

采用蛋白质组学技术筛选 大肠癌转移相关蛋白*

赵亮 刘莉 王爽 李祖国 丁彦青**

(南方医科大学病理学教研室, 教育部和广东省共建重大疾病转录组学与功能蛋白质组学重点实验室,
广东省分子肿瘤病理重点实验室, 广州 510515)

摘要 采用对同一亲本来源、不同转移潜能细胞株 SW480 和 SW620 的蛋白质表达谱进行双向凝胶电泳和质谱技术分析, 并在蛋白质和 mRNA 水平进行验证, 成功鉴定了 10 个大肠癌转移相关蛋白, 其中 SW620 细胞株表达上调的蛋白质有磷酸甘油酸变位酶 1, 磷脂酰乙醇胺结合蛋白和高迁移率族蛋白 B-1, 而热休克蛋白 27, 膜联蛋白 I, 甲硫腺苷磷酸化酶, 切丝蛋白 1 和表皮型脂肪酸结合蛋白在 SW620 中表达下调. 大多数差异蛋白质功能涉及肿瘤细胞生长、运动、粘附、凋亡等过程, 研究结果为阐明大肠癌转移机制及寻找预测大肠癌转移的潜在标志物提供了理论依据.

关键词 大肠癌, 转移, 蛋白质组, 双向凝胶电泳

学科分类号 Q50, Q51

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 大肠癌转移是患者的主要致死原因, 因此, 阐明肿瘤转移机制及控制肿瘤转移是目前肿瘤研究的重大课题. 肿瘤转移是一个复杂的多基因参与的多步骤过程, 明确肿瘤转移相关基因及蛋白质的作用, 筛选和鉴定肿瘤生物学标志物是肿瘤研究的最前沿领域和热点之一, 肿瘤蛋白质组技术为实现上述研究提供了可靠的新技术. 本研究应用蛋白质组技术比较了来自同一亲本, 具有不同的转移潜能 SW480 和 SW620 人大肠腺癌细胞株的蛋白质表达谱, 鉴定出一些大肠癌转移相关蛋白, 为寻找大肠癌转移潜在标志物及阐明大肠癌转移机制提供了有价值的理论基础.

1 材料与方法

1.1 高低转移细胞系的双向电泳分离

1.1.1 细胞培养. 所采用的人大肠癌高转移细胞株 SW620 和低转移细胞株 SW480 购自美国 ATCC 公司(ATCC 号分别为 CCL227 和 CCL228), 用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养.

1.1.2 蛋白质样品制备. 细胞培养至对数生长期, 弃去培养基, 预冷 PBS 冲洗 3 次, 用细胞刮刀轻轻刮净细胞, 离心收集. 细胞沉淀中加入适量的裂解液(含 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS,

20 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 0.2% Bio-Lyte 3/10 两性电解质和 1 mmol/L 苯甲磺酰氟), 超声处理后, 4℃ 15 000 g 离心 60 min, 改良 Bradford 法测量蛋白质浓度, 上清储存于 -80℃ 冰箱备用.

1.1.3 双向电泳. 按照 Protean IEF Cell 操作说明进行. 细胞总蛋白(700 μg)与泡胀液混合至总体积 350 μL, 室温被动泡胀 16 h 左右, 等电聚焦设置为: 250 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 5 000 V 3 h 及 70 000 Vh, 完毕后分别在含 1% DTT 的平衡液 I 和含 2.5% 碘乙酰胺的平衡液 II 中平衡各 15 min, 第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用浓度为 13% 的均一胶, 起始电流 12 mA, 30 min 后 48 mA 至溴酚蓝到底, 电泳后用考马斯亮蓝 G-250 进行染色.

1.1.4 凝胶成像及图像分析. 利用 UMAX PowerLook 1100 透射扫描仪获取图像, 用 PDQuest 7.1 软件包进行图像分析, 选取表达量差异 2 倍以上的点作为后续质谱分析的候选蛋白质点.

*国家重点基础研究发展计划项目(973)(2001CB510207)和广东省科技重大专项(2003A308401).

** 通讯联系人. Tel/Fax: 020-61642148,

E-mail: dyq@fimmu.com

收稿日期: 2005-12-05, 接受日期: 2006-01-28

1.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

1.2.1 胶内酶切及质谱鉴定. 将考马斯亮蓝染色后凝胶中的差异蛋白质点切成 $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ 大小的胶块, 用含 500 ml/L 乙腈的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液浸泡胶片, 振荡 20 min, 弃去溶液, 用真空离心干燥机 SpeedVac(Sevant)干燥 50 min, 使胶片完全脱水, 加入 $3 \sim 10 \mu\text{l}$ 20 mg/L 胰酶, 待酶液完全吸收后补充适量 25 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液, 37°C 孵育 16~18 h. 酶解肽段先以 5% 三氟乙酸萃取 1 h, 再以 2.5% 三氟乙酸-50%乙腈萃取 1 h, 两者混合于 EP 管中真空冻干. 取 $1 \mu\text{l}$ 萃取液与 $1 \mu\text{l}$ 基质 (α - 胍基 -4- 羟基肉桂酸溶于 1 ml/L 三氟乙酸, 500 ml/L 乙腈的饱和溶液) 混合, 点板进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 分析.

1.2.2 数据库检索. 使用国际互联网上的蛋白质数据库 MSDB 提供的检索程序进行检索 (<http://www.matrixscience.com>). 检索条件为: 容差为 25 ppm, 酶解片段不完全选择为 1 个, 物种来源为人类, 半胱氨酸修饰氧化选择脲甲基半胱氨酸. 对蛋白质的质谱分析结果数据用 peakErazor 滤峰软件处理. 匹配肽段超过 4 个、MASCOT 得分大于 63 分的蛋白质认为有统计学意义.

1.3 mRNA 和蛋白质表达水平的验证

1.3.1 半定量 RT-PCR. 采用 Trizol 试剂提供的标准步骤提取两种细胞的总 RNA, DNA 酶处理后 Superscript II 逆转录酶合成 cDNA. 取 $1 \mu\text{l}$ cDNA 与 dNTP、引物、Taq 酶等混合组成 25 μl PCR 反应体系. 看家基因 GAPDH 作对照, 5 μl 产物通过

1%琼脂糖凝胶电泳检测. 引物序列见 2.3 (上海博亚公司合成).

1.3.2 蛋白质印迹. 收集对数生长期细胞 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白质, 取等量蛋白进行分析, 以 β -actin 作内参照, HSP27 多克隆抗体、Cofilin-1 多克隆抗体、 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司. 先在 5%聚丙烯酰胺浓缩胶中 60 V 电泳至分离胶, 后在 8%聚丙烯酰胺分离胶中 100 V 继续电泳直至溴酚兰到底, 湿转法转移至 PVDF 膜, 电流 100 mA 2 h, 后用 5%TBSA 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 1:200 抗体反应过夜, ECL 化学发光检测, 显色试剂盒购自 Pierce 公司.

1.3.3 免疫组织化学检测. 选择南方医院大肠癌手术切除癌组织标本 52 例(其中 26 例发生淋巴结转移), 所有患者术前均未接受放疗或化疗. 标本经 10%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋并制备厚 $4 \mu\text{m}$ 切片. S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司, 操作步骤按照试剂盒说明进行. 结果判断: 根据两个病理医生分别计数 20 个高倍视野的阳性细胞, 其阳性细胞的表达率 0%~5%、6%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%分别为-、+、++、+++和++++, 以+++和++++为过表达标准.

2 结 果

2.1 SW480 和 SW620 细胞株的 2-DE 差异分析

先采用 pH3-10NL 的 IPG 胶条对两细胞株总蛋白进行双向电泳分离, 经过考马斯亮蓝染色和 PDQuest7.1 软件包分析后, 发现一些蛋白质点的

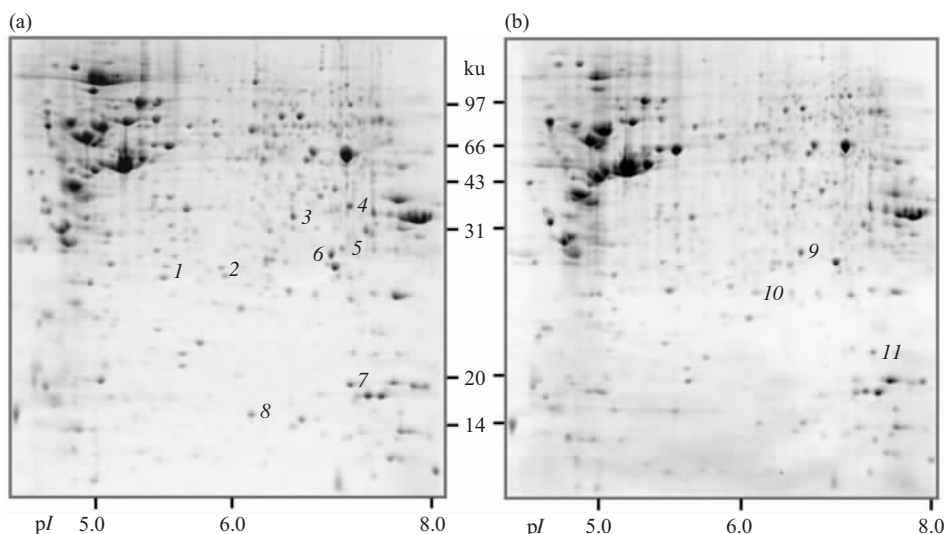


Fig. 1 2D gel images of protein expression in SW480 and SW620 cells

(a) SW620 cells, (b) SW480 cells. Altered proteins marked with number in the two images were successfully identified by MS.

表达水平明显改变 (Student's *t* 检验, $P < 0.05$), 个别点仅出现于 SW480 或 SW620 的 2-DE 图谱中, 选取 11 个差异表达蛋白质点进行质谱分析, 图 1

和图 2 分别为典型的 2-DE 图谱和差异蛋白的局部放大图.

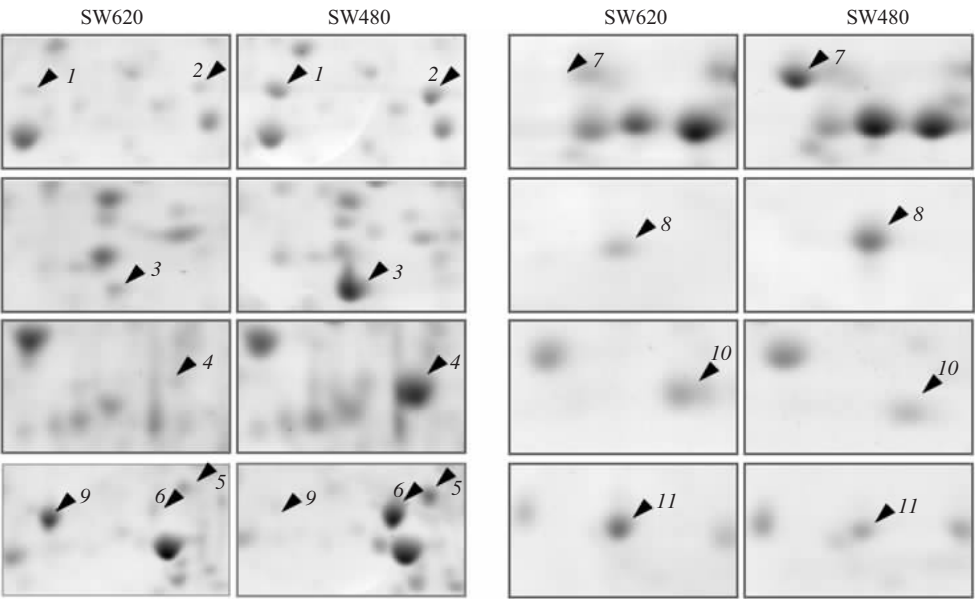


Fig. 2 Protein spot discrepancies in enlarged images

The above eight images are the marked areas in Figure 1. Protein spot discrepancies are arrowed and marked with number (1 to 11).

2.2 差异蛋白质点的 MALDI-TOF 质谱及肽指纹图谱鉴定

用刀片切取 11 个差异蛋白质点进行胶内酶解和 MALDI-TOF 质谱分析 (图 3), 结合数据库检索

成功鉴定了这些差异蛋白质点为 10 种蛋白质 (表 1). 在这些候选差异蛋白中, SW620 细胞株表达上调的蛋白质有磷酸甘油酸变位酶 1 (phosphoglycerate mutase1, PGAM1)、磷脂酰乙醇

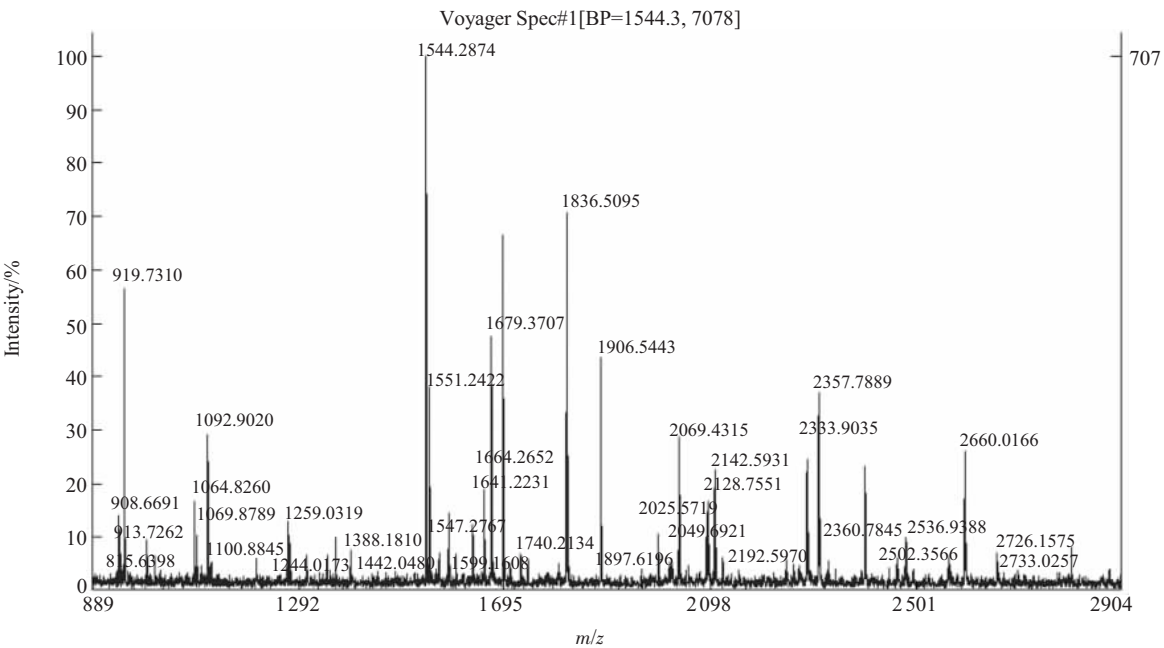


Fig. 3 MALDI-TOF mass spectrum obtained from spot 3 after trypsin digestion

胺结合蛋白 (phosphatidylethanolamine binding protein, PBP) 和高迁移率族蛋白 B-1 (high-mobility group box 1, HMGB1), 而热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27)、膜联蛋白 I (annexin I, ANX I), 甲硫腺苷磷酸化酶 (methylthioadenosine phosphorylase, MTAP), 切丝

蛋白 1 (cofilin-1, COF1), 线粒体粪卟啉原 III 氧化酶 (coproporphyrinogen III oxidase, CPOX) 和表皮型脂肪酸结合蛋白 (epidermal fatty acid binding protein, E-FABP) 在 SW620 中表达下调, 其中 PGAM1 (9 号蛋白质点) 仅出现在 SW620 细胞中, COF1 (7 号蛋白质点) 仅出现在 SW480 细胞中。

Table 1 Identification results of proteins differentially expressed between SW480 and SW620 using MALDI-TOF MS and PMF

Protein index ¹⁾	Theoretical <i>Mr/pI</i> ²⁾	Summary score ³⁾	Protein coverage ⁴⁾	Protein level ⁵⁾	MSDB ID	Protein description
1	22826/5.98	94	74%	↓	HHHU27	Heat shock protein 27
2	22427/7.83	134	72%	↓	E980237	H.sapiens HSP27 sequence
3	38787/6.64	213	61%	↓	ANXA1_HUMAN	Annexin I
4	40836/6.65	215	87%	↓	I52444	Coproporphyrinogen oxidase precursor, mitochondrial
5	31729/6.75	173	61%	↓	Q5T3P3_HUMAN	Methylthioadenosine phosphorylase
6	28916/6.67	254	82%	↓	Q6P6D7_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1 (Brain)
7	18588/8.26	66	66%	↓	COF1_HUMAN	Cofilin-1 (18 ku phosphoprotein)
8	15366/6.84	64	75%	↓	FABPE_HUMAN	Fatty acid-binding protein, epidermal
9	28769/6.75	246	75%	↑	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1
10	18323/9.72	79	63%	↑	Q5T7C2_HUMAN	High-mobility group box 1 (Fragment)
11	21027/7.42	72	58%	↑	PEBP_HUMAN	Phosphatidylethanolamine binding protein

¹⁾Defined according to spot positions in 2D gel indicated as Figure 1. ²⁾Calculated from the database entry without any processing. ³⁾MASCOT score for MALDI-TOF MS analysis. ⁴⁾Calculated by amino acid count. ⁵⁾↑, Up-regulated in SW620 cells; ↓, Down-regulated in SW620 cells.

2.3 RT-PCR 验证 mRNA 水平表达

对质谱所鉴定的几个差异候选蛋白进行了半定量 RT-PCR 验证 mRNA 水平表达, GAPDH 基因作

为内参照, 高低转移细胞株间 mRNA 半定量的结果与蛋白质组的分析结果基本一致 (图 4)。表 2 示各基因引物和 PCR 条件。

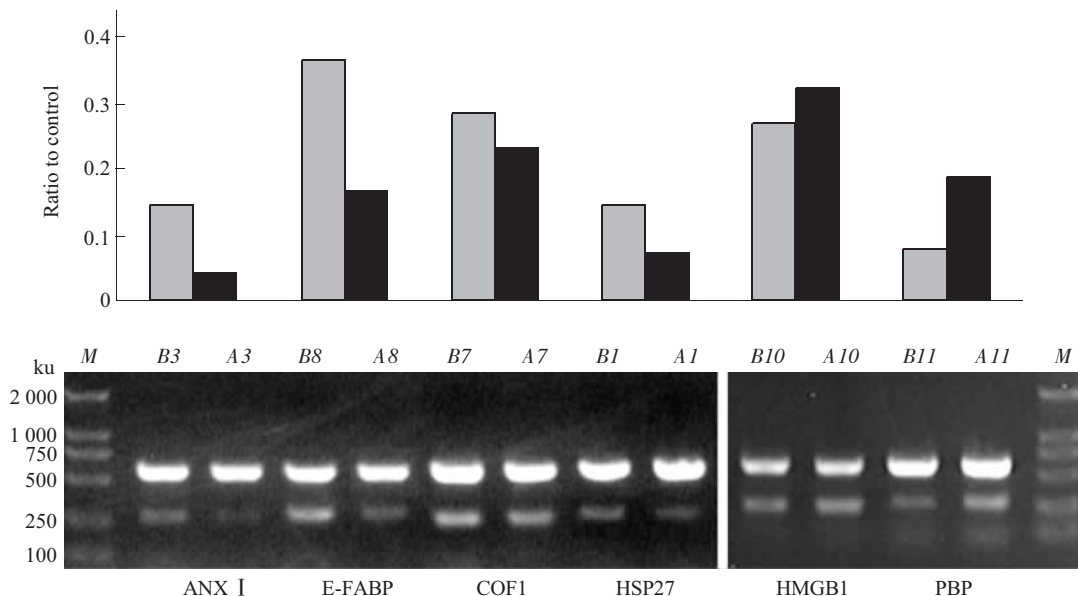


Fig. 4 RT-PCR results of six genes from SW480 and SW620 cells

The two lanes labeled with “M” are the molecular marker “DL2000” containing different fragment sizes listed on the left. The other lanes with two stripes show the amplified results of the lower interesting gene and upper reference GAPDH. The differentially densitometric analysis of each gene is showed in the upper histogram. “A” and “B” refer to the cDNAs from SW620 and SW480 cells, respectively; “1, 3, 7, 8, 10, 11” denote the same genes reported in Figure 2 and Table 1. Product length are showed in Table 2. ■: SW480, ■: SW620.

Table 2 Primers and PCR condition for each gene

Spot	Name	Primers (5'~3')	Annealing/℃	Product/bp
1, 2	HSP27	Sense: GGACGAGCATGGCTACATCT Antisense: CTTTACTTGGCGGCAGTCTC	58	322
3	Annexin I	Sense: TGAAGTCATCCAAAGGTGGT Antisense: CGCTGGAGTTTTTAGCAGAG	58	275
7	Cofilin-1	Sense: TCTTCTGCCTGAGTGAGGAC Antisense: TGATCCCTGTCAGCTTCTTC	58	285
8	E-FABP	Sense: GCCAAGCCAGATTGTATCAT Antisense: TTCATGACACACTCCACCAC	58	254
10	HMGB1	Sense: GTGCTCAGAGAGGTGGAAGA Antisense: GGCGATACTCAGAGCAGAAG	58	200
11	PBP	Sense: GCAGCACTGTTACTGGGTCT Antisense: TCTCTGTCTGGGTCTGCTC	58	297
—	GAPDH	Sense: AATCCCATCACCATCTTCCA Antisense: CCTGCTTCACCACCTTCTTG	58	580

2.4 蛋白质印迹验证蛋白质水平表达

蛋白质水平验证高低转移细胞株 SW480 和 SW620 间候选蛋白, β-actin 作为内对照. 结果表明, 在原发灶来源的细胞株 SW480 中 COF1 和 HSP27 表达水平明显下调, 这也与双向电泳分析结果一致(图 5).

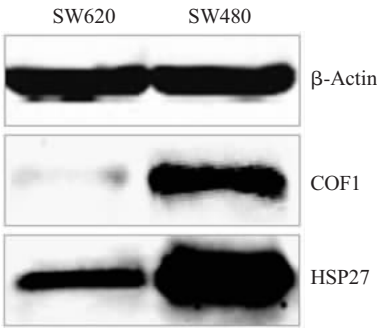


Fig. 5 Western blotting analysis of candidate proteins including COF-1 and HSP27 using β-actin as internal control between SW620 and SW620 cells

2.5 HSP27 在大肠癌组织中的表达

镜下见癌细胞排列成腺管状, 阳性颗粒定位于胞浆, 且在表层上皮细胞表达较强, 而在副基底层细胞表达较弱, 部分腺腔内表面可见阳性着色增强带(图 6a). 间质和内皮细胞也可见 HSP27 阳性. 在伴有淋巴结转移的大肠癌组织中 HSP27 表达率为 57.69%(15/26), 无淋巴结转移者为 65.38%(17/26), 统计学分析二者无显著性差异($P>0.05$), 但无淋巴结转移组中有 5 例 HSP27 呈过表达(图 6b), 有淋

巴结转移组则无一例过表达.

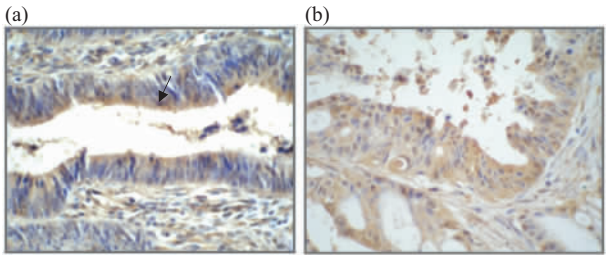


Fig. 6 HSP27 expression in colorectal adenocarcinomas (a) HSP27 is localized in the cytoplasmic region of CRC cell. A band-like enhancement of staining (black arrow) was locally observed on the medial surface of the colorectal glandular cavity. (b) Overexpression of HSP27 in colorectal cancer without lymph node metastasis.

3 讨 论

肿瘤转移是一个复杂的生物学过程, 肿瘤转移过程中可能有众多的基因和蛋白质参与, 筛选及鉴定与肿瘤转移密切相关的基因及其蛋白质对阐明肿瘤转移机制、寻找肿瘤转移早期诊断、预后判断及药物治疗新靶点均有重要意义. 我们利用蛋白质组学技术比较了来源于同一患者原发病灶及转移淋巴结的 SW480 和 SW620 两种细胞系, 发现 10 种蛋白质的表达水平发生了明显的改变, 而已有研究表明, 这些候选差异蛋白通过促进或抑制细胞生长、运动、侵袭、凋亡调节和肿瘤免疫等功能而影响肿瘤的侵袭与转移.

HSP27 和 COF1, 参与肌动蛋白的解聚. HSP27

可抑制肌动蛋白的聚合, 目前也有研究表明了 HSP27 过表达能有效地抑制肿瘤的侵袭与转移能力. Aldrian 等^[1]通过在黑色素瘤细胞中转染 hsp27 基因发现细胞不但发生形态学改变, 而且人工基底膜胶 (matrigel) 实验观察到细胞体外侵袭能力下降. Lemieux 等^[2]在乳腺癌细胞中分别稳定转染了 hsp27 的正义链和反义链, 发现 hsp27 过表达株丧失细胞的突起结构而胞膜褶皱增多, 同时细胞运动性降低, 本实验结果清楚地显示, HSP27 在转移淋巴结来源的 SW620 细胞系中表达增高, 表明其可能在防止大肠癌侵袭、转移等方面发挥作用. 而 COF1 能通过可逆的磷酸化调节肌动蛋白参与的细胞运动. 值得一提的是 COF1 仅在 SW480 细胞中检测到, 提示其可能在肿瘤转移方面发挥重要作用. 有研究指出, ATP 所支持的肌动蛋白丝踏板现象是肌动蛋白持续运动的动能基础, 而这一作用受 COF, 微丝结合蛋白 Profilin 和加帽蛋白调节. 肌动蛋白的解聚和聚合活动促进癌细胞的移动和转移的发生^[3].

HMGB1 是一种非组蛋白核蛋白, 最近对 HMGB1 的深入研究发现, HMGB1 可以激活和促进单核细胞和巨噬细胞的分泌^[4], 在炎症、细胞移动和肿瘤侵袭方面发挥重要作用. 对 KIT 突变和无 KIT 突变的胃肠间质瘤比较蛋白质组学研究表明, 在突变组中表达上调, 可能与肿瘤生长、侵袭相关基因的相互作用有关^[5]. 本研究中 HMGB1 蛋白在转移淋巴结来源的 SW620 细胞中表达增高, 我们推测 HMGB1 蛋白可能是促进大肠癌转移的相关蛋白质.

PBP 和 ANX I 是钙离子 / 磷脂结合蛋白. PBP, 又名 Raf 激酶抑制蛋白 (RKIP), 具有结合 Raf 阻断其磷酸化 MEK 的能力. RKIP 能调节许多影响转移发生的细胞功能, 如抑制血管生成和细胞浸润, 促进凋亡. 在转移性前列腺癌细胞系中 RKIP mRNA 表达水平降低^[6], 其蛋白质在良性组织中表达水平最高, 癌组织中较低, 而在转移病灶中呈阴性表达^[7], 表明 RKIP 表达缺失与前列腺癌转移的发生密切相关. ANX I 能促进钙离子依赖的膜融合, 通过对不同转移潜能乳腺癌细胞的比较蛋白质组学研究发现, ANX I 蛋白与非转移表型有关^[8], 然而许多研究均表明 ANX I 作为转移促进因子, 对同一亲本来源不同转移能力的头颈鳞状细胞癌细胞系的蛋白质组学研究也表明 ANX I 是一种转移相关蛋白^[9].

E-FABP 和 MTAP 是参与肿瘤的恶性转化及生长过程的两种蛋白质. E-FABP 是脂肪酸结合蛋白家族的成员, Jing 等^[10]将 E-FABP 转染到良性非转移性鼠上皮细胞系 Rama37 可以诱导细胞发生转移, 获得转移能力, 说明 E-FABP 是一种转移诱导基因, 适宜条件下诱导某些肿瘤发生转移. 进一步机制研究发现 E-FABP 可能在 VEGF 作用通路中发挥重要作用^[11]. MTAP 涉及多胺代谢, 对腺嘌呤和甲硫氨酸的补救合成起重要作用. 许多恶性肿瘤细胞中 MTAP 活性缺失^[12,13], MTAP 失活在黑色素瘤^[14]和胰腺癌^[15]发生方面发挥重要作用, 然而目前仍无 MTAP 在肿瘤转移方面的研究报道.

CPOX 和 PGAM1 是参与细胞代谢过程的蛋白质, 最近的研究表明, 肿瘤细胞的生存有赖于糖酵解途径, PGAM1 可作为肿瘤治疗的新靶点^[16]. 在本实验中, 在 SW480 细胞中检测到 PGAM1, 提示其可能在大肠癌转移方面发挥作用, 但目前尚未见 CPOX 和 PGAM1 与肿瘤转移的相关报道, 其功能尚待进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 Aldrian S, Trautinger F, Frohlich I, *et al.* Overexpression of Hsp27 affects the metastatic phenotype of human melanoma cells *in vitro*. *Cell Stress Chaperones*, 2002, **7** (2): 177~185
- 2 Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence J A, *et al.* The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis*, 1997, **17** (3): 113~123
- 3 Carlier M F, Wiesner S, Le Clainche C, *et al.* Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution *in vitro*. *C R Biol*, 2003, **326** (2): 161~170
- 4 Wang H, Bloom O, Zhang M, *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, **285** (5425): 248~251
- 5 Choi Y R, Kim H, Kang H J, *et al.* Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation. *Cancer Res*, 2003, **63** (9): 2188~2193
- 6 Fu Z, Dozmorov I M, Keller E T. Osteoblasts produce soluble factors that induce a gene expression pattern in non-metastatic prostate cancer cells, similar to that found in bone metastatic prostate cancer cells. *Prostate*, 2002, **51** (1): 10~20
- 7 Fu Z, Smith P C, Zhang L, *et al.* Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95** (12): 878~889
- 8 Kreunin P, Urquidí V, Lubman D M, *et al.* Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics*, 2004, **4** (9): 2754~2765
- 9 Wu W, Tang X, Hu W, *et al.* Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp*

- Metastasis, 2002, **19** (4): 319~326
- 10 Jing C, Beesley C, Foster C S, *et al.* Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis inducer. *Cancer Res*, 2000, **60** (9): 2390~2398
 - 11 Jing C, Beesley C, Foster C S, *et al.* Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res*, 2001, **61** (11): 4357~4364
 - 12 Garcia-Castellano J M, Villanueva A, Healey J H, *et al.* Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (3): 782~787
 - 13 Kamatani N, Carson D A. Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines. *Cancer Res*, 1980, **40** (11): 4178~4182
 - 14 Behrmann I, Wallner S, Komyod W, *et al.* Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol*, 2003, **163** (2): 683~690
 - 15 Hustinx S R, Leoni L M, Yeo C J, *et al.* Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol*, 2005, **18** (7): 959~963
 - 16 Evans M J, Saghatelian A, Sorensen E J, *et al.* Target discovery in small-molecule cell-based screens by *in situ* proteome reactivity profiling. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (10): 1303~1307

Screening Metastasis-associated Proteins in Colorectal Cancer Through Proteome Analysis*

ZHAO Liang, LIU Li, WANG Shuang, LI Zu-Guo, DING Yan-Qing**

(Department of Pathology, Guangdong Province-Ministry of Education Key Co-Laboratory of Functional Proteomics and Transcriptomics Related to Major Diseases Molecular Tumor Pathology of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangdong 510515, China)

Abstract Two-dimensional (2D) gel electrophoresis followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry was utilized to compare the protein expression profiles between two colorectal cancer (CRC) cell lines with high and low metastatic potentials, SW620 and SW480. 10 metastasis-associated proteins were identified and further validated by Western blotting and/or semi-quantitative RT-PCR analysis. Of the identified proteins, the expressions of phosphoglycerate mutase 1, phosphatidylethanolamine binding protein and high-mobility group box 1 were elevated in SW620 cells. However, heat shock protein 27, annexin I, methylthioadenosine phosphorylase, cofilin-1 and epidermal fatty acid binding protein were down-regulated in SW620 cells. Most of the candidate proteins have been evident to be somehow associated with various aspects of tumor metastasis such as cell growth, motility, invasion, adhesion, apoptosis and tumor immunity. These results provide the basis for searching for potential markers for CRC prognosis and give some clues to elucidate the mechanism of CRC metastasis.

Key words colorectal cancer, metastasis, proteome, two-dimensional gel electrophoresis

*This work was supported by grants from The National Key Basic Research Program of China (2001CB510207) and The Key Science and Technology Research Program of Guangdong Province (2003A308401).

**Corresponding author. Tel: 86-20-61642148, Fax: 86-20-61642148, E-mail: dyq@fimmu.com

Received: December 5, 2005 Accepted: January 28, 2006