维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0302-05

大肠癌核基质蛋白变化与其生物学行为的关系

高 静,王娅兰

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:比较不同分化程度大肠癌及伴有或不伴有淋巴结转移大肠癌与切缘大肠正常组织核基质蛋白表达差异,初步探讨核基质蛋白变化与大肠癌生物学行为的关系及其机制。方法:应用高分辨率双向电泳分析 12 例大肠癌组织及切缘大肠正常组织核基质蛋白成分的差异。用免疫组织化学 SP 方法检测大肠癌 MMP-9、CB 的表达。结果:大肠癌组织中存在 5 个特异性核基质蛋白,在正常大肠组织中未表达。正常大肠组织中存在 3 个特异性核基质蛋白,在大肠癌组织中缺乏。不同分化程度大肠癌核基质蛋白表达也具差异。一核基质蛋白(N4),存在于 12 例切缘正常大肠组织及 9 例中高分化不伴有淋巴结转移的癌组织中,而在 3 例低分化且伴有淋巴结转移的癌组织中则缺乏。免疫组织化学染色显示 MMP-9、CB 在缺乏核基质蛋白 N4 的低分化大肠癌中表达呈强阳性,明显强于具有核基质蛋白 N4 的中-高分化大肠癌。结论:大肠癌中存在肿瘤特异性核基质蛋白,不同分化程度及伴有或不伴有淋巴结转移大肠癌核基质蛋白表达也具有差异,大肠癌特异性核基质蛋白可望成为大肠癌的肿瘤标志物。大肠癌核基质蛋白改变可能与淋巴结转移有关,且可能与其对 MMP-9、CB 表达调节有关。

【关键词】核基质蛋白;双向凝胶电泳;大肠肿瘤,MMP-9 和 CB

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-24

Correlation between changes of nuclear matrix protein and biological behaviar of colorectal colon carcinoma

GAO Jing, et al

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

【Abstract】*Objective*: To identify the existence of the specific NMP in the human normal colon tissues and different differentiation of colon carcinoma, and try to study the association between changes of nuclear matrix protein and biological behaviar of colorectal colon carcinoma. *Methods*:Two-dimensional gel electrophoresis was used in the analysis of 12 matched human colon carcinomas and adjacent normal samples. MMP-9 and CB were detected by immunohistochemical SP method. *Results*: Analysis of multiple gels for each sample revealed that 5 proteins were present in tumor samples, but not in the matched normal colon tissues; and 3 proteins in normal colon tissues but not in the colon carcinomas. There were different NMPs in different types of colon carcinoma. One nuclear matrix protein (called N4) appeared in 9 moderate-well differentiational colon carcinomas without lymph node metastasis and in 12 normal colon tissues, but were absent in 3 poor differentiational colon carcinomas with lymph node metastasis. The result of immunohistochemistry showed that the expression of MMP-9 and CB in poor differentiational colon carcinoma which was lack of expression of NMP N4 was strongly positive, and was stronger than that in the moderate-well differentiational colon carcinomas which expressed NMP N4. *Conclusion*: The data suggests that there are colon carcinoma- specific NMPs. There are different NMPs in different types of colon carcinomas , and with or without lymph node metastasis. Colon carcinoma-specific NMPs may serve as the tumor markers of colon carcinoma in future. There is a relation between changes of nuclear matrix protein and lymph node metastasis of colorectal colon carcinoma; the changes of NMPs probably play a role in MMP-9 and CB expression of colon carcinoma.

【Key words】Nuclear matrix protein; Two-dimensional electrophoresis; Colon carcinoma, MMP-9 and CB

在真核细胞内除染色质、核膜与核仁外,还有一个以非组蛋白为主的网架结构体系,包括核纤层、内部纤维-颗粒状网架结构体系和核仁基质等 3 部分。这一网架结构体系是由 Berezney 和 Coffey 于 1974 年研究大鼠肝细胞核时发现,并首次将之

作者介绍:高 静(1978-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤病理。

基金项目:重庆市首批高校优秀中青年骨干教师资助计划资助(批文编号:渝教人【2002】17 号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

命名为核基质[1]。其主要成分为非组蛋白，此外还含有少量的 RNA 和 DNA。研究表明核基质不仅在维持细胞核的形态结构，而且在染色体组装、DNA 复制、RNA 转录等一系列活动中发挥重要作用。核基质蛋白具有组织和细胞特异性，不少研究表明，许多肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、白血病等肿瘤中存在着各自的特异性核基质蛋白。亦有文献报道，大肠癌及其癌前病变中核基质蛋白存在差异。有文献报道核基质蛋白变化与前列腺癌恶性程度有关。

有研究表明[2]某些抑癌基因如 p53 等产物可通过与核基质结合参与细胞周期和细胞生长的调节。如果核基质蛋白成分发生改变，则有可能引起癌基因或抑癌基因功能的改变，从而导致细胞生物学行为改变。

有文献报道肝转移性大肠癌中存在着特异的核基质蛋白，认为这种核基质蛋白对与大肠癌经血道远处转移有关。大肠癌最常见的转移途径是经淋巴道转移，且其与肿瘤细胞分化程度有关。不同分化程度大肠癌核基质蛋白是否有差异，其与淋巴结转移是否也有关，尚未见文献报道。大肠癌浸润转移与许多蛋白酶的释放有关，我们在既往研究中也注意到，组织蛋白酶 B（cathepsin B,CB）、组织蛋白酶 D 与大肠癌浸润转移有关[3,4]。故本研究对不同分化程度及伴有或不伴有淋巴结转移的大肠癌及其切缘正常大肠组织核基质蛋白变化进行了观察，同时应用免疫组织化学 SP 方法检测大肠癌 MMP-9、CB 的表达，初步探讨大肠癌特异性核基质蛋白变化与大肠癌生物学行为的关系及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

手术切除大肠癌标本 12 例取自重庆医科大学附属第一医院外科，其中 3 例为低分化腺癌伴淋巴结转移，另外 9 例为中－高分化腺癌，均无淋巴结转移，并切取各自上下切缘正常组织作对照。取材后部分组织石蜡包埋，HE 染色作病理组织分型，部分组织立即置于液氮速冻，再存放于 -80℃ 低温冰箱保存备用。

1.1.1 试剂 白胃素（Leupeptin）、抑肽酶（Aprotinin）、Dnase Ⅰ、Rnase A、EGTA 购自 Roche 公司，十二烷基磺酸钠（SDS）、PMSF 购自 Sigma 公司，DTT 购自 Genview 公司，30%丙烯酰胺（acrylamide）/甲叉双丙烯酰胺（2.6%）、CHAPS 购自 Sigma 公司，超纯尿素购自 Genview 公司，IPG 覆盖液、IPG 干胶条（pH=3~10，L=17）、Pharmalyte（pH = 3~10）、碘乙酰胺（iodoacetamide）购自 Bio-rad 公司。

兔抗人组织蛋白酶 B 抗体和基质金属蛋白酶 -9 抗体购自博士德生物试剂公司

1.1.2 仪器 Protean IEF cell 等电聚焦仪、Protein Ⅱ垂直电泳单元及附件（Bio-rad 公司）、图像分析系统（Amersham-pharmacia 公司）。

1.2 方法

1.2.1 大肠癌核基质蛋白的提取 参照 Fey 和 Penman[5]的方法。其主要步骤：将 -80℃保存的大肠癌和对照组织于 37℃迅速解冻，切成碎片，在含有蛋白酶抑制剂的细胞骨架缓冲液中匀浆 10min。过滤匀浆并离心去除脂类和可溶性蛋白，沉淀置于含有 100μg/ml Dnase Ⅰ和 Rnase A 的消化缓冲液，室温下作用 45 min，并离心。沉淀加入终浓度为 0.25mol/L 的冷硫酸铵，离心后沉淀蛋白主要包括核基质蛋白和中间丝。沉淀蛋白溶于含有 8mol/L 尿素的解聚液中，经透析去除尿素。取上清，测定蛋白浓度，乙醇沉淀核基质蛋白，-80℃保存待用。

1.2.2 双向电泳分析 (1) 固相化 pH 梯度（IPG）等电聚焦：样品蛋白 100μg 溶于含有 8mol/L 尿素的水化上样缓冲液，并放入 pH 为 3~10 的 IPG 干胶条，设定水化和聚焦程序，在 17℃恒温下进行水化和聚焦。(2) IPG 胶条的平衡和转移：将等电聚焦后的 IPG 胶条先后分别放入平衡液Ⅰ和Ⅱ中，摇床各振荡 10min。平衡液Ⅰ中含 DTT 0.2g，平衡液Ⅱ内由碘乙酰胺 0.25g 取代 DTT。(3) 第二向 SDS-PAGE：配制 20cm × 20cm 的 10%的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶，顶端固定 IPG 胶条后，于 15~20℃下电泳，待指示剂抵达底边时终止电泳。(4) 银染色：取出凝胶后，进行银染色。先用含 50%无水乙醇固定液固定凝胶过夜。加入含 0.125%戊二醛、0.2%硫代硫酸钠的增敏液反应 30 min，以去离子水漂洗凝胶。再以 0.1%硝酸银溶液（含 0.02%甲醛）染色 20 min，最后用 2.5%无水碳酸钠和 0.01%甲醛溶液显色 3~10 min，以 5%醋酸溶液终止反应，染色过程均在 20℃振荡下进行。

本研究中，从核基质蛋白提取到双向电泳，所有过程至少重复 3 次，结果有可重复性方视为核基质蛋白的组成成分。核基质蛋白经双向电泳后，图像分析用 Amershampharmacia 公司生产的 Image master 2002 图像分析软件进行分析。

1.2.3 免疫组织化学检测大肠癌组织蛋白酶 B、MMP-9 的表达

免疫组化方法按试剂说明书进行。

结果判断 参照 Shimizu 方法[6]，稍加修改，即根据每张切片的阳性细胞比例及着色深浅计分，着色细胞比例 1/3 以下为 1 分，1/3 ~ 2/3 为 2 分，2/3 以上 3 分。着色深度：无着色为 0 分，浅黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分。然后二者积分相加为最后阳性等级：0 分为阴性（－），1 ~ 2 分为弱阳性（+），2 ~ 4 分为阳性（++），大于 4 分为强阳性（+++）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 大肠癌及其正常大肠组织核基质蛋白的对比观察

通过 Image master 2002 图像分析软件分析，对比观察大肠癌组织及其各自切缘正常大肠组织核基质蛋白的组成差异，每块双向电泳胶上可识别到约 500 个不同的核基质蛋白。绝大多数蛋白在大肠癌组织及其切缘正常大肠组织中均能见到，即切缘正常大肠组织和大肠癌组织核基质蛋白组成极为相似。但可观察到有 3 个不同的核基质蛋白（分别记为 C1、C2、C5）出现于所有 12 例大肠癌组织中，其相应切缘正常大肠组织未见出现。另有 2 个核基质蛋白（分别记为 C3、C4）虽不是所有大肠癌中均有，但可见于绝大多数大肠癌组织中（C3 出现于 8/12 的病例中，C4 出现于 10/12 的病例中）。而其相应切缘正常大肠组织未见出现（见表 1 及图 1，2），各自 PI 和 Mr 见表 2。

反之，有 2 个核基质蛋白（记为 N1、N2）出现于所有 12 例切缘正常大肠组织中，而大肠癌组织中未见出现。另有 1 个核基质蛋白（记为 N3）虽不是所有正常组织中均有，但可见于绝大多数病例（出现于 10/12 的病例中），而大肠癌组织中则缺乏（见表 1 及图 1,2），各自 PI 和 Mr 见表 3。

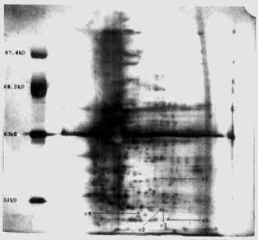


图 1 大肠癌双向电泳，示肿瘤特异性 NMPs C1–C5

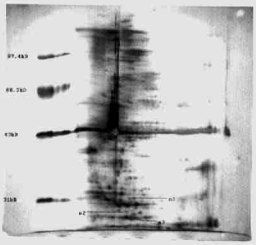


图 2 切缘正常大肠组织双向电泳，示正常大肠组织特异性 NMPs N1–N3

表 1 12 例大肠癌组织和切缘正常大肠组织核基质蛋白表达差异

核基质蛋白	大肠癌（例）	切缘正常组织（例）
N1	0	12
N2	0	12
N3	0	10
C1	12	0
C2	12	0
C3	8	0
C4	10	0
C5	12	0

表 2 大肠癌特异性核基质蛋白（C1–C5）分子量和等电点

核基质蛋白	分子量	等电点
C1	33.612	6.62
C2	29.991	7.05
C3	29.749	7.14
C4	29.101	5.99
C5	27.768	7.37

表 3 正常大肠组织特异性核基质蛋白（N1–N3）分子量和等电点

核基质蛋白	分子量	等电点
N1	31.245	5.86
N2	29.072	5.75
N3	27.726	6.24

2.2 不同类型大肠癌核基质蛋白变化的对比观察

本实验结果显示，在不同类型大肠癌中，核基质蛋白表达也具有差异。一核基质蛋白（记为 N4），其 Mr 为 32.418，PI 为 6.68，存在于所有 12 例切缘正常大肠组织，同时出现于 9 例中–高分化的癌组织，而在 3 例低分化且伴有淋巴结转移的癌组织中则缺乏（见图 3~5）。

2.3 大肠癌组织蛋白酶 B、MMP-9 的表达

2.3.1 MMP-9 在大肠癌组织中的表达 12 例大肠癌标本有不同程度的阳性表达，阳性率为 100%。切缘粘膜表达为阴性，在 3 例低分化伴有局部淋巴结转移者显示强阳性（见图 6，表 4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

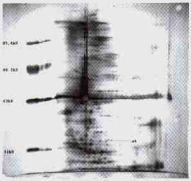


图 3 切缘正常大肠组织双向电泳,示 NMP N4

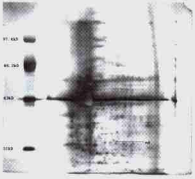


图 4 中-高分化大肠癌双向电泳,示 NMP N4

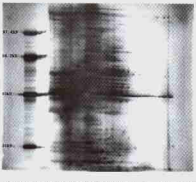


图 5 低分化大肠癌双向电泳图,无 N4 蛋白表达 (O 所示处)

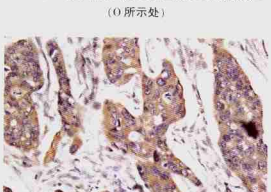


图 6 示低分化大肠癌 MMP-9 强阳性表达(+++), 免疫组织化学 SPx400

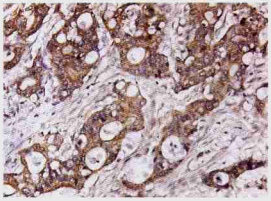


图 7 示低分化大肠癌 CB 强阳性表达(+++), 免疫组织化学 SPx40

表 4 12 例大肠癌组织和切缘正常大肠组织 CB 和 MMP-2 的表达

分型	CB				MMP			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
中高分化腺癌	0	4	5	0	0	3	6	0
低分化腺癌	0	0	0	3	0	0	0	3

2.3.2 CB 在大肠癌组织中的表达 12 例大肠癌标本有不同程度的阳性表达,阳性率为 100%。切缘粘膜均为阴性,3 例低分化伴有局部淋巴结转移者显示强阳性(见图 7,表 4)。

3 讨 论

核基质是存在于真核细胞核内的以蛋白成分为主的不溶于水性纤维蛋白网络体系。近年来研究发现,组织细胞不同,核基质蛋白成分也有一定的差别。迄今为止,在对人、大鼠和小鼠研究中均发现核基质蛋白成分具有组织特异性。核基质成分随着细胞转化和分化而出现或消失某些特异性蛋白,肿瘤细胞中亦有特异性核基质蛋白成分存在。这些特异性核基质蛋白对肿瘤诊断提供了重要信息,可能成为临床诊断的标记物。文献报道膀胱癌中存在的一种高表达的特异性核基质蛋白 NMP52,被认为对膀胱癌的诊断有临床意义[3]。亦有文献报道 NMP66 有可能作为肿瘤标志物用于早期乳腺癌的鉴别[4]。

本研究采用双向电泳方法比较了 12 例大肠癌组织及其切缘正常大肠组织核基质蛋白的组成,结果表明在大肠癌中有核基质成分的改变。虽然正常大肠组织和大肠癌组织核基质蛋白的组成极为相似,但在大肠癌中,有 5 个核基质蛋白在正常组织

维普资讯 http://www.cqvip.com

中未见。其中 C1、C2、C5，出现于所有被测的 12 例大肠癌中，而未见于切缘正常大肠组织。另在切缘正常大肠组织中观察到的 3 个不同的核基质蛋白，其中 N1、N2，在被测的 12 例切缘正常大肠组织中均有出现，其余 1 个蛋白 N3 不是所有正常组织中均有，但出现于绝大多数病例中，而大肠癌组织中未见出现。本结果提示 C1~C5 及 N1~N3 在大肠癌组织具有相对特异性，有望成为该肿瘤的标志物，被用于目前临床病理诊断中仅凭组织学和肿瘤生物学标记所不能确定的良、恶性肿瘤的诊断和鉴别诊断以及转移性肿瘤原发灶的确定。因此有必要扩大样本量，做进一步的研究。

研究表明，核基质不仅在维持细胞核的形态结构，而且在染色体组装、DNA 复制、RNA 转录、细胞癌变等一系列活动中发挥重要作用。但有关核基质蛋白与肿瘤发生之间的关系的研究，至今仍处于起步阶段。有研究表明[2,9]抑癌基因 p53、pRb、$p21^{WAF1}$ 的产物都是细胞核基质结合蛋白，通过与核基质结合参与细胞周期和细胞生长的调节，从而有效地控制细胞生长。因此如果核基质蛋白成分发生改变，则有可能引起癌基因或抑癌基因功能的改变，从而导致细胞生物学行为改变。有文献报道不同病理分期的前列腺癌组织核基质蛋白存在差异性表达，其中一种核基质蛋白 YL-1（76kD）特异性存在于所有前列腺癌预后差的组织中，10 例预后好的组织仅有 1 例表达，中间组 10 例有 9 例弱阳性表达，而正常前列腺组织则无表达，表明该蛋白和前列腺癌恶性程度高度相关[10]。Samuel 等[11]也曾报道，在 ras 或 fes 癌基因转染的鼠高转移性纤维母细胞株有相同的核基质蛋白，在低转移性细胞株则无这种核基质蛋白。Zhao 等也报道，用 HMBA（Hexamethylamine bisacetamide）诱导胃粘液腺癌细胞 MGc80-3 细胞分化，其核基质蛋白发生改变[12]。尚有作者报道乳腺恶性肿瘤组织中存在着一种 c-erbB-2 启动子 DNA 特异性结合核基质蛋白，其仅存在于乳腺恶性肿瘤中，其可诱导 NIH/3T3 细胞有丝分裂并可诱导其表达 c-erbB-2 蛋白[13]。我们在本实验中也观察到，核基质 N4 仅见于高分化无淋巴结转移的大肠癌，却在低分化伴有淋巴结转移的大肠癌中消失，提示正常、不同分化程度以及淋巴结转移与否的大肠癌核基质蛋白成分存在差异，在 3 例低分化伴有局部淋巴结转移者显示 CB、MMP-9 强阳性。这种差异性核基质蛋白的改变，有可能导致某些基因表达异常，包括酶如 CB、MMP-9 等的基因异常表达，从而促进肿瘤浸润转移，其详尽机制待进一步研究。

（通讯作者：王娅兰，女，教授，硕士生导师。）

参 考 文 献

[1] Berezey R, Coffey DS. Identitfication of nuclear matrix[J]. Biochem Biophys Res Commune,1974;60(4):1410-1417.

[2] Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste 24 protease is linked to p53 signalling activation[J]. Nature, 2005;437(7058):564-568.

[3] 林 晓，王娅兰. 大肠癌组织蛋白酶 B 表达及其与肿瘤微血管密度和生物学行为的关系 [J]. 重庆医科大学学报，2002;27(3):264-266.

[4] 王娅兰，苗德林，王顺和.组织蛋白酶 D 在大肠癌分布与浸润关系研究[J]. 重庆医科大学学报，1997;22(4):295-299.

[5] Fey EG, penman S.Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988;85(1):121-125.

[6] Shimizu M, Saiton Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum Pathol, 1990;21(6):607-612.

[7] Attallah AM, Sakr HA, Ismail H, et al. An office-based immunodiagnostic assay for detecting urinery unclear matrix protein 52 in patients with bladder cancer[J].BJU Int, 2005;96(3):334-339.

[8] Luftner D, Possinger K. Nuclear matrix proteins as biomarkers for breast cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2002;2(1):23-31.

[9] Obata H, Sawada N, Isomura H,et,al. Abnormal accumulation of copper in LEC rat liver induces expression of p53 and nuclear matrix-bound p21 waf1/cip1 [J]. Carcinogenesis, 1996;17(10):2157-2161.

[10] Lakshmanan Y,Subong EN, Parin AW. Differential nuclear matrix protein expression in prostate cancers correlation with pathologic stage[J]. J Urol, 1998;159(4):1354-1358.

[11] Samuel SK, Minish TM, Daie JR. Altered nuclear matrix protein profiles in oncogene-transfomed mouse fibroblasts exhibiting high metastatic potential[J]. Cancer Res,1997;57(1):147-151.

[12] Zhao CH, Li QF. Altered profiles of nuclear matrix protein during the differentiation of human gastric mucous adenocarcinoma MGc80-3 cells[J]. World Gastroenterol , 2005;11(30):4628-4633.

[13] Raziuddin A, Court D, Sarkar FH, et al. A c-erbB-2 promoter-specific nuclear matrix protein from human breast tumor tissues mediates NF-κB DNA binding activity [J]. J Biol Chem, 1997;272(25):15715-15720.