

文章编号:1005-6947(2007)05-0433-05

· 基础研究 ·

人胰腺导管腺癌组织及癌旁组织双向电泳图谱的差异分析

田锐¹, 魏黎明², 李延³, 秦仁义¹, 杜志勇¹, 夏维¹, 金红⁴

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030; 2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 皮肤科, 湖北武汉 430022; 4. 复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要:目的 探讨人胰腺导管腺癌组织和癌旁组织之间差异的表达蛋白。方法 利用双向凝胶电泳(2-DE)对8例胰腺导管腺癌组织和癌旁组织的总蛋白进行分离,并用质谱仪对两组间差异蛋白质点进行肽指纹谱和串联质谱鉴定。利用蛋白质印迹分析和免疫组化法检测差异蛋白在胰腺癌和癌旁组织的表达。结果 2-DE显示,肿瘤组织中有28个蛋白质点表达上调,17个表达下调。上述蛋白质点经质谱鉴定得到30个蛋白质,包括酶类、抗氧化蛋白、信号转导蛋白、钙结合蛋白、结构蛋白及分子伴侣等。Western blot和免疫组化结果显示差异表达蛋白annexin II在胰腺癌组织中表达上调,与2-DE结果一致。结论 以2-DE为基础的蛋白质组学技术是研究肿瘤的一种重要手段。本实验所得的annexin II等差异表达蛋白可能成为潜在的诊断胰腺癌的分子标志或控制肿瘤生长的治疗靶点。

[中国普通外科杂志,2007,16(5):433-437]

关键词: 胰腺肿瘤; 腺癌; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号:R735.9;Q51

文献标识码:A

Differential analysis of two-dimensional gel electrophoresis profile of pancreatic ductal adenocarcinoma and adjacent tissue

TIAN Rui¹, WEI Li-ming², LI Yan³, QIN Ren-yi¹, DU Zhi-yong¹, XIA Wei¹, JIN Hong⁴

(1. Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Wuhan 430030, China; 3. Department of Dermatology, Affiliated Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; 4. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To study the difference of expression of proteins in pancreatic cancer and adjacent tissue. **Methods** Proteomes of eight pairs of pancreatic ductal adenocarcinoma tissue samples and adjacent tissue samples were obtained by high resolution two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Comprehensive analyses of proteins were focused on total protein spots exhibiting statistical alternations between the two groups. Protein identification was done by peptide mass fingerprinting with tandem mass spectrometry (MS/MS). In addition, Western blotting and immunohistochemistry were performed to verify the expression of certain candidate protein. **Results** A total of 28 protein spot-features were found to be significantly increased and 17 significantly decreased in tumor tissues. Thirty of these protein spots were identified, which included enzymes, antioxidant proteins, signal transduction proteins, calcium-binding protein, structural proteins, chaperones and others. Western blotting and IHC further validated up-regulated expressions of one candidate protein (annexin II) in tumor tissues. **Conclusions** The analysis of proteomics with 2-DE on human tissue is a useful method for discovering valuable cancer marker candidates. These differentially expressed proteins may serve as biomarkers for early detection and therapeutic targets to pancreatic cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 433-437]

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471693)

收稿日期: 2006-10-17; **修订日期:** 2006-12-25。

作者简介: 田锐,男,湖北荆门人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者: 秦仁义 E-mail: ryqin@tjh.tjmu.edu.cn

Key words: Pancreatic Neoplasms; Adenocarcinoma; Proteome; Two-dimensional Gel Electrophoresis

CLC number: R735.9; Q51

Document code: A

胰腺癌发病隐匿,并具有高度侵袭性,较早时即可沿神经、血管、淋巴发生转移,故确诊的患者往往已处于晚期。尽管近来手术切除率有所提高,但其5年生存率仍不足5%^[1]。因此,早期预测和诊断胰腺癌是提高患者生存率的关键。近年来蛋白质组学研究技术为筛选新的肿瘤标志物和治疗靶点以及深入研究疾病的病理改变提供了强有力的工具。本研究初步探讨蛋白质组学技术在胰腺癌中的应用,拟从中发现一些与胰腺癌相关的标志物,为胰腺癌早期诊断、治疗和预后判断提供线索。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器设备

固相pH梯度干胶条、两性电解质、二硫苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺以及IPG-phor等电聚焦仪均为Amersham Biosciences公司产品;碘乙酰胺(IAA)为Fluka公司产品;胰蛋白酶为Roche公司产品;增强化学发光(ECL)试剂盒为Pierce公司产品;Protean垂直电泳槽、GS-800图像扫描仪、PDQuest凝胶图像分析软件均为Bio-Rad公司产品;4700 TOF/TOF质谱仪为ABI公司产品。

1.2 样本及制备

1.2.1 标本来源 35例胰腺癌及配对癌旁胰腺组织取自同济医院胰腺癌患者手术切除的新鲜标本,均经术后病理诊断证实为胰腺导管腺癌。其中8例用于二维电泳。

1.2.2 样本制备 取胰腺癌及离肿瘤3 cm以上的癌旁胰腺组织,无菌状态下用生理盐水反复清洗以去除血液。液氮研磨至粉末状,置于裂解液中充分涡旋混匀,然后以15 000 r/min,4℃离心30 min;收集上清液,-80℃保存。用Bradford法测定获取的蛋白质的浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 双向凝胶电泳(2-DE) IPG干胶条在400 μg蛋白质样品和水化液共350 μL混合液中20℃水化12 h,加电压聚焦,阶梯上升至8 000 V,持续总电压时间积达64 000 Vh。聚焦后,胶条先后在含DTT(1%)和IAA(2.5%)的平衡缓冲液中平衡15 min,然后移至12%的聚丙烯酰胺凝胶上端进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。电泳所得的2-DE胶用双胺

银染法染色。

1.3.2 图像分析 通过GS-800扫描仪及PDQuest7.03软件对凝胶进行扫描获取图像。利用PDQuest7.03分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配、1D校正、建立平均凝胶等分析,并筛选在两组平均凝胶中表达差异在5倍以上的差异蛋白点。

1.3.3 胶内酶解和质谱鉴定 挖取差异蛋白点,脱色、还原、烷基化、酶解、样本回收及脱盐处理参见Li等^[2]的方法。回收样本送入4700 TOF/TOF质谱仪进行肽指纹谱和串联质谱鉴定。

1.3.4 数据库检索 质谱数据通过Mascot搜索引擎对NCBI非冗余蛋白质序列数据库进行检索。自动的数据分析与数据库检索由GPS Explore软件完成。

1.3.5 免疫印迹法(Western blot)检测annexin II蛋白的表达 将提取的蛋白质样本按每孔30 μg上样于12% SDS-PAGE后进行电泳。用半干电转移法转移蛋白质至硝酸纤维素膜,然后用5%脱脂奶粉封闭膜1 h。加入小鼠抗人annexin II单克隆抗体(1:500, Santa Cruz公司)后4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG孵育1 h。参照ECL试剂盒说明进行化学发光法显示结果,X线胶片曝光。

1.3.6 免疫组织化学(免疫组化)检测annexin II蛋白的分布 35例配对标本经10%甲醛固定,石蜡包埋,5 μm连续切片。石蜡切片脱蜡水化,置pH6.0的柠檬酸溶液高温抗原修复10 min,羊血清封闭30 min,小鼠抗人annexin II单克隆抗体(1:100)37℃孵育1.5 h,HRP标记的羊抗鼠IgG室温反应0.5 h,DAB显色,苏木素复染核。结果根据Esposito^[3]的标准判定:按染色强度及阳性细胞数分为0,(+),(++),(+++)共4个级别,0为阴性表达;(+)~(+++)等为阳性表达。

2 结果

2.1 人胰腺导管腺癌组织及癌旁组织2-DE图谱的建立及差异分析

两种样本总蛋白分别进行3次2-DE以保证实验的重复性。选择其中2-DE效果好,点数多的一块胶作为参考胶,进行两组间的匹配分析,获得了重复性较好的人胰腺癌及对应的癌旁组织的2-DE图

谱(图 1)。经两组图谱进行差异分析后筛选出存在的 5 倍及其以上的差异点 45 个。肿瘤组织中共有

28 个蛋白质点表达上调,17 个表达下调。



图 1 胰腺癌和癌旁组织的双向电泳图谱 A:胰腺癌组织; B:癌旁组织

2.2 差异蛋白质点的肽指纹图分析及串联质谱图分析

45 个差异蛋白质点通过胶内原位酶解进行飞行时间质谱肽质量指纹图的测定,并自动获取其中高峰粒子进一步进行串联激发获取串联质谱图。检索时,设置匹配肽的理论质量数实验质

量数和误差,并结合 2-DE 相应蛋白点的理论等电点、分子质量、匹配片段以及氨基酸的覆盖率进行蛋白质鉴定。总共成功鉴定出 30 个蛋白质;其中在胰腺癌高表达的蛋白质点有 19 个,在癌旁组织高表达的有 11 个(表 1)。

表 1 胰腺癌和癌旁组织中差异表达的蛋白

功能分类	NCBI ID	蛋白名称	M_r^a/p^b	覆盖率 ^c (%)	表达趋势 ^d
蛋白酶	gi:119339	α -烯醇酶	47.01/6.99	64	T > N
	gi:2507461	蛋白质二硫化物异构酶 A3	56.75/5.98	56	T > N
	gi:12644008	胞苷酸激酶	22.21/5.44	71	T > N
	gi:127981	核苷二磷酸激酶	17.14/5.83	58	T > N
	gi:51702775	亲环素 A	17.87/7.82	52	T > N
	gi:1730201	脘基转移酶	48.42/8.26	21	T < N
	gi:113600	乙醛还原酶	36.42/6.34	38	T < N
	gi:136413	阴离子胰蛋白酶原	26.47/4.78	24	T < N
	gi:117617	糜蛋白酶原 B 前体	27.85/6.79	26	T < N
	gi:1729976	酮糖转移酶	67.83/7.58	13	T < N
	gi:399196	羧肽酶 A1	47.11/5.45	24	T < N
	gi:120649	3-磷酸甘油醛脱氢酶	35.9/8.58	32	T < N
	抗氧化蛋白	gi:38503333	锰超氧化物歧化酶	22.13/6.86	54
gi:548453		过氧化氧化还原蛋白 1	22.1/8.27	47	T > N
gi:1351361		Rieske 铁硫蛋白	29.63/8.55	20	T < N
信号转导蛋白	gi:56404943	肿瘤基因 DJ-1	19.88/6.33	71	T > N
	gi:398953	14-3-3 sigma	27.76/4.68	63	T > N
	gi:116533	从生蛋白	52.46/5.89	10	T < N
钙结合蛋白	gi:136479	翻译控制肿瘤蛋白	19.58/4.84	44	T > N
	gi:113950	annexin II	38.45/7.56	43	T > N
	gi:729022	巨噬细胞成帽蛋白	38.49/5.88	33	T > N
	gi:400042	应激诱导磷蛋白 1	62.6/6.4	30	T < N
	gi:547749	细胞角蛋白 10	59.48/5.13	27	T > N
结构蛋白	gi:56757569	微管蛋白 β -2 链	49.64/4.78	44	T > N
	gi:3123283	转胶蛋白	22.47/8.88	67	T > N
	gi:136090	原肌球蛋白 2	32.83/4.66	45	T > N
	gi:19855073	热休克蛋白 27	22.77/5.98	32	T > N
分子伴侣	gi:123644	热休克相关蛋白 71	71.2/5.49	23	T > N
	gi:121047	I γ -4 c 链	35.92/7.18	16	T > N
其他	gi:113576	血浆白蛋白前体	69.32/5.92	22	T < N

注: M_r^a 为匹配蛋白质的理论分子质量(kD); p^b 为匹配蛋白质的理论等电点;覆盖率^c 为鉴定出的肽段占总肽段的比率;表达趋势^d:T 为肿瘤组织;N 为癌旁组织

2.3 差异表达蛋白 annexin II 的表达差异验证结果

以 β -actin 为内参照,用 Western blot 分析 annexin II 在胰腺癌和癌旁组织中的表达情况如下:annexin II 在癌旁组织中的表达微弱,而在其对应的肿瘤组织中的表达明显(图 2)。

免疫组化结果表明,annexin II 在胰腺癌组织的细胞膜上有较强表达,细胞膜呈棕黄色;在癌旁胰腺组织的细胞膜中表达程度明显降低,细胞膜多不着色(图 3)。88.6% 的肿瘤组织(31/35)

的 annexin II 表达阳性,显著高于癌旁组织(34.2%,12/35)($P < 0.05$)。

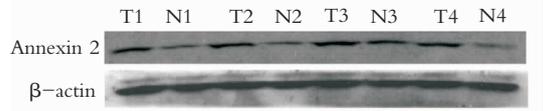


图 2 Western blot 分析检测 annexin II 的表达差异 T1,T2,T3 和 T4 为胰腺癌组织;N1,N2,N3 和 N4 为配对的癌旁组织

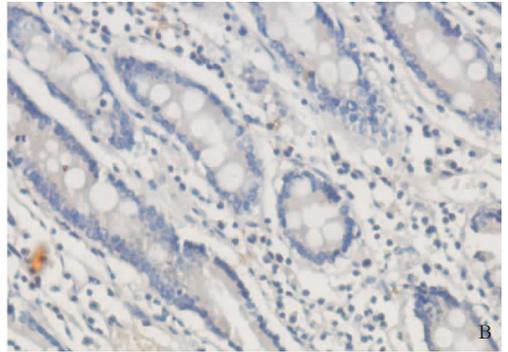
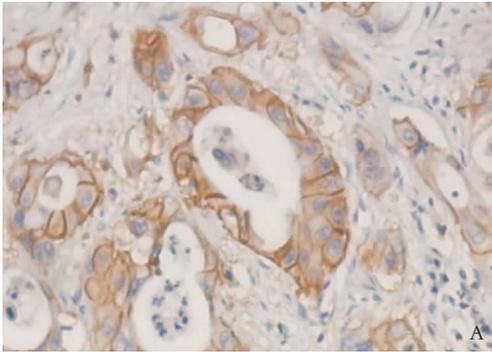


图 3 免疫组化检测 annexin II 的表达差异 A:胰腺癌组织;B:癌旁组织

3 讨论

胰腺癌的发生、发展是多因素、多步骤的复杂过程。目前对胰腺癌在基因水平上的变化已有较多的研究报道^[4]。但这些基因在胰腺癌中究竟如何发挥作用,仍须经过对基因功能的执行体——功能性蛋白的研究才能解决。近来兴起的蛋白质组学研究可以动态、整体、定量地检测肿瘤发生、发展过程中蛋白种类和数量的改变,有助于寻找和鉴定与肿瘤诊断及预后相关的标志物及药物治疗的靶点^[5]。

本实验在组织水平上进行蛋白质组学研究,获取了胰腺癌和癌旁组织的蛋白质差异表达谱。初步分析鉴定出 30 个差异表达蛋白,其中有一些与肿瘤发生、发展相关。根据其功能将这些差异表达蛋白分为以下几类:(1)蛋白质酶类,如亲环素 A 等。亲环素 A 在非小细胞型肺癌等多种肿瘤中表达异常,其致瘤机制可能与影响细胞生长和分化、转录调控、细胞信号通路以及免疫抑制等生理过程有关^[6]。(2)抗氧化蛋白类,如过氧化氧化还原蛋白 1 (PRDX-1) 等。有报道^[7]称,PRDX-1 在膀胱癌、肺癌、及乳腺癌中表达升高,其机制可能与癌组织中 DNA 氧化损伤有关。(3)信号转导蛋白类,如 14-3-3 sigma 等。14-3-3 sigma 是一种抗凋亡因子,能通过控制靶

蛋白的亚细胞定位以及调节关键酶的活性等机制抑制凋亡的发生,进而与肿瘤的发生相关^[8]。(4)钙结合蛋白,如 annexin II 等。(5)结构蛋白类,如原肌球蛋白 2 等。原肌球蛋白 2 在胰腺癌中表达上调^[9],其产物肌动蛋白是细胞骨架的重要组成部分,是保持肿瘤细胞恶性特质所必需。(6)分子伴侣类及其他,如热休克蛋白 27 (HSP27) 等。HSP27 除作为分子伴侣保护细胞外,还具有调节细胞凋亡,影响细胞骨架及细胞迁移作用等多种生物学功能,并可作为独立判断多种肿瘤预后的分子指标^[10]。

annexin II 是 annexin 蛋白家族的成员,除了参与一系列依赖 Ca^{2+} 的膜性生物学活动,还具有稳定细胞骨架以及参与细胞增殖等多种生物学功能。annexin II 能结合肿瘤细胞膜上的组织纤维蛋白溶解酶原激活因子和金属基质蛋白酶,导致胞外基质蛋白水解进而促进肿瘤细胞的侵袭^[11]。在大多数肿瘤中,包括肺癌、结肠癌以及肾癌中均可观察到 annexin II 过表达现象;同时在胰腺癌的肿瘤浸润灶和转移灶中也发现 annexin II 蛋白表达量增高^[12]。与上述文献结果一致,本实验 Western blot 和免疫组化结果显示 annexin II 在胰腺癌表达上调。因此,annexin II 可能成为一个潜在的胰腺癌诊断标志物;同时推测,annexin II 在肿瘤侵袭力方面的重要作用也使其有可能成

为控制胰腺癌生长的治疗靶点。

本实验应用蛋白质组学研究方法双向凝胶电泳和质谱技术分析鉴定胰腺癌组织和癌旁组织间的差异表达蛋白,并初步筛选出几种可能的潜在胰腺癌诊断标志物。关于这些蛋白质在时序上的动态表达规律和功能学上的意义尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Li D, Xie K, Wolff R, *et al.* Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2004, 363 (9414): 1049 - 1057.
- [2] Li C, Chen Z, Xiao Z, *et al.* Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309 (1): 253 - 260.
- [3] Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrièche M, *et al.* Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2006, 208 (5): 673 - 685.
- [4] 冯延平, 黄涛, 高军, 等. EphA2 与 E-cadherin 在胰腺癌中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (12): 914 - 917.
- [5] Wulfskuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (4): 267 - 275.
- [6] Campa MJ, Wang MZ, Howard B, *et al.* Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and

cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (7): 1652 - 1656.

- [7] Karihtala P, Mantyniemi A, Kang SW, *et al.* Peroxiredoxins in breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (9): 3418 - 3424.
- [8] Xing H, Zhang S, Weinheimer C, *et al.* 14 - 3 - 3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades [J]. *Embo J*, 2000, 19 (3): 349 - 358.
- [9] Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, *et al.* Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (24): 8614 - 8622.
- [10] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10 (2): 86 - 103.
- [11] Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, *et al.* Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro [J]. *Gut*, 2004, 53 (7): 993 - 1000.
- [12] Vishwanatha JK, Chiang Y, Kumble KD, *et al.* Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14 (12): 2575 - 2579.

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》(ISSN 1005 - 6947/CN43 - 1213/R)由国家教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。国内外公开发行人(国内邮发代号:42 - 121;国际代码:M6436)。主编吕新生教授,顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、裘法祖、黎介寿等十多位国内外著名普通外科专家担任,编委会由全国各地普通外资深专家、学科带头人近 80 人组成。出版周期短,时效性强。以传播现代普外科学的新理念、新技术、新方法,以及普通外科领域的理论、实践、基础研究和相关方面的最新进展为宗旨,以开展国内外学术交流,促进普通外科学科发展为己任,服务于普外临床、教学、科研工作者。

《中国普通外科杂志》为中国科技论文核心期刊,设有栏目为述评、专家论坛、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、误诊误治与分析、手术经验与技巧、文献综述、病案报告、国内外学术动态等,目前本刊已进入多个国内外重要检索系统和数据库,如美国化学文摘(CA),俄罗斯文摘(AJ),中国科学引文数据库(CSCD),中国科技论文与引文数据库,中国学术期刊综合评价数据库,中国期刊网全文数据库,中文科技期刊数据库,中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),万方数据 - 数字化期刊群,中国生物医学期刊光盘版等。创刊 15 年,多次获奖,2004 年获全国高校优秀科技期刊,2005 年获湖南省十佳科技期刊。

2007 年《中国普通外科杂志》(月刊),国际标准开本(A4),每期 80 页,每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷,封面美观大方。定价 9.50 元/册,全年 114 元。欢迎到全国各地邮局订购,邮发代号:42 - 121。

编辑部可办理邮购。编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(湘雅医院内),邮政编码:410008,电话(传真):0731 - 4327400, E-mail: zpwzcn@gmail.com; pw4327400@126.com; jcgssyxc@126.com。