维普资讯 http://www.cqvip.com

综 著 文章编号:0253-3626(2007)02-0121-04

激光捕获显微切割技术在食管鳞癌蛋白质组学研究中的应用

李俊材[1],傅仲学[1],汪 斌[1],周建荣[1],白晓苏[2],董蒲江[1],黄开顺[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016;2.内分泌科,重庆 400016;3.重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection system,LCM)在获得较单一食管鳞癌细胞中的价值,为食管癌组织蛋白质组学的研究奠定基础。方法:通过激光捕获显微切割技术获取食管鳞癌和正常食管上皮细胞,采用双向凝胶电泳方法分离蛋白质,采用计算机辅助的图像分析技术比较分析凝胶图像。结果:激光捕获了较纯的目的细胞,获得到了分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱,比较分析发现 38 个蛋白点的表达量存在明显差异,其中新增蛋白点 3 个,缺失 5 个,20 个蛋白点明显上调,10 个蛋白点发生明显下调。结论:本研究结果提示 LCM 技术能较好地获取较为均一的目的细胞,并发现食管鳞癌与正常食管上皮细胞蛋白质表达存在明显差异,可能与食管鳞癌发生机制有关。

【关键词】癌;食管癌;蛋白质组;激光捕获显微切割

【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿时间】2006-11-16

Proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection

LI Juncai, et al

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

【Abstract】*Objective*: To exclude the disturb of mixed cell types, acquire human esophageal squamous cell carcinoma cells and normal esophageal epithelial cells, analyze the differential expression of proteme between them. *Methods*: Pure human esophageal squamous cell carcinoma cells and normal esophageal epithelial cells were obtained by LCM, protein were separate by Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique, and computer-assisted image analysis were used to analyze the images of polyacrylamide gels. *Results*: Laser capture microdissection obtained pure objective cells. Analyzed the image of polyacrylamide gels, there were 38 prorein spots that were significantly differentially expressed. Of those 38 protein spots, 3 protein spots were newly found, 5 protein spots were disappeared, while 20 prorein spots increased markedly, 10 prorein spots were decreased significantly. *Conclusion*: Laser capture microdissection can be apllied to successfully obtain pure objective cells from frozen sections. The proteomic expression in esophageal squamous cell carcinoma cells is significantly different from that of normal esophageal epithelial cells, which may be associated with the mechanism of esophageal carcinogenesis.

【Key words】Carcinoma; 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[1],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[2,3]。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试验结果影响很大,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[4,5]。为此,我们应用 LCM 技术分离食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞,并结合双向凝胶电泳技术对两者的蛋白表达图谱进行分析,为进一步的质谱鉴定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 食管鳞癌组织及癌旁组织 选取重庆医科大学附属

作者介绍:李俊材(1980-),男,硕士,
主要研究方向:消化道肿瘤的基础与临床的研究。

基金项目:重庆市自然科学基金项目(编号:CSTC,2006BB5302)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

第一医院的食管鳞癌手术病例，所有病例术前均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 3~5cm 食管上皮组织)，于冰盐水(含 0.1mmol/LPMSF)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 10min 内完成，然后移至 -80℃冰箱保存。

1.1.2 试剂 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(cocktail)购自 Amresco 公司。四甲基乙二胺，pH3~10 固相化线性 17cm 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 冰冻切割机(德国 Leica CM 1900)，LCM(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)，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 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，切片厚度 10μm，每例标本第 1 张切片用 HE 染色，以后每张切片只做苏木素染色，经乙醇梯度脱水，二甲苯透明。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)60μm，光束能量(beam power)80mV，激光传递脉冲(transfer pulses)为 7000，按此法取得 40000~50000 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(8mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，4% CHAPS，65mM DTT，0.2%两性电解质，10ml/L cocktail)提取总蛋白，加入裂解液后，冰浴振荡 30min，再低温超声数次后，给予 4℃，20000×g 离心 1h，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 et al[6]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 100μg 加入重泡胀液 (8mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，4% CHAPS，65mMDTT，0.2%两性电解质，0.001%痕量溴酚蓝)至终体积 350μl 混匀。将样本均匀加入持胶槽中，胶面向下放入 17cm 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 (6mol/L 尿素，2%SDS，0.375mol/L pH8.8 Tris-HCL，20%甘油，20g/LDTT)和平衡液 B(6mol/L 尿素，2% SDS，0.375mol/L pH8.8 Tris-HCL，20%甘油，25g/L 碘乙酰胺)中各平衡 15min，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 10μl，低溶点琼脂糖封闭，电泳参数：5mA/gel 1h，待溴酚蓝前沿移入 SDS 胶时，以 30mA/gel 6h 直至溴酚蓝前沿抵达距胶底边缘约 0.5cm 时为止。

1.2.4 硝酸银染色 染色基本过程依次为：先用去离子水漂洗 SDS-PAGE 胶 5min；在含 50%甲醇、10%乙酸、0.05%甲醛固定液中固定 60min；在用 35%乙醇水洗 30min；在含 0.2%硫代硫酸钠、0.0016%甲醛敏化液中敏化 2min；水洗 3 次，每次 5min；在含 0.2%硝酸银和 0.08%甲醛染色液中银染 20min；水洗 2 次，每次 1min；在含 6%碳酸钠和 0.05%甲醛的显影液中显影至凝胶上蛋白质斑点清晰；以 5%甲醇和 10%乙酸终止 10min；凝胶去离子水洗数次后，保存于 1%乙酸中备用。

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 version7.4 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。

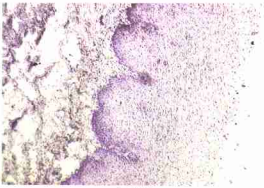
2 结 果

2.1 目的细胞的激光捕获微切割

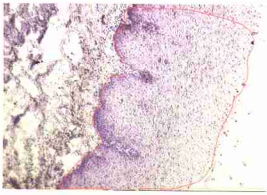
食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞的冰冻切片经苏木素染色后可以分辨癌细胞和周围结缔组织间质细胞，根据癌巢在切片中的位置和大小调整视野，激光束沿间质细胞一侧切割(图 1、2)。在直视下，所获得细胞中目的细胞占总细胞数≥95%。

2.2 食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞双向凝胶电泳图谱

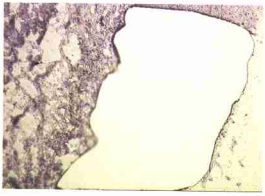
维普资讯 http://www.cqvip.com



A：切割前

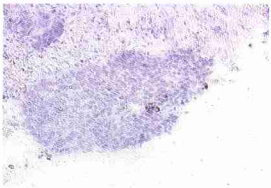


B：选取切割部位



C：切割后

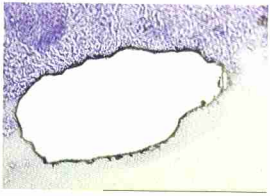
图 1　正常食管上皮细胞(苏木素染色 10×)



A：切割前



B：选取切割部位



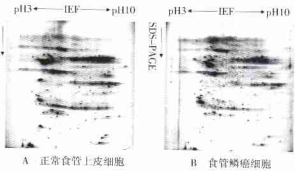
C：切割后

图 2　食管鳞癌细胞(苏木素染色 20×)

从食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞中获取的蛋白在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，通过双向凝胶电泳分离技术建立了双向电泳银染图谱(图 3)。

2.3　双向凝胶电泳图谱分析

通过光密度、点大小以及三维观察，发现 38 个蛋白点的表达量存在明显差异，其中新增蛋白点 3 个，缺失 5 个，20 个明显上调，10 个蛋白点发生明显下调。



A　正常食管上皮细胞　　B　食管鳞癌细胞

图 3　正常食管上皮细胞和食管鳞癌细胞的双向凝胶电泳图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

食管鳞癌的发生是多基因调控的复杂过程，为了阐明在肿瘤发生和发展不同阶段如不典型增生、原位癌、浸润癌及转移癌发生时特定细胞内的分子生物学改变，其关键的分子生物学改变等重要信息，需要获得单一的同类细胞群。组织是多种细胞群体相互作用的三维空间结构，以往的各种技术所获得的细胞，其内既有肿瘤细胞，又多少不等地含有一些其他细胞。因此，组织细胞异质性已成为肿瘤蛋白质组学研究的一大障碍[7]。

LCM 技术是一项在显微镜下从组织切片中确定、分离、纯化单个细胞或单一类型细胞群的技术，并具有快速准确和无细胞损伤等优点，是目前解决组织异质性的操作中组理想的方法[8]，我们应用LCM技术从食管鳞癌组织和正常食管上皮组织冰冻切片中获取目的细胞，剔除了粘膜肌层、结缔组织、血管等杂合性细胞成分。在试验中碰到棘手的问题主要是在切割完毕后，目的细胞粘连在玻片塑胶膜上，不易脱落至收集管中，这种情况严重影响了切割时间，其常见的原因有：切片脱水不彻底；组织平铺于载玻片上时局部皱褶不平，激光切割不彻底，导致部分组织粘连；环境湿度的影响。解决办法有：保证乙醇脱水时间充分，每天更换乙醇和二甲苯溶液；组织平铺，不要使用有皱褶的切片；不在潮湿的环境中进行 LCM 操作。

试验过程中摸索试验条件：(1)冰冻切片机使用前应以无水乙醇清洁整个箱体内部，并更换刀片，避免蛋白酶对切片组织中蛋白的消化。(2)待切组织从 -80℃冰箱取出后，应立即置入预冷的冰冻切片机内，应在几分钟内快速完成切片的制作，染色确认切片制做成功后，组织马上送还 -80℃冰箱。(3)苏木素染色能清新辨别肿瘤细胞，勿需伊红再次染色，尽量避免因染色问题导致的蛋白所带电荷改变而引起的 2-DE 胶模式的变化；染色染色时间控制在 10min 中内，染色后室温风干至载玻片微变白即可进行 LCM。(4)LCM 参数设置以不要使光镜下光束中心产生焦黑斑为限，尽可能使一次激光击发捕获最大量细胞。(5)捕获的细胞最好尽快溶于提取裂解液中提取蛋白，-80℃保存。

通过对目的细胞蛋白质的双向凝胶电泳，我们成功获得了食管鳞癌细胞和正常食管上皮细胞的蛋白质组电泳图谱，对两种蛋白质组的表达差异分析结果显示，这两种细胞的蛋白质表达存在明显差异，其中新增蛋白点 3 个，缺失 5 个，20 个明显上调，10 个蛋白点发生明显下调。这些蛋白质成分可能与食管鳞癌的发生机制密切相关，进一步的质谱分析可以鉴定出这些蛋白质的种类，以明确其功能，为认识食管鳞癌的发病机制提供线索。综合上述结果，我们认为激光捕获显微切割技术在本试验中是成功。

（通讯作者 傅仲学 Tel：(023)89012302 E-mail：fzx990521@sina.com）

（致谢 衷心感谢重庆医科大学基础医学研究所王正义老师、李春莉老师在试验过程中给予的指导和帮助！）

参 考 文 献

[1] Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, presentand future[J].Electrophoresis, 1996; 17: 443-532.

[2] Molly MP.Two dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients[J].Anal Biochem, 2000; 280(1): 1-10.

[3] Kim J, Kim SH, Lee SU, 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.

[4] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection[J]. Science, 1996; 274(8): 998.

[5] Bonner RF, Emmert-Buck M, Co K, et al. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue[J].Science, 1997; 278(5342): 1481-1483.

[6] Gorg A, Obermaier C, Thornley JP, et al.The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J].El-electrophoresis, 2000; 21: 1037-1053.

[7] Lo YL, Shen CY. Laser capture microdissection in carcinoma analysis[J].Methods-Enzymol, 2002; 356: 137-144.

[8] Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings[J].Elelectrophoresis, 1999; 20(45): 689-700.