

采用定量蛋白质组学技术筛选小鼠肝癌 淋巴道转移相关蛋白*

孙成荣¹⁾ 唐建武^{1)**} 孙明忠²⁾ 刘淑清³⁾ 张宏颖¹⁾
王波¹⁾ 宋波¹⁾ 张亚楠¹⁾ 张竹清¹⁾ 赵志英¹⁾

¹⁾大连医科大学病理教研室, 大连 116027; ²⁾大连医科大学生物技术专业, 大连 116027;

³⁾大连医科大学生化教研室, 大连 116027)

摘要 淋巴道转移是上皮来源恶性肿瘤转移的早期阶段, 其发生机制不清, 一直是肿瘤学研究面临的难题, 为寻找淋巴道转移相关蛋白, 以一对来源于同一亲本细胞, 且淋巴道转移潜能显著不同的小鼠肝癌腹水型细胞株为研究对象, 其中 Hca-F 为高淋巴道转移力细胞株, Hca-P 为低淋巴道转移力细胞株, 采用定量蛋白质组学技术——荧光差异双向凝胶电泳, 建立了高低淋巴道转移力小鼠肝癌细胞荧光差异蛋白表达图谱, 高通量筛选与肿瘤淋巴道转移相关的蛋白质. 经 DeCyde 软件分析, 共得到 163 个有统计学差异的蛋白质点, 选择 2 倍以上的差异性蛋白质点 23 个, 经质谱鉴定得到 17 个蛋白质, 在 Hca-F 中高表达的蛋白质有 7 个: 转羟乙醛酶、波形蛋白、肌酸激酶(脑)、膜联蛋白 7、膜联蛋白 5、烯酰辅酶 A 水合酶 1 (过氧化物酶体)、核内异质核糖核蛋白 A2/B1 异构体 1. 而在 Hca-P 中低表达的蛋白质有 10 个: 真核翻译延长因子 2、Ero1 样蛋白、乙醛脱氢酶 2 (线粒体)、苹果酸盐脱氢酶 2(NAD)、 β -内酰胺酶 2、谷胱甘肽 S 转移酶 ω 1、泛素 C 末端水解酶同工酶 L3、内质网蛋白 29(前体)、溶血磷脂酶 1、微管不稳定蛋白. 这些差异性蛋白质的功能涉及到代谢、蛋白质分泌、蛋白质结合、核苷酸结合、钙离子结合、凋亡和调节生长等过程. 对这些蛋白质功能的进一步验证, 将有助于解析肿瘤淋巴道转移的分子机制.

关键词 肝癌, 淋巴道转移, 定量蛋白质组, 荧光差异双向凝胶电泳, 质谱

学科分类号 R735.7

转移是恶性肿瘤的基本特征, 是恶性肿瘤患者死亡的主要原因^[1]. 恶性肿瘤大部分是上皮来源的, 其转移首先发生在淋巴道, 临床上区域性淋巴结转移是上皮来源恶性肿瘤患者最重要的预后因素^[2]. 因此对淋巴道转移机制和转移干预的研究, 对于提高恶性肿瘤患者的生存率和预后有重要意义.

Hca-F 和 Hca-P 是一对来源于同一亲本细胞、且淋巴道转移潜能显著不同的小鼠肝癌腹水型细胞株^[3~5], 其中 Hca-F 为高淋巴道转移力细胞株, Hca-P 为低淋巴道转移力细胞株, 二者在肿瘤淋巴道转移机制研究中互为参照, 是难得而有效的细胞模型.

目前对淋巴道转移机制的研究指出, 该过程是多基因、多参数参与的动态网络体系. 我们已应用基因芯片^[6]等高通量技术手段, 在 mRNA 水平对 Hca-F 细胞株和 Hca-P 细胞株进行研究, 发现二者有明显差异的基因表达. 本研究应用近年来发展起

来的定量蛋白质组学技术(quantitative proteomics)——荧光差异双向凝胶电泳^[7] (fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D DIGE) 在蛋白质水平对这 2 种细胞株的基因表达进行比较研究, 建立相应的 2D DIGE 蛋白表达图谱, 并对部分有统计学意义的差异性蛋白质点进行质谱(mass spectrometry)分析, 以筛选肝癌淋巴道转移相关蛋白, 为肿瘤转移的早期诊断和治疗提供新线索.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和细胞系. 近交系 615 小鼠由大连医科

*国家自然科学基金资助项目(30572098).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0411-84720021/84721296, E-mail: jianwutang@163.com

收稿日期: 2007-01-11, 接受日期: 2007-04-11

大学病理教研室繁育并提供[辽实质字(2000)028号].小鼠肝癌细胞株 Hca-F 和 Hca-P, 由大连医科大学病理教研室自建并冻存.

1.1.2 试剂. RPMI1640 培养液、牛胎血清购自 Gibco 公司; 细胞裂解液(ReadyPrep Sequential Extraction Regent2)、蛋白质定量标准(DC protein assay)购自 Bio-Rad 公司; β -actin 购自北京博奥森公司; 兔抗小鼠 Erp29 多克隆抗体购自 Abcam 公司; 山羊抗鼠 UCHL3 多克隆抗体购自 SANTA-CRUZ 公司; IPG 干胶条(长 24 cm, 等电点范围 3~10)载体两性电解质、IPG 缓冲液、二硫苏糖醇(DTT)、尿素、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TDMED、Cy3 荧光染料(1-(5-carboxypentyl)-1'-propylindocarbocyanine halide N-hydroxy-succinimidyl ester)、Cy5 荧光染料 1-(5-carboxypentyl)-1'-methylindodi-carbocyanine halide N-hydroxy-succinimidyl ester、Cy2 荧光染料 3-(4-carboxymethyl) phenylmethyl 3'-ethylloxacarbocyanine halide N-hydroxysuccinimidyl ester 均购于 Amersham Bioscience 公司; 胰蛋白酶购于 Promega 公司; 乙腈购于 Brodick Johnson 公司; 碳酸氢胺、99%三氟乙酸购于 Fluka 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与动物实验.

从液氮罐中取出冻存的 Hca-F 细胞与 Hca-P 细胞, 复苏后, 以每只 2×10^6 个细胞(0.2 ml)分别接种入 615 小鼠腹腔内(第一代). 小鼠腹腔孵育 1 周后, 取腹水 0.2 ml 分别再接种入 615 小鼠腹腔内(第二代). 第二代瘤株腹腔孵育 1 周后, 取腹水细胞进行体外培养 24 h, 巨噬细胞贴壁, 瘤细胞悬浮, 收集瘤细胞. 一部分用于鉴定淋巴结转移率的动物实验, 一部分用于总蛋白提取.

Hca-F 细胞和 Hca-P 细胞以每只 2×10^6 个(0.2 ml)分别接种入 20 只 615 小鼠的右腋中皮下. 接种后 28 天, 处死小鼠, 收集引流淋巴结, 经固定, 石蜡包埋后, 进行常规 HE 染色, 在光镜下观察并检测淋巴结转移率.

1.2.2 总蛋白提取、定量及荧光标记.

瘤细胞经 TRIS (10 mmol/L) 和乙酸镁 (5 mmol/L, pH 8.0) 洗涤 3 次, 并在冷冻离心机离心 3 次(12 000 r/min, 4 min). 去上清, 取沉淀加入 3 倍体积的细胞裂解液, 并在冰浴下超声破碎, 作用 5 s, 间歇 10 s, 15 个循环. 取混合液体在冷冻离

心机离心 13 000 r/min, 15 min, 小心提取上清于新的试管中. 采用蛋白质定量标准定量, 波长 480 nm 测定吸光度, 做标准曲线. 测定样品浓度.

蛋白质的荧光标记按照厂家介绍的步骤进行. Cy3(Cy5)染料 400 pmol 标记 50 μ g Hca-F 细胞提取的蛋白质; Cy5(Cy3)染料 400 pmol 标记 50 μ g Hca-P 细胞提取的蛋白质; Cy2 染料标记 Hca-F 细胞和 Hca-P 细胞提取的蛋白质各 25 μ g, 共计 50 μ g. 然后溶于新鲜配制的二甲基甲酰胺中, 在室温, 暗室中反应 30 min, 10 nmol 赖氨酸终止反应. 未标记的各组蛋白质 150 μ g 与以上标记的蛋白质混合, 再与同等体积的 2 倍缓冲液混合(2%载体两性电解质 3~10、2% DTT、8 mol/L 尿素、4% CHAPS), 然后再与 IPG 泡涨液(20 mmol/L DTT、8 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.5% IPG 缓冲液)混合, 制成一向等电聚焦体系.

1.2.3 双向凝胶电泳及凝胶图像分析.

20℃条件下, 以上等电聚焦体系重泡涨 IPG 干胶条 10 h 后, 使用 IPGph II 电泳仪(Amersham Bioscience 公司), 按照操作说明, 以 50 mA 电流等电聚焦 76 kVh, 具体参数如下: 30 V, 12 h; 300 V, 900 vh; 600 V, 1 350 vh; 1 000 V, 2 400 vh; 8 000 V 13 500 vh; 7 000 V, 56 000 vh.

将等电聚焦结束的 IPG 胶条放入 SDS 平衡缓冲液和 0.5% DTT 中 10 min, 再放入 SDS 平衡缓冲液和 4.5% 碘乙酰胺中 10 min. 然后将胶条放于 12.5% SDS-PAGE 上, 其上含有溴酚蓝, 并用低熔点的 1%琼脂糖覆盖. 电泳参数为: 温度为 15℃, 0.2 W, 60 min; 0.4 W, 60 min; 1.8 W, 844 min, 直至溴酚蓝从胶的顶部移动到底部.

显示标记蛋白应用 Typhoon™9400 成像系统(Amersham Bioscience 公司), Cy2 图像、Cy3 图像、Cy5 图像分别使用以下激光扫描和发射过滤器: 488 nm、532 nm、633 nm; 520 nm (BP40)、580 nm (BP30)、670 nm (BP30).

采用 DeCyder(Amersham Bioscience 公司)软件 DIA (differential in-gel analysis) 和 BVA (biological variation analysis)模式, 进行凝胶图像分析. 不同凝胶内分析模式采用配对比较. 以 Cy2 为内标计算比值, 通过 Cy3 /Cy2 及 Cy5 /Cy2 的比率对应每个蛋白质点含量, 并对其进行标准化计算. 重复 4 块胶用来计算每个蛋白质点平均量的改变, 并进行 *t* 检验, 计算 *P* 值, 设定 *P* < 0.05 为有显著性差异.

1.2.4 蛋白质点酶切及电喷雾电离串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 分析. 经 DeCyder 软件分析有统计学意义的蛋白质点后, 经自动蛋白质点切割机 (Amersham Bioscience 公司) 切取后, 转移至 96 孔板中, 进行胰蛋白酶胶内酶解: 以 25 mmol/L 碳酸氢铵, 100% 乙腈分别洗 2 次, 每次各 10 min, 弃液体, 加入胰酶工作液, 在 37℃, 50 mmol/L 碳酸氢铵中孵育样品过夜, 加入 1% 三氟乙酸终止反应. 冰浴下超声处理胶后离心 20 min, 共进行 2 次, 以 50% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸反复提取液体 3 次, 然后应用超速真空吸干机浓缩样品, 样品用于电喷雾电离串联质谱. 以下为液质联用工作条件和参数. 流动相组成: A, 5% 乙腈与 0.1% 三氟乙酸; B, 95% 乙腈与 0.1% 三氟乙酸; 梯度条件: 7 min 脱盐, 2% 乙腈梯度洗脱 (B 的 0%~80%, 40 min); 柱温度: 25℃; 柱流速: 200 nl/min; 仪器校正方法: 由厂家提供的标样进行内校正. 毛细管电压: 39.5 V; 毛细管温度: 200℃; 能量碰撞: 35%; 锥孔电压: 4.50 kV; 所有测定均在 ESI (DecaXpPlus, ThermoFinnigan) 方式进行, 碰撞气体为 He; 检索参数设定: X_c 值单电荷时设为 1.90, 2 个电荷设为 2.50, 3 个电荷设为 3.00. 通过 Sequest 软件检索 NCBI nr 数据库鉴定蛋白质.

1.2.5 蛋白质印迹验证差异蛋白质的表达水平. 以前述方法培养、收集 Hca-F 细胞与 Hca-P 细胞, 超声破碎方法裂解细胞, 工作 20 s, 间歇 10 s, 20 个循环, 8 000 r/min、4℃ 离心、30 min 取上清, 为细胞总蛋白质. 测定浓度后, 50 μ g 蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 分离, 蛋白质电转移至 PVDF 膜, 印迹膜用 5% 的脱脂牛奶室温下, 摇床封闭 2 h. 以 β -actin 为内参, 多克隆抗体 (1:500), Erp29 多克隆抗体 (1:2 500), UCHL3 (1:500) 一抗反应 1 h, 置 4℃ 过夜. PBS 洗膜 3 次, 分别加入二抗、三抗, DAB 显色. 实验重复 3 次, Bandscan 图像分析软件进行灰度分析.

2 结 果

2.1 成瘤率和淋巴结转移率

Hca-F 细胞株和 Hca-P 细胞株的成瘤率 100%, 淋巴结转移率分别为 75% (15/20) 和 25% (5/20), 两者相比的统计学检验有显著性意义 ($P < 0.05$) (表 1), 符合本实验对细胞模型的要求.

Table 1 The lymph node metastasis rates of Hca-F and Hca-P cell

Group	Metastasis	Non- metastasis	Total	<i>P</i> -value
Hca-F	15	5	20	
Hca-P	5	15	20	
Total	20	20	40	0.002

$\chi^2=10.00$.

2.2 荧光差异双向凝胶电泳蛋白表达图谱

为产生有统计学意义的可靠结果, 共跑 4 块平行胶, 使用 DeCyder 软件分析图谱所检测到的蛋白质点和匹配上的蛋白质点, 如表 2 所示.

Table 2 The number of detected protein spots and matched protein spots in gels

Gel ID	Label	No.of Spots	Matched	Group
1	Cy2	2 515	1 486	Standard
	Cy3	2 515	1 486	F
	Cy5	2 515	1 486	P
2	Cy2	2 508	1 455	Standard
	Cy3	2 508	1 455	P
	Cy5	2 508	1 455	F
3	Cy2	2 422	1 591	Standard
	Cy3	2 422	1 591	F
	Cy5	2 422	1 591	P
4	Cy2	2 406	1 551	Standard
	Cy3	2 406	1 551	P
	Cy5	2 406	1 551	F

所建立的 Hca-P 和 Hca-F 细胞的蛋白质荧光差异双向凝胶电泳蛋白表达图谱如图 1 所示, 将每块凝胶重叠的总图谱分解为 3 张图, 分别对应 Cy2 标记的标准样品 (蓝)、Cy3 标记的样品 (绿) 和 Cy5 标记的样品 (红) (图 2、图 3 和图 4). DeCyder 软件的 DIA 能检测一块胶中完全重叠的 3 幅图像. 对 3 幅图像 (1 个内标和 2 个样品) 进行共找点, 得到一致、精确的比值计算. 全自动进行背景扣除, 定量, 归一化胶内的匹配以便达到低实验偏差的高通量分析.

DeCyder 软件的 BVA 在凝胶之间进行匹配, 并检测所有凝胶上的样品之间差异的一致性, 并应用统计学计算每个差异的可信度水平. 经分析, Hca-F 和 Hca-P 样品间有统计学意义的差异性蛋白质点共 163 个 (图 5), 其中比值改变 2 倍以上的差

异性蛋白质点 23 个(表 3), 1.5~2 倍的差异性蛋白质点 79 个, 1~1.5 倍差异性蛋白质点 61 个. 在 Hca-F 细胞中上调的蛋白质点为 86 个, 在 Hca-P 细胞中上调的蛋白质点为 77 个.

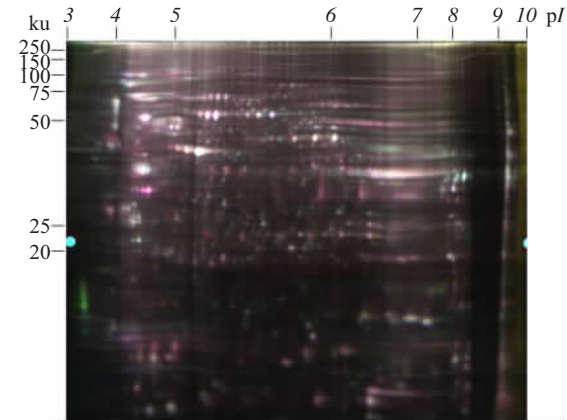


Fig. 1 2D DIGE image of Hca-F and Hca-P (Gel 1)



Fig. 2 The image of standard sample labelled by Cy2 (Gel 1)

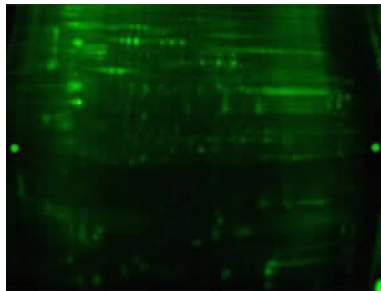


Fig. 3 The image of Hca-F sample labelled by Cy3 (Gel 1)

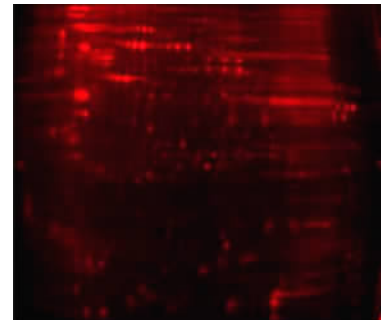


Fig. 4 The image of Hca-P sample labelled by Cy5 (Gel 1)

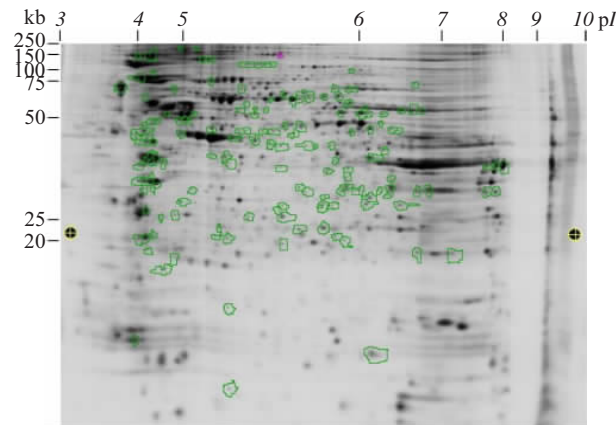


Fig. 5 163 differential protein spots with statistical significance between Hca-F and Hca-P in master gel

2.3 差异性蛋白质点的质谱 (LC-ESI-MS/MS) 鉴定

在 Hca-F 和 Hca-P 细胞之间蛋白质表达有统计意义的 163 个差异性点之中, 选取比值变化在 2 倍以上的 23 个点, 进行质谱分析, 分析结果进行数据库搜索. 图 6 是 24 号蛋白胰酶消化后肽段 m/z 为 2286.20874 的串联 MS/MS 谱图, 其序列为 VAFTGSTGVGH LIQVAAGSSNLK. 图 7 是该蛋白质数据库搜索结果, 共匹配上 24 个肽段, 覆盖率为 47%, 为 Aldh2 protein (线粒体乙醛脱氢酶 2). 其余蛋白质都是如此进行分析.

共鉴定出 17 个蛋白质(表 3), 在高淋巴道转移瘤株 Hca-F 中高表达的蛋白质有 7 个: 转羟乙醛酶 (transketolase, Tkt)、波形蛋白 (vimentin, Vim)、肌酸激酶(脑)(creatine kinase, brain, Ckb)、膜联蛋白 7 (anxa7 protein, Anxa7)、膜联蛋白 5 (anxa5 protein, Anxa5)、烯酰辅酶 A 水合酶 1 (过氧化物酶体)(enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal, Ech1)、核内异质核糖核蛋白 A2/B1 异构体 1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1, Hnrpa2b1). 而在 Hca-F 瘤株中低表达的蛋白质有 10 个: 真核翻译延长因子 2 (eukaryotic translation elongation factor 2, Eef2)、Ero1 样蛋白 (Ero1 protein, Ero1)、乙醛脱氢酶 2 (线粒体) (Aldh2 protein, Aldh2)、苹果酸盐脱氢酶 2 (NAD) (malate dehydrogenase 2, NAD, Mdh2)、 β -内酰胺酶 2 (lactamase, beta 2, Lactb2)、谷胱甘肽 S 转移酶 ω 1 (glutathione S-transferase omega1, GST ω 1)、泛素 C 末端水解酶同工酶 L3 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3, UCHL3)、内质网蛋白 29(前体)(endoplasmic reticulum protein

Table 3 Identified proteins by LC-ESI-MS/MS in Hca-P vs. Hca-F comparison

Spots No.	Master No.	Av. Ratio ¹⁾	Gi-Accession	Protein name	PP ²⁾	Match ³⁾	cover-age(%) ⁴⁾	M/u ⁵⁾	pI ⁶⁾	Biological process	GO ⁷⁾ Cell component	Molecular function
1	176	2.07	13938072	Eukaryotic translation elongation factor 2	7.90E-09	4	6.1	95 253.9	6.40	Translation		GTP binding
2	495	-2.05	33244005	Transketolase	7.02E-13	6	14.9	67 589.6	7.22	Regulation of growth		Calcium ion binding
3	631	2.1	71059719	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	9.30E-11	13	32.6	54 051.2	6.10	Electron transport	Endoplasmic reticulum	Oxidoreductase activity
4	826	2.12	13529509	Aldh2 protein	1.10E-15	24	47.8	56 502.8	7.47	Metabolism	Mitochondrion	Aldehyde dehydrogenase (NAD) activity
5	886	-2.29	31982755	Vimentin	2.42E-10	14	33.3	51 534.1	4.80	Intermediate filament-based process	Cytoplasm	Protein binding
6	887	-2.29	31982755	Vimentin	2.89E-09	14	36.5	51 534.1	4.80	Intermediate filament-based process	Cytoplasm	Protein binding
7	1006	-2.49	14290464	Anxa7 protein	7.22E-10	8	13.5	49 878.3	5.04	Calcium ion homeostasis	Cytosol, nuclear envelope	Calcium ion binding
8	1007	-2.95	14290464	Anxa7 protein	4.20E-09	11	20.3	49 878.3	5.04	Calcium ion homeostasis	Cytosol, nuclear envelope	Calcium ion binding
9	1040	-2.1	15929689	Creatine kinase, brain	1.71E-09	10	32.0	42 678.3	5.31		Mitochondrion	Creatine kinase activity
10	1071	-2.11	15929689	Creatine kinase, brain	8.88E-14	8	29.8	42 678.3	5.31		Mitochondrion	Creatine kinase activity
11	1361	2.73	19484047	Malate dehydrogenase 2, NAD	5.20E-11	15	52.9	35 589.8	8.79	Glycolysis	Mitochondrial inner membrane	L-lactate dehydrogenase activity
12	1454	-2.47	13277612	Anxa5 protein	1.11E-10	19	66.0	35 717.2	4.67	Blood coagulation		Calcium ion binding
13	1457	-3.16	13277612	Anxa5 protein	1.11E-10	21	51.8	35 717.2	4.67	Blood coagulation		Calcium ion binding
14	1526	-2.68	7949037	Enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	7.50E-10	9	30.7	36 096.2	7.63	Fatty acid metabolism	Mitochondrion	Catalytic activity
15	1533	-2.01	7949053	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1	3.70E-09	3	12.1	35 971.9	8.95	mRNA processing	Nucleus	Nucleic acid binding
16	1546	2.27	13278495	Lactamase, beta 2	3.10E-09	3	12.8	32 735.0	5.88		Mitochondrion	
17	1579	2.28	55154387	Glutathione S-transferase omega 1	2.73E-06	5	21.1	27 480.9	7.16	Metabolism	Cytoplasm	Glutathione transferase activity
18	1588	2.4	55154387	Glutathione S-transferase omega 1	8.29E-09	4	15.6	27 480.9	7.16	Metabolism	Cytoplasm	Glutathione transferase activity
19	1625	2.91	17380334	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	9.25E-12	5	23.3	26 136.8	4.82	Adult walking behavior	Intracellular	Cysteine-type peptidase activity
20	1647	2.69	16877776	Endoplasmic reticulum protein ERp29, precursor	1.90E-09	7	30.3	28 806.1	5.83	Protein secretion	Endoplasmic reticulum	
21	1650	2.27	16877776	Endoplasmic reticulum protein ERp29, precursor	2.91E-07	5	27.9	28 806.1	5.83	Protein secretion	Endoplasmic reticulum	
22	1753	2.1	71059731	Lysophospholipase 1	6.89E-08	2	10.2	24 673.3	5.73	Fatty acid metabolism	Mitochondrion	Catalytic activity
23	1864	2.86	14625464	Stathmin	2.91E-06	5	31.4	17 206.9	5.90	Axonogenesis	Cytoplasm	Protein binding

¹⁾ “+” up-regulated in Hca-P cell line; “-” up-regulated in Hca-F cell line. ²⁾ The value is the lower, the identification results is the more reliable.

³⁾ Number of matched peptides was obtained from software. ⁴⁾ The protein amino acid sequence coverage by the matching peptides. ⁵⁾ Theoretical molecular mass. ⁶⁾ Theoretical pI. ⁷⁾ Gene Ontology.

Erp29, precursor, ERp29)、溶血磷脂酶 1 (lysophospholipase 1, Lypla1)、微管不稳定蛋白 (stathmin, Stmn1). 有 5 个蛋白质 Vim、Anxa7、Ckb、Anxa5 和 Erp29 反复出现 2 次, 分析与翻译后修饰有关, 这包括磷酸化、糖基化及可变剪切, 均可导致多个蛋白质点来源于同一个基因.

对以上 17 个蛋白质进行 Gene Ontology(GO)的功能分类, 在细胞成分中, 有 12 个细胞器蛋白, 其中线粒体蛋白有 6 个; 在生化过程中, 有 9 个是与代谢相关蛋白; 在分子功能中, 有 9 个蛋白质具有催化活性. 它们功能涉及到蛋白质分泌、蛋白质结合、核苷酸结合, 钙离子结合、凋亡和调节生长等过程(表 3).

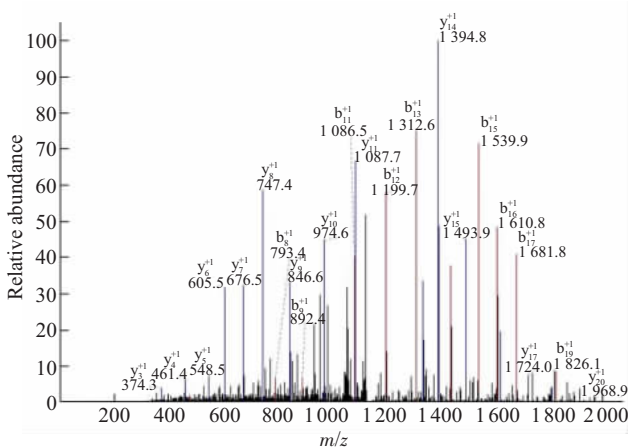


Fig. 6 MS/MS spectrum of VAFTGSTEVGHLIQVAA-GSSNLK from protein spot 24

Reference: gi|13529509|gb|AAH05476.1|Aldh2 protein [Mus musculus]
Database: c:\Xcalibur\database\mouse20060505.fasta
Number of Amino Acids: 519 Monoisotopic MW: 56502.8 pI: 7.47

Protein:	MLRAALTTVR	RGPRLSRLLS	AAATSAPVAP	NHQPEVFCNQ	IFINNKHDA
	VSRKTFTPTVN	PSTGEVICQV	AEGNKEDVDK	AVKAARAAFQ	LGSPWRRMDA
	SDRGRLLYRL	ADLIERDRTY	LALETLDNG	KPYVISYLV	LDMVLKCLRY
	YAGWADKYHG	KTIPIDGDF	SYTRHEPVG	CGQIIPWNFP	LLMQAWKLG
	ALATGNVVVM	KVAEQTPLTA	LYVANLIKEA	GPPPGVVNIV	PGFGPTAGAA
	IASHEGVDKV	AFTGSTEVGH	LIQVAAGSSN	LKRVTLELGG	KSPNIIMSDA
	DMDWAVEQAH	FALFFNQGC	CCAGSRTFVQ	ENVYDEFVER	SVARAKSRVV
	GNPFDSTRTEQ	GPQVDETQFK	KILGYIKSGQ	QEGAKLLCGG	GAAADRGYFI
	QPTVFGDVVD	GMTIAKEEIF	GPVMQILKFK	TIEEVVGRAN	DSKYGLAAAV
	FTKDLDKANY	LSQALQAGTV	WINCYDVFGA	QSPFGGYKMS	GSGRELGEYG
	LQAYTEVKTV	TVKVPQKNS			
Protein Coverage:					
Sequence					
	KTFPTVN	PSTGEVICQVAEGNKEDVDK			
	TFPTVN	PSTGEVICQVAEGNK			
	TFPTVN	PSTGEVICQVAEGNKEDVDK			
	AAFQLGSPWR				
	LADLIER				
	YYAGWADK				
	YYAGWADKYHGK				
	TIPIDGDFSYTR				
	HEPVGVCQIIPWNFP	LLMQAWK			
	LGPALATGNVVVMK				
	VAEQTPLTALYVANLIK				
	EAGFPPGVVNIVPGFGPTAGAAIASHEGVDK				
	VAFTGSTEVGHLIQVAAAGSSNLK				
	VAFTGSTEVGHLIQVAAAGSSNLKR				
	RVTLELGGK				
	VTLELGGK				
	TFVQENVYDEFVER				
	VVGPNPFSR				
	TEQGPQVDETQFK				
	KILGYIK				
	ILGYIK				
	SGQOEGAKLLCGGGAAADR				
	LLCGGGAADR				
	GYFIQPTVFGDVK				
	DGMTIAK				
	DGMTIAKEEIFGPVMQILK				
	EEIFGPVMQILK				
	TIEEVVGR				
	YGLAAAVFTK				
	ELGEYGLQAYTEVK				
	TVTVPQK				
Totals:					

Fig. 7 The searching result in database from differential protein spot 24

2.4 差异性蛋白的蛋白质印迹验证结果

蛋白质印迹验证高低淋巴道转移力细胞株 Hca-F 和 Hca-P 间差异性表达蛋白, β -actin 为内

参, 结果表明, Erp29 和 UCHL3 在 Hca-P 细胞中均高表达, 这与 2D DIGE 的分析结果一致 (图 8).

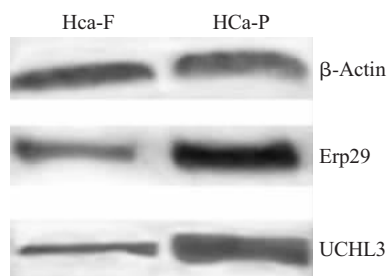


Fig. 8 Western blotting analysis of difference proteins including Erp29 and UCHL3 using β -actin as internal control between Hca-F and Hca-P cell lines

3 讨 论

浸润性生长和转移潜能是恶性肿瘤不同于良性肿瘤的根本特征,是恶性肿瘤顽固性和难治性的根本原因.由转移所导致的恶性肿瘤患者死亡率高、预后差及其发生机制不清,长期以来一直是肿瘤学研究面临的难题之一.由上皮来源的恶性肿瘤,淋巴道转移是其早期转移的主要方式,因此对于淋巴道转移机制进行研究,发现淋巴道转移关键分子机制和通路,并建立起一套行之有效的针对性阻遏手段,将对恶性肿瘤患者具有重要的现实意义.

由于哺乳类动物恶性肿瘤与人类恶性肿瘤的发生部位、组织学类型、转移途径及方式均类似,约有40%的小鼠和人类基因组序列高度相似,80%人类基因在小鼠基因组中找到相应的基因.因此应用小鼠肿瘤淋巴道转移模型,可为人类肿瘤转移相关基因的筛选、分离提供必要的基础材料,对探讨恶性肿瘤淋巴道转移机制意义深远,为基因治疗肿瘤淋巴道转移奠定基础.

肿瘤的异质学说指出,原发瘤的瘤细胞群体异质性强,其内有不同转移潜能的亚群存在^[9].因此基于该理论,筛选并建立了多种不同转移潜能肿瘤细胞的细胞模型. Hca-F 细胞株和 Hca-P 细胞株是大连医科大学病理教研室利用可移植性小鼠腹水性肝癌细胞(H₂₂),将其接种于有正常免疫功能的615小鼠足垫,经多次淋巴系统筛选,得到的高度同源,且淋巴道转移能力明显不同细胞株.其中 Hca-F 是具有高转移潜能的细胞株,淋巴结转移率高于70%; Hca-P 是具有低转移潜能的细胞株,淋巴结转移率低于30%,二者的主要差异集中在淋巴道转移表型上,因此应用此来源于同一亲本细胞,遗传背景相似,但转移潜能不同细胞模型进行对比研究,可为解析淋巴道转移机制提供可靠的研究平台.

本课题所采用的技术是基于双向凝胶电泳的定量蛋白质组学技术.双向凝胶电泳^[9]是蛋白质组研究中的主流技术,但该技术的重复性、敏感性差,缺乏对蛋白质点的精确定量.而荧光差异双向凝胶电泳技术克服了以上缺点,在同一块凝胶上同时电泳2~3个样品,能精确地在较宽的动态范围内对相应的蛋白质进行定量,而且引进内标,使凝胶内的待比较样品对应于内标产生了标准化的数据,检测到的是比值(ratio),而不是“量”(volume),从而在不同凝胶之间可以精确定量和统计学分析.最重要的是将实验变异从真正的生物学变异中分离出来,使实验结果的精确性和可靠性大为增加,可检测到样品间小于10%的蛋白质表达差异,统计学可信度达到95%以上^[10].

应用荧光差异双向凝胶电泳技术,本实验共检测到 Hca-F 和 Hca-P 细胞之间163个有统计学差异的蛋白质点,在 Hca-F 细胞中表达上调的蛋白质点为86个,在 Hca-P 细胞中表达上调的蛋白质点为77个.这些差异性蛋白质可能与肝癌淋巴道转移相关,分别起到促进或抑制淋巴道转移的作用.针对这些差异性蛋白质点,本课题选取2倍以上的23个蛋白质点进行质谱分析,共鉴定出17个蛋白质.这些蛋白质都能在人类组织细胞中找到同源蛋白.

在 Hca-F 细胞中表达上调的蛋白质中,有些是已报道在某些肿瘤中能够促进转移的蛋白质. TKT 在人唾液腺腺瘤的高转移瘤株中表达^[11]; VIM 与乳腺癌、宫颈癌、胃肠肿瘤的转移有关^[12]; 而 HNRPA2B1 能够调节多种肿瘤的增殖、分化、转移^[13,14],尤其对于肺癌的早期诊断、进展更具有意义. CKB 是肌酸激酶的一种同工酶,主要在脑中表达.在胃肠道肿瘤,前列腺癌、卵巢癌中表达增加,且在肝癌细胞中的活性增加^[15]. HNRPA2B1 与 CKB 联合可作为肠癌进展的潜在标记物^[16]. 但有更多的蛋白质与肿瘤的转移关系不明确. ANXA7 蛋白属于膜联蛋白家族,具有钙离子结合,钙离子依赖的磷脂结合分子功能,是前列腺癌,乳腺癌,黑色素瘤,多发性纤维胶质瘤的肿瘤抑制基因,在基因敲除小鼠 Anx7(+/-)中^[18],肝癌、淋巴瘤等恶性肿瘤的进展迅速,但 Srivastava 等^[19]发现 ANXA7 高表达水平与乳腺癌的侵袭性及 HER2 阴性的短生存期相关. 故该蛋白质还需进一步研究其与淋巴道转移的关系. ECH1 是羧甲酸盐合酶蛋白亚家族10个家族成员之一,具有催化活性,参与脂肪酸代谢, Nishigaki 等^[20]应用蛋白质组技术鉴定人胃癌的差异

性表达蛋白, 发现该蛋白质在胃癌中表达下调, 但该蛋白质与肿瘤的具体关系未见进一步的研究, 更未见与肿瘤转移关系的相关报道. 因此该蛋白质可作为与淋巴道转移相关的潜在研究对象, 进一步研究.

在 Hca-F 细胞中表达下调的蛋白质中, 多为与肿瘤转移关系不清的蛋白质. ALDH2 蛋白是 NAD 依赖的具有乙醛脱氢酶活性的酶, 能够将易引起细胞和 DNA 损伤的乙醛转变成乙酸, 其基因型的多态性与肝癌、胃癌、食道癌等消化道肿瘤的发病相关^[21]. ERP29 是内质网上的分泌蛋白, 在肠癌, 乳腺癌, 唾液腺癌中的表达上调, 对基底细胞癌分型有一定意义^[22], Myung 等^[23]发现该蛋白质在 10 种人类肿瘤细胞中作为分子伴侣. UCHL3 是泛素硫酸化酶家族成员, 具有半胱氨酸类型肽酶活性和水解酶活性, 基因敲除后的纯合子小鼠中枢神经根变性, 出生后出现进行性视网膜 - 肌肉退行性变, 小鼠很快死亡, 后研究发现, 其视网膜病变是由于该基因缺乏而引起感光细胞凋亡造成的^[24]. 与该蛋白质凋亡作用相反的家族成员 UCHL1 在肠癌、卵巢癌等多种肿瘤中高表达. 这些蛋白质国内外均未见与肿瘤转移相关的报道, 可作为与淋巴道转移相关的候选蛋白进一步研究.

本研究以先进的定量蛋白质组学技术 2D DIGE 与质谱结合, 以稀有的肝癌高低淋巴道转移细胞株为研究对象, 筛选出与肿瘤淋巴道转移相关的蛋白质共 17 个, 可能分别起到促进或抑制淋巴道转移的作用, 可利用现有的后基因组时代的技术和手段, 进一步深入研究这些蛋白质的功能, 这将为解析肿瘤淋巴道转移的分子机制提供基础.

参 考 文 献

- Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (3): 497~503
- Nathanson D. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*, 2003, **2** (98): 413~422
- 凌茂英, 刘希凤, 关素琴, 等. 小鼠肝癌不同转移力克隆的分离极其特性的研究. *中华医学杂志*, 1990, **70** (6): 315~318
Ling M Y, Liu X F, Guan S Q, *et al.* *Chin Med J*, 1990, **70** (6): 315~318
- 凌茂英, 王明辉, 郭伶俐, 等. Hca/16A3-F 及 Hca/16A2-P 两株小鼠淋巴道转移肝癌细胞系的特性研究. *中华医学杂志*, 1995, **75** (3): 170~171
Ling M Y, Wang M H, Guo L L, *et al.* *Chin Med J*, 1995, **75** (3): 170~171
- Hou L, Li Y, Jia Y H, *et al.* Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol*, 2001, **7** (4): 532~536
- Song B, Tang J W, Wang B, *et al.* Identify lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines using gene chip. *World J Gastroenterol*, 2005, **11** (10): 1463~1472
- Unlu M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 1997, **18** (11): 2071~2077
- Poste G, Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 1980, **283** (5743): 139~146
- O'farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, **250** (10): 4007~4021
- Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **382** (3): 669~678
- An J, Sun J Y, Yuan Q, *et al.* Proteomics analysis of differentially expressed metastasis-associated proteins in adenoid cystic carcinoma cell lines of human salivary gland. *Oral Oncol*, 2004, **40** (4): 400~408
- Uluoglu O, Akyurek N, Uner A, *et al.* Interdigitating dendritic cell tumor with breast and cervical lymph-node involvement: a case report and review of the literature. *Virchows Arch*, 2005, **446** (5): 546~554
- Hiraki A, Murakami T, Aoe K, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 expression in malignant mesothelioma. *Cancer Sci*, 2006, **97** (11): 1175~1181
- Sheu C C, Chang M Y, Chang H C, *et al.* Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology*, 2006, **70** (3): 203~211
- Meffert G, Gellerich F N, Margreiter R, *et al.* Elevated creatine kinase activity in primary hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*, 2005, **5**: 5~9
- Balasubramani M, Day B W, Schoen R E, *et al.* Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. *Cancer Res*, 2006, **66** (2): 763~769
- Corsten M F, Hofstra L, Narula J, *et al.* Counting heads in the war against cancer: defining the role of annexin A5 imaging in cancer treatment and surveillance. *Cancer Res*, 2006, **66** (3): 1255~1260
- Srivastava M, Montagna C, Leighton X, *et al.* Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7(+/-) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (24): 14287~14292
- Srivastava M, Bubendorf L, Raffeld M, *et al.* Prognostic impact of ANX7-GTPase in metastatic and HER2-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2004, **10** (7): 2344~2350
- Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, *et al.* Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics*, 2005, **5** (12): 3205~3213
- Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, *et al.* Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, **15** (4): 696~703
- Chereti C, Dietrich F, Chatzistamou I, *et al.* Expression of ERp29,

- an endoplasmic reticulum secretion factor in basal-cell carcinoma. Am J Dermatopathol, 2006, **28** (5): 410~412
- 23 Myung J K, Afjehi-Sadat L, Felizardo-Cabatic M, *et al.* Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines. Proteome Sci, 2004, **14**; **2** (1): 8
- 24 Sano Y, Furuta A, Setsuie R, *et al.* Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice. Am J Pathol, 2006, **169** (1):132~141

Identification Lymphatic Metastasis-associated Proteins in Mouse Hepatocarcinoma Cell Lines Using Quantitative Proteomics Technique*

SUN Cheng-Rong¹⁾, TANG Jian-Wu^{1)**}, SUN Ming-Zhong²⁾, LIU Shu-Qing³⁾, ZHANG Hong-Ying¹⁾,
WANG Bo¹⁾, SONG Bo¹⁾, ZHANG Ya-Nan¹⁾, ZHANG Zhu-Qing¹⁾, ZHAO Zhi-Ying¹⁾

¹⁾Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

²⁾Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

³⁾Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract Lymphatic metastasis is the first step in the metastatic process of malignant tumors deriving from epithelia, and its uncertain mechanisms are always the major problem in the field of oncology. In order to obtain lymphatic metastasis-associated proteins, the protein expressed profiles of mouse hepatocarcinoma ascites syngeneic cell lines Hca-F with highly lymphatic metastatic potentiality and Hca-P with low lymphatic metastatic potentiality were compared using fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis(2D DIGE). DeCyde software was applied to analyze 2D DIGE images, and 163 differential protein spots between Hca-F and Hca-P were detected, including 86 up-regulated protein spots in Hca-F and 77 down-regulated protein spots in Hca-F. 23 protein spots representing differential ratio more than 2-fold were chosen to be analyzed by MS. 17 metastasis-associated proteins were identified, and the partial identified proteins were further validated by Western blotting analysis. Of the identified proteins, the expression of transketolase, vimentin, creatine kinase(brain), anxa7 protein, anxa5 protein, enoyl coenzyme A hydratase 1 (peroxisomal), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 were up-regulated in Hca-F. Whereas eukaryotic translation elongation factor 2, Ero11, Aldh2 protein, malate dehydrogenase 2 (NAD), lactamase beta 2, glutathione S-transferase omega1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3, endoplasmic reticulum protein ERp29(precursor), lypla1, stathmin were down-regulated in Hca-F. On the basis of the Gene Ontology (GO) classification, the differential expression proteins were found to be involved in many of biological process, such as metabolism, protein secretion, protein binding, nucleic acid binding, calcium ion binding, apoptosis and regulation of growth etc. Validating the function of these proteins is helpful to elucidate the mechanisms of lymphatic metastasis.

Key words hepatocarcinoma, lymphatic metastasis, quantitative proteomics, fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis (2D DIGE), mass spectrometry(MS)

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30572098).

**Corresponding author . Tel/Fax: 86-411-84720021/84721296, E-mail: jianwutang@163.com

Received: January 11, 2007 Accepted: April 11, 2007

