

新技术讲座

胶片吸附的激光显微切割技术及其在蛋白质组研究中的应用

吴惠玲 邹强*

(第三军医大学免疫学教研室, 全军免疫学研究所, 重庆 400038)

摘要 组织显微切割在特定细胞亚群的比较研究中起着重要作用. 新近发展的胶片吸附激光显微切割技术能从复杂的生物组织中快速准确地分离纯化出特定细胞亚群. 在这项技术中, 透明的乙烯乙酸乙烯基酯热塑性胶片覆盖于病理组织切片表面, CO₂ 激光束特异性作用于目的细胞群表面的胶片, 胶片对细胞较强的吸附作用使得选择性自动移取目的细胞群成为可能. 目前, 这项技术已在蛋白质组分析中获得成功应用, 并有望对其产生较深远的影响.

关键词 显微切割, 胶片吸附的激光显微切割技术, 蛋白质组分析

学科分类号 Q7

显微切割技术在特定细胞亚群的比较研究中起着重要作用. 手工操作的微玻璃针法及利用激光直接作用于生物组织的早期激光显微切割技术, 已在特定细胞亚群的分离纯化中获得广泛应用. 但操作复杂, 分离所得细胞群纯度不高. 而新近发展的胶片吸附激光显微切割技术 (laser capture microdissection, LCM), 利用激光直接作用于胶片, 然后借助胶片作用于生物组织, 从而准确取样. 这不仅能快速简便地分离纯化细胞群, 使其免受周围组织的污染, 而且能较好地保留周围组织, 以便深入研究. 目前, 该技术已在蛋白质组的比较研究中取得了成功应用: 比较研究正常组织及病变组织中蛋白质表达谱的改变, 有望为疾病的诊断、治疗和预后等研究寻求新的突破点.

本文将就 LCM 技术的原理及其在分子病理的蛋白质组分析中的应用作一简要介绍.

1 LCM 的原理

从复杂组织中分离纯化特定细胞亚群进行比较研究是分子病理学等学科中的常用研究方法. 在这类研究中, 从组织标本中分离获取目的细胞群的纯度将直接影响研究结果的准确度. 早期的显微切割技术中, 微玻璃针法需手工操作, 费时费力. 一般的激光显微切割直接“烧掉”目的细胞群的周围组织, 然后手工移取细胞群. 此法操作程序并未简化, 而且已将周围组织破坏, 无法深入研究. 而新近发展的 LCM 可利用激光对目的细胞群间接作用, 快速准确地分离高纯度细胞群.

该项技术中, 激光直接作用于透明的乙烯乙酸乙烯基酯热塑性胶片, 胶片上具有近红外吸收带. 组织-胶片夹层置于显微镜下, 目的细胞群位于视野中央 (图 1a). 目的细胞亚群的选择则既可依据镜下细胞形态结构, 也可利用免疫组化或分子特异性荧光标记进一步提高取样精度^[1]. 与显微镜同轴的微细激光束瞬间作用于胶片, 被作用点的温度瞬时升高至熔点 (90℃), 后迅速冷却, 凝固, 并与目的细胞群强作用结合 (图 1b). 细胞群贴附于胶片上, 随胶片一同移开, 被置于 DNA、RNA 或是蛋白质的缓冲溶液中, 进入标准化的处理过程 (图 1c).

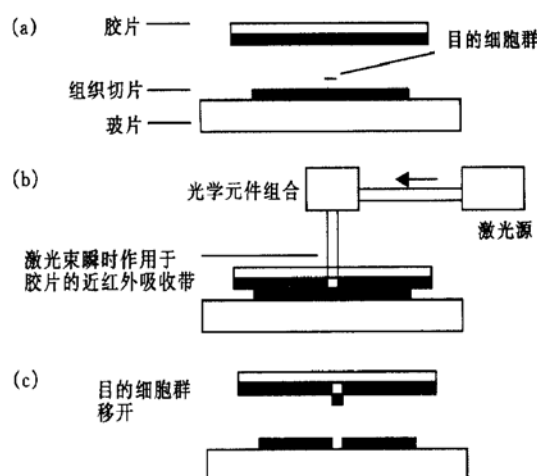


Fig. 1 Schematic figure for LCM system

图 1 LCM 技术原理示意图

* 通讯联系人.

Tel: 023-68752238, E-mail: qiangzouzk@yahoo.com

收稿日期: 2001-01-18, 接受日期: 2001-04-17

任何波长的激光都可作用于胶片, 但通常使用 CO₂ 激光器, 因为胶片对此波段激光的吸收率最高, 可吸收足够能量以熔化. 胶片设计为 100 μm 厚. 激发过程中, 虽然激光将胶片温度瞬时提高至 90 $^{\circ}\text{C}$, 但由于胶片已吸收了几乎全部的能量, 所以细胞内 DNA、RNA 及蛋白质等生物大分子仍然完好无损^[2].

相对其他的显微切割方法, LCM 有以下几个明显的优点: 设备要求不高, 对组织切片无特殊要求, 使用简单迅速, 而且目的细胞群的大小可由微细激光束的直径及激发时间来决定. 更重要的是: 分离纯化细胞群极少受污染, 且周围组织保留较好, 可备深入研究.

新近发展 LCM 系统中的激光束直径可变化于 7.5~30 μm , 且将以往的平面状胶片改为圆柱形胶片, 胶片与组织的接触面积缩小近 200 倍, 为直接获取单个细胞奠定了基础. 这种圆柱形胶片的转动, 可提供新的胶片作用面, 即一次操作可多次取样^[3].

2 LCM 在蛋白质组分析中的应用

在对疾病的发病机制、诊断、治疗、预后等方面的研究中, 细胞亚群间的蛋白质组比较分析是有效手段之一. 这使得分离高纯度单一细胞群成为研究的前提条件. 其间, LCM 充分发挥了其独特优势.

目前, LCM 已经成功地运用于数例人体和动物细胞的蛋白质组比较分析中. 最近研究表明: LCM 不但可以根据细胞的表型或功能性相关抗原快速、准确地分离纯化细胞群^[3], 而且可以在扩增细胞后使用, 如对上皮细胞的分离^[4]. 因此, 不难看出: LCM 为获取足量高纯度细胞群提供了捷径.

Ornstein 等^[5]采用前列腺根治切除术切除患者体内病变组织, 部分制成病理切片, 部分进行体外建系. 利用 LCM 分离获取病理切片上的正常细胞群和癌变细胞群. 比较分析病理切片上的癌变细胞群与体外培养的肿瘤细胞群, 惊奇地发现: 只有近于 20% 的相同蛋白质组分. 表明: 体外培养的种种因素改变了细胞的蛋白质表达谱, 故体外培养的细胞系难以真实反映其在体内的功能状态. 比较分析病理切片上的癌变细胞群与正常细胞群, 发现 6 种癌细胞特异性蛋白质, 2 种正常上皮细胞特异性蛋白质. 其中一种已被免疫印迹法鉴定为前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA), 而其

余几种蛋白质的含量与 PSA 相当, 这几种高丰度的蛋白质均有望成为治疗、预后的标记或血清、显像标记物. 这种蛋白质成分的明显差异在两例患者中均得到证实^[5]. 可见, LCM 技术的使用提供了获取足量高纯度细胞群的方法, 可直接从病理切片中取样, 使得研究结果能比较真实地反映体内细胞蛋白质的表达状况.

另有研究表明: 获取确定数目的前列腺上皮细胞后, 可使用敏感的定量化学发光免疫测定法测定单个细胞内 PSA 的数目. 结果发现: 同一前列腺中的正常上皮细胞及处于不同阶段的癌细胞 (前列腺上皮内瘤细胞和侵入性癌细胞) 内 PSA 分子数目不尽相同, 由 2×10^4 至 6.3×10^6 变化不等. 进一步体现了 PSA 作为分子标记物的可能性^[6]. 值得注意的是, 该项研究的前提是准确获取确定数目的各类细胞亚群分别进行测定, 而且由于研究需要多次测定, 故相应要求多次取样. LCM 准确、快速取样的特点使得整个研究过程丝毫不显得繁琐, 充分显示了其优势.

在其余类似的蛋白质组分析中, LCM 亦发挥着其特有的作用. 就食道正常扁平上皮和肿瘤细胞的蛋白质组进行分析, Emmert-Buck 等^[7]发现同类型肿瘤细胞内蛋白质的相似性高达 98%; 10 种特异性蛋白仅存于肿瘤细胞, 7 种特异性蛋白仅存于正常上皮细胞. 其中有一种已由质谱测量法及免疫印迹分析鉴定为细胞角蛋白 1. 在对新生鼠和老龄鼠大动脉平滑肌细胞的蛋白质组分析中发现: 14 种蛋白质有差异, 其中 4 种仅存于新生鼠, 10 种仅存于老龄鼠. 在老龄鼠特有的蛋白质中, 有一种已鉴定为维生素连接蛋白, 含 16 个氨基酸, 这是在已分化的老龄血管平滑肌细胞中首次发现类维生素 A^[8]. 在使用环孢菌素 A 治疗人和鼠的肾中毒时, 新发现的一种 28 ku 蛋白质大量减少^[9]. 在以鼠的珐琅细胞作为模型研究钙生物学^[10]以及肾癌细胞的蛋白质组分析^[11]中, 激光显微切割技术亦得到成功应用. 不难看出, 以上各类细胞亚群间特异性蛋白的比较研究, 高度依赖于研究初期的精确取样, 而 LCM 恰恰做到了这一点.

目前, 血清及脑脊液是疾病研究中的常选对象之一. 虽然, 其蛋白质成分的改变可能预示着蛋白质表达的改变, 可能与某些疾病的病因及诊断相关. 但是, 它难以说明脑组织中某一特定区域的蛋白质表达状况. 因此, 对脑组织进行特异性蛋白质组研究不乏作为其一个有益补充. 在神经障碍的多

种致病机制研究及急慢性中枢神经系统疾病成分分析中, 特异性脑组织中细胞亚群的蛋白质组分析不但可避免实验模型的各种不确定性, 而且可能为临床提供特异性疾病标记物或是有针对性的快速治疗方法^[12]. 其间, LCM 亦发挥着举足轻重的作用.

3 结 语

LCM 凭借其分离获取特异性细胞亚群的优势, 已在蛋白质组比较研究中得到成功应用, 并已成为其获取样品的有力工具之一. 当然, 如果研究中生物样品本身就具有同源性, 而不致于影响研究结果的准确度, 那么, LCM 完全有可能毫无用武之地. 样品可稍经处理, 甚至直接进入分析. 不过, 如果生物样品是复杂组织块时, 在现阶段看来, 分离纯化细胞亚群仍为必经之路. LCM 仍不失为一研究取样的有效手段. 相信随着 LCM 的应用, 蛋白质组的研究也将获得进一步发展.

参 考 文 献

- 1 Fend F, Emmert-Buck M R, Chuaqui R, *et al.* Immun-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol*, 1999, **154** (1): 61~66
- 2 Emmert-Buck M R, Bommer R F, Smith P D, *et al.* Laser capture microdissection. *Science*, 1996, **274** (5289): 998~1001
- 3 Suarez-Quian C A, Goldstein S R, Pohida T, *et al.* Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Bio Techniques*, 1999, **26** (2): 328~335
- 4 Maitra A, Wistuba H, Virmani A, *et al.* Enrichment of epithelial cells for molecular studies. *Nature Med*, 1999, **5** (4): 459~463
- 5 Ornstein D K, Gillespie J W, Pawletz C P, *et al.* Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and *in vitro* prostate cell lines. *Electrophoresis*, 2000, **21** (11): 2235~2242
- 6 Simone N L, Remaley A T, Charboneau L, *et al.* Sensitive immunoassay of tissue cell proteins procured by laser capture microdissection. *Am J Pathol*, 2000, **156** (2): 445~452
- 7 Emmert-Buck M R, Gillespie J W, Pawletz C P, *et al.* An approach to proteomic analysis of human tumors. *Mol carcinog*, 2000, **27** (3): 158~165
- 8 Cremona O, Muda M, Appel R D, *et al.* Differential protein expression in aortic smooth muscle cells cultured from newborn and aged rats. *Exp Cell Res*, 1995, **217** (2): 280~287
- 9 Aicher L, Wahl D, Arce A, *et al.* New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis*, 1998, **19** (11): 1998~2003
- 10 Hubbard M J. Proteomic analysis of enamel cells from developing rat teeth: big returns from small tissue. *Electrophoresis*, 1998, **19** (5): 1891~1900
- 11 Banks R E, Dunn M J, Forbes M A, *et al.* The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis: preliminary findings. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~5): 689~700
- 12 Rohlf C. Proteomics in molecular medicine: applications in central nervous systems disorders. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1227~1234

Laser Capture Microdissection (LCM) with its Applications in Proteome Analysis

WU Hu-Ling, ZOU Qiang*

(Department of Immunology in the Third Military Medical University, Institute of Immunology, Chongqing 400038, China)

Abstract Tissue microdissection is potentially one of the most useful techniques in the comparative investigations of specific cells. A novel laser capture microdissection (LCM) has been developed to procure precisely the single cells from complex normal and diseased tissues, in a rapid and practical manner. In this technique, a transparent thermoplastil film (ethylene vinyl acetate polymer) is applied to the surface of the tissue section on a standard glass histopathology slide; a carbon dioxide laser pulse then specifically activates the film above the cells of interest. Strong focal adhesion allows selective procurement of the targeted cells. Now LCM system had been available in proteome analysis and is likely to have a profound impact on proteome analysis.

Key words microdissection, laser capture microdissection, proteome analysis

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752238, E-mail: qiangzouzk@yahoo.com

Received: January 18, 2001 Accepted: April 17, 2001