

# 蛋白质组学在肝癌发生机制及诊治中的作用

撒忠秋, 秦建民, 倪雷

撒忠秋, 秦建民, 倪雷, 上海中医药大学附属普陀医院普外科 上海市 200062

上海市普陀区科委重点基金资助项目, No. B84

作者贡献分布: 本文由撒忠秋综述; 倪雷与秦建民审核。

通讯作者: 秦建民, 副教授, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院普外科. jianminqin@yahoo.com

收稿日期: 2010-01-09 修回日期: 2010-03-29

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-28

## Role of proteomics in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma

Zhong-Qiu Sa, Jian-Min Qin, Lei Ni

Zhong-Qiu Sa, Jian-Min Qin, Lei Ni, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: the Key Project of the Science and Technology Commission of Shanghai Putuo District, No. B-84

Correspondence to: Associate Professor Jian-Min Qin, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. jianminqin@yahoo.com

Received: 2010-01-09 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-28

## Abstract

The development and progression of primary liver cancer are a very complicated process that involves multiple genes and steps. DNA sequencing can not thoroughly reveal the biological function of genes since a single gene can encode multiple proteins with distinct functions. The protein profiles of liver cancer cells, tissue and peripheral serum can be determined to analyze the structure and function of proteins involved in the development, progression, recurrence and metastasis of primary liver cancer. Proteomics plays an important role in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

**Key Words:** Proteomics; Primary liver cancer; Mechanism; Diagnosis; Treatment

Sa ZQ, Ni L, Qin JM. Role of proteomics in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1521-1524

## 摘要

原发性肝癌的发生、发展涉及一系列多基因参与、多步骤协同的复杂过程, 通过DNA序列无法解释所有的生物功能, 同样的基因组却表达出不同的蛋白质, 显示出不同的生物学功能. 通过检测肝癌细胞、组织及外周血清蛋白质表达谱, 深入开展肝癌发生、发展、复发与转移相关蛋白质结构和功能的研究, 对于阐明肝癌发病机制以及研究新的肝癌诊断与治疗方法, 具有重要的研究意义和应用价值.

**关键词:** 蛋白组学; 肝癌; 机制; 诊断; 治疗

撒忠秋, 秦建民, 倪雷. 蛋白质组学在肝癌发生机制及诊治中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1521-1524

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1521.asp>

## 0 引言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC, 以下简称肝癌)是世界上第三大癌症, 每年约有100万以上的人口患病. 在我国每年约有20余万人患肝癌, 在我国恶性肿瘤死亡率中肝癌居第2位, 其5年生存率仅有5%-6%, 大部分肝癌患者(>80%)就诊时已属晚期, 无法手术切除, 即使可以手术切除的肝癌患者, 2年复发率依然高达50%, 严重影响肝癌治疗效果<sup>[1-3]</sup>. 肝癌的发生发展是一系列多基因参与、多步骤协同的复杂过程, 为降低其发病率和死亡率, 诸多学者曾试图在基因水平上寻找肝癌分子靶标, 但随着人类基因组测序的完成, 人们意识到仅仅通过DNA序列无法解释所有的生物功能, 尽管所有的细胞都拥有同样的基因组, 但却表达出不同的蛋白质并显示出不同的生物学功能, 细胞差异很大程度是由基因表达的最终产物-蛋白质来决定的. 如何开展肝癌发生、发展、复发与转移相关蛋白质结构和功能的研究, 对肝癌发病机制与诊治的深入研究, 具有重要的应用前景.

## 1 肝癌蛋白质组学研究的意义

1994年澳大利亚Macquarie大学Wilkins和Williams首次提出“蛋白质组”这个概念<sup>[4]</sup>. 蛋白质组学

## ■背景资料

目前对原发性肝癌的研究在基因水平虽然发现一些有价值的相关基因, 但对于阐明肝癌发生机制和临床诊治应用价值有限, 亟须从基因表达的最终产物-蛋白质水平进行深入研究, 以期对肝癌发病机制的揭示和临床早期诊治起到重要的研究价值.

## ■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

## ■应用要点

从细胞、组织和血清三个方面研究肝癌蛋白质组学,能够从不同角度较为全面地揭示肝癌发生机制、临床诊治。

是指研究蛋白质组或应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的一门学科,是对基因组所表达的整套蛋白质的分析,在蛋白质整体水平上对疾病机制、细胞模式、功能联系等方面进行探索的科学。主要涉及研究各种蛋白质组的组成成分,力图描绘出人类大约3-4万多基因编码的所有蛋白质谱,建立蛋白质组数据库-表达蛋白质组学;以及研究蛋白质组的各种功能,揭示细胞生理和病理状态的进程与本质,对外界环境刺激的反应途径,以及细胞调控机制,获得对某些关键蛋白的定性和功能分析-即功能蛋白质组学。随着人类基因组计划、计算机技术及网络技术的发展,蛋白质组生物信息学已经成为蛋白质组研究一个不可缺少的部分<sup>[5]</sup>。蛋白质的生物信息学用来分析和构建双向凝胶电泳图谱,搜索与构建蛋白质组数据库。随着后基因组时代的到来,蛋白质组学研拳直接定位于蛋白质水平,从整体、动态、定量的角度去研究肝癌发生发展过程中蛋白质种类、数量、性质、功能及其动态改变,进一步揭示肝癌的发病机制,为肝癌的早期诊断及治疗开辟了新的途径。

## 2 肝癌细胞系蛋白质组学研究

近年来,肝癌细胞系的蛋白质组学研究为揭示肝癌发生机制奠定了重要的实验基础。Fujii等<sup>[6,7]</sup>运用荧光饱和标记染色法、Western blot法、双向荧光差异凝胶电泳法等分析技术研究了约9株不同肝癌系细胞,不仅发现抑癌基因结合蛋白、转录调节蛋白、脂肪酸结合蛋白、细胞周期调节蛋白、增殖细胞核抗原、末端结合蛋白等在正常细胞和癌细胞之间表达的差异性,并且建立了肝癌细胞系HepG2的蛋白电泳图谱和数据库,鉴定了123个基因位点对应的92种蛋白,在肝癌蛋白质谱研究领域具有里程碑式的意义。Zhou等<sup>[8]</sup>利用多种蛋白组织化学技术分析比较了人非肝癌但已发生变化的肝细胞系、未转移的HCC细胞系-Hep3B和高度转移的肝癌细胞系-MHCC97H的蛋白质谱,构建了该三种细胞系的糖蛋白组数据库,并发现该三种细胞系的糖蛋白及总蛋白的表达有着明显差异,认为可以通过检测肝组织蛋白糖基化变化对肝癌的发生及转移进行早期预测及诊断。He等<sup>[9]</sup>构建了携带HBX基因的表达载体pEGFP2N1-X,然后将其转染到HepG2细胞,并在细胞质和核边缘表达,利用蛋白组化技术发现四种差异明显的蛋白在HBX转染的细胞中表达上调,考虑可能与

肝癌的发生及早期转移有关。Cui等<sup>[10]</sup>运用2-DE技术比较分析了无转移的Hep3B的肝癌细胞系、低转移的MHCC97L肝癌细胞系和高转移MHCC97H肝癌细胞系的蛋白二维电泳图差异,并用液相色谱2电喷雾离子阱质谱鉴定了其中显著差异的26个蛋白,认为这些蛋白可能成为预测肝癌患者预后的蛋白标志物。Ding等<sup>[11]</sup>运用蛋白质组学技术比较分析了高转移肝癌细胞系MHCC97H和低转移MHCC97L,发现细胞角蛋白CK19(cytokeratin19)在MHCC97H中高表达而在MHCC97L中低表达,并在102例有明显肝内转移的肝癌患者血清中检测出CK19蛋白阳性,该组研究还通过放射免疫技术发现肝细胞癌小鼠血清CK19的水平随着肿瘤的进展有所增加并在发生肺转移后显著增加,认为这些蛋白不仅可以成为预测肝癌患者早期转移的蛋白标志物,还可用于延缓或阻止肝癌的转移的治疗靶点。上述差异蛋白质的筛选、结构与功能的鉴定,为肝癌发病机制、靶向治疗和预后的研究提供了重要的研究平台。

## 3 肝癌患者血清蛋白质组学研究

Le Naour等<sup>[12]</sup>用2-DE等方法分析了原发性肝癌患者和正常人的血清,发现8种蛋白的抗体在肝细胞癌中高表达,而在健康人群中无表达( $P<0.05$ )。Block等在土拨鼠肝癌模型鼠的血清中发现GP73蛋白明显高于正常鼠,而后发现肝癌患者血清中的GP73蛋白也明显高于正常人。Marrero等<sup>[13]</sup>利用蛋白印迹技术比较了肝癌患者和肝硬化患者血清中GP73水平差异,其结果表明肝癌患者血清GP73水平明显高于肝硬化患者,且在肝癌早期检出的敏感性明显高于AFP( $P<0.05$ )。Capurro等<sup>[14]</sup>运用蛋白组化技术研究了近来肝癌早期诊断热点之一的磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)在不同人群中的表达差异,结果表明GPC3在肝癌患者血清中过度表达,而在肝炎等其他肝脏疾病患者及正常人群中低表达或不表达。Poon等<sup>[15]</sup>利用蛋白组化技术对比分析了肝癌患者、肝硬化患者和正常人的血清,发现并归类分析了250个差异表达蛋白质点,这些差异蛋白能正确识别所有血清标本,能够无偏性的反应肝癌蛋白组特异性,展示了蛋白组学在肝癌标志物研究中的前景。Steel等<sup>[16]</sup>利用2-DE及肽链指纹图谱鉴定技术分析肝癌患者和活性/隐匿性HBV感染而无任何临床症状的患者的血清,发现补体C3-C末端片段和载脂蛋白A1同源蛋白

质在肝细胞癌患者血清中含量相对较高, 有可能成为肝癌早期检测的标志物. Comunale等<sup>[17]</sup>利用蛋白组学技术分析比较了HBV相关肝癌患者和、慢性肝炎患者以及正常人血清, 发现部分蛋白核心高度的岩藻糖基化, 包括AFP在内的19种岩藻糖基化蛋白明显升高, 并且这些岩藻糖基化蛋白在AFP阴性的肝癌患者中也明显升高, 其价值可能优于AFP, 可以进一步作为肝癌早期检查的血清标志物. 为进一步筛选肝癌早期诊断特异性标志物提供了新的研究依据.

#### 4 肝癌肿瘤组织的蛋白组学研究

Kim等<sup>[18]</sup>利用2-DE技术分析比较了肝癌组织和正常肝组织的蛋白位点差异, 鉴定出包括热休克蛋白27(hot shock protein 27, HSP27)、生长因子受体结合蛋白2(Grb2)、组织蛋白酶D(cathepsin D)等11个在肝癌发生发展过程中起重要的差异表达蛋白. Kim等<sup>[19]</sup>利用蛋白组化技术比较了HBV阳性肝癌患者、HCV阳性肝癌患者和肝炎病毒阴性肝癌患者的组织蛋白表达图谱, 分析了60种蛋白质点在上述三者中的表达差异性, 有14种蛋白表达趋同, 有46种具有肝炎病毒表达特异性, 例如HSP27就在HCV阳性肝癌患者中高表达, 在HBV阳性患者中低表达. Yokoyama等<sup>[20]</sup>利用蛋白组化技术对比分析了肝癌和癌旁组织的蛋白质组成分, 发现了11个差异蛋白质点, 其中有转铁蛋白轻链、精氨酸酶1、肝型醛缩酶、原肌球蛋白 $\beta$ 链等8个蛋白质点在肝癌组织中表达下调, 这些蛋白大都与肝细胞功能缺失以及肝癌形成有关. Alaiya等<sup>[21]</sup>用蛋白质组技术比较分析了肝癌组织和正常肝组织中的蛋白表达差异, 发现相关的基因编码在正常肝组织中表达的是相对分子质量为37 000 Da, 等电点为68的醛糖还原酶, 而在肝癌组织中表达的是一个相对分子质量为35 000 Da, 等电点为74的醛糖还原酶样蛋白, 经免疫组织化学证实, 正常人肝脏中无此蛋白表达, 在癌前病变和肝癌组织中表达明显, 而周围正常组织不表达, 研究者认为上述变化可能与肝癌的发病机制密切相关. Park等<sup>[22]</sup>运用2-DE、Western blot、免疫组织化学等技术对比分析了肝癌患者癌组织和癌旁正常组织铁蛋白轻链水平, 发现癌组织中的铁蛋白轻链表达下调或缺失, 研究者进一步运用RT-PCR方法发现铁蛋白轻链mRNA翻译后修饰可能是抑制癌组织中轻链表达的原因, 为肝癌发病机制中铁缺失的研究提供新的研究方

向. 在White等<sup>[23]</sup>的研究中, 他们首先建立了SD大鼠的肝癌模型, 再通过蛋白组学技术分析大鼠肝癌组织与正常鼠肝组织的蛋白表达差异, 发现核受体超家族成员中的多个差异蛋白质点, 包括细胞质环氧化物水解酶、过氧化物酶体双功能酶, 羟甲基戊二酰辅酶A, 长链酰基辅酶A硫酯酶等, 认为核受体超家族成员蛋白组学变化可能与肝癌的发生机制有关. Lim等<sup>[24]</sup>利用蛋白质组化技术, 对比分析了肝癌组织、癌旁组织、癌远端正常组织, 以及肝硬化患者和正常人的肝组织等的蛋白质表达谱, 鉴定出21种差异表达蛋白质点, 包括肝羧酸酯酶、层黏蛋白B1等, 这些蛋白质都可作为肝癌的标志物, 用于肝癌早期发现. Song等<sup>[25]</sup>运用2-DE、免疫组织化学和Western blot等技术分析比较了12例肝细胞癌患者(6例转移, 6例未转移)病变肝脏组织中与伴侣蛋白、细胞流动性、细胞支架结构等有关的16种蛋白, 包括HSP27、S100A11、CK18等, 6例转移标本中HSP27高度表达, 认为HSP27过高表达可以作为肝癌转移的早期监测. Yokoo等<sup>[26]</sup>利用蛋白质组学技术分析比较了12例肝癌术后6 mo内肝癌复发及15例术后2年内无复发的肝脏组织的蛋白表达情况, 发现磷酸丝氨酸氨基转移酶、膜联蛋白等在内的23种与早期肝癌复发高度相关的蛋白质参与了信号转导途径、葡萄糖代谢、胞骨架结构、细胞黏附、抗氧化剂等功能, 认为这些蛋白质对肝癌复发的早期发现和预后预测有重要意义. 肝癌组织蛋白质组学的研究, 为进一步揭示肝癌的发生、发展机制, 深入开展肝癌早期诊断与术后复发转移的预测奠定了重要的研究基础.

#### 5 结论

随着后基因时代的来临, 蛋白组学技术已广泛深入到生命科学医药卫生的各个领域, 其理论和技术的高速发展为肝癌的诊治带来了新的思维方式和研究前景. 但是目前蛋白质组学研究本身还存在着许多不足, 包括蛋白质分离技术的滞后性、低敏感性, 蛋白质分析技术的复杂性和重复性差等, 同一研究在不同的单位研究结果存在差异, 尚未统一的“金标准”. 因此无论从样品的制备、分离到鉴定, 还是研究结果的归纳、总结到最后的实际应用, 都需要不断的发展和改进. 相信在不久的将来, 随着科技的不断发展, 蛋白质组学技术及相关数据库建设的进一步壮大充实, 蛋白质组学会有更广阔的

#### ■研究前沿

近年来在筛选新的肝癌诊断标志物方面进行了大量的研究, 尤其是AFP阴性肝癌诊断问题一直是关注的焦点问题.

## ■同行评价

本文层次清楚,逻辑性较强,对从事肝癌的临床工作者及研究者具有指导意义。

发展前景,将会大大加快对肝癌发生机制、早期诊断、治疗、复发与转移的研究,造福于更多的肝病患者。

## 6 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 郭武华, 张吉翔. 肝癌综合治疗的现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2199-2203
- 3 Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2892-2899
- 4 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-1861
- 5 Liang RC, Neo JC, Lo SL, Tan GS, Seow TK, Chung MC. Proteome database of hepatocellular carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 771: 303-328
- 6 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* 2005; 5: 1411-1422
- 7 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Okano T, Yamada M, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye. *Proteomics* 2006; 6: 1640-1653
- 8 Zhou H, Liu Y, Chui J, Guo K, Shun Q, Lu W, Jin H, Wei L, Yang P. Investigation on glycosylation patterns of proteins from human liver cancer cell lines based on the multiplexed proteomics technology. *Arch Biochem Biophys* 2007; 459: 70-78
- 9 He Y, Yang F, Wang F, Song SX, Li DA, Guo YJ, Sun SH. The upregulation of expressed proteins in HepG2 cells transfected by the recombinant plasmid-containing HBx gene. *Scand J Immunol* 2007; 65: 249-256
- 10 Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 615-622
- 11 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
- 12 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Bréchet C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203
- 13 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012
- 14 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- 15 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
- 16 Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 601-609
- 17 Comunale MA, Lowman M, Long RE, Krakover J, Philip R, Seeholzer S, Evans AA, Hann HW, Block TM, Mehta AS. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2006; 5: 308-315
- 18 Kim J, Kim SH, Lee SU, Ha GH, Kang DG, Ha NY, Ahn JS, Cho HY, Kang SJ, Lee YJ, Hong SC, Ha WS, Bae JM, Lee CW, Kim JW. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis* 2002; 23: 4142-4156
- 19 Kim W, Oe Lim S, Kim JS, Ryu YH, Byeon JY, Kim HJ, Kim YI, Heo JS, Park YM, Jung G. Comparison of proteome between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5493-5500
- 20 Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004; 4: 2111-2116
- 21 Alaiya AA, Franzén B, Auer G, Linder S. Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 2000; 21: 1210-1217
- 22 Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 1459-1466
- 23 White IR, Man WJ, Bryant D, Bugelski P, Camilleri P, Cutler P, Hayes W, Holbrook JD, Kramer K, Lord PG, Wood J. Protein expression changes in the Sprague Dawley rat liver proteome following administration of peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma ligands. *Proteomics* 2003; 3: 505-512
- 24 Lim SO, Park SJ, Kim W, Park SG, Kim HJ, Kim YI, Sohn TS, Noh JH, Jung G. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1031-1037
- 25 Song HY, Liu YK, Feng JT, Cui JF, Dai Z, Zhang LJ, Feng JX, Shen HL, Tang ZY. Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 92-98
- 26 Yokoo H, Kondo T, Okano T, Nakanishi K, Sakamoto M, Kosuge T, Todo S, Hirohashi S. Protein expression associated with early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative surgery. *Cancer Sci* 2007; 98: 665-673