论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0354-03

食管鳞癌转移淋巴结蛋白质双向凝胶电泳图谱差异分析

汪 斌[1],李俊材[2],傅仲学[2],朱 旦[3] (重庆医科大学附属第一医院:[1]胸心外科,[2]普通外科,[3]临床检验诊断学实验室,重庆 400016)

提 要:目的 分析食管鳞癌转移淋巴结与正常淋巴结组织蛋白质表达差异。**方法** 采用双向凝胶电泳(2-DE)技术和计算机辅助的图像分析方法,对食管鳞癌转移淋巴结与正常淋巴结组织蛋白质进行分离和比较分析。**结果** 获得了背景清晰、分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱,比较分析显示23个蛋白点的表达量存在明显差异,其中新增蛋白点4个,缺失1个,14个蛋白点表达发生明显上调,4个蛋白点表达发生明显下调。**结论** 食管鳞癌转移淋巴结与正常淋巴结蛋白质表达存在明显差异,可能与食管鳞癌淋巴结转移机制有关。

关键词: 食管鳞癌;淋巴转移;蛋白质组;双向凝胶电泳

中图法分类号: R322.25;R730.43;R735.1 **文献标识码:** A

Proteomic analysis of lymph nodes affected by esophageal squamous cell carcinoma by two-dimensional gel electrophoresis

WANG Bin[1], LI Jun-cai[2], FU Zhong-xue[2], ZHU Dan[3] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, [2]Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, [3]Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To analyze the differential expression of proteome between metastatic lymph nodes and normal lymph nodes in esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique and computer-assisted image analysis were used to separate the protein spots and analyze the differential expression of proteome in the metastatic lymph nodes and normal lymph nodes. **Results** There were 23 protein spots significantly differentially expressed, of which 4 protein spots were newly found, 1 protein spot disappeared, 14 protein spots increased markedly, and 4 protein spots decreased significantly. **Conclusion** The proteomic expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is significantly different from that of the normal lymph nodes, which may be associated with the mechanism of metastasis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; lymphatic metastasis; proteome; two-dimensional gel electrophoresis

我国是食管癌的高发区,主要为食管鳞状细胞癌。区域淋巴结转移(N_1)是食管癌重要的不利预后因素,多数患者死于手术后肿瘤转移复发[1]。食管鳞癌常通过淋巴结进行转移,因此对食管鳞癌淋巴结转移机制的研究尤为重要。蛋白质组学技术可以识别及鉴定一种细胞或组织所表达的全部蛋白质及它们的表达模式。我们应用双向凝胶电泳技术对食管鳞癌转移淋巴结组织和正常淋巴结组织进行分析,以期发现其蛋白质的表达差异,为发现具有高敏感和特异性的食管鳞癌转移诊断标志物以及食管鳞癌淋巴结转移机制的研究提供理论依据。

基金项目: 重庆市自然科学基金(2006BB5302)
Supported by Natural Science Foundation of Chongqing(2006BB5302)

作者简介: 汪 斌(1964-),男,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事胸心外科治疗方面的研究。电话:(023)66778865

通讯作者: 傅仲学,电话:(023)89011010,E-mail: FZX990521@sina.com

收稿日期: 2006-09-28;**修回日期:** 2006-11-28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 食管鳞癌淋巴结转移组织及正常淋巴结组织 选取2005年1-5月重庆医科大学附属第一医院的食管鳞癌手术病例共14例,男性8例,女性6例,年龄38~77岁,平均56.5岁。所有患者术前均经纤维胃镜活检证实为胸段食管鳞癌,手术中收集食管癌及区域淋巴结组织。手术中切下的淋巴结组织,切取1/2,于冰盐水(含0.1 mmol/L PMSF)中清洗干净,滤纸吸去多余的液体,立即置液氮中速冻,此过程在组织离体10 min内完成。然后移至-80 ℃冰箱保存,另1/2送石蜡切片以明确淋巴结有无转移,在14例手术病例中,有6例发现有淋巴结转移,选取这些病例的转移淋巴结为研究对象,以自身正常淋巴结为对照。

1.1.2 试剂 超纯尿素(urea),硫脲(sulfocarbamide),丙烯酰胺(acrylamide),甲叉双丙烯酰胺(N,N' methylene-bisacrylamide),十二烷基磺酸钠(SDS),过硫酸铵(APS),二硫苏糖醇(DTT),甘氨酸(glycine),碘乙酰胺(indoacetamide),苯甲基磺

酰氟(PMSF),DNA 酶和 RNA 酶购自 BBI 公司,复合蛋白酶抑制剂(cocktail)购自 Amresco 公司,四甲基乙二胺(TEMED),pH 3~10 固相化线性 17 cm 干胶条(IPG strip)购自 BIO-RAD 公司,宽范围分子量蛋白标记购自宝生物公司,其他常用试剂为国产分析纯(市售商品),所用溶液均用去离子水配制。

1.1.3　仪器　　低温高速离心机(HERMLE Z233MK-2),紫外分光光度计(HITACHI U-1800),循环水浴箱(杭州雪中炭恒温技术有限公司 XT5203-031-RL5C),电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-10C),IPG 等电聚焦仪(PROTEAN IEF CELL)、垂直电泳仪(PROTEAN Ⅱ xi cell)、灌胶模具均为 BIO-RAD 公司产品,扫描仪(MICROTEK 4850Ⅱ)。

1.1.4　计算机分析软件　　BIO-RID 公司的 PDQuest2D version7.4 软件。

1.2　方法

1.2.1　食管鳞癌转移淋巴结组织和正常淋巴结蛋白质提取

按 100 mg 样品加 400 μl 组织裂解液的比例加入裂解液(8 mol/L尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT, 0.2% 两性电解质,10 ml/L cocktail),置冰浴上予匀浆器手工匀浆后加入 0.1 g/L DNA 酶和 0.025 g/L RNA 酶,室温 28 ℃放置30 min,以 14 000 × g 置于 4 ℃离心 1 h,取上清,分装,贮存于 -80 ℃冰箱,同时用考马斯亮蓝法测定提取液中的蛋白质浓度。

1.2.2　第一向固相 pH 梯度(IPG)等电聚焦　　主要按 Gorg 等[2]的方法。取上述蛋白质样品,按 1 mg 的上样量计算出蛋白质上样体积,依该体积加入蛋白质样品,加入重泡胀液(8 mol/L尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT, 0.2% 两性电解质,0.001% 痕量溴酚蓝)至终体积 350 μl,混匀。将样本均匀加入持胶槽中,胶面向下放入 17 cm IPG 干胶条,避免气泡产生,然后滴加矿物油 3 ml,置于等电聚焦仪上,重泡胀和等电聚焦在 19 ℃下自动进行,自动程序电泳参数设置如下:重水化 0 V 14 h→线形升压 250 V 1 h→快速升压 1 000 V 1 h→线性升压 10 000 V 5 h→聚焦 60 000 Vh→500 V 维持。等电聚焦后,IPG 胶条分别在平衡液 A(6 mol/L 尿素,2% SDS, 0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl,20% 甘油,20 g/L DTT)和平衡液 B(6 mol/L 尿素,2 % SDS,0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl, 20% 甘油,25 g/L 碘乙酰胺)中各平衡 15 min 后用去离子水润洗胶条 1 s,并用滤纸吸去多余的液体。

1.2.3　第二向垂直平板 SDS PAGE　　配置 12 % 的均匀 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,将平衡后的 IPG 胶条胶面向上移至凝胶的上方,胶条一端加入宽范围的蛋白标记物 10 μl,低溶点琼脂糖封闭,电泳参数:5 mA/gel 1 h,待溴酚蓝前沿移入 SDS 胶时,以 20 mA/gel 6 h 直至溴酚蓝前沿抵达距胶底边缘约 0.5 cm 时为止。

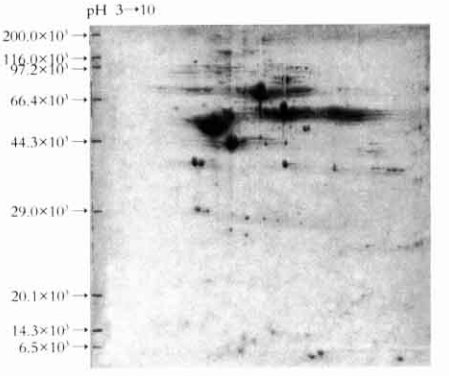
1.2.4　考马斯亮蓝染色　　将凝胶在固定液(95 % 乙醇 500 ml/L,冰乙酸 100 ml/L,去离子水 500 ml/L)中固定 1 h, 0.2 g/L考马斯亮蓝染色液中染色 2 h,脱色液(95% 乙醇250 ml, 冰乙酸 80 ml,去离子水 670 ml/L)中脱色 2 h,更换脱色液过夜。

1.2.5　凝胶图像采集与分析　　应用扫描仪 MICROTEK 4850Ⅱ采集凝胶图像,应用 BIO-RAD 公司的 PDQuest version 7.4 软件进行图像分析,应用软件自动画出胶上的蛋白点,手工删除明显的伪点,进行匹配,得出匹配的蛋白点数和匹配率,分析蛋白点的吸光度变化,选取表达水平(相对体积)增加 2 倍及 2 倍以上的点,得出差异表达点。

2　结果

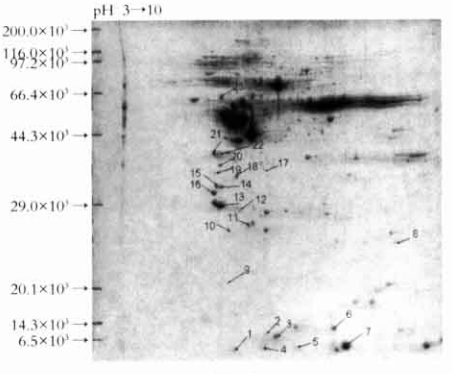
2.1　食管鳞癌转移淋巴结与正常淋巴结组织蛋白质双向凝胶电泳图谱

获得了分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱,见图 1,2。



1 - 23:蛋白点

图 1　正常淋巴结双向电泳图谱



1 - 23:差异蛋白点

图 2　转移淋巴结双向电泳图谱

2.2　食管鳞癌转移淋巴结的蛋白表达变化

通过 PDQuest version 7.4 软件对差异蛋白点的光密度、点大小以及三维观察等作图像分析(图 3),显示有 23 个蛋白质点的表达存在明显差异,其中新增蛋白点 4 个,缺失 1 个,14 个蛋白点表达发生明显上调,有 4 个蛋白点发生明显下调,各蛋白点的等电点和分子量详见表 1 - 3(序号同图 2 标注的蛋白点序号,其中新增 5、8、10、11 号点,9 号点表达缺失)。

表 1　转移淋巴结组发生明显上调蛋白质信息

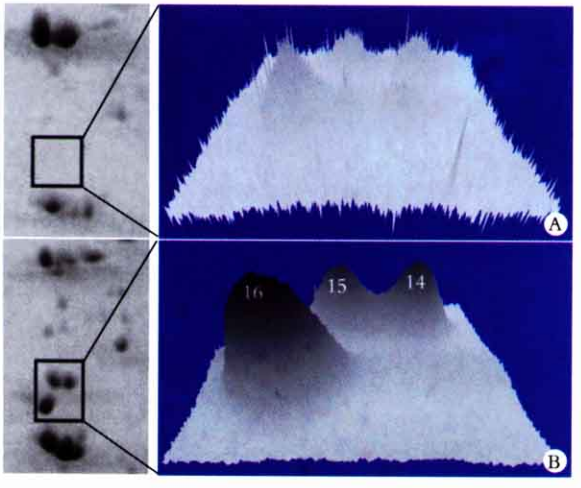
蛋白点	分子量	等电点
1	13.0	5.55
3	13.9	6.32
6	14.5	7.53
7	13.3	7.80
12	27.1	5.63
13	27.9	5.25
14	30.9	5.29
15	31.1	5.17
16	29.8	5.14
17	33.3	6.11
18	32.4	5.56
19	32.9	5.15
20	34.0	5.22
23	44.8	5.28

表2 转移淋巴结组发生明显下调蛋白质信息

蛋白点	分子量	等电点
2	14.1	5.42
4	13.3	6.13
21	36.0	5.11
22	35.7	5.24

表3 转移淋巴结组新增、缺失蛋白质信息

蛋白点	分子量	等电点
新增		
5	13.2	6.73
8	22.8	8.80
10	24.3	5.43
11	25.1	5.80
缺失		
9	20.6	5.51



A:正常淋巴结; B:转移淋巴结; 14-16:蛋白点

图3 部分差异蛋白点的三维比较观测

3 讨论

食管鳞癌是一种常见的消化系统肿瘤,肿瘤细胞常通过淋巴及血行转移,目前肿瘤的转移机制尚不清楚。近年来对于食管鳞癌淋巴结转移机制的研究取得了长足的进步,已经发现黏蛋白1(mucin1,mycl)[3]、血管内皮生长因子受体(VEGFR-3)、角蛋白19(CK-19)[4,5]、VEGF-C、CD31[6]等生物活性物质的改变与食管鳞癌淋巴结转移有密切的联系,这些研究都为食管鳞癌淋巴结转移机制提供了细胞分子生物学的基础。

目前国内外学者已经运用双向凝胶电泳的研究方法对食管癌组织与正常组织、食管癌血清与正常人血清的蛋白表达进行分析,发现周斑蛋白(periplakin)、核基蛋白(nuclear matrix proteins)、类视网膜母细胞瘤结合蛋白8(STRBP8)、血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A, SAA)[7,8]等与食管癌的发生相关,但是使用蛋白组技术对食管癌转移淋巴结差异蛋白表达的研究鲜有报道。因此我们采用双向凝胶电泳技术,从整体上把握食管癌转移淋巴结蛋白质表达的差异。在实验中通过改进蛋白质提取过程和优化双向凝胶电泳参数,对其中关键步骤反复摸索:通过改进蛋白质提取过程中的组织破碎方法、裂解液成分的选择等增加蛋白质的溶解浓度;通过蛋白酶抑制剂的使用、实验温度的控制等抑制蛋白质的降解;通过上样量的选择、一向IPG胶条的选择、二向SDS凝胶浓度的选择以及双向电泳参数的设置等保证低丰度蛋白质的分离。得到了分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱,能满足进行蛋白质组研究所需的要求。

通过比较食管鳞癌转移淋巴结和正常淋巴结蛋白质组电泳图谱得到,细胞内多种蛋白质成分在疾病发生发展过程中出现了变化,这些蛋白质成分可能参与了食管鳞癌淋巴结组织生物学特征改变的调节与控制,导致肿瘤细胞的淋巴结转移。我们已经获得这些蛋白点的分子量和等电点,进一步的质谱分析可以鉴定这些蛋白质的种类,以明确其功能,为认识疾病发病机制提供线索。食管鳞癌转移淋巴结的蛋白质组学研究不仅为揭示食管鳞癌的淋巴结转移机制提供新的研究方向,其发现的差异表达蛋白质液可能成为疾病诊断的分子标记物,进而还可能成为治疗和药物开发的靶点,因而具有较重要的理论和实践意义。

参考文献:

[1] Qi Y, Chiu J F, Wang L, *et al*. Comparative proteomic analysis of esophageal squamouscell carcinoma[J]. Proteomics, 2005, 5(11): 2960-2971.

[2] Gorg A, Oobermaier C, Thornley J P, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Elelectrophoresis, 2000, 21: 1037-1053.

[3] Song Z B, Gao S S, Yi X N, *et al*. Expression of MUCl in esophageal squamous-cell carcinoma and its relationship with prognosis of patients from Linzhou city, a high incidence area of northern China[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 404-407.

[4] 马惠文,梁后杰. VEGFR-3在食管鳞癌中的表达及与新生淋巴管形成的关系[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1580-1583.

[5] 邱雪峰,潘铁成,李 军, 等. PN0食管癌淋巴结微转移的检测及与预后的关系[J]. 肿瘤, 2005, 25(4): 383-385.

[6] Dou C. Expression of VEGF-C mRNA and CD31 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270 Supplement: 131-133.

[7] Nishimori T, Tomounaga T, Matsushita K, *et al*. Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin[J]. Proteomics, 2006, 6(3): 1011-1018.

[8] Xiong X D, Li E M, Xu L Y, *et al*. Differential expression of STRBP8, a new candidate oncogene, in cancerization of human immortalized esophageal epithelial cells[J]. Ai Zheng, 2005, 24(4): 385-390.

(编辑 邓强庭)