恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0542-04

早期肺鳞癌患者与正常人血清表达差异蛋白筛选

韩 冰，吴 倩，谢汝佳，杨 婷，杨 勤
（贵阳医学院病理生理教研室，贵阳 550002）

【摘 要】目的：应用蛋白质组学方法来比较早期肺鳞癌患者和健康人血清蛋白质的差异，筛选与肺鳞癌发生发展密切相关的蛋白质。方法：以 6 例Ⅰ期肺鳞癌患者血清和健康正常人血清为研究对象，运用比较蛋白质组学方法，用双向凝胶电泳（2-Pimentional electrophoresis，2-DE）分离肺鳞癌患者血清和正常人血清的总蛋白质，银染显色后经图像分析识别差异表达的蛋白质，再应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF-MS）鉴定差异表达的蛋白质点。结果：肺鳞癌患者血清和健康正常人血清的平均蛋白质点数分别为 939 ± 40 和 962 ± 27，匹配率达 89.2%和 87.1%；找到表达量差异 3 倍以上蛋白质点 25 个；对 25 个差异蛋白质点进行分析，得到了 16 张肽质量指纹图谱，最终鉴定出 8 个差异蛋白质。其中，有 3 个蛋白质只在早期肺鳞癌患者血清中表达，1 个蛋白质在早期肺鳞癌患者血清中表达显著上调。另 4 个蛋白质在早期肺鳞癌患者血清中表达显著下调或缺失。结论：通过对早期肺鳞癌患者和健康正常人血清的蛋白质表达谱进行比较，鉴定出 8 个与早期肺鳞癌可能相关的蛋白质，为进一步筛选肺鳞癌早期诊断、治疗和预后评估的分子生物学标志物奠定了基础。

【关键词】早期肺鳞癌；双向凝胶电泳；血清蛋白质组学；分子标志物
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-26

Differential proteomic analysis of serum from early-stage lung squamous carcinoma patients and normal subjects

HAN Bing, WU Qian, XIE Ru-jia, YANG Ting, YANG Qin
（*Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College*）

【Abstract】*Objective*: To compare and analyze the difference in serum proteins between patients with early-stage lung squamous carcinoma（LSC）and normal subjects and identify the proteins related with LSC. *Methods*: Serum samples were collected from 6 normal subjects and 6 patients with stage 1 of LSC. 2-DE were performed to separate serum proteins. After silver staining, the proteins of differential expression were analyzed and then identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry（MALDI-TOF-MS）. *Resluts*: There were an average of（939 ± 40）spots and（962 ± 27）spots on 2-DE matching of two groups and the matching rates were 89.2 % and 87.1%. From the two groups, 25 differential protein spots with over three times of differential expressions were analyzed by MALDI-TOF-MS. 8 proteins were identified, of whith 3 proteins were expressed only in sera of the patients with early-stage LSC. Up-regulated expression was observed in 1 protein and down regulated expression or scarce expresseion were observed in 4 proteins in the patient serum group. *Conclusion*: Compared with the normal subject group, the sera in the early-stage lung squamous carcinoma patients group showed differential expression in protein profile. The proteins with differential expression are expected to be the serum markers for lung squamous carcinoma.

【Key words】early-stage lung squamous carcinoma; 2-Pimentional electrophoresis(2-DE); serologic proteome analysis; molecular biomarke

由于临床缺乏有效的用于肺鳞癌早期诊断和预后监测的特异性分子标志物，导致目前肺鳞癌患者早期诊断率和预后生存率无明显提高[1,2]。而分子标志物是肿瘤早期诊断最敏感的指标，因此寻找到准确特异的分子标志物成为肺鳞癌防治的研究热点。在肿瘤细胞生长增殖过程中与周围环境不断发生物质交换，它们分泌的各种蛋白质进入血液后成为肿瘤标志物。本研究正是基于此研究目的，采用双向凝胶电泳（2-Pimentional electrophoresis，2-DE）技术分离早期肺鳞癌患者和健康正常人血清的总蛋白质，获取血清蛋白质表达谱，寻找差异蛋白质点，再利用质谱技术对差异蛋白质进行鉴定，以期找寻其潜在的分子生物学标志物，为早期诊断、筛查肺鳞癌提供客观依据。

作者介绍：韩 冰（1979-），男，博士，
研究方向：脏器纤维化发病机制。
通信作者：杨 勤，女，教授，Email:qinyang@gmc.edu.cn。
基金项目：国家自然基金资助项目（编号：30360036）。

表达与组织部位、细胞类型及分化程度有关。CK10 只在基底层以上细胞中表达，并随着上皮的成熟而增强。它的主要功能是调控上皮细胞的生理功能，不仅可影响细胞的自身形态，还可影响组织的动态平衡，是上皮角化细胞终末分化的标志。在分化好的角质层角化细胞中，被看作正常角化矫正的标记物。此外，它通常还可作为肿瘤分化程度的标志物。这可能是不同的 CK 介导不同的信号通路所致，与肿瘤发生、发展中细胞病理表型及病理生理过程有重要关联[16]。以往研究表明 keratin 10 在皮肤及内脏复层上皮来源的高分化鳞状细胞癌：如膀胱鳞状上皮细胞癌、口腔鳞癌中高表达，并与细胞的分化程度密切相关[17]，本研究中发现 CK10 只在早期肺鳞癌患者血清中表达，与李萃[18]等用肿瘤免疫学结合蛋白质组学的方法研究的结果一致。因此提示 CK10 可作为肺鳞癌早期诊断的 1 个标记物。

Haptoglobin（HP）结合珠蛋白，又称触珠蛋白。是 1 种血浆酸性糖蛋白，广泛存在于人类和许多哺乳动物的血清及体液中。HP 有 6 种异构体，能结合游离的血红素以防止肾脏、脉管系统等受游离的血红素所诱导的氧化性损伤，并促进血红素内铁的循环[19]。此外，结合珠蛋白作为 1 种急性期蛋白，参与宿主抗感染，损伤组织的修复以及维持内环境稳定的过程中起着重要作用。其血清含量在感染、创伤、炎症、心肌梗死等病理状态时显著升高，在肿瘤的发生发展过程中，HP 也具有参与上皮细胞的恶性转化、免疫抑制和血管生成等作用[20]。已有研究报道，HP 在卵巢癌、乳腺癌、白血病等肿瘤患者血清中表达水平上调，为潜在的肿瘤血清标志物[21]。最近有研究报道肺部损伤时有血清或组织 HP 表达增加。本研究中发现 HP 在早期肺鳞癌患者血清中表达升高，与聂赣娟等[22]用 ESI-Q-TOFMS/MS 鉴定肺鳞癌患者血清的结果一致，其结果经过 Western blot 验证，提示 HP 在肺鳞癌诊断方面具有潜在的临床应用价值。

此外，本实验中转铁蛋白（Transferrin）、血清白蛋白（Serum albumin）等蛋白质在肺鳞癌患者血清中表达明显下调，这可能是与机体生理状态有关。转铁蛋白在肝内合成，最基本的生理功能就是结合、运输三价铁离子，它提供可利用铁，是细胞生长和增殖所必需的生长因子，它在血液和细胞中传递能量，更具有抗菌杀菌的保护功能，可能还参与和其它蛋白质的共同作用，与机体抗肿瘤免疫有关。肾病综合征、肝硬化、恶性肿瘤、炎症等也可引起其表达降低[23]。血清白蛋白是血液中最为丰富的蛋白质，是血液系统的重要组分，具有结合和运输内源性及外源性物质，维持血液胶体渗透压、清除自由基、抑制血小板的功能和抗凝血以及影响动脉血管的渗透性等生理功能。重症病人常伴随血清白蛋白的减少，因此，它也成为临床上严重病症的 1 个非特异性的指标。血清白蛋白下降越显著，则提示病情越重，死亡率越高。因此，我们认为，这些蛋白在肺鳞癌患者血清中表达下调可能是肺癌患者全身表现的一部分，但也不排除它们可能是肺鳞癌潜在的分子标志物之一。

总之，肿瘤的发生发展过程与细胞增殖、分化、凋亡等正常生命活动息息相关，由于各种基因或蛋白质水平的变化，如一些与细胞生长、分裂和增殖有关的蛋白质过表达而导致增殖失控、凋亡受阻以及侵袭与转移能力等等，使细胞在整个基因或蛋白质调控网络上表现出与正常细胞的许多区别，最终引起肿瘤的发生。本文的研究结果显示：Nesprin-2 在肺鳞癌患者血清中的表达水平显著高于正常人血清，keratin 10、Haptoglobin、Xin B 只在肺鳞癌患者血清中表达，且后三者与其他学者对肺鳞癌的研究报道一致，提示这些差异蛋白在早期肺鳞癌发生发展中具有重要的作用，很可能是肺鳞癌早期诊断潜在的血清分子标志物。serum albumin 等血清蛋白在肺鳞癌血清中的表达水平显著低于正常对照血清，这可能是肿瘤状态下机体病理改变的反映，也不排除它们是肺鳞癌的潜在标志物，可对肺鳞癌治疗及预后监测提供一些参考。

参 考 文 献

[1] Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1): 33-64.

[2] Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2003[J]. CA Cancer J Clin, 2003, 53(1): 5-26.

[3] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.

[4] Randles K N, Lam le T, Sewry C A, et al. Nesprins, but not sun proteins, switch isoforms at the nuclear envelope during muscle development [J]. Dev Dyn, 2010, 239(3): 998-1009.

[5] Broderick M J, Winder S J. Specn, alpha-actinin, and dystrophin[J]. Adv Protein Chem, 2005, 70: 203-246.

[6] Warren D T, Tajsic T, Mellad J A, et al Novel nuclear nesprin-2 variants tether active extracellular signal-regulated MAPK1 and MAPK2 at promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and act to regulate smooth muscle cell proliferation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(2): 1311-1320.

[7] Zhang Q, Ragnauth C D, Skepper J N, et al. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle[J]. Cell Sci, 2005, 118(4): 67-87.

[8] Oh P, Li Y, Yu J, et al. Subtraetive proteomic mapping of theendo the lial surface in lung and solid tumours for tissue specific therapy [J]. Nature, 2004, 429(6992): 629.

[9] Gerke V, Moss S. Annexins: from structure to function[J]. Physio Rev, 2002, 82(10): 331.

[10] Alldridge L C, Bryant C E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the $ERK_{1/2}$ MAPK signal[J]. Exp Cell Res, 2003, 290(1): 93.

[11] Rosengarth A, Gerke V, Lueche H. X-ray structure of full-length annexin l and implications for membran e aggregation[J]. J M ol Biol, 2001, 306(3): 489-498.

恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0546-04

重组人血管内皮抑素联合 NP 方案对人乳腺癌裸鼠移植瘤作用的实验研究

程 丽[1]，张幸平[1]，杨鸿捷[2]，周涛琪[1]，饶明月[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科，重庆 400016；2. 成都医学院基础医学院形态学教研室，成都 610081）

【摘 要】目的：探讨重组人血管内皮抑素（Recombinant human endostatin，rh-ES）联合长春瑞滨＋顺铂（NP 方案）化疗对人乳腺癌裸鼠移植瘤的肿瘤生长及新生血管生成的抑制作用。方法：将 40 只荷瘤裸鼠随机分成 NP 方案组（A 组）、rh-ES 组（B 组）、联合用药组（C 组）和空白对照组（D 组），每组 10 只。A 组给予 NP 方案化疗 1 周期，B 组给予 rh-ES 2 周期，C 组给予 rh-ES 两周期加 NP 方案 1 周期，D 组给予等剂量生理盐水。其中，rh-ES 连续用药 14 d 为 1 周期，间隔 7 d 后重复 1 周期。计算各组抑瘤率，绘制肿瘤生长曲线。肿瘤组织进行免疫组化法染色，测各组血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）及微血管密度（Microvascular density，MVD）的表达。结果：A、B、C 3 组抑瘤率分别为 61.80%、64.79%、88.95%，C 组抑瘤率明显高于其它两组。C 组与 A、D 两组比较 VEGF 表达，具有显著的统计学差异（P 值均为 0.001）。C 组与 A、B、D 3 组比较 MVD，P 值分别为 0.000，0.006 和 0.000，均具有统计学意义。结论：rh-ES 联合 NP 方案化疗能明显抑制人乳腺癌裸鼠移植瘤生长及新生血管生成，且两者联用具有协同作用。

【关键词】乳腺癌；MCF-7 细胞株；重组人血管内皮抑素；血管内皮生长因子；微血管密度

【中国图书分类法分类号】R73-36 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-16

作者介绍：程 丽（1982-），女，硕士，研究方向：肿瘤临床及基础研究。

通信作者：张幸平，女，教授，Email：zhang.xinping@163.com。

[12] Km S W，Rhee J，Ko J，et al.Inhibition of cytosolic phospholipase A2 b annexin I：specific interaction model and mapping of the interaction site[J].J BiolChem，2001，276（19）：151712-151719.

[13] Alldridge L C，Bryant C E.Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the $ERK_{1/2}$ MAPK signal[J].Exp Cell Res，2003，290（1）：93.

[14] 张 毅，孙树汉，陈 蕊，等.一个新的钙磷脂结合蛋白-Annexin32 对血凝及血栓形成的影响[J].中国科学，2002，32（2）：172-175.

[15] Bai X F，Ni X G，Zhao P，et al.Overexpresion of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance[J].World J Gastroenterol，2004，10（10）：1466-1470.

[16] Rao J Y.Targeting actin remodeling profiles for the detection and management of urothelial cancers a perspective for bladder cancer research [J].Front Biosci，2002，7（1）：1-8.

[17] Rrichelt J，Fursten berger G，Magin T M.loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase（MAPK）activation，increased keratinocyle turnover，and decreased tumor formation in mice[J].J Invest Dermatol，2004，123（5）：973-981.

[18] 李 萃，肖志强，章晓鹏，等.人肺鳞癌组织的血清蛋白质组学的比较分析[J].中国生物化学与分子生物学报，2005，21（3）：357-368.

[19] Hoagland L F，Campa M J，Gottlin E B，et al.Haptoglobin and post-translational glycan-modified derivatives as serum biomarkers for the diagnosis of nonsmall cell lung cancer[J].Cancer，2007，110（10）：2260-2268.

[20] Juan H F，Chen J H，Hsu W T，et al.Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques：from mouse to human[J].Proteomics，2004，4（9）：2766-2775.

[21] Huang H L，Stasyk T，Morandell S，et al.Biomarker discovery in breast cancer serum using 2D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays[J].Electrophoresis，2006，27（8）：1641-1650.

[22] 聂赣娟，李茂玉，张鹏飞，等.肺鳞癌患者和健康人血清的差异蛋白质组学研究[J].国际病理科学与临床杂志，2007，27（6）：470-475.

[23] 龙 华，曾 勇，郑 英.转铁蛋白的研究与发展[J].生物工程进展，2001，21（2）：32-39.

（责任编辑：冉明会）