

激光捕获显微切割技术纯化的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞的比较蛋白质组学研究*

程爱兰** 黄卫国** 张鹏飞 李茂玉 彭芳 李峰
李苹 易红 李美香 陈主初 肖志强***

(中南大学湘雅医院医学实验研究中心, 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

摘要 为筛选鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的分子标志物, 采用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)分别从 NPC 组织和正常鼻咽上皮组织(normal nasopharyngeal epithelial tissue, NNET)中切割纯化 NPC 细胞和正常鼻咽上皮细胞(normal nasopharyngeal epithelial cells, NNEC), 应用二维凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)分离 LCM 纯化细胞的蛋白质, 图像分析识别差异表达的蛋白质点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离串联质谱(ESI-Q-TOF-MS)鉴定差异蛋白质点, Western blot 检测差异蛋白 cytokeratin 8 (CK8)在 LCM 纯化的 NPC 细胞和 NNEC 以及具有不同分化程度或转移潜能的 4 株 NPC 细胞中的表达, 免疫组织化学检测 CK8 在 63 例 NPC、28 例 NNET 及 20 例颈淋巴结转移 NPC 组织中的表达水平. 建立了 LCM 纯化的 NPC 细胞和 NNEC 的 2-DE 图谱, 质谱鉴定了 29 个差异蛋白质, 其中 15 个蛋白质只在 NPC 表达或表达明显增高, 14 个蛋白质在 NPC 中表达下调或缺失; Western blot 结果显示, CK8 的表达水平在 NPC 中较 NNET 明显下调, 并与 NPC 细胞株的分化程度和转移潜能有关; 免疫组织化学结果显示, CK8 在 NPC 组织中的表达较 NNET 明显下调, 在颈淋巴结转移 NPC 中的表达较原发 NPC 明显上调. 研究结果提示, CK8 与 NPC 分化及淋巴结转移相关, 有望成为预测 NPC 转移和区别 NPC 分化程度的分子标志物.

关键词 激光捕获显微切割, 鼻咽癌, 蛋白质组学, 二维凝胶电泳, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 电喷雾电离串联质谱, Western blot, 免疫组织化学

学科分类号 R318.0

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方和东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均居头颈恶性肿瘤之首^[1]. 由于 NPC 早期症状不明显及其高转移潜能, 绝大多数 NPC 患者就诊时已是晚期, 严重影响其治疗效果和预后, 大多数病人死于 NPC 侵袭和远处转移^[2,3]. 因此, 寻找预测 NPC 转移的分子标志物对其疗效和预后具有重要作用. 尽管血清 EBV 抗体^[4]、血清淀粉样蛋白 A^[5]、Bmi-1^[6]和 Met 蛋白^[7]等被报道为潜在的 NPC 分子标志物, 但由于其特异性和敏感性低, 其临床应用价值有限. 发现新的 NPC 分子标志物将有助于 NPC 的诊断、治疗和发病机制研究.

高通量的基因芯片技术和蛋白质组学技术具有发现肿瘤相关分子的潜能. 如 cDNA 芯片分析 NPC 的基因表达谱已发现一些可能与 NPC 发病有

关的异常表达基因^[8]. 由于蛋白质是细胞的功能分子, 蛋白质组学技术在临床应用方面被认为优于 cDNA 芯片技术, 它在识别与肿瘤发生发展相关的蛋白质、发现肿瘤分子标志物和治疗靶标方面具有独特的优势.

肿瘤组织与其起源的正常组织的比较蛋白质组学是发现肿瘤标志物和治疗靶标的最直接和合理的方式之一. 然而, 采用组织样本进行蛋白质组学研

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB5120), 芙蓉学者特聘教授科研奖励基金(湘教通[2007]362 号), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教计函[2002]48)和湖南省科技厅重大科技专项(04XK1001, 06SK2004)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel:0731-4327239, Fax: 0731-4327332

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-10-12, 接受日期: 2007-12-18

研究的主要障碍是组织的异质性。组织异质性问题在NPC尤为明显,因为NPC组织样本常常含有大量的浸润性淋巴细胞和其他间质细胞,NPC起源的NNEC在鼻咽上皮组织样本中所占比例也不到10%,导致活检组织常常不含目的细胞。因此,为提高比较蛋白质组学研究筛选肿瘤标志物的准确性,有必要纯化靶细胞用于蛋白质组学研究。从肿瘤组织中纯化细胞的方法有许多种,如激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、组织原代培养和流式细胞术分选等。LCM技术是目前从组织中纯化细胞的最好方法之一^[9],已有采用LCM技术从乳腺癌^[10]、肝癌^[11]和胰腺癌^[12]等组织中纯化靶细胞用于蛋白质组学研究的报道。

为筛选NPC的标志物,本研究采用LCM技术从新鲜的活检NPC组织和正常鼻咽上皮组织样本中纯化相应的靶细胞,2-DE和质谱技术分离、鉴定LCM纯化NPC细胞和NNEC的差异蛋白质,Western blot和免疫组化检测差异蛋白质CK8的表达。研究结果发现,CK8与NPC分化及淋巴结转移相关,有望成为NPC的分子标志物。据我们所知,这是首次采用LCM纯化的NPC细胞和NNEC进行蛋白质组学研究,研究结果将有助于揭示NPC癌变机制以及NPC诊断与治疗分子标志物的发现。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织. 54例新鲜的活检NPC组织(未分化型非角化鳞癌即WHO type III)及54例新鲜的活检正常鼻咽上皮组织(NNET)取自中南大学湘雅一医院和湘雅二医院,用于2-DE和Western blot分析,病人为未经放疗和化疗的初诊病人,并经病理学确诊。石蜡包埋组织标本包括63例NPC组织(10例无淋巴结转移,其余53例有淋巴结转移。按WHO组织学分类:4例为角化性鳞癌即WHO type I,9例为分化型非角化鳞癌即WHO type II,50例为未分化型非角化鳞癌即WHO type III),28例NNET和20例颈淋巴结转移的NPC组织取自湖南省肿瘤医院病理科,用于H.E.与免疫组织化学法染色。

1.1.2 细胞. 高分化NPC细胞系CNE1、低分化NPC细胞系CNE2、高转移NPC细胞系5-8F和低转移NPC细胞系6-10B由本室保存,用含10%小牛血清的RPMI1640培养液进行传代培养。

1.1.3 试剂. 丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、三羟

甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、硫脲、过硫酸铵、CHAPS、IPG缓冲液pH 3~10、24 cm固相化pH梯度干胶条、考马斯亮蓝G-250、2D蛋白定量试剂盒购自Amersham Biosciences公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK处理的胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈、 α -氨基-4-羟基肉桂酸(CCA)、鼠抗人 β -actin抗体购自Sigma公司;鼠抗人CK8单克隆抗体购自美国Lab Vision公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购自Santa Cruz公司;S-P免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.1.4 主要仪器. 激光捕获显微切割仪(Leica AS)、冰冻切片机为Leica公司产品;IPGphor等电聚焦仪、Ettan DALT II垂直电泳系统、Imagescanner扫描仪、Labscan扫描软件为Amersham Biosciences公司产品;Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪为Applied Biosystem公司产品;ESI-Q-TOF串联质谱仪(Micromass)为Waters公司产品;PDquest 7.0凝胶图像分析软件为Bio-Rad公司产品;Mascot肽质量指纹图数据库查询软件为Matrixscience公司产品。

1.2 方法

1.2.1 激光捕获显微切割纯化细胞. NPC组织和NNET行8 μ m厚连续冰冻切片,贴于LCM专用薄膜载片(Leica公司)。冰冻切片用75%的乙醇固定,1%的甲苯胺蓝染色,空气干燥3~5 min。然后用激光捕获显微切割仪分别从NPC组织和NNET切片上切割肿瘤细胞和NNEC。因为鼻咽部活检标本太小,从一个标本中纯化的细胞数量不够一次2-DE分析,所以将从10例NPC组织或NNET中纯化的细胞混合后进行2-DE分析。

1.2.2 2-DE. 在收集的纯化细胞中,加入组织裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,100 mmol/L DTT,4% CHAPS,0.5 mmol/L EDTA,40 mmol/L Tris,2% NP40,1% Triton X-100,5 mmol/L PMSF和2% Phamarlyte)4℃裂解1 h,12 000 r/min、4℃离心45 min,取上清即为组织细胞总蛋白,2-D蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。1.0 mg细胞总蛋白与水化液(8 mol/L尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,18 mmol/L DTT,0.5% IPG pH 3~10缓冲液,痕量溴酚蓝)混合至总体积为450 μ l。蛋白质样本于IPGphor等电聚焦仪上按如下条件:30 V水化14 h后经500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V

10 h 进行等电聚焦. 等电聚焦结束后分别于平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 0.2 % DTT, 痕量溴酚蓝)和平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 3%碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)各平衡 15 min. 平衡后的 IPG 胶条转移至 12% SDS-PAGE 胶上端, 在 Ettan DALT II 垂直电泳槽上进行第二向垂直电泳. 电泳结束后, 对 2-D 胶进行考马斯亮蓝染色. 实验重复三次.

1.2.3 图像分析. 应用 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件扫描染色的 2-D 胶, 获取 2-D 图像. PDQuest 2-DE 软件比较分析 NPC 细胞与 NNEC 的 2-DE 图谱的差异, 选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点进行质谱分析.

1.2.4 MALDI-TOF-MS 分析. 从胶中切取差异蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 加入 1 ml 50%乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢铵混合液、置于 37℃水浴箱中脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 60 min, 37℃酶解 14 h, 30 μ l 萃取液(100 %乙腈:5 %三氟乙酸 1:1)萃取 30 min, 重复萃取 1 次. 将萃取液收集于 0.5 ml EP 管, 冷冻浓缩至 10 μ l, 取 0.5 μ l 样品与 1 μ l CCA 基质液混合, 点样于不锈钢板, 在 MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行分析. MALDI-TOF-MS 分析采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压 20 000 V, 反射电压比 1.12, N_2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 使用胰蛋白酶自降解峰 m/z 842.50 和 m/z 2211.10 作为内校正, 获得肽质量指纹图谱(PMF). Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质.

1.2.5 ESI-Q-TOF 分析. 为保证蛋白质鉴定结果的准确性, 所有 MALDI-TOF-MS 鉴定的差异蛋白质点均进行 ESI-Q-TOF 串联质谱分析. 所有测定均在正离子方式下进行. 雾化气体为氮气, 碰撞气体为氦气. 源温 80℃, 锥孔电压 50 V. TOF 加速电压为 0.2 kV, MCP 检测器电压为 2.7 kV, 当进行 LC-ESI-MS/MS 自动分析时, 毛细管电压为 3 000 V. 测定结果仪器以 peaklist 文件形式给出, 通过 Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质点.

1.2.6 Western blot 验证差异蛋白 CK8 的表达水平. 以 24 对显微切割纯化的 NPC 细胞和 NNEC 为样本, 加入组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA,

0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L Aprotinin, 25 mg/L Leupeptin)冰上裂解 1 h, 12 000 r/min、4℃离心 30 min 后取上清即为组织细胞总蛋白, Bradford 方法测定蛋白质浓度. 40 μ g 总蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 蛋白质电转移至 PVDF 上, 印迹膜用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h; 1:1 000 稀释的鼠抗人 CK8 一抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min; 1:4 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min. ECL 试剂发光、显影和定影. 实验重复 3 次.

1.2.7 Western blot 检测 4 株 NPC 细胞系中 CK8 的表达水平. 收集对数生长期的 CNE1、CNE2、5-8F 和 6-10B 细胞, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L Aprotinin, 25 mg/L Leupeptin)冰上裂解 30 min, 12 000 r/min、4℃离心 15 min 后取上清即为细胞总蛋白质. 然后按 1.2.6 步骤进行 Western blot 分析.

1.2.8 免疫组织化学染色. 免疫组织化学染色按 S-P 免疫组化试剂盒说明进行. 简要步骤如下: 石蜡切片常规脱蜡和水化, 0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0) 98℃, 20 min 进行微波抗原修复, 过氧化物酶阻断溶液(试剂 A)阻断内源性过氧化物酶的活性 10 min, 非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min, 一抗(1:400 稀释的鼠抗人 CK8) 4℃孵育过夜, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照, 二抗(试剂 C)室温孵育 12 min, 链霉菌抗生物素 - 过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育 10 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封固.

1.2.9 免疫组织化学染色评分. 随机选取至少 10 个高倍镜视野($\times 200$), 至少计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果^[3], 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; <30 %为 1 分; 30 %~60 %为 2 分; ≥ 60 %为 3 分. 两者相加 0~2 分为弱阳性; 3~4 分为阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.10 统计学分析. 应用 SPSS13.0 统计软件对实验结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 即差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 LCM 纯化的 NPC 细胞与正常鼻咽上皮细胞 2-DE 图谱的建立

采用 LCM 技术分别从 NPC 组织和 NNET 中分离、纯化 NPC 细胞和 NNEC(图 1). 在相同条件下, 对 3 对混合的 LCM 纯化的 NPC 细胞和 NNEC 的总蛋白质分别进行 2-DE 分离, 考马斯亮蓝染色

显色后得到 2 种细胞 2-DE 图谱各 3 张. 使用 PDQuest 图像分析软件分析 NPC 细胞和 NNEC 的 2-DE 图谱, 比较 2 种细胞平均胶的差异(组间比较, t 检验, $P < 0.05$), 得到表达差异大于 2 倍的蛋白质点共 41 个. 图 2a 和 2b 为代表性的 LCM 纯化的 NPC 细胞与 NNEC 蛋白的 2-DE 图谱, 图中标出了质谱鉴定的 29 个差异蛋白质点. 图 2c 为局部放大的部分差异表达的蛋白质点.

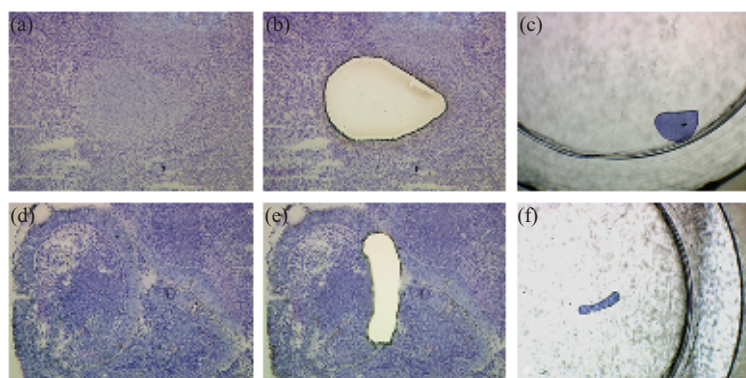


Fig. 1 LCM of tissues

NPC tissue before (a) and after (b) LCM, and captured cancer cells (c); normal nasopharyngeal epithelial tissue before (d) and after (e) LCM, and captured normal cells (f).

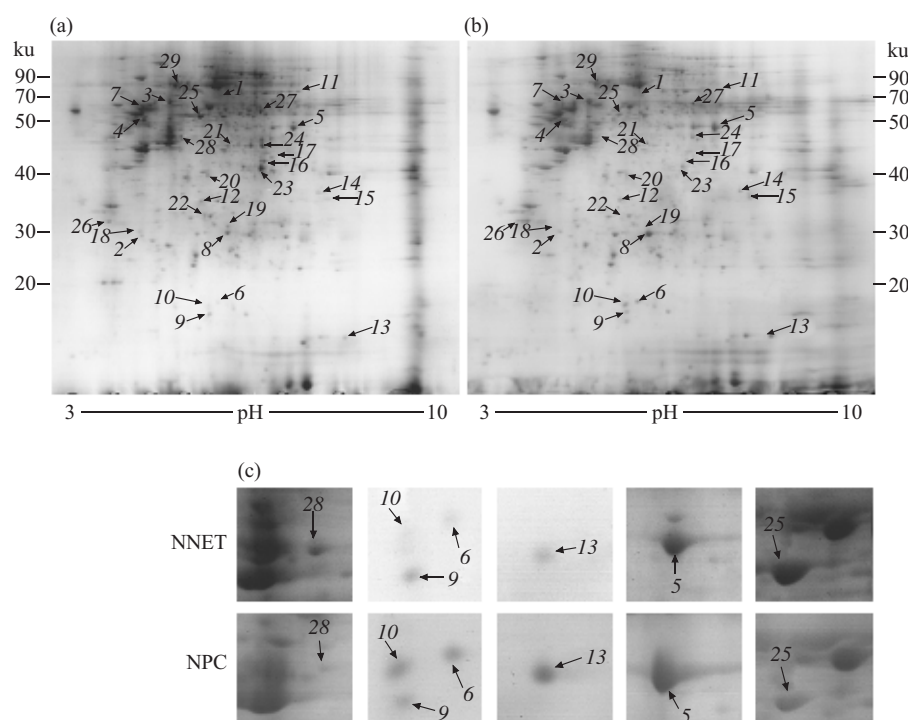


Fig. 2 Representative 2-DE maps of NPC and normal nasopharyngeal epithelial cells purified by LCM

(a) LCM-purified normal nasopharyngeal epithelial cells. (b) LCM-purified NPC cells. The protein spots marked with arrows were twenty-nine differential protein spots identified by MS. (c) Close-up of the region of the gels showing partial differential expression proteins between the normal and NPC cells.

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

从胶中切取 41 个差异蛋白质点, 胶内酶解后进行 MALDI-TOF-MS 和 ESI-Q-TOF 分析, 分别获取肽质量指纹图谱及肽序列标签, 数据库搜寻鉴定蛋白质, 共鉴定出 29 个差异表达的蛋白质, 它们在 2-DE 图谱上的位置和具体信息见图 2 和表 1.

在 NPC 中表达下调的 25 号蛋白质点鉴定结果见图 3 和图 4. 该差异蛋白的肽质量指纹图谱检索 SwissProt 数据库显示为 CK8 蛋白, ESI-Q-TOF 分析亦显示, 来自该蛋白质的肽片段(m/z 2837.4810) 序列 LEGLTDEINFLR 为 CK8 氨基酸序列的一部分.

Table 1 Differential expressed proteins identified by MS between microdissected NPC vs. NNEC

Spot	Accession number ¹⁾	Protein name	Mr	pI	Sequence coverage(%)	Scores	Expression in NPC/NNEC ²⁾	Function
1	P17987	t-complex-type molecular chaperone TCP1	60 356	6.03	43	570	↑ 2.00	Chaperone
2	P43487	Ran-binding protein 1	34 252	5.71	38	298	↑ 2.00	Signal transduction
3	P10809	Chaperonin groEL precursor	61 187	5.7	49	203	↑ 2.01	Metabolism
4	P06576	H ⁺ -transporting two-sector ATPase beta chain precursor	56 525	5.26	73	262	↑ 2.01	Metabolism
5	P31947	Enolase 1	47 139	7.01	57	826	↑ 2.09	Metabolism
6	P15531	Metastasis inhibition factor/nm23 protein	20 398	7.07	32	188	↑ 2.25	DNA binding
7	P08670	Vimentin	53 653	5.03	43	908	↑ 2.29	Cytoskeleton
8	P04792	HSP27 protein	22 313	7.83	67	392	↑ 2.57	Chaperone
9	Q96CE4	Stathmin	17 326	5.76	18	152	↑ 3.15	Metabolism
10	P37802	Transgelin-2,	24 400	8.44	36	335	↑ 3.24	Metabolism
11	Q6NTA2	HNRPL protein	60 719	6.65	33	166	↑ 3.56	Metabolism
12	P47756	Actin-capping protein beta chain	30 952	5.69	64	196	↑ 5.09	Metabolism
13	P62937	Peptidylprolyl isomerase A	17 999	7.85	39	78	a	Metabolism
14	Q5VWK3	VDAC2 protein	30 329	8.00	32	138	a	Signal transduction
15	Q53HU2	Guanine nucleotide binding protein	35 055	7.60	18	186	a	Signal transduction
16	P14550	Alcohol dehydrogenase	36 761	5.11	30	150	↓ 2.02	Metabolism
17	Q9NR45	N-acetylneuraminic acid phosphate synthase	40 267	6.29	28	154	↓ 2.03	Metabolism
18	P04632	Calpain small chain	28 469	5.05	31	74	↓ 2.03	Metabolism
19	P30084	Enoyl-CoA hydratase	31 351	8.34	43	262	↓ 2.11	Metabolism
20	P40121	Chain A, Ca ²⁺ -binding mimicry in the crystal structure of the Eu ³⁺ - bound mutant human macrophage capping protein Cap G	38 500	5.32	26	362	↓ 2.64	Metabolism
21	Q9UBS4	ER-associated Hsp40 co-chaperone	40 774	5.81	39	110	↓ 3.08	Chaperone
22	P07339	Cathepsin D	26 229	5.31	48	304	↓ 3.17	Metabolism
23	Q5TZZ9	Annexin I	38 690	6.57	45	946	↓ 3.42	Metabolism
24	Q86W04	SCCA1	44 507	6.35	37	541	↓ 4.08	Metabolism
25	P05787	Cytokeratin 8	53 529	5.52	36	765	↓ 4.42	Cytoskeleton
26	Q53HR3	14-3-3σ	27 757	4.68	58	552	↓ 5.22	Metabolism
27	P00352	Aldehyde dehydrogenase	54 827	6.30	36	550	↓ 7.07	Metabolism
28	P05783	Keratin 18	47 305	5.27	33	394	↓ 7.50	Metabolism
29	P34931	Heat shock 70 ku	70 854	5.37	3	62	b	Chaperone

a: only expression in NPC.

b: only expression in NNEC.

¹⁾ SwissProt accession number.

²⁾ “↑” indicated that spot intensity ≥ 2-fold increased in NPC in comparison to NNEC; “↓” indicated that spot intensity ≥ 2-fold decreased in NPC in comparison to NNEC.

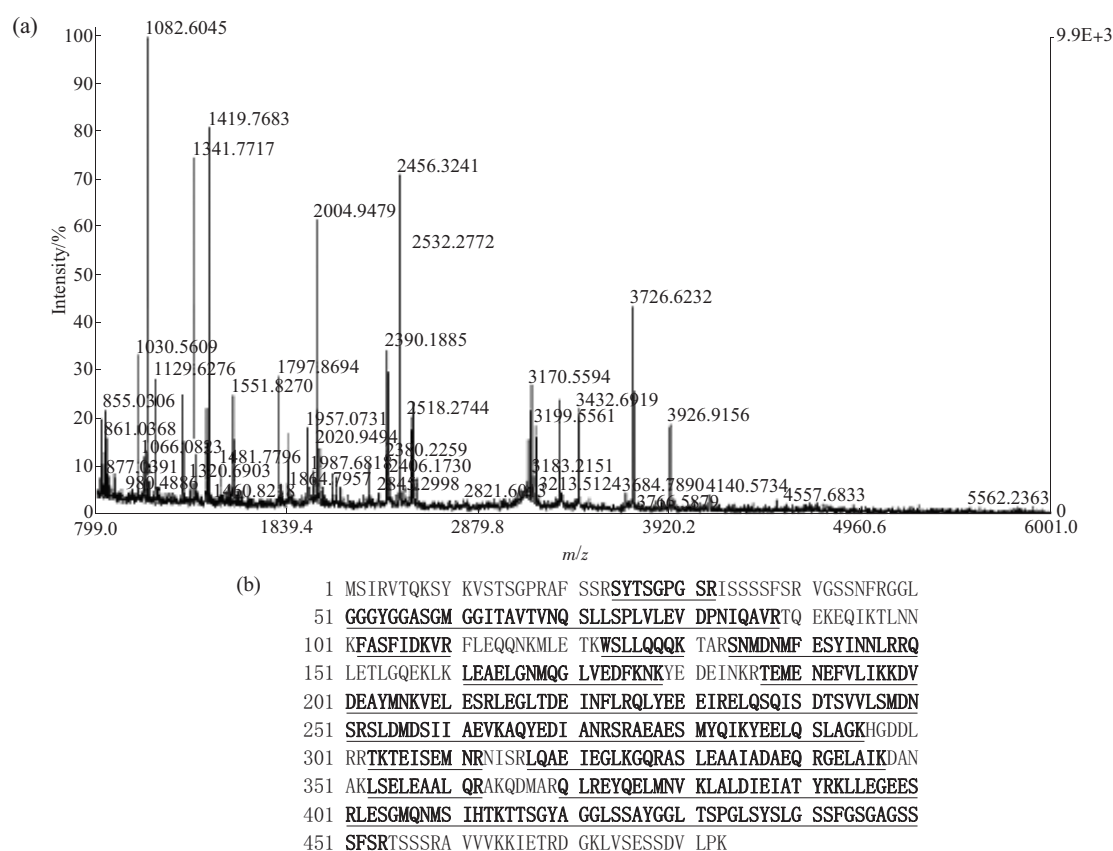


Fig. 3 MALDI-TOF-MS analysis of differential protein spot 25

(a) The MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 25 is shown, which was identified as the CK8 according to the matched peaks. (b) Protein sequence of CK8 is shown, and matched peptides are indicated in bold font and underlined.

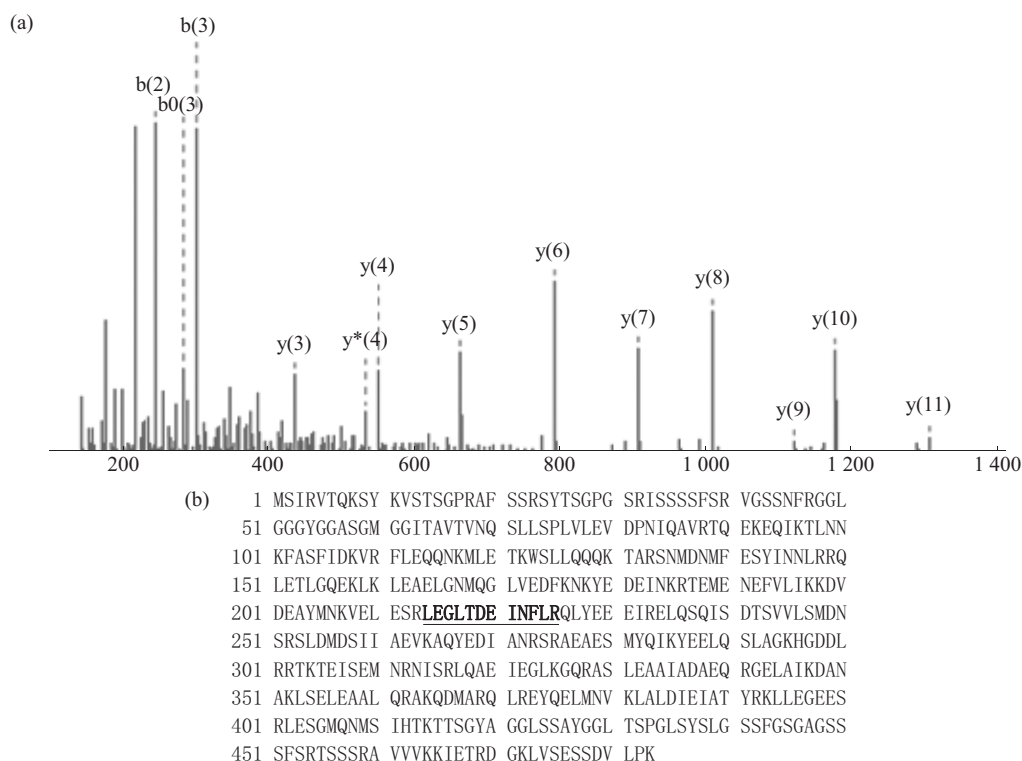


Fig. 4 ESI-Q-TOF analysis of differential protein spot 25

(a) The amino acid sequence of a doubly charged peptide with m/z 2 837.481 0 was identified as LEGLTDEINFLR from mass differences in the y-fragment ions series. (b) Protein sequence of CK8 is shown, and LEGLTDEINFLR fragmentation matched with residues 214 ~225 of CK8 is indicated in bold font and underlined.

2.3 差异蛋白表达水平的验证

为验证比较蛋白质组学研究的结果, 采用 Western blot 方法检测 25 号差异蛋白质点 CK8 在 LCM 纯化的 24 对 NPC 细胞与 NNEC 中的表达水平. 结果显示: 与 NNEC 相比, CK8 蛋白在 NPC 细胞中表达明显下调(图 5). Western blot 检测结果与比较蛋白质组学研究结果一致(表 1).

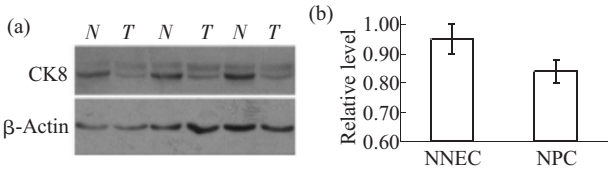


Fig. 5 Representative result of Western blot of CK8 in the NPC and NNEC purified by LCM
(a) Western blot shows changes in expression level of CK8 in LCM-purified NPC cells (T) and normal nasopharyngeal epithelial cells (N). (b) Histogram shows the expression level of the protein in the tumor and normal cells as determined by densitometric analysis.

2.4 CK8 在 NPC 细胞系中的表达

为探讨 CK8 是否与 NPC 的分化和转移有关, 采用 Western blot 方法检测差异蛋白 CK8 在具有不同转移潜能 (5-8F、6-10B) 和分化程度 (CNE1、CNE2) 的 NPC 细胞系中的表达. 结果显示: CK8 在低分化 NPC 细胞系 CNE2 中的表达水平较高分化 NPC 细胞系 CNE1 明显下调($P < 0.01$), 在高转移 NPC 细胞系 5-8F 中的表达水平较低转移 NPC

细胞系 6-10B 明显上调($P < 0.01$)(图 6). 结果提示, CK8 可能与 NPC 的分化和转移有关.

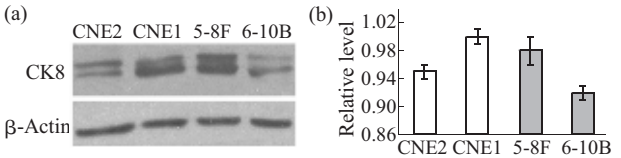


Fig. 6 Representative result of Western blot of CK8 in NPC cells
(a) Western blot shows changes in expression level of CK8 in NPC cell lines CNE2, CNE1, 5-8F and 6-10B. (b) Histogram shows the expression level of CK8 in 4 NPC cell lines as determined by densitometric analysis.

2.5 CK8 在正常鼻咽上皮组织、原发 NPC 和淋巴结转移 NPC 组织中的表达

为进一步探讨 CK8 与 NPC 分化和转移的关系, 采用免疫组化方法检测 CK8 在福尔马林固定、石蜡包埋的 63 例原发 NPC, 28 例 NNET 及 20 例颈淋巴结转移癌组织(LMNPC)中的表达. 结果显示: 与 NNET 相比, CK8 在原发 NPC 组织中的表达明显下调($P < 0.01$)(图 7, 表 2); CK8 表达与 NPC 的分化程度有关($P < 0.01$), 在原发 NPC 中, 与 WHO type I 和 type II 相比, CK8 在 WHO type III 中的表达明显下调($P < 0.01$, 图 7, 表 3); 与原发 NPC 比较, CK8 在 LMNPC 中的表达明显上调($P < 0.01$) (图 7, 表 2). 结果进一步提示, CK8 可能与 NPC 分化和转移有关.

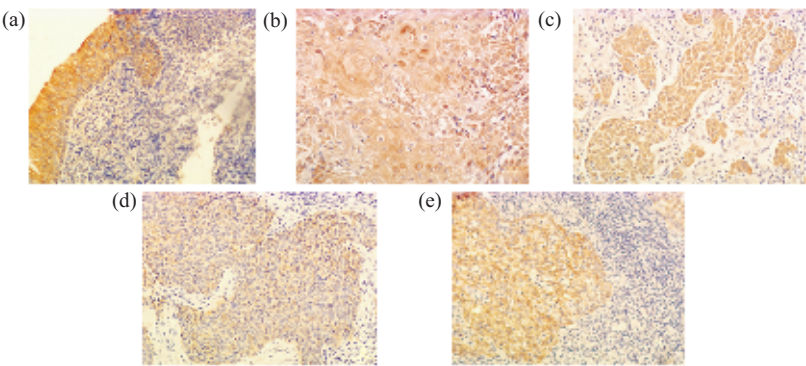


Fig.7 Representative results of immunohistochemistry (IHC) of CK8 in the tissue specimens
IHC of CK8 in NNET (a), WHO type I (b), WHO type II (c) and WHO type III (d) primary NPC, and LMNPC (e). Hematoxylin counterstain. Original magnification: $\times 200$

Table 2 The difference of CK8 expression in NPC, NNET and LMNPC					
	n	Score			P
		Low (0~2)	Moderate(3~4)	High(5~6)	
NNET	28	0	0	28	0.000 ¹⁾
NPC	63	27	25	11	0.001 ²⁾
LMNPC	20	2	8	10	

¹⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney U test, NNET vs NPC. ²⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney U test, NPC vs LMNPC.

Table 3 Correlation between CK8 expression and differentiated degree of NPC

	<i>n</i>	Score			<i>P</i>
		Low (0~2)	Moderate(3~4)	High(5~6)	
WHO type					0.000 ¹⁾
Type I + type II	13	0	5	8	
Type III	50	21	21	8	

¹⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test.

3 讨 论

因 NPC 病变部位隐匿、早期症状不明显及其高转移潜能，绝大多数 NPC 患者就诊时已是晚期，严重影响其治疗效果和预后。另外，大量临床资料显示，同一临床分期，但不同分化程度的 NPC 对放疗的敏感性不同，低分化 NPC 对放疗的敏感性高于高分化 NPC。但目前确定 NPC 的分化程度主要依赖 HE 染色的病理切片观察，尚无客观指标。因此，发现与 NPC 转移和分化有关的分子标志物将有助于 NPC 的诊断、治疗和发病机制研究。

蛋白质组学的出现及其理论、技术的发展和完善为发现肿瘤分子标志物提供了全新的手段^[14]。肿瘤组织与其起源的正常组织的比较蛋白质组学是发现肿瘤标志物和治疗靶标的最有效方式之一。然而，采用组织样本进行蛋白质组学研究的主要障碍是组织的异质性。为此，本研究首次采用 LCM 与蛋白质组学技术相结合的方法进行 NPC 组织与 NNET 的比较蛋白质组学研究，建立了 LCM 纯化的 NPC 细胞与 NNEC 的 2-DE 图谱，质谱鉴定了 29 个差异蛋白质，其中 15 个蛋白质仅在 NPC 中表达或者高表达，而 14 个蛋白质在 NPC 中表达下调或者缺失。这些差异蛋白质为研究鼻咽癌的发病机制、筛选鼻咽癌的分子标志物奠定了基础。

在鉴定的差异蛋白质中，细胞角蛋白 8(CK8) 在 NPC 中表达下调。细胞角蛋白是上皮细胞骨架的组成成分，属于中间丝蛋白家族，能够定性上皮组织、反映上皮细胞的细胞类型和分化状态。在中间丝蛋白家族中，CK8 在单层上皮细胞及其起源的肿瘤细胞中表达最广泛、最丰富^[15]，是上皮源性恶性肿瘤最有用的分子标志物之一。据报道，CK8 在乳腺癌细胞中表达，但在正常乳腺上皮细胞表达阴性^[16, 17]。Fukunaga 等^[18]报道，与不吸烟的正常人群和小细胞肺癌相比，CK8 在非小细胞肺癌中高表达并与肿瘤的发生、发展及病人预后密切相关。有关 CK8 与 NPC 的关系目前国内外尚未见报道。本研究发现，与 NNET 相比，CK8 不仅在 NPC 中

表达明显下调，而且与 NPC 分化程度相关，但其机制有待进一步研究。

CK8 除作为中间丝参与细胞骨架的构成外，其过表达在体内和体外均能增强许多恶性肿瘤细胞的侵袭力^[19, 20]。Hembrough 等^[17]报道，CK8 在肝癌细胞和乳腺癌细胞系表面作为纤溶酶原受体参与纤溶酶原活化，在肿瘤细胞侵袭和迁移中发挥重要作用。Fujita 等^[21]也报道，CA19-9 作为与肿瘤转移密切相关的 E-选择蛋白的配体在转移中起重要作用，CK8 包含 CA19-9 抗原决定簇，参与非小细胞肺癌的侵袭和转移。这些研究表明，CK8 的高表达能促进癌细胞的侵袭和转移。本研究发现，与低转移 NPC 细胞系 6-10B 相比，CK8 在高转移 NPC 细胞系 5-8F 中表达上调，而且 CK8 在颈淋巴结转移 NPC 中的表达高于原发 NPC，这提示 CK8 表达上调可能与 NPC 的侵袭和转移有关。

本研究首次采用 LCM 技术结合蛋白质组学方法进行 NPC 组织的蛋白质组学研究，建立了 LCM 纯化的 NPC 细胞和 NNEC 的 2-DE 图谱，发现并证实 CK8 在 LCM 纯化的 NPC 细胞中的表达水平低于正常鼻咽上皮细胞，并发现 CK8 表达与 NPC 分化和颈淋巴结转移相关。研究结果提示，CK8 可能参与 NPC 的发生、发展，CK8 可能成为一个潜在的预测 NPC 转移与鉴别 NPC 分化程度的分子标志物。

参 考 文 献

- 1 Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12**(6): 421~429
- 2 Vokes E E, Liebowitz D N, Weichselbaum R R. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 1997, **350** (9084): 1087~1091
- 3 Ahmad A, Stefani S. Distant metastases of nasopharyngeal carcinoma: a study of 245 male patients. *J Surg Oncol*, 1986, **33**(3): 194~197
- 4 Wong M M, Lye M S, Cheng H M, *et al.* Epstein-Barr virus serology in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2005, **23**(1): 65~67
- 5 Cho W C, Yip T T, Yip C, *et al.* Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of

- nasopharyngeal carcinoma by serum proteomic profiling. Clin Cancer Res, 2004, **10**(1): 43~52
- 6 Song L B, Zeng M S, Liao W T, *et al.* Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. Cancer Res, 2006, **66**(12): 6225~6232
 - 7 Qian C N, Guo X, Cao B, *et al.* Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. Cancer Research, 2002, **62**(2): 589~596
 - 8 Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie J W, *et al.* Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. Clin Cancer Res, 2004, **10**(15): 4944~4958
 - 9 Emmert-Buck M R, Bonner R F, Smith P D, *et al.* Laser capture microdissection. Science, 1996, **274**(5289): 998~1001
 - 10 Neubauer H, Clare S E, Kurek R, *et al.* Breast cancer proteomics by laser capture microdissection, sample pooling, 54-cm IPG IEF, and differential iodine radioisotope detection. Electrophoresis, 2006, **27**(9): 1840~1852
 - 11 Li C, Hong Y, Tan Y X, *et al.* Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, 2004, **3**(4): 399~409
 - 12 Shekouh A R, Thompson C C, Prime W, *et al.* Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. Proteomics, 2003, **3**(10): 1988~2001
 - 13 Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. Acta Neuropathol, 2004, **108**(1): 43~48
 - 14 陈主初, 梁宋平. 肿瘤蛋白质组学. 第1版. 湖南长沙: 湖南科学技术出版社, 2002. 1~7
Chen Z C, Liang S P. Tumor Proteomics. 1st. Changsha, Hunan: Hunan Science Technique Press, 2002. 1~7
 - 15 Moll R, Franke W W, Schiller D L, *et al.* The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 1982, **31**(1): 11~24
 - 16 Godfroid E, Geuskens M, Dupressoir T, *et al.* Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells. J Cell Sci, 1991, **99**(3): 595~607
 - 17 Hembrough T A, Vasudevan J, Allietta M M, *et al.* A cytokeratin 8-like protein with plasminogenbinding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. J Cell Sci, 1995, **108**(3): 1071~1082
 - 18 Fukunaga Y, Bandoh S, Fujita J, *et al.* Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. Lung Cancer, 2002, **38**(1): 31~38
 - 19 Schaafsma H E, Ramaekers F C S, van Muijen G N P, *et al.* Cytokeratin expression patterns in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract. Am J Pathol, 1991, **139**(6): 1389~1400
 - 20 Schaafsma H E, van der Velden L A, Manni J J, *et al.* Increased expression of cytokeratin 8, 18 and vimentin in the invasion front of mucosal squamous cell carcinoma. J Pathol, 1993, **170**(1): 77~86
 - 21 Fujita J, Dobashi N, Ohtsuki Y, *et al.* Detection of large molecular weight cytokeratin 8 as carrier protein of CA19-9 in non-small-cell lung cancer cell lines. Br J Cancer, 1999, **81**(5): 769~773

Comparative Proteomics Analysis of LCM Purified Nasopharyngeal Carcinoma and Normal Nasopharyngeal Epithelial Tissue*

CHENG Ai-Lan**, HUANG Wei-Guo**, ZHANG Peng-Fei, LI Mao-Yu, PENG Fang, LI Feng,
LI Cui, YI Hong, LI Mei-Xiang, CHEN Zhu-Chu, XIAO Zhi-Qiang ***

(Medical Research Center, Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract To search for nasopharyngeal carcinoma (NPC) biomarkers, laser capture microdissection (LCM) was used to purify the target cells from NPC and normal nasopharyngeal epithelial tissues (NNET). Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed to separate the total proteins of microdissected NPC and NNET, PDQuest software was applied to analyze 2-DE images, and the differential protein spots between the two types of tissues were identified by both MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS. The expression of cytokeratin 8 (CK8), one of the differential proteins, in the microdissected NPC and NNET as well as 4 NPC cell lines with different differentiated degrees and/or metastatic potentials was detected by Western blot. Immunohistochemistry was also used to detect the expression of CK8 in paraffin-embedded tissues including 63 cases of primary NPC, 28 cases of NNET and 20 cases of cervical lymphonode metastasis. In the present study, 2-DE patterns of microdissected NPC and NNET were established, and 29 differential proteins in the above two tissues were identified, of which 15 only expressed or up-regulated in NPC and 14 only expressed or up-regulated in NNET. The expression level of differential protein CK8 between the NPC and NNET was selectively confirmed, and was found to be related to the differentiation and/or metastasis of NPC cell lines. Significant down-regulation of CK8 was observed in NPC compared with NNET, and significant up-regulation of CK8 was also observed in lymphonode metastasis compared with primary NPC. The data suggest that CK8 may be related to the differentiation and lymphonode metastasis of NPC, and may serve as molecular biomarkers for metastasis and differentiation of NPC.

Key words laser capture microdissection, nasopharyngeal carcinoma, proteome, two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-MS, ESI-Q-TOF-MS, Western blot, immunohistochemistry

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB510207), Government of Hunan Province Hibiscus Scholars ([2007]362), for Outstanding Scholars of New Era from the Ministry of Education of China ([2002]48) and Key Research Program from The Science and Technology Committee of Hunan Province, China (04XK1001, 06SK2004).

**CHENG Ai-Lan and HUANG Wei-Guo contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-4327239, Fax: 86-731-4327332, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: October 12, 2007 Accepted: December 18, 2007