

肺癌转移相关蛋白的比较蛋白质组分析与鉴定*

蒋代凤^{1,2)} 应万涛¹⁾ 万晶宏¹⁾ 邱宗荫²⁾ 钱小红¹⁾ 贺福初¹⁾**

(¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所基因组学与蛋白质组学实验室, 北京 100850;

²⁾ 重庆医科大学检验系, 重庆 400016)

摘要 采用比较蛋白质组技术对肺巨细胞癌高、低转移株的蛋白质表达谱进行双向电泳分离和 MALDI-TOF 分析, 并在蛋白质和 mRNA 水平进行进一步验证, 成功鉴定了 11 个肺癌转移相关蛋白. 其中, 候选蛋白膜联蛋白 1 (ANX1)、细胞骨架蛋白 (CK18)、Rho-GDP 解离抑制剂 1 (GDIR)、原肌球蛋白 3 (TPMF)、蛋白谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶 (TGLC) 和白介素 18 (IL-18) 在肺巨细胞癌高转移株显著高表达, 而候选蛋白核氯离子通道蛋白 1 (CLIN)、蛋白质二硫键异构酶 (ER60)、肌酸激酶、硫氧还蛋白过氧化物酶 1 (PDX1) 和热休克蛋白 60 (CH60) 在肺巨细胞癌高转移株显著低表达. 大多数的候选蛋白可通过调控肿瘤细胞的生长、迁移、粘附、凋亡和肿瘤免疫等环节来影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力. 迄今为止, 还未见候选蛋白 CLIN 和 IL-18 与肺癌转移相关的报道, 提示这两种蛋白质可能为新的肺癌转移相关蛋白.

关键词 肺癌, 转移, 蛋白质组, 核氯离子通道蛋白 1, 白介素 18

学科分类号 Q503

肺癌作为威胁全世界人类健康的重大疾病, 其死亡率高达 13%, 且呈逐渐上升趋势, 主要与其广泛转移有关. 基于肿瘤细胞的异质性特点, 通过比较遗传背景相似而具有不同转移能力的肿瘤细胞, 就可获得影响肿瘤细胞转移能力的重要生物大分子, 继而可设计出肿瘤治疗的药靶. 前期的研究表明: 来源于同一母细胞株, 但具有不同转移能力的肺巨细胞癌高、低转移株 (分别命名为 PLA801D、PLA801C) 存在着转移表型的差异^[1,2], 可作为研究肿瘤转移的理想细胞模型.

目前, 肿瘤转移的分子调控机制零星研究较多, 往往强调单个或少数几个分子的作用, 缺乏在蛋白质水平的系统性、整合性的研究, 故为肿瘤转移机制的阐明带来了困难. 而蛋白质组技术在寻找肿瘤早期诊断的生物标志和新的分子治疗的药靶、评价药物的疗效方面取得的进展, 为我们研究肿瘤转移提供了思路^[3,4]. 鉴于此, 本文采用比较蛋白质组技术比较高、低转移株的蛋白质表达谱, 鉴定了多个肺癌转移相关蛋白, 这些差异表达蛋白可从一定程度上解释引起肿瘤细胞转移表型差异的原因, 并为进一步阐明肿瘤转移的机制提供了线索.

1 材料和方法

1.1 肺巨细胞癌高、低转移株的比较蛋白质组分离

1.1.1 细胞培养: 人肺巨细胞癌高 (PLA801D)、低转移株 (PLA801C) 由军事医学科学院三所陆

应麟教授提供.

1.1.2 样品处理: 收获对数生长期的细胞, 每 1×10^6 个细胞中加入 60~100 μ l 的裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 0.8% Pharmalyte 和 1% 二硫苏糖醇, 内含 2~8 mmol/L 苯甲磺酰氟 (PMSF) 以及蛋白酶抑制剂混合物) 裂解细胞. 之后, 快速冻融 3~4 个循环, 12 000 g 离心 30 min, 上清储存于 -70℃ 冰箱保存备用. 采用 Bradford 法对 PLA801C、PLA801D 的细胞总蛋白进行蛋白质浓度测定, 取等量蛋白质进行双向电泳 (2-DE) 分离.

1.1.3 PLA801C、PLA801D 细胞株总蛋白的 2-DE 分离: 分别取三批 PLA801C、PLA801D 的细胞总蛋白进行 2-DE 分离, 每批样品重复三次. 具体的实验操作步骤参照 Pharmacia 公司的仪器说明书. 在进行第一相固相 pH 梯度等电聚焦时, 分别于 pH3-10L 或 pH 4-7L 的 IPG 胶条中加入样品蛋白 400 μ g 或 600 μ g. 采用浓度为 12%, 大小为 200 mm $\times$ 200 mm, 厚 1 mm 的均匀胶进行第二相 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 电泳后将 2-DE 胶用考马斯亮蓝 R-250 进行染色鉴定.

* 国家重点基础研究资助项目 (2001CB510204, 2001CB510201, G1998051213) 和国家自然科学基金重大项目 (39730270, 39990600) 部分资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-68171208, Fax: 010-68214653

E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2002-11-26, 接受日期: 2002-12-26

1.1.4 图象分析: 利用 GS-710 光密度仪 (Bio-Rad 公司) 对经考马斯亮蓝 R-250 染色的 2-DE 胶进行扫描, 之后用 PDQUEST6.0 软件进行图像分析. 选取具有 2 倍以上量变, 以及仅在 PLA801C 或 PLA801D 的 2-DE 图谱中被考马斯亮蓝染色检测到的蛋白质点, 作为进一步基质辅助激光解吸附飞行时间质谱 (MALDI-TOF/MS) 分析的差异候选蛋白.

1.2 差异候选蛋白的 MALDI-TOF 鉴定

1.2.1 蛋白质斑点的脱色和胶上原位酶切: 切取二维电泳凝胶上的候选蛋白质斑点进行蛋白质斑点的脱色和胶上原位酶切, 之后, 提取肽混合物进行 MALDI-TOF 分析 (仪器采用 Bruker 公司的 ReFlex II).

1.2.2 数据库检索: 使用国际互联网上的蛋白质数据库 ExPASy Molecular Biology Server 提供的 PeptIdent 检索程序进行查询. 查询条件为: database (SWISS-PROT); species to be searched (MAMMALIA); all peptide masses are monoisotopic; Mass tolerance (1.0Da); enzyme (Trypsin); Cysteine is treated with iodoacetamide; Methionine is oxidized; missed cleavage site (1). 查询结果的判断依据 Gerner 等^[5]的观点.

1.3 蛋白质和 mRNA 水平的验证

1.3.1 蛋白质印迹 (1-D Western blotting) 技术验证差异候选蛋白: 收集对数生长期的细胞, 用 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白, 取等量蛋白质进行 Western blotting 分析, 实验中以肌动蛋白 (actin) 作内参照. anti-CK18 (mouse MAb, DC10), anti-IL-18 (mouse mAb, 151E3E1), anti-CH60 (mouse mAb, LK-1), anti-actin (goat polyanitbody, I 19), goat-anti-mouse IgG, rabbit-anti-goat IgG, ECL 显色试剂盒均购自 Santa Cruz 公司, anti-annexin I 抗体由 Dr. Celis 和 Dr. Gerker 惠赠.

1.3.2 半定量 RT-PCR 技术验证差异候选蛋白: 提取对数生长期的 PLA801C、PLA801D 细胞的总 RNA, 取等量的 RNA 在相同条件下进行逆转录合成 cDNA, 并在待扩增样品的 PCR 指数曲线的线性期进行 PCR 扩增, 以 β_2 -微球蛋白 (β_2 -microglobin) 为内参照与目的片段一起扩增. 待扩增片段的引物设计如下 (所有的 DNA 序列均由上海博亚公司合成): β_2 -microglobin, 5'-GCTATCCAGCGTACTCCAAAGA-3' (sense) 和 5'-AACCTGCTCAGATACATCAAACAT-3'

(antisense); ANX1, 5'-TAAGGGTGACCGATC-TGAGGAC-3' (sense) 和 5'-AGACCATCAAGG-GAATGTTTAG-3' (antisense); CLIL, 5'-CCTAG-TTTGGGTGCAAGTAGGTC-3' (sense) 和 5'-AG-ATTGTCATTGAGTGCGGTGTT-3' (antisense); IL-18, 5'-AGGAATAAAGATGGCTGCTGAA-3' (sense) 和 5'-AGCTAGAAAGTATCCTTCG-TAT-3' (antisense); ER60, 5'-GTGCTAGA-ACTCACGGACGACA-3' (sense) 和 5'-TTG-CTGGCTGCTTTTAGGAACT-3' (antisense); GDIR, 5'-CAGCGGAGAACGAGGAGGATGA-3' (sense) 和 5'-TCTGTGAAGCGGGACTTGAT-GC-3' (antisense); KCRB, 5'-ACCACCTGC-GGGTCATCTCCAT-3' (sense) 和 5'-GCAC-TGCCCAGGCAATAAGTTAGG-3' (antisense); PDX1, 5'-GTGTCGGTGGTTAGTTTCTGCG-3' (sense) 和 5'-CAACAGGGAGGGTCATTTAC-AG-3' (antisense); TGLC, 5'-GTGGCATGGT-CAACTGCAACGA-3' (sense) 和 5'-TGAT-GGCACGAACTGGAAGTGG-3' (antisense); TPMF, 5'-AATATGAAGAGGTGGCCCGTAA-3' (sense) 和 5'-CCTGACCTAGCTGGTAT-CTTGTTG-3' (antisense). PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s (循环数依据每个对象的 PCR 扩增指数曲线不同而有所不同) 72℃ 延伸 7 min.

1.3.3 RNA 印迹 (Northern blot) 技术鉴定差异候选蛋白: 提取对数生长期的 PLA801C、PLA801D 细胞的总 RNA, 取 20 μ g 总 RNA 进行甲醛变性的 RNA 电泳. 采用毛细管转移法将甲醛变性胶上的 RNA 转移至尼龙膜上. 以半定量 RT-PCR 的产物作为模板, 采取随机引物合成法合成 α -³²P 标记的探针 (Promega 公司试剂盒), 标记后的探针用 Sephadex G-50 进行纯化再变性.

2 结 果

2.1 高、低转移株的 2-DE 分离结果

先采用 pH3-10L 的 IPG 胶条进行 PLA801C、PLA801D 细胞总蛋白 2-DE 分离, 经考马斯亮蓝染色和 PDQUEST6.0 软件分析后, 共检测到了大约 850 个蛋白质点, PLA801C 与 PLA801D 2-DE 图谱间的相关性为 76%, 且差异蛋白点主要集中在 pH4~7 的范围内, 挑取了其中 9 个差异表达蛋白质点进行质谱鉴定. 其典型的 2-DE 图谱见图 1.

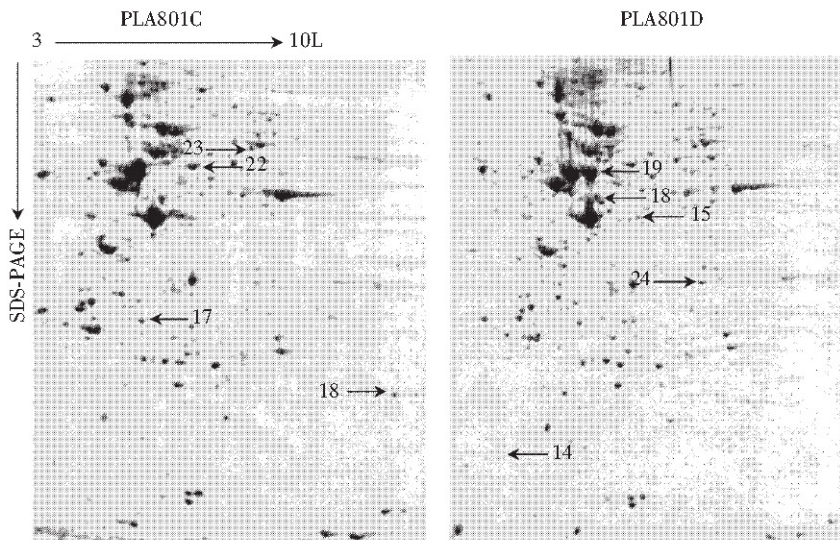


Fig. 1 Representative 2-DE gels between PLA801C and PLA801D

Coomassie Brilliant Blue R250 stain, pH3-10L. Differentially expressed proteins were indicated with arrows.

进一步采用窄范围 (pH4-7L) 的 IPG 胶条进行 2-DE 分析, 可将上样量增大至 600 μ g, 2-DE 的分辨能力大大提高, 蛋白质点分布均匀, 且有助于一些低丰度蛋白质点的检出. 经考马斯亮蓝染色和 PDQUEST 软件分析后, 确定在 PLA80C 和

PLA801D 细胞中可检出大约 900 个蛋白质点, PLA801C 和 PLA801D 细胞间的 2-DE 图谱相关性为 82%, 挑选了 15 个差异蛋白质点进行进一步的质谱鉴定. 其典型的 2-DE 图谱见图 2.

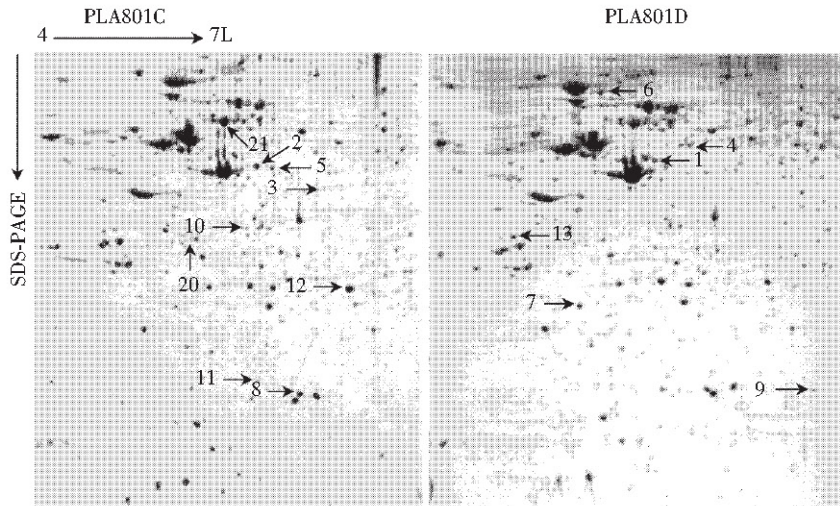


Fig. 2 Representative 2-DE gels between PLA801C and PLA801D

pH4-7L, Coomassie Brilliant Blue stain. Differentially expressed proteins were indicated with arrows.

2.2 MALDI-TOF/MS 分析及数据库查询

PLA801C、PLA801D 细胞总蛋白分别经宽、窄范围的 IPG 胶条分离后, 共选择、切取了 24 个

差异蛋白质点进行了 MALDI-TOF 分析, 结合数据库查询以及该蛋白质点在 2-DE 图谱上大概的分子质量和等电点, 成功鉴定出了其中的 12 个蛋白

质 (来源于 pH4-7L 的 2-DE 图谱中的 2 号蛋白质
与来源于 pH3-10L 的 2-DE 图谱中的 16 号蛋白质

均鉴定为 KCRB). 该 12 个蛋白质点经 PDQUEST
软件分析和 MALDI-TOF 鉴定的结果见表 1.

Table 1 List of identified protein spots differentially expressed between PLA801C and PLA801D sublines

Spot	Score	Sequence coverage	AC	ID	Description	PLA801C ($\bar{x}+s$)	PLA801D ($\bar{x}+s$)	P value	pI	M _r
1	19/27	0.480	P05783	K1CR	KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 18 (CYTOKERATIN 18) (K18) (CK 18).	11.86+2.27	41.5+5.97	0.001	5.34	47926.62
2	9/13	0.381	P12277	KCRB	CREATINE KINASE, B CHAIN (EC 2.7.3.2) (B-CK)	77.4+20.30	15.4+9.40	0.0086	5.34	42644.68
6	6/7	0.119	P21980	TGLC	PROTEIN GLUTAMINE (γ-GLUTAMYLTRANSFERASE, TISSUE TRANSGLUTAMINASE)	()	16.7+2.05		5.17	77257.75
7	9/14	0.348	P52565	GDIR	RHO GDP-DISSOCIATION INHIBITOR 1(RHO GDI 1) (RHO-GDI ALPHA)	23.40+5.60	44.70+2.83	0.0036	5.03	23207.11
13	6/15	0.246	P09494	TPMF	TROPOMYOSIN, FIBROBLAST ISOFORM TM3	17.23+1.04	29.34+1.36	0.0003	4.72	32875.93
14	3/5	0.28	Q14116	IL-18	CHAIN 1; INTERLEUKIN-18	1.86+1.08	12.31+4.24	0.014	5.04	18216.74
16	5/11	0.123	P12277	KCRB	CREATINE KINASE, B CHAIN (EC 2.7.3.2) (B-CK)	76.30+20.12	38.57+19.87	0.082	5.34	42644.68
17	12/26	0.647	000299	CLII	CHLORIDE INTRACELLULAR CHANNEL PROTEIN 1 (NUCLEAR CHLORIDE ION CHANNEL (NCC27) (P64 CLCP)	49.97+7.74	29.80+2.60	0.013	5.02	26923.71
18	9/18	0.709	Q06830	PDX1	PEROXIREDOXIN 1(THIOREDOXIN PEROXIDASE 2)(THIOREDOXIN-DEPENDENT PEROXIDEREDUCTASE) (PROLIFERATIONASSOCIATED PROTEIN PAG) (NATURAL KILLER CELL ENHANCING FACTOR A) (NKEF-A)	25.57+5.26	11.25+0.24	0.036	8.27	22110.36
21	16/32	0.402	P10809	CH60	CHAIN 1; 60 KDA HEAT SHOCK PROTEIN	47.95+3.75	27.75+3.75	0.033	5.24	57962.86
22	11/23	0.312	P30101	ER60	CHAIN 1; PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	88.07+2.10	63.60+3.54	0.002	5.61	54265.22
24	9/25	0.351	P04083	ANX1	ANNEXIN I (PHOSPHOLIPASE A2 INHIBITORY PROTEIN) (LIPOCORTIN I) (CALPACTIN II) (P35) (CHROMOBINDIN 9)	21.43+7.81	36.87+4.47	0.041	6.64	38583.05

Score; the ratio of matched peptide from a database inquiry with total PMF peptides. Sequence coverage; the percent of identified sequence with PMF data to the complete sequence of the known protein. AC; SWISS-PROT accession number. ID; SWISS-PROT entry name. Description; name of the matching protein (SWISS-PROT DE line). The relative A value ($\bar{x}+s$) of each protein spot was calculated using nine 2-DE gels. The P value was statistically analyzed as compared between PLA801C and PLA801D by student T-test. pI; theoretical isoelectric point of the matching protein. M_r; theoretical relative molecular mass of the matching protein. () means the protein spot was not detected by Coomassie Brilliant Blue stain.

2.3 差异候选蛋白的验证结果

2.3.1 高、低转移株间差异候选蛋白在蛋白质水平的验证结果: actin 在 PLA801C、PLA801D 细胞株的表达水平基本一致反应了总蛋白质上样量一致, 白介素 18 (IL-18) 仅在 PLA801D 株检测到;

膜联蛋白 1 (annexinI, ANX1)、细胞骨架蛋白 (CK18) 在高转移 PLA801D 细胞株显著升高, 而热休克蛋白 60 (CH60) 在低转移的 PLA801C 表达增高 (图 3), 该结果与蛋白质组分析结果一致.

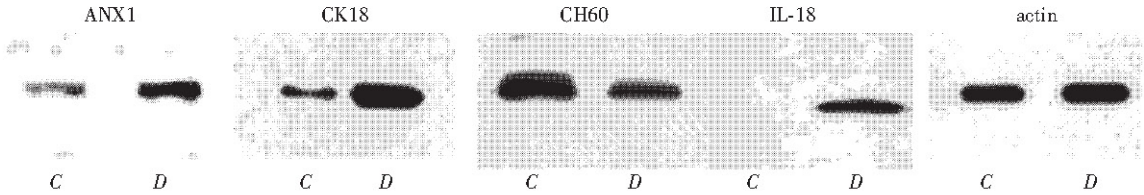


Fig. 3 1-D Western blotting analysis of candidate proteins including ANX1, CK18, IL-18 and CH60 using actin as internal control between PLA801C and PLA801D
C; PLA801C; D; PLA801D.

2.3.2 编码候选蛋白质 mRNA 差异表达水平的验证: 为了检测差异候选蛋白质在 mRNA 水平是否仍然存在显著性差异, 采用半定量 RT-PCR 结合 RNA 印迹技术对其中几个差异候选蛋白质进行了验证. 半定量 RT-PCR 的结果表明: 内参照 β_2 -微球蛋白在 PLA801C、PLA801D 细胞内 mRNA 水平基本一致的情况下, 编码 ANX1、Rho-GDP 解离抑制剂 1 (Rho-GDP dissociation inhibitor 1, GDIR)、IL-18、蛋白谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶 (TGLC) 的 mRNA 在 PLA801D 细胞株表达水平增高, 而编码核氯离子通道蛋白 1 (CL11)、蛋白质二硫键异构酶 60 (ER60)、肌酸激酶 (creatine

kinase B chain, KCRB)、硫氧还蛋白过氧化物酶 1 (peroxiredoxin, PDX1) 的 mRNA 在 PLA801D 细胞株表达水平降低. 编码原肌球蛋白 3 (tropomyosin 3, TPMF) 的 mRNA 在高、低转移株间无显著差异 (图 4). RNA 印迹的检测结果显示与蛋白质组的分析结果基本一致, 在总 RNA 上样量一致的情况下 (28S 的亮度和胞内 GAPDH 的 mRNA 水平基本一致说明了 RNA 上样量的一致性), 编码 CL11、PDX1、ER60 的 mRNA 在高转移株 PLA801D 表达降低, 而编码 GDIR 的 mRNA 在高转移株显著升高, IL-18 mRNA 只在高转移的 PLA801D 株检测到 (图 5).

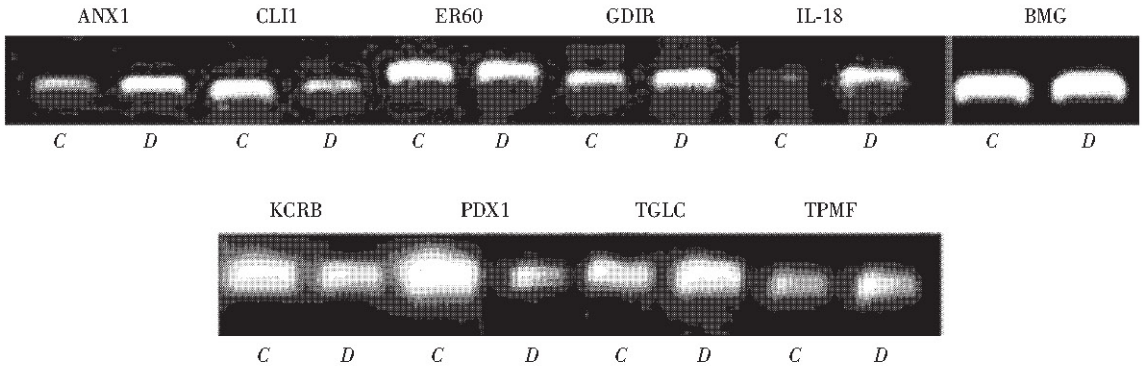


Fig. 4 Determination of mRNA coding ANX1, CL11, ER60, GDIR, IL-18, KCRB, PDX1, TGLC and TPMF between PLA801C and PLA801D by semi-quantitative RT-PCR using β_2 -microglobulin as internal control
C; PLA801C; D; PLA801D.

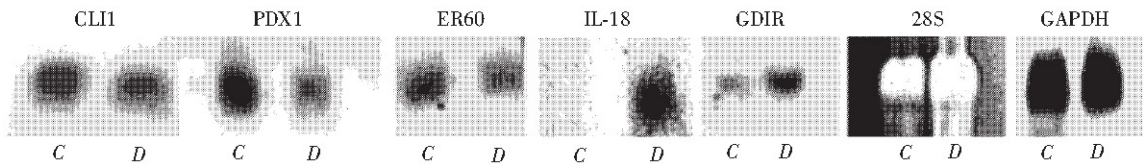


Fig. 5 Northern blot analysis of mRNA coding candidate proteins CL11, ER60, PDX1, GDIR and IL-18 between PLA801C and PLA801D
C; PLA801C; D; PLA801D; EB stained-28S and the Northern blot result of GAPDH showed the equal amount of loaded RNA between PLA801C and PLA801D.

3 讨 论

本文以肺巨细胞癌高、低转移株为肿瘤转移的研究模型,采用宽范围(pH3-10L)结合窄范围(pH4-7L)的IPG胶条进行了比较蛋白质组分析鉴定,并结合在蛋白质和mRNA水平的验证,鉴定了11个与肺癌转移相关的蛋白质;其中,在高转移的PLA801D细胞株出现了CK18、TGLC、GDIR、TPMF、IL-18和ANX1的显著高表达以及ER60、CH60、PDX1、CL11和KCRB的显著低表达。高、低转移株间2-DE图谱的相关性为80%左右则表明:来源于同一亲代母细胞的肺巨细胞癌高、低转移株表达的大部分蛋白质相同,少数的差异蛋白质就解释了高、低转移株细胞间转移表型的差异。至于编码TPMF的mRNA在高、低转移株间无显著差异,可能与蛋白质存在翻译后修饰等原因有关^[6]。其余12个蛋白质在数据库中未能有效鉴定不能排除该蛋白质是未知蛋白质的可能性,也可能与本文采用的鉴定技术有关。

据相关文献报道:多数差异候选蛋白可通过调控肿瘤细胞的生长、迁移、粘附、凋亡、或肿瘤免疫等途径影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力。但迄今为止,还未见有关候选蛋白CL11和IL-18与肺癌转移相关的报道。根据候选蛋白参与调控肿瘤转移过程中的不同环节,可将候选蛋白分为以下7类:

a. ANX1及KCRB,调控肿瘤细胞的生长增殖。ANX1在高转移株的显著高表达可能与它具有调节细胞骨架的胞内信号传导,维持正常上皮细胞的形态以及促进肿瘤的发生有关^[7]。此外,ANX1还可通过影响钙粘着蛋白(E-cadherin)的表达,调节细胞的集落形成能力以及细胞间的粘附能力^[8]。另一候选蛋白质KCRB在高转移的PLA801D细胞内显著低表达可能与KCRB具有下调其胞内磷酸化底物(cyclocreatine),促进肿瘤细胞的生长有关^[9]。ANX1以及KCRB在调控肿瘤细胞生长中发挥的正向和负向调控作用,均表明候选蛋白可能通过调节肿瘤细胞的生长增殖,从而影响肿瘤细胞的转移能力。

b. ANX1和PDX1,参与肿瘤细胞的凋亡调控。ANX1在高转移株的高表达除了与其调控肿瘤细胞的生长增殖有关外,还可能与ANX1的抗凋亡能力有关^[10,11],而肿瘤细胞的转移能力往往与肿瘤细胞的抗凋亡能力正相关^[12]。此外,PDX1的低表达与肿瘤的淋巴结转移和肿瘤细胞的低分化呈

正相关,故其在高转移株的显著低表达与文献报道一致^[13]。

c. CK18, GDIR和TPMF,能够与细胞骨架蛋白直接或间接相互作用。细胞骨架蛋白CK18在高转移株的显著高表达再次证实,中间丝成分在调节肿瘤细胞的侵袭和转移过程中发挥重要作用^[14]。GDIR可能通过调节Rho蛋白(如Cdc42、RhoA等)的膜型和可溶性形式,影响Rho蛋白与细胞骨架蛋白的结合^[15]。此外,TPMF可通过与肌动蛋白的结合,影响肿瘤细胞的运动、迁移^[16]。有意思的是,能够与细胞骨架蛋白相互作用的三个候选蛋白,均在高转移株出现了显著高表达。该结果提示:与细胞骨架蛋白相互作用的蛋白质可能在肿瘤细胞的转移中发挥着重要作用。

d. ER60和CH60,参与调控肿瘤免疫。二者均在高转移的PLA801D细胞株显著低表达。蛋白二硫键异构酶ER60作为MHC I复合体组装过程中的一个重要成分,参与了MHC I分子的折叠和生物合成^[17]。而肿瘤细胞通过MHC I的缺失来逃避CTL的免疫杀伤的机制已研究得比较成熟^[10]。另一候选蛋白CH60作为先天性免疫系统识别的肿瘤抗原,在启动肿瘤免疫反应过程中上调^[11],这正好解释了为何在低转移株出现了CH60的高表达。ER60和CH60在高转移株的显著低表达提示,参与肿瘤免疫调节的蛋白质在调控肿瘤细胞的转移中可能发挥了一定作用。

e. TGLC,参与胞外基质的组装、肿瘤细胞与细胞外基质的粘附。细胞表面的TGLC作为整合素相关的肿瘤细胞表面的共受体,可促进肿瘤细胞与纤连蛋白Fn的结合,从而促进肿瘤细胞与细胞外基质的粘附和迁移^[18]。TGLC在肺巨细胞癌高转移株的显著高表达与在乳腺癌和黑色素瘤中的报道一致^[19,20]。

f. CL11。据我们所知,目前还未见CL11与肿瘤转移相关的报道。由于CL11在调节胞浆、核浆和核周之间的氯离子传导过程中发挥着重要作用^[21]以及该蛋白质广泛分布和高度保守的特征,可以预料CL11在影响细胞增殖、凋亡等过程中发挥作用。已有报道表明CL11参与了细胞周期的调控^[22]。新近发现的氯离子通道家族的又一成员CLIC3(其结构、组织分布和功能与CL11及其相似)有可能参与细胞生长的调控^[23]。这一研究结果提示我们:是否CL11也参与了肿瘤细胞的生长调控。

g. IL-18. 值得一提的是, 在本转移模型中, IL-18 及其 mRNA 都只能在高转移的 PLA801D 细胞中检测到, 强烈提示 IL-18 有可能在肺癌转移中具有极其重要的作用. 最近的报道表明, IL-18 可通过 H_2O_2 途径诱导肝血窦内皮细胞 (HSE) 分泌血管细胞附着分子 1 (VCAM-1), 从而促进循环的黑色素瘤细胞与肝血窦内皮细胞的粘附^[24,25]. IL-18 还可通过核因子 NF- κ B 和 PI 3-kinase 途径活化内皮细胞表达 E-选择素, 从而促进白血病细胞 HL-60 与内皮的粘附^[26]. 此外, 在乳腺癌发生转移的患者血清中检测到了 IL-18 的显著高表达^[27], 这与 IL-18 在高转移的 PL801D 细胞株的显著高表达是一致的. 但据我们所知, 目前还未见 IL-18 与肺癌转移相关的报道. 究竟 IL-18 通过何种机制促进肺癌细胞的转移, 尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 陆应麟, 黄靖香, 李向红, 等. 人肺巨细胞癌 PLA-801 母系细胞系及其克隆化细胞株 (A、C、D、E) 裸鼠皮下种植后自发转移特性的研究. 中华肿瘤杂志, 1989, **11** (1): 1~7
Lu Y L, Huang J X, Li X H, *et al.* Chin J Oncol, 1989, **11** (1): 1~7
- 2 Mei L, Lezhen C, Po Z, *et al.* Study on the metastatic mechanisms of human giant-cell lung carcinoma comparison between the strains C and D. Asian Pac J Allergy Immunol, 1998, **16** (4): 167~176
- 3 Celis J E, Ostergaard M, Rasmussen H H, *et al.* A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer; <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. Electrophoresis, 1999, **20** (2): 300~309
- 4 Jungblut P R, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, *et al.* Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. Electrophoresis, 1999, **20** (10): 2100~2110
- 5 Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, *et al.* The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. J Biol Chem, 2000, **275** (50): 39018~39026
- 6 Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis, 1997, **18** (3~4): 533~537
- 7 Pawletz C P, Ornstein D K, Roth M J, *et al.* Loss of annexin I correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. Cancer Res, 2000, **60** (22): 6293~6297
- 8 Frey B M, Reber B F, Vishwanath B S, *et al.* Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. FASEB J, 1999, **13** (15): 2235~2245
- 9 Lillie J W, O'Keefe M, Valinski H, *et al.* Cyclocreatine (1-carboxymethyl-2-iminoimidazolidine) inhibits growth of a broad spectrum of cancer cells derived from solid tumors. Cancer Res, 1993, **53** (13): 3172~3178
- 10 Feng H, Zeng Y, Whitesell L, *et al.* Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. Blood, 2001, **97** (11): 3505~3512
- 11 Chen W, Syldath U, Bellmann K, *et al.* Human 60-kDa heat-shock proteins: a danger signal to the innate immune system. J Immunol, 1999, **162** (6): 3212~3219
- 12 Wu Y L, Jiang X R, Lillington D M, *et al.* Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. Br J Haematol, 2000, **111** (3): 807~816
- 13 Yanagawa T, Iwasa S, Ishii T, *et al.* Peroxiredoxin 1 expression in oral cancer: a potential new tumor marker. Cancer Lett, 2000, **156** (1): 27~35
- 14 Chu Y W, Sefter E A, Romer L H, *et al.* Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. Am J Pathol, 1996, **148** (1): 63~69
- 15 Nomanbhoy T K, Erickson J W, Cerione R A. Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry, 1999, **38** (6): 1744~1750
- 16 Lin J J, Helfman D M, Hughes S H, *et al.* Tropomyosin isoforms in chicken embryo fibroblasts: purification, characterization, and changes in Rous sarcoma virus-transformed cells. J Cell Biol, 1985, **100** (3): 692~703
- 17 Lindquist J A, Hammerling G J, Trowsdale J. ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. FASEB J, 2001, **15** (8): 1448~1450
- 18 Akimov S S, Krylov D, Fleischman L F, *et al.* Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. J Cell Biol, 2000, **148** (4): 825~838
- 19 Hettasch J M, Bandarenko N, Burchette J L, *et al.* Tissue transglutaminase expression in human breast cancer. Lab Invest, 1996, **75** (5): 637~645
- 20 van Groningen J J, Klink S L, Bloemers H P, *et al.* Expression of tissue-type transglutaminase correlates positively with metastatic properties of human melanoma cell lines. Int J Cancer, 1995, **60** (3): 383~387
- 21 Valenzuela S M, Martin D K, Por S B, *et al.* Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. J Biol Chem, 1997, **272** (19): 12575~12582
- 22 Valenzuela S M, Mazzanti M, Tonini R, *et al.* The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. J Physiol, 2000, **529** (3): 541~552
- 23 Qian Z, Okuhara D, Abe M K, *et al.* Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. J Biol Chem, 1999, **274** (3): 1621~1627
- 24 V Vidal-Vanadoccha F, Fantuzzi G, Mendoza L, *et al.* IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (2): 734~739
- 25 Mendoza L, Carrascal T, De Luca M, *et al.* Hydrogen peroxide mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression from interleukin-18-activated hepatic sinusoidal endothelium; implications for circulating cancer cell arrest in the murine liver. Hepatology, 2001, **34** (2): 298~310
- 26 Morel J C, Park C C, Woods J M, *et al.* A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF- κ B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. J Biol Chem, 2001, **276** (40): 37069~37075
- 27 Merendino R A, Gangemi S, Ruello A, *et al.* Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. Int J Biol Markers, 2001, **16** (2): 126~129

Characterization and Identification of Metastasis-associated Proteins of Lung Cancer by Comparative Proteome Analysis*

JIANG Dai-Feng^{1,2)}, YING Wan-Tao¹⁾, WAN Jing-Hong¹⁾,
QIU Zong-Yin²⁾, QIAN Xiao-Hong¹⁾, HE Fu-Chu¹⁾**

¹⁾ *Department of Genomics and Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;*

²⁾ *Department of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)*

Abstract Comparative proteomic analysis, combined with 2-DE separation and MALDI-TOF identification, was utilized to compare the protein expression profiles between highly and lowly metastatic subpopulations (i. e. PLA801D and PLA801C) and 11 metastasis-associated proteins were identified and further validated by 1-D Western blotting, Northern blot and/or semi-quantitative RT-PCR analysis. Compared with that in lowly metastatic subpopulation, CK18, TGLC, GDIR, TPMF, IL-18 and ANX1 were significantly up-regulated, while ER60, CH60, PDX1, CLI1 and KCRB were significantly down-regulated in highly metastatic subpopulation. Most of the candidate proteins have been evidenced to be somehow associated with various aspects of tumor metastasis such as cell growth, motility, invasion, adhesion, apoptosis and tumor immunity, etc. Up to now, CLI1 and IL-18 have not been reported to be associated with lung metastasis, which implied that CLI1 and IL-18 might be new metastasis-associated proteins of lung cancer.

Key words lung cancer, metastasis, proteome, CLI1, IL-18

* This work was supported by grants from The National Basic Research Programs of China (2001CB510204, 2001CB510201 & G1998051213) and The National Natural Science Foundation of China (39730270 & 39990600).

** Corresponding author. Tel: 86-10-68171208, Fax: 86-10-68214653, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Received: November 26, 2002 Accepted: December 26, 2002