基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001026

基于 iTRAQ 技术筛选肝癌转移相关差异蛋白

宋琳岚，杨　敏，蒋小燕，陈　瑜，汤　慧，颜　亮，廖　勇
（重庆医科大学病毒性肝炎研究所、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室、
重庆医科大学附属第二医院感染科，重庆　400016）

【摘　要】目的：通过对不同转移潜能的肝癌细胞系的差异蛋白组学研究，以筛选鉴定出与肝癌转移相关的差异表达蛋白。**方法**：3 株具有相同遗传背景、不同转移潜能的肝癌细胞系 MHCC97-L、MHCC97-H 及 HCCLM3 作为研究材料，经过收集胞质蛋白，浓缩、酶解、脱盐并用同位素标记相对和绝对定量技术（isobaric tags for relative and absolute quantitation，iTRAQ）对其进行标记，应用二维液相色谱串联质谱技术对肽段进行鉴定，得到的结果与数据库进行比对，对蛋白进行注释。基于 WebGestalt 数据库对差异表达的蛋白进行 GO（gene ontology）功能分析和通路分析以筛选与肝癌转移相关的目标蛋白。并用 Western blot 对 3 个关键蛋白（PLEC、SHMT2、LDHA）进行验证。**结果**：经过 iTRAQ 标记并质谱检测分析，共发现鉴定 1 170 个蛋白，其中在 L/H（MHCC97-L/MHCC9-H）组鉴定发现 47 个差异表达蛋白，在 M/H（HCCLM3/MHCC97-H）组鉴定发现 65 个差异表达蛋白。生物信息学分析显示 L/H 和 M/H 组差异表达的蛋白主要参与酶催化和细胞间粘附及细胞代谢的过程。应用 Western blot 在蛋白水平上的验证，PLEC 在高转移细胞株 MHCC97-H 和 HCCLM3 中表达上调，SHMT2 在 HCCLM3 中表达上调，LDHA 在 MHCC97-H 中表达上调。**结论**：在本研究中应用 iTRAQ 标记高通量的蛋白质组学技术对 3 株不同转移潜能的肝癌细胞系的差异表达蛋白进行检测和鉴定分析，发现 PLEC 和 SHMT2 蛋白是两种新的与肝癌转移可能相关的蛋白。

【关键词】肝细胞性肝癌；蛋白组学；同位素标记相对和绝对定量技术；转移
【中图分类号】R735.7　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-03-27

Screening of differentially expressed proteins related to metastasis in hepatocellular carcinoma based on iTRAQ

Song Linlan, Yang Min, Jiang Xiaoyan, Chen Yu, Tang Hui, Yan Liang, Liao Yong
(*Institute for Viral Hepatitis; Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Founded by Ministry of Education; Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate proteomics of hepatocellular carcinoma(HCC) cells with different metastatic potentials by isobaric tags for relative and absolute quantitation(iTRAQ); to screen and identify proteins related to metastasis, and to provide new molecular targets for metastasis and treatment. ***Methods***: Cytoplasmic proteins, extracted from three cell lines with similar genetic background and different metastatic potentials were concentrated, digested, desalted and labeled with iTRAQ. Differentially expressed proteins were identified by 2D-LC-MS/MS, then the proteins were annotated by comparing with known protein database. Target proteins related with metastasis were singled out by gene ontology analysis and related pathway analysis using WebGestalt databases. These proteins were then validated by Western blot. ***Results***: Using iTRAQ labeling for quantification and detection by LC-MS/MS, 1 170 proteins were identified. Forty-seven proteins were differential expressed in L/H(MHCC97-L/MHCC9-H) groups, and 65 proteins in M/H(HCCLM3/MHCC97-H) groups. Bioinformatics analysis revealed that differential expression proteins in L/H and M/H groups were mainly related to the catalytic activity of some enzymes and cells adhesion, and play important role in the cellular metabolic process. At translational level, PLEC was up-regulated in MHCC97-H and HCCLM-3, SHMT2 was up-regulated in HCCLM3, LDHA was up-regulated in MHCC97-H, thus the results of Western blot were consistent with those of LC-MS/MS. ***Conclusion***: PLEC and SHMT2 are validated to be novel candidate HCC metastasis-associated proteins based on the analysis of this study.

【Key words】hepatocellular carcinoma; proteomics; isobaric tags for relative and absolute quantitation; metastasis

作者介绍：宋琳岚，Email：823111096@qq.com，
研究方向：肿瘤干细胞。
通信作者：廖　勇，Email：yongliao@cqmu.edu.cn.
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81172066、81472858）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161026.1650.003.html
（2016-10-26）

肝癌是消化道常见的恶性肿瘤，据世界卫生组织统计全球每年约有 78.2 万例新发病例，74.5 万例死亡病例，其中 70%~90%为肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC），中国肝癌的新发病例数及死亡病例数均占一定比例，约为 50%[1]。尽管在过去 30 年间对肝癌的诊断和治疗都取得了卓有成效的发展，但肝癌的侵袭和转移率仍然高达 43.5%[2-3]，这也是肝癌患者死亡率高、预后较差的一个重要原因[4]。肝癌转移是多因素参与、多步骤完成、复杂动态的生物学过程，与肿瘤细胞的粘附、运动、增殖，对基质蛋白的水解化及促进肿瘤组织内血管生成等因素有关。肿瘤转移可以分为：肿瘤的局部浸润侵袭；渗入血管，随循环系统转移；移出血管，侵入并与基底膜和靶器官细胞胞外基质发生粘附并降解；癌细胞在靶器官定植并形成克隆。在此过程中众多研究者发现一系列肝癌的侵袭和转移涉及多种信号分子转导通路，包括粘附分子、血管生长因子、趋化因子及转移相关抑制调控基因等。肝癌转移的生物学机制尚未完全阐明，临床亦无相关检测转移的标志物和治疗靶标，因此发掘肝癌转移相关蛋白分子尤为重要。

过去数年间高分辨率和高通量的蛋白组学研究技术被广泛应用于各种组织及细胞模型中，用于研究蛋白表达的差异、翻译后修饰以及蛋白-蛋白相互作用等，为研究和发现疾病特异性生物标志物提供了新的思路[5]。在本实验中应用基于 iTRAQ 的定量蛋白组学方法对具有相同遗传背景不同转移潜能的 3 株肝癌细胞株进行差异蛋白的检测和分析，以找到肝癌转移相关的蛋白，为今后进一步深入探讨肝癌转移的预警和干预研究提供新的靶标。

采用的 3 种细胞株 MHCC97-L、MHCC97-H 及 HCCLM3 由复旦大学肝癌研究所提供，是从一名肝癌患者的新鲜瘤组织分离并建立小鼠异种移植模型，并进一步通过体内肝脏原位移植和体外分筛的方法建立的，且经过系统的体内和体外生物学验证[6]。其中 MHCC97-H 和 MHCC97-L 是从同一株细胞株 MHCC97 中分选而来，在肝脏原位移植瘤模型中 2 株细胞的转移能力不同，其中 MHCC97-H 可以发生 100%的肺转移、80%的肝内转移及 40%的腹壁转移，而 MHCC97-L 只有 40%的肺转移和20%的腹腔内转移[7]。HCCLM3 是通过 MHCC97-H 在裸鼠体内连续传代筛选出来的，其在肝脏的原位移植瘤模型中可以发生 100%的肺、肝转移及 80%的腹腔内转移，在裸鼠皮下接种时发生 100%的肺转移[8]。因为其来源的特殊性，本研究同时对 3 株细胞进行 iTRAQ 标记并进行质谱检测和分析，数据分析时将3株细胞分为 MHCC97-L/MHCC97-H 和 HCCLM3/MHCC97-H 两组进行比较，以 MHCC97-H 为基准，其余 2 株细胞均与之比较筛选转移相关差异表达蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 3 种人肝癌细胞系 MHCC97-L、MHCC97-H 及 HCCLM3 由复旦大学肝癌研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂 高糖（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM），胰酶（Hyclone）；胎牛血清（Gibco）；2-D Quant kit 蛋白定量试剂盒（Amersham Biosciences）；测序级修饰胰酶（Promega）；iTRAQ 8 标试剂盒（Applied Biosystems）；丙酮、尿素、甲酸及三氟乙酸（Sigma）；WB 相关抗体（CST）；30%AB（Bio-Rad）；苯甲基磺酰氟化物（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）、PIC 及 N,N,N',N'四甲基乙二胺（N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine，TEMED）等（上海生工）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及蛋白样品制备 肝癌细胞 MHCC97-L、MHCC97-H 和 HCCLM-3 是贴壁生长细胞，用含 10%FBS 及 1%P/S 的 DMEM 高糖培养基于 5%的 CO_2 和 37 ℃细胞培养箱中培养。待细胞汇合至 80%时传代，并隔天换液。细胞长至对数期时，以细胞裂解液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 8；150 mmol/L NaCl；1% NP40；1 mmol/L EDTA，pH 8；PMSF 10 μmol/L；PIC 10 μmol/L）提取胞质蛋白，并以 2-D Quant kit 的方法对蛋白样品进行定量。

1.2.2 iTRAQ 试剂标记样本及脱盐 每组样品经计算分别取 100 μg，分别加入-20 ℃丙酮中沉淀 6 h，弃上清，并以新鲜预冷的丙酮洗涤蛋白沉淀 2 次，开盖待丙酮完全挥发干。将蛋白沉淀分别用 iTRAQ 试剂盒中的溶解液充分溶解，后依次加入 2 μL 还原剂，37 ℃反应 1 h；加入半胱氨酸封闭剂 1 μL，室温处理 10 min；加入适量溶解的胰酶，混匀后 37 ℃过夜，真空干燥离心；以溶解液重溶蛋白结晶，分别加入 iTRAQ 试剂，按以下顺序标记：MHCC97-H 为 115、118；MHCC97-L 为 116、119；HCCLM3 为 117、121，室温处理 3 h，真空离心干燥；最后以 0.1%的 TFA 重溶蛋白结晶，并通过预先处理的 SPF 柱以除去标记试剂和缓冲液中的盐离子，真空泵离心干燥浓缩，4 ℃保存备用。

1.2.3 肽段分离及质谱扫描 第一维强阳离子柱（strong cation exchange，SCX）分离，使酶解并 iTRAQ 标记的样品重新溶解到 A 液（含有 10 mmol/L KH2PO4，25% ACN，pH 2.6）中，然后加入到分离柱（2.1 mm × 100 mm，5 μm，200 A）上样。B 液含 10 mmol/L KH_2PO_4，350 mmol/L KCl，25%ACN，pH 2.6。

设定基本信息，紫外检验波长 214 nm/280 nm；流速为 200 μl/min；梯度为 60 min。按以下程序的浓度梯度进行分离：0~5%缓冲液 B 5 min；5%~25%缓冲液 B 15 min；25%~80%缓冲液 B 5 min；80% 缓冲液 B 液 5 min；80%~0%缓冲液 B液 1 min；51~60 min 停止。根据峰型和时间共收取 24 个梯度，经真空离心干燥浓缩后，用 50 μl 的 RPLC A 液（5% ACN，0.1% FA）进行溶解，准备进行第二维液质串联质谱分析。

第二维液质串联质谱分析用于溶解的 A 液含有 5% ACN，0.1% FA，B 液含有 95% ACN，0.1% FA。设定基本信息为，流速 33 nl/min，洗脱基本程序为：5%~35% 缓冲液 B 85 min；35%~80%缓冲液 B 5 min；80%缓冲液 B 5 min；80%~5%的缓冲液 B 5 min；5%~0%的缓冲液 B 15 min。设定采集信息为阳离子模式。质谱鉴定的扫描范围：400~1 800 m/z，MS/MS 扫描范围：100~2 000 m/z。

1.2.4 数据检索 所有 LC-MS/MS 得到的数据导入基于 Paragon 算法和 ProGroup 的 Protein Pilot 4.5 软件中，选择 Paragon Method 为分析算法，对每个鉴定的蛋白质会产生 unused ProtScore 值（即蛋白独有肽段的得分值），设置 unused 的界限为大于 1.3，即设置界限为 95%置信区间。将得到的蛋白质数据在 SwissProt human 数据库中进行比对分析。设置参数：数据库选择为 SP_Human_20140410，酶选择 Trypsin，允许的未酶切位点选择为 1，固定修饰位点选择为 MMTS，肽片段容差选择为 0.2 D，据通过 Protein Pilot 软件系统设置有误差修复，可以对误差进行校正，数据进行标准化；所有的数据识别基于错误检出率<1%。对应多种蛋白的同一多肽片段软件会自动识别并排除。最终两组蛋白的比值是从 2 次重复实验中比值的均值中获得，为后续研究方便，比值均以 Log 2 为底求均值的对数表示，P 值以 Log 10 为底的负对数表示。

1.2.5 生物信息学分析 应用数据库 PANTHER 对差异表达蛋白分子功能及结构类型进行分析。并应用 WebGestalt 数据库进行通路富集分析和相关疾病的分析。将已鉴定的蛋白的 Gene ID 单独提取，进行文本格式的转化，上载至 WebGestalt 数据库中，选择种属来源“Hsapiens”，并选择识别选项为“Gene symbol”提交，并设置筛选标准，对样品进行进一步富集分析。

1.2.6 Western blot 验证蛋白表达水平 当细胞处于对数生长期时以细胞裂解液提取胞质蛋白，并以 Bradford 的方法测定蛋白浓度进行定量，分别取 36 μg 加入预先配制的 10%聚丙烯酰胺凝胶对应孔中，100 V 进行电泳分离，并用湿转的方法将蛋白转至 PVDF 膜上。5%的牛奶封闭后，加入稀释好的一抗（一抗为 1:1 000 稀释，Actin 为 1:2 000 稀释）4 ℃过夜，并经 TBST 洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的兔二抗（1:5 000 稀释），室温反应 1 h 时后，以 ECL 化学发光。并用 Image ProPlus 软件计算灰度值。

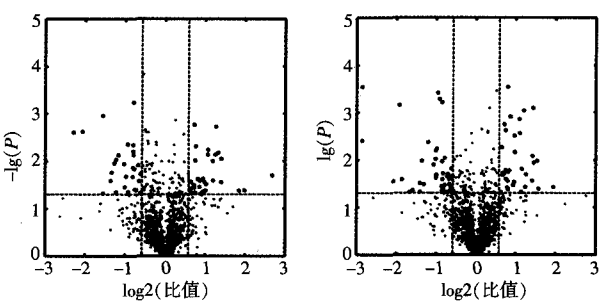
1.3 统计学分析

数据统计学分析采用 SPSS 20.0 软件。数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，其组间两两比较采用 Dunnett-t 检验，检验标准 α=0.05。

2. 结 果

2.1 iTRAQ 分析差异表达蛋白

为了实验的可信度和鉴定的蛋白覆盖的范围，选用不同标记对同一细胞株的蛋白进行了 2 次重复标记，标记顺序：MHCC97-H 标记为 115 和 118，MHCC97-L 标记为 116 和 119，HCCLM3 标记为 117 和 121。对于不同标记蛋白其对应质谱图的峰下面积代表样品中的蛋白相对丰度，并用 Protein Pilot 4.5 软件对蛋白进行比对分析，分析中其独有肽段的得分值（即 unused 值）大于 1.3，置信度大于 95%，经质谱鉴定检测得到 1 170 个具有 95%可信度的蛋白，详见表 1。设置筛选差异蛋白标准为：在 2 次重复标记中均被检测到的蛋白；蛋白质的鉴定基于 2 个或 2 个以上特异性肽段的检测；在 2 次标记中平均比值≥±1.5 倍（t 检验，P<0.05）。根据以上标准在 L/H 组共挑选出 47 个蛋白（其中有 26 个蛋白表达上调，21 个蛋白表达下调），在 M/H 组挑选出 65 个差异表达蛋白（34 个蛋白表达上调，31 个蛋白表达下调）（图 1，表 2，表3），并进行进一步分析。



x轴代表蛋白比值，以大于 ± 1.5 倍为界，图中以 log2（比值）表示；y 轴代表 P 值，以 P<0.05 为界，图中以 -lg（P）表示

图 1 差异蛋白的火山图分布

Fig.1 Volcano plots showing the distribution of significance and fold change of identified proteins

表 1 质谱鉴定结果的统计学数据概要

Tab.1 Statistical summary of mass spectrum identified results

阈值	非冗余蛋白数量	总蛋白数量	独特肽段	鉴定总光谱量	总光谱（%）
>2.0（99）	913	1564	8558	13649	54.5
>1.3（95）	1170	1926	9040	14239	56.9
>0.47（66）	1368	3234	9484	14767	59.0
阈值：>1.3（95%）	1170	1926	9040	14239	56.9

表 2 MHCC97-L/MHCC97-H 组的差异表达蛋白列表

Tab.2 Partial list of the up-regulated and down-regulated proteins in MHCC97-L compared with MHCC97-H by iTRAQ analysis

L/H 组上调蛋白					L/H 组下调蛋白				
编号	蛋白编号	基因名	比值	*P* 值	编号	蛋白编号	基因名	比值	*P* 值
1	Q3ZCQ8	TIMM50	9.457	0.048	1	P00558	PGK1	0.205	0.002
2	O60218	AKR1B10	6.349	0.020	2	P15121	AKR1B1	0.341	0.047
3	P27824	CANX	3.922	0.041	3	P06744	GPI	0.390	0.026
4	P35580	MYH10	3.567	0.041	4	O00469	PLOD2	0.396	0.017
5	P35900	KRT20	2.631	0.009	5	Q9BQE5	APOL2	0.415	0.011
6	Q9UBM7	DHCR7	2.495	0.007	6	Q16658	FSCN1	0.428	0.045
7	P00352	ALDH1A1	2.400	0.002	7	P21980	TGM2	0.429	0.009
8	Q9UPN3	MACF1	2.372	0.007	8	P02545	LMNA	0.446	0.007
9	P68871	HBB	2.278	0.025	9	Q15149	PLEC	0.498	0.035
10	P09210	GSTA2	2.265	0.010	10	P00338	LDHA	0.508	0.021
11	P35579	MYH9	2.098	0.006	11	P06733	ENO1	0.531	0.045
12	P11216	PYGB	2.083	0.007	12	Q03135	CAV1	0.571	0.021
13	P09525	ANXA4	2.026	0.030	13	P19338	NCL	0.574	0.014
14	P07339	CTSD	2.004	0.042	14	P47897	QARS	0.578	0.006
15	Q13618	CUL3	1.922	0.023	15	P09104	ENO2	0.580	0.007
16	P20700	LMNB1	1.904	0.045	16	Q15233	NONO	0.581	0.001
17	P49327	FASN	1.759	0.023	17	Q14103	HNRNPD	0.586	0.015
18	P05787	KRT8	1.699	0.005	18	P09651	HNRNPA1	0.593	0.039
19	Q06830	PRDX1	1.681	0.010	19	P51991	HNRNPA3	0.638	0.027
20	P37837	TALDO1	1.680	0.047	20	Q7L5D6	GET4	0.648	0.048

表 3 HCCLM3/MHCC97-H 组的差异表达蛋白列表

Tab.3 Partial list of the up-regulated and down-regulated proteins in HCCLM3 compared with MHCC97-H by iTRAQ analysis

M/H 组上调蛋白					M/H 组下调蛋白				
编号	蛋白编号	基因名	比值	*P* 值	编号	蛋白编号	基因名	比值	*P* 值
1	P27824	CANX	3.814	0.037	1	O94906	PRPF6	0.137	0.000
2	P35270	SPR	2.950	0.040	2	P02765	AHSG	0.238	0.028
3	P09525	ANXA4	2.882	0.010	3	P02545	LMNA	0.263	0.001
4	P09210	GSTA2	2.717	0.011	4	P52926	HMGA2	0.313	0.048
5	P61604	HSPE1	2.693	0.001	5	Q03135	CAV1	0.333	0.044
6	P68871	HBB	2.663	0.008	6	Q9UQ35	SRRM2	0.376	0.031
7	Q9UPN3	MACF1	2.640	0.027	7	O00571	DDX3X	0.377	0.047
8	P06703	S100A6	2.351	0.037	8	P27635	RPL10	0.390	0.011
9	P00352	ALDH1A1	2.281	0.001	9	P23246	SFPQ	0.404	0.033
10	P11216	PYGB	2.208	0.015	10	Q92597	NDRG1	0.433	0.004
11	Q86UX7	FERMT3	2.186	0.047	11	Q00839	HNRNPU	0.495	0.010
12	P40939	HADHA	2.128	0.003	12	P09651	HNRNPA1	0.496	0.006
13	P10809	HSPD1	2.118	0.001	13	Q15149	PLEC	0.496	0.024
14	P05023	ATP1A1	1.957	0.007	14	Q03252	LMNB2	0.499	0.021
15	P37837	TALDO1	1.937	0.029	15	Q15393	SF3B3	0.505	0.006
16	P07339	CTSD	1.898	0.034	16	O00469	PLOD2	0.515	0.000
17	P23141	CES1	1.803	0.001	17	P12004	PCNA	0.530	0.001
18	O95831	AIFM1	1.773	0.016	18	Q13283	G3BP1	0.550	0.036
19	P51572	BCAP31	1.738	0.042	19	Q13435	SF3B2	0.553	0.045
20	P35900	KRT20	1.723	0.028	20	P55060	CSE1L	0.554	0.011

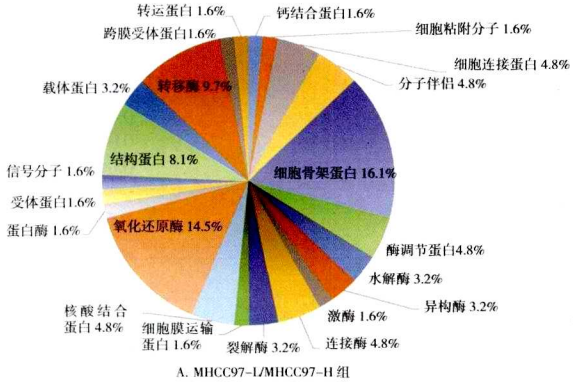
2.2 差异表达蛋白结构与功能分类

为了更好地分析有意义的差异表达蛋白，应用 PANTHE 数据库，对挑选出的有差异表达的蛋白在其结构类型及分子生物学功能两个方面进一步分析。如图 2 和图 3 所示，在 L/H 组筛选出的差异蛋白中分别代表了 22 种蛋白结构类型、8 种分子生物学功能及参数。从结构类型看这些差异表达的蛋白中细胞骨架蛋白排位第一，为 16.1%；从分子生物学功能类型看主要是酶调节活性蛋白分子(43.6%)，结构分子活性蛋白(20%)及结合功能的蛋白分子(20%)。在 M/H 组中筛选出的差异表达蛋白分别代表了 20 种蛋白结构类型、7 种分子生物学功能。其中从结构类型看核酸结合蛋白(15.5%)和细胞骨架蛋白(12.7%)排名靠前；从分子生物学功能类型看主要是结合功能的蛋白分子(34.3%)及酶调节活性蛋白分子(32.8%)。

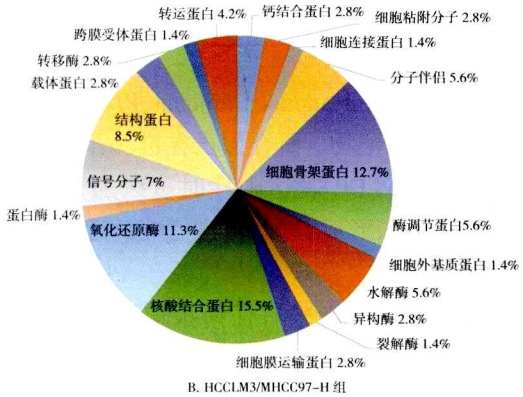
2.3 差异表达蛋白 KEGG 分类

将 3 株细胞筛选出的差异表达蛋白用 WebGestalt 数据库进行通路富集分析和相关疾病分析，以便能更深一层寻找差异蛋白在 3 株细胞之间功能的不同。KEGG 的通路富集分析如图 4 所示，列出了在 L/H 组中差异表达蛋白相关性排名前七的通路，其中排名前两位的是代谢通路(含 12 种分子)以及糖酵解/糖异生通路(含 5 种分子)。在 M/H 组中，发现排名前三的通路是剪切体途径(含 6 种分子)、赖氨酸降解途径(含 3 种分子)及代谢途径(含 8 种分子)。对差异表达的蛋白进行相关疾病的富集分析可以看到，如表 4 所示分别列举出

2组排名前十的相关性疾病，恶性腺癌(adj P=2.62×10^{-11})相关性排第一位，还包括肿瘤转移(adj P=7.19×10^{-8})及乳腺癌/瘤(adj P=4.53×10^{-6})。在 M/H 组中，排在第一位的是肿瘤转移(adj P=1.15×10^{-7})，符合本研究的主题。



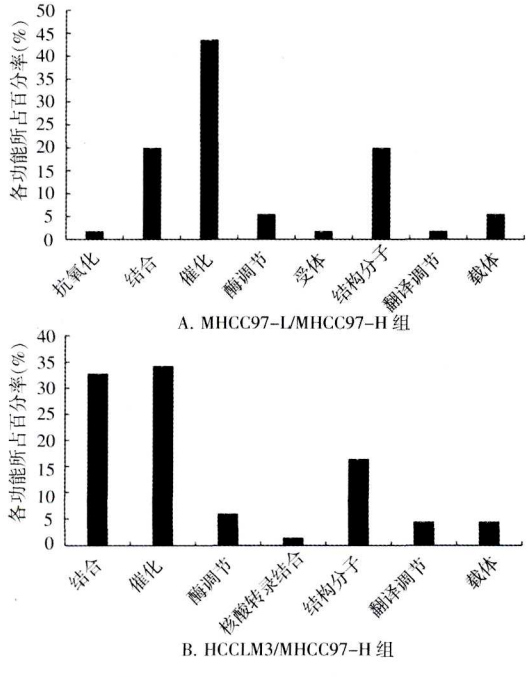
A. MHCC97-L/MHCC97-H 组



B. HCCLM3/MHCC97-H 组

图 2　差异表达蛋白结构类型

Fig.2　Protein class of deferentially expressed proteins

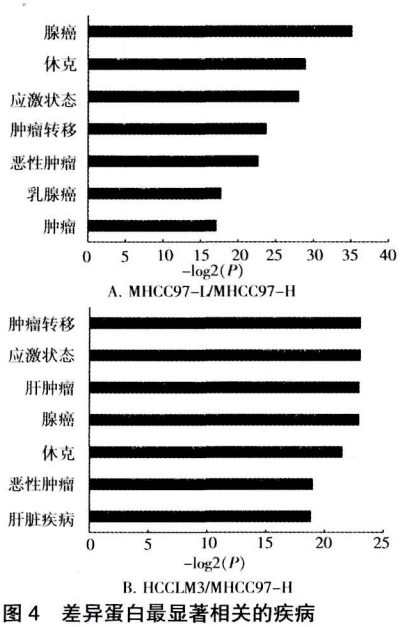


A. MHCC97-L/MHCC97-H 组

B. HCCLM3/MHCC97-H 组

图 3　差异蛋白的分子功能分类

Fig.3　Molecular functions of deferentially expressed proteins



A. MHCC97-L/MHCC97-H

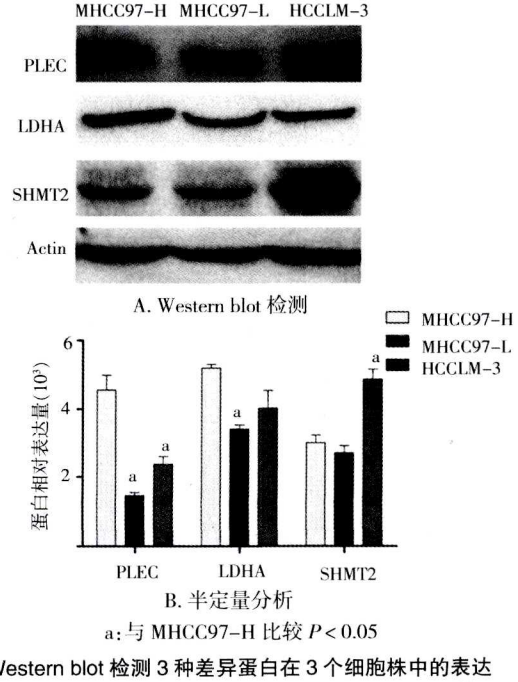
B. HCCLM3/MHCC97-H

图 4　差异蛋白最显著相关的疾病

Fig.4　Diseases significantly associated deferentially expressed proteins

2.4　差异表达蛋白的验证

挑选 3 个差异表达关键蛋白 PLEC、SHMT2 及 LDHA，进行 Western blot 验证。PLEC 是参与连接细胞骨架不同部分的重要结构分子家族中的一员，SHMT2 是甘氨酸羟甲基转移酶，是代谢通路旁支的一个重要蛋白，LDHA 是糖酵解的关键酶。结果如图 5 所示，PLEC 在 MHCC97-L 和 HCCLM-3 中表达均比 MHCC97-H 的低(P=0.000，P=0.003)，SHMT2 的表达在 HCCLM3 中比 MHCC97-H 中高(P=0.003)，LDHA 的表达在 MHCC97-H 比 MHCC97-L 高(P=0.012)，均与质谱结果相符。



A. Western blot 检测

B. 半定量分析

a：与 MHCC97-H 比较 P<0.05

图 5　Western blot 检测 3 种差异蛋白在 3 个细胞株中的表达

Fig.5　Expression of PLEC,SHMT2 and LDHA in three cell lines by Western blot

表 4 差异蛋白最显著富集的前 7 条通路

Tab.4 The top 7 significantly enriched pathways of deferentially expressed proteins

MHCC97-L/MHCC97-H KEGG 通路	相关基因数	基因名	*P* 值
代谢通路	12	ENO1、PGK1、QARS、AKR1B10、FASN、LDHA、AKR1B1、GPI、TALDO1、DHCR7 ALDH1A1、ENO1	0.000
糖酵解 / 糖异生	5	GPI、ENO2、ENO1、PGK1、LDHA	0.000
病毒性心肌炎	3	MYH9、CAV1、MYH10	0.000
磷酸戊糖途径	2	GPI、TALDO1	0.001
剪接体	3	HNRNPA1、SNRNP70、HNRNPA3	0.001
果糖及甘露糖代谢	2	AKR1B1、AKR1B10	0.002
丙酮酸代谢	2	AKR1B1、LDHA	0.002
HCCLM3/MHCC97-H KEGG 通路	**相关基因数**	**基因名**	***P* 值**
剪接体	6	HNRNPA1、SNRNP200、HNRNPU、PRPF6、SF3B3、SF3B2	0.000
赖氨酸降解	3	ALDH2、PLOD2、HADHA	0.000
内质网蛋白加工	4	HASP90B1、CANX、BCAP31、HSPA5	0.001
代谢通路	8	ALDH2、HADHA、MDH2、CES1、IDH2	0.000
β - 丙氨酸代谢	2	ALDH2、HADHA	0.001
三羧酸循环 (TCA cycle)	2	IDH、MDH2	0.002
丙酸代谢	2	ALDH2、HADHA	0.002

3 讨 论

HCC是我国最常见的恶性肿瘤之一，尽管采取及时合理治疗仍有极高的复发率、瘤内转移率及死亡率[9-10]。基于临床标本和细胞系的研究已经发现了一系列肝癌转移相关分子，但肝癌转移的源头及机制仍未完全阐明，面临众多挑战与难题，需要更进一步的探究。比较蛋白组学，即应用多种技术在大规模水平上对蛋白质进行比对分析及评估差异表达的研究，已在各类肿瘤的研究中广泛应用。本研究应用基于 iTRAQ 技术的绝对相对定量蛋白组学对 3 株具有相同遗传背景及不同转移潜能的肝癌细胞系进行研究，以初步筛选肝癌转移的相关差异表达蛋白。

经过筛选并确定了 3 种蛋白，即 PLEC、LDHA及 SHMT2 进行验证。PLEC 属于 plakin 家族的多结构域蛋白，可以和多种骨架蛋白交联，在维持细胞形状和结构方面起着重要的作用[11]。有研究表明 PLEC 在凋亡时参与微丝网络的重构，当 caspase-8 在凋亡早期活跃时可以影响 PLEC，但在肿瘤中多种凋亡通路被破坏；这种凋亡期的重构受到影响，进而使得 PLEC 蛋白在肿瘤细胞中的累积[12]。PLEC 蛋白的功能决定了它与细胞的运动有关，有研究表明PLEC1 在结肠癌细胞系 SW480 伪足的粘附侵袭过程中表达升高[13-14]，表明其可能参与肿瘤侵袭转移的过程。同时 Bausch 等[15]认为 PLEC 可以作为胰腺导管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma，PDAC）发生转移的主要分子标记物。研究人员在进一步的机制研究中发现胞膜 PLEC 表达阳性时可以通过整合素 β4 促进外泌体的形成，进而促进癌症的远处转移[16]。在查阅文献过程中发现国内外关于 PLEC 蛋白与 HCC 转移方面研究尚未有任何报道，本研究首次发现 PLEC 在高转移潜能细胞株MHCC97-H 和 HCCLM3 中表达高于低转移细胞株MHCC97-L，并经过 WB 的初步验证，因此推断PLEC 蛋白的表达可能会促进肝癌的转移，值得进一步关注。本研究结果显示 SHMT2 在 HCCLM3 中高表达。SHMT2 是甘氨酸羟甲基转移酶，甘氨酸合成的重要酶类，是代谢通路旁支的一个重要蛋白，主要位于线粒体及胞外，细胞骨架也含有部分。但 SHMT2 与肝癌转移的研究很少，最近的一篇研究表明 SHMT2 是miR-615-5p 的下游靶基因，其敲除或过表达可以抑制或促进肝癌细胞的增殖和迁移，且在组织中检测 SHMT2 时发现其高表达影响肝癌患者的预后，但如何影响肝癌的转移值得我们进一步探究[17]。

此外，本次实验还发现，在 L/H 组和 M/H 组中筛选出的差异表达蛋白有很多属于代谢通路中的主要蛋白。KEGG 分析中可以看到 L/H 组有 12 个蛋白分子归类于代谢通路，且相关性排在第一位，同时糖酵解/糖异生、磷酸戊糖途径和丙酮酸代谢等多条代谢相关通路均排于前十位。近些年肿瘤的代谢研究逐渐成为热点，通过 iTRAQ 技术筛选得到的差异表达蛋白中，糖酵解通路上的蛋白 ENO1/2、GPI、

LDHA及 PGK1 等在 MHCC97-H 中高表达，其中 LDHA 是乳酸脱氢酶，已经有研究确定 LDHA 是促进肿瘤增殖和驱动恶性肿瘤发生的基因之一，但在肝癌中的报道较少，且其促进肝癌转移中的作用尚不清楚[18]，本研究推测高转移的肝癌细胞更易受到低氧环境影响，可以利用糖酵解来作为主要能量代谢并降低周围环境的 pH 值来达到其促进增殖、免疫逃逸并发生转移的目的。本研究经过 iTRAQ 筛选出的差异表达蛋白分析结果显示代谢通路上的一些蛋白在 HCCLM3 中比 MHCC97-H 表达高，尤其是三羧酸循环中的一些蛋白，可能与在远距离转移过程中癌细胞需要更多的能量故三羧酸循环的供能比重增加有关。已经有研究佐证了本研究的观点，即在转移进程中当从原位向远处转移时肿瘤细胞必须克服生存和转移时的能量缺乏[19]，因而线粒体代谢会增加以产生足够的 ATP，同时丙酮酸的摄取也会增加[19-20]。同时，有研究表明肿瘤细胞为适应缺氧环境会进行代谢重编程[21]，且越来越多的研究集中于原位和转移灶的肿瘤细胞代谢差异，目前有研究表明不同转移潜能的细胞拥有不同的代谢方式[22]，侧面印证了本研究的结果。随着人们对肿瘤和代谢的认识程度的加深及代谢组学技术的飞速进展，代谢和转移的关系也逐渐引起更多人的关注，而本的研究结果只是证实了一些表象，深度而庞大复杂的研究仍需继续。

参 考 文 献

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[2] Lau SH, Sham JS, Xie D, et al. Clusterin plays an important role in hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Oncogene, 2006, 25(8): 1242-1250.

[3] Hanazaki K, Kajikawa S, Shimozawa N, et al. Survival and recurrence after hepatic resection of 386 consecutive patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Am Coll Surg, 2000, 191(4): 381-388.

[4] Cui JF, Liu YK, Zhang LJ, et al. Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro[J]. Proteomics, 2006, 6(22): 5953-5961.

[5] Ding SJ, Li Y, Shao XX, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials[J]. Proteomics, 2004, 4(4): 982-994.

[6] Tian J, Tang ZY, Ye SL, et al. New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis[J]. Br J Cancer, 1999, 81(5): 814-821.

[7] Li Y, Tang ZY, Ye SL, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(5): 630-636.

[8] Li Y, Tang Y, Ye L, et al. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through in vivo selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(1): 43-51.

[9] Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 1999, 353(9160): 1253-1257.

[10] Tang Z, Zhou X, Lin Z, et al. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis[J]. Chin Med J (Engl), 1999, 112(10): 887-891.

[11] Sonnenberg A, Liem RK. Plakins in development and disease[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(10): 2189-2203.

[12] Pawar H, Kashyap MK, Sahasrabuddhe NA, et al. Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(6): 510-522.

[13] Gad A, Lach S, Crimaldi L, et al. Plectin deposition at podosome rings requires myosin contractility[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2008, 65(8): 614-625.

[14] Takkunen M, Hukkanen M, Liljestrom M, et al. Podosome-like structures of non-invasive carcinoma cells are replaced in epithelial-mesenchymal transition by actin comet-embedded invadopodia[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6B): 1569-1593.

[15] Bausch D, Thomas S, Mino-Kenudson M, et al. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(2): 302-309.

[16] Shin SJ, Smith JA, Rezniczek GA, et al. Unexpected gain of function for the scaffolding protein plectin due to mislocalization in pancreatic cancer[J]. Proc Natl Acad Soi USA, 2013, 110(48): 19414-19419.

[17] Wu XY, Deng L, Tang DC, et al. miR-615-5p prevents proliferation and migration through negatively regulating serine hydromethyltransferase 2 (SHMT2) in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biology, 2016, 37(3): 6813-6821.

[18] Sheng SL, Liu JJ, Dai YH, et al. Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma[J]. FEBS J, 2012, 279(20): 3898-3910.

[19] Caneba CA, Bellance N, Yang L, et al. Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 303(8): E1036-E1052.

[20] Weber GF. Metabolism in cancer metastasis[J]. Int J Cancer, 2016, 138(9): 2061-2066.

[21] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. Science, 2009, 324(5930): 1029-1033.

[22] Dupuy F, Tabaries S, Andrzejewski S, et al. PDK1-dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer [J]. Cell Metab, 2015, 22(4): 577-589.

（责任编辑：张辉洁）