维普资讯 http://www.cqvip.com

综述 文章编号:0253-3626(2007)02-0222-03

蛋白组学与喉癌

周建荣[1]综 述,傅仲学[2] 审 校

(重庆医科大学附属第一医院 1.耳鼻咽喉科;2.胃肠外科学,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R767.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-19

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其发病率约占全身恶性肿瘤的 5%[1],占耳鼻咽喉癌的 11%~22%[2]。由于环境致癌因素的增加,喉癌的发病率呈不断增长趋势。虽然肿瘤诊断与治疗的手段日新月异,但全球的喉癌总体生存率并未得到明显改善,尤其是晚期病人[3]。如果能够早期诊断,无论采取手术、放疗都能使病人获得较好预后,还能保留喉的发音功能。Srinivus 等[4]研究发现,肿瘤在早期即可伴随肿瘤标志物的改变,检测其含量变化有助于肿瘤的早期发现。因此,寻找理想的肿瘤标记物对早期诊断喉癌具有重要的临床意义,也是喉癌研究领域的热点。由于蛋白质组研究具有在整体水平上发掘和寻求潜在肿瘤标志物的能力,使其一经提出便受到肿瘤研究者的重视。

1 蛋白组学概念、方法研究、应用

1.1 蛋白组学概念

蛋白质组学的概念源于蛋白质组(proteome)。而蛋白质组的概念源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的杂合[5]。基因组是一个细胞内所有 DNA 分子的总和。基因组学(genomics)是一门研究基因组结构和功能的科学。基因组包含的遗传信息经转录产生 mRNA,一个细胞在特定生理或病理状态下表达的所有种类的 mRNA 称为转录子组(transcriptome)。不同细胞在不同生理或病理状态下转录子组包含的 mRNA 种类不尽相同 mRNA 经翻译产生蛋白质,一个细胞在特定生理或病理状态下表达的所有种类蛋白质称为蛋白质组[6]。不同细胞在不同生理或病理状态下所表达的蛋白质的种类也不尽相同。蛋白质组学,就是从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成份、表达水平与修饰状态,了解蛋白质间相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律一个新的研究领域[7]。

1.2 蛋白质组学方法研究

蛋白组学研究流程大体可分为分离、鉴定、分析三步。即先从组织或细胞中提取蛋白质,进行双向电泳以实现蛋白质的分离;然后进行蛋白质样品显色,切下待分析的蛋白质斑点,用胰蛋白酶胶内消化;接着,对消化后得到的多肽片段进行生物质谱分析测定,得到肽质量指纹图谱;最后,数据库检索对蛋白质进行鉴定及功能分析。

20 多年前 O.Farrel 和 Klose 各自创建了蛋白质高分辨双向凝胶电泳(two-di-mensional gel electrophoresis,2-DE)。O.Farrel 对大肠杆菌细胞抽提物双向电泳后,分离到 1100 个蛋白质组分,从此拉开了蛋白质组研究的序幕[8],双向凝胶电泳仍是蛋白质分离的支撑技术。经过 Grg 等人的改进,现已普遍采用固相化 pH 梯度 (immobilized pH gra-dients,IPG)胶条作为第一向电泳的介质,改善了双向凝胶电泳的可重复性和上样量[9]。为适应大规模蛋白质组分析,质谱已逐渐成为蛋白质鉴定的核心技术。除此之外,还有 Edman 降解法、HPLC 柱法、氨基酸组成分析等。20 世纪初质谱就已经发明,但直到 20 世纪 80 年代末"软电离"技术出现以后,才逐渐进入生物大分子的鉴定领域[10],如 20 世纪 80 年代后期电喷雾质谱(elec- trospray ionization mass spectrometry,ESI-MS)和基质辅助的激光解吸飞行时间质谱 (matrix-assisted laser-desorptin ionizationtime of flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS) 技术的发明。SELDI 芯片技术(Surface-enhanced Laser Desorption/Ioniza- tion)为近年出现的新技术之一,其优点是能简单、快速的从各种体液及组织中找出新的肿瘤标记物,有着广阔的应用前景。

1.3 蛋白质组学的应用

在应用研究方面,蛋白质组学研究很广泛,近 2 年来蛋白质组研究技术已被应用到各种生命科学领域,如细胞生物学、神经生物学、药理学等。且已分为多种亚组学,如临床蛋白组学、药理蛋白组学、毒理蛋白组学等。在临床蛋白组学研究涉及临床各个方面。主要有:①诊断:如疾病筛查、疾病分期分型等。②指导治疗:如病程分析、用药、手术时机的选择等。③提供药物开发的临床依据:如确定药物靶点、新药开发(某些药物本身就是蛋白质)等。④预后判断:如根据生物标志物在不同疾病中的变化,从而判断疾病的性质和严重程度等。在临床蛋白组学中已有心血管病、脑血管病肿瘤的发生与发展、毒理学、细胞分化与胚胎发育、基因调控机制重大疾病的发生与治疗、个体化诊断[11]、消化系统疾病[12]、神经生理学、肥胖、早老性痴呆药学研究和环境与健康的关系等方的

作者介绍:周建荣(1969-),女,副主任医师,博士生,主要研究方向:头颈肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究,其中部分是直接通过蛋白芯片、蛋白质飞行质谱检测技术 (SELDI)、固定的抗体芯片等手段通过典型的蛋白谱(protein pattern)进行差异蛋白的检测作为疾病的诊断、治疗的观察及预后制定等。蛋白质组学代表了人们对生命现象认识层次的深入,带动了现代医学和生命科学的前沿学科和领域,在一定程度上起到牵动全局的作用。

2 蛋白组学与肿瘤标记物

2.1 肿瘤蛋白质组学的研究现状

目前用于肿瘤标志物研究的主要蛋白质组学方法包括表达蛋白质组学、细胞图谱蛋白质组学、比较蛋白质组学、血清蛋白质组学等。用于鉴定肿瘤标志物的方案有:①比较分析肿瘤组与对照组的组织或细胞全组分图谱;②提取组织或细胞系的亚细胞组分、膜蛋白或分泌性蛋白质,建立差异图谱比较分析;③分析蛋白抗原及其对应血清或体液中的自身抗体,从中寻找新的肿瘤标志物。这些特异蛋白质既可作为肿瘤诊断的分子标记,又有助于阐明肿瘤发生发展的机制,还可作为治疗和药物开发的靶点[13]。目前,各国科学家们已对多种人类肿瘤,如鼻咽癌[14]、肺癌[15]、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、神经母细胞瘤、Burkitt 氏淋巴瘤、白血病等进行了蛋白质组水平的研究,建立了多种组织或细胞的双向电泳图谱及不同分期、不同特性、药物处理前后等的差异图谱,并对喉癌病人的组织及血清标本进行了分析。

2.2 蛋白质组学在肿瘤早期检测中的应用

肿瘤标志物是细胞在特定疾病状态下的分子信号,是检测、诊断、治疗、监测肿瘤和判断肿瘤预后的重要丁具。如何发现新的、具有高度特异度和灵敏度的肿瘤标志物多年来一直是肿瘤研究的热点之一[16-18]。

肿瘤的早期检测是众多研究者关注的问题。调查显示,60%的恶性肿瘤,如乳腺癌、肺癌、结肠癌及卵巢癌等在发现时已是晚期,伴有广泛的转移,疗效差[19]。王国清[20]发现晚期食管癌术后 5 年生存率约为 25%,而早期食管癌治疗后的 5 年生存率可达 85%以上。因此开展早期检测、诊断和治疗,是控制肿瘤的重要途径之一。肿瘤的早期检测是指在足够早的阶段发现肿瘤,此时肿瘤尚未形成远处播散和转移,治疗效果好[21],不同于肿瘤诊疗分期中的"早期"。

蛋白质和蛋白质组学研究的快速发展给肿瘤标志物研究注人了新的活力。蛋白质组学的优势和基本方法以基因组学为基础、旨在发现新的肿瘤标志物,其方法包括表达序列标记(EST)测序法、基因表达系列分析法(SAGE)和 eDNA 表达阵列杂交法等[22]。由于 mRNA 水平的高低并不能如实反映蛋白质水平的状况及蛋白质往往会发生翻译后的修饰等原因,这些方法不能直观地描述可作为肿瘤标志物的蛋白质的质和量。与之相比,蛋白质组学具有天然的优势,以其为基础的方法可鉴定修饰和未经修饰的蛋白质。

3 蛋白质组学技术在喉癌研究中的应用

3.1 喉癌血清的蛋白质组分析

肖雪媛等[23,24]于 2003 年将 33 例喉癌(12 例声门癌,18 例声门上癌,3 例声门下癌)病人和 31 例正常人的未经酶解的血清直接点样于 SELDI 蛋白质芯片(WCX2)上,用蛋白质芯片阅读机读取数据从而获得蛋白质谱。结果显示喉癌病人与正常人的血清蛋白质谱相比有 16 个差异蛋白,其中 8 个标志分子在病人血清中高表达,其余 8 个呈低表达。根据这 16 个标志分子峰值的不同对病人进行筛选,可将 96.9%的喉癌病人和 96.7%正常人正确划分出来。

3.2 喉癌组织的蛋白质组分析

张红茹等[25]于 2004 年通过固相 PH 梯度双向凝胶电泳分离 8 例喉癌及癌旁组织总蛋白质,首次建立了喉癌及癌旁喉黏膜组织蛋白质组的表达图谱。通过 PDQUEST 2DE 软件找出差异蛋白质点并进行 MALDI 质谱分析,鉴定出与喉癌发生密切相关的 12 种蛋白质。其中 10 种蛋白质在喉癌组织中表达高于癌旁组织,分别是 connexin 31.1、Tropomyosin、Angiopietin-2、Inhibitor of apoptcxis-like protein 2、urokinase type plasminogen activatorreceptor uPAR、Transforming protein N-Ras、P21 和 c-Met;而 connexin 31.1 与 Tropomyosin 两种蛋白质在喉癌组织中的表达低于癌旁组织。作者认为喉癌组织中血管异常增殖、癌基因激活、细胞信号传导通路改变的相关蛋白,以及凋亡蛋白抑制因子等多种蛋白质出现异常表达,可能与喉癌的发生发展有关。

此外,荷兰学者 wu 等[26]于 2001 年利用 2-DE 分离头颈鳞癌原发部位癌细胞系及同一病人一年后头颈鳞癌转移淋巴结中癌细胞系的总蛋白质,差异蛋白质点经酶解后通过 SELDI 蛋白质芯片(H4Chip)系统进行质谱鉴定。结果发现在转移淋巴结的头颈鳞癌细胞系中,两种膜相关蛋白(annex-i-nI、annexinlI)及参与糖分解的 α-烯醇化酶表达上调,而钙调素前体表达下调,认为 annexinI、annexinlI 及 α-烯醇化酶在头颈部肿瘤的浸润转移中可能发挥重要作用。美国维吉尼亚的 Wadsworth JT 等[27]于 2004 年利用 SELDI 蛋白质芯片筛选 99 个头颈部鳞状细胞癌病人与 102 个正常人血清样本的差异蛋白表达,获得头颈部鳞癌与正常对照组的差异蛋白质谱,并发现多数差异蛋白质的分子量集中于 2778~20800 Da 之间。

综上所述,目前蛋白质组学技术在喉癌研究中主要用于血清、组织及细胞系的差异蛋白质组分析,运用了双向凝胶电泳、质谱分析、蛋白质芯片等技术。双向凝胶电泳是唯一能在同一块胶上分离上万种蛋白质的技术,但操作较复杂。蛋白质芯片能方便、快捷地检测血清样本的蛋白质谱,尽管当前受技术水平的限制,但仍有广阔的临床应用前景。国内外已初步观察喉癌病人与正常人血清、喉癌与癌旁组织、原发癌与淋巴结转移细胞系的蛋白质表达谱,证实了这些对应的蛋白质表达谱之间确实存在差异。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 展 望

随着人类基因图谱基本绘就，蛋白组学的研究更多的关注到蛋白网络。肿瘤蛋白质组学通过对正常血清、组织和疾病血清、组织(从癌前病变到肿瘤)，原发及转移细胞株之间差异表达的蛋白质进行定量分析和鉴定，已经在多种头颈肿瘤中找到有明确变化的蛋白质，从中有可能发现肿瘤特异性标志物。目前，运用蛋白质组技术分离和鉴定肿瘤标志物的研究还未完全成熟，那些被发现的新的肿瘤相关的蛋白标志物还需进一步扩大样本量，通过严格的对照来评价其特异性。多种蛋白质组学技术联合应用于肿瘤标志物研究及临床，高通量、自动化筛查肿瘤相关蛋白的表达图谱，对探明肿瘤发生、发展的分子机制以及发现临床早期肿瘤，预测转移及复发都有重要意义。由于每一种癌症都应有其特异性变化的蛋白质谱，因此这已成为蛋白质组学技术的研究方向。

参 考 文 献

[1] Sanderson RJ,Ironside JAD.Squamous cell carcinoma of the head and neck[J].BMJ,2002;325(7368):822-827.

[2] 胡俊兰，宋军健，葛俊恒，等.声门型喉癌 T3 病变喉部分切除术后疗效评价[J].中华耳鼻咽喉科杂志，2000;35:138-140.

[3] 季文樾，杜 强.晚期喉癌的综合治疗分析[J].中华耳鼻咽喉科杂志，2004;39(1):20-23.

[4] Srinivas PR,Kramer Bs,Srivastave S.Trends in biomarkers research for cancer detection[J].LancetOncol,2001;2(11):698-704.

[5] Ideker T,Thorsson V,Ranish JA,et al.Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically per-turbed metabolic network [J].Science,2001;292(5518):929-934.

[6] Gerlai R.Phenomics:fiction or the future [J].TrendsNeurosci, 2002;25(10):506-509.

[7] Petricoin EF,Zoon KC,Kohn EC,et al.Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality[J].Nature Rev Drug Discov,2002;1(9):683-695.

[8] O'Farrell PH.High resolution two-mensional eleetrophoresis of protein[J].J Biol Chem,1975;250(10):4007-4021.

[9] Grg A,Obemaier C,Boguth G,et al.Recent developments in two-dimensional gel electrophomsis with immobilizedpH gradients: wide pH gradients up top pH 12,longer separation distances and-simplified procedures[J].Electrophoresis,1999;20(4-5):712-717.

[10] Yates JR.Database searching usingmass spectrometry data [J]. Electrophoresis,1998;9(6):893-900.

[11] 康熙雄，王雅杰.生物芯片技术发展现状及应用前景[J].中华检验医学，2004;27(5):273-274.

[12] Man WJ,White IR,Bryant DA,et al.Protein expressionanalysis of drug-mediated hepatotoxicity in the SpragueDawley rat [J].Proteomics,2002;2(11):1577-1585.

[13] 陈主初，梁宋平.肿瘤蛋白质组学[M].长沙：湖南科技出版社，2002.1-7.

[14] Tan C,Li J,Wang J,et al.Proteomic analysis of differentialprotein expression in human nasopharyngeal carcinoma cells induced by NAG7 transfection[J].Proteomica,2002;2(3):306-312.

[15] Zhu~v TA,Johanson RA,Cantor AB,Clark RA,To&manMS. Discovery of distinct protein profiles specific for lungnrmorsand pre~malignant lung lesions by SELDI~pectrtm3etry[J].Lung Cancer, 2003;40(3):267-279.

[16] Srinivas PR,Kramer BS,Srivastava S.Trends inbiomarker research for cancer detection[J].Lancet Oncol,2001;6(11):698-704.

[17] Ul uhle JD,Liotta LA,Petricoin EF.Proteomic applications for the early detection of cancer[J].Nat RevCancer,2003;3(4):267-275.

[18] Rinivas PR,Verma M,Zhao Y,et a1.Proteomics forcancer biomarker discovery[J].Clin Chem,2002;48(8):1160-1169.

[19] WUI FKUHI E J D,I IOT、A I A,PETRIC IN E F.Proteomic applications for the early detection of cancer[J].NatRev Cancer,2003; 3(4):267-275.

[20] 王国清.食管癌高危地区早诊早治 30 年临床研究经验[J].中国医学科学院学报，2001;23(1):69-72.

[21] TZINI R,URBAN N,RA MSEY S,et al.The case for early detection[J].Nat Rev CamPr,2003;3(4):243-252.

[22] Kiviat NB,Critchlow CW.Novel approaches to identify.cation of biomarkers for detection of early stage cancer [J].Dis Markers,2002; 18(2):73-81.

[23] 肖雪媛.利用蛋白质组学方法筛选及确定喉癌诊断的标志分子[J].中国科学 C 辑 - 生命科学，2004;34(1):49-53.

[24] XiaoX,ZhaoX,Liu J,et a1.Discoveryoflaryngeal carcinomaby senm1 proteomic pattern analysis[J].Sci china C Life Sci,2004;47 (3):210-223.

[25] 张红茹，肖健云，赵素萍.喉癌及喉正常黏膜组织蛋白质组差异表达的初步研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2004;10(3):136-139.

[26] WeiguoWu,XinningTang,Wei Hu.Identification and validation ofmetastasis-associated proteins in head and neck cancer lines by two-dimensioned electrophonesis and mass spectrometry[J].clinicall & Expetirmntal Metastasis,2002;19(4):319-326.

[27] Wadsworth JT,Kenneth Ds,SaHC,et a1.Sertun proteinprofilestoidentify head and neck cancer[J].ClinicalCancel"Research,2004; 10(5):1625-1632.