

促凋亡胱天蛋白酶衔接蛋白在前列腺癌组织中的表达研究

马亚东, 高继学, 贺晓龙

(延安大学附属医院, 陕西 延安 716000)

摘要: [目的] 寻找前列腺癌组织与正常组织的差异表达蛋白。[方法] 运用蛋白质组学的方法分析前列腺癌组织和正常组织蛋白表达谱的差异, 通过双向电泳筛选差异蛋白, 质谱鉴定。[结果] 成功构建了前列腺癌组织的双向电泳图谱, 并筛选出一个差异蛋白, 该差异蛋白在 17 例 (17/24, 70.8%) 前列腺癌组织中表达上调, 仅在 5 例 (5/24, 20.8%) 对照组中呈高表达, 两者具有统计学差异 ($P=0.001$)。经鉴定, 该差异蛋白为促凋亡胱天蛋白酶衔接蛋白 (PACAP)。

[结论] 促凋亡胱天蛋白酶衔接蛋白可以视作潜在的前列腺癌肿瘤标志物。

关键词: 促凋亡胱天蛋白酶衔接蛋白 (PACAP); 前列腺癌; 肿瘤标志物

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)08-0572-03

Expression of Proapoptotic Caspase Adaptor Protein in Prostate Cancer Tissue

MA Ya-dong, GAO Ji-xue, HE Xiao-long

(Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the differentially expressed protein between prostate cancer tissue and normal tissue. [Methods] Proteomic technology was applied to analyze protein expression profile difference between prostate cancer tissue and normal tissue. Two-dimensional gel electrophoresis was used to screen differentially expressed proteins, which was then identified by mass spectrometry. [Results] Two-dimensional gel electrophoresis profiles of prostate tissues were established. One protein spot was screened out, which was over-expressed in 17 (17/24, 70.8%) prostate cancer tissues but only in 5 (5/24, 20.8%) normal prostate tissues, with significant difference between them ($P=0.001$). The protein spot was identified by mass spectrometry as proapoptotic caspase adaptor protein (PACAP). [Conclusion] The proapoptotic caspase adaptor protein might be a potential biomarker for prostate cancer.

Subject words: proapoptotic caspase adaptor protein (PACAP); prostatic neoplasms; tumor biomarker

前列腺癌是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤^[1], 目前, 前列腺癌只有当出现临床症状, 即当患者已处于疾病进展的晚期时才被检测到。当前的检测方法, 如 X 射线、核磁共振, 虽然在理论上可用作一般筛查工具^[2], 但将这些方法应用于大规模筛选的可行性较低。因此, 建立特异性和敏感性强的早期检测方法, 对肿瘤的诊断和预后有重要的意义。随着人类基因组测序的完成, 后基因组时代将蛋白质组学等理论带入到疾病的机制及诊断研究当中^[3]。本研

究则是利用经典的蛋白质组学方法, 根据肿瘤细胞与正常细胞存在表达谱差异的理论, 筛选潜在的前列腺癌肿瘤标志物。

1 资料与方法

1.1 样本采集

收集延安大学附属医院前列腺癌患者肿瘤切除术后的肿瘤组织和距离肿瘤边缘 1cm 处的组织标本, 切除的组织样品立刻冷冻于液氮中, 邻近组织作为对照。所有病例均经病理确诊, 共 24 例, 年龄为 59~81 岁, 平均年龄 70.8 岁。组织学病理分级: 低分

基金项目: 延安大学附属医院创新基金 (201102)

通讯作者: 马亚东, 主治医师, 硕士; 陕西省延安大学附属医院泌尿外科, 陕西省延安市北大街 43 号 (716000); E-mail: mayadong117@sina.com。

收稿日期: 2012-03-27; **修回日期:** 2012-06-08

化腺癌 9 例,中分化腺癌 10 例,高分化腺癌 5 例; Gleason 评分: ≥ 8 分 13 例, < 8 分 11 例;临床分期: B 期 3 例, C 期 12 例, D 期 9 例。

1.2 蛋白提取

从液氮中取出冷冻组织,并将其切成碎块,转移至预冷的研钵中,并用液氮完全冷冻。在研钵将组织研磨成粉,加入 10 倍体积的裂解液 (40mmol/L 柠檬酸钠, 5mmol/L Mg-Cl₂, 1% Genapol X-080, 0.02% 叠氮化钠) 使其溶解。将匀浆液离心 (5 000r/m, 5min), 取上清, 转移至另一个小管并再次离心 (20 000r/m, 5min)。得到的上清液包含可溶性蛋白质用于进一步分析。

1.3 双向电泳和质谱检测

将 3mg 的蛋白样品与 9ml 样品缓冲液 (8mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、2%CHAPS、0.4%IPG 缓冲液 pH4~7、0.5% DTT) 混合并孵育 1h。测定蛋白质浓度。在对应 1.5mg 蛋白质的体积中加入样品缓冲液至终体积 350 μ l, 再水合 IPG 条带 pH4~7。采取以下步骤进行等电聚焦 (IEF): ①2min 至 600V; ②2h 至 3 500V; ③在恒定的 3 500V 下 20h 以得到 80kVh。IEF 之后, 条带在 -80℃ 贮存或直接用于 SDS-PAGE。

在 SDS-PAGE 之前, 先将 IEF 的条带孵育在平衡缓冲液 (6mol/L 尿素, 50mol/L Tris/HCl, pH 8.8, 30%甘油, 2% SDS) 中, 加入 DDT 进行还原 (DTT 50mg/ml, 20min), 加入 IAA 进行烷基化 (碘乙酰胺 25mg/ml, 15min)。将条带置于 12% 聚丙烯酰胺凝胶上并进行电泳, 以 1W/凝胶电泳 1h, 之后以 17W/凝胶电泳。之后, 将凝胶固定 (100ml 醋酸钠, 500ml 甲醇, 双蒸水定容至 1L) 并使用考马斯亮蓝染色过夜。

用 UMAX Power Look 2100XL 扫描仪对凝胶扫描, ImageMaster 2D Platinum 软件对扫描后的图像进行分析。以 Vol 的百分比值作为蛋白点的表达量, Vol 的百分比值 > 1 为高表达, < 1 为低表达。

再将目标蛋白点切下, 冷链送至艾米诺公司做质谱检测。

1.4 统计学处理

数据分析采用 SPSS 15.0 统计软件行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 前列腺组织的双向电泳结果

我们成功构建了前列腺组织的双向电泳图谱, 并发现一种在肿瘤组织中强烈表达而在正常组织中低表达的差异蛋白, 见图 1。

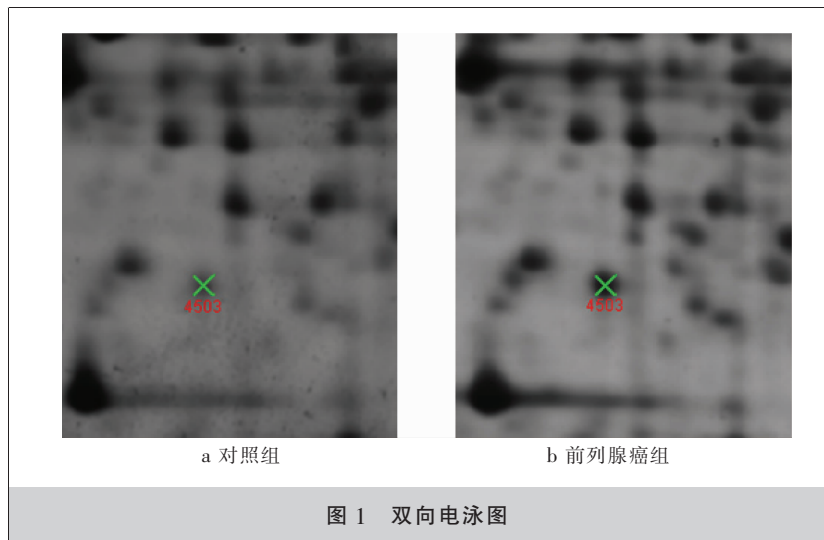


图 1 双向电泳图

2.2 差异蛋白在前列腺癌组织和对照组织中的表达情况

差异蛋白在 24 例前列腺癌组织中有 17 例表达上调, 占 70.8%。在正常对照组织中仅有 5 例高表达, 占 20.8%。该差异蛋白在前列腺组织的表达明显高于正常对照组织 ($P = 0.001$)。见表 1。

表 1 PACAP 蛋白在两组中的表达情况 (例)

组 别	高表达	低表达	高表达率 (%)	χ^2	P
前列腺癌组	17	7	70.8	12.084	0.001
对照组	5	19	20.8		

2.3 目标蛋白质谱检测结果

通过质谱检测, 发现在前列腺癌组织和正常对照组织中表达的差异蛋白为促凋亡胱天蛋白酶衔接蛋白 (proapoptotic caspase adaptor protein, PACAP)。该蛋白可作为潜在的前列腺癌肿瘤标志物。

3 讨 论

近些年来, 许多血清肿瘤标志物已用于临床筛查和诊断。例如细胞角蛋白的可溶性 30kD 片段 (CYFRA21-1)、癌胚抗原 (CEA)、神经元特异烯醇化

酶(NSE)和鳞状细胞癌抗原(SCC)都是较为突出的前列腺癌标志物。然而,它们中没有一个满足筛查所需的灵敏度和特异性标准^[4,5]。

Katoh 等^[6]使用 EST 信息和生物信息学鉴定并克隆表达了人 *MGC29506* 基因和其编码的蛋白质。该基因的表达过程中由于 mRNA 选择性剪接可得到 3 个蛋白质:即全长 PACAP 蛋白(189aa)、剪接变体 Q8WU39-2 蛋白(123aa)和 Q8WU39-3 蛋白(61aa)。PACAP 是具有 N-端信号肽和 6 个保守半胱氨酸残基的分泌型蛋白质。PACAP 已显示为 *MGC29506* 基因主要表达的同种型。Katoh 等^[6]发现 PACAP 基因在肠型胃癌中常常被下调,提示 PACAP 可能是涉及肠型胃癌的候选肿瘤抑制基因。

Bonfoco 等^[7]通过酵母双杂交系统克隆促凋亡分子 PACAP,鉴定了具有 13.6kD 的 123 个氨基酸的蛋白质 PACAP-2。使用体外蛋白质结合测定和蛋白质印迹分析,Bonfoco 等^[7]发现 PACAP-2 与胱天蛋白酶-2 和胱天蛋白酶-9 相互作用,将 PACAP-2 鉴定为凋亡诱导蛋白。本实验在上述文献的基础上,利用蛋白质组学的方法研究 PACAP 在前列腺癌组织中的表达情况。通过双向电泳研究,我们发现 PACAP 蛋白在前列腺癌组织中表达水平较癌旁组织要高。提示 PACAP 可作为潜在的前列腺癌肿瘤标志物。如果应用于临床,尚需要进一步做免疫组化实验,然而,由于目前缺乏商业性的 PACAP 蛋白抗体,免疫组化实验难以进行,也是本研究的不足之处。

由于 PACAP 在前列腺肿瘤组织中高表达,提示其可能参与了使得肿瘤细胞绕过细胞凋亡途径的信号通路,因此,可作为潜在的肿瘤标志物,我们可以在细胞学、分子生物学等领域研究 PACAP 参与的信号通路,研究 PACAP 参与肿瘤细胞抗凋亡的机制,从而为设计小分子干扰药物奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中国泌尿外科杂志, 2004, 25(2):77-80.
- [2] 黄松涛, 卜丽红, 王景林, 等. 磁共振波谱对前列腺癌的诊断价值[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(2):171-176.
- [3] 倪晓光, 赵平, 刘煜, 等. 蛋白质组学在实体瘤肿瘤标志物研究中的应用[J]. 癌症, 2003, 22(6):664-667.
- [4] Chu XY, Hou XB, Song WA, et al. Diagnostic values of SCC, CEA, Cyfra21-1 and NSE for lung cancer in patients with suspicious pulmonary masses: a single center analysis [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(12):995-1000.
- [5] Molina R, Auge JM, Escudero JM, et al. Mucins CA 125, CA 19.9, CA 15.3 and TAG-72.3 as tumor markers in patients with lung cancer: comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE[J]. Tumour Biol, 2008, 29(6):371-380.
- [6] Katoh M, Katoh M. *MGC29506* gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, encodes secreted-type protein with conserved cysteine residues[J]. Int J Oncol, 2003, 23(1):235-241.
- [7] Bonfoco E, Li E, Kolbinger F, et al. Characterization of a novel proapoptotic caspase-2- and caspase-9-binding protein[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31):29242-29250.