

表皮生长因子受体调控的人鼻咽癌 细胞系 CNE2 分泌蛋白质的筛选*

梁可^{1,2)} 陈主初^{1,2)} 易红¹⁾ 李建玲¹⁾ 张鹏飞¹⁾
李茂玉¹⁾ 李萃¹⁾ 冯雪萍¹⁾ 彭芳¹⁾ 肖志强^{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)

摘要 为筛选表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 调控的鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞的分泌蛋白质, 揭示 EGFR 在 NPC 发病中的作用机制, 采用无血清培养法培养 NPC 细胞系 CNE2, 并用转化生长因子 (transforming growth factor- α , TGF- α) 刺激 CNE2 细胞 24 h 作为实验组, 对照组 CNE2 细胞不用 TGF- α 刺激. 超滤法脱盐并浓缩两组细胞的培养上清制备分泌蛋白, 采用双向凝胶电泳技术 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 分离两组细胞的分泌蛋白, PDquest 图像分析软件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 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 鉴定差异表达蛋白. 建立了实验组和对照组 CNE2 细胞分泌蛋白的 2-DE 图谱, 图像分析识别了 22 个差异蛋白质点, 质谱鉴定了 8 个非冗余蛋白质, 其功能涉及肿瘤细胞侵袭转移、细胞凋亡和增殖, 为进一步揭示 EGFR 在 NPC 发病中的作用及其机制奠定了基础.

关键词 鼻咽癌, CNE2 细胞, 表皮生长因子受体 (EGFR), 分泌蛋白质组, 二维凝胶电泳, 质谱
学科分类号 Q50, Q51

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是一种由 EGFR 瘤基因编码的 170 ku 跨膜酪氨酸激酶受体, 其配体主要有表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和转化生长因子 - α (transforming growth factor- α , TGF- α). 当配体与 EGFR 结合后, 受体通过自身磷酸化活化, 活化的受体启动下游 MAPK、PI3 Kinase 等信号通路, 调控靶基因的表达, 发挥调节细胞生长、分化、凋亡和迁移的作用. EGFR 在多种肿瘤中存在过表达或异常活化, 使肿瘤细胞增殖加快、侵袭和转移能力增强、凋亡受阻, EGFR 已成为目前肿瘤治疗的重要靶分子^[1,2].

已有大量关于 EGFR 与鼻咽癌 (NPC) 相关性的报道. 如 NPC 中不仅有 EGFR 过表达或异常活化, 而且 EGFR 过表达或异常活化与 NPC 恶性表型、生长增殖、病理分级和临床分期密切相关^[3], NPC 细胞能分泌 EGF, 通过 EGF/EGFR 自分泌环路促进自身增殖和转移^[4], EB 病毒的潜在致癌蛋白——潜伏膜蛋白 (LMP1), 可上调 NPC 细胞

EGFR 及其配体 EGF 的表达发挥其致癌作用^[5,6]. 这些研究结果提示, EGFR 在 NPC 的发生发展中具有重要的作用, 但是 EGFR 在 NPC 发病中的作用机制仍不太清楚, 有待进一步阐明.

肿瘤细胞分泌的各种蛋白质不仅是肿瘤细胞自身生长、侵袭和转移所必需, 而且还是筛选肿瘤标志物的重要源泉. 因此, 识别、鉴定肿瘤细胞的分泌蛋白不仅有助于揭示肿瘤发病的分子机理, 而且有可能发现肿瘤分子标志物. 肿瘤是一种多阶段、多基因参与的复杂过程, 其基因水平的变化必然导致大量分泌性蛋白的改变, 然而由于方法的局限性, 以往关于肿瘤分泌蛋白的研究绝大多数是针对单一或某类蛋白质. 随着蛋白质组学技术的出现和发展, 肿瘤分泌蛋白质组 (secretome) 研究正在兴

*国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB510207), 教育部跨世纪
优秀人才培养计划(教育部教技函[2002]48号)基金资助项目.

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

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-21, 接受日期: 2006-07-15

起^[5,6]. 如前列腺癌分泌蛋白质组研究不仅发现几种受雄激素调控的蛋白质与前列腺癌生长密切相关, 而且识别了几种前列腺癌的潜在分子标志物^[7].

为揭示 EGFR 在 NPC 发病中作用机制, 本研究从分泌蛋白质组的角度出发, 用 TGF- α 刺激鼻咽癌细胞株 CNE2, 运用蛋白质组学技术分离、鉴定 EGFR 调控的 NPC 细胞分泌蛋白, 发现 8 个 EGFR 活化后分泌发生了改变的蛋白质. 据我们所知, 这是首次采用蛋白质组学技术筛选 EGFR 调控的 NPC 分泌蛋白, 为进一步探讨 EGFR 在 NPC 发病中的作用与机制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系. 人低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE-2 由湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室保存, 该细胞系有 EGFR 高表达.

1.1.2 试剂. 小牛血清、RPMI1640 培养基为 Gibco BRL 产品; 2D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒、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、CHAPS、硫脲、过硫酸铵、IPG 缓冲液 pH3~10 和 24 cm 固相化 pH 梯度干胶条购自 Amersham Pharmacia 公司; 转铁蛋白、TGF- α 、胰岛素、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、乙腈和基质 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸(CCA)购自 Sigma 公司; 超滤离心管 (CENTRIPLUS Centrifugal Filter Devices)为 Millipore 公司产品; 磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠(EDTA- Na_2)为国产分析纯.

1.1.3 仪器. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪以及 Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪为 Applied Biosystem 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 TGF- α 刺激. 用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基培养 CNE-2 细胞至 60%融合, 去除培养基, Hank's 液洗涤 5 次, 加入无血清培养基 (含 5 mg/L 转铁蛋白与 5 mg/L 胰岛素的 RPMI1640 培养基) 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h, 再次去除培养基, Hank's 液洗涤 2 次. 实验组细胞用含 30 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 的上述无血清培养基继续培养 24 h, 对照组细胞用不含 TGF- α 的无血清培养基同时培养. 实验重复 2 次.

1.2.2 细胞分泌蛋白的制备. 收集 2 组细胞的培养上清, 离心去除细胞, 先用 0.45 μm 的无菌滤器过滤上清以去除细胞碎片, 再按厂家说明用超滤离心管将 15 ml 上清脱盐浓缩至 0.25 ml 左右, 加入等量的蛋白质裂解液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT) 漩涡混匀溶解, 15 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min 取上清即为分泌蛋白. 采用 2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度.

1.2.3 双向凝胶电泳. 操作步骤主要按照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行. 将 450 μl 蛋白质溶液 (1000 μg) 加至含 IPG 干胶条 (pH 3~10 NL) 的 IPG 胶条槽内, 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 10 ml 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 10 ml 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- 聚丙烯酰胺 (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, 用 "Blue silver" 染色方法对 2-D 进行考马斯亮蓝染色. 二维凝胶电泳分析重复 2 次.

1.2.4 图像分析. 应用 ImageScanner 扫描仪 (Amersham Biosciences) 扫描染色的 2-D 胶. PDQuest 2-DE 软件比较分析实验组和对照组细胞分泌蛋白二维电泳图谱的差异, 选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点进行质谱分析. 所有数据的统计分析在 Excel 软件上进行.

1.2.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析. 从胶中切取差异蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 50%乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢铵脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 加入 10 μl TPCK 处理的胰蛋白酶 (0.1 mg/L) 冰上吸胀 40 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解 12 h, 30 μl 萃取液 (100%乙腈: 5%三氟乙酸 1:1) 萃取 60 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 μl , 取 0.5 μl 样品与 1 μl 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 SwissProt 数据库鉴定蛋白质.

2 结 果

2.1 实验组和对照组 CNE2 分泌蛋白 2-DE 图谱的建立

在相同条件下对实验组和对照组 CNE2 细胞的分泌蛋白进行了 3 次双向凝胶电泳, 建立 2 组细胞

分泌蛋白的 2-D 电泳图谱. 应用 PDQuest 2-DE 软件分析其 2-D 电泳图谱, 分别可检测到大约 250 个蛋白质点, 每组细胞 3 张 2-D 胶的平均胶比较(组间比较)共有 32 个差异表达大于 2 倍的蛋白质点. 实验组和对照 CNE2 细胞分泌蛋白的 2-D 电泳图谱见图 1, 图 1 中标出了得到鉴定的 10 个蛋白质点, 10 个蛋白质点表达量的差异见表 1. 图 2 为局部放大的部分差异表达的蛋白质点.

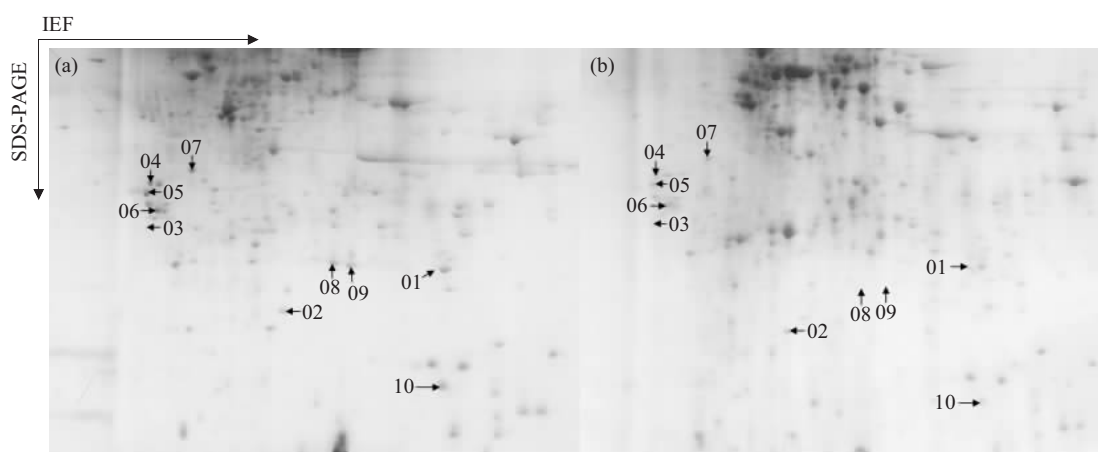


Fig. 1 2-DE maps of secretome of NPC cell line CNE2 stimulated with or without TGF- α

10 differential expression proteins spots are labeled with arrows, and the data on the differential expression proteins are presented in the Table 1. (a) Control CNE2 cells. (b) CNE2 cells stimulated with TGF- α .

Table 1 Differential expressed proteins of colonic epithelium identified by MALDI-TOF MS between CNE2 cell stimulated with or without TGF- α

Spot No	Swissprot Access code	Name	Changing folds (Experimental/control)	Function	Subcelluar locations
1	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	6.2	Transcription & translation	Secreted
2	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2.2	Transcription & translation	Secreted
3	P05067	Amyloid β -protein precursor	12.1	Miscellaneous	Secreted
4	AAG17014	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2	0.2	Unkown	Unkown
5	Q4VJB6	14-3-3 protein epsilon isoform transcript variant 1	0.22	Signal transduction	Cytoplasm
6	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	0.21	Signal transduction	Cytoplasm
7	P08758	Annexin A5	0.48	Signal transduction	Secreted
8	P16035	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0.01	Protein turnover or anti-degradation	Secreted
9	P16035	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0.01	Protein turnover or anti-degradation	Secreted
10	P01034	Cystatin C	0.45	Protein turnover or anti-degradation	Secreted

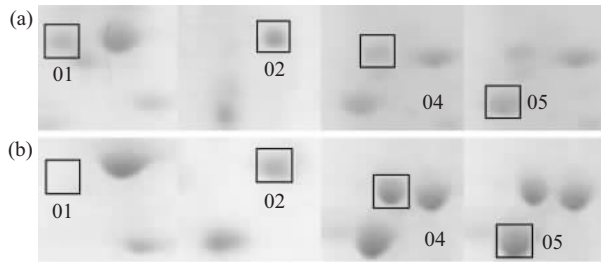


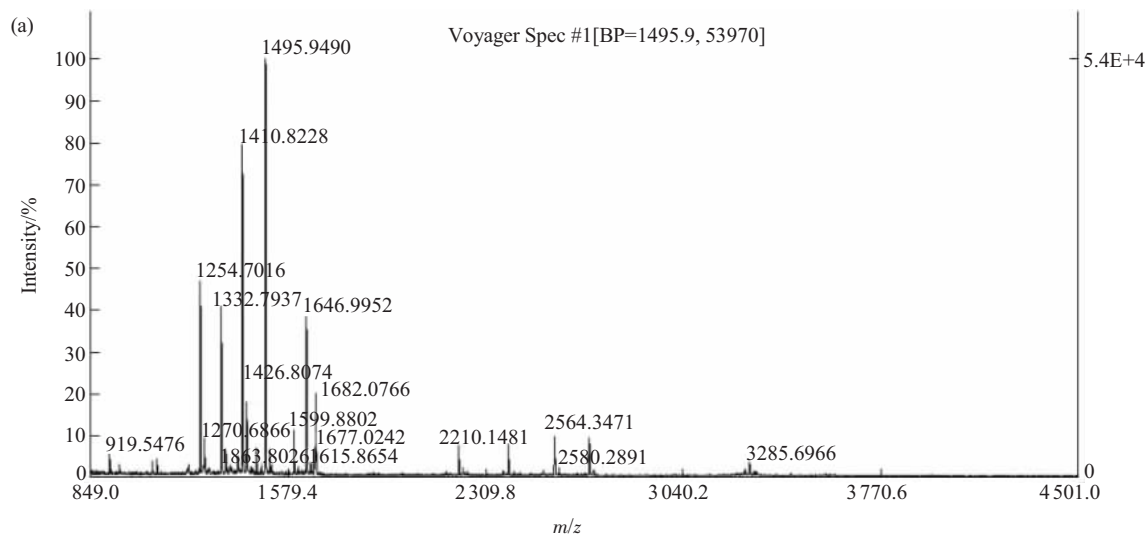
Fig. 2 Close-up image of partial differential expression protein spots between CNE2 stimulated with or without TGF- α

(a) CNE2 cells stimulated. (b) Control CNE2 cells.

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

从胶中切取 32 个差异蛋白质点, 胶内酶解后进行 MALDI-TOF-MS 分析, 获取肽质量指纹图

谱, 数据库搜寻鉴定蛋白质, 共 10 个蛋白质点包括 8 种非冗余蛋白得到鉴定. 8 号蛋白质点鉴定结果见图 3. 该差异蛋白的肽质量指纹图谱检索 SwissProt 数据库显示为 Tissue inhibitor of metalloproteinase 2. 其余 23 个点由于丰度较低未能获得 PMF 图谱, 或由于数据库搜索未能达到具有统计学意义的分数而未得到鉴定. 依据 SWISS-PROT 数据库中提供的蛋白质功能信息及相关资料的查阅, 点 8、9、10 为与转移侵袭相关的蛋白质, 点 5、6、7 为与凋亡相关的蛋白质, 点 1、2、3、4 为与增殖相关的蛋白质. 依据 SWISS-PROT 数据库和北京大学 SPD 数据库提供的蛋白质定位信息, 点 1、2、3、7、8、9、10 为分泌蛋白, 点 5、6 定位于胞浆, 点 4 定位不明. 表 1 列出了 8 个得到鉴定的差异表达蛋白的详细信息.



(b) Database : MSDB 20050929 (2344227 sequences; 779380795 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (141910 sequences)
 Timestamp : 19 Apr 2006 at 13:42:40 GMT
 Top Score : 117 for AAC50729, HUMANT IMP 5 NID: —Homo sapiens

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 64 are significant ($P < 0.05$).

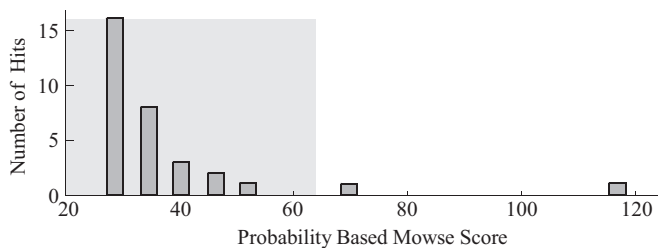


Fig. 3 MALDI-TOF-MS analysis of spot 8

(a) Peptide mass fingerprinting of protein spot 8. (b) Database query result and scores of spot 8.

3 讨 论

EGFR在多种肿瘤中存在过表达和异常活化的现象,能增加肿瘤细胞的增殖、阻止肿瘤细胞凋亡、增强肿瘤细胞的粘附性和侵袭性,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,EGFR已成为目前肿瘤治疗的重要靶分子.研究表明,包括NPC在内许多肿瘤能够通过自分泌EGF或/和TGF- α 活化EGFR促进肿瘤细胞增殖和转移^[8,9],但EGFR在NPC发生发展中的作用机制仍有待进一步阐明.为揭示EGFR在NPC发病中的作用机制,本研究从肿瘤分泌蛋白质组学的角度出发,首次采用蛋白质组学技术筛选EGFR调控的NPC分泌蛋白,初步分离和鉴定了8个EGFR调控的分泌蛋白,这些蛋白质的功能涉及肿瘤细胞侵袭转移、凋亡与增殖.

3.1 与肿瘤细胞侵袭转移相关的蛋白质

TGF- α 刺激CNE2细胞后,其分泌蛋白中组织金属蛋白酶抑制剂2(tissue inhibitor of metalloproteinase 2, TIMP-2)表达下调,TIMP-2以其明确的肿瘤转移抑制作用而受到广泛关注^[10].基质金属蛋白酶-2(metalloproteinase-2, MMP-2)能降解基底膜,促进肿瘤细胞的浸润转移,而TIMP-2能抑制MMP-2的活性,降低肿瘤细胞的浸润性,使肿瘤细胞的穿膜移动能力受到限制.生理状态下TIMP-2/MMP-2处于平衡状态,而在病理状态下,例如有转移倾向的肿瘤中,则往往出现MMP-2的高表达并同时伴有的TIMP-2低表达^[11].本研究中,TGF- α 刺激CNE2细胞后下调TIMP-2的分泌,提示EGFR活化可能通过下调TIMP-2的分泌促进NPC浸润转移.

TGF- α 刺激CNE2后,其分泌蛋白中半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(cystatin C)表达下调.肿瘤细胞的侵袭转移与各种蛋白酶对细胞外基质的降解密切相关,其中,木瓜蛋白酶样-半胱氨酸蛋白酶扮演着很重要的角色.Cystatin C是存在于细胞外的木瓜蛋白酶样-半胱氨酸蛋白酶抑制剂,能够抑制肿瘤的转移^[12].有研究用转染cystatin C基因的人纤维肉瘤细胞建立裸鼠移植瘤,结果发现,高表达cystatin C对纤维肉瘤细胞的转移具有明显的抑制作用,这说明cystatin C是肿瘤转移的抑制因子^[13].本研究中,TGF- α 刺激CNE2细胞后下调cystatin C的分泌,提示EGFR活化可能通过下调cystatin C的分泌促进NPC浸润转移.

3.2 与细胞凋亡相关的蛋白质

TGF- α 刺激CNE2细胞后,其分泌蛋白中膜联蛋白A5(annexin A5)表达下调.研究表明,Annexin A5在凋亡的早期出现外化(externalize)即胞膜外表达,是一个凋亡的早期事件,Annexin A5可作为凋亡发生的指示分子^[14].本研究中,TGF- α 刺激CNE2细胞后下调Annexin A5的表达,提示EGFR活化可能通过下调Annexin A5的分泌抑制NPC细胞凋亡.

本研究识别了另外一个凋亡相关蛋白——14-3-3蛋白epsilon与zeta在TGF- α 刺激CNE2细胞后表达下调.14-3-3蛋白可与各种信号分子包括激酶、磷酸酶、膜受体等结合,在许多生理和病理过程中发挥重要作用,如有丝分裂、信号传导、细胞凋亡、细胞周期控制等.研究发现,14-3-3蛋白可直接影响磷脂酶活性及Ca²⁺有关的信号传导,抑制细胞凋亡^[15].本研究中,TGF- α 刺激CNE2细胞后下调14-3-3蛋白的表达,它与NPC细胞凋亡的关系有待进一步研究.

3.3 与细胞增殖相关的蛋白质

TGF- α 刺激CNE2后,分泌蛋白中的 β 淀粉样蛋白前体(amyloid β -protein precursor, APP)表达上调.APP是一种表达于多种细胞中的膜结合蛋白,具有促进细胞粘附、维护神经细胞突触膜稳定性等功能.APP主要通过两种途径进行加工修饰:一为分泌途径,由分泌酶催化,即APP经酶解加工后释放出可溶性的片段——分泌型APP(secreted APP, sAPP);另一为胞内体-溶酶体途径^[16].中枢神经系统中APP的异常剪切与Alzheimer氏病有关.而最近的一些研究表明,APP在细胞增殖方面扮演着重要的角色.有研究发现,在胰腺癌中存在APP的表达上调,并存在高水平的APP酶切加工,导致sAPP水平升高,阻断sAPP信号通路能够抑制胰腺癌细胞的增殖^[17].另外,在口腔鳞癌和结肠癌中也发现有APP的高表达,采用APP基因反义核酸抑制肿瘤细胞APP和sAPP的表达,可抑制肿瘤细胞的生长^[18,19].本研究中,TGF- α 刺激CNE2细胞后上调APP的分泌,提示EGFR活化可能通过上调APP分泌促进NPC细胞增殖.

TGF- α 刺激CNE2细胞后,分泌蛋白中核内不均一核糖核蛋白A1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1)表达上调.

hnRNP A1 是一种核内的 RNA 结合蛋白, 参与 RNA 前体的包装, 以及将 poly(A) mRNA 由核转移至胞浆并调节 mRNA 的剪切^[20]. hnRNP A1 的表达与细胞增殖呈正相关. 有研究表明, 在散发性人结肠癌中存在 hnRNP A1 的表达上调, hnRNP A1 的表达上调可导致结肠上皮细胞的恶性转化^[21]. 本研究中, TGF- α 刺激 CNE2 细胞后上调 hnRNP A1 的分泌, 提示 EGFR 活化可能通过上调 hnRNP A1 的分泌促进 NPC 细胞增殖.

本研究首次开展 EGFR 调控的 CNE2 细胞的分泌蛋白质组学研究, 筛选到 8 个 EGFR 调控的分泌蛋白, 其功能涉及肿瘤细胞侵袭转移、凋亡与增殖, 它们可能与 EGFR 在 NPC 发病中的作用有关, 有进一步研究的价值.

参 考 文 献

- 陶永光, 邓锡云, 曹亚. 以表皮生长因子受体为靶向的肿瘤信号转导干预治疗. 国外医学肿瘤学分册, 2001, **28** (2): 120~123
Tao Y G, Deng X Y, Cao Y. Foreign Medical Sciences Cancer Section, 2001, **28** (2): 120~123
- 张敏. 表皮生长因子受体与酪氨酸激酶抑制剂在肿瘤防治中的应用进展. 中国癌症杂志, 2003, **13** (3): 275~278
Zhang M. China Oncology, 2003, **13** (3): 275~278
- 王承兴, 李晓艳, 顾焕华, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中上调 EGFR 表达. 中华肿瘤杂志, 2001, **23** (4): 269~272
Wang C X, Li X Y, Gu H H, *et al.* Chinese J Cancer Research, 2001, **23** (4): 269~272
- 段朝军, 陈主初, 赵明伦. EB 病毒 LMP 与 EGF 自分泌在鼻咽癌细胞生长中的作用及其相互关系. 湖南医科大学学报, 1997, **22** (6): 483~448
Duan Z J, Chen Z C, Zhao M L. Bulletin of Hunan Medical University, 1997, **22**(6): 483~448
- Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, *et al.* The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. Proteomics, 2005, **5**(2): 585~596
- Dupont A, Tokarski C, Dekeyzer O, *et al.* Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. Proteomics, 2004, **4** (6): 1761~1778
- Martin D B, Gifford D R, Wright M E, *et al.* Quantitative proteomic analysis of proteins released by neoplastic prostate epithelium. Cancer Res, 2004, **64** (1): 347~355
- Narita T, Taga T, Sugita K, *et al.* The autocrine loop of epidermal growth factor receptor-epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha in malignant rhabdoid tumor cell lines: heterogeneity of autocrine mechanism in TTC549. Jpn J Cancer Res, 2001, **92**(3): 269~278
- El-Obeid A, Hesselager G, Westermark B, *et al.* TGF-alpha-driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun, 2002, **290** (1): 349~358
- Ozen O, Krebs B, Hemmerlein B, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. Clin Cancer Res, 2004, **10** (14): 4746~4753
- Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2003, **6** (3): 217~222
- Strojan P, Oblak I, Svetic B, *et al.* Cysteine proteinase inhibitor cystatin C in squamous cell carcinoma of the head and neck: relation to prognosis. Br J Cancer, 2004, **90** (10): 1961~1968
- Kopitz C, Anton M, Gansbacher B, *et al.* Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. Cancer Res, 2005, **65** (19): 8608~8612
- Monceau V, Belikova Y, Kratassiouk G, *et al.* Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. Cardiovascular Research, 2004, **64** (3): 496~506
- van Hemert M J, Steensma H Y, van Heusden G P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. BioEssays, 2001, **23** (10): 936~946
- 陈培利, 童坦君, 张宗玉. Alzheimer 氏病淀粉样前体蛋白的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26** (2): 105~108
Chen P L, Tong T J, Zhang Z Y. Prog Biochem Biophys, 1999, **26** (2): 105~108
- Hansel D E, Rahman A, Wehner S, *et al.* Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. Cancer Res, 2003, **63** (21): 7032~7037
- Ko S Y, Lin S C, Chang K W, *et al.* Increased expression of amyloid precursor protein in oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer, 2004, **111** (5): 727~732
- Meng J Y, Kataoka H, Itoh H, *et al.* Amyloid beta protein precursor is involved in the growth of human colon carcinoma cell *in vitro* and *in vivo*. Int J Cancer, 2001, **92** (1): 31~39
- Raffalli-Mathieu F, Glisovic T, Ben-David Y, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and regulation of the xenobiotic-inducible gene Cyp2a5. Mol Pharmacol, 2002, **61** (4): 795~799
- Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, *et al.* Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. Int J Oncol, 2005, **26** (3): 635~640

Screening of EGFR-regulated Secreted Proteins in Human NPC Cell Line CNE2*

LIANG Ke^{1,2}, CHEN Zhu-Chu^{1,2}, YI Hong¹, LI Jian-Ling¹, ZHANG Peng-Fei¹,
LI Mao-Yu¹, LI Cui¹, FENG Xue-Ping¹, PENG Fang¹, XIAO Zhi-Qiang¹**

¹Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to screen EGFR-regulated secreted proteins in human nasopharyngeal carcinoma(NPC), and to reveal the role and mechanism of epidermal growth factor receptor(EGFR) in the pathogenesis of NPC. NPC cell line CNE2 cells were cultured in serum-free medium and stimulated by transforming growth factor- α (TGF- α) for 24 h in experimental group. Control CNE2 cells were cultured at the same condition but without TGF- α stimulation. The culture medium of control and experimental cells was desalted and concentrated through ultrafiltration to prepared the total secreted proteins. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to separate the secreted proteins of control and experimental cells, PDQuest software was applied to analyze 2-DE images, and the differential protein spots between the control and experimental cells were identified by desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The 2-DE patterns of the secreted proteins of TGF- α stimulated and un-stimulated CNE2 cells were established, 22 differential proteins spots between the two groups of cells were found, and 8 non-redundant proteins were identified with MALDI-TOF-MS, the functions of which were involved in invasion, metastasis, apoptosis and proliferation of cancer cells. The data will be valuable for further to study the role and mechanism of EGFR in the pathogenesis of NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma (NPC), CNE2, epidermal growth factor receptor (EGFR), secretome, two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2001CB510207) and Ministry of Education of China for Outstanding Scholars of New Era (2002-48).

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

Received: June 21, 2006 Accepted: July 15, 2006