

人原发性肺腺癌转移相关分子的 定量蛋白质组学研究*

刘迎福^{1,2)} 肖志强¹⁾ 张鹏飞¹⁾ 李茂玉¹⁾ 李 萃¹⁾
彭 芳¹⁾ 余艳辉²⁾ 易 红¹⁾ 陈主初^{1,2)**}

(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 癌细胞转移是人原发性肺腺癌(lung adenocarcinoma, AdC)死亡率高和预后差的主要原因。为了筛选潜在的肺腺癌转移相关分子标志物, 依据临床诊断选取无转移的肺腺癌组织和有转移的肺腺癌组织作为研究对象, 首先采用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)对两组肺腺癌组织中的癌细胞进行纯化, 再利用荧光差异凝胶电泳技术(two-dimensional differential in-gel electrophoresis, 2D-DIGE)分离无转移肺腺癌组和有转移肺腺癌组的癌细胞总蛋白, 通过Decyder软件分析两组差异表达的蛋白质点, 质谱(mass spectrometry, MS)对差异表达的蛋白质点进行鉴定, Western blot验证部分差异蛋白annexin A1, annexin A2, annexin A3, B23和S100A9的表达。建立了LCM纯化的无转移和有转移的肺腺癌组织癌细胞的2D-DIGE图谱, 质谱鉴定了20个非冗余差异蛋白质, 其中12个蛋白质在有转移肺腺癌组中较无转移肺腺癌组表达上调, 8个蛋白质在有转移肺腺癌组中表达下调。Western blot验证分析显示, 差异蛋白annexin A1, annexin A2, annexin A3和S100A9的表达水平在有转移肺腺癌中较无转移肺腺癌增高, B23的表达水平在有转移肺腺癌中较无转移肺腺癌降低。免疫组化进一步证实S100A9在有转移的肺腺癌中较无转移的肺腺癌中表达上调。首次应用LCM技术联合2D-DIGE及MS技术分析鉴定出肺腺癌转移相关蛋白质, 为研究肺腺癌的转移分子机制、筛选预测肺腺癌转移的分子标志物奠定了基础。

关键词 肺腺癌, 转移, 蛋白质组, 激光捕获显微切割技术, 荧光差异凝胶电泳技术

学科分类号 R734.2, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00586

肺癌是发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类的健康。肺腺癌是肺癌常见的组织学类型之一。近几年, 肺腺癌的发病率有明显上升趋势, 并且其生存率非常低, 预后很差^[1]。肺腺癌发病比较隐匿, 转移早, 病人常常以转移病灶为首发症状。肺腺癌的转移是造成生存率低预后差的主要原因。因此, 提高肺腺癌转移的诊断和治疗是降低其死亡率的主要手段。

肿瘤转移是一极其复杂的过程, 涉及癌细胞的增殖和迁移, 基质膜的降解, 癌细胞的侵袭和黏附, 以及肿瘤血管形成^[2]。众多的转移相关分子参与肿瘤转移过程, 并在转移过程中起着极其关键的调控作用。现有研究报道, cathepsin B^[3], caveolin-1^[4], CRMP-1^[5], CTGF^[6]和 contactin-1^[7]等许多基因在促进或抑制肺腺癌细胞系的侵袭和转移过程中发挥着极其重要的作用。还有许多学者用基

因芯片技术分析肺腺癌的分化和预后, 检测出了一些肺腺癌分化和预后的相关基因^[8~10]。然而, 在生命活动中, 真正执行生物学功能的是蛋白质, 且基因表达的mRNA和蛋白质存在着不一致性。因此, 探讨病理过程中蛋白质分子的改变更为直接可行, 意义重大。随着蛋白质组学时代的到来, 蛋白质组学技术在肿瘤的研究领域得到了广泛的应用。应用蛋白质组学技术可以从整体的角度来分析肿瘤转移过程中的蛋白质分子改变, 可以筛选出一些能用于预测肿瘤转移的分子标志物, 并且对阐明肿瘤

* 国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB5120), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教计函[2002]48)和湖南省科技厅重大科技专项(04XK1001, 05SK1004-1)。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2008-08-22, 接受日期: 2008-10-13

转移的分子机制提供理论基础。很多研究者利用蛋白质组学技术分析了肝癌, 胃癌, 胰腺癌, 前列腺癌等许多恶性肿瘤的侵袭转移过程中的分子改变, 得到了一些具有重要意义的信息, 为揭示这些恶性肿瘤的侵袭转移的分子机制提供了有利的线索。蛋白质组学技术分析肺癌转移也有些报道, 如 Jiang 等^[10]用蛋白质组学技术在不同转移潜能的大细胞肺癌细胞系 PLA801C 和 PLA801D 中鉴定出一些转移相关分子。Tian 等^[11]用二维凝胶电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)分析肺腺癌低转移细胞系 CL1-0 和高转移细胞系 CL1-5 的差异表达蛋白。然而, 迄今为止, 真正有价值的且能在临床上预测肺腺癌病人是否发生转移的标志物尚未鉴定, 且其转移分子机制尚未完全阐明。

双向凝胶电泳技术(2-DE)联合质谱是蛋白质组学的经典技术, 在 2-DE 的基础上, 将不同样品在电泳前标记 Cy2, Cy3 和 Cy5 三种荧光染料, 然后将标记后的三种样品混合, 同时在一块胶上进行电泳, 即为双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)。该方法可以在同一块胶上同时分离多个由不同荧光标记的样品, 并以荧光标记的样品混合物为内标, 对每个蛋白质点和每个差异都可以进行统计学可信度分析, 从而具有良好的重复性和较高的准确率。此外, 荧光染料的使用, 使得双向荧光差异凝胶电泳具有高灵敏度的特性, 能够满足高通量差异蛋白质组学研究分析的要求。目前, 2D-DIGE 技术在肿瘤蛋白质组研究领域得到了广泛的应用^[12]。运用该技术分析了结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌等许多恶性肿瘤蛋白质分子的改变, 为这些肿瘤的发病及演变进程分子机制的阐明提供了理论依据。差异蛋白质组研究中, 样品的选取尤其重要。组织是多种细胞群体相互作用的三维空间结构, 其内既有肿瘤细胞, 又多少不等地含有一些其他细胞, 存在组织异质性问题。体外培养的细胞系虽能解决组织异质性问题, 但其培养环境与组织内环境存在差异, 难以真实反映在体内复杂环境下生长的肿瘤细胞具有的各种特性。组织细胞异质性已成为肿瘤蛋白质组学研究的一大障碍。激光捕获显微切割技术(LCM), 是在显微镜下从组织切片中高选择性地分离、纯化单一类型细胞群或单个细胞的新技术, 可有效地克服组织中细胞异质性造成的偏差, 成功地解决了组织异质性问题。

为了能全面地阐明肺腺癌转移过程中蛋白质分子的改变, 或能找到肺腺癌转移相关的分子标志

物, 或者有望得到一些能控制肺腺癌转移过程的分子靶标, 我们首先采用激光捕获显微切割技术(LCM)对无转移原发肺腺癌组织和有转移原发肺腺癌组织中的癌细胞进行纯化, 再利用 2D-DIGE 技术分离这两组癌细胞总蛋白, 用 Typhoon 扫描仪对三种不同激发波长的荧光进行扫描, Decyder 软件分析其蛋白质点的表达丰度差异。本研究结果共得到 33 个差异蛋白质点($|$ 比率 $| \geq 1.5$, $P \leq 0.05$), 质谱分析得到 20 个非冗余的差异蛋白质。Western blot 方法进一步验证分析显示, annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 在有转移的肺腺癌中较无转移的肺腺癌表达明显上调, 而 B23 在有转移的肺腺癌中较无转移的肺腺癌表达明显下调。免疫组化技术进一步证实 S100A9 表达水平在有转移的肺腺癌中较无转移的肺腺癌增高。这些差异蛋白为研究肺腺癌的转移分子机制、筛选预测肺腺癌转移的分子标志物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织。9 例无转移的肺腺癌新鲜标本和 12 例有转移的肺腺癌新鲜标本为湘雅医院胸外科和肿瘤医院胸外科 2004~2006 年手术切除标本, 用于 2D-DIGE 和 Western blot 实验, 标本离体后, 用生理盐水冲洗几遍, 速冻存于液氮中, 再置于 -70°C 保存。所有标本均经病理学诊断确诊。石蜡包埋组织标本包括 30 例无转移肺腺癌、33 例有转移的原发性肺腺癌及 33 例配对淋巴结转移性癌组织, 所有标本取自湘雅医院病理科, 用于免疫组织化学分析。

1.1.2 试剂。Cy2, Cy3 和 Cy5 为 GE Healthcare 公司产品。2D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒、尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH4-7NL, 24cm)、IPG 缓冲液(pH4-7NL)、两性电解质(pharmalyte, pH4~7)、覆盖液、溴酚蓝均为 Amersham Biosciences 产品; 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, PMF 为 Sigma-Aldrich 公司产品; 磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠(EDTA-Na_2)均为国产分析纯。OCT 组织包埋剂、带 PEN 膜的载片、LCM 专用 Eppendorf 管, 德国 Leica 公司产品; 甲基绿粉末、组织蛋白酶抑制剂, 碳酸氢铵(NH_4HCO_3), 三氟乙酸(TFA), 乙腈和基质 α - 氰基 -4- 羟基肉桂

酸(CHCA)均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 胰蛋白酶(Trypsin Gold)为美国 Promega 公司产品. PVDF 膜为瑞典 Amersham 公司产品; 兔抗人 annexin A1 和兔抗人 annexin A3 抗体为 Abcam 公司产品; 鼠抗人 annexin A2, 鼠抗人 S100A9 和鼠抗人 B23 抗体以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔和羊抗鼠二抗均为美国 Santa cruz 公司产品. 蛋白质小分子质量标准, ECL(Enhanced chemiluminescence)试剂盒为瑞典 Amersham 公司产品; 免疫组化试剂盒为福建迈新公司产品.

1.1.3 主要仪器. 冰冻切片机、激光捕获显微切割仪(Leica AS)为 Leica 公司产品; IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳系统、Typhoon 扫描仪、Labscan 扫描软件为 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; DeCyder 凝胶图像分析软件为 Amersham Biosciences 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 激光捕获显微切割技术. 肺腺癌新鲜组织标本从 -70°C 冰箱取出后, 迅速移入 -25°C 的冰冻切片机, 用 OCT 对组织进行包埋, 切片厚度为 $8\text{ }\mu\text{m}$, 贴于载玻片上的 PEF 膜上, 75%乙醇固定 1 min, 0.5%甲基绿染色 30 s, 双蒸水漂洗 2 次, 室温干燥. 然后在病理专家的指导下, 于合适的放大倍率选择肺腺癌细胞进行激光捕获, 收集管收集切割下来的癌细胞, 置于 -70°C 冰箱冻存, 累积足够数量用于总蛋白的抽提.

1.2.2 组织总蛋白的抽提及蛋白质浓度测定. 激光捕获显微切割纯化的每例肺腺癌细胞加入适量的组织裂解液(30 mmol/L Tris, 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, pH8.5), 充分混匀, 冰上放置 1 h, 再用超声仪间隔超声以致蛋白质充分降解, 12 000 r/min, 4°C 离心 30 min, 吸取上清入 EP 管, 用 50 mmol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 8.5. 取 $5\text{ }\mu\text{l}$ 用于蛋白质浓度测定, 其余上清置于 -70°C 保存备用. 采用 2D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒测定总蛋白浓度, 其操作步骤严格按照试剂盒说明书进行, 绘制标准曲线, 计算直线回归方程. 9 例无转移的肺腺癌组织中每 3 例进行蛋白质等量混合, 共分成 3 份混合样品为无转移肺腺癌组; 12 例有转移的肺腺癌组织中每 4 例进行等量混合, 也共分成 3 份混

合样品为有转移肺腺癌组, 均作为各组的 3 次生物学重复, 从而本实验共产生 3 块 2D-DIGE 分析胶.

1.2.3 蛋白质荧光染料标记. 每组蛋白质均取 $25\text{ }\mu\text{g}$ 等量混合作为内标, $50\text{ }\mu\text{g}$ 内标蛋白用 400 pmol Cy2 进行标记, 无转移肺腺癌组和有转移肺腺癌组交叉以 $50\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白每 400 pmol Cy3 和 400 pmol Cy5 标记, 冰上避光放置 30 min, 再加 $1\text{ }\mu\text{l}$ 亮氨酸(10 mmol/L)中止反应 10 min.

1.2.4 2D-DIGE 分析胶电泳和图像扫描. $50\text{ }\mu\text{g}$ Cy2, Cy3 和 Cy5 标记的样品进行混合, 加等体积的 $2\times$ 样品缓冲液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 2% Bio-lyte pH 4~7, 130 mmol/L DTT), 再加适量水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 1% Bio-lyte pH 4~7, 13 mmol/L DTT)补至总体积 $450\text{ }\mu\text{l}$, 上样, 30 V 水化 13 h, 然后经过 100 V 0.5 h 、500 V 0.5 h 、1 000 V 1 h 、5 000 V 1 h , 最后稳定在 8 000 V 下进行等电聚焦 8.5 h. 一向电泳完后, 取出 IPG 胶条先后置入平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 1% SDS, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 1% SDS, 3%碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)中各平衡 15 min. 平衡后的胶条移至浓度 12.5% PAGE 分离胶上端用 0.5%琼脂糖封胶, 2.5W 电泳 30 min, 然后以 11W 恒功率电泳, 直至溴酚蓝指示线到达凝胶底边处停止电泳. 整个过程均避光操作. 双向电泳完后, 胶条取出擦洗干净, 轻置 Typhoon 扫描仪, 以 Cy2 (488 nm 激发激光和 520BP40 发射过滤器), Cy3 (532 nm 激发激光和 580BP30 发射过滤器)和 Cy5 (633 nm 激发激光和 670BP30 发射过滤器)设置进行扫描获得分析使用的凝胶图像, 3 块 2D-DIGE 分析胶经扫描后共产生 9 张分析图像. 另外, 还制作了一块制备胶, 步骤同 2D-DIGE, 其上样为 1 000 μg 内标蛋白, 电泳后考马斯亮蓝进行染色, 用于差异蛋白的质谱鉴定.

1.2.5 图像采集分析和质谱分析. 2D-DIGE 分析胶图像用 DeCyder 5.0 软件进行分析, 首先对每一张胶图上的所有蛋白质点扫描进行胶内分析(differential in-gel analysis, DIA), 对不同胶的同一个蛋白质点与内标匹配, 每个点的容积(背景删减后)、面积、峰值均被检测, 计算每组(Cy3/Cy2, Cy5/Cy2)成像的标准丰度比值. 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), 对匹配后每个

蛋白质点的相对量进行比较分析后确定差异蛋白, 无转移肺腺癌组和有转移肺腺癌组采用 t 检验统计学分析, 筛选出 9 张分析图像均出现并 | 比率 | ≥ 1.5 , $P \leq 0.05$ 的差异点. 在制备胶上找到与分析胶上的差异点匹配的质点, 取点, 脱色, 酶解及样品萃取, 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 或电喷雾串联质谱 (ESI-TOF-MS) 技术进行检测, 获取 PMF 肽指纹图谱及 PKL 文件, 在 NCBI 蛋白质数据库中进行蛋白质匹配.

1.2.6 Western blot. 显微切割纯化后, 每个肺腺癌组织各取 20 μg 蛋白质加等体积的上样缓冲液 (135 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 20%甘油, 0.02%溴酚蓝, 6% SDS, 10% β - 巯基乙醇) 热变性后再在 10% 胶上行 SDS-PAGE, 电泳后将蛋白质转移至 PVDF 膜. 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 兔抗人 annexin A1 和 annexin A3 一抗以及鼠抗人 annexin A2, S100A9 和 B23 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST (20 mmol/L Tris-Cl, 140 mmol/L NaCl, pH 7.6, 含 0.1% Tween-20) 漂洗, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔和羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗, ECL 发光, X 片曝光, 显影, 定影. β -actin 选作内参, ImageQuant 软件分析蛋白质条带的灰度值, 计算蛋白质表达的相对强度.

1.2.7 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进行. 简要步骤如下: a. 石蜡切片常规脱蜡和水化; b. 0.1 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 98 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 进行微波抗原修复; 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 (1:300 稀释的鼠抗人 S100A9) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照; f. 二抗 (试剂 C) 室温孵育 10 min; g. 链霉菌抗生物素 - 过氧化物酶溶液 (试剂 D) 室温孵育 10 min; h. DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封固.

1.2.8 免疫组织化学染色评分. 随机选取至少 10 个高倍镜视野 ($\times 200$), 至少计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果^[14]. 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; $< 30\%$ 为 1 分; $30\% \sim 60\%$ 为 2 分; $\geq 60\%$ 为 3 分. 两者相加 0~2 分为弱阳性; 3~4 分为中等阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.9 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, 两两比较用 Mann whitney U test, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义.

2 结 果

2.1 2D-DIGE 分离 LCM 纯化的肺腺癌组织癌细胞总蛋白

利用 LCM 技术对无转移肺腺癌 (non-LNM AdC) 组和有转移肺腺癌 (LNM AdC) 组的癌细胞进行纯化, 以去除癌组织中间质的干扰 (图 1), 再采用 2D-DIGE 技术对无转移肺腺癌组和转移肺腺癌组的癌细胞总蛋白进行分离, 共得 3 块 DIGE 胶. 分别对每块 DIGE 胶用不同波长激光对 Cy2 (488 nm)、Cy3 (532 nm)、Cy5 (633 nm) 进行扫描 (图 2a, 2b, 2c), 3 块胶被 Typhoon 扫描仪扫描后共得到 9 张分析胶图像. 2D-DIGE 分析胶图像用 DeCyder 5.0 软件进行分析, Decyder 软件的 DIA 模块检测同一块胶中 3 张图像, 对此 3 张图像进行共找点, 检测到每张胶平均有 2 035 个蛋白质点, 每个点的容积 (背景删减后)、面积、峰值均被检测, 然后计算每组 (Cy3/Cy2, Cy5/Cy2) 成像的标准丰度比值. Decyder 软件的 BVA 模块在凝胶之间进行匹配, 并检测所有凝胶上样品之间差异的一致性, 应用 t 检验分析计算每个差异的可信度水平. 分析发现, 3 块分析胶中共有 1 650 个蛋白质点被匹配上. 与内标匹配分析后, 得到有转移肺腺癌组与无转移肺腺癌组 | 比率 | ≥ 1.5 , $P \leq 0.05$, 并在 9 张分析胶图像中均出现的差异表达蛋白质点共 33 个 (图 2d). 其中在转移肺腺癌组有 21 个点上调, 12 个点下调. 2D-DIGE 胶与制备胶进行匹配, 在制备胶上切取这 33 个差异蛋白质点, 进行质谱鉴定. 图 3 为 Decyder 软件分析蛋白质点 8 号、20 号、27 号、30 号在无转移肺腺癌组和有转移的肺腺癌组中差异表达的曲线图和三维图.

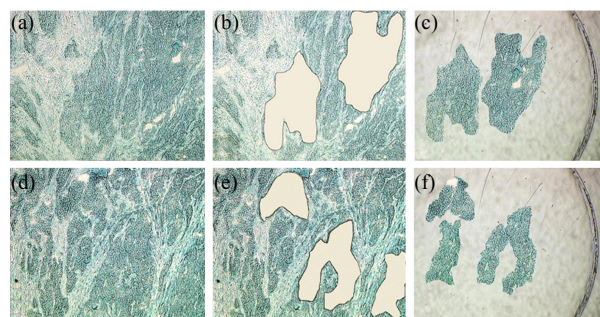


Fig. 1 LCM of lung AdC tissues

Lung non-LNM AdC tissue before (a) and after (b) LCM, and captured cancer cells (c); LNM AdC before (d) and after (e) LCM, and captured cancer cells (f).

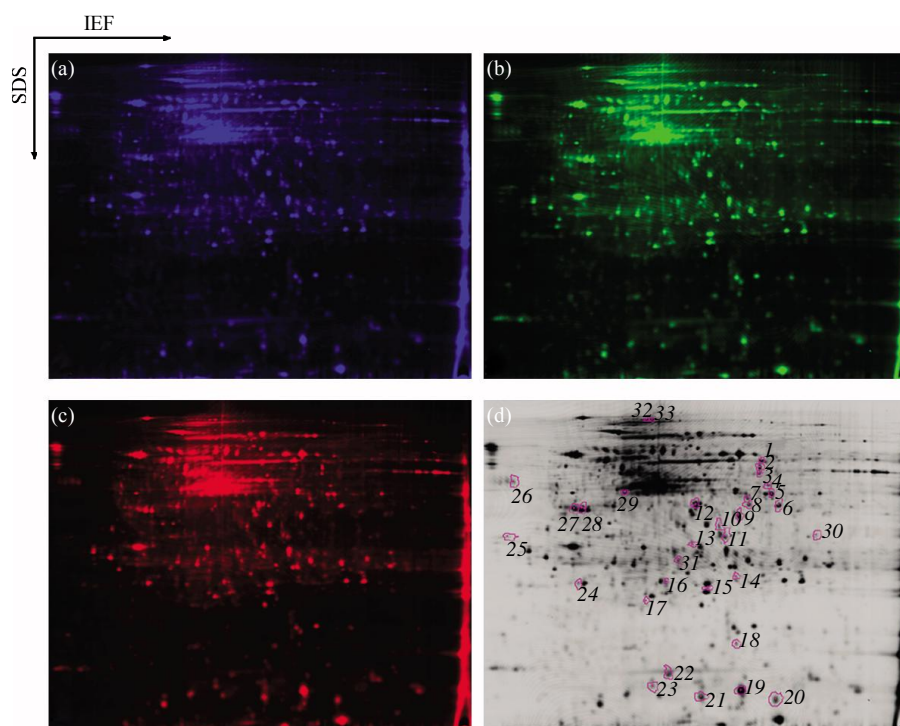


Fig. 2 Representative 2D-DIGE gel images of microdissected non-LNM AdC and LNM AdC tissues

The protein lysates are labeled with Cy2 (blue, internal control) (a), Cy3 (green, non-LNM AdC) (b) and Cy5 (red, LNM AdC) (c) and subjected to 2D-DIGE using immobilized Dry IPG strips (pH 4~7). (d) The differentially expressed protein spots are detected by Decyder software.

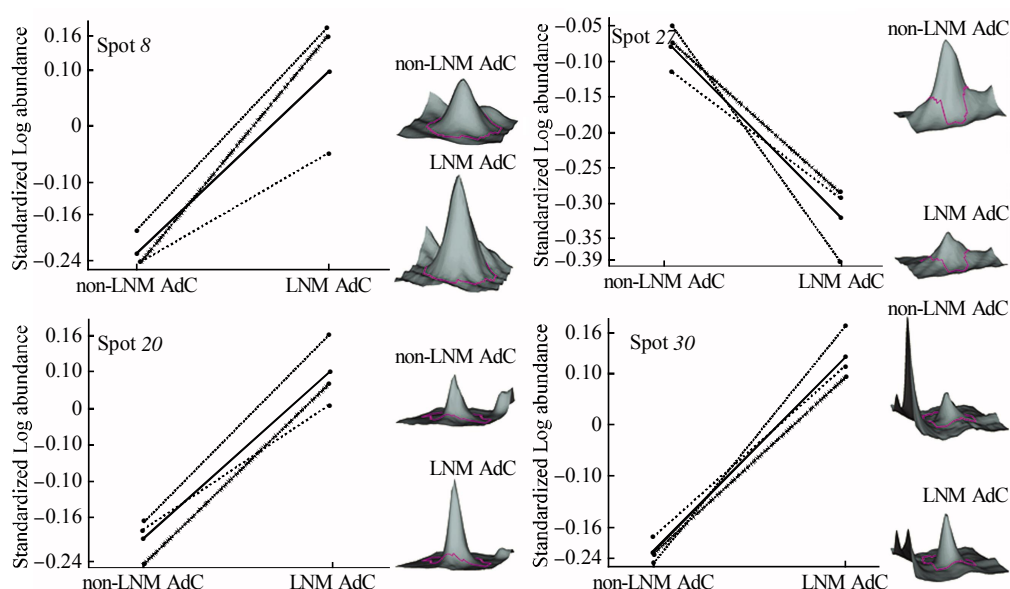


Fig. 3 The graph views and 3D views of protein spot 8, 20, 27, 30

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

采用 MALDI-TOF-MS 或 ESI-Q-TOF 分析经胶内酶解后的差异蛋白质点, 获取肽质量指纹图谱 (PMF) 或肽序列标签, 查询 NCBI 数据库。图 4a 是 20 号蛋白胰酶消化后经 MALDI-TOF-MS 分析的 PMF 图谱, 图 4b 为 S100 calcium-binding

protein A9 (S100A9) 蛋白质数据库搜索结果, 匹配的肽段覆盖率达 83%。MALDI-TOF-MS 未鉴定出的蛋白质点再经 ESI-Q-TOF 分析, 最终共鉴定出 20 个非冗余差异蛋白。鉴定出来的差异蛋白的名称、等电点、分子量、变化的倍数以及 *t* 检验的 *P* 值见表 1。与无转移肺腺癌组相比, 在有转移肺

腺癌组表达上调的 8 号、9 号、20 号、30 号点经肽质量指纹图谱检索 NCBI 数据库分析，鉴定出蛋白质分别为 annexin A3，annexin A1，S100A9，annexin A2；表达下调的 27 号差异蛋白质点被鉴定为 B23。

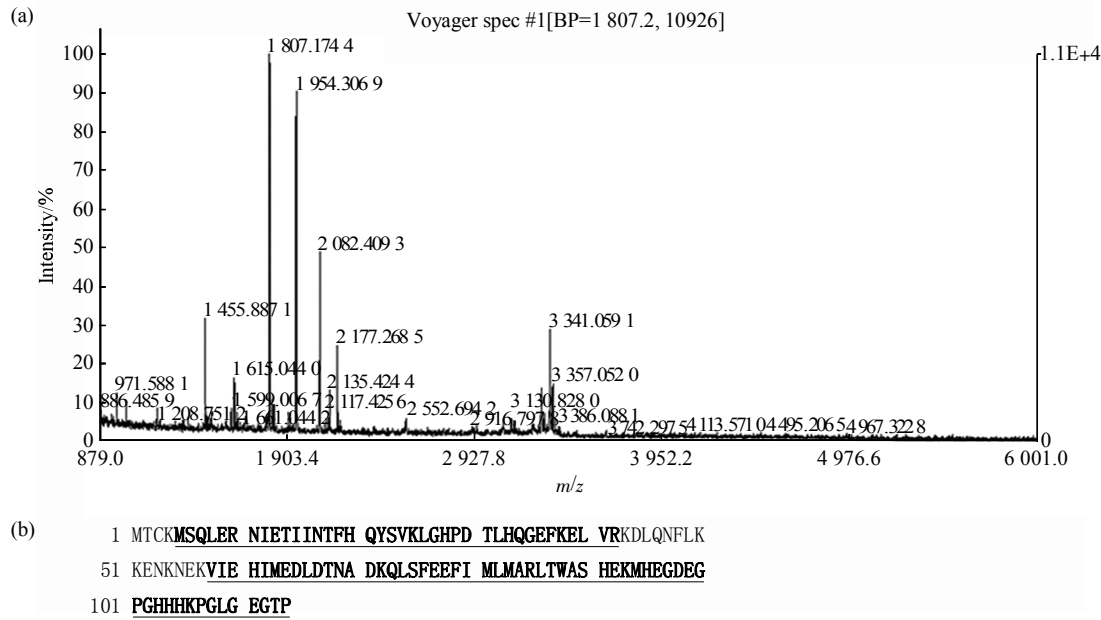


Fig. 4 MALDI-TOF-MS analysis of differential protein spot 20

(a) MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 20 identified as S100A9 according to the matched peaks is shown. (b) Protein sequence of S100A9 is shown, and matched peptides are underlined.

Table 1 The differential proteins between non-LNM AdC and LNM AdC identified by MS

Spot No.	Protein AC	Protein name	Mass	pI	MASCOT score	Sequence coverage	Av. Ratio*	t-test
1	gi 178390	Aldehyde dehydrogenase	58 658	7.00	95	18%	-1.91	0.032
2	gi 67464392	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	60 277	8.22	182	30%	2.16	0.013
5	gi 63252913	Gelsolin-like capping protein	38 760	5.82	110	39%	-1.70	0.013
6	gi 4505763	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK 1)	44 985	8.30	117	37%	1.88	0.001
7	gi 4503571	Alpha-enolase	47 481	7.01	136	38%	1.79	0.005 5
8	gi 4826643	Annexin A3	36 524	5.63	110	47%	1.91	0.001 3
9	gi 4502101	Annexin A1	38 918	6.57	135	44%	1.99	0.002 9
10	gi 5031777	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD ⁺) alpha	40 022	6.47	75	16%	1.53	0.000 28
11	gi 23308751	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	35 705	8.38	82	24%	1.55	0.025
12	gi 15277503	ACTG1 protein	40 536	5.55	99	44%	1.73	0.011
14	gi 1617118	Peroxiredoxin 2	22 049	5.66	182	30%	-1.51	0.008 2
16	gi 2204207	Glutathione S-transferase	23 595	5.43	68	25%	1.65	0.005
20	gi 4506773	Protein S100-A9	13 292	5.71	123	83%	2.86	0.029
24	gi 1147783	Myosin-Ixb	230 022	9.35	84	6%	-1.58	0.01
25	gi 119395750	Keratin 1	66 170	8.15	86	23%	-1.52	0.006 7
26	gi 2809324	Calumenin	37 164	4.47	74	11%	1.55	0.000 37
27	gi 825671	Nucleophosmin (B23)	32 729	4.64	408	22%	-1.65	0.003 9
29	gi 62087614	Aldo-keto reductase family 1, member C2	32 364	6.86	109	54%	2.37	0.019
30	gi 119597993	Annexin A2	38 812	7.57	123	14%	2.10	0.043
32	gi 6005942	Valosin-containing protein	89 950	5.14	98	31%	-1.66	0.002 7

*Av. Ratio: LNM group/ non-LNM group.

2.3 Western blot 验证分析差异蛋白的表达水平

采用 Western blot 方法验证分析差异蛋白 annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 和 B23 在 LCM 纯化的无转移和有转移肺腺癌组织癌细胞中的表达水平, 结果如图 5 所示. 差异蛋白 annexin A1, annexin A2, annexin A3 和 S100A9

在有转移肺腺癌中较无转移肺腺癌表达上调, B23 在有转移肺腺癌中较无转移肺腺癌表达下调. Western blot 结果与上述的蛋白质组结果一致. 表明这些鉴定出来的差异蛋白质为研究肺腺癌的转移分子机制、筛选预测肺腺癌转移的分子标志物奠定了基础.

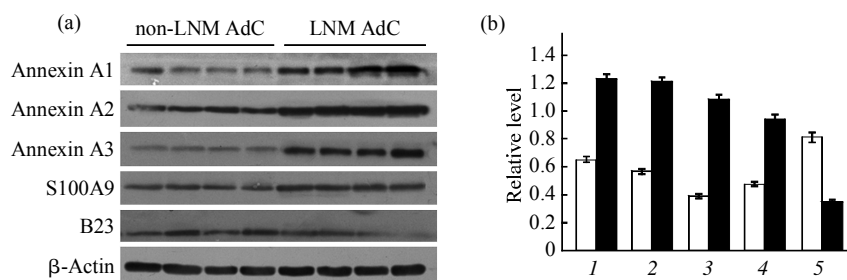


Fig. 5 Representative results of Western blot validation of annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 and B23 expression in microdissected non-LNM AdC tissues and LNM AdC tissues

(a) Western blot shows annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 up-regulated and B23 down-regulated in LNM AdC compared with non-LNM AdC. β -Actin is used as the internal loading control. (b) Histogram of relative levels of the five proteins expression in non-LNM AdCs and LNM AdCs as determined by densitometric analysis ($P < 0.05$). 1: Annexin A1; 2: Annexin A2; 3: Annexin A3; 4: S100A9; 5: B23. $\square$: non-LNM AdC; $\blacksquare$: LNM AdC.

2.4 S100A9 在原发性肺腺癌组织及阳性淋巴结转移性肺腺癌中的表达

进一步分析 S100A9 与肺腺癌转移的关系, 采用免疫组化方法检测 S100A9 在福尔马林固定、石蜡包埋的 63 例原发性肺腺癌(30 例无转移的肺腺癌和 33 例有转移的肺腺癌)及 33 例淋巴结转移癌组织中的表达. 结果显示: 与无转移的肺腺癌相

比, S100A9 在有转移的肺腺癌组织中的表达明显上调($P < 0.05$)(图 6, 表 2), 与有转移的肺腺癌原发灶相比, 统计学分析 S100A9 在淋巴结转移性癌组织中表达无显著性差异. 由此说明 S100A9 可能在肺腺癌的转移启动或早期阶段发挥着积极的作用.

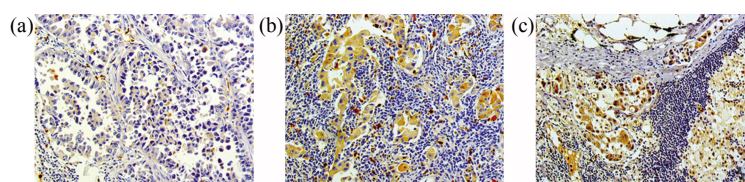


Fig. 6 Representative photographs of immunohistochemistry of S100A9 in lung AdC specimens

(a) Weak staining of non-LNM AdC. (b) Strong staining of LNM AdC. (c) Strong staining of matched positive node metastasis.

Table 2 The difference of S100A9 expression in lung AdC specimens

	Number	Score			<i>P</i>
		Low (0~2)	Moderate (3~4)	High (5~6)	
non-LNM AdC	30	27	3	0	0.017*
LNM AdC	33	22	4	7	
Positive LN	33	19	6	8	0.509

* $P < 0.05$ by Mann-Whitney U test, non-LNM AdC versus LNM AdC.

3 讨 论

肺腺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 它有着发病率高、死亡率高的特点. 肺腺癌发病较

隐匿, 易转移, 这就是其预后差的主要原因. 然而, 肺腺癌的转移机制尚未明了, 并且临床上缺乏能预测肺腺癌转移的蛋白质标志物及控制其转移的治疗靶标, 因此寻找有价值的肺腺癌转移相关分

子, 对临床诊断、预测预后、控制转移以及阐明其转移的分子机制提供理论基础。

本研究以无转移的肺腺癌组织和有转移的新鲜的肺腺癌组织作为研究对象, 采用高通量的蛋白质组学技术进行筛选及鉴定其差异表达的蛋白质, 并对筛选出的差异蛋白进行验证。为了解决组织异质性问题, 我们先用激光捕获显微切割技术(LCM)对肺腺癌组织中的癌细胞进行纯化, 去除癌间质的干扰, 以获得更真实更准确的信息。荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)是蛋白质组学研究的新技术, 在经典的双向凝胶电泳(2DE)基础上, 先对不同的样品进行荧光素标记, 在同一块双向凝胶上进行定量比较分析, 并在每块凝胶中引入了内标, 减少了不同凝胶间的误差, 减少了实验重复的次数, 2D-DIGE敏感性高, 所需的样品量少, 特别适合微量蛋白质的定量研究。

本研究首次采用 LCM 联合 2D-DIGE 技术对肺腺癌的转移进行蛋白质组学研究, 建立了良好的无转移与有转移肺腺癌的 2D-DIGE 图谱, 筛选出 33 个差异蛋白质点, 其中 21 个蛋白质点在有转移的肺腺癌中表达上调, 12 个表达下调, 通过质谱鉴定出 20 个非冗余差异蛋白, 这些差异蛋白为肺腺癌的转移分子机制的阐明及肺腺癌预后标志物的筛选提供线索。这些差异表达的蛋白质主要参与细胞骨架形成, 钙离子结合, 细胞迁移, 信号传导, 细胞生长以及糖酵解等生物学过程, 均参与肿瘤的发生及其演变。Tian 等^[12]也曾利用蛋白质组学技术研究了肺腺癌低转移潜能细胞系 CL1-0 与高转移潜能细胞 CL1-5 之间的差异表达蛋白。然而, 我们采用临床组织标本来进行分析差异蛋白, 我们的结果在某些程度上跟他们的结果基本一致, 但还是存在不同的差异蛋白。

本研究鉴定了 3 个在有转移的肺腺癌组中明显表达上调的蛋白质 annexin A1, annexin A2 和 annexin A3, 并通过 Western blot 方法进一步证实了这 3 个蛋白质在有转移的肺腺癌组织中较无转移的肺腺癌组织中明显表达上调, 这提示 annexin A1, annexin A2 和 annexin A3 在肺腺癌组织中过表达可能与肺腺癌转移有关, 有望能成为预测肺腺癌转移和其病人预后的候选分子标志物。蛋白质 annexin A1, annexin A2 和 annexin A3 均为钙和磷脂结合蛋白, 属于 annexin 超家族成员, 结构具有高度同源性。该家族成员在蛋白质 C 端通常包含 4 个由 70 个氨基酸残基组成的重复保守序列结构,

成为中心结构域, 负责结合钙离子和磷脂。然而, 每个成员的 N 端都不相同, 因而赋予了它们特殊的功能和性质。Annexin A1 在肿瘤的发生与肿瘤演变过程中起着重要的调节作用。Annexin A1 在肝癌、转移的肾细胞癌以及进展期的膀胱癌中表达明显上调, 而在食管癌、前列腺癌、鼻咽癌中表达却明显下调^[15]。据报道, annexin A1 与结直肠癌转移^[16]、肝癌转移^[17]和食管胃交界处腺癌病人的预后^[18]密切相关。这些报道都提示 annexin A1 蛋白在肿瘤的发展过程中起着重要的作用。有研究发现, annexin A1 被癌细胞分泌至胞外, 活化跨膜的甲酰肽受体, 从而引发信号通路激活, 促进癌细胞的迁移和侵袭能力^[19]。本研究发现, annexin A1 在有转移的肺腺癌组织中较无转移的肺腺癌组织表达明显上调, 这提示 annexin A1 在肺腺癌的转移过程中可能起着重要的调节作用。至于, annexin A1 促进肺腺癌转移的分子机制, 还有待于进一步研究。

Annexin A2 是一个多功能的蛋白质, 具有多种重要的生理功能, 如参与纤溶、细胞骨架活动、胞膜运输、细胞间的黏附、黏合素介导的细胞信号转导、病毒感染及细胞的增殖、迁移与分化等。研究表明, annexin A2 在大多数人类恶性肿瘤中, 包括胃癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌, 均异常表达, 在肿瘤的肿瘤浸润灶和转移灶中 annexin A2 表达量明显增加, 且与肿瘤的浸润、转移或预后明显相关^[20~22]。Annexin A2 作为一类钙依赖性磷脂结合蛋白, 在细胞信号转导过程中发挥重要作用。Annexin A2 可分布于胞核、胞浆及细胞表面, 胞膜上的 annexin A2 是组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原、组织蛋白酶 B 及细胞黏合素 C 的受体, 这些蛋白酶及其底物均与肿瘤的发展及转移关系密切。本实验分析发现, annexin A2 在有转移的肺腺癌中高表达, 这提示 annexin A2 在肺腺癌的转移过程也起着重要的调控作用。Annexin A3 也是 annexin 家族成员之一, 然而, 与其他成员相比, 对 annexin A3 的研究报道很少。本研究发现, annexin A3 在有转移的肺腺癌组织中较无转移的肺腺癌组织表达明显上调。研究表明, annexin A3 为一新的潜在的血管生成因子, 它通过 HIF-1 通路诱导 VEGF 的产生, 从而促进新生血管生成^[23]。由此推测 annexin A3 可能诱导肿瘤血管的生长而促进肺腺癌的演进与转移。然而, 这 3 个 annexin 蛋白在肺腺癌转移过程到底发挥怎样的作用, 其具体的分子机制阐明有待于后续的实验分析。

B23 为我们鉴定的一个在有转移的肺腺癌组织中表达下调的蛋白质。B23 是一种多功能的核仁磷酸化蛋白, 参与监控核仁活性及细胞增生。B23 在细胞增殖中发挥着重要的作用, 这可能与 B23 能结合许多参与细胞周期和增生调控的重要因子有关, 并通过在核仁与核浆之间的穿梭, 协助这些因子在细胞内执行它们的功能。B23 在肿瘤的发生发展演进过程中起着极其重要的作用, 但是它在侵袭转移过程究竟充当什么角色, 是否调控这个极其复杂的生物学过程, 还需要进一步探讨分析。

在鉴定的差异蛋白中, S100A9 在有转移的肺腺癌中较无转移的肺腺癌明显上调, Western blot 和免疫组化证实了蛋白质组的结果。S100A9 属于 S100 家族成员之一, 为一钙结合蛋白, 参与钙离子的信号传导, 在细胞生长、运动及细胞分化过程起着极其重要的作用, 文献报道, S100A9 在乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌和前列腺癌中表达上调, 且其异常表达与肿瘤的分化密切相关^[24, 25]。还有文献报道, S100A9 与胃癌的侵袭转移过程起重要作用。总之, S100A9 在肿瘤的癌变及演变过程中发挥着关键作用^[26]。本研究结果也提示 S100A9 在肺腺癌转移过程中可能起着积极的作用。

综上所述, 本研究采用 LCM 技术联合 2D-DIGE 技术进行肺腺癌转移的蛋白质组学研究, 建立了 LCM 纯化的无转移肺腺癌和有转移肺腺癌的 DIGE 图谱, 鉴定并验证了部分差异蛋白 annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 在有转移的原发肺腺癌组织中较无转移的肺腺癌组织表达明显上调, 而 B23 在有转移的原发性肺腺癌组织中较无转移的肺腺癌表达明显下调。结果提示, 这些差异表达蛋白在肺腺癌的转移过程中可能起着关键作用, 为筛选潜在的预测肺腺癌转移的分子标志物以及为今后阐明肺腺癌转移的分子机制提供理论基础。

参 考 文 献

- Little A G, Gay E G, Gaspar L E, *et al.* National survey of non-small cell lung cancer in the United States: epidemiology, pathology and patterns of care. *Lung Cancer*, 2007, **57**(3): 253~260
- Yoshida B A, Sokoloff M M, Welch D R, *et al.* Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst*, 2000, **92**(21): 1717~1730
- Sukoh N, Abe S, Nakajima I, *et al.* Immunohistochemical distributions of cathepsin B and basement membrane antigens in human lung adenocarcinoma: association with invasion and metastasis. *Virchows Arch*, 1994, **424**(1): 33~38
- Ho C C, Huang P H, Huang H Y, *et al.* Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol*, 2002, **161**(5): 1647~1656
- Mitsuta K, Yokoyama A, Kondo K, *et al.* Polymorphism of the MUC1 mucin gene is associated with susceptibility to lung adenocarcinoma and poor prognosis. *Oncol Rep*, 2005, **14**(1): 185~189
- Chang C C, Shih J Y, Jeng Y M, *et al.* Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 2004, **96**(5): 364~375
- Su J L, Yang C Y, Shih J Y, *et al.* Knockdown of contactin-1 expression suppresses invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2006, **66**(5): 2553~2561
- Shibata T, Uryu S, Kokubu A, *et al.* Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(17): 6177~6185
- Larsen J E, Pavey S J, Passmore L H, *et al.* Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(10): 2946~2954
- Nakamura N, Kobayashi K, Nakamoto M, *et al.* Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 2006, **25**(30): 4245~4255
- Jiang D, Ying W, Lu Y, *et al.* Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics*, 2003, **3**(5): 724~737
- Tian T, Hao J, Xu A, *et al.* Determination of metastasis-associated proteins in non-small cell lung cancer by comparative proteomic analysis. *Cancer Sci*, 2007, **98**(8): 1265~1274
- Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(1): 38~43
- Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol*, 2004, **108**(1): 43~48
- Lim L H, Pervaiz S. Annexin I: the new face of an old molecule. *Faseb J*, 2007, **21**(4): 968~975
- Liang L, Qu L, Ding Y. Protein and mRNA characterization in human colorectal carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Cancer Invest*, 2007, **25**(6): 427~434
- Dai Z, Liu Y K, Cui J F, *et al.* Identification and analysis of altered alpha1, 6-fucosylated glycoproteins associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *Proteomics*, 2006, **6**(21): 5857~5867
- Wang K L, Wu T T, Resetkova E, *et al.* Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(15): 4598~4604
- Babbin B A, Lee W Y, Parkos C A, *et al.* Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem*, 2006, **281**(28): 19588~19599
- Cole S P, Pinkoski M J, Bhardwaj G, *et al.* Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer*, 1992, **65**(4): 498~502

- 21 Vishwanatha J K, Chiang Y, Kumble K D, *et al.* Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers. *Carcinogenesis*, 1993, **14**(22): 2575 ~ 2579
- 22 Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, *et al.* Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene*, 2004, **23**(22): 3980 ~ 3989
- 3 Park J E, Lee D H, Lee J A, *et al.* Annexin A3 is a potential angiogenic mediator. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **337**(4): 1283 ~ 1287
- 24 El-Rifai W, Moskaluk C A, Abdrabbo M K, *et al.* Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res*, 2002, **62**(23): 6823 ~ 6826
- 25 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
- 26 Yong H Y, Moon A. Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. *Arch Pharm Res*, 2007, **30**(1): 75 ~ 81

Quantitative Proteomic Analysis of Metastasis-Associated Proteins in Human Primary Lung Adenocarcinoma*

LIU Ying-Fu^{1,2)}, XIAO Zhi-Qiang¹⁾, ZHANG Peng-Fei¹⁾, LI Mao-Yu¹⁾, LI Cui¹⁾,
Peng Fang¹⁾, YU Yan-Hui²⁾, YI Hong¹⁾, CHEN Zhu-Chu^{1,2)**}

⁽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)

Abstract Cancer cell metastasis is the major cause of lung adenocarcinoma (AdC) with high mortality and poor prognosis. To screen metastasis-associated biomarkers of lung AdC, laser capture microdissection (LCM) was used to purify the cancer cells from primary lung AdC with (LNM AdC) and without metastasis (non-LNM AdC) according to clinical diagnosis of lymph node metastasis and distant metastasis. Then two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) was performed to isolate the total proteins of the pooled microdissected cancer cells from non-LNM AdC and LNM AdC. The differential proteins between non-LNM AdC and LNM AdC were analyzed by Decyder software and further identified by mass spectrometry (MS). The partial differential proteins annexin A1, annexin A2, annexin A3, S100A9 and B23 were validated by Western blot. 2D-DIGE patterns of microdissected non-LNM AdC and LNM AdC were established, and 20 differential proteins in the above two tissues were identified, of which 13 proteins were up-regulated and 7 proteins were down-regulated in LNM AdC compared to non-LNM AdC. Western blot results indicated that annexin A1, annexin A2, annexin A3 and S100A9 were significantly up-regulated in LNM AdC compared to non-LNM AdC; B23 was significantly down-regulated in LNM AdC compared to non-LNM AdC. Immunohistochemical analysis indicated S100A9 was up-regulated in LNM AdC compared with non-LNM AdC. It was the first time that metastasis-associated proteins were identified in primary adenocarcinoma by LCM coupled with 2D-DIGE and MS techniques. The findings will facilitate understanding of lung AdC metastasis and provide some direct proof for mining markers for predicting metastasis and patients' outcome so as to improve the diagnose and treatment of lung AdC.

Key words lung adenocarcinoma, metastasis, proteome, laser capture microdissection, two-dimensional differential in-gel electrophoresis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00586

*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 (04XK1001, 05SK1004-1).

**Corresponding author.

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

Received: August 22, 2008 Accepted: October 13, 2008