

Her-2 阳性与 Her-2 阴性人乳腺癌组织蛋白质组的差异表达

赵洁, 刘晓颖

(湖南省人民医院, 湖南 长沙 410005)

摘要: [目的] 通过蛋白质组学方法探讨 Her-2 阳性与 Her-2 阴性人乳腺癌组织蛋白质组的差异表达。[方法] 采用顺序抽提的方法将细胞总蛋白分为水溶性和疏水性两个组分, 并应用双向电泳方法对其进行分离, 以获取蛋白质的表达谱; 通过软件分析, 找出表达量存在显著差异的蛋白质点; 再应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱与生物信息学相结合的方法对差异表达蛋白点进行分析鉴定。[结果] 双向电泳图谱分析表明对水溶性蛋白质和疏水性蛋白都取得了很好的分离, 并成功鉴定出 7 个差异表达蛋白, 其中 4 个下调, 3 个上调。[结论] 乳腺癌的发生发展与蛋白的表达改变有关, 这些蛋白质参与信号传导、浸润转移及能量代谢等多个方面。

关键词: 乳腺癌; 蛋白质组; 差异表达; Her-2

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)09-0794-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.09.B011

Different Expression of Proteome in Her-2-Positive and Her-2-Negative Human Breast Cancer

ZHAO Jie, LIU Xiao-ying

(Hunan Province People's Hospital, Changsha 410005, China)

Abstract: [Objective] To investigate the different expression of proteome in Her-2-positive and Her-2-negative human breast cancer by proteomic technologies. [Methods] Sequential protein extraction was used and proteins were fractionated as soluble or hydrophobic fractions which were analyzed by 2DDE. Spots were detected and evaluated by 2D platinum Software 5.0 and the spots with different expression levels were subjected to MS analysis. [Results] 2DDE patterns demonstrated a good resolution for soluble proteins and for hydrophobic proteins. Moreover, 7 significant proteins were identified, among which 4 were down regulated and 3 were up regulated. [Conclusion] The occurrence and development of breast cancer may be related to the expression change of proteins, which are involved in signal transduction, invasion and metastasis, as well as energy metabolism.

Subject words: breast cancer; proteomics; differential expression; Her-2

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤之一, 全世界每年约有 120 万妇女发病, 占女性所有肿瘤的 18%。乳腺癌 5 年生存率为 50%~60%, 近 50% 患者治疗后复发转移。晚期乳腺癌患者平均生存时间仅 18~30 个月。早期发现、早期诊断和早期治疗是改善乳腺癌预后的重要因素。因而寻找乳腺癌早期诊断和治疗的新的标志物具有重要的意义。蛋白质组学从研究生命的真正体现者——蛋白质入手, 利用

高通量的一维或二维电泳(1-/2-DE)、高效液相色谱(HPLC)分离蛋白质, 高灵敏的质谱仪进行蛋白质鉴定, 加上强大的生物信息学手段, 有望成为早期乳腺癌发现与诊断的重要技术手段。本文着重从蛋白质组研究乳腺癌发生发展机制。

1 资料与方法

1.1 组织标本

选取湖南省人民医院 2014 年 1 月至 2015 年 12 月手术前未经任何治疗的乳腺癌手术切除标本

基金项目: 湖南省科技厅基金资助项目(2014FJ3036)

通讯作者: 赵洁, 副主任医师, 硕士; 湖南省人民医院病理科, 湖南省长沙市解放西路 61 号 (410005); E-mail: shehaihong970622@126.com

收稿日期: 2016-12-30; **修回日期:** 2017-02-08

120 例,标本离体后,部分放入液氮冷冻及-80℃超低温冰箱贮存备用,用于蛋白质组等分析;部分经10%中性缓冲福尔马林固定、石蜡包埋。

1.2 病理学检查

将人乳腺癌组织以10%中性缓冲福尔马林固定24h,常规石蜡包埋、切片、HE染色、镜检。参考《WHO肿瘤病理学与遗传学分类乳腺肿瘤分册》进行病理分型与组织学分级,其中非特殊类型浸润性导管癌94例,浸润性小叶癌14例,浸润性乳头状癌8例,小管癌4例;Ⅰ级24例,Ⅱ级70例,Ⅲ级26例;无淋巴结转移52例,有淋巴结转移68例。

1.3 Her-2 免疫组织化学检测

Her-2 检测严格按试剂盒说明书进行,即4μm厚连续石蜡切片,65℃烘烤脱蜡,3% H_2O_2 去离子水阻断内源性过氧化物酶,柠檬酸盐缓冲液微波修复抗原,加一抗4℃冰箱过夜,PBS冲洗后加二抗37℃反应30min,冲洗后加二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,脱水、封片后在光镜下观察。以PBS代替一抗作阴性对照。按照文献^[1]判读结果:Her-阳性细胞多数为膜着色,(-)无细胞膜着色,(+)任何比例的浸润癌细胞呈现微弱、不完整的细胞膜着色,(++)>10%癌细胞呈现弱至中等强度、完整但不均匀的细胞膜棕黄色,或<30%的癌细胞呈现强且完整的细胞膜棕褐色着色,(+++)>30%的癌细胞呈现强的、完整的细胞膜棕褐色着色,Her-2(+++)定义过表达,Her-2(-)/(+)定义为阴性,Her-2(++)必要时行FISH检测。

1.4 Her-2 阳性与 Her-2 阴性人乳腺癌组织差异蛋白的表达分析

1.4.1 人乳腺癌组织总蛋白制备

分别称取-80℃冰箱中保存的每例乳腺癌组织各200mg,预冷的PBS洗涤3次后用眼科剪将组织剪碎于EP管中,再加入适量的组织裂解液,冰上超声,静置30min,14 000g离心30min后取上清。Bradford方法蛋白定量,-70℃保存备用。

1.4.2 二维凝胶电泳

水化液调整蛋白上样量为800μg,pH 3~10(非线性,17cm)的IPG胶条吸收样品1h后,覆盖矿物油溶胀12h,进行等电聚焦,具体参数设置如下:①250V,1h,线性;②1 000V,1h,快速;③10 000 V,5h,线性;④10 000V,60 000V,1h,快速;⑤500V,2h,快速。将等电聚焦后的IPG胶条放入平衡液中平衡15min,

再用2.5%碘乙酰胺替换2%DTT,平衡15min。配制12%的均匀胶,将平衡后的胶置于均匀胶胶面上,0.5%琼脂糖封胶。垂直电泳SDS-PAGE在14℃循环水冷却下进行。待电泳结束,凝胶用固定液固定3h,去离子水漂洗后考马斯亮蓝染色液染色5h。

1.4.3 凝胶图像分析及差异蛋白点匹配

利用光密度仪对考马斯亮蓝染色的凝胶进行扫描获取图像。利用分析软件对凝胶图像进行平滑处理、背景减噪、斑点检测和匹配。差异蛋白点的选取标准:①在凝胶图中有相似的定性改变;②差异倍数大于1.5倍。

1.4.4 串联飞行时间质谱分析及数据库检索

切割相应蛋白点转入EP管中,清洗脱色至透明,吸弃上清,加入1NH₄HCO₃,室温孵育15min。吸弃上清冻干,再加入测序级Trypsin溶液,37℃反应20h;吸出酶解液,转移至新EP管中,原管加入60%乙腈/0.1%三氟乙酸,超声15min,合并酶解液冻干,脱盐后备用。复溶酶解样品2μl,点样,自然干燥后,取0.5μl过饱和CHCA基质溶液(溶剂为50%乙腈和0.1%三氟乙酸)点至对应靶位自然干燥。样品靶经氮气吹净后放入仪器进靶槽并用串联飞行时间质谱仪进行测试分析,激光源为355nm波长的Nd:YAG激光器,加速电压为2KV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据,获得肽质量指纹图谱。肽质量指纹图谱通过网站进行查询,检索IPI人源数据库,得到鉴定的蛋白质结果。

1.5 统计学处理

采用SPSS18.0软件对数据进行处理。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Her-2 在乳腺癌组织中的表达

120例乳腺癌组织中Her-2阳性49例,占40.8%;Her-2阴性71例,占59.2%。免疫组织化学结果显示Her-2阳性表达>30%的细胞膜染成棕黄色或黄褐色(Figure 1)。

2.2 二维凝胶电泳结果

用ImageMaster 2D Platinum 6.0软件分析Her-2阳性与Her-2阴性人乳腺癌组织差异蛋白表达的二维凝胶电泳扫描结果(Figure 2)。在Her-2阳性与

Her-2 阴性人乳腺癌组织蛋白点的比较中,根据匹配的差异表达蛋白点的比值大于 2,且同组 3 块胶图谱中都出现相同变化的蛋白点,均视为差异表达蛋白。选择匹配较佳的 28 个差异蛋白点进行分析,经酶解等过程,进行 MALDI-TOF-MS 分析,得到蛋白质点的肽质量指纹图。应用肽质量指纹图谱,通过 Mascot 查询软件搜索 SwissProt 数据库,在这些蛋白点中,有 7 个差异表达蛋白点被成功鉴定(Table 1)。

3 讨 论

乳腺癌发生发展是一个多基因、多步骤的过程。早期对乳腺癌患者筛选和检测的重要手段仅限于一些成像技术,如乳房 X 光照射、超声以及核磁共振成像等,然而仍有 20.0%的乳腺癌患者被漏诊^[2],表明早期诊断需要有效的分子标志物。目前对乳腺癌诊断的研究,新兴技术如利用 MALDI 质谱分析血浆蛋白质组,该方法尤其适用于血浆中低分子量组分,应用于癌症的诊断^[3-5],但该方法存在研究成本高、技术路线复杂、结果不稳定等缺陷。也有利用血浆进行传统二维凝胶电泳分离并结合质谱分析,但其中也存在一些争议,DIAMAN-

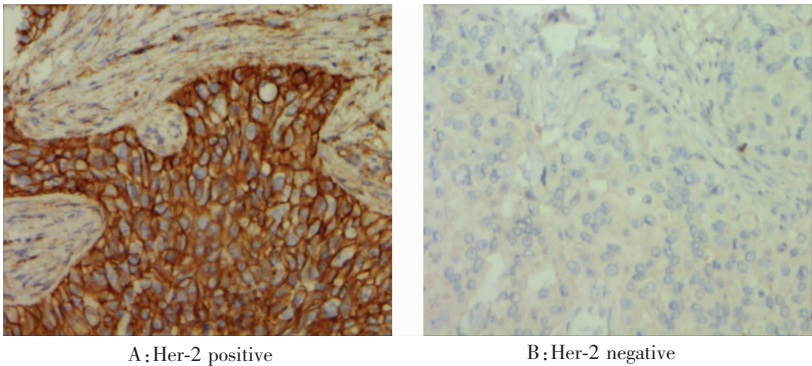


Figure 1 Immunohistochemical detection results of Her-2 in breast cancer

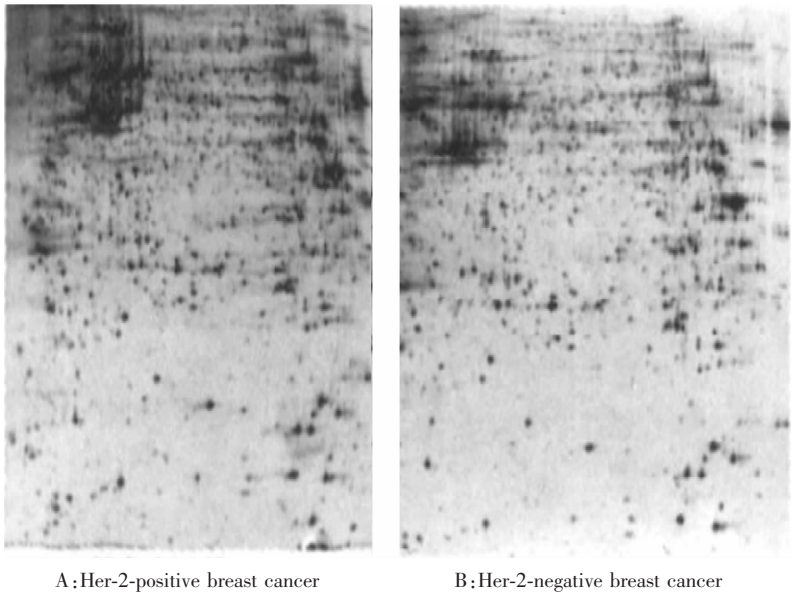


Figure 2 Silver stain of two-dimensional electrophoresis

DIS 等^[6]认为,血浆蛋白的影响因素很多,差异表达蛋白也许只是由于肿瘤造成的恶液质而导致的肝脏合成蛋白的减少,或是由肝脏产生的急性期蛋白,再加上血浆中高丰度蛋白对低丰度蛋白的掩盖等缺陷,给研究带来了困难。人类表皮生长因子受体-2

Table 1 Different expression of proteome in Her-2-positive and Her-2-negative human breast cancer

Spot No.	Accession No.	Protein name	PI /Mr(×10 ³)	Peptide matched	Score	Function	Expression in Her-2(+)
1	IPI00025252	Protein disulfide-isomerase	A3 5.98/57.15	7	138	Tumor metastasis	Down
2	IPI00003362	78 kDa glucose-regulated protein	5.07/72.40	20	979	Tumor metastasis	Down
3	IPI00883946	LASPI Uncharacterized protein	9.04/19.03	8	277	Tumor metastasis	Up
4	IPI00658013	Nucleophosmin isoform	34.56/28.50	8	168	Signal transduction	Down
5	IPI00848226	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like	17.6/35.51	11	413	Signal transduction	Up
6	IPI00465248	Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase	7.01/47.48	16	277	Energy metabolism	Down
7	IPI00797270	TPI1P1 Isoform 1 of Triosephosphate isomerase	6.45/26.94	19	682	Energy metabolism	Up

(Her-2)基因定位于染色体17q12~21 上的原癌基因 17q21,编码相对分子量 185kD 的酪氨酸蛋白,具有细胞内酪氨酸激酶样活性,可以促进细胞分裂和蛋白水解酶的分泌,并增强细胞的运动能力,从而促进肿瘤侵袭和转移,Her-2 基因激活后,通过一系列信号传导通路使细胞的生物学特性发生改变,导致细胞恶性转化和出现恶性表型。较多的恶性肿瘤研究均报道 Her-2 在包括结肠癌^[7]、肺癌^[8]、乳腺癌^[9,10]中的表达水平增高,Her-2 阳性的乳腺癌患者往往表现为肿瘤恶性程度高、治疗效果及预后较差,但对其使用特异的 Her-2 靶向药物治疗效果较好。

本研究以 Her-2 阳性与 Her-2 阴性人乳腺癌组织为研究对象,对二维凝胶电泳图谱中出现的 28 个差异表达蛋白进行 MALDI 质谱和生物信息学分析,成功鉴定了 7 个蛋白,其中在 Her-2 人乳腺癌组织中低表达的有 4 个,包括 Protein isulfide isomerase、78kDa lucose-regulated protein、Nucleophoin isoform、Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase,其余 3 个均为高表达,包括 LASP1 Uncharacterized protein、Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like、TPI1P1 Isoform1 of Triosephosphate isomerase,这些蛋白与信号传导、浸润转移及能量代谢有关。参与能量代谢的蛋白有 α -烯醇酶 (ENO1)、磷酸丙糖异构酶 1 (TPI1P1)、烯酰辅酶 A 水化酶。TPI1P1 则是联系人体内各种代谢途径网节点的重要酶,通过将糖酵解、磷酸戊糖途径、甘油磷脂类代谢等途径为机体提供能量,它在多种肿瘤细胞中表达均上调,参与肿瘤细胞的能量供应,促进了肿瘤细胞的增殖、分化^[11,12]。本研究中 TPI1P1 在 Her-2 阳性的乳腺癌组织表达上调,有利于乳腺癌发生。参与细胞信号转导的蛋白有核仁磷酸蛋白异构体 3 和鸟嘌呤核苷酸结合蛋白,与肿瘤转移有关的蛋白有 LASP1、二硫化物异构酶 A、葡萄糖调节蛋白 78(HSPA5)。LASP1 蛋白属于 LIM 蛋白家族成员,参与细胞间相互作用。近年来关于该蛋白的研究较多,LASP1 在癌细胞中过度表达,会导致肿瘤增殖、转移和侵袭。本研究中 LASP1 在 Her-2 阳性的乳腺癌组织中表达上调,促进了乳腺癌的浸润转移。

总之,本实验采用蛋白质组学分析手段鉴定了 Her-2 阳性与 Her-2 阴性人乳腺癌组织的蛋白差异表达,为 Her-2 阳性乳腺癌的抗癌作用提供了新的分子机制。

参考文献:

- [1] Wang YJ, Mi CR, Wang W. The correlation of contrast-enhanced ultrasound in sentine lymph node of breast cancer and expression of ER, PR, Her-2 in breast cancer tissues [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2013, 35 (5): 528-531. [王琰娟, 米成嵘, 王文. 乳腺癌前哨淋巴结的超声造影检查及与乳腺癌组织 ER、PR 和 Her-2 表达的相关性[J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(5): 528-531.]
- [2] Astley SM. Computer-based detection and prompting of mammographic abnormalities [J]. Br J Radiol, 2004, 77: S194-S200.
- [3] Pang D, Yang YM, Zhang GQ, et al. The applied research of serum protein fingerprints in the prediction of axillary lymph Nodes (ALN) metastasis [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2008, 35(17): 1010-1014. [庞达, 杨艳梅, 张国强, 等. 血清 SELDI 蛋白质指纹图谱在乳腺癌腋淋巴结转移中的应用研究[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(17): 1010-1014.]
- [4] Rosenblatt KP, Bryant-reenwood T, Killian JK, et al. Serum proteomics in cancer diagnosis and management [J]. Annu Rev Med, 2004, 55: 97-112.
- [5] Gunko VO, Pogorelova TN, Linde VA. Proteomic profiling of the blood serum for prediction of premature delivery [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2016, 161 (6): 829-832.
- [6] Diamandis EP. Serum proteomic profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for cancer diagnosis: next steps [J]. Cancer Research, 2006, 66(11): 5540-5541.
- [7] Drecoll E. Expression analysis of heat shock protein 90 (HSP90) and Her2 in colon carcinoma [J]. International Journal of Colorectal Disease, 2014, 29(6): 663-671.
- [8] Li Y, Xu S, Yue W. Advances of EGFR and Her-2 autoantibodies in serum of lung cancer patients [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2009, 12(10): 1115-1118.
- [9] Nuciforo P, Thyparambil S, Aura C, et al. High HER2 protein levels correlate with increased survival in breast cancer patients treated with anti-HER2 therapy [J]. Mol Oncol, 2016, 10(1): 138-147.
- [10] Engels CC, Kiderlen M, Bastiaannet E, et al. The clinical value of Her-2 overexpression and PIK3CA mutations in the older breast cancer population: a FOCUS study analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 156(12): 361-370.
- [11] Ozdemir N, Aksoy S, Akinci MB, et al. Capecitabine/ cisplatin doublet in patients with antracycline and taxane pretreated and HER2-negative metastatic breast carcinoma [J]. Journal of Clinical Oncology, 2011, 29(15): e11115.
- [12] Roth U, Razawi H, Hommer J, et al. Differential expression proteomics of human colorectal cancer based on a syngeneic cellular model for the progression of adenoma to carcinoma [J]. Proteomics, 2010, 10(2): 194-202.