

LCM 纯化的鼻咽癌间质和正常鼻咽间质的定量蛋白质组学研究*

李美香^{1,2,3)} 肖志强¹⁾ 彭芳¹⁾ 李国庆^{1,4)} 张鹏飞¹⁾李茂玉¹⁾ 李萃¹⁾ 李峰²⁾ 刘迎福^{1,2)} 陈主初^{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⁾南华大学医学院组织胚胎学教研室, 衡阳 421001; ⁽⁴⁾南华大学生命科学与技术学院, 衡阳 421001)

摘要 间质在肿瘤发生发展中的作用越来越受到重视. 为寻找与鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)发生发展相关的特异性间质蛋白, 采用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)纯化鼻咽癌间质和正常鼻咽黏膜间质, 荧光差异双向凝胶电泳(fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis 2-D, DIGE)结合质谱技术分离鉴定间质相关蛋白. Western blot 及免疫组织化学技术验证了其中 3 个差异蛋白(CapG、L-plastin 和 S100A9), 证实了 2D-DIGE 结果的可靠性. 建立了 LCM 纯化的鼻咽癌间质和正常鼻咽间质的荧光差异蛋白表达图谱, 高通量筛选与肿瘤发生相关的间质蛋白, 共得到 34 个有统计学意义的蛋白质点, 质谱鉴定得到 20 个差异蛋白. 研究结果提示: 这些差异表达的蛋白质将有助于阐明鼻咽癌细胞和周围间质的关系. 对间质蛋白功能的进一步研究, 将有助于解析间质在肿瘤发生中的作用机制, 并为从间质途径寻找肿瘤治疗靶标提供新思路.

关键词 鼻咽癌, 间质, 激光捕获显微切割, 荧光差异双向凝胶电泳, 质谱, Western blot, 免疫组织化学

学科分类号 R766.3, R363.2, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00059

近年来研究认识到, 间质在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用, 肿瘤的发生发展并非由上皮或间质单方面决定, 而是由两者相互作用所构成的肿瘤-宿主微环境的平衡状态所决定^[1,2]. 在肿瘤中, 间质细胞成分、细胞外基质与肿瘤细胞相互作用, 构成了肿瘤微环境^[1,3], 是肿瘤细胞生长、转移、逃逸免疫监视的基础. 这些特异性间质细胞包括血管内皮细胞及其周围的支持细胞、炎症细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞)、免疫细胞(淋巴细胞和肥大细胞)、成纤维细胞和平滑肌细胞^[4]. 异常的间质内环境, 直接或间接调节间质蛋白、细胞表面分子、黏附蛋白的功能, 或释放生长因子, 产生细胞外基质形成肿瘤生长所必需的微环境, 最终可能促进附近的上皮细胞的增生和恶性转化^[5], 从而促进肿瘤的发生发展. 因此, 肿瘤-间质相互作用对肿瘤的发生和发展所起的支持与促进作用受到越来越多的关注.

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种

好发于我国南方各省及东南亚地区的常见恶性肿瘤, 早期转移是鼻咽癌的显著特征之一和患者死亡的主要原因^[6,7]. 肿瘤的生长、侵袭和转移, 在细胞内均有相应的蛋白质作为执行者. 蛋白质组学的出现及其技术的发展为生命科学研究、人类疾病的防治带来了新的革命. 荧光差异双向凝胶电泳技术(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2-D DIGE)是新的蛋白质组学技术, 该技术可以明显提高双向凝胶电泳的重复性和敏感性, 为在蛋白质整体水平探讨鼻咽癌间质在鼻

* 国家重点基础研究发展规划(973)(2001cb510207), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教计函[2002]48), 湖南省科技厅重大科技专项(06SK2004), 国家自然科学基金(30500558, 30800419)和教育部新世纪优秀人才培养计划基金(教育部科技函[2007]70)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4327321, Fax: 0731-2355116, E-mail: tcbl@xysm.net

收稿日期: 2009-01-31, 接受日期: 2009-03-19

咽癌的发生发展中的作用提供了一种全新的手段,从而为进一步探讨鼻咽癌发生发展机制提供实验依据。采用组织样本对鼻咽癌间质和正常鼻咽间质进行蛋白质组学研究的主要障碍是组织的异质性。激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)是目前纯化组织的最好方法之一,已有不少学者采用 LCM 技术从鼻咽癌^[8]、乳腺癌^[9]和肝癌^[10]等组织中纯化靶细胞用于蛋白质组学研究。本实验采用 LCM 技术从 NPC 与正常鼻咽黏膜(normal nasopharyngeal mucosa, NNM)中纯化肿瘤间质(tumor stroma, TS)和正常间质(normal stroma, NS)用于定量蛋白质组学研究。

本研究采用 LCM 结合 2D-DIGE 技术在蛋白质水平对 NPC 与 NNM 间质的基因表达进行比较研究,建立相应的 2D-DIGE 蛋白表达图谱,并对差异表达蛋白进行了质谱(mass spectrometry, MS)分析,以筛选与鼻咽癌发生发展相关的间质特异性蛋白。据我们所知,这是首次采用定量蛋白质组学技术分离 LCM 纯化鼻咽癌间质和正常鼻咽间质,研究结果将有助于阐明肿瘤微环境在肿瘤发生发展中的作用,为从间质中发现 NPC 诊断或治疗的分子靶标开辟了新的途径,为从间质水平了解鼻咽癌发生发展的分子机制提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织。42 例新鲜的活检 NPC 组织(未分化型非角化鳞癌即 WHO type III)及 42 例新鲜的活检正常鼻咽黏膜(NNM)均取自中南大学湘雅一医院,其中 30 例分别用于 2D-DIGE 分析,12 例分别用于 Western blot 分析。病人为未经治疗的初诊病人,并经病理学专家确诊。石蜡包埋组织标本包括 30 例 NNM 组织、66 例 NPC 组织(54 例男性和 12 例女性,平均年龄为 (48 ± 9) 岁,临床分期为 II 到 IV)和 20 例颈淋巴结转移的 NPC 组织(lymphnode metastasis of NPC, LMNPC),均取自中南大学湘雅一医院病理科,用于 H.E.与免疫组化染色。

1.1.2 试剂。Bio-Rad Protein Assay Dye 购自美国 Bio-Rad 公司; DIGE 染料(Cy2, Cy3, Cy5)、ECL (enhanced chemiluminescence)试剂盒均购自 Amersham Biosciences 公司;二甲基酰胺(DMF)购自 Sigma-Aldrich Chemie 公司;NaOH、赖氨酸(lysine)为上海生工生物工程公司产品。2-D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒、尿素、硫脲、固相 pH 梯

度干胶条(IPG strip pH4~7NL, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH4~7NL)、两性电解质(pharmalyte, pH4~7)、十二烷基磺酸钠(SDS)、覆盖液、溴酚蓝、琼脂糖、过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、TEMED、Tris、CHAPS、SDS、考马斯亮蓝 G-250、磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠(EDTA- Na_2)、三羟甲基氨基甲烷均购自 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 -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)、鼠抗人 β -actin 抗体均为 Sigma 公司产品;羊抗人 CapG 多克隆抗体、鼠抗人 L-plastin 单克隆抗体、鼠抗人 S100A9 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记马抗羊二抗均购自 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。

1.1.3 主要仪器。CM1900 冰冻切片机、CTR6000 激光捕获显微切割仪为 Leica 公司产品;Typhoon9410 扫描仪,美国 GE Healthcare 公司产品;IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳系统、Imagesscanner 扫描仪、Labscan 扫描软件、DeCyderTM 2D 6.5 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;PDquest7.0 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间质。NPC 组织和 NNM 行 8 μm 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%乙醇固定,0.5%甲基绿染色,双蒸水漂洗,空气干燥。然后用激光捕获显微切割仪分别从 NPC 组织和 NNM 切片上纯化肿瘤间质和正常间质(图 1)。因为鼻咽部活检标本太小,从一个标本中纯化的间质蛋白量不够一次 2D-DIGE 分析,所以将从 10 例 NPC 组织或 NNM 组织中纯化的间质蛋白混合后进行一次 2D-DIGE 分析。实验进行 3 个生物学重复。

1.2.2 总蛋白提取、定量及荧光标记。

收集的纯化间质用 70%预冷的乙醇脱色,加入组织裂解液(30 mmol/L Tris-Cl, 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲(thiourea), 4% CHAPS, pH 8.5, protease inhibitor cocktail) 4℃ 裂解 1 h,冰上超声, 12 000 r/min、4℃ 离心 45 min,取上清即为间质总

蛋白. 2-D 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度.

蛋白质的荧光标记采用通用电气医疗集团(GE Healthcare, USA)提供的实验指南进行实验设计(表 1). 用 50 mmol/L NaOH 调节蛋白 pH 值至 8.0~9.0 之间. 从 NPC 和 NNM 各 30 例标本收集的纯化间质分别随机分为 3 组(TS1、TS2、TS3, NS1、NS2、NS3), 每组 10 例, 按每 400 pmol 染料标记 50 μ g 蛋白, Cy3 和 Cy5 染料随机标记 NPC 间质蛋白和 NNM 间质蛋白, 同时分别从 6 个样品中取等量蛋白混合作为内标(internal standard), 用 Cy2 标记(表 1). 4℃ 避光反应 30 min 后, 每份样品加 1 μ l 10 mmol/L 的多聚赖氨酸冰上终止反应 10 min. 将用 Cy2, Cy3 和 Cy5 分别标记的样品各 50 μ g 混合, 在同一块胶上电泳.

Table 1 Experiment design of different fluorescent dye labeling

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Internal standard	NS1*	TS1*
2	Internal standard	TS2*	NS2*
3	Internal standard	NS3*	TS3*

*NS1, NS2 and NS3 are normal stroma of normal nasopharyngeal mucosa, TS1, TS2 and TS3 are tumor stroma of nasopharyngeal carcinoma.

1.2.3 双向凝胶电泳及凝胶图像分析.

标记好的蛋白质用 IPG (immobilized pH gradients)胶条(Bio2Rad, pH 4~7, 24 cm)进行第一向等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF). 将等电聚焦结束的 IPG 胶条先后放入 SDS 平衡缓冲 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)和平衡缓冲 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)中各平衡 15 min. 然后将胶条置于 12% SDS-PAGE 上进行第二向凝胶电泳. 与此同时制作一张制备胶, 蛋白质上样量为 1 000 μ g, 考马斯亮蓝染色.

应用 Typhoon TM9400 荧光扫描仪对凝胶进行扫描(Amersham Bioscience 公司)显示标记蛋白, 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、532、633 nm, 520 nm (BP40)、580 nm (BP30)、670 nm (BP30), 每一张胶扫描后可得到 3 张(Cy2 蓝色, Cy3 绿色, Cy5 红色)凝胶图(共 9 张凝胶图).

凝胶图像采用 DeCyder (Amersham Bioscience 公司)软件进行分析. 对每一张凝胶图上的所有蛋白质点扫描后进行胶内分析(differential in-gel analysis, DIA), 然后对不同胶上的同一个蛋白质点与内标匹配, 进行胶间分析(biological variation analysis, BVA), 对匹配后的每个蛋白质点的相对量比较(Cy3 /Cy2 或 Cy5 /Cy2)后确定差异蛋白, 两种间质的差异蛋白采用 *t* 检验进行定量比较($P < 0.05$). 在 9 张凝胶图上均出现表达水平相差 1.5 倍以上的蛋白质点被认为是可靠的差异蛋白质点, 手动确认. 对于同时制作的制备胶, 第二向凝胶电泳结束后进行胶体考马斯亮蓝染色, Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件扫描, 获取 2-D 图像.

1.2.4 质谱分析.

制备胶 2-D 图与 2D-DIGE 凝胶图匹配后从制备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 碳酸氢铵等量混合液, 置于 37℃ 水浴箱中脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 随后加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 60 min, 37℃ 酶解过夜, 30 μ l 萃取液(100%乙腈: 5%三氟乙酸(1:1)) 37℃ 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, N₂ 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 NCBI 数据库鉴定蛋白质.

对于 MALDI-TOF-MS 未鉴定出的蛋白质点或提示为混合物的蛋白质点均进行 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 NCBI 数据库鉴定蛋白质.

1.2.5 Western blot 验证差异蛋白的表达水平. 以 12 对显微切割纯化的 NPC 间质和 NNM 间质为样

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 后取上清即为间质细胞总蛋白, Bradford 法测定蛋白质浓度. 40 μg 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, 一抗 CapG (1:1 000)、L-plastin(1:1 000)、S100A9 (1:500) 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜 3×10 min; 1:4 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3×10 min. ECL 试剂发光、显影和定影. β-actin (1:5 000)作为内参同时检测. 实验重复 3 次.

1.2.6 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书进行. 简要步骤如下: a. 石蜡切片常规脱蜡和下行入水; b. 抗原修复: 0.1 mol/L pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液煮沸后 95℃ 维持 15 min, 自然冷却; c. 过氧化酶阻断溶液(试剂 A)阻断内源性过氧化物酶的活性 10 min; d. 非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min; e. 一抗 CapG (1:500)、L-plastin (1:500)、S100A9 (1:200) 4℃ 孵育过夜, 阴性对照用 PBS 代替一抗; f. 二抗(试剂 C, 羊抗或鼠抗)室温孵育 15 min; g. 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育 15 min; h. DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片.

免疫组化切片用双盲法进行评分. 为评价 CapG、S100A9 和 L-plastin 在 NPC 间质和 NNM

间质中的表达情况, 每张切片计数 10 个视野, 在 40×视野下计数阳性细胞数, 计算出一个均数^[11].

为了便于分析, 分析结果分为两组: 阳性细胞数大于平均数的为高表达组(high group), 阳性细胞数低于平均数的为低表达组(low group).

1.2.7 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, 组间多重比较采用 Kruskal-Wallis H test, 两两比较用 Mann whitney U test, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 LCM 纯化的 NPC 间质与 NNM 间质 2D-DIGE 图谱的建立

采用 LCM 技术分别从 NPC 组织和 NNM 组织中纯化 NPC 间质和 NNM 间质(图 1). 2-D DIGE 分离后分别用不同波长激光进行扫描, 得到 3 种不同颜色的凝胶图. 图 2a、2b 分别显示的是 Cy3 标记的正常间质和 Cy5 标记的肿瘤间质. 经 DeCyder 软件分析, 每张胶图上共得到大约($1\,789 \pm 120$)个蛋白质点, 与内标匹配分析后共获得表达差异大于 1.5 倍、 t 检验 $P < 0.05$ 、在 9 块胶图上均出现的蛋白质点 34 个, 其中 17 个点在 NPC 间质中表达上调, 17 个点在 NPC 间质中表达下调(图 2c). 图 2d~f 分别显示了 L-plastin、CapG 和 S100A9 的 2D-DIGE 的局部放大图、三维模拟图和曲线图, L-plastin 在 NPC 间质中明显下调($P = 0.0004$), 而 CapG 和 S100A9 在 NPC 间质中明显上调($P = 0.023$ 和 0.0041).

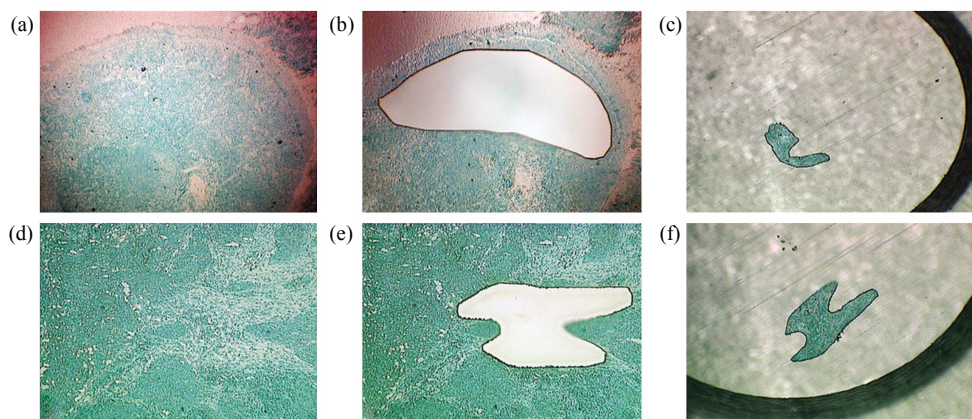


Fig. 1 LCM of NNM and NPC tissues

NNM tissue stained with methyl green before LCM (a) and after LCM (b), and captured normal stroma (c); NPC tissue stained with violet-free methyl green before LCM (d) and after LCM (e), and captured tumor stroma (f).

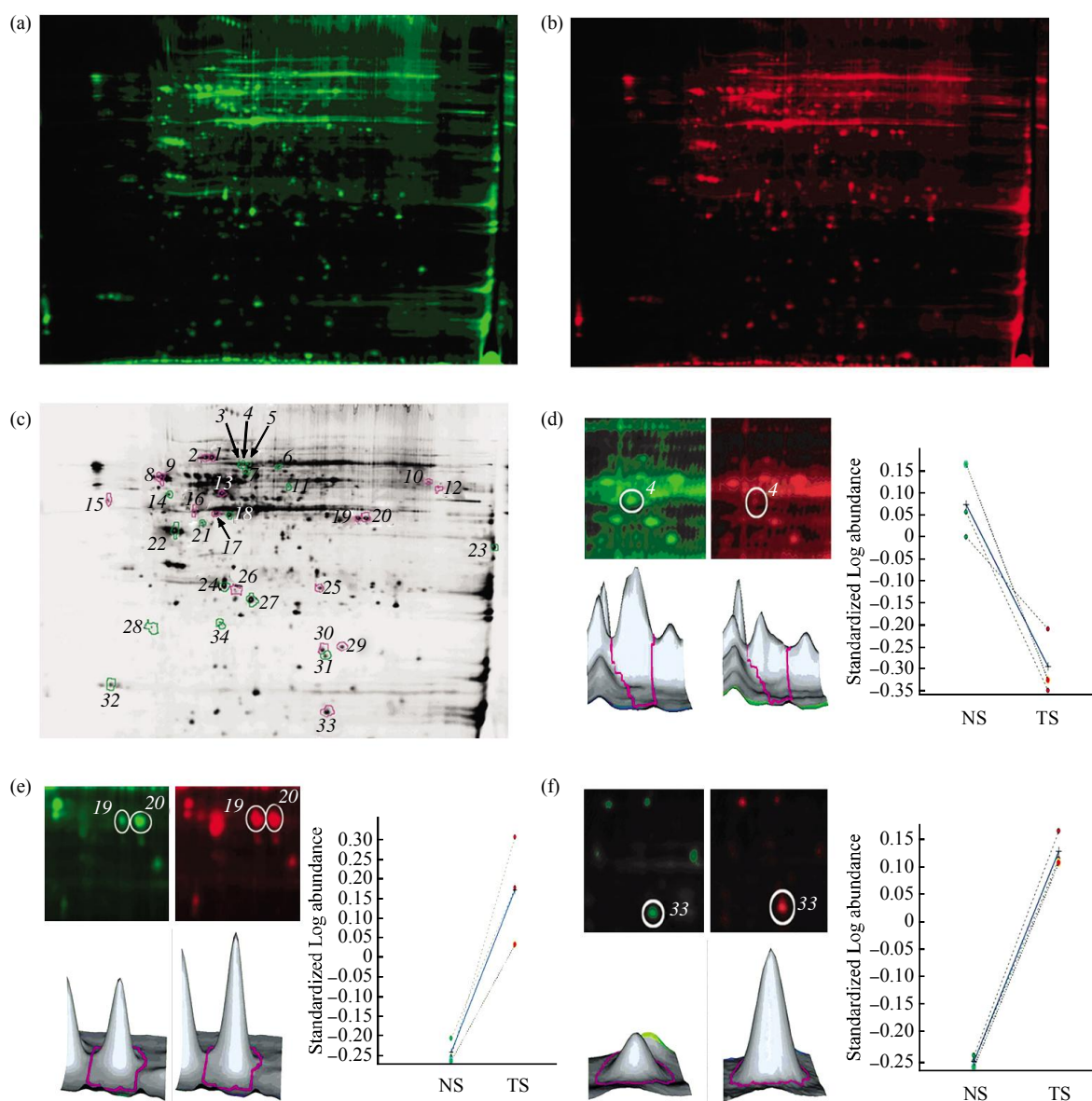


Fig. 2 Comparative proteomic analysis of the stroma of NPC and NNM tissue by 2D-DIGE

(a) Representative 2D-DIGE gel image of microdissected normal stroma (Cy3-labeled, green). (b) Representative 2D-DIGE gel image of microdissected tumor stroma (Cy5-labeled, red). The pI ranges from 4 to 7 (left to right). (c) The differential protein spots detected by Decyder software, red circles indicate up-regulated proteins and blue circles indicate down-regulated proteins. (d) Left top, a close-up of the region of 2D-DIGE gel images showing the significant down-expression of protein spot 4 in tumor stroma compared with normal stroma; left bottom, three-dimensional simulation of protein spot 4; right, the associated graph view of spot 4 indicated the average ratio of expression for spot 4, as obtained by computational analysis with DeCyder 5.0 software which allows the detection of significant abundance changes, P -value is 0.0004. (e) Left top, a close-up of the region of 2D-DIGE gel images showing the significant up-expression of protein spot 19 and 20 in tumor stroma compared with normal stroma; left bottom, three-dimensional simulation of protein spot 20; right, the associated graph view of spot 20, P -value is 0.0023. (f) Left top, a close-up of the region of 2D-DIGE gel images showing the significant up-expression of protein spot 33 in tumor stroma compared with normal stroma; left bottom, three-dimensional simulation of protein spot 33; right, the associated graph view of spot 33, P -value is 0.0041.

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

从制备胶中切取 34 个差异蛋白质点, 进行

MALDI-TOF-MS 或 ESI-Q-TOF 分析, 获取肽质量指纹图谱或肽序列标签, 分析结果进行数据库搜

索, 共鉴定出 20 个差异表达的蛋白质, 它们在 2D-DIGE 图谱上的位置和具体信息见图 2 和表 2。在 NPC 间质中表达上调的 20 号蛋白质点鉴定结果见图 3a, b。该差异蛋白的肽质量指纹图谱检索 NCBI 数据库显示为 CapG 蛋白, 在 NPC 间质中

表达下调的 4 号蛋白质点鉴定结果见图 3c, d。ESI-Q-TOF 分析显示, 来自该蛋白质的肽片段(m/z 838.3755)序列 FSLVGIGGQDLNEG NR 为 L-plastin 氨基酸序列的一部分。

Table 2 Differential proteins identified by MS after 2-D DIGE of the tumor stroma versus normal stroma

No.	Proteins	Accession No.	M_r	pI	MASCOT score	Coverage (%)	Av. ratio*	t -Test
1	BiP protein	gi 6470150	71 002	5.23	83	68	1.71	0.01
2	GRP78 precursor	gi 386758	72 185	5.03	671	71	1.59	0.036
3	L-plastin isoform 3	gi 114651523	70 815	5.2	355	59	-1.56	0.000 56
	Heat shock 70 ku protein 8 isoform 1	gi 5729877	71 082	5.37	139	29	-1.56	0.000 56
4	L-plastin isoform 3	gi 114651523	70 815	5.2	390	63	-2.34	0.000 4
5	Heat shock 70 ku protein 8 isoform 1	gi 5729877	71 082	5.37	155	29	-1.56	0.004 3
6	L-plastin variant	gi 62898171	70 785	5.2	203	58	-2.02	0.019
7	Transformation upregulated nuclear protein	gi 460789	51 325	5.13	377	54	-1.52	0.032
8	Prolyl 4-hydroxylase,	gi 20070125	57 480	4.76	639	34	2.03	0.001 6
9	Prolyl 4-hydroxylase,	gi 20070125	57 480	4.76	87	34	2.03	0.012
10	Periostin, osteoblast specific factor	gi 5453834	93 901	7.57	93	63	2.38	0.004 9
11	Not determined						-2.74	0.000 97
12	Not determined						1.81	0.028
13	Protein disulfide isomerase	gi 1710248	46 512	4.95	124	33	1.81	0.000 47
14	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	gi 5031753	49 484	5.89	146	27	-2.59	0.025
15	Cytokeratin-1	gi 1346343	66 149	8.16	134	25	1.55	0.029
16	Ribosomal protein SA, isoform CRA_c	gi 119584991	19 853	8.37	92	55	1.66	0.004 5
17	Cytokeratin-1	gi 1346343	66 149	8.16	235	25	1.55	0.030
18	Cytokeratin-19	gi 90111766	44 065	5.04	240	21	-1.61	0.000 96
19	Gelsolin-like capping protein isoform 9	gi 55597035	38 779	5.88	72	27	2.67	0.005 0
20	Gelsolin-like capping protein isoform 9	gi 55597035	38 779	5.88	80	52	2.67	0.002 3
21	C protein	gi 306875	32 004	5.10	178	53	-2.19	0.004 8
22	Nucleolar phosphoprotein B23	gi 190238	9 246	9.72	73	17	-1.52	0.021
23	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	gi 73976124	32 524	8.74	67	24	-1.61	0.033
24	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	gi 56676393	23 031	5.10	202	77	-2.61	0.002 2
25	PYCARD protein	gi 48257192	21 326	5.67	107	43	1.93	0.000 98
26	Proapolipoprotein	gi 178775	28 944	5.45	176	54	1.67	0.023
27	Chain A, crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A-I	gi 90108664	28 061	5.27	85	26	-1.63	0.013
28	Not determined						-6.17	0.001 5
29	Nm23 protein	gi 35068	20 746	7.07	114	25	1.99	0.014
30	Not determined						2.42	0.000 039
31	Superoxide Dismutase[Cu-Zn]	gi 31615344	16 154	5.7	98	68	-1.89	0.000 62
32	Not determined						-1.81	0.000 089
33	Mrp14 (migration inhibitory factor-related protein 14)(S100A9)	gi 20150229	13 159	5.71	106	76	2.42	0.004 1
34	Not determined						-1.51	0.022

*Av. Ratio: Tumor stroma/normal stroma.

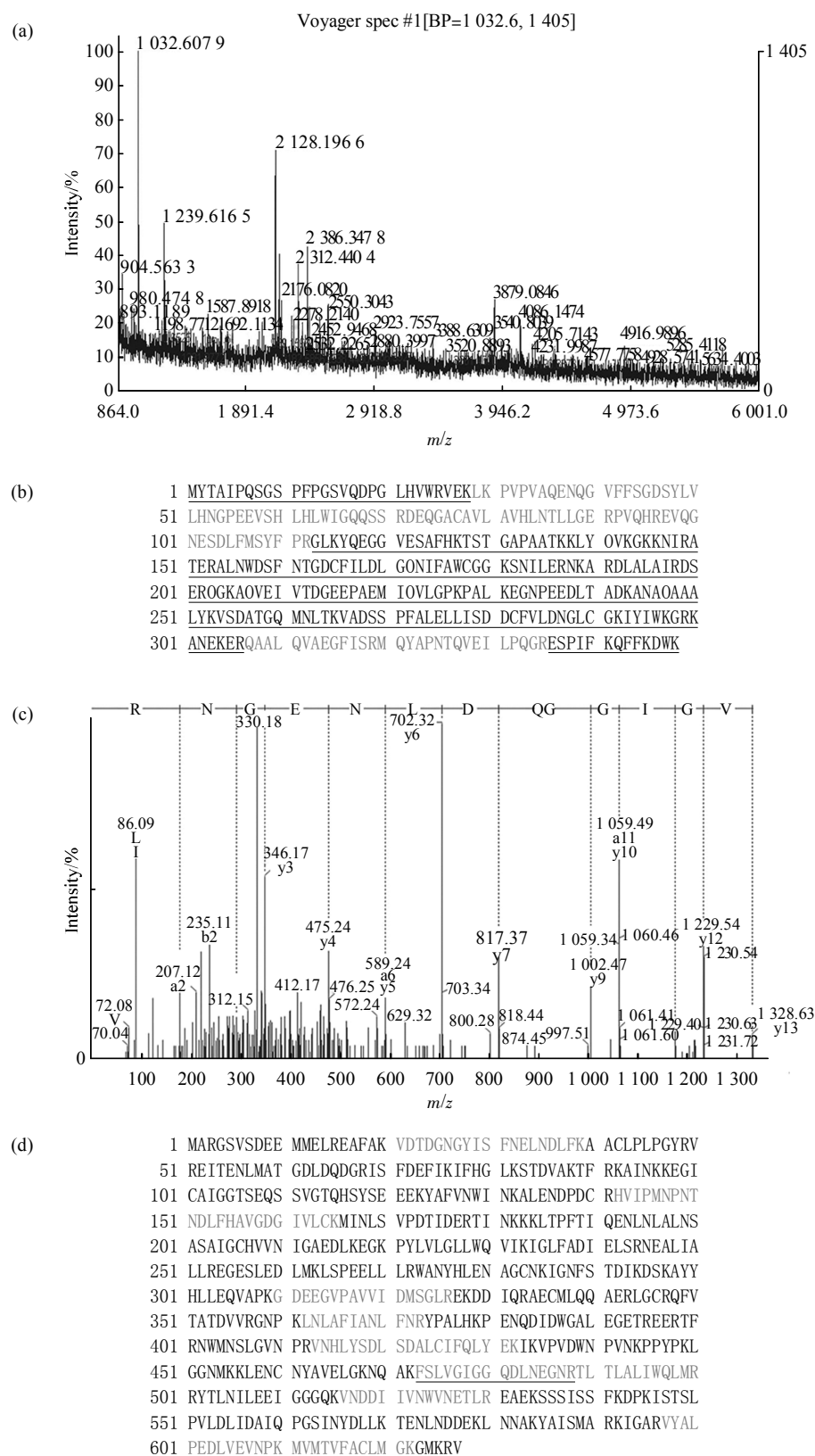


Fig. 3 MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS analysis of differential protein spot 20 and spot 4

(a) MALDI-TOF MS mass spectrum of spot 20 identified as CapG according to the matched peaks was shown. (b) Protein sequence of CapG was shown, and matched peptides were underlined. (c) ESI-QTOF-MS sequenced spectrum of spot 4, the amino acid sequence of a doubly charged peptide with m/z 801.443 9 was identified as LVDQNIFS FYLSR from mass differences in the y-fragment ions series, and matched with residues 473~488 of L-plastin was shown. (d) Protein sequence of L-plastin was shown, and matched peptides were underlined.

在 NPC 间质中高表达的蛋白有 periostin, S100A9, CapG, PYCARD 等, 在 NPC 间质中低表达的蛋白有 L-plastin, Rho-GDI- β , B23, hnRNP K 等. 根据人类蛋白质参考数据库^[12](<http://www.hprd.org/>) 对以上 20 个蛋白质进行功能分类, 这些蛋白质参与了信号传导和细胞通讯、细胞生长或维持、蛋白代谢、能量代谢、运输和凋亡等过程.

2.3 Western blot 验证差异表达蛋白

为验证蛋白质组学研究的结果, 采用

Western blot 方法检测差异蛋白 CapG、L-plastin 及 S100A9 在 LCM 纯化的 12 对 NPC 间质与 NNM 间质中的表达水平. 结果显示: 与 NNM 间质相比, CapG、S100A9 蛋白在 NPC 间质中表达明显上调, L-plastin 在 NPC 间质中表达明显下调(图 4). Western blot 检测结果与 2D-DIGE 研究结果一致(表 2).

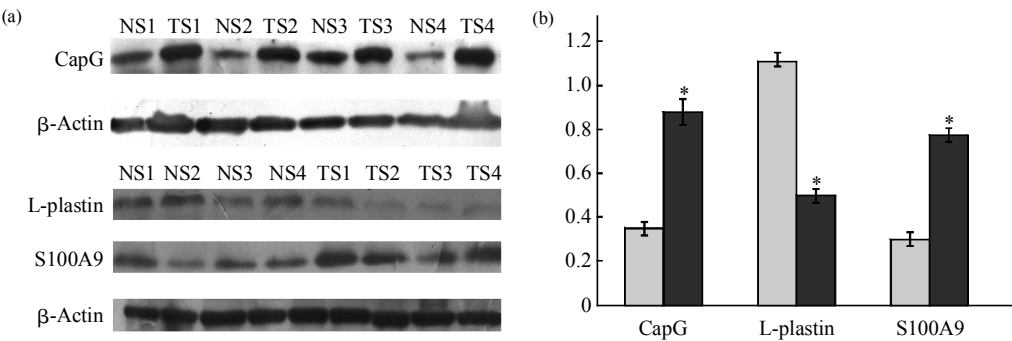


Fig. 4 Representative results of Western blotting of CapG, L-plastin and S100A9 in the microdissected stroma from NNM and NPC tissue

(a) Western blotting shows changes in the expression levels of CapG, L-plastin and S100A9 in tumor stroma (TS) and normal stroma(NS), β -actin is used as the internal loading control. (b) Histogram shows the relative expression of CapG, L-plastin and S100A9 in the tumor stroma and normal stroma as determined by densitometric analysis. $P = 0.002$. $\square$: NS; $\blacksquare$: TS.

2.4 免疫组织化学分析差异表达蛋白

进一步采用免疫组织化学方法检测 CapG、L-plastin 及 S100A9 在福尔马林固定、石蜡包埋的

30 例 NNM 组织、66 例原发 NPC 及 20 例颈淋巴结转移 NPC 组织(LMNPC)中的表达(图 5). 结果显示: 与 NNM 相比, CapG 与 S100A9 在原发 NPC

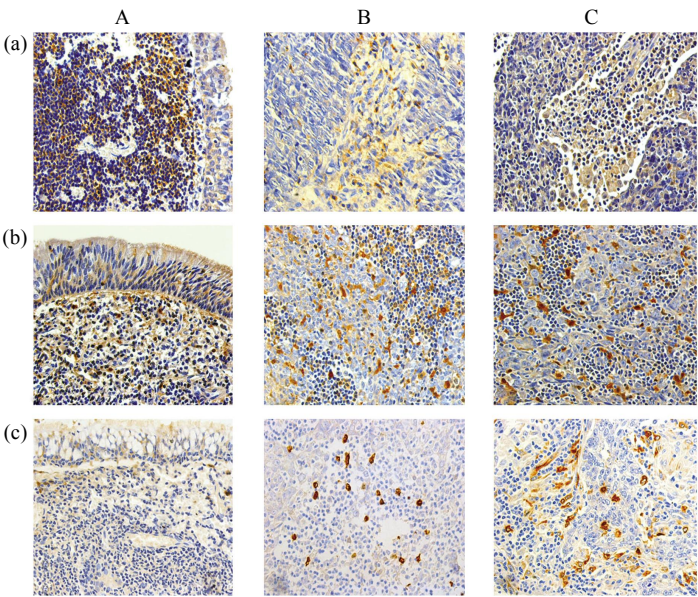


Fig. 5 Representative photographs of immunohistochemistry(IHC) of L-plastin, CapG and S100A9 in the NNM, NPC and LMNPC specimens

(a) IHC of L-plastin, strong staining in the stroma of NNM (A), weak staining in the stroma of primary NPC (B) and LMNPC (C). (b) IHC of CapG, weak staining in the stroma of NNM (A), strong staining in the stroma of primary NPC (B) and LMNPC (C). (c) IHC of S100A9, weak staining in the stroma of NNM (A), strong staining in the stroma of primary NPC (B) and LMNPC (C). Hematoxylin counterstain. Original magnification, $\times 400$.

间质中的表达明显上调($P < 0.01$), L-plastin 在原发 NPC 间质中的表达明显下调($P < 0.01$, 图 5, 表 3). 与原发 NPC 比较, CapG 和 L-plastin 在 LMNPC 间质中的表达无显著性差异, S100A9 在 LMNPC 中的表达明显上调($P < 0.05$). CapG、L-plastin 及 S100A9 在 66 例原发 NPC 的表达与临床因素的相关性分析见表 3. 3 种蛋白质在 NPC 间质中的表达水平均与 NPC 的分化程度及临床分期相关. NPC 组织中 CapG 和 S100A9 的高表达及 L-plastin 的低

表达倾向于更晚的临床分期及更差的分化程度, 且 S100A9 的高表达还与淋巴结转移相关. 3 种蛋白质在 NPC 组织中的表达水平与病人的年龄、性别、肿瘤的分期均无相关性, 而 CapG 和 L-plastin 的表达水平与病人有无淋巴结转移无相关性. 实验结果提示, CapG、L-plastin 及 S100A9 可能与 NPC 的分化程度相关, S100A9 可能还与 NPC 的转移相关.

Table 3 Relationships between L-plastin, capG and S100A9 expression and clinicopathologic factors in NPC

Variables	<i>n</i>	L-plastin			CapG			S100A9		
		Low	High	<i>P</i>	Low	High	<i>P</i>	Low	High	<i>P</i>
Group										
NNM	30	7	23	0.000 ^{1)*}	22	8	0.000 ^{1)*}	25	5	0.000 ^{1)*}
NPC	66	57	9	0.489 ²⁾	12	54	0.505 ²⁾	15	51	0.038 ^{2)*}
LMNPC	20	16	4		5	15		1	19	
Age										
≤50	31	27	4	0.435	10	21	0.340	6	25	0.271
> 50	35	30	5		13	22		9	26	
Gender										
Male	54	46	8	0.278	15	39	0.174	11	43	0.168
Female	12	11	1		5	7		4	8	
Histology type (WHO)										
WHO II	12	8	4	0.015*	6	6	0.011*	7	5	0.0005*
WHO III	54	49	5		10	44		8	46	
Primary tumor (T)stage										
T1	18	16	2	0.430	5	13	0.917	3	15	0.449
T2	23	19	4		7	16		6	17	
T3	20	18	2		7	11		5	15	
T4	5	4	1		1	4		1	4	
Regional lymph node (N)metastasis										
N0	7	5	2	0.233	2	5	0.926	4	3	0.011*
N1	11	8	3		3	8		5	6	
N2	31	28	3		6	25		3	28	
N3	17	16	1		4	13		3	14	
Clinical stage										
II	7	2	5	0.000*	5	2	0.022*	5	2	0.005*
III	38	36	2		8	0		6	32	
IV	21	19	2		5	16		4	17	

¹⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney Utest, NNM vs NPC. ²⁾ $P < 0.05$ by Mann-Whitney Utest, NPC vs LMNPC. * $P < 0.05$ or 0.01 by Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis H test.

3 讨 论

肿瘤形成可以认为是组织细胞体系之间的一种

病理性失衡^[1, 13, 14]. 肿瘤细胞周围的间质在癌变发生时不再是一个沉默的旁观者, 在肿瘤的发生和发展过程中, 可能扮演了十分重要的角色. 间质细胞基

因的特异表达,一则为肿瘤不断提供能源物,二则参与肿瘤的转移。肿瘤侵袭和转移是一个涉及到多因素、多步骤、动态、连续的复杂过程,在此宿主参与了瘤细胞的诱导、选择和扩展。研究表明:肿瘤细胞和周围间质细胞之间的“cross-talk”在肿瘤发生发展过程中起着关键作用^[1]。大量流行病学调查发现肿瘤微环境对肿瘤细胞的生存、增殖、分化和迁移有着重要影响。有学者提出:如果癌症的状态是由于它的微环境改变的结果,并能通过参与肿瘤-宿主之间交谈的分子信号来识别,那么间质治疗将可作为一种预防和干预癌症的有效方法^[1]。但有关间质对肿瘤发生发展的影响机制目前尚不明确。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^[15]。由于 NPC 早期症状不明显及其高转移潜能,导致绝大多数 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^[6,7]。目前科研工作者对 NPC 相关基因及蛋白质进行了大量的研究^[8,16~18],但有关 NPC 的发病机制仍未取得突破性进展。

蛋白质是细胞内基因功能的执行者,蛋白质组学的出现及其理论和技术的发展与完善为研究肿瘤的发生发展机制提供了全新的手段^[12]。研究表明,肿瘤细胞和其周围间质细胞之间的相互作用可促进肿瘤的形成和发展,在肿瘤间质中特异表达的蛋白质与肿瘤的发生密切相关^[19]。本研究首次采用 LCM 与蛋白质组学技术相结合的方法将 NPC 间质与 NNM 间质进行定量比较蛋白质组学研究,建立了 LCM 纯化的 NPC 间质与 NNM 间质的 2-DE 图谱,鉴定了 20 个主要与信号转导、细胞通讯、细胞生长和免疫反应等相关的间质特异性基因产物,为研究鼻咽癌的发生机制、阐明肿瘤和间质的关系开辟了新途径,为从间质途径寻找 NPC 治疗的靶标及 NPC 的早期预防提供了新思路。

CapG,也叫巨噬细胞帽蛋白,是一种肌动蛋白结合蛋白,由 348 个氨基酸组成。Witke 等^[20]研究发现,CapG 是受体介导的巨噬细胞膜胞运动所必需的,推测 CapG 可能是机体调节巨噬细胞介导的炎症反应的一个有用的靶标。研究发现 CapG 通过维持细胞形态、调节细胞迁移、黏附和生长来参与肿瘤细胞的迁移和侵袭^[21]。CapG 过表达可提高成纤维细胞的运动能力,同时也可调节内皮细胞的运动^[22],研究发现 CapG 过表达在体内和体外均能增强许多恶性肿瘤细胞的侵袭能力^[23]。在本研究

中, CapG 在 NPC 间质中的表达高于 NNM 间质,临床分析发现 CapG 与 NPC 的分化及临床分期相关,但有关 CapG 在间质细胞上的定位和功能还有待进一步研究。

Plastins 属于肌动蛋白结合蛋白家族,具有组织表达特异性。在哺乳动物中,plastins 有 3 种异构体: T-plastin 主要在细胞来源的实体瘤组织表达, I-plastin 特异性地在小肠的微绒毛和肾组织表达,而 L-plastin 主要在造血细胞来源的细胞上表达。研究发现, L-plastin 通过参与调节细胞的黏附和运动来调节肿瘤的侵袭和转移^[24], L-plastin 的高表达与肿瘤的发生发展密切相关,磷酸化的 L-plastin 可提高肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[25,26]。在本研究中, L-plastin 在正常鼻咽间质的淋巴细胞上高表达,在 NPC 间质低表达,临床分析提示, L-plastin 与 NPC 的分化及临床分期相关,但 L-plastin 在 NPC 的发生发展中的作用机制还需进一步研究。

S100A9 是一种钙结合蛋白,具有生长调控功能,能调节各种钙离子介导的细胞功能,与细胞的分化、转录、信号转导、迁移和黏附过程有着紧密联系^[27],被认为是与肿瘤的发生发展紧密相关的因子^[28]。S100A9 在炎症部位通常和 S100A8 形成一种稳定的异源二聚体(S100A8/A9),对炎症灶周围的白细胞具有很强的趋化作用^[29]。Arai 等^[30]研究发现, S100A9 在肝细胞癌、乳腺癌组织中高表达,并与肿瘤组织的分化程度呈负相关。这与我们的研究结果是一致的。我们的研究发现: S100A9 在 NPC 间质高表达,且与 NPC 的分化、临床分期及淋巴结转移相关,但其机制尚有待进一步研究。

本研究首次采用 LCM 技术结合定量蛋白质组学方法,以 NPC 间质和 NNM 间质为研究对象,建立了 LCM 纯化的两种间质的 2-DE 图谱,筛选出 20 个鼻咽癌间质相关的差异表达蛋白,实验结果提示,鼻咽癌的间质细胞可以表达某些自身特有的蛋白质,参与鼻咽癌的发生发展及其侵袭和转移。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,为解析间质在肿瘤发生发展中的作用提供基础。

参 考 文 献

- 1 Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 2001, **411**(6835): 375~379
- 2 Rubin H. Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res*, 2001, **61**(3): 799~807

- 3 Cruz-Munoz W, Kim I, Khokha R. TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, 2006, **25**(4): 650~655
- 4 Iyengar P, Combs T P, Shah S J, *et al.* Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*, 2003, **22**(41): 6408~6423
- 5 Barcellos-Hoff M H. It takes a tissue to make a tumor: epigenetics, cancer and the microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, **6**(2): 213~221
- 6 Vokes E E, Liebowitz D N, Weichselbaum R R. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 1997, **350**(9084): 1087~1091
- 7 Ahmad A, Stefani S. Distant metastases of nasopharyngeal carcinoma: a study of 256 male patients. *J Surg Oncol*, 1986, **33**(3): 194~197
- 8 Cheng A L, Huang W G, Chen Z C, *et al.* Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(2): 435~445
- 9 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
- 10 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
- 11 Sheikh A A, Vimalachandran D, Thompson C C, *et al.* The expression of S100A8 in pancreatic cancer-associated monocytes is associated with the Smad4 status of pancreatic cancer cells. *Proteomics*, 2007, **7**(11): 1929~1940
- 12 Peri S, Navarro J D, Amanchy R, *et al.* Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans. *Genome Res*, 2003, **13**(10): 2363~2371
- 13 Silberstein G B. Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res*, 2001, **3**(4): 218~223
- 14 Tlsty T D. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol*, 2001, **11**(2): 97~104
- 15 Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12**(6): 421~429
- 16 Qian C N, Guo X, Cao B, *et al.* Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2002, **62**(2): 589~596
- 17 Yan J, Fang Y, Huang B J, *et al.* Absence of evidence for HER2 amplification in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, **132**(2): 116~119
- 18 Hui A B, Lo K W, Teo P M, *et al.* Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 2002, **20**(3): 467~473
- 19 Mueller M M, Fusenig N E. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**(11): 839~849
- 20 Witke W, Li W, Kwiatkowski D J, *et al.* Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol*, 2001, **154**(4): 775~784
- 21 Rao J, Li N. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, **4**(4): 345~354
- 22 Pellieux C, Desgeorges A, Pigeon C H, *et al.* Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem*, 2003, **278**(31): 29136~29144
- 23 Van den Abbeele A, De Corte V, Van Impe K, *et al.* Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion *in vitro*. *Cancer Lett*, 2007, **255**(1): 57~70
- 24 Lapillonne A, Coue O, Friederich E, *et al.* Expression patterns of L-plastin isoform in normal and carcinomatous breast tissues. *Anticancer Res*, 2000, **20**(5A): 3177~3182
- 25 Klemke M, Rafael M T, Wabnitz G H, *et al.* Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *Int J Cancer*, 2007, **120**(12): 2590~2599
- 26 Samstag Y, Klemke M. Ectopic expression of L-plastin in human tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Adv Enzyme Regul*, 2007, **47**: 118~126
- 27 Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, *et al.* S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res*, 2006, **312**(2): 184~197
- 28 Hermani A, Hess J, De Servi B, *et al.* Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(14): 5146~5152
- 29 Ryckman C, Gilbert C, de Medicis R, *et al.* Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2004, **76**(2): 433~440
- 30 Arai K, Teratani T, Nozawa R, *et al.* Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation. *Oncol Rep*, 2001, **8**(3): 591~596

Quantitative Proteomics Analysis of LCM Purified Stroma of Nasopharyngeal Carcinoma and Normal Nasopharyngeal Mucosa*

LI Mei-Xiang^{1,2,3}, XIAO Zhi-Qiang¹, PENG Fang¹, LI Guo-Qing^{1,4}, ZHANG Peng-Fei¹,
LI Mao-Yu¹, LI Cui¹, LI Feng², LIU Ying-Fu^{1,2}, CHEN Zhu-Chu¹**

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 Histology and Embryology, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁴ School of Life Science and Technology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract The mechanism of how stroma plays an important role in tumor carcinogenesis is now a hotspot. To delineate the features of stromal protein between nasopharyngeal carcinoma (NPC) and normal nasopharyngeal mucosa (NNM), laser capture microdissection (LCM) was performed to purify stromal cells from the NPC and NNM, respectively. The protein expressed profiles of the stroma of NPC and NNM were compared using fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and 34 differential protein spots between tumor stroma and normal stroma were chosen to be identified by mass spectrometry (MS). A total of 20 differential proteins were identified, and three differential proteins (CapG, L-plastin and S100A9) were selectively further validated by Western blotting and immunohistochemical analysis to confirm the results of 2D-DIGE. 2D-DIGE patterns of the stroma of NPC and NNM were established for the first time, the results suggested that differentially expressed proteins in the stroma of NPC and NNM may be useful for understanding the relationship between NPC cells and their surrounding microenvironment. Further studying of these proteins will be helpful to elucidate the mechanisms of NPC carcinogenesis and provide new thoughts on therapy of NPC through stroma.

Key words nasopharyngeal carcinoma, stroma, laser capture microdissection, two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE), mass spectrum (MS), Western blot, immunohistochemistry

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00059

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB510207), for Outstanding Scholars of New Era from The Ministry of Education of China (2002-48), Key Research Program from The Science and Technology Committee of Hunan Province, China (06SK2004), The National Natural Science Foundation of China (30500558, 30800419) and Program for New Century Excellent Talents in University (NCET) (2007-70).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-4327321, Fax: 86-731-2355116, E-mail: tcb1@xysm.net

Received: January 31, 2009 Accepted: March 19, 2009