论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0302-04

膀胱癌T-24细胞系中细胞角蛋白20的分离纯化及鉴定

刘彦慧,罗春丽,吴小候,蔡晓钟 (重庆医科大学检验系实验诊断学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 分离纯化细胞角蛋白20(Cytokeratin20, CK20)并加以鉴定,为进一步研制抗CK20单克隆抗体奠定基础。**方法** 培养人膀胱肿瘤T-24细胞系并用免疫组化检测CK20表达,然后大量培养并收集细胞,超声波细胞粉碎后,先用萃取、高速离心、透析等方式进行蛋白初分离,然后利用以DE52为介质的阴离子交换层析分离纯化CK20蛋白,以电泳示踪,最后采用SDS-PAGE、HLPC和Western-blotting加以鉴定。**结果** 在阴离子交换层析时出现3组洗脱峰,CK20主要存在第二组峰中,该峰在SDS-PAGE和Western-blotting上均呈现单一条带,HLPC分析显示CK20蛋白主峰呈正态分布,仅见一个较低峰度的蛋白质杂峰。**结论** 该纯化方法简便、可行、效果好、获得的蛋白纯度高,提取的蛋白可确认为CK20并且具有较高的免疫生物活性。

关键词: 细胞角蛋白20;分离纯化;阴离子交换层析;人类膀胱癌T-24细胞

中图法分类号: Q503; Q512.6; R392-33 **文献标识码:** A

Purification and identification of cytokeratin20 from T-24 cell line of bladder cancer

LIU Yan-hui, LUO Chun-li, WU Xiao-hou, CAI Xiao-zhong (Department of Experimental Diagnostics, Faculty of Clinical Laboratory, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To purify and identify cytokeratin20 (Ck20) in order to produce monoclonal antibody of CK20. **Methods** Expression of CK20 was detected by immunohistochemistry after culture of T-24 cells. Then large number of cells were cultured and collected in our laboratory. After breaking cells by ultrasonic and separating roughly CK20 by extraction, centrifugation, and dialysis, DEAE-cellulose anion exchange chromatography was used for further purification. Finally, we identified CK20 by SDS-PAGE, Western-blotting, and high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** DEAE-cellulose anion exchange chromatography revealed three peaks. CK20 was in the second peak. SDS-PAGE and Western-blotting also showed a single band in the second peak. HPLC showed that the major peak of CK20 protein was distributed normally, except for a small peak. **Conclusion** Our methods are effective and the separated protein can be regarded as CK20 with high biological activity.

Key words: cytokeratin20; separation and purification; anion exchange chromatography; human T-24 cell line

细胞角质蛋白20 (Cytokeratin20, CK20)是Moll等[1]在1990年分离鉴定出来的Ⅰ型角质蛋白中间丝的一种,其在维持细胞的完整性,调节胞浆蛋白的利用、细胞信号传导、细胞分化、诱导肿瘤化疗耐药,参与肿瘤的发生、进展,以及细胞表面受体中起重要作用[1,2]。CK20特异地分布于上皮细胞及其来源的肿瘤,具有Ⅰ型角质蛋白的特征,但又不与其它的Ⅰ型角质蛋白的单克隆抗体发生交叉反应,具有严格的上皮细胞分布,使其成为诊断特定肿瘤如膀胱肿瘤的良好标记物[3]。

Moll于1992年研制获得抗CK20单克隆抗体,经组织、分化等方面研究发现CK20在胃肠道上皮及膀胱肿瘤的泌尿道上皮有表达,而正常组织上皮的表达却受到严格限制。近年来,该类研究日趋增多,特别在膀胱肿瘤研究方面。文献[4]显示,膀胱癌患者肿瘤组织中CK20阳性表达率为91.0%,而正常膀胱组织无表达;利用CK20免疫组化联合HE染色检测膀胱癌尿脱落细胞可大大提高膀胱癌检出阳性率[5]。总之,由于CK20的分布和表达特点,已成为国内外学者的研究焦点,但目前国内的抗CK20单克隆抗体一直依赖进口,价格昂贵,严重影响它的推广应用和研究。本研究论述CK20抗原分离纯化的研究成果,为下一步在国内率先研制抗CK20单克隆抗体奠定基础。

基金项目: 重庆市医学科研资助项目(2003-2-078)
Supported by the Scientific Research Foundation of Chongqing (2003-2-078)

作者简介: 刘彦慧(1971-),男,河南省清丰县人,硕士,主治医师,主要从事膀胱肿瘤基因诊断和基因方面的研究。电话:(023)68485223

通讯作者: 罗春丽,电话:(023)687485223

收稿日期: 2004-09-25; **修回日期:** 2004-10-12

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株及培养基　　人类膀胱肿瘤 T-24 细胞系由本实验室保存，1640 培养基为 Hyclone 公司产品。

1.1.2　主要试剂　　丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购置 Bebco 公司，蛋白标准为 Fermenta 产品，阴离子交换介质 DE52 为 Whatman 产品，免疫组化用 CK20 单克隆抗体来自 Neomarkers 公司。

1.1.3　主要设备　　蛋白电泳仪、转膜系统及凝胶成像及分析系统均为 Bio-Rad 公司产品，蛋白质层析系统为德国 LKB 产品。

1.2　方法

1.2.1　T-24 细胞系培养与收集　　细胞系的复苏、传代培养按常规进行，分批收集，PBS 洗涤 3 次，细胞计数后于 -80 ℃保存，共收集 $1,234\times10^9$ 个细胞。

1.2.2　T-2424 细胞株 CK20 表达的鉴定　　采用 16 孔培养板制备贴壁细胞，无水乙醇固定 30 min，3% 过氧化氢浸泡 10 min，胰酶消化 10 min，加 CK20 单抗，37 ℃温浴 30 min，二抗及 S-P 复合物各温浴 10 min，各步骤之间采用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次，最后 DAB 显色，镜下观察棕黄色阳性细胞。

1.2.3　分离和纯化

1.2.3.1　纯化前处理　　将上述收集保存的肿瘤细胞参照文献[1,6]按如下方式处理：①解冻：37 ℃水浴迅速解冻，低温离心（5 000 × *g* 离心 10 min），弃上清，用 2 倍体积 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.2（含 1.5 mol/L KCl，0.5% Triton X-100，5 mmol/L EDTA，0.4 mmol/L PMSF）缓冲液悬浮。②超声波粉碎细胞：以碎冰降温，间接进行（5 s × 240），共计 20 min，镜下观察细胞破碎率不低于 95%。③聚乙二醇浓缩：将溶液移入截留分子质量为 $15\,000\times10^3$ 的透析袋，两端扎紧，埋入聚乙二醇（Mr20000）中，置 4 ℃冰箱过夜。④萃取：将浓缩后溶液（约 6 ml）移入一个 100 ml 小烧杯中，加 5 倍体积 9.5 mol/L 尿素（含 5 mmol/L DTT，10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0），总量约 30 ml，混匀，于 4 ℃条件下萃取过夜。⑤离心：15 000 × *g*，离心 1 h。⑥透析：将离心上清液移入透析袋中，于 4 ℃条件下，对 8 mol/L 尿素（含 2.5 mmol/L DTT，30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0）透析过夜。⑦采用 Bradford 法蛋测定白浓度。

1.2.3.2　蛋白纯化　　利用阴离子交换层析纯化蛋白。层析前将蛋白溶液用聚乙二醇浓缩约为 6 ml，以 DE-52 为固定相，装 2× 150 cm 层析柱，缓冲液采用 8 mol/L 尿素（含 2.5 mmol/L DTT，30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0），以 0 ~ 100 mmol/L 盐酸胍为流动相进行梯度洗脱，流速 0.5 ml/min，分别收集蛋白峰进行鉴定。DE-52 前处理、装柱、平衡均按常规操作。

1.2.3.3　蛋白浓度测定　　按 Bradford assay 法进行[7]。既用 0.5% NaCL 为缓冲液，考马斯亮蓝为染料，牛血清白蛋白（BSA）为标准，取 5 支试管，蛋白浓度按次序梯度增加，595 nm 处测定吸光度值，空白管调零，绘制标准曲线，查取蛋白浓度。

1.2.4　蛋白鉴定

1.2.4.1　蛋白质分子质量测定　　采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），参照文献[7]进行两层不连续电泳，分离胶和浓缩胶浓度分别为 12% 和 5%，采用 Tris 缓冲体系统。将蛋白混合液和 5 × 上样缓冲液（20 μl + 5 μl）混合后煮沸 2 ~ 5 min，每孔上样 20 μl（约含蛋白 30 μg），电泳开始后，浓缩胶保持 80 mA，分离胶控制在 120 mA，电泳 2 h，考马斯亮蓝 R-250 染色，以蛋白标准做对照，凝胶成像分析系统分析蛋白条带。

1.2.4.2　纯度鉴定　　采用 HPLC 分析。取 20 μl 纯化物上样，在 280 nm 处测定蛋白峰。

1.2.4.3　蛋白质活性鉴定　　采用 Western-blotting。SDS-PAGE 电泳后，将蛋白转移至硝酸纤维素（PVDF）膜上，取下 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，加一抗（CK20 单抗）过夜，PPS 洗 3 次，加二抗（辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体），室温孵育 1 h，PBS 充分洗涤，DAB 显色，凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。

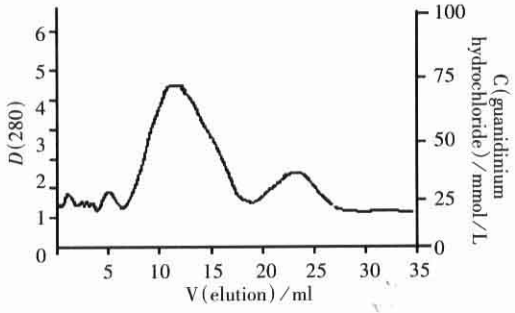
2　结果

2.1　T-24 细胞株具有 CK20 高表达

免疫组化结果可见大量棕黄色阳性细胞，占 80% 以上。

2.2　离子交换层析出现三组蛋白峰

上样后，采用 0 ~ 100 mmol/L 盐酸胍梯度洗脱，随着流动相浓度增加，一个低峰之后，盐酸胍浓度大约为 50 mmol/L 时可见一个幅度较大的峰，紧接着又出现第 3 个峰，大约在 65 mmol/L，分别收集蛋白峰进行蛋白浓度测定和鉴定（图 1）。



There are 3 major separated peaks after using a linear gradient from 0 to 100 mmol/L guanidinium hydrochloride for elution. The second peak is abroad more which may be CK20

图 1　T-24 细胞裂解液的阴离子交换层析峰

Fig 1　Anion-exchange chromatography of T-24 cells

2.3　SDS-PAGE 出现单一蛋白条带

从电泳图谱上看。未经阴离子交换层析纯化前的蛋白溶液，电泳染色后出现很多条带（图 2），这是说明人膀胱肿瘤 T-24 细胞株中蛋白种类繁多，而纯化后所收集的 3 组蛋白峰在电泳图谱上均出现单一条带，分别位于 66.2×10^3、45×10^3 和 35.0×10^3 附近，提示该层析法比较适合该蛋白的分离纯化，见图 2。

2.4　CK20 位于第二组峰中且纯度较高

电泳条带经凝胶成像分析可知，第 2 组峰的蛋白分子质量约为 46×10^3，可初步确定为 CK20。将该峰收集的样品经 HLPC 分析，出现单一峰，且成正态分布，又进一步说明蛋白纯度较高。

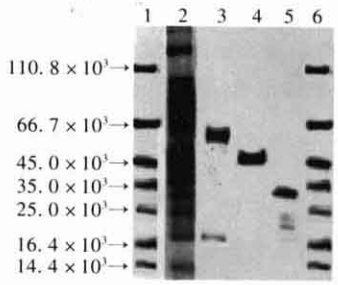
2.5　纯化 CK20 抗原免疫活性和特异性均较高

SDS-PAGE 电泳后，将蛋白条带转移到 PVDF 膜上，先后与 CK20 单抗和酶标二抗反应后，加底物显色，凝胶成像分析。结

果显示，在 PVDF 膜上呈现单一抗原抗体杂交带，无非特异性条带出现。结果见图 3。

2.6 Bradford 法测定蛋白质浓度

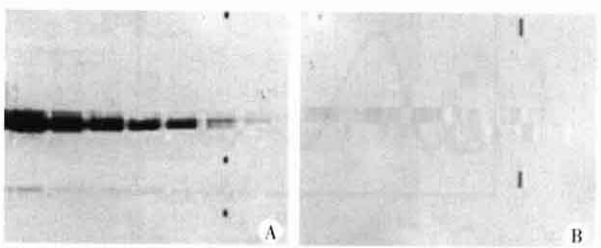
5 个 BSA 标准浓度管的 D 值分别是 0、0.089、0.169、0.232、0.292，蛋白溶液测定管 D 值是 0.250，以 D 值为纵坐标，BSA 浓度为横坐标绘制曲线。通过查该标准曲线得纯化前溶液蛋白浓度约为 1.65 μg/μl。



1,6: Protein molecular weight marker; 2: Protein bands of polypeptide fragments; 3: Protein band of the first peak; 4: Protein band of the second peak; 5: Protein band of the third peak

图 2 层析前细胞裂解液和层析后 3 个洗脱峰的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of polypeptide fragments and 3 peaks by chromatography



A: Immunoreactive bands of Western-bloting; B: Gel after translation

图 3 电泳后第二个洗脱峰的蛋白免疫印记分析

Fig 3 Western-blotting analysis of the second peak after SDS-PAGE

3 讨论

天然蛋白的分离纯化难度较大，主要原因之一是含量极少，因此，选择合适材料极为重要。本研究选择人膀胱肿瘤 T-24 细胞系做为纯化 CK20 蛋白的材料，目前尚少见报道，但从体外培养细胞系中提取蛋白屡见报道[1]。无论选择何种细胞系均应首先鉴定是否有目的蛋白存在，本研究利用免疫细胞化学方法证实了 T-24 细胞系具有 CK20 高表达，因此，从中提取 CK20 蛋白是可能的。

做为抗原用的蛋白必须保持免疫活性，为此，应严格控制纯化条件。蛋白在常温下极易失活，本研究整个过程在 4 ℃以下条件中进行。超声波粉碎细胞时，蛋白很快从细胞中释放出来，同时也释放很多蛋白酶而降解蛋白，为避免 CK20 被降解，在缓冲液中加入两种蛋白酶抑制剂 EDTA 和 PMSF，可抑制丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和金属蛋白水解酶等对蛋白的降解作用。

纯化方法的运用对于获得高纯度蛋白极为重要。凝胶过滤层析是以分子质量大小来分离蛋白的，而 CKs 至少有 20 个家族成员，分子质量彼此很接近。CK20 分子质量约为 46×10^3，其大小几乎居中，而且常与 CK8,18,19 形成异源或同源聚体。显然，凝胶过滤层析不适合 CK20 分离纯化。但其具有另外一个重要性质，既 CKs 家族根据酸碱性分为Ⅰ和Ⅱ两型，故离子交换层析可比较容易地将两型分开。本研究选用 DE-52 为介质的阴离子交换层析法，该介质呈弱碱性，带正电荷。Ⅰ型 CK 为酸性，在 pH 高于它们等电点的缓冲液中带负电荷。这样，Ⅰ型 CKs 可结合在 DE-52 上，而Ⅱ型 CKs 呈碱性，带正电荷，不能和 DE-52 结合或结合程度较轻而被除去。再者，CK20 属酸性 CKs，但酸性较弱，在 9.5 mol/L 尿素中 PI 约为 6.1，因此，和 DE-52 结合的程度也较弱，梯度洗脱时随着洗脱液离子强度增加可先被洗下。本研究以 100 mmol/L 盐酸胍为流动相，该溶液性质较温和，可减少对蛋白的破坏作用。由层析图可见，盐酸胍梯度洗脱时当浓度在 35、50、65 mmol/L 时，共出现 3 组峰被分别洗脱。

鉴定蛋白质最直观和简单的方法是采用 SDS-PAGE 电泳分析分子量。电泳及凝胶成像分析结果表明，第二组峰电泳条带的分子质量约为 46×10^3，这与 Moll 从人小肠粘膜上皮中提取的 CK20 的分子质量一致，可初步确定为 CK20 蛋白。第二组峰在 46×10^3 处呈现单一蛋白条带说明 CK20 的纯度较高，本研究又采用精确度较高的 RP-HLPC 进行分析，结果显示主峰成正态分布，这进一步说明纯化获得的蛋白纯度较高。但除主峰之外还可见一较低的蛋白峰，该蛋白可能是 CK18[1]，本研究未做鉴定。

蛋白质有无活性也是纯化成功与否之关键。免疫法是行之有效的最简便方法之一，我们采用 Western-blotting，该方法具有特异性高，样品用量少、敏感性强等特点。检测结果显示了单一且明显的抗原抗体杂交带，说明该蛋白具有较高的抗原活性。

文献[1]报道离子交换层析后，进一步采用 RP-HLPC、以氰化甲烷为流动相进一步纯化可得到纯度更高的 CK20 蛋白。但仍不能完全去除杂蛋白，另外，纯化程序越多，蛋白损失越多，而氰化甲烷对蛋白又有破坏作用，更重要的是制备单克隆抗体的抗原不需过高的纯度，因此我们没有做进一步纯化。

参考文献：

[1] Moll R, Schiller D L, Franke W W. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns[J]. J Cell Biol, 1990, 111(2): 567-580.

[2] Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz L K. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications[J]. Hsitol Histopathol, 1999, 14(2): 657-664.

[3] Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, *et al*. Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2000, 37(5): 601-604.

[4] Buchumensky V, Klein A, Zemer R, *et al*. Cytokeratin20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma[J]. J Urol, 1998, 60(6Pt1): 1971-1974.

[5] 罗春丽，吴小候，蔡晓钟，等。免疫组化技术检测膀胱癌尿脱落细胞角蛋白20的临床价值[J]. 中华检验医学杂志，2001，24(1)：42.

[6] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al*. Cytokeratin 20 in human carcinomas: A new histodiagnostic marker detected by monolonal antibodies[J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 427-447.

[7] 汪家政，范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2002. 79-97, 42-47.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2005)04-0305-01

个案与短篇

异位妊娠中整体治疗的研究

Study of intact therapy on ectopic pregnancy

程 湘，杨 鹰，李 真，王 欣，钟序素，王 智，林桂兰 （第三军医大学新桥医院妇产科，重庆 400037）

异位妊娠是妇科常见病。随着生活方式的转变和现代诊断技术的提高，我院就治的异位妊娠患者也逐年增多。异位妊娠的治疗包括手术、药物、及期待疗法。这些治疗方法各有特点，而患者对不同治疗方法会有不同的认知。因此如何选择治疗方式，达到对每一位患者的身心同治，是临床迫切需要解决的问题。对异位妊娠患者，我们采取了与患者共同选择治疗方案的医患共同参与的整体治疗，收到了较好的效果。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2002年1月至2003年6月因异位妊娠在我院住院治疗者126例。年龄19～42岁。诊断标准采用全国高等医药院校教材（七年制用）。

1.2 异位妊娠患者对不同治疗方式的认知情况调查

自制问卷调查表，在异位妊娠患者入院后，采用表格登记方式进行问卷调查。调查内容包括：①自己对治疗方式的要求；②认为自己所选治疗方式的优点。

1.3 整体治疗的方法

入院患者分手术治疗组（简称手术组）和药物治疗组（简称保守组）。手术组的适应证：①生命体征不稳定；②生命体征平稳，B超见附件区有混合性包块。保守组的适应症：腹腔内无出血或者出血量少，生命体征平稳，B超见附件区有混合性包块。患者入院后，如果生命体征不稳定，就决定手术治疗。如果生命体征稳定，就告知有不同的治疗方法：可以手术，也可以药物治疗。并告知两种方法各有其特点，由患者了解病情和治疗的医学知识后确定。治疗方法包括：①手术治疗：行输卵管全部/部分切除术或输卵管妊娠病灶切除术。②药物治疗：氨甲蝶呤50 mg/m^2，肌注1次。3～7 d后复查血HCG，下降≤15%者重复治疗1次。

1.4 术后随访与统计分析

对异位妊娠不同治疗方式患者的围手术期情况进行分析。出院前了解患者对治疗的满意程度。

2 结果

2.1 异位妊娠患者对不同治疗方式的认知情况

参加问卷调查的异位妊娠患者有126人。对治疗方式的态度：听医生安排的有45人，咨询后听医生安排的有34人。

具有保守治疗条件而坚决要求手术治疗的11人中，认为手术治疗方式的好处为不易复发、不需要考虑将来的妊娠、恢复快、治疗周期短者分别有11、10、9和11人。不具有保守治疗条件而坚决要求保守治疗的36人中，认为保守治疗方式的好处为没有手术和麻醉的风险，对将来妊娠影响小，能够保留输卵管好、腹部美观无疤痕、费用低者分别有30、29、19、23和12人。

2.2 治疗情况与随访

126例异位妊娠，61例手术治疗，65例保守治疗。具有保守治疗条件而坚决要求手术治疗的11人，占18.03%。不具有保守治疗条件而坚决要求保守治疗的有36人，占55.38%。保守组65例有12例出现腹痛，占总数的18.5%。其中4例为内出血增多改手术治疗。8例无内出血增多，考虑氨甲蝶呤药物作用所致，予对症治疗后好转。15例保守治疗失败，8例符合

（下转308页）

作者简介：程 湘（1963-），女，重庆市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事妇科肿瘤、女性内分泌失调及心理咨询方面的研究，发表论文10篇。电话：(023)65215190

收稿日期：2004-08-15；修回日期：2004-10-20