维普资讯 http://www.cqvip.com



·综 述·

# 蛋白质组学在肿瘤诊断及治疗中的进展

## Progress of proteomics in diagnosis and therapy of tumor

徐红梅[1]，秦 琴[2]，胡志安[1] （1.第三军医大学基础医学部教学实验中心，重庆 400038；2. 解放军95830部队门诊部，北京 100011）

[关键词] 蛋白质组学；肿瘤；诊断；治疗
[中图分类号] R730.4 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2006)03-0197-03

蛋白质组(proteome)指的是由一个基因组表达的全部蛋白质，由马克·威尔金斯(Marc Wilkins)于1994年首先提出，旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式，鉴定蛋白质的存在方式(修饰形式)，研究其结构、功能、定量和相互作用等。蛋白质组学研究的技术主要有双向凝胶电泳技术(2-DE)，质谱技术(MS)，以及生物信息学技术。目前认为恶性肿瘤的发生是由环境与遗传因素相互作用而导致许多基因突变，从而导致蛋白质的表达、结构和功能改变。蛋白质组学在肿瘤高危人群的筛选，肿瘤标志物的鉴定，肿瘤细胞的蛋白质分子变化的分析，以及肿瘤的预防、诊断、治疗及预后研究方面是一个先进有效的工具。

## 1 蛋白质组学的研究方法

### 1.1 双向凝胶电泳技术

2-DE是一种有效的分离蛋白质的方法。其原理是根据蛋白质的等电点和相对分子量特异性，将蛋白混合物在第一个方向上按等电点的高低进行分离即等电聚焦，在第二个方向上按相对分子量大小进行分离。双向电泳的第一向是等电聚焦(IEF)，根据蛋白质等电点不同而将之分离。第二向是SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，根据蛋白质分子质量不同进一步分离等电点相同的蛋白质。2-DE技术具有分辨率高、结果直观、实验成本相对较低等特点，已成为蛋白质组研究中最常用的分离技术。但2-DE技术本身亦存在许多缺陷，如对于高疏水性、低丰度、极酸或极碱、分子质量过大(>200 KD)或过小(<10 KD)的蛋白质的分离分析能力差；对于相同蛋白质表达量的变化，检出能力较低，重复性较低，不易实现自动化操作，因此，尚不能适应大规模蛋白质组分析的需要。

### 1.2 质谱技术

MS是带电原子、分子或分子碎片按质荷比(或质量)的大小顺序排列的图谱。质谱技术是鉴定蛋白质的一种手段。其基本原理是将化合物形成离子和离子碎片，按其质荷比的不同进行分离测定，来进行成分和结构分析[1]。通过质谱分析，可以获得分析样品的分子量、分子式、分子中同位素构成和分子结构等多方面的信息。常用的质谱技术有：① 电喷雾质谱(ESI-MS)—是在喷射过程中以连续离子化方式使多肽样品电离。② 基质辅助激光解吸质谱(MALDI)—是利用基质吸收激光的能量使得固相的多肽样品离子化[2]。它常与飞行时间质谱(TOF-MS)联用，称为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)[3]。它是将多肽成分转换成离子信号，并依据m/z来对多肽进行分析。将待检样品与含有在特定波长下吸光的发光团的化学基质混合，将分析物分散在基质分子中形成晶体，用激光(337 nm氮激光)照射晶体时，使基质分子吸收激光能量而被激活，此激活产生的能量作用于多肽，使之由固态样品混合物变成气态，再直接进入TOF质量分析仪。测量多肽离子由分析仪的一端飞抵另一端探测器所需要的时间，最后经电脑软件探测器寻得的多肽m/z同数据库中不同蛋白经蛋白酶消化后所形成的特定多肽的m/z比较，鉴定该肽来源蛋白质。即多肽质量指纹分析。该法操作简便，敏感性高，是质谱鉴定方法首选的方法。另外还有快原子轰击质谱和同位素质谱等[4]。

### 1.3 生物信息学

生物信息学是随着人类基因组计划、计算机技术、网络技术的发展而诞生的一门新兴学科，是蛋白质组学研究中不可缺少的一部分[5]。蛋白质组的生物信息学—数据库和分析软件是蛋白质组的研究不可缺少的信息学手段[6]，利用生物信息学将质谱分析结果与蛋白质数据库中的氨基酸序列进行比较，即可实现蛋白质的鉴定。用于蛋白质鉴定的数据库主要有以下几类：① 蛋白质氨基酸序列数据库；② 蛋白质结构域与家族数据库；③ 蛋白质高级结构及分类数据库；④ 蛋白质2-DE图谱数据库；⑤ 蛋白质相互作用数据库。常用的蛋白质数据库有SWISS-PROT / TrEMBL、Protein Information Resource (PIR)、NCBInr、dbEST、OWL、UniGe。

## 2 蛋白质组学在肿瘤研究方面的应用

### 2.1 寻找及鉴别肿瘤标志物

蛋白质组学在肿瘤研究中应用的一个主要方面，就是寻找新的、特异的肿瘤相关蛋白—肿瘤标志物，因此，对肿瘤的早期诊断和分型具有重大意义[7]。

2.1.1 呼吸系统肿瘤 常见肿瘤标志物中肺癌标志物最多，其中包括蛋白质、内分泌物质、酶、肽类和各种抗原物质。

[收稿日期] 2006-01-20 [修回日期] 2006-03-05

维普资讯 http://www.cqvip.com



Chen 等[8]对肺腺癌进行了蛋白组分析，运用固相 pH 梯度双向凝胶电泳方法检测 93 例肺腺癌患者和 10 份非肺癌标本，进而用 MALDI-MS 进行肽段分析，结果发现有 9 例蛋白中的单一亚型在肺腺癌中表达，有助于成为该种肿瘤的生物学标记[9]。肺癌血清蛋白质组分析发现了一个命名为 PGP9.5 的蛋白质，特异性表达于肺癌细胞系 A549，在部分肺癌患者当中也检测到 PGP9.5 的抗体，基因表达序列分析发现 PGP9.5 高表达于原发性肺癌组织和肺癌细胞系，有望成为肺癌筛选和早期诊断的指标[10]。李峰等运用蛋白质组学技术对鼻咽癌细胞系 HONE1 进行分析，鉴定出人鼻咽癌细胞系 HONE1 中表达较强的 10 个点相应的蛋白质。

2.1.2 消化系统肿瘤 Huang 等[10]对 2 例食管鳞癌及其邻近正常鳞状上皮的蛋白质组变化进行研究，发现有 17 种蛋白为肿瘤特异改变，其中 10 种只存在于肿瘤细胞中。Kennedy 等[11]对 33 例原发性肝细胞癌患者、19 例肝硬化及 19 名健康人的血清进行蛋白质组学研究，发现 10 种蛋白在原发性肝细胞癌中有差异表达，可作为潜在的肿瘤标志物。Ahmed 等[12]对具高转移性的结肠癌细胞系 HCT116 研究发现，血浆尿激酶型溶酶原激活剂（uPA）及其受体（uPAR）在肿瘤转移过程中发生丢失，提示 uPA 和 uPAR 可能是造成结肠癌进展或转移的重要因素，有望成为肿瘤监测和治疗的新指标。Chaurand 等[13]通过 MALDI 技术对正常结肠组织和结肠癌进行分析后发现，钙结合蛋白 calgranulin（S100）家族中的几种蛋白质：calgranulin A（S100A8）、calgranulin B（S100A9）和 calgizzarin（S100A11）在肿瘤组织中表达上调，提示上述 3 种蛋白可能为结肠癌特异性标记物。

2.1.3 泌尿系统肿瘤 应用 SEL-DI-MS 对膀胱移行癌和鳞状细胞癌组织及其尿液中蛋白表达情况进行研究，在患者尿液中发现了 5 个新的标志物和蛋白簇。Adam 等[14]用 SELDI 蛋白质芯片系统从血清中筛选出前列腺癌的特异性生物标记物，并用于诊断，当用其中 21 个蛋白作为一个诊断组来诊断前列腺癌与非前列腺癌时特异性和敏感性可达 97%。Sarto 等将 10 个肾细胞癌病人的癌组织和 10 个正常肾组织的蛋白质组表达谱进行分析，发现血浆谷胱甘肽过氧化物酶的两种异构体和锰超氧化物歧化酶（Mn-SOD）的两种单体只出现在正常组织中，而 Mn-SOD 多聚体只出现在肿瘤组织中，因此认为这两种蛋白质可作为肾细胞癌的诊断标志物。

### 2.2 肿瘤药物的研究和新药筛选

目前，一些抗肿瘤药物在体内的作用机理并不清楚。应用蛋白质组学研究技术，分析药物处理过的细胞、组织或体液表达的蛋白质组，并比较处理前后的蛋白质组的差异，鉴定其中发生相应变化的蛋白质，可揭示药物的作用机理。蛋白质组学在药物作用靶点的发现和筛选模型的建立上，有其独到的优越性。在寻找药物和作用靶点时，可将一个细胞或组织的健康和疾病状态的蛋白质组图谱进行比较，找出差异蛋白质。这是蛋白质组学的最普遍的应用—比较蛋白质组学。对疾病和正常组织的不同蛋白质组进行分析来鉴定疾病（如癌症）过程中的诊断标志物，也属于靶点探测的一部分内容。蛋白质组学可以提供一种发现和鉴定在疾病过程中表达异常的蛋白质（疾病相关蛋白质）的方法，此蛋白质可作为药物筛选的作用靶点或是相关疾病的分子标志物。蛋白质组学研究技术也可应用于新药筛选。目前，组合化学技术的成熟可以源源不断地提供新药开发的新化合物。但是，由于筛选技术的相对落后，仍是制约新药研发的最大瓶颈。而应用蛋白质组学研究技术进行新药筛选，由于可以同时观察活性化合物对细胞、组织中数千种蛋白质表达的影响，因而在这方面具有明显优势。

## 3 展望

蛋白质组学作为跨越基因组与临床应用之间鸿沟的桥梁，在诞生后的几年中已经取得了突飞猛进的发展，蛋白质组学研究的新方法、新技术、新观点不断涌现，展现出广阔的应用前景。但是蛋白质组学的研究仍然难以实现鉴定细胞和组织的每一个蛋白质，对于一些极酸、极碱、低丰度、难溶蛋白质的检测仍存在一定难度。对于肿瘤与正常组织或细胞的差异分析，也往往缺少适合的正常组织和细胞作为对照。目前蛋白质数据库还不成熟，建立完整的蛋白质数据库还需要很长的时间。总之，随着基因组研究的进一步拓展，蛋白质研究数据的不断积累，我们将在更高的水平上寻找肿瘤的功能蛋白质组和生物标志物，在肿瘤发病机理研究、肿瘤的诊断和治疗方面取得重大突破，为肿瘤的研究、诊断和治疗带来新的希望。

## [参考文献]

[1] Kuster B, Mortensen P, Andersen JS, et al. Mass spectrometry allows direct identification of proteins in large genomes [J]. Proteomics, 2001, 1(5): 641-650.

[2] Chalkley RJ, Burlingame AL. Identification of GlcNA cylation sites of peptides and alpha-crystallin using Q-TOF mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2001, 12(10): 1106-1113.

[3] Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 437-473.

[4] Zhou H, Ranish JA, Aebersold R, et al. Quantitative proteome analysis by solidphase isotope tagging and mass spectrometry[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 512-515.

[5] Boguski MS, Mclntosh MW. Biomedical informatics for proteomics[J]. Nature, 2003, 422: 233-237.

[6] O'Donovan C, Apweiler R, Bairoch A, et al. The human proteomics initiatve (HPI) [J]. Trends Biotech, 2001, 19(5): 178-181.

[7] Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer[J]. Nature Rev, 2003, 3 (4): 267-275.

[8] Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2298-2305.

[9] Birchory F, Beer D, Hanash S, et al. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer [J]. Cancer Research, 2001, 61 (21): 7908-7912.

[10] Huang J, Hu N, Taylor P, et al. An approach to proteomic analysis of human tumors[J]. Mol Carcinog, 2000, 27(2): 158-165.

维普资讯 http://www.cqvip.com



[11] Kennedy S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative[J]. Toxicol Lett, 2001, 120 (123): 379 - 384.
[12] Ahmed N, Oliva K, Wang Y, et al. Proteomic profiling of proteins associated with urokinase plasminogen activator receptor in a colon cancer cell line using an antisense approach[J]. Proteomics, 2003, 3 (3): 288 - 298.
[13] Chaurand P, DaGue BB, Pearsall RS, et al. Profiling proteins from azoxymethane induced color tumors at the molecular level by matrix2assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry[J]. Proteomics, 2001, 1(10): 1320 - 1326.
[14] Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a patternmatching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostae hyperplasia and healthy men[J]. Cancer Res, 2002, 62(13): 3609 - 3614.

(编辑:蒋登金)

# 自动血细胞计数质量标准的研究进展

## Research progress in quality specification of the automated blood cell count

**汤桂丽** (解放军第324医院检验科,重庆 400020)

[关键词] 血细胞; 计数; 质量标准
[中图分类号] R446.111 [文献标识码] B [文章编号] 1672 - 5042(2006)03 - 0199 - 02

任何实验室检测的主要目的是得出足够准确的结果供临床使用。自动血细胞计数包括全血细胞计数(CBC),分类白细胞计数(DLC),及网织红细胞计数等分类计数。现在,关注的焦点问题是数字结果的可靠性,自动分析的效率,以及对病理标本(包括幼稚或非典型细胞)提供临床诊断的敏感性。一个完整的质量规划还应考虑分析前和分析后阶段的其他方面,以下几个方面是将来发展要重点考虑的论题:抗凝剂的影响、样品保存时间和温度是分析前阶段的焦点问题;分析阶段的不精密性和偏倚;分析后阶段的医学考查标准和标准的报告。下面,本文就抗凝剂的选择、标本保存、分析的不精密性、分析偏倚和报告的质量等方面进行综述。

## 1 抗凝剂的选择

国际血液病标准化委员会(ICSH)于1993年公布推荐用于的$K_2$EDTA(乙二胺四乙酸)为细胞计数和测量细胞大小的抗凝剂。$K_2$EDTA优于$K_3$EDTA的地方在于无对标本的稀释效应和较少影响红细胞平均容积(MCV),而$K_3$EDTA使红细胞皱缩致MCV降低。以往发表的不同的研究对比了$K_2$EDTA与$K_3$EDTA在自动检测CBC和DLC中的效果,只有部分结果相同;Asanuma等在血液PH值不同时发现两种抗凝剂对MCV值检测的差别,使用$K_3$EDTA时MCV值偏低,并在pH降低时出现更大的偏差[1]。这种结果涉及血液透析病人的血样和使用光散射方法测量细胞容积的仪器。VanCott等分析了正常受试者和病人的样本在4 ℃环境保存4 h或24 h后,用光散射分析器测定,他们发现在使用$K_3$EDTA的所有的案例中只有CBC参数轻微的降低[2]。这些检测结果差别应归因于液态$K_3$EDTA的稀释效应,案例中的MCV值差异是由于红细胞皱缩。总之,根据国际血液病标准化委员会的标准,$K_2$EDTA应该是自动血细胞计数的首选抗凝剂。

## 2 样本保存和稳定性

血液中的细胞成分在EDTA液中有限的稳定时间,过度的延迟处理会导致检测结果的精密性受到影响。而且,样本保存的另一方面必须注明,即光学或阻抗自动计数的方法差别。样本保存在低温环境下被认为能改善部分CBC和DLC参数的稳定性[3-7],但是,目前还没有系统的研究用有效的仪器证实正常样本和病理标本在延迟检测时会产生完全不同的结果。Wood等用自动分析仪的阻抗法检测CBC,光学法检测DLC(Cell Dyn 3500, Abbott),标本在室温下保存24 h后检测只有MCV升高约2.6%。白细胞计数在光学法检测时系统地偏低8.5%,阻抗法检测时稳定,其余地CBC参数稳定。他们注意到,DLCs中所有样本的中性粒细胞计数降低而淋巴细胞和嗜碱粒细胞计数升高;这种差别在病人的标本比对照更明显。标本保存在4 ℃环境24 h的CBC参数比室温保存更稳定,仅有中性粒细胞轻微升高和淋巴细胞稍稍降低,嗜碱粒细胞升高的百分比在两种保存方法中类似。甚至在细胞涂片镜检的DLC中,样本在室温保存24 h后检测,表现为中性粒细胞百分比值升高和淋巴细胞降低,可能是因为中性粒细胞的核变化在4 ℃保存时不发生[8]。Houwen建议制备血涂片做显微镜分析最好在标本收集2 h内完成,即使8 h后所做的血涂片结果仍能接受,但标本必须保存在4 ℃环境中[9]。

## 3 分析的不精密性

从病人的血液样本中得出的分析结果的精确度是很重要的,即使结果中包含的分析和生物学的差异不被临床医生所直接理解。如果其中的某一元件远大于其他参数,它就成为限制因素。在评估一个方法的精密度时,必然要求了解生物学变异:改进分析精密度超过某种限制,因为当一个参数具有高度

[收稿日期] 2006 - 01 - 25 [修回日期] 2006 - 04 - 11