

蛋白质组学在消化系肿瘤中的应用

丁莺, 吕宾, 沈雁

丁莺, 吕宾, 沈雁, 浙江中医药大学附属第一医院消化内科
浙江省杭州市 310006

吕宾, 教授、主任医师、博士生导师, 长期从事消化系肿瘤、功能性胃肠病及消化内镜的诊疗工作。

作者贡献分布: 本文由丁莺与沈雁综述; 吕宾审校。

通讯作者: 吕宾, 教授, 主任医师, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-86620285

收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-07-09

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-08-08

Application of proteomics in the study of digestive system tumors

Ying Ding, Bin Lv, Yan Shen

Ying Ding, Bin Lv, Yan Shen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Professor Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2009-05-21 Revised: 2009-07-09

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-08-08

Abstract

Proteomics is the study of all proteins present in a given organism, tissue, cell, and even organelle. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrography are two core technologies in proteomics. Proteomic studies can help us understand the life as a whole. As a new platform for tumor research, proteomics is of important significance for early diagnosis, biomarker discovery, therapy and discovery of novel drug targets for esophageal carcinoma, gastric cancer, liver cancer, pancreatic cancer and colorectal cancer. Thus, it has potential broad application prospects.

Key Words: Proteomics; Digestive system tumor; Biomarker

Ding Y, Lv B, Shen Y. Application of proteomics in the study of digestive system tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(22): 2227-2230

摘要

蛋白质组学是以双向凝胶电泳和质谱技术为

核心, 从整体的角度研究生物机体、组织、细胞甚至细胞器基因编码的全部蛋白质, 在更贴近生命本质的层次上发现和理解生命活动的规律。作为肿瘤研究的新平台, 蛋白质组学对食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、结直肠癌等消化系肿瘤的早期诊断, 寻找新标志物, 治疗以及药物开发的新靶点等方面有重要意义, 具有潜在、广阔的应用前景。

关键词: 蛋白质组学; 消化系肿瘤; 标志物

丁莺, 吕宾, 沈雁. 蛋白质组学在消化系肿瘤中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(22): 2227-2230

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2227.asp>

0 引言

蛋白质组指的是由一个基因组表达的全部蛋白质, 这一概念由澳大利亚学者Wilkins和Williams于1994年提出, 并于1995-07首次在《电泳》杂志上发表^[1]。目前理解为生物机体、组织、细胞在特定的时间和空间表达的所有蛋白质。蛋白质组学是一门以全面的蛋白质性质研究(如表达水平、转录后修饰、细胞内定位、相互作用等)为基础, 在蛋白质整体水平对疾病机制、细胞模式、功能联系等方面进行探索的科学。消化系肿瘤是目前发病率最高的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类健康。在其研究中, 蛋白质组学能直接从分子水平动态定量考察肿瘤发生过程中蛋白质种类、数量的改变, 有助于寻找肿瘤早期诊断和预后的特异性标志物以及有效的治疗靶标^[2], 因此已成为消化系肿瘤研究的前沿领域和热点。现对蛋白质组学在消化系肿瘤中的研究进展作一简要综述。

1 蛋白质组学的研究技术

其研究技术主要由双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)、质谱(mass spectrometry, MS)鉴定技术及生物信息学3部分组成, 其中2-DE是蛋白质组学研究的基石。蛋白鉴定主要依靠MS分析, 如基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱(matrix assisted

■背景资料

消化系肿瘤是目前发病率最高的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类健康。早期检测和诊断是提高其生存率、改善预后的关键, 但目前仍缺乏特异的筛选标志物。蛋白质组学的迅速发展为解决上述难题提供了可靠的途径。

■同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

■研发前沿

蛋白质组学的研究是继基因组学研究之后的又一个具有重大发展前景的科学领域,其在寻找敏感和新的肿瘤生物分子标志物方面有着极为广阔的应用前景。

laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)、表面增强激光解吸离子化质谱(surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-MS)等。2-DE图像可利用生物信息学软件进行分析,通过数据库查询质谱结果,还可对感兴趣的未知蛋白质进行结构和功能方面的分析。迄今为止,研究蛋白质组最成熟的方法仍是采用2-DE进行蛋白质的分离和显影,然后联合MS经肽质量指纹图和串联质谱肽序列进行蛋白质鉴定^[3]。已有越来越多的实验室对包括消化系肿瘤在内的多种人类肿瘤进行了蛋白质组学的研究。

2 蛋白质组学在消化系肿瘤中的应用

2.1 食管癌 Nishimori *et al*^[4]利用琼脂糖2-DE和MS方法对12例原发性食管癌患者手术获得的癌组织及癌旁正常组织进行蛋白质分析鉴定。结果发现一种相对分子质量195 kDa的蛋白质periplakin,在食管癌中表达呈显著下降,并由免疫印迹法得到证实。免疫组织化学提示该蛋白质主要位于正常上皮细胞和异常分化细胞的交界处,而在早期食管癌该蛋白质即从细胞分界处转移至胞质中,在进展期食管癌则很少表达。这些结果表明,对检测早期食管癌及评估食管癌的进展极有价值。Fu *et al*^[5]对分化程度不同的食管鳞状上皮细胞癌所表达的蛋白质组进行研究。与正常食管组织相比,在食管鳞状上皮癌中有18个蛋白位点表达出现差异,其中alpha-actinin 4(ACTN4)和67 kDa laminin receptor(67LR)的表达水平从肿瘤I期到III期渐升。用组织微阵列技术(tissue microarrays, TMA)研究其与临床病理学的联系,揭示了ACTN4过表达与肿瘤的侵袭、转移潜能有关,但67LR的过表达则只与肿瘤的恶性程度有关。他们认为该两种蛋白可以成为食管鳞状上皮细胞癌诊断和治疗的靶点。

2.2 胃恶性肿瘤 Ryu *et al*^[6]对11例胃癌患者组织标本及其正常和边缘组织进行2-DE分析,并对癌和正常组织之间的差异蛋白质点进一步作了MS鉴定,发现有7种蛋白质在癌组织中过表达,分别为NSP3、transgelin、prohibition、热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)、蛋白质二硫化物异构酶A3、未命名蛋白质产物和葡萄糖调节蛋白,同时也发现阿朴脂蛋白A1、p20、核苷二磷酸异构酶A、 α 1抗胰蛋白酶、

desmin、血清清蛋白、血清转铁蛋白等7种蛋白质在癌组织中低表达。上述结果为研究胃癌发病机制,寻找胃癌的标志物提供了有价值的资料。Suehara *et al*^[7]采用蛋白组学方法筛选胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)的相关蛋白。在预后较好和较差两组GIST样本中,有43个蛋白质点出现统计学差异。MS技术鉴定25种蛋白质,其中8个蛋白质点确定为钾通道蛋白pfetin。蛋白免疫印迹法和实时聚合酶链反应(real-time PCR)证实了pfetin的表达程度与肿瘤的转移潜能成反比。对210例患者的临床资料分析发现,pfetin阳性患者的5年存活率(93.9%)远高于pfetin阴性患者的5年存活率(36.2%)。这些结果提示pfetin可能作为GIST预后的标志物和潜在的分子治疗靶标。

2.3 肝癌 肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年增加。许多肝癌患者明确诊断时已处于晚期,因此预后极差,5年生存率低于5%^[8]。Ding *et al*^[9]对高转移的MHCC97-H和低转移的MHCC97-L两株HCC细胞株的研究发现,细胞角蛋白19在MHCC97-H中过表达,提示血清细胞角蛋白19是一种预测肿瘤转移的标志物,或进行药物治疗的目标分子。Luk *et al*^[10]应用蛋白质双向电泳研究了146例肝脏组织样本的蛋白质表达谱,包括67对从肝细胞癌患者手术获得的癌组织及癌旁组织,同时还包括12例正常肝脏组织。其中在肝癌细胞中表达明显上调的种标志物通过MS鉴定属于伴侣蛋白成员:HSP27、HSP70和葡萄糖调节蛋白78。对应于临床病理学参数,HSP27与 α 甲胎蛋白相关($P = 0.007$);葡萄糖调节蛋白78与肿瘤静脉浸润相关($P = 0.035$)。表明肝癌细胞通过提高伴侣蛋白质的表达来维持自身保护功能,并促进肿瘤的生长和浸润。Cui *et al*^[11]应用液相色谱、电喷雾电离串联质谱发现,转移性肝癌细胞株MHCC97H、MHCC97L较非转移性肝癌细胞株Hep3B有明显的差异蛋白质表达,其中S100钙结合蛋白A4可作为肝癌的首选标记蛋白,其与肝癌细胞的运动性、浸润、基质金属蛋白酶的分泌等紧密相关。刘博 *et al*^[12]应用表面增强激光解吸离子化(surface enhanced laser desorption/ionization, SELDI)蛋白质芯片技术分析肝内胆管癌细胞系ICC-9810与正常肝细胞系L02的蛋白质表达差异,发现27个差异蛋白。其中3767、7999、10555、12163、22066和26794 Da 6个差异蛋白可被WCX2和IMAC3芯片共同捕获。这些差异蛋白为寻找肝

■相关报道

刘博 *et al*采用SELDI蛋白质芯片技术比较肝内胆管癌细胞系ICC-9810和正常肝细胞系L02的蛋白表达,特别是WCX2和IMAC3两个芯片共同捕获的3767、26794、7999、10555、12163和22066 Da 6个蛋白,这些差异蛋白为寻找肝肿瘤标志物,了解肝内胆管癌发病机制提供了重要线索。

肿瘤标志物, 了解肝内胆管癌的发病机制提供了重要线索.

2.4 胰腺癌 Lu *et al*^[13]对12例胰腺癌患者的组织提取物(胰腺腺癌和临近的正常组织)进行对比蛋白质组学分析. 通过双向电泳法、MALDI-TOF-MS及图谱分析软件鉴别出在癌组织中有70种蛋白质有较强表达(多数 ≥ 2 倍); 而在正常组织中有41种较强表达. 在癌组织中表达增强的有细胞骨架蛋白、低分子GTP结合蛋白及一些S100家族成员. 其中2种蛋白质的水平由免疫组化得到进一步证实, 最有意义的是fascin在21例肿瘤患者中有13例阳性表达, 而在正常胰腺样本中无一表达, 且fascin的表达与胰腺癌的分化程度密切相关. Shekouh *et al*^[14]联合LCM和2-DE对正常和胰腺导管腺癌上皮细胞蛋白表达谱进行比较, 发现9种差异表达蛋白质, 其中5种蛋白质在肿瘤细胞中表达上调, 4种蛋白质在正常胰腺上皮细胞表达而在肿瘤细胞中不表达或微弱表达. 进一步对胰腺癌中表达上调的蛋白质进行鉴定, 发现其中之一为钙结合蛋白s100A6, 该蛋白在正常胰腺导管上皮不表达, 有望成为诊断胰腺癌分子标志物. Chen *et al*^[15]使用ICAT(isotope-coded affinity tag)标记技术^[16]对胰腺癌组织和正常组织进行定量蛋白谱研究, 定量分析了656个特异性蛋白, 其中151个蛋白差异表达量相差2倍以上. 其中大部分调节蛋白在细胞生理活动、上皮和肿瘤细胞的细胞外基质相互作用的通讯系统中发挥作用.

2.5 结肠癌 Albrethsen *et al*^[17]应用SELDI-TOF-MS比较结肠癌患者血清和正常人血清的蛋白质指纹图谱及结肠癌组织和正常结肠组织的蛋白质指纹图谱发现, 人中性粒细胞防御素组分(human neutrophil peptide 1-3, HNP1-3)在结肠癌患者血清中和结肠癌组织蛋白提取物中表达上调, 应用微流检测技术发现从结肠癌组织中提纯的HNP1-3对哺乳动物细胞是致命的, 从而得出结论, HNP1-3作为结肠癌的标志物, 可以和一些现有的方法联合用于诊断结肠癌, 也可作为治疗随访的预后标志物. 国内湘雅医院裴海平 *et al*^[18]通过筛选大肠癌组织与正常大肠组织中的差异表达蛋白, 选择在癌组织中高表达的30个点进行质谱和生物信息学分析, 鉴定出这些差异蛋白包括谷胱甘-S-转硫酶(GST), annexin IV, β -actin, APOA 1蛋白, 肝型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein, L-FABP)和HSP27等. 这些发现都有可能用作新的生物标志物进行结肠癌前病变的筛选和早期发现结肠癌.

3 结论

随着基因组学、转录组学和蛋白质组学的迅猛发展, 更多肿瘤分子标记被发现和鉴定, 医学科学界对复杂的癌症成因和分子路径开始有更多地了解, 药物研发将这些特异性分子和基因改变作为靶点, 以期在杀灭癌细胞的同时对正常器官系统不产生毒性作用^[19-20]. 基于质谱的蛋白质组学定量技术为探寻疾病的发生发展过程带来更多的机会和挑战^[21]. 但在取得进步同时, 我们更应该清醒地意识到, 蛋白质组学的研究仍有很多问题和缺点亟待解决. 首先, 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, 因而有许多重要蛋白质的信息可能会丢失. 其次, 蛋白质图谱分析系统的敏感性仍待提高, 蛋白质数据库还不成熟. 尽管存在许多困难, 但是随着技术与方法的不断创新与发展, 蛋白质组学必将在肿瘤及生命科学各学科中发挥越来越重要的作用, 从而成为揭示肿瘤发生本质、诊断和治疗肿瘤的有力武器.

4 参考文献

- 1 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094
- 2 Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 2006; 6: 5650-5661
- 3 Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Shimada H, Ochiai T, Nomura F. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2007-2014
- 4 Nishimori T, Tomonaga T, Matsushita K, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Nomura F, Matsubara H, Shimada H, Ochiai T. Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin. *Proteomics* 2006; 6: 1011-1018
- 5 Fu L, Qin YR, Xie D, Chow HY, Ngai SM, Kwong DL, Li Y, Guan XY. Identification of alpha-actinin 4 and 67 kDa laminin receptor as stage-specific markers in esophageal cancer via proteomic approaches. *Cancer* 2007; 110: 2672-2681
- 6 Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, Myong NH, Hwang CH, Lee GS, Yom HC. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 505-509
- 7 Suehara Y, Kondo T, Seki K, Shibata T, Fujii K, Gotoh M, Hasegawa T, Shimada Y, Sasako M, Shimoda T, Kurosawa H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S. Pftin as a prognostic biomarker

■ 创新盘点

本文综述了蛋白质组学在消化系统肿瘤中的最新进展. 为读者在基因组学、蛋白质组学和代谢组学技术日臻完善的今天, 如何将这些生物技术运用到医学疾病的研究中带来新的启发, 为如何解决肿瘤诊断、治疗上的难点带来新的希望.

■ 应用要点

研究差异蛋白可以进一步地了解正常细胞和肿瘤细胞的生物学特性, 筛选出消化系统肿瘤的可能标志蛋白, 从而揭示消化系统肿瘤发生、发展的分子机制.

■同行评价

本文行文简洁,参考价值较好,若能对蛋白质组学在消化系统肿瘤中的研究进展及应用作更深入的讨论,将对读者更有裨益。

- of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1707-1717
- 8 Feng JT, Shang S, Beretta L. Proteomics for the early detection and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3810-3817
 - 9 Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81
 - 10 Luk JM, Lam CT, Siu AF, Lam BY, Ng IO, Hu MY, Che CM, Fan ST. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006; 6: 1049-1057
 - 11 Cui JF, Liu YK, Zhang LJ, Shen HL, Song HY, Dai Z, Yu YL, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Tang ZY, Yang PY. Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro. *Proteomics* 2006; 6: 5953-5961
 - 12 刘博,肖雪媛,董家鸿,何大澄,黄志强.肝胆管癌细胞系ICC-9810与肝细胞系L02蛋白质组学的差异分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 759-762
 - 13 Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics* 2004; 4: 3975-3988
 - 14 Shekoth AR, Thompson CC, Prime W, Campbell F, Hamlett J, Herrington CS, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T, Buechler MW, Friess H, Neoptolemos JP, Pennington SR, Costello E. Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 1988-2001
 - 15 Chen R, Pan S, Brentnall TA, Aebersold R. Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 523-533
 - 16 Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 994-999
 - 17 Albrethsen J, Bøgebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* 2005; 5: 8
 - 18 裴海平,朱红,曾亮,李宜雄.应用二维电泳和质谱技术筛选大肠癌与正常肠组织的差异表达蛋白. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 748-752
 - 19 Cho WC, Cheng CH. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 401-410
 - 20 Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2007; 6: 25
 - 21 Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007; 5: 77-85

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为0引言;1材料和方法,1.1材料,1.2方法;2结果;3讨论;4参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题;2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述:(1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;第3套为^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并拷入光盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。(5)致谢 后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。(常务副总编辑:张海宁 2009-08-08)