维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0395-04

# 喉鳞形细胞癌比较蛋白质组的初步研究

周建荣[1],魏莲枝[1],李银平[1],傅仲学[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;2.胃肠外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究喉癌及癌旁喉正常黏膜组织蛋白质组的差异表达。方法:用固相 pH 梯度双向凝胶电泳分离喉癌及癌旁喉正常黏膜组织总蛋白质,考马斯亮蓝染色显色、ImageMaster 2D 软件分析所获得的双向凝胶电泳图谱,找出差异表达的蛋白质点。取差异表达的蛋白质点进行质谱鉴定。结果:获得分辨率和重复性均较好的双向凝胶电泳图谱,并找出在喉癌和癌旁喉正常黏膜组织差异表达的 33 种蛋白质。其中有 22 种蛋白质在喉癌组织中表达上调,11 种蛋白质表达明显下调。随机取 10 个在喉癌组织中表达上调的蛋白点进行质谱指纹图分析,查询数据库初步鉴定出了 8 个蛋白质。结论:本研究建立了分辨率和重复性较强的喉癌及喉正常黏膜组织蛋白质组表达图谱,且两者蛋白质的表达明显不同,差异表达的蛋白质可能成为潜在的诊断喉癌的肿瘤标志物和治疗靶分子,对探讨喉癌的发生机制有重要意义。

【关键词】喉肿瘤;蛋白质;双向凝胶电泳

【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-22

# Comparative proteomics analysis of laryngeal squamous cell carcinoma

*ZHOU Jianrong, et al*

(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the differential expression proteins of laryngeal squamous cell carcinoma tissue and paired normal tumor adjacent mucosa epithelia tissue. *Methods*: The total proteins of laryngeal cancer tissue and paired normal tumor-adjacent mucosa epithelial tissue were separated by means of immobilized pH gradient-based two-dimensional gel electrophoresis(2-DE). Coomassie brilliant blue dyeing. The differential expression proteins were analyzed by using ImageMaster 2D analysis software. Then identified by peptide mass fingerprint (PMF)based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)and database searching. *Result*: We obtained well-resolved, reproducible 2-DE patterns of laryngeal cancer and normal mucosa epithelia1. Differential protein spots were defined as spots in 2-DE gels. 33 proteins were preliminarily identified, among which 22proteins were upregulated in laryngeal cancer tissue, while 11 were decreased significantly. PMF maps of 10 proteins which were upregulated in laryngeal cancer tissue were obtained by MALDI-TOF-MS. The typic peptide masses were searched in the Mascot database. Eight proteins were preliminanily identified. *Conclusion*: We established the expression maps of proteomics in laryngeal cancer and normal mucosa epithelia1. There were significant differences among proteome of laryngeal cancer and normal mucosa epithelia1. These proteins may be potential diagnostic markers and therapeutic targets for laryngeal cancer. And is valuable for studying mechanisms of laryngeal carcinogenesis.

【Key words】Laryngeal Neoplasms; Protein; Two-dimensional gel electrophoresis

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其发病率约占全身恶性肿瘤的 5%[1]。由于环境致癌因素的增加,喉癌的发病率呈不断增长趋势。虽然肿瘤诊断与治疗的手段日新月异,但全球的喉癌总体生存率并未得到明显改善,尤其是晚期病人[2]。如果能够早期诊断,无论采取手术或放疗都能使病人获得较好预后,还能保留喉的发音功能。由于蛋白质组研究具有从整体水平上发掘和寻求潜在肿瘤标志物的能力,本研究利用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术分离喉癌及癌旁喉正常黏膜组织总蛋白质,建立蛋白质组表达图谱,分析比较两者蛋白质的差异表达,通过质谱分析鉴定喉癌与喉正常黏膜差异表达的蛋白质,为寻找喉癌特异性肿瘤标志物和研究喉癌的发病机制提供依据。

作者介绍:周建荣(1969- ),女,副主任医师,博士生,主要研究方向:头颈肿瘤。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com



1.1.1 组织　8 例喉癌标本来自重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科，均为男性，年龄在 50~75 岁之间，TNM 分期为 $T_2$-$_3N_0M_0$，术后病理证实为喉鳞形细胞癌。喉正常黏膜取自同一病人癌旁正常黏膜，来源均为鳞状上皮组织，病理证实无肿瘤细胞的侵犯。所取组织于冰盐水中清洗干净，去除血液，尽可能剪去肿瘤表面的血管及坏死组织，正常喉黏膜尽量去除黏膜下结缔组织。标本保存于-80℃冰箱中备用。

1.1.2 试剂　超纯尿素(urea)，硫脲(sulfocarbamide)，十二烷基磺酸钠(SDS)，过硫酸铵(APS)均购自 sigma 公司，丙烯酰胺(acrylamide)，甲叉-双丙烯酰胺(N,N'-methylenebisacrylamide)，pH3~10 固相化线性 17cm 干胶条(IPG strip)，购自 Bio-Rid 公司，二硫苏糖醇(DTT)，甘氨酸(glycine)，四甲基乙二胺(TEMED)，碘乙酰胺(indoacetamide)，苯甲基磺酰氟(PMSF)，DNA 酶和 RNA 酶，低分子量蛋白标记，Tris 碱，CHAPS(两性离子去垢剂)，考马斯亮蓝 R-250，均购自上海生工。

1.1.3 主要设备　Bio-Rad proteinIEFcell 型等电聚焦仪及 Bio-Rad protein Ⅱ XI Cell 型垂直电泳槽（Bio-Rad 公司产品）；Amersham ImageMasterVDS-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 喉癌及正常粘膜组织蛋白质的提取　按 80mg 样品加 100μl 组织裂解液的比例加入裂解液，匀浆，加入 DNA 酶，RNA 酶，悬液取出后离心。吸取上清液即为组织的总蛋白质。取上清，分装，贮存于-70℃冰箱备用。BCA 法测提取液中蛋白质浓度。

1.2.2 第一向固相 pH 梯度等电聚焦　操作步骤主要按照 Gorg[16]等的方法和 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行。取 1mg 组织总蛋白质与水化液充分混合，加入 IPG strip 持胶槽，IPG 干胶条 pH3~10 去保护膜后，胶面朝下化和聚焦在 20℃自动进行。

1.2.3 平衡　将等电聚焦后的 IPG 胶条放入 5ml 平衡液 A 和 5ml 平衡 B 液中于摇床上各平衡 15min。

1.2.4 第二向垂直 SDS-PAGE 电泳　配制 12%SDS-PAGE 均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方，用 5%低熔点琼脂糖封闭。凝固后用 Protein Ⅱ XI Cell 电泳系统进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS，设置温度 15℃，先按 10mA/gel 电泳 40min，再按 25mA/gel 恒流电泳至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。

1.2.5 考马斯亮蓝入 Holder 中，并与电极紧密接触，再加上覆盖液。置于 IPGphor 等电聚焦仪的电极板上，水染色　将 2-DE 胶放入考马斯亮蓝 R-250 染色液中染色，然后在脱色液中脱色至背景清晰，蒸馏水反复洗涤多次。

1.2.6 图像分析　Amersham ImageMasterVDS-CL 型凝胶成像系统对考马斯亮蓝 R-250 染色的 2-DE 胶进行扫描，ImageMaster 2D V2002.1 图像分析软件分析，斑点位置的重复性按 Gorbett [16] 等的方法进行计算。所有数据的统计分析在 SPSS10.0 软件和 Excel 上进行。

1.2.7 质谱及生物信息学分析　选取图像分析得到的差异蛋白质点，依次进行脱色、脱水、还原、烷基化、酶解、萃取，获得肽质量指纹图，将肽质量指纹数据通过因特网在蛋白质序列数据库中进行搜索，确定各点所属蛋白。

## 2　结　果

### 2.1　喉鳞形细胞癌和对照组正常黏膜蛋白质组双向凝胶电泳图谱

经图象分析显示在相同设定值条件下获取的蛋白斑点，以其中一块胶为参考胶进行 3 块胶间的斑点匹配。图 1A 所示为喉癌组织双向凝胶电泳平均胶图谱。图 1B 所示为对照组喉正常黏膜组织双向凝胶电泳平均胶图谱。两个样品以 PI=4~8 和分子质量 20.1~116ku 范围的蛋白斑点分布最多。喉癌组平均胶蛋白斑点数为 1236，正常黏膜组平均胶蛋白斑点数为 943，与喉癌组平均胶匹配点数为 678，匹配率 71.89%。

### 2.2　喉鳞形细胞癌蛋白质组的差异表达

比较两组平均胶，发现有 33 个蛋白质点的表达存在明显差异。其中有 22 个蛋白点在喉癌组织中表达明显上调，有 11 个蛋白点在喉癌组织中表达发生明显下调而在喉正常组织中表达上调（如图 1A、图 1B 所示）。

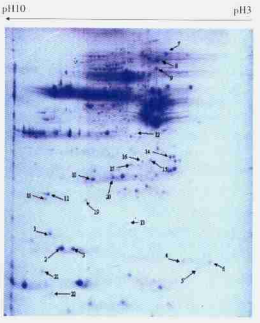



图 1A　喉癌组织双向凝胶电泳图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com



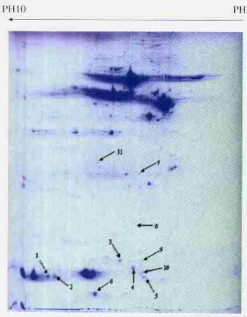



图 1B 正常喉黏膜组织双向凝胶电泳图谱

表 1 喉癌组织凝胶中高表达的蛋白质点

| 蛋白点名称 | 匹配肽段 | 分子量 | 积分 | 等电点 |
|---|---|---|---|---|
| Zinc finger protein 41 | 9 | 96104 | 33 | 5.9 |
| GRP94 | 11 | 92411 | 66 | 4.8 |
| Cofilin-1 | 6 | 18360 | 64 | 8.3 |
| Superoxide dismutase [Mn] | 8 | 24707 | 59 | 6.9 |
| Cytochrome c oxidase subunit 5A | 5 | 16935 | 36 | 9.8 |
| Apolipoprotein A-I precursor | 6 | 30759 | 46 | 5.7 |
| Spliceosome RNA helicase BAT1 | 9 | 49416 | 62 | 5.1 |
| 14-3-3 protein epsilon | 8 | 29326 | 73 | 5.3 |

### 2.3 质谱鉴定结果

将寻找到的表达增加超过 2 倍以上的蛋白斑点进行了质谱分析和数据库鉴定，初步鉴定出在喉癌组织中表达升高的 8 个蛋白：锌指蛋白 41，GRP94，cofilin-1，Superoxide dismutase[Mn]，细胞色素 C 氧化酶，载脂蛋白 A-I 前体，Spliceosome RNA helicase BAT1，14-3-3 protein epsilon。

## 3 讨 论

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一，由于其所处部位为重要的呼吸及发音器官，所以对患者危害性极大。随着环境致癌因素的增加，喉癌发病率有逐年增高的趋势，找到有效的早期诊断和防治方法有重要价值，但喉癌的确切发病机制至今还很难确定。研究者从分子水平及单个蛋白质方面试图寻找肿瘤标志物和探讨喉癌的发生机制，陈锦屏等[5]研究发现肿瘤抑制基因 PTEN 在喉癌的发生发展中起着极为重要的作用，它可能是预测喉鳞癌侵袭与转移能力重要的分子标志物。Bcl-2 与肿瘤分级、淋巴结转移、浸润程度有关，它是预测喉癌预后一个独立的分子指标[6]。P57 表达减少与喉鳞癌的发生、发展及其淋巴结转移有关[7]。

虽然发现了很多与喉癌发生密切相关的基因和蛋白，但目前还没有找到理想的与喉癌诊断及治疗、评估预后相关的肿瘤标志物。蛋白质组学及相关技术的发展为人们从整体水平阐明肿瘤的发病机制提供了有力的工具，也使发现具有临床诊断价值的肿瘤标志物成为可能。

本研究利用双向凝胶电泳技术分离喉癌及癌旁喉正常黏膜组织中的总蛋白质，考马斯亮蓝染色显色，ImageMaster 2D 软件分析获得双向凝胶电泳图谱，找出差异表达的蛋白质点。我们通过改进蛋白质提取过程和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，匹配率为 71.89%，完全能够满足进行蛋白质组研究所需的要求。其中关键的步骤是裂解液的组成成分，蛋白质提取时裂解液与组织的配比，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。通过比较喉鳞形细胞癌和癌旁正常黏膜组织蛋白质组电泳图谱，得到蛋白质在表达数量和强度上的差异。对这两种蛋白质组表达差异的分析结果显示，有 33 个蛋白质表达出现明显差异，有 22 个在喉癌组织中发生明显上调，有 11 个蛋白质表达发生明显下调。我们通过质谱分析，初步鉴定出了在喉癌组织中高表达的 8 种蛋白质，在初步鉴定的差异蛋白质点中有一些与肿瘤发生、发展相关。

GRP94 是 HSP90 家族成员。HSP 过表达通常与细胞有害损伤有关[8]。近年来的研究显示 HSP90 在肿瘤细胞的存活过程中有非常重要的作用，它是很多癌基因通路中的重要组成部分，它可能是肿瘤细胞生长中所必需的一些蛋白的分子伴侣，参与对肿瘤细胞周期的调控[9]。在喉癌中 GRP94 的表达增加提示细胞的自我防御机制被激发来应对细胞的恶性转化。它在喉癌肿瘤发生和癌细胞存活及抑制凋亡中发生的作用是我们下一步研究的一个方向。

cofilin-1，(切丝蛋白-1) 调节肌动蛋白的运动，而后者的解聚和聚合活动促进癌细胞的移动和转

维普资讯 http://www.cqvip.com



移的发生[10]。

Zinc finger protein 41 属锌指蛋白家族，锌指蛋白功能非常广泛，其功能主要包括 DNA 识别、RNA 包装、转录调控、蛋白折叠和装配、脂质结合，并参与生长发育过程和恶性肿瘤的形成等[11]。

Superoxide dismutase[Mn],MnSOD 是存在于细胞线粒体基质中的一种抗氧化酶,MnSOD 的增加提示我们熟知的抗氧化防御机制已被激发起。研究显示 MnSOD 过度表达抑制肿瘤细胞的生长[12],MnSOD 参与肿瘤发生的机制尚未完全清楚。大多数学者认为 MnSOD 主要通过影响细胞内氧化还原状态而影响肿瘤的发生发展。MnSOD 水平下降,导致细胞线粒体内 ROS 水平增加，低浓度的 ROS 水平在调节信号转导和转录因子活性中执行基本的生理功能，而高浓度的 ROS 则对细胞 DNA 及其它重要细胞结构有损伤作用，有助于肿瘤的发生和转化，同时也有利于肿瘤细胞周期行进,促进细胞增殖。

细胞色素 C 氧化酶，载脂蛋白 A-I 前体，Spliceosome RNA helicase BAT1,14-3-3 protein epsilon4 种蛋白质在喉癌中的高表达在国内外未见有相关报道。它们在喉癌中所发挥的作用还需要做进一步的研究。总之,我们正在确认其它差异蛋白质是否为喉鳞癌发生发展相关的蛋白质,并对这些蛋白质在人喉鳞癌的作用进行深入研究,它们可能成为潜在的诊断喉癌的肿瘤标志物和治疗靶分子，对探讨喉癌的发生机制有重要价值。

（通讯作者:傅仲学,教授,主任医师,博士生导师,E-mail:fzx990521@yahoo.com.cn）

## 参 考 文 献

[1] Sanderson RJ,Ironside JAD.Squamous cell carcinoma of the head and neck[J].BMJ,2002;325(7368):822-827.

[2] 季文樾,杜 强.晚期喉癌的综合治疗分析[J].中华耳鼻咽喉科杂志,2004;39(1):20-23.

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

[4] Corbett JM,Dunn MJ,Posch A,et a1.Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradients isoelectrie focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison[J].Electrophoresis,1994;15:1205-12l1.

[5] 陈锦屏，李向阳. 抑癌基因 PTEN 在喉癌中的表达及临床意义[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2006;20(10):454-456.

[6] Redondo M, Esteban F,Gonzalez-Moles MA. Expression of the anti apoptotic proteins cluster in and bcl-2in laryngeal squamous cell carcinomas[J]. Tumour Biol,2006;27(4):195-200.

[7] Fan G K,Xu F,Yang B,et al.p57 (kip2) expression is related to carcinogenesis and tumor progression in laryngeal tissues [J]. Acta Otolaryngol,2006;126(3):301-305.

[8] Jia Chen, Qing-Yu He,Anthony Po-Wing Yuen,et al. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: The involvement of multiple pathways in tumorigenesis[J].Proteomics,2004;4:2465-2475.

[9] Martin K J,Kritzman B M,Price L M,et al.Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer[J].Cancer Res,2000;60:2232-2238.

[10] Carlier M F,Wiesners,Le Clainche C,et al.Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro[J].C R Biol,2003;326(2):161-170.

[11] Ladomery M,Dellaire G. Multifunctional zinc finger proteins in development and disease[J].Ann Hum Genet,2002;66(Pt6):331-342.

[12] Oberley L W. Anti cancer therapy by over expression of manganese super oxide dismutase[J].Antiox Redox Signaling,2001;3:461-472.