

通过外泌体发现的肝癌标志物

王琳钧 肖 淋 陈贞仪

福建中医药大学附属人民医院药学部 福建福州 350004

【摘要】目的 寻找肝癌细胞和正常细胞中表达有差异的蛋白。**方法** 收集两种细胞分泌的外泌体,通过凝胶电泳和质谱手段分析两组外泌体内蛋白组学的差异。**结果** 找到两种在肝癌细胞外泌体中表达量明显高于正常细胞的蛋白:纤维结合蛋白(Fibronectin 1, Fn)、膜联蛋白A2(Annexin A2, ANXA2)。**结论** Fn和ANXA2可能是肝癌的特异性标志物,并在肝癌的发生发展中发挥重要作用。

【关键词】 肝癌;外泌体;肿瘤标志物;Fn, ANXA2

【中图分类号】 R735.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-0415(2022)01-088-02

肝癌是目前临床常见的一种恶性肿瘤,与之相关的调控因子的研究有非常重要的意义。外泌体是一种具有脂质双分子层结构的囊泡,各种生物体液和细胞的培养上清中都可分泌出外泌体。肿瘤细胞分泌的外泌体又具有特殊的功能,能够介导肿瘤的免疫功能,还能促进肿瘤的生长。外泌体内含有多小RNA和蛋白质,许多研究显示,这些内含物具有调控细胞行为的功能,肿瘤细胞分泌的外泌体又能够指导肿瘤的发展和转移,因此这些小RNA和蛋白质很可能成为肿瘤标志物^[1]。肿瘤标志物在临床疾病诊断环节发挥重大作用,可以使患者通过常规体检在早期发现疾病,尽早治疗。目前临床常用的肝癌标志物主要为甲胎蛋白(AFP)和甲胎蛋白异质体(AFP-L3),其检测准确度有待提高,因此发现新的肝癌标志物对疾病诊断具有重要意义。

本文试图对比肝癌细胞外泌体和正常肝细胞外泌体中的蛋白表达,找到在肝癌中高表达的蛋白。本实验选择肝癌细胞系HepG2和正常肝组织提取分离出的肝原代细胞hN作为实验对象,分别提取二者分泌的外泌体,通过对其内蛋白质组银染的方法,找到了表达量具有明显差异的两种蛋白,这些蛋白可能对肝癌的研究有重要意义,对肝癌的发展有促进作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、试剂、仪器

HepG2人肝癌细胞系由厦门大学医学院周大旺教授实验室赠。在取得厦门大学伦理委员会许可及患者知情同意书的前提下,利用厦门大学附属中山医院所提供的肝组织样本进行本章所述研究。MEM培养基、William's E medium培养基和胎牛血清(FBS)购自美国Gibco。0.25%胰蛋白酶购自美国Hyclone。Percoll购自美国Sigma。糖原染液D004购自南京建成。立式超速冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特。Q-Exactive质谱仪购自美国Thermo Fisher。

1.2 hN的分离纯化

将人肝组织剪碎洗涤后,配置Washing buffer以37℃洗涤10-20分钟,待肝碎块呈黄色后弃上清。配置Digestion buffer以37℃消化25-45分钟,镜检观察到活细胞后终止消化,过0.22 μm滤膜。将滤液以50×g、4℃离心5分钟得到的细胞用24% Percoll进行密度梯度离心20分钟(1278×g、4℃),取下层细胞进行培养。

1.3 细胞培养

以100000×g超速离心过夜去除FBS本身的外泌体,混合William's E medium培养基,配置成含1%此种FBS的培养基,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养hN。用含量为

1%的普通FBS混合MEM培养液,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养HepG2。待两种细胞汇合至50%时,弃去培养液,换用超速离心过的FBS配置的培养液培养。细胞汇合至100%时,收集细胞培养上清。

1.4 纯化外泌体

分别将两种细胞培养上清以400×g、4℃离心15分钟,弃沉淀取上清。分别将两种离心后的上清再以10000×g、4℃离心30分钟,弃沉淀取上清,上清分别过0.22 μm滤膜。将滤液分别以100000×g超速离心2h,弃上清,沉淀分别用PBS重悬后以100000×g超速离心70 min,弃上清,保存PBS重悬后的沉淀。

1.5 糖原染色

按照糖原染液说明书分别配置试剂一、试剂二和试剂三,并在规定条件下孵育固定了细胞的玻片,待干后在显微镜下镜检^[2]。

1.6 蛋白质凝胶电泳

通过BCA法测定蛋白浓度后,取相同质量的两种外泌体行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。首先在两板间加入10%分离胶,待其凝固后加入5%浓缩胶并插入梳子。而后安装跑胶装置,加入电泳液。再次取3 μl蛋白Marker和两种蛋白样品各80 μg分别上样。最后用80V电压跑胶。约3小时后停止电泳。

1.7 银染

将凝胶卸下,用乙醇:冰醋酸:ddH₂O=4:1:5的固定液固定30分钟后,加入含120mL乙醇、1.24g硫代硫酸钠和16.2mL乙酸钠的敏化液浸泡30分钟或过夜,水洗后加入0.4g硝酸银和80 μl甲醛新鲜配置成的银染液染色40分钟,水洗后加入新鲜配置的含40 μl甲醛和10.0g无水碳酸钠的显色液显色10-15分钟,待蛋白位点显色完全后加入含5.84g EDTA-Na的终止液。

1.8 质谱

切割目标胶条,使用20 μg/mL胰酶分别对其进行胶内酶解,对酶解后的肽段提取液进行ZipTipC18柱脱盐,将真空抽干后的肽段样品打入Q-Exactive质谱仪进行LC-MS/MS鉴定,用Thermo Proteome Discoverer(PD1.4.0288)软件分析肽段最可信的蛋白质来源,并用Uniprot人类蛋白质数据库进行搜索。

2 结果

2.1 hN的鉴定

从正常人肝组织中分离纯化肝原代细胞。由于肝脏内糖原含量丰富,肝细胞可用糖原染液鉴定。由染色结果可见细胞内存在大量糖原颗粒,表示分离出的活细胞为肝原代细胞,

且功能良好、纯度较高。分别培养正常人肝组织分离出的原代细胞和肝癌细胞系 HepG2, 收集细胞培养上清用于分离两种细胞分泌的外泌体 (见图 1)。

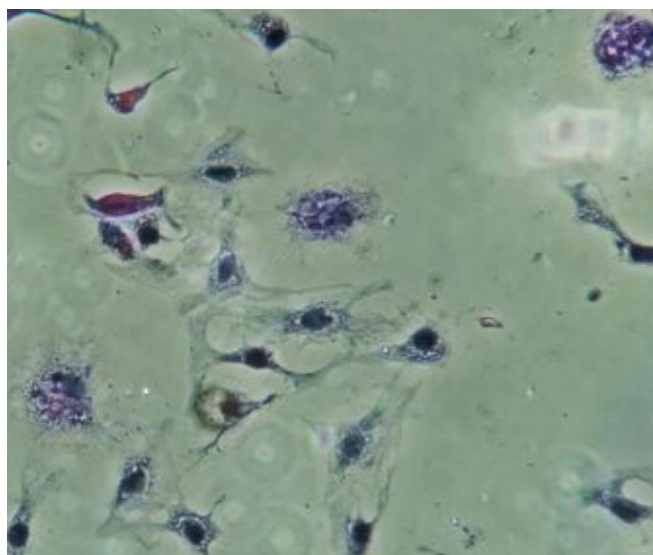


图 1: hN 糖原染色结果

2.2 银染

分别定量 80 μ g 的外泌体, 染色后可见, 在 49 大小处 hN 和 HepG2 均有大量表达, 这是外泌体特异性标志物 CD63, 证明本处所用原料为纯化后的外泌体。另外相比于 hN, HepG2 在 250 和 30 左右有蛋白高表达, 将两处的胶体切下, 送质谱处理 (见图 2)。

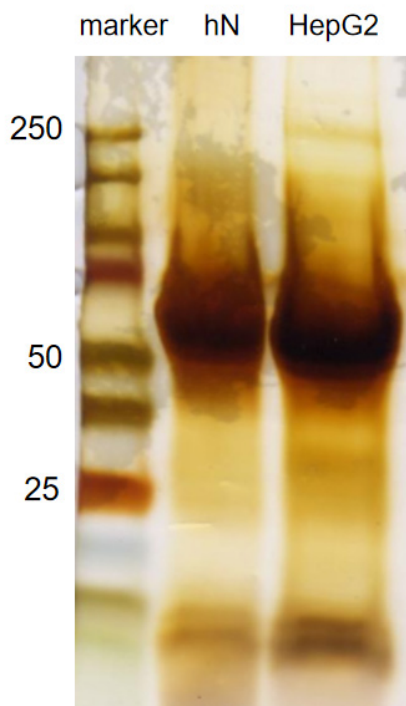


图 2: hN 和 HepG2 外泌体蛋白质银染结果

2.3 质谱

对 hN 和 HepG2 的外泌体蛋白质组银染结果进行观察, 可见 250kDa 和 30kDa 处 HepG2 外泌体有高表达的蛋白, 提示相比于正常细胞, 肝癌细胞可能有这两种蛋白质的异常表达。切割、质谱分析显示 250kDa 处为纤维结合蛋白 (Fibronectin 1, Fn), 30kDa 处为膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) (见图 3)。

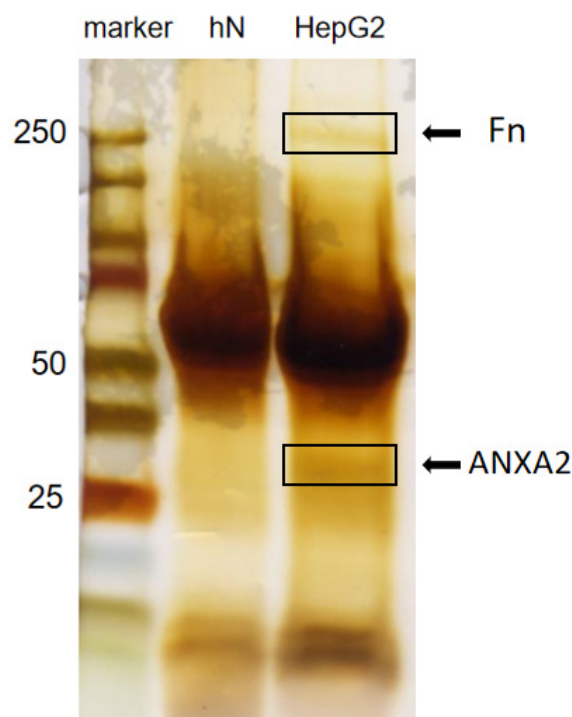


图 3: 质谱分析结果

3 讨论

本文通过近些年被证实的一种参与生物细胞生长、增殖和生理功能的重要囊泡——外泌体, 研究肝癌细胞中的特异性蛋白, 找到两种相比于正常细胞, 肝癌细胞内高表达的蛋白。

通过文献检索发现这两种蛋白确实与肿瘤的发生发展有关联。Fn 是一种与凝血有关的蛋白质。有研究显示其可能与肝细胞的恶性增殖有关, 本文的实验结果与之相呼应^[3]。ANXA2 是一种由钙离子介导的、和磷脂结合的蛋白质, 其功能主要为参与细胞膜生理过程中一系列依赖于钙调蛋白的行为^[4]。另外有研究显示, ANXA2 与肿瘤的发生、发展有关, 本文的实验结果印证了这一结论^[5]。可在本次实验的基础上进一步研究其在肝癌中发挥的作用, 这对肝癌形成的机理研究具有一定意义。另一方面, 这两种细胞在肝癌中表达明显高于正常细胞, 提示其有作为肝癌标志物的潜在价值。可以通过进一步的研究, 检测这两种蛋白在肝癌患者和正常人的生物体液内是否具有表达差异, 也许其能成为新的肝癌生物标志物。

参考文献

- [1] 王琳钧. 新的肝癌生物标志物的发现 [D]. 厦门大学, 2017.
- [2] 余莹, 张日华, 朱自强, 等. 改良的小鼠原代肝细胞分离纯化方法 [J]. 南京医科大学学报, 2008, 28(011):1437-1440.
- [3] 周道银, 易滨, 石磊, 等. 纤维结合蛋白, 纤维蛋白原及凝血酶原时间在肝硬化, 肝癌中的意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 1998, 14(4):224.
- [4] 林枝云, 宋英, 何巍, 等. 膜联蛋白 A2 的结构、功能及其在疾病中的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(10):1350-1354.
- [5] 章蔼然, 潘宁, 侯颖春. 膜联蛋白 A2 与恶性肿瘤发展进程的关系 [J]. 细胞生物学杂志, 2008(03):307-311.