

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00856

· 论 著 ·

大肠癌早期肝转移的血清特征蛋白及组织表达特异基因筛查

蔡相军^{1*}, 熊仁青¹, 王福荣¹, 王春喜², 王斌¹, 王克夫¹, 刘彩刚³, 冷晗¹

1. 解放军 202 医院普通外科, 沈阳 110003

2. 解放军 301 医院普通外科, 北京 100853

3. 中国医科大学附属第一医院乳腺外科, 沈阳 110001

[摘要] **目的** 应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术及 RT² ProfilerTM PCR Array Human Tumor Metastasis(PAHS-028A)芯片筛查早期肝转移患者血清特异性蛋白及相关肿瘤基因,为大肠癌肝转移的早期诊断提供理论依据。**方法** 应用弱阳离子蛋白质芯片(WCX2)及 SELDI-TOF-MS 技术检测 20 例大肠癌和 20 例大肠癌早期肝转移患者血清中蛋白的相对含量。PCR 基因芯片技术对原发灶和肝转移灶组织进行差异基因筛选。**结果** 应用 SELDI-TOF-MS 的 3 组样本本质荷比在 2 000~30 000 间有 3 774、11 851 的 2 个蛋白峰有显著差异。应用 RT² ProfilerTM PCR Array Human Tumor Metastasis (PAHS-028A)芯片技术发现在大肠癌原发灶中表达明显高于肝转移结节的基因有: ACTB、APC、CTNNA1、ITGB3、NR4A3、MMP10、MMP11、ETV4、CTSL1、RB1、GNRH1、HPSE、CDKN2A、KISS1R、IL8RB、ITGA7、DENR、RPSA、CXCR4、NME2、PNN、SMAD4、SRC、SSTR2、SYK、RORB、TCF20、MMP3、MYCL1、TIMP2、TIMP3、TIMP4、TRPM1;在转移灶表达明显高于原发灶的基因有: MMP9、FN1、CST7、CCL7。**结论** 利用 SELDI-TOF-MS 及基因芯片技术可以为大肠癌早期肝转移的机制研究及诊断与治疗提供实验数据和资料。

[关键词] 结直肠肿瘤;肝肿瘤;肿瘤转移;蛋白质阵列分析;基因芯片**[中图分类号]** R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0856-04

Screening of serum proteomic patterns and tissue-specific genes for early liver metastasis of colorectal cancer

CAI Xiang-jun^{1*}, XIONG Ren-qing¹, WANG Fu-rong¹, WANG Chun-xi², WANG Bin¹, WANG Ke-fu¹, LIU Cai-gang³, LENG Han¹

1. Department of General Surgery, No. 202 Hospital of PLA, Shenyang 110003, Liaoning, China

2. Department of General Surgery, No. 301 Hospital of PLA, Beijing 100853, China

3. Department of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To screen for the serum proteomic patterns and related genes in early liver metastasis of colorectal cancer by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and the RT² ProfilerTM PCR Array Human Tumor Metastasis (PAHS-028A) chip, so as to provide theoretical evidence for diagnosis of early liver metastasis of colorectal cancer. **Methods** The serum proteins of 20 colorectal cancer patients and 20 patients with early liver metastasis of colorectal cancer were detected by WCX2 chip and SELDI-TOF-MS. PCR gene chips were used to screen the differentially expressed genes between the primary tumor and the liver metastases. **Results** SELDI-TOF-MS found that, when the *M/Z* values ranged 2 000-30 000, the contents of two proteins (3 774 and 11 851) were significant different in three samples. PCR gene chip found that the expressions of following genes were significantly higher in the primary colorectal cancer specimens than in the liver metastatic nodules: ACTB, APC, CTNNA1, NR4A3, MMP10, CTSL1, RB1, HPSE, ETV4, GNRH1, CDKN2A, KISS1R, IL8RB, ITGA7, ITGB3, DENR, RPSA, CXCR4, MYCL1, NME2, PNN, SMAD4, MMP11, SRC, RORB, SSTR2, SYK, TCF20, MMP3, TIMP2, TIMP3, TIMP4, and TRPM1; and the following genes were significantly higher in the liver metastases than in the primary tumors: MMP9, FN1, CST7, and CCL7. **Conclusion** SELDI-TOF-MS and gene chip technique can provide a theoretic basis for the mechanism, diagnosis and treatment of early liver metastasis of colorectal cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; liver neoplasms; neoplasm metastasis; protein array analysis; gene chips

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8):856-859]

[收稿日期] 2011-04-11**[接受日期]** 2011-07-05**[基金项目]** 沈阳市科学技术计划项目(071995). Supported by Science and Technology Project of Shenyang(071995).**[作者简介]** 蔡相军, 硕士, 主任医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 024-28853511, E-mail: caixiangjun61@126.com

大肠癌是发病率较高的消化道恶性肿瘤之一,近年来发病率呈逐年增高趋势。大肠癌病死率高,预后差,如果复发,患者生活质量极差,严重威胁人类的生命健康。肝转移是大肠癌患者主要的死亡原因之一,且大肠癌肝转移的早期临床诊断较为困难。因此,研究早期肝转移的预测基因和蛋白,为肝转移的早期诊断提供理论依据具有重要意义^[1]。本研究利用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术及PCR基因芯片技术筛选大肠癌早期肝转移的特异性血清蛋白及相关基因,为大肠癌早期肝转移的机制、研究及诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料 20例大肠癌未发生远处转移和20例大肠癌早期肝转移标本来自我院肝胆外科行手术治疗的患者,大肠癌组平均年龄37.65岁(32~42岁);大肠癌早期肝转移组平均年龄45.5岁(39~52岁)。所有病例均为病理诊断大肠癌,接受大肠癌根治手术或联合部分肝脏切除术。所有病例未接受术前放疗、化疗等辅助治疗,术后病理判断肿瘤分期分型、淋巴结转移情况。患者的临床病例资料完备,告知患者同意。

1.2 主要仪器及试剂 Protein Chip Biology System (PBSIC)型质谱仪、能量吸收分子SPA、弱阳离子交换(weak cation exchanger, WCX2)型蛋白质芯片、Proteinchip Software 3.2和BioMarker Wizard Software分析软件均为美国Cipergen公司产品。乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)、尿素(Urea)、Tris-HCl、DTT、CHAPS、HEPES等试剂均购自Sigma公司。RT² ProfilerTM PCR Array Human Tumor Metastasis (PAHS-028A)芯片(Sabiosciences corporation)。

1.3 SELDI-TOF-MS技术试验过程及原始数据处理 采集患者空腹静脉血3 ml,4℃静置30 min后分离血清,-80℃保存。实验时血清样品置冰盒上融解;以8 000×g 4℃离心5 min。取10 μl血清,加入含20 μl U9(9 mol/L Urea, 2%CHAPS)的缓冲液,在EP管中冰浴振荡30 min,使之变性。30 μl上述变性后样品加入360 μl WCX2芯片缓冲液(50 mmol/L NaAC, pH 4.0)稀释待上样。取出WCX2的芯片并装入生物芯片处理器。每孔加入200 μl WCX-2缓冲液平衡芯片5 min,重复1次。平衡后,每孔中加入100 μl处理好的样品,室温震荡结合1 h(400~600转/min)。然后每孔用200 μl WCX-2缓冲液洗掉非特性结合蛋白(5 min),共2次;最后每孔加入HEPES(1 mmol/L, pH 4.0) 200 μl快速洗涤1次。取出芯片,风干后,每个加样孔上加SPA

(50% CAN+0.5% TFA)0.5 μl 2次,待全干后上机测定。采集数据前以All-in-one(含7个标准蛋白)芯片进行A、D、G三点校正。采用PBSIC型蛋白质芯片阅读仪读取芯片,用Protein Chip Software 3.2分析软件自动采集数据。低相对分子质量范围质谱仪参数设定:激光强度185,检测灵敏性8,优化范围20 000~300 000,最大相对分子质量200 000,收集位置22~82,平均每点收集8次,共收集104次。数据分析前对原始数据进行归一化,然后用BioMarker Wizard软件筛除噪音,初筛蛋白质峰。设定某峰在至少10%的样本中信噪比>5才被认为是蛋白质峰,同一蛋白质峰在不同样本中的偏差<0.1%。

1.4 SELDI-TOF-MS技术应用的统计学方法 采用BioMarker Wizard软件对不同组相同质荷比的蛋白质含量进行统计学分析。以符合 $P < 0.05$ 、同一峰在两组中的信噪比平均值比值 ≥ 2 的蛋白峰认为组间有差异。

1.5 RNA提取及纯化 每50~100 mg大肠癌组与大肠癌早期肝转移组织样品,加入1 ml的TRIzol试剂,用电动匀浆器进行匀浆。所加样品体积不能超过匀浆此样品所使用的TRIzol试剂体积的10%。将水相转移到新离心管中。水相与异丙醇混合以沉淀其中的RNA,加入异丙醇的量为每个样品匀浆时加入1 ml TRIzol试剂的此时加0.5 ml的异丙醇。混匀后15~30℃孵育10 min,于4℃12 000×g离心10 min。移去上清液,每1 ml TRIzol试剂匀浆的样品中加入至少1 ml的75%乙醇,清洗RNA沉淀。振荡后,4℃7 500×g离心5 min。去除乙醇溶液,空气中干燥RNA沉淀5~10 min。在RNA沉淀中加入无RNA酶的水,用枪反复吹打几次,然后55~60℃孵育10 min溶解RNA,获得的RNA溶液保存于-70℃。用无RNA酶的水将经过DNase I消化的RNA样品(RNA $\leq 45 \mu\text{g}$)的体积调整为200 μl。随后加700 μl buffer RLT,充分混匀。加500 μl无水乙醇,用移液器轻轻吸打数次混匀后,取700 μl得到的溶液过柱(RNeasy MinElute Spin Column),轻轻盖上管盖,室温8 000×g离心15 s,去除收集管中的液体。将剩余样品过柱,每次所加的样品体积 $\leq 700 \mu\text{l}$ 。将柱子转移到新的2 ml收集管后,加500 μl Buffer RPE洗柱子,轻轻盖上管盖,室温8 000×g离心15 s,去除收集管中的液体,将柱子放回收集管中。将柱子转移到一新的2 ml收集管,打开柱子的盖子,最大转速离心5 min,将收集管及液体丢弃。洗脱,将柱子转移到一新的1.5 ml收集管,取14 μl无RNA酶的水悬空加到柱子的膜中央,轻轻盖上盖子,最大转速离心1 min洗脱RNA。

1.6 合成cDNA及实时定量PCR 打开PCR Ar-

ray 上的膜,加 25 μ l 混合液到 PCR Array 对应的每个孔中,盖上盖子密封 PCR Array。在设置 PCR 程序前将准备好的 PCR Array 放在冰上。实时定量 PCR 程序设置完后,将 PCR Array 置于实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应。

2 结果

2.1 SELDI-TOF-MS 结果 采用 SELDI-TOF-MS 技术的两组样本在质荷比为 2 000~20 000 的范围内检测到了 96 个蛋白峰,4 个蛋白峰差异有统计学

意义 ($P < 0.05$),其质荷比分别为 3 774.625、7 828.496、11 851.58、11 681.16。

以信噪比 > 5 为蛋白质峰,在相对分子质量范围为 2 000~20 000 中检测到了 96 个蛋白。大肠癌组与大肠癌早期肝转移组对比,符合 $P < 0.05$ 、同一峰在两组中的信噪比平均值比值 ≥ 2 的有两个蛋白峰,其相对分子质量为 3 774、11 851(图 1)。通过相对分子质量为 3 774、11 851 的两个蛋白对 20 例大肠癌组与 20 例大肠癌早期肝转移组重新分组,特异性与敏感性分别为 90.00%(18/20)、85.00%(17/20)。

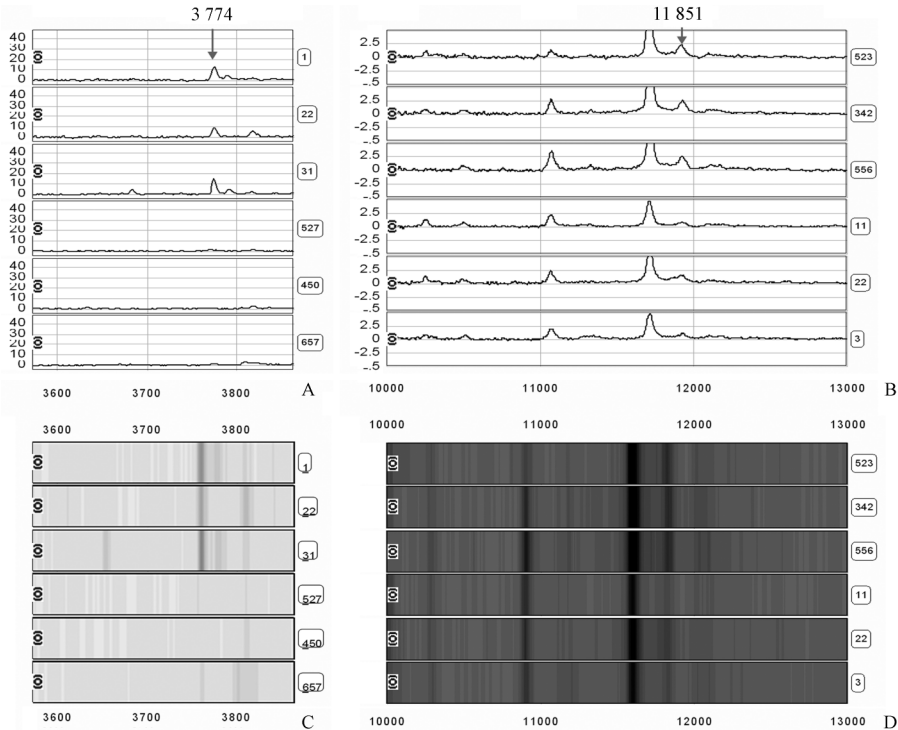


图 1 蛋白峰(A,C)及凝胶电泳图(B,D)

Fig 1 Protein peak chart (A,C) and gel electrophoresis (B,D)

A and B showing that the contents of protein of 3 774 was significantly higher in the primary colorectal cancer group than in the early liver metastases group (taking case 527,450,657 as examples); C and D showing that the contents of protein of 11 851 was significantly higher in the early liver metastases group than in the primary colorectal cancer group (taking case 523, 342, 556 as examples)

2.2 PCR 芯片结果 采用 PCR 芯片发现以下基因在大肠癌原发灶中表达明显高于肝转移结节(扩增倍数比值 $2^{-\Delta Ct} > 1$,表 1): APC、CDKN2A、CTNNA1、CTSL1、CXCR4、DENR、ETV4、GNRH1、KISS1R、HPSE、IL8RB、ITGA7、ITGB3、RPSA、MMP10、MMP11、MMP3、MYCL1、NME2、NR4A3、PNN、RB1、RORB、SMAD4、SRC、SSTR2、SYK、TCF20、TIMP2、TIMP3、TIMP4、TRPM1、ACTB。以下基因肝转移灶表达明显高于原发灶(扩增倍数比值 $0 < 2^{-\Delta Ct} < 1$,表 2): CCL7、CST7、FN1、MMP9。

3 讨论

肝转移是大肠癌较为常见的转移途径,也是大肠

癌患者死亡的主要原因。约 25% 的结肠癌患者就诊时已有远处转移,其中肝转移比例达 50% 以上,且近 1/3 的患者转移灶仅局限于肝脏^[2]。大肠癌肝转移患者若不做任何治疗,中位生存期为 5~10 个月^[3]。所以肝转移的早期诊断极其重要,可以为手术切除提供有利时机。国内外临床上常用的大肠癌的早期肝转移的诊断及筛检方法包括有肿瘤标志物以及影像学检查如术前和术中彩超、CT 等。血清肿瘤标志物因在癌症早期的表达低,致其在大肠癌早期肝转移的诊断中的特异性及敏感性不高^[4-5];而影像学检查的早期诊断效果也难以令人满意^[6-7]。随着实验水平的提高,基因蛋白诊断以及基因芯片的出现、发展,恶性肿瘤早期诊断方法已从传统的观念中逐渐转变过来^[8-10]。

表 1 各基因扩增倍数比值
Tab 1 Amplification folds of genes

Symbol	$2^{-\Delta Ct}$		Fold Difference Colorectal cancer/ Liver nodules
	Colorectal cancer	Liver nodules	
APC	8.5E-04	2.0E-04	4.28
CDKN2A	5.8E-03	2.0E-03	2.86
CTNNA1	1.0E+00	4.4E-01	2.33
CTSL1	8.5E-04	2.0E-04	4.28
CXCR4	7.0E-02	1.7E-02	4.10
DENR	6.1E-01	2.8E-02	21.56
ETV4	8.5E-04	2.2E-04	3.85
GNRH1	2.6E-02	8.2E-03	3.17
KISS1R	8.5E-04	2.0E-04	4.28
HPSE	1.4E-02	4.0E-03	3.58
IL8RB	1.0E-03	2.0E-04	5.19
ITGA7	8.5E-04	2.0E-04	4.28
ITGB3	1.3E-02	5.0E-04	25.06
RPSA	2.1E+00	6.8E-01	3.13
MMP10	1.6E-01	2.2E-02	7.30
MMP11	6.0E-01	2.8E-01	2.16
MMP3	1.2E+00	2.2E-01	5.62
MYCL1	8.5E-04	2.0E-04	4.28
NME2	2.8E+00	1.1E+00	2.44
NR4A3	3.8E-03	1.7E-03	2.23
PNN	5.3E-01	1.5E-01	3.66
RB1	7.9E-02	4.4E-03	17.78
RORB	8.5E-04	2.0E-04	4.28
SMAD4	1.1E-01	2.6E-02	4.00
SRC	1.7E-02	3.5E-03	4.86
SSTR2	8.5E-04	2.0E-04	4.28
SYK	8.1E-03	1.7E-03	4.73
TCF20	4.1E-01	1.4E-01	2.96
TIMP2	1.1E-01	4.7E-02	2.36
TIMP3	8.5E-04	2.0E-04	4.28
TIMP4	8.5E-04	2.0E-04	4.28
TRPM1	8.5E-04	2.0E-04	4.28
ACTB	1.0E+01	1.3E+00	7.82

表 2 各基因扩增倍数比值
Tab 2 Ratio of amplification folds of each gene

Symbol	$2^{-\Delta Ct}$		Fold Difference Colorectal cancer/ Liver nodules
	Colorectal cancer	Liver nodules	
CST7	3.6E-03	1.1E-02	0.33
CCL7	8.5E-04	2.9E-03	0.29
MMP9	4.8E-02	1.6E-01	0.29
FN1	1.4E-01	3.6E-01	0.39

目前仍缺乏应用于大肠癌筛检的特异性血清肿瘤标志物。本研究利用 SELDI-TOF-MS 技术通过比较蛋白质组学的方法发现了 4 个蛋白峰在大肠癌组和大肠癌早期肝转移组表达上有显著差异。为排除混杂因素的影响,本研究把符合 $P < 0.05$ 、同一峰在两组中的信噪比平均值比值 ≥ 2 的蛋白峰认为有差异,按上述条件对大肠癌早期肝转移组与大肠癌

组进行对比,有 2 个蛋白峰符合上述两个条件,其质荷比为 3 774、1 1851。通过相对分子质量为 3 774、11 851 的两个蛋白对 20 例大肠癌组与 20 例大肠癌早期肝转移组重新分组,特异性与敏感性分别为 90.00% (18/20)、85.00% (17/20)。故本研究认为质荷比为 3 774、11 851 的两蛋白峰可以为大肠癌早期肝转移的筛选及诊断提供新的指标。

基因芯片技术是实用性强、早期投入使用的一种生物芯片技术,可以检测肿瘤患者早期蛋白表达的变化,还可用于肿瘤细胞特异性基因的定位筛选^[15-17],应用基因芯片技术早期诊断大肠癌新的肝转移病灶,可以为大肠癌术后早期发现的肝转移患者进行微创治疗提供可靠的依据。本研究使用 PCR 基因芯片用于比对原发灶和肝转移灶进行差异基因检测,成功筛选出了大肠癌早期肝转移的相关基因。

SELDI-TOF-MS 技术及 PCR 基因芯片技术是科研实验研究中常用的技术项目,尚没有在临床试验诊断上广泛应用,本研究应用 SELDI-TOF-MS 技术发现的两个蛋白峰及利用 PCR 基因技术发现的相关基因虽然尚不完善,随着科技水平的进展,相信可以为大肠癌肝转移患者的早期诊断提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Xing X, Peng L, Qu L, Ren T, Dong B, Su X, et al. Prognostic value of PRL-3 overexpression in early stages of colonic cancer [J]. *Histopathology*, 2009, 54: 309-318.
- [2] 戴广海. 大肠癌常见诊疗误区解析[J]. *医学与哲学: 临床决策论坛版*, 2010, 31: 19-21.
- [3] Ruers T, Bleichrodt R P. Treatment of Liver metastases, an update on the possibilities and results[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38: 1023-1033.
- [4] 刘宝善, 燕锦, 左明, 刘超. 大肠癌的复发与转移[J]. *大肠肛门病外科杂志*, 2002, 8: 59-61.
- [5] 汪晓东, 纳飞飞, 邓磊, 李立. 肿瘤标志物在大肠癌临床诊治中的应用进展[J]. *医学与哲学: 临床决策论坛版*, 2009, 30: 54-56.
- [6] 尹贻碧, 聂孟良, 贺伟. 大肠癌肝转移的早期诊断和治疗(附 89 例报告)[J]. *中国实用外科杂志*, 1999, 19: 604-605.
- [7] 徐永俊. 大肠癌肝转移 63 例早期诊断与治疗[J]. *中原医刊*, 2006, 33: 36-37.
- [8] 刘志勇, 欧阳忠, 邹小明. EZH2 在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. *黑龙江医药*, 2010, 23: 628-630.
- [9] 李小卫, 刘平, 丁彦青. Sialyl Lewis-X 抗原在大肠癌 LoVo、HT29 细胞系及大肠癌肝转移组织中表达的临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15: 526-528.
- [10] 关泉林, 谭继英, 汪晓伟, 高明太, 李玉民, 袁文臻. 应用 RT-PCR 检测乳腺癌患者外周血 CEA mRNA 和 CK-19 mRNA 的研究及意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31: 732-740.