

4-NQQ 诱导小鼠舌癌形成过程中的血清差异蛋白筛选

李 邦¹, 王 飞², 张亚军², 刘来奎³, 孙应明¹

摘要 目的 通过蛋白质组学 iBT 技术, 筛选舌癌形成过程中血清的差异表达蛋白, 以期筛选出舌癌早期诊断的肿瘤标志物。方法 使用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQQ) 诱导小鼠舌黏膜癌变, 收取小鼠舌癌形成过程中特定时间点血清行蛋白质组学分析。结果 在 24 周时成功诱导小鼠舌黏膜癌变并有部分小鼠出现了浸润癌, 血清蛋白质组学分析结果显示, 在 8 周和 16 周对比组中显示癌相关蛋白胶原蛋白 α -1 高表达, 纤连蛋白(FN) 低表达; 在 16 周和 24 周的对比组中显示癌相关蛋白 FHL1、FN、热休克蛋白 84b(HSP 84b)、Serine/threonine-protein (PP2A)、(14-3-3) 低表达。通路分析结果显示在舌癌形成过程中, RAS 通路(RAS)、NF- κ B 通路(NF- κ B)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、JAK-STAT 通路(JAK-STAT) 癌相关通路异常。结论 在蛋白质组学的结果中发现的差异蛋白 FHL1、FN、HSP、PP2A、14-3-3 等在舌癌形成的过程中异常表达, 有可能成为舌癌诊断的标志物, 异常表达的通路如: NF- κ B、PI3K、JAK-STAT 等则有可能成为舌癌免疫治疗重要的靶点。

关键词 舌癌; 动物模型; 4-硝基喹啉-1-氧化物; C57BL/6 小鼠; 肿瘤标志物; 舌癌免疫治疗

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1513-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.006

全球每年约 35 万人被诊断为口腔癌, 其中舌癌约占 40% 左右, 为最常见的口腔癌^[1]。近年来舌癌的发病率有上升趋势, 且其早期诊断困难并伴有高转移率, 所以尽管最近提出了很多新的治疗方法, 但患者的 5 年生存率一直未见明显的提高, 仅 50% 左右^[2]。因此寻找舌癌的早期诊断标志物以及探索舌癌形成的机制变得越来越重要。目前舌癌的发病机制尚不明了, 研究^[3]表明长期的小剂量接触致癌

物导致基因突变可引起组织发生恶性转化而发生癌变。其中蛋白质组学技术能全面地检测生物体全部蛋白质的表达模式和功能模式, 并且在肿瘤的早期筛选、探索肿瘤治疗的新靶点中发挥重要的作用。在致癌物 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQQ) 诱导舌癌模型中, 整个实验历时较长, 经历小鼠生长发育的整个时期, 与人类舌黏膜癌变过程相类似, 能很好地模拟人舌癌形成的过程^[3]。该研究采用 4-NQQ 诱导小鼠舌黏膜癌变, 然后取 3 个特定时间点小鼠血清行蛋白质组学分析, 筛选舌癌形成过程中其血清的差异表达蛋白, 以期筛选出舌癌早期诊断的肿瘤标志物。

1 材料与方法

1.1 实验动物及舌癌模型诱导 100 只 C57BL/6 小鼠(雌雄随机), SPF 级, 鼠龄 6~8 周, 购自南京医科大学医学实验动物中心。将 100 只小鼠随机分为 10 组, 每组 10 只。在 10 组小鼠中, 随机挑选 5 组为实验组, 5 组为对照组。实验组饮用水中加入 4-NQQ 浓度为 0.004%, 对照组小鼠正常饲养。分别在 8、12、16、20、24 周时处死小鼠, 取舌头。右心室取小鼠静脉血, 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清血清, -80 °C 保存, 避免反复冻融。

1.2 小鼠舌黏膜组织病理学观察 在特定时间点处死小鼠后取舌头, 浸泡在 4% 多聚甲醛中, 脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色。舌癌的组织学分析: 在双盲实验中, 两名病理医师为小鼠舌黏膜病变程度打分, 使用如下打分系统: 0 = 无改变; 1 = 轻度异型增生, 上皮的紊乱及细胞异型局限在上皮下 1/3; 2 = 中度异型增生, 上皮紊乱及细胞异型局限在上皮的中 1/3; 3 = 重度异型增生, 上皮的紊乱及细胞异型超过上皮的 2/3; 4 = 浸润癌, 肿瘤细胞突破基底膜沿舌肌向下浸润。

1.3 iBT 定量蛋白质组学分析 在小鼠舌黏膜出现典型病变时取小鼠静脉血清即在 8 周(舌黏膜开始出现异常时)、16 周(轻度异型增生)、24 周(开始出现浸润癌)时。随机取其中 5 只小鼠血清混合后(满足 iBT 实验所需, 剩余血清进行其他实验)行 iBT 定量蛋白质组学分析(深圳华大基因), 血清蛋白

2018-05-04 接收

基金项目: 江苏省自然科学基金(编号: BK20171483)

作者单位: ¹ 安徽医科大学无锡临床学院口腔科, 无锡 214044

² 中国人民解放军第 101 医院口腔科, 无锡 214044

³ 南京医科大学附属口腔医院口腔基础教研室, 南京 210029

作者简介: 李 邦, 男, 硕士研究生;

孙应明, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sun_yingmingkqzj@163.com

按如下步骤进行分析: 蛋白提取、蛋白酶解、肽段标记、肽段分离、质谱检测。原始数据获得后进行如下分析: 选择蛋白数据库、Mascot(版本为 Mascot2.3.02) 搜索使用、蛋白 iBT 定量、差异蛋白通路富集分析。当蛋白差异满足差异比值 > 1.5 及 $P < 0.05$ 时, 认为该蛋白为差异蛋白。

1.4 统计学处理 差异蛋白统计学分析使用 IQuant 软件(华大基因) IQuant 显示蛋白差异有统计学意义是根据 Benjamini-Hochberg 算法中的多重假设分析。

2 结果

2.1 舌癌模型诱导 为了探索舌癌形成过程中, 血清蛋白表达的变化, 为舌癌的治疗及早期诊断提供依据。在小鼠的饮用水中加入 4-NQX 诱导小鼠舌黏膜癌变。在成瘤实验过程中, 小鼠在 16 周时开始出现活动性下降, 20 周时小鼠成堆蜷缩在笼子一角, 厌食, 活动减少, 且 1 只实验组小鼠死亡(死亡原因不明) 24 周时小鼠毛发稀疏无光泽, 颜部可见

食物碎屑结痂且潮湿, 部分小鼠呈恶病质状濒死状, 部分小鼠体重仅 16 g 左右。小鼠舌外观 8 周时开始出现邹缩、粗糙, 20 周时开始出现疣状物凸起及白斑, 24 周时小鼠出现疣状物凸起的比例增加, 且单个舌头上疣状物的数量增多(图 1 A)。病理学结果如下: 其中 8 周时 10 只小鼠舌黏膜均无明显异型增生, 但部分小鼠舌黏膜出现增生及过角化; 12 周时 70% 出现轻度异型增生; 16 周时 100% 出现轻度异型增生; 20 周时 33.33% 出现轻度异型增生, 44.44% 出现中度异型增生, 22.22% 出现重度异型增生。24 周时 10% 小鼠出现浸润癌, 10% 重度异型增生, 60% 中度异型增生, 20% 轻度异型增生(图 1 B、表 1)。

2.2 iBT 定量蛋白组学分析 两个对比组即 8 周/16 周和 16 周/24 周共发现差异蛋白 194 种, 其中 8 周/16 周共检测到 89 种差异蛋白, 其中 62 种上调蛋白, 27 种下调蛋白, 16 周/24 周共检测到 105 种差异蛋白, 其中 43 种上调蛋白, 62 种下调蛋白(图 2 A)。其中差异蛋白通路富集分析提示: RAS 信号通

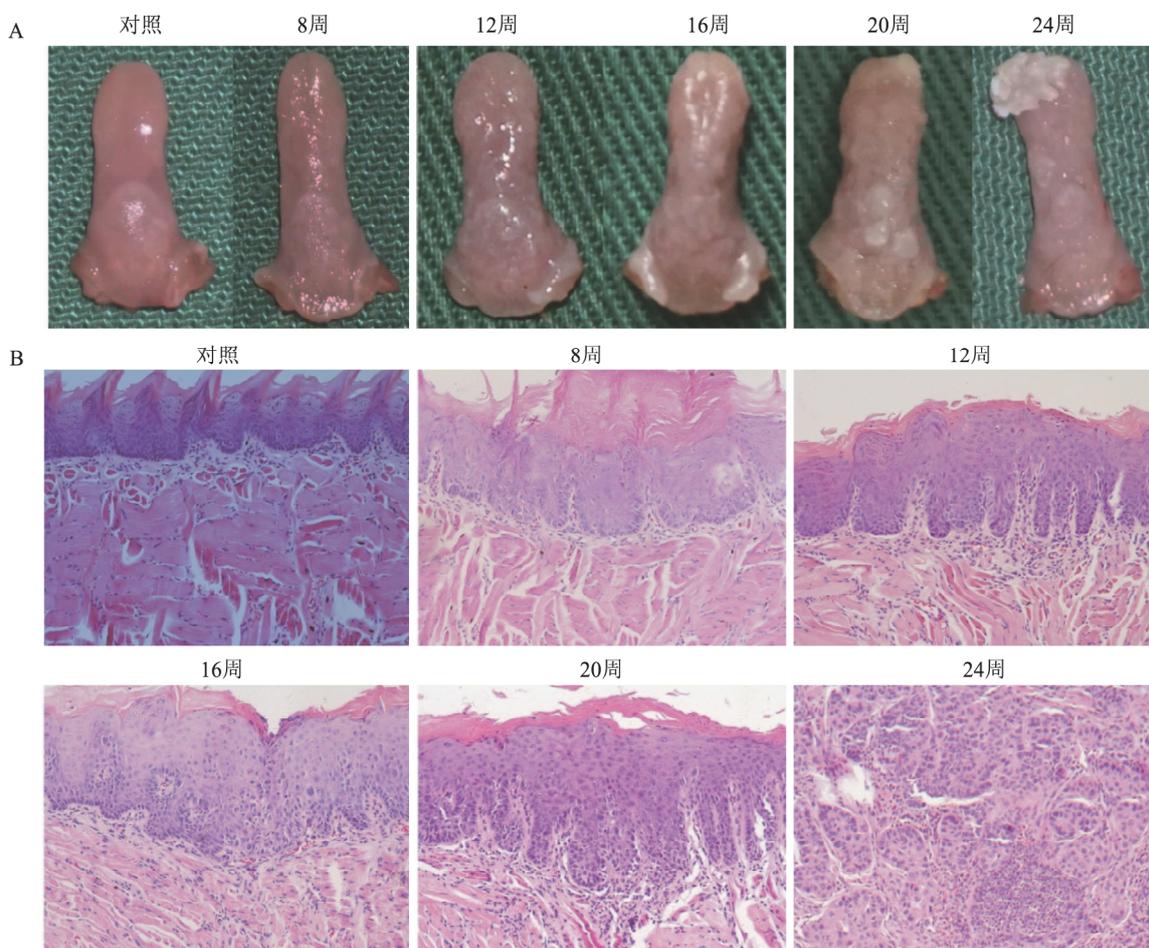


图1 4-NQX 诱导小鼠舌黏膜癌变

A: 小鼠舌黏膜在各时间点的改变; B: 各时间点小鼠舌切片 HE × 200

表 1 4-NQO 诱导舌黏膜癌变的结果(n)

异型增生 登记	8 周		12 周		16 周		20 周		24 周	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
0	10	10	3	10	0	10	0	10	0	10
1	0	0	7	0	10	0	3	0	2	0
2	0	0	0	0	0	0	4	0	6	0
3	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
合计	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10

表 2 蛋白组学结果:3 个时间点两个对比组的差异蛋白

对比组	蛋白编号	蛋白名称	蛋白覆盖比	唯一肽段数	比值	P 值
16 周 / 8 周	tr B9EHT6 B9EHT6	FN	0.496	5	0.658	0.001
16 周 / 8 周	tr Q8BP43 Q8BP43	TPMI	0.732	1	0.548	0.01
24 周 / 16 周	sp P97447 FHL1	FHL1	0.321	8	0.648	0.006
24 周 / 16 周	tr B9EHT6 B9EHT6	FN	0.134	1	0.486	0.047
24 周 / 16 周	sp P11499 HSP90B	HSP 84b	0.398	5	0.666	0.001
24 周 / 16 周	sp P63330 PP2AA	PP2A	0.217	2	0.610	0.022
24 周 / 16 周	tr E9QQ18 E9QQ18	ECM	0.213	21	3.155	0.001
24 周 / 16 周	sp P61982 1433G	14-3-3	0.263	4	0.640	0.006
24 周 / 16 周	sp P68254 1433T	14-3-3	0.249	3	0.665	0.002
24 周 / 16 周	sp P62259 1433E	14-3-3	0.396	8	0.658	0.001

路、NF-κB 通路、PI3K 信号通路、Pathway in cancer 信号通路、Proteoglycans in cancer 信号通路、JAK-STAT 信号通路、microRNA in cancer 信号通路在舌癌形成过程中持续异常。在 8 周和 16 周对比组中发现癌相关蛋白: 纤连蛋白(Fibronectin ,FN) 和原肌球蛋白 1(tropomyosin 1 ,TPMI) 低表达。在 16 周和 24 周的对比组中发现癌相关蛋白 Four and a half LIM domains protein 1(FHL1)、FN、热休克蛋白(heat shock protein 84b ,HSP 84b)、serine/threonine-protein (PP2A)、蛋白聚糖 4(Proteoglycan 4 ,ECM)、14-3-3 protein gamma subtype and MCG126220 and Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein(14-3-3) 低表达(图 2B、表 2)。

3 讨论

舌癌作为最严重的口腔疾病,但是常常被认为是其他口腔疾病如口腔溃疡、舌肿块等而被忽视,由于其早期转移率高,大多数在确诊时常常已发生了颈淋巴结转移,给治疗带来很大的困难。并且由于其缺乏早期诊断标志物,且常常被忽视,因而早期发现并诊断舌癌变得异常困难。

蛋白组学技术具有高敏感性和特异性,能广泛地分析鉴定蛋白质,在肿瘤的特异性标志物的筛选及肿瘤形成机制的研究中发挥着越来越重要的作用。血液是临床体检、疾病筛查等工作中常见的样本,其中血清中含有大量的免疫球蛋白和异质组织蛋白,在使

用血清作为临床筛选肿瘤的工作中已取得大量进展,在早癌的筛查中扮演越来越重要的作用。

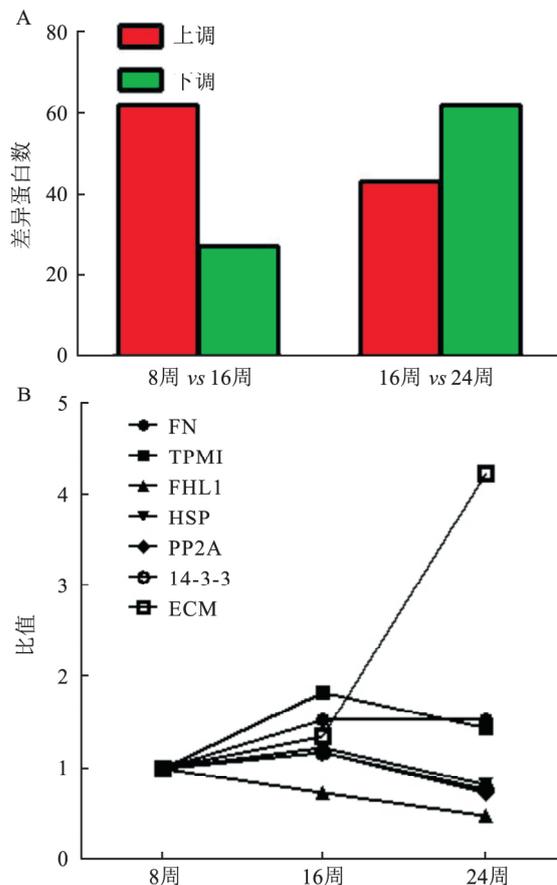


图 2 iBT 定量蛋白组学结果

A: 两个对比组差异蛋白总览; B: 肿瘤相关的差异蛋白各时间点变化折线图

因此课题组使用 4-NQQ 诱导舌癌模型,在特定的时间点取小鼠血清行蛋白组学分析,希望能筛选出有利于舌癌早期诊断的标志性蛋白质。在小鼠舌癌模型诱导方面,整个实验耗时 6 个月,模型诱导实验结束时小鼠开始出现浸润性舌癌,但浸润癌出现的比例不高,主要是由于小鼠状态不佳,部分恶病质体重仅 16 g 左右,呈现濒死状态,因而不得已结束小鼠舌癌诱导实验。诱导实验中使用小剂量致癌物长期刺激小鼠舌黏膜,且经历了小鼠生长发育的整个时期(性成熟期至中老年期),小鼠的舌黏膜病理改变从轻度异型增生到中度异型增生,然后为重度异型增生,最后发展为浸润癌,该过程与人类舌癌的形成过程相类似,能很好地模拟人舌癌的形成过程与诱因^[4]。

蛋白组学分析一共发现差异蛋白 194 种,其中 8 周/16 周共检测到 89 种差异蛋白,其中 62 种上调蛋白,27 种下调蛋白,16 周/24 周共检测到 105 种差异蛋白,其中 43 种上调蛋白,62 种下调蛋白。其中癌相关蛋白 FHL1、FN、HSP 84b、PP2A 等在舌癌形成的过程中有明显差异,未有文献明确报道其能作为舌癌的早期诊断标志物。但有多篇文献^[5-8]报道指出它们在肿瘤形成过程中表达紊乱。例如 FHL1 为肿瘤形成过程中的抑制剂,在肿瘤的形成和进展中发挥重要的作用,蛋白组学的结果提示其在舌癌形成的过程中对比 8 周持续低表达^[5]。基质及细胞中的 FN 能预测舌癌的进展及转归,当其在肿瘤基质中低表达时舌癌的预后较好,结果提示其小鼠舌癌形成的过程中低表达^[6]。HSP27 在舌癌的原发灶中的表达量与肿瘤的低分化关系密切,且其高表达提示患者有个良好的预后,蛋白组学的结果提示 HSP 84b 在舌癌形成中低表达^[7]。PP2A 被报道其有可能作为肿瘤的抑制器,蛋白组学的结果提示其在舌癌中高表达,特别是在肿瘤形成的最后阶段即 16 至 24 周时^[8]。通路分析结果提示癌相

关通路如: NF- κ B 通路、PI3K 信号通路、JAK-STAT 信号通路等信号通路在舌癌的免疫治疗被广泛应用^[9-10]。由于蛋白质学仅仅是初步筛选未能验证,因此课题组下一步计划在人舌癌及正常组织标本中验证蛋白组学中检测的蛋白质如 FHL1、FN、HSP 84b、PP2A 等,且对蛋白组学中检测到的可能的异常通路进行验证,进一步揭示舌癌形成的机制,为舌癌的早期诊断提供新的标志物。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Gamaes E, Kiss K, Andersen L, et al. Increasing incidence of base of tongue cancers from 2000 to 2010 due to HPV: the largest demographic study of 210 Danish patients [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(1): 131-4.
- [3] Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats [J]. *Oral Oncol*, 1997, 33(2): 105-9.
- [4] 代晓明, 刘华. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导 C57BL/6 小鼠舌黏膜癌变的研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2015, 33(4): 357-60.
- [5] Ji C, Liu H, Xiang M, et al. Deregulation of decorin and FHL1 are associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 20965-70.
- [6] Sundquist E, Kauppila J H, Veijola J, et al. Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(5): 640-8.
- [7] Wang A, Liu X, Sheng S, et al. Dysregulation of heat shock protein 27 expression in oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 167.
- [8] Schönthal A H. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2001, 170(1): 1-13.
- [9] Psyrri A, Seiwert T Y, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013: 246-55.
- [10] Isaacsson Velho P H, Castro G Jr, Chung C H. Targeting the PI3K pathway in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015: 123-8.

Screening of serum differential proteins by iBT quantification proteomics during 4-NQQ induced tongue cancer in mice

Li Bang¹, Wang Fei², Zhang Yajun², et al

(¹Dept of Stomatology, Wuxi Clinical College of Anhui Medical University, Wuxi 214044;

²Dept of Stomatology, The 101st Military Hospital, Wuxi 214000)

Abstract Objective Screening differentially expressed proteins in serum of tongue carcinoma by proteomics iBT technique to screen for tumor markers for early diagnosis of tongue cancer. **Methods** 4-nitroquinoline-1-oxide (4-

情绪相关脑电信号的特征选取与导联优化

李彤^{1,2}, 王永宗³, 张艺耀⁴, 彭宏³, 朱玲玲², 赵永岐^{1,2}

摘要 目的 探究与情绪密切相关的脑电特征,并藉此优化最少导联集合。方法 30名被试观看四类典型情绪图片(轻松、沮丧、愉悦、恐惧)并记录脑电信号。Fisher分数(F-score)算法筛选每导联脑电特征,使用支持向量机方法(SVM)分类四种情绪。结果 24名被试情绪诱发有效,四个特征组合(β 频带、 γ 频带、信息熵、微分熵)的F-score均值作为情绪有效性评价指标,筛选出分类准确率达81.15%的5个导联(FT7、T7、FC4、TP10、O1)。结论 利用校正后的F-score算法首次筛选出脑电信号的特征组合,获得与情绪密切相关的最优导联集合,极大地降低了运算时间,该结果对实现情绪的快速识别有重要价值。

关键词 情绪; 情绪识别; 脑电信号; 特征选取; F-score

中图分类号 R 318

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1517-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.007

2018-05-18 接收

基金项目: 军事医学科学院军事医学创新基金(编号: 2015CXJJ011)

作者单位: ¹ 安徽医科大学研究生院, 合肥 230032

² 军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 军事认知与应激医学实验室, 北京 100850

³ 兰州大学信息科学与工程学院, 甘肃省可穿戴装备重点实验室, 兰州 730000

⁴ 中国人民解放军空军总医院特诊科, 北京 100042

作者简介: 李彤, 女, 硕士研究生;

赵永岐, 男, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yqzhaoprc@sina.com

近年来, 脑电(electroencephalogram, EEG)以其低伪装性及较高时间分辨率在情绪识别领域中脱颖而出。研究^[1]表明, EEG高频成分可以反映人的情绪和认知状态, 其中 γ 和 β 频带比低频频带能更好地区分情绪状态的转换^[2]。Jie et al^[3]通过非线性特征样本熵实现了高低唤醒度和高低愉悦度的情绪识别。Duan et al^[4]在情绪识别中采用微分熵进行机器学习, 分类正确率最高为84.22%, 可见微分熵作为非线性EEG特征具有较高的分类效率。但庞大的数据量和导联数目的增加, 不利于情绪的快速识别。针对此问题, 该研究应用校正后的Fisher分数(F-score)算法, 筛选与典型情绪密切相关的线性和非线性的EEG特征和最优导联集合, 为实现情绪的快速识别提供可能。

1 材料与方法

1.1 筛选刺激图片和被试者 通过预实验, 从北京师范大学周仁来教授提供的中国化的情绪图片系统^[5]中筛选出60张情绪图片, 其中轻松情绪图片15张, 图片效价评分(6.72 ± 0.49)、唤醒度评分(3.77 ± 0.97); 沮丧情绪图片15张, 图片效价评分(2.88 ± 0.62)、唤醒度评分(4.97 ± 0.69); 愉悦情绪图片15张, 图片效价评分(7.26 ± 0.44)、唤醒度评分(5.80 ± 0.66); 恐惧情绪图片15张, 图片效价

NQQ) was used to induce tongue cancer in mice and serum proteomic analysis was performed at a specific time point during the development of tongue cancer in mice. **Results** At 24 weeks, mice were successfully induced into tongue cancer and some mice developed invasive carcinoma. The results of serum proteomics analysis were as follows, in the compare groups of 8 weeks vs 16 weeks, cancer-associated collagen alpha-1 protein was up-regulated and Fibronectin (FN) was down-regulated. FHL1, FN, heat shock protein 84b (HSP 84b), serine/threonine-protein (PP2A) and (14-3-3) were found down-regulated in the compare groups of 16 weeks vs 24 weeks. Signal pathway analysis showed that cancer-related signaling pathways such as RAS, NF- κ B, PI3K and JAK-STAT were abnormal in tongue carcinogenesis. **Conclusion** According to the results of iBT quantification analysis, FHL1, FN, HSP, PP2A, 14-3-3, etc. are found abnormally express in the process of tongue tumorigenesis. Those proteins may become markers for the diagnosis of tongue cancer. The abnormal pathways such as: NF- κ B, PI3K, JAK-STAT, etc. may become important targets for immunotherapy of tongue cancer.

Key words tongue carcinoma; animal model; 4-nitroquinoline 1-oxide; C57BL/6 mice; tumor marker; tongue cancer immunotherapy