

人支气管上皮不典型增生与浸润癌组织的 比较蛋白质组学研究*

吴晓英^{1,2,3)} 陈主初^{1,2)}** 肖志强¹⁾ 李 萃^{1,2)}

汪春年³⁾ 李建玲¹⁾ 冯雪萍¹⁾ 张鹏飞¹⁾

(¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;

²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078;

³⁾中南大学基础医学院超微结构教研室, 长沙 410078)

摘要 为筛选支气管上皮鳞状不典型增生进展的分子标志物, 采用改良的脱氧胆酸-三氯醋酸 (deoxycholate-trichloroacetic acid, DOC-TCA) 法提纯支气管上皮总蛋白质进行双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE), 应用 ImageMaster 2D 分析软件、Student's *t*-检验识别差异蛋白质点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 得到相应的肽质指纹图 (peptide mass fingerprint, PMF), 搜索数据库鉴定差异蛋白质。由此获得人支气管上皮不典型增生和浸润癌组织的 2-DE 图谱及其凝胶的平均蛋白质点数 ($1\ 273.00 \pm 43.31$, $1\ 326.00 \pm 66.63$), 且两阶段间平均差异蛋白质点数为 56.00 ± 8.96 。取 38 个差异蛋白质点进行 PMF 分析, 鉴定出一些与细胞生长、分化或肿瘤发生等有关的蛋白质, 随即应用免疫组化检测差异蛋白质 EGFR、c-Jun、Mdm2 在两类组织中的表达, 其结果也显示了类似的表达差异。支气管上皮不典型增生恶性转化过程中存在蛋白质的差异表达, 这些差异蛋白质可能以不同的方式参与了癌变过程, 且 EGFR、c-Jun、Mdm2 的免疫组化验证结果与质谱结果的一致性表明, 比较蛋白质组学是一种筛选癌变相关分子标志物的可靠方法之一。

关键词 比较蛋白质组学, 人支气管上皮, 差异表达蛋白质, 免疫组化, 分子标志物

学科分类号 Q50; Q51

肺癌是目前全球发病率、死亡率均较高的恶性肿瘤之一^[1]。在亚洲, 尤其在我国的, 肺癌发病率继续上升, 现已成为我国城市人口癌症死亡的首位原因^[2,3]。据 WHO 估计我国将成为 21 世纪的肺癌大国。因此, 探讨肺癌的发病机理及癌变过程具有重要的理论和实践意义。尽管诊断水平、治疗的不断进步, 肺癌患者的总存活率仍仅为 15%。这种低下的存活率可能是因为确诊时已到了相对晚的阶段。

肺癌按组织学分类以肺鳞癌最常见, 肺鳞癌大多起源于支气管上皮且是一个多阶段的演变过程。在致癌因素的作用下, 支气管上皮发生癌变的过程一般要经过基底细胞增生、鳞化, 进而在此基础上进展为不典型增生、癌变 (原位癌), 再发展为微浸润癌和浸润癌。故肺癌的形成是一个较为漫长的过程。因此, 如果肺癌能在癌前病变、在血管生成、浸润和转移发生前被确诊, 有可能更大地提高存活率。在这一点上, 我们对癌前病变可能的恶性转化机制几乎没有什么了解。当代分子生物

学、基因组及蛋白质组等技术的问世与进步提供了这样的可能性, 即可以更有效地探讨这些早期病变进展的分子机制。因此在支气管上皮由轻度、中度、重度鳞状不典型增生再发展为微浸润癌和浸润癌的过程中, 重要的目标是鉴定蛋白质的优选表达, 发展可用于延缓、阻断或逆转此进展的药用分子靶标, 及可用于分子病理学诊断的标志物。本研究中, 我们将鳞状不典型增生的支气管上皮与上皮鳞状浸润癌组织的蛋白质图谱进行比较, 进行质谱分析及免疫组化检测以筛选分子标志物。

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB510207), 教育部跨世纪优秀人才基金项目 (教育部科技函 [2002] 48 号), 国家自然科学基金项目 (30000028, 30240056, 30370642), 湖南省科技厅重大和重点科研项目 (04XK1001, 02SSSY2001-1) 和湖南省卫生厅重点科研项目 (Z02-04) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4327325, Fax: 0731-4327332

E-mail: rzpatvip@sina.com.cn

收稿日期: 2004-06-16, 接受日期: 2004-08-02

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织: 16 例人支气管上皮组织均取自中南大学湘雅一医院和湘雅二医院胸外科, 2001 年 3 月~2003 年 11 月手术切除标本, 并经病理医师确诊. 其患者均为 50~60 岁的男性, 含中度不典型增生及上皮浸润癌组织各 8 例, 有 4 对来自同一患者.

1.1.2 试剂: 二喹啉甲酸 (bicinchoninic, BCA)、蛋白质定量试剂盒为 Pierce 公司产品; 硫脲、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺、双向凝胶电泳蛋白质标准、甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲一酮-胰蛋白酶 (TPCK-Trypsin)、铁氰化钾 [$K_3Fe(CN)_6$]、三氟乙酸 (TFA)、基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA)、硫代硫酸钠 ($Na_2S_2O_3$)、碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)、氯化钙 ($CaCl_2$) 均为 Sigma 公司产品; 固相 pH 梯度干胶条 (IPG strip pH 3~10L, 24 cm)、IPG 缓冲液 (pH 3~10)、两性电解质 (pharmalyte, pH 3~10)、覆盖液、低分子质量蛋白质标准、蛋白银染试剂盒和尿素均为 Amersham Biosciences 公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、DNA 酶和 RNA 酶均为 Promega 公司产品; DOC、TCA 均为国产分析纯. 乙腈为 Fisher 公司产品. 甲醛、二甲苯、石蜡、伊红、苏木素等均为国产分析纯. 作用于 c-Jun 及 EGFR 的兔抗人多克隆抗体、作用于 Mdm2 的鼠抗人单克隆抗体, 及羊抗兔、羊抗鼠的单克隆第二抗体均系 Santa Cruz Biotechnology 公司产品. 5% 的多聚甲醛、DAB 显色试剂盒 (DAB Kit 20X) 购自北京中山生物技术有限公司.

1.1.3 仪器: IPG phor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳槽、ImageMaster 2D Elite 4.01 凝胶图像分析软件、Imagescanner 扫描仪、Labscan 扫描控制、分析前处理软件和 4307 MALDI-TOF Mass Spectrometer (ABI) 均系 Amersham Biosciences 公司产品. Elx800 自动酶标仪系 Bio-Tek Instruments 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 组织标本的处理: 收取手术切除的新鲜肺标本, 分离出支气管并用生理盐水快速清洗, 剪去多余的外围组织, 再置于解剖显微镜下观察, 将支气管每隔开 5 mm 纵向一分为二, 一部分留做光镜病理切片, 另一部分继续在解剖显微镜下剥离支气

管上皮, 尽可能去掉软骨层, 然后 $-80^{\circ}C$ 冻存、备用, 待病理切片筛选后再抽取各类支气管上皮的蛋白质.

1.2.2 组织总蛋白质的制备及脱氧胆酸-三氯醋酸 (DOC-TCA) 沉淀法纯化蛋白质: 取 30~60 mg 组织样品于液氮下充分研碎至粉末状, 置于 400 μ l 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L thiourea, 2% NP-40, 1% TritonX-100, 100 mol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte, 1 g/L Dnase I, 0.25 g/L RNase A) 中, 裂解抽提总蛋白质. 采用改良的 DOC-TCA 进行蛋白质沉淀, 即每 200 μ l 样品加 10 μ l 的 0.15% DOC, 混匀, 室温放置 10 min, 再加入 50 μ l 100% TCA, 混匀后离心, 上清中重复加入 TCA 1 次, 离心弃上清, 用 1:1 的乙醇-乙醚洗涤沉淀 3 次, 用水化液代替经典的缓冲液再悬沉淀. 纯化前后样品均用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白质的浓度.

1.2.3 固相 pH 梯度双向凝胶电泳: a. 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳按 Gorg 等^[4]方法进行. 将已定量的组织总蛋白质液 (0.75 mg) 与水化液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH 3~10 L, 痕量溴酚蓝) 充分混合, 以总体积 350 μ l 在等电聚焦仪上, 水化和聚焦在 $20^{\circ}C$ 自动进行, 总电压时间积为 68 000 Vh, 其中 30 伏低电压水化 16 h, 然后经过 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 最后稳定在 8 000 V 下等电聚焦. b. 平衡. 等电聚焦结束后, 迅速取出一向的 IPG 胶条先后置于 20 ml 平衡液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 0.2% DTT) 和 20 ml 平衡液 B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 中分别平衡 15 min. c. 第二向垂直板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 将平衡后的胶条移至 0.75 mm 厚的不连续分离胶 (12.5% 均匀分离胶) 的上端, 在其酸性端同时放置 SDS 蛋白质标准, 用 0.5% 的琼脂糖封胶, 冷却后装入电泳槽中, 先设置每块胶恒功率 2 W, 电泳 30 min, 后设置每块胶恒功率 17 W 进行电泳, 至溴酚蓝离胶最底端的 1 mm 处停止电泳.

1.2.4 银染: 按 Marshall^[5]描述的方法进行.

1.2.5 凝胶图像分析: 利用 ImageMaster 2D Elite 4.01 分析软件对图像进行强度校正、点检测、背

景消减、匹配、1D 校正等分析, 获取点的体积强度百分比 (%)。斑点位置的重复性按 Corbett^[6] 的方法进行计算。所有数据的统计分析 (Student *t*-test) 在 SPSS 10.0 软件上进行, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.2.6 制备质谱样品: 随机选取支气管不典型增生与上皮浸润癌组织两阶段差异较明显的蛋白质点 38 个, 另选取了在不典型增生与上皮浸润癌两块胶上认为匹配的点以及空白胶 (溴酚蓝线以外的胶) 作为对照, 切下的蛋白质点置于 Eppendorf 管中, 对银染蛋白质用 100 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和 30 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) 进行脱色, 然后用 100 mmol/L NH_4HCO_3 , 10 mmol/L DTT 于 57℃ 还原 1 h, 再在暗处用 100 mmol/L NH_4HCO_3 , 55 mmol/L 碘乙酰胺烷基化 30 min, 冻干后加入 TPCK-Trypsin (0.1 g/L) 37℃ 酶解 24 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清用 Millipore 公司 ZIPTIP™ C18 微柱进行脱盐后与 CCA 基质液混合, 轻微旋涡后, 于不锈钢点样板上均匀点样 2 μl , 空气中自然风干待分析。

1.2.7 质谱分析和数据库查询: 将制备好的点样板置于 Applied Biosystems Voyager System 4307 MALDI-TOF-MS 仪上进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压为 20 000 V, 反射电压比为 1.12, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Pa, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 获得了肽质量指纹图。通过英特网在 ExPASy 的 PeptIdent 软件中进行搜寻, 搜寻参数如下: 肽质量指纹图中的肽片段质量选择在 800 ~ 4 000 ku 范围, 表观等电点的误差范围为 ± 0.3 pH, 表观分子质量的误差范围为 $\pm 20\%$, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl-Cys), 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点, 最少匹配肽片段数为 5, 物种来源选择人类, 离子选择 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 Monoisotopic, 另根据需要调整参数。

1.2.8 免疫组化方法: 采用 EnVision 二步法。a. 10% 的多聚赖氨酸处理玻片, 烤干。b. 常规石蜡切片 (4 μm), 捞片。c. 切片脱蜡至水; 二甲苯 I、二甲苯 II 分别脱蜡 10 min, PBS 洗 5 min 3 次。d. 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性 30 min, 双蒸水洗 5 min 3 次。e. 抗原修复: 将切片浸入 0.01 mmol/L 枸橼酸盐液 (pH 6.0) 中,

微波火力加热 5 min, 室温冷却 10 min, 再微波火力加热 5 min, 冷却后, 双蒸水洗 5 min 3 次, PBS 洗 5 min 3 次。f. 免疫羊血清 (1:10) 37℃ 封闭 30 min。g. 加一抗 (1:100) 即分别加 c-Jun 及 EGFR 兔抗人多克隆抗体、Mdm2 鼠抗人单克隆抗体, 37℃ 1 h 后, 4℃ 冰箱过夜, PBS 漂洗 5 min 3 次。h. 加二抗 (羊抗兔及羊抗鼠的单克隆抗体, 1:200), 37℃, 放置 30 min。PBS 漂洗 5 min 3 次。i. DAB 显色约 10 min。j. 流水洗, 苏木素复染, 常规封片, 显微镜下观察。

1.2.9 免疫组化结果判断及其统计学处理: 设阳性对照及同时用 PBS 代替一抗为空白对照, 具体为: 已知 EGFR 阳性的卵巢癌组织切片作为 EGFR 蛋白免疫组织化学染色的阳性对照, 同时用 PBS 代替一抗为阴性对照; 已知 c-Jun 阳性的骨肉瘤组织切片作为 c-Jun 蛋白免疫组织化学染色的阳性对照, 同时用 PBS 代替一抗为阴性对照; 已知 Mdm2 阳性的骨肉瘤组织切片作为 Mdm2 蛋白免疫组织化学染色的阳性对照, 同时用未加抗 Mdm2 抗体的组织切片作为阴性对照。每例随机选出 5 个不重复、不重叠的高倍视野 (10 × 40), 记数阳性细胞数及所有细胞数, 计算阳性细胞率 = 阳性细胞总数/视野所有细胞总数 × 100%。根据阳性细胞率进行分级, 将 EGFR、c-Jun 及 Mdm2 的表达水平分为 3 级: 阳性细胞率 $\leq 10\%$, 记作 (-), 阳性细胞率 10% ~ 25%, 记作 (+), 阳性细胞率 $\geq 25\%$, 记作 (++)。应用统计软件 SPSS10.0 进行统计学分析, 采用方差分析 (χ^2 检验), 确定 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结 果

2.1 人支气管上皮鳞状不典型增生及上皮浸润癌组织的 2-DE 图谱和比较分析

分别抽提人支气管上皮鳞状不典型增生及上皮浸润癌组织的蛋白质并进行双向电泳 (2-DE) 分离, 银染显色, 且每一例标本重复 3 次实验, 由此获得了分辨率、重复性均较高的支气管上皮组织的 2-DE 图谱, 其中不典型增生和浸润癌组织凝胶的平均蛋白质点数分别为 $1\,273.00 \pm 43.31$, $1\,326.00 \pm 66.63$ 。图 1 是一张上皮浸润癌组织的 2-DE 银染胶, 它显示了从上皮浸润癌组织分离的蛋白质点。比较分析 16 例标本的双向凝胶电泳图谱, 获取并比较蛋白质点的平均体积强度百分比 (%), 发现两阶段间平均差异蛋白质点数为

56.00 ± 8.96, 图 2 显示了 3 种差异蛋白质 EGFR、c-Jun、Mdm2 分别在鳞状不典型增生及上皮浸润癌组织的丰度定量。

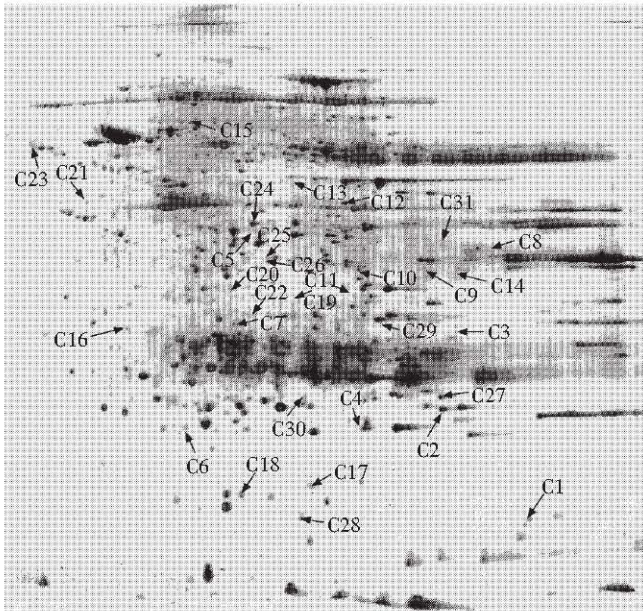


Fig. 1 2-D gel map of invasive cancer tissue of human bronchial epithelium

The gel was visualized by silver staining. Arrowed are proteins that were differentially expressed between dysplasia and invasive cancer.

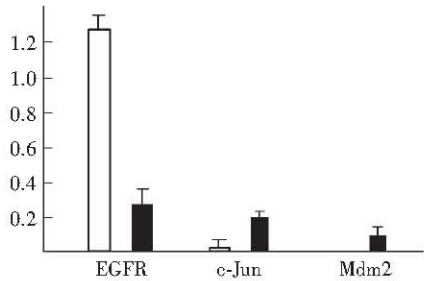


Fig. 2 Quantitation of variable protein abundance of EGFR, c-Jun and Mdm2 in bronchial dysplasia and invasive cancer

□: dysplasia; ■: invasive cancer.

2.2 支气管上皮不典型增生与浸润癌组织间差异蛋白质点的MALDI-TOF-MS肽质指纹图分析

通过软件分析获得了支气管上皮不典型增生及上皮浸润癌组织的差异表达蛋白质点。为了保证匹配结果的准确性，两个匹配点(D₀和C₀)同时进行质谱鉴定，结果表明它们是一样的蛋白质(AC: Q9UF87的Hypothetical protein)。随机选取至少在5对不典型增生及上皮浸润癌组织中均有相同变化的差异点共38个，其中4个点仅在不典型增生上皮表达，26个点仅在癌浸润的上皮组织中表达，余下的8个点在不典型增生与浸润癌组织中至少有

5 倍的表达差异。这些差异点分别通过胶内原位酶解进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图的测定，并以酶自动降解峰(*m/z* = 1 993.9 772 Da)进行校正，利用Expasy中的PeptIdent查询软件搜索SWISS-PROT以及Trembl数据库，搜索情况如表1所示，同时结合双向凝胶电泳相应蛋白质点的表观等电点、分子质量、匹配片段的多少以及氨基酸序列的覆盖率进行蛋白质鉴定，结果见表2。

2.3 免疫组化检测EGFR、Mdm2、c-Jun在不典型增生上皮与上皮浸润癌组织的表达

EGFR阳性反应定位于胞膜或胞浆内，表现为细胞膜染成棕黄色或胞浆内出现棕黄色颗粒(图3)。12例不典型增生上皮有9例EGFR阳性，阳性率为75%。15例浸润癌组织全为阳性表达，阳性率为100%，两者间EGFR表达水平无明显差异(*P* > 0.05)(表3)。不典型增生的支气管上皮组织中，EGFR阳性呈簇状分布，但同区域内阳性细胞染色的强度基本一致(图3a)。而支气管上皮浸润癌组织中，EGFR阳性表达呈明显的异质性，同一切片不同区域或同一区域内阳性细胞分布不均匀，癌巢与癌巢间阳性反应深浅不均，染色范围和强度也不同(图3b)。

Table 1 Matching of protein spot- c1 peptide mass fingerprint data with protein Q86WI4 in database

User mass	Matching mass	Δ mass/u	#MC	Modification	Position	Peptide
1 092. 5139	1 092. 4601	-0. 0537	0		15 ~ 23	FMTYNSCAR
1 165. 5444	1 165. 4765	-0. 0678	0	1 $\times$ Cys_ CAM, 1 $\times$ MSO	15 ~ 23	FMTYNSCAR
1 179. 5464	1 179. 4922	-0. 0541	0	1 $\times$ Cys_ PAM, 1 $\times$ MSO	15 ~ 23	FMTYNSCAR
1 475. 6864	1 475. 7134	0. 027	1	1 $\times$ Cys_ PAM	12 ~ 23	ALKFMTYNSCAR
1 838. 8329	1 838. 8809	0. 048	0	2 $\times$ Cys_ CAM	24 ~ 39	LCLNQETVCLASTAM K

#MC: Missed cleavage sites

68. 3% of sequence covered:

1	11	21	31	41	51
1 mdpaeavlqe	kALKFMTYNS	CARLCLNQET	VCLASTAMKt	e	

Table 2 Characterized differentially expressed proteins between human bronchial dysplasia and invasive carcinoma

Spot number	Expression in dysplasia	Expression in carcinoma	Ratio	Peptide matches	AC	Description	pI	M	Coverage
Dea1	141 167 $\pm$ 862	6 403 $\pm$ 416	22. 46	5/21	Q9H3C8	Truncated epidermal growth factor receptor (Fragment). -Homo sapiens	undefined	undefined	18. 3%
Dea2	16 306 $\pm$ 864	82 015 $\pm$ 133	5. 03	23/45	P05412	Transcription factor AP-1 (Activator protein 1) (AP1) (Proto-oncogene c-jun) (V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog) (p39). - Homo sapiens (Human)	8. 90	35 675. 57	60. 4%
Dea3	81 813 $\pm$ 603	0		4/29	O95903	Hypothetical protein (Fragment). - Homo sapiens (Human)	undefined	undefined	22. 6%
Dea4	43 685 $\pm$ 257	0		6/30	Q8TB95	Similar to GDP dissociation inhibitor 2 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	25. 5%
Dea5	96 912 $\pm$ 981	17 361 $\pm$ 335	5. 59	17/72	O94813	CHAIN 3: SLIT PROTEIN C-PRODUCT. - Homo sapiens (Human).	6. 70	44524. 37	26. 0%
Dea6	39 850 $\pm$ 892	0		11/88	Q8WY12	B lymphocyte activation-related protein. - Homo sapiens	7. 00	40 578. 18	31. 0%
Dea7	114 138 $\pm$ 731	0		5/35	Q7RTS2	Class II bHLH protein ASCL4 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	36. 0%
C1	0	74 152 $\pm$ 507		5/23	Q86WI4	F-box and WD-repeat protein 1B isoform 3 (Fragment). - Homo sapiens (Human).	undefined	undefined	68. 3%
C2	206 637 $\pm$ 357	9 955 $\pm$ 023	20. 76	5/32	Q9YM49	UEV1Bs (EC 6. 3. 2. 19) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2) (Ubiquitin- protein ligase) (Ubiquitin carrier protein) (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	33. 1%
C3	0	104 376 $\pm$ 921		5/48	Q96P16	Cyclin-dependent kinase inhibitor-related protein. - Homo sapiens	7. 13	35719. 68	14. 4%

									Continued
Spot number	Expression in dysplasia	Expression in carcinoma	Ratio	Peptide matches	AC	Description	pI	M	Coverage
C4	0	30 276 ± 817		4/61	P36980	CHAIN 1: COMPLEMENT FACTOR H-RELATED PROTEIN 2. - Homo sapiens	5.80	28738.37	23.8%
C5	77 331 ± 114	463 986 ± 638	6.02	7/11	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	5.13	59750.	18.0%
C6	0	8 334 ± 763		6/69	Q9H4I5	DJ340N1.1 (Novel phospholipase similar to mouse phospholipase A2 group IIF (PLA2G2F)) (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	40.6%
C7	12 921 ± 514	24 417 ± 431	5.29	7/51	Q15929	DNA-binding protein (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	60.8%
C8	31 475 ± 219	193 866 ± 103	6.16	12/55	Q96BM3	Similar to zinc finger protein 345 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	36.7%
C9	0	56 239 ± 306		7/54	Q9H278	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-75 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	24.6.0%
C10	0	46 581 ± 718		9/68	Q96KR0	P63 delta (Cellular tumor antigen p53) (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	31.5%
C11	0	83 560 ± 102		10/67	Q9BY29	Kruppel-like zinc finger factor X31 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	36.1%
C12	0	23 435 ± 304		13/65	O60529	Antigen NY-CO-8 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	35.3%
C13	0	15 809 ± 207		15/70	P02545	Lamin A/C (70 kDa lamin). - Homo sapiens	6.57	73 139.49	23.8%
C14	0	62 757 ± 113		5/45	O43831	NFX. 1 (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	68.4%
C15	192 756 ± 567	23 254 ± 712	8.28	11/91	Q8IV85	DJ831D17.1.2 (Zinc finger protein 64 homolog (Mouse), variant 3) (Fragment). - Homo sapiens	undefined	undefined	21.5%
C16	0	8 120 ± 482			Q00987-2	Splice isoform Mdm2-A of Ubiquitin-protein ligase E3 Mdm2 (EC 6.3.2.-) (p53-binding protein Mdm2) (Oncoprotein Mdm2) (Double minute 2 protein) (Hdm2). - Homo sapiens (Human)	4.21	33 140.12	47.0%
C17	0	51 166 ± 768		12/84	P08709	CHAIN 1: FACTOR VII LIGHT CHAIN. Homo sapiens (Human)	5.03	17025.93	80.3%
C18	0	36 793 ± 114		9/84	Q96QX7	BA397O8.1 (Integrin, beta-like 1 (With EGF-like repeat domains)) (Fragment) -Homo sapiens (Human)	undefined	undefined	56.1%

Continued									
Spot number	Expression in dysplasia	Expression in carcinoma	Ratio	Peptide matches	AC	Description	pI	M	Coverage
C19	0	3 720 ± 402		9/84	P29372	DNA-3-methyladenine glycosylase-Homo sapiens (Human).	5.7	33 872.00	31.2%
C20	0	11 439 ± 322		8/64	Q9H2X4	IMPACT-Homo sapiens (Human).	4.86	36476.46	48.4%
C21	0	11 452 ± 584		8/48	Q9UPI5	U-plasminogen activator receptor form 2-human (Fragment) -Homo sapiens (Human	undefined	undefined	49.8%
C22	0	14 090 ± 682		7/46	Q86U51	General transcription factor II, i. -Homo sapiens (Human).	4.95	30 408.57	38.0%
C23	0	31 751 ± 224		14/47	Q96GE5	Hypothetical protein (Fragment) - Homo sapiens (Human)	undefined	undefined	51.8%
C24	0	7 918 ± 116		7/41	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 (CK9) -Homo sapiens (Human)	5.14	61987.28	23.2%
C25	0	12 505 ± 682		7/51	Q9UIC8	Leucine carboxyl methyltransferase 1 (EC 2. 1. 1. -) (Protein-leucine O-methyltransferase) (CGI-68) -Homo sapiens (Human)	5.73	38 379.09	30.2%
C26	0	8 021 ± 322		7/45	Q9BWT0	Soluble urokinase plasminogen activator receptor precursor. -Homo sapiens (Human	5.90	33 304.62	41.5%
C27	0	59 504 ± 728		4/42	Q13637	Ras-related protein Rab-32. - Homo sapiens (Human)	6.08	24 997.29	23.6%
C28	0	59 183 ± 112		7/43	O43609	Sprouty homolog 1 (Spry-1) (Fragment) -Homo sapiens (Human)	undefined	undefined	68.3%
C29	0	9.071 ± 572		8/210	Q13287	N-myc-interactor (Nmyc a) (N-myc andSTAT interactor) -Homo sapiens (Human).	6.18	35 117.00.	28.5%
C30	0	16 008 ± 902		5/24	O15492	Regulator of G-protein signaling 16 (RGS-R) (A28-RGS14P) -Homo sapiens (Human).	6.32	2 277.66	39.9%
C31	0	12 360 ± 315		8/126	P53779	Mitogen-activated protein kinase 10 (Sress-activated protein kinase JNK3) -Homo sapiens (Human)	6.80	52 586.00	27.6%

Thirty-eight protein spots were included in Table 1. “Dea” stands for excised protein spots from gels of dysplasia, “C” for excised protein spots from gels of invasive cancer. 4 proteins spots were only expressed in dysplasia, 26 proteins spots only expressed in invasive carcinoma, 8 proteins spots were different in intensity, including 5 spots that were decreased in invasive carcinoma, and 3 spots that were increased. AC; Access code; pI: Isoelectric point; M: Molecular mass.

c-Jun 阳性信号主要分布于细胞核内，少量位于胞浆，抗体染色后胞核出现棕黄色颗粒为阳性（图 4）。12 例不典型增生中有 5 例阳性，阳性率为 33.33%。15 例浸润癌组织 11 例为阳性表达，

阳性率为 73.33%。与不典型增生上皮比较，浸润癌组织的 c-Jun 表达水平明显升高，差异有显著意义（ $P < 0.05$ ），见表 3。不典型增生的支气管上皮组织中，c-Jun 阳性呈簇状分布，但不同区域内阳

性细胞染色强度基本一致 (图 4a)。而支气管上皮浸润癌组织中, c-Jun 阳性表达呈巢状分布, 即癌巢内的阳性反应明显强于癌巢交界处, 且癌巢内阳性细胞大多集中分布于外周, 癌巢中心稀少, 核染色强度和范围基本一致 (图 4b)。

Mdm2 阳性信号主要位于细胞核膜上、部分位

于细胞核内 (图 5)。12 例不典型增生的支气管上皮组织中 无 Mdm2 蛋白阳性信号。15 例浸润癌组织中 10 例 Mdm2 蛋白呈阳性。故支气管上皮浸润癌组织中 Mdm2 的表达水平明显高于不典型增生的支气管上皮组织, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

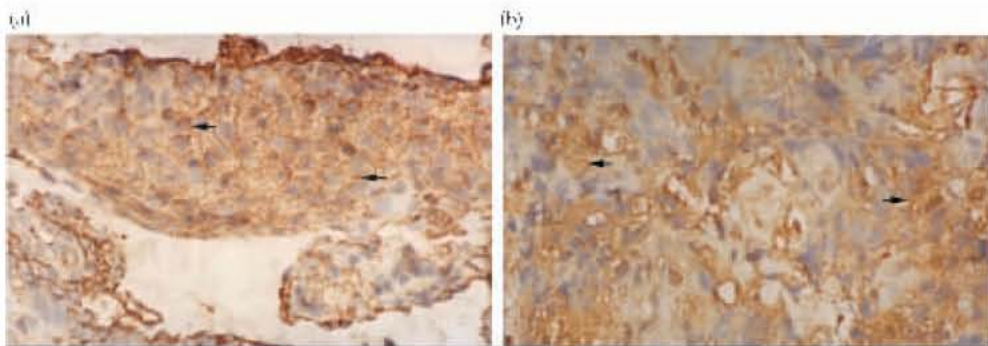


Fig. 3 Expression of EGFR in human bronchial dysplasia (a) and invasive cancer tissues (b)

Paraffin sections were prepared and stained with anti-EGFR + DAB, as described in “Materials and methods”. Arrows showed positive reactivity (×400).

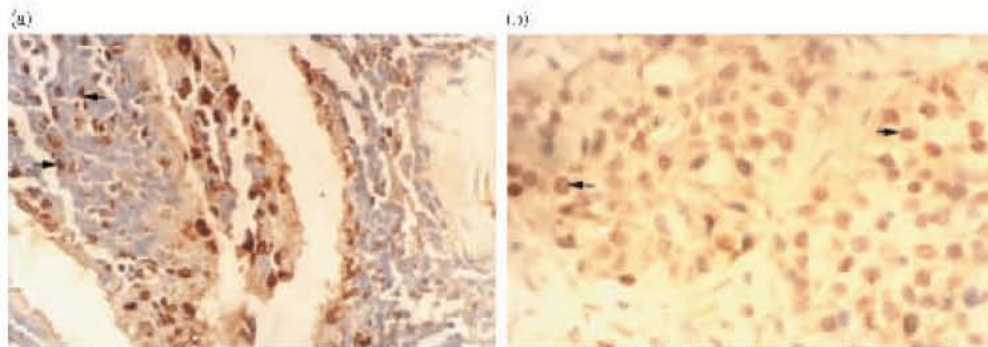


Fig. 4 Expression of c-Jun in human bronchial dysplasia (a) and invasive cancer tissues (b)

Paraffin sections were prepared and stained with anti-c-Jun + DAB, as described in “Materials and methods”. Arrows showed positive reactivity (×400).

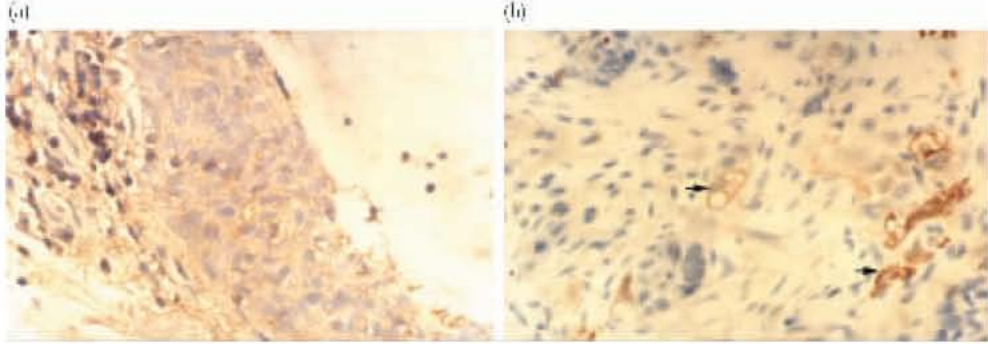


Fig. 5 Expression of Mdm2 in human bronchial dysplasia (a) and invasive cancer tissues (b)

Paraffin sections were prepared and stained with anti- Mdm2 + DAB, as described in “Materials and methods”. Arrows showed positive reactivity (×400).

Table 3 Expression of EGFR, Mdm2 and c-Jun in dysplasia and invasive cancer by immunohistochemistry

Tissue types	EGFR		P	c-Jun		P	Mdm2		P
	Positive	Negative		Positive	Negative		Positive	Negative	
Dysplasia	9 (75.00%)	3 (25.00%)	0.0752	5 (33.33%)	7 (66.67%)	0.0281	0 (0.00%)	12 (100.00%)	0.0004
Invasive cancer	15 (100.00%)	0 (0.00%)		11 (73.33%)	4 (26.67%)		10 (66.67%)	5 (33.33%)	

3 讨 论

3.1 癌前病变的概念

癌变被认为是由基因突变堆积组成的多步骤过程。癌前病变可能是从正常→恶性组织过程中不同阶段的形态表型。我们对这些发生在支气管上皮可能的癌前病变的认识才刚刚起步。世界卫生组织（WHO）最近发布与出版的肿瘤分类系统，定义了支气管上皮的3种不同的癌前病变：a. 鳞状不典型增生和原位癌，b. 腺瘤样不典型增生，c. 弥散性先天性肺神经内分泌细胞增生。同时鳞状不典型增生和原位癌可能是鳞癌的前体。因此，探讨鳞状不典型增生上皮进展的分子机制具有重要意义。

由于人支气管癌前病变组织的新鲜标本来源极其困难，作者通过对大量手术切除的肺标本进行细致筛选，获得了年龄阶段、性别均较一致的鳞状不典型增生及上皮浸润癌组织各8例，其中4对分别来自同一患者，这极大地保证了样品的可比性。

3.2 支气管上皮不典型增生与上皮浸润癌组织的2-D图谱比较分析及差异蛋白质的意义

2-DE分离样品蛋白质后，本文采用银染显色，此染色方法具有高敏感性，但由于饱和度的影响，线性显色范围较窄。故每例样品至少获取3块来自不同实验的凝胶进行分析。应用ImageMaster软件分析凝胶图谱，确定差异蛋白质点。随机选取至少在5对不典型增生上皮与上皮浸润癌组织间均有共同变化的38个差异蛋白质点进行质谱分析，获取肽质量指纹图。在鉴定的38个蛋白质中，有些与细胞生长、分化、周期调控、信号传导有关，有些是瘤基因和抑瘤基因的产物，与肿瘤发生、发展等有关，有些则功能不清楚。

在上述鉴定的38个差异蛋白质中，4个蛋白质仅在不典型增生上皮中表达，其中B lymphocyte activation-related protein与机体免疫应急有关，它在浸润性鳞癌组织中的缺失是否与癌组织免疫缺陷、免疫逃逸相关，这有待证实。另有研究表明，Class II bHLH protein ASCL4在组织发生中与细胞的增生、分化和功能特化有关，且RNA差异分析

表明在克隆的癌细胞系中其转录水平下调^[7]，这支持了本文的结果，即bHLH在不典型增生的支气管上皮组织中的表达水平显著高于支气管上皮浸润癌组织。

在上皮浸润性鳞癌组织中，表达下调的5个差异蛋白中Truncated epidermal growth factor receptor是EGFR的切割产物，而EGFR属生长因子受体家族成员。研究表明，在不同的支气管病变阶段EGFR的表达水平不同，即在正常上皮至浸润癌的序列中表达水平随病变程度加深而上调^[8]，但本文2-DE及质谱结果显示，切割型EGFR在支气管上皮中度不典型增生中的表达水平明显高于上皮浸润性鳞癌组织，这表明，EGFR表达水平及存在形式可能随支气管病变阶段不同而变化。其中Slit Protein C-Product是一种介导细胞迁移的分子，与其同系物的受体相互作用而发挥功能^[9]，UEV1BS除调控细胞的分化外，还对细胞周期的分布产生影响^[10]。

在浸润性鳞癌组织中表达上调的3个差异蛋白，包括Proto-oncogene c-jun、cytoskeletal 10及Similar to zinc finger protein 345，其中Transcription factor AP-1是原癌基因c-Jun的产物，属Jun亚家族蛋白，现已证实，人原癌基因c-Jun编码的一种DNA相随蛋白质具有转录因子AP-1的结构和功能特点，并与c-fos作用形成二聚体^[11]，异常表达时与细胞的增殖、分化或癌变有关。

已鉴定的仅在上皮浸润性鳞癌组织中表达的26个差异蛋白，其中P63、Lamin A/C、Ras-related protein Rab-32、Oncoprotein Mdm2、Sprouty homolog 1及N-myc-interactor (Nmi)等与肿瘤的发生、发展密切相关。如P63与P53是同一家族成员，在肿瘤的抑制、分化和发展中具有重要的作用。功能研究表明，它在许多肿瘤中作为抑制子存在，诱导细胞生长停滞或凋亡，可作为活化因子参与细胞周期调控，并以控制某组基因的方式抑制细胞分化^[12]。Lamin A/C已被证明在几种疾病中均存在基因突变^[13]。Ras-related protein Rab-32是RAS小分子量G蛋白超家族的成员之一，是一种

激酶锚定蛋白, 通过锚定 cAMP 依赖的蛋白激酶参与线粒体的分化和代谢^[14,15]. Sprouty homolog 1 是几种生长因子信号通路的抑制子, 以限制同族诱导物的作用范围而在发展模式起重要作用. Sprouty 突变时, FGF 通路过度激活及异常分支通路被诱导^[16]. Oncoprotein Mdm2 是 Mdm2 癌基因编码的产物, 在人类其产物为 P90, 可以和 P53 蛋白形成复合物, 而使肿瘤抑制基因 p53 失活^[17]. 目前研究表明, Mdm2 参与细胞基本生理过程, 并在多种肿瘤中异常表达^[18], 且发现 Mdm2 扩增与肿瘤转移密切相关^[19]. N-myc-interactor (Nmi) 是 Myc 蛋白家族的新成员, Myc 属于核内癌基因, 此蛋白质家族在细胞增生、分化和肿瘤转型方面起着重要作用. 已证实 Nmi 在除脑组织外的所有胚胎及成人组织中仅有低水平的表达, 而在几种癌细胞系中高表达^[20], 提示该蛋白质在支气管上皮的癌变过程发生了一定作用.

另两种仅在浸润癌组织中高表达的差异蛋白 RGS-R (Regulator of G-protein signaling 16) 和 Mitogen-activated protein kinase 10 (JNK3) 均为重要的信号传导蛋白. RGS-R 参与 EGFR 信号传导通路^[21, 22], P53 对此种 G 蛋白信号调节子具有靶向性抑制作用^[23]; JNK3 除调节信号传导外, 还是一种与神经凋亡有关的蛋白激酶^[22].

3.3 免疫组化结果及其意义

3.3.1 免疫组化技术回顾性验证: 为了验证 2-DE 图谱及质谱鉴定结果的准确性, 本文进行了另外的补充实验, 即应用免疫组化技术进行回顾性验证. 随机选取与癌变相关的 3 种差异蛋白质 EGFR、c-Jun、Mdm2 作为研究对象, 分别检测它们在人支气管上皮鳞状不典型增生及浸润癌组织的表达水平, 这对进一步确认人支气管上皮癌变相关的分子标志物是必需和有意义的.

3.3.2 EGFR 在人支气管上皮鳞状不典型增生及浸润癌组织的差异表达及其意义: EGFR 及其配体表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 (TGF- α) 和双调蛋白是细胞信号传递系统的一部分. 当 EGFR 与其配体结合后可激活酪氨酸蛋白激酶, 从而启动刺激细胞增生的信号传导系统, 促进细胞分裂^[24]. 原癌基因 c-erbB-2 与 EGFR 高度同源, 其编码的突变型 EGFR 也具有酪氨酸蛋白激酶活性, 可以不依赖配体激活就保持高度活性, 处于持续激活状态, 导致细胞过度增殖、癌变^[25]. 表皮生长因子受体 EGFR 高表达常见于上皮细胞肿瘤, 有研究

表明, EGFR 的超量表达与肺癌前病变的发生、发展及恶变密切相关^[26].

免疫组化结果表明, EGFR 不典型增生上皮及上皮浸润癌组织的 EGFR 阳性率均升高, 且不典型增生和浸润癌组织间 EGFR 表达水平无明显差异 ($P > 0.05$), 与 2-DE 及质谱结果——不典型增生上皮中 EGFR (切割型) 显著高于上皮浸润癌组织似乎不一致, 这可能是 2-DE 及质谱鉴定的差异蛋白质 EGFR 仅是 EGFR 的切割产物, 并不代表所有形式的 EGFR 蛋白, 而免疫组化用的一抗是多克隆抗体, 它可以检测所有具有 EGFR 抗原活性的形式包括异构体、切割产物等.

本实验观察到 EGFR 的阳性表达与分布在不同的病变组织具有不同的特点, 如不典型增生的支气管上皮组织中, EGFR 阳性簇状分布的特点则反应了 EGFR 在异型细胞巢的高表达. EGFR 阳性在支气管上皮浸润癌组织中的不均匀分布表明了癌组织异质性.

3.3.3 c-Jun 在人支气管上皮鳞状不典型增生及浸润癌组织的差异表达及其意义: c-Jun 是一种细胞原癌基因, 其产物与 c-Fos 的产物一起是参与 DNA 修复及细胞增生信号转导途径 AP-1 转录因子的一种成分^[27]. 研究证明人类原癌基因 c-Jun 编码一种 DNA 相随蛋白, 此蛋白质具有转录因子 AP-1 的结构和功能特点, 与 c-Fos 产物作用可形成二聚体, 组成转录因子 AP-1 复合物^[28], 因此, c-Jun 在基因表达和信号转导的调节中起重要作用, 对细胞生长和功能产生影响. 由于原癌基因是一类编码关键性调控蛋白的正常细胞基因, 在正常情况下 c-Jun、c-Fos 基因不表达或只有有限表达, 当受到理化等因素作用而活化时, 它们可以异常表达, 导致细胞的增殖、分化或癌变.

以往研究表明, c-Jun 在外界条件刺激下, 表现为一过性升高, 故称为即刻早期基因. 而本文的活检组织的免疫组化结果显示, c-Jun 在癌组织高表达, 对比不典型增生上皮差异具有显著意义, 这与本文 2-DE 分析及质谱鉴定的结果一致, 表明 c-Jun 可能与支气管上皮癌前病变的进展和转化有关.

3.3.4 Mdm2 在人支气管上皮鳞状不典型增生及浸润癌组织的差异表达及其意义: Mdm2 系小鼠双微基因 2, 其人类的同源物可以和 P53 蛋白形成复合物, 而使肿瘤抑制基因 p53 失活^[17], 这有助于阐明少数无 p53 突变肿瘤的基因机理, 然而, 由于

Mdm2 的精确功能尚不清楚, 因此它的过度表达是否可以通过其他机理, 而不是通过灭活 p53 而促进肿瘤生长, 尚待探讨。

本文活检组织的免疫组化实验结果亦显示 Mdm2 仅在支气管上皮浸润性鳞癌组织中表达, 在不典型增生上皮中无阳性着色或仅有微弱阳性表达, Mdm2 在支气管上皮浸润性鳞癌组织中的表达水平显著高于支气管上皮各癌前病变阶段组织, 差异具有统计学意义。这与本文 2-DE 及质谱结果一致, 即支气管鳞状上皮与上皮浸润癌组织的比较蛋白质组学研究也表明, Mdm2 是一种在癌组织中表达上调的差异蛋白。Mdm2 在支气管上皮浸润性鳞癌组织的异常表达提示, Mdm2 可能参与了支气管上皮癌前病变的恶性转化, 可作为支气管上皮癌前病变进展的候选分子标志物。

总之, 本研究说明新兴的蛋白质组学技术与免疫组化等经典的生物学技术相结合, 有利于寻找癌前病变进展的相关分子标志物。同时, 本文的结果也有助于理解癌前病变进展的生物学行为, 并为最终防治癌变提供新思路、新线索。

参 考 文 献

- Rom W N, Hay J G, Lee T C, *et al.* Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir CRIT Care Med*, 2000, **161** (4 Pt 1): 1355 ~ 1367
- 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率 20 年变化趋势近期预测分析. *中华肿瘤杂志*, 1997, **19** (1): 3 ~ 9
Li L D, Lu F Z, Zhang S W, *et al.* *Chin J Oncology*, 1997, **19** (1): 3 ~ 9
- Lopez A D. Counting the dead in China: measuring tobacco's impact in the developing world. *British Medical Journal*, 1998, **317** (7170): 1399 ~ 1400
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1037 ~ 1053
- Marshall T. Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal Biochem*, 1984, **136** (2): 340 ~ 346
- Corbett J M, Dunn M J, Posch A, *et al.* Postional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradients isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison. *Electrophoresis*, 1994, **15** (11): 1205 ~ 1211
- McLellan A S, Langlands K, Kealey T. Exhaustive identification of human class II basic helix-loop-helix proteins by virtual library screening. *Gene Expr Patterns*, 2002, **2** (3): 329 ~ 335
- Meert A P, Verdebout J M, Martin B, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in pre-invasive and early invasive bronchial lesions. *Eur Respir J*, 2003, **21** (4): 611 ~ 615
- Holmes G P, Negus K, Burrige L, *et al.* Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev*, 1998, **79** (1): 57 ~ 72
- Sancho E, Vila M R, Sanchez-Pulido L, *et al.* Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in *in vitro*

- differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (1): 576 ~ 589
- Bohmann D, Bos T J, Admon A, *et al.* Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 1987, **238** (4832): 1386 ~ 1392
- Klein C, Georges G, Kunkle K P, *et al.* High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 core domain from the homologous tumor suppressor p53. *J Biol Chem*, 2001, **276** (40): 37390 ~ 37401
- Caux F, Dubosclard E, Lascols O, *et al.* A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88** (3): 1006 ~ 1013
- Bao X, Faris A E, Jang E K, *et al.* Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (1): 259 ~ 271
- Alto N M, Soderling J, Scott J D. Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, 2002, **158** (4): 659 ~ 668
- Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, *et al.* Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell*, 1998, **92** (2): 253 ~ 263
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, 1997, **420** (1): 25 ~ 27
- Veldhoen N, Metcalfe S, Milner J. A novel exon within the mdm2 gene modulates translation initiation *in vitro* and disrupts the p53-binding domain of mdm2 protein. *Oncogene*, 1999, **18** (50): 7026 ~ 7033
- Kussie P H, Gorina S, Marechal V, *et al.* Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 1996, **274** (5289): 948 ~ 953
- MYC Bao J, Zervos A S. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene*, 1996, **12** (10): 2171 ~ 2176
- Derrien A, Druey K M. RGS16 function is regulated by epidermal growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 2000, **276** (51): 48532 ~ 48538
- Xie X, Gu Y, Fox T, *et al.* Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure*, 1998, **6** (8): 983 ~ 991
- Buckbinder L, Velasco-Miguel S, Chen Y, *et al.* The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **94** (15): 7868 ~ 7872
- Santini J, Formento J L, Francoual M, *et al.* Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 1991, **13** (2): 132 ~ 139
- Downward J, Yarden Y, Mayes E, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 1984, **307** (5951): 521 ~ 527
- Franklin W A, Vee R, Hirsch F R, *et al.* Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol*, 2002, **29** (1 Suppl 4): 3 ~ 14
- Hattori K, Angel P, Le Beau M M, *et al.* Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (23): 9148 ~ 9152
- Bohmann D, Bos T J, Admon A, *et al.* Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 1987, **238** (4832): 1386 ~ 1392

Comparative Proteomics Analysis of Dysplasia and Invasive Cancer Tissues in Human Bronchial Epithelia *

WU Xiao-Ying^{1,2,3)}, CHEN Zhu-Chu^{1,2)} **, XIAO Zhi-Qiang¹⁾, LI Cui^{1,2)},
WANG Chun-Nian³⁾, LI Jian-Ling¹⁾, FENG Xue-Ping¹⁾, ZHANG Peng-Fei¹⁾

(¹⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

(²⁾ Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

(³⁾ Department of Medical Ultrastructure, College of Basic Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to examine molecular markers of dysplasia progression, improved deoxycholate-trichloroacetic acid (DOC-TCA) extracted total protein of bronchial epithelial. After profiling squamous dysplasia versus invasive carcinoma of bronchial epithelium using two-dimensional electrophoresis, the patterns were compared and differential proteins were found with ImgeMaster software and Student *t*-test ($P < 0.05$). The selected differential protein-spots were identified by peptide mass fingerprint (PMF) based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching. The average spots for dysplasia and invasive carcinoma were ($1\ 273.00 \pm 43.31$) and ($1\ 326.00 \pm 66.63$), respectively. After matching, the number of spots of differentially expressed proteins between the dysplasia and invasive cancer tissues were (56.00 ± 8.96). Thirty eight differential proteins were identified, some of which are known to be involved in regulating the processes of proliferation, differentiation and tumorigenesis. In particular, c-Jun was up-regulated in invasive cancer compared with dysplasia, and murine double minute gene 2 (Mdm2) was only expressed in invasive cancer. But truncated EGFR (epidermal growth factor receptor) is reduced in invasive cancer. The subsequent immunohistochemical analysis of human tissues biopsies also showed a similar expression pattern. Therefore there are differentially expressed proteins during malignant transformation of bronchial epithelium from dysplasia to cancer. These differential proteins probably take part in carcinogenesis in different forms. The similar results of mass spectrometry and immunohistochemistry illustrated the use and reliability of comparative proteomics to screen relevant molecular markers of carcinogenesis.

Key words comparative proteomics, bronchial epithelial tissue, differential expression protein, immunohistochemistry, molecular markers

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510207), Outstanding Scholars of New Era from Ministry of Education of China (2002-48), The National Natural Science Foundation of China (30000028, 30240056, 30370642), Significant Research Program and Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan (04XK1001, 02SSSY2001-1) and Key Research Program From Public Health Bureau of Hunan Province (202-04).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4327325, Fax: 86-731-4327332, E-mail: rzpatvip@sina.com.cn

Received: June 16, 2004 Accepted: August 2, 2004