

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.014

结肠炎相关结肠癌分泌蛋白质体外富集方法的建立*

马怡茗 肖 汀 赵新华 韩文晓 汪红英[△]

(北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021)

摘要 目的:建立小鼠结肠炎相关结肠癌分泌蛋白质体外富集的方法;**方法:**利用结肠炎相关结肠癌小鼠模型,取不同阶段实验小鼠的结肠体外培养 48h,收集分泌蛋白质。使用 SDS-PAGE 分离分析分泌蛋白质,并通过 Western blot 检测分泌蛋白质是否存在胞浆蛋白或者核蛋白的污染。**结果:**在实验条件下收集得到的分泌蛋白重现性好,分泌蛋白中核蛋白和胞浆蛋白的污染较少,且能够明显分辨与病程相关差异表达蛋白质条带。**结论:**成功建立了结肠炎相关结肠癌分泌蛋白质的体外富集方法。

关键词:结肠炎相关结肠癌;分泌蛋白质;组织培养

中图分类号: R735.35; Q5; R322.8 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)17-3259-03

Establishment of in Vitro Methods for Collection of Colitis-associated Colon Cancer Secretome*

MA Yi-ming, XIAO Ting, ZHAO Xin-hua, HAN Wen-xiao, WANG Hong-ying[△]

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

ABSTRACT Objective: To establish in vitro method to collect the secreted proteins from mouse with colitis-associated colon cancer. **Methods:** Colitis-associated colon cancer was induced by azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS) in C57BL/6 mice. Colon tissue was collected at different stages during the development of colon cancer. The whole colons were sectioned into pieces for in vitro culture with serum-free media, and then the conditioned media were collected at 48h. Western blot was applied to detect whether there is cytoplasm and nucleus protein contaminant in secreted proteins. **Results:** The method had good reproducibility. There was trace amount of contaminants from cytoplasm and nucleus in collected secretome. And several different protein bands were observed among different groups and correlated with the stage of colitis-associated colon cancer. **Conclusion:** An in vitro method to collect secreted proteins from mouse with colitis-associated colon cancer was successfully established.

Key words: Colitis-associated colon cancer; Secreted protein; Tissue culture

Chinese Library Classification(CLC): R735.35; Q5; R322.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3259-03

前言

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率位居欧美发达国家第三位。随着生活水平的提高,我国城市人口结直肠癌的发病率和死亡率呈快速上升趋势,已分别位居恶性肿瘤第四位和第五位。结肠炎(colitis)或炎性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)作为一种反复发作的慢性消化道炎症,是结肠癌发生的重要高危因素之一,约 20%的结肠炎患者最终会发展为结肠癌^[1]。因而寻找特异性高、敏感性强的结肠炎相关结直肠癌早期诊断标志物具有非常重要的意义。为了发现更多的可用于辅助结直肠癌早期诊断的候选标志,基于质谱技术的差异蛋白质组学已经应用于结直肠癌相关标志的研究^[2-4]。然而,蛋白质组学技术面临的主要挑战是体液(特别是血液)中高丰度蛋白(如白蛋白和免疫球蛋白)对低丰度蛋白鉴

定的影响,而体液中疾病相关标志往往是低丰度蛋白。

为避免血清高丰度蛋白的影响,近年开展了肿瘤细胞或癌组织分泌蛋白的研究^[5-7]。将癌细胞或离体癌组织培养于无血清培养基(serum-free media, SFM)内^[8,9]。由于不存在其他污染蛋白的影响,条件培养基(conditioned media, CM)内的蛋白对于癌细胞或组织来说都是相对特异的,降低了质谱分析对待检蛋白丰度范围的要求,提高了质谱鉴定的准确度。然而,目前相关研究仍处于起步阶段。

综上所述,我们将研究结肠炎相关结肠癌分泌蛋白质的体外富集方法,这将更有助于我们寻找到理想的结直肠癌肿瘤标志物,为结直肠癌的早期诊断、监测和治疗提供有益的指导,具有重要的临床应用价值。

1 材料与方法

* 基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2011CB910700);国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91129717)

作者简介:马怡茗(1983-),女,博士,中级,主要研究方向:分子肿瘤,电话:010-87787384, E-mail:removal@163.com

△ 通讯作者:汪红英, E-mail: hongyingwang@cicams.ac.cn

(收稿日期:2014-02-19 接受日期:2014-03-18)

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 鼠龄 6~8 周, 体重 18~20 克, 购自中国医学科学院动物所, 按实验要求饲养于中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)购自美国 Sigma 公司, 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS), 相对分子量为 36000~50000, 购自美国 MP Biomedicals 公司, β -actin 抗体购于 sigma 公司, PARP 抗体和二抗购于 CST 公司, 培养液均为 Gibco 公司产品, LHC-9 培养液由肖汀老师赠予。

1.2 实验方法

1.2.1 结肠炎相关结肠癌动物模型的复制 经过适应性饲养的小鼠随机分成对照组(control)和实验组, 对照组不作任何处理。实验组在实验第一天单剂量腹腔注射 AOM(12.5 mg/kg 体重), 一周后给予含 2.5% DSS 的饮用水, 连续 5 天, 然后停药 16 天, 作为第一个 DSS 周期; 再次给予含 2.5% DSS 的饮用水 5 天, 停药 16 天, 作为第二个 DSS 周期; 一共进行三个 DSS 周期。另外, 设立一个 DSS 组, 只给予三个周期的 DSS^[10]。

1.2.2 动物标本采集 在每个 DSS 周期结束之后处死一批给药组和对照组小鼠, 分别命名为 AD1、AD2、AD3 和 C1、C2、C3 (合并为 C)。无菌条件下解剖后取小鼠的全结肠, 即上至回盲交界处下至肛门。取下结肠后剖开, 用含 1%青链霉素的生理盐水将内容物冲洗干净, 取降结肠迅速进行体外培养。

1.2.3 小鼠结肠体外培养 将离体 30 分钟以内的小鼠组织进行体外培养。采用 LHC-9 条件培养基, 将组织用手术刀切成 5 mm³ 左右的小块, 种入培养皿后放进培养盒中, 充入含有 50% N₂, 45% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 将培养盒放在摇摆器上, 摇摆频率为 8-10 次每分钟, 36.5 °C 孵箱中培养。随后在 48 小时收集其条件培养基(无血清, 所有成分、含量已知)。条件培养基中的蛋白组分经过透析除盐、冻干浓缩后, 利用一维聚丙烯酰胺凝胶电泳(1D-SDS-PAGE)分离。考马斯亮蓝法将凝胶染色^[11]。

1.2.4 小鼠组织总蛋白的提取 取小鼠新鲜结肠组织, 用预冷的 PBS 清洗干净, 加入适量的组织蛋白裂解液, 冰水浴下高速匀浆, 裂解 30 min 后充分离心取上清液。

1.2.5 Western blot 各取 25 ug 蛋白质进行 SDS-PAGE 分离, 并采用湿转法将蛋白从分离胶转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜放入封闭液中室温封闭 1 h, 用 5%脱脂牛奶稀释一抗(β -actin 1:10000; PARP 1:1000), 4°C 孵育过夜。TTBS 室温漂洗 10 min 3 次, 随后用 5%牛奶以 1:10000 稀释二抗, 室温孵育 1h。TTBS 室温漂洗 10 min 3 次后加入 ECL 发光液, 曝光后显影。

2 结果

2.1 建立小鼠结肠组织体外培养体系

首先选用正常小鼠结肠组织进行体外培养, 共成功培养 5 例, 条件培养基分泌蛋白的 SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示。结果显示, 小鼠结肠分泌蛋白与总蛋白的蛋白质分布具有很大差异, 且分泌蛋白的重现性极佳, 证明我们建立的培养条件适合结肠组织的培养。

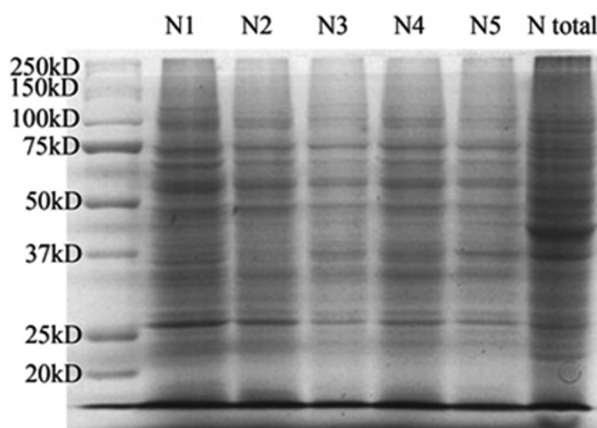


图 1 正常小鼠结肠分泌蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of normal mouse colon secretome

2.2 小鼠结肠分泌蛋白的质量鉴定

采用 Western blot 检测小鼠结肠总蛋白及分泌蛋白中细胞骨架蛋白 β -actin 和核蛋白 PARP 的表达水平。如图 2 所示, 在上样量相同的前提下, 上述两种蛋白在正常小鼠结肠总蛋白中大量表达, 而在分泌蛋白中几乎不能被检测到。证明所收集的分泌蛋白中核蛋白和胞浆蛋白的污染较少, 我们的培养体系有利于小鼠结肠组织的体外生存, 适用于小鼠结肠组织分泌蛋白的收集。

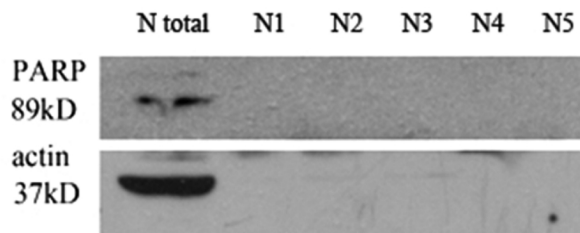


图 2 WB 验证分泌蛋白中核蛋白和胞浆蛋白的污染

Fig. 2 WB analysis of nuclear and cytoplasmic protein in secretome

2.3 结肠炎相关结肠癌分泌蛋白质分析

利用 AOM-DSS 小鼠模型模拟从 "正常→轻度不典型增生→中度不典型增生→重度不典型增生→腺癌" 的演变过程, 收集不同时间点的小鼠结肠新鲜样本进行体外培养。在实验结束时 AD3 组小鼠成瘤率约为 94%(成瘤的小鼠具有肉眼可见的结肠腺瘤), 而其他各组小鼠结肠上均未发现肿瘤。每组各成功培养 3 只小鼠, 等质量混合后用 SDS-PAGE 进行分析, 如图 3 所示。结果显示各阶段分泌蛋白间差异显著, 能够明显分辨与病程相关蛋白质条带。

3 讨论

分泌蛋白质组(secretome)的定义是细胞或组织分泌或漏出蛋白的总和。在多细胞生物体内, 这些分泌蛋白可以决定、控制和协调许多生物进程, 如细胞生长、分化和凋亡, 以及生命体的发育、免疫防御、凝血和肿瘤发生^[12,13]。肿瘤的形成是一个长期的多因素参与的复杂过程。在该过程中, 肿瘤细胞能够分泌细胞因子、蛋白酶及其抑制物等多种蛋白质, 这些蛋白质广泛参与肿瘤细胞间以及肿瘤细胞与细胞外基质间的信号转导, 并通过影响肿瘤局部的微环境来调控肿瘤的发生、发展、侵袭和

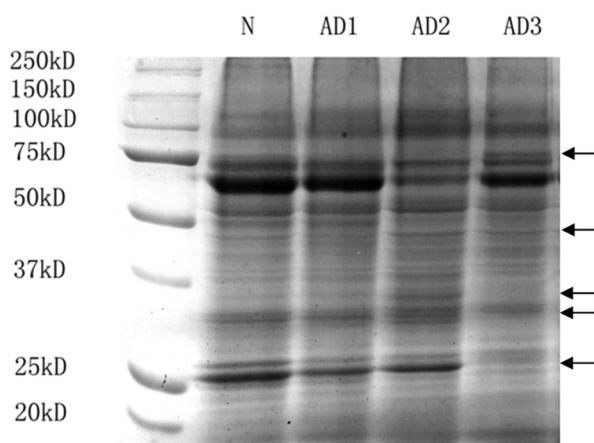


图3 小鼠结肠炎相关结肠癌分泌蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of colitis-associated colon cancer secretome

转移^[14-16]。这些蛋白质由肿瘤细胞分泌后可以进入血液、组织间隙液、尿液等体液中,易于检测。

近年来,有关结肠癌分泌蛋白质组的研究已有一些报道^[17-19]。Shin 等^[20]人利用 ICPL 稳定同位素标记技术,测定了人结肠癌细胞系 SNU-C4 的分泌蛋白质组,发现糖酵解通路的酶类在分泌蛋白质中的丰度显著升高;Shi 等人^[21]则着重分析了人体结肠癌组织的分泌蛋白质组,他们将癌组织和癌旁组织在含有 35S 的培养液中孵育 16 小时,然后收集组织分泌蛋白质,运用双向电泳技术分离蛋白质,通过放射性强度辨别差异电泳点,最后以 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定差异蛋白质。虽然作者找到了 31 个差异点,但是其中仅有两个被鉴定为蛋白质。这些分泌蛋白质组数据清楚表明了结肠癌细胞可能发生分泌蛋白质的变异。

本文成功建立小鼠结肠组织体外培养体系。结直肠是一个相对开放和相当复杂的环境,结直肠中的正常菌群以及粪便使体外组织培养极易发生污染。因此,我们首先需要解决的问题就是防止污染的发生,提高组织培养的成功率。在实验中,我们通过调整洗液中抗生素的浓度,将污染发生率降至最低。另一方面,适合的条件培养液是确保组织分泌蛋白质量的关键环节。高质量的条件培养液分泌蛋白应还有大量的外泌蛋白,而仅含极少量的骨架蛋白、胞浆蛋白及核蛋白。在我们建立的培养条件下,条件培养液中仅含很少量的胞浆蛋白和核蛋白,为后续质谱分析提供了高质量蛋白质样本。这将更有助于我们寻找到理想的结直肠癌肿瘤标志物,为结直肠的早期诊断、监测和治疗提供有益的指导,具有重要的临床应用价值。

参考文献(References)

- [1] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? [J]. *Lancet*, 2001, 357(9255): 539-545
- [2] Xu B J, Li J, Beauchamp R D, et al. Identification of early intestinal neoplasia protein biomarkers using laser capture microdissection and MALDI MS[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(5): 936-945
- [3] Xie L Q, Zhao C, Cai S J, et al. Novel proteomic strategy reveal combined alpha1 antitrypsin and cathepsin D as biomarkers for colorectal cancer early screening[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4701-4709
- [4] Ma Y, Peng J, Huang L, et al. Searching for serum tumor markers for colorectal cancer using a 2-D DIGE approach [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(15): 2591-2599
- [5] Xiao T, Ying W, Li L, et al. An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(10): 1480-1486
- [6] Weng L P, Wu C C, Hsu B L, et al. Secretome-based identification of Mac-2 binding protein as a potential oral cancer marker involved in cell growth and motility[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(9): 3765-3775
- [7] Gronborg M, Kristiansen T Z, Iwahori A, et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(1): 157-171
- [8] De Wit M, Kant H, Piersma S R, et al. Colorectal cancer candidate biomarkers identified by tissue secretome proteome profiling [J]. *J Proteomics*, 2014, 99C: 26-39
- [9] Zeng X, Yang P, Chen B, et al. Quantitative secretome analysis reveals the interactions between epithelia and tumor cells by in vitro modulating colon cancer microenvironment[J]. *J Proteomics*, 2013, 89: 51-70
- [10] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(11): 965-973
- [11] Xiao T, Ying W, Li L, et al. An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(10): 1480-1486
- [12] Pardo M, Garcia A, Antrobus R, et al. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(7): 2802-2811
- [13] Chen S T, Pan T L, Juan H F, et al. Breast tumor microenvironment: proteomics highlights the treatments targeting secretome [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(4): 1379-1387
- [14] De Boeck A, Hendrix A, Maynard D, et al. Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression[J]. *Proteomics*, 2013, 13(2): 379-388
- [15] Webber J P, Spary L K, Sanders A J, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes [J]. *Oncogene*, 2014[Epub ahead of print]
- [16] Shahinian M, Loessner D, Biniossek M, et al. Secretome and degradome profiling shows that Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6, and 7 induce TGFβ -1 signaling in ovarian cancer cells.[J]. *Mol oncol*, 2014, 1(8): [Epub ahead of print]
- [17] Imperlini E, Colavita I, Caterino M, et al. The secretome signature of colon cancer cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(11): 2577-2587
- [18] Xue H, Lu B, Zhang J, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 545-555
- [19] Chiu K H, Chang Y H, Liao P C. Secretome analysis using a hollow fiber culture system for cancer biomarker discovery[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(11): 2285-2292
- [20] Shin Y K, Yoo B C, Hong Y S, et al. Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance[J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(12): 2182-2192
- [21] Shi H J, Stubbs R, Hood K. Characterization of de novo synthesized proteins released from human colorectal tumour explants [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(14): 2442-2453