

消化系统肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000318

过氧化氧化还原蛋白 2 在结直肠癌中的表达
及其作用机制的研究

吴星烨, 刘茂希, 杜昆利, 傅仲学

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨过氧化氧化还原蛋白 2 (peroxiredoxins 2, PRDX2) 在结直肠癌及正常结直肠组织中的表达情况及其可能的作用机制。**方法:**收集 32 例组织标本, 采用免疫组织化学及 Western blot 的方法对 PRDX2 在结直肠癌组织及正常结直肠组织中的表达情况进行检测; 免疫共沉淀及 HPLC-CHIP-MS/MS 方法检测结肠癌细胞 SW480 中与 PRDX2 相互作用的蛋白质。**结果:**免疫组织化学显示: PRDX2 蛋白主要表达于细胞浆, 在结直肠正常组织 (21.88%, 7/32) 与结直肠癌组织中 (71.88%, 23/32) PRDX2 蛋白的表达差异有统计学意义 ($P=0.001$)。随机抽取 8 例标本进行 Western blot 的检测, PRDX2 蛋白在 7 例癌组织中表达高于正常组织, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。在结肠癌细胞 SW480 中鉴定出 17 种与 PRDX2 相互作用的蛋白质, 其中有 9 种蛋白受 c-Myc 基因的调控。**结论:**PRDX2 在结直肠癌的发展、转移中发挥了一定的作用; PRDX2 可能与 c-Myc 基因调控通路间存在密切的联系。

【关键词】结直肠肿瘤; 过氧化氧化还原蛋白 2; c-Myc**【中图分类号】**R735.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】** - -

Expression of PRDX2 in colorectal neoplasms and its mechanism

Wu Xingye, Liu Maoxi, Du Kunli, Fu Zhongxue

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of PRDX2 in histological samples of colorectal neoplasm and the normal tissues and to analyze its mechanism. **Methods:** The expression of PRDX2 was detected by immunohistochemistry and Western blot. In colon cancer cell SW480, interacting proteins with PRDX2 was detected by immunoprecipitation and HPLC-CHIP-MS/MS. **Results:** Immunohistochemistry indicated that PRDX2 protein was expressed mainly in the cytoplasm. The expression of PRDX2 was weaker in normal colorectal tissues (21.88%, 7/32) than in carcinomas tissue (71.88%, 23/32) ($P=0.001$). Western blot analysis revealed that the expression of PRDX2 protein was significantly higher in carcinomas than in control colorectal tissues ($P<0.01$). In SW480 cells, 17 proteins were obtained from immunoprecipitation using specific antibodies against PRDX2, 9 of them were regulated by c-Myc gene. **Conclusion:** PRDX2 play roles in the development and metastasis of colorectal cancer. PRDX2 might be associated with c-Myc gene regulatory pathway.

【Key words】colorectal neoplasms; peroxiredoxins 2; c-Myc

肿瘤的发生、发展过程中, 由于癌细胞能量需求增高、生长过程中导致间歇性缺氧以及伴随的感染、炎症等疾病, 导致肿瘤微环境中活性氧的产生量急剧增加。即使是少量活性氧的长期存在也会对肿瘤细胞的生存造成严重威胁。过氧化氧化还原蛋

白 (peroxiredoxins, PRDX) 家族就是一类在对抗活性氧以及细胞抗氧化过程中发挥关键作用的蛋白质。6 种 PRDX 蛋白在哺乳动物细胞可分为: 保守的 2-半胱氨酸亚群, 包括 PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4; 非典型的 2-半胱氨酸亚群, PRDX5; 1-半胱氨酸亚群, PRDX6^[1]。PRDX 在清除活性氧的过程中, 自身也被氧化, 随后可以通过合成新的蛋白质或在硫氧还蛋白及其他氧化还原剂的作用下再次恢复功能。

从其功能上看, PRDX2 是 6 个 PRDX 因子中恢复抗氧化功能最快的^[2]。为明确 PRDX2 在结直肠癌

作者介绍: 吴星烨, Email: wuxingye19830221@126.com,

研究方向: 胃肠道肿瘤的发病机理及转移机制。

通信作者: 傅仲学, Email: fzx990521@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81172295)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000318.html>

中的表达情况及其作用机制,本实验采用免疫组织化学和 Western blot 的方法对 PRDX2 在结直肠癌组织中的表达情况进行检测;采用免疫共沉淀结合 HPLC-CHIP-MS/MS 的方法对其可能的作用机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 细胞、组织标本来源及临床资料

结肠腺癌细胞株 SW480 购置于中科院上海细胞所。收集 2009 年 3 月至 2009 年 5 月,重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 32 例结直肠癌手术切除的癌组织及远处正常组织标本(距肿瘤>5 cm)。男性 13 例,女性 19 例,年龄 38~75 岁,平均年龄 61 岁。TNM 分期:Ⅰ~Ⅱ期 20 例,Ⅲ期 12 例。所有患者术前均未进行放化疗,术后病理证实为结直肠癌。

1.2 试剂

SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥公司;化学发光试剂盒、二抗羊抗兔抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 PRDX2 多克隆抗体购自 Proteintech 公司;免疫共沉淀试剂盒 Immunoprecipitation Kit(Protein G),产品号:11719386001,购自 Roche 公司。

1.3 主要设备

SW-CJ-2A 标准型超净工作台购自重庆汇诚空气净化设备制造公司;371 灭菌型 CO₂ 培养箱购自 Thermo 公司;CM1900 冰冻切片机、RM2235 石蜡切片机购自 Leica 公司;ChimiDox-XRS 凝胶成像仪购自 BIO-RAD 公司。

1.4 免疫组织化学

组织标本采用多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度为:5 μm。石蜡切片采用二甲苯、梯度酒精脱蜡;枸橼酸盐缓冲液微波加热后进行抗原修复;室温下行内源性过氧化物酶灭活;滴加正常山羊血清封闭;滴加兔抗人 PRDX2 多克隆抗体,4℃孵育过夜或 37℃ 2 h;滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,37℃孵育 20 min;DAB 显色,苏木精复染,1%盐酸酒精分化,饱和碳酸锂返蓝,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。本实验中免疫组化的研究仅为了进行定性分析,故只考虑阳性细胞所占的百分比进行结果的判断,具体方法如下:在 400 倍显微镜下观察,细胞为黄色或棕黄色为阳性细胞。计数至少 5 个随机视野,取平均值,阳性细胞数<10%计为(-),≥10%计为(+).

1.5 Western blot

常规提取组织总蛋白并进行浓度测定。取等量蛋白样品 50 μg 进行 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,经 5%脱脂奶粉封闭,与兔抗人 PRDX2 多克隆抗体 4℃反应过夜及相应的羊抗兔二抗反应。加入化学发光剂反应,显色,对图像条带进行光密度分析。同一样本重复检测 3 次,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 PRDX2 蛋白条带与内参 β-actin 条带光密度比值作为 PRDX2 蛋白的相对表达量。

1.6 免疫共沉淀

本部分实验按照 Roche 公司免疫共沉淀试剂盒说明书进行,步骤如下:胰酶消化、收集约 1×10^7 个结肠癌 SW480 细胞,清洗后加入 1 ml 细胞裂解液;200 μl 样品中(蛋白量约 500 μg)加入 1 μg PRDX2 相同种属的普通 IgG 及 20 μl 充分重悬的 Protein G Agarose,4℃缓慢摇动 2 h;2 500 r/min 离心 5 min,弃沉淀;加入 PRDX2 一抗,4℃缓慢摇动 10 h;再加入 20 μl 充分重悬的 Protein G Agarose,4℃缓慢摇动 5 h;4 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 清洗 3 次;加入 20 μl SDS-PAGE 电泳上样缓冲液重悬沉淀,沸水煮 5 min;SDS-PAGE 凝胶电泳,采用硝酸银法染色;切取 SDS-PAGE 电泳差异蛋白条带,进行胶内酶解。由重庆市疾病蛋白质组学市级重点实验室采用 HPLC-CHIP-MS/MS 完成质谱分析的相关工作。经质谱分析获得的蛋白点指纹图谱,采用 NCBI 数据库进行信息学分析。

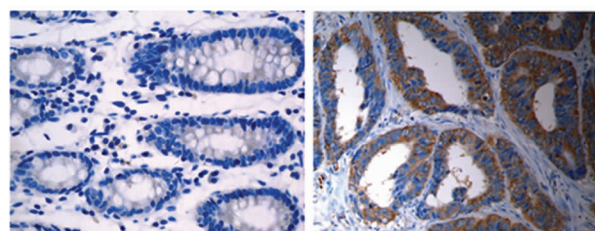
1.7 统计学方法

数据采用 SPSS 11.5 统计软件处理,免疫组化结果为计数资料,采用配对卡方检验。Western blot 的数据为计量资料,采用 *t* 检验进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 PRDX2 蛋白的表达情况

对本组 32 例标本,采用特异性的抗体检测结直肠癌及远处正常组织中 PRDX2 蛋白的表达情况见图 1。PRDX2 蛋白主要表达于细胞浆,着色呈棕黄色。在结直肠癌远处正常组织中,PRDX2 蛋白的表达微弱或缺失,阳性表达率为 21.88% (7/32);在结直肠癌组织中,PRDX2 蛋白的阳性表达率为 71.88% (23/32),见表 1。两者相比差异有统计学意义($P=0.001$)。



A. 正常结肠组织 B. 结直肠癌组织

图 1 免疫组织化学检测 PRDX2 蛋白的表达 (200 ×)

Fig.1 Expression of PRDX2 protein detected by immunohistochemistry (200 ×)

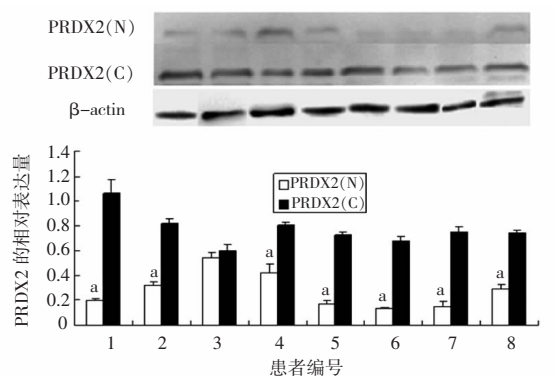
表 1 PRDX2 在结直肠癌组织及远处正常组织的表达

Tab.1 Expression of PRDX2 in colorectal neoplasm and the normal tissues

结直肠癌远处 正常组织	结直肠癌组织		合计
	阳性	阴性	
阳性	4	3	7
阴性	19	6	25
合计	23	9	32

2.2 Western blot 检测 PRDX2 蛋白的表达情况

从 32 例标本中随机抽取 8 例结直肠癌组织及相应的远处正常组织,采用 Western blot 方法对免疫组织化学的检测结果进行验证。1 例癌组织与相应的远处正常组织中 PRDX2 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$); 在 7 例标本中, PRDX2 蛋白的表达在结直肠癌组织明显增高,与 PRDX2 蛋白在远处正常组织中的表达相比,差异有统计学意义, ($P<0.01$) (图 2)。



N: 正常结直肠组织; C: 结直肠癌组织; a. 与 PRDX2 蛋白在结直肠癌组织中的表达相比, $P<0.01$

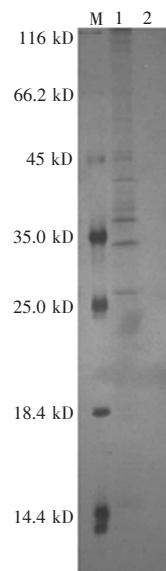
图 2 Western blot 检测 PRDX2 蛋白的表达

Fig.2 Expression of PRDX2 protein detected by Western blot

2.3 免疫共沉淀结果

采用免疫共沉淀的方法对结肠癌细胞 SW480 中与 PRDX2 相互作用的蛋白质进行分析。结果显示: 实验组出现多

条蛋白条带, 对照组未出现蛋白条带见图 3。切取差异蛋白条带经 HPLC-CHIP-MS/MS 检测及信息学分析, 共鉴定出 ENO1、HSPD1 等 17 种蛋白质见表 2。在 www.myc-cancer-gene.org 上进行查找发现 ENO1、HSPD1、RPL6、RPL31、RPL22、RPL4、ZNF271、NAP1L1、SLC25A4 受 c-Myc 基因的调控。



M. Marker; 1. 实验组; 2. 对照组

图 3 免疫共沉淀分析结肠癌细胞 SW480 中与 PRDX2 相互作用的蛋白质

Fig.3 PRDX2-associated proteins analyzed by the immunoprecipitation in colon cancer cell SW480

表 2 免疫共沉淀差异蛋白的基本信息

Tab.2 Basic information of precipitated proteins

编号	蛋白名称	等电点	蛋白分子量(D)	平均肽谱强度(杜昆利 2014.5.27)	数据登录号(杜昆利 2014.5.27)
1	ENO1	7.01	47 169.2	1.63e+008	IPI00465248
2	HSPD1	5.70	61 055.0	1.12e+008	IPI00784154
3	RPL6	10.55	32 872.2	4.82e+007	IPI00790342
4	RPL31	10.81	14 632.3	3.32e+007	IPI00848331
5	RPL22	9.21	14 787.1	2.38e+007	IPI00219153
6	RPL4	11.06	47 697.6	8.00e+007	IPI00003918
7	ZNF271	9.24	48 176.0	2.48e+007	IPI00099531
8	NAP1L1	4.36	45 374.4	6.97e+007	IPI00023860
9	SLC25A4	9.78	33 064.7	4.06e+007	IPI00022891
10	GAPDH	8.57	36 053.4	2.05e+008	IPI00219018
11	ANXA2	8.53	40 411.4	5.57e+007	IPI00418169
12	ANXA1	6.57	38 714.5	6.54e+007	IPI00218918
13	APOA1	5.56	30 778.0	4.09e+007	IPI00021841
14	CAB39L	8.49	39 087.7	2.24e+008	IPI00026359
15	MTG1	9.54	37 236.9	2.19e+007	IPI00029803
16	IGF2BP1	9.26	63 456.8	3.37e+007	IPI00008557
17	C1QTNF7	5.23	31 540.5	5.13e+006	IPI00784310

注: 信息学分析显示 1~9 号蛋白受 c-Myc 基因的调控

3 讨论

PRDX 最初在酵母菌中被发现,随后的研究表明其在生物界中广泛存在。起初其被命名为硫氧还蛋白过氧化物酶,因为其以硫氧还蛋白作为中介将过氧化氢转化为水。随后的研究表明 PRDX 家族中并不是所有的成员都以硫氧还蛋白作为中介,故将它们改名为过氧化氧化还原蛋白。哺乳动物的 PRDX 不同亚型定位于不同的亚细胞部位,以氧化应激较明显的线粒体和内质网最为集中,而 PRDX 过表达可能是由于细胞对抗活性氧产生的氧化应激所导致的。

在过去的三十年中,许多学者对 PRDX2 在不同类型肿瘤中的表达情况进行研究,发现在宫颈癌和乳腺癌中 PRDX2 为高表达^[3-4],这与本实验中 PRDX2 在结直肠癌中的表达升高相一致。研究报道,与 PRDX2 结构、功能极其相似的 PRDX1 可作为肿瘤的标记物并与患者的肿瘤类型及 TNM 分期相关^[5-6]。本研究的组织标本收集于 2009 年 3 月至 2009 年 5 月在重庆医科大学附属第一医院胃肠外科接受手术治疗的结直肠癌患者。从临床工作中来看,大多数结直肠癌患者的病理检查结果为中分化腺癌,在此期间收集的标本也符合上述情况。对 32 例中分化结直肠癌患者 PRDX2 蛋白的表达情况进行分析,发现肿瘤组织中 PRDX2 的表达明显升高,提示 PRDX2 在结直肠癌的发展、转移中发挥了一定的作用。课题组将在随后的研究中对不同分化程度的结直肠癌中 PRDX2 的表达进行检测。

大量研究数据表明,PRDX2 除了抗氧化作用外,尚在许多细胞功能中发挥重要作用。高表达 PRDX2 的培养细胞具有抵抗过氧化氢、血清剥夺、依托泊苷和神经酰胺等引起的细胞凋亡;下调 PRDX2 可以增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性;PRDX2 的高表达可使甲状腺细胞避免过氧化氢诱导的凋亡。但是 PRDX2 的作用途径尚不明确。本实验在结肠癌细胞 SW480 中采用免疫共沉淀结合 HPLC-CHIP-MS/MS 的方法,鉴定出 17 种与 PRDX2 发生作用的蛋白质,通过信息学的检索,发现 ENO1、HSPD1 等 9 种蛋白受 c-Myc 基因的调控^[7-8]。

c-Myc 基因在调控正常细胞的增殖、生长等方面发挥了重要作用。但由于基因易位、点突变、基因缺

失等原因造成的 c-Myc 基因的调节失控,将对细胞的复制、自我更新等方面产生影响,为肿瘤的发生创造条件^[9]。现有研究表明,70% 的结肠癌中存在 c-Myc 基因的过表达;通过基因组学的研究发现,8q24 是结直肠癌易感性位点之一,而这正是 c-Myc 基因所在的染色体位点,由此可见其在结直肠肿瘤发生、发展中的关键作用^[10]。本实验虽然尚未发现 PRDX2 与 c-Myc 基因的直接作用,但与 PRDX2 相互作用的 17 种蛋白质中有 9 种受 c-Myc 基因的调控,提示结直肠癌中 PRDX2 可能与 c-Myc 基因调控通路间存在密切的联系。针对 PRDX2 进行深入的研究可能为认识结直肠癌的发生、发展机制及治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Rhee SG,Chae HZ, Kim K.Peroxiredoxins:a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling[J].Free Radic Biol Med,2005,38(12):1543-1552.
- [2] Neumann CA,Fang Q.Are peroxiredoxins tumor suppressors?[J].Curr Opin Pharmacol,2007,7(4):375-380.
- [3] Lomnyska MI,Becker S,Bodin I,et al.Differential expression of ANXA6,HSP27,PRDX2,NCF2,and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis;diagnostic and prognostic value[J].Br J Cancer,2011,104(1):110-119.
- [4] Desmetz C,Bascoul-Molle C,Rochaix P,et al.Identification of a new panel of serum autoantibodies associated with the presence of in situ carcinoma of the breast in younger women[J].Clin Cancer Res,2009,15(14):4733-4741.
- [5] Ren P,Ye H,Dai L,et al.Peroxiredoxin 1 is a tumor-associated antigen in esophageal squamous cell carcinoma[J].Oncol Rep,2013,30(5):2297-2303.
- [6] Li J,Yang ZL,Ren X,et al.ILK and PRDX1 are prognostic markers in squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinoma of gallbladder[J].Tumour Biol,2013,34(1):359-368.
- [7] Liu Z,Chen C,Yang H,et al.Proteomic features of potential tumor suppressor NESG1 in nasopharyngeal carcinoma[J].Proteomics,2012,12(22):3416-3425.
- [8] Jung Y,Lee S,Choi HS,et al.Clinical validation of colorectal cancer biomarkers identified from bioinformatics analysis of public expression data[J].Clin Cancer Res,2011,17(4):700-709.
- [9] Albiñ A,Johnsen JL,Henriksson MA.MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies[J].Adv Cancer Res,2010(107):163-224.
- [10] Goel A,Boland CR.Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer[J].Curr Opin Gastroenterol,2010,26(1):47-52.

(责任编辑:关蕴良)