

文章编号:1005-6947(2007)04-0327-04

· 基础研究 ·

# 大肠癌临床分期相关蛋白的蛋白质组学研究

裴海平<sup>1</sup>, 朱红<sup>2</sup>, 李宜雄<sup>1</sup>, 肖自强<sup>3</sup>

(中南大学湘雅医院 1. 普外科 2. 肿瘤科 3. 卫生部蛋白质组重点实验室, 湖南长沙 410008)

**摘要:**目的 筛选与大肠癌临床分期相关的蛋白,为大肠癌分子分期和预后预测提供依据。  
方法 将不同临床分期大肠癌组织蛋白进行二维凝胶电泳,选择部分差异表达蛋白进行MALDI-TOF质谱分析和生物信息学分析以鉴定差异表达蛋白;免疫组织化学方法验证筛选结果。**结果** 建立了不同临床分期大肠癌组织的二维凝胶电泳图谱,其中I, II, III, IV大肠癌组织平均蛋白质点数分别为 $970 \pm 41$ ,  $980 \pm 32$ ,  $1010 \pm 43$ ,  $1240 \pm 34$ ;以I期大肠癌为参照,II期大肠癌差异表达蛋白有 $52.00 \pm 12$ , III期大肠癌差异表达蛋白 $42.00 \pm 11$ , IV期大肠癌差异表达蛋白 $72.00 \pm 15$ ,通过进行质谱分析和生物信息学查询,鉴定30个显著差异表达的蛋白点,其中II, III, IV均上调的有3种蛋白:Annexin II, Annexin IV, 热休克蛋白27(HSP27)。而仅在IV期中上调蛋白有1种蛋白,即肝脂肪酸结合蛋白(LFABP)。Annexin II和肝型脂肪酸结合蛋白表达的免疫组化检测结果与蛋白质筛选结果基本一致。**结论** 不同临床分期的大肠癌中存在着差异表达蛋白,这些蛋白可能作为大肠癌分子分期和预后的标志物。  
[中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 327-330]

**关键词:** 结直肠肿瘤; 蛋白质组学; 临床分期; 标志物

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

## Proteomic Study of associated proteins of clinical stage of colorectal carcinoma

PEI Hai-ping<sup>1</sup>, ZHU Hong<sup>2</sup>, LI Yi-xiong<sup>1</sup>, XIAO Zi-qiang<sup>3</sup>

(1. Department of General Surgery 2. Department of Oncology 3. Key laboratory of Proteomics, National Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract: Objective** To screen the associated proteins of clinical stage of colorectal carcinoma (CRC) in order to provide the basis of molecular biological stages and outcome prediction of CRC. **Methods** Total protein from colorectal carcinoma tissues were extracted, differential proteome profiles were established and analyzed by means of immobilized pH gradient-based two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Immunohistochemical method was used to assess the results mentioned above. **Results** Well-resolved, reproducible 2-DE profiles of human colorectal carcinoma tissues were obtained. Average protein dots were  $970 \pm 41$ ,  $980 \pm 32$ ,  $1010 \pm 43$ ,  $1240 \pm 34$  in stage I, stage II, stage III, stage IV, respectively; compared to stage I, differential expressed protein dots was  $52.00 \pm 12$  in stage II;  $42.00 \pm 11$  in stage III;  $72.00 \pm 15$  in stage IV; 30 differential expressing proteins were analyzed by mass spectrometry and bioinformation, part of them were well characterized. Three proteins (Annexin II, Annexin IV and HSP27) were overexpressed in stage II, stage III, stage IV, and Liver fatty acid-binding protein (LFABP) was only overexpressed in stage IV. Results of immunohistochemical assay for Annexin II and LFABP were consistent with proteomic results. **Conclusions** Differential expressed proteins exist in different clinical stage of CRC, which would be as biomarkers for diagnosis and prediction of prognosis of CRC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 327-330]

**Key words:** Colorectal Neoplasms; Proteomics; Clinical Stage; Tumor Marker

CLC number: R735.3

Document code: A

基金项目:湖南省科技厅资助项目(05JT1011, 05SK3007);湖南省卫生厅资助项目(C2005-009)

收稿日期:2006-12-15; 修订日期:2006-03-19。

作者简介:裴海平,男,湖南邵东人,中南大学湘雅医院副教授,主要从事胃肠道肿瘤综合治疗方面的研究。

通讯作者:裴海平 E-mail: peihaiping1966@163.com

随着蛋白质组学(Proteomics)技术的不断完善,该技术逐渐被应用于临床研究,其研究结果可更直接地用于疾病的预防、诊断和治疗。大肠癌是我国常见的恶性肿瘤,临床分期是决定其治疗效果和预后的重要判断依据。已有报道<sup>[1]</sup>将蛋白质组学技术已应用于结肠癌发生机制的研究。本研究采用蛋白质组学方法对大肠癌临床分期相关蛋白进行筛选,企以为大肠癌分子分期提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本及来源

1.1.1 蛋白质组研究 大肠癌组织标本取自中南大学湘雅医院普外科,共20例,男12例,女8例;年龄33~65(平均48.7)岁。病理诊断均为中分化腺癌。临床分期:根据美国癌症联合会(AJCC, 1988)与国际抗癌联盟(UICC, 1987)即AJCC/UICC大肠癌TNM分期标准进行分期<sup>[2]</sup>。I期5例,II期5例,III期5例,IV期5例。

1.1.2 免疫组化实验 大肠癌组织标本来自湖南省肿瘤医院病理科,经病理诊断为中分化腺癌。男84例,女76例,年龄23~75(平均51.2)岁。临床分期I, II, III, IV期各40例。

### 1.2 主要材料

固相pH梯度干胶条(IPG)(pH3-10)为美国Amersham pharmacia biotech公司产品,电泳试剂:丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺等均为Amresco公司产品;质谱鉴定试剂:二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、铁氰化钾、胰蛋白酶、三氟乙酸等均为Sigma公司产品。IPGphor等电聚焦电泳仪为美国Amersham pharmacia biotech公司产品,Protean II垂直板电泳槽(Bio-rad), Gel Doc2000凝胶成像仪, PDQUEST2-DE图象分析软件(Bio-rad), Applied Biosystem Voyager-DETM STR Biospectrometry™ workstation system 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪,均为ABI公司产品。抗Annexin II多克隆抗体为Santa Cruz公司产品,抗LFBP多克隆抗体为晶美公司产品,免疫组织化学SP试剂盒,福建迈新生物技术公司产品。BCA蛋白浓度测定试剂盒, Pierce公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 组织蛋白质的提取 将新鲜大肠癌组织加入裂解液进行低温匀浆,在20℃室温放置2h

后,以14 000转离心60min,将蛋白上清液抽出备用。使用BCA法测定蛋白浓度。

1.3.2 二维凝胶电泳<sup>[1]</sup> 将蛋白样品加入EP管(含水化液)中,振荡后上样。将IPG胶条放入电泳槽进行IEF电泳。电泳结束,取出2条胶条,冲洗及平衡。将胶条放置于SDS-PAGE胶面上进行第二向电泳。取出胶条依次进行固定、敏化、漂洗、银染、显影。

1.3.3 凝胶图象分析 凝胶通过Imagescaner扫描仪以及Labscan扫描软件进行扫描获取图像。然后利用Imagemaster 2D Elite 4.01分析软件对结肠癌和正常肠组织的双相电泳银染图像依次进行强度校正点检测,背景消减、匹配,1D及2D校正,建立平均凝胶,量化获取蛋白斑点的信息。蛋白斑点位置的重复性按Corbett法进行计算。用统计软件SPSS10.0进行数据的统计学分析。

1.3.4 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,从凝胶上取点,进行脱色、脱水、烷基化、冲洗、脱水并完全干燥,尔后进行酶解、萃取、离心、脱盐。样品与基质液充分混合,取混合液点样于不锈钢点样板上,自然风干备待质谱分析。将点样板置于质谱仪中进行分析,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,搜索软件为Profound。

1.3.5 免疫组织化学检测 Annexin II和LFABP 组织抗原修复首先将切片于枸橼酸/枸橼酸钠抗原修复液中在720W微波炉中预热至95℃以上,再间断加热30min,每加热10min间歇2min;依次滴加正常血清及一抗,4℃冰箱中过夜,PBS洗涤后按免疫组化SP法完成,DAB显色,Mayer苏木精复染。用PBS液代替一抗作为每次染色的空白对照。结果判断:Annexin II和LFABP阳性信号均定位于细胞浆,细胞浆中可见棕黄色或棕褐色颗粒。具体判断标准:根据阳性细胞在全部癌细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果:A按显色细胞数记分,阳性细胞数<1/3为1分,阳性细胞数1/3~2/3为2分,阳性细胞数≥2/3为3分。B按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。积分数=A×B。A×B=0为(-),A×B=1~2为(+),A×B=3~4为(++),A×B=6~9为(+++)。

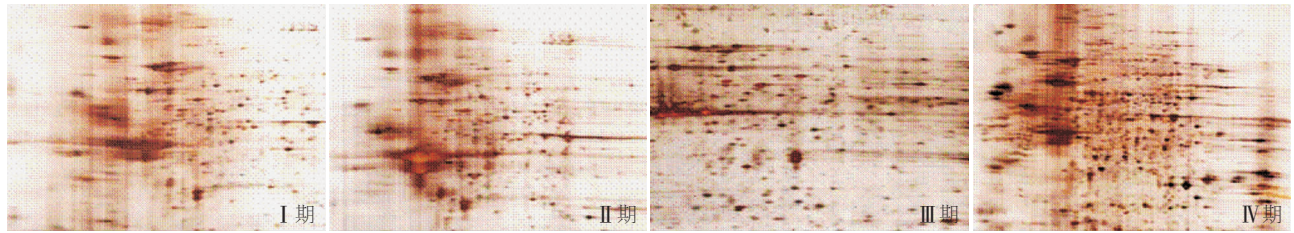
## 1.4 统计学分析

本实验结果主要为计数资料,主要的统计方法包括配对样本的卡方检验( $\chi^2$ ), $P < 0.05$ 。使用的统计学工具为 SPSS13.0 统计软件包。

## 2 结果

### 2.1 二维凝胶电泳

I, II, III, IV期大肠癌组织平均蛋白质点数分别为  $970 \pm 41$ ,  $980 \pm 32$ ,  $1010 \pm 43$ ,  $1240 \pm 34$ ; 并以



附图 不同临床分期大肠癌组织的二维电泳凝胶图谱(银染)

### 2.2 质谱及生物信息学分析

在不同临床分期大肠癌的二维凝胶电泳图谱中,选取部分差异蛋白质点, MALDI-TOF-MS 分析得到蛋白质点的肽质量指纹图(PMF),获取 PMF。应用 PMF 数据,通过 Profound 查询软件搜索 NCBI nr 数据库,进行蛋白质点的肽质量指纹谱与蛋白质数据库的比较来鉴定蛋白质。其中以匹配分值(Mowse Score)为基础的概率(P)评价数据库搜寻结果的质量,匹配分值的大小表示鉴定蛋白属于随机匹配的可能性,当匹配分值达到或超过 63 分时,待测蛋白的氨基酸序列与数据库中某已知蛋白的氨基酸序列覆盖率较高,认为匹配的可能性很大,有统计学意义( $P < 0.05$ )。本研究中蛋白质分值大于 63 的蛋白质点包括 Fatty acid synthase, glutathione s-transferase, HSP27, Annexin II, annexin IV, liver fatty acid-binding protein (LFABP)。与 I 期大肠癌的蛋白比较, II, III, IV 期均上调的有 3 个蛋白,包括 HSP27、annexin IV、Annexin A2, 而仅在 IV 期中上调蛋白为 liver fatty acid-binding protein。

### 2.3 Annexin II 和 LFABP 在不同临床分期大肠癌中的表达

使用免疫组化技术检测 Annexin II 和 LFABP 在不同临床分期大肠癌中的表达,以验证蛋白质组筛选结果的可靠性及临床意义。Annexin II 的表达在 I, II, III, IV 期大肠癌组织中的表达阳性

等电点 4~9 和分子量 40~90kDa 间蛋白斑点分布最多。通过进行 2D 图像扫描,软件分析以及点检测和背景消减基础上,根据蛋白质点表达量与所有匹配蛋白质点表达量总和的比值大于 3,且同组 3 块胶图谱中都出现相同变化的蛋白点,被认为是差异蛋白质点。以 I 期大肠癌为参照, II 期大肠癌差异表达蛋白有  $52.00 \pm 12$ , III 期大肠癌差异表达蛋白  $42.00 \pm 11$ , IV 期大肠癌差异表达蛋白  $72.00 \pm 15$  (附图)。

率分别为 25.0%, 30.0%, 57.5%, 90.0%, 统计学分析提示 I 期与 IV 期 ( $\chi^2 = 34.58$ ,  $P < 0.001$ ) 间, II 期与 IV 期 ( $\chi^2 = 30.00$ ,  $P < 0.001$ ) 间, III 期与 IV 期 ( $\chi^2 = 10.91$ ,  $P < 0.001$ ) 间的 Annexin II 阳性表达率均有极显著性差异。说明 Annexin II 随着临床分期的进展表达增加。LFABP 的表达在 I, II, III, IV 期大肠癌组织中的表达阳性率分别为 5.0%, 35.0%, 50.0%, 90.0%, 统计学分析显示 LFABP 阳性表达率在 I 期与 III 期 ( $\chi^2 = 20.31$ ,  $P < 0.001$ ) 及 IV 期 ( $\chi^2 = 57.95$ ,  $P < 0.001$ ), II 期与 IV 期 ( $\chi^2 = 25.81$ ,  $P < 0.001$ ) 间均有显著性差异,而在 I 期与 II 期, II 期与 III 期间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。以上结果说明 LFABP 亦随着临床分期的进展表达增加(附表)。

附表 不同临床分期大肠癌组织中 Annexin II 和 LFABP 的表达情况

| 分组    | n  | 阳性(例) | Annexin II 表达      |       | LFABP 表达              |
|-------|----|-------|--------------------|-------|-----------------------|
|       |    |       | 阳性率(%)             | 阳性(例) | 阳性率(%)                |
| I 期   | 40 | 10    | 25.0 <sup>1)</sup> | 2     | 5.0                   |
| II 期  | 40 | 12    | 30.0 <sup>1)</sup> | 14    | 35.0                  |
| III 期 | 40 | 23    | 57.5 <sup>1)</sup> | 20    | 50.0 <sup>2)</sup>    |
| IV 期  | 40 | 36    | 90.0               | 36    | 90.0 <sup>2),3)</sup> |

注:1)与IV期比较, $P < 0.001$ ;2)与I期比较, $P < 0.001$ ;3)与II期比较, $P < 0.001$

### 3 讨论

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其术后转移和复发是大肠癌患者死亡的重要原因。临床分期是决定其治疗效果和预后的重要依据,而准确判断肿瘤有无转移及其转移的途径和范围,对大肠癌的治疗及预后判断有重要意义。通过现代生物化学或分子生物学方法辅助分期,可能对大肠癌预后的判断更为准确,本研究的目的是希望通过蛋白质组学技术筛选出大肠癌临床分期相关标志物。

本研究选定进行质谱分析的30个差异表达蛋白点,在Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ期大肠癌中的表达均高于Ⅰ期大肠癌。但最终仅鉴定出19种蛋白,其原因可能是二维电泳的分辨力或质谱分析敏感性的限制,以及部分蛋白可能是未发现的新蛋白。

本研究在Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ期所筛选出的高表达的HSP27,Annexin IV,Annexin A2,可能与肿瘤的侵袭和预后有关。HSP27可在多种肿瘤中表达也可作为预后判断指标,其表达强度降低,表明生存期短和预后差<sup>[3-6]</sup>。Annexin II是一种钙依赖性磷脂结合蛋白,在结肠癌中过表达与组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、脉管侵犯及临床分期有关<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,在不同临床分期大肠癌组织中,Annexin II和LFABP表达随着临床分期的进展而增高,越到晚期,这两种蛋白的表达率越高,提示它们与大肠癌的发展有关,表达越高预后越差,与文献报道的结果一致<sup>[7-8]</sup>。

综上所述,蛋白质组学方法是研究大肠癌临床分期相关蛋白的有效手段,能得到大量相关信

息。在本研究中筛选出的与大肠癌分期相关蛋白Annexin II,LFABP可能作为大肠癌诊断、转移或预后以及化疗敏感的生物标志物,但要进一步用于临床常规检测,还有待临床的进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] 陈主初,梁宋平. 肿瘤蛋白质组学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社,2002. 33-34.
- [2] Gospodarowicz MK, Henson RDE, Hutter VP, *et al.* Prognostic factors in Cancer[M]. 2nd ed. New York: A John Wiley & Sons, Inc, Publication. 2001. 251-280.
- [3] Kapranos N, Kominea A, Konstantinopoulos PA, *et al.* Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128(8): 426-432.
- [4] Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, *et al.* HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2004, 25(2): 165-168.
- [5] Lo Muzio L, Leonardi R, Mariggio MA, *et al.* HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(1): 119-128.
- [6] Mese H, Sasaki A, Nakayama S. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2002, 9(2): 341-344.
- [7] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, *et al.* Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma[J]. Cancer, 2001, 92(6): 1419-1426.
- [8] Kanda T, Sakai Y. Liver fatty acid-binding protein is a new prognostic factor for hepatic resection of colorectal cancer metastases[J]. J Surg Oncol, 1999, 72(2): 83-87.

### 关于优先处理、录用课题论文的启事

为及时反映全国各地临床医学的新成果、新技术、本刊将对获得国家、省、市等各类科研基金资助、立项课题的来稿,尽快审稿,对可用稿件尽快刊登。敬请全国各地医药科研临床工作者踊跃投稿。投稿时请附相关材料、资助项目文件的复印件、单位介绍信,并在稿件左下方脚注中注明基金资助项目名称、编号。