综述

文章编号:1000-5404(2005)17-1810-03

SELDI 蛋白质芯片技术及其在医学研究中的应用

SELDI protein chips technology and application in medical reasearch

赵 艇[1] 综述,高春芳[2] 审校 ([1]第二军医大学研究生院,上海 200433;[2]解放军150中心医院全军肛肠外科中心,洛阳 471031)

随着人类基因组计划的最终完成,蛋白质作为生命功能的最终执行者,其功能已越来越受到人们的重视。深入研究蛋白质的结构、功能以及它们之间的相互作用,将成为最终揭示人体疾病发生发展和转归规律的最关键环节之一。传统蛋白质研究的方法如色谱分离纯化技术、二维电泳、质谱等方法因操作过程繁锁、耗时冗长、重复性差、检测样本量小等缺点而不适合对蛋白质开展大规模的筛选研究,蛋白质组学研究迫切需要一种高通量、快速、全自动化的用于对批量蛋白质进行快速研究的仪器。近几年来,随着相关基础科学的发展,融合了生命科学与微电子科学、材料学等多门学科最新研究成果的表面增强激光解附离子化飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization-time of flight - mass spectrometry, SELDI-TOF - MS)蛋白芯片诞生了,该技术广泛用于各类疾病特异性生物标志物的检测和筛选、蛋白质的相互作用、揭示蛋白酶的作用、测定血清中小分子物质的含量及新药的研制和开发等领域,并取得了一系列突破性进展。

1 蛋白质芯片的基本结构、工作原理及技术特点

蛋白质芯片又称蛋白质微阵列,是继基因芯片之后又一种新型的生物芯片,最早由德国科学家 Lueking 等[1]开始研究。SELDI 蛋白芯片由芯片,样品处理系统和数据分析系统3部分组成。蛋白质芯片和基因芯片一样,同属于生物芯片的范畴,它一般包括两个基本组成部分:①特殊材料制成的固相载体,呈薄片型,长条状,经特定处理后承载吸附有关的生物制剂。常用的芯片制作材料有硅、云母、各种膜片等。②在固相载体表面以特定方式固定的具有特定功能的生物制剂,它们与固相载体共同形成芯片池。这些生物制剂包括化学吸附剂和生物吸附剂两大类,从而形成化学芯片和生物芯片[2]。样品(可用组织、细胞和体液)加入芯片池后,能与芯片上吸附剂相结合的蛋白质将被保留在芯片上,而不能与吸附剂相结合的蛋白质将被特殊的缓冲液洗掉。由于蛋白质本身不吸收能量,因此,在蛋白质与芯片结合后,必须加入能够吸收激光能量的介质,即能量吸收分子。蛋白芯片仪的样品处理系统是在质谱分析的基础上实行的表面加强的激光解析电离化飞行时间(SELDI-TOF)。其原理是利用激光脉冲辐射使芯片池中的分析物解析成荷电离子,根据不同质荷比这些离子在仪器的磁场中的飞行时间长短不一,由此绘出一张质谱图,该图传入分析系统后,由分析软件对质谱图进行分析,可直接显示样品中各种蛋白质的分子量和含量等信息,若将正常组和某种疾病的蛋白图谱对比,即可捕获与该疾病特异性相关的生物标志蛋白。

2 蛋白芯片在蛋白质组学研究领域的应用

蛋白质组技术包括蛋白质分离技术和鉴定技术。目前,蛋白分离的核心技术是二维电泳,经过蛋白样品的变性,等电聚焦分离,固定 pH 梯度胶条上泳动,梯度胶条上将出现不同的蛋白质条带,此条带再置于含十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)的聚丙烯凝胶上,根据分子量大小而分离,银染后通常每块胶可显示 1 000 ~ 3 000 个蛋白质点。分离后的蛋白质条带须经特殊的软件和蛋白质组数据库进行分析鉴定。通过差减处理,可展示出不同来源的蛋白质样本间的差异。对感兴趣的蛋白质可根据其等电点和分子质量及其它辅助技术加以确认,这些技术也包括高敏感性的质谱技术。

在基础医学领域,国内外学者利用蛋白芯片技术对相关蛋白质的研究取得了许多突破性的进展。Viard 等[3]采用疏水蛋白芯片,利用 SELDI - TOF-MS 蛋白芯片仪分离并鉴定了 HIV -1 融合蛋白,并认为这种方法可用于分析自然折叠的、聚合的、完整的膜蛋白。国内学者高燕等[4]利用 SELDI-TOF - MS 蛋白芯片技术,采用金属离子螯合型芯片成功地实现了对组织中金属硫蛋白的快速分离、纯化和检测。在蛋白质和 DNA、RNA 相互作用方面,Forde 等[5]报道,用 DNA 覆盖芯片表面,制成生物芯片,以捕获与之有特异性结合能力的蛋白质,并由此建立了一种用于筛查结合到启动 DNA 序列的转录因子的方法。Tenenbaum 等[6]也介绍了用 SELDI 纯化和鉴定内源性 mRNA-蛋白质复合体的方法。

3 蛋白芯片在肿瘤学研究方面的应用

应用 DNA 芯片技术实现了通过全基因组分析检测癌变过程中基因异常活化或改变,但一些与肿瘤发生发展相关的改变可能与分子水平无关,如许多蛋白的过度甲基化与肿瘤的发生有关,蛋白质翻译后调节功能的异常也与肿瘤的发生密切相关,这预示着蛋白质组技术将是最终阐明癌症本质及提供有效防治措施的最有力的手段。目前,蛋白质芯片用于肿瘤研究已经发现了一系列新的肿瘤特异性生物标志物,包括前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤等等,同时在肿瘤的发病机制方面也取得了一些新的进展。

3.1 前列腺癌

前列腺癌是西方男性最常见的恶性肿瘤之一。目前用于前列腺癌诊断的特异性蛋白质前列腺特异性抗原(prostate - specific antigen, PSA)诊断的特异性较低。Adam 等[7]用蛋白质芯片技术对 167 例前列腺癌,77 例前列腺良性增生,82 例正

作者简介:赵 艇(1975-),男,河南省荥阳市人,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤方面的研究。电话:(0379)64181784-69306

收稿日期:2005-06-20;修回日期:2005-08-10

常人的血清进行了研究,结果发现,分子质量为 4 475,5 74,5 382,7 024,7 820,8 141,9 149,9 507,9 565 的 9 个蛋白质作为一组特异性生物标记物对前列腺癌的诊断具有很重要的意义,随后通过双盲法验证其敏感性为 83%,特异性为 97%,阳性预测值为 96%,Banez 等[8] 的研究结果认为,联合弱阳离子芯片和铜离子芯片所得的质谱资料用于前列腺癌的诊断,其敏感性和特异性均可达 85%,认为两种芯片的联合应用可以大大提高蛋白质芯片的检测效力。

Cazares 等[9] 证实了在前列腺癌细胞和前列腺液中,利用蛋白质指纹图谱技术鉴定已知前列腺癌标记物以及发现过渡表达或不全表达潜在分子生物学标记物的有效性。他们将正常人、良性前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)、前列腺内皮细胞癌变(prostate intraepithelial neoplasia, PIN)、前列腺恶性肿瘤(prostate cancer, PCA)4 组人群的细胞裂解液的蛋白质指纹图谱对比,发现明显不同的蛋白表达,其中几种小分子多肽(3 000 ~ 5 000)PIN 和 PCA 细胞裂解液中明显增加;在 86% 的 BPH 细胞裂解液中,另一个对应平均分子质量为 5.6×10^3 蛋白质质谱峰明显增加,同样的峰值在 22% 的 PIN 细胞裂解液中明显增加,而 PCA 细胞裂解液没有这一对应峰值的表达。还发现与正常人相比,PSA(前列腺特异性抗原)在 PIN 和 PCA 细胞裂解液中减少。经过统计学分析,组合多个标记物即可有效区分良性增生与 PIN、PCA 样本,它的敏感性为 93.3%,特异性为 93.8%。这种差异表达的蛋白质标记物组合,在前列腺癌的早期诊断中具有重要意义。并可以使我们更深入了解由健康人到良性患者再到恶性肿瘤患者过程中不断变化的蛋白质表达。

Xiao 等[10] 还利用蛋白芯片技术,检测血清前列腺特异性细胞膜抗原浓缩物(prostate-specific membrane antigen, PSMA),从前列腺增生人群中区分出全部 PCA 患者,而同组常规检测 PSA 的特异性仅为 25% ~ 30%。这一成果对于 PSA 阴性的 PCA 患者具有更高的敏感性,减少了不必要的活检操作,为鉴别良恶性前列腺增生病人提供了可靠的方法。

3.2　卵巢癌

目前,普遍认可的用于卵巢癌诊断的特异性生物标志物 CA125 单独作为生物标志物的阳性预测值不足 10%。Petricoin 等[11] 报道了用疏水性芯片对卵巢癌血清蛋白质组学的研究结果:他们发现在卵巢癌和正常人的血清中有 5 种蛋白质的含量同时变化,对诊断卵巢癌具有重要意义,用此蛋白质组合作为诊断卵巢癌的特异性生物标志物,对正常人、卵巢癌、和卵巢良性病变的血清进行双盲法研究,结果显示,该方法的灵敏度为 100%,特异性为 95%,阳性预测值为 94%,而同步检测 CA125,其阳性预测值仅为 35%。

Katherine 等[12] 利用蛋白质指纹图谱技术,将 184 例血清标本加载在强阴离子交换表面(strong anion exchange, SAX)芯片上,其中包括 109 例卵巢癌、19 例良性卵巢肿瘤以及 56 例健康人。应用单变量及多变量统计学方法分析由其中 140 例血清样本所获取的蛋白片段的相关数据,得出了 3 组有诊断意义蛋白质标记物群。第 1 组包括 5 种候选的蛋白标记物,这一组合对卵巢癌诊断的敏感性为 95.7%,特异性为 82.6%,准确性为 89.2%,;另外两组蛋白质标记物群,分别包括 5 种和 4 种候选的蛋白标记物,对卵巢癌诊断的敏感性分别为 81.7% 和 72.8%,特异性均为 94.9%,准确性分别为 88.2% 和 83.9%。这筛选出 3 组蛋白质标志物群,利用剩余的 44 例未知血清进行盲法验证。结果显示,三者联合应用时,41 例血清被正确诊断,其中卵巢癌患者中有 21 例得到正确诊断:11 例进展期卵巢癌全部确诊,11 例早期卵巢癌中 10 例被确诊;6 例低度恶性潜能肿瘤均被正确诊断,6 例良性肿瘤中有 5 例排除了卵巢癌,10 例正常人群血清中有 1 例误诊。由此,Katherine 等认为已经发现了具有诊断意义的卵巢癌蛋白物标记物群,可以有效区分健康人群和良恶性卵巢肿瘤。

Ye 等[13] 利用蛋白芯片技术,分析了 80 例卵巢癌患者和 91 例健康人血清,在分子质量为 11.7×10^3 的位置发现了差异蛋白峰,它较对照组密度峰值明显增高,利用亲和色谱方法纯化,再利用流体色谱法和质谱仪确定其蛋白序列,由此结果合成多肽链,最终鉴定出这一多肽片段是结合珠蛋白 α 链并导出相应抗体。将其与 CA125 联合使用,对卵巢肿瘤诊断的敏感性为 95.7%,特异性为 82.6%,提高了卵巢癌的早期诊断率,降低了 CA125 的假阳性率。目前相关技术在美国已开始应用于卵巢癌的筛查。

3.3　乳腺癌

临床确诊的乳腺癌多为中晚期患者,严重影响乳腺癌的术后 5 年生存率,其原因主要是缺乏早期诊断的方法。约翰·霍普金斯医学研究所 Li 等[14] 利用蛋白芯片技术,采用 Ni 离子激活蛋白芯片,一共选取 169 例血清样本,其中 103 例乳癌(0 期 4 例,Ⅰ期 38 例,Ⅱ期 37 例,Ⅲ期 24 例),25 例良性乳腺包块,41 例健康人。与金属离子螯合的蛋白质在 PBS Ⅱ 蛋白芯片阅读模式下处理,利用 ProPeak 软件包分析对比所得数据,发现了由 3 个标记物蛋白组成的蛋白质标志物群可以较理想地将早期乳癌和非癌组鉴别开来,交叉验证其敏感性为 93%,特异性为 91%,它不仅能区分良恶性样本,在乳癌不同分期亦有明显不同,显示了该技术用于乳腺癌早期诊断的巨大潜力。

Carter 等[15] 利用蛋白芯片及相关技术,成功的纯化了乳腺珠蛋白和蛋白脂蛋白 B 复合物,对其有效片断进行深入研究,从蛋白质水平上明确了该复合物作为乳腺癌诊断及预后标志物的意义。

3.4　大肠癌

随着我国人民膳食结构的改变,近年来大肠癌发病率有上升的趋势。目前广泛应用的血清学早期诊断标记物癌胚抗原 CEA 敏感性及特异性不高。Bryumor [16] 通过对比结肠癌、结肠息肉、结肠炎及健康人血清的蛋白质表达,发现了在所有患结肠癌及可能发生癌变的息肉病人血清中独特表达的,分子质量为 13.8 一种特殊相关蛋白,该蛋白在良性病变中未见表达。由此认为该蛋白可用于大肠癌早期检测。Bernstein 等[17] 在研究细胞凋亡过程中,利用脱氧胆酸诱导结肠细胞,利用蛋白质组学技术发现与对照组相比,35 种蛋白表达异常,这不仅有可能成为大肠癌早期诊断的特异性标记物,还为治疗提供了潜在靶点,这一成果及相关理论,将开辟蛋白质组学应用于肿瘤治疗所作用的蛋白靶分子检测的新领域。

作者的实验室[18] 内近两年采用蛋白芯片技术对大肠癌、大肠良性疾病和正常人的血清蛋白质进行了大量的比较研究,发现 5 种蛋白质的同时变化可以作为诊断大肠癌的特异性生物标志物,用双盲法对该生物标志物进行验证,其敏感性和特异性均可达 90% 以上,此外,我们还研究了不同分期大肠癌血清蛋白质组学的变化,我们同样也发现了可用于大肠癌早期诊断的特异性生物标志物。上述特异性生物标志物已初步用于临床结直肠癌的大规模检测,其敏感性和特异性已得到初步证

实。进一步研究方向是将发现的特异性生物标志物进行纯化和测定其氨基酸序列,并在蛋白质库内进行比对,确定性基本性质。国内郑树等也利用该项新技术对大肠癌的早期诊断作了大量工作,也发现了特异性和敏感性均较强的用于大肠癌早期诊断的生物标志物。

3.5 胃癌

胃癌在我国及整个世界范围都是最常见的恶性肿瘤,目前缺乏早期特异性血清学诊断标记物。德国 Ebert 等[19]利用决策树方法来处理 SELDI-TOF MS 技术分析不同病理分期及良性胃肿瘤、健康人血清所得到的蛋白质指纹图谱,可将全部恶性肿瘤区分。将这一结果在应用于受试者,9 例Ⅰ期胃癌中 8 例被正确诊断,28 例外院胃癌病人血清均被正确诊断,并且鉴别出 11 例非胃癌病人血清,准确鉴定了 30 例正常人血清中的 29 例。他们认为将蛋白质指纹图谱技术与生物信息学结合,可为胃癌诊断提供高度特异性及敏感性指标。

4 蛋白质芯片技术存在的问题及其发展前景

蛋白芯片技术最近几年的发展极为迅速,该技术是当前临床蛋白质组学研究中比较理想的一种技术平台,由于该技术不完全依赖于蛋白质的构象,从而优于那些源于抗原抗体相互作用的普通蛋白质芯片。它的发展将会为蛋白质组学的研究提供更强有力的工具,但也存在一些问题,如目标蛋白的纯化、试验的标准化和数据报告的规范化、大量数据的处理和分析软件的开发、高度集成化样品的制备及检测仪器的研制和开发、检测灵敏度的提高等,这些问题不仅在某些程度上限制了蛋白芯片技术的发展,还会直接影响该技术临床应用的进程。目前,各芯片技术开发商正针对上述问题加强相关技术研发。通过创立了早期检测研究网络(early detection research network, EDRN),美国国家癌症研究所在生物标记物研究中发挥了领导作用。这一网络将学术界和生产部门的专家联合起来,以加速生物标记物的研究和论证。它为蛋白质组学加快已发现的蛋白标记物转化为临床早期诊断工具和风险评估提供了公共平台[20]。随着该技术的迅猛发展,蛋白质芯片技术必将在大规模研究蛋白质性质、蛋白质之间相互作用及肿瘤标志物方面更加特异、快捷、自动化,从而推动疾病尤其是肿瘤的早期诊断、药物筛选、个性化药物的研发和应用等领域发生重大革新。

关键词:蛋白质芯片;蛋白质组学;肿瘤学

中图法分类号:R730.43 **文献标识码**:A

参考文献

[1] Lueking A, Horn M, Eickhoff H, *et al*. Protein microarrays for gene expression and antibody screening[J]. Anal Biochem, 1999, 270(1): 103-111.

[2] Merchant M, Winberger S R. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1164-1177.

[3] Viard M, Blumenthal R, Raviv Y. Improved separation of integral membrane proteins by continuous elution electrophoresis with simultaneous detergent exchange: application to the purification of the fusion protein of the human immunodeficiency virus type 1[J]. Electrophoresis, 2002,23(11):1659-1666.

[4] 高 燕,雍 政,董旭东,等. 蛋白质芯片及其在蛋白质组研究中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2004, 31(1): 26-29, 64.

[5] Forde C E, Gonzales A D, Smessaert J M, *et al*. A rapid method to capture and screen for transcription factors by SELDI mass spectrometry[J]. Biochem Biophys Res Commum, 2002, 290(4): 1328-1335.

[6] Tenenbaum S A, Lager P J, Carson C C, *et al*. Ribonomics: identifying mRNA subsets in mRNP complexes using antibodies to RNA-binding proteins and genomic arrays[J]. Methods, 2002, 26(2): 191-198.

[7] Adam B L, Qu Y, Davis J W, *et al*. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men[J]. Cancer Res, 2002, 62(13): 3609-3614.

[8] Banez L L, Prasanna P, Sun L, *et al*. Diagnostic potential of serum proteomic patterns in prostate cancer[J]. J Urol, 2003, 170(2Pt 1): 442-446.

[9] Cazares L H, Adam B L, Ward M D, *et al*. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(8): 2541-2552.

[10] Xiao Z, Adam B L, Cazares L H, *et al*. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease[J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 6029-6033.

[11] Petricoin E F, Ardekani A M, Hitt B A, *et al*. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. Lancet, 2002, 359(9306): 572-577.

[12] Kozak K R, Amneus M W, Pusey S M, *et al*. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(21): 12343-12348.

[13] Ye B, Cramer D W, Skates S J, *et al*. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(8): 2904-2911.

[14] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, *et al*. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1296-1304.

[15] Carter D, Douglass J F, Cornellison C D, *et al*. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer[J]. Biochemistry, 2002, 41(21): 6714-6722.

[16] Watkins B, Szaro R, Ball S, *et al*. Detection of early-stage cancer by serum protein analysis[J]. Am Lab, 2001, 33(9): 32-36.

[17] Bernstein H, Payne C M, Kunke K, *et al*. A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(5): 681-692.

[18] 赵 光,高春芳,宋国英,等. 血清中蛋白质组构型对结直肠癌的诊断意义[J]. 癌症, 2004, 23(6): 614-618.

[19] Ebert M P, Meuer J, Wiemer J C, *et al*. Identification of gastric cancer patients by serum protein profiling[J]. J Proteome Res, 2004, 3(6): 1261-1266.

[20] Srinivas P R, Verma M, Zhao Y, *et al*. Proteomics for cancer biomarker discovery[J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1160-1169.

(编辑 栾 嘉)