

基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断研究进展

廖剑, 殷正丰

■背景资料

蛋白质组学技术的飞速发展, 为疾病的早期诊断开拓了一条全新的道路。在将最新的蛋白质组学技术应用于肝癌的研究过程中, 研究者们发现并鉴定了一批潜在标志物, 并且建立了新的诊断模式, 推动了肝癌早期诊断的发展。

廖剑, 殷正丰, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室 上海市 200438

国家自然科学基金资助项目, No. 30672002

作者贡献分布: 本文写作由廖剑完成; 殷正丰审校、修改、定稿。
通讯作者: 殷正丰, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室。

yinzfk@yahoo.com.cn

电话: 021-25070859 传真: 021-25070859

收稿日期: 2008-11-22 修回日期: 2008-12-24

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Progress in proteomics-based diagnosis of hepatocellular carcinoma

Jian Liao, Zheng-Feng Yin

Jian Liao, Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672002

Correspondence to: Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. yinzfk@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-22 Revised: 2008-12-24

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

Over the years, the research for new biomarkers of hepatocellular carcinoma has been slow. Proteomics technology, mainly including two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, has provided a very good platform for finding new biomarkers of hepatocellular carcinoma and sped up the study of laboratory diagnosis in hepatocellular carcinoma. This paper reviewed the recent progress in the laboratory diagnosis of hepatocellular carcinoma based on proteomics technology.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Laboratory diagnosis; Proteomics

Liao J, Yin ZF. Progress in proteomics-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 284-287

摘要

多年来, 寻找新的肝癌标志物的研究一直进展缓慢。以双向电泳、新型质谱分析为主的蛋白质组学方法为寻找肝癌标志物提供了良好的技术平台, 促进了肝癌实验诊断研究的快速发展。本文综述了近年来基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断临床研究的主要进展。

关键词: 肝癌; 实验诊断; 蛋白质组学

廖剑, 殷正丰. 基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 284-287

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/284.asp>

0 引言

肿瘤通常被认为是基因性疾病, 也被认为是一种蛋白质组疾病。肿瘤蛋白质组学包括对正常组织与疾病组织(从癌前病变到肿瘤)之间差异表达蛋白质的鉴定和定量分析。一个正常细胞在转变为肿瘤的过程中, 细胞内蛋白质表达谱会发生一系列显著变化。就肝癌而言, 蛋白质组学研究可以整体、动态、定量地研究肝癌发生过程中蛋白质种类、数量的改变, 不仅有助于进一步揭示肝癌的发病机制, 而且可鉴别出使正常细胞转化为癌细胞的蛋白质, 进而开发出检测这些肝癌标志物的实验技术, 以帮助诊断早期肝癌, 从而实现肝癌诊断方面的实质性突破。目前, 以双向电泳、质谱分析为主的蛋白质组学方法为肝癌实验诊断研究提供了良好的技术平台。

1 肝癌实验诊断相关双向电泳分析

1.1 肝癌细胞系双向电泳分析 Ding *et al*^[1]应用双向电泳技术比较了肝癌高转移细胞株MHCC97-H与低转移细胞株MHCC97-L的蛋白表达情况, 共发现56个差异表达的蛋白质点。其中4个蛋白质点仅在MHCC97-H中表达。通过质谱鉴定, 发现丙酮酸激酶M2等6种蛋白在MHCC97-H细胞中表达增加, 而锰超氧化物歧化酶等7种蛋白表达降低。其中多数蛋白质分子

■同行评议者

龚建平, 教授, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

已报道与肿瘤转移相关, 因此认为他们也可能与肝癌转移有关。

1.2 肝癌组织双向电泳分析 Sun *et al*^[12]收集了12例乙肝病毒相关性肝癌组织和配对癌旁组织, 经双向荧光电泳分离, 共得到219个表达差异蛋白点。其中肝癌组织中61个蛋白点表达上调, 158个蛋白点表达下调。应用质谱分析, 共鉴定71个分子, 建立了一个肝癌相关差异蛋白质库, 其中Hsp70/Hsp90-organizing protein和不均一核内糖核蛋白C1/C2从未报道过与肝癌相关。随后的Western blot和免疫组化检测结果表明, 这两个蛋白在70例肝癌组织中均有表达, 而对应的癌旁组织中几乎无表达。提示其具有作为肝癌标志物的潜在可能性。Yi *et al*^[13]收集了103例乙肝病毒相关性肝癌组织和配对癌旁组织以及16例正常肝组织, 应用双向电泳技术分离样本蛋白, 通过数据分析和质谱鉴定, 发现肝癌组织中HSPA9基因编码的致死蛋白(mortalin)表达明显上调。进一步研究发现, 与35例术后1年未复发的肝癌患者相比, 68例术后早期复发肝癌患者的致死蛋白表达量明显增高。另外发现, 肝癌高转移细胞株中致死蛋白表达量也明显增高, 并且致死蛋白与临床肝癌的恶化和侵袭转移相关。因此认为致死蛋白可以作为监测肝癌早期复发的一个候选标志物。Takashima *et al*^[14]采用双向电泳技术将15例肝癌组织和癌旁组织以及5例正常肝组织的蛋白进行分离, 用自体血清进行免疫印迹反应, 通过比对, 发现肝癌组织中有4个蛋白点表达上调。进一步鉴定后, 发现抗锰超氧化物歧化酶、热休克蛋白70和过氧化物还原酶的自身抗体在肝癌患者血清中具有明显的免疫反应, 因此认为是肝癌特异性抗体, 具有作为肝癌诊断标志物的潜能。

1.3 肝癌血清双向电泳分析 Feng *et al*^[15]将20例乙肝病毒相关性肝癌患者, 20例乙肝病毒感染者和20例健康志愿者的血清分别混合后, 先除去血清白蛋白和免疫球蛋白, 然后通过双向电泳分离和质谱鉴定, 共发现热休克蛋白27、甲胎蛋白等8种蛋白在3组中存在明显的表达差异。应用Western blot进一步验证, 发现90%肝癌患者和2例乙肝病毒感染者血清中表达热休克蛋白27, 而健康者血清中均没有表达。故认为该蛋白可作为肝癌诊断的一个候选血清标志物。Block *et al*^[16]用早獭建立肝癌模型, 在凝集素富集糖蛋白后, 应用双向电泳技术从肝癌早獭血清中分离出一组高度岩藻糖基化糖蛋白, 并进行了质

谱鉴定。随后对其中的高尔基蛋白73(GP73)进行Western blot验证, 发现与乙型肝炎患者相比, 肝癌患者血清GP73表达量差异没有统计学意义, 但是肝癌患者血清岩藻糖基化GP73表达量明显增高, 表明岩藻糖基化GP73具有作为肝癌诊断标志物的潜在可能。

2 肝癌实验诊断相关质谱分析

2.1 固体芯片飞行时间质谱技术的应用

2.1.1 固体芯片飞行时间质谱技术: 美国Ciphergen公司提供的蛋白质芯片技术是随着蛋白质组学兴起而出现的一种可能比较适合于临床应用的新技术。该技术又称表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS), 集蛋白质芯片、质谱分析技术和生物信息软件于一体。作为蛋白质组学研究的一个强有力工具, SELDI-TOF-MS已被用来研究肝炎、肝硬化和肝癌的蛋白指纹图谱, 通过不同组间的蛋白表达差异来建立疾病诊断模型。显然, 同时对一组与肝癌相关的蛋白进行分析比对, 诊断的灵敏度和特异性必然高于目前以单一标志物为依据或者少数几个标志物联合检测的诊断方法。

2.1.2 肝癌血清固体芯片飞行时间质谱分析: Paradis *et al*^[17]收集了82例肝硬化患者血清, 其中44例伴有肝癌, 38例排除肝癌。将这些标本分别随机分为建模组和验证组, 其中建模组血清通过SELDI-TOF-MS技术建立了由6个差异蛋白表达峰组成的蛋白表达图谱模型。用验证组血清验证该模型的灵敏度和特异性, 分别达到92.5%和90%。其中表达差异最大的一个峰(8900 Da)经双向电泳分离和质谱鉴定, 确认为玻璃粘连蛋白C端的一个片段, 可用来作为诊断肝癌的一个潜在标志物。Schwegler *et al*^[18]收集39例健康者、36例未肝硬化肝病、38例肝硬化和57例肝癌患者血清, 采用铜离子螯合的亲合芯片, 通过SELDI-TOF-MS技术建立了一个以38个不同蛋白组成的图谱模型。利用该模型进行盲法检测, 鉴别丙型肝炎病毒相关疾病如慢性丙型肝炎、丙型肝炎肝硬化或者丙肝病毒相关性肝癌和健康者, 其灵敏度和特异性可达74%-95%; 而采用该模型区别慢性丙型肝炎和丙肝病毒相关性肝癌的灵敏度可达61%, 特异性达76%。如果该诊断模型和AFP、异常凝血酶原和GP73联用, 则将灵敏度和特异性分别提高到75%和92%。并且该模型可将肝癌从肝病患者在肝硬化之前或者发生肝硬化之时就检测出来, 特别是丙肝病毒

■研发前沿

基于蛋白质芯片技术建立的蛋白指纹图谱诊断模型可以在同一个芯片上同时检测临床标本中的一组蛋白, 且过程简单, 分析迅速, 是很有前途的诊断新方法。但是, 蛋白质芯片技术的诸多弊端, 例如重复性差、不同研究者研究结果不一致等, 又限制了蛋白质组学技术在临床上的应用。

■相关报道

国外对基于蛋白质组学的肝癌实验诊断的研究已取得长足的进步。通过双向电泳技术和质谱技术分离鉴定了一批肝癌的潜在标志物, 并通过飞行时间质谱技术建立了蛋白指纹图谱诊断模型, 大大提高了肝癌诊断的灵敏度和特异性。

■应用要点

通过对多种方法在肝癌蛋白质组学研究中的运用,发现他们各有利弊.因此可将多种蛋白质组学技术联合应用,取长补短,必能发挥各自优势,大大提高肝癌早期诊断的特异性 and 灵敏度.

相关肝病. Kanmura *et al*^[9]收集了77例丙型肝炎病毒相关的慢性肝病和64例肝癌血清,分别随机分为2组,其中一组35例为肝癌,44例为其他肝病;另一组29例为肝癌,33例为其他肝病.选用第一组血清通过SELDI-TOF-MS建立了由6个差异蛋白表达峰组成的蛋白表达图谱诊断模型.用第二组血清验证该模型的灵敏度和特异性,分别为83%和76%.同时收集了7例肝癌在诊断为肝癌前1年的血清和5例未发生肝癌肝病3年前的血清,用该模型进行检测,7例肝癌患者有6例阳性,而5例肝病全部为阴性.表明该模型对慢性丙型肝炎病毒感染者进行肝癌的早期检测和预测具有显著的意义. Zinkin *et al*^[10]应用SELDI-TOF-MS对41例丙型肝炎病毒相关性肝癌和51例丙型肝炎相关性肝硬化患者血清进行分组检测,建立了由一个11个蛋白表达峰组成的诊断模型,用于肝癌诊断的灵敏度为79%,特异性为86%.将8例小于2 cm的肝癌患者血清用于验证,结果验证出7例,而AFP、AFP异质体和异常凝血酶原只分别鉴定出3例、1例和1例,说明该模型对于肝癌的诊断比传统的肝癌标志物更加准确. Poon *et al*^[11]收集了38例肝癌和20例其他慢性肝病血清,选用WCX2和IMAC3芯片,应用SELDI-TOF-MS建立了鉴别慢性肝病的肝癌指纹图谱模型,其灵敏度和特异性分别为92%和90%. Ward *et al*^[12]应用SELDI-TOF-MS技术研究了肝癌患者癌前、患癌和治疗后的血清,发现癌前和患癌的血清中有数个明显的差异表达蛋白峰,但在治疗后并没有消失,说明这些蛋白表达量的变化与肿瘤有无并无多大关联,而主要与肝病的进展和癌前期的病变相关.经分离鉴定,得到一个差异表达蛋白为 $\beta 2$ 微球蛋白,认为可作为判断肝病进展和癌前期病变的候选标志物.

2.1.3 固体芯片飞行时间质谱技术存在的问题:随着SELDI-TOF-MS技术逐渐应用于临床,发现这项技术存在一些问题尚待解决和完善,如不能在线鉴定差异蛋白;图谱中的峰高和蛋白质浓度之间并非都是线性关系;由于检测过程中涉及因素较多,控制又未标准化,同一疾病的特征性波峰在不同研究者之间重现性差.因此,SELDI-TOF-MS作为快速诊断、发现并鉴定肿瘤标志物的手段应用于临床,在准确性、稳定性和重复性等方面还需要进一步提高.

2.2 肝癌血清液体芯片飞行时间质谱分析 近年来出现了一项可与SELDI-TOF-MS竞争的新的质谱技术,即布鲁克公司提供的液体芯片飞行

时间质谱技术(CLINPROT MALDI-TOF-MS, 又称CLINPROT系统),其准确性、稳定性、灵敏性和重复性等可能更胜一筹.与SELDI-TOF-MS相比,CLINPROT系统最大的特点是用液体芯片技术取代固体芯片技术,即先在液态中用某种磁珠捕获特定的蛋白.由于捕获的低丰度蛋白或多肽种类多,保证了检测的准确性和灵敏度,同时纳米磁珠巨大的表面积使蛋白的捕获具有良好的重现性.该系统另一个独特的优势是二次质谱技术,可以在寻找生物标志物的同时进一步在线直接鉴定单个候选标志物.总之,CLINPROT系统允许科研人员使用单一、易于应用的集成系统检测蛋白质表达谱、发现蛋白质组指纹以及识别蛋白质. Goldman *et al*^[13]收集了78例丙肝病毒相关性肝癌血清和72例非肝癌血清,应用磁珠富集小分子量蛋白,通过MALDI-TOF-MS建立了一个由6个差异表达蛋白峰构成的诊断模型,对50例验证组血清进行盲法检测的灵敏度达100%,特异性达91%.其中2个显著差异蛋白峰经过在线质谱鉴定,确认为补体C3和C4的片段,认为可作为肝癌的候选标志物.

3 其他蛋白质组学技术的应用

随着液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术、激光捕获微切割(LCM)、差异凝胶电泳(2D-DIGE)和同位素标记亲和标签技术(ICAT)等生物新技术的相继出现,蛋白质组学技术得到不断完善,并进一步推动肝癌实验诊断研究的深入发展.而目前越来越倾向于多种方法联合应用于肝癌的蛋白质组学研究.

Li *et al*^[14]联合应用激光捕获显微切割、同位素亲和标记和二维液相色谱-质谱联用等三种技术,对肝癌和非肝癌组织的细胞进行差异蛋白质组分析,定性鉴定了644种蛋白质,包括定量鉴定了261种蛋白质,其中149种蛋白质表达量有2倍以上的差异.这些结果为进一步发现新的肝癌标志物奠定了扎实的基础. Lee *et al*^[15]应用差异凝胶双向电泳技术和液相色谱-质谱联用技术,从人肝癌组织中分离并鉴定了30个具有明显表达差异的蛋白(与癌旁肝组织比较),其中16个蛋白表达上调,14个蛋白表达下调.进一步研究表明,14-3-3 γ 蛋白(14-3-3 gamma protein)表达显著增加,可作为肝癌标志物. Lee *et al*^[16]随后应用SELDI-TOF-MS对55例丙型肝炎病毒相关性肝癌、48例慢性丙型肝炎以及9例健康者血

清进行测定, 找到一个表达显著差异的蛋白峰, 分子质量为8900 Da, 通过双向电泳技术和二维液相色谱-质谱联用技术分离鉴定该蛋白为补体蛋白C3a。进一步分析表明, 补体C3a水平与丙氨酸转氨酶、肿瘤大小等参数之间均无显著相关性。

4 结论

近年来, 应用蛋白质组学技术已发现并鉴定了一批潜在的肝癌标志物。但是, 随之而产生的另一个困扰则是如何选择合适的肝癌标志物进行联合诊断, 以及如何形成多种标志物检测结果的有效报告。这无疑需要大量的临床验证以及统计学分析处理, 过程繁琐、复杂。基于蛋白质芯片技术建立的蛋白指纹图谱诊断模型可以在同一个芯片上同时检测临床标本中的一组蛋白, 且过程简单, 分析迅速, 则能很好地解决这个问题。但是, 蛋白质芯片技术的诸多弊端, 例如重复性差、不同研究者研究结果不一致等, 又限制了蛋白质组学技术在临床上的应用。因此, 技术进步仍是今后肝癌实验诊断研究的一个重点, 一方面需要将现有的技术方法不断完善, 综合运用, 取长补短; 另一方面则需要进一步丰富和发展新的蛋白质组学技术, 提高其可重复性和稳定性。

5 参考文献

- Ding SJ, Li Y, Shao XX, Zhou H, Zeng R, Tang ZY, Xia QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics* 2004; 4: 982-994
- Sun W, Xing B, Sun Y, Du X, Lu M, Hao C, Lu Z, Mi W, Wu S, Wei H, Gao X, Zhu Y, Jiang Y, Qian X, He F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1798-1808
- Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, Lau GK, Beretta L, Fan ST. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 315-325
- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 3894-3900
- Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- Block TM, Comunale MA, Lowman M, Steel LF, Romano PR, Fimmel C, Tennant BC, London WT, Evans AA, Blumberg BS, Dwek RA, Mattu TS, Mehta AS. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-784
- Paradis V, Degos F, Dargère D, Pham N, Belghiti J, Degott C, Janeau JL, Bezeaud A, Delforge D, Cubizolles M, Laurendeau I, Bedossa P. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 40-47
- Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, Block TM, Marrero JA, Drake RR. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 41: 634-642
- Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 2007; 45: 948-956
- Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, Otu HH, Spentzos D, Kalmowitz B, Wells M, Guerrero M, Asara JM, Libermann TA, Afdhal NH. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 470-477
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
- Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Billingham LJ, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006; 94: 287-292
- Goldman R, Ransom HW, Abdel-Hamid M, Goldman L, Wang A, Varghese RS, An Y, Loffredo CA, Drake SK, Eissa SA, Gouda I, Ezzat S, Moiseiwitsch FS. Candidate markers for the detection of hepatocellular carcinoma in low-molecular weight fraction of serum. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2149-2153
- Li C, Hong Y, Tan YX, Zhou H, Ai JH, Li SJ, Zhang L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 399-409
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Yu CY, Lu FJ, Chow LP. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 2062-2069
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, Yu CY, Wen CL, Lu FJ, Chow LP. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics* 2006; 6: 2865-2873

■同行评价

本文有较好的创新性, 国内同类型文章较少, 全文资料丰富, 写作详尽, 结构清楚, 条理清晰, 有较好的学术价值和应用价值。

编辑 李军亮 电编 何基才