论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1028-04

高效液相色谱-质谱法在筛选胆管癌肿瘤标志物中的应用

张 磊[1],杨 闯[1],王 颖[2],黄 勇[2],王济明[1],吴 军[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室[2])

【摘要】 目的 应用蛋白质组学技术筛选人胆汁中与胆管癌相关的蛋白质分子。**方法** 收集2008年3月至2009年10月重庆医科大学附属第一医院肝胆外科经明确病理诊断的胆管癌住院患者的胆汁共15例,正常人胆汁5例。应用非离子型脱脂剂结合分子筛超滤方法制备纯化胆汁样本,通过高效液相色谱-质谱法(HPLC-CHIP-MS/MS)鉴定差异表达的蛋白质,并用Spectrum Mill software对检测结果进行分析。**结果** 与正常人胆汁比较,在胆管癌患者胆汁中,检测到109个高可信蛋白,其中12个为新增蛋白质,其功能主要涉及癌细胞的发生、增殖、分化、转移等。**结论** 高效液相色谱-质谱法鉴定的12个差异表达蛋白质可能成为研究胆管癌的生物学分子标志物。

【关键词】 HPLC-CHIP-MS/MS;胆管癌;胆汁;分子标志物

【中图法分类号】 R735.8;R341;R394-33 **【文献标志码】** A

Screening of cholangiocarcinoma tumor markers in bile through HPLC-CHIP-MS/MS

Zhang Lei[1], Yang Chuang[1], Wang Ying[2], Huang Yong[2], Wang Jimimg[1], Wu Jun[2] ([1]Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Key Laboratory for Proteomics of Diseases of Chongqing, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To screen proteins associated with cholangiocarcinoma in human bile with proteomic techniques. Methods Bile specimens were collected from 15 inpatients, who were diagnosed with cholangiocarcinoma in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, China, from March 2008 to October 2009, and 5 healthy persons. The bile specimens were purified with nonionic lipid removal reagent Cleanascite™ and ultrafiltration (molecular weight cutoff = 10×10^3). HPLC-CHIP-MS/MS was employed to identify the differentially expressed proteins in the purified bile specimens, and the results were analyzed with Spectrum Mill software. Results Compared with the bile specimens from the healthy persons, 109 highly reliable proteins were detected in those from the inpatients with cholangiocarcinoma, 12 of which were first reported in proteomic studies of bile. These 12 proteins were mainly associated with oncogenesis, proliferation, differentiation, metastasis, etc. of tumor cells. Conclusion The 12 proteins reported here are potential tumor markers of cholangiocarcinoma.

【Key words】 HPLC-CHIP-MS/MS; cholangiocarcinoma; bile; biomarkers

Supported by the key Foundation for Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (07-1-003). Corresponding author: Wang Jiming, Tel: 86-23-89011182, E-mail: wangjiming1182@126.com; Wang Ying, Tel: 86-23-68752688, E-mail: junwupro@126.com

胆管癌是一种起源于胆管细胞伴有胆管细胞分化的上皮细胞肿瘤[1-2]。其发病隐匿,缺乏理想的早期诊断标志物,对常规放疗缺乏敏感性,预后极差。然而胆管癌患者的胆汁中经常存在一些肿瘤相关蛋白质,来自于肿瘤细胞自身分泌的蛋白或是来源于肿瘤细胞脱落后破裂,细胞膜及胞内蛋白质释放入胆汁,而且胆汁经过胆囊的浓缩和储存,使得胆汁中肿瘤相关蛋白的浓度较血清中高,更容易被检测到[3]。本研究运用蛋白质组学质谱技术筛选胆管癌患者胆汁以及正常人胆汁蛋白质表达谱,寻找可用于胆管癌诊断的特异性生物学分子标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集2008年3月至2009年10月重庆医科大学附属第一医院肝胆外科胆管癌住院患者,于手术中行胆管穿

【基金项目】 重庆市卫生局重点科研基金(07-1-003)

【通信作者】 王济明,电话:(023)89011182,E-mail:wangjiming1182@126.com

王 颖,电话:(023)68752688,E-mail:junwupro@126.com

刺取得胆汁标本共15例。其中肝门部胆管癌患者10例,下段胆管癌患者5例。男性11例,女性4例,平均年龄59(46~71)岁。所取标本病例均经手术和病理诊断证实为腺癌。正常胆汁共5例,来自于肝移植供体。

1.1.2 主要试剂 甲酸(色谱纯,美国TEDIA公司),甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司),乙腈(色谱纯,美国TEDIA公司),其余试剂均为分析纯。胰蛋白酶(美国Promega),非离子型脱脂剂CleanasciteTM HC 100(美国Biotech公司),矿物油,Protein Assaykit(美国Thermo公司),IPG缓冲液(pH 3~10)、IPG干胶条(pH 3~10,17 cm)均购于Agilent公司,标准蛋白溶液(Biosciences公司),尿素,二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT),三羟甲基氨基甲烷(Tris-base),十二烷基磺酸钠(SDS),碘乙酰胺(IAA)。

1.1.3 主要仪器与软件 HPLC 1100 series、HPLC-CHIP-MS/MS ION TRAP 6330、电子分析天平(Agilent,美国),多振幅轨道摇床(上海智城分析仪器制造有限公司),Eppendorf离心机(Eppendorf,德国),水平摇床(北京六一仪器制造厂),Specrum Mill软件(Rev A.03.02.060,Agilent)。

1.2 样品处理

每例胆汁样本采集后立即低温保存送实验室,并低温高速离心(16 000 r/min,4 ℃)15 min,去除脱落细胞、胆石微粒,收集上清液,分装于硅化的EP管中,每管1 ml,置-80 ℃冰箱保存待用。肝门部胆管癌胆汁样本随机分为实验组1、实验组2($n=5$),下段胆管癌胆汁样本为实验组3($n=5$),正常胆汁样本为对照组($n=5$)。每组各取混合后的胆汁5 ml,分别加入1.25 ml非离子型脱脂剂Cleanascite™,4 ℃孵育3 h后,16 000 r/min离心10 min,收集上清。把脱脂后的样本置于分子筛(MVC 10×10^3)中,14 000 r/min离心30 min至浓缩完全;用8 mol/L尿素溶液清洗样品液3次,每次14 000 r/min离心30 min,倒转分子筛,3 000 r/min离心5 min,收集馏分;采用Bradford法进行蛋白定量(每例样本均重复测量3次)。

1.3 溶液内酶解

按40 μg的蛋白量分装样品,每组样品共需200 μg;向分装后的每个样品内加入10 μl 10 mmol/L DTT溶液,于56 ℃反应45 min;加入20 μl 20 mmol/L IAM溶液,避光反应1 h;加入10 μl 10 mmol/L DTT溶液,37 ℃反应1 h;加入40 μl 12.5 ng/μl胰酶溶液,37 ℃过夜反应。

1.4 除盐

上柱前准备完毕后接MRP柱[Macroporous Reversed-phase C18(mRP-C18),4.6×50 mm column],分别以H_2O+0.1% FA、乙腈+0.1% FA冲洗管路及MRP柱20 min,以50% H_2O+0.1% FA、50%乙腈+0.1% FA平衡MRP柱30 min,进空白水样冲洗进样回路;每组样品取110 μl,离心;编辑序列,上样分析;将收集的馏分编号,冻干备用。

1.5 OFFGE分离

首先取出IPG胶条,将胶条的封面去掉,低pH端置于电泳盘的正极,放上支架,每孔加入20 μl buffer液,再加20 μl去离子水,水化过夜;将样品用3.6 ml去离子水溶解,混匀,向每孔加150 μl的样品溶液,在支架的两旁各放2片湿润的盐桥;上电极,开机,调出方法,开始电泳聚焦,待分离完成后,收集馏分,每个样品经过等电聚焦分离得到24个组分,分别上质谱分析。

1.6 HPLC-CHIP-MS/MS质谱分析

在标准增强模式下进行MS分析,最大累计时间设置为150 ms,300~1 600 Th扫描,取5位平均数。在每个MS扫描后,允许2个先驱离子进一步分裂,在4个光谱之后具有活性排斥,在先驱离子最后一次分裂1 min后排斥解除。在MS/MS时,采用40 ms的扫描时间,MS/MS断裂幅度从1.3 V的30%~200%(SmartFrag)。在MS/MS分析时,使用1位平均数、3Th的分离宽度过度扫描模式,MS/MS的ICC智能目标设置为500 000,扫描范围200~2000。毛细管电压设置为1 900 V。最后干气流和温度设置为4 L/min,325 ℃。

1.7 Spectrum Mill搜索结果

采用Specrum Mill软件分析数据。以胰酶为蛋白酶,在默认的条件下获得原始数据,然后在IPI数据库中搜索针对人的序列,允许2个不完全裂解位点,并且包括在搜索中氧化甲硫氨酸和N-末端谷胺酰胺转化成5-氧-2-吡咯烷羧酸的变量修正,如果前向-逆转得分大于2,列1-列2得分大于2,得分阈值大于7.67,得分百分比峰强度大于70%,认为肽段有效。只有当蛋白具有2个或2个以上的有效肽段、总得分大于25时,认为是有效,可以报告。为了比较处理组间的鉴定的蛋白,我们采用每个蛋白光谱的数目和肽段的总计离子强度(总离子强度)作为蛋白量的指标。

2 结果

2.1 差异蛋白质的筛选

通过HPLC-CHIP-MS/MS质谱分析以及Spectrum Mill搜索,并选取Distinct Summed MS/MS Search Score≥6.00以及%AA Coverage≥2的蛋白位点。实验组1显示95个蛋白质点,实验组2显示165个蛋白质点,实验组3显示265个蛋白质点,对照组显示80个蛋白质点。实验组与对照组比较分析,确认实验组中含有而对照组不存在的蛋白点以及各实验组间对比排除共同的蛋白点,然后将这些候选蛋白点输入http://www.uniprot.org/uniprot/,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/查询,共得到109个高可信蛋白。

2.2 差异蛋白质点的功能分类

利用蛋白质组分析数据库所描述的蛋白功能,109个蛋白按功能分为15大类。转运蛋白5种、蛋白酶11种、蛋白激酶8种、免疫蛋白4种、糖蛋白5种、凋亡蛋白5种、蛋白酶抑制因子2种、调节蛋白5种、糖苷酶3种、脂酶6种、凝血因子3种、其他酶类17种、连接蛋白9种、癌基因3种、其他蛋白23种。

2.3 新增蛋白质点分析

在109个高可信蛋白质点中,发现12个新增蛋白质点(表1)。选取其中2个点分析,见OLFM4、CD146蛋白质谱图(图1、2)。

表1 HPLC-CHIP-MS/MS 质谱分析胆管癌胆汁样本中新增蛋白质点

序号	蛋白编码	蛋白缩写	蛋白全称	氨基酸覆盖率(%)	实验组别
1	O60667	FAIM3_HUMAN	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	41	1
2	Q6UX06	OLFM4_HUMAN	Olfactomedin-4	37	1
3	O00194	RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	10	1
4	Q96J77	TPD55_HUMAN	Tumor protein D55	5	1
5	Q9Y5R2	MMP24_HUMAN	Matrix metalloproteinase-2	3	2
6	Q96JP0	FEM1C_HUMAN	Protein fem-1 homolog C	2	2
7	P20813	CP2B6_HUMAN	Cytochrome P450 2B6	3	2
8	Q14641	INSL4_HUMAN	Early placenta insulin-like peptide	14	3
9	Q9Y6M1	IF2B2_HUMAN	Insulin-like growth factor 2mRNA-binding protein 2	5	3
10	Q5T2W1	NHRF3_HUMAN	Na^+/H^+ exchange regulatory cofactorNHE-RF3	4	3
11	P43121	MUC18_HUMAN	Cell surface glycoprotein MUC18	3	3
12	Q9Y572	RIPK3_HUMAN	Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3	2	3

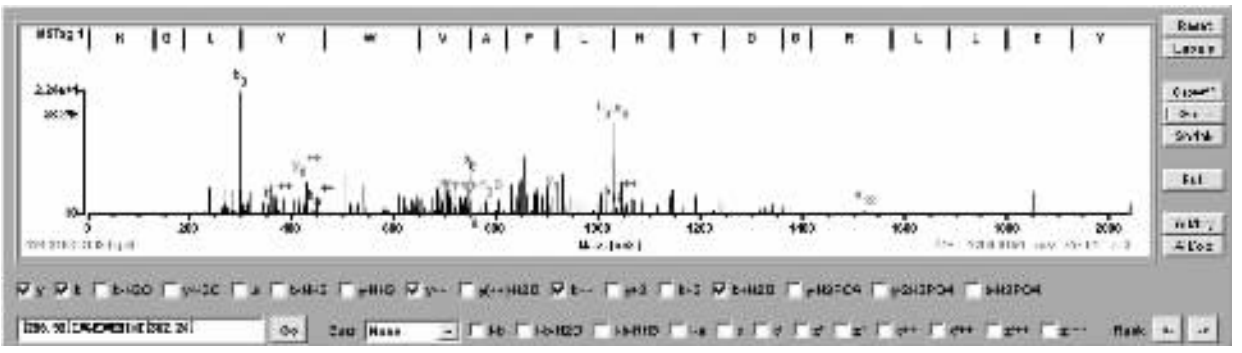


图1 OLFM4 蛋白质谱图

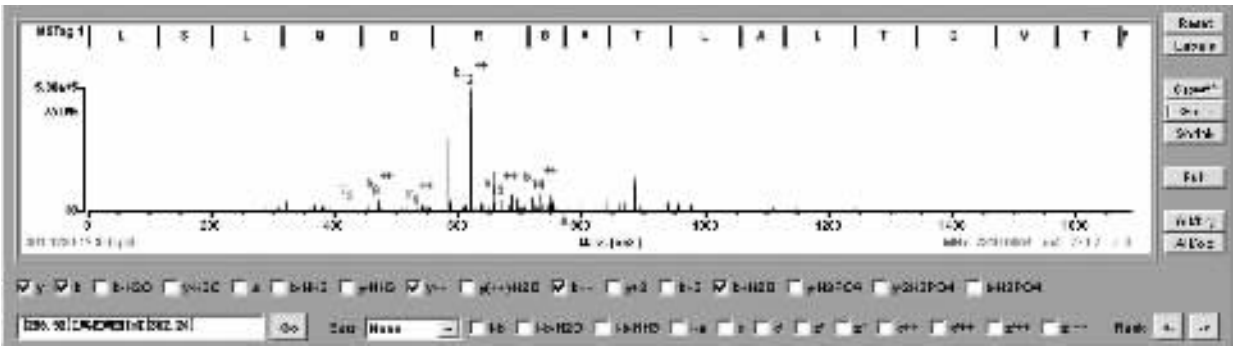


图2 CD146 蛋白质质谱图

3 讨论

蛋白质组学技术的发展为寻找有效的肿瘤标记物提供了新的思路[4-6]。但蛋白质组学研究成功与否，很大程度上取决于其技术方法水平的高低。虽然目前国内外已经初步成功构建了胆管癌和正常人胆汁的蛋白质图谱[7-8]，但还没有一种技术能够全面鉴别出胆汁中所有蛋白质，仍需要大量的后续研究来进行详实和扩充。

本课题组曾利用双向凝胶电泳-MAL-DI-TOF 质谱技术对胆管癌胆汁疾病相关的蛋白质进行分析，筛选出了58个蛋白质点，并分析了5种有意义的蛋白质[9]。Chen 等[7]也利用双向凝胶电泳对胆管癌胆汁进行了分析，但存在上样量的限制及低丰度蛋白、疏水蛋白、膜蛋白、极端等电点的蛋白无法进入双向凝胶电泳的有效分离范围内的缺陷。本实验在样品处理时使用了脱脂效果理想且蛋白回收率高的非离子型脱脂剂，以获得高纯化胆汁。运用反相高效液相色谱法与离子阱质谱技术完美结合的 HPLC-CHIP-MS/MS 技术，实现了对一些低丰度、碱性和极酸性蛋白、膜蛋白、

大分子质量和小分子质量蛋白等分离鉴定。我们筛选出了109个高信度蛋白点，而Kristiansen等[10]报道为87个蛋白点。这些蛋白点按功能可分为15类。同时，我们发现有12个蛋白质点在胆汁蛋白质组学研究中未曾报道过。根据Distinct Summed MS/MS评分和蛋白位点氨基酸的覆盖率，结合蛋白质功能与肿瘤的密切关系，本实验选择OLFM4和CD146两个蛋白质点进行分析。OLFM4是olfactomedin-related蛋白质家庭中的一员，由510个氨基酸组成，相对分子质量为55×10^3，是一种抗细胞凋亡因子[11-12]。近年研究显示，OLFM4与肿瘤细胞的增殖及细胞黏附等方面相关[13]，其在正常组织及癌旁组织只有低表达，而在癌组织中高度表达并具有分泌性表达的特点，可作为肿瘤标志物[14]。CD146是一种细胞膜糖蛋白，由603个氨基酸组成，相对分子质量为113×10^3。CD146介导细胞与细胞之间或细胞与细胞外基质之间的相互作用，有助于局部黏连聚集、细胞骨架重组、细胞间相互作用、细胞形态的维持及细胞游走和增殖的调控[15-16]。同时CD146能促进血管内皮细胞增殖和血管新生，其在许多恶性肿瘤组织中高表达[17-20]，提示CD146可能在肿瘤发生发展及转移中起重要作用。这些差异蛋白质点可能有助于胆管癌的早期诊断以及预后判断的参考指标。

本实验筛选出的差异蛋白质为胆管癌疾病相关蛋白质的后续研究奠定了基础。我们将从基因水平、蛋白质水平对差异蛋白进行验证，并进行与胆管癌发病的相关性、发病部位、手术前后有何改变以及作为联合诊断指标的可能性等方面的深入研究。

参考文献：

[1] Tamura T, Mizuyama Y, Shinto O, *et al*. A long-term survival case of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma treated with chemotherapy [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2010, 37(12): 2732-2734.

[2] 邢雅翕. 高位胆管癌56例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1172, 1175.

[3] 邹声泉. 胆汁蛋白质组研究筛选胆道肿瘤早期诊断标志物的意义[J]. 外科理论与实践, 2009, 14(2): 132-134.

[4] 刘国红, 杨继要, 呼琳, 等. 人胃贲门腺癌组织和正常胃黏膜组织蛋白质组双向电泳图谱的差异分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1712-1713.

[5] 赵艇, 高春芳, 魏东. SELDI飞行质谱技术检测结直肠癌患者血清肿瘤转移相关蛋白[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 662-663.

[6] 王茂生, 崔平. 蛋白质组学研究在胆道肿瘤诊治中的应用[J]. 中外医学研究, 2010, 8(6): 63-65.

[7] Chen B, Dong J Q, Chen Y J, *et al*. Two-dimensional electrophoresis for comparative proteomic analysis of human bile [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6(4): 402-406.

[8] Farina A, Dumonceau J M, Frossard J L, *et al*. Proteomic analysis of human bile from malignant biliary stenosis induced by pancreatic cancer [J]. J Proteome Res, 2009, 8(1): 159-169.

[9] 黄国飞, 王济明, 罗诗樵, 等. 人胆管癌与正常人胆汁蛋白质组学研究[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(2): 106-111.

[10] Kristiansen T Z, Bunkenborg J, Gronborg M, *et al*. A proteomic analysis of human bile [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(7): 715-728.

[11] Zhang X, Huang Q, Yang Z, *et al*. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth [J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 2474-2481.

[12] Kim K K, Park K S, Song S B, *et al*. Up regulation of GW112 Gene by NF kappaB promotes an antiapoptotic property in gastric cancer cells [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(3): 259-270.

[13] Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, *et al*. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells [J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 334-340.

[14] Oue N, Sentani K, Noguchi T, *et al*. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg Ⅳ is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2383-2392.

[15] Kang Y, Wang F, Feng J, *et al*. Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells [J]. Cell Res, 2006, 16(3): 313-318.

[16] So J H, Hong S K, Kim H T, *et al*. Gicerin/Cd146 is involved in zebrafish cardiovascular development and tumor angiogenesis [J]. Genes Cells, 2010, 15(11): 1099-1110.

[17] Morozov A, Downey R J, Healey J, *et al*. Benign mesenchymal stromal cells in human sarcomas [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(23): 5630-5640.

[18] Mills L, Tellez C, Huang S, *et al*. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma [J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 5106-5114.

[19] Aldovini D, Demichelis F, Doglioni C, *et al*. M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. Int J Cancer, 2006, 119(8): 1920-1926.

[20] Garcia S, Dales J P, Charafe-Jauffret E, *et al*. Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increase expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype [J]. Hum Pathol, 2007, 38(6): 830-841.

（收稿 2010-11-15 修回 2011-01-27）

（编辑 栾 嘉）