文章编号:1000-5404(2007)19-1869-04

论著

运用激光捕获显微切割对食管鳞状上皮癌蛋白质组的分析

汪 斌[1],李俊材[2],傅仲学[2],董蒲江[2] (重庆医科大学附属第一医院:[1]胸心外科,[2]普通外科,重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 分析食管鳞癌与正常食管上皮细胞蛋白质的表达差异,获取鉴别两者的分子标志物。**方法** 激光捕获显微切割技术分离食管鳞癌和正常食管上皮细胞的纯细胞,双向电泳和质谱的方法检测两者表达的差异蛋白。**结果** 48个差异蛋白点,通过质谱鉴定出20种有意义的蛋白,其中11种蛋白如galectin 7、14-3-3 proteinε等在食管鳞癌细胞表达明显增高,9种蛋白如MTCBP-1等表达下调。**结论** 激光捕获显微切割可以有效地解决组织异质性的问题;食管鳞癌和正常食管上皮细胞的2-DE蛋白质图谱具有明显的差异表达,提示食管鳞癌的发生是多种蛋白质功能共同作用的结果。

关键词: 食管鳞癌;蛋白质组;激光捕获显微切割

中图法分类号: R394-33; R394.3; R735.1 **文献标识码:** A

Proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection

WANG Bin[1], LI Jun-cai[2], FU Zhong-xue[2], Dong Pu-jiang[2] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, [2]Department of General Surgery, Key Laboratory of General Surgery of Chongqing, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To search for the biomarkers for differential diagnosis between human esophageal squamous cell carcinoma cells and normal esophageal epithelial cells. Methods Laser capture microdissection was used to separate human esophageal squamous cell carcinoma cells and normal esophageal epithelial cells. Proteome alterations were observed using 2 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Results A total of 48 protein spots were discovered and 20 were identified as significant, in which the expressions of 11 proteins such as galectin 7, 14-3-3 protein were upregulated and 9 proteins such as MTCBP-1 downregulated in esophageal squamous cell carcinoma cells. Conclusion Laser capture microdissection is a key technique in proteomic study, which can effectively resolve the problem of irrelevant tissues. A differential expression of 2-DE proteomics was verified between human esophageal squamous cell carcinoma cells and normal esophageal epithelial cells, suggesting that a variety of proteins may be involved in the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; proteome; laser capture microdissection

蛋白质组学是近年来兴起的一门新学科,其主要的技术为双向凝胶电泳、质谱分析技术,从总体水平上揭示细胞内蛋白的表达情况,为寻找肿瘤分子标志物提供了良好的技术平台[1,2]。然而,肿瘤组织是由不同类型的细胞构成的混合群体,正常细胞和肿瘤细胞含量不同对实验结果影响很大,激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)是20世纪90年代末期发展起来的一门新技术,其突出特点是能高效地从复合组织中特异性分离出单个细胞或单一类型细胞群,能排除细胞异质性对肿瘤研究的干扰[3]。为此,我们联合应用LCM、双向电泳MALDI-TOF-MS技术对食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞的差异蛋白进行研究,探讨食管鳞癌的发生、发展机制。

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

作者简介: 汪 斌(1964-),男,重庆市人,博士研究生,副主任医师,主要从事食管癌及心外科基础与临床方面的研究。电话:(023)66778865

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

收稿日期: 2007-01-22;**修回日期:** 2007-04-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 食管鳞癌组织及癌旁组织 选取本院的食管鳞癌手术病例，所有病例术前经纤维胃镜活检证实为胸段食管鳞癌，手术收集食管鳞癌组织、食管鳞癌癌旁组织(距原癌组织3～5 cm食管上皮组织)，于冰盐水(含0.1 mmol/L PMSF)中清洗干净，滤纸吸去多余的液体，立即置于液氮中速冻，此过程在组织离体10 min内完成，然后移至－80 ℃冰箱保存。

1.1.2 试剂和仪器 超纯尿素、硫脲、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠、过硫酸铵、二硫苏糖醇、甘氨酸、碘乙酰胺、苯甲基磺酰氟购自BBI公司，复合蛋白酶抑制剂购自Amresco公司。四甲基乙二胺、pH 3～10固相化线性17 cm干胶条购自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，冰冻切割机(德国Leica CM 1900)，LCM仪(德国Leica公司)，低温高速离心机(HERMLE Z233MK-2)，紫外分光光度计(HITACHI U-1800)，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 4850 Ⅱ)，MALDI-TOF质谱仪(ABI公司，VOYAGER-DE TRO)。

1.1.3 计算机分析软件 采用Bio-Rid公司的PDQuest 2D version7.4软件。

1.2 方法

1.2.1 冰冻切片的准备以及激光捕获显微切割 待切组织标本从－80 ℃冰箱取出后，立即移入温度设置为－30 ℃的冰冻切片机中，切片厚度10 μm，每例标本第1张切片用HE染色，以后每张切片只做苏木精染色。将制备好的切片放在显微镜的载物台上，直视下观察选定要切割的区域，按最大捕获效率设定参数。具体为：光束直径(beam diameter)60 μm，光束能量(beam power)80 mV，激光传递脉冲(transfer pulses)为1.6 ms，按此法取得40 000～50 000个细胞，并通过软件对所获取的细胞计数。

1.2.2 样本制备 切割下来的细胞通过组织裂解缓冲液(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)提取总蛋白，加入裂解液后，冰浴振荡30 min，再低温超声数次后，给予4 ℃，20 000×g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。

1.2.3 双向凝胶电泳 主要按Gorg等[4]方法，并按照等电聚焦系统程序指南进行。取上述蛋白质样品100 μg加入重泡胀液至终体积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，滴加矿物油，置于等电聚焦仪上，重泡胀过夜，等电聚焦在19 ℃下自动进行。等电聚焦后，IPG胶条分别在平衡液A(含20 g/L DTT)和平衡液B(含25 g/L碘乙酰胺)中各平衡15 min，将平衡后的IPG胶条置于12%的均匀SDS聚丙烯酰胺凝胶上方，胶条端滴加宽范围的蛋白标记物，低溶点琼脂糖封闭，电泳参数：5 mA/胶1 h，待溴酚蓝前沿移入SDS胶时，以30 mA/胶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 硝酸银染色 40%乙醇＋10%冰乙酸固定60 min；6.8%乙酸钠＋30%乙醇＋0.2% $Na_2S_2O_3$敏化30 min；去离子水漂洗5 min×3次；0.2%硝酸银染色20 min；去离子水漂洗1 min×2次；2.5%无水碳酸钠＋0.04%甲醛显色；5%冰乙酸终止10 min；10%甘油保存。

1.2.5 凝胶图像采集与分析 应用扫描仪MICROTEK 4850 Ⅱ采集凝胶图像，在相同条件下，对两种细胞的总蛋白样品分别进行3次双向电泳及图像分析，在同种细胞的蛋白质电泳图谱中选择蛋白质点清晰的图像作为参照，与其他2次电泳的图像进行匹配，然后将3次电泳所得的蛋白质点图谱在PDQuest 2D version 7.4软件中创建平均胶，对2种细胞的平均胶进行匹配，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。

1.2.6 质谱鉴定 选取胶上差异蛋白质点，用刀片沿斑点染色边缘切下，置于Eppendof管中，按Gharahdaghi等[5]方法进行蛋白质胶内消化，然后进行MALDI-TOF质谱鉴定。借助互联网上的蛋白质数据库检索程序NCBInr (http://prospector.ucsf.edu)。

2 结果

2.1 食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞蛋白表达图谱

食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞随机配对后，相同的试验条件和参数设置的情况下，试验重复3次，得到清晰度、蛋白点满意的图像，通过2D-PAGE分离技术建立了食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞的双向凝胶电泳银染图谱，如图1。

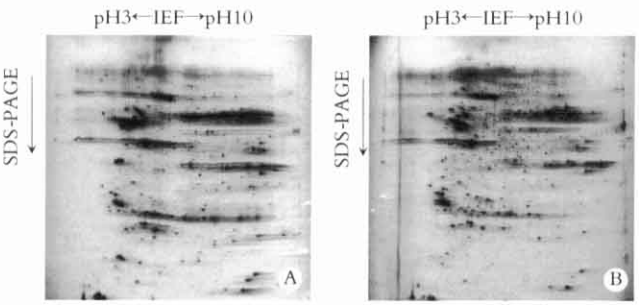


图1 正常食管上皮细胞(A)和食管鳞癌细胞(B)的双向凝胶电泳银染图谱

2.2 食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞蛋白表达差异

通过分析，显示48个蛋白点的表达量存在明显差异，成功鉴定出20种差异蛋白，结果见表1、2。

表 1　食管鳞癌组织中表达下调的蛋白

编号	序列号	蛋白质名称	相对分子质量/等电点	配对肽数量	序列覆盖率(%)	总质量误差	MOWSE 分值
01	4506773	钙结合蛋白 S100A9	13 242/5.7	8	58.0	0.826	183
02	22202624	谷胱甘肽转移酶	24 114/7.6	4	27.0	-0.041 4	38.5
03	80476713	Tsc1	52 918/6.4	5	15.9	-0.094 9	939
04	62896493	膜型基质金属蛋白酶胞质尾部结合蛋白 I(MTCBP-1)	22 577/5.4	5	20.9	0.168	229
05	4960030	rab GDP 解离抑制蛋白[rab GDP-dissociation inhibitor (rab GDI) proteins]	41 041/8.0	5	15.6	-0.253	442
06	13561413	F-BOX 结构域蛋白(F-BOX domain protein)	43 447/6.6	6	22.1	0.035 5	2 508
07	54696624	真核生物翻译起始因子 4A	46 154/5.3	9	31.0	0.121	11 621
08	54696358	蛋白磷酸酶 4	35 079/5.0	4	21.8	-0.173	343
09	27881698	Axin 1	91 654/6.5	6	12.3	0.546	1 234

表 2　食管鳞癌组织中表达上调的蛋白

编号	序列号	蛋白质名称	相对分子质量/等电点	配对肽数量	序列覆盖率(%)	总质量误差	MOWSE 分值
01	4504985	半乳凝素 7	15 075/7.0	10	69.0	0.335	20 977
02	30841309	锰型超氧化物歧化酶(MnSOD)	23 673/6.9	7	46.0	0.682	1 042
03	14124960	微管蛋白, beta 2c	25 876/4.9	4	11.0	-0.245	60.2
04	62131678	14-3-3 proteinε	26 504/4.8	7	26.6	0.407	34 546
05	1100166	T 细胞 α 受体	31 319/4.9	6	25.0	-0.109	330
06	28279379	周期素依赖性蛋白激酶 4	33 751/6.5	5	23.3	0.201	2 726
07	4502741	周期素依赖性蛋白激酶 6	36 939/6.0	4	18.2	-0.514	384
08	34782865	pUS3 蛋白	29 181/5.8	4	25.0	0.332	860
09	74355458	Sorting nexin 11	30 434/6.6	4	25.2	0.010 1	112
10	4557845	核苷酸还原酶 M2(RRM2)	44 878/5.3	5	11.8	-0.216	309
11	32891807	胆绿素还原酶 B [flavin reductase (NADPH)]	22 120/7.1	10	57.3	-0.373	611 766

3　讨论

目前对食管鳞癌的蛋白质组研究国内外已经在广泛开展,一些可能与食管癌发生、发展及转移有关的蛋白质也不断被研究者发现[6,7],如丙酮酸激酶 M2、丙酮酸激酶 M1、热休克蛋白 27、锰型超氧化物歧化酶 MnSOD、TPM4、peroxiredoxin1 等。然而,癌组织中含有数万种蛋白,尚有与肿瘤的发展过程紧密联系的蛋白不为人们所发现。LCM 技术是新出现的一项技术,是目前获取单一类型的细胞、解决组织异质性的操作中最理想的方法之一[3]。因此,本研究将 LCM 应用到食管鳞癌的蛋白质研究中,通过质谱鉴定出 20 种有意义的蛋白,其中包括了肿瘤发展机制中转录调控、细胞信号转导、凋亡以及侵袭和转移等相关蛋白质。

半乳凝素-7(galectin-7)是动物凝集素家族中的一员,与肿瘤的发生、转化、细胞的凋亡起重要作用[8,9],并能通过增强基质金属蛋白酶-9 的表达,使肿瘤细胞的侵袭性增加[10]。MT1-MMP 是基质金属蛋白酶中最重要的一种蛋白酶,能够刺激肿瘤细胞的生长、侵袭和转移[11], MTCBP-1 结合在 MT1-MMP 的细胞质尾区,属于 MMP 家族的膜锚着点成员之一,在肿瘤细胞系中的表达显著低于正常细胞系,在加强其表达后能显著降低由 MT1-MMP 引起的细胞迁移性和侵袭性增高[12]。本研究结果显示,半乳凝素-7 在癌细胞中表达增高,而 MTCBP-1 在鳞癌细胞中表达降低,说明两种蛋白的作用可能肿瘤细胞迁移性和侵袭性的增高,导致肿瘤细胞的侵袭性和迁移性增高。

$\cdot O_2^-$ 是生物体内主要的自由基,可与许多生化成分如脂质、蛋白质、核酸等发生反应,破坏细胞的化学结构,干扰其正常功能,造成各种损害,大量证据表明肿瘤的发生有活性氧介入,而活性氧主要影响肿瘤形成的促癌阶段间接损伤 DNA,可使 DNA 分子链断裂、碱基互换,继而引起基因突变[13],本研究表明 MnSOD 的在食管鳞癌细胞表达增高,结果同 Zhou 等[7],其可能原因是癌组织中的自由基增多导致的 MnSOD 代偿性增高。

14-3-3 proteinε 为普遍存在的磷酸丝氨酸苏氨酸骨架蛋白,其二聚体作为分子伴侣,参与细胞信号传导以及胞外分泌。14-3-3 proteinε 是 caspase-3 底物之一,细胞凋亡过程中 14-3-3 proteinε 断裂,释放 Bad 蛋白,利于 Bad 蛋白移位到线粒体,以及与 Bcl-x(L)的相互作用,从而促进细胞凋亡[14]。本研究中癌组织中 14-3-3 proteinε 表达上调,表明在食管鳞癌细胞中信号转导、细胞凋亡作用增强。

本实验结合 LCM 鉴定出 20 种有意义的差异蛋白,这些蛋白可能是在食管鳞癌的发生机制中起关键作用的蛋白质,关于它们的功能、在肿瘤发展中的作用有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Molly M P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins u-

sing immobilized pH gradients[J]. Anal Biochem, 2000,280(1): 1-10.

[2] Kim J, Kim S H, Lee S U, *et al*. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins[J]. Electrophoresis, 2002, 23(24): 4142-4156.

[3] Bonner R F, Emmert-Buck M, Cole K, *et al*. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue[J]. Science, 1997, 278(5342): 1481,1483.

[4] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Elelectrophoresis, 2000, 21(6):1037-1053.

[5] Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, *et al*. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. Elelectrophoresis, 1999, 20(3): 601-605.

[6] 汪 斌,李俊材,傅仲学,等. 食管鳞癌转移淋巴结蛋白质双向凝胶电泳图谱差异分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 354-356.

[7] Zhou G, Li H, DeCamp D, *et al*. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers[J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(1):117-124.

[8] Saussez S, Kiss R. Galectin-7[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6): 686-697.

[9] Saussez S, Cucu D R, Decaestecker C, *et al*. Galectin 7 (p53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2006,13(7): 999-1009.

[10] Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5205-5210.

[11] Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3): 207-214.

[12] Uekita T, Gotoh I, Kinoshita T, *et al*. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors[J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 12734-12743.

[13] Nozoe T, Honda M, Inutsuka S, *et al*. Significance of immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase as a marker of malignant potential in colorectal carcinoma[J]. Oncol Rep ,2003, 10(1): 39-43.

[14] Won J, Kim D Y, La M, *et al*. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis [J]. J Biol Chem, 2003, 278(21): 19347-19351.

(编辑 龙 亮)

(上接1865页)

1.3 疗效标准

本组病例疗效定为以下标准:优良:有正常咬合功能,具有咀嚼普通食物的正常咬合力量;无自觉症状;患牙不松动,牙龈无炎症。有效:能咀嚼普通食物;咬合力量较正常部牙略差,无自觉症状,牙齿松动度Ⅱ度以下,牙龈有轻度炎症。无效:不能咀嚼食物,患牙疼痛,反复形成脓肿,最终拔除患牙。

2 结果

50例均获得随访,随访期最短18个月,最长4年,保证每3个月定期复查1次,由固定医师记录。结果:优良者27例,占54%;有效者16例,占32%;7例失败,占14%。

3 讨论

3.1 断根术治疗磨牙牙周病的临床意义

牙周病的病因和发病机制尽管目前尚待深入研究,但就磨牙而言,由于其解剖生理特点,咬合负担大,根分叉处受创伤的牙槽骨发生垂直性吸收[1]。临床上表现为某一牙根牙周袋加深,附着该牙根的牙周组织几乎全部破坏,但该牙根的邻的其余牙周组织则无损害或损害极轻,患牙尚较稳固。鉴于牙周袋深,感染难以清除,临床列为拔出的适应证。采用患根截除术,使自多患牙周病的多根牙消除了牙周袋,控制了感染,保留了患牙的生理功能,避免拔除,从而增加了处理牙周病保留患牙的方法。

3.2 体会

3.2.1 围手术期处理 术前患牙根管治疗应规范完善,避免根尖感染影响截根术效果;降低患牙咬合应用时调磨对验牙,尤其注意解除侧方验时的创伤性早接触,有利于断根术后创面愈合。术后强调保持口腔良好的环境,应用含漱剂,避免食用刺激性食物;定期检查调整咬合关系;注意控制菌斑;伤口愈合面最好更换1-2次塞治剂。

3.2.2 术中注意事项 牙龈纵行切口不要直接做在患牙区的近远中牙龈,而应做在邻近牙的近远中牙龈,如此有利于骨成形术操作,并且龈瓣复位时可以充分覆盖截根创面;截根时勿用暴力敲打,以避免骨面创伤过大和产松患牙。截根修整断面和骨面时均应使用涡轮钻为宜。

3.2.3 适应证选择 有关截根术病例选择,尚无统一标准[2-4],根据我们的体会,适应证不宜过宽,患牙达Ⅲ度松动,严重的创伤性咬合经调验不能改善者,根管内钙化或极度弯曲无法完成规范的根管预备和充填者不宜行截根术。

关键词:断根术;牙周病

中图法分类号:R781.405 文献标识码:B

参考文献:

[1] 王翰章,王大章,李巨岳. 中华口腔医学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1735.

[2] Bhaskar S N. Synopsis of oral pathology[M]. 3rd ed. ST. Louis: Mosby C V Company, 1986: 216.

[3] 邓鹏举,张震康,余龙岩. 实用口腔科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1735.

[4] 李巨岳,张文明,孙 勤. 实用口腔内科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2000: 917.

(编辑 薛国文)