

临床研究·写作要求



- 1 **题名：**简明确切地反映论文的特定内容，鲜明而有特色，阿拉伯数字不宜开头，不用副题名，一般 20 个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。
- 2 **作者：**作者署名的次序按贡献大小排列，多作者时姓名间用逗号。英文摘要中，先名后姓，首字母大写，如：Ying-Qiu Huang, Ming Li. 增加第一作者简介。
- 3 **单位：**作者后写单位的全称空 1 格后再写省市及邮政编码，不同作者单位分别写出。
- 4 **基金资助项目：**可以增加省市级以上基金资助项目，并加基金号。英文摘要中翻译为准确的英文。
- 5 **通讯作者：**本刊只设一位通讯作者，不设共同通讯作者，需增加职称。
- 6 **摘要：**应包括中英文摘要，结构式摘要，内容应包括：目的(一般用探讨，研究，观察，评价，比较等引领整个句子，25 字)，方法(一般包含四要素，即分组，造模，给药，指标检测，<225 字)，结果(根据方法中的检测指标得出结果，尽量将原始数据体现出来，如果原始数据过多检验值是一种很好的选择，<225 字)，结论(精练、尽量采用一句话式表达，25 字)。
- 7 **关键词：**应包括中英文关键词，作者应在关键词列表中提供 3-10 个关键词，来反映论文中的核心内容。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版 *Index Medicus* 中医学主题词表 (MeSH) 内所列的词。必要时可采用惯用的自由词。每个关键词之间用“;”分隔。格式如：肠道菌群；急性胰腺炎；慢性胰腺炎；自身免疫性胰腺炎。每个英文关键词第一个字母大写。每个关键词之间用“;”分隔。

8 正文：文章层次为：0 引言；1 材料和方法，1.1 材料，1.2 方法；2 结果；3 讨论；4 参考文献。序号一律左顶格写，后空 1 格写标题；2 级标题后空 1 格接正文；3 级标题为 1.2.1 等；4 级标题为(1)，(2)，(3)；尽量不要出现更小的分级。

9 图表：图表的数量要精选。表应有表序和表题，并有足够具有自明性的信息，使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头，表内非公知通用缩写应在表注中说明，表格一律使用三线表(不用竖线)，在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注，以使其容易被读者理解，所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图，统一用一个注解分别叙述。如：图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用：^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值，则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ ；第 3 套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。

10 参考文献：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 等”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……，潘伯荣等^[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]。文献量达 35 条，可以参考本刊相关文献。

11 名词术语：应标准化，前后统一，如原词过长且多次出现者，可于首次出现时需要包含中英文全称，以后直接用简称。

写作格式实例

●临床研究●

食管鳞癌肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶 1 的鉴定

高红军, 周兰萍, 毛友生, 王 伟, 乔媛媛, 刘 芳, 蔡毅然, 赵晓航

高红军, 周兰萍, 刘芳, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北

京市 100021

毛友生, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院胸外科 北京市 100021

王伟, 中国人民解放军海军总医院胸外科 北京市 100037

乔媛媛, 赵晓航, 中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心 北京市 100037

蔡毅然, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科 北京市 100021

高红军, 博士, 主要从事食管癌功能基因组和蛋白质组学研究

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, Nos. 30572126, 30772507, 30721001; 高技术发展计划“863”资助项目, Nos. 2006AA02Z19B, 2006AA02Z341, 2006AA02A403; 国家重点基础研究发展计划“973”资助项目, No. 2004CB518707; 教育部博士点专项基金资助项目, No. 20060023010.

作者贡献分布: 主要实验、数据分析和文章起草由高红军完成; 病例选择、样本取材、临床资料整理和细胞培养由周兰萍、毛友生、王伟及乔媛媛完成; 免疫组化分析和评分由刘芳与蔡毅然完成; 课题设计、文章修改和审阅由赵晓航完成.

通讯作者: 赵晓航, 研究员, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里 17 号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室. zhaoxh@cicams.ac.cn

收稿日期:

修回日期:

接受日期:

在线出版日期:

Phosphoglycerate kinase 1 as a candidate of tumor-associated antigen identified from esophageal squamous cell carcinoma

Hong-Jun Gao, Lan-Ping Zhou, You-Sheng Mao, Wei Wang, Yuan-Yuan Qiao, Fang Liu, Yi-Ran Cai, Xiao-Hang Zhao

Hong-Jun Gao, Lan-Ping Zhou, Fang Liu, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

You-Sheng Mao, Department of Thoracic Surgery, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Wei Wang, Department of Thoracic Surgery, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Yuan-Yuan Qiao, Xiao-Hang Zhao, Center for Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese PLA,

Beijing 100037, China

Yi-Ran Cai, Department of Pathology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30572126, 30772507 and 30721001; National High-Tech R & D Program of China (863), Nos. 2006AA02Z19B, 2006AA02Z341 and 2006AA02A403; State Key Development Program for Basic Research of China (973), No. 2004CB518707; and Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20060023010.

Correspondence to: Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjia Yuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. zhaoxh@cicams.ac.cn

Received:

Revised:

Accepted:

Published online:

Abstract

AIM: To investigate and identify novel tumor-associated antigens in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Modified serological proteome analysis (mSERPA) strategy was used to separate and identify the candidate proteins. The subcellular protein fractions (cytosolic, membrane and nuclear fractions) of ESCC cell lines and EC0156 cells were extracted first and then cytosolic proteins were separated using SDS-PAGE. The separated proteins were incubated with different serum of ESCC patients (29 cases) or healthy controls (28 cases) respectively, and then one of the positive bands in 43 kDa was excised followed by in-gel tryptic digestion. Separated peptides were identified using a high definition mass spectrometry (HDMS). Western blot and immunohistochemical staining (IHC) were used to validate possible candidates.

RESULTS: Successful compartmental protein extraction was demonstrated by specific organelle markers. Serum samples of ESCC patients bound EC0156 cytoplasmic protein, suggesting selective recognition of tumor-associated antigen. 43kDa protein band showed significantly higher positive binding rate with serum of ESCC patients (41.4%, 12/29) than with serum of healthy individuals (3.6%, 1/28). Five high-confidence proteins were identified from the

43kDa band using HDMS including phosphoglycerate kinase 1(PGK1), β -actin, proteasome 26S subunit, S-adenosylhomocysteine hydrolase and hosphoribosylaminoimidazole carboxylase . Immunohistochemistry. Western blot analysis showed that PGK1 was located in both cytoplasm and nucleus, and had a higher expression in cancer tissues (69.23%, 18/26) than in normal esophageal epithelia.

CONCLUSION: The mSERPA strategy is useful for tumor-associated antigen identification. As a new candidate of tumor-associated antigen, PGK1 was over-expressed in ESCC which may play a role in tumorigenesis of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Tumor-associated antigens; Phosphoglycerate kinase 1

Gao HJ, Zhou LP, Mao YS, Wang W, Qiao YY, Liu F, Cai YR, Zhao XH. Phosphoglycerate kinase 1 as a candidate of tumor-associated antigen identified from esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008

摘要

目的: 鉴定新的食管鳞癌肿瘤相关抗原.

方法: 食管癌 EC0156 细胞总蛋白先经亚组分预分离, 有效富集胞浆、胞膜和胞核等组分蛋白; 胞浆组分蛋白经 SDS-PAGE 分离后分别与食管癌患者血清或健康志愿者血清共孵育, 分离血清结合蛋白条带; 胶内酶解阳性蛋白条带, 肽段经色谱分离后用 Synapt™ HDMS 质谱鉴定. 候选蛋白进一步 Western blot 经免疫组化验证.

结果: 总蛋白经亚组分分离后, 不同组分蛋白均得到有效富集. 食管癌患者血清能与 EC0156 细胞胞浆蛋白结合, 即选择性识别肿瘤相关抗原. 其中, 43 kDa 蛋白条带与食管癌血清(41.4%, 12/29)和对照(3.6%, 1/28)结合阳性率具有明显差异. 从该蛋白条带中共鉴定到磷酸甘油酸激酶、 β -actin、蛋白酶体 26 s 亚基、S-腺苷高半胱氨酸水解酶和磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶 5 个高可信度蛋白. 磷酸甘油酸激酶(PGK1)定位于胞浆和胞核, 在食管癌组织中高表达(69.23%, 18/26).

结论: 改良血清蛋白质组分析策略(mSERPA)可有效分离鉴定肿瘤相关抗原. PGK1 是食管癌候选肿瘤相关抗原, 在食管癌发生发展中可能发挥重要作用.

关键词: 食管鳞癌; 肿瘤相关抗原; 磷酸甘油酸激酶 1

高红军, 周兰萍, 毛友生, 王伟, 乔媛媛, 刘芳, 蔡毅然, 赵晓航. 食管鳞癌肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶 1 的鉴定. 世界华人消化杂志 2008

0 引言

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一, 居恶性肿瘤死亡率第四位. 5 年生存率只有 25-30%, 如果早期发现, 及时治疗, 5 年生存率可达 70% 以上^[1]. 因而, 早期发现, 早期治疗是提高食管癌治愈率、改善疗效的关键. 在我国食管癌的主要组织学类型是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC).

食管癌缺乏特异血清学标志. 目前, 食管癌相关血清标志有癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA), 细胞角蛋白片段 19(cytokeratin 19 fragments, CYFRA 21-1)和鳞状细胞癌相关抗原(squamous cell carcinoma associated antigen, SCC antigen). 但是, 这些标志诊断食管癌的敏感度仅为 17%, 43.9% 和 26.8%, 效果不理想, 不能满足临床诊断需要^[2]. 20 世纪 70 年代发现肿瘤患者体内可以检测到自身抗体和/或自身反应性 T 淋巴细胞, 由此表明肿瘤存在自身抗原^[3]. 疾病自身抗原的分离鉴定对研究自身免疫病, 肿瘤的发病机制, 机体免疫功能与疾病发生发展和转归的相互关系至关重要. 同时, 也是发展有效疫苗、诊断试剂、治疗性抗体, 及其筛选有效药物靶标的重要前提^[4].

Prasannan 等于 2000 年报道了一种称为血清蛋白质组分析(serological proteome analysis, SERPA)的分离鉴定自身抗原的方法^[5]. 以蛋白质二维电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和免疫印记分析(Western-blot)为基础, 联合蛋白谱鉴定筛选自身抗原. 与常用血清自身抗原筛选方法, 即重组 cDNA 表达文库血清学分析方法(serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)^[4, 6-8]相比, SERPA 主要优点是避免了构建 cDNA 文库和预杂交消除非特异性结合的步骤, 所用时间短; 系统保持着蛋白质的转录后修饰, 可以更好地展现抗原决定簇. 目前已有一些用 SERPA 技术筛选自身抗原的相关研究^[5, 9-19]. SERPA 的主要不足是, 工作量大、由 2-DE 本身的一些缺陷如分离极酸、极碱蛋白和水溶性差的膜蛋白能力有限, 只能鉴定丰度相对较高的抗原, 灵敏度有限等.

为避免 SERPA 技术的缺陷, 提高低丰度抗原鉴定的可能性, 避免血清污染与肿瘤异质性, 本研究采用改良 SERPA 法(modified serological proteome analysis, mSERPA), 即以食管癌细胞亚细胞蛋白组分为抗原, 经一维 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后以食管癌患者和健康对照血清为一抗进行免疫印记分析, 筛选具有特异性信号的蛋白条带, 后者经酶解、质谱鉴定分离肿瘤自身抗原, 进一步经大样本免疫组织化学验证. 用 mSERPA 技术分离鉴定了食管鳞癌血清肿瘤相关抗原磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, PGK1).

1 材料和方法

1.1 材料

采集中国医学科学院肿瘤医院和海军总医院胸外科 2004-10/2007-04 接受单纯手术治疗的 29 例食管鳞癌患者术前静脉血和 26 例配对食管鳞癌新鲜组织标本. 28 例健康志愿者清晨空腹外周血. 其中, 食管癌病例包括 24 例男性和 5 例女性, 年龄 41-73(平均年龄 59)岁, 中位年龄 58 岁; 健康志愿者包括 20 例男性和 8 例女性, 年龄 40-70(平均年龄 55)岁, 中位年龄 54 岁. 健康志愿者均经系统健康体检, 无上消化系相关疾病史和恶性肿瘤家族史. 所有病例取材得到知情同意, 术前未行放疗或化疗. 另外 26 例(与 29 例血清标本不是一组病例)新鲜组织标本一经分离, 迅速去除坏死组织和血管等结缔组织, 分别切取、分离癌和远端切缘的正常食管粘膜, 放入预冷的生理盐水内, 洗 3-4 次. 称质量, 分装, 放入液氮速冻后转入-80℃冰箱保存. 用于免疫组织化学分析的经 40 g/L 甲醛固定后石蜡包埋. DMEM 培养基购自 GIBCO/BRL 公司; 丙烯酰胺、N,N' 甲叉双丙烯酰胺购自 BBI 公司; 四甲基乙二胺、过硫酸铵购自 Sigma 公司; 胰酶购自 Promega 公司; 乙腈、HPLC 超纯水购自 Agilent 公司; 亮氨酸、抑酞酶购自 Fluka 公司; 聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; Aprotinin 购自 Roche 公司; Coomassie Plus Protein Assay 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; ProteoExtract™亚细胞蛋白组分提取试剂盒购自 Merck 公司; S-P 试剂盒购自迈新公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗人、抗兔和抗鼠二抗、兔抗山羊二抗和 DAB 试剂盒购自中杉金桥公司; 兔抗人 PGK1 抗体购自 Abnova 公司; 小鼠抗人 α -tubulin 抗体, 山羊抗人 AIF 抗体, 兔抗人 GLI-1 抗体和 ECL 试剂盒购自 Santa Cruz 公司; 真空无抗凝剂采血管购自 BD 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人食管鳞癌细胞系 ECO156 由本实验室建系^[20], 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃、50 mL/L CO₂ 条件下培养.

1.2.2 血清分离: 清晨空腹抽取肘静脉血约 4 mL, 放入 4℃冰箱保存, 30 min 后 4℃ 1 500 g 离心 10 min, 小心吸取上清转入 2 mL 离心管中, 10 000 g, 4℃离心 15 min, 将同一例样品的血清混合后分装于 0.5 mL 离心管中, 迅速至于干冰中, 后转入-80℃冰箱保存. 处理过程在 4 h 内完成. 应用时所有样本冻融≤2 次.

1.2.3 细胞系亚细胞蛋白组分提取: 培养的 ECO156 细胞待长满培养皿的 80%-90%时, 用 4℃预冷的 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 用 ProteoExtract 亚细胞蛋白提取试剂盒按说明书操作步骤将 ECO156 细胞裂解蛋白分成胞浆、胞膜系统和细胞核等三个亚组分蛋白, 分别蛋白定量后分装冻存.

1.2.4 Western blot 分析: (1)肿瘤自身抗原筛选: 200 μ g 胞浆组分蛋白样品经 120 g/L 的 SDS-PAGE 分离以后, 湿转法转印至 PVDF 膜上. 将转印了蛋白质的 PVDF 膜分别切割为 4 mm 宽的小条, 做好标记后将每个小条分别放入 8 通道的杂交盘中. 5%的脱脂牛奶室温封闭 3 h 后, 分别与 1:200 稀释的食管癌或健康对照血清(一抗)于室温孵育 3 h, 用洗膜液(20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 50 mmol/L NaCl; 0.1% Tween-20)洗膜, 5 min×6 次; 与辣根

过氧化物酶标记的山羊抗人(1: 3000)二抗室温孵育 1h.再经 TBST 溶液洗膜, 5 min×6 次后 ECL 化学发光检测. 作用 3 min 左右, 暗室曝光.结果经 ChampGel 3000(Sage Creation 公司)灰度扫描. (2)亚组分蛋白分离效果检测: 15 μ g 不同组分蛋白上样, 以 120 g/L SDS-PAGE 分离, 转膜后分别与抗 α -tubulin(1:200)、AIF(1:2000)和 GLI-1(1:200)室温孵育 3 h. 洗膜后分别与对应二抗(1:3000 稀释)孵育后曝光. (3)PGK1 在 EC0156 亚细胞组分中的表达: 15 μ g 总蛋白以 120 g/L SDS-PAGE 分离, 转膜后分别与抗人 PGK1 抗体(1: 200)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗(1: 3000)检测 PGK1 在不同亚细胞组分中的表达.

1.2.5 蛋白酶解和质谱鉴定: 切取目的条带经胰酶酶解^[21,22]、反相色谱分离, 肽段经 Synapt[®] HDMS(ESI-Q-TOF MS)质谱分析, 用 Mascot 搜索引擎搜索 NCBI 数据库, 获知氨基酸序列.

1.2.6 免疫组织化学染色及其结果评分: 包含癌和癌旁正常上皮的组织切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化后, 浸入 3%的 H₂O₂ 中 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性.切片经 PBS 冲洗后, 将其置入 0.01 mol/L, pH6.0 的柠檬酸缓冲液沸水浴 10 min, 以充分暴露抗原.切片室温冷却 30 min 后, PBS 冲洗, 滴加山羊非免疫血清, 室温封闭 15 min, 然后滴加小鼠抗人 PGK1 mAb(1:50 稀释), 4℃孵育过夜.阴性对照采用小鼠的非免疫血清替代.切片经 PBS 冲洗后, 滴加生物素标记的第二抗体, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 而后滴加辣根过氧化物酶标记的链亲和素抗体, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗.切片组织经 DAB 溶液显色约 2-3 min 后, PBS 终止反应, 再经苏木素复染、自来水冲洗返蓝.经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后, 中性树脂封片.

结果用以下标准评价表达程度, 包括染色强度和观察结果评分.着色强度评分: 未着色(0 分)、浅黄色(1 分)、浅棕色(2 分)和深棕色(3 分); 观察结果评分, 即阳性细胞占病变细胞的百分比: <5%(0 分); 5%-25% (1 分); 26%-50% (2 分); 51%-75% (3 分)和>75% (4 分). 染色强度评分和观察结果评分的乘积为表达程度, 表达增强(9-12 分)、表达减弱(5-8 分)、明显减弱(0-4 分). 本研究以胞浆出现均匀分布的棕黄色颗粒和表达强度综合得分>4 分为表达阳性.

2 结果

2.1 亚细胞组分蛋白富集效果评价

食管鳞癌细胞 EC0516 总蛋白经分步提取后, 分别用 Western blot 检测细胞浆、胞膜和细胞核等标志分子在不同组分中的表达情况.结果表明(图 1A), 胞浆蛋白标志分子管蛋白(α -tubulin)^[23]仅在胞浆蛋白组分中被检测到; 细胞质膜系统蛋白标志分子凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)^[24, 25]主要出现在膜组分, 同时在细胞核组分也有少量表达; 细胞核标志分子胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1(glioma-associated oncogene homolog 1, GLI-1)^[26, 27]主要出现在细胞核组分中, 膜组分蛋白中也有少量表达.结果表明, 经过蛋白预处理后, 不同细胞亚组分蛋白均得到了有效富集.

2.2 胞浆组分蛋白肿瘤相关抗原的筛选

EC0156 细胞胞浆组分蛋白经一维 SDS-PAGE 分离、转膜后, 分别与 29 例食管癌患者和 28 例健康对照血清进行 Western blot 分析. 结果发现, 食管癌患者血清能与部分肿瘤细胞胞浆组分蛋白产生免疫印迹反应而与正常对照血清形成明显差异, 其中之一是相对分子质量为 43 kDa 的蛋白. 该蛋白与 41.4%(12/29) 的食管癌血清呈阳性反应, 仅与 3.6%(1/28) 的对照血清呈较弱结合, 可能为食管癌候选的肿瘤相关抗原(图 2).

2.3 相对分子质量 43 kDa 候选蛋白的质谱鉴定

食管癌 EC0156 细胞胞浆组分蛋白经一维 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮兰染色, 切取相对分子质量大约为 43 kDa 的蛋白条带. 将蛋白经胰蛋白酶酶解后, 提取的肽段再经 Synapt[®] HDMS 质谱(Waters 公司)鉴定. 所得数据用 Mascot 搜索引擎搜索 NCBI 数据库. 共计检索到 5 个高可信度的蛋白(Mascot score>30)按照得分由高到低依次为磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)、 β -actin、蛋白酶体 26S 亚基(proteasome 26S subunit)、S-腺苷高半胱氨酸水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase)和磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase). 选取 PGK1 做进一步验证, PGK1 的质谱鉴定结果如图 3 所示.

2.4 PGK1 在食管癌不同亚细胞组分中的 Western blot 分析

食管鳞癌 EC0156 细胞胞浆、细胞膜系统和胞核等亚细胞组分蛋白经 SDS-PAGE 分离、转膜后分别与抗 PGK1 抗体孵育, 检测 PGK1 在不同亚细胞组分蛋白中得的表达. 结果发现 PGK1 主要表达于胞浆和细胞核组分, 细胞核组分中 PGK1 为相对分子质量 80 kDa 蛋白, 胞浆组分表现为 43 kDa 和 30 kDa 的异构体, 细胞膜系统未检测到 PGK1 的表达(图 1B).

2.5 PGK1 在食管癌组织和癌旁食管上皮的表达

用免疫组化的方法检测了 PGK1 在 26 对配对食管癌组织和癌旁食管上皮中的表达(图 4). 其中高分化食管癌 14 例, 中分化食管癌 8 例, 低分化食管癌 4 例. 结果表明 PGK1 在 78.57% 高分化(11/14)、50% 中分化(4/8) 和 75% 低分化(3/4) 食管癌组织中表达明显升高. 与正常食管上皮相比, 食管癌中 PGK1 表达阳性率为 69.23%(18/26), 正常食管上皮组织 PGK1 表达率为 7.7%(2/26).

3 讨论

分离鉴定肿瘤相关抗原(tumor associated antigens, TAAs)有可能发现新的辅助早诊, 预后判断和疗效监测的候选肿瘤标志. 本研究通过先行分离食管癌 EC0156 细胞胞浆、膜系统和细胞核等不同细胞亚组分蛋白, 使目的蛋白得到富集并经 SDS-PAGE 分离后, 与食管癌患者和健康对照血清杂交, 筛选并获得特异性结合蛋白即肿瘤自身抗原 PGK1. Pereira-Faca 等曾用类似策略鉴定了肺癌相关抗原 14-3-3 theta^[28].

磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK)是糖酵解的关键酶, 存在于所有生物体并在进化中高度保守, 该酶缺乏可引起生物体代谢紊乱. PGK 是单体的、高度柔曲性的糖酵解酶, 主要由两个球形结构域构成, 在与底物结合过程中发生显著的构象改变, 产生催化效应. 多数生物体内含 2-3 种 PGK 同工酶, 它们在生物体内分

布不一, 具有独特的生物学功能^[29]. PGK1 是一种分泌型糖酵解酶, 催化 1,3-二磷酸甘油酸 1 位碳上的高能磷酸基团转移到 ADP 分子上形成 ATP^[30]. 目前报道了 13 个 PGK1 突变体, 均为单个氨基酸突变或缺失^[31]. PGK 基因突变可导致许多种疾病, 最常见的是慢性贫血, 如遗传性球形红细胞溶血性贫血, 同时可伴有智力减退、神经功能的紊乱和肌肉病变^[32]. 近期研究表明 PGK1 也与肿瘤发生发展密切相关^[33, 34]. PGK1 在 70% 胰腺导管腺癌($n = 63$)和胰腺癌患者血清高表达^[35]. Shichijo 等通过筛选结肠癌患者的肿瘤浸润淋巴细胞以发现肿瘤相关抗原、HLA-A2 限制性和肿瘤反应性细胞毒性 T 细胞, 发现 PGK1 的表位多肽很可能是 HLA-A2(+) 结肠癌患者特异免疫治疗的靶分子^[36]. Chen 等用 ELISA 方法检测肺癌患者血清 PGK1 水平, 发现肺癌血清 PGK1 水平明显升高(91.45%, 107/117), 而且 PGK1 表达水平与不良预后有关^[37].

Chuthapisith 等研究了对化疗敏感与否的两株乳腺癌细胞系的差异蛋白谱, 发现 PGK1 表达与肿瘤对化疗药物敏感性有关^[38]. Wang 等研究表明, PGK1 是 CXCL12/CXCR4 信号通路的关键下游靶基因, 参与调节肿瘤血管生成而与肿瘤生长与转移密切相关^[39].

迄今, 尚无有关 PGK1 与食管鳞癌相关的报道. 我们的研究表明 PGK1 是食管癌的肿瘤相关抗原, 在部分食管癌外周血可以检测到 PGK1 自身抗体. 免疫组织化学分析结果发现, PGK1 在 78%(11/14) 高分化、50%(4/8) 中分化和 75%(3/4) 的低分化食管癌组织中高表达, 主要定位于细胞浆和细胞核. 为进一步证明 PGK1 在食管癌 EC0516 细胞中的定位, 采用 Western blot 方法检测了 PGK1 在 EC0516 细胞系的亚细胞蛋白组分中的表达, 结果表明与免疫组化细胞定位结果一致, 即 PGK1 同时存在于食管癌细胞的胞浆和细胞核中. 同时发现, 胞浆中除了相对分子质量为 43 kDa 的 PGK1 表达蛋白外, 还存在一个相对分子质量为 30 kDa 的异构体, 而细胞核中的 PGK1 呈现相对分子质量为 80 kDa 的表达蛋白. 目前认为 PGK1 主要定于细胞浆, 相对分子质量为 43 kDa. 30 kDa 可能是该蛋白的截短表达形式或降解片段, 80 kDa 形式可能是该蛋白与其它相互作用蛋白或 DNA 等紧密结合的复合体^[40, 41]. Kumble 等的研究表明, 在 Hela 细胞的核基质中 PGK1 与 annexin II 紧密结合发挥 DNA 多聚酶起始识别因子的功能, 参与调节细胞的 DNA 复制^[42]. 有趣的是 Brichory 等对肺腺癌细胞 A549 的研究发现, annexin II 是肺癌相关抗原, 在肺癌组织中表达明显升高^[10]. 肿瘤细胞的 DNA 复制功能活跃, 而机体失去了对调节 DNA 复制功能密切相关的两个调控蛋白的调控, 同时 PGK1 与 annexin II 间可能存在反馈调节现象. 本实验同样检测到核型 PGK1 的表达, 提示 PGK1 转位到细胞核中可能与细胞的恶性转化行为相关. 本研究结果与上述其他肿瘤研究工作结果一致, PGK1 在可能食管鳞癌的发生、发展及转移过程中起重要的作用, 是候选的肿瘤相关抗原之一, 为深入理解食管癌癌变机制, 发现新的候选肿瘤标志具有科学意义.

4 参考文献

- 1 王国清. 食管癌高发地区早期早治 30 年临床研究经验. 中国医学科学院学报 2001; 23: 69-72
- 2 Kawaguchi H, Ohno S, Miyazaki M, Hashimoto K, Egashira A, Saeki H, Watanabe M, Sugimachi K. CYFRA 21-1

determination in patients with esophageal squamous cell carcinoma: clinical utility for detection of recurrences. *Cancer* 2000; 89: 1413-1417 [PMID: 11013352] doi:10.1002/1097-0142(20001001)89:7<1413::AID-CNCR1>3.0.CO;2-I

3 Shiku H, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma. III. Recognition of autoantibodies with unusual characteristics. *J Exp Med* 1977; 145: 784-789 [PMID: 233917] doi:10.1084/jem.145.3.784

4 Gunawardana CG, Diamandis EP. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett* 2007; 249: 110-119 [PMID: 17306453] doi:10.1016/j.canlet.2007.01.002

5 Prasannan L, Misek DE, Hinderer R, Michon J, Geiger JD, Hanash SM. Identification of beta-tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3949-3956 [PMID: 11051243]

6 Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11810-11813 [PMID:8524854] doi:10.1073/pnas.92.25.11810

7 Fernandez Madrid F, Tang N, Alansari H, Karvonen RL, Tomkiel JE. Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 230-235 [PMID: 15893717] doi:10.1016/j.autrev.2004.11.004

8 Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1224-1235 [PMID: 16177248] doi:10.1056/NEJMoa051931

9 Klade CS, Voss T, Krystek E, Ahorn H, Zatloukal K, Pummer K, Adolf GR. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics* 2001; 1: 890-898 [PMID: 11503213] doi:10.1002/1615-9861(200107)1:7<890::AID-PROT890>3.3.CO;2-Q;

10 Brichory FM, Misek DE, Yim AM, Krause MC, Giordano TJ, Beer DG, Hanash SM. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9824-9829 [PMID: 11504947] doi:10.1073/pnas.171320598

11 Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 7908-7912 [PMID: 11691811]

12 Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3328-3335 [PMID: 11705844]

13 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203 [PMID: 12096119] doi:10.1074/mcp.M100029-MCP200

14 Kellner R, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Ackermann A, Beck J, Brenner W, Melchior S, Seliger B. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2002; 2: 1743-1751 [PMID: 12469344] doi:10.1002/1615-9861(200212)2:12<1743::AID-PROT1743>3.0.CO;2-U

15 Seliger B, Menig M, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Halder TM, Kersten M, Harder A, Ackermann A, Beck J, Muehlenweg B, Brenner W, Melchior S, Kellner R, Lottspeich F. Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 2003; 3: 979-990 [PMID: 12833523] doi:10.1002/pmic.200300404

16 Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res*

2004; 64: 5504-5510 [PMID: 15289361]

doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0077

17 Canelle L, Bousquet J, Pionneau C, Deneux L, Imam-Sghiouar N, Caron M, Joubert-Caron R. An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. *J Immunol* [PMID: 15914192] doi:10.1016/j.jim.2005.01.015

18 Cui JW, Li WH, Wang J, Li AL, Li HY, Wang HX, He K, Li W, Kang LH, Yu M, Shen BF, Wang GJ, Zhang XM. Proteomics-based identification of human acute leukemia antigens that induce humoral immune response. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1718-1724 [PMID: 16081408] doi:10.1074/mcp.M400165-MCP200

19 Li C, Xiao Z, Chen Z, Zhang X, Li J, Wu X, Li X, Yi H, Li M, Zhu G, Liang S. Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 547-558 [PMID: 16342241] doi:10.1002/pmic.200500256

20 Wang Q, Xu Y, Zhao X, Chang Y, Liu Y, Jiang L, Sharma J, Seo DK, Yan H. A facile one-step in situ functionalization of quantum dots with preserved photoluminescence for bioconjugation. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 6380-6381 [PMID: 17469831] doi:10.1021/ja071434y

21 http://www.proteomics.com.cn/2005/info_lib.asp.

22 Zhang G, Spellman DS, Skolnik EY, Neubert TA. Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res* 2006; 5: 581-588 [PMID: 16512673] doi:10.1021/pr050362b

23 Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1931-1936 [PMID: 12574499] doi:10.1073/pnas.2627984100

24 Kohli M, Yu J, Seaman C, Bardelli A, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Zhang L. SMAC/Diablo-dependent apoptosis induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16897-16902 [PMID:15557007] doi:10.1073/pnas.0403405101

25 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446 [PMID: 9989411] doi:10.1038/17135

26 Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, Kim WJ, Lee YJ, Kim SH. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* 2006; 19: 1139-1147 [PMID: 16778829]

27 Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 312-319 [PMID: 10559945] doi:10.1038/13031

28 Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs E, Zhang Q, Krasnoselsky AL, Phanstiel D, Qiu J, Misek DE, Hinderer R, Tammemagi M, Landi MT, Caporaso N, Pfeiffer R, Edelstein C, Goodman G, Barnett M, Thornquist M, Brenner D, Hanash SM. Identification of 14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 12000-12006 [PMID: 18089831] doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2913

29 吴德, 吴忠道, 余新炳. 磷酸甘油酸激酶的研究进展. *中国热带医学* 2005; 5: 385-387

30 Blake CC, Rice DW. Phosphoglycerate kinase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981; 293: 93-104 [PMID: 6115427] doi:10.1098/rstb.1981.0063

31 Valentin C, Birgens H, Craescu CT, Brodum-Nielsen K, Cohen-Solal M. A phosphoglycerate kinase mutant PGK Herlev; D285V in a Danish patient with isolated chronic hemolytic anemia: mechanism of mutation and structure-function relationships. *Hum Mutat* 1998; 12: 280-287 [PMID: 9744480] doi:10.1002/SICI1098-1004(199812)12:4<280::AID-HUMU10>3.0.CO;2-V

32 Fujii H, Yoshida A. Molecular abnormality of phosphoglycerate kinase-Uppsala associated with chronic

- nonspherocytic hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 5461-5465 [PMID: 6933565] doi:10.1073/pnas.77.9.5461
- 33 Yeh CS, Wang JY, Chung FY, Lee SC, Huang MY, Kuo CW, Yang MJ, Lin SR. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep* 2008; 19: 81-91 [PMID: 18097579]
- 34 Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condron R, Hogg PJ. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 2000; 408: 869-873 [PMID: 11782484] doi:10.1038/35048596
- 35 Hwang TL, Liang Y, Chien KY, Yu JS. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 2259-2272 [PMID: 16493704] doi:10.1002/pmic.200500345
- 36 Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, Ito M, Maeda Y, Ishihara Y, Itoh K. Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2+ colon cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5828-5836 [PMID: 15355913] doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0350
- 37 Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ, Kardia SL, Iannettoni MD, Yee J, Hogg PJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13537-13542 [PMID: 14573703] doi:10.1073/pnas.2233850100
- 38 Chuthapisith S, Layfield R, Kerr ID, Hughes C, Eremin O. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *Int J Oncol* 2007; 30: 1545-1551 [PMID: 17487377]
- 39 Wang J, Wang J, Dai J, Jung Y, Wei CL, Wang Y, Havens AM, Hogg PJ, Keller ET, Pienta KJ, Nor JE, Wang CY, Taichman RS. A glycolytic mechanism regulating an angiogenic switch in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 149-159 [PMID: 17210694] doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2971
- 40 Aldrich HC, McDowell L, Barbosa MF, Yomano LP, Scopes RK, Ingram LO. Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 1992; 174: 4504-4508 [PMID: 1320611]
- 41 Fossel ET, Solomon AK. Ouabain-sensitive interaction between human red cell membrane and glycolytic enzyme complex in cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1978; 510: 99-111 [PMID: 667039] doi:10.1016/0005-2736-7890133-5
- 42 Kumble KD, Vishwanatha JK. Immunoelectron microscopic analysis of the intracellular distribution of primer recognition proteins, annexin 2 and phosphoglycerate kinase, in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 1991; 99 (Pt 4): 751-758 [PMID: 1837552]

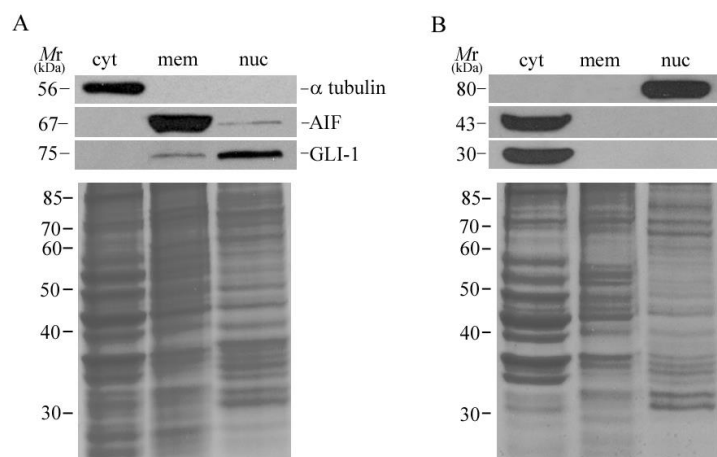


图 1 亚细胞组分蛋白富集与定位的 Western blot 分析. A: EC0156 细胞亚细胞组分蛋白富集效果, 其中 cyt、mem 和 nuc 分别表示胞浆、膜系统和细胞核组分蛋白; B: PGK1 在 EC0156 亚细胞蛋白组分中的表达. 下图为对应上图的上样量对照(考马斯亮兰染色 SDS-PAGE 凝胶).

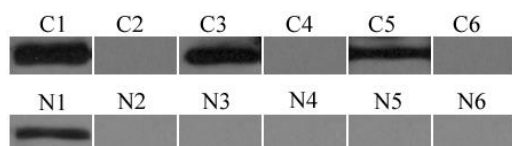


图 2 食管癌血清与 EC0156 胞浆蛋白的 Western blot 分析. EC0156 胞浆蛋白经 SDS-PAGE 分离后转到 PVDF 膜上, 分别以食管癌血清和健康对照血清为一抗进行 Western blot 分析. C1-C6 表示不同食管癌血清的 Western blot 结果, N1-N6 表示不同健康对照血清的 Western blot 结果.

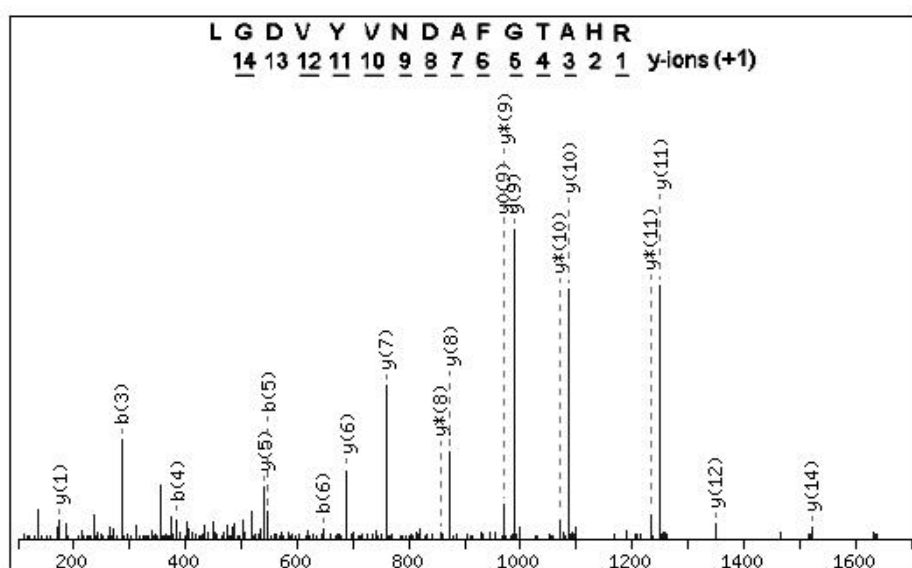


图 3 PGK1 的 HDMS 质谱鉴定结果. PGK1 峰质量为 817.9 的肽片段经 HDMS 解析的氨基酸序列为 LGD V Y V N D A F G T A H R.

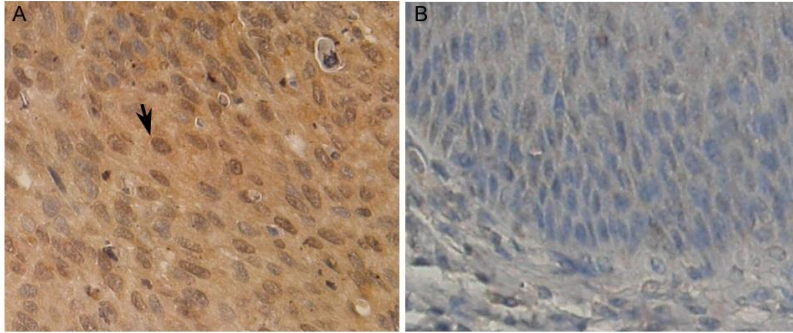


图 4 **PGK1** 在不同食管癌组织和配对癌旁正常上皮的表达. A: 食管癌组织; B: 正常食管上皮($\times 200$). 箭头所示细胞为 **PGK1** 表达阳性细胞, 可见胞浆和胞核均表达 **PGK1**.