

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.006

裸鼠肝癌移植瘤模型体内微量蛋白谱分析

于卉,陶华林[△],汪碧琼

(西南医科大学第一附属医院检验科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 采用 Bel-7402 人肝癌细胞悬液接种裸鼠构建肝癌裸鼠移植瘤模型,探讨模型体内微量差异蛋白的表达情况。**方法** 在裸鼠皮下接种浓度为 1×10^7 /mL 的肝癌细胞悬液构建肿瘤模型,剂量为每只 0.1 mL,对照组接种相同剂量无血清培养基,观察肿瘤生长情况。在不同时间点取血,用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测分析裸鼠血清中的小分子蛋白。利用 Ciphergen ProteinChip 3.0 和 Ciphergen Biomaker Wizard 3.1 软件进行蛋白质数据采集和分析,筛选与肝癌相关的差异蛋白。**结果** 筛选出 115 个差异表达蛋白($P < 0.01$),其中有 5 个差异蛋白表达规律性较强,质荷比(M/Z)分别为 2 016、3 309、3 442、3 745、2 747 Da。**结论** Bel-7402 人肝癌细胞在裸鼠体内生长过程中能够表达与肝癌相关的微量蛋白质,经进一步蛋白鉴定和试剂开发可用作肝癌早期诊断的标志物。

[关键词] 肝肿瘤;蛋白质组学;表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术;裸鼠模型

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3040-03

Serum microprotein spectrum analysis in vivo of nude mice with hepatocellular carcinoma

Yu Hui, Tao Hualin[△], Wang Biqiong

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** We injected nude mice with human hepatoma cell line (Bel-7402), in order to analyze their serum microprotein spectrum, and so as to find the early diagnosis markers of liver cancer. **Methods** We injected every nude mice with cell suspension (concentration: 1×10^7 /mL; dosage: 0.1 mL) to built the tumor model, the control group was injected with the same dose of serum free medium. We observed the growth of nude mice and sampled their blood in different time, and then we analyzed the serum microprotein spectrum by SELDI-TOF-MS and screened the proteins related to hepatoma by the embedded software (Ciphergen ProteinChip 3.0 and Ciphergen Biomaker Wizard 3.1). **Results** We got 115 significantly differentiated proteins ($P < 0.01$), and among them, there were 5 proteins expression regularity, M/Z was 2 016, 3 309, 3 442, 3 745, 2 747 Da, respectively. **Conclusion** Bel-7402 human liver cells in nude mice in vivo growth process has five proteins have difference, further protein identification and reagent development can open up a new way for early diagnosis of liver cancer.

[Key words] liver neoplasms; proteomics; SELDI-TOF-MS; nude mice model

近年来肝癌发病率逐年上升,病因极其复杂,目前肝癌的诊断主要包括实验室检查、影像和超声等,但这些方法在早期诊断中均有较高的漏诊和误诊率,早期病检又有侵入性损伤,患者难以接受^[1-4]。表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)是近年来发展较快的一门新技术,无需样本纯化,可直接检测血液、尿液、细胞液等标本的微量蛋白,快速、高效^[5-11]。本研究采用弱阳离子交换芯片(WCX2)在质谱仪上检测分析了裸鼠肝癌移植瘤模型体内的微量蛋白质谱图,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞株 雌性 BALB/C 裸鼠 32 只,3 周龄,体质量 12~16 g,购于重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司。Bel-7402 人肝癌细胞株购于上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 试剂 A_μ 蛋白芯片(Ciphergen 公司,美国),新鲜南美胎牛血清和 RPMI 1640 细胞培养基(Gibco 公司,美国),0.25%胰蛋白酶(碧云天生物公司),促肾上腺皮质激素(中科

亚光公司)。

1.1.3 仪器 高速离心机(安亭科学仪器厂),二氧化碳恒温孵育箱(Thermo 公司,美国),PBS II/C 型蛋白指纹图谱分析仪(Ciphergen 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 Bel-7402 肝癌细胞株的培养、传代 肝癌细胞株经复苏后加入 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C 5% CO₂ 的恒温培育箱内进行培养、传代,配置成浓度为 1×10^7 /mL 的癌细胞悬液^[12-14]。

1.2.2 裸小鼠接种 用乙醇消毒裸鼠的左肩背部皮肤,使用皮试注射器吸取混匀的肝癌细胞悬液 0.1 mL(1×10^7 /mL),缓慢注射接种于裸鼠左肩背部皮下。对照组裸鼠的接种处理方法与实验组相同,但接种液为不含血清的 RPMI 1640 培养基。

1.2.3 裸鼠血清标本的收集 在移植瘤造模成功后 20、40、60 d 时用摘眼球法取血,标本于 30 min 内存放 4 °C 冰箱中静置 1 h,再低温 3 000 r/min 离心 5 min,将血清分装于 Eppendorf 管中,每份标本分装 3 管,置于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.4 微量蛋白谱分析

1.2.4.1 标本的处理 取出待用冻存标本,用实验冰袋低温溶解后低温(4℃)离心(10 000 r/min 2 min)。取血清 5 μL 与 PBS 缓冲液等体积混匀,取 2 倍体积(即 10 μL)的半饱和 SPA 溶液加入混合样品中混匀。

1.2.4.2 活化芯片 该过程应与标本的前处理同时进行,在芯片上依次加入丙酮溶液、盐酸溶液、盐酸甲醇溶液和甲醇溶液各 50 μL,每加一种溶液后均需充分振荡 5 min 后拍干,在空气中晾干备用,所有标本加样均控制在 10 min 内完成。

1.2.4.3 点样 在活化好的金芯片上,按标记顺序依次加处理好的待测血清标本 2 μL,并预留空白对照,待空气中晾干后再于每个点上加半饱和 SPA 溶液 1 μL,待自然晾干后即可上机检测。

1.2.5 数据的收集 使用 PBS II /C 型蛋白质指纹图谱仪检测后,通过 Ciphergen Proteinchip 软件自动收集数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,蛋白质图谱分析用 Biomarker Wizard 3.1 软件,蛋白峰值比较用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 模型的构建 接种 Bel-7402 肝癌细胞珠的裸鼠,15~20 d 后出现明显肿块,对照组裸鼠则无明显异常,见图 1、2。



图 1 对照组裸鼠



图 2 实验组裸鼠

2.2 裸鼠移植瘤肿块的病理组织学检查 移植瘤肿块组织经病理学检查结果显示,其肿块组织中瘤细胞异型性明显,符合肝癌的病理诊断。见图 3。

2.3 两组微量蛋白检测结果 对照组和实验组裸鼠血清经上

机检测,用相关软件对数据进行校正分析后,筛选出 115 个差异表达蛋白($P < 0.01$),其中表达规律性较强的有 5 个,质荷比(M/Z)分别为 2 016、3 309、3 442、3 745、2 747 Da,尤其前 4 种微量蛋白表达逐渐增强,见表 1、图 4。

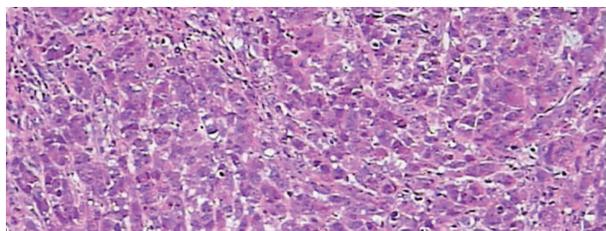


图 3 病理切片活检结果(×100)

表 1 裸鼠血清微量差异蛋白检测结果($\bar{x} \pm s$)

M/Z	对照组	实验组			F	P
		建模 20 d	建模 40 d	建模 60 d		
3 442	13.18±1.68	21.24±1.78	22.86±1.56	24.05±1.50	6.77	<0.01
2 016	9.28±1.70	9.42±1.87	10.88±1.44	15.52±1.52	21.38	<0.01
3 309	6.63±0.76	7.28±0.78	8.19±1.45	8.42±0.36	17.90	<0.01
3 745	1.45±0.71	2.91±0.76	3.97±1.07	4.04±1.43	11.29	<0.01
2 747	6.28±1.76	5.93±1.33	5.38±1.48	4.08±0.35	13.64	<0.01

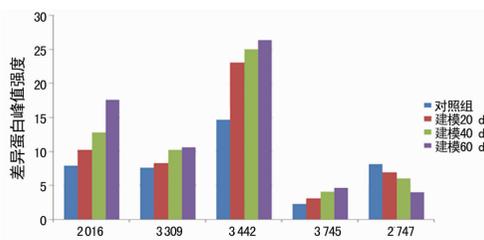


图 4 差异蛋白表达强度与时间的关系

3 讨 论

在本实验中通过 SELDI-TOF-MS 技术和 Biomarker Wizard 3.1 软件检测分析实验组和对照组裸鼠血清中的微量蛋白质谱,发现有 115 个差异表达蛋白,其中有 5 个微量蛋白表现出较明显的规律性变化,肝癌细胞在裸鼠体内生长过程中,其表达呈现逐渐增高或者降低的规律性,这 5 个微量蛋白的 M/Z 分别为 2 016、3 309、3 442、3 745、2 747 Da,前 4 个微量蛋白表达的峰值逐渐增强,后 1 个微量蛋白表达的峰值逐渐降低。将 5 个微量蛋白输入 Swiss-Prot 蛋白数据库进行检索发现,对应的蛋白质分别是 Protein 2A,钾通道毒素、丝氨酸蛋白酶抑制剂 2、神经毒素 P2、亮氨酸前导反应合成肽。它们都具有不同的功能,可能在肿瘤的生长过程中发挥不同的作用。当然这种蛋白的识别具有一定的局限性,如有条件可通过专门机构进行蛋白鉴定,并进行动物免疫,制备抗体,研发与微量蛋白相对应的检测方法和试剂,有望用于临床作为肝癌早期血清标志物检测指标。

SELDI-TOF-MS 技术发展迅速,尽管已成为蛋白质组学研究的理想技术平台,在各个方面的优势都较明显,如样本无需纯化、耗时短、标本需量少、速度快、大规模、高通量,但 SELDI-TOF-MS 技术对实验室的环境、仪器配置和实验操作条件等要求较高^[6]。该技术分析微量蛋白谱时,最好同时设置内标

和外标,所有标本同时检测,以减少激光衰减,芯片类型等对检测结果的影响。

原发性肝癌的病因与诱因多种多样如环境、饮食和水源、吸烟饮酒等生活习惯,细菌、病毒和寄生虫感染亦是诱发肝癌的可能因素,在不同病因或诱因的情况下可能会导致不同细胞类型的肝癌,在体内表达的微量蛋白谱也许有差异^[9],而本研究仅仅是作了一株肝癌细胞,在后续工作中还需用不同肝癌细胞株建模,研究体内蛋白表达情况,综合分析肝癌相关标志物,有利于提高肝癌早期诊断率。

本研究肝癌细胞在动物造模中采用的是皮下异位造膜,如果用肝癌细胞原位接种动物构建模型,其体内蛋白表达是否与皮下接种造模有差异,是否可用影像学的方法来观察原位接种动物模型的肿瘤生长情况及效果,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 杨军,张小莉. 蛋白质组学的发展以及在医学中的应用概况[J]. 中国民族民间医药,2012,23(1):19-20.
- [2] 周玲丽,曹骥,李薇,等. RNA 干扰 FABP5 基因对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(4):603-608.
- [3] Xia HJ, Chen CS. Progress of non-human primate animal models of cancers[J]. Dongwuxue Yanjiu, 2011, 32(1): 70-80.
- [4] 李薇,曹骥,周玲丽,等. RNAi 沉默 CDC25a 基因对人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤的影响[J]. 实用医学杂志, 2015,31(3):348-352.
- [5] Liu C. The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 245821.
- [6] 张建忠,朱建云,包海燕,等. 血清 MMP-13 及 TIMP-1 检

测对原发性肝癌的早期诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(2):293-295.

- [7] 张铁序,张朝霞,黄东龙,等. HSP27 在人不同转移性前列腺癌细胞株比较蛋白质组学的初步研究[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(35):19-25.
- [8] Larkin SE, Zeidan B, Taylor MG, et al. Proteomics in prostate cancer biomarker discovery[J]. Expert Rev Proteomics, 2010, 7(1):93-102.
- [9] 杨素芳,邱颂平,刘清华. 不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱的观察[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(10):1352-1355.
- [10] 安黎,周红光. 蛋白质组学在原发性肝癌中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(9):1306-1310.
- [11] 李华成,王建刚,费新应,等. 膈下逐瘀汤加减方作用人肝癌细胞 SMMC-7721 蛋白质组学研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2015,25(3):156-158.
- [12] 张英剑,王萍,郭虹,等. 肝病良恶性腹腔积液前期处理后差异蛋白质组学分析[J]. 中国医药,2014,9(4):509-511.
- [13] Wang Z, Gou W, Liu M, et al. Expression of P53 and HSP70 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and early and advanced hepatocellular carcinoma tissues and their diagnostic value in hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study[J]. Met Sci Monit, 2015, 23(11): 3209-3215.
- [14] Wang L, Yao M, Dong ZZ, et al. Circulating specific biomarkers in diagnosis of hepatocellular carcinoma and its metastasis monitoring[J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 9-20.

(收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-04-02)

(上接第 3039 页)

- by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92482.
- [6] 李晓东,李英,丁新国,等. 1,25(OH)2D3 对甲状旁腺素诱导的肾小管上皮细胞转分化和 TGF- β_1 的表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(2):156-159.
 - [7] Szuster-Ciesielska A, Mizerska-Dudka M, Daniluk J, et al. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF- κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(2):222-237.
 - [8] Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, et al. Mechanisms of action of acetaldehyde in the up-regulation of the human α 2(I) collagen gene in hepatic stellate cells; key roles of Ski, SMAD3, SMAD4, and SMAD7 [J]. Am J Pathol, 2014, 184(5):1458-1467.
 - [9] 张健,王炳元. 酒精性肾损害时 α -SMA 的表达及复方中药的干预作用[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 17

(12):69-70.

- [10] 邱皓,滕玉莲,刘文,等. 中药康肾合剂对酒精性肾损伤大鼠尿酶变化及肾脏 TGF- β_1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(12):3714-3716.
- [11] Zheng RP, Bai T, Zhou XG, et al. Lefty A protein inhibits TGF- β_1 -mediated apoptosis in human renal tubular epithelial cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2):621-625.
- [12] Yang L, Ma X, Cheng T, et al. Effect of tangnaikang on TGF-beta1-induced transdifferentiation of human renal tubular epithelial HK-2 cells [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3):388-393.
- [13] Sarközi R, Flucher K, Haller VM, et al. Oncostatin M inhibits TGF- β_1 -induced CTGF expression via STAT3 in human proximal tubular cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(4):801-806.

(收稿日期:2016-02-25 修回日期:2016-04-11)