技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)08-1212-05

蛋白质组学技术筛选肝癌血浆/血清中的差异蛋白质

尚京川[1],易发平[2],吴民军[3],母昭德[1]

(重庆医科大学:1.药学院药物分析教研室;2.分子医学与肿瘤研究中心,3.生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立分析肝癌患者血浆/血清中低丰度差异表达蛋白质的双向凝胶电泳(2-DE)方法。方法:以 10 例肝癌患者血浆、8 例肝癌患者血清及 8 例正常志愿者血浆和血清为研究对象,选用安捷伦免疫亲和色谱 Agilent MARS Spin Cartridge 去除血浆中 6 种主要高丰度蛋白,2-DE 分离血浆/血清低丰度蛋白质,差异蛋白质斑点经酶解后,MALDI-TOF/MS 检测的肽指纹谱(Peptide mass fingerprinting,PMF)在 NCBInr 数据库中进行搜索。结果:10 例肝癌患者血浆样品中共鉴定出有 20 种差异蛋白,其中 18 种表达上调,2 种表达。8 例肝癌患者血清样品中共鉴定出 23 种差异蛋白,其中 17 种蛋白表达上调,6 种蛋白表达下调。在肝癌患者血清和血浆组中共同识别到 2 种差异蛋白质。结论:血浆组中识别到的指环蛋白 34(RING finger protein 34),威尔姆肿瘤 1-关联蛋白(Wilms' tumor 1-associating),CD147 抗原,卵泡前体 FS(Follistatin precursor,FS)蛋白和血清组中识别到的蛋白激酶 NYD-SP9(Protein kinase NYD-SP9),肿瘤坏死因子受体超家族成员 19 前体(Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 precursor),组蛋白键合蛋白 RBBP4(Histone-binding protein RBBP4),FADD 蛋白,26S 蛋白酶调控亚基 P28(26S proteasome regulatory subunit p28),CD82 抗原,自体吞噬蛋白 5(Autophagy protein 5)等蛋白有望成为(Hepato celluar careinoma,HCC)的特异蛋白。

【关键词】肝细胞癌;血浆/血清;蛋白质组学;双向电泳;MALDI-TOF/MS

【中国图书分类法分类号】Q592.1;R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-03

Selection and identification of differential proteins in plasma/serum with hepatocellular carcinoma by proteomic techniques

SHANG Jing-chuan, et al

(*Department of Medicine Analysis, College of Pharmaceutical, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE) technique for plasma/serum proteomics. *Methods*: Plasmas from 8 healthy volunteers and 10 with hepatocellular carcinoma (HCC), and sera from 8 HCC were collected. After six proteins of the highest abundance in plasma/sera were depleted by the Multiple Affinity Removal System (MARS) Technologies from Agilent, plasma/sera were subjected to 2-DE. After comparing, analyzing and identifying by the software PD Quest (7.4,0), the enzyme-digested products of differential expression proteins were analyzed by MALDI-TOF-MS. The Peptide mass fingerprinting(PMF) data were obtained and used to identify proteins through NCBInr data bank. *Results*: In comparison with the healthy volunteers, 20 differential proteins were identified in the plasmas of the HCC patients, among which 18 protein expressions were up-regulated and 2 down- regulated. In the sera of the cancer patients, 23 differential proteins were identified, among which 17 protein expressions were up-regulated and 6 down-regulated. Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-14 and FADD protein were both identified in the plasmas and sera of the cancer patients. *Conclusion*: The differential proteins, including RING finger protein 34, Wilms' tumor 1-associating protein, CD147 antigen, Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-14 from plasmas group and Protein kinase NYD-SP9, Tumor necrosis factor receptor super family member 19 precursor, Histone-binding protein RBBP4, FADD protein, 26S protease regulatory subunit p28, CD82 antigen, Autophagy protein 5 from sera group may be used as markers for HCC in blood.

【Key words】Hepatocellular carcinoma (HCC); Plasma/sera; Proteomics; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI-TOF-MS

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC),简称肝癌,其病死率占我国恶性肿瘤病死率第二位,每年死于肝癌的人数占全球肝癌病人死亡数的 53%[1]。传统的甲胎蛋白对肝癌诊断的特异性和灵敏性均不高。因此,寻找新的特异性的诊断标志物对于早期诊断和治疗 HCC 患者、提高病人存活率、提高预期治疗效果具有重要意义。人血液含有来源于几乎所有细胞、组织、器官的蛋白,可以直接反映机体的病理、生理状

作者介绍:尚京川(1961-),男,副教授,研究方向:药物分析。

通讯作者:母昭德,女,副教授,E-mail:mzd2008@tom.com。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30800945)、重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2008BB5398)。

况,是发现与各种疾病相关生物标志物的最有价值样本之一[2]。

蛋白质组学为寻找 HCC 血液生物标志物研究提供了新颖的思想和策略。双向电泳(Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis,2-DE)- 质谱技术(Mass spectrometry,MS)(2-DE/MS) 鉴定策略是目前蛋白质组学研究最常用的经典技术路线,已被应用于分析组织和细胞样品中差异蛋白质的变化情况[3,4],本文以肝癌患者血浆/血清为研究对象,选用免疫亲和色谱 Agilent MARS Spin Cartridge 去除血浆血清中 6 种主要高丰度蛋白,2-DE 分离低丰度蛋白, 差异蛋白点经 MALDI-TOF/MS 鉴定,为从血液中筛选诊断新颖标志物提供了可行的技术路线。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

多重亲和去除系统(MARS,Agilent high capacity multiple afinity removal system spin cartridge,Hu-6HC)(美国 Agilent 公司);尿素,二硫苏糖醇(DTT),CHAPS,SDS,Tris,碘乙酰胺,矿物油,甘油,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺、纯胰酶(上海生工);两性电解质(pH4~6,pH5~7)(Bio-Rad 公司),碳酸氢胺(美国 Sigma 公司);硫代硫酸钠、碳酸钠、硝酸银、甲醇、无水乙醇、甲醛、冰醋酸、乙腈(国产分析纯); Millipore 去离子水。Protean IEF Cell 等电聚焦仪(Bio-Rad 公司)、垂直电泳系统(Protean Ⅱ XI Cell), 中晶 4850Ⅱ透射扫描仪,KDC-160HR 高速冷冻离心机。质谱外标混合液 Mixyure 2[包括以下片段: Angiotensin Ⅰ 1 297.51;ACTH (1~17) 2 094.46;ACTH(18~39) 2 466.72;ACTH(7~38) 3 660.19;insulin 5 734.59(+1),2 867.80 (+2)], α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid);三氟乙酸(THA)(Fluka 公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 研究病例 按照原发性肝癌诊断标准[5],选取 10 例 HCC 患者(来自重庆医科大学附属第一医院),8 例健康志愿者(5 例男性,年龄(21 ± 2)岁,HIV,HBV,HCV 和梅毒均为阴性)。

1.2.2 血液样品的采集 按照国际人类血浆蛋白质组计划(PPP)推荐的方法采集处理血液样本[6],血浆为 10 例患者枸橼酸血浆,血清为 10 例患者中的 8 例 9(表 1)。健康志愿者混合血浆/血清由采集的 8 例健康志愿者血浆和血清分别混匀后处理。

1.2.3 免疫亲和色谱去除血浆高丰度蛋白 按 Agilent MRS 说明书去除血浆/血清中的高丰度蛋白质,得到的低丰度蛋白质的溶液经浓缩后用 20 mmol/L NH_4HCO_3、2 mmol/L EDTA (pH8.5)缓冲溶液交换,Bradford 法测定蛋白质浓度,进一步用 4% ~ 12% 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证 MARS 柱去除人血浆高丰度蛋白的效果,-80℃保存,备用。

1.2.4 双向凝胶电泳分离、染色和图像分析[7] 取 300μg 血浆/血清低丰度蛋白溶液,参照文献[7]对血液样品进行双向电泳分析。2-DE 所得凝胶进行酸性银染色,染色后凝胶由 Image Scaner 采集图像,分离所得蛋白质斑点由 Image Master 软件进行分析。

1.2.5 质谱分析与蛋白质鉴定 将银染色后的凝胶用于获取鉴定用的蛋白质点。切割凝胶差异蛋白点后,进行脱色、胶内酶切及 MALDI-TOF/MS 检测 PMF,得到的数据在 NCBInr 数据库中,用 MatrixScience/MS-Fit 软件搜索。所有蛋白点搜索均限定在人类,最大容忍质谱误差为 PMF 方式小于 ± 1 Da。

2 结 果

2.1 免疫亲和色谱去除人血浆高丰度蛋白

疾病标志物常常是在疾病过程中由机体分泌到血液中的低丰度蛋白质[8],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,会掩盖很多中、低丰度蛋白的特性并干扰低丰度蛋白检测。因此,需要有效地去除样品中的高丰度蛋白。

免疫亲和色谱是以针对血液中多种高丰度蛋白的单克隆或多克隆抗体来特异性地去除血液中高丰度蛋白的技术。相对于去除高丰度蛋白质的多种方法[9-12],免疫亲和色谱具有特异性高、有效性高和重复性好等特点,因而得到了研究者的普遍认可,其中,Agilent MARS 免疫亲和色谱柱能有效去除血液中 6 种主要高丰度蛋白(白蛋白、结合珠蛋白、免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G、转铁蛋白、α-1- 抗胰蛋白酶),已成为国际人类血浆蛋白质组计划推荐为分离纯化血液中低丰度蛋白质的主要技术手段[13]。

对健康志愿者混合血浆/血清和 10 例 HCC 患者血浆/血清, MARS 柱结合的高丰度蛋白和流出的低丰度蛋白梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示(见图 1), MARS 免疫亲和色谱柱流出部分中, 高丰度蛋白含量大大减少,更多的中、低丰度蛋白得以呈现。

2.2 血液样品 2-DE 条件的优化[7]

双向电泳技术是分离蛋白质组的核心技术, 然而影响 2-DE 分离效果的因素很多,本实验主要从:①IPG 胶条 pH 范围的选择;②上样缓冲液成分和浓度的选择;③垂直板 SDS-PAGE 电泳的电流及样品储存缓冲液的种类和浓度、2-DE 加样量、SDS-PAGE 浓度等因素进行了反复比较和优化调整,建立了相对稳定的血液蛋白质 2-DE 技术:pH 范围为 4~7 的 IPG 胶条,上样缓冲液为尿素 9 mol/L、硫脲 2 mol/L、2%CHAPS、两性电解质 1:1(pH=4~6,pH=5~7),10%的 SDS-PAGE 胶浓度和 SDS-PAGE 按 5μA 30 min,30μA 2 h,20μA 至结束,获得了斑点匹配率为 85%的高分辨率 2-DE 图谱。

2.3 蛋白质组学研究

2.3.1 二维电泳表达谱差异 分别对每例肝癌患者血浆和血清进行 2-DE 分析,得到的银染图谱如图 2、图 3,与健康志愿者相比,10 例血浆样品中有 18 个蛋白点表达上调,2 个蛋白点表达下调;8 例血清样品中有 17 个蛋白点表达上调,6 个蛋白点表达下调。在肝癌患者血浆和血清组中共同识别到 2 种差异蛋白质(表 2)。

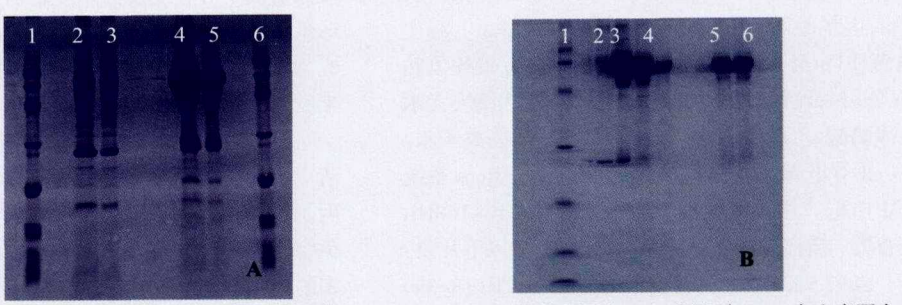
2.3.2 差异蛋白的鉴定结果 以健康志愿者血浆/血清蛋白表达量为标准, 肝癌患者血浆/血清中各差异蛋白点通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术鉴定(图 4),鉴定结果见表 2,分析这些差异蛋白质的功能发现,它们分别属于与物质代谢、免疫、肿瘤等有关的蛋白质。

2.3.3 血液样品对总差异蛋白识别率和单个差异蛋白重复

识别率　将每个血液样品对总差异蛋白的识别率和每种差异蛋白在总的血液样本中的重复识别率进行分析，结果表明，10 例肝癌患者血浆样品对鉴定出的 20 种差异蛋白质的平均识别率为 52%，每种蛋白质在 10 例样品中的平均重复识别率为 52%。8 例肝癌患者血清样品对鉴定出的 23 种差异蛋白的平均识别率为 54.34%，每种蛋白质在 8 例样品中的平均重复识别率为 53.80%。

表 1　10 例肝癌患者的详细临床资料

序号	年龄（岁）	HBsAg/HBsAb	HBeAg/HBeAb	HBcAb/HCVAb	甲胎蛋白(ng/ml)
1	46	+/–	+/–	+/–	1.0
2	42	–/–	–/–	+/–	6.37
3	39	+/–	+/–	+/–	3.95
4	51	+/–	–/+	+/–	1.9
5	45	+/–	–/–	+/–	21.3
6	73	+/–	+/–	+/–	24.32
7	33	+/–	–/–	–/–	38 350
8	46	+/–	–/–	+/–	1.91
9	50	+/–	–/–	+/–	32 120
10	56	+/–	–/+	+/–	668.63



1、6. Marker; 2、3. 低丰度蛋白；4、5. 原血浆　　1. Marker; 2. 低丰度蛋白；3、4. 原血清；5、6. 高丰度蛋白

图 1　血浆（A）和血清（B）SS–PAGE 图谱

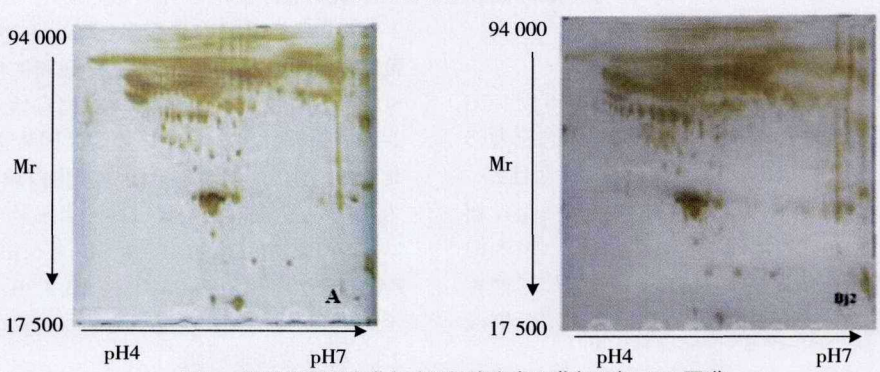


图 2　健康志愿者血浆（A）和肝癌患者血浆（Bjz）2–DE 图谱

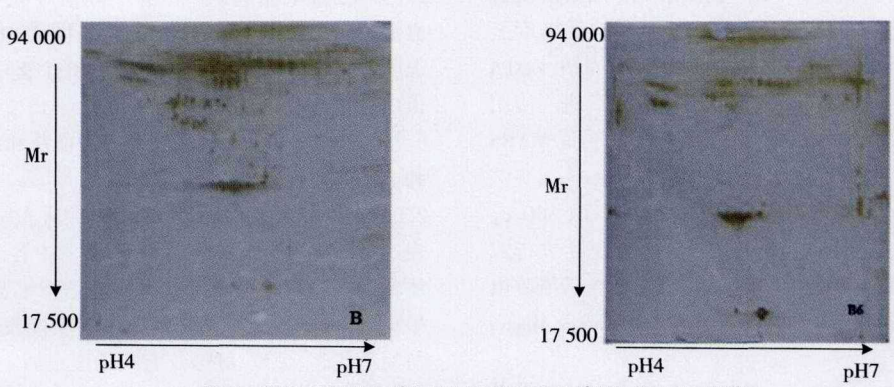


图 3　健康志愿者血清（A）和肝癌患者血清（Bb）2–DE 图谱

表 2 肝癌患者血浆和血清中的差异蛋白

No.	序列号	序列覆盖率	Mr(Da)/pI	蛋白质名称	与对照组表达比较结果
血浆					
1	Q969K3	21.2	41 641/4.8	RING finger protein 34(RIFF)	↑
2	Q15007	17.4	44 244/5.1	Wilms' tumor 1-associating protein	↑
3	P35613	9.6	42 201/5.4	CD147 antigen	↑
4	P26022	11.5	42 020/4.9	Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-14	↑
5	P24385	23.7	33 729/5.0	PRAD1 oncogene	↑
6	P43365	16.9	34 837/4.7	MAGE-12 antigen	↑
7	Q99675	32.8	38 242/5.1	Cell growth regulator with RING finger domain 1	↑
8	P61421	28.2	40 329/4.9	Vacuolar ATP synthase subunit d	↑
9	O43866	22.2	38 088/5.3	IgM-associated peptide	↑
10	Q9BRR0	15.6	60 617/5.9	Zinc finger protein 306	↑
11	P02679	33.1	51 512/5.4	Fibrinogen gamma chain precursor	↑
12	Q9NV56	42.2	22 417/5.6	MRG-binding protein	↑
13	Q7Z6A9	37.0	32 782/5.9	B and T lymphocyte-associated protein	↑
14	Q16539	19.2	41 162/5.5	Mitogen-activated protein kinase 14	↑
15	P02741	25.9	25 039/5.5	C-reactive protein precursor	↑
16	Q9BV57	15.6	21 499/5.4	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentenedioxygenase	↑
17	Q9H426	28.3	29 330/5.7	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 4	↑
18	P31995	24.1	35 579/6.4	IgG Fc receptor Ⅱ-c	↑
19	P19883	21.5	38 008/5.5	Follistatin precursor (FS) (Activin-binding protein)	↓
20	Q13158	21.6	23 280/5.5	FADD protein	↓
血清					
23	P48595	52.4	45 403/5.8	Serpin B10	↑
24	P48667	14.8	42 469/5.3	Keratin	↑
25	P01009	15.3	46 737/5.4	Alpha-1-antiproteinase	↑
26	O75121	39.1	45 380/5.1	Protein kinase NYD-SP9	↑
27	Q9NS68	18.4	46 016/5.3	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 precursor(TRADE)	↑
28	Q09028	5.7	47 525/4.7	Histone-binding protein (RBBP4)	↑
29	Q15649	41.3	17 607/5.5	HNF-4a coactivator	↑
30	P05162	23.5	14 645/5.9	Galectin-2	↑
31	O43312	11.1	82 252/6.5	Metastasis suppressor protein 1	↑
32	P11142	9.6	70 899/5.4	Heat shock 70 kDa protein 8	↑
33	O95125	11.3	74 693/5.6	Zinc finger protein 202	↑
34	P02768	24.8	69 367/5.9	Serum albumin precursor	↑
35	P06727	17.4	45 371/5.3	Apolipoprotein A-Ⅳ precursor	↑
36	Q8TD91	25.5	71 910/4.8	Melanoma-associated antigenC3	↑
37	O00499	9.4	64 700/5.0	Myc box dependent-interacting protein 1	↑
38	Q8N8U3	15.2	52 817/4.4	Zinc finger CCHC domain-containing protein 5	↑
39	Q13547	6.2	55 103/5.3	Histone deacetylase 1	↑
40	Q13158	21.6	23 280/5.5	FADD protein	↓
41	O75832	25.7	24 428/5.7	26S proteasome regulatory subunit p28	↓
42	P27701	19.1	29 626/5.1	CD82 antigen	↓
43	Q9H1Y0	10.5	32 448/5.5	Autophagy protein 5(APG5-like)	↓
44	P22891	38.0	44 744/5.6	Vitamin K-dependent protein Z precursor	↓
45	P26022	15.7	42 020/4.9	Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-14	↓

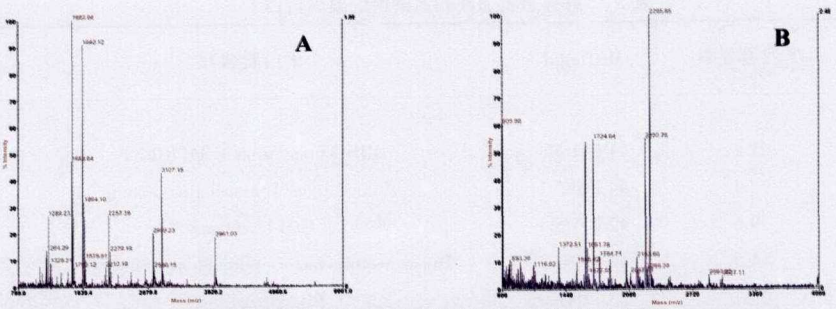


图 4　肝癌患者血浆（A）和血清（B）差异蛋白质的肽指数图谱

3　讨　论

从实验结果发现，不管是血浆还是血清样品，任何一个样品均不能识别完全相同的差异蛋白，同样，同一种差异蛋白也很难在所有的样品中同时得到识别，这就暗示，通过蛋白质组学手段寻找疾病标志物，如果采用混合血液样品分析，很容易因为样品的个体差异而得到假阳性的结果。

血浆、血清由于形成方式不同，因而所含蛋白质种类和数量也不同。从实验结果发现，即使来自相同病人的血浆和血清，能同时识别到的相同差异蛋白也很少，本实验在血浆和血清中仅仅识别到两个相同的蛋白质，而其中的一种蛋白在血浆、血清中的变化刚好相反，结果提示，在从血液中寻找疾病标志物时，最好同时考虑血浆和血清，以保证能全面准确地寻找到疾病标志物。

在血浆组中识别到的指环蛋白 34（RING finger protein 34），威尔逊肿瘤 1- 关联蛋白（Wilms' tumor 1-associating），CD147 抗原，卵泡前体 FS（Follistatin precursor）蛋白和血清组中识别到的蛋白激酶 NYD-SP9（Protein kinase NYD-SP9），肿瘤坏死因子受体超家族成员 19 前体（Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 precursor），组蛋白键合蛋白 RBBP4（Histone-binding protein RBBP4），FADD 蛋白，26S 蛋白酶调控亚基 P28（26S proteasome regulatory subunit p28），CD82 抗原，自体吞噬蛋白 5（Autophagy protein 5）差异蛋白在各例标本中的重复识别率均在 70%以上，因此，这些差异蛋白有望成为肝癌血液的特异蛋白质，特别是在血浆和血清中同时识别到的低表达蛋 FADD，已有研究表明该蛋白的表达随肝癌肿瘤体积增大、恶性程度的增加而下降，本研究得到了与之相一致的结论[14-16]。另外，在血清样品中识别到的Serpin B10（丝蛋白）（50%），Keratin（角蛋白）（62.5%），Alpha-1-antiproteinase（α-1- 抗蛋白激酶）（62.5%）蛋白，尽管其重复识别率未达到 70%，但已有许多研究证明三者与肝癌之间有着密切的关系而值得引起关注[17]。

本文利用建立的稳定的 2-DE 技术，分析和识别了肝癌血浆/血清中的差异蛋白，所得的实验结果不仅有助于肝癌标志物的筛选，也为肝癌的免疫机制研究、肝癌疫苗的开发、肝癌药物靶标的筛选奠定了一定的基础。

参　考　文　献

[1]　张思维，李连弟，鲁凤珠，等.中国恶性肿瘤高发现场点资料的分析和利用[J].中华肿瘤杂志，1999，21(4)：245-249.

[2]　Anderson N L，Anderson N G.The Human plasma proteome history，character，and diagnostic prospects[J].Mol Cell Proteomics，2002，1(11)：845-867.

[3]　罗国安，邓　斌，叶能胜，等.肺鳞癌和小细胞肺癌组织比较蛋白质组学研究[J].高等学校化学学报，2005，9(9)：1645-1649.

[4]　刘　宁，李子健，刘志强，等.笨肾上腺素诱导乳鼠心肌细胞蛋白质表达变化的蛋白质组分析[J].高等学校化学学报，2006，27(1)：79-81.

[5]　中国抗癌协会肝癌专业委员会，原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J].中华肝病杂志，2001，9(6)：324.

[6]　Li X H，Gong Y，Wang Y，et al. Comparsion of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO plasma proteome project[J].Proteomics，2005，5：3423-3441.

[7]　母昭德，彭泳波，邱宗荫，血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立[J].重庆医科大学学报，2006，31 (6)：821-823.

[8]　Petricoin E F，Paweletz C P，Liotta L A. Clinical applications of proteomics：proteomic pattern diagnostics[J].Mammary Glang Biol Neoplasia，2002，7(4)：433-440.

[9]　Nina Zolotarjova，James Martosella，Gordon Nicol，et al. Differences among techniques for high-abundant protein depletion[J].Proteomics，2005，5：3304-3313.

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

[11]　Brett A，Chromy G，Arlene D，et al.Analyzing Alkaline Proteins in Human Colon Crypt Proteome[J].Proteome Res，2004，3(6)：1120-1127.

[12]　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.

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

[14]　顾　炜，彭志海，裘国强，等.肝癌组织中凋亡信号蛋白的表达及其临床意义[J].中国肿瘤，2003，12(1)：48-50.

[15]　Sun B，Wang B，Zhao X. Expression of FADD in primary hepatocellular carcinoma and its relationship with hepatic apoptosis[J].Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi，2000，8(1)：37-39.

[16]　Li M S，Ma Q L，Chen Q，et al.Alpha-fetoprotein triggers hepatoma cells escaping from immune surveillance through altering the expression of Fas/FasL and tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand and its receptor of lymphocytes and liver cancer cells[J].World J Gastroenterol，2005，11(17)：2564-2569.

[17]　张宇清，朱运松.蛋白酶抑制剂 10-Ov- 抑丝酶家族的新成员[J]，生命的化学，2001，21(2)：103-105.

（责任编辑：关蕴良）