

肺癌蛋白质组学常用研究方法

穆龙龙 朱朝晖

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院核医学科 北京 100730)

摘要 肺癌是死亡率较高的一种常见恶性肿瘤。因缺乏有效的早期诊断手段,多数患者诊断时已处于中晚期,预后很差。近年来,通过对肺癌患者进行相关的蛋白质组学研究,搜寻与肺癌相关的特异性肿瘤标志物,为临床肺癌的早期诊断、评估和预后提示许多新的发展方向。本文主要介绍与肺癌蛋白质组研究相关的实验技术,并综述近期研究进展。

关键词 肺癌 蛋白质组 质谱 2D-PAGE

引言

肺癌可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌。非小细胞肺癌又可分为三个组织学亚型:鳞状细胞癌(简称鳞癌),腺癌和大细胞癌,其中最为常见的是鳞癌和腺癌^[1]。肺癌是危害人类生存的最常见恶性肿瘤之一:它是男性肿瘤致死的首位原因;在女性中,其导致死亡的比例也正在超过乳腺癌。据 WHO 估计,21 世纪中国将成为肺癌发病率相对较高的几个国家之一^[2]。

临床诊断肺癌的主要方法有:胸部 X 射线检查、低剂量 CT、支气管镜检查、痰细胞学分析和肿瘤标记物(如癌胚抗原)检测等。然而,这些方法均缺乏足够的敏感性或特异性,往往无法对肺癌进行有效的早期诊断。因此,多数肺癌患者预后较差,5 年生存率很低^[3]。近年来,针对肺癌蛋白质组的研究已取得长足的进展,为探索肺癌的发病机制、早期诊断、转移和治疗评估提供许多新的发展方向。

蛋白质组是指在一种细胞内存在的全部蛋白质,这一概念是 Wilkins 等人于 1995 年提出的^[4]。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,从整体蛋白质水平研究细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,解释蛋白质功能和细胞生命活动的规律^[5]。Takefumi 和 P. David 认为^[6],将蛋白质组学应用于肺癌研究,不仅可以从蛋白质总体水平上揭示肺癌的发生、发展和转移机制,而且由于其可利用各种不同的组织进行分析,包括癌症患者的血液、体液等易获取的标本,极大地方便蛋白质组的临床检验应用。

1 双向凝胶电泳技术及其在肺癌方面的应用

肺癌蛋白质组的研究策略主要包括蛋白质组的分离和鉴定。在实际应用中,蛋白质组的分离和鉴

定往往是连续或同步进行的,二者没有绝对的界限。

双向凝胶电泳(2D-PAGE)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种有效的二维分离技术。完整的 2D-PAGE 技术包括样品制备、等电聚焦、平衡转移、SDS-PAGE、斑点染色、图像捕获和图谱分析等。其原理是基于不同蛋白质的等电点和分子量不同的特性:第一相是等电聚焦电泳,第二相是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[7]。利用银染或考马斯亮蓝染色,结合相关软件,可以对 2D-PAGE 的结果进行半定量分析;也可选择不同的荧光染料对样品进行定量荧光法分析。后者可实现自动化分析,从而大大减少人员的工作量。此外,2D 凝胶的结果还可以结合质谱进行分析,并通过大规模基因组和蛋白质组数据库的应用,使得对蛋白质的比照和分析更为全面^[6-8]。

Chen 等^[9]利用 2D-PAGE 技术和蛋白质微点阵技术结合,对约 100 名肺癌患者进行分析,成功报道磷酸甘油酸酯激酶(PGK1)可作为肺癌患者存活的预测蛋白。聂贇娟等^[10]利用 2D-PAGE 对健康人、I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞癌血清各 9 例样本进行 2D-PAGE,凝胶结果采用 Bandleader 图像分析软件对结合珠蛋白-2(HP-2)表达水平进行分析,提示 HP-2 在肺鳞癌患者血清中的表达水平高于健康对照($P < 0.05$),在 I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞癌血清中的表达水平无明显差异。

2D-PAGE 在实际应用中也存在着诸如对样本需求量大、难以进行大规模研究、容易造成极酸或极碱性蛋白质丢失和对低表达量(拷贝数 < 1000)及疏水性蛋白不易检测到等缺点^[4]。因此,单独应用 2D-PAGE 并不能对蛋白质组中可能的生物标志物进行直接而完全的确认^[11]。

不过,随着样品制备方法的完善,固相 pH 梯度 2D-PAGE 的应用及相关的图像分析软件性能的

提高,这种技术将能够达到较高的流通量、较高的分辨率和较好的重复性,并能很好地与质谱鉴定方法匹配。目前,这一方法仍是最常用、最经典的蛋白质分离检测技术^[12]。

2 质谱技术及其在肺癌方面的应用

质谱技术的基本原理:将样品分子离子化后,根据不同离子间质荷比(M/Z)的差异来分离,并确定其分子量。目前有3种质谱技术被应用于蛋白质组学研究^[5]:(1)基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)。(2)电喷雾电离串联-飞行时间质谱技术(electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, ESI-TOF-MS)。(3)表面增强激光解析离子化-飞行时间质谱技术(surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)。目前应用较广的是SELDI-TOF-MS技术。

2.1 MALDI-TOF-MS

此法操作简单,高效、快速,较小的样本甚至对少量的细胞即可以做分析。离子电荷通常为1~2个,而非多电荷离子,对分子量较大的样品而言,不会形成复杂的多电荷图,因而对图谱的解析比较清楚,适用于大样本的高通量蛋白质组的分析与筛选。此外,该技术对于样品中杂质的容忍程度相对较好。不过该技术对小分子量蛋白质的检测效果较差。鉴定到的蛋白质分子量覆盖度明显较小^[13]。

Howard B. A.^[14]对肺癌患者和健康人血清蛋白质组进行分析,结合MALDI-TOF-MS方法,发现两组样本存在离子峰值为11702Da的蛋白质的差异,经鉴定,认为这种蛋白是血清淀粉样蛋白A(SAA,相对分子质量为11682.7Da),这种蛋白质在肺癌患者血清中平均表达含量为286ng/mL,在健康人血清中为34.1ng/mL。作者认为利用MALDI-TOF-MS技术结合计算机分析,对于肺癌或其他疾病的血清生物标志物的筛选有很大用途。

冯燕国^[15]等人对SBC-5小细胞肺癌细胞系建立的蛋白质双向凝胶电泳图谱进行分析,发现蛋白质点分布以PI值4~7、相对分子质量20000~80000Da范围内最多,利用MALDI-TOF-MS技术与数据库检索,对其中一个蛋白质点作出鉴定,结合双向凝胶电泳相应蛋白质点的表观等电点、分子量、匹配片段的多少以及氨基酸序列的覆盖率等进行综合分析,最终成功确定该蛋白质为膜联蛋白A1(Annexin A1)。

2.2 ESI-TOF-MS

电喷雾离子化主要原理是将待测蛋白样品溶解在溶剂中,以液相方式通过毛细管到达喷口,在喷口高压作用下形成带电荷的微滴,随着微滴中的挥发性溶剂蒸发,微滴表面电场随半径减少而增加,到达某一临界点时,蛋白样品将以离子方式从液滴表面蒸发,进入气相,实现样品的离子化。然后再通过飞行时间-质谱技术检测其分子量。这一方法主要适用于针对小分子量蛋白质进行检测^[5,13]。

2.3 SELDI-TOF-MS

其基本原理最早于1993年由2002年诺贝尔化学奖获得者田中耕一提出。同年,美国的Bill Hutchens和Tai Yung Yip提出改良的表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术SELDI-TOF-MS^[16]。此技术集蛋白质芯片和质谱于一身,具有快速、高通量、高灵敏度等特点,可同时检测高分子量和低分子量蛋白质,为蛋白质组学的研究提供更为高效、便捷、准确的方法,因此,此技术在最近几年应用于肿瘤蛋白质组的研究正在快速增长。目前,对恶性肿瘤标志物筛选的研究主要依靠的是此种方法^[17]。

SELDI-TOF-MS技术由蛋白质芯片系统和质谱仪组成,蛋白质芯片系统的主要原理是利用固相表面所固定的不同物质对所需检验的蛋白质组进行分离。其中,“化学表面”蛋白芯片包括疏水性表面、阴离子交换表面、阳离子交换表面、固相金属亲和层析表面、亲水性表面以及混合型表面等,利用疏水性相互作用、共价键、离子键等作用方式对蛋白质进行分离;而另一类蛋白质芯片技术则利用一种预活化的“生物表面”,通过耦合一些生物活性分子,利用抗原-抗体、受体-配体、DNA-蛋白质等之间的相互作用,对蛋白质组进行分离和分析^[18,19]。

Han KQ等^[20]用金属亲和蛋白芯片和SELDI-YOF-MS技术对血清标本进行研究,先利用89例肺癌和68例年龄、性别匹配的对照建模,找到48个差异峰,利用其中3个(5808、5971和7779Da)建立树状分类方法,其灵敏度为91%,特异性为97%;然后对62例肺癌和34例健康对照进行盲筛,达到89%的灵敏度和91%的特异性,阳性预测值为90%。

Yang SY等^[3]利用SELDI技术对158名肺癌病人和50名健康人的血清蛋白质组进行分析,筛选出峰值在11493、6429、8245、5335和2538Da的5种蛋白质作为生物标志物,其对肺癌的灵敏度达到86.9%,特异性为80.0%,阳性预测值为

92.4%。在此数据基础上,发现以 SELDI 标志物对非小细胞肺癌的灵敏度为 91.4%,对 I 期和 II 期肺癌的诊断灵敏度为 79.1%,显著高于临床常用的血清标志物 Cyfra21-1 和 NSE。

赵健等^[21]利用 WCX2 蛋白芯片结合 SELDI-TOF-MS 技术,对 24 例肺腺癌和 10 例正常人血清蛋白质谱进行筛选,共检测到 86 个有效的蛋白质波峰,其中 m/z 位于分子质量 2000~10000 的波峰有 78 个。筛选出 m/z 分子质量为 8129.55、2022.18、3271.91、3933.44、3504.49 和 3811.71Da 的 6 个血清肿瘤标志物,以 m/z 为 8129.55Da 建立的诊断模型可区分肺腺癌患者与正常人,其灵敏度为 91.67%,特异性为 80.00%。

尽管 SELDI-TOF-MS 技术只能对蛋白质的相对分子质量做出测定,还不能直接对所检测到的蛋白质进行生物学特性分析,但是通过结合相关的下游技术,可对待测蛋白质的结构、功能和性质等做出全面的评估^[12, 22]。SELDI-TOF-MS 技术对于蛋白质功能的研究,蛋白质组的研究,乃至对新蛋白质的发现都有很重要的价值和应用前景。

3 展望

蛋白质组学技术在肿瘤研究中的应用,可以更为全面地揭示肿瘤蛋白表达水平的变化与肿瘤发展的不同阶段之间的关系,为肿瘤的早期诊断和有效治疗提供更多的可能性。针对肺癌的蛋白质组学研究,则可以鉴定出高表达的肺癌相关蛋白质,分析及鉴定肺癌抗原及自身抗体,探讨肺癌发生、发展的机理,以及研究肺癌蛋白质指纹图谱等,这些工作都为解决临床对肺癌早期诊断的不足提供可能性。相信随着相关技术的不断改进和完善,相关认识的不断深入,后基因组时代的蛋白质组学研究能够最终为临床解决肺癌的早期诊断难题,并在肺癌诊治过程中发挥重要的指导作用。

参考文献

- Masahiro Seike, Tadashi Kondo, Kazuyasu Fujii, et al. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics* 2005, 5(11):2939~2948
- Yao H, Zhang Z, Xiao Z, et al. Identification of metastasis associated proteins in human lung squamous carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis and laser capture microdissection. *Lung Cancer* 2008, (11):4
- Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer*. 2005,20(5):83
- 杨拴盈,南岩东,温雪萍. 肺癌蛋白质组学研究的现状与进展, *国际呼吸杂志*, 2006, 26(6):471~473
- 王彦艳,陈公琰. SELDI 蛋白质芯片技术及在肺癌肿瘤标志物中的研究进展, *实用肿瘤学杂志*, 2006, 20(5):455~457
- Kikuchi T, Carbone DP. Proteomics analysis in lung cancer: challenges and opportunities. *Respirology*. 2007,12(1):22~8
- 罗元明,刘彦信,郑德先. 蛋白质组学研究方法及其在生物学中的应用, *基础医学与临床*, 2003, 23(2):311~316
- 潘俊,刘延盛. 蛋白质组学技术及其在肺癌诊断研究中的应用进展, *医学研究生学报*, 2008, 21(6):652~656
- Chen G, Gharib TG, Huang CC et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin. Cancer Res*. 2002,8(7): 2298~305
- 聂赣娟,周建华,李茂玉等. 肺鳞癌患者与健康人血清的差异蛋白质组学研究, *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(3): 349~355
- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3(4):267~75
- 耿鑫,张维铭. 蛋白质组学研究方法及其新进展, *中国医学文摘·肿瘤学*, 2003, 17(4):339~341
- 潘俊,陈海泉. 诊断蛋白质组学及其在肺癌生物标记物中的研究进展, *实用医学杂志*. 2008, 24(9):1472~1473
- Howard BA, Wang MZ, Campa MJ, et al. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *Proteomics*. 2003,3(9):1720~4
- 冯燕国,张贺龙,冯英明等. 小细胞肺癌细胞系 SBC-5 蛋白质组双向凝胶电泳图谱的建立, *现代肿瘤学*, 2008, 16(6): 886~889
- 黄维华,赵健,王远东. SELDI-TOF-MS 技术在非小细胞肺癌中的应用, *世界肿瘤杂志*, 2007, 6(1):55~57
- Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, et al. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2005, 230(1~2):95~106
- Volker Seibert, Andreas Wiesner, Thomas Buschmann, et al. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChips technology in proteomics research. *Pathology – Research and Practice*. 2004, 200:83~94
- Popper HH, Kothmaier H. Proteomics-tissue and protein microarrays and antibody array: what information is provided. *Arch Pathol Lab Med*. 2008, 132(10):1570~2
- Han KQ, Huang G, Gao CF, et al. Identification of lung cancer patients by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Am J Clin Oncol*. 2008, 31(2): 133~9
- 赵健,黄维华,王远东等. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肺腺癌患者血清诊断标志物, *肿瘤基础与临床*, 2008, 21(1): 7~9
- Zhong L, Hidalgo GE, Stromberg AJ, et al. Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005, 172(10):1308~14

(下转第11页)

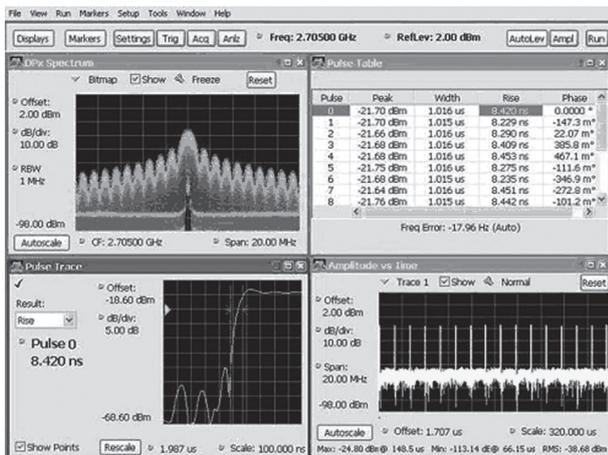


图 10 内嵌在实时频谱系统里面的脉冲测量分析软件

4 结束语

实时频谱分析不但具有一般频谱分析的功能,而且还具有时间测量、实时频谱、解调分析、发射参数测量、触发捕获等特殊功能。数字荧光显示技术和强大的触发捕获功能可以对特定的脉冲信号进行发现和捕获,可以用于跳频/雷达信号的捕捉;

时间测量功能可以用于跳频信号跳频频率表、跳频序列、跳频速度、跳频频道建立时间、跳频频道驻留时间等参数的测量,也可以用于雷达信号有关时间参数的测量。此外,实时频谱分析系统拥有独特的脉冲测量分析软件,可以全面的对复杂调制脉冲进行分析,特别适合对雷达信号参数的测量和分析。

参考文献

- 1 TEKTRONIX RSA6000 Training Materials[Z]
- 2 RSA6000 系列实时频谱分析仪用户手册 [Z]
- 3 张鹏,丁镇. 实时频谱仪在雷达对抗中的应用 [J], 现代雷达, 2007,29(3): 84~89
- 4 杨小牛等著. 软件无线电原理与应用 [M], 北京: 电子工业出版社, 2001
- 5 陈大海,张健,向敬成. 软件无线电体系结构研究 [J], 信息与电子工程, 2003,1(4): 318~323
- 6 梅文华等著. 跳频通信 [M], 国防工业出版社, 2005
- 7 肖晓萍等著. 电子测量与仪器(修订版) [M], 南京: 东南大学出版社, 2000
- 8 (美)威特(Witte,R.A.)著,李景威等译. 频谱和网络测量 [M], 北京: 科学技术文献出版社, 1997

The principle and application of real-time spectrum analysis

Liu Yujun¹ Wu Xiaodong¹ Wang Dongyang¹ Liu Xueling² Jiang Meilei¹

(1.Department of Information Engineering of Armored Force Engineering Institute, Beijing 100072)

(2.Academy of Armored Forces Engineering, Beijing 100094)

Abstract This paper focuses on the principle, structural design and application of real-time spectrum analysis. It firstly expounds the significance of the real-time analysis of the spectrum on spectrum management and signal analysis. Then, it gives an introduction on the principles, design concept and general structural design of a real-time spectrum analyzer; taking a real-time spectrum analyzer for example, it tackles measurement of a real-time spectrum analyzer on several parameters of radio frequency signal. Finally, the paper introduces some special functions and application of the real-time spectrum analysis, such as rapid detection of the signals between the pulses, triggering capture, real-time spectrum, time and pulse measurement and so on.

Key words Spectrum analysis Radio frequency signal Real-time capture Mask trigger

(上接第16页)

Common methods for proteomic analysis of lung cancer

Mu Longlong Zhu Zhaohui

(Department of Nuclear Medicine of PUMC Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100730)

Abstract Lung cancer is a common malignant tumor with high mortality. Lack of effective means for early diagnosis, the prognosis of lung cancer patients are usually very poor. The basic proteomic researches of lung cancer aim to find out potential bio-markers for early diagnosis, evaluation and prognosis of lung cancer. And the new developments are promoting the technologies possible for clinical application. This article introduced the common technologies for proteomic analysis of lung cancer, and reviewed the new developments in this field.

Key words Lung cancer Proteomics Mass Spectrometry(MS) 2D-PAGE