

文章编号:1005-6947(2005)10-0748-05

· 实验研究 ·

应用二维电泳和质谱技术筛选大肠癌与正常肠组织的差异表达蛋白

裴海平¹, 朱红², 曾亮³, 李宜雄¹

(中南大学湘雅医院 1. 普通外科 2. 肿瘤科, 湖南长沙 410008; 3. 湖南省肿瘤医院 病理科, 湖南长沙 410006)

摘要:目的 通过筛选大肠癌组织与正常癌组织中的差异表达蛋白, 以发现用于大肠癌早期诊断的生物标志物。方法 收集大肠癌组织及配对的正常肠组织, 提取组织蛋白, 进行二维电泳, 选择在癌组织中高表达的 30 个点进行质谱和生物信息学分析, 确定所分析的蛋白质类型。结果 正常肠组织和大肠癌组织的二维电泳图谱的平均蛋白质点数分别为 760 ± 45 和 $1\,098 \pm 28$; 正常肠组织在 IEF 方向上的平均偏差为 (0.542 ± 0.12) mm, 在 SDS-PAGE 方向上的平均偏差为 (0.933 ± 0.098) mm; 大肠癌组在 IEF 方向上的平均偏差为 (0.745 ± 0.130) mm, 在 SDS-PAGE 方向上的平均偏差为 (1.233 ± 0.272) mm。对选择的 30 个在大肠癌中高表达的蛋白质点进行质谱和生物信息学分析, 鉴定了其中的 16 个点, 包括有 Apolipoprotein A1, calreticulin precursor, 谷胱甘肽 S 转移酶, 肝型脂肪酸结合蛋白、热休克蛋白 27 等。结论 大肠癌与正常癌组织的差异表达蛋白可能作为大肠癌早期诊断的候选生物标志物; 蛋白质组学技术是筛选生物标志物的有效方法。

关键词: 结直肠癌; 蛋白质组学; 热休克蛋白; 谷胱甘肽 S 转移酶; 肝型脂肪酸结合蛋白

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

Screening of differential expression protein from human colorectal carcinoma and normal colorectal tissues by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry

PEI Hai-ping¹, ZHU Hong², ZENG Liang³, LI Yi-xiong¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Radiotherapy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Department of Pathology, Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha 410006, China)

Abstract: **Objective** To find early diagnostic biomarkers for colorectal carcinoma by comparing differential expressing proteins from colorectal carcinoma and normal colorectal tissues. **Methods** Colorectal carcinoma tissues and paired normal tumor-adjacent colorectal tissues were collected, and tissue total protein was extracted; differential proteome profiles were established and analysed by means of immobilized pH gradient-based two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Results** Well-resolved, reproducible 2-DE profiles of human colorectal carcinoma tissues and paired normal tumor adjacent colorectal tissues were obtained. For tumor tissue, a total of 1098 ± 28 spots were detected, and for normal tissue, 760 ± 45 spots were detected. For normal tissue, The average deviation of spot position was (0.542 ± 0.12) mm in IEF direction and (0.933 ± 0.098) mm in SDS-PAGE direction for tumor tissue. The average deviation of spot position was (0.745 ± 0.130) mm in IEF direction and (1.233 ± 0.272) mm in SDS-PAGE direction. 30 differential expressing proteins were analysed by mass spectrometry and bioinformation,

基金项目: 湖南省科技厅资助项目(04SK3043-1); 湖南省卫生厅资助项目(B2004-029; B2004-129)。

收稿日期: 2005-04-18; **修订日期:** 2005-07-11。

作者简介: 裴海平(1966-), 男, 湖南邵东人, 中南大学湘雅医院副教授, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的诊断和治疗方面的研究。

16 of them were well characterized including Apolipoprotein A1 (apoA1), calreticulin precursor , glutathione S-transferase , hepatic fatty acid-binding protein 、heat shock protein 27 ect. **Conclusions** Differential expression proteins can be candidate biomarkers for early diagnosis of colorectal carcinoma ; and proteomic technique is valuable for screening the diagnostic biomarkers .

Key words : Colorectal Neoplasms ; Proteomics ; Glutathione ; Heat Shock Protein ; S-transferase ; Hepatic Fatty Acid-binding Protein

CLC number : R735.3

Document code : A

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,近年来,其发病率呈明显上升趋势。大肠癌患者确诊时约30%~40%已发生远处转移,即使早期病变也有约50%患者术后复发转移,故早期发现、早期诊断在大肠癌患者的治疗效果和预后中显得尤为重要。常用的大肠癌检测生物标志物主要为血清癌胚抗原(CEA),该指标不具有特异性的诊断价值,且有一定的假阳性和假阴性,因此不适合作为普查或早期诊断。

全基因组表达分析主要体现在基因组学和蛋白质组学技术,且已用于提高肿瘤的诊断和治疗^[1]。目前已有一些蛋白质组学技术应用于大肠癌研究的报道^[2~4]。在本研究中笔者从检测大肠癌中的肿瘤特异蛋白着手,企以筛选大肠癌早期生物标志物。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 大肠癌组 大肠癌组织标本均取自中南大学湘雅医院普外科手术切除的标本,共10例,均经病理诊断为腺癌,包括结肠癌6例,直肠癌4例。男5例,女5例;年龄为23~75岁,平均51.2岁。

1.1.2 癌旁组织组(对照组) 10例。为距肿块边缘至少10cm以上的大肠组织。

1.2 材料

固相pH梯度干胶条(IPG)pH3~10(Amersham pharmacia biotech)电泳试剂:丙稀酰胺,甲叉双丙稀酰胺,甘氨酸,尿素,Tris,CHAPS,SDS均为Amresco产品。质谱鉴定试剂:二硫苏糖醇(DTT),碘乙酰胺,铁氰化钾,TPCK处理的胰蛋白酶,CCA,三氟乙酸均为Sigma产品。IPGphor等电聚焦电泳仪(Amersham pharmacia biotech公司)。Protean II垂直板电泳槽,Gel Doc2000凝胶成像仪,PDQUEST2-DE图象分析软件均为Bio-rad公司产品,离心机(Bekman公

司),TL-100 Tabletop Ultracentrifuge(Palo Alto公司),Applied Biosystem Voyager-DETM STR Biospectrometry™ workstation system 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪(ABI公司)。

1.3 方法

1.3.1 组织蛋白质的提取 标本组织称重,剪取50mg组织,放入匀浆管中,加入裂解液400μL,加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulphonyl fluoride,PMSF),放入预冷的匀浆器中以5500r/min搅拌5min。匀浆完毕,在20℃室温放置2h。将匀浆管内液体全部吸出放入EP管中,以14000r/min离心60min。离心结束后,将蛋白上清液抽出,转入1支EP管。使用蛋白测定仪,测定蛋白浓度。

1.3.2 二维电泳 将蛋白样品(上样量为400μg)加入EP管(含水化液)中,振荡混匀,然后开始上样。将含蛋白的水化液均匀加入holder槽,均匀上样。撕开胶条上的保护层,以胶面向下的方式放入胶条,添加覆盖液。设最大电流55μA,在不同电压下依次进行电泳:30V,14h;500V,1h;1000V,1h;3000V,0.5h;5000V,0.5h;6000V,0.5h;7000V,0.5h;8000V,5h,共52420Vh。电泳结束,取出2条胶条,冲洗并于DTT平衡液中平衡,同时配制聚丙烯酰胺凝胶。将胶条小心地放置于电泳槽两玻璃之间的SDS-PAGE胶面上,正极在左边。将10μL中分子量蛋白质标准品滴加在3mm×3mm的小滤纸片上并放置在胶条靠近正极处一端,加琼脂糖封胶液固定并排除气泡。先30mA电泳20min,然后再60mA电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。打开电泳仪电源,每根胶条恒流15mA,2根为30mA20min,20min后加至60mA,继续跑至溴酚蓝到底部距玻璃板2~3mm处。取出胶条在固定液(无水乙醇200/100mL、无水冰醋酸50/25mL)固定30min;然后加入敏化液作用30min;蒸馏水漂洗;加入银反应液(硝酸银1.25g/500mL,

37% 甲醛 0.4 mL / 500 mL), 反应时间为 20 ~ 30 min。漂洗; 显影 2 ~ 5 min, 终止显影。

1.3.3 凝胶图象分析 凝胶通过 Imagescaner 扫描仪以及 Labscan 扫描软件进行扫描获取图像。然后利用 Imagemaster 2D Elite 4.01 分析软件对大肠癌和正常肠组织的双相电泳银染图像依次进行强度校正点检测, 背景消减、匹配, 1D 及 2D 校正, 建立平均凝胶, 量化获取蛋白斑点的信息。蛋白斑点位置的重复性按 Corbett 法进行计算。用统计软件 SPSS10.0 进行数据的统计学分析。

1.3.4 质谱及生物信息学分析 选取图像分析得到的差异蛋白质点, 从凝胶上取下这些点, 转入 Eppendoff 离心管中反复冲洗; 加入脱色工作液进行脱色; 去掉所有液体, 加纯乙腈脱水。而后在蛋白质样品中加入还原液 (100 mmol/L NH_4CO_3 , 10 mmol/L DTT) 于 57℃ 1h, 还原蛋白质, 室温冷却; 弃上清液, 在暗处加入新配置的烷基化溶液, 避光放置 30 min, 冲洗、脱水并完全干燥。然后在每管样品中加入 10 μL 酶解液 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trypsin + 40 mmol/L NH_4CO_3 + 9% I), 37℃ 浸泡 16h。将酶解 EP 管离心, 吸取上清到新的 EP 管, 然后加入萃取液 (100% 乙腈: 5% TFA = 1: 1) 覆盖胶块, 37℃, 30 min, 离心, 将萃取液与新的 EP 管内的上清液合并。用 Millipore 公司的 ZipTip™ C18 移液器吸嘴进行脱盐。样品与基质液用涡旋搅拌器充分混合, 取混合液点样于不锈钢点样板上, 自然风干后留待质谱分析。将点样板置于质谱仪中进行分析, 获得肽质量指纹图, 将肽质量指纹数据通过因特网在蛋白质序列数据库中进行搜索, 确定各点所属蛋白, 搜索软件为 Profound, 用 Mascot Distiller 对 PMF 原始质谱峰进行去同位素处理并过滤肽质量峰。搜索参数为: 数据库选择 NCBI nr, 物种为人类, 搜索蛋白为单个, 肽片段质量选择在 0.8 ~ 4 kD 之间。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳结果

在相同条件下, 对蛋白样品进行 3 次双向电泳, 比较结果发现, 大肠癌组的蛋白斑点数多于对照组, 并以等电点 4 ~ 9 和分子量 4 ~ 9 kD 间蛋白斑

点分布最多 (附图)。对照组和 3 次凝胶的平均蛋白质点数分别为 760 ± 45 和 $1\,098 \pm 28$, 将其中一块胶设定为参考胶, 进行 3 块胶间的匹配分析得到平均匹配率分别为 78.5% 和 89.3%。进一步的重复性分析发现, 大肠癌组和对照组 3 块胶中的蛋白质点在其位置上均有较好的重复性。对照组在 IEF 方向上与在 SDS-PAGE 方向上的平均偏差分别为 (0.542 ± 0.12) mm, (0.933 ± 0.098) mm; 大肠癌组在 IEF 方向与在 SDS-PAGE 方向上平均偏差分别为 (0.745 ± 0.130) mm, (1.233 ± 0.272) mm。根据蛋白质点表达量与所有匹配蛋白质点表达量总和的比值大于 3, 且同组 3 块胶图谱中都出现相同变化的蛋白点, 被认为是差异蛋白质点。选择其中大肠癌组中表达而在正常肠黏膜中不表达的蛋白质点 30 个进行质谱分析。

a: 大肠癌组织

b: 癌旁正常组织

附图 大肠癌与正常肠组织的二维电泳图谱

2.2 质谱结果及生物信息学分析

在大肠癌和癌旁正常肠组织二维电泳图谱中, 选取大肠癌中高表达的蛋白斑点 30 个, 经切割、脱色、还原、烷基化、胰酶酶解、萃取和脱盐后, 进行 MALDI-TOF-MS 分析, 以基质峰和酶自动降解峰进行校正, 得到蛋白质点的肽质量指纹图 (PMF), 30 个点共获取 30 张 PMF。应用 PMF 数据, 通过 Profound 查询软件搜索 NCBI nr 数据库, Profound 进行蛋白质点的肽质量指纹谱与蛋白质数据库的比较来鉴定蛋白质, 其中以 Mowse 分值 (Mowse Score) 为基础的概率 (P) 评价数据库搜寻结果的质量, 分值大小表示鉴定蛋白属于随机匹配的可能性, 分值大于 63 表明具有显著性意义。本研究中所分析的 30 个点中, 分值大于 63 的差异蛋白质点有 16 个 (附表)。

附表 部分差异表达蛋白的质谱分析和数据查询结果

GeneBank 号	蛋白名称	匹配分数 (score)	质量 (D)	等电点 (pI)	蛋白序列覆盖率(%) (sequence coverage)
1AVOB	I1s regulator, chain B	81	16343	7.14	34
Q96E67	ACTB protein	92	40194	5.55	44
Q96HG5	Actin, beta	91	40978	5.56	43
A42077	annexin IV	70	36062	5.84	29
CAA00975	APOAI PROTEIN	161	28061	5.27	73
A37047	calreticulin precursor	102	48112	4.29	49
Q5SZY0	Chaperonin containing TCPI	76	57935	6.46	32
FZHUL	fatty acid-binding protein, hepatic	65	14257	6.60	74
E980237	HSP27	95	22429	7.83	67
B34595	pregnancy-specific glycoprotein	73	39849	8.58	25
1A06A	serum albumin, chain A	99	65695	5.63	23
TAGL	Transgelin	88	22523	8.88	63
TPIS	triosephosphate isomerase	113	26812	6.51	50
A26561	tubulin beta chain	108	49727	4.75	52
A25074	vimentin	157	53619	5.06	76
2PGTB	glutathione s-transferase	68	23196	5.44	53

注:匹配分数(score)大于63为具有显著性意义

3 讨论

肿瘤的早期诊断和早期治疗可降低癌症人群死亡率,改善预后,提高生活质量。因此,筛选和发现合适的肿瘤特异性标志物将有助于肿瘤的早期诊断。高通量生物技术,包括基因芯片,蛋白质组学技术/蛋白质芯片等的日益成熟,已逐渐被应用于肿瘤生物标志物筛选的研究。

目前,大肠癌早期诊断方法主要为直肠指诊、纤维结肠镜,但应用范围和效果有限,且难以进行高危人群的筛查。故筛选能用于大肠癌早期诊断的生物标志物具有重要意义。本研究中,对大肠癌组织在二维电泳图谱中高表达的30个蛋白点进行质谱和生物信息学分析,鉴定发现了差异表达蛋白,包括谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST), annexin IV, β -actin, APOA1 蛋白, calreticulin precursor, 肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP), HSP27, pregnancy-specific glycoprotein, triosephosphate isomerase, beta-tubulin, vimentin 等。Stierum 等^[5]应用蛋白质组技术研究结直肠癌细胞株 Ca-

co-2 蛋白质组中发现18种与分化相关的蛋白,其中3种蛋白,包括谷胱甘肽S转移酶、热休克蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白的改变。本实验结果与Stierum 等报道的结果一致。

令人感兴趣的是,本研究中发现在大肠癌组织中一组多药耐药相关蛋白呈高表达状态,包括了GST, HSP27, Annexin。GST存在于全身器官中的细胞浆及线粒体中,在多种肿瘤中呈现高表达,与肿瘤耐药有关。结直肠癌的危险性与GSTT1缺失显著相关。研究发现GST P1-1通过抑制结肠癌前病变的细胞凋亡而可能在结肠早期癌变中起着关键作用。GST多态性可能影响酶活性而不能有效分解体内有害化学物,增加患结直肠癌的可能性^[6,7]。而HSP27和HSP70在乳腺癌、内膜癌和胃癌中呈高表达,与肿瘤的转移、预后差和对化疗或放疗的抗性有关^[8,9]。信号转导激活相关的基因阵列研究显示在正常肠组织和结直肠癌组织间的差异表达基因,其中在结肠癌组织中HSF1,热休克因子27,1,90(HSF)以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达增加^[10]。annexin II在进展期结直

肠癌中过表达,可能和结直肠癌的转移有关^[11,12]。这些研究可提示在肿瘤发生过程中一些蛋白表达的改变可能伴有耐药性的形成。此外,在大肠癌中高表达的 transgelin 也可能参与化疗敏感性的调节过程,研究发现在大肠癌中化疗药物 Polysaccharide-K 可通过影响 transgelin 来增强其抗肿瘤的作用^[13]。

有报道^[14]在高转移性肝癌细胞中 calreticulin precursor 表达下调,而本研究中该蛋白在大肠癌中表达上调,它是否也在大肠癌肝转移中具有意义,有待于进一步研究。脂肪酸结合蛋白(FABPs)在大肠癌中呈高表达,FABPs 通过在细胞内转运长链脂肪酸来参与脂质代谢。有报道,人胃癌中心型 FABP 表达,并与脂肪酸合成、预后不良及肿瘤进展相关,而肝型脂肪酸结合蛋白在胃腺癌和非典型性增生中高表达,和胃癌进展、预后及脂肪酸的合成无相关性。肝型 FABP 在肝和肠道上皮中合成,它能较敏感地反映分化,在正常结肠上皮、结肠腺瘤、黏液腺癌和腺癌中均有一定比例的表达,它在大肠癌中表达增加提示其表达被异常激活,其中机制有待进一步研究^[15~17]。此外,在本研究中筛选出的大肠癌高表达蛋白有些蛋白功能未明;一些蛋白可能同时与肿瘤的发生,药物敏感及预后相关;一些蛋白的改变在大肠癌中具有相对特异性,这些均值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Carr KM, Rosenblatt K, Petricoin EF, *et al.* Genomic and proteomic approaches for studying human cancer: prospects for true patient-tailored therapy [J]. *Hum Genomics*, 2004, 1(2):134-140.
- [2] Krieg RC, Fogt F, Braunschweig T, *et al.* ProteinChip Array analysis of microdissected colorectal carcinoma and associated tumor stroma shows specific protein bands in the 3.4 to 3.6 kDa range [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3a):1791-1796.
- [3] Friedman DB, Hill S, Keller JW, *et al.* Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2004, 4(3):793-811.
- [4] Hoffmann P, Ji H, Moritz RL, *et al.* Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy [J]. *Proteomics*, 2001, 1(7):807-818.
- [5] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, *et al.* Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1650(1-2):73-91.
- [6] Nobuoka A, Takayama T, Miyanishi K, *et al.* Glutathione-S-transferase P1-1 protects aberrant crypt foci from apoptosis induced by deoxycholic acid [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(2):428-443.
- [7] Kiss I, Nemeth A, Bogner B, *et al.* Polymorphisms of glutathione-S-transferase and arylamine N-acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(6):3965-3970.
- [8] Rashmi R, Kumar S, Karunakaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(2):179-187.
- [9] Chen K, Jiang QT, He HQ. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(3):331-335.
- [10] Cen H, Zheng S, Fang YM, *et al.* Induction of HSF1 expression is associated with sporadic colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(21):3122-3126.
- [11] Han EK, Tahir SK, Cherian SP, *et al.* Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(1):83-88.
- [12] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, *et al.* Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer*, 2001, 92(6):1419-1426.
- [13] Yoshikawa R, Yanagi H, Hashimoto-Tamaoki T, *et al.* Gene expression in response to anti-tumour intervention by polysaccharide-K (PSK) in colorectal carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(6):1287-1293.
- [14] Ding SJ, Li Y, Shao XX, *et al.* Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials [J]. *Proteomics*, 2004, 4(4):982-994.
- [15] Hashimoto T, Kusakabe T, Watanabe K, *et al.* Liver-type fatty acid-binding protein is highly expressed in intestinal metaplasia and in a subset of carcinomas of the stomach without association with the fatty acid synthase status in the carcinoma [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(3):115-122.
- [16] Hashimoto T, Kusakabe T, Sugino T, *et al.* Expression of heart-type fatty acid-binding protein in human gastric carcinoma and its association with tumor aggressiveness, metastasis and poor prognosis [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(5):267-273.
- [17] Carroll SL, Roth KA, Gordon JI. Liver fatty acid-binding protein: a marker for studying cellular differentiation in gut epithelial neoplasms [J]. *Gastroenterology*, 1990, 99(6):1727-1735.