

应用蛋白质组学方法研究大肠癌分化相关蛋白

裴海平¹, 曾 亮², 朱 红³, 甘 毅⁴, 李宜雄¹

A Proteomic Study on Differences among High and Low Differentiation Colorectal Carcinoma Tissues

PEI Hai-ping¹, ZENG Liang², ZHU Hong³, GAN Yi⁴, LI Yi-xiong¹

1. Department of Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Pathology, Hunan Tumor Hospital; 3. Department of Radiotherapy, Xiangya Hospital, Central South University; 4. Department of Surgery, Xiangya 3rd Hospital, Central South University

Abstract : **Objective** To explore the proteomic differences among the high and low differentiation colorectal carcinoma tissues by using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry. **Methods** In sample preparation, the fresh carcinoma tissue was cut off from the specimen and these tissues were classified into three groups according to the postoperative pathological diagnosis: high differentiation carcinoma, low differentiation carcinoma and normal epithelium. Protein separation was performed using 2-DE. After silver-staining, the images of the gels were scanned and analyzed to find the differentially expressed protein-spots in each group. We acquired the peptide mass fingerprintings (PMF) of differentially expressed protein-spots by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and identified the proteins by data searching in the Mascot-database. Protein expression was assayed by immunohistochemistry. **Results** We detected calreticulin precursor and O98007-like protein expressed exclusively and AA H10915 和 AA H75839 increased in both the two cancer groups. In high differentiation group, E980237 and tubulin beta chain expressed exclusively and triose-phosphate isomerase and fatty acid-binding protein increased. In low differentiation group, 2 HHEB and Zinc finger protein312-like protein expressed exclusively and Q9 TQL5-like protein increased (over than 5 fold). The HSP27 positive rate is significantly higher in high differentiation group than low differentiation group. **Conclusion** Some differentially expressed proteins existed in high and low differentiation colorectal carcinoma as well as the normal colon mucosa. These proteins are related with colorectal carcinoma cell differentiation.

Key words : Colorectal carcinoma; Differentiation; Proteomics

摘 要 : **目的** 研究人大肠癌高、低分化组织及癌旁正常粘膜之间蛋白质组表达差异,寻找和鉴定高、低分化癌组织之间差异表达蛋白。**方法** 收集新鲜大肠癌标本,根据病理诊断结果分为高分化癌组、低分化癌组,以癌旁正常肠粘膜作为对照。提取组织总蛋白,进行双向凝胶电泳,对得到凝胶图谱进行合成、对比和差异分析,比较和寻找高分化与低分化组织之间表达差异点。将这些差异蛋白点进行肽指纹图分析及网上数据库鉴定。应用免疫组织化学方法检测组织中蛋白质表达。**结果** 高分化和低分化癌标本中均存在钙网硬蛋白前体、O98007 蛋白类似物的特异表达以及 AA H10915、AA H75839 蛋白表达上调;在高分化癌组中存在 E980237 蛋白的特异表达以及三磷酸异构酶、肝脂肪酸结合蛋白表达上调;在低分化癌组中存在 2 HHEB (氧化血红蛋白变异体)和锌指蛋白 312 类似物的特异表达以及 Q9 TQL5 蛋白 (Fragment)类似物表达上调。HSP27 在大肠癌高分化组的表达率显著高于低分化组。**结论** 高分化癌组织与低分化癌组织之间存在蛋白质组差异表达,这些蛋白与大肠癌细胞分化有关。

关键词 : 大肠癌;组织分化;蛋白质组学

中图分类号 : R730.231;R735.3⁺4 **文献标识码 :** A **文章编号 :** 1000-8578(2007)04-0253-03

收稿日期 : 2006-04-27; **修回日期 :** 2006-06-14

作者单位 : 1. 410008 长沙,中南大学湘雅医院外科; 2. 湖南省肿瘤医院病理科; 3. 中南大学湘雅医院放疗科; 4. 中南大学湘雅三医院外科

作者简介 : 裴海平 (1966-),男,博士,副教授,主要从事胃肠道肿瘤的防治及发生发展的分子机制的研究

0 引言

大肠癌是当前严重危害人类健康的恶性肿瘤^[1]。肿瘤分化程度是影响大肠癌预后的非常重要的因素。一般认为分化越差的肿瘤预后也越差,但其机制还没有完全阐明。国内外已有应用蛋白质组

学技术研究大肠癌细胞株发生、耐药和转移机制的报道^[3,4],在本研究中将蛋白质组学方法用于比较高、低分化大肠癌组织差异表达蛋白。

1 材料与方法

本研究中用于蛋白质组研究的组织标本取自中南大学湘雅医院普外科,共 10 例,经病理诊断 5 例为高分化腺癌(高分化组),5 例为低分化腺癌(低分化组);10 例配对的正常肠组织均距离肿块边缘至少 15cm(对照组)。40 例高分化大肠癌和 40 例低分化大肠癌组织取自湖南省肿瘤医院病理科。

IPGp Hor 电泳系统为 Pharmacia 公司产品;Protein II 垂直平板电泳槽、PDQUEST 2D 胶分析软件均为 Bio-Rad 公司产品。质谱仪为英国 Micromass 公司的电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱 Micro Q-TOF。蛋白质组双向凝胶电泳分析试剂以及 Q-TOF 质谱分析试剂的具体配制方法见参考书目^[2]。

1.1 组织蛋白质的提取 对组织标本进行裂解,低温匀浆,离心,将蛋白上清液吸出备用。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(pierce 公司)测定蛋白浓度。

1.2 固相 pH 梯度 IEF-SDS 蛋白质组双向凝胶电泳分析^[6] 将蛋白样品上样。将 IPG 胶条放入电泳槽进行 IEF 电泳、冲洗、平衡;然后进行 SDS-PAGE 电泳。将胶条进行固定、敏化、漂洗、银染、显影。凝胶进行扫描获取图像,用 Imagemaster 2D Elite 4.01 分析软件依次进行强度校正点检测、背景消减、匹配、1D 及 2D 校正,建立平均凝胶,量化获取蛋白斑点,最后得到各组不同样本的平均蛋白质点数。蛋白斑点位置的重复性按 Corbett 法进行计算。采用方差分析即 ONEWAY ANOVA F 检验分析高分化组、低分化组和对照组间总蛋白质点数的差异。统计软件为 SPSS 10.0。

1.3 MALDI TOF 肽质指纹图分析及蛋白质库搜寻鉴定 将样品酶解、脱盐后进行质谱分析,用 Mascot 软件(Matrix science Ltd., U K)中的串联质谱数据库搜寻(MS/MS Ion Search)功能进行搜索。

免疫组织化学:将组织切片脱蜡至水, H₂O₂ 处理,在枸橼酸/枸橼酸钠抗原修复液中进行组织抗原微波修复;依次滴加正常血清及一抗(HSP27),按免疫组化 SP 法完成,DAB 显色,Mayer 苏木精复染。用 PBS 液代替一抗作为空白对照;用公司提供阳性切片作为对照。阳性信号定位于细胞浆,细胞浆中可见棕黄色或棕褐色颗粒。根据阳性细胞在全部癌细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果^[8]。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳结果

对 5 例高分化腺癌和 5 例低分化腺癌和与之相对应的癌旁正常粘膜进行了 2-DE,蛋白质斑点清晰可辨。高、低分化大肠癌组和癌旁正常粘膜的大部分蛋白斑点均位于分子量 20~90kd,pH4~8 的区域,特别是 30~85kd,pH 4.5~7.7 区域。与正常组相比,高分化癌组中特异表达或表达上调超过 5 倍的蛋白点出现 8 个,低分化癌组中有特异表达或表达上调超过 5 倍的蛋白点出现 7 个。在这 8 个和 7 个蛋白特异点中,有 4 个蛋白点位置基本相同,说明它们在高、低分化癌组中均有特异表达,可作为大肠癌高低分化组织中共同的特异性标志物。为了鉴定这些蛋白质,我们在显示清晰的凝胶上将上述差异蛋白点切下,进行了质谱分析和网上鉴定,见图 1。

2.2 质谱鉴定结果

将寻找到的特异蛋白和表达增加超过 5 倍以上的蛋白斑点进行了质谱分析和数据库鉴定,发现在高、低分化癌组中均有特异表达或升高的蛋白有 4 个:calreticulin precursor(钙网硬蛋白前体)、O98007, MHC class I antigen 蛋白类似物(主要组织相容性复合体的片段)、AAH10915 蛋白、AAH75839 蛋白。在高分化癌组中高表达的 4 个蛋白,包括热休克蛋白 27 序列、微管蛋白 β -链、丙糖磷酸异构酶、肝脂肪酸结合蛋白。在低分化癌组中有特异表达或升高的蛋白 3 个,包括氧合血红蛋白突变体;锌指蛋白 312 类似物;Fragment 类似物。

2.3 免疫组化验证结果

HSP27 在分化程度不同的大肠癌组织中表达的免疫组织化学结果显示,HSP27 在高分化大肠癌组织中的阳性表达率显著高于其在低分化大肠癌组织中的阳性表达率,与蛋白质组学筛选结果基本一致,见图 2。

表 1 大肠癌高、低分化组中 HSP27 的表达

分组	n	阴性或弱阳性(例)	阳性(例)	阳性率(%)
大肠癌低分化组	40	20	20	50
大肠癌高分化组	40	4	36	90

² = 10.912, P < 0.01

3 讨论

蛋白质组学方法的不断完善使有效研究基因功能成为可能。已有报道蛋白质组学技术应用于大肠癌研究。Stulik 等^[4]采用双向凝胶电泳分析了 23 例大肠癌组织和正常粘膜组织之间的蛋白质组表达差异,发现癌组织中的一种钙结合蛋白 S100A9 表

达显著上调。Stierum 等^[3]报道应用双向电泳和质谱分析了大肠癌 Caco2 细胞系蛋白质组表达,发现有 18 种蛋白质与其增殖和分化有关。

一般认为,肿瘤分化程度越差,恶性程度就越高,分化程度对肿瘤生物学特征,如生长速度、侵袭转移、预后等有重要影响,故阐明大肠癌不同分化程度形成的机制在大肠癌预后预测、个体化治疗中意义重大。将筛选的差异蛋白分为 4 类:第 1 类与肿瘤细胞的发生、增殖和分裂有关,如热休克蛋白、微管蛋白、锌指蛋白 312 类似物。热休克蛋白(HSP)是一类与机体应激反应相关的蛋白家族,有保护细胞内部动态平衡以及抗肿瘤功能^[5,6]。通过临床病理标本的免疫组化进一步研究,初步确定 HSP27 在高分化腺癌中表达更强,具体机制还有待进一步研究。锌指蛋白可以协助完成细胞的许多功能,如细胞分裂、分化等^[7]。有人报道在 80 % 以上的大肠癌中有锌指蛋白高表达,本实验中发现锌指蛋白在低分化组中特异表达,可能与其在大肠肿瘤中促进分裂、增殖等功能有关。第 2 类蛋白与肿瘤细胞的能量代谢有关,如丙糖磷酸异构酶、肝脂肪酸结合蛋白、氧化血红蛋白突变体;第 3 类与组织相容性抗原有关,如 O98007 和 Q9TQL5 蛋白片段;第 4 类蛋白的作用不明,如钙网硬蛋白前体、AAH10915 和 AAH75839 蛋白等。第 2 类蛋白的特异表达或表达增强可能与肿瘤细胞的增殖、分裂和能量代谢比较活跃的状态有关,而丙糖磷酸异构酶、肝脂肪酸结合蛋白在高分化组表达上调而在低分化组上调不明显,可能与低分化肿瘤组织主要以无氧糖酵解的方式进行能量供应相适应,还可能因为低分化肿瘤细胞的蛋白质分解速度高于蛋白质的合成速度。第 3 类中与组织相容性抗原有关的蛋白,推测是因为在大肠肿瘤发生和发展过程中,存在着机体对肿瘤组

织的免疫攻击和肿瘤细胞的免疫逃避二者共同作用而引起肿瘤组织的组织相容性抗原发生变化。第 4 类蛋白因为在数据库中还没有很好的进行功能鉴定,有待进一步研究。本实验结果与以往的报道对照,有的蛋白其功能得到了肯定,也有的蛋白表达的功能不能肯定,不排除样本量的因素和实验误差的原因,还需要进一步的研究来验证。

(本文图见插页)

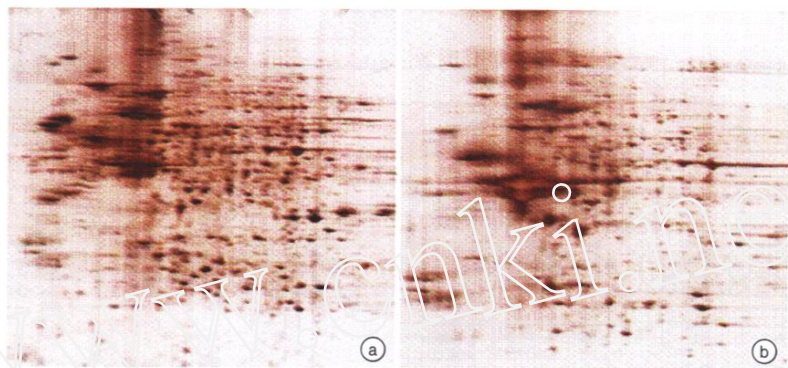
参考文献:

- [1] 严律南,李立. 结肠疾病[A]. 王先明,李永国. 门诊外科学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2001. 643-646.
- [2] 陈主初,梁宋平. 肿瘤蛋白质组学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2002. 33-34.
- [3] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, et al. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1650(1-2):73-91.
- [4] Stulik J, Osterreicher J, Koupilova K, et al. The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of microscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass[J]. Electrophoresis, 1999, 20(4-5):1047-1054.
- [5] Kapranos N, Kominea A, Konstantinopoulos PA, et al. Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128(8):426-432.
- [6] Lo Muzio L, Leonardi R, Mariggio MA, et al. HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(1):119-128.
- [7] Basyuk E, Coulon V, Le Digarcher A. The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas[J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(9):483-492.
- [8] 纪小龙,施作霖. 诊断免疫组织化学[M]. 军事医学科学出版社,1997. 12-31.

[编辑:贺文]

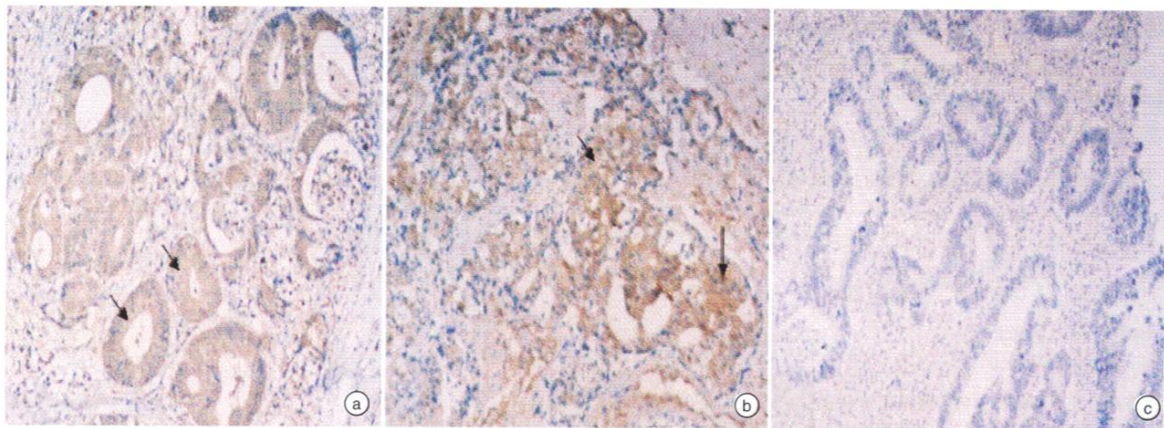
应用蛋白质组学方法研究大肠癌分化相关蛋白

(正文见 253 页)



a. 高分化腺癌组； b. 低分化腺癌组

图1 不同组织分化程度的大肠癌双向凝胶电泳图谱



a. 高分化腺癌； b. 低分化腺癌； c. 空白对照(箭头所示细胞浆中的棕色阳性信号)

图2 HSP27 在大肠高分化腺癌和低分化腺癌中的表达

TRAIL、NF- κ B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及意义

(正文见 256 页)

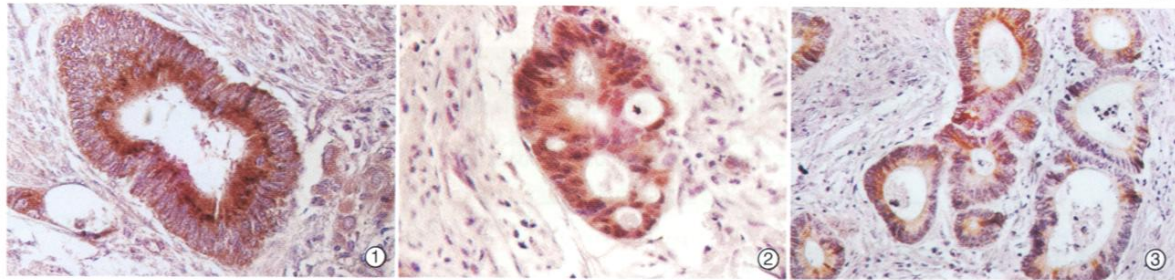


图1 TRAIL 在大肠癌中的表达 (SP × 400) 图2 NF- κ B 在大肠癌中的表达 (SP × 400)
图3 Caspase-3 在大肠癌中的表达 (SP × 400)