

PDIA1 和 EF1D 在左侧和右侧结肠癌差异表达的实验研究 *

曾 亮¹ 裴海平² 朱 红³ 吴胜其⁴ 刘 利³ 黄林生²

(1 湖南省肿瘤医院病理科 湖南 长沙 410013 2 中南大学湘雅医院普外科 湖南 长沙 410008 ;

3 中南大学湘雅医院肿瘤科 湖南 长沙 410008 ;4 湖南省肿瘤医院中心实验室 湖南 长沙 410013)

摘要 目的 :初步确定蛋白质二硫化异构酶 A1 和延伸因子 1-delta 为左侧和右侧结肠癌中差异表达蛋白 ,为左侧和右侧结肠癌在肿瘤生物学方面的差异提供分子遗传学依据。方法 :收集人左侧结肠癌(LSCC)和右侧结肠癌(RSCC)组织标本,进行二维凝胶电泳、质谱分析和生物信息学分离和鉴定左右侧结肠癌中差异表达蛋白质 ,进一步应用 RT-PCR、Western Blot 和免疫组织化学技术检测蛋白质二硫化异构酶 A1 和延伸因子 1-delta 在左侧和右侧结肠癌中的表达状态。结果 :筛选并成功鉴定出左侧和右侧结肠癌中 16 种差异表达蛋白质,与右侧结肠癌比较,10 种蛋白在左侧结肠癌表达上调,6 种蛋白在左侧结肠癌表达下调,其中蛋白质二硫化异构酶 A1 在左侧结肠癌中表达上调,延伸因子 1-delta 在左侧结肠癌中表达下调,并通过 RT-PCR、Western Blot 和免疫组化方法证实了在左侧和右侧结肠癌中该两种蛋白表达的差异,与蛋白质组学结果一致。结论 :左侧结肠癌和右侧结肠癌的蛋白质组存在差异,其中蛋白质二硫化异构酶 A1 和延伸因子 1-delta 在 mRNA 和蛋白水平均存在差异,这些可能是左侧和右侧结肠癌生物学行为差异的原因。

关键词 左侧结肠癌;右侧结肠癌;蛋白质二硫化异构酶;延伸因子;蛋白质组学

中图分类号 R735.34 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)17-3227-06

Experimental Study on PDIA1 and eEF1D differential Expression between Left Sided Colon Carcinoma and Right Sided Colon Carcinoma*

ZENG Liang¹, PEI Hai-ping², ZHU Hong³, WU Sheng-q⁴, LIU L³, HUANG Lin-sheng³

(1 Department of Pathology, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013 P.R.China;

2 Key laboratory, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013 P.R.China;

3 Department of Surgery, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013 P.R.China)

ABSTRACT Objective: To provide molecular genetic basis for oncobiological difference between Left sided colon cancer and Right sided colon cancer by detecting the expression of Left sided colon cancer and Right sided colon cancer including Protein disulfide-isomeraseA1 and Elongation factor 1. **Methods:** Tissue samples including Left sided colon cancer and Right sided colon cancer were collected. Protein was separated by using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and the images of the gels were acquired by the scanner. The peptide mass fingerprintings (PMF) was acquired by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the proteins were identified by data searching with bioinformatics. The expression were assayed by RT-PCR, Western Blot, Immunohistochemical method. **Results:** 16 protein spots were identified. Compared with right sided colon cancer, 10 proteins up-regulated including PDIA1 and 6 proteins down-regulated including EEF-1D in Left sided colon cancer. The expression of PDI-A1 and EEF-1D between right sided colon cancer and left sided colon cancer were confirmed by RT-PCR, Western Blot and Immunohistochemical method. **Conclusions:** There were differentially expressed proteins between Left sided colon cancer and Right sided colon cancer, especially for PDIA1 and EEF-1D, which were cause by oncobiological difference between Left sided colon cancer and Right sided colon cancer.

Key Words: Left sided colon cancer; Right sided colon cancer; Protein disulfide-isomerase; Elongation factor ; Proteomics

Chinese Library Classification(CLC): R735.34 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)17-3227-06

前言

在解剖学上结肠分为左侧结肠 (Left sided colon ,LSC)和右侧结肠(Right sided colon ,RSC),左侧结肠包括脾曲、降结肠、乙状结肠,右侧结肠包括回盲部、升结肠、横结肠。临床观察发现左半结肠癌(Left sided colon carcinoma ,LSCC)和右侧结

肠癌 (Right sided colon carcinoma ,RSCC) 在临床上表现出差异,如右侧结肠癌以全身症状、贫血、梗阻或腹部包块等为主要表现,多见于老年人及女性^[1,2],低分化癌、粘液腺癌及印戒细胞癌也多见于右侧结肠^[3-5]。左侧结肠癌以肠梗阻、便秘、腹泻便血等症状为主。研究证实左、右侧结肠癌之间在细胞和分子水平上也存在差异^[6-12],其中涉及染色体、DNA 含量、癌基因和抑癌

* 基金项目 湖南省卫生厅科研基金课题(C2009-010)

作者简介 :曾亮 男,博士,副主任医师,研究方向:恶性肿瘤的生物标志物,E-mail:zlx03@yahoo.com

(收稿日期:2011-03-23 接受日期:2011-04-15)

基因、DNA 错配修复基因等方面的差别,如 c-myc 和 Ras 是在左侧大肠癌表达显著高于右侧大肠癌,而 Ras 基因在左侧大肠癌突变率高于右侧大肠癌。另外左侧大肠癌抑癌基因 APC、DCC、p53 的等位缺失率均明显高于右侧。P53、P14、P16 在左右半结肠中的突变状态也有不同。右侧结肠癌的微卫星不稳定检出率显著高于左半结肠癌和直肠癌的检出率,提示左、右侧结肠癌的发生在基因水平上是不同的,既右侧结肠癌的发生主要是通过复制错误途径引起肿瘤相关基因的突变而引发肿瘤,而左侧结肠癌的发生主要通过杂合丢失途径引起癌基因和抑癌基因的突变而导致肿瘤的。这说明 LSCC 和 RSCC 可能在致癌途径和生物学行为方面存在较大差异,这些差异是否存在有分子遗传学基础仍存在许多不清楚的问题,因此本研究拟通过应用蛋白质组学方法初步筛选 LSCC 和 RSCC 中的差异表达蛋白并对其中的差异表达蛋白蛋白质二硫化异构酶和延伸因子在 LSCC 和 RSCC 差异表达情况进行较为深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 以脾区为界,将结肠分为左侧结肠和右侧结肠。取人 RSCC、LSCC 组织各 7 例,均取自中南大学湘雅医院普外科手术切除标本,为散发性结肠癌,术前行放疗及化疗,术后病理确诊为中分化腺癌, AJCC 分期为 I 期~IV 期,切缘病理检查为阴性。患者年龄分布在 38~78 岁,中位年龄 59 岁。100 例用于免疫组化检测的结肠癌病例包括 76 例男性和 24 例女性,年龄区间为 31-78 岁,平均年龄 53.2 ± 12.2 岁, AJCC 分期从 I 到 IV 期,从湖南省肿瘤医院普外科随机选取,病例选择采用随机数字表法。所选病例均进行病理学检测,组织标本经过 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋制片,病理确诊为中分化腺癌,入组病例的病理诊断由两位高级病理医师验证。病例根据手术部位及随机表分组法分为两组左侧结肠组和右侧结肠组,患者的年龄、性别、临床分期(包括肿块大小,肠壁浸润深度)在两组间没有显著性差异($P > 0.05$)。

1.1.2 主要试剂 二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品;硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、双向凝胶电泳标准蛋白质、甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲-酮-胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸(TFA)、基质--氰基-4-羟基肉桂酸均为 Sigma 公司产品;固相 Ph 梯度干胶条(IPGstrip Ph4-7L,24CM)、IPG 缓冲液(pH4-7)、两性电解质(pharmalyte, PH4-7)、覆盖液、低分子量标准蛋白质、蛋白银染试剂盒、尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS 均为 AB 公司产品;DNA 酶、RNA 酶均为 Promega 公司产品;硫代硫酸钠、碳酸氢铵、氯化钙为国产分析纯;乙腈为国产色谱纯。Trizol Reagent(Invitrogen Cat.NO.15596-026) Reverta Ace- α -TM First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO #FSK-100),Taq DNA Polymerase (recombinant, Fermentas #EP0402),dNTP Mix (2mM each Fermentas #R0241),DNA Marker DL2,000(TaKaRa D501A)。NC 膜(PIERCE,Catalog#88018),滤纸(Whatman,3MM CHR)。eEF1D 的 Genebank 登录号为 NM_001195203,PDIA1 的 Genebank 登录号为 NM_001141142,内对照 GAPDH 基因的 Genebank 登录号为 NM_001115114。Homo-EEF1D-F5-GCTG-

GCGTGAGGCCAAAGCAAA -3,Homo-EEF1D-R5-CATTC-ATGGCTGGCCCCCTCGG -3,片段长度为 173bp。Human PDI-A1-F 5-CTCGACAAAGATGGGGTTGT-3,Human PDIA1-R 5-TGCTCAGTTTGCCGTCATAG-3,片段长度为 229bp。内对照 GAPDH 基因引物的设计:Homo-GAPDH-F: 5'-ACCACAGTC-CATGCCATCAC-3',Homo-GAPDH-R 5'-TCCACCACCCT-GTTGCTGTA-3',片段长度为 450bp。Anti-PDIA1 antibody (ab85564, Abcam, 美国),Rabbit polyclonal to EEF1D (ab13962, abcam, 美国);二抗及 DAB 显色试剂盒均为 Santa Cruz 公司产品。

1.1.3 主要仪器 IPGphor 等电聚焦仪、ImageMaster 2 D Elite 4.01 凝胶图像分析软件、Imagescanner 扫描仪、Labscan 扫描控制和分析前处理软件、ProTEAN 垂直电泳槽、PowerPAC3000 电泳仪(Bio-Rad 公司产品),MALDI-TOF-MS 质谱仪(ABI 公司),Elx800 自动酶标仪(Bio-Tek Instruments, Inc)。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的处理及组织总蛋白质的制备 取手术后新鲜的结肠癌组织,无菌状态下将组织分别用生理盐水反复清洗,以去除血液及其他异物,并尽可能剪去多余的组织。处理后的样品立即置于 -80℃ 保存。组织裂解提取总蛋白(采用 Total protein Extraction Kit, ProMab, Cat. No. SJ-200501)。用剪刀剪取约 0.5mg 肿瘤组织,置于组织匀浆器中,加入 1ml 总蛋白提取液,匀浆 20min 直到组织充分破碎,然后冰上放置 20min 后,再匀浆 20min,将匀浆液吸出放到 1.5ml 离心管中。超声 3 次,每次 3s。9000rpm,离心 10min,取适量上清置于新的 1.5ml 离心管中,-20℃ 冻存。蛋白质浓度测定采用 Amersham 专门针对蛋白质组学的蛋白质抽提优化的 2-D Quant Kit 试剂盒。

1.2.2 固相 pH 梯度双向凝胶电泳及质谱分析 固相 pH 梯度双向凝胶电泳主要按 IPGphor 等电聚焦系统指南和 Gorg 等方法进行。IPG 干胶条水化和聚焦在 20℃ 自动进行,上样量为 400ug,根据所测蛋白浓度计算上样体积。总电压时间积为 8000Vh,其中于 30V 低电压水化 13h,然后经过 100V1h,500V1h,1000V1h,5000V1h,最后稳定在 8000V8.5h 下进行等电聚焦。等电聚焦结束后,将胶条进行两步平衡,然后将平衡后的胶条移至 0.75mm 厚的 12.5%均匀分离胶的上端,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳所得到的 2-DE 胶按蛋白质银染试剂盒的操作手册进行银染。然后进行凝胶图像分析,凝胶通过 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan (扫描软件进行扫描获取图像,利用 PDQuest-V8.0.1 分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配、校正、建立平均凝胶等分析。进一步制备质谱样品对差异表达的点进行质谱分析。切下的蛋白质点置于 EP 管中,超纯水冲洗 3 次,除去杂质,加入脱色工作液待蛋白质颜色消失至凝胶无色透明,弃去超纯水,加入 100%乙腈脱水,冷冻抽干之胶块完全脱水,加酶解工作液 37℃ 酶解过夜。取上清置于 0.5mlEP 管中,加萃取工作液,冷冻抽干浓缩之 2~5ul。后均匀点样 0.5ul 于不锈钢点样板上,空气中自然风干待分析。最后对制备好的样本进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析,将制备好的点样板置于 MALDI-TOF-MS 质谱仪中,采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压为 20KV,反射电压比为 1.12,N2 激光波长 337nm,脉

冲宽度为 3ns,离子延迟提取 100ns,真空度 4×10^{-7} Torr,质谱信号单次扫描累加 50 次,质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正,获得了肽质量指纹图,每个蛋白样品测定 3 次质谱峰。Mascot 软件检索 Uniprot 数据库鉴定蛋白质。

1.2.3 免疫印迹 (Western Blot) 首先进行 SDS-PAGE 电泳,将组织裂解液样品(上样量 100ug)与 $5 \times$ 上样缓冲液混匀,在 100°C 加热 3min 以使蛋白质变性加样。工作电压为 200V,待溴酚蓝迁移到分离胶底部 0.5cm 处停止。进行免疫印迹操作,首先进行电转膜,将凝胶 - 膜插入转移槽,连接好转移电极恒流 300mA 转移 70min。电转完毕后,将电转膜置于 5%的脱脂奶粉中封闭 37°C 2h。免疫检测一抗与靶蛋白作用,一抗(均为 1:2000)分别稀释于 5%脱脂牛奶中,与印迹膜室温温育 1 h; TBS/0.1% Tween20 (TBS-T)洗膜 $3 \times 15\text{min}$,辣根过氧化物酶标记二抗 1:10000 分别稀释于 5%脱脂牛奶中,与印迹膜室温温育 1 h; TBS/0.1% Tween20 (TBS-T)洗膜 $3 \times 15\text{min}$,保鲜膜上配置 ECL 检测试剂的底物,使与印迹膜作用 3~5min,暗盒中曝光 3min,取出 X 光片显影、定影。将看家蛋白 GAPDH 表达情况作为内对照校正(Load Control)。阳性条带以 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测其 IOD(integrated optical density)累积光密度参考值。

1.2.4 组织总 RNA 提取与 RT-PCR 首先提取组织总 RNA,每样本加入 1ml Trizol 试剂消化,匀浆样品在室温静置 10min 后加入 0.2 倍体积的氯仿,震荡 15 秒后在 4°C 下 $12,000 \times g$ 离心 15min,将水样层转移至干净的试管,加入 0.5 倍体积的异丙醇,混匀后 -20°C 下静置 10-15min,在 4°C 下 $12,000 \times g$ 离心 10min 移去上层悬液,将 RNA 沉淀用 1ml 75%乙醇洗涤,在震荡器上混匀后 4°C 下 $7,500 \times g$ 离心 5min,弃去上清液。适度干燥 RNA 沉淀后,加入适量无 RNase 的水,使 RNA 完全溶解。2000rpm 离心 20sec。反转录 ($20\mu\text{L}$ 体系) total RNA (按 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 计) $1\mu\text{L}$ Oligo (dT)20 ($10\text{pmol}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$ RNase Free H_2O $10\mu\text{L}$ $5 \times$ RT Buffer $4\mu\text{L}$ dNTP mixture (10mM) $2\mu\text{L}$ RNase Inhibitor ($10\text{u}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$ ReverTra Ace $1\mu\text{L}$ 。RT 反应程序: 42°C 20min 99°C 5min 4°C 5min 瞬间离心。PCR ($20\mu\text{L}$ 体系): Template (反转录产物) $1.0\mu\text{L}$ Primer sense ($100\mu\text{mol}/\text{L}$) $0.5\mu\text{L}$ Primer anti-sense ($100\mu\text{mol}/\text{L}$) $0.5\mu\text{L}$ dNTP Mixture (2mM) $2\mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\text{mmol}/\text{L}$) $1.5\mu\text{L}$ $10 \times$ PCR Buffer $2\mu\text{L}$ Taq DNA Polymerase (500U) $0.5\mu\text{L}$ PCR H_2O $12.0\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: 95°C 5min 94°C 30s 55°C 30s 72°C 30s 72°C 5min 4°C 保存 40 循环。产物用琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,加样量为 $10\mu\text{L}$,电压 120V,电泳完毕后在溴化乙锭(EB)中染色,在紫外灯下观察结果并照相。RT-PCR 结果进行半定量法处理,即将实验组条带的 IOD 值分别与其看家基因条带(内对照)的 IOD 值比较得到校正值,然后得出左侧大肠癌组和右侧大肠癌组校正值均数,进行统计学分析。

1.2.5 免疫组织化学方法 石蜡切片脱蜡后首先进行柠檬酸微波抗原修复,依次滴加正常封闭血清及一抗(PDIA1 和 EEf-1D 抗体,工作浓度 1:200) 4°C 冰箱中过夜, PBS 洗涤后按 SP 试剂盒(福建迈新生物有限公司产品)说明书完成。结果判断: HSP27 阳性信号主要定位于细胞浆,呈棕黄色或棕褐色颗粒。具体判断标准:根据阳性细胞在全部癌细胞中所占比例以及阳

性细胞染色强度判定 A 按显色细胞数记分,阳性细胞数 $<1/3$ 为 1 分,阳性细胞数 $1/3 \sim 2/3$ 为 2 分,阳性细胞数 $\geq 2/3$ 为 3 分。B 按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。积分数 $=A \times B$ 。 $A \times B=0$ 判断为(-), $A \times B=1 \sim 2$ 判断为(+), $A \times B=3 \sim 4$ 判断为(++), $A \times B=6 \sim 9$ 判断为(+++) 其中 - 为阴性, + - +++ 为阳性。

1.2.6 统计学方法 主要统计方法包括计数资料配对样本的卡方检验 (χ^2) 和计量资料的 t 检验。使用的统计学工具为 SPSS13.0 统计软件包。

2 结果

2.1 人左侧结肠癌和右侧结肠癌组织的二维电泳、质谱分析和生物信息学分析

对 7 例左侧结肠癌(LSCC)和 7 例右侧结肠癌(RSCC)组织进行了双向凝胶电泳分析,在相同条件下重复 3 次,蛋白质斑点清晰。用 PDQuest8.0.1 软件分析两组凝胶图谱, RSCC 组蛋白点有 890 ± 64 个, RSCC 癌旁组织蛋白质点有 865 ± 77 个, LSCC 组蛋白点有 881 ± 48 个, LSCC 癌旁组织蛋白质点有 798 ± 72 个,见图 1,两组间差异表达蛋白质点数为 55 个。从凝胶匹配的蛋白质点中选择表达差异的点 55 个进行 MALDI-TOF-MS 分析,测定蛋白质点的肽质量指纹图(PMF)。利用 PeptIdent 查询软件搜索 Uniprot 以及 Trembl 数据库,对搜索结果按匹配片段数、覆盖率等进行综合考虑判定所搜结果。鉴定有意义的蛋白点 16 个,其中与右侧大肠癌比较,左侧结肠癌中表达增加的蛋白有 10 个,包括蛋白质二硫化异构酶 A1(Protein disulfide-isomerase A1, PDIA1), 78 kDa 葡萄糖调节蛋白,热休克蛋白 60,抑制素,含硫氧还蛋白域的蛋白 5, T- 复合蛋白 1 ϵ 亚单位,应急蛋白 70,异柠檬酸脱氢酶,蛋白质二硫化异构酶 A3,巨噬细胞加帽蛋白;左侧结肠癌表达降低的蛋白有 6 个,包括 ATP 合成酶 β 亚单位,延伸因子 1-delta(Elongation factor 1-delta, EEf-1D),热休克蛋白 β 1,载脂蛋白 A- ,转甲状腺素蛋白,热休克蛋白 β 6。在本研究中最关注的是左侧结肠癌中表达上调的 PDIA1 和下调 EEf1-delta,见图 2。这两种蛋白在左侧和右侧癌旁组织中表达无显著差别,其中 PDIA1 在左侧结肠癌中表达高于左侧癌旁组织, EEf1-delta 在右侧结肠癌中表达高于右侧癌旁组织。

2.2 RT-PCR 检测左侧和右侧结肠癌中 EEfD1 和 PDIA1 mRNA 的表达

在左侧结肠癌和右侧结肠癌差异表达蛋白中选取左侧结肠癌中表达降低的蛋白 EEf1D,左侧结肠癌中表达升高的蛋白 PDIA1,应用 RT-PCR 技术检测对应基因的 mRNA 表达情况,结果显示, EEf1D mRNA 水平在左侧结肠组中的表达显著低于右侧结肠组,有显著性差异 ($t=-4.552$ $P=0.001$)。PDIA1 mRNA 水平在左侧结肠组中的表达显著高于右侧结肠组,具有显著性差异 ($t=5.222$, $P=0.000$) 见图 2。

2.3 Western Blot 检测左右侧结肠癌中 eEF-1D 和 PDIA1 的表达

在左侧结肠癌和右侧结肠癌差异表达蛋白中选取左侧结肠癌中表达降低的蛋白 eEF-1D,左侧结肠癌中表达升高的蛋白 PDIA1,应用 Western Blot 技术检测对应基因的蛋白质表达

情况,结果显示,EEF1D 蛋白在左侧结肠癌组中的表达显著低于右侧结肠癌组,有显著性差异 ($t=3.281, P=0.017$)。PDIA1 蛋白在左侧结肠组(1-7)中的表达显著高于右侧结肠组(8-14),有显著性差异($t=3.436, P=0.005$) ,见图 3。

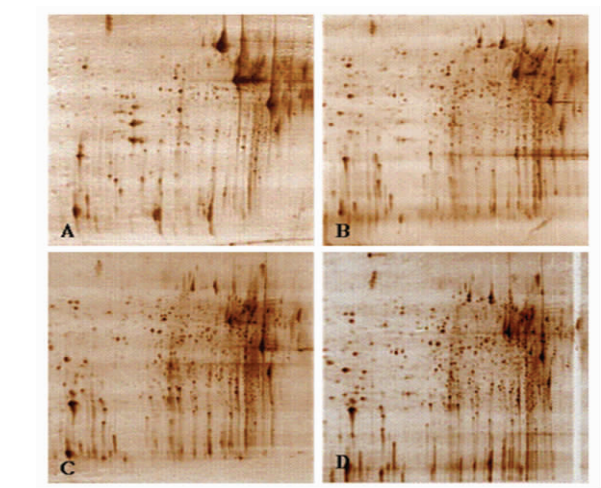


图 1 左半结肠癌(LC)和右半结肠癌(RC)的二维电泳凝胶图谱:A:左侧结肠癌 ;B:左侧结肠癌癌旁 ;C:右侧结肠癌 ;D:右侧结肠癌癌旁
Fig 1 Representative Images of Two-dimensional gel for LSCC tissues and RSCC tissues:A: LSCC,B para-LSCC; C: RSCC; D: para-RSCC

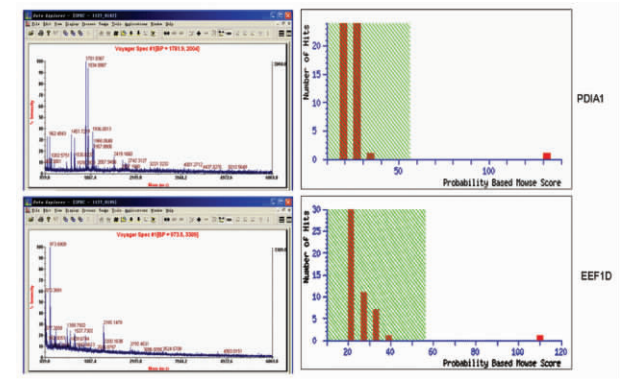


图 2 左半结肠癌(LC)和右半结肠癌(RC)的二维电泳凝胶图谱
Fig 2 Representative Images of Two-dimensional gel for LSCC tissues and RSCC tissues

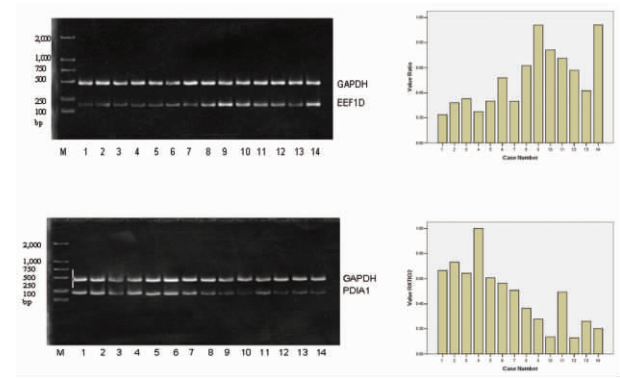


图 3 左侧和右侧结肠癌中 EEF1D 和 PDIA1 mRNA 表达水平比较:1-7 左侧结肠癌 ;8-14 右侧结肠癌
Fig3 EEF1D and PDIA1 mRNA expression between left-sided colon carcinoma and right-sided colon carcinoma:1-7 left-sided colon carcinoma ;8-14 right-sided colon carcinoma

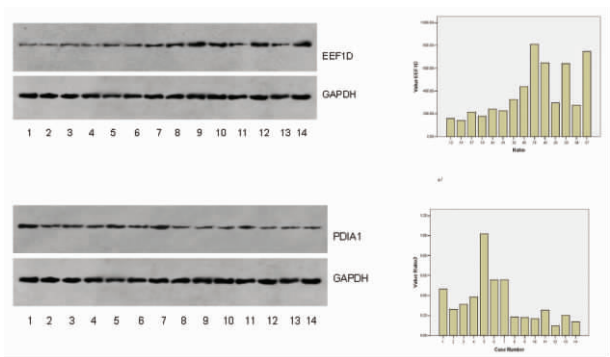


图 3 左侧和右侧结肠癌中 EEF1D 和 PDIA1 蛋白表达水平比较:1-7 左侧结肠癌 ;8-14 右侧结肠癌
Fig3 EEF1D and PDIA1 Protein expression between left-sided colon carcinoma and right-sided colon carcinoma by Western Blot method:1-7 left-sided colon carcinoma ;8-14 right-sided colon carcinoma

2.4 免疫组织化学方法检测左侧结肠癌和右侧结肠癌中 eEF-1D 和 PDI-A1 的表达

在左侧结肠癌和右侧结肠癌差异表达蛋白中选取左侧结肠癌中表达降低的蛋白 eEF-1D,左侧结肠癌中表达升高的蛋白PDI-A1,应用免疫组化方法检测蛋白质表达情况,免疫组化结果显示,EEF-1D 蛋白主要定位于细胞浆,其在左侧结肠癌组中的表达率和表达强度均显著低于右侧结肠癌组。PDIA1 蛋白主要定位于细胞浆,其在左侧结肠癌组中的表达率和表达强度显著高于右侧结肠癌组,均具有显著性差异,见图 4 及表 1。

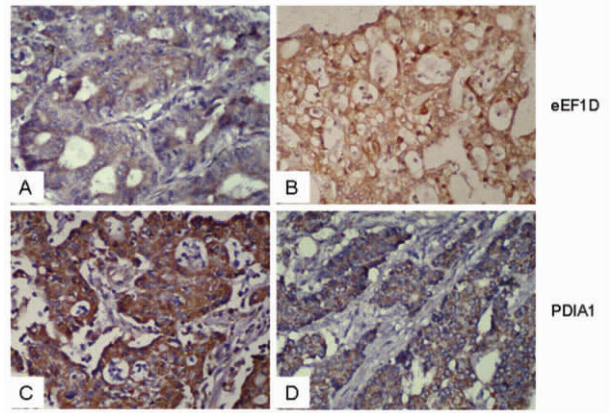


图 4 免疫组织化学方法检测左侧和右侧结肠癌中 EEF1D 和 PDIA1 的表达(200x)A,C:左侧结肠癌 ;B,D:右侧结肠癌
Fig4 EEF1D and PDIA1 expression in between LSCC and RSCC by immunohistochemical methodA,C:LSCC ;B,D:RSCC

3 讨论

蛋白质组学技术目前差异表达蛋白研究最有效和可靠的方法之一。在本研究中通过建立左侧和右侧结肠癌的蛋白质组表达谱,发现了左侧结肠癌和右侧结肠癌的差异表达蛋白,并成功鉴定出 16 种有意义的差异表达蛋白质,其中 10 种蛋白质在左侧结肠癌表达上调,6 种蛋白质在右侧结肠癌表达上调,按功能分为基本代谢相关的酶类、分子伴侣、物质转运相关蛋

白、转录和翻译相关蛋白、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白等。其中 PDI-A1 和 eEF-1D 均是在左侧和右侧结肠癌中表达差异显著的蛋白,经过多种方法验证,确定左侧结肠癌中 PDI-A1 表达高于右侧结肠癌,左侧结肠癌中 eEF-1D 表达低于右侧结肠癌。本研究蛋白质组学结果提供了关于 PDI-A1 和 eEF-1D 表达的三方面信息,第一方面是 PDI-A1 和 eEF-1D 在左侧结肠癌和右侧结肠癌中的表达均高于相应癌旁组织,这些结果说明了这两种蛋白与左侧和右侧结肠癌的发生均相关,有报道发现 eEF-1D 参与 mRNA 翻译的延伸并且与细胞恶性转化有关。在食道癌的研究中发现和癌旁组织比较, eEF-1D 在癌中呈过表达,并且与淋巴结转移、临床晚期和预后差有关。在 NIH3T3 细胞的转化研究中发现翻译 EF-1D 的过表达具有致癌作用,而阻

断 mRNA 表达可逆转肿瘤转化。TEF-1 delta 过表达也认为是钼反应性原癌基因。但在人上皮细胞 HaCaT 中 v-Ha-ras 过表达可诱导 EF-1D mRNA 表达显著降低,此外, CdC12 诱导的 eEf-1D 与人支气管上皮细胞的恶性转化呈正相关^[13-18]。而我们的结果也显示 eEF-1D 与结肠癌的发生有关。内质网 PDI 作为氧化还原反应中的伴侣分子,主要参加氧化还原反应,特别是与生物毒素有关的氧化还原过程。如霍乱毒素是 PDI 催化的还原反应的底物,在霍乱毒素的作用中可通过结合和释放 A 链来实现向胞浆中的转移。溴苯的肝毒性研究中发现 PDIA1 是溴苯毒性的反应性蛋白之一^[19-21]。尽管本研究结果显示 PDIA1 可能参与结肠癌的发生,但该因子在结肠癌发生中是作为始动因素起作用还是反应性因素有待进一步研究。

表 1 免疫组织化学方法检测左侧和右侧结肠癌中 eEF1D 和 PDIA1 的表达
Table 1 eEF1D and PDIA1 expression in between LSCC and RSCC by immunohistochemical method

组别 Group	例数 No	EEF1D		PDIA1	
		阳性数 positivity Number	阳性率% positivity rate	阳性数 positivity Number	阳性率% positivity rate
左侧结肠癌组 LSCC	50	24	48	38	76
右侧结肠癌组 RSCC	50	34	68	28	56
x ²		4.150		4.456	
P		0.043		0.035	

本研究结果显示 PDI-A1 和 eEF-1D 在左侧和右侧癌旁组织中的表达没有差异。说明在正常状态下这两种因子有一定表达,可能参与一些生理反应过程,并且它们的作用可能没有显著性区别。

本研究还发现这两种蛋白在左侧结肠癌和右侧结肠癌中存在表达的差异。对 eEF-1D 的表达分别进行应用 RT-PCR, Western Blot 和免疫组化方法进行验证,发现其在左侧大肠癌中 mRNA 水平和蛋白水平低于右侧大肠癌,这与蛋白质组结果一致,也说明转录调控机制与 eEF-1D 在左右侧大肠癌的差异表达有关。有报道在食道癌中 EF-1 高表达与淋巴结转移、肿瘤晚期和预后差有关。在原发性肝癌的研究中也发现分化越差 eEFs-1 表达越强。eEF-1D 表达差异是否也影响左侧和右侧结肠癌临床特点的差异有待进一步研究。在左侧大肠癌表达上调的蛋白中有蛋白质二硫化异构酶 A(protein disulfide isomerase A, PDIA)的两个亚型 PDIA1 和 PDIA3,其中对 PDIA1 的表达分别进行进一步 RT-PCR, Western Blot 和免疫组化检测,发现其在左侧大肠癌中 mRNA 水平和蛋白水平高于右侧大肠癌,这与蛋白质组结果一致,也提示转录调控机制参与 PDIA1 在左右侧大肠癌的差异表达。有报道在结直肠癌细胞株 Caco-2 的蛋白质组学研究发现 11 种与分化相关的蛋白,包括蛋白二硫化异构酶^[22]。化疗药物脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, DAC)作用的胰腺癌细胞的研究发现中 PDIA3 表达分别上调^[23],说明 PDIA3 与化疗反应性有关。

本研究结果推测在左侧和右侧结肠癌发生和演进过程中,可能在 PDI-A1 和 eEF-1D 转录和翻译过程中存在的不同机制导致这两种因子在左侧和右侧结肠癌中的差异表达,这种表达的差异可能是始动因素,也可能是受其它致癌因子的调节所致,但可以推断它们在左侧和右侧结肠癌差异表达这一特性是具有重要意义的,它是左侧和右侧结肠癌肿瘤生物学行为差异的一个重要环节,也可作为左侧和右侧结肠癌不同临床特征如转移和预后预测的重要候选标志物,有待体外细胞生物学的进一步求证。

致谢 感谢中南大学湘雅医院卫生部蛋白质组学重点实验室提供技术平台和支持。

参考文献(References)

[1] Distler P, Holt PR. Are right- and left-sided colon neoplasms distinct tumors?[J]. Digestive diseases (Basel, Switzerland), 1997,15:302-311
[2] Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer?[J]. International Journal of cancer, 2002,101:403-408
[3] Nozoe T, Anai H, Nasu S, et al. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum [J]. Journal of surgical oncology, 2000,75:103-107
[4] Kawabata Y, Tomita N, Monden T, et al. Molecular characteristics of poorly differentiated adenocarcinoma and signet-ring-cell carcinoma of colorectum[J]. International Journal of cancer, 1999, 84:33-38
[5] Nawa T, Kato J, Kawamoto H, et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology

- and histology [J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2008, 23:418-423
- [6] Paluszkiwicz P, Berbe? H, Paw?owska WB, et al. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours[J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(4):252-9
- [7] Burri N, Shaw P, Bouzourene H, et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer. Lab Invest[J]. 2001, 81(2):217-29
- [8] Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, et al. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age[J]. Cancer, 2003, 97(6):1421-7
- [9] Notarnicola M, Altomare DF, Calvani M, et al . Fatty acid synthase hyperactivation in human colorectal cancer: relationship with tumor side and sex[J]. Oncology, 2006, 71(5-6):327-32
- [10] Papagiorgis P, Oikonomakis I, Karapanagiotou I, et al. The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal cancer [J]. J Buon, 2006 , 11(3):317-21
- [11] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA, 2008, 299(4):425-36
- [12] Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, et al. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma [J]. Br J Cancer, 2004, 91(2):282-6
- [13] Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, et al. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2000, 20(4):2489-94
- [14] Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, et al. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma [J]. Br J Cancer, 2004 , 91(2):282-6
- [15] Lei YX, Chen JK, Wu ZL. Blocking the translation elongation factor-1 delta with its antisense mRNA results in a significant reversal of its oncogenic potential [J]. Teratog Carcinog Mutagen, 2002, 22(5): 377-83
- [16] Joseph P, Lei YX, Whong WZ, et al. Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8):6131-6
- [17] Kolettas E, Lymboura M, Khazaie K, et al. Modulation of elongation factor-1 delta (EF-1 delta) expression by oncogenes in human epithelial cells[J]. Anticancer Res, 1998, 18(1A):385-92
- [18] Lei YX, Wang M, Wei L, et al. Alternative expression and sequence of human elongation factor-1 delta during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(2):151-7
- [19] Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, et al. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin [J]. Cell, 2001, 104(6):937-48
- [20] Orlandi PA. Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of the A subunit of cholera toxin in a human intestinal cell line [J]. J Biol Chem, 1997, 272(7):4591-9
- [21] Koen YM, Hanzlik RP. Identification of seven proteins in the endoplasmic reticulum as targets for reactive metabolites of bromobenzene [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15(5):699-706
- [22] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, et al. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2 [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1650(1-2):73-91
- [23] Cecconi D, Astner H, Donadelli M, et al. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. Electrophoresis, 2003, 24(24):4291-303