

·综述·

蛋白质组学在肺癌诊治研究中的应用

戴明 综述, 罗荣城 审校

Application of Proteomics to Diagnosis and Treatment of Lung Cancer

DAI Ming, LUO Rong-Cheng

[ABSTRACT] With the completion of human genome sequence project (HGP), the application of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), mass spectrometry (MS), and bioinformatics, more achievements have been made in proteomics research. From the new point of view, looking for tumor-specific proteins with proteomics research strategy may help to elucidate the correlation of the change of protein expression to oncogenesis, and may play a vital role in the early detection of cancer and anticancer therapy including drug exploitation. This article briefly reviewed the relevant techniques, strategies, and application of proteomics research on lung cancer.

KEYWORDS: Lung neoplasm; Proteomics; Two-dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry; Application

【摘要】随着人类基因组计划的完成,双向凝胶电泳和质谱的应用以及生物信息学的引入,蛋白质组学的研究获得了极大发展。肿瘤蛋白质组学从新的角度研究肿瘤,寻找肿瘤标志蛋白,进而阐明其表达水平的变化与肿瘤发生、发展的相互关系,对肿瘤的早期诊断、治疗、药物研发等方面具有重要意义。本文就蛋白质组学的相关技术、策略及其在肺癌研究中的应用作一简要综述。

关键词:肺肿瘤;蛋白质组学;双向凝胶电泳;质谱;应用

中图分类号:R734.204; R34 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)06-0669-04

随着人类基因组计划的完成,生命科学的重心转移到蛋白质研究上,产生了一门新的学科——蛋白质组学(Proteomics)。“蛋白质组(proteome)”最早是澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 在 1994 年提出,并于 1995 年 7 月首次在《电泳》发表^[1]。目前认为恶性肿瘤是环境与遗传因素相互作用而导致的多种基因和蛋白质参与的复杂疾病。蛋白质组学在恶性肿瘤研究方面已形成了“肿瘤蛋白质组学”(cancer proteomics)分支,现以实体瘤研究为主,90%与上皮源性肿瘤相关。肺癌是全世界发病率较高的恶性肿瘤之一,随着蛋白质组学的发展,比较肺癌不同个体的组织(细胞)之间或同一个体肿瘤细胞与正常细胞之间蛋白质组的异同,可以发现一些特异性蛋白质,深入了解它们的结构和功能,将极大促进肺癌的发病机理、诊断、治疗和新药开发的研究,具有重要的理论和现实意义。

1 蛋白质组学研究方法

蛋白质组学主要涉及两方面:一是表达蛋白质组学的研究;二是功能蛋白质组学的研究。目前主要集中在前者,其支撑技术有:双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、质谱(mass spectrum, MS)和生物信息技术。而后者则揭示蛋白质组成员间的相互作用、相互协调的关系,并深入了解蛋白质的结构与功能的相互关系及基因结构与蛋白质结构功能的关系,是蛋白质组学研究的最终目标,主要有免疫沉淀、蛋白质亲和纯化、酵母双杂交系统(yeast two hybrids system)、蛋白质芯片(protein chip)等技术。

1.1 经典技术

2-DE 是目前蛋白质分离最有实用价值的核心方法。随着疏基尿素等特殊溶解剂的引入,宽(pH3~12)、窄(pH1.0~1.5)固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)凝胶的联合应用和显

南方医科大学南方医院肿瘤中心,
广东 广州 510515

Center of Oncology,
Nanfang Hospital,
Southern Medical University,
Guangzhou, Guangdong, 510515,
P. R. China

通讯作者:罗荣城

Correspondence to: LUO Rong-Cheng

Tel: 86-20-61641651

Fax: 86-20-87726110

E-mail: lrc@nfhoc.com

收稿日期:2006-07-30

修回日期:2006-12-04

色方法的发展,使得 2-DE 分离效果明显提高,能够在不同实验室之间、不同细胞和组织之间、同一组织细胞正常与异常状态之间及疾病状态下组织细胞在不同时期或接受治疗前后,进行数据比较。质谱分析是蛋白质鉴定的核心技术,标本在离子发生装置内离子化;在分析装置内根据质量电荷比差异来分离;经检测装置中电子放大器的测定,获得肽质量指纹(peptide mass fingerprinting, PMF),其结果与数据库查询匹配。由于蛋白质转录后修饰所致质量改变及多肽均能获得不同的质谱,故质谱不仅能明确蛋白质性质,还能反映蛋白质功能状况。现常用电喷射离子化(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解析电离化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS),后者对标本中的金属盐类、磷酸、尿素等具有较高耐受性,更适于分析消化后的样本。表面加强激光解析电离化飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)是美国 Ciphergen Biosystem 公司开发的技术,可直接在固相蛋白质芯片表面使用脉冲氮激光,将捕获的靶蛋白从芯片表面电离出来,记录其飞行时间,被测蛋白质在谱图的位置取决于飞行时间并以一系列峰的形式呈现。由于芯片具备高集成、超微化、自动化等技术,具有多样、快速等优点,是目前飞行质谱的首选。夏梁等^[2]选用 3 种不同类型细胞来源的体外培养的肺癌细胞株(A549、Calu-6 和 PG),利用 SELDI 确认 24 个标志蛋白,10 个表达增高,14 个表达降低。其中 4353Da 和 4873Da 可被两种蛋白质芯片同时捕获。比较 3 种肺癌细胞株的蛋白质谱差异时,发现 3 个标志蛋白只在 PG 细胞株中高表达,3 个标志蛋白在 A549 和 Calu-6 细胞株中高表达。杨拴盈等^[3]用 SELDI 筛选 5 个蛋白峰作为一个标志物组合模式,建立分类树模型,并用盲筛组验证,其敏感性、特异性及阳性预测值分别为 83.7%、80.0% 和 91.1%,结果认为应用该技术为非小细胞肺癌的筛查和早期诊断提供了新的有效工具。

生物信息技术在蛋白质组学中的应用有两方面:一是通过与数据库中的已知蛋白质比较来判断未知蛋白质的功能;二是预测蛋白质结构,判断蛋白质有无发生修饰。目前数据库有:2-DE 和蛋白质搜寻数据库,前者把各种来源的蛋白质通过 2-DE 分离并进行质谱分析,建立数据库和网上查询系统,现应用最普遍的有 NRDB 和 dbEST 数据库。后者利用基因组学的蛋白质信息,通过计算机推测出各蛋白质的氨基酸序列、分子量等,进一步推测出各蛋白质经不同酶消化后产生的氨基酸序列、分子量等,从而建立相关搜寻数据库。质谱分析获得的肽质谱转变为蛋白质信息,是该数据库的功能之一。Oh 等^[4]鉴定大量不同类型肺癌表达的蛋白质,建立了肺癌蛋白质表达资料库,有利于肺癌的分类及鉴定新的早期诊断标志物。詹显全等^[5]用 2-DE 和 MALDI 分析人肺鳞癌细胞 NCI-H520 蛋白质组分,初步鉴定 44 个蛋白质,其中有细胞周期相关蛋白、信号转导相关蛋白及癌基因相关蛋白,完善了人肺鳞癌细胞蛋白质组数据库。邓斌等^[6]用 2-DE 检测肺癌患者的蛋白质表达,结合 SWISS-PORT 和 TrEMBL 蛋白数据库确定 17 个与肺癌相关,另有 7 个蛋白质与其它肿瘤相关。李茂玉等^[7]用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术分离 NCI-H446 细胞总蛋白,凝胶银染显色,应用 MALDI 和数据库,鉴定了 58 个蛋白质,其中大多数与细胞代谢、信号转导和增殖相关,为进一步构建小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 蛋白质表达数据库奠定了基础。

1.2 其它技术手段

由于 2-DE 手工操作难以掌握,耗时长,对低拷贝数、疏水性、分子量极大(小)、极端酸(碱)性蛋白质,都很难分离,加之高效液相色谱、毛细管电泳、电色谱技术等灵敏度、分离效果、速度及成本消耗等方面的优势和长处,人们正开发新技术来获得图谱。结合应用差异凝胶电泳(different gel electrophoresis, DIGE)通过荧光识别特定蛋白质点的丰度变化、缺失或新蛋白质点的出现;同位素编码亲和标记(isotope coded affinity tags, ICAT)的液相色谱和串联质谱(liquid chromatography and tandem

mass spectrometry, LC-MS/MS)联用定量分析蛋白质混合物;多维蛋白质识别技术(multi-dimension protein identification technique, MUDPIT)将蛋白混合物酶解消化后,经多维肽色谱预分离,再用串联质谱仪对肽混合物进行鉴定分析。此外,质谱鸟枪法(shot-gun)、毛细管电泳-质谱(CE-MS)联用等新方法已用于直接鉴定全蛋白质组混合酶解产物。Fliser 等^[8]介绍了 CE-MS 联用检测患者的尿液、脑脊液等体液的蛋白质组学研究,肯定其在临床诊断及生物标志物鉴定上的作用。

2 蛋白质组学在肺癌诊治中的临床应用

2.1 诊断

2.1.1 寻找肿瘤标志物 依托大规模 2-DE/MS 系统,筛选和鉴定特异性肿瘤标志物,提高早期癌症诊断的特异性和敏感性,这是当前肿瘤蛋白质组学研究的重点和热点。Yanagisawa 等^[9]用 MALDI 识别出 1 600 余峰,同时建立分型预测模型。应用该模型对 37 例肺癌和 6 例正常肺组织标本进行盲法测试,以评估进行肺癌组织学分型及区别原发瘤和转移瘤的准确性,结果准确率达 85%。由 15 个明确质谱峰组成的蛋白质图谱还对非小细胞肺癌术后预后情况进行评价,鉴定出 3 个蛋白质作为肿瘤标志物。其中, SUMO-2 是与致瘤生成作用具有潜在相关性的蛋白,胸腺素- β 4 已被认为同肿瘤增殖密切相关。Chen 等^[10]证实糖酵解高表达的患者预后不良,并发现 4 个可调节糖异生和糖酵解的蛋白(磷酸甘油酸激酶 1、磷酸甘油酸变位酶、 α -烯醇化酶、丙酮酸激酶 M1)与生存相关。Maciel 等^[11]对 III B 和(或)IV 期男性肺癌患者的血清进行 2-DE 和 MALDI 检测,发现 5 个蛋白质上调(免疫球蛋白 λ 链、甲状腺激素结合蛋白单体、结合珠蛋白 α 2 和 2 个血清淀粉样蛋白亚型),1 个蛋白质下调(载脂蛋白 A-I 片段)。张丽娟等^[12]采用蛋白质组学等技术首次在血清中发现核内小核糖体蛋白 U1-A (U1-A small nuclear ribonucleoprotein, U1-A snRNP)自身抗体。它与肺癌的亚型、患者的病程密切相关,该项检测可纠正或

补充 SELDI 结果,进一步提高肺癌患者的阳性检出率。Okano 等^[13]用 2-DE 检测肺癌患者血液样本,发现 364 个蛋白质点表达水平两倍于正常人,质谱分析证实同 58 个基因产物相关(如丛生蛋白、凝溶胶蛋白、磷酸丙糖异构酶等)。

2.1.2 研究蛋白差异表达 詹显全等^[14]采用 2-DE/MS 技术分析人肺腺癌 A549 细胞与正常支气管上皮 HBE 细胞间差异表达的蛋白质,鉴定出 18 个蛋白质(如:多发蛋白酶抑制子 2、白介素 12 和 CD27 轻链受体)。谢玲等^[15]利用固相 pH 梯度双向电泳、肽质量指纹谱等技术,对 Maspin 蛋白在永生化细胞系及恶性转化细胞系的表达进行功能蛋白组学分析。凝胶图像分析和 Northern blot 均显示 Maspin 在永生化细胞系中表达较恶性转化细胞系高,提示:Maspin 在细胞转录和翻译水平的表达异常可能是肺癌发生的原因之一。邹志鹏等^[16]采用不同的 IPG 双向凝胶电泳,优化 SPC-A1 细胞株图谱,获得较为清晰的蛋白质斑点,并重点分离了特定区域的蛋白质,为进一步分析药物处理前后的总蛋白质表达差异创造了条件。蒋代凤等^[17]采用比较蛋白质组技术对肺巨细胞癌高、低转移株的蛋白质表达谱进行 2-DE 分离和 MALDI 分析,鉴定了 11 个肺癌转移相关蛋白,其中核氯离子通道蛋白 1(CL11)、白介素 18 与转移相关,可能是新的肺癌转移相关蛋白。李萃等^[18]利用 IPG 双向电泳分离人肺鳞癌组织及癌旁正常支气管上皮组织的总蛋白质,以识别差异表达的蛋白质;应用质谱仪得到相应的肽质指纹图谱,鉴定出一些与瘤基因、细胞周期调控、信号转导等有关的蛋白质,为筛选肺鳞癌特异性分子标志物奠定基础。朱文等^[19]应用 IPG 双向电泳、MALDI-TOF-MS 和蛋白质数据库对 L9981 和 NL9980 细胞株的蛋白质表达进行差异鉴定,发现人高、低转移大细胞肺癌细胞株的蛋白质组表达存在明显差异,19 个蛋白质点在两种细胞株中均存在,其中 9 个蛋白质点在 L9981 中表达量显著高于 NL9980,10 个蛋白质点在 NL9980 中表达量显著高于 L9981,为进一步发现肺癌转移相关分子和阐明肺癌侵袭转移的分子机制提供实验证

据。吴广平等^[20]采用 2-DE 对肺癌患者与健康者的胸腔积液进行蛋白质表达的差异分析,获得独有点数 36 枚,考虑是肺腺癌细胞分泌的特有蛋白质,可作为判断良、恶性的客观标准。在相互匹配的 149 枚蛋白质中,可通过染色强度定量分析蛋白差异,在肺腺癌细胞组上调 > 2 倍的有 23 枚,上调 > 5 倍的有 7 枚;下调至 50% 以下的有 24 枚,下调至 20% 以下的有 6 枚。

2.2 治疗及药物开发

高通量的蛋白质组学研究技术在发现药物靶蛋白方面具有不可比拟的优势,具体地说,通过分析比较化合物处理(治疗)前后组织或细胞的蛋白质表达图谱,不仅可快速获得该化合物的药效和毒理方面的信息,而且可将化合物作用的靶蛋白构建成分子药理学模型,用于大量新化合物的筛选和评价其药物效能,或观察蛋白质信号通路中的关键性节点分子,进行靶向治疗。Bergman 等^[21]发现肺癌组织中组织蛋白酶 D 的表达量 6 倍于正常组织,它的功能主要是分解细胞外基质,增加肿瘤的侵袭性并促细胞增殖,是未来研制单抗药物的分子靶点。Pandey 等^[22]在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号转导通路的蛋白质组研究中揭示了鸟嘌呤核苷酸交换因子(vav-2)及其它一些蛋白质在分子信号通路中的作用。Wu 等^[23]发现一天然真菌(*Antrodia camphorate*)可有效地抑制人肺腺癌 A549 细胞系的增殖,2-DE 和 LC-ESI-MS 分析发现与 5 个蛋白质点明显下调相关(人 Galectin-1、人真核翻译起始因子 5A、人 RhoGDP 解离抑制因子 α 、人钙依赖蛋白酶小亚基和人 AnnexinV)。肿瘤的耐药现象是目前肿瘤化疗失败的重要原因,是当今癌症治疗方面亟待解决的难题。相信通过对发生耐药的肿瘤细胞进行蛋白质组学研究,分析蛋白质在诱导肿瘤细胞耐药过程中的改变,为今后解决肿瘤耐药性提供线索。

3 问题与展望

蛋白质组学研究已成为后基因时代研究的主流,高通量、全自动化的蛋白质纳摩尔分析技术将会是未来新的

支持技术。目前利用蛋白质组学技术可分离出患者血清中以纳摩尔至皮摩尔(远低于白蛋白的 $10^6 \sim 10^9$ 倍)的浓度级出现的蛋白质点或峰值^[24]。陈岗等^[25]在经过特殊处理的痰液中滴入纳米复合体粒子,可识别 90% 以上的癌细胞。由于纳米功能粒子表面活性强,胺基团含量增多,使得单位质量微球表面的特异性蛋白含量相应增加,从而提高了对复杂体系中肺癌细胞的俘获能力,镜下显示癌细胞表面全部被纳米复合体粒子覆盖,此研究有望作为早期诊断的依据。尽管蛋白质组学带来了比基因组学更富于功能性的研究方法,但蛋白质组学技术仍存在许多不足,低丰度蛋白质的分辨能力还需要提高;极端酸性、碱性和难溶性蛋白质的分离鉴定也有待解决;一些技术如酵母双杂交系统、生物传感芯片质谱和蛋白质复合物纯化仍需进一步改进。随着肺癌蛋白质组学研究的不断深入发展,与基础肿瘤学、临床肿瘤学等多学科的结合,必将不断产生新的生物分子靶标,为肿瘤的早期诊断、靶标治疗、新药研发和预后带来广泛深入的影响,为人类最终攻克肿瘤做出贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: mycoplasma genitalium [J]. Electrophoresis, 1995, 16 (7): 1090-1094.
- [2] 夏梁,蔡伟丽,张丽娟,等.体外培养的不同亚型肺癌细胞株差异蛋白的初步分析 [J]. 现代仪器, 2004, 10(1): 12-16.
- [3] 杨拴盈,肖雪媛,张王刚,等.用蛋白质芯片技术筛选非小细胞肺癌患者血清中标志蛋白 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(1): 31-34.
- [4] Oh J M, Brichory F, Puravs E, et al. A database of protein expression in lung cancer [J]. Proteomics, 2001, 1(10): 1303-1319.
- [5] 詹显全,陈主初,关勇军,等.双向凝胶-飞行时间质谱法分析人肺鳞癌细胞 NCI-H520 蛋白质组成分 [J]. 癌症, 2001, 20(6): 575-582.

- [6] 邓 斌,罗国安,王义明,等. 蛋白质组学方法应用于人肺癌组织蛋白表达的研究 [J]. 生命科学, 2003,1(2):31-34.
- [7] 李茂玉,肖志强,李 萃,等. 小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 蛋白质表达谱的建立 [J]. 癌症, 2004,23(10):1116-1121.
- [8] Fliser D, Wittke S, Mischak H. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes [J]. Electrophoresis, 2005,26(14):2708-2716.
- [9] Yanagisawa K, Shyr Y, Xu B J, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer [J]. Lancet, 2003,362(9382):415-416.
- [10] Chen G, Gharib T G, Wang H, et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(23):13537-13542.
- [11] Maciel C M, Junqueira M, Paschoal M E, et al. Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients [J]. J Exp Ther Oncol, 2005,5(1):31-38.
- [12] 张丽娟,刘吉福,张 颖,等. 肺癌病人血清中 U1-A snRNP 自身抗体的发现与鉴定 [J]. 中国科学(C 辑)生命科学, 2005,35(5):446-451.
- [13] Okano T, Kondo T, Kakisaka T, et al. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. Proteomics, 2006,6(13):3938-3948.
- [14] 詹显全,关勇军,陈主初,等. 人肺癌腺 A549 和正常细胞 HBE 的蛋白质组差异分析 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2002,34(1):50-56.
- [15] 谢 玲,应万涛,李邦印,等. 蛋白质组学技术识别 Maspin 在支气管上皮永生化和恶性转化细胞中的差异表达 [J]. 癌症, 2003,22(5):463-466.
- [16] 邹志鹏,杨翠兰,王 翔,等. 肺腺癌 SPC-A1 细胞双向电泳图谱的优化 [J]. 中国医学物理学杂志, 2003,20(1):31-33.
- [17] 蒋代凤,应万涛,万晶宏,等. 肺癌转移相关蛋白的比较蛋白质组分析与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理进展,2003,30(4):586-593.
- [18] 李 萃,陈主初,肖志强,等.人肺鳞癌组织及癌旁组织蛋白质双向电泳图谱的差异分析 [J]. 癌症, 2004,23(1):28-35.
- [19] 朱 文,邓幼林,周清华,等. 人高、低转移大细胞肺癌细胞株双向凝胶电泳图像分析 [J]. 中国肺癌杂志, 2005,8(1):1-7.
- [20] 吴广平,侯伟健,周海涛. 双向凝胶电泳分析诊断肺癌性胸腔积液的临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006,3(4):318-319.
- [21] Bergman A C, Benjamin T, Alaiya A, et al. Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000,21(3):679-686.
- [22] Pandey A, Podtelejnikov A V, Blagoev B, et al. Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet derived growth factor receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(1):179-184.
- [23] Wu H, Pan C L, Yao Y C, et al. Proteomic analysis of the effect of antrodia camphorata extract on human lung cancer A549 cell [J]. Proteomics, 2006,6(3):826-835.
- [24] Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical cancer proteomics: promises and pitfalls [J]. J Proteome Res, 2005,4(4):1213-1222.
- [25] 陈 岗,惠 春. 纳米色覆颗粒分离富集法检测痰液中肺癌细胞的研究 [J]. 中国健康月刊(肿瘤), 2006,11:23.

[编辑及校对:林志祥]

首届广州肺癌论坛通知

首届广州肺癌论坛将于 2007 年 8 月 16-19 日在中国广州举行, 本次论坛是由中山大学肺癌研究中心和中山大学附属肿瘤医院倡议并主办的。目的是促进中国肺癌领域的学术交流与合作。届时将有 500 余名肺癌领域的国际、国内专家与会, 共同分享国内及国际肺癌研究领域的最新信息, 对肺癌外科治疗、放射治疗、化学治疗、靶向治疗、肺癌多学科综合治疗、肺癌基础研究和应用基础研究等多个范畴内存在的问题难点, 热点和发展方向展开深入的讨论。本届会议将是一次高水平的肺癌学术盛会。

广州常年鲜花繁盛, 独得“花城”之雅号。您在这里将领略魅力无穷的南国风情。

欢迎您踊跃投稿并届时与会, 和国内外专家同道一起交流肺癌基础与临床研究的经验和成果, 我们期待着与您相会在广州!

截稿日期:2007-07-15

会务费:600 元

联系人:马国伟 电话:020-87343317, 13501546669 电子邮件:guowei.ma@yahoo.com

林勇斌 电话:13922276678 电子邮件:linyongb@mail.sysu.edu.cn

投稿地址:广州市东风东路 651 号, 中山大学肿瘤医院胸外科 邮政编码:510060

首届广州肺癌论坛组织委员会

中山大学肺癌研究中心

中山大学附属肿瘤医院

2007 年 5 月 28 日