论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0828-03

应用RP-HPLC/TOF-MS技术识别肝癌血浆差异蛋白质

母昭德[1,2],尚京川[1],彭咏波[1],黄开顺[3],邱宗荫[1,2] (重庆医科大学:[1]药学院药物分析教研室,[2]临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,[3]基础医学研究所,重庆 400016)

提 要:目的 应用RP-HPLC / TOF-MS技术筛选肝癌血浆差异蛋白质。**方法** 9例肝癌和8例正常组血浆采用Agilent高丰度蛋白质分离系统(multiple affinity removal system, MARS)洗脱白蛋白等高丰度蛋白质后,样品首先采用RP-HPLC法分离分析,然后采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱鉴定差异蛋白质相对分子质量。**结果** 肝癌血浆和健康志愿者血浆的RP-HPLC图谱中存在3组差异蛋白质,相对分子质量为(15~50)×10^3的蛋白质在健康志愿者中有较高表达,而相对分子质量为(50~90)×10^3的蛋白质在肝癌患者中有较高表达。**结论** RP-HPLC/TOF-MS技术可以发现肝癌发生发展过程中血浆蛋白表达谱质或量的变化。

关键词: 肝癌血浆;蛋白质;反相高效液相色谱;基质辅助激光解吸附飞行时间质谱

中图法分类号: R446.11; R730.43; R735.7 **文献标识码:** A

Identification of differential proteins in plamsa of hepatocellular carcinoma by RP-HPLC/TOF-MS

MU Zhao-de[1,2], SHANG Jing-chuan[1], PENG Yong-bo[1], HUANG Kai-shun[3], QIU Zong-yin[1,2] ([1]Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, [2]Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, [3]Institute for Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To identify the differential proteins in plasma of hepatocellular carcinoma (HCC) with RP-HPLC and matrix-assisted laser desorption ionzation time of flight mass spectrum (MALDITOF MS). **Methods** Plasma from 8 healthy volunteers and 9 HCC patients were collected. After depleting six plasma proteins of the highest abundance by the Multiple Affinity Removal System (MARS) Technologies from Agilent, plasma were subjected to RP-HPLC and the molecular weight of differentially expressed protein was identified by MALDITOF MS. **Results** The proteins whose molecular weight are between 15×10^3 and 50×10^3 in plasma from healthy subjects were more than in hepatocelluar carcinoma patients, while the proteins whose molecular weight are between 50×10^3 and 90×10^3 in plasma from healthy subjects are less than in hepatocelluar carcinoma patients. **Conclusion** RP-HPLC/TOF MS based plasma proteome analysis can be useful in detecting protein expression alteration resulting from the carcinogenesis and development of HCC and new discovered biomarkers might be an aid in the diagnosis of HCC.

Key words: plasma of hepatocelluar carcinoma; protein; reversed-phase high-performance liquid chromatography; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrum

我国是肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)大国,肝癌死亡率占恶性肿瘤死亡率第2位,占全球肝癌死亡人数的53%[1]。而传统的甲胎蛋白作为肝癌诊断时特异性和灵敏性均不高,因此人们一直在寻求其他灵敏、特异的生物标志物,以利于肝癌的早期诊断。蛋白质组学研究的主要技术是双向凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)和质谱(mass spectrometry, MS)。虽然2-DE的技术很成熟,但重复性和稳定性仍然是2-DE技术存在的主要问题,而且它复杂的实验过程和大量的样本需求不适应大规模的标本检测,限制了2-DE直接用于临床检

基金项目: 重庆市教委研究项目(KJ060314),重庆市高校优秀中青年骨干教师资助(渝教人200415)
Supported by the Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (KJ060314) and the Funds for the Talent Teachers of Chongqing Colleges (200415)

作者简介: 母昭德(1966-),女,重庆市人,博士研究生,副教授,主要从事药物分析和血液蛋白质组学方面的研究。电话:(023)68485048,E-mail:mzd2008@tom.com

通讯作者: 邱宗荫,电话:(023)68486727,E-mail:zongyin@sohu.com

收稿日期: 2006-12-27;**修回日期:** 2007-01-16

测，同时 2-DE 对于膜蛋白、强疏水性蛋白的有效分离也还存在困难，使其对疾病标志物的识别具有一定的局限性。本研究采用 RP-HPLC 法分析肝癌患者血浆蛋白质组分，获得了疏水性较强的差异蛋白，并通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱（matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrum，MALDI TOF MS）确定了差异蛋白质的相对分子质量，为肝癌血浆特异蛋白质的寻求提供了一种新的途径，同时也为肝癌新的诊断方法提供了一定的依据。

1　材料与方法

1.1　材料

安捷伦高效液相色谱仪（Agilent-1100 系列），基质辅助激光解吸附飞行时间质谱仪（Voyager-DE PRO，美国 ABI 公司）；高丰度蛋白质分离系统 Multiple Affinity Removal System（MARS），4 ml 蛋白质离心浓缩柱（5×10^3），0.22 μm 血清过滤柱，缓冲溶液 A、缓冲溶液 B 均购自安捷伦公司；尿素、硫脲购自上海生工，碳酸氢胺为 Sigma 产品，Millipore 去离子水、色谱纯乙腈（江苏汉帮），KDC-160HR 高速冷冻离心机。健康自愿者血浆（重庆医科大学附属第二医院），肝癌患者血浆（重庆医科大学附属第一医院）。

1.2　方法

1.2.1　样品收集[2]　健康对照组：取健康志愿者 8 例，男性 5 例，女性 3 例，年龄 30～65（51.2±7.5）岁，HIV、HBV、HCV 和梅毒均为阴性。肝癌患者组：取肝癌患者 9 例，男性 7 例，女性 2 例，年龄 33～73（50.6±9.95）岁。两组均在空腹时抽静脉血 3 ml，4 ℃下4 000 r/min 离心 15 min，上清液在 4 ℃下 2 400 r/min 离心 5 min 后，分装到硅烷化 EP 管中，－80 ℃保存备用。其中健康志愿者血浆为 8 例健康志愿者血浆混合液。

1.2.2　样品处理　按供货商说明书去除血浆中的高丰度蛋白质（白蛋白、免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 A、触球蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、转铁蛋白），得到 4 ml 含低丰度蛋白质的溶液，用蛋白质离心浓缩柱（5×10^3）在 4 ℃下 6 600 r/min 离心到大约 200 μl，样品溶液用 20 mmol/L NH_4HCO_3（pH 8.5）缓冲溶液交换，Bradford 法测定蛋白质浓度，样品用 9 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲溶液稀释为 50 ng/μl，－80 ℃保存，备用。

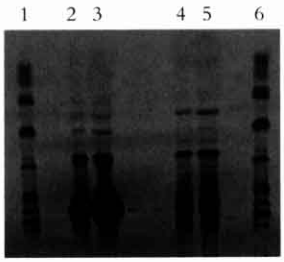
1.2.3　RP-HPLC 分析　色谱柱 ZORBAX 300SB-C18（250 mm×4.6 mm，5 μm），是可在低 pH（0.8～8）下使用并免受损害的一种烷基反相柱。流动相为：A＝0.1% 三氟乙酸溶液，B＝0.09% 三氟乙酸乙腈；时间程序：开始时 1% B，保持 3 min；到 100 min 时增加至 100%，保持 10 min，到 115 min 时降低至 1%，至 120 min 结束。流速为 0.75 ml/min。检测波长：280 nm；进样量：100 μl；柱温：25 ℃。分别手动收集 1、2、3 组色谱峰的蛋白质组分于 1.5 ml 硅烷化 EP 管中（起峰 2 s 后开始收集，峰完后继续收集 2 s）。冰冻干燥后，用 2 μl 50% 乙腈、0.1% 三氟乙酸、49.9% 水溶液涡旋溶解 2 min，离心 1 min，作 MALDI-TOF 质谱分析。

1.2.4　MALDI-TOF MS 分析　氮激光波长 337 nm，激光脉冲宽度 100 ns；在反射模式下，加速电压为 20.0 kV，反射电压为 20.0 kV；以 Insulin（bovine）（57 345.9 MW）、Thiore（*E. coli.*）（11 674.48 MW）和 Apomygoylobin（horse）（16 952.56 MW）为外标。SA（10 g/L）为基质，基质和样品以 1∶1（体积分数）混合后取 2 μl 在靶上点样。

2　结果

2.1　样品处理

经过样品预处理后，血浆样品中低丰度蛋白质得到较好的分离和浓缩（图 1）。

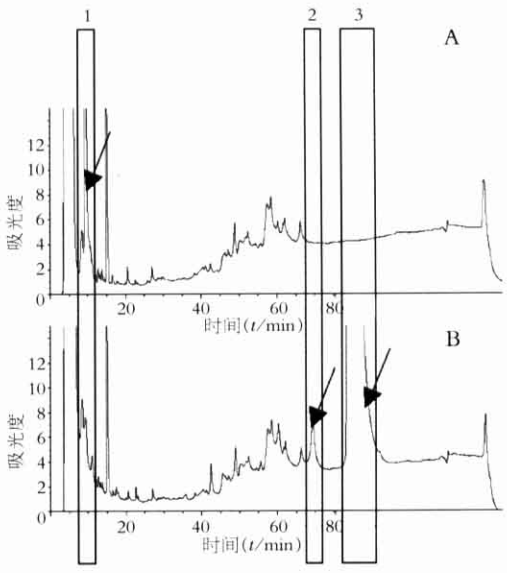


1,6：标准；4,5：低丰度蛋白；2,3：原血浆

图 1　原血浆、低丰度蛋白 SDS-PAGE 图谱

2.2　RP-HPLC 结果分析

对健康志愿者和 9 例样本检测到的 HPLC 图谱进行分析，发现二者之间存在 3 组具有显著性差异的色谱峰（图 2）。其中的色谱峰 1 在健康志愿者中明显高于肝癌患者，将健康志愿者混合血浆重复进样 3 次，得到峰面积的平均值为 1 457.67（SD 为 14.45），9 例患者血浆分别进样，得到峰面积的平均值为 611.07（SD 为 290.55），将二者峰面积的平均值进行统计学处理（秩和检验），二者之间具有显著性差异（$P<0.05$）。色谱峰 2 和 3 代表的高疏水性蛋白质只在肝癌患者中出现。



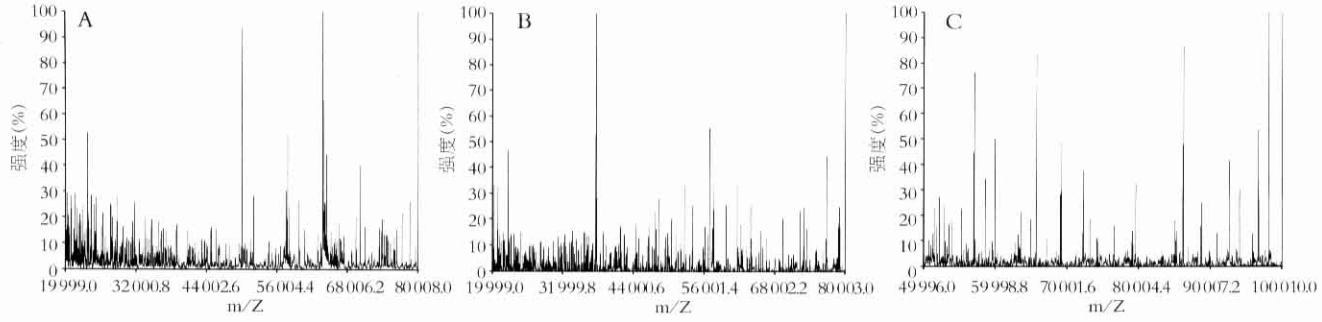
1,2,3：健康志愿者与肝癌患者有差异的色谱峰

A：健康志愿者；B：肝癌患者

图 2　肝癌患者与健康志愿者血浆的色谱图比较

2.3 MALDI-TOF MS 结果分析

收集健康志愿者 RP-HPLC 中峰 1 及肝癌患者 RP-HPLC 中峰 2 和 3 流出的蛋白质，分别进行 MALDI-TOF MS 分析（图 3），A、B 和 C 分别表示差异蛋白质组 1、2 和 3 对应的质谱图。将峰 1 鉴定得到的蛋白质同峰 2、3 鉴定得到的蛋白质，按相对分子质量分布分析，结果表明，在相对分子质量为（15～50）×10^3 范围中，健康人血浆中的蛋白质多于肝癌患者，而在相对分子质量为（50～90）×10^3 范围中，肝癌患者血浆中蛋白质却多于健康人血浆蛋白质，这种蛋白质分布的差异，应是由于肝癌病变所引起，因此通过血浆蛋白质分布的差异有可能对肝癌作出初步的判断。



A：色谱峰 1；B：色谱峰 2；C：色谱峰 3

图 3 血浆差异蛋白质的 MAMDI-TOF MS 图

3 讨论

血液具有：①所含蛋白质种类多；②获取容易和安全；③含机体在各种特殊时刻及时分泌的各种蛋白质表型（phenotype）等特点，成为寻求疾病标志物的重要源泉。然而占血液总蛋白含量 80% 以上的白蛋白等几种高丰度蛋白质的存在，给从血液样品中寻求疾病标志物造成了极大的麻烦，因此去除血液中少数几种占主要含量的高丰度蛋白质是分析低丰度蛋白质、尤其是作为疾病标志物的低丰度蛋白质的关键。目前去除高丰度蛋白质的方法较多[3-6]，然而 Agilent 的高丰度蛋白质分离系统以其特异性高、重现性好、非特异键合低、使用寿命长等特点，已成为人类血浆蛋白质组计划（plasma proteome project，PPP）推荐为分离纯化血液中低丰度蛋白质的主要技术手段[7]，通过该技术处理样品后，血浆中低丰度蛋白质得到较好的分离和浓缩。

从血液中寻求特异性生物标记物用于肝癌等疾病的诊断是目前临床急需解决的难题。本研究采用具有耗时少、灵敏度高、重现性好等特点的 RP-HPLC/TOF MS 技术，通过比较蛋白质组学研究，识别到一些 2-DE 不能分离和识别的高疏水性差异蛋白质，对通过 2-DE 方法识别肝癌血浆标志物提供了一定的补充。对该部分蛋白质作进一步的分离、鉴定以及相关蛋白质的生物学功能分析，将为肝癌标志物的寻求、肝癌的早期诊断、肝癌药物的开发以及肝癌的机制研究提供有效的理论依据，这将是今后研究的一个重点。

参考文献：

[1] 张思维，李连弟，鲁凤珠，等. 中国 1990～1992 年原发性肝癌死亡调查分析[J]. 中华肿瘤杂志，1999，21(4)：245－249.

[2] Li X, Gong Y, Wang Y, *et al*. Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project [J]. Proteomics, 2005, 5(13): 3423－3441.

[3] Rothemund D L, Locke V L, Liew A, *et al*. Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the Gradiflow [J]. Proteomics, 2003, 3(3): 279－287.

[4] Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, *et al*. Differences among techniques for high-abundant protein depletion [J]. Proteomics, 2005, 5(13): 3304－3313.

[5] Fountoulakis M, Juranville J F, Jiang L, *et al*. Depletion of the high-abundance plasma proteins [J]. Amino Acids, 2004, 27(3－4): 249－259.

[6] Chromy B A, Gonzales A D, Perkins J, *et al*. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins [J]. J Proteome Res, 2004, 3(6): 1120－1127.

[7] Omenn G S, States D J, Adamski M, *et al*. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database [J]. Proteomics, 2005, 5(13): 3226－3245.

（编辑 王小寒）