



涎腺腺样囊性癌高低转移细胞系 mRNA 及蛋白质表达谱差异研究*

杨捷琳¹⁾ 朱乃硕¹⁾** 王颖¹⁾ 关晓峰²⁾ 郑兆鑫¹⁾

(¹⁾ 复旦大学生命科学学院病毒及分子免疫实验室, 上海 200433;

(²⁾ 中国医科大学口腔医学院, 沈阳 110001)

摘要 转移性和侵袭性是恶性肿瘤的重要特征, 与基因和蛋白质水平上一系列改变密切相关. 应用 mRNA 抑制性消减杂交技术和双向电泳结合肽质量指纹分析技术, 对涎腺腺样囊性癌高、低转移细胞系的 mRNA 和蛋白质表达谱的差异性进行比较研究. 实验结果显示, 在抑制性消减杂交中, 分别以两个细胞系为测试子, 共获得差异片段 34 个, 其中高转移株细胞中高表达的基因序列有 6 个, 低转移细胞系中有 28 个, 其中包括两个新的表达序列标签 (EST). 对这些基因序列, 进一步以 RNA 斑点杂交对这些基因的表达状况进行验证并排除假阳性结果, 结果发现, 32 个基因在 mRNA 水平上有不同程度的表达量改变, 改变趋势与消减杂交结果一致. 以蛋白质等电聚焦结合 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的双向电泳技术获得的总蛋白质分离, 经 PDQuest2DE 软件分析结果表明, 高转移细胞系表达谱的平均蛋白质点数为 (978 ± 38), 低转移细胞系的平均蛋白质点数为 (996 ± 27). 其中高转移细胞与低转移细胞相比, 其蛋白质点有 355 个未被匹配, 低转移细胞相比高转移细胞有 222 个未被匹配. 对其中 10 个差异较明显的蛋白质点, 进一步进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定肽质量指纹图谱, 用 Peptident 软件对 SWISS PROT 数据库比较分析, 结果显示, Stratifin、Symplekin 和乳腺癌相关抗原 NY-BR-20 等蛋白质在高转移细胞中表达, 在低转移中未被检测到, B7 蛋白质在低转移细胞中高表达, 在高转移细胞中低表达. 结果表明涎腺腺样囊性癌高转移特性与多种基因、蛋白质相关, 这些基因或蛋白质参与血管生成、蛋白质合成、信号传递、细胞周期调控、分子伴侣以及免疫共刺激等多种生理活动. 同时在 mRNA 和蛋白质水平上进行表达谱分析使结果更全面, 具有明显的互补性, 这些结果为进一步探索腺样囊性癌肿瘤转移分子机理以及肿瘤控制和基因治疗提供了重要的依据.

关键词 涎腺腺样囊性癌, 抑制性消减杂交, 双向电泳, 肿瘤转移, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

学科分类号 Q291

转移性和侵袭性是恶性肿瘤的重要特征, 癌细胞的侵袭和转移是多阶段、多步骤、多因素、多基因作用和发展的过程^[1]. 肿瘤若失去转移特性其恶性度将大大降低, 对肿瘤转移相关基因的研究是攻克肿瘤不可缺少的重要基础工作之一. 涎腺腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, Acc) 是口腔颌面部常见的恶性肿瘤, 其临床生物学特征之一就是易发生肺转移^[2], 对其转移机理目前仍知之甚少. Guan 等^[2]运用转移灶体内连续传代技术及体外克隆技术, 在对低转移细胞系 Acc-2 第 162 代细胞异质性研究的基础上, 成功筛选到了具有高转移能力的涎腺腺样囊性癌克隆株——Acc-M. 两个细胞系转移性有显著差异, Acc-M 转移率为 96%, Acc-2 转移率为 18%. 本文拟用 mRNA 抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术^[3]、双向电泳技术及肽质量指纹分析 (peptide

mass fingerprinting) 技术等, 以涎腺腺样囊性癌高转移细胞系为材料, 与低转移细胞系进行比较研究, 以期获得相关信息资料, 为肿瘤的治疗和转移控制打下基础.

1 材料与方法

1.1 细胞

人涎腺腺样囊性癌高转移细胞系 Acc-M 和涎腺腺样囊性癌低转移细胞系 Acc2 (购自上海市第九人民医院口外肿瘤实验室), Acc-M 为经裸鼠体内连续传代培养分离出的高转移细胞系, 转移率达 89% 以上. 用 RPMI 1640-10% 小牛血清-双抗, 5% CO₂ 培养.

* 国家自然科学基金资助项目 (30070816).

** 通讯联系人.

Tel: 021-65641215, E-mail: nzhu@fudan.edu.cn

收稿日期: 2003-09-04, 接受日期: 2003-10-28

1.2 试剂

RPMI 1640 为 Gibco 公司产品, 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), Trizol 总 RNA 抽提试剂 (Gibco/Brl 公司), PCR-select cDNA subtraction kit (CLONTECH 公司), Oligotex™ mRNA 分离试剂盒 (QIAGEN 公司), 载体 pGEMT (Promega 公司), RNADetector™ 试剂盒 (Catalog # 54-30-02) (KPL 公司, USA), 蛋白 Sequential reagent3、DTT、碘乙酰胺及固相 pH 梯度干胶条 (IPG strip pH3 ~ 10L, 17 cm)、AmpholytePH3 ~ 10 均为 Bio-Rad 公司产品, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素 (urea)、硫脲、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS 均为华舜生物工程公司产品; 低分子量标准蛋白质购自上海华美生物工程公司; 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、无水乙酸钠为国产分析纯, 所有溶液均用 MilliQ 水配制。

1.3 mRNA 分离纯化和抑制性消减杂交

取 RPMI 1640 及 5% CO_2 和双抗条件下培养 3 天的 Acc-2 和 Acc-M 细胞, 0.125% 胰酶消化。按 Trizol 说明书抽提总 RNA, 按 Oligotex™ 说明书分离 mRNA。抑制性消减杂交全部操作按照 CLONTECH 公司操作手册 PT-1117 进行。

1.4 差异显示片段的克隆及同源性比较

将差异显示获得的 DNA 片段电泳后割胶纯化, 并克隆到 pGEM-T 载体中, X-gal-IPTG-Amp 平板上挑选重组子, 随机挑选 97 个克隆, 用 ABI PRISM 377 测序仪 DNA Sanger 双脱氧核酸测序法测序, 排除载体序列和巢式 PCR 引物序列后, 获得的序列在 NCBI 的 BlastN 中进行同源性分析。

1.5 RNA 斑点杂交及 RT-PCR 分析

1.5.1 Klenow 酶随机引物法标记探针: 用 T7 和 SP6 通用引物从重组子质粒上扩增插入片段, 常规割胶回收扩增片段, 电泳鉴定, 在 dNTP 中掺入一定量的 Biotin-dUTP, 用随机九聚体作引物进行标记, 模板 95℃ 热变性 5 min, 冰上骤冷, 按如下操作加入标记底物: 10 × Klenow 缓冲液 1.25 μl , dATP、dCTP、dGTP 混合物 ($3 \times 0.4 \text{ mmol/L}$) 各 1.2 μl , dTTP (0.2 mmol/L) 1.2 μl , dUTP-Biotin (0.2 mmol/L) 1.2 μl , Klenow 酶 ($4 \text{ U}/\mu\text{l}$), 0.25 μl ; 37℃ 孵育 15 h。

1.5.2 RNA 斑点杂交实验: 取等量 AccM 和 Acc2 细胞抽提总 RNA, 电泳后检测 RNA 浓度, NC 膜用 MilliQ 水润湿, 点样器经 2 mmol/L 的 DTT 溶液浸泡过夜, 每孔 2 μl RNA 溶液点样, 负压抽滤, 待溶液吸收完全, 80℃ 干烤 2 h, 用含有 100 mg/L

Salmon Sperm DNA 的甲酰胺杂交液 42℃ 预杂交 4 h, 含有 250 mg/L 浓度探针的甲酰胺杂交液 42℃ 杂交 16 ~ 18 h, 按照 KPL 公司碱性磷酸酶标记抗生物素抗体方法显色至颜色深浅合适为止。

1.5.3 RT-PCR 分析: 对抑制性消减杂交中获得的两个新基因序列进一步利用 RT-PCR 进行验证。AccM 和 Acc2 细胞总 RNA 各取 1 μg 作范本, Oligo dT 作引物进行反转录, 再利用基因特异性引物 PCR 扩增 C9 和 C12 基因。扩增 C9 基因引物为: C9 F 5' ACTGAGATACCTACAGCGTG 3', C9 R 5' AGCGGTATCAGCTCACTCAA 3', 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 150 s, 30 个循环, 72℃ 5 min, 预期扩增产物为 296 bp。扩增 C12 基因的引物为: C12F 5' ACGGCAGTTGTCAGATGTT 3', C12R 5' CTTCTTCTACACTGCGT-ACACTG 3', 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 45 s, 72℃ 150 s, 30 个循环, 72℃ 5 min, 预计扩增产物为 325 bp。同时以 G3PDH 为内参对照。

1.6 双向电泳比较蛋白质表达差异

1.6.1 固相 pH 梯度双向凝胶电泳:

a. 双向电泳。AccM 及 Acc2 细胞生长状况良好时, 胰酶消化收集, PBS 洗涤 ($4 \times 10 \text{ min}$), 细胞计数, 取等量细胞, 每管加入 850 μl 细胞全蛋白质裂解提取液 (8 mol/L 尿素 - 4% CHAPS - 40 mmol/L Tris - 65 mmol/L DTT), 反复吹打, 至裂解液澄清, 枪头吹打时无堵塞、粘附感, 16 000 r/min 4℃ 离心 60 min, Bradford 法测定蛋白质浓度, 分装上清保存于 -80℃。取 300 μg 细胞总蛋白提取物与 150 μl 水化液 (8 mol/L 尿素 - 4% CHAPS - 65 mmol/L DTT-ampholyte (pH3 ~ 10) 5 μl + 痕量溴酚蓝) 充分混合上样, 按照 Bio-rad 操作手册, 修改程序如下: 被动水化 12 h, 500 V 1 h, 8 000 V 4 h, 聚焦时间为 45 000 V/h。等电聚焦结束后, 将胶条移至灌制好的 0.75 mm 10% 分离胶上端, 用 1% 琼脂糖封闭。10 mA 每胶条电泳 30 min, 35 mA 每胶条, 至溴酚蓝到达凝胶底部结束电泳。

b. 银染。50% 乙醇-10% 乙酸固定液将凝胶固定过夜, 浸泡 (75 ml 乙醇-17 g 醋酸钠-1.25 ml 25% 戊二醛-0.5 g 硫代硫酸钠, 定容至 250 ml) 30 min, MilliQ 水漂洗 3 次, 每次 5 min, 银染 (0.25 g 硝酸银, 定容至 250 ml) 20 min, 用 25 g/L Na_2CO_3 -0.01% 甲醛显色至蛋白质点数量和染色达到所需程度为止, 用 5% 乙酸终止, 蒸馏水漂洗 3 次 4℃ 保存。

1.6.2 凝胶图像分析: 银染显色的凝胶通过 Gel Doc 2000 凝胶成像系统获取图像, PDQuest2D 分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等.

1.6.3 差异蛋白质的肽质量指纹分析: 加大总蛋白质上样量, 选取仅在 AccM 或仅在 Acc2 中的蛋白质点, 做好标记, 用过火灭菌的手术刀片沿凝胶边缘切下银染蛋白质点, 置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 送交上海基康公司作质谱分析.

2 结 果

2.1 差异表达基因克隆及同源性比较

本实验分别以 Acc-M 为测试子, Acc-2 为驱动

子和 Acc-2 为测试子, Acc-M 为驱动子进行了平行实验. 以 Acc-2 为驱动子获得一个差异表达基因序列库, 克隆并转化后挑选部分克隆测序, 获得 28 个呈差异表达的基因 (表 1), 以 Acc-M 为测试子时获得 6 个相对于 Acc-2 高表达的基因 (表 2). 34 个呈差异表达的基因中, 32 个为已知基因片段, 其中 G 蛋白和铁蛋白 I 重链基因有部分核苷酸序列突变, 已被 GenBank 收录 (登录号分别为 AF522026 和 AF522027). 两个新发现的基因序列与 GenBank 已登录的基因序列比较, 同源性均低于 80%, 已登录 GenBank (登录号分别为 AF522024 和 AF522025).

Table 1 Genes highly expressed in Acc2 by mRNA SSH

Clones	Genetic homology and/or name	GenBank Accession	Function
C1	Cysteine-rich angiogenic-inducer protein	BC016952	Angiogenic-inducer
C2	Chromosome 7 clone RP11-52501	AC021218	Retinocytoma associated
C3	ACC metastasis-associated G protein	AF522027 #	Cell signaling
C4	ACC metastasis-associated heavy polypeptide I	AF522026 #	Metabolism
C5	Jumping translocation breakpoint	BC019277	DNA replication
C6	Eukaryotic translauiion elongation 1α	BC012819	Protein synthesis
C7	Folate receptor	BC002947	Metabolism
C8	Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	AK001313	Protein synthesis
C9	ACC metastasis-associated RNH	AF522024 *	ACC metastasis-associated
C10	Ribosomal protein L7a (RPL7A)	NM_ 000972	Protein synthesis
C11	Homo sapiens ribosomal protein S21	NM_ 001024	Protein synthesis
C12	ACC metastasis-associated suspected protein	AF522025 *	ACC metastasis-associated
2-5	Arsenite-resistant protein ASR2	AF248955	Unknown
2-8	Homo sapiens cDNA clone FB7D3	U83515	Unknown EST
2-11	Fetal kidney subtracted cDNA library	BI740295	Unknown EST
2-19	Na, K-ATPase beta subunit (ATP1B)	M25160	Metabolism
2-49	KIAA0081 mRNA	D42039	Unknown
2-51	Similar to LOC168246	BC027989	Unknown
2-61	Chaperonin containing TCP1, subunit 5	BC035499	Chaperonin
2-97	Voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3)	NM_ 005662	Transmembrane signaling
2-108	Lipopolysaccharide specific response-67 protein	AF147724	Cell signaling
2-119	Sorting nexin 7 (SNX7), Transcript variant 2	NM_ 152238	Unknown
2-126	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23)	BC021983	Transportation, Gene regulation
2-131	Ferritin, Heavy polypeptide 1	BC015946	Transportation
2-134	AGENCOURT_ 7790792 NIH_ MGC_ 72	BQ439975	Unknown EST
2-139	Olfactomedin related ER localized protein	NM_ 014279	Cell signaling
2-145	Heat shock 90 ku protein 1	NM_ 007355	Protection
2-148	HSU83515 Homo sapiens cDNA clone FB7D3	U83515	Unknown EST

The symbol * represents the novel sequence and the # represents mutated sequences submitted by our laboratory.

Table 2 Genes highly expressed in AccM by mRNA SSH

Clones	Genetic homology and/or name	GenBank Accession	Function
m-11	Ribosomal protein L35 (RPL35)	NM_ 007209	Protein synthesis
m-24	Hypothetical protein FLJ22611 Arginine methyltransferase-interacting protein	NM_ 032226	Chaperones/Intracellular Trafficking/etc
m-27	Haplotype L3b mitochondrion (NADH dehydrogenase subunit 4)	AF381991	Metabolism
m-4	Similar to activated leucocyte cell adhesion molecule	BC029639	Adhesion molecular
m-12	XAGE-1b gene for cancer-associated protein	AJ400997	Sarcoma metastasis-associated
m-28	Small GTPase rac1b	AJ132694	Protein synthesis

2.2 RNA 斑点杂交和 RT-PCR 分析结果

2.2.1 RNA 斑点杂交验证：根据以上测序和同源性比较的结果，对获得的差异表达序列以 G3PDH 为对照用 RNA 斑点杂交进行半定量验证，排除假阳性。RNA 斑点杂交验证结果与 SSH 结果基本一致，排除部分假阳性结果如 ACC metastasis-

associated G protein, Homo sapiens ribosomal protein S21 等。在呈差异表达的基因中，有 6 个基因在 AccM 细胞中高表达，26 个在 Acc2 中高表达（表 3 和图 1），其中，12 个基因表达量检测相差 2 倍以上。

Table 3 Validation of expression level of gene fragments obtained by SSH

Clone	Gene name	Expression level in Acc2	Expression level in AccM
C1	Cysteine-rich angiogenic-inducer protein	++	+
C2	Chromosome 7 clone P11-52501	+++	++
C3	ACC etastasis-associated G protein	++	++
C4	ACC metastasis-associated heavy polypeptide I	+	+/-
C5	Jumping translocation breakpoint	++	+
C6	Eukaryotic translation elongation1α	+/-	-
C7	Folate receptor	+++	++
C8	Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	+	+/-
C9	ACC metastasis-associated RNH	+++	+/-
C10	Ribosomal protein L7a (RPL7A)	++	+
C11	Homo sapiens ribosomal protein S21	++	++
C12	ACC metastasis-associated suspected protein	+	+/-
2-5	Arsenite-resistant protein ASR2	++	+
2-8	Homo sapiens cDNA clone FB7D3	++	-
2-11	Fetal kidney subtracted cDNA library	++	+/-
2-19	Na, K-ATPase beta subunit (ATP1B)	++	+
2-49	KIAA0081 mRNA	+++	+/-
2-51	Similar to LOC168246	+	-
2-61	Chaperonin containing TCP1, submit 5	++	-
2-97	Voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3)	+++	++

Continued

Clone	Gene name	Expression level in Acc2	Expression level in AccM
2-108	Lipopolysaccharide specific response-67 protein	+	+/-
2-119	Sorting nexin 7 (SNX7), Transcript variant 2	+++	+
2-126	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23)	++	+
2-131	Ferritin, Heavy polypeptide1	+++	++
2-134	AGENCOURT_7790792 NIH_MGC_72	+/-	+/-
2-139	Olfactomedin related ER localized protein	++	+/-
2-145	Heat shock 90 ku protein 1	+	-
2-148	HSU83515 Homo sapiens cDNA clone FB7D3	-	-
M-11	Ribosomal protein L35 (RPL35)	+	+++
M-24	Hypothetical protein Arginine methyltransferase-interacting protein	+/-	++
M-27	Haplotype L3b mitochondrion (NADH dehydrogenase subunit4)	-	+++
M-4	Similar to activated leucocyte cell adhesion molecule	+/-	+
M-12	XAGE-1b gene for cancer-associated protein	+/-	+++
M-28	Small GTPase rac1b	+/-	++

“-”: undetectable; “+/-”: barely detectable; “+”: low expression; “++”: moderate expression; “+++”: high expression; “++++”: very high expression.

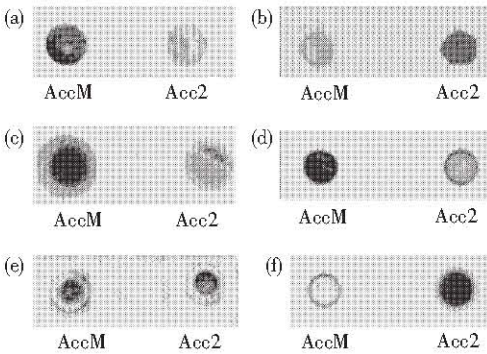


Fig. 1 Representative results of RNA dot blot

2 μg RNA was loaded onto each dot of NC membrane, SSH cloned cDNA fragment was synthesized with Biotin - labelled dNTP and used as probe. (a) M-12; (b) 2-119; (c) M-4; (d) M-11; (e) G3PDH; (f) 2-139.

2.2.2 RT-PCR 验证: 对高低转移细胞系中的 C9 和 C12 经反转录 PCR 分析, 结果均可见有明显扩增条带, 同时以 G3PDH 作内参对照, 显示 C9 和 C12 基因在 AccM 细胞中相比于 Acc2 细胞呈低表达, 根据图象扫描定量分析, 在 AccM 和 Acc2 细胞中 2 个基因表达量相差达 5 倍以上 (图 2)。

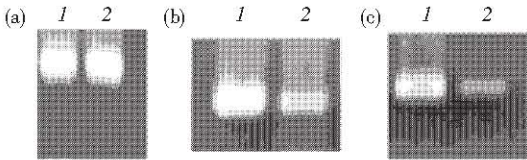


Fig. 2 The RT-PCR results of C9, C12 and G3PDH (a) G3PDH; (b) C12; (c) C9. 1: Acc2; 2: AccM.

2.3 双向电泳

AccM、Acc2 细胞全蛋白经多次相同条件的双向电泳检测, 获得了分辨率高、重复性好的结果, 总蛋白质分布模式类似, 利用银染检测到在 pH 4 ~ 8、30 ~ 60 ku 范围蛋白质斑点分布最多, pDQuest (Bio-rad) 软件分析图象检测到 AccM 图谱的平均蛋白质点数为 (978 ± 38) 个, Acc2 的平均蛋白质点数为 (996 ± 27) 个, 不同胶间蛋白质点的位置偏差在 IEF 方向为 (2.85 ± 0.48) mm, 在 SDS-PAGE 方向为 (2.69 ± 0.37) mm. 其中 AccM 中有 355 个与 Acc2 蛋白点未被匹配, Acc2 中相比 AccM 有 222 个未被匹配 (图 3), 选取部分差异显著的蛋白质斑点 (图 4) 进一步作质谱分析。

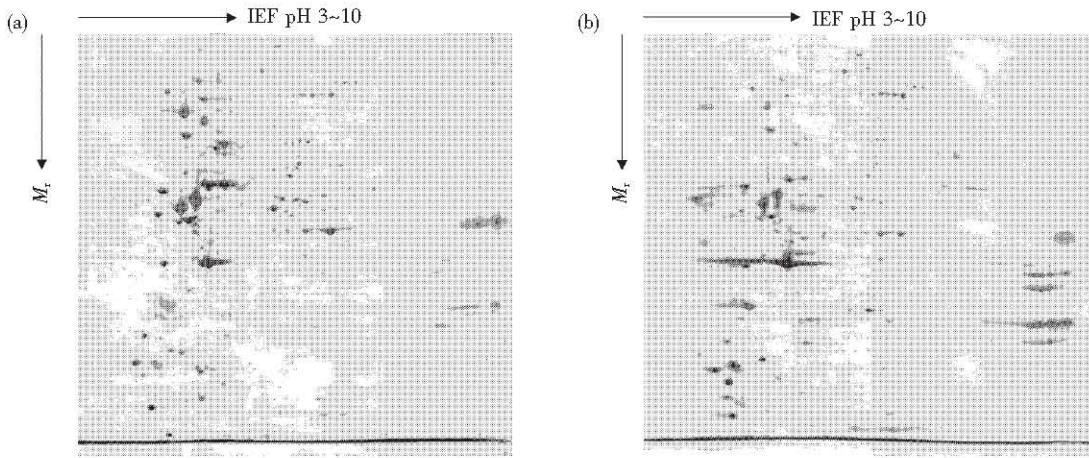


Fig. 3 Two dimensional electrophoretic map of human adenoma cystic carcinoma of high metastatic cell AccM and low metastatic cell Acc2 proteome
(a) AccM; (b) Acc2.

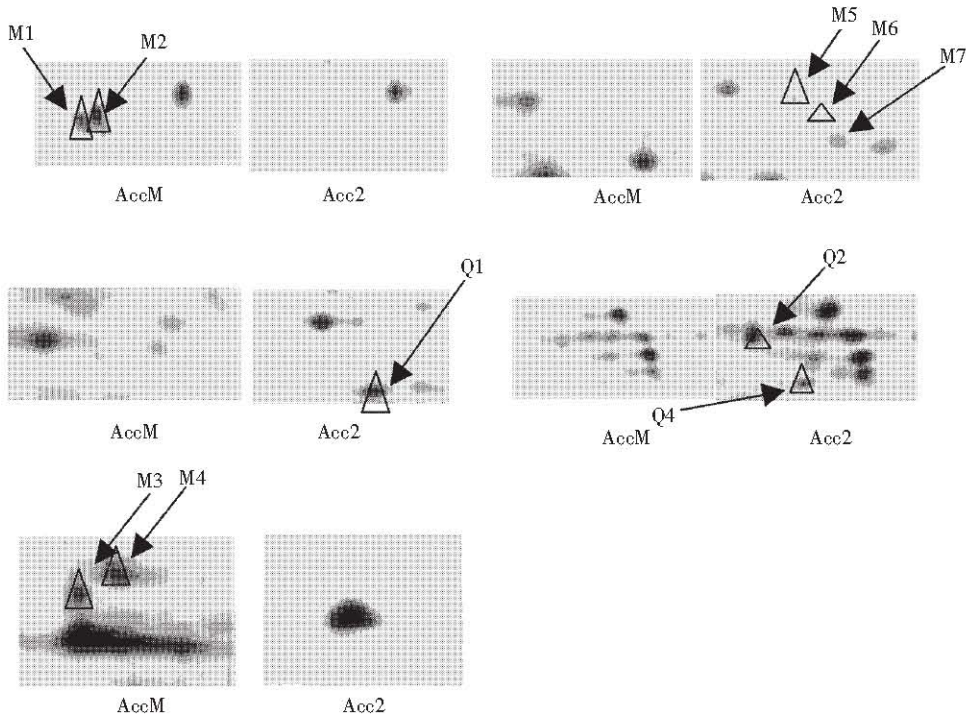


Fig. 4 Parts of differential protein spots obtained by comparing 2-DE maps of AccM and Acc2 proteome
“Δ” stands for differential protein spots existing in one 2-DE map but not in the another 2-DE map.

2.4 质谱分析

质谱分析采用 PE Biosystem Voyager System 6192 分析仪, 用线性模式、正离子谱测定, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 18.85 kV, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 并用基质峰和胰蛋白酶自动降解离子峰作为内标校正质谱峰, 获得肽质量指纹图谱. 所切割的 10 个斑点

均得到质谱结果, 通过 Expasy (<http://www.Expasy.org>) 的 Peptident 软件进行查询. 查询条件: 肽质量指纹图谱中的肽片段质量控制在 900 ~ 4 000, 表观 pI 的误差范围为 $\pm 0.5pH$, 表观 M_r 误差范围为 $\pm 20\%$, 物种来源选择人类, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl cysteine). 被选择片段峰信号在基线宽度一倍以上, 结果见表 4 和图 5.

Table 4 Differential protein spots identified preliminarily by peptide mass fingerprinting in AccM and Acc2 proteomics 2-DE maps

Spot ID	SWISS-PROT ID	Peptides matched	Intensity matched/%	Protein name (GenBank No.)
M1	28862	4/15	15%	AS1 (stratifin, checkpoint, regulator of cell cycle)
M2	27498377	4/10	19%	Similar to hypothetical protein
M3	19072647	5/15	40%	TPMsk1 tropomyosin isoforms
M4	15823666	4/15	46%	ALS2CR19 a putative GTPase regulator
M5	12060826	4/15	26%	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-20
M6	2149582	4/15	18%	Symplekin (tight junction plaque component)
M7	17933774	5/15	43%	MY0876G05 protein
Q1	10441386	5/15	37%	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2
Q2	30148246	4/15	30%	Similar to RIKEN cDNA 9030227G01 gene
Q4	20988646	4/13	52%	B7 protein

“M” represents protein only can be seen in AccM, “Q” represents protein higher expressed in Acc2 cell lines than AccM.

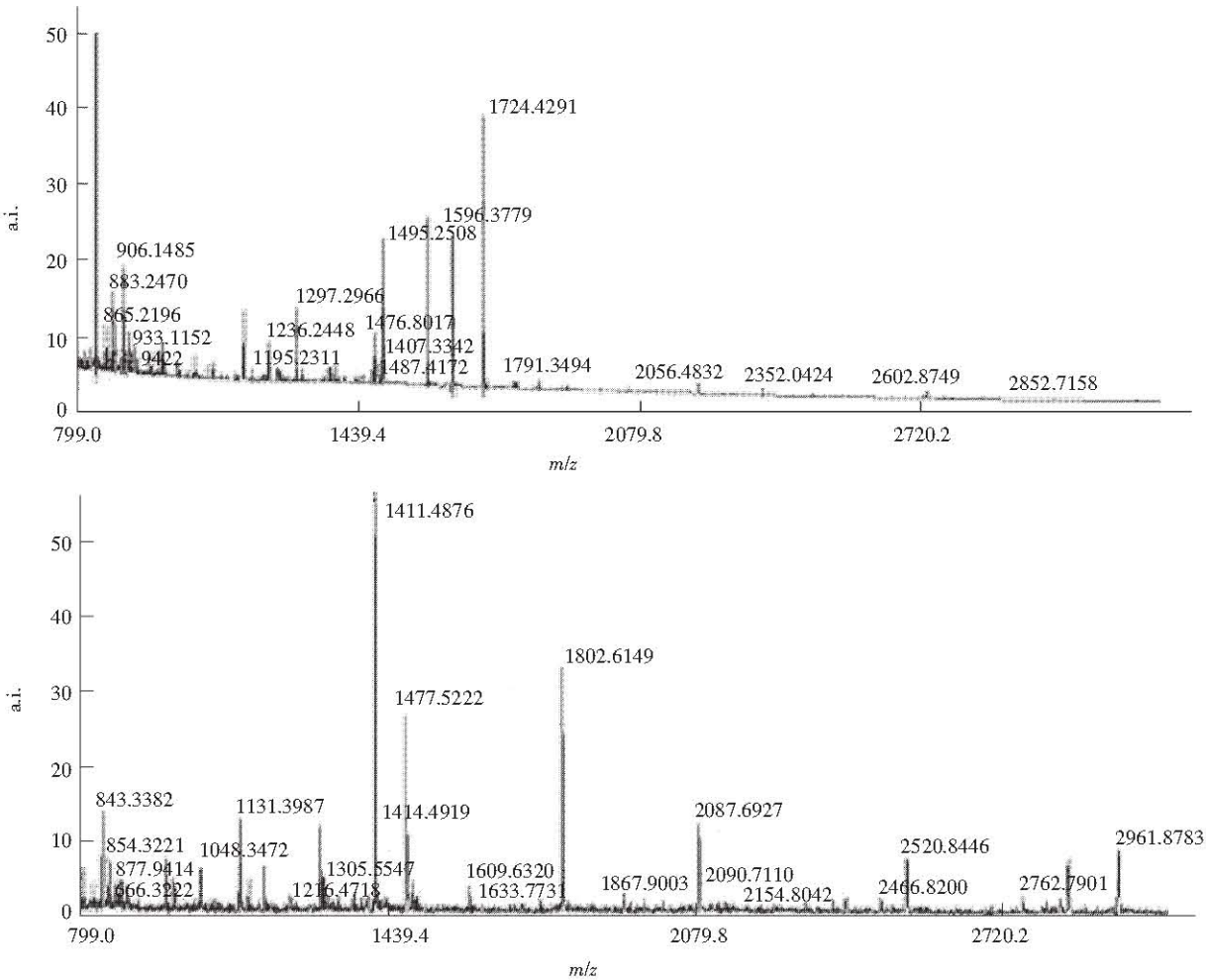


Fig. 5 Peptide mass figure-printing of protein spot Q1 in Acc2 proteomic 2-DE map and of protein spot M2 in AccM proteomic 2-DE map

3 讨 论

涎腺腺样囊性癌高转移细胞系 Acc-M 是由从其低转移母细胞株 Acc-2 分离而来, 是比较研究肿瘤转移相关基因和蛋白质的适合的细胞模型材料. 本研究希望通过这两个细胞系 mRNA 及蛋白质表达差异的比较, 获得在肿瘤转移这一特殊生物学背景下与转移表型可能相关的基因和蛋白质, 更深入研究涎腺腺样囊性癌转移的机制.

本实验结果表明, 在两个细胞系中差异表达的基因涉及肿瘤发生, 细胞新陈代谢, 细胞与细胞、细胞与胞外基质间粘附等多方面功能. 其中, 多种基因曾有研究表明与肿瘤转移相关. 白细胞粘附因子 (M4, Similar to activated leucocyte cell adhesion molecule) 表达产物参与细胞间粘附, 在转移性黑色素瘤细胞中高表达^[4]. Cyr61 能与 c-fos、c-myc 等原癌基因协同作用对细胞生长分化和血管生成诱导进行调控^[5]. Lester 等^[6]曾在高转移的 B16 小鼠黑色素瘤细胞中发现, 该细胞高度表达对百日咳毒素 (Pertussis toxin, PTX) 敏感的 Gi2 (G 蛋白一种), 用 PTX 处理后, 可使 Gi2 发生 ADP 核糖基化, 明显降低瘤细胞的侵袭能力, 而低转移 B16 细胞则不表达 Gi2, PTX 处理也不改变瘤细胞的原有特性. 铁蛋白对于肿瘤的转移有抑制作用, 其低表达与肿瘤转移特性的获得在 Jacqueline 的转移差异比较研究中也得到了证实^[7]. 酸性核糖体磷酸蛋白 (human acidic ribosomal phosphoprotein)、多种核糖体蛋白以及代谢相关蛋白铁蛋白、叶酸受体的表达在两个细胞系中表达的差异更多地与肿瘤细胞较高的代谢需要有关^[8].

在表达的差异基因序列中, 有 2 个序列经 GenBank 检索, 同源性均低于 80%. 这两个序列分别命名为血管生成抑制因子同源的囊性癌转移相关基因 (ACC metastasis-associated RNH, 登录号为 AF522024) 和囊性癌转移相关蛋白 (ACC metastasis-associated suspected protein, 登录号为 AF522025)^[9], 目前我们正在对这些基因的结构和功能作进一步深入研究, 以探明这些基因在该肿瘤转移中的确切意义.

我们利用双向电泳及质谱所获得的差异蛋白质中, Symplekin 是一种与细胞间通讯相关的紧密连接斑的组成^[10]. ALS2CR19 蛋白在多种组织及细胞中均有表达, 编码的蛋白质包含多个与 Ran GEF 和 Rho GEF 同源结构域的蛋白质^[11], 这一基因的结构

域与 RCC1、RIN1 等蛋白质具有同源性, 可能担负着蛋白质分拣、转运和 (或) Ran 相关 GTPases 调节子/激活子的功能. 原肌球蛋白 (Tropomyosin, TM) 异构体表达量的增加或降低与细胞转化、高血压等多种疾病相关. 其表达量下调被认为是细胞转化中的重要事件, 是细胞恶性转化的一个新的抑制因素^[12], 在本实验中, TM 在高转移细胞中表达, 在低转移细胞中未检测到表达, 与高转移囊性癌细胞血行转移的运动、游走是相一致的^[13].

在获得的差异表达蛋白质中, B7 蛋白与肿瘤发生、分化和转移的相关性已有了深入的研究, 是目前肿瘤治疗疫苗中的主要靶向分子. B7 分子作为 T 细胞激活的共刺激分子和胞外粘附分子, 能够引发细胞介导的抗肿瘤免疫反应, 在乳腺癌、胃癌等多种肿瘤的转移灶组织中表达量明显低于原发灶组织, 分化越差的原发灶瘤明显高于分化较好的原发灶瘤. 说明在肿瘤侵袭和转移过程中, 不完全的 B7 分子共刺激使肿瘤可以逃避宿主免疫系统的破坏^[14]. 将 B7-1 粘附分子转染 K1735-M2 黑色素瘤细胞系、黑色素瘤 B16、T 淋巴瘤 EL4、肥大细胞瘤 P815、乳腺癌 MA891 后免疫小鼠, 结果发现转移率显著下降^[15].

从本课题研究的结果来看, 细胞表型和功能相关的基因表达谱研究仅停留在 RNA 或蛋白质水平上, 都是不够全面的, 同时进行 mRNA 和蛋白质表达水平变化研究具有明显优势. 但由于多种因素的影响, mRNA 水平上的变化并不能完全反映蛋白质水平上的变化. 从方法技术的自身特点来看, mRNA 的差异能对微量表达的基因进行分析, 而限于方法学检测灵敏度的限制, 蛋白质水平上最低检出值也只能达到 10 ng (银染灵敏度). 因此, 用不同方法对表达谱分析具有明显的互补性. 在本研究中, 将 mRNA 水平和蛋白质水平差异检测的方法综合运用, 得到了用单一方法难以获得、具有明显互补性的结果. 我们用抑制性消减杂交获得了 XAGE-1、白细胞粘附因子、Cyr61 等多种差异基因, 而在双向电泳与质谱联用的蛋白质水平上, 获得了与细胞周期调控有关的蛋白 Stratifin, 细胞间紧密连接斑相关蛋白 Symplekin, 以及与细胞的胞外粘附和抗原性有关的 B7 分子. 两者结合起来才能较全面完整地反映转移差异性细胞的基因和蛋白质全局表达谱的变化, 这为进一步探索肿瘤转移的分子机理以及肿瘤控制和基因治疗提供了重要的基础资料.

参 考 文 献

- 1 方伟岗. 21 世纪肿瘤侵袭转移研究面临的机遇和挑战. 中华医学杂志, 2001, **81** (4): 193 ~ 194
- 2 Fang W G. Chin Medical J, 2001, **81** (4): 193 ~ 194
- 3 Guan X, Qiu W, He R, *et al.* Selection of adenoid cystic carcinoma cell clone highly metastatic to the lung: an experimental study. Inter J Oral Maxi Surg, 1997, **26**: 116 ~ 119
- 4 VonStein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for transcribed differentially expressed genes. Nucleic Acids Res, 1997, **25** (13): 2598 ~ 2602
- 5 Gen W G, van Kempen L C, Gijzen E G, *et al.* MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule. American J Pathology 1998, **152** (3): 805 ~ 813
- 6 Grotendorst G R. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblasts. Cytokine Growth Factor Reviews, 1997, **8** (3): 171 ~ 179
- 7 Lester B R, McCarthy J B, Sun Z Q, *et al.* G-protein involvement in matrix-mediated motility and invasion of high and low experimental metastatic B16 melanoma clones. Cancer Res, 1989, **49** (21): 5940 ~ 5948
- 8 Zhang L, Zhou W, Velculescu V E, *et al.* Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science, 1997, **276** (23): 1268 ~ 1272
- 9 Jacqueline A M V, Reindert J A, van Moorselaar. Differential expression of ferritin Heavy chain in a rat transitional cell carcinoma progression model. Biochim Biophys Acta, 1997, (1360): 39 ~ 44
- 10 Zhu N S, Yang J L, Wang Y M, *et al.* Study of the difference of high and low metastasis cell line's gene expression map and metastasis-related genes of adenoid cystic carcinoma. Experimental and Molecular Medicine, 2003, **35** (4): 243 ~ 248
- 11 Hirsch M, Noske W. The tight junction: structure and function. Micon, 1993, **24**: 325 ~ 352
- 12 Adano S, Hand C K, Osuga H, *et al.* A gene coding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. Nature Genetics, 2001, **29**: 166 ~ 173
- 13 Bharadwaj S, Prasad G L. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. Cancer Lett, 2002, **183** (2): 205 ~ 213
- 14 Jiang D, Ying W, Lu Y, *et al.* Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. Proteomics, 2003, **3** (5): 724 ~ 737
- 15 Koyama S, Maruyama T, Adachi S, *et al.* Expression of costimulatory molecules, B7-1 and B7-2 on human gastric carcinoma. J Cancer Res Clin Onc, 1998, **124** (7): 383 ~ 388
- 16 Saiki I. Cell adhesion molecule and cancer metastasis. Jpn J Pharmacol, 1997, **75** (3): 215 ~ 242

Comparison of mRNA and Protein Expression Profiles Between Adenoid Cystic Carcinoma High and Low Metastatic Cell Lines*

YANG Jie-Lin¹⁾, ZHU Nai-Shuo^{1)**}, WANG Ying¹⁾, GUAN Xiao-Feng²⁾, ZHENG Zhao-Xin¹⁾

⁽¹⁾ Laboratory of Molecular Immunology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

⁽²⁾ Department of Oral Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract The molecular genesis of a tumor is a multi-step and complex process in which many factors are involved such as oncogenes, tumor suppressor genes and MHC- I etc. Metastasis is the essential character causing mortality from such tumors and little is currently known about mechanisms underlying cancer metastasis. As a step toward understanding the complex differences between high metastatic and low metastatic cells, metastasis-associated gene expression patterns and proteomes were separated and identified by suppression subtraction hybridization and comparative proteomics analysis between high metastatic cell AccM and low metastatic cell Acc2. Although extensive similarity was noted between the expression profiles of the two cell lines, twenty-eight genes highly expressed were obtained in tester, low metastatic cells, compared with their low expression in driver, high metastatic cells while six genes in reverse hybridization. These function of genes are related to cell proliferation, differentiation or cell metabolism while several novel EST sequences which function are unknown. Two novel genes were ACC metastasis-associated RNH ACC metastasis-associated suspected protein. Meanwhile, ten proteins were randomly selected which are expressed different qualitatively or quantitatively and identified by mass fingerprinting (MALDI-TOF-MS). These proteins are stratifin, symplekin, B7, TPMsk1 tropomyosin isoforms, serologically defined breast cancer antigen NY-BR-20 etc. Intriguingly, most identified candidate proteins have been shown to be somehow associated with distinct aspects of tumor metastasis such as cell communication protein, motility, adhesion, invasion and tumor immunity associated protein, etc. These results suggest that attaining the ability to metastasize is related to the changed expression of these genes or protein. These data provide insight into the extent of expression differences underlying metastasis-related genes that may prove useful as diagnostic or prognostic markers.

Key words adenoid cystic carcinoma (Acc), suppression subtractive hybridization (SSH), two dimensional electrophoresis, cancer metastasis, MALDI-TOF-MS

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070816).

** Corresponding author. Tel: 86-21-65641215, E-mail: nzhu@fudan.edu.cn

Received: September 4, 2003 Accepted: October 28, 2003