

肝内胆管癌细胞系ICC-9810与肝细胞系L02蛋白质组学的差异分析

刘博, 肖雪媛, 董家鸿, 何大澄, 黄志强

刘博, 董家鸿, 黄志强, 中国人民解放军总医院肝胆外科 全军肝胆外科研究所 北京市 100853
肖雪媛, 何大澄, 北京师范大学生物系细胞所 中国高校蛋白质组学研究院 北京市 100875
通讯作者: 刘博, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院肝胆外科. jnliubo@sohu.com
电话: 010-66935569
收稿日期: 2007-12-08 修回日期: 2008-01-30

Differential expression of proteins in intrahepatic cholangiocarcinoma cell line ICC-9810 and liver cell line L02

Bo Liu, Xue-Yuan Xiao, Jia-Hong Dong, Da-Cheng He, Zhi-Qiang Huang

Bo Liu, Jia-Hong Dong, Zhi-Qiang Huang, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA; Hepatobiliary Surgery Institute of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Xue-Yuan Xiao, Da-Cheng He, Institute of Cell Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
Correspondence to: Dr. Bo Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. jnliubo@sohu.com
Received: 2007-12-08 Revised: 2008-01-30

Abstract

AIM: To analyze the differential expression of proteins in intrahepatic cholangio-carcinoma cell line ICC-9810 and normal liver cell line L02, and to screen the potential molecular markers for the diagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma.

METHODS: Surface enhanced laser desorption / ionization (SELDI) mass spectrometry with ProteinChip IMAC3 and WCX2 was performed to compare the expressed proteins in intrahepatic cholangiocarcinoma cell line ICC-9810 and normal liver cell line L02. Protein profiling was examined with a PBSII-C ProteinChip reader and proteome data were analyzed using Proteinchip Software 3.0.2.

RESULTS: ProteinChip IMAC3 and WCX2 captured all the 376 protein peaks in ICC-9810 and L02 cell lines. Among the identified 27 dif-

ferential proteins in ICC-9810 cell line, 9 showed a higher expression and 18 a lower expression as compared with L02 cell line. Six proteins, namely 3767, 7999, 10 555, 12 163, 22 066 and 26 794 Da, were conjointly detected by IMAC3 and WCX2 ProteinChip.

CONCLUSION: Expression of proteins is different in intrahepatic cholangiocarcinoma cells and normal liver cells. These differentially expressed proteins can be used as candidate biomarkers of intrahepatic cholangiocarcinoma and provide insights into the pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma.

Key Words: Intrahepatic cholangiocarcinoma; Hepatocyte; Differential protein; Surface enhanced laser desorption / ionization

Liu B, Xiao XY, Dong JH, He DC, Huang ZQ. Differential expression of proteins in intrahepatic cholangiocarcinoma cell line ICC-9810 and liver cell line L02. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(7): 759-762

摘要

目的: 分析肝内胆管癌细胞系ICC-9810与正常肝细胞系L02的蛋白质表达差异, 筛选肝内胆管癌的潜在分子标志物。

方法: 应用表面增强激光解吸离子化(surface enhanced laser desorption/ionization, SELDI)蛋白质芯片技术检测肝内胆管癌及正常肝细胞系的蛋白质谱。用PBSII-C型蛋白质芯片阅读机读取数据, 采用Proteinchip Software 3.0.2软件分析数据。

结果: IMAC3、WCX2两种蛋白芯片共捕获376个蛋白峰, 发现27个差异蛋白。与正常肝细胞系L02蛋白谱相比, 9个蛋白在肝内胆管癌细胞系ICC-9810中高表达, 18个蛋白在肝内胆管癌细胞系ICC-9810中低表达。其中3767、7999、10 555、12 163、22 066和26 794 Da 6个差异蛋白可被WCX2和IMAC3芯片共同捕获。

结论: 肝内胆管癌与正常肝细胞存在差异蛋

背景资料

肝内胆管癌占肝脏恶性肿瘤的10%-15%。其发病率和病死率有逐年增高的趋势。胆管癌5年生存率为7%, 根治术后5年生存率12.5%。其早期诊断、鉴别诊断和术前定性诊断都相当困难。临床确诊患者多属晚期, 且预后差。CA19-9是胆管癌常用的血清学指标, 80%以上患者CA19-9升高, 但特异性差, 绝大部分患者都是在晚期被诊断而丧失了手术的机会。因此, 寻找新的血清标志分子对于胆管癌的早期诊断、术后复发的监测非常重要。

同行评议者
曹志成, 院士, 香港伊利沙伯医院临床肿瘤部, 肿瘤科研部

研发前沿
蛋白质组学的研究是继基因组学研究之后的又一个具有重大发展前景的科学领域,其在实际应用方面也有极为广阔的前景。

白表达,这些差异蛋白为寻找肝肿瘤标志物,了解肝内胆管癌的发病机制提供了重要线索。

关键词: 肝内胆管癌; 肝细胞; 差异蛋白; 表面增强激光解吸离子化

刘博, 肖雪媛, 董家鸿, 何大澄, 黄志强. 肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 与肝细胞系 L02 蛋白质组学的差异分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(7): 759-762

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/759.asp>

0 引言

肿瘤细胞蛋白质组与正常细胞蛋白质组差异表达的研究是探索肿瘤发生机制、发现肿瘤标志物的有效途径. 肝内胆管癌约占肝癌的10%, 近年来在世界范围内肝内胆管癌发生率逐渐上升^[1-3]. 我们利用蛋白质芯片技术分析了肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 与正常肝细胞系 L02 的蛋白质谱, 对筛选肝内胆管癌的标志蛋白进行了初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料 肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 由中国人民解放军总医院提供, 正常肝细胞系 L02 购自中国科学院上海细胞所. 胰蛋白酶、RPMI 1640 购自 Gibco 公司, 乙氰、三氟乙酸、尿素、蛋白酶抑制剂、Hepes、Tri-HCl、CHAPS 和 OGP 购自 Sigma 公司. IMAC3 蛋白质芯片、WCX2 蛋白质芯片和阴离子交换柱(Hyper QDF)、PBSII-C 型蛋白质芯片阅读机和 Proteinchip Software 3.0.2 分析软件购自 CIPHERGEN Biosystems 公司.

1.2 方法 肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 和肝细胞系 L02 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养. 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化、收集细胞, PBS 洗涤, 加入细胞裂解液(8 mol/L Urea、40 g/L CHAPS、40 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mg/L 的 Leupeptin 和 Aprotinin、0.1 mmol/L PMSF), 作用 15 min, 20 049 g 离心 30 min, 取少量上清用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度, 剩余上清-80℃分装冻存备用. 用 1 mol/L Urea 调节蛋白浓度至 2 g/L. 取 200 μL 滴加到阴离子交换柱柱床上面, 1100 g/min 振荡 20 min. 阴离子交换柱采用梯度 pH 洗脱液(pH9, pH7, pH5, pH4, pH3 和有机溶剂)洗脱, 以获得不同 pH 范围的流出液组分. 每组分别采用 IMAC3 和 WCX2 芯片检测, 每组同时在两个同种芯片上检测, 以避免同一种芯片之间的组间差异. 按照 CIPHERGEN Biosystems

公司蛋白质芯片操作指导进行 IMAC3、WCX2 蛋白芯片实验. 本课题设定有意义峰的信噪比为 3, 差异蛋白定义为蛋白质峰强度相差 1 倍以上. 根据这一标准, PBSII-C 型蛋白质芯片阅读机收集 IMAC3、WCX2 蛋白芯片数据, CIPHERGEN Proteinchip 软件系统自动分析数据. 细胞培养在解放军总医院全军肝胆外科研究所进行, 蛋白质提取及检测在北京师范大学中国高校蛋白质组学研究院完成.

2 结果

分析蛋白质芯片阅读机读取的 IMAC3、WCX2 蛋白芯片数据, IMAC3、WCX2 两种蛋白芯片共捕获 376 个蛋白峰, 与正常肝细胞 L02 蛋白谱相比, 有 27 个蛋白质在肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 中出现明显的变化, 其中分子量为 3639、3767、4422、5800、8716、9115、10 127、10 527 和 26 794 Da 的 9 个蛋白在肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 中高表达, 分子质量 3782、4084、4843、5339、5362、5961、6056、6959、7027、7189、7999、8160、8400、10 555、11 643、12 163、12 207 和 22 066 Da 的 18 个蛋白在肝内胆管癌细胞中低表达. 在上述差异蛋白中有 6 个蛋白可被 WCX2 和 IMAC3 芯片共同捕获, 3767、26 794 Da 蛋白在肝内胆管癌细胞系 ICC-9810 中高表达, 7999、10 555、12 163 和 22 066 Da 蛋白峰只在正常肝细胞系中高表达(图1-2).

3 讨论

胆管癌分肝内胆管癌和肝外胆管癌. 近年来肝内胆管癌发病率和死亡率有逐年增高的趋势. 肝内胆管癌病因不明, 研究显示与胆管结石、胆管炎、胆管囊肿、免疫性肠病、寄生虫感染、HBV 及 HCV 病毒感染、肝硬化及饮酒等有关^[4-9]. 肝内胆管癌早期诊断困难, 临床确诊患者多属晚期, 预后差. 周俭 *et al*^[10] 分析 31 例肝内胆管癌临床资料, 5 年生存率 7%. 寻找敏感性高和特异性强的肝内胆管癌标志物, 力求做出早期诊断, 是提高肝内胆管癌生存率的关键.

蛋白质是基因组的表达产物, 能更直接地反映疾病在分子水平的变化. 国内外多家机构已经开始利用蛋白质组学寻找肿瘤特异蛋白, 并对各种蛋白进行分离鉴定^[11-17]. Srisomsap *et al*^[19] 利用蛋白质组学技术分析了肝内胆管癌细胞系 HuCCA-1、肝细胞癌细胞系 HepG2

相关报道
Yu *et al* 采用双向凝胶电泳技术比较了肝细胞癌细胞系 BEL-7402 和正常肝细胞系 L02 的蛋白质谱变化, 发现肝癌细胞谷光甘肽巯基转移酶蛋白比正常肝细胞高 18 倍, 而脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白只存在于正常肝细胞.

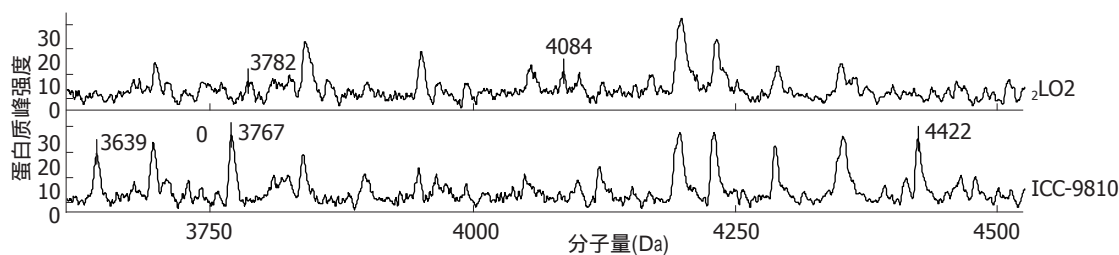


图 1 两细胞系在IMAC3芯片3600–4500 Da区段的蛋白质谱图. 在分子量为3782、4084 Da处, 肝内胆管癌细胞系ICC-9810的蛋白表达量低于肝细胞L02, 在分子量为3639、3767、4422 Da处, 肝内胆管癌细胞系ICC-9810的蛋白表达量高于L02.

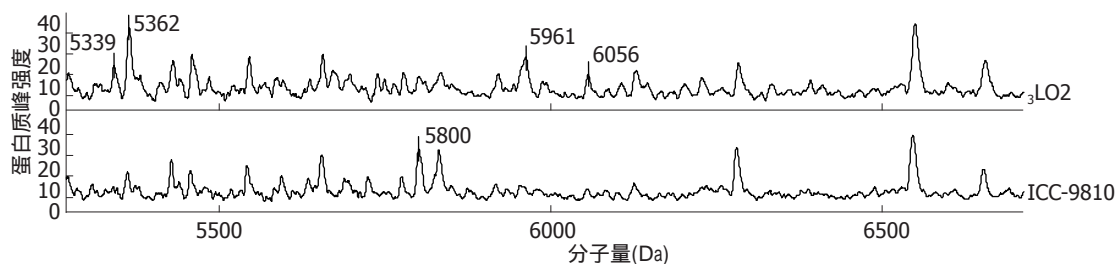


图 2 两细胞系在IMAC3芯片5300–6700 Da区段的蛋白质谱图. 在分子量为5339、5362、5961、6056 Da处, 肝内胆管癌细胞系ICC-9810的蛋白表达量低于肝细胞L02, 在分子量为5800 Da处, 肝内胆管癌细胞系ICC-9810的蛋白表达量高于肝细胞L02.

和 HCC-S102及人乳腺癌细胞系MCF-7的蛋白质表达, 发现43个差异蛋白, 进一步研究表明CK7、CK19 和分子质量为32.9 kDa的三个蛋白质在肝内胆管癌细胞中特异表达, 对肝内胆管癌的诊断和与肝细胞癌的鉴别诊断具有重要意义. 周福平 *et al*^[20]利用显微切割技术研究了组织标本的肝内胆管癌和肝细胞癌蛋白质组, 通过质谱鉴定出28个有意义的蛋白, 20个蛋白仅在肝细胞癌表达或表达明显增高, 8个蛋白仅在肝内胆管癌中表达或者高表达. 免疫组化证实BK125H2.1在肝细胞癌中表达强阳性, 而肝内胆管癌中缺失表达. 分析认为BK125H2.1可能成为鉴别肝细胞癌与肝内胆管癌特异性的分子标记物.

最近研究证实, 肝干细胞定向分化为成熟肝细胞和胆管细胞, 异常分化为肝细胞癌和胆管细胞癌. 认为肝内胆管癌和正常肝细胞具有共同的母细胞来源, 只是异常分化和正常分化的结果^[21]. 因此肝内胆管癌和正常肝细胞具有一定的可比性. 本研究以体外培养的肝内胆管癌细胞系ICC-9810和正常肝细胞系L02为实验材料, 采用SELDI蛋白质芯片技术比较肝内胆管癌细胞系ICC-9810和正常肝细胞系L02的蛋白表达, 发现有27个蛋白质在肝内胆管癌细胞系ICC-9810中出现明显的变化, 9个蛋白在肝内胆管癌细胞系ICC-9810中高表达, 18个蛋白低表达. 特别是WCX2和IMAC3芯片共同捕获的3767、26 794、7999、10 555、12 163和22 066

Da 6个蛋白, 进一步减少了单一芯片检查的误差, 增加了芯片检查的可信度, 获得的肿瘤细胞与正常细胞蛋白差异的生物学信息更准确. 我们已经开始对这些差异蛋白进行凝胶电泳分离、氨基酸测序和鉴定, 以确定差异蛋白的性质, 这些差异蛋白即是肝内胆管癌标志物的候选蛋白. 研究这些差异蛋白, 可以进一步了解正常肝细胞和肝脏肿瘤细胞的生物学特性, 就有可能筛选出肝内胆管癌的标志蛋白, 从而揭示肝内胆管癌发生发展的分子机制.

肝内胆管癌细胞系与肝细胞系之间的蛋白差异, 并不能全面反映肝内胆管癌和肝细胞之间的蛋白差异. 我们正在进行从肝癌患者血清或组织标本中筛选和鉴定肝癌的标志蛋白的研究.

4 参考文献

- 1 Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 115-125
- 2 Singh P, Patel T. Advances in the diagnosis, evaluation and management of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 294-299
- 3 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 4 祝学光. 胆管癌发病机理研究进展. *中华实验外科杂志* 2002; 19: 391-392
- 5 Welzel TM, Mellemejaer L, Gloria G, Sakoda LC, Hsing AW, El Ghormli L, Olsen JH, McGlynn KA. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: a nationwide case-control study. *Int J Cancer* 2007; 120: 638-641
- 6 Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, Thomas M,

创新盘点

本文采用SELDI蛋白质芯片技术比较肝内胆管癌细胞系ICC-9810和正常肝细胞系L02的蛋白表达, 特别是WCX2和IMAC3两个芯片共同捕获的3767、26 794、7999、10 555、12 163和22 066 Da 6个蛋白, 进一步减少了单一芯片检查的误差, 增加了芯片检查的可信度, 获得的肿瘤细胞与正常细胞蛋白差异的生物学信息更准确.

应用要点

研究差异蛋白可以进一步了解正常肝细胞和肝脏肿瘤细胞的生物学特性, 筛选出肝内胆管癌的可能标志蛋白, 从而揭示肝内胆管癌发生发展的分子机制.

同行评价
本文行文简洁,但
研究内容稍嫌简
单,若能对其蛋白
鉴定作更深入研
究,将对读者更有
裨益。

- Brown TD, Patt YZ, Hassan MM. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1016-1021
- 7 Donato F, Gelatti U, Tagger A, Favret M, Ribero ML, Callea F, Martelli C, Savio A, Trevisi P, Nardi G. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case-control study in Italy. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 959-964
- 8 Nakanuma Y, Harada K, Ishikawa A, Zen Y, Dosaki M. Anatomic and molecular pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 265-281
- 9 Shimonishi T, Sasaki M, Nakanuma Y. Precancerous lesions of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 542-550
- 10 周俭, 吴志全, 樊嘉, 马曾辰, 任正刚, 邱双健, 汤钊猷. 胆管细胞癌临床特点及其与肝细胞癌的比较. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 330-332
- 11 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 12 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 13 曹志成. 蛋白质芯片SELDI-TOFMS技术的研究进展及其在临床中的应用. *生物工程学报* 2006; 22: 871-876
- 14 肖雪媛, 卫秀平, 何大澄. 应用蛋白质芯片技术从血清中筛选肺癌标志. *中国科学(C辑)* 2003; 33: 1-6
- 15 Yu LR, Zeng R, Shao XX, Wang N, Xu YH, Xia QC. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 3058-3068
- 16 Seow TK, Liang RC, Leow CK, Chung MC. Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics. *Proteomics* 2001; 1: 1249-1263
- 17 Feng Y, Tian ZM, Wan MX, Zheng ZB. Protein profile of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721: identification and functional analysis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2608-2614
- 18 Wang KJ, Wang RT, Zhang JZ. Identification of tumor markers using two-dimensional electrophoresis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2179-2183
- 19 Srisomsap C, Sawangareetrakul P, Subhasitanont P, Panichakul T, Keeratichamroen S, Lirdprapamongkol K, Chokchaichamnankit D, Sirisinha S, Svasti J. Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics* 2004; 4: 1135-1144
- 20 周福平, 胡和平, 艾建华, 陆豪杰, 王红阳, 吴孟超. 运用激光捕获显微切割对肝细胞癌与肝内胆管癌蛋白质组分析. *第二军医大学学报* 2005; 26: 1111-1114
- 21 潘兴华, 陈系古, 庞荣清, 靳杭红. 肝干细胞与肝再生、肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1925-1927

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.(常务副总编辑:张海宁 2008-03-08)