

基于 iTRAQ 标记结合 2D nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS 技术筛选卵巢癌血清标记物*

李莉^① 唐杰^① 于春霞^① 丁珊珊^① 王茜^②

摘要 **目的:** 利用相对和绝对同位素标记(iTRAQ)和纳升级二维高效液相色谱-电喷雾-OrbiTrap 质谱(2D nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS)蛋白质组学方法探寻卵巢癌血清标记物,以提高早期卵巢癌诊断率。**方法:** 收集卵巢癌患者血清20例(卵巢癌组),CA125异常的卵巢良性囊肿16例(良性囊肿组),健康者20例(正常对照组),每组取10例组内等量混合后去除高丰度蛋白,iTRAQ试剂标记,进行强离子交换柱分离多肽、nanoLC分离并在线连接电喷雾串联OrbiTrap质谱分析,筛选出重要的差异蛋白。随后采用Western blot方法,将筛选出的重要差异蛋白进行56例临床血清样本逐例验证。**结果:** 共鉴定出差异蛋白326个。其中重点筛选出了8个重要的差异蛋白:蛋白PARD3、SRP1-alpha、LAMA4、LRP16、IgSF2、NRAMP1、NF-E2-related factor 1和APOA4;验证了3个重要差异蛋白:PARD3、NRAMP1、APOA4。**结论:** 应用iTRAQ标记的定量蛋白质组学技术筛选出了8个重要的差异蛋白,可能是潜在的肿瘤标记物。其中APOA4蛋白有可能成为区分恶性与良性卵巢疾病的生物标志物。

关键词 卵巢癌 蛋白质组学 肿瘤标志物 iTRAQ

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.24.022

Search for Differentially Expressed Protein in Ovarian Cancer Serum Using iTRAQ and 2D Nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS

Li LI¹, Jie TANG¹, Chunxia YU¹, Shanshan DING¹, Qian WANG²

Correspondence to: Qian WANG; E-mail: 99ga@163.com

¹Department of Gynecology, Third Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, ²Public Health College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang (Grant No. 2011211A038)

Abstract Objective: The objective of this study is to detect ovarian cancer tumor markers using proteomics approaches of isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) and two-dimensional nano high-performance liquid chromatography-electrospray-OrbiTrap mass spectrometry (2D nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS) to improve the early diagnosis rate. **Methods:** Serum samples from 10 patients with ovarian cancer, 10 with benign ovarian tumor, and 10 normal women subjects were pooled with equal volume. A high abundance of protein was depleted after the balanced mix of the samples. The samples were then detected and identified by the iTRAQ-coupled 2D nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS technology. The proteins with significant differences were checked using Western blot in the 56 serum samples. **Results:** A total of 326 proteins were identified. Among these proteins, eight important proteins were interpreted, including proteins PARD3, SRP1-alpha, LAMA4, LRP16, IgSF2, NRAMP1, NF-E2-related factor 1, and APOA4. Using Western blot technology, three important proteins with significant differences were validated, namely, proteins APOA4, PARD3, and NRAMP1. **Conclusion:** The eight important proteins discovered using iTRAQ may be the potential tumor makers of ovarian cancer. As a novel protein, APOA4 may become a biological marker to differentiate malignant from benign tumor in a serum that has an elevated CA-125.

Keywords Ovarian cancer; Proteomics; Tumor biomarker; Tags

卵巢癌死亡率长期位居妇科肿瘤第1位,严重危害广大女性的健康。主要原因为就诊时60%~70%患者已属晚期。早期诊断卵巢癌是降低卵巢癌死亡率的主要措施。目前的诊断方法(妇科检查、经阴道超声、血清标记物CA125检测、腹腔镜检查和细胞学

检查等)在发现早期病例中均有一定的局限。因此,寻找一种新的早期诊断方法已成为临床研究的重点。利用肿瘤标志物对肿瘤进行早期筛查是一个有效途径。蛋白质组学技术的发展为寻找新的更加理想的肿瘤标志物提供了新研究方向。近年来出现的

作者单位:①新疆医科大学附属肿瘤医院妇科(乌鲁木齐市830011);②新疆医科大学公共卫生学院

*本文课题受新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2011211A038)资助

通信作者:王茜 99ga@163.com

相对和绝对同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术具有同时比较和鉴定低丰度蛋白、同时标记4~8个样本、检测样本广泛等特点,成为一种理想的寻找肿瘤标志物的技术,已被应用于多种恶性肿瘤血清标志物的研究中。本研究应用鸟枪法(shotgun)蛋白组学研究方法,基于iTRAQ技术和纳升级二维高效液相色谱-电喷雾-Orbitrap质谱分离检测技术平台进行卵巢癌血清定量疾病蛋白组学研究,为寻找用于卵巢癌早期诊断的血清肿瘤标志物奠定一定的临床前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2009年1月至2010年5月新疆医科大学附属肿瘤医院收治经病理证实为卵巢上皮来源的恶性肿瘤患者晨空腹血清20份,年龄33~70岁,平均年龄(50±11.6)岁,设为卵巢癌组;组织病理:浆液性腺癌8例,黏液性腺癌1例,子宫内膜样腺癌2例,中分化腺癌1例,中-低分化腺癌2例,低分化腺癌6例;期别:Ⅰc期1例,Ⅱc期2例,Ⅲc期17例。另选取同期收治的CA125升高的同时经病理证实为卵巢子宫内膜异位症患者晨空腹血清16份,年龄25~49岁,平均年龄(37±10.8)岁,设为良性囊肿组;CA125:47~232.8 mmol/L(正常值:0~35 mmol/L)。同期经体检无任何疾病的健康人群晨空腹血清20份,设为正常对照组。所采集的血清标本保存于-80℃冰箱。标本的采集经本院伦理委员会批准和患者本人或家属的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血清差异蛋白筛选 1)去除高丰度蛋白:每组样品先取10例冰上解冻。等体积混合得到混合血清。从中取20 μL,用缓冲液A各稀释4倍。加入0.22 μm的离心过滤器4℃ 16 000 g离心1 min,去除血清中碎片成分。取稀释血清80 μL,进行LC分离,流速0.125 mL/min,在11~16 min收集低丰度蛋白的流出组分。采用Bradford试剂盒检测馏分蛋白浓度。其余样本-80℃保存待用。2)蛋白定量标记:1.2 mL的预冷丙酮加入300 μL低丰度蛋白血清,见沉淀物形成。4℃ 15 000 g离心100 min,弃上清,沉淀室温放置20 min使丙酮挥发完全。然后加入20 μL溶解缓冲液漩涡混匀,使样品充分溶解。每组样品取100 μg,加入2倍体积的还原剂,漩涡混合,60℃孵育1 h。管内加入半胱氨酸封闭剂漩涡混合后室温孵育10 min。按1:30(胰酶:蛋白质)的比例向样品管内加入消化酶,漩涡混合,37℃孵育16 h。iTRAQ试剂室温冻融,每管iTRAQ试剂加入70 μL无水乙醇,漩涡混合。使之溶解后转入样品管。然后按照卵巢癌组加入质量

数为118的标记,良性肿瘤组119和正常对照组121的次序分别加入样品管,漩涡混匀,室温孵育1 h。3)标记多肽的2D-LC-MS/MS质谱分析:浓缩的iTRAQ标记样本加入2 mL稀释液,调溶液pH值低于3。采用HPLC柱进行阳离子交换色谱分析。由强阳离子交换柱分离活的组份经真空干燥,多肽采用20 μL溶剂A重悬,Nano LC分离并在线连接电喷雾串联质谱分析。实验采用的是Nano Aquity UPLC系统(Waters公司)Nano在线连接电喷雾离子源的LTQ Orbitrap XL质谱仪(Thermo公司)。所有MS/MS谱图采用Thermo公司的SEQUEST[v.28(revision 12)]软件进行,使用数据库为人Swiss-Prot数据库(Release 2010-04)。多肽分子量误差范围为15 ppm,碎片离子误差为0.1 Da。采用Trans Proteomic Pipeline Software(revision 4.2)蛋白软件鉴定蛋白和计算蛋白比例。多肽结果经Peptide Prophet($P=0.9$)和Protein Prophet(置信度0.95)过滤后用作蛋白鉴定。

各差异蛋白的功能和定位可以在蛋白数据库UniProt数据库中查询,汇总蛋白的功能可以获得总体蛋白的GO分类图。蛋白的pathway分析使用采用日本基因组数据库中的KEGG数据库进行pathway分析,选择合适的pathway用作蛋白的解释并为后续验证做参考。

1.2.2 蛋白质验证 采用Western blot方法,将蛋白质组学筛选出的重要差异蛋白进行临床血清样本56例(包括原有的卵巢癌10例,卵巢良性肿瘤10例以及正常人10例血清标本,并在该的基础上增至卵巢癌20例,卵巢良性囊肿16例,健康人20例)蛋白验证。

2 结果

2.1 质谱鉴定结果

数据经搜索蛋白质数据库及数据处理后,共鉴定出iTRAQ标记定量信息的蛋白326个。相比正常对照组,在卵巢癌组中上调1.2倍以上的差异蛋白有9个,下调1.5倍以上的有75个。相比正常对照组,在良性囊肿组中上调1.2倍以上的差异蛋白有32个,下调1.5倍以上的有103个。依据卵巢癌组与正常对照组的差异蛋白和良性囊肿与正常对照组的差异蛋白进行对比,得到卵巢癌组对比良性囊肿组上调1.2倍以上的差异蛋白有77个,下调1.5倍以上的有43个。

2.2 卵巢癌组、良性囊肿组和正常对照组定量鉴定蛋白的生物信息学分析

按Geneontology进行生物功能分类,发现卵巢

癌、良性囊肿组和正常对照组的定量鉴定蛋白主要参与多细胞器的发育(22.91%)、解剖结构发育(19.81%)、运输(19.81%)、定位的建立(19.81%)、生物质量控制(13.31%)、解剖结构形态发生(11.46%)等过程(图1)。按 Geneontology 进行细胞成分分类,发现定量鉴定蛋白主要发生在胞外基质成分、膜、细胞器成分等(图2)。

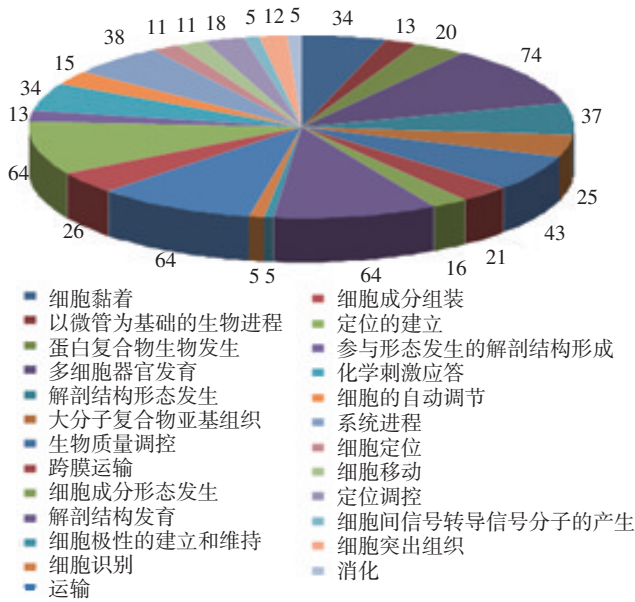


图1 GO分析-生物功能

Figure 1 GO analysis: biological function

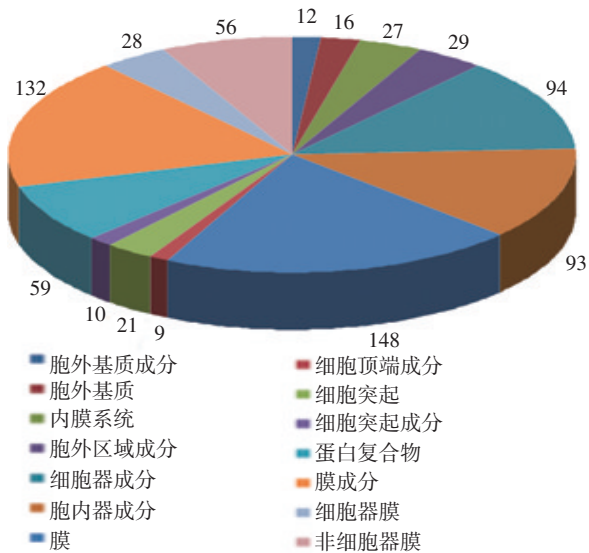


图2 GO分析-细胞成分

Figure 2 GO analysis: cell components

2.3 卵巢癌血清差异蛋白的筛选

在卵巢癌与卵巢良性囊肿的差异蛋白列表中差异倍数最显著的蛋白中,选择生物学功能意义重要的差异蛋白8个(表1)。

表1 卵巢癌与良性卵巢囊肿血清差异显著蛋白

Table 1 Proteins with significant differences identified from the serum of patients with ovarian cancer and benign ovarian cyst

序号	重要差异蛋白
1	splQ8TEW0IPARD3_HUMAN
2	splP52292(IMA2_HUMAN)
3	splQ16363ILAMA4_HUMAN
4	splQ9BQ69IMACD1_HUMAN
5	splQ93033IIGSF2_HUMAN
6	splP49279INRAM1_HUMAN
7	splQ14494INF2L1_HUMAN
8	splP06727IAPOA4_HUMAN

1)蛋白 Q8TEW0IPARD3_HUMAN,是产生于基因 PARD3 的蛋白(Partitioning defective 3 homolog)。在本研究中,良性囊肿组的PARD3有高幅度的上调表达(上调3.4倍),但在卵巢癌组里无变化。2)蛋白 P52292 (IMA2_HUMAN),是产生于基因 KPNA2 的蛋白 Importin subunit alpha-2,又称 SRP1-alpha 蛋白,在卵巢癌组里基本无变化,良性囊肿组表现上调(上调2.81倍)。3)蛋白 Q16363ILAMA4_HUMAN,是产生于基因 LAMA4 的蛋白(Laminin subunit alpha-4),该蛋白在卵巢癌组上调(1.21倍),良性囊肿组下调(以正常组为1,良性囊肿组较正常对照组差异倍数为0.68,下调1.5倍)。4)蛋白 Q9BQ69IMACD1_HUMAN,是产生于基因 MACROD1 的蛋白 MACRO domain-containing protein 1,又称 LRP16 蛋白,该蛋白在卵巢癌组轻微下调(0.93,以正常对照组为1),而在良性囊肿组大幅度下调(0.29,以正常对照组为1,下调>3倍)。5)蛋白 Q93033IIGSF2-HUMAN,是产生于基因 CD101 的蛋白 Immunoglobulin superfamily member 2,简称 IgSF2 蛋白,该蛋白在卵巢癌组上调(1.16倍),良性囊肿组下调(以正常对照组为1,良性囊肿组较正常对照组差异倍数为0.54,下调近2倍)。6)蛋白 P49279INRAM1_HUMAN,是产生于基因 SLC11A1 的蛋白(Natural resistance-associated macrophage protein 1,简称 NRA MP1 蛋白),该蛋白在卵巢癌组中上调(1.3),良性囊肿组下调(0.7)。7)蛋白 Q14494INF2L1_HUMAN,是产生于基因 NFE2L1 的蛋白(Nuclear factor erythroid 2-related factor 1,简称 NF-E2-related factor 1 蛋白),在卵巢癌组中下调0.6倍,在良性囊肿组上调1.3倍。8)蛋白 P06727IAPOA4-HUMAN,是产生于基因 APOA4 的蛋白[Apolipoprotein A-IV,简称 APOA4(或 APOA-IV)]。APOA4在卵巢癌组下调(0.7,下调>1.4倍),APOA4在良性囊肿组上调(1.24,上调>1.2倍)。

2.4 差异蛋白临床血清验证结果

从上述发现的8个重要蛋白中筛选出3个重要差异蛋白:APOA4蛋白、PARD3蛋白、NRAMP1蛋白。采用Western blot技术进行逐例血清样本的蛋白验证筛查。APOA4蛋白逐例验证了56例血清(卵巢癌组20例,良性囊肿组16例,正常对照组20例)。以灰度值的平均值计,卵巢癌表达量为0.54,卵巢良性囊肿表达量为0.79,正常对照组为0.61(图3),与疾病蛋白组学质谱定量结果趋势一致(质谱定量结果在卵巢癌组表达量最低,为0.7,良性囊肿组表达量最高,为1.2,正常对照组为1,介于其中)。PARD3蛋白Western blot结果差,有杂带,放弃用该蛋白做临床血清逐例筛选。NRAMP1蛋白逐例验证了血清21例(卵巢癌组9例,良性囊肿组6例,正常对照组6例)。在卵巢癌组中表达量最高(1.3),良性囊肿组表达量最低(0.7),正常对照组(1)介于其中(图4)。

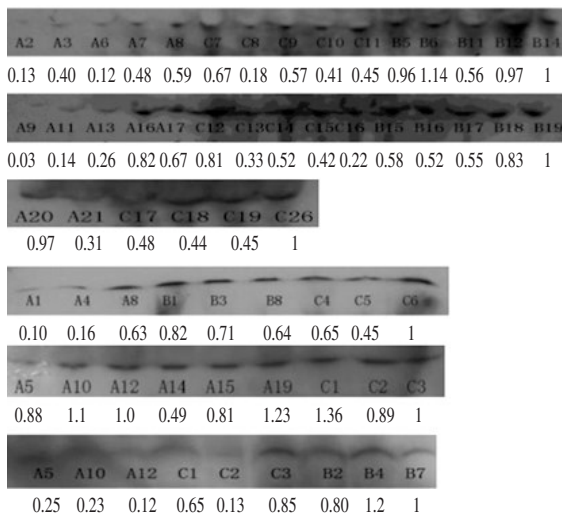


图3 Western blot逐例验证APOA4蛋白

Figure 3 Western blot atlas proved by the APOA4 protein case by case

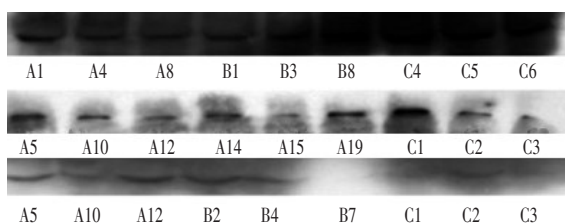


图4 Western blot逐例验证NRAMP1蛋白

Figure 4 Western blot atlas proved by the NRAMP1 protein case by case

3 讨论

与卵巢癌高度相关的糖类抗原CA125是目前临床上使用的卵巢癌主要肿瘤标志物。虽然临床上CA125明显升高多见于卵巢癌,但CA125的特异性并不理想,乳腺癌、胰腺癌、胃癌、肺癌等以及其他妇科肿瘤CA125也可能增高,同时有些非恶性肿瘤如子宫内膜异位症、盆腔炎、卵巢囊肿、胰腺炎、肝炎等疾病

甚至怀孕状态,CA125也会有不同程度的升高^[1-2]。另外对于早期肿瘤体积较小的病灶,敏感性低。在早期卵巢癌患者中阳性预测值较低(仅50%),这在临床上对卵巢癌的早期诊断造成较大困扰^[1]。

卵巢癌疾病蛋白组学研究进展迅速^[3-4],已筛选出许多潜在差异蛋白标志物。Amon等^[5]研究以血清和腹水为卵巢癌研究样本,在血清里筛选到54个定量蛋白,在腹水中找到358个蛋白,17个蛋白在两种样本中均定量测得,其中14个是细胞间基质相关蛋白,并对其中1个蛋白IGFBP1第一次进行了蛋白验证。有研究表明通过互补的iTRAQ和2-DE定量分析方法,结合LC-MS/MS,研究两种上皮性卵巢癌细胞株ToV-81D和TOV-112D蛋白表达图谱,找到了一系列具有转录活性、细胞代谢和细胞粘附等蛋白有研究等^[6]。近年来出现的iTRAQ技术可以寻找差异蛋白表达,并分析其蛋白功能,同时可以对1个基因组表达的全部蛋白质或1个复杂体系中的所有蛋白进行精确定量和鉴定,已被广泛应用到国内外的蛋白组学的定量研究中,具有极大的优越性^[7-10]。

本研究经搜索蛋白质数据库及数据处理后,在卵巢癌血清差异蛋白表达中共鉴定出iTRAQ标记定量信息的蛋白326个。其中重点筛选出了8个重要的差异蛋白,将其中发现的3个重要差异蛋白APOA4蛋白、PARD3蛋白、NRAMP1蛋白进行了验证。PARD3蛋白Western blot有杂带,结果差,放弃用该蛋白做临床血清逐例筛选。

NRAMP1蛋白的生物学功能是二价金属转运子,参与铁代谢和某些病原菌宿主抗性。该蛋白的表达机制与其等位基因的位点有很大关系,由等位基因2推动的该蛋白下调表达对炎症的发生发展有促进作用,而当那些推动该蛋白上调表达的等位基因占主导时,癌症和自体免疫性疾病更可能发生^[11]。在本研究中,该蛋白的表现与以往研究一致,在卵巢癌组中上调(1.3),良性囊肿组下调(0.7),这说明NRAMP1蛋白在卵巢癌、良性卵巢炎症的发生发展中也具有相当重要的作用,并很可能成为潜在的肿瘤标志物。逐例验证了血清NRAMP1蛋白21例(卵巢癌组9例,良性囊肿组6例,正常对照组6例)。其中,卵巢癌组分别做了卵巢癌早中期(3例)和晚期(6例)。该蛋白基本符合疾病蛋白组学的结果,在卵巢癌组表达量最高(1.3),良性囊肿组表达量最低(0.7),正常对照组(1)介于其中。但因其在各血清样本中波动较大(仅验证21例),所以判断该蛋白对于区分卵巢癌组与正常对照组实际应用意义会较低,不考虑大规模验证该蛋白。

APOA4基因位于人体11号染色体的长臂上,共

同组成 APOAI/C3/A4/A5 基因簇。APOA4 参与多种生理功能,包括脂质吸收、转运、胆固醇的反向转运及抗氧化功能等^[12]。近年来,APOA4 与肿瘤的关系日益引起关注,人们在子宫颈癌^[13]等血清中观察到 APOA4 水平降低。有报道部分肾癌患者^[14]和卵巢癌患者^[15]血液中的 APOA4 水平表达降低。尽管 APOA4 降低的机制还有待进一步的研究,但血液中 APOA4 水平降低,可在一定程度上作为诊断肿瘤辅助的生物学标记物。本研究中,APOA4 的变化同 Dieplinger 等^[15]观察到卵巢癌中 APOA4 的变化规律一致,APOA4 在癌组下调(0.7,下调>1.4倍),值得关注的是,APOA4 在良性囊肿组上调(1.24,上调>1.2倍)。虽然 Dieplinger 等^[15]认为 APOA4 的特异性 40.8%较低,不适宜用于生物标记物,但本研究显示在 CA125 升高的患者群中,APOA4 有可能成为区分恶性与良性卵巢疾病的生物标志物。APOA4 蛋白逐例验证了血清 56 例(卵巢癌组 20 例,良性囊肿组 16 例,正常对照组 20 例),在逐例验证中表现稳定,符合疾病蛋白组学的质谱定量结果,在卵巢癌组表达量最低(0.7),良性囊肿组表达量最高(1.2),正常对照组(1)介于其中。该蛋白 Western blot 结果以灰度值的平均值计,卵巢癌表达量为 0.54,卵巢良性囊肿表达量为 0.79,正常对照组为 0.61,与疾病蛋白组学结果一致。说明该蛋白在区分卵巢癌与正常对照,区分 CA125 高的样本中恶性与良性肿瘤具有重要意义。其作用机制目前尚属未知,还有待于进一步研究。

本研究所选择的卵巢癌患者均为晚期,原因是临床发现 I 期患者较少。另外存在部分患者术前未考虑为早期卵巢癌患者,产生标本漏取的情况。本研究得出的 APOA4 蛋白验证结果,也仅为对晚期卵巢癌和 CA125 升高的卵巢良性囊肿的小样本验证结果。APOA4 蛋白对于早期卵巢癌的诊断意义还需进一步扩大早期样本进行研究。

参考文献

- Bagan P, Berna P, Assouad J, et al. Value of cancer antigen 125 for diagnosis of pleural endometriosis in females with recurrent pneumothorax[J]. *Eur Respir J*, 2008, 31(1):140-142.
- Sarandakou A, Protonotariou E, Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2007, 44(2): 151-178.
- Faça VM, Ventura AP, Fitzgibbon MP, et al. Proteomic analysis of ovarian cancer cells reveals dynamic processes of protein secretion and shedding of extra-cellular domains[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2425.
- Palmer C, Duan X, Hawley S, et al. Systematic evaluation of candidate blood markers for detecting ovarian cancer[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2633.
- Amon LM, Law W, Fitzgibbon MP, et al. Integrative proteomic analysis of serum and peritoneal fluids helps identify proteins that are up-regulated in serum of women with ovarian cancer[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6):e11137.
- Gagné JP, Ethier C, Gagné P, et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer[J]. *Proteome Sci*, 2007, 5:16.
- Zhu M, Simons B, Zhu N, et al. Analysis of abscisic acid responsive proteins in *Brassica napus* guard cells by multiplexed isobaric tagging[J]. *J Proteomics*, 2010, 73(4):790-805.
- Ye H, Sun L, Huang X, et al. A proteomic approach for plasma biomarker discovery with 8-plex iTRAQ labeling and SCX-LC-MS/MS[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 343 (1-2): 91-99.
- 刘韬韬,薛如意,黄晓武,等.基于 iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术筛选肝细胞癌的生物标记物[J]. *中国临床医学*, 2010, 17(6): 771-774.
- 曹美群,吴正治,吴伟康.应用 iTRAQ 技术筛选乳腺癌白苔和黄苔患者血清差异表达蛋白[J]. *世界中西医结合杂志*, 2011, 6(7): 557-559.
- Awomoyi AA. The human solute carrier family 11 member 1 protein (SLC11A1): linking infections, autoimmunity and cancer[J]? *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007, 49(3):324-329.
- Nagasawa M, Akasaka Y, Ide T, et al. Highly sensitive upregulation of apolipoprotein A-IV by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in human hepatoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(12):1738-1746.
- Jeong DH, Kim HK, Prince AE, et al. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. *J Gynecol Oncol*, 2008, 19(3):173-180.
- Haiman M, Salvenmoser W, Scheiber K, et al. Immunohistochemical localization of apolipoprotein A-IV in human kidney tissue[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(3):1130-1136.
- Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, et al. Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(4):1127-1133.

(2012-04-23 收稿)

(2012-09-16 修回)

(本文编辑:邢颖)