

肿瘤标志物的蛋白质组学

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷, 复旦大学肝癌研究所 上海市 200032
项目负责人: 邱双健, 200032, 上海市医学院路, 复旦大学肝癌研究所.
wyq1415@sh163.net
电话: 021-64041990 传真: 021-64037181
收稿日期: 2003-10-27 接受日期: 2004-01-08

摘要

随着蛋白质组学概念的提出及其技术的不断发展,人们可以从细胞蛋白整体水平研究肿瘤的发病机制,寻找肿瘤诊断和预后的特异性标志.蛋白质组学表达模式研究的技术包括用于蛋白质分离的双向凝胶电泳,用于鉴定的质谱分析及用于蛋白质对比研究的数据库,这些技术正应用于肿瘤标志物的寻找和鉴定.人们已在肾细胞癌中找到相关的诊断标志,并建立了膀胱癌相关蛋白数据库;在肝癌研究中也发现了大量可能用于早期诊断和肿瘤分型的蛋白;在肺癌早期可检测“恶性”蛋白信号,预测肿瘤发生和观察化疗效果;在卵巢肿瘤中联合应用筛选的肿瘤标志和CA125可明显提高肿瘤的检出率;另外蛋白质组学方法在乳腺癌、结肠癌、白血病等疾病研究中的应用也日益广泛.尽管这项技术仍有不足,但他在不断完善,使我们能发现更多敏感、特异的肿瘤标志物.

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷. 肿瘤标志物的蛋白质组学. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1188-1190

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1188.asp>

0 引言

恶性肿瘤是一种多基因参与的复杂疾病.其基因表达分析涉及转录组及蛋白质组学方法.随着1994年Winkins提出蛋白质组学的概念和近期人类基因组计划的完成,生命科学已进入后基因时代,人们从组织和细胞蛋白整体水平研究肿瘤成为可能.因此用蛋白质组学方法从整体上研究肿瘤地发病机制,寻找肿瘤诊断和预后的特异性标记以及药物治疗的靶标已成为近期研究的热点^[1-3].

1 蛋白质组学研究的技术

蛋白质组学研究涉及蛋白质表达模式研究和功能模式研究,目前以前者研究较为集中.蛋白质表达模式研究的支撑技术主要有蛋白质的分离、鉴定技术和生物信息学.其中蛋白质的分离技术有O'Farrell于1975年创立的双向凝胶电泳(2DE),目前已发展到固相pH梯度(IPG)凝胶电泳、双向高效柱层析技术以及毛细管电泳法.2DE技术仍在不断地完善和改进中,如Pharmacia公司

的2DE-MS自动化系统及第二相电泳中,6-12块胶同时电泳的Etan系统.

蛋白质的鉴定技术主要为质谱法(MS),即利用样品离子化后,离子间的质荷比(m/z)的差异来分析确定样品的分子质量.现最常用的有两种,即电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS).

近来出现所谓第二代蛋白质组学研究方法为蛋白质精确定量开辟了新的途径.这些方法包括荧光差异显示双向电泳(fluorescence 2D differential gel-electrophoresis, F-2D DIGE)、Gygi建立的同位素亲和标签(isotope-coded-affinity tag, ICAT)和蛋白芯片等.为克服2D-MS系统的局限性,还出现液质联用技术:液相色谱-电喷雾质谱联用(LC-MS-MS)、电喷雾串联质谱(ESI-MS-MS)、多维色谱技术和多维蛋白质鉴定技术.

生物信息学应用于构建和分析2D电泳图谱及数据库的搜索和构建.目前应用最为普遍的是SWISS-PROT和GENPETP等组成的NRDB数据库及由美国国家生物技术信息中心/欧洲生物信息学研究所(NCBI/EBI)共同编辑的dbEST数据库.

2 蛋白质组学技术在肿瘤标志物研究中的应用

2003-03在美国圣巴巴拉召开的“肿瘤标志物:从发现到应用”会议上,大会主席Herbert A回顾总结了近年来生物技术发展对新的肿瘤标志物发现的作用时,认为2D电泳结合MS、高压液相分析(HPLC)、表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS),LC-MS-MS等技术使人们可以从蛋白质水平分析潜在的肿瘤标志物,从而使新标志物的发现提升到一个更高的水平^[4].

应用差异蛋白质组学技术可以比较肿瘤和正常细胞之间的蛋白质组异同,从而发现肿瘤特异性蛋白,找到肿瘤标志物,这是近期研究中的热点.

Sarto et al^[5]将10个肾细胞癌组织和10个正常肾组织的蛋白质双向电泳图谱进行对比分析,发现有4种蛋白质在肾癌中缺失,而谷胱甘肽过氧化物酶两种异构体、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)单体只出现在正常组织中,Mn-SOD多聚体只出现在肿瘤组织中,通过生物信息学进一步分析发现,该蛋白质表达变化与染色体变化存在着相关性,认为这种蛋白可以作为肾细胞癌的诊断标志物.

Celis et al^[6]采用 2D 电泳、微量蛋白质测序、MS、冰冻切片免疫荧光检测等方法对膀胱癌组织和原代培养的膀胱癌细胞进行研究, 从中发现 20 多个膀胱癌相关蛋白, 建立了膀胱癌蛋白质的数据库, 该库可以提供 2D 电泳凝胶图象、蛋白质的生物特性及与疾病进程的关系. 他们对膀胱鳞状细胞癌患者进行随访, 通过尿液中蛋白质组学变化判断有否肿瘤转移, 并发现特异性肿瘤标志物.

肝细胞肝癌(HCC)的肿瘤标志物研究较多, 除了临床最常用的甲胎蛋白(AFP)外^[7], 还包括癌胚抗原(CEA)、铁蛋白、 α -L-岩藻糖苷酶、 γ -GT、组织多肽受体、肝细胞生长因子(HGF)等^[8]. 目前肝癌标志物的蛋白质组学研究进展较快. Yu et al^[9]对照正常肝细胞系 L-02 和肝癌细胞 BEL7404, 发现了 99 种蛋白质点在表达的质和量上有显著差异; Seow et al^[10]用蛋白质组学方法研究肝癌细胞株 HCC-M 蛋白, 分析了 408 个点, 除发现部分看家蛋白外, 还分析与癌变相关蛋白, 如 14-3-3 蛋白、连接素(annexin)、抑制素(prohibitin)等; Ou et al^[11]对其中 301 个点进行 MALDI-TOF-MS 分析, 建立了 HCC-M 蛋白表达数据库; Poon et al^[12]用全蛋白组表达谱(comprehensive proteomic profiling)方法分析肝细胞肝癌(HCC)患者及慢性肝病患者的血清, 发现在常见的 2 384 个血清蛋白质组特征中, 有 250 个在肝癌和慢性肝病间有显著差异, 在进展期的肝细胞肝癌(包括有淋巴浸润和远处转移两种亚型)患者的血清中, 这些蛋白质聚集成簇, 由此认为通过蛋白质组学技术可以找寻特异的肿瘤标志物, 用于 HCC 的检测和分型. Le Naour et al^[13]用蛋白质组学分析了 37 例 HCC 患者和 31 例 HBV/HCV 慢性感染患者的血清, 同时还分析了 116 例其他肿瘤患者血清及 24 例正常者对照, 发现 10% HCC 患者的血清中可以检测到 8 种蛋白的自身抗体, 而健康人群中却没有. 在慢性肝炎患者血清中可检测出其中 4 种自身抗体, 检出率与肝癌相当, 另 4 种蛋白: Careticulin 异构体、细胞因子 8、核苷酸二磷酸激酶 A、F1-ATP 合成酶 β 亚单位的自身抗体只出现于 HCC 中, 与 HBV/HCV 状态无关, 其中 Careticulin 诱导的自身抗体在 HCC 中检出率为 27%, 因此认为这些抗体的检测可以在 HBV/HCV 高危患者中早期诊断 HCC. Steel et al^[14]根据 HCC 高危因素将研究对象分成健康人群组、健康 HBV 携带者组、活动性 HBV 感染者组和 HCC 患者组, 进行血清多肽的蛋白质组学研究, 发现补体 C3 羧基片段和载脂蛋白 A1 的异构体在 HCC 组中显著降低, 作者认为由于患者总数较少, 尚难作出这两种蛋白与 HCC 疾病进展完全相关的结论, 但蛋白质组学的方法无疑可以提高用于早期诊断的肿瘤标志物的检出.

Zhukov et al^[15]从肺癌筛选试验中获取的肺癌标本用激光捕获显微切割(LCM)获取纯细胞, 包括癌细胞、正常细胞及非典型腺瘤样增生(AAH)细胞, 进行 SELDI-

MS 分析, 建立每种细胞蛋白表达谱. 与正常细胞相比, 肿瘤细胞在 17-23 kD 质谱范围内有 3 个峰值, 在 AAH 中为低水平, 因此用 SELDI-MS 方法可以从肺癌或恶变前肺泡上皮中检出“恶性”蛋白信号. 这些蛋白信号可以从肺癌高危人群中检测肿瘤的发生, 监测肺癌化疗药物的疗效.

卵巢肿瘤在临床上仍缺乏敏感特异的肿瘤标志物, 因此蛋白质组学, 特别是高通量技术和生物信息技术在这方面应用较多, 以期发现有临床应用价值的肿瘤标志物. 有研究表明, 卵巢恶性肿瘤中调节细胞周期的 PCNA、癌蛋白(Oncoprotein) 18 等表达增高. Rai et al^[16] 1998/2001 收集了卵巢肿瘤患者术前的血清样本, 进行蛋白质组学研究, 在差异蛋白中筛选出 7 个标志蛋白, 并对其中 3 个进行纯化. 发现单独应用其中任一标志对卵巢肿瘤敏感性都不及 CA-125, 而联用 4 个标志, 则明显优于 CA-125. 如将特异性固定在 94% 时, 两个标志联合 CA-125 可使敏感性高达 94% (单用 CA-125 时, 敏感性为 81%), 因此认为用蛋白质组学方法可以筛选到敏感特异的肿瘤标志, 与现有的肿瘤标志物相结合可明显提高肿瘤的检出率. Petricoin et al^[17]用生物信息学技术, 通过对 50 例卵巢癌患者和 50 例非卵巢肿瘤人群的血清蛋白质谱特征建立运算模型, 并将该模型以盲法检测临床 116 份血清标本, 发现其敏感性为 100%, 特异性为 95%, 阳性预检准确率达 94%.

在乳腺癌肿瘤中, 核增生抗原和膜蛋白 HS90、pHS60 在侵袭性癌中高表达^[10]; 应用 SELDI-TOF-MS 方法可以对乳腺癌细针穿刺的样品进行蛋白质组学分析, 完成临床肿瘤标志物的检测.

另外蛋白质组学技术在结肠癌、白血病、淋巴瘤的肿瘤标志物研究中的应用也有不少报道.

3 前景与展望

总之, 蛋白质组学本身正在迅速发展, 同时随着其在肿瘤标志物研究中的广泛应用, 新的肿瘤标志物不断被发现, 这些标志物临床应用的重要性日渐凸现. 由于肿瘤标志物的多样性及复杂性, 须有国际间研究组织的合作, 以期建立网络数据库. 美国国家癌症研究所(The National Cancer Institute)建立了早期检测研究网(Early Detection Research Network, EDRN), 目的在于加速新发现的肿瘤标志物临床应用, 同时评估其危险因素. 该网络建立了生物标志物发展评价的五阶段标准: (1)临床前探索期, 确定可靠方向. (2)临床分析和验证期, 分析评价标志物对疾病的检测能力. (3)回顾性纵向分析设定的指标, 对临床前疾病的检测能力, 制定阳性筛选标准. (4)前瞻性观察标志物对疾病的检出率及假阳性率. (5)设计前瞻性临床随机试验, 对普遍人群进行筛查^[18].

Wei^[4]认为建立肿瘤的生物储备和组织库(biorepository and tissue bank)是非常必要的, 他可以成为发现新标志物的平台. 目前一项大规模的建库工作正在进行, 计划

收集 50 000 病例的完整的人口统计资料、临床数据和 3 a 随访分析结果。

尽管蛋白质组学技术仍有许多不足,但其本身的发展非常迅速,特别是高通量、自动化对大量基因及表达产物的大规模分析技术,使我们能够发现更有高度敏感性和特异性的肿瘤标志物用于临床。

4 参考文献

- 1 Hanash SM, Bobek MP, Rickman DS, Williams T, Rouillard JM, Kuick R, Puravs E. Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. *Proteomics* 2002;2:69-75
- 2 Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol* 2001;2:698-704
- 3 Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics* 2001;1:1295-1302
- 4 Wei WZ. Tumor markers: discovery to practice. *DDT* 2003;8:441-443
- 5 Sarto C, Frutiger S, Cappellano F, Sanchez JC, Doro G, Catanzaro F, Hughes GJ, Hochstrasser DF, Mocarelli P. Modified expression of plasma glutathione peroxidase and manganese superoxide dismutase in human renal cell carcinoma. *Electrophoresis* 1999;20:3458-3466
- 6 Celis JE, Ostergaard M, Rasmussen HH, Gromov P, Gromova I, Varmark H, Palsdottir H, Magnusson N, Andersen I, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Wolf H, Orntoft TF, Celis P, Celis A. A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *Electrophoresis* 1999;20:300-309
- 7 Birrer RB, Birrer DE, Klavins JV. Alphafetoprotein and hepatoma. *J Tumor Marker Oncol* 2001;16:403-468
- 8 Birrer RB, Birrer DE, Klavins JV. Markers of hepatocellular carcinoma. *J Tumor Marker Oncol* 2001;16:371-402
- 9 Yu LR, Zeng R, Shao XX, Wang N, Xu YH, Xia QC. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional

- electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:3058-3068
- 10 Seow TK, Ong SE, Liang RC, Ren EC, Chan L, Ou K, Chung MC. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:1787-1813
- 11 Ou K, Seow TK, Liang RC, Ong SE, Chung MC. Proteome analysis of a human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M: an update. *Electrophoresis* 2001;22:2804-2811
- 12 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003;49:752-760
- 13 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta LA. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:197-203
- 14 Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003;3:601-609
- 15 Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, Clark RA, Tockman MS. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre-malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry. *Lung Cancer* 2003;40:267-279
- 16 Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, Shih IeM, Pham T, Fung ET, Sokoll LJ, Chan DW. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1518-1526
- 17 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577
- 18 Sullivan Pepe M, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1054-1061

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文,如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文,将优先发表,使 WJG 成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。