·综述·

蛋白质组学在肿瘤研究中的进展

杨 文[1]综述,陈 仁[2],林英姿[3]审校

关键词:蛋白质组学;肿瘤;进展
中图分类号:R341;R73 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)01-0049-03

0 引言

肿瘤是困扰人类的重大疾病之一。据卫生部卫生统计信息中心提供的《2001 年全国卫生事业发展情况统计公报》表明,我国城市居民中恶性肿瘤死亡率为135.59/10 万,位居各类疾病死亡率之首,在农村地区,死亡率为105.36/10 万,位居第三位。如何了解人类众多的基因与危害身心健康的疾病之间的关系,是生命科学研究者必须着手解决的一个重大问题。近年逐渐兴起的大规模蛋白质组学可以分析、鉴定肿瘤细胞的蛋白质分子变化,为肿瘤的预防、诊断、治疗及预后提供极有价值的信息。本文就蛋白质组学技术及其在肿瘤方面的研究进展作一综述。

1 蛋白质组学的定义

随着人类基因组计划研究成果的逐步公布及许多物种的基因组测序的快速推进,人们对基因的认识也逐渐清晰。生命科学也逐渐进入了后基因时代。1994 年,澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 首先提出蛋白质组(proteome)的概念,系指"一个细胞或一个组织基因组所表达的全部蛋白质",它是对应于一个基因组的所有蛋白质构成的整体,而不是局限于一个或多个蛋白质。近年来逐渐形成一门新兴学科——蛋白质组学,即是以蛋白质组为研究对象,应用相关研究技术,从整体水平上来认识蛋白质的存在及活动方式(表达、修饰、功能、相互作用等)的学科。

2 蛋白质组研究技术

2.1 样品的制备

在肿瘤研究领域,如何制备优良的肿瘤样品蛋白质是肿瘤蛋白质组学研究的首要问题。肿瘤样品主要有肿瘤细胞及肿瘤组织两大类。但由于肿瘤细胞系不能完全体现体内的真实情况,要真正解决临床的问题仍然离不开肿瘤组织标本的采集。肿瘤组织标本的获取过程受多方面因素的影响,如血液、结缔组织等。目前,可采用荧光标记的流式细胞仪(fluorescence-activated cell sorter,FACS)或激光捕获显微切割术(laser capture microdissection,LCM)进行取材从而克服组织内异质性的问题。近些年来,标本的制备除了肿瘤细胞和肿瘤组织外,还可取来自健康人和患者的体液标本如血清、尿液、脑脊液等进行蛋白质组学研究。

2.2 固相 pH 梯度等电聚焦双向电泳(IPG—2DE)技术

这是一类目前在蛋白质组学研究中应用最广泛的双向电泳技术,第一向是采用固相 pH 梯度(IPG)进行等电聚焦电泳,其根据不同的蛋白质分子所带电荷量的差异,以等电聚焦技术进行分离。从而克服了载体两性蛋白质引起的聚焦时间过长,pH 梯度不稳定、操作繁琐、阴极漂移等现象。第二向 SDS 凝胶电泳,蛋白质分子在 SDS 系统中的迁移率不受电荷和分子形状等因素的影响,其主要决定于蛋白质分子质量的大小。此外,双向高效柱层析、毛细管电泳也是分离蛋白质组分的有效技术。蛋白质可视化采用考马斯亮蓝染色和银染色,近年来,新的染色技术如荧光标记、同位素标记技术的出现,使其更向高灵敏度和自动化方向发展。双向电泳图谱反映了蛋白质组的特性,即蛋白质的种类和含量,其分析通常依赖于软件分析,如 melanie Ⅱ & 3,PDQuest 6.0,ImageMaster 2D Elite 3.10,Phoretix 2D 等。

2.3 质谱

利用质谱(MS)分析进行蛋白质鉴定,其基本原理是样品的分子离子化后,根据离子间质荷比(m/z)的差异来分离并确定样品的分子质量。蛋白质组研究中用质谱技术鉴定和注释蛋白质主要通过两种路线:一种是通过肽质谱指纹图(peptide mass fingerprinting, PMF)和数据库搜寻匹配的路线,进行

收稿日期:2003-09-16;修回日期:2004-07-29
基金项目:海南省教育厅高校科研资助项目(Hjkj200325)。
作者单位:1.571101 海口,海南医学院微免实验室;2.中南大学湘雅医院传染科;3.海南医学院微免教研室

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分析的质谱仪首选是 MALDI —TOF 质谱仪,另一种是通过测出样品中部分肽段二级质谱信息或氨基酸序列标签与数据库搜寻匹配的路线,适合于进行这种分析的仪器主要是电喷雾串行质谱仪。

2.4　生物信息学

生物信息学在蛋白质组学研究中的应用大致为:对双向电泳结果进行图像分析,从中寻找疾病与生理状态下表达有差异的蛋白质斑点,构建双向电泳图谱数据库;参与对双向电泳凝胶中的蛋白质斑点的鉴定,包括单独或综合运用质谱数据,氨基酸测序结果,氨基酸组成分析结果等数据查询数据库以鉴定蛋白质等。

3　蛋白质组学在肿瘤研究中的应用

在肿瘤研究中,应用蛋白质组学技术从新的角度研究肿瘤,能够动态、整体、定量地观察肿瘤发生过程,蛋白质种类和数量的变化,通过比较正常和病理情况下细胞或组织中蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态上的差异,可以发现与病理改变有关的蛋白质和疾病特异性蛋白质,这些蛋白质既可为疾病发病机制提供线索,也可作为疾病诊断的分子标记,还可作为治疗和药物开发的靶标,是目前肿瘤及其药物筛选研究中最新并且最强有力的手段之一,概述如下。

3.1　宫颈癌

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一。据 WHO 统计宫颈癌发病率居妇癌之首,尤其在非洲和东南亚国家及地区发病率较高,其死亡率仅次于乳腺癌位居第二位,其癌变机制尚未清楚。目前诊断宫颈癌主要依据宫颈细胞学涂片检查,但其早期诊断阳性率较低,因此寻找一种早期诊断和治疗宫颈癌敏感有效的方法极为迫切。Trejo-Becerril 等[1]学者运用 SDS-PAGE 方法对正常宫颈细胞及宫颈癌细胞的膜蛋白进行比较发现,在 29 例正常的宫颈细胞中有一种高度表达的蛋白质,但在 48 例肿瘤细胞中则有三种类型的蛋白质(Ⅰ型:25 %、Ⅱ型:29.2 %、Ⅲ型45.8 %) 且高分子量蛋白表达下调或丢失。Matsui -NM 等[2]利用 2-D 和 MALDI-TOF 质谱技术在 ME-180 宫颈癌细胞中鉴定出 IFN-γ、TNF 调节蛋白和三种细胞因子调节蛋白。

3.2　卵巢癌

恶性程度最高的妇科癌症之一。由于卵巢癌深藏于盆腔,患者临床症状隐匿,以致确诊时超过 70 %的患者已属晚期,其死亡率较高。卵巢肿瘤可以分为良性、交界性和恶性肿瘤。Alaiya 等[3]运用蛋白质组学方法对以上三种类型的肿瘤组织蛋白质组进行比较发现,PCNA、癌蛋白 1 8(Op1 8)和应激蛋白 calreticulin、p HSp60、HSp90 在恶性卵巢肿瘤中的表达水平升高 ,而原肌球蛋白 1、2 在交界性和恶性肿瘤中的表达水平下降。因此可通过蛋白质的变化来对肿瘤进行分类。

3.3　肺癌

肺癌对人类健康的威胁日益严重,其发病率和死亡率已居各类恶性肿瘤之首。Hirano 等[4]利用 2-DE 对 14 例不同组织学类型的肺癌组织的蛋白质组比较研究发现,微管蛋白-β、HSp90、PCNA 和核纤层蛋白 B 等在小细胞肺癌(SCLC)组织中高表达。Brichory 等[5]研究发现一个被称为 PGP9.5 的蛋白质不仅能在 14 %(9/64 例)的肺癌病人血清中引起自身抗体,而且在另外 2 例未查出抗体的肺癌病人血清中也检测到可溶性的 PGP9.5 自身抗原。因此,他们认为 PGP9.5 可作为肺癌筛查和诊断的生物标志物。

3.4　肝癌

肝癌为我国常见的恶性肿瘤之一。我国上海生化所应用蛋白组学技术分析了人肝癌细胞系 BEL-7404 和人正常肝细胞系 L-02 差异表达的蛋白质,他们发现谷胱甘肽巯基转移酶 —P 在人肝癌细胞系中的表达比在人正常肝细胞系中的表达高 18 倍,同时 HSp27、内质网钙结合蛋白(reticulocalbin)等 7 种蛋白质表达上调,高表达的蛋白质具有抑制凋亡,促进肿瘤细胞增殖作用,而表皮细胞脂肪酸结合蛋白(epidermal fatty acid binding protein,E-FABP)和脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(adipocyte-type fatty acid binding protein,A-FABP)只见于正常肝细胞,在肝癌细胞系中未检测到表达[6]。新加坡学者 Seow 等[7]也鉴定了一株乙型肝炎病毒表面抗原(HBs-Ag)阳性的肝癌细胞系 HCC-M 中表达的蛋白质,鉴定出约 400 个肝癌细胞特异蛋白点及一些肿瘤相关蛋白点,建立了该细胞系的蛋白质数据库。

3.5　肾癌

Sarto 等[8]对正常肾细胞与肾细胞癌细胞的蛋白质组比较研究结果表明,有 4 种蛋白存在于正常组织中而在肾癌细胞中缺失。这 4 种蛋白分别是:泛醌细胞色素 c 还原酶、线粒体 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶复合物 Ⅰ和两种未知蛋白。

除了以上阐述几种肿瘤的蛋白质组学研究外,目前国内外对神经母细胞瘤、黑色素瘤、胃癌等的研究也有了一定的进展。

4　前景与展望

蛋白质组学研究已在上述各种人类疾病研究中

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全面展开 ,其结果已经或即将应用于疾病的诊断,但它仍然存在一些亟待解决的问题,如对低峰度蛋白、极碱性蛋白、高相对分子质量蛋白的分离及对蛋白翻译后修饰的鉴定等,以及该技术在重复性、高通量、自动化等方面的不足,使得蛋白质组研究的技术平台目前还处于发展完善阶段。随着蛋白质组学不断的深入发展,人们对各种疾病必将有更深刻、更全面的了解,为疾病的诊断和治疗提供极有意义的新的手段。

参考文献:

[1] Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Membrane proteins in neoplasic and normal uterine cervix[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2001, 20(2):231-237.

[2] Matsui NM, Smith DM, Clauser KR, et al. Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3-4):409-417.

[3] Alaiya AA, Franzen B, Fujioka K, et al. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors[J]. Int J Cancer, 1997, 73(5):678-683.

[4] Hirano T, Fujioka K, Franzen B, et al. Relationship between TA01 and TA02 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features[J]. Br J Cancer, 1997, 75(7):978-985.

[5] Brichory F, Beer D, Le Naour F, et al. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(21):7908-7912.

[6] 俞利荣,王楠,吴高德,等. 人肝癌细胞系 BEL-7404 和正常肝细胞系 L-02 表达的蛋白质组双向凝胶电泳分析[J]. 科学通报, 2000, 45(2):170-178.

[7] Seow TK, Liang RC, Leow CK, et al. Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics[J]. Proteomics, 2001, 1(10):1249-1263.

[8] Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, et al. Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3-4):599-604.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]

www.cnki.net

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net