



论文

荷人卵巢上皮性癌裸鼠慢性心理应激模型中移植瘤蛋白质组研究

高军^①, 高国兰^{②*}, 张艳玉^①, 王芬^①^① 南昌大学第一附属医院妇产科, 南昌 330006;^② 航空总医院妇科, 北京 100012

* 联系人, E-mail: guolan_gao.1962@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-17; 接受日期: 2010-10-12

国家自然科学基金(批准号: 30860301 和 30660192)资助项目

摘要 心理社会因素对肿瘤患者的影响已经引起了国内外学者的密切关注, 长期生活在不良心理应激状态下能促进恶性肿瘤的发生和发展已成定论, 但对其具体机制尚不完全清楚. 为探讨慢性心理应激影响肿瘤发生发展的分子学机制, 建立荷人卵巢癌裸鼠慢性心理应激模型. 通过双向电泳和 nanoUPLC-ESI-MS/MS, 在裸鼠移植瘤组织中发现了 20 种明显差异表达蛋白, 其中相比对照组, 应激组有 14 种蛋白表达上调, 5 种表达下调, 而 1 种蛋白只在应激组裸鼠皮下移植瘤中被发现; Western blotting 验证结果与蛋白质组学一致. 本研究为揭示心理和肿瘤的关系提供了新的分子方面的依据.

关键词
蛋白质组
心理应激
卵巢癌
双向电泳
UPLC-ESI-MS/MS

近年来, 在肿瘤治疗方面取得了很大的成就. 但作为女性生殖系统第二大最常见恶性肿瘤^[1], 卵巢癌起病隐匿, 难以在早期被发现, 且一经发现, 大约 70% 的患者已进入中晚期阶段, 其 5 年生存率仅为 19%~38.7%^[2], 死亡率高居妇科肿瘤的首位. 患者一经诊断, 精神、心理压力增大, 很容易失去治疗的信心, 直接影响到临床治疗和预后.

随着医学模式从单一的生物医学向生物-心理-社会模式的转换, 对于躯体疾患, 人们不仅重视其理化刺激、致病感染、药物或遗传等因素, 而且更加关注其社会经济、生活习惯、个性、情绪等心理社会因素的影响. 研究表明, 心理社会因素主要通过下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能紊乱来影响免疫系统, 进而影响癌症的发生和转归^[3,4]. 目前的临床和实验

研究大多局限于神经内分泌和免疫功能层面, 有关其分子机制的报道很少, 未见有关肿瘤蛋白差异方面的报道.

蛋白质组分析, 能提供总的蛋白质谱信息, 是肿瘤研究的一大优势. 肿瘤相关蛋白质组学应用于调查肿瘤发生、筛选肿瘤标志物、早期诊断和治疗癌症及预后评估是切实可行的^[5]. 表达蛋白质组学可以发现不同组织和细胞, 或采取不同处理的同一组织和细胞的差异表达蛋白质, 确定能够早期发现、早期诊断和监测治疗效果的肿瘤标志物, 最后找出其影响的分子机制^[2,6-13]. 有几篇关于应激造成小鼠海马蛋白表达谱变化的报道^[14-16], 但未见有利用荷人卵巢癌裸鼠研究不良应激对皮下移植瘤组织蛋白表达谱的报道. 本研究围绕差异蛋白组学研究方法展开, 通

英文版见: Gao J, Gao G L, Zhang Y Y, et al. Proteomic analysis of human epithelial ovarian cancer xenografts in immunodeficient mice exposed to chronic psychological stress. *Sci China Life Sci*, 2011, 54, doi: 10.1007/s11427-010-4126-x

过建立荷人卵巢癌裸鼠模型, 利用慢性束缚应激对裸鼠进行不良心理应激, 用双向电泳技术对移植瘤蛋白进行分离, 通过全面比较应激与非应激荷人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤中蛋白表达谱的不同, 筛选出差异蛋白, 并利用质谱技术(nano-UPLC-ESI-MS/MS)对所选差异蛋白进行鉴定. 旨在探讨慢性心理应激在荷瘤裸鼠肿瘤发生、发展中的分子机制, 最终为临床上对卵巢癌患者进行心理和分子治疗提供理论和实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 试剂. RPMI 1640 培养液, 胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品; 十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基胺基甲烷(Tris)、溴酚蓝、过硫酸铵(APS)、甘氨酸、丙烯酰胺、固相 pH 梯度干胶条(IPGs, pH 3~10, 线性)、固相 pH 梯度缓冲液(IPG-Buffer)、覆盖液、琼脂糖、尿素、考马斯亮蓝 R-250、二维的标准品等购自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司. 二甲基亚砜(DMSO)、牛血清白蛋白(BSA)、三氟乙酸(TFA)、N'-亚甲基双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、碘乙酰胺(IAA)、3-[3-(胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司; 脱氧核糖核酸酶(Dnase)、核糖核酸酶(RNase)、无水醋酸钠、无水碳酸钠、硝酸银、硫代硫酸盐钠、戊二醛、乙醇、冰醋酸、甲醇、乙腈(ACN)、甘油、甲醛、吐温-20 等均均为国产分析纯或色谱纯; 实验中所用水为 Milli-Q 去离子水.

(2) 仪器设备. UV-160 紫外分光光度计购自日本岛津公司; IPGphor 等电聚焦系统、图像扫描仪、恒温循环器、二维图像分析软件 imagemaster 2D platinum 是瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 产品; PROTEAN II Xi Cell 垂直电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司; nano-UPLC-ESI-MS/MS 系统购自美国 Waters 公司等.

(3) 细胞系和动物. 人卵巢细胞癌 SK-OV-3 细胞系于 2009 年 3 月购自中国科学院细胞库, 使用短串联重复序列的 DNA 指纹技术作为表证方法^[17]. 用含灭活的 10%胎牛血清和 50 U/mL 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基, 培养在温度 37℃, 湿度 95%, 含

5%CO₂ 的孵箱中, 每 3~4 天传代一次, 具体见 Park 等人^[18]所述. 待细胞到对数生长期, 用胰酶消化, 经 D-Hanks 液和冰 PBS 液冲洗后进行计数, 用不含血清的 RPMI 1640 液调整浓度至 2×10^7 细胞/mL, 接种于裸鼠皮下, 100 μ L/只. 雌性 4~6 周龄 BALB/C-nu 裸鼠购自湖北省实验动物研究中心, 饲养于 SPF 级层流架上, 12 h/12 h(黑夜/白天)交替环境^[19]. 动物实验方案全部遵从美国国立照顾和使用实验动物卫生研究院(National Institutes of Health for the Care and Use of Laboratory Animals)的指导方针, 并经南昌大学医学院动物伦理委员会批准.

1.2 实验方法

(1) 荷瘤裸鼠慢性心理应激模型的建立. 适应新环境 1 周后, 裸鼠随机分为应激组 and 对照组, 每组 6 只. 应激组放入打满小孔的 50 mL 离心管中, 进行每天 6 h(11:00 am~5:00 pm)连续束缚应激, 食物和水在应激间歇期提供, 具体步骤如 Alfonso 等人^[20]和 Sheridan 等人^[21]所述. 应激的第 8 天, 将 SKOV3 细胞接种于两组裸鼠的右侧腋下皮下^[22]. 然后, 应激组仍进行连续 35 天的每天 6 h 的应激, 对照组不接受应激. 全部裸鼠在结束应激后的第 2 天予颈椎脱臼法处死, 剥取肿瘤后仔细解剖, 使其不含任何多余的宿主组织并清理血块, 用 PBS 液洗涤后投入液氮中保存待测.

(2) 蛋白质的提取. 移植瘤组织标本在液氮中研磨, 并在冰上用玻璃组织匀浆器进行匀浆. 每 100 mg 标本加 1000 μ L 裂解液(由 40 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 1%DTT, 4%CHAPS, 1 mmol/L EDTA 组成)和 10 μ L 蛋白酶抑制剂. 用超声破碎仪破碎细胞(共 10 次, 每次超 5 s 停 15 s), 随后加入 10 μ g/ μ L DNA, RNA 酶各 5 μ L. 冰浴 20 min 后, 4℃, 18000 $\times g$ 离心 20 min, 吸取上清, 用 Bradford 法测定蛋白含量, 分装, -80℃保存.

(3) 双向电泳(Two-Dimensional Electrophoresis, 2-DE). 将 100 μ g 蛋白样品加入重泡胀液(8 mol/L 尿素, 2%CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液, 18 mmol/L DTT 和痕量溴酚蓝)至总量达到 350 μ L, 加载于 18 cm pH 3~10 的线性 IPG 胶条, 并用覆盖液覆盖. 蛋白样品进行等电聚焦程序, 20℃, 30 V, 被动水化 12 h, 500 V, 1 h, 1000 V, 1 h, 8000 V, 6 h. 将聚焦后的胶条在 SDS 平衡液(1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 50 mmol/L, 30%

甘油, 6 mol/L 尿素, 2% SDS, 痕量溴酚蓝) 中平衡 2 次, 摇床上振荡 15 min $\times$ 2, 其中第一种平衡液中加入 20 mmol/L DTT, 第 2 种平衡液中加入 100 mmol/L 碘乙酰胺。平衡后的胶条转移至 13% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 进行第二相蛋白质分离, 设定 15 mA/胶 15 min, 30 mA/胶 6 h 至溴酚蓝到达胶的下缘。

(4) 凝胶扫描和图像分析。2-DE 胶图经硝酸银染色法后扫描, 用 Image Master 2D Platinum 软件分析, 经过背景消减、点识别、设置参照点、点匹配等处理, 计算蛋白的表达量。两组胶条同时进行分析, 每个样品以相同条件分析 3 次以消除系统误差。每组选择一块斑点均匀、杂质少、斑点分布最具代表性的胶条作为参考胶进行匹配分析。以比对照组表达平均改变 2 倍以上的差异点定义为显著差异点, 且其在组内相对恒定表达。

(5) 差异蛋白质的质谱鉴定。选择考马斯亮蓝 G-250 对预备胶进行染色, 对比银染胶上的差异蛋白点进行选点, 切取选择的 20 个差异蛋白点, 将小胶粒放入 1.5 mL 的硅化 eppendorf 管中进行胶内酶切。先用 Milli-Q 水洗 2 次, 然后在室温下用含 50% 乙腈、100 mmol/L 碳酸氢铵脱色溶液脱色 20 min, 脱色后的胶块在真空干燥机中脱水干燥约 30 min, 使胶粒完全脱水, 在干燥后的胶粒上加 0.01 μ g/ μ L 的 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液 37 $^{\circ}$ C 消化过夜(12~16 h), 收集酶切后的上清液进行肽段提取并按 Winter 等人^[23]所述方法制备样品液。将 5 μ L 样品液注入 nano-Acquity 系统进行 nano-UPLC-ESI-MS/MS 分析。UPLC-ESI-MS/MS 系统包括一个 nano ACQUITY UPLC 和一个 Synapt High Definition Mass Spectrometry 系统。ACQUITY UPLC 分析柱是内含 1.7 μ m 颗粒的 75 μ m $\times$ 250 mm 的超高效液相色谱键合乙烷杂颗粒柱 BEH C18, 富集柱是含 5 μ m 颗粒的 180 μ m $\times$ 20 mm 的 Symmetry C18; 柱温度为 35 $^{\circ}$ C; 流动相的流速为 200 nL/min, 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈; 流动相的梯度为 1%~40% B 80 min, 到 80% B 10 min, 80% B 停留 10 min, 平衡 20 min 到起始 1% B。ESI-MS/MS 离子化方式为纳升电喷雾正离子; 毛细管电压为 2.5 kV, 锥孔电压为 35 V, 源温和脱溶剂温度分别为 90 和 300 $^{\circ}$ C; 锥气和雾化气为氮气, 碰撞气体为氩气; 用 DDA 方式作为数据采集模式, 每次扫描中选择两个强度最高的离子进行串联质谱分析。得到的 MS/MS 质谱图经 PLGS

(version 2.3) 软件处理后, 数据通过 Mascot 软件 (<http://www.matrix-science.com>) 从 NCBI 蛋白质数据库搜索出对应的蛋白。搜索参数如下: 甲硫氨酸的氧化、碘乙酰胺烷基化设置为可变修饰, 漏切位点数最多 1 个, MS/MS 质量误差为 ± 0.2 Da; 单个离子得分值 > 38 , 说明与数据库里的蛋白相同或具有高度同源性 ($P < 0.05$)。

(6) Western blotting。具体步骤参照 Culp 等人^[24]所述。取蛋白质样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 用 Bio-Rad 系统电转 1 h 将蛋白样品转至聚偏氟乙烯膜(PVDF, Millipore, USA)上; 将膜置于封闭液(5% 脱脂奶粉溶于含有 0.1% Tween 20 的 PBS 溶液)中室温封闭 1 h; 封闭后的膜放入一抗中孵育过夜, 采用如下抗体进行: 兔抗-Peroxiredoxin 1(Millipore, USA), 兔抗-Cu/Zn Superoxide Dismutase(Alexis-Bio, USA), 兔抗-nm23(Millipore, USA), 兔抗-Creatine Kinase MM (ABCAM, Britain) 和 glutathione-S-transferase omega 1 鼠多克隆抗体(ABCAM, Britain); 进而选用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中生生物工程高技术公司)孵育 1 h; 用 PBS 脱色后化学发光、显影、定影, 最后肉眼检测、扫描或拍照。

1.3 统计学处理

用 SPSS17.0 软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm SD$ 表示; 组间比较采用 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠体重和瘤重

实验结束后, 应激组裸鼠体重明显低于对照组 ($n=6$, (21.17 ± 2.02) g vs. (24.52 ± 0.67) g, $P < 0.01$), 而实验开始时, 两组体重比较差异无统计学意义 ($n=6$, (18.58 ± 1.07) g vs. (18.42 ± 0.86) g, $P > 0.05$); 裸鼠在接种 SK-OV-3 细胞后 4 天左右皮下出现可以触动的结节, 第 10 天左右皮下瘤开始迅速生长, 实验结束后应激组瘤重明显高于对照组 ((1.717 ± 0.571) g vs. (1.083 ± 0.286) g, $P < 0.05$)。

2.2 移植瘤的蛋白表达谱

对每组 3 只裸鼠的移植瘤组织分别进行双向电泳分离, 每只裸鼠得到一个二维图谱。应激组的移植瘤平均能检测到 1467 个蛋白质斑点, 而对照组则平

均检测到 1292 个(图 1). 对照组内的凝胶匹配率为 92.1%, 应激组内的匹配率为 89.4%, 两组间的匹配率达到 82.4%, 表明这些图像有良好的重复性(匹配率>75%即表明重复性好). 通过图像分析, 发现应激组相比对照组有 19 个蛋白质斑点变化超 2 倍(14 个上调表达、5 个下调表达), 1 个蛋白质斑点仅出现于应激组中(图 2~4).

2.3 质谱鉴定结果

将 20 个目标蛋白点用 UPLC-ESI-MS/MS 系统鉴定并通过 NCBI 数据库检索, 所有目的蛋白均成功鉴定. 14 个上调表达的蛋白为过氧化物酶 1、层粘连蛋白、14-3-3 蛋白 ϵ 、肿瘤转移抑制基因蛋白和磷酸甘油酸激酶 1 等; 而 5 个下调表达的蛋白为 N-myc 下游调节蛋白 1、肌酸激酶和肌球蛋白轻链 2 等; 仅在应激组表达的蛋白被鉴定为 SET 蛋白(表 1).

2.4 Western blotting 结果

结果表明, 应激组中 Prdx1, SOD1, GSTO1, Nm23 蛋白明显高于对照组; CKM 蛋白则低于对照组; 与蛋白质组学结果一致(图 5).

3 讨论

心理因素已经逐渐被证明能影响卵巢癌的发生和预后, 然而卵巢癌的发生发展是涉及到多基因、多信号途径的复杂过程, 其机制仍不完全明了. 因此, 深入研究心理与肿瘤发生发展的关系, 利用心理治疗来阻止肿瘤的发生、发展已成为医学研究关注的重点. 由于人的情感、心理因素复杂多样, 难于统一控制标准, 采用应激动物模型来研究心理因素对肿瘤的影响, 有利于统一标准, 重复性好, 可控制性强, 观察周期短, 有望获得理想的结果. 本研究采用蛋白质组方法来揭示荷人卵巢上皮性癌慢性心理应激模型皮下移植瘤蛋白表达谱的改变, 有望找出有关心理应激与肿瘤发展新的蛋白和信号途径. 将荷人卵巢上皮性癌的裸鼠进行连续 35 天, 每天 6 h 的束缚应激. 提取移植瘤蛋白, 进行 2-DE 和 nanoUPLC-ESI-MS/MS 分析. 在 2 组间发现了 20 个差异明显的蛋白, 大多数涉及多种生理过程, 如能量代谢、细胞增殖、侵袭和凋亡等.

Prdx1 和 Prdx3 属于抗氧化剂的蛋白质家族, 它们能降低过氧化氢和烷基氢过氧化物, 参与细胞的抗氧化剂的保护作用, 并有助于 CD8(+)T 细胞的抗

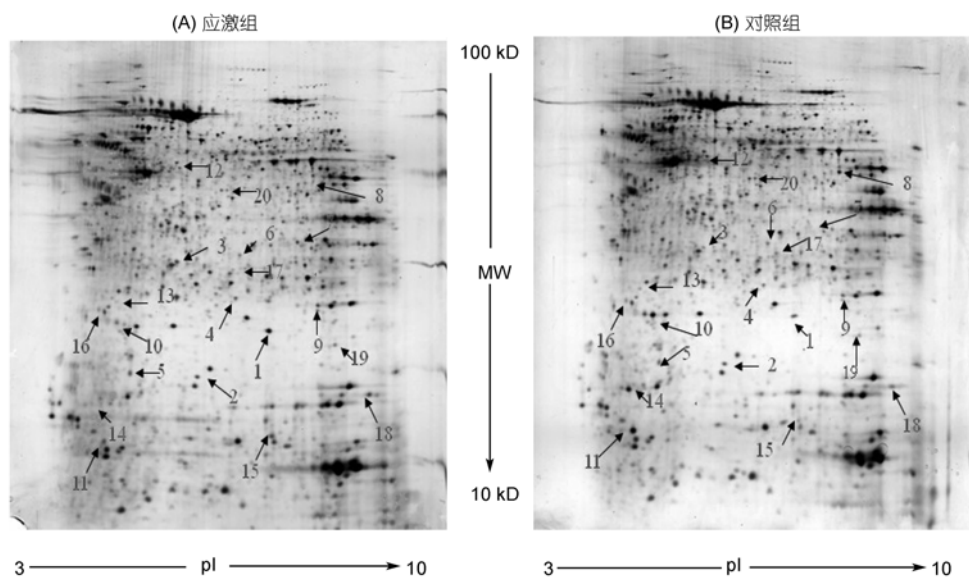


图 1 荷人卵巢上皮细胞癌慢性心理应激模型移植瘤的 2-DE 凝胶图谱

(A) 应激组; (B) 对照组. 所有的移植瘤蛋白用双向电泳并采用银染色. 差异表达的蛋白质斑点用数字标注

病毒活性. 这类蛋白可能具有增殖作用, 在癌症的发生和发展中起重要作用. 先前研究表明, 线粒体调控细胞增殖会产生较低水平的过氧化氢, 高浓度的过氧化氢会产生细胞毒性导致细胞凋亡. Prdx3 转染的前列腺癌细胞对由于缺氧所造成的过氧化氢的产生表现出明显的抵抗, 从而抵抗细胞凋亡^[25]. 表明, Prdx3 过表达会使癌细胞免受过氧化氢所引起的凋亡.

在口腔癌、胰腺癌、甲状腺滤泡癌、食道癌、肺癌、间皮瘤、乳腺癌、头颈部癌症等组织中均发现了高表达的 Prdx1 蛋白, 且高表达的 Prdx1 被发现与肺癌细胞放疗抵抗和乳腺癌化疗抵抗相关, 下调表达 Prdx1 使肺癌细胞对放射敏感等. 这些研究均表明, Prdx1 会增强癌细胞的侵略性, 并增加治疗的难度^[26]. 本研究认为, 应激组上调表达的 Prdx1 和 Prdx3 与肿瘤细

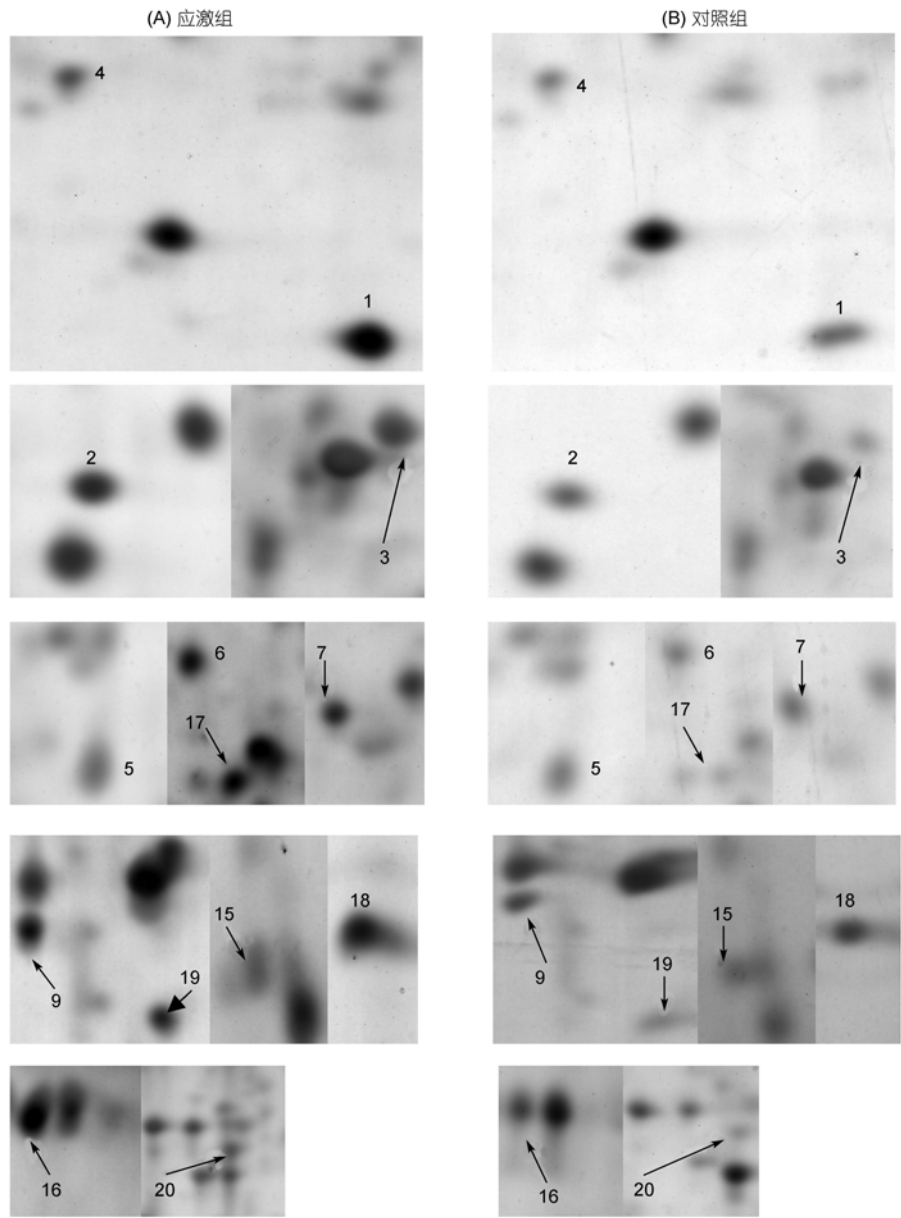


图2 应激组和对照组的双向电泳差异蛋白点的放大对比图

(A) 应激组; (B) 对照组. 采用3块平行胶的蛋白斑点平均值计算蛋白质的丰度. 将比正常对照组变化2倍以上的差异点定义为显著差异点. 应激组蛋白点1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 15, 16, 17, 18, 19和20表达明显上调

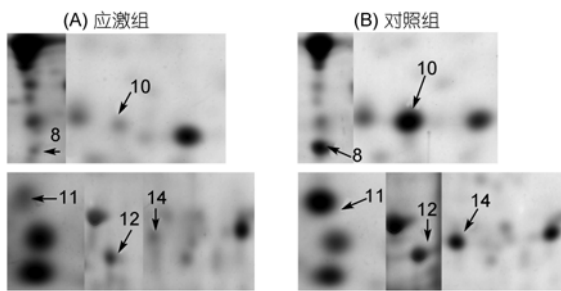


图 3 两组双向电泳差异蛋白点的放大对比图
应激组(A)蛋白斑点 8, 10, 11, 12, 14 表达明显下调

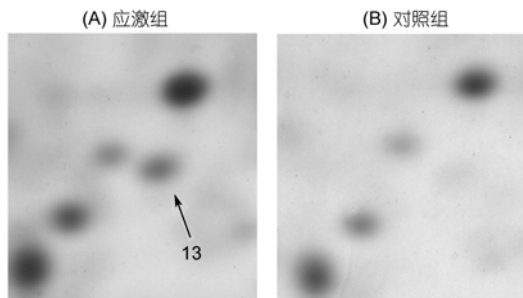


图 4 两组双向电泳差异蛋白点的放大对比图
蛋白斑点 13 只表达于应激组(A)中, 而在对照组(B)中未见表达

胞的抗氧化和抗凋亡密切相关。

超氧化物歧化酶(SODs)是负责解除超氧自由基毒性的一个酶家族, 分布于人体大多数器官. SOD2 在膀胱癌、乳腺癌、胃癌、急性髓系白血病和前列腺癌等组织中高表达, 并能增加患前列腺癌、肺癌、结肠癌和卵巢癌的风险^[27]. Hirose 等人^[28]发现高水平的 SOD1 能增强肿瘤细胞抵抗药物和放射等治疗的能力. Brown 等人^[29]认为, SOD1 是卵巢癌顺铂抵抗的关键因素, 调节其活性能致敏顺铂耐药细胞, 体外实验中使用 SOD1 抑制剂能减少血管生成和肿瘤细胞增殖. 据此推测, 慢性心理应激能影响 DNA 修复、肿瘤细胞药物运输和血管生成过程。

BPGM 是一个亚基二聚体, 与磷酸变位酶(PGM)中的大亚基具有很强的同源性, PGM 和 PGK1 在糖酵解途径中都通过催化反应参与糖酵解和能量代谢过程. PGM 和其活性水平在乳腺肿瘤中明显高于相应的正常组织^[30]. Hwang 等人^[31]发现, PGK1 在胰腺癌组织中高表达. 而 Tang 等人^[32]认为, PGK1 高表达的肺癌细胞降低了 COX-2 的表达并促进 Th1 免疫功能, 从而影响细胞浸润、血管生成和免疫功能, 最终抑制肿瘤的发展. 本实验发现, PGK1 在应激后的卵

巢癌组织中上调表达, 但其在肿瘤发生和抗肿瘤中的作用需要进一步探讨. 核糖体是一个能催化蛋白质合成的细胞器, 包括一个 40S 的小亚基和一个 60S 的大亚基, 这些亚基由 4 个 RNA 结构和大约 80 种不同的蛋白连接在一起. 已经发现, 大肠癌组织与相应正常结肠黏膜比较, RPS12 表达上调, 而上调表达 RPS12 被认为是癌变的征兆^[33]. Marty 等人^[34]发现, MRPL12 mRNA 高表达的结肠线粒体活动相应减少, 说明 MRPL12 与肿瘤的形成有关. 目前, 尚未见核糖体蛋白和卵巢癌关系的相关报道, 有待今后更深入的研究。

nm23 基因多数被报道为一种肿瘤转移抑制基因, 但 nm23 基因在卵巢癌发生发展中的作用仍具争议. Youn 等人^[35]和 Schneider 等人^[36]发现, Nm23 蛋白高表达的卵巢癌预后差、总的生存率低. Nm23 蛋白可能具有导致卵巢癌临床疗效不佳的生物学功能. 本实验中, Nm23 蛋白在应激组中表达明显上调, 是否意味着 Nm23 蛋白高表达的卵巢癌预后更差? 14-3-3 蛋白是一种二聚体蛋白家族, 涉及多个信号转导途径. 已经发现, 14-3-3 蛋白有 7 个亚基且各个亚基在细胞的凋亡控制中均起重要作用. 本研究中, 在应激组中高表达的 14-3-3-ε 是一个抗凋亡蛋白, 其功能是激活酪氨酸和色氨酸羟化酶, 而后两者受 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶调控^[37]. 本研究认为, 14-3-3-ε 可能是酪氨酸和色氨酸羟化酶介导的细胞信号传导途径的一个多功能调节器。

其他在应激组中高表达的蛋白, 均参与调节肿瘤细胞的增殖和分化. 例如, 层粘连蛋白已被证实与肿瘤细胞的生物侵略性有很大的关联^[38]. GSTO1 作为一个小应激反应蛋白, 可能参与细胞氧化还原平衡, 控制还原型谷胱甘肽共轭双键的大多数外源和内源性疏水亲电^[37]. 酯酶 D 可能参与了唾液酸再利用, 常作为视网膜母细胞瘤和威尔森氏症的遗传标志物^[39]. NADPH 催化哺乳动物血红素代谢的最后一步, 被认为与药物和抗凋亡有关, 在调节细胞的氧化还原平衡和信号通路中扮演重要角色^[40]。

肌球蛋白是一种六聚体 ATP 酶细胞运动蛋白. 作为细胞骨架的重要组成部分, 肌球蛋白家族参与多种生理过程, 如形态维持、物资运输等. 本研究发现, 肌球蛋白在应激组中下调表达, 提示心理应激可能与细胞生理活动相关, 如破坏细胞骨架系统等. 此外, Zhou 等人^[41]发现, 肌球蛋白轻链激酶减少能抑制

表 1 应激组 and 对照组移植瘤中差异表达蛋白的 nano-UPLC-ESI-MS/MS 鉴定结果

蛋白点	登录号	蛋白名称	分子量(M _r)/ 等电点(pI)	得分值*	序列 覆盖率(%)	表达改变#	差异倍数 ($\bar{x} \pm SD$)**	P ^Δ
1	gi 4505591	peroxiredoxin 1(Prdx1)	22096/8.27	332	36	↑	6.49±0.20	<0.05
2	gi 1237406	Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)	15868/5.86	170	34	↑	2.94±0.07	<0.05
3	gi 34234	laminin-binding protein	31774/4.84	39	10	↑	2.98±0.12	<0.05
4	gi 14250063	peroxiredoxin 3 (Prdx3)	27705/7.11	269	33	↑	3.31±0.03	<0.05
5	gi 1313962	mitochondrial ribosomal protein L7L12(MRPL12)	21365/9.04	67	21	↑	2.17±0.04	<0.05
6	gi 4758484	glutathione-S- transferase omega 1 (GSTO1)	27548/6.23	507	39	↑	2.23±0.12	<0.05
7	gi 33413400	esterase D/formylglutathione hydrolase	31442/6.54	339	46	↑	2.09±0.67	<0.05
8	gi 21536288	muscle creatine Kinase (CKM)	43074/6.77	670	48	↓	-(5.98±0.18)	<0.05
9	gi 38503339	superoxide dismutase[Mn], mitochondrial(SOD2)	22190/6.86	311	30	↑	2.56±0.13	<0.05
10	gi 17986273	fast skeletal myosin alkali light chain 1 isoform 1f	21132/4.97	394	41	↓	-(5.59±0.28)	<0.05
11	gi 48762932	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) (CCT8)	59583/5.42	134	10	↓	-(3.63±0.22)	<0.05
12	gi 37655183	N-myc downstreamregulated 1(NDRG1)	42808/5.49	736	36	↓	-(2.42±0.17)	<0.05
13	gi 338039	set	32115/4.12	303	36	new		<0.00
14	gi 1220346	myosin light chain 2	19073/4.91	332	54	↓	-(4.52±0.27)	<0.05
15	gi 14277700	ribosomal protein S12 (RPS12)	14505/6.81	159	52	↑	2.88±0.12	<0.05
16	gi 67464424	14-3-3 protein epsilon isoform	26740/4.92	95	9	↑	3.12±0.10	<0.05
17	gi 4505753	bisphosphoglycerate mutase 1 (BPGM)	28786/6.67	119	16	↑	4.49±0.22	<0.05
18	gi 35068	Nm23 protein	20398/7.07	349	33	↑	2.28±0.16	<0.05
19	gi 4502419	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	22105/7.13	779	69	↑	3.96±0.10	<0.05
20	gi 4505763	phosphoglycerate kinase 1(PGK1)	44586/8.30	404	45	↑	2.50±0.07	<0.05

* 单个离子得分>38 说明与数据库里的蛋白相同或具有高度的同源性($P<0.05$); # 同对照组相比, 应激组中上调(↑)或下调(↓)表达的蛋白质斑点; new 表示此蛋白只在应激组表达; ** 只列举出改变≥2 倍的蛋白质斑点, 下调表达 2 倍以上的以“-”表示; Δ 用 SPSS17.0 软件分析, 组间比较采用 *t* 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义

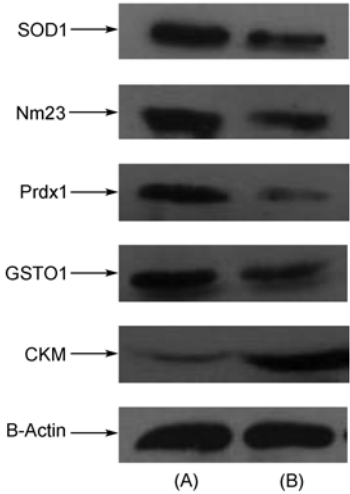


图 5 蛋白质 Western blotting 验证
(A) 应激组; (B) 对照组

乳腺癌细胞增殖和迁移. Ren 等人^[42]报道, 高表达的人肌纤生成调节因子 1 与肌球蛋白轻链 2 介导的癌细胞增殖和迁移密切相关. 这与以往的研究结果似乎矛盾, 仍需进一步探讨.

肌酸激酶(CK)在生物体内无处不在, 催化 ATP 和肌酸之间的可逆磷酸化反应. 生物体在有高和波动的能量需求时, CK 在细胞能量代谢中起关键作用. CK 的活性在肿瘤组织中明显低于正常组织, 起蛋白动员的作用^[30]. CCT8 是一种分子伴侣, 在装配肌动蛋白和微管蛋白时起重要作用. 微管数量减少是恶性转化细胞的一个重要特征. Myung 等人^[43]报道, 伴侣素(chaperines)在人 10 种肿瘤细胞系中表达. CK 和 CCT8 在应激组均下调表达, 这将进一步支持心理应激影响肿瘤细胞能量代谢和细胞骨架系统的假设. NDRG1 被发现是 P53 介导肿瘤细胞凋亡的重要因素,

在抑制肿瘤细胞生长上扮演着非常重要的角色. NDRG1 的表达下降是淋巴结和骨转移者的显著特征, 有报道称在结肠癌、食管鳞状细胞癌等几种癌症中, NDRG1 起肿瘤转移抑制因子的作用^[44,45]. 本研究中, NDRG1 在应激组中下调表达.

set 是一种被公认与髓系白血病发生有关的致癌基因, SET 蛋白在慢性髓细胞性白血病中已被认为是一种肿瘤抑制剂^[46]. 此外, Ouellet 等人^[47]发现, SET 复合物在高度恶性的侵袭性浆液性卵巢癌中高

表达. 本研究发现, SET 蛋白只在应激组的移植瘤中表达. 对于该蛋白还知之甚少, 这将是进一步研究的重点.

目前的研究表明, 暴露于慢性心理应激可能导致肿瘤蛋白质谱发生很大的变化. 这些蛋白表达的改变, 可能通过调节细胞能量代谢, 干扰细胞骨架和细胞增殖、分化、凋亡等来影响肿瘤的生长. 本研究的结果为心理应激影响肿瘤发生发展的分子学机制提供了新的证据.

参考文献

- Lynch H T, Casey M J, Lynch J, et al. Genetics and ovarian carcinoma. *Semin Oncol*, 1998, 25: 265—280
- 李征宇, 赵霞, 杨金亮, 等. 顺铂作用卵巢癌细胞株的蛋白质组学研究. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 254—261
- Kiecolt-Glaser J K, Robles T F, Heffner K L, et al. Psycho-oncology and cancer: psychoneuroimmunology and cancer. *Ann Oncol*, 2002, 13 (S4): 165—169
- Antoni M H. Psychoneuroendocrinology and psychoneuroimmunology of cancer: plausible mechanisms worth pursuing. *Brain Behav Immun*, 2003, 17: 84—91
- Boyce E A, Kohn E C. Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutics targets. *Int J Gynecol Cancer*, 2005, 15: 266—273
- Philip R, Murthy S, Krakover J, et al. Shared immuno-proteome for ovarian cancer diagnostics and immunotherapy: potential theranostic approach to cancer. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2509—2517
- Gortzak-Uzan L, Ignatchenko A, Evangelou A I, et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res*, 2008, 7: 339—351
- Zhu Y, Wu R, Sangha N, et al. Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics*, 2006, 6: 5846—5856
- Wang J, Zhang X, Ge X, et al. Proteomic studies of early-stage and advanced ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*, 2008, 111: 111—119
- Young T, Mei F, Liu J, et al. Proteomics analysis of H-RAS-mediated oncogenic transformation in a genetically defined human ovarian cancer model. *Oncogene*, 2005, 24: 6174—6184
- Jackson D, Craven R A, Hutson R C, et al. Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 7370—7379
- Davidson B, Espina V, Steinberg S M, et al. Proteomic analysis of malignant ovarian cancer effusions as a tool for biologic and prognostic profiling. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 791—799
- Ye B, Cramer D W, Skates S J, et al. Haptoglobin- α subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2904—2911
- Uys J D, Hattingh S M, Stein D J, et al. Large scale hippocampal cellular distress may explain the behavioral consequences of repetitive traumatic experiences—a proteomic approach. *Neurochem Res*, 2008, 33: 1724—1734
- Teague C R, Dhabhar F S, Barton R H, et al. Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in sprague-dawley rats. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2080—2093
- Carboni L, Piubelli C, Pozzato C, et al. Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychological stress. *Neuroscience*, 2006, 137: 1237—1246
- Masters J R, Thomson J A, Daly-Burns B, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8012—8017
- Park S J, Kim M J, Kim H B, et al. Trichostatin A sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulation of c-FLIPL via inhibition of EGFR pathway. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77: 1328—1336
- Stangelberger A, Schally A V, Varga J L, et al. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 49—57
- Alfonso J, Frick L R, Silberman D M, et al. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry*, 2006, 59: 244—251
- Sheridan J F, Dobbs C, Jung J, et al. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. *Ann NY Acad Sci*, 1998, 840: 803—808

- 22 Kim S, Park Y W, Schiff B A, et al. An orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma in athymic nude mice. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1713—1721
- 23 Winter D, Kugelstadt D, Seidler J, et al. Protein phosphorylation influences proteolytic cleavage and kinase substrate properties exemplified by analysis of *in vitro* phosphorylated Plasmodium falciparum glideosome-associated protein 45 by nano-ultra performance liquidchromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2009, 393: 41—47
- 24 Culp W D, Neal R, Massey R, et al. Proteomic analysis of tumor establishment and growth in the B16-F10 mouse melanoma model. *J Proteome Res*, 2006, 5: 1332—1343
- 25 Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 682—689
- 26 Kim J H, Bogner P N, Baek S H, et al. Up-regulation of peroxiredoxin1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2326—2333
- 27 Kang D, Lee K M, Park S K, et al. Functional variant of manganese superoxide dismutase(SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16: 1581—1586
- 28 Hirose K, Longo D L, Oppenheim J J, et al. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J*, 1993, 7: 361—368
- 29 Brown D P, Chin-Sinex H, Nie B, et al. Targeting superoxide dismutase 1 to overcome cisplatin resistance in human ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63: 723—730
- 30 Durany N, Joseph J, Jimenez O M, et al. Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 2000, 82: 20—27
- 31 Hwang T L, Liang Y, Chien K Y, et al. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics*, 2006, 6: 2259—2272
- 32 Tang S J, Ho M Y, Cho H C, et al. Phosphoglycerate kinase 1-overexpressing lung cancer cells reduce cyclooxygenase 2 expression and promote anti-tumor immunity *in vivo*. *Int J Cancer*, 2008, 123: 2840—2848
- 33 Pogue-Geile K, Geiser J R, Shu M, et al. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 3842—3849
- 34 Marty L, Taviaux S, Fort P. Expression and human chromosomal localization to 17q25 of the growth-regulated gene encoding the mitochondrial ribosomal protein MRPL12. *Genomics*, 1997, 41: 453—457
- 35 Youn B S, Kim D S, Kim J W, et al. NM23 as a prognostic biomarker in ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol*, 2008, 21: 885—892
- 36 Schneider J, Pollán M, Jiménez E, et al. nm23-H1 expression defines a high-risk subpopulation of patients with early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 2000, 82: 1662—1670
- 37 Castagna A, Antonioli P, Astner H, et al. A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431. *Proteomics*, 2004, 4: 3246—3267
- 38 Satoh K, Narumi K, Abe T, et al. Diminution of 37-kDa laminin binding protein expression reduces tumour formation of murine lung cancer cells. *Br J Cancer*, 1999, 80: 1115—1122
- 39 Young L J, Lee E Y, To H A, et al. Human esterase D gene: complete cDNA sequence, genomic structure and application in the genetic diagnosis of human retinoblastoma. *Hum Genet*, 1988, 79: 137—141
- 40 Xia C, Meng Q, Liu L Z, et al. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 2007, 67: 10823—10830
- 41 Zhou X, Liu Y, You J, et al. Myosin light-chain kinase contributes to the proliferation and migration of breast cancer cells through cross-talk with activated ERK1/2. *Cancer Lett*, 2008, 270: 312—327
- 42 Ren K, Jin H, Bian C, et al. MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through myosin light chains-2 (MLC2)/focal adhesion kinase (FAK)/akt signaling pathway. *J Biol Chem*, 2008, 283: 35598—35605
- 43 Myung J K, Afjehi-Sadat L, Felizardo-Cabatic M, et al. Expressional patterns of chaperines in ten human tumor cell lines. *Proteome Sci*, 2004, 2: 8—13
- 44 Ando T, Ishiguro H, Kimura M, et al. Decreased expression of NDRG1 is correlated with tumor progression and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 2006, 19: 454—458
- 45 Ellen T P, Ke Q, Zhang P, et al. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 2—8
- 46 Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*, 2005, 8: 355—368
- 47 Ouellet V, Le Page C, Guyot M C, et al. SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 2006, 119: 2119—2126