

· 基础研究 ·

胃腺癌伴淋巴结转移的蛋白质组学分析*

陈 茉 丁士刚** 刘琳娜 张 静 姜雅欣^① 杨 彬^① 刘 丹^①

(北京大学第三医院消化内科, 北京 100191)

【摘要】 目的 筛选出参与胃腺癌淋巴结转移过程的相关蛋白。 方法 标本来源: 2 例中分化腺癌, 淋巴结未侵及; 1 例低分化腺癌, 1 例低分化腺癌局灶伴印戒细胞癌分化, 胃小弯侧淋巴结可见癌转移。裂解液、超声破碎法提取胃腺癌组织总蛋白, 经双向电泳后获得胃腺癌组织蛋白质图像, 运用 PDQuest 软件进行图像分析, 找到胃腺癌伴淋巴结转移和胃腺癌不伴淋巴结转移的差异蛋白质。应用四级杆飞行时间电喷雾串联质谱 (Q-TOF) 鉴定差异表达的蛋白质。最后用 Mascot 数据库进行检索。 结果 与胃腺癌不伴淋巴结转移相比, 胃腺癌伴淋巴结转移中有 2 个蛋白质点高表达, 质谱鉴定结果为胃蛋白酶 A (pepsin A)、巨噬细胞加帽蛋白 (macrophage-capping protein); 在胃腺癌不伴淋巴结转移中有 1 个蛋白质点高表达, 质谱鉴定结果为免疫球蛋白 κ 链恒定区 (Ig κ chain C region)。 结论 巨噬细胞加帽蛋白在伴淋巴结转移胃腺癌组织中高表达, 推测其可能在胃腺癌淋巴结转移发生中发挥着一定作用。

【关键词】 胃肿瘤; 淋巴结转移; 蛋白质组

中图分类号: R735.2

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2012)04-0359-05

Proteomic Analysis of Gastric Adenocarcinoma with Lymph Node Metastasis Chen Mo, Ding Shigang, Liu Linna, et al.
Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 **Objective** To screen out the protein that plays a role in lymph node metastasis of gastric adenocarcinoma. **Methods** Specimens were collected from 2 patients with moderately differentiated adenocarcinoma without lymph node invasion, 1 patient with poorly differentiated adenocarcinoma, 1 patient with poorly differentiated adenocarcinoma with focal signet ring cell carcinoma and invasion to the lymph node of the arcus minor ventriculi. We extracted whole-tissue protein from the gastric adenocarcinoma by using lysis buffer and sonication, and then obtained the protein maps of the gastric adenocarcinoma by two-dimensional gel electrophoresis. Differentially expressed protein spots were analyzed by PDQuest software and identified by electrospray ionization quadrupole time of flight tandem mass spectrometry (Q-TOF), afterwards all these proteins were searched in Mascot database. **Results** Compared with gastric adenocarcinoma without lymph node metastasis, two protein spots were highly expressed in gastric adenocarcinoma with lymph node metastasis. Mass identification identified that the two proteins were Pepsin A and Macrophage-capping protein; On the contrary, in gastric adenocarcinoma without lymph node metastasis, one protein was significantly expressed and the protein was Ig κ chain C region. **Conclusion** Macrophage-capping protein in gastric adenocarcinoma with lymph node metastasis is highly expressed, suggesting that the protein plays a potential role in the lymph node metastasis of gastric adenocarcinoma.

【Key Words】 Gastric neoplasm; Lymph node metastasis; Proteome

胃癌致死率居所有肿瘤致死率的第二位^[1]。胃癌致死的主要原因之一是转移。而淋巴结转移则是胃癌的主要转移方式,即使是早期胃癌,其淋巴结转移率也可达 17.5%^[2],且手术后常规病理检查阴性的前哨淋巴结仍然有 13.1% 的微转移率^[3]。因此,认识胃癌淋巴结转移的分子机制将有助于对胃癌转移做出早期诊断并指导临床治疗,这对提高胃

癌的治疗水平和改善防治措施具有重要的意义。

蛋白质组学随时间、地点、环境等条件变化,能动态反映机体病理情况下蛋白质组成成分、表达水平、修饰状态,揭示蛋白质在生命活动中的作用。本研究利用蛋白质组学相关技术,研究胃腺癌伴或不伴淋巴结转移患者的组织蛋白表达差异,旨在初步探讨胃腺癌淋巴结转移机制。

* 基金项目:国家自然科学基金(30770980)

** 通讯作者, E-mail: dingshigang222@163.com

① (北京大学医学部医药卫生分析中心, 北京 100191)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 4 例标本取自 2011 年 4~6 月在我院手术的胃腺癌患者,男 3 例,女 1 例。年龄 57~64 岁,平均 61 岁。术前未进行放化疗等治疗,术后病理:2 例为中分化腺癌,淋巴结未侵及;1 例为低分化腺癌,1 例为低分化腺癌局灶伴印戒细胞癌分化,胃小弯侧淋巴结可见癌转移。

1.1.2 试剂 尿素、二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)为北京拜尔迪生物公司产品,蛋白定量试剂盒、pH 3-10 非线性胶条、固相化 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)缓冲液、碘乙酰胺、丙烯酰胺、胰酶、两性电解质 Bio-lyte 3/10、三羟甲基氨基甲烷(Tris)均为 Bio-rad 公司产品。蛋白酶抑制剂(cocktail)为 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.1.3 仪器 DH6000 型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司),PROTEAN IEF Cell、PROTEAN xi Multi-Cell、Model 550 酶标仪(美国 Bio-rad),四级杆飞行时间电喷雾串联质谱(Q-TOF Ultima Global)(美国 Waters)、CapLC(毛细管液相色谱)(美国 Waters),IPGphor 等电聚焦仪、垂直电泳槽、凝胶图像分析软件、扫描仪均为 Bio-rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的处理 离体后将组织块用 1×PBS 缓冲液进行反复清洗,以去除血液,尽可能剪去多余的其他组织,储存于液氮。

1.2.2 胃腺癌组织总蛋白的提取及蛋白质定量 将冻存于液氮的胃腺癌组织块取出,称重后用研钵加液氮研磨,并加入组织裂解液 60~100 mg/ml[7 mol/L 尿素(urea),2 mol/L 硫脲(thiourea),4% CHAPS,65 mmol/L DTT,40 mmol/L Tris,2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),0.2% Bio-lyte,10 μl/ml 蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitor cocktail)],待溶液完全融化后转移入 EP 离心管后冰浴超声破碎,3 s/次,间歇 10 s/次,共 8 次。冰浴 30 min,17 000 r/min,15℃,离心 60 min,收集上清。采用 Bradford 法(应用 Bradford 试剂盒)进行蛋白质定量。4 个样本分别提取总蛋白,并进行分装。

1.2.3 双向电泳 ①第一向等电聚焦:采用 IPG 预制胶条(17 cm pH 3~10,非线性),银染上样量为 100 μg,向样品中加入水化上样缓冲液至总体积 300 μl。设置聚焦仪程序为:50 V,12 h,被动水化;200 V,30 min,线性,除盐;500 V,1 h,线性,除盐;1000 V,1 h,线性,除盐;10 000 V,5 h,线性,升压;10 000 V,70 000 Vh,快速,聚焦;500 V,10 h,快速,

保持。②平衡:等电聚焦(IEF)结束后,将胶条取出置于平衡缓冲液 I(含 DTT 0.02 g/ml)和 II(含碘乙酰胺 0.025 g/ml)中各震荡 15 min。③第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:配置 12% 丙烯酰胺凝胶,将平衡后的 IPG 胶条移至 0.75 mm 厚的 12% 凝胶上端,并在一端加入蛋白质标准品,排尽气泡后,用含痕量溴酚蓝的低熔点琼脂糖封固,先用低恒电流(10 mA),再加大电流(35 mA),待溴酚蓝指示剂到达底部边缘时即停止电泳。每个样本分别进行 3 次电泳,获得分辨率较高,重复性较好的二维电泳(2-DE)图谱。

1.2.4 图像分析 蛋白质经银染后用 DUOSCAN T1200 扫描仪进行反射和透射扫描,PDQuest 软件结合人工校正对凝胶图像进行灰度值校正、蛋白质点的检测、匹配,分别以各组中 2-DE 效果好、点数多的一块胶为参考胶,进行组间的匹配分析。具体方法:先对每组内 2 个样本同时出现的蛋白点进行标记,消除个体差异;再对标记点进行组间比较。比较分析蛋白质 2-DE 图谱的差异,切取差异表达蛋白质点进行胶内酶解。

1.2.5 差异蛋白点的质谱分析 利用 Q-TOF 鉴定差异蛋白质点。毛细管液相色谱梯度洗脱脱盐后,1.4 μl 直接上样,采用 Q-TOF 分析。二级质谱得到的图谱经 MaxEnt3 软件处理后可以对该肽段氨基酸的序列进行鉴定。经串联质谱分析,获得肽序列标签(peptide sequence tag, PST),用 Mascot 软件搜索 NCBI 非冗余蛋白质数据库,其中以匹配分值(MOWSE score)为基础的概率(P)评价数据库搜寻结果的质量,匹配分值的大小表示鉴定蛋白属于随机匹配蛋白的可能性,当匹配分值达到或超过 64 分时,待测蛋白的氨基酸序列与数据库中某已知蛋白的氨基酸序列覆盖率较高,认为匹配的可能性很大,统计学上有意义($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 二维凝胶电泳图谱及图像分析

控制在相同条件下提取胃腺癌伴和不伴淋巴结转移组织总蛋白,分别进行 3 次双向电泳,各组蛋白表达谱类似。胃腺癌不伴淋巴结和伴淋巴结转移双向电泳图像见图 1。应用图像分析软件对电泳图谱进行分析,两者的蛋白质点数目分别为 540 ± 90 和 620 ± 95 。

通过 PDQuest 软件结合手工进行组成分析比较,寻找胃腺癌伴淋巴结转移组和胃腺癌不伴淋巴结转移组之间差异蛋白质点,结果为 2 个点在胃腺癌伴淋巴结转移中高表达(图 3 中的点 3,图 4 中的点 4),2 个点在胃腺癌不伴淋巴结转移中高表达(图 2)。对这 4 个蛋白质点进行质谱分析。

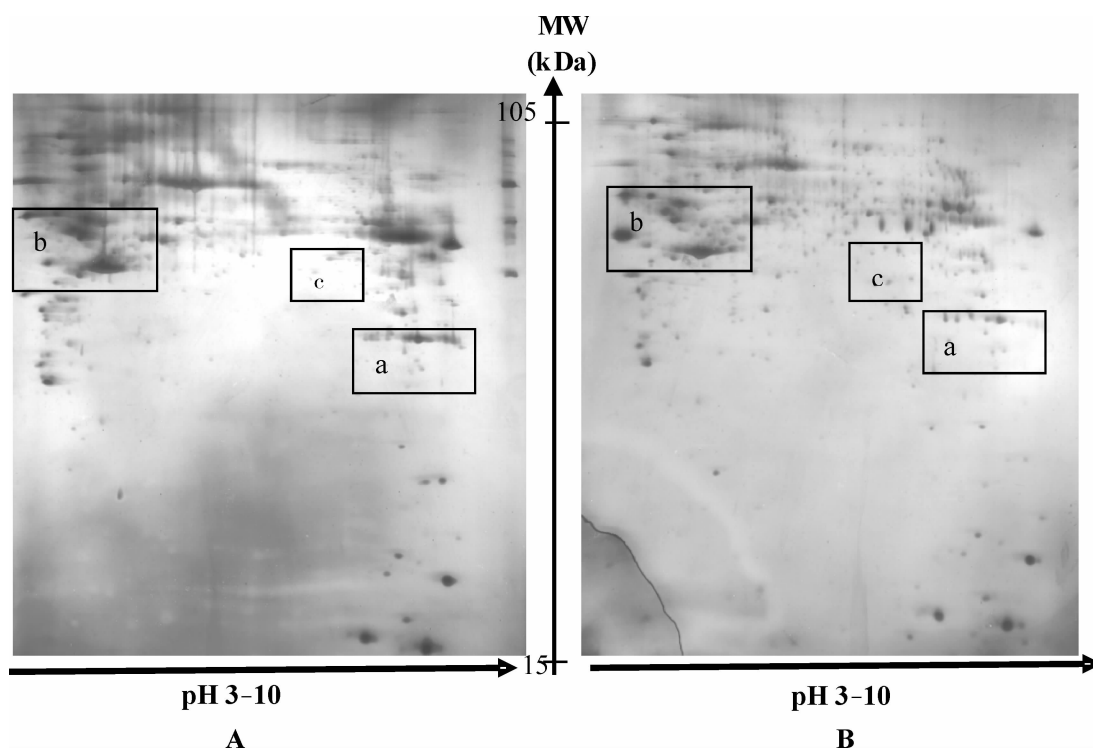


图 1 胃腺癌不伴淋巴结转移 (A) 和伴淋巴结转移 (B) 双向电泳图像 (方框中为取材位置, a - 图 2; b - 图 3; c - 图 4)

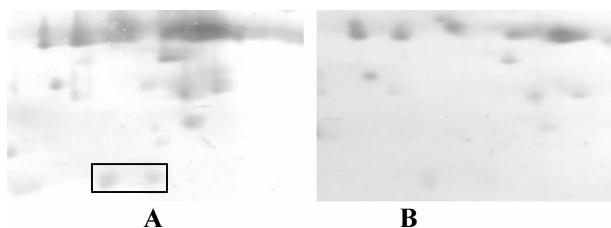


图 2 点 1、2 的位置

(A: 不伴淋巴结转移; B 伴淋巴结转移)

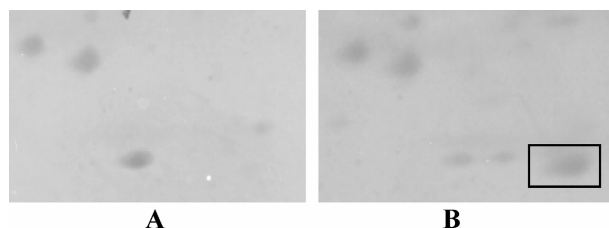


图 4 点 4 的位置

(A: 不伴淋巴结转移; B 伴淋巴结转移)

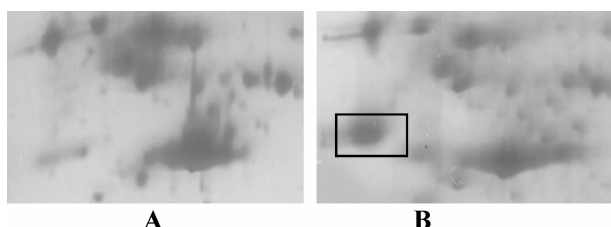


图 3 点 3 的位置

(A: 不伴淋巴结转移; B 伴淋巴结转移)

2.2 蛋白质鉴定结果

利用 Q-TOF 对上述 4 个蛋白质点进行鉴定 (图 5), 并用 Mascot 数据库进行检索, 检索结果见表 1。伴淋巴结转移胃腺癌组织高表达的蛋白质为胃蛋白酶 A (pepsin A)、巨噬细胞加帽蛋白 (macrophage-capping protein); 不伴淋巴结转移胃腺癌组织高表达的蛋白质为免疫球蛋白 κ 链恒定区 (Ig κ chain C region)。

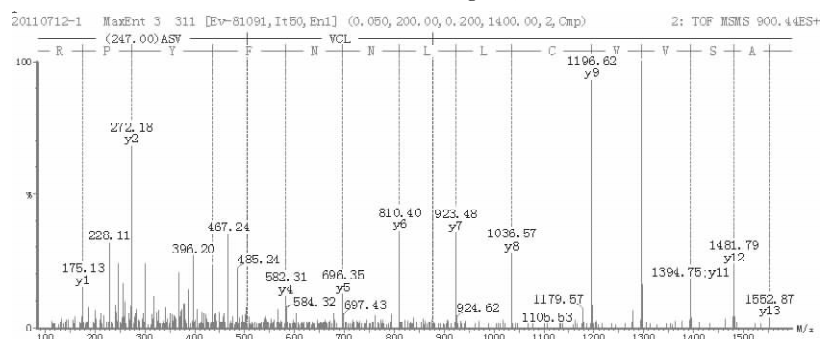


图 5 图 2 中点 1、2 免疫球蛋白 κ 链恒定区的 Q-TOF 质谱图, 质荷比为 900.44 的氨基酸序列其相应序列为 SGTASVCLLNIFYPR

表 1 差异蛋白质检索结果

编号	中文名称	英文名称	等电点	相对分子质量	MOWSE 得分
1,2	免疫球蛋白 κ 链恒定区	Igκ chain C region	5.58	11 773	517,256
3	胃蛋白酶 A	pepsin A	4.16	42 350	97
4	巨噬细胞加帽蛋白	macrophage-capping protein	5.82	38 760	130

3 讨论

蛋白质组能动态、整体、定量地观察肿瘤发生、发展过程中蛋白种类和数量的变化,其相关技术是研究肿瘤的有力工具。以往研究以胃癌细胞系简化研究对象,减少胃癌间质的影响。Takikawa 等^[4]应用 2-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE)研究表明在高转移能力的胃癌细胞系中高表达多个蛋白,包括膜联蛋白、细胞角蛋白、tRNA 合成酶和代谢酶。Chen 等^[5]应用相同的方法,在高胃癌转移细胞系发现超过 200 种蛋白高表达,包括联蛋白、整联蛋白和组织蛋白酶。但其与病人的真实胃癌组织存在明显变异,肿瘤细胞和周围间质的相互作用促进肿瘤的形成和发展,在肿瘤间质中特异表达的蛋白质与肿瘤的发生密切相关^[6]。本研究以手术切除胃腺癌组织伴或不伴淋巴结转移为研究对象,包括中、低分化的胃腺癌细胞和间质,裂解液、超声破碎法提取胃腺癌组织总蛋白,双向电泳分离蛋白,银染获得分辨率较高、重复性较好的蛋白质图像,PDQuest 软件分析、比较胃腺癌伴或不伴淋巴结转移差异表达的蛋白质点,应用 Q-TOF 鉴定蛋白质,用 Mascot 数据库进行检索。研究结果为胃蛋白酶 A、巨噬细胞加帽蛋白(CapG)在伴淋巴结转移胃腺癌组织中高表达,免疫球蛋白 κ 轻链恒定区(Igκ chain C region)在不伴淋巴结转移胃腺癌组织中高表达。其中 Igκ chain C region 特别是 CapG 与肿瘤关系密切,具有重要的意义。下面对这 2 个蛋白进行阐述,重点介绍 CapG。

经典免疫学理论认为 Igκ chain C region 等免疫球蛋白只有在成熟的 B 细胞表达,但近年多个研究结果表明在上皮性肿瘤细胞表达免疫球蛋白。1991 年曹亚等^[7]从人类鼻咽癌细胞系 CNE2 基因组 DNA 文库中克隆一个恶性转化基因 Tx 转染小鼠 JB6⁺细胞,使细胞恶性转化,后续的研究证实 Tx 是一个缺乏 V 区的异常的人类免疫球蛋白 κ 轻链基因^[8]。进一步观察到在一系列上皮来源的肿瘤细胞包括 MCF-7(人乳腺癌细胞系)、MGC(人胃癌细胞系)、SW480(结肠癌细胞系)、HeLa(人宫颈癌细胞系)、鼻咽癌细胞系及鼻咽癌组织也表达 Igκ 恒定区蛋白及 mRNA^[8],并观察到 Igκ 异位表达与宫颈组织病变阶段具有相关性^[8]。同时,用免疫组化、蛋白免疫印迹等方法观察到多种免疫球蛋白重链恒

定区、可变区及 TCR 在多种肿瘤组织及上皮性肿瘤传代细胞系中有表达。上述研究表明,非淋巴细胞系来源的肿瘤细胞表达免疫球蛋白并非偶然性现象,其与肿瘤的发生、发展与转移的相关性及与机体抗肿瘤免疫的关系需要进一步的探讨。

CapG,巨噬细胞加帽蛋白,由 348 个氨基酸组成,是一种重要的肌动蛋白结合蛋白,其通过切断、封端肌动蛋白丝,或使肌动蛋白聚集成核等方式来控制肌动蛋白的结构。这个小分子蛋白(39 kDa)分布在细胞的胞浆和胞核。对 CapG 的研究始于其在正常细胞移动中具有一定作用。Witke 等^[9]研究表明,CapG 是受体介导的巨噬细胞边缘波动所必需的。另外,CapG 过表达可提高成纤维细胞的移动能力,同时也可调节内皮细胞的移动^[10]。然后,CapG 对细胞骨架形成的作用也影响着细胞形态、动力、黏附及生长调节,这些都与肿瘤的浸润和转移密切相关。因此启发研究者从基因组学水平研究 CapG 与肿瘤发生、发展的关系,通过筛选 mRNA 数据库和分析真实临床样本的 cDNA 和 mRNA 水平,并与配对正常和肿瘤组织相比,CapG 高表达于乳腺癌,特别是转移性乳腺癌,以及胰腺癌和卵巢癌^[11,12]。对人恶性胶质瘤(脑肿瘤中侵袭力最高的肿瘤)mRNA 的全面分析显示,CapG 高表达 8 倍^[13]。CapG 还与眼部黑色素瘤相关^[14]。此外,在肺腺癌中 CapG 和免疫应答基因的表达与基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达高度相关^[15]。

随着蛋白质组学理论和技术的成熟,需要从蛋白水平验证基因组学实验结果,并且进一步探明 CapG 在肿瘤发生、发展中的具体作用机制。前期多个研究表明,CapG 在多类肿瘤细胞系中高表达,并通过体外实验证实下调其表达将影响肿瘤细胞的移动能力。Thompson 等^[12]观察到 CapG 在 3 种胰腺癌细胞系中均高表达,RNA 干扰抑制后,共培养和划痕试验结果均显示细胞移动能力明显降低,提示缺乏有效的 CapG,可能通过影响肌动蛋白干扰细胞骨架的重组,从而引起细胞移动能力下降。可能是由于缺乏凝溶胶蛋白剪切微丝产生的短肌动蛋白丝,或者是由于 CapG 封闭倒刺末端失去抑制作用,引起肌动蛋白丝的过度延伸^[16]。同样,在其他一些肿瘤细胞系的研究中也得到验证,如 PC-3(前列腺癌细胞系)或 MDA-MB 231(乳腺癌细胞系)下调 CapG 的表达显著降低细胞的移动能力^[16]。反之,

上调 CapG 基因的表达,可以增加胰腺癌细胞的侵袭能力,提示 CapG 在胰腺癌浸润转移方面起重要作用^[12]。

CapG 在各种肿瘤组织的表达情况及临床意义也有相关报道。Thompson 等^[12]的研究已证实 CapG 在胰腺癌组织的高表达。临床分析表明, CapG 在鼻咽癌间质中的表达升高,并与鼻咽癌的分化及临床分期相关,但关于 CapG 在间质细胞上的定位和功能还有待进一步研究^[17]。与不伴糖尿病组相比, CapG 在伴糖尿病的胰腺癌组显著高表达,且伴糖尿病组患者生存期缩短,提示两者可能有一定的相关性, CapG 可能加速浸润转移、病情进展^[18]。从上述国内外对 CapG 与肿瘤发生、发展尤其是与肿瘤转移关系的研究结果推测, CapG 在胃腺癌淋巴结转移组织中高表达具有一定意义,可能在胃腺癌淋巴结转移发生中发挥着一定作用,为胃腺癌发生转移的机制提供新视野,也为抑制胃腺癌的转移提供新的靶蛋白。

蛋白质是生命活动的执行者,在蛋白质组学水平研究肿瘤的发生发展必不可少,并形成了“肿瘤蛋白组学”分支。本研究利用蛋白质组学技术初步筛选与胃腺癌淋巴结转移相关蛋白,研究结果显示: Igκ chain C region 在胃腺癌组织中高表达,但另需要注意的是:不能完全排除 B 细胞的掺杂,干扰了实验结果。且本实验样本例数较少,需扩大样本量,或通过免疫组化、蛋白免疫印迹进一步验证实验结果。与不伴淋巴结转移胃腺癌相比,巨噬细胞加帽蛋白高表达于伴淋巴结转移胃腺癌,但其在胃腺癌伴淋巴结转移发生、发展中的具体作用仍需大量进一步研究。

参考文献

- 1 Hotta K, Oyama T, Akamatsu T, et al. A comparison of outcomes of endoscopic submucosal dissection (ESD) For early gastric neoplasms between high-volume and low-volume centers: multi-center retrospective questionnaire study conducted by the Nagano ESD Study Group. *Intern Med*, 2010, 49(4): 253 – 259.
- 2 王婕敏, 周丽雅, 林三仁, 等. 早期胃癌淋巴结转移规律及其影响因素分析. *中华内科杂志*, 2010, 49(4): 297 – 300.
- 3 Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, et al. Evaluation of sentinel node concept in gastric cancer based on lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Ann Surg*, 2006, 243(3): 341 – 347.
- 4 Takikawa M, Akiyama Y, Maruyama K, et al. Proteomic analysis of a highly metastatic gastric cancer cell line using two-dimensional differential gel electrophoresis. *Oncol Rep* 2006, 16: 705 – 711.
- 5 Chen YR, Juan HF, Huang HC, et al. Quantitative proteomic and genomic profiling reveals metastasis-related protein expression patterns in gastric cancer cells. *J Proteome Res*, 2006, 5: 2727 – 2742.
- 6 Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes- bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(11): 839 – 849.
- 7 Cao Y, Sun Y, Poirier S, et al. Isolation and partial characterization of a transformation-associated sequence from human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*, 1991, 4(4): 297 – 307.
- 8 Li M, Ren W, Weng XX, et al. Nucleotide sequence analysis of a transforming gene isolated from nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2: an aberrant human immunoglobulin kappa light chain which lacks variable region. *DNA Seq*, 2001, 12(5 – 6): 331 – 335.
- 9 Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, et al. Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol*, 2001, 154(4): 775 – 784.
- 10 Pellieux C, Desgeorges A, Pigeon CH, et al. Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 29136 – 29144.
- 11 Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, et al. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J Pathol*, 2005, 205(1): 21 – 28.
- 12 Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S, et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility. *Gut*, 2007, 56(1): 95 – 106.
- 13 Lal A, Lash AE, Altschul SF, et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res*, 1999, 59(21): 5403 – 5407.
- 14 Van Ginkel PR, Gee RL, Walker TM, et al. The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1448(2): 290 – 297.
- 15 Creighton C, Hanash S. Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) in adenocarcinomas strongly correlated with expression of immune response genes. *In Silico Biol*, 2003, 3(3): 301 – 311.
- 16 Van den Abbeele A, De Corte V, Van Impe K, et al. Down regulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro. *Cancer Lett*, 2007, 255(1): 57 – 70.
- 17 周琳, 王立顺, 陈国强. 胰腺癌伴糖尿病的蛋白质组学分析. *中华消化杂志*, 2008, 10(28): 699 – 701.
- 18 李美香, 肖志强, 彭芳, 等. LCM 纯化的鼻咽癌间质和正常鼻咽间质的定量蛋白质组学研究. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(9): 1122 – 1133.

(收稿日期: 2011 – 09 – 06)

(修回日期: 2012 – 02 – 07)

(责任编辑: 王惠群)