探索肿瘤相关蛋白的调控机制,对于揭示相关肿瘤治疗的新靶点具有重要意义。

DCLK1 是细胞质中的一种微管相关蛋白质,可催化微管聚合^[22]。*DCLK1* 作为一种肿瘤干细胞标记物,在许多类型肿瘤中高度表达,是癌症治疗的重要蛋白激酶靶点^[23]。Nevi 等^[24]研究发现,在原发性胆管肿瘤干细胞培养中 *DCLK1* 具有抗肿瘤作用,可能是胆管癌的有效治疗靶点。同样,*DCLK1* 亦是结直肠癌细胞的候选标志物,在结直肠癌的早期诊断和治疗中起重要作用^[25]。尽管 *DCLK1* 作为肿瘤治疗的靶点已有一些研究,但 *DCLK1* 在肿瘤形成、发展过程中的作用及其与其他蛋白质的互作机制仍不够明确^[26]。本研究发现,非成瘤性 MDCK 细胞中,*DCLK1* 基因的相对表达水平极显著低于高成瘤性细胞,这与前人研究结果^[24-25]一致。由于 *DCLK1* 基因在多种肿瘤中高表达,推测其可能是 MDCK 细胞成瘤性增强的驱动因素,但具体因果关系还需要通过 *DCLK1* 基因的过表达或敲除试验进行进一步验证。非成瘤性 MDCK 细胞中,*DCLK1* 基因的低表达可能还通过调控 PI3K-Akt、Wnt/ β -catenin 等信号通路来影响细胞增殖和存活^[27]。此外,*DCLK1* 可能还参与肿瘤微环境的调节,如血管生成和免疫逃逸等^[28]。

TFPI2 是一种具有 Kunitz 结构域的蛋白水解酶抑制剂,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族^[29-30]。TFPI2 在前列腺癌^[31]、胰腺导管腺癌^[32]、胃癌^[33]、非小细胞肺癌^[34]等多种恶性肿瘤中呈低表达,并且与各类恶性肿瘤的发展密切相关。本研究结果显示,非成瘤性 MDCK 细胞中,TFPI2 基因呈高表达,说明 TFPI2 基因可能通过维持细胞外基质稳定性抑制肿瘤微环境的形成^[35],还可能通过阻断基质金属蛋白酶(MMPs)介导的细胞外基质重塑^[36],抑制细胞迁移与侵袭能力,从而降低成瘤性。

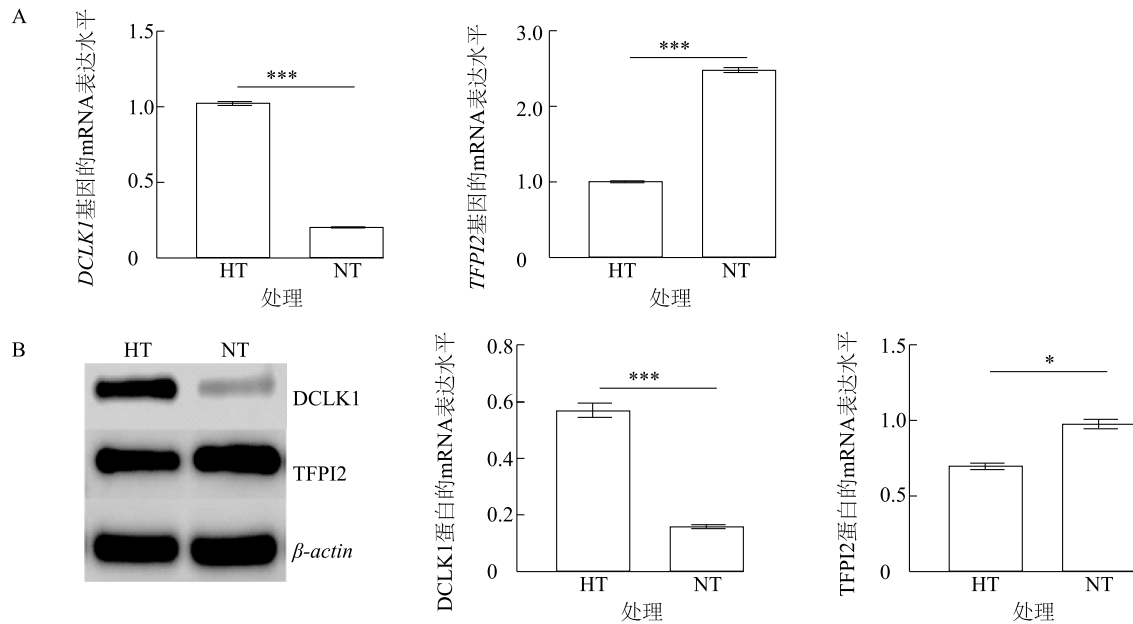
DIA 是一种质谱技术,可以对复杂蛋白质样品进行蛋白质鉴定和定量分析。本研究使用该技术分析不同成瘤性 MDCK 细胞蛋白表达特征,并通过生物信息学分析差异蛋白功能及代谢通路。



A:不同成瘤特性差异表达蛋白数量;B:差异表达蛋白火山图;C:差异表达蛋白的基因本体论(GO)功能分析;D:差异表达蛋白的代谢途径富集;E:差异表达蛋白互作网络分析。FC:差异倍数;上调、下调:与高成瘤性 MDCK 细胞相比,非成瘤性 MDCK 细胞中蛋白质表达上调或下调。

图3 不同成瘤性 MDCK 细胞差异蛋白的生物信息学分析

Fig.3 Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins in different tumorigenic MDCK cells



A:不同成瘤性 MDCK 细胞中, *DCLK1* 和 *TFPI2* 基因的 mRNA 表达水平; B:不同成瘤性 MDCK 细胞中, *DCLK1* 和 *TFPI2* 蛋白的相对表达水平; HT:高成瘤性 MDCK 细胞; NT:非成瘤性 MDCK 细胞。*、*** 分别表示处理间在 0.05 和 0.001 水平上差异显著。

图 4 不同成瘤性 MDCK 细胞中 *DCLK1* 和 *TFPI2* 的表达差异

Fig.4 Different expression of *DCLK1* and *TFPI2* in different tumorigenic MDCK cells

4 结论

本研究通过 DIA-MS 技术发现,高成瘤性 MDCK 细胞与非成瘤性 MDCK 细胞存在 163 个差异表达蛋白质,其中 93 个蛋白质在非成瘤性细胞中上调表达,70 个蛋白质下调表达。差异表达蛋白质主要与细胞信号传导、蛋白质磷酸化等过程相关,还与细胞外空间密切相关。RT-qPCR 和 Western blot 验证发现,非成瘤性 MDCK 细胞中 *DCLK1* 基因的相对表达量极显著低于成瘤性 MDCK 细胞。*DCLK1* 基因可能是调控 MDCK 细胞成瘤性的关键因子。

参考文献:

- [1] TREE J A, RICHARDSON C, FOOKS A R, et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains[J]. *Vaccine*, 2001, 19(25/26):3444-3450.
- [2] MERTEN O W, KIERULFF J V, CASTIGNOLLES N, et al. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals; use of various cell lines[J]. *Cytotechnology*, 1994, 14(1):47-59.
- [3] MERTEN O W, KALLEL H, MANUGUERRA J C, et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses [J]. *Cytotechnology*, 1999, 30(1/2/3):191-201.
- [4] JOB E R, BOTTAZZI B, GILBERTSON B, et al. Serum amyloid P is a sialylated glycoprotein inhibitor of influenza A viruses[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59623.
- [5] OMEIR R L, TEFEREDEGNE B, FOSEH G S, et al. Heterogeneity of the tumorigenic phenotype expressed by Madin-Darby canine kidney cells[J]. *Comparative Medicine*, 2011, 61(3):243-250.
- [6] 乔自林, 马桂兰, 李明生, 等. 无成瘤性 MDCK 细胞克隆株: CN106801031A[P]. 2017-06-06.
- [7] 马忠仁, 王家敏, 马桂兰, 等. 无成瘤性 MDCK 细胞克隆株: CN106884003A[P]. 2017-06-23.
- [8] 敖慧娟, 郭寿清, 阿依木古丽·阿不都热依木, 等. 不同成瘤性 MDCK 细胞中 SQSTM1 的差异表达验证[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2020, 50(8):51-55.
- [9] QIAO Z L, YANG D, LIU L X, et al. Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in MDCK cell lines with high and low tumorigenicities[J]. *Genomics*, 2020, 112(2):1077-1086.
- [10] SONG Y M, ZHONG L J, ZHOU J T, et al. Data-independent acquisition-based quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers of kidney cancer[J]. *Proteomics Clinical Applications*, 2017, 11(11/12):201700066.
- [11] HU A, NOBLE W S, WOLF-YADLIN A. Technical advances in proteomics; new developments in data-independent acquisition[J]. *F1000Research*, 2016, 5:419.
- [12] REUBSAET L, SWEREDOSKI M J, MORADIAN A. Data-independent acquisition for the orbitrap Q exactive HF; a tutorial[J].

- Journal of Proteome Research, 2019, 18(3):803-813.
- [13] GILLET L C, NAVARRO P, TATE S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(6):O111. 016717.
- [14] MÜLLER F, KOLBOWSKI L, BERNHARDT O M, et al. Data-independent acquisition improves quantitative cross-linking mass spectrometry[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2019, 18(4):786-795.
- [15] TRAN N H, QIAO R, XIN L, et al. Deep learning enables *de novo* peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry[J]. Nature Methods, 2019, 16(1):63-66.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [17] 中华人民共和国国务院. 实验动物管理条例[EB/OL]. 2017-03-01. https://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5219148.htm.
- [18] 敖慧娟. MDCK 细胞成瘤相关蛋白的筛选及其作用机制的研究[D]. 兰州: 西北民族大学, 2021.
- [19] WANG D Y, HONG Y, CHEN Y G, et al. PEST-containing nuclear protein regulates cell proliferation, migration, and invasion in lung adenocarcinoma[J]. Oncogenesis, 2019, 8(3):22.
- [20] LEU S J, LEE Y C, LEE C H, et al. Generation and characterization of single chain variable fragment against alpha-enolase of *Candida albicans* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8):2903.
- [21] RIWALDT S, BAUER J, PIETSCH J, et al. The importance of caveolin-1 as key-regulator of three-dimensional growth in thyroid cancer cells cultured under real and simulated microgravity conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12):28296-28310.
- [22] PATEL O, DAI W W, MENTZEL M, et al. Biochemical and structural insights into doublecortin-like kinase domain 1 [J]. Structure, 2016, 24(9):1550-1561.
- [23] CHENG L N, YANG Z J, GUO W H, et al. DCLK1 autoinhibition and activation in tumorigenesis[J]. The Innovation, 2022, 3(1):100191.
- [24] NEVI L, DI MATTEO S, CARPINO G, et al. DCLK1, a putative stem cell marker in human cholangiocarcinoma [J]. Hepatology, 2021, 73(1):144-159.
- [25] RAZI S, SADEGHI A, ASADI-LARI Z, et al. DCLK1, a promising colorectal cancer stem cell marker, regulates tumor progression and invasion through miR-137 and miR-15a dependent manner [J]. Clinical and Experimental Medicine, 2021, 21(1):139-147.
- [26] AGULTO R L, ROGERS M M, TAN T C, et al. Autoregulatory control of microtubule binding in doublecortin-like kinase 1 [J]. eLife, 2021, 10:e60126.
- [27] LIANG Z W, GE Y, LI J J, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway offer a promising therapeutic strategy for cholangiocarcinoma patients with high doublecortin-like kinase 1 expression [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2024, 150(7):342.
- [28] YE L, LIU B B, HUANG J L, et al. DCLK1 and its oncogenic functions: a promising therapeutic target for cancers [J]. Life Sciences, 2024, 336:122294.
- [29] CHAND H S, SCHMIDT A E, BAJAJ S P, et al. Structure-function analysis of the reactive site in the first kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(17):17500-17507.
- [30] HERMAN M P, SUKHOVA G K, KISIEL W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(9):1117-1126.
- [31] KOBAYASHI H, IMANAKA S. Toward an understanding of tissue factor pathway inhibitor-2 as a novel serodiagnostic marker for clear cell carcinoma of the ovary [J]. The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2021, 47(9):2978-2989.
- [32] SATO N, PARKER A R, FUKUSHIMA N, et al. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(5):850-858.
- [33] TAKADA H, WAKABAYASHI N, DOHI O, et al. Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is frequently silenced by aberrant promoter hypermethylation in gastric cancer [J]. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2010, 197(1):16-24.
- [34] ROLLIN J, IOCHMANN S, BLÉCHET C, et al. Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer [J]. British Journal of Cancer, 2005, 92(4):775-783.
- [35] KONDURI S D, TASIQU A, CHANDRASEKAR N, et al. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells *in vitro* [J]. International Journal of Oncology, 2001, 18(1):127-131.
- [36] ZHENG L L, HUANG J, SU Y, et al. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor 2 attenuates trophoblast proliferation and invasion in preeclampsia [J]. Human Cell, 2020, 33(3):512-520.

(责任编辑:石春林)