

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0505-06

激光显微切割结合蛋白质组学技术分析 DDAH-1 在肝细胞癌表达的变化

王 庆^{1▲}, 洪 毅^{2▲}, 胡和平^{1*}, 谈冶雄², 艾建华², 陆豪杰³, 刘淑琴², 王红阳²(1. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 消化内科, 上海 200438; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 生物信号转导中心, 上海 200438; 3. 复旦大学 生物化学研究所, 上海 200433)

[摘 要] 目的: 应用激光显微切割(laser capture microdissection, LCM)结合蛋白质组学技术筛查肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及其癌旁组织的差异表达蛋白, 分析二甲基精氨酸二甲胺水解酶 1(dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, DDAH-1)在肝细胞癌表达的变化。方法: 选取 2003 - 2006 年间东方肝胆外科医院原发性肝细胞癌患者的手术切除标本 40 例。利用 LCM 技术分离捕获肝癌组织及癌旁组织的肝实质细胞, 应用二维凝胶电泳技术(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)筛选全部标本共同差异表达频率 > 80%、差异强度 > 3 倍的蛋白质点; 应用电喷雾串联质谱(electrospray ionisation tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS)及基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对差异蛋白点进行质谱鉴定分析; 采用 Western blotting 及免疫组化对差异蛋白 DDAH-1 进行检测。结果: 2-DE 筛查获得在肝癌及癌旁组织差异表达的蛋白质点共 20 个, 通过质谱鉴定获得 12 个蛋白质, 其中 5 个在肝癌组织表达上调, 7 个下调; 这 12 个蛋白质与细胞代谢、增殖、分化及信号调控相关, 其中的 DDAH-1 是参与调控一氧化氮相关通路的重要酶。Western blotting 检测显示, 20 例标本中 16 例 DDAH-1 表达明显升高; 免疫组化检测证实, 10 例标本 DDAH-1 全部呈强阳性表达。结论: 肝细胞癌组织细胞中筛查到 12 个差异表达蛋白质, 其中的 DDAH-1 在肝癌组织中表达上调, 其有可能在肝癌发生、发展过程中起重要作用。

[关键词] 肝细胞癌; 激光捕获显微切割; 蛋白质组学; 差异表达蛋白; 二甲基精氨酸二甲胺水解酶 1

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

Laser capture microdissection combined with proteome analysis in determining differential expression of DDAH-1 in hepatocellular carcinoma

WANG Qing^{1▲}, HONG Yi^{2▲}, HU He-ping^{1*}, TAN Ye-xiong², AI Jian-hua², LU Hao-jie³, LIU Shu-qin², WANG Hong-yang²(1. Department of Gastroenterology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Center of Biomolecular Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438; 3. Biochemical Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the differential expression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1(DDAH-1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and surrounding non-tumor tissues using laser capture microdissection (LCM) combined with proteome analysis. **Methods:** Forty surgical specimens of HCC were from patients who were treated in Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital in 2003 - 2006. LCM was applied to isolate hepatic parenchymal cells of cancerous tissues and surrounding non-cancerous tissues. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was used to screen for the differential expression proteins (the differential frequency > 80% and the intensity > 3 times). The differentially expressed proteins were identified by electrospray ionization-tandem mass spectrometry(ESI-MS/MS) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Western blotting and immunohistochemistry were used to analyze the differential expression of DDAH-1 in HCC. **Results:** Totally 20 protein spots were identified to be differentially expressed between HCC tissue cells and the non-tumor tissue cells. Using ESI-MS/MS and MALDI-TOF MS technology, 12 spots were identified by peptide mass fingerprint (PMF), with 5 spots upregulated and 7 spots downregulated in HCC cells, including metabolism related proteins, cell signal proteins, binding proteins and so on. Among these proteins,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 20527004). Supported by the National Natural Science foundation of China(No. 20527004)

[作者简介] ▲并列第一作者; 王 庆(1982-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事肝胆肿瘤治疗的研究; E-mail: qingwang11@ hotmail. com
洪 毅(1976-), 男, 福建厦门人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学研究

* Corresponding author. E-mail: hp-hu@ medmail. com. cn

DDAH-1 is a critical regulator of the nitrogen monoxidum (NO) signaling pathway. Western blotting showed that the expression of DDAH-1 was markedly increased in 16 of 20 HCC tissues. Immunohistochemistry showed that DDAH-1 was localized in the cytoplasm and was highly expressed in HCC tissues. **Conclusion:** Twelve differentially expressed proteins have been identified in HCC cells. DDAH-1 is overexpressed in HCC tissue, which may play a very important role in the mechanism of hepatocarcinogenesis.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; laser capture microdissection; proteomics; differential expression proteins; dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 505-510]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma ,HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病是一个多因素多阶段的病理过程,机制尚不清楚^[1-2]。正常细胞在蛋白质水平向肿瘤细胞转化的过程存在许多变化,如蛋白质的差异表达、蛋白活性的变化及异常定位等,这些变化都将影响细胞的正常功能。鉴别并了解这些变化是肿瘤蛋白质组学的基础^[3]。蛋白质组学技术为肿瘤相关蛋白变化的检测提供了相对精确的方法。然而,不管是在蛋白质还是基因水平,分析组织样本时存在的主要问题是样本的异质性。近年来,激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)已应用于特定种类的细胞或组织的采集,能为鉴别特定组织区域蛋白的差异表达提供更可靠的手段^[4-7]。

本研究应用 LCM 技术采集肝细胞癌组织及癌旁组织中均质细胞,利用二维凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术、电喷雾串联质谱(electrospray ionization-tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS)技术和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术对肝癌细胞差异表达蛋白进行筛查和鉴定,获得了 12 个在肝癌组织与癌旁组织表达有明显差异的蛋白质;选择其中与肿瘤血管新生密切相关^[8]的二甲基精氨酸二甲胺水解酶 1(dimethylarginine dimethylaminohydrolase1, DDAH-1),进一步以 Western blotting 及免疫组化方法检测其在肝癌组织与癌旁组织的差异表达,为深入研究 DDAH-1 在肝癌发生、发展中的作用提供基础性实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验试剂和材料

IPG 胶条(pH 3 ~ 10)及 2-DE 试剂均购自 Amerisham Pharmacia Biotech 公司;TFA 购自 Acros 公司;ACN 购自 Baker 公司;DDAH-1 羊抗人单克隆抗体购自 Acris 公司;其他试剂购自 Sigma 公司。

Leica CM 1900 型冰冻切片机、激光显微切割机为德国 Leica 公司 AS LMD 型 LCM , Ettan IPGphor 固相 pH 梯度等电聚焦仪、Ettan DALTsix 垂直电泳仪、Image Scanner 扫描仪均为美国 GE 公司产品。质谱分析系统为美国 Applied Biosystems 公司的 Voyager System 6192 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)仪。

1.2 标本采集

选取 2003 - 2006 年间东方肝胆外科医院原发性肝细胞癌患者的手术切除标本 40 例。患者均为 HBsAg 阳性,其中男性 27 例、女性 13 例,平均年龄(52.3 ± 7)岁;术前均未经特殊治疗,其病理分期均为 Edmondson's III 期。所有病例标本采集均取得患者的知情同意。其中 10 例标本经 4% 甲醛固定,常规石蜡包埋用于免疫组化检测;30 例标本于切除后无菌 PBS 冲洗,并速冻于液氮中,用于 LCM 和 Western blotting 检测。

1.3 激光捕获显微切割肝癌细胞

使用 Leica1900 切片机将肝癌及癌旁冰冻组织切片(切片厚 5 ~ 10 μm),并分为 2 组:一组溶于 2-DE 裂解液中;另一组置于玻片上,苏木精和伊红染色,用 Leica AS LMD 显微切割机进行切片,激光束的直径是 60 μm ,强度为 80 mW,激光枪的频率是 500 ms⁻¹,每次激光打下 20 ~ 50 个细胞。每管约采集 1 × 10⁴ 个细胞溶于 2-DE 裂解液中。

1.4 2-DE 筛查肝癌细胞中的差异表达蛋白

肝癌细胞样本 4 °C 离心,收集上清,重泡胀 IPG 胶条 12 h。一相(IEF)电压 400 V、20 min,3 h 内逐渐升高并稳定在 8 000 V,7 h。一相结束后,在含 1% DTT 的平衡液 I 和含 2.5% 碘乙酰胺(IAA)平衡液 II 中分别平衡 15 min。第二相电泳采用 12.5% 的均一胶,5 mA 泳动 45 min,20 mA 直至溴酚蓝泳动至胶底部。银染显色。2-DE 4.01 软件进行胶影像匹配分析。

1.5 肝癌组织表达差异蛋白的质谱分析

将癌组织和癌旁组织 2-DE 胶片上有差异的点

切成 $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ 胶块,并用 25 mmol/L 碳酸氢氨/ 50% 氰化甲烷冲洗,真空冷冻干燥后加入 0.01 mg/ml 胰酶 $10 \mu\text{l}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 30 min , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 18 h , 再加入 5% 甲酸 $100 \mu\text{l}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 1 h , 吸出上清,加 2.5% 三氟乙酸和 50% 乙腈 $100 \mu\text{l}$ $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 1 h , 吸起上清液,合并 2 次上清,冷冻干燥。用 $10 \mu\text{l}$ 0.5% 三氯乙酸溶解冷冻干燥肽段,应用 LC-ESI-MS/MS 和 MALDI-TOF-MS 对肽混合物进行质谱和肽指纹谱分析。

蛋白质序列检索:根据质谱数据库检索程序 Mascot <http://www.matrixscience.com>, 通过 NCBI nr 及 Swiss port 蛋白质序列数据库进行检索。

1.6 Western blotting 检测肝癌组织中 DDAH-1 蛋白的表达

从差异表达蛋白中选择与肿瘤新生血管密切相关的 DDAH-1 进行验证。裂解液裂解冰冻组织,超声处理。蛋白定量,用 $8\% \sim 18\%$ SDS-PAGE 电泳分离,上样量为 $60 \mu\text{g}$ 。电泳完毕后将样品转移至硝酸纤维素膜,室温下,用 5% 脱脂奶封闭 1 h , 分别用羊抗人 DDAH-1 单克隆抗体 ($1:2000$)、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 ($1:5000$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 漂洗后与辣根过氧化物酶标记的抗羊/抗鼠二抗孵育 1 h 。TBST 洗膜,ECL 显影。

1.7 免疫组化法检测肝癌组织中 DDAH-1 蛋白的表达

石蜡标本 $4 \mu\text{m}$ 厚度连续切片,脱蜡和水化, 3% 过氧化氢酶处理,封闭抗体,一抗为 DDAH-1 羊抗人单克隆抗体 ($1:50$),使用亲和生物素方法。DAB 显色,苏木精复染。

采用 Fromowitz 等^[10]的方法对免疫组化结果判定:每张切片随机观察 5 个中倍 ($\times 200$) 视野,每个视野计数 100 个细胞,计算每个视野中阳性细胞数的平均百分比作为该切片阳性细胞百分比进行计分。阳性范围计分: $0 \sim 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分;阳性着色计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两项结果相加 < 2 分为阴性, $2 \sim 3$ 分为弱阳性 (+), $4 \sim 5$ 分为中度阳性 (++) , $6 \sim 7$ 分为强阳性 (+++)。

2 结果

2.1 LCM 对肝癌组织细胞的切割捕获

使用 LCM 对 10 例肝癌及癌旁冰冻组织切片,分别进行单一类型肝实质细胞分离,避开肝纤维结缔组织等其他异质结构(图 1A、B),将分离得到的细胞置于 Eppendorf 管,每管约采集 1×10^4 个细胞溶

于 2-DE 裂解液中。

应用 2-DE 比较 LCM 样本与 HCC 组织匀浆(对照样本),结果显示,对照样本与 LCM 样本中蛋白分布相似,然而部分对照样本中的点未见于 LCM 样本中,如血红蛋白。表明 LCM 可去除样本中混杂的血液或其他组织来源的与肝癌细胞无关的蛋白点。

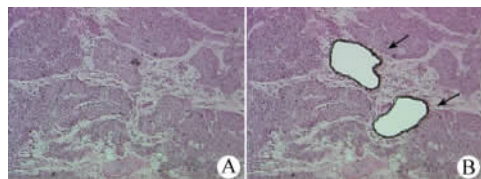


图 1 LCM 从肝癌组织切片上切割捕获肝癌细胞 ($\times 200$)
Fig. 1 Capture of hepatic parenchymal cells of cancer tissue section by LCM

A: HCC tissue section before LCM; B: HCC tissue section after LCM; the arrows show the cell traces after capture

2.2 肝癌组织与癌旁组织中差异表达蛋白的筛查和鉴定

应用 2-DE 分析配对的癌组织细胞及癌旁组织细胞的蛋白表达(图 2),对每例癌组织及癌旁组织进行 2-DE 胶影像分析,计算所有配对标本中共同的差异表达蛋白点的频率,挑取频率在 80% 以上的蛋白质点;再选取表达强度差异在 3 倍以上的蛋白质点,共选出 20 个。

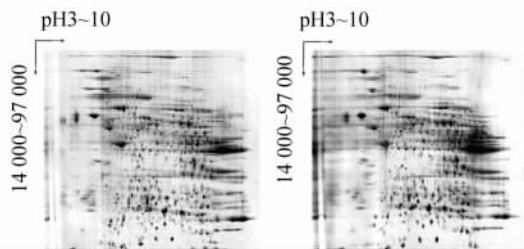


图 2 2-DE 检测 LCM 捕获肝癌与癌旁组织细胞的差异表达蛋白

Fig. 2 2-DE detection of different expression of proteins between HCC tissue cells and surrounding non-tumor tissue cells after LCM

A: Protein spots obtained from HCC tissue cells; B: Protein spots obtained from surrounding non-tumor tissue cells

质谱鉴定这 20 个蛋白质点的氨基酸序列和物理性能参数,得到 12 个差异表达蛋白质,其中上调表达的蛋白质有 5 个(蛋白点编号 1~5),下调表达的蛋白质有 7 个(蛋白点编号 6~12),详见表 1。它们是 DDAH-1、Prx II、Apo-AI (Apolipoprotein A-I

precursor)、HAD (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II)以及 p14. 5(14. 5 kDa translational inhibitor protein)等,这些蛋白质参与调控细胞代谢、增殖、分化及信号转导等 [13-18]。

表 1 ESI-MS/MS 分析鉴定肝癌组织细胞中差异表达蛋白[△]

Tab. 1 Differentially expressed proteins in HCC tissue cells identified with ESI-MS/MS[△]

No.	Accession No.	Description	Mr/pI	Matched peptide sequence	Score
1	P30066	Phosphatidylethanolamine-binding protein(PEBP)(prostaticbinding protein)(HCNPpp)	20 926/7. 43	NRPTSISWDGLDSGKLYTLVLTDP-DAPSRGNDISSGTVLSDYVGSGLPPK YVWLVEYQDRPLKC * DEPILSNR-LYEQLSGK	304
2	P00441	Superoxidedismutase[Cu-Zn](EC 1. 15. 1. 1)	15 795/5. 7	HVGD LGNVTADKGDGPVQGIIN-FEQKDG VADVSIEDSVISLSGDHC * IIGRGLTEGLHGFHVHEFGDN-TAGC * TSAGPHFNPLSR	186
3	P52758	14. 5 kD translational inhibitor protein (p14. 5)(UK114 antigen homolog)	14 485/8. 74	APGAIGPYSQAVLVDR	83
4	SHC004	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase1 (DDAH-1)	38 498/4. 1	DENATLDGGDVLFTGR	81
5	P06132	Uroporphyrinogen decarboxylase (EC4. 1. 1. 37)(URO-D)	40 761/5. 77	AAQDFSTC * RSPEAC * C * ELTLQ-PLRGPSPFEPLREEQDLER	66
6	P78417	Glutathionetransferaseomega1 (EC2. 5. 1. 18)(GSTO1C1)	27 548/6. 23	GSAPPGPVPEGSIRHEVININ-LKVPSLVG SFIREDYAGL-KEEFREDPTVSALLTSEK	231
7	P02647	ApolipoproteinA-I precursor(Apo-AI)	30 759/5. 56	AKPALEDLRATEHL-STLSEK VQPYLDDFQKTHLAPYS-DELRDYVSQFEGSALGK	217
8	P32119	Peroxiredoxin2(EC1. 11. 1. -)(thioredoxin peroxidase1)	21 878/5. 66	LSEDYGLKRLSEDYGV-LKQITVNDLPV GREGGLGPLNIPL-LADVTR	196
9	P02766	Transthyretin precursor(prealbumin)(TPA)(TTR)	15 877/5. 52	GSPAINVAVHVFR	68
10	Q99714	3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (EC1. 1. 1. 35)(Type IIIHADH)(endoplasmicreticulum-associated amyloid beta-peptide binding protein	26 923/7. 65	GLVAVITGGASGLGLATAER	66
11	P02647	ApolipoproteinA-I precursor(Apo-AI)	30 759/5. 56	THLAPYSDELRL	34
12	P00441	Superoxidedismutase[Cu-Zn](EC 1. 15. 1. 1)	15 795/5. 7	HVGD LGNVTADK	30

[△] : The fragmented ion lists were searched with MASCOT in the Swiss-Prot database

* : Cysteines marked were modified by IAA during the equilibrium step of 2-DE.

2.3 HCC 中 DDAH-1 的差异表达及肽指纹谱鉴定
本研究对前述 12 个蛋白质中的差异表达蛋白

DDAH-1 进行进一步分析。2-DE 检测(图 3)发现 DDAH-1 在肝癌组织细胞及其癌旁组织细胞中存在

明显的差异表达,肝癌组织中 DDAH-1 蛋白的表达有 3 倍以上的增加。

应用 MALDI-TOF MS 技术对 DDAH-1 蛋白进行肽指纹谱(peptide mass fingerprint, PMF)鉴定。对 2-DE 上的该蛋白质斑点进行切割,用胰蛋白酶消化后,进行 MALDI-TOF MS 检测,得到 DDAH-1 的肽指纹谱(图 4)。通过数据库搜索结合双向电泳图上相应蛋白的 M_r 、 pI 值,进一步鉴定确认其为二甲基精氨酸二甲胺水解酶 1(dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, DDAH-1)。

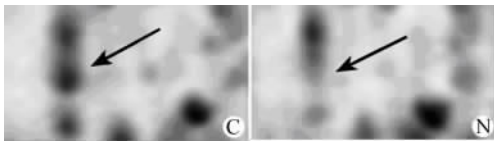


图 3 2-DE 检测 DDAH-1 在肝癌组织细胞中的差异表达

Fig. 3 2-DE maps showing differential expression of DDAH-1 in HCC tumor tissue cells and non-tumor tissue cells

C: Cancerous tissue; N: Surrounding non-cancerous tissue.

The arrow shows that DDAH-1 is up-regulated in HCC tissues

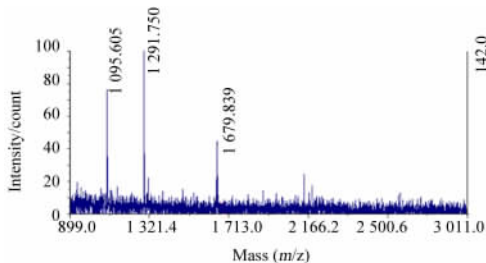


图 4 用 MALDI-TOF-MS 检测差异表达蛋白 DDAH-1 的肽指纹图

Fig. 4 PMF of differentially expressed protein DDAH-1 detected by MALDI-TOF MS

2.4 DDAH-1 的 Western blotting 检测

为证实 DDAH-1 在 HCC 组织中差异表达情况,应用 Western blotting 对 20 例冰冻肝癌组织及癌旁组织进行分析(图 5)。结果显示,DDAH-1 在 20 例癌组织和癌旁组织中均有表达,其在 16 例癌组织中的表达明显上调。

2.5 差异表达蛋白 DDAH-1 的免疫组化检测

为明确 DDAH-1 在肝癌组织及细胞中的定位,对 10 例石蜡包埋的肝癌组织标本进行免疫组化分析(图 6)。结果发现,DDAH-1 在肝癌组织中呈强阳性表达。低倍镜下,可见肝癌细胞呈弥漫性棕黄色或棕褐色着色;高倍镜下,可见阳性着色主要位于细胞胞质内。在癌旁组织中 DDAH-1 的表达明显减

低,呈弱阳性或阴性。

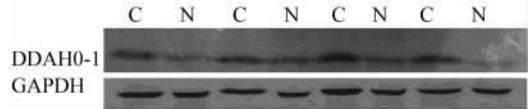


图 5 Western blotting 检测 DDAH-1 在肝癌和癌旁组织的表达差异

Fig. 5 Differential expression of DDAH-1 in HCC tumor tissues and non-cancerous tissues as detected by Western blotting

Four representative samples of 20 samples. C: Cancerous tissue; N: Surrounding non-cancerous tissue

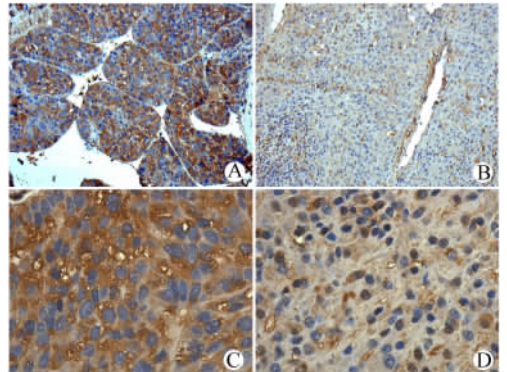


图 6 免疫组化法检测 DDAH-1 在肝癌和癌旁组织的表达差异

Fig. 6 Immunohistochemical detection of DDAH-1 expression in HCC and the non-cancerous tissues

A&C: Cancerous tissue; B&D: Non-cancerous tissues (A&B: $\times 100$; C&D: $\times 400$)

3 讨论

目前,2-DE 与 ESI-MS/MS 及 MALDI-TOF MS 技术结合进行包括 HCC 在内的肿瘤蛋白质组学研究已广泛开展,但由于样本存在组织异质性,即样本含不同种类的组织或细胞,导致蛋白表达形式的变化和差异,使研究结果不尽相同^[7,11]。在控制了其他相关因素的干扰,如病因、病理分期、有无转移等之后,最大限度地减少或消除组织异质性,将有助于比较蛋白质组学正确筛选有意义的差异表达蛋白。LCM 能从组织中分离特定的细胞或组织结构,减少由组织样本异质性所致的干扰^[12]。

本研究应用 LCM 分离捕获肝细胞癌组织中的肝实质细胞,经 2-DE 证实 LCM 样本和匀浆组织样本中蛋白点的分布形式极为相似,但前者样本中消除了部分与肝癌无关的蛋白点。将 LCM 与比较蛋白质组学技术相结合,有助于提高肝癌及癌旁组织中差异表达蛋白筛查的准确性。2-DE 对 LCM 分离的肝癌及癌旁组织的实质细胞进行差异表达蛋白点的筛选,获得 20 个差异蛋白质点。通过质谱鉴定,

获得 12 个在肝癌中差异表达的蛋白质,其中上调表达的蛋白质有 5 个,下调表达的蛋白质有 7 个。这些蛋白质包括 DDAH-1、Prx II、Apo-AI、HAD 以及 p14.5 等,它们与细胞代谢、增殖、分化及信号调控等功能密切相关^[13-16]。Neumann 等^[17]发现 Prx I 有肿瘤抑制作用。Norton 等^[18]发现 HBV 能抑制肝癌细胞系 hepG2 细胞中 ApoA-I mRNA 的表达,提示 ApoA-I 与肝癌相关。进一步研究这些蛋白质的功能将有助于了解肝癌发生发展的机制,同时可能从中找到新的生物标志物。

其中的 DDAH -1 是参与调控 NO 相关通路的重要酶,它可通过降解 iNOS 的内源性抑制物非对称二甲基精氨酸(ADMA),正调控 iNOS 的活性和一氧化氮(NO)的产生^[19];而 NO 是重要的血管调节因子,肿瘤的生长和转移与血管新生密切相关,肿瘤组织血管新生的能力是决定肿瘤大小、局部及远处扩散的关键因素;一旦肿瘤血管新生被抑制,肿瘤细胞就可能发生凋亡,肿瘤生长也将停止。有报道^[8]称 DDAH -1 与血管内皮新生与骨架蛋白形成密切相关。本研究通过 2-DE 及质谱分析鉴定发现,DDAH-1 在肝癌细胞中表达明显上调,因而重点选取该差异表达蛋白进一步通过 Western blotting 和免疫组化法分析验证。结果证实,DDAH-1 在神经胶质瘤中表达上调的报道^[20],目前尚无 DDAH -1 与肝癌的相关文献报道。DDAH-1 是否在肝癌新生血管形成中起正调控作用还有待进一步研究证实。DDAH-1 有望成为 HCC 新的生物学标记物,其功能还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Bosch FX, Ribes J, Díaz M, *et al.* Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 suppl 1): s5-s16.
- [2] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [3] Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(11): 698-704.
- [4] Zhou G, Li H, DeCamp D, *et al.* 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(2): 117-124.
- [5] Craven RA, Totty N, Harnden P, *et al.* Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(3): 815-822.
- [6] Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, *et al.* Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue [J]. *Science*, 1997, 278(5342): 1481-1483.
- [7] Yu LR, Zeng R, Shao XX, *et al.* Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(14): 3058-3068.
- [8] Leiper J, Nandi M, Torondel B, *et al.* Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(2): 198-203.
- [9] Ying W, Zhang K, Qian X, *et al.* Proteome analysis on an early transformed human bronchial epithelial cell line, BEP2D, after alpha-particle irradiation [J]. *Proteomics*, 2003, 3(1): 64-72.
- [10] Fromowitz FB, Voila MV, Chao S, *et al.* Ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 1987, 18(12): 1268-1275.
- [11] Lim SO, Park SJ, Kim W, *et al.* Proteome analysis of hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 1031-1037.
- [12] Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, *et al.* Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(9): 683-695.
- [13] Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(44): 27670-27678.
- [14] Kang SW, Chae HZ, Seo MS, *et al.* Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11): 6297-6302.
- [15] Suto K, Kajihara-Kano H, Yokoyama Y, *et al.* Decreased expression of the peroxisomal bifunctional enzyme and carbonyl reductase in human hepatocellular carcinomas [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, 125(2): 83-88.
- [16] Norton PA, Gong Q, Mehta AS, *et al.* Hepatitis B virus-mediated changes of apolipoprotein mRNA abundance in cultured hepatoma cells [J]. *J Virol*, 2003, 77(9): 5503-5506.
- [17] Neumann CA, Krause DS, Carman CV, *et al.* Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression [J]. *Nature*, 2003, 424(6948): 561-565.
- [18] Norton PA, Gong Q, Mehta AS, *et al.* Hepatitis B virus-mediated changes of apolipoprotein mRNA abundance in cultured hepatoma cells [J]. *J Virol*, 2003, 77(9): 5503-5506.
- [19] Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(12): 939-950.
- [20] Kostourou V, Robinson SP, Whitley GS, *et al.* Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging [J]. *Cancer Res*, 2003, 15, 63(16): 4960-4966.

[收稿日期] 2007 - 10 - 12

[修回日期] 2007 - 11 - 04

[本文编辑] 王莹