

## 激光捕获显微切割技术结合 $^{18}\text{O}$ 标记定量蛋白质组技术在胃癌标志物筛查中的应用研究\*

张志强<sup>1, 2)\*\*</sup> 李茂玉<sup>3)\*\*</sup> 张桂英<sup>1)\*\*\*</sup> 彭芳<sup>3)</sup> 姚慧欣<sup>3)</sup>  
李美香<sup>3)</sup> 肖志强<sup>3)</sup> 陈主初<sup>3, 4)</sup>

<sup>1)</sup>中南大学湘雅医院消化科, 长沙 410008; <sup>2)</sup>新疆医科大学第一附属医院消化科, 乌鲁木齐 830054;

<sup>3)</sup>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 410078; <sup>4)</sup>中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410008)

**摘要** 建立一种更加精确地分离鉴定胃癌特异肿瘤标志物的定量蛋白质组学技术。首先采用激光捕获显微切割技术(LCM)纯化胃腺癌细胞及胃黏膜良性上皮细胞, 将裂解的样本总蛋白经过 1D SDS-PAGE 预分离, 然后采用  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  分别标记两种样本酶切后的多肽混合物。结合纳升级液相色谱(Nano-HPLC-MS/MS)定量地鉴定胃癌细胞和胃黏膜良性上皮细胞的差异表达蛋白。共筛选出 78 个差异表达蛋白, 其中 42 个蛋白质在胃癌组织中表达上调, 36 个蛋白质下调。Western blot 技术验证了其中几个差异蛋白(moesin, periostin, annexin A2, annexin A4)的表达, 与蛋白质组学研究的结果一致。LCM 技术结合  $^{18}\text{O}$  稳定同位素标记的定量蛋白质组学技术, 为研究胃癌发生机制、筛选胃癌的分子标志物提供了新的思路, 亦为诸如胃癌等复杂体系蛋白质的分离鉴定提供了新的技术选择。

**关键词** 胃癌, 激光捕获显微切割, 定量蛋白质组学,  $^{18}\text{O}$  标记

**学科分类号** R57

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00400

恶性肿瘤的发病机制、早期诊断及治疗一直是肿瘤学研究和临床医生所面临的主要挑战, 通过对肿瘤蛋白质组的研究, 有望为征服这一顽疾带来新契机。据统计, 胃癌是目前国内发病率居于第三位的肿瘤, 并将在未来 10 年成为国内沉重的负担<sup>[1]</sup>。临床上大多数胃癌病人确诊时往往已经处于晚期, 其 5 年生存率不超过 10%<sup>[2]</sup>。为此, 寻找早期诊断的肿瘤标志物对于胃癌具有十分重要的意义。国内外有学者应用蛋白质组学的方法筛查胃癌标志物, 发现了一些有意义的分子标志物, 如: AMP-18<sup>[3]</sup>(18 ku antrum mucosa protein)、组织蛋白酶 D<sup>[4]</sup>、胃蛋白酶 C<sup>[5]</sup>等。常用的蛋白质组分析技术(双向聚丙烯酰胺凝胶电泳, 2D-PAGE)寻找肿瘤标志物存在一定的缺陷, 开发高通量、更加精确的蛋白质组方法显得非常必要。

基于稳定同位素标记与质谱联用的定量蛋白质组学技术(quantitative proteomics)近年来发展迅速, 既能够鉴定差异表达的蛋白质, 又能够进行准确的定量分析, 克服了传统蛋白质组学的一些缺点, 是目前蛋白质组学研究的新前沿<sup>[6, 7]</sup>。其中  $^{18}\text{O}$  同位素

标记技术因其反应简单、处理步骤少、试剂便宜等优点, 在定量蛋白质组学研究中受到越来越多的关注<sup>[8, 9]</sup>。 $^{18}\text{O}$  标记技术反应原理为酶切肽段在蛋白水解酶的作用下其 C 端羧基的一个或两个  $^{16}\text{O}$  原子被  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中的  $^{18}\text{O}$  替换出来, 通过计算分别标记  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  的配对肽段的比值, 就可以推算出配对蛋白的相对丰度, 从而定量地鉴定差异蛋白质。

激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)的应用解决了组织异质性的难题, 为肿瘤蛋白质组学研究提供了最佳的生物样本<sup>[10, 11]</sup>。本研究应用 LCM 技术结合  $^{18}\text{O}$  稳定同位素标记的定量蛋白质组学技术平台, 对胃腺癌与良性胃黏膜上皮细胞差异蛋白进行研究, 建立了稳定且标记效率较高的实验方案, 鉴定出一些特异的与胃

\* 中南大学博士点基金资助项目(0575240)和湖南省科技重大专项资助(04sk1006-2)。

\*\* 共同第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。Tel: 0731-4327282, Fax: 0731-4327332

E-mail: guiyinzhong@hotmail.com

收稿日期: 2008-06-03, 接受日期: 2008-10-13

癌发生以及癌变过程相关分子标志物, 为复杂的胃癌组织以及其他肿瘤组织差异蛋白的分离鉴定提供了新的可行的技术方案.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 试剂和仪器.** 98%  $H_2^{18}O$  购自江苏 Huayi Isotope 公司. 丙烯酰胺、甲叉一双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、CHAPS、购自 Amersham Pharmacia 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈购自 Sigma 公司; 其他常用试剂为国产分析纯市售商品, 所用溶液均用 Milli-Q 去离子水配制. 使用仪器包括 Beckman L765 超速离心机(美国 Beckman 公司), Leica CM 1900 冰冻切割机、LCM 系统(德国 Leica 公司), Mini-PROTEAN 3 凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司), ImageScanner 扫描仪(瑞典 Amersham Biosciences 公司), Q-TOF micro(英国 Micromass 公司). 鼠抗人 Moesin 抗体购自美国 NeoMarkers 公司; 兔抗人 Periostin 抗体购自美国 Biovender 公司; 兔抗人 Annexin A2 抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗人 Annexin A4 抗体购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记鼠、兔二抗购自 Santa Cruz 公司.

**1.1.2 标本采集及处理.** 24 例胃癌标本来自于 2007 年 5~8 月中南大学湘雅医院普外科手术切除标本, 所有病例均经术后病理确认, 术前未进行放疗化疗等治疗手段. 其中男性 11 例, 女性 12 例, 年龄 39~72 岁, 平均 59 岁, TNM 分期包括 I~III 期. 手术标本取出后, 取新鲜胃癌组织与其对应远端距原发肿瘤至少 5 cm 远的胃黏膜层组织各约 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 大小, 立即将组织块用生理盐水进行反复清洗, 以去除血液, 并尽可能剪去多余的其他组织, 置于-80 $^{\circ}C$  冰箱保存.

### 1.2 方法

**1.2.1 冰冻切片制备和激光捕获显微切割(LCM).** 冰冻组织 OCT 包埋, 在 Leica CM 1900 冰冻切割机下切成 8~10  $\mu m$  的冰冻切片. 每例标本第 1 张切片用 HE 染色, 以做病理对照. 以后每张切片组织固定在表面覆盖有 EVA 膜(乙烯乙酸乙烯酯膜)的载玻片上, 只做甲基绿染色(染色剂中含蛋白酶抑制剂 AEBSF, 德国 AppliChem 公司), 切片在室温下自然干燥, 然后直视下观察, 选定要切割的区

域, 按最大捕获效率设定参数. 具体为:光束直径 (beam diameter) 60  $\mu m$ , 光束能量 (beam power) 80 mV, 激光传递脉冲 (transfer pulses) 为 116 ms. 每张切片的总捕获时间不超过 40 min. 收集的组织细胞置于 EP 管中, -80 $^{\circ}C$  保存备用.

**1.2.2 样本制备.** 12 对经 LCM 捕获的胃癌及配对良性黏膜细胞各自分别混合, 使用组织裂解缓冲液提取总蛋白. 组织裂解液是一种包含尿素和硫脲 (thiourea) 的混合物(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, 40 mmol/L DTT), 冰上裂解 1 h, 再低温超声数次, 于 4 $^{\circ}C$ , 10 000 g 离心 45 min, 提取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白质的浓度, -80 $^{\circ}C$  保存备用.

**1.2.3 1D SDS-PAGE(一向聚丙烯酰胺凝胶电泳)预分离组织细胞总蛋白.** 使用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳对裂解的胃癌细胞及良性胃黏膜细胞总蛋白预分离, 两种样本蛋白质分别平行上样到两个泳道, 上样量为 50  $\mu g$ . 电泳条件: 80 V 恒压. 电泳完毕后, 对凝胶进行考马氏亮蓝染色. 将凝胶等份切割成 25 个蛋白质凝胶条带, -20 $^{\circ}C$  保存备用.

**1.2.4 蛋白质胶内酶切.** 蛋白质条带凝胶用 200  $\mu l$  50%乙腈碳酸氢铵溶液(50 mmol/L, pH8.0)洗涤数次, 每次 30 min, 弃去上清, 洗涤至蓝色消失. 用乙腈脱水后, 加入 100  $\mu l$  10 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT, 溶于 100 mmol/L  $NH_4HCO_3$ ), 在 56 $^{\circ}C$  孵育 30 min. 再次用乙腈脱水, 加入 100  $\mu l$  55 mmol/L 碘乙酰胺(IAA, 溶于 100 mmol/L  $NH_4HCO_3$ ), 在室温和黑暗中孵育 1 h. 用 100  $\mu l$  50%乙腈碳酸氢铵溶液洗涤凝胶胶粒 5 min 后, 用乙腈脱水并进行真空离心干燥. 加入酶切溶液 0.01 g/L 胰蛋白酶溶液, 在 37 $^{\circ}C$  孵育 15 h 或过夜. 萃取(5%TFA+50%乙腈)后, 合并多肽混合物提取液, 冻干, -20 $^{\circ}C$  保存备用.

**1.2.5  $^{18}O/^{16}O$  标记样本多肽混合物.** 将标记反应的 Immobilized trypsin (Pierce 公司)(2  $\mu l$ /样本)用胰酶缓冲液(100 mmol/L 醋酸铵, pH6.8)反复洗 3 遍, 再用 10  $\mu l$  样本的胰酶缓冲液溶解. 10  $\mu l$  样本溶解好的 Immobilized trypsin 加入到样本中, 完全冷冻烘干. 在混有 Immobilized trypsin 的多肽混合物中加入 8  $\mu l$   $H_2^{18}O$ (或  $H_2^{16}O$ )和 2  $\mu l$  乙腈, 混匀后 37 $^{\circ}C$  孵育 24 h. 标记结束后用 1  $\mu l$  甲酸终止反应, 14 000 g 离心 15 min 去除 Immobilized trypsin, -20 $^{\circ}C$  保存. 正式实验前先标记酶切的标准蛋白肽

段(BSA), 酶切条件及标记方法同上, 以验证  $^{18}\text{O}$  标记的效率。

**1.2.6 蛋白质组鉴定.** 纳升级毛细管反相液相色谱在含有不同多肽混合物的 Eppendorf 管中加入流动相 A 液(2%乙腈水溶液, 含 0.1%甲酸)7.0  $\mu\text{l}$ , 漩涡振荡后, 在 10 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清 3.5~6.5  $\mu\text{l}$  于专用的带有锥底的小瓶中, 置于 Ultimate FAMOS 液相色谱系统自动进样器的样品架上. 首先用辅助泵 C, 以流动相 A 液, 在流速为 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 10 min, 将样品上样到预柱上并脱盐, 然后将预柱切换到与毛细管分析柱相连, 进行梯度洗脱. 溶剂梯度为: A(水 / 乙腈, 5/95, 并加入 0.1% 甲酸), 0~10 min; 5%~90%B(水 / 乙腈), 55 min; 90%B, 5 min; 90~0%B, 10 min. 经过 15 min 平衡后, 进行下一次分离. 纳升级分析色谱柱的流速约为 250 nl/min. 洗脱液直接通过 ESI 源离子化进入 Q-TOF 质谱仪进行分析. 采用标准肽段 Glu-Fibrino peptide B 对质谱仪进行外标校正。

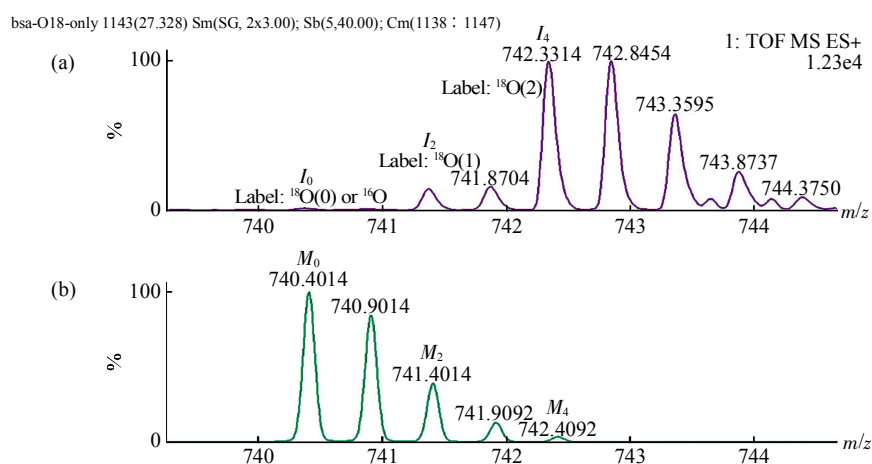
**1.2.7 质谱(MS)数据分析.** 数据经 Masslynx 4.0 处理产生 pkl 文件, 采用本地 Mascot 2.0 查询 IPI 数据库鉴定蛋白质. 查询参数: 数据库为 IPI Human v3.09; 固定修饰为半胱氨酸经碘乙酰胺修饰; 可变修饰为蛋氨酸氧化, C 端 1 个  $^{18}\text{O}$  和 2 个  $^{18}\text{O}$  标记; MS 误差 0.5 u, MS/MS 误差 0.5 u; 电荷选择

2+, 3+, 4+; 酶漏切位点数为 1; Mascot 数据库查询打分算法是一种基于概率的算法, 以 Score0.05、Score0.01 分别表示  $p=0.05$ 、0.01 时 Score 值, 蛋白质鉴定标准采用 2 和 2 个以上肽段匹配且得分大于 Score0.05, 或单肽段匹配且得分大于 Score0.01.

定量分析则采用 Masslynx 软件从总离子流(TIC)图中提取包含待定量肽段的 Survey Scan, 然后整合(Combine)这些 Survey Scan, 产生用于定量分析的质谱图, 并从中分析获得  $I_0$ 、 $I_2$ 、 $I_4$  峰峰面积(如图 1a 所示), 通过 Masslynx 软件自带工具 Isotope Tool 获取该肽段理论分布, 获取  $M_0$ 、 $M_2$ 、 $M_4$  峰峰面积(如图 1b 所示), 通过公式  $1^{[12, 13]}$  计算  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  比例。

$$\text{Ratio} \left( \frac{^{16}\text{O}}{^{18}\text{O}} \right) = \frac{I_0}{I_4 - \frac{M_4}{M_0} I_0 + I_2 \left( 1 - \frac{M_2}{M_0} \right) - \left( 1 - \frac{M_2}{M_0} \right) \frac{M_2}{M_0} I_0} \quad (1)$$

$I_0$ : 实际测量的单同位素峰的相对强度;  $I_2$ : 实际测量的相差 2u 的单同位素峰的相对强度;  $I_4$ : 实际测量的相差 4u 的单同位素峰的相对强度;  $M_0$ : 理论的单同位素峰的相对强度;  $M_2$ : 理论的相差 2u 的单同位素峰的相对强度;  $M_4$ : 理论的相差 4u 的单同位素峰的相对强度。



**Fig. 1** Mass spectrum showing isotopic distribution patterns of peptide(740.4, 2+) (a) Isotopic distribution patterns after  $^{18}\text{O}$  labelling. (b) Theoretical isotopic distribution patterns.

**1.2.8 Western blot 验证差异蛋白质表达水平.** 以 20 对 LCM 纯化的胃腺癌细胞和配对的良性胃黏膜上皮细胞为样本, 加入组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% P40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L Aprotinin, 25 mg/L Leupeptin)冰上

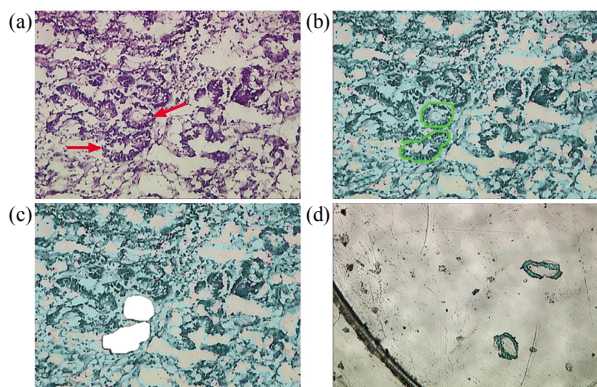
裂解 1 h, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min 后取上清即为组织细胞总蛋白, Bradford 方法测定蛋白质浓度. 40  $\mu\text{g}$  总蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 蛋白质电转移至 PVDF 上, 印迹膜用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h; 稀释后的一抗(moesin 抗体, 1:400 稀释; periostin 抗体,

1 : 400 稀释; annexin A2 抗体, 1 : 500 稀释; annexin A4 抗体, 1 : 1 600 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min; HRP 标记的二抗室温孵育 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.

## 2 结 果

### 2.1 LCM 获取样本细胞

组织切片采用甲基绿方法染色后, 经有经验的病理专家选取细胞形态完整、对比度好、肿瘤细胞和间质可清楚区分的合格切片. 在设定捕获条件下, 每张切片捕获后能够进行准确的细胞收集, 胃腺癌细胞及良性黏膜上皮细胞可以准确地辨认, 捕获后获得的细胞同质性高, 可达 90% 以上(图 2).

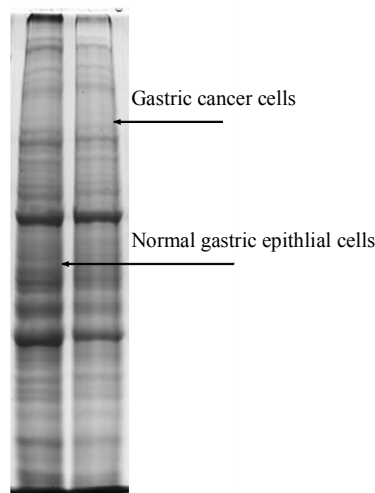


**Fig. 2 Laser capture microdissection of gastric tissue sections**

(a) Hematoxylin & eosin (H&E) stained gastric carcinoma section. Red arrows indicate carcinoma cells. (b) Methyl green stained the same gastric carcinoma section. Green laser outlines show the carcinoma cells to be collected. (c) The remaining cells after laser capture. (d) Shows the cells collected from the outlined area(x200).

### 2.2 组织细胞总蛋白的 1D SDS-PAGE 预分离

从胃腺癌细胞和良性胃黏膜上皮细胞中获取的蛋白质在相同的试验条件和参数设置的情况下进行 1D SDS-PAGE 分离, 得到清晰度好、蛋白质条带满意的图像(图 3).

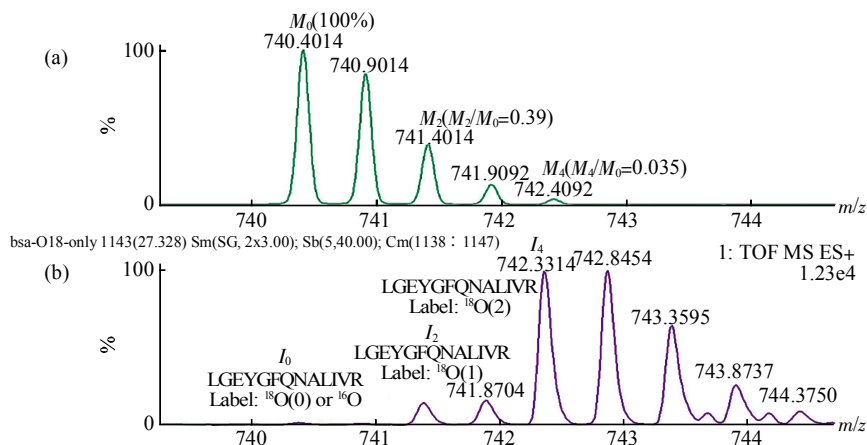


**Fig. 3 1D SDS-PAGE of normal gastric epithelial cells proteins and gastric carcinoma cells**

Fifty micrograms of each sample protein fraction were separated on 10% gels and stained with Coomassie blue. Each lane was cut into 25 slices.

### 2.3 肽段 <sup>18</sup>O 标记效率及质谱分析

由于 <sup>18</sup>O 标记不会改变肽段的物理化学性质, 因而不会明显地影响肽段在液相色谱中保留时间, 在一级 MS 谱图中相应的肽段会一前一后成对出现, 通过比较肽段离子峰强度或峰面积, 从而实现肽段的相对定量(如图 4 所示 BSA 其中一个酶切肽段标记后质谱图). 根据公式 1 计算该肽段 <sup>18</sup>O 标记后效率  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O} = 0.0143$ , 标记效率为 98.6%. 对于标准蛋白 BSA 鉴定到多个肽段, 其各肽段 <sup>18</sup>O 标记效率见表 1, 平均标记效率为 96.6%.



**Fig. 4 Mass spectrum showing the isotopic distribution patterns of the peptide of BSA(LGEYGFQNALIVR)**

(a) Theoretical isotopic distribution patterns ( $M_0$ : Monoisotopic peak;  $M_2$ : Second isotopic peak;  $M_4$ : Fourth isotopic peak). (b) Isotopic distribution patterns after <sup>18</sup>O labeling. ( $I_0$ -unlabeled,  $I_2$ - single <sup>18</sup>O labeled,  $I_4$ -doubly <sup>18</sup>O labeled).

**Table 1**  $^{18}\text{O}$  Labeling efficiencies for BSA peptides from the Nano-HPLC-MS/MS Analysis

Peptide	Mascot Score	$^{18}\text{O}$ labeling mean ratio (%)
LVNELTEFAK	57	99.1
HPEYAVSVLLR	31	91.9
HLVDEPQNLIK	39	95.3
TVMENFVAFVDK	94	96.2
SLHTLFGDELCK + Carbamidomethyl (C)	50	99.0
RHPEYAVSVLLR	44	99.0
LGEYGFQNALIVR	112	98.6
EYEATLECCAK	49	98.0
VPQVSTPTLVEVSR	72	95.2
DAFLGSFLYEYSR	70	90.9
LKPDPTLTCDEFK + Carbamidomethyl (C)	71	92.6
KVPQVSTPTLVEVSR	96	97.1
MPCTEDYLSLILNR + Carbamidomethyl (C)	80	99.0
HPYFYAPELLYYANK	45	99.0
LFTFHADICTLPDTEK	52	96.2
DAIPENLPLTADFAEDK	59	99.0
RHPYFYAPELLYYANK	34	98.0
DAIPENLPLTADFAEDKDVCK + Carbamidomethyl (C)	48	99.1
GLVLIAFSQYLQCPFDEHVK + Carbamidomethyl (C)	25	91.9
		96.6 $\pm$ 0.028

## 2.4 差异蛋白的质谱鉴定

通过 1D SDS-PAGE 蛋白质混合物的预分离、胶上酶切和提取, 再经过纳升级毛细管反相液相色谱质谱总共得到 7 535 条肽段, 去冗余后得到 2 040 条肽段, 归结 306 种蛋白质。按照  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  比

值在 2 倍以上或低于 0.5 倍为差异蛋白的标准, 总共得到 78 个差异蛋白, 这些蛋白质的具体信息及  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  比值见表 2。图 5 所示其中一个差异蛋白 Moesin(膜刺突蛋白)的一个肽段标记后同位素峰质谱图。

**Table 2** Differentially expressed proteins with at least two-fold quantitative alterations in gastric adenocarcinoma and normal musoca epithelial cells by Nano-HPLC-MS/MS

IPI accession	Protein name	Matching peptides	Scores	Mean ratio ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) <sup>1)</sup>	$p$ <sup>2)</sup>	$M$ /ku <sup>3)</sup>	Reported function
Metabolic enzyme							
IPI00031522	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor (78 ku gastrin-binding protein)	10	324	0.40 $\pm$ 0.12	8.98	79.0	Fatty acid metabolism, oxidoreductase
IPI00009893	Gastric triacylglycerol lipase precursor (LIPF, gastric lipase)	6	154	3.17 $\pm$ 0.52	6.86	43.2	Lipid degradation, hydrolase
IPI00103397	Mucin 5 (Fragment)	2	62	4.37	4.98	51.1	Gastric mucin
IPI00022213	Gastricsin precursor	2	75	2.58	3.59	35.5	Hydrolyzes a variety of proteins
IPI00305383	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	1	61	0.29	7.74	46.8	Electron transport, a component of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex
IPI00062206	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39, isoform 2	1	39	0.31	6.60	35.1	ATP-dependent helicase activity
IPI00216171	Gamma-enolase	1	72	0.38	4.91	47.1	Glycolysis, lyase
IPI00004358	Glycogen phosphorylase, brain form	2	122	0.41	6.41	96.6	Carbohydrate metabolism
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin precursor	1	51	0.45	5.37	44.3	Inhibitor of serine proteases
IPI00218414	Carbonic anhydrase 2	2	97	2.01 $\pm$ 0.12	6.86	29.1	Reversible hydration of carbon dioxide

Continued

IPI accession	Protein name	Matching peptides	Scores	Mean ratio ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) <sup>1)</sup>	pI <sup>2)</sup>	M/ku <sup>3)</sup>	Reported function
IPI00024993	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	3	193	2.06 ± 0.19	5.88	28.3	Lipid metabolism
IPI00011107	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	9	75	0.32 ± 0.25	8.32	46.6	Plays a role in intermediary metabolism and energy production
IPI00022977	Creatine kinase B-type	5	219	3.20 ± 0.79	5.35	42.5	Reversibly catalyzes the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens
Redox regulation							
IPI00006663	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	2	79	0.35	5.69	54.4	Oxidoreductase
IPI00604664	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 ku subunit, mitochondrial precursor	3	122	0.47 ± 0.13	5.42	77.0	Oxidoreductase
IPI00024919	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor (Peroxioredoxin-3)	2	73	2.04	5.77	21.5	Involved in redox regulation of the cell
IPI00004457	Membrane copper amine oxidase	1	42	2.18	6.05	84.5	Oxidoreductase
IPI00017510	Cytochrome c oxidase subunit 2	3	78	2.29	4.67	25.6	Cytochrome-c oxidase activity
IPI00294398	Isoform 1 of Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	3	39	2.54	8.38	32.8	Oxidoreductase
IPI00293721	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	4	93	2.71	6.67	37.2	Oxidoreductase
IPI00219217	L-lactate dehydrogenase B chain	2	93	7.04	5.71	36.6	Glycolysis, oxidoreductase
Signal transduction							
IPI00218918	Annexin A1	5	45	0.46 ± 0.04	6.64	38.6	Signal transduction, calcium ion binding
IPI00418169	Annexin A2 isoform 1	2	178	0.43 ± 0.16	7.57	38.6	Signal transduction, calcium ion binding
IPI00221225	Annexin A4	5	175	0.19 ± 0.02	5.85	35.7	Anti-apoptosis, signal transduction, calcium ion binding
IPI00013881	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	2	89	0.38	5.89	49.1	mRNA processing, ribonucleoprotein
IPI00215965	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform b	1	47	0.49	9.26	38.7	mRNA processing, ribonucleoprotein
IPI00021263	14-3-3 protein zeta/delta	3	276	0.50	4.73	27.7	Anti-apoptosis, signal transduction, transcription factor binding
IPI00027462	Protein S100-A9	2	78	0.09 ± 0.24	5.71	13.2	Calcium ion binding, Signal transduction
Cytoskeleton-related							
IPI00003865	Isoform 1 of Heat shock cognate 71 ku protein	3	112	0.23 ± 0.11	5.37	70.9	Stress related, chaperone
IPI00304925	Heat shock 70 ku protein 1	3	49	0.31 ± 0.19	5.48	70.1	Stress related, chaperone
IPI00382470	Heat shock protein HSP 90-alpha 2	6	211	0.35 ± 0.14	4.94	84.5	Stress related, chaperone
IPI00554788	Keratin, type I cytoskeletal 18	1	95	0.25	5.34	47.9	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments

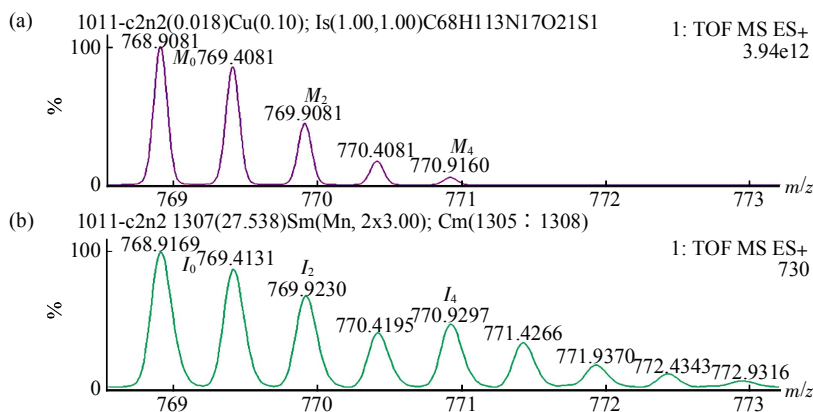
Continued

IPI accession	Protein name	Matching peptides	Scores	Mean ratio ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) <sup>1)</sup>	$p$ <sup>2)</sup>	$M/\text{ku}$ <sup>3)</sup>	Reported function
IPI00295684	Keratin 10	12	596	7.70	5.13	59.5	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00554648	Keratin, type II cytoskeletal 8	2	92	$0.44 \pm 0.23$	5.52	53.6	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00220327	Keratin, type II cytoskeletal 1	20	45	4.70	8.16	65.9	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00293665	Keratin, type II cytoskeletal 6B	3	164	$5.30 \pm 1.15$	8.14	59.9	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00021304	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	298	$5.54 \pm 0.24$	8.07	65.9	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00217963	Keratin, type I cytoskeletal 16	3	158	$4.35 \pm 0.29$	7.87	26.8	Cell proliferation, cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00032541	Keratin, type II cuticular Hb5	2	39	$6.00 \pm 0.16$	6.27	55.8	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00019359	Keratin, type I cytoskeletal 9	7	56	6.68	5.19	62.1	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00290078	Keratin 4	2	65	2.94	5.07	104.5	Cytoskeleton protein of Intermediate filaments
IPI00387144	Tubulin alpha-ubiquitous chain	5	161	0.27	4.94	50.1	The major constituent of microtubules
IPI00011654	Tubulin beta-2 chain	6	276	$0.49 \pm 0.02$	4.78	49.7	Cytoskeleton, the major constituent of microtubules
IPI00015671	Tubulin, alpha-like 3	2	80	0.31	5.68	49.9	The major constituent of microtubules
IPI00180675	Tubulin alpha-3 chain	5	163	0.34	4.94	50.1	The major constituent of microtubules
IPI00023761	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 3 isoform 1	2	38	2.57	8.73	87.4	The major constituent of microtubules
IPI00007960	Isoform 1 of periostin precurs (osteoblast specific factor, Osf-2)	7	219	$0.35 \pm 0.06$	7.35	91.0	Binds to heparin. Induces cell attachment and spreading and plays a role in cell adhesion
IPI00644989	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	8	44	$0.38 \pm 0.20$	4.95	46.1	Chaperone, isomerase, and redox activities
IPI00019880	47 ku heat shock protein precursor 150 ku	1	78	0.45	8.81	44.5	Stress related, chaperone
IPI00000877	Oxygen-regulated protein precursor	2	216	0.48	5.07	107.7	Stress related, chaperone
IPI00020984	Calnexin precursor	1	64	0.45	4.47	65.4	Chaperone, angiogenesis, calcium ion binding
IPI00297779	T-complex protein 1 subunit beta	3	164	$0.45 \pm 0.04$	6.02	57.4	Molecular chaperone; assist the folding of proteins upon ATP hydrolysis
IPI00027341	Macrophage capping protein	1	45	0.46	5.88	38.5	Actin capping
IPI00219365	Moesin	2	71	0.46	6.09	67.7	Cell motility, probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma membrane
IPI00418471	Vimentin	4	53	0.46	5.06	53.5	Cell motility, structural constituent of cytoskeleton
IPI00554711	Junction plakoglobin	1	48	2.22	5.95	81.6	Cell adhesion, chaperone

							Continued
IPI accession	Protein name	Matching peptides	Scores	Mean ratio ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) <sup>1)</sup>	pI <sup>2)</sup>	M/ku <sup>3)</sup>	Reported function
IPI00013079	EMILIN-1 precursor	1	58	2.89	5.07	37.2	Cell adhesion
IPI00304840	Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain precursor	2	54	7.14	5.85	106.5	Structural protein, Collagen VI acts as a cell-binding protein
IPI00413728	Isoform 1 of spectrin alpha chain, brain	2	83	0.10	5.22	284.5	Actin capping, cytoskeleton protein
Protease-related							
IPI00221224	Aminopeptidase N	6	144	0.22 ± 0.07	5.31	109.3	Angiogenesis, differentiation, hydrolase
IPI00643920	Transketolase (EC 2.2.1.1 TK)	1	57	0.45	7.58	67.9	Transferase
IPI00215638	ATP-dependent RNA helicase A	1	69	0.47	6.41	141.0	Helicase, hydrolase
IPI00185374	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1	46	0.48	7.68	52.8	Acts as a regulatory subunit of the 26S proteasome
IPI00029012	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10	2	43	2.31	6.39	16.6	Protein biosynthesis
IPI00295857	Coatomer subunit alpha	4	121	2.45	7.70	13.8	Hormone
IPI00007611	ATP synthase O subunit, mitochondrial precursor (OSCP)	3	81	7.40	9.81	20.9	ATP synthesis, ion transport
IPI00218919	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	7	254	2.63 ± 0.05	5.58	114.0	Hydrolase, responsible for acid production in the stomach
IPI00007188	ADP/ATP translocase 2	4	125	2.33 ± 0.33	9.76	32.8	Catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane
IPI00549805	23 ku protein Hydroxyacyl-Coen	1	52	3.22	8.28	55.2	ATP synthesis
IPI00017726	Zyme A dehydrogenase, type II isoform 1	2	49	3.31	7.87	26.8	Binds intracellular amyloid-beta
IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	3	38	4.37	7.43	20.9	Binds ATP, opioids and phosphatidylethanolamine, protease inhibitor
IPI00218914	Retinal dehydrogenase 1	9	476	6.25 ± 0.89	6.29	54.7	Binds free retinal and cellular retinol-binding protein-bound retinal, oxidoreductase
Others							
IPI00015602	Mitochondrial precursor proteins import receptor	1	67	0.46	6.75	67.5	Receptor that accelerates the import of all mitochondrial precursor proteins
IPI00018219	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 precursor	2	78	0.48 ± 0.23	7.37	72.4	Cell proliferation, binds to type I, II, and IV collagens
IPI00219077	LTA4H protein	1	62	0.50	5.80	69.2	Leukotriene biosynthesis, inflammatory response
IPI00022300	Hypothetical protein LOC25840	2	45	2.22 ± 0.06	8.72	24.8	Probable methyltransferase
IPI00177673	Ring finger protein 183	1	39	4.84	8.07	21.7	Unknown
IPI00004573	Polymeric-immunoglobulin receptor precursor	1	57	5.48	5.59	81.3	This receptor binds polymeric IgA and IgM at the basolateral surface of epithelial cells

<sup>1)</sup>Normal gastric epithelial cells labeling with  $^{18}\text{O}$ . Gastric carcinoma cells labeling with  $^{16}\text{O}$ . <sup>2)</sup>Theoretical pI. <sup>3)</sup>Theoretical molecular mass.



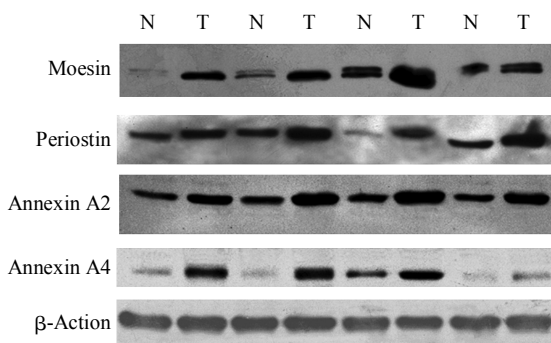


**Fig. 5 Isotopic distribution patterns of the peptide of moesin(GMLREDAVLEYLK)**  
 (a) Theoretical isotopic distribution patterns. (b) Measured isotopic distribution patterns after  $^{18}\text{O}$  labeling.

鉴定的 78 个差异蛋白中, 其中 42 个蛋白质在胃癌中高表达, 36 个蛋白质较良性黏膜组织中表达降低. 差异表达蛋白的功能按照文献报道功能分类包括蛋白质代谢酶类、生物氧化相关酶类, 细胞骨架蛋白、信号转导相关蛋白、酶解相关蛋白和一些功能未知蛋白等.

**2.5 Western blot 验证差异蛋白表达水平**

为验证  $^{18}\text{O}$  标记定量蛋白质组学研究的結果, 采用 Western blot 方法检测差异蛋白 (moesin, periostin, annexin A2, annexin A4) 在 LCM 纯化的胃腺癌细胞和配对良性胃黏膜上皮细胞表达水平. 结果显示: 与良性胃黏膜上皮细胞相比, moesin, periostin, annexin A2, annexin A4 蛋白在胃腺癌细胞中表达明显上调(图 6). Western blot 检测结果与蛋白质组学研究结果一致.



**Fig. 6 Results of Western blot analysis**  
 Validation of the differential expression of moesin, periostin, annexin A2, and annexin A4 proteins between matched microdissected noncancerous gastric mucosa tissues (N) and GA tissues (T).  $\beta$ -Actin was used as an internal control for equal protein loading.

**3 讨 论**

对病人病变组织进行研究是筛选肿瘤诊断和治疗分子靶标的最直接和最有说服力的材料. 肿瘤组织是多种细胞群体相互作用的三维空间结构, 以往的各种技术所获得的细胞, 其内既有肿瘤细胞, 又多少不等地含有一些间质细胞. 组织细胞异质性已成为肿瘤蛋白质组学研究的一大障碍<sup>[4]</sup>. 最近发展起来的激光捕获显微切割(LCM)技术, 以其简单、快速、精确度高等多功能特点, 成功地解决了从所需标本不同成分中获取纯净细胞这一问题, 甚至可从同一标本的不同阶段和不同部位获取材料, 是目前解决组织异质性的操作中较理想的方法<sup>[5]</sup>. 目前 LCM 技术在实体瘤研究中应用较多, 该方法在肿瘤中的研究主要应用于核酸分子以及染色体研究, 近年来虽逐渐应用于蛋白质组学研究领域, 但仍然受到很大的限制. 主要是由于虽然 LCM 技术是一个快速获取目的细胞的方法, 但是由于传统的 2D-PAGE 蛋白质组方法需要较大的样本量(有时上样量需达 1 mg), 并要求尽可能多地重复实验, 这样要获取足够的样本就会耗费大量的时间. 另外, 2D-PAGE 技术固有的缺陷, 如重现性不好、偏向性严重等, 只有有限的一部分差异蛋白能够被检测出来, 一些重要的分子标志物往往被遗漏了. 本研究将 LCM 技术与纳升级液相色谱结合起来, 样本需求量大大减少, 并且自动化程度高, 很好地解决了 LCM 技术和蛋白质组技术兼容的问题. 另外, LCM 技术中组织染色液的选择是一个关键, 染色的结果直接影响目的细胞的选择, 也有可能影响后续的质谱鉴定. 应用于蛋白质组学研究的 LCM

技术中常用的组织染液包括苏木素、苏木素 - 伊红、甲基绿、甲苯胺蓝等<sup>[10]</sup>, 本实验室前期的研究已证实甲基绿可以很好地与 MALDI-TOF 结合使用<sup>[16]</sup>, 我们使用甲基绿对胃癌组织切片进行染色, 可以较好地分辨组织中各个类型的细胞, 捕获后细胞的同质性可达 90% 以上. 本实验也证实了甲基绿和后续的液相质谱有很好的兼容性.

基于稳定同位素标记与质谱联用的定量蛋白质组学是目前蛋白质组学研究技术中发展较快的领域. 其原理是将来源不同, 如不同病理生理条件下的蛋白质或肽段样品经过化学性质相同但质量不同的稳定同位素分别标记, 混合后经质谱检测. 由于不同来源的同一种蛋白质具有相同的离子化能力, 因而会在质谱图中出现一对特征性的同位素峰, 借此可以通过比较其配对的同位素质谱峰的强度改变, 反映对应蛋白质在不同状态下表达量的变化<sup>[6]</sup>. 目前, 常用的稳定同位素标记包括体内代谢标记技术, 如  $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$  标记、细胞培养氨基酸稳定同位素标记 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC); 体外化学标记技术, 如 (ICAT<sup>TM</sup>), iTRAQ<sup>TM</sup> 和  $^{18}\text{O}$  标记等.  $^{18}\text{O}$  稳定同位素作为一种体外化学标记技术相对于体内代谢标记技术, 具有其自身的特点: a. 所用的主要试剂  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  相对便宜, 它标记效率高, 可以标记所有酶解的肽段, 从而使相对定量所有的蛋白质成为可能. b.  $^{18}\text{O}$  标记法不会改变肽段的物理性质, 从而不会有色谱峰的漂移等问题. c. 可以标记多种不同类型的样品, 如组织、细胞溶解物、血清、尿样等, 没有体内稳定同位素对样品类型的局限性. d. 有较高的准确性, 可以对 1.5 倍以上的蛋白质准确定量<sup>[17, 18]</sup>.

$^{18}\text{O}$  标记技术目前还在不断发展中, 如何优化实验条件, 建立稳定的、高效率的  $^{18}\text{O}$  标记方法是首要考虑的问题. 目前  $^{18}\text{O}$  标记方法有酶解过程中的标记和酶解后的标记两种. 前者的蛋白酶解和标记过程是在同一个反应体系同时进行的, 而后者则在蛋白酶切之后在肽段水平再进行标记, 过程分为两步进行. 酶解后标记的方法使实验设计更加灵活, 可以分别优化酶解和标记反应的条件, 同时可以节省  $^{18}\text{O}$  水的用量, 因此在复杂样本的标记中得到广泛应用<sup>[12, 19]</sup>. 酶切后标记过程中缓冲体系的 pH 值可以影响  $^{18}\text{O}$  标记的效率.  $^{18}\text{O}$  标记过程中胰酶介导的交换反应最佳的缓冲体系 pH 应该兼顾胰酶的活性 (pH7~9) 及酶 - 底物的反应条件 (酸性环境). 本实验经过多次反复验证, 认为醋酸铵 (pH6.8)

作为标记的缓冲体系, 可最大限度地避免了碱性环境下胰酶的脱酰胺作用, 以及过酸环境中的天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸的侧链氨基发生氧标记反应的非特异反应. 相继有报道证实使用固相化胰酶 (Immobilized trypsin) 做为标记反应的酶, 也可以提高标记的效率<sup>[20, 21]</sup>. 这是由于 Immobilized trypsin 在标记完成后可以去除, 这就避免了样本混合后水中的氧原子与肽段 C 端的两个氧原子中的羟基继续发生交换反应. 国内 Liu 等<sup>[22]</sup>采用二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 修饰的  $^{18}\text{O}$  双标法, 认为可以最大限度地避免后交换反应. 另外, 有报道认为, 为了提高定量的准确性, 反标的方法是非常必要的<sup>[23]</sup>. 标记反应的时间也是必须考虑的问题, 一般 18~30 h 氧交换反应可以达到最大标记率. 本实验采用胶内酶解后的多肽混合物, 使用 Immobilized trypsin 在醋酸铵 (pH6.8) 缓冲液中进行标记, 37°C 标记 24 h. 标记结束后使用甲酸终止反应, 高速离心去除 Immobilized trypsin 后, 标记肽段十分稳定. 整个标记过程简单, 标准蛋白标记效率达 96.6%.

通过  $^{18}\text{O}$  标记结合液相色谱鉴定技术, 我们共鉴定和定量了胃腺癌组织与良性胃黏膜组织差异表达 2 倍以上的蛋白质 78 个. Western blot 技术验证了其中几个差异蛋白 (moesin, periostin, annexin A2, annexin A4) 的表达, 与蛋白质组学的结果一致. 一些在其他胃癌蛋白质组研究中发现的差异蛋白如热休克蛋白 70 (HSP70)、细胞骨架蛋白 8、16 (CK8、CK16)、转化生长因子 (TGF $\beta$ 1、14-3-3 zeta/delta、肌酸激酶  $\beta$  (creatine kinase B-type)、弹性蛋白 (vimentin) 等认为与胃癌的发生发展或在调节胃癌细胞的侵袭和转移过程中可能发挥重要作用<sup>[3, 24]</sup>. 本研究也发现这些蛋白质表达差异, 这说明  $^{18}\text{O}$  标记定量技术在识别差异蛋白方面的有效性. 近年来, 越来越多的研究发现, 膜联蛋白家族在肿瘤的发生、发展过程中可能发挥重要作用, 如介导凋亡、分化等. Duncan 等<sup>[25]</sup>利用蛋白质组学的方法研究证实膜联蛋白家族 (annexin A1、A2、A4) 与结肠癌的分期、转移等密切相关, 但在胃癌中的研究较少, 本实验同样发现这些蛋白质在胃癌中的表达变化, 但其在胃癌中的作用机制值得进一步研究. 本研究首次发现不均一核糖核蛋白体 H1 (hnRNP H1)、二硫键异构酶 A6 (PDI A6)、膜刺突蛋白 (moesin) 等在胃癌组织中高表达, 这些蛋白质能否作为胃腺癌的标志物, 需要进一步实验和临床验证. 在发现的差异蛋白中, 一些是胃特异表达的蛋白质如

78 ku 胃泌素结合蛋白(78 ku gastrin-binding protein)、胃黏液素(gastric mucin)、胃脂肪酶(gastric lipase)等, 这些蛋白质的发现一方面证实了 LCM 捕获技术准确性, 另一方面为寻找胃癌特异的分子标志物提供了线索. 本研究还发现一些功能未知的差异表达蛋白, 提示它们可能与胃癌的发生、发展有关. 当然要确认上述蛋白质是否为胃癌相关的蛋白质, 还需深入研究这些差异蛋白的结构和功能及其在胃癌发生发展中所起的作用.

$^{18}\text{O}$  稳定同位素标记的定量蛋白质组学技术应用于临床样本的研究目前尚不多, 一部分原因是由于组织样本的复杂性. Li 等采用 LCM 技术各捕获乳腺导管上皮细胞和有转移的乳腺导管癌细胞, 结合液相色谱离子阱共鉴定 76 个蛋白质, 其中 24 个为差异表达蛋白<sup>[12]</sup>. Hood 等<sup>[26]</sup>用 LCM 从福尔马林固定的前列腺癌和前列腺增生石蜡组织切片获得纯化的细胞, 然后采用  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  分别标记, 傅立叶变换质谱鉴定差异蛋白, 发现 cytokine-1 蛋白在前列腺癌中显著高表达. 我们在实验中也采用了 1D SDS-PAGE 预分离细胞总蛋白, 以降低组织样本的复杂性. 相信随着质谱技术的发展, 该技术能更多地应用于临床样本的研究中, 发现更多更有意义的差异蛋白.

我们在实验中也发现  $^{18}\text{O}$  标记技术存在着一些主要的缺陷: a. 基于酶催化的标记反应是可逆性的, 很难保证肽段 100% 的标记上两个  $^{18}\text{O}$  原子. b. 目前缺乏广泛适用的计算软件, 用于计算标记效率<sup>[8]</sup>. 随着该技术的发展, 这些缺陷有望得到很好的解决. 本实验采用  $^{18}\text{O}$  标记和 nano-HPLC-MS/MS 结合的定量蛋白质组学方法, 对经 LCM 捕获的胃腺癌细胞与胃黏膜良性上皮细胞的差异蛋白进行了分析研究, 并对  $^{18}\text{O}$  标记方法进行了优化. 结果表明, 这种实验方案可作为传统 2D-PAGE 技术的有效补充甚至是替代方案, 并为 LCM 结合  $^{18}\text{O}$  标记定量技术进一步应用于胃癌等实体瘤生物样本的差异蛋白质组学研究提供了参考.

### 参 考 文 献

- Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(1): 17~20
- Peddanna N, Holt S, Verma R S. Genetics of gastric cancer. *Anticancer Research*, 1995, **15**(5B): 2055~2064
- He Q Y, Cheung Y H, Leung S Y, *et al.* Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics*, 2004, **4** (10): 3276~3287
- Ebert M P, Kruger S, Fogeron M L, *et al.* Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics*, 2005, **5**(6): 1693~1704
- Melle C, Ernst G, Schimmel B, *et al.* Characterization of pepsinogen C as a potential biomarker for gastric cancer using a histo-proteomic approach. *J Proteome Res*, 2005, **4**(5): 1799~1804
- Chaerkady R, Pandey A. Quantitative proteomics for identification of cancer biomarkers. *Proteomics Clinical Applications*, 2007, **1**(9): 1080~1089
- 刘 新, 应万涛, 钱小红, 等. 比较蛋白质组学研究中的稳定同位素标记技术. *化学通报*, 2007, **35**(2): 84~88  
Liu X, Ying W T, Qian X H, *et al.* *Chemistry*, 2007, **35**(2): 84~88
- Miyagi M, Rao K C. Proteolytic  $^{18}\text{O}$ -labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 2007, **26** (1): 121~136
- Johnson K L, Muddiman D C. A method for calculating  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  peptide ion ratios for the relative quantification of proteomes. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, **15**(4): 437~445
- Craven R A, Totty N, Harnden P, *et al.* Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis-Evaluation of tissue preparation and sample limitations. *American J Pathology*, 2002, **160**(3): 815~822
- Gutstein H B, Morris J S. Laser capture sampling and analytical issues in proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2007, **4**(5): 627~637
- Zang L, Toy D P, Hancock W S, *et al.* Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotopic labeling. *J Proteome Research*, 2004, **3** (3): 604~612
- Qian W J, Monroe M E, Liu T, *et al.* Quantitative proteome analysis of human plasma following *in vivo* lipopolysaccharide administration using  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  labeling and the accurate mass and time tag approach. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(5): 700~709
- Emmert-Buck M R, Bonner R F, Smith P D, *et al.* Laser capture microdissection. *Science*, 1996, **274**(5289): 998~1001
- Murray G I. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem*, 2007, **109**(3): 171~176
- 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
- 谭 颖, 王玉霞, 李 晶, 等.  $^{18}\text{O}$  标记法在定量蛋白质组学中的应用. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**(6): 783~786  
Tan Y, Wang Y X, Li J, *et al.* *Chin J Cell Biol*, 2006, **28**(6): 783~786
- Stewart II, Thomson T, Figeys D.  $^{18}\text{O}$  labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, **15**(24): 2456~2465
- Lassman M E, Rahbar A, Medintz I L, *et al.* Incorporation of ( $^{18}\text{O}$ ) oxygen into peptide mixtures and analysis with multi-dimensional chromatography and mass-spectroscopy. *Analytical Letters*, 2007, **40**(10): 1864~1878
- Brown K J, Fenselau C. Investigation of doxorubicin resistance in MCF-7 breast cancer cells using shot-gun comparative proteomics

- with proteolytic  $^{18}\text{O}$  labeling. *J Proteome Res*, 2004, **3**(3): 455~462
- 21 Hood B L, Darfler M M, Guiel T G, *et al.* Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, **4**(11): 1741~1753
- 22 Liu H, Zhang Y, Meng L, *et al.* Non-gel-based dual  $^{18}\text{O}$  labeling quantitative proteomics strategy. *Anal Chem*, 2007, **79**(20): 7700~7707
- 23 Lane C S, Wang Y, Betts R, *et al.* Comparative cytochrome P450 proteomics in the livers of immunodeficient mice using  $^{18}\text{O}$  stable isotope labeling. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(6): 953~962
- 24 Chen C D, Wang C S, Huang Y H, *et al.* Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics*, 2007, **7**(1): 155~167
- 25 Duncan R, Carpenter B, Main L C, *et al.* Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2008, **98**(2): 426~433
- 26 Hood B L, Darfler M M, Guiel T G, *et al.* Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(11): 1741~1753

## Quantitative Proteome Analysis of Clinical Gastric Adenocarcinoma Using $^{18}\text{O}$ Stable Isotope Labeling and LCM\*

ZHANG Zhi-Qiang<sup>1,3)\*\*</sup>, LI Mao-Yu<sup>2)\*\*</sup>, ZHANG Gui-Ying<sup>1)\*\*\*</sup>, PENG Fang<sup>3)</sup>, YAO Hui-Xin<sup>4)</sup>,  
LI Mei-Xiang<sup>4)</sup>, XIAO Zhi-Qiang<sup>3)</sup>, CHEN Zhu-Chu<sup>3,4)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China;

<sup>2)</sup> Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

<sup>3)</sup> Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China;

<sup>4)</sup> Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract** A high accuracy method for quantitative expression proteomics was developed for the identification of putative markers in gastric adenocarcinoma. Firstly, gastric adenocarcinoma and nonmalignant epithelial cells were obtained through laser capture microdissection (LCM), which were proteolysis and then prefractionated by 1D SDS-PAGE. The post-digestion  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  labeling method followed by Nano-HPLC-MS/MS were conducted to identify the differentially expressed proteins between gastric adenocarcinoma and nonmalignant gastric mucosa. A total of 78 differential proteins were identified, among these proteins, 42 proteins are over-expressed in gastric adenocarcinoma tissues and 36 proteins are down-expressed. Some of these differentially expressed proteins (moesin, periostin, annexin A2, annexin A4) were further confirmed by Western blot analysis. The quantitative proteomic protocol of  $^{18}\text{O}$  stable isotope labeling coupled with LCM was an effectively alternate technique for complicated proteins such as gastric cancer.

**Key words** gastric cancer, laser capture microdissection, quantitative proteomics,  $^{18}\text{O}$ -labeling

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00400

---

\*This work was supported by grants from The Ph.D. Programs Foundation of Central South University (05075204) and Key Research Program from The Science and Technology Committee of Hunan Province, China(04sk1006-2).

\*\* ZHANG Zhi-Qiang and LI Mao-Yu contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-731-4327282, Fax: 86-731-4327332, E-mail: guiyingzhang@hotmail.com

Received: June 3, 2008 Accepted: October 13, 2008