维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0166-03

宫颈永生化细胞和癌细胞的胞质蛋白双向电泳图谱的建立及初步分析

宋大萍,赵 涌,巫静娴,贾世军

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立 HPV-16 阳性的宫颈上皮永生化细胞(H8 细胞株)和宫颈癌细胞(CaSKi 细胞株)胞质蛋白双向电泳图谱,并初步分析找出特征性的差异蛋白点。方法:分别培养 H8 和 CaSki 细胞,用亚细胞结构蛋白质提取试剂盒提取胞质蛋白进行双向电泳,用 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件分析电泳图谱,筛选差异蛋白点。结果:获得了分辨率和重复性均较好的宫颈永生化细胞和癌细胞胞质蛋白 2-DE 图谱,并分析找出了显著的差异蛋白点 8 个,其中 3 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达上调,1 种蛋白质表达明显下调,2 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达缺失,2 种蛋白质在永生化细胞株表达缺失。结论:应用亚细胞蛋白双向凝胶电泳技术对 HPV-16 阳性的宫颈癌前和癌变的胞质蛋白分析,能有效找出蛋白质表达差异点,为进一步确定宫颈癌前病变和癌细胞的关键性差异蛋白质的结构和功能奠定了基础。

【关键词】宫颈;永生化细胞;癌细胞;蛋白质组;2-DE

【中国图书分类法分类号】R361⁺.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-04

Establishment and analysis of 2-DE patters of cytoplasmic proteomics of immortalized cervical cell and cervical cancer cell

SONG Da-ping, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To establish two-dimensional electrophoresis profiles with high resolution and reproducibility from immortalized human endocervical cell (H8) and cervical cancer cell (CaSKi), and to identify the differential expressions of cytoplasmic proteins. *Methods*: H8 cells and CaSKi cells were incubated, the cytoplasmic proteins of H8 cells and CaSKi cells were extracted and seperated by means of immobilized pH gradient-based two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The differential expression proteins were analyzed by using ImageMaster 2D analysis software. *Results*: We obtained well-resolved, reproducible 2-DE patterns, and 8 notable differential protein spots were defined in 2-DE gels. *Conclusion*: Cytoplasmic proteins of cervical precancerous lesion and cervical cancer are separated by means of immobilized pH gradient-based two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The expression maps of proteomics in cytoplasmic proteins of H8 and CaSKi are established. There are significant differences in proteome between cytoplasmic proteins of H8 cells and CaSKi cells. These data may be valuable for differential proteomics research of cervical precancerous lesion and cervical cancer.

【Key words】 Cervix; Human immortalized endocervical cell; Cancer cell; Proteomics; Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

差异蛋白质组学是蛋白质组学研究的一个最为主要内容,广泛应用于肿瘤生物学标记物的筛选和鉴定、肿瘤分类、治疗疗效的评价及肿瘤发生机制探讨等,成为肿瘤研究的前沿领域[1,2]。而肿瘤细胞成分蛋白质差异的研究更是对肿瘤发生、发展及机制研究进一步的深入细化,进而成为近年肿瘤研究热点[3]。宫颈癌是我国最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,研究表明人类乳头状瘤病毒(HPV)与宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌的发生密切相关[4]。但宫颈癌前病变和宫颈癌关键性差异蛋白质组及癌变机制至今仍不清楚。本研究旨在应用亚细胞结构蛋白提取法,对宫颈癌前病变和宫颈癌胞质蛋白进行差异蛋白质组学研究,为宫颈癌及癌前病变的诊

作者介绍:宋大萍(1978-),女,硕士,
研究方向:宫颈癌前及癌变的蛋白质组学。
通讯作者:赵 涌,男,教授,联系电话:023-68485789。

维普资讯 http://www.cqvip.com

断、鉴别和癌变机制的探讨提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

主要试剂：亚细胞结构蛋白质提取试剂盒(ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit)购于德国默克生物制剂公司，聚丙烯酰胺(Acr)、三羟甲基氨基乙烷(Tris)、甘氨酸、尿素、十二烷基磺酸钠(SDS)、硝酸银、低熔点琼脂糖、四甲基乙二胺(TEMED)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、过硫酸铵(AP)、CHAPS 购自上海生工(Sagon)。线性固相 pH 梯度预制胶条(pH3~10，18cm)、两性电解质购于美国安玛西亚公司。胰酶购于 Promega。

宫颈上皮永生化细胞株(H8)源于中国医学科学院协和医科大学基础研究所。

宫颈癌细胞株(CaSki)从重庆医科大学分子生物教研室获得。

仪器：双向电泳仪购于美国安玛西亚公司，TC2323CO_2 培养箱(美国 SL 公司)，5417R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)，UV-1100 紫外—可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司)，Amersham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统及 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件(Amersham pharmacia 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和样品制备 将 H8 细胞和 CaSki 细胞复苏后，置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中，待细胞数达到 3×10^6 个时收集细胞，倒掉上面培养液，加入亚细胞结构蛋白质提取试剂盒中洗液冲洗 2 次，然后加入 Buffer Ⅰ和 Cocktail 蛋白酶 1ml，放在冰上 10min 后吸出所有液体，其提取物为胞质蛋白质，并用蛋白质定量试剂盒（Bradford 方法）[5]进行蛋白定量，然后进行丙酮沉淀风干，储存于 -70℃冰箱备用。

1.2.2 双向凝胶电泳分离 参照 Gorg A 等的方法[6]和安玛西亚等电聚焦系统操作指南进行。第一向(固相)IPG 胶条电聚焦胞质蛋白质(上样量为 250μg)与水化上样缓冲液(7mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，2%CHAPS，65mmol/L DTT，0.2%两性电解质，痕量溴酚蓝)混合，总体积 340μl，加入 IPG 胶槽中，18cm IPG 胶条，线性，pH3~10，IPG phor 水平电泳仪电泳。等点聚焦条件设置：(1)被动水化 12h；(2)200V/1h，step and hold，除盐；(3)500V/1h，step and hold，除盐；(4)1 000V/5h，step and hold，除盐；(5)8 000V/36 000Vh，step and hold，升压；(6)10 000V/25 000Vh，step and hold，聚焦。聚集结束后，胶条在平衡液 A(6mol/L 尿素，2%SDS，0.375mol/L pH8.8 Tris-HCl，20%甘油，1%DTT)中平衡 13min，于平衡液 B(6mol/L 尿素，2% SDS，0.375mol/L pH8.8 Tris-Hcl，20%甘油，2.5%碘乙酰胺)中平衡 13min。第二向垂直电泳将平衡后的胶条移至 12.5%分离胶上，0.5%低溶点琼脂糖封顶。以恒功率方式：5W、1h；17W、7h，直至溴酚蓝前沿迁移至凝胶底边停止电泳取出凝胶。

1.2.3 硝酸银染色 电泳凝胶在含 50%乙醇 10%乙酸的液体中固定 2h，35%乙醇漂洗 10min，3 次；敏化液(含 0.02%硫代硫酸钠)摇动 2min，去离子水漂洗 5min，3 次；放入银反应液中(含 0.2%硝酸银)20min。去离子水漂洗 1min，2 次；显影液中(含 6%碳酸钠，0.05%甲醛)，3 ~ 10min，至清晰显影后，用终止液(50%甲醇、10%冰醋酸)终止，置 1%乙酸液中保存。

1.2.4 图像分析 对银染后的电泳凝胶进行扫描，获取图像，运用 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件进行分析，包括蛋白质点的检测、量化、背景扣除和点的匹配。点检测的同时对点进行编辑。点检测完成后，根据每个蛋白点的编号、峰值、量值和位置，选择蛋白点较多、点分布较好、清晰的胶作为标准胶的模板，进行匹配，自动识别相对应的点和不匹配的点，即差异表达的蛋白质。

2 结 果

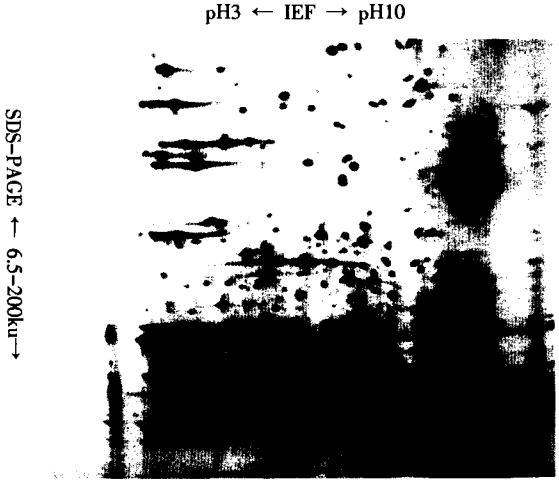


图 1 H8 胞质蛋白质图

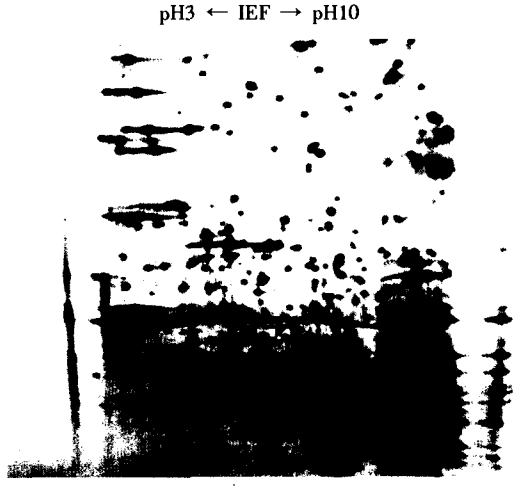


图 2 CaSki 胞质蛋白质图

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 双向电泳

经一向等电聚焦,二向垂直电泳,银染后获得 H8 和 CaSki 的胞质蛋白质双向电泳图谱(图 1、图 2)。图 1 所示为宫颈永生化细胞(H8)胞质蛋白质双向凝胶电泳图谱,图 2 所示为宫颈癌细胞(CaSki)胞质蛋白质凝胶电泳图谱。

2.2 电泳图谱的分析

通过 ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件分析,以其中 1 块胶为参考胶进行 2 块胶间的斑点匹配,2 个样品凝胶图像蛋白斑点主要集中在 PI 为 4 ~ 8 和分子量为 10 ~ 180ku,H8 细胞胞质蛋白斑点总数约为 1 123 个,CaSki 细胞胞质蛋白斑点总数约为 1 231 个,匹配率为 70%。比较 2 块胶发现有 8 个蛋白点的表达存在明显的差异,其中 3 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达上调,1 种蛋白质表达明显下调,2 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达缺失,2 种蛋白质在永生化细胞株表达缺失。

3 讨 论

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤。从流行病学资料看,主要与人类乳头状病毒感染(HPV)有关的宫颈癌前病变 - 宫颈上皮内瘤变(CIN)宫颈癌发病显著增加,因而对宫颈癌的病因、诊断、治疗和预防的研究受到高度重视。差异蛋白质组技术可以对比观察分析正常细胞、癌前病变和癌细胞各自的蛋白质种类和数量的差别,是肿瘤研究的一种有效手段。

宫颈癌和正常宫颈上皮的蛋白质组学研究近几年仅有少量文献报道。Lee 等[7]利用双向电泳和质谱对韩国妇女宫颈鳞状上皮细胞癌组织进行了蛋白质表达分析,发现了 35 种蛋白,其中 17 种蛋白上调 18 种蛋白下调,在蛋白质鉴定时,12 种是以前在肿瘤中被发现。香港中文大学妇产科通过蛋白质芯片(Proteinchip)和质谱技术的蛋白质谱分析平台 SELDI-MS,从 35 例宫颈癌和 27 名正常人中鉴别出 7 种差异蛋白,并且建立起一种评分系统,为寻找宫颈癌早期诊断的标志物提供了可能性。但他们都是通过提取细胞总蛋白对宫颈癌进行研究,由于全细胞蛋白多且复杂,分析困难,更难以准确地从细胞亚结构上把握癌前和癌的相关蛋白或基因的变化。宫颈癌前病变和宫颈癌之间有着完全不同的生物学行为,到底是什么基因编码的关键蛋白质(组)导致这种差别,是值得探讨的课题。目前尚未见宫颈癌前病变与宫颈癌的亚细胞成分差异蛋白质(组)研究的文献报道。

要获得具有高分辨率和重复性好的二维凝胶电泳图谱,其样品制备是关键[8]。本实验应用德国默克生物制剂公司细胞亚结构蛋白质(Western 方法证实其为胞质蛋白)提取试剂盒,进行细胞成分蛋白的提取,与全细胞蛋白提取比较,差异蛋白质定位更为准确,更易明确其功能,凝胶蛋白的拖尾现象也得到了明显改善,同时我们用的是 18cm 胶条,pH3 ~ 10,其上样量较 11cm 和 13cm 胶条高,蛋白质分离范围增大,蛋白质的分离效果提高,通过优化双向凝胶电泳参数,得到了分辨率和重复性良好的双向凝胶电泳图谱,匹配率 70%,完全能够满足进行蛋白质组研究所需的技术要求,得到可靠的分析结果。

本实验应用目前最新的亚细胞结构蛋白提取及 2-DE 方法,比较分析 HPV16 阳性的 H8 细胞(癌前病变模型)和 CaSki 细胞(癌细胞)亚细胞成分蛋白(胞质蛋白)差异表达,得到了清晰易辨的电泳图谱。通过 H8 细胞和 CaSki 细胞胞质蛋白质电泳图谱的比较,得到两者蛋白质在表达数量和强度上的差异,其中有 8 个蛋白质表达差异,其中 3 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达上调,1 种蛋白质表达明显下调,2 种蛋白质在宫颈癌细胞株表达缺失,2 种蛋白质在永生化细胞株表达缺失,这些蛋白质成分可能参与了癌前病变向癌病变转化的调节与控制。进一步对这些差异蛋白点的质谱分析,可以鉴定其蛋白质(组)的具体种类及成分,明确其功能。有可能发现宫颈癌早期诊断的分子标记物或宫颈癌治疗和药物开发的新靶点,也可为揭示宫颈癌的发病机制提供新的线索。

参 考 文 献

[1] Le Naour F, Brichory FM, Hanash SM, et al. Contribution of proteomics to tumor immunology[J]. Proteomics, 2001;1(10):1295-1302.

[2] Bichsel VE, Liotta LA, Patricion EF. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling[J]. Cancer J, 2001;7(1):69-78.

[3] Pandy A, Manna M. Proteomics to study genes and genomes[J]. Nature, 2000;404(6788):837-846.

[4] Haie-Meder C, Crevoisier R, Bruna A, et al. Concomitant chemoradiation in patients with cervix cancer[J]. Bull Cancer, 2005;92

(下转第 176 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

成[4]。炎症后期,通过 CD40/CD40L 交联,成纤维细胞增生、聚集,合成并释放胶原蛋白,沉积在组织局部,引起纤维化。

本研究结果显示,失血性休克后肺组织中出现 CD40 及 CD40L 表达,主要表达在肺泡上皮细胞及支气管粘膜上皮细胞,而正常肺组织未见表达。本研究还观察到,失血性休克兔肺组织 W/D 重比正常对照组明显增高,光镜下肺组织病理学检查结果显示肺充血,间质水肿及炎症细胞聚集,提示失血性休克后肺组织有炎症反应的发生。由此可见,CD40 及 CD40L 在失血性休克后的肺组织中的表达与肺组织炎症反应的发生有一定关系。根据本研究结果发现在失血性休克后,血浆中 TNF-α 浓度随休克时间的延长而增高。同时血浆中抗炎介质 IL-10 浓度在休克后较休克前明显增高,但休克后 1h 和休克后 2h 相比无明显变化。这表明失血性休克后机体炎症介质 TNF-α 的释放强度强于抗炎介质 IL-10 的释放,这进一步说明了失血性休克后机体内发生了失控的炎症反应,这正是引发肺损伤的重要原因。但我们发现,CD40 及 CD40L 在休克后 1h 及休克后 2h 肺组织中的表达无明显差异,说明在失血性休克后肺组织中 CD40 及 CD40L 的表达与炎症介质 TNF-α 浓度变化、肺组织的炎症反应及病理损伤程度不一致,可能是此时水平的 CD40/CD40L 足够介导失血性休克后肺组织的炎症反应,也可能是其他因素参与了这种炎症反应,或者是某些抗炎介质如 IL-10 抑制了 CD40/CD40L 的相互作用。

根据本研究结果并结合相关文献报道可以知道,失血性休克后,机体可被激活合成和释放大量 TNF-α,TNF-α 又可促进其他细胞因子和炎症介质的释放,形成炎性网络,产生炎症瀑布效应[5]。在炎症反应早期,肺组织中 CD40 及 CD40L 的数量和分布与 TNF-α 等炎症因子的释放具有共增长的关系[6]。CD40/CD40L 的表达与炎症介质的刺激有关,同时,又促进了炎症介质的产生。CD40/CD40L 的表达参与了肺组织炎症反应的发生,促进了呼吸道中的炎症反应。但只观察了单纯性失血性休克 2h 内 CD40/CD40L 表达的变化,尚不清楚更长时间后 CD40/CD40L 的变化规律。由于肺组织内炎性反应的信号转导机制较为复杂,CD40/CD40L 对失血性休克肺损伤确切的分子机制,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Song Y,Ao L,Raeburn CD,et al. A low level of TNF-α mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor [J]. Am J physiol Lung Cell Mol Physiol,2001;281:677-684.

[2] Strieter RM,Kunkel SL,Keane MP,et al. Chemokines in lung injury:Thomas A. Neff lecture[J]. Chest,1999;116(1 Suppl):103s-110s.

[3] Van Kooten C,Banchereau J. CD40-CD40ligand[J]. J Leukoc Biol,2000;67(1):2-17.

[4] Sime PJ,O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment[J]. Clin Immunol,2001;99(3):308-319.

[5] Oberholzer A,Oberholzer C,Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity[J]. Shock,2001;16(2):83-96.

[6] Lei XF,Ohkawara Y,Stampfli MR,et al. Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice [J]. J Clin Invest,1998;101(6):1342-1353.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 168 页)

(12):1032-1038.

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

[6] Bae SM,Lee CH,Cho YL,et al.Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients [J]. Gynecol Oncol,2005;99(1):26-35.

[7] Wong YF,Cheung TH, Lo KW,et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips:proteomic scring to discriminate cervical cancer from nomal cervix[J]. Cancer Lett,2004;211(2):227-234.

[8] 夏其昌,曾 嵘,编著.蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京:科学出版社,2004.242-248.

(责任编辑:冉明会)