

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0301-03

## 蛋白质组学及其在肿瘤标记物筛选鉴定中的应用

侯彦强 综述; 仲人前, 孔宪涛 审阅 (上海长征医院实验诊断科全军临床免疫中心, 上海 200003)

**[摘要]** 蛋白质组学是针对蛋白质组研究的一门新兴学科,包括结构蛋白质组学和功能蛋白质组学,主要是在整体水平上研究细胞内蛋白质的组成及其活动规律。近年来多种新技术的应用极大地推动了蛋白质组学的发展,同时也成功地应用于肺癌、乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌和肾癌等常见肿瘤标记物的筛选鉴定。蛋白质组学研究的迅速发展在生命科学领域已取得了许多成果,显示出强大的应用前景,对肿瘤的诊断、治疗、监控及肿瘤相关机制的探讨具有重要意义。

**[关键词]** 蛋白质; 蛋白质组学; 肿瘤标记物

**[中图分类号]** R730.43 **[文献标识码]** A

随着人类基因组计划(HGP)的顺利实施及人类基因组序列草图的完成,生命科学的研究进入了一个崭新的后基因组时代。基因组学的重点也从结构基因组学转向功能基因组学,而蛋白质组学(proteomics)是功能基因组学的核心内容。目前,蛋白质组学广泛应用于生命科学领域,并已成为寻找疾病分子标记和药物靶标最有效的方法之一。本文就蛋白质组学及其在肿瘤标记物(tumour markers)筛选鉴定中的应用作一综述。

### 1 蛋白质组学的概念、研究内容及技术方法

蛋白质组学是指应用各种技术手段来研究蛋白质组的一门新兴学科,主要是在整体水平上研究细胞内蛋白质的组成及其活动规律。蛋白质组(proteome)一词最早是由澳大利亚的两位学者 Wilkins 和 Williams 在 1994 年提出的,指全部基因表达的全部蛋白质及其存在方式,是 1 个基因组即 1 个细胞、组织或个体所表达的全部蛋白质。然而由于蛋白质表达及存在状态的复杂性,蛋白质组实际上是一个在空间和时间上动态变化的整体,随着研究的不断深入,蛋白质组的概念也在不断发展和深化。

蛋白质组学的研究内容主要有两个方面:结构蛋白质组学和功能蛋白质组学。前者主要是研究蛋白质的组成成分,即蛋白质表达模式的研究,包括蛋白质氨基酸序列分析及空间结构的解析、种类分析及数量确定;后者主要是研究蛋白质组的功能,即蛋白质功能模式的研究,包括蛋白质的功能及蛋白质间的相互作用。就技术方法而言,对蛋白质表达模式研究的支撑技术是双向凝胶电泳、质谱分析及相关的生物信息学,对蛋白质功能模式研究的主要技术有酵母双杂交系统、噬菌体展示和蛋白质芯片等。双向凝胶电泳(2-DE)的原理是根据蛋白质等电点和分子量的不同在电场中将其分开,第一向在高压电场下对蛋白质进行等电聚焦(IEF),然后在第一向垂直的方向上进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。随着技术的进步,等电聚焦电泳由最初的载体两性电解质管胶电泳发展到目前的固相 PH 梯度凝胶电泳

(IPG),这大大提高了上样量和可重复性,也避免了因载体两性电解质引起的聚焦时间延长、pH 梯度不稳定和阴极漂移等现象。质谱(mass spectrometry, MS)的基本原理是将蛋白质分子离子化后在磁场中飞行,根据离子间质荷比的差异来分离并确定蛋白质的分子质量和特性。目前质谱分析主要有 2 种:电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。生物信息学是随着计算机技术、网络技术和人类生命科学的研究而形成的一门新兴学科,由数据库、计算机网络和应用软件 3 部分组成,其在蛋白质组学双向电泳凝胶图谱构建与分析及数据库的构建和搜索中发挥重要作用。

在蛋白质的分离上,2-DE 方法存在一些缺陷,如上样量低,对偏碱、偏酸或疏水性强及分子量小于 10 kD 的蛋白质检测及回收困难。近几年发展起来的反相高效液相色谱(RPHPLC)和液相等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)等非 2-DE 方法,其不再受上样量的限制,可分离出低丰度的蛋白质。另外还有二维色谱(2D-LC)、二维毛细管电泳(2D-CE)和液相色谱-毛细管电泳(LC-CE)等新的蛋白质分离技术。在蛋白质的鉴定方面也出现了纳摩尔电喷雾电离质谱(nanoelectrospray ionization mass spectrometry)、图像质谱(imaging MS)、表面增强激光解吸离子化-飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)和质谱鸟枪法(shotgun)等先进技术<sup>[1-3]</sup>,所有这些极大地推动了蛋白质组学的发展。而值得注意的是,继基因芯片后蛋白质芯片的出现使蛋白质组学的研究展现出更加美好的前景。蛋白质芯片具有的快速、并行、自动化和高通量的特点,使其已成为蛋白质组研究的重要手段<sup>[4]</sup>。

### 2 蛋白质组学在肿瘤标记物筛选鉴定中的应用

近年来,运用蛋白质组学筛选鉴定肿瘤标记物的研究成为一大热点。这种研究有助于寻找到肿瘤的特异性分子标记以及药物治疗的靶标,不仅有理论价值,而且蕴藏着巨大的市场前景。在对肿瘤蛋白质组学的研究中,激光捕获显微切割(laser capture micro-dissection, LCM)的应用解决了肿瘤

细胞获取的问题,它可直接在显微镜下从组织切片上精确地切割特定的细胞或细胞群,这极大地推进了肿瘤蛋白质组的研究。对许多肿瘤的研究发现了一些表达水平异常的或新的蛋白质,其中部分已确认可作为肿瘤的标记物,其余的也具有作为标记物的潜在可能,以下就蛋白质组学在几种常见肿瘤中的研究情况作简要概述。

### 2.1 肺癌

Chen 等<sup>[5]</sup>用双向凝胶电泳和质谱分析对肺腺癌研究发现,ATP5D,UCHL1, AOE372 等 9 种蛋白质在肺腺癌中过度表达,其具有潜在的作为标记物的可能。Hirano 等<sup>[6]</sup>研究发现,在原发性肺腺癌中有两种分子量相同而等电点不同的未知多肽 TAO1( MW 35 kD, PI 5.45)和 TAO2( MW 35 kD, PI 5.29)高表达,表达的量要比小细胞肺癌、肺鳞癌、来自结肠癌的转移性肺腺癌和正常组织高许多,这可以作为区分原发性肺腺癌和肠、乳腺癌转移来的肺腺癌的标记物。美国密执安大学的 Brichory 等<sup>[7]</sup>采用 2-DE、MALDI-MS 和蛋白质 N 端测序技术建立起了一个肺癌的蛋白质数据库,发现有一种被称为 PGP 9.5 的蛋白质不仅能在 14% 的肺癌血清中引起自身抗体,而且在另外 2 例未查出抗体的肺癌病人血清中也检测到可溶性的 PGP 9.5 自身抗原,因此认为 PGP 9.5 可作为肺癌筛选和诊断的标记物。

### 2.2 乳腺癌

Sauter 等<sup>[8]</sup>对 20 位乳腺癌患者和 13 位健康个体的乳头抽取液进行蛋白质组比较分析,结果发现两者间有 5 种蛋白质不同,其中 6 500 kD 和 15 940 kD 2 种蛋白质对诊断乳腺癌有较高的特异性和敏感性。Luftner 等<sup>[9]</sup>报道,采用蛋白质组学分析发现一种 28.3 kDa 的血清蛋白质( NMP66)能用于肿瘤的早期诊断,并已大规模试用于临床。Franzen 等<sup>[10]</sup>应用 2-DE, ESI-MS 和 MALDI-MS 在乳腺癌中筛选鉴定出 10 个蛋白质标记物,细胞色素 B5、hnRNPC1/c2. F、磷蛋白 B23、细胞角蛋白 6D 和一些以前尚未鉴定的蛋白质。Li 等<sup>[11]</sup>用蛋白质芯片技术对乳腺癌的肿瘤标记物进行筛选鉴定,结果发现 3 种蛋白质,进行多元线性回归分析表明,3 种蛋白质对乳腺癌诊断分级的特异性和敏感性分别达 93% 和 91%。Williams 等<sup>[12]</sup>对 2 株正常人乳腺细胞系和 13 株不同类型的人乳腺癌细胞系的蛋白质表达进行了比较,结果发现 8% 的蛋白质表达水平有变化,其中有 8 种蛋白质只表达在正常的乳腺细胞系,而乳腺癌细胞系则不表达。Vercoutter-Edouart 等<sup>[13]</sup>用 2-DE 和 MALDI-TOF 技术发现乳腺癌细胞中 14-3-3 sigma 的表达下调。

### 2.3 结肠癌

Stulik 等<sup>[14]</sup>的研究显示,与正常结肠粘膜组织相比,结肠癌的肝脂肪酸结合蛋白( L-FABP)和平滑肌蛋白 22- $\alpha$ ( SM22-alpha)表达下调,而钙结合蛋白 S100 家族中的 S100A8, S100A9 和 S100A11 的表达上调。Ji 等<sup>[15-16]</sup>建立了几个结肠癌细胞系的数据库,并发现了一种新的胃肠特异性单抗隆抗体 A33。Jungblut 等<sup>[17]</sup>在结肠癌中发现了一个分子量为 13 000 kD、等电点为 5.6 的蛋白质,其仅表达于肿瘤

组织,在结肠癌病人中 87% 表达上调。

### 2.4 膀胱癌

Vlahou 等<sup>[18]</sup>研究了人移行细胞癌( TCC)和其它泌尿生殖系统疾病及健康人的尿样,在 TCC 组中检测到 5 种新的 TCC 标记物和 7 种蛋白质簇,并在膀胱癌中也检测到其中的一种称为防御素( alexin)的标记物。Celis 等<sup>[19]</sup>在膀胱癌检测到 4 种与膀胱癌相关的蛋白质:银屑素、银屑病相关脂肪酸结合蛋白、凝胶溶素片断和前列腺素 D2 合成酶。

### 2.5 前列腺癌

Meehan 等<sup>[20]</sup>研究发现,正常表达于前列腺中的 NEDD8, calponin 和 follistatin 相关蛋白在前列腺癌中表达下调或缺失。Senior 等<sup>[21]</sup>用蛋白质芯片技术检测了健康人和前列腺癌患者的血清,仅用 3 d 时间发现了 6 种潜在的前列腺癌的标记物。Alaiya 等<sup>[22]</sup>用 2-DE 和 MS 研究了前列腺癌的蛋白质谱,发现 PCNA、HSP90、HSP60、癌蛋白 18、延长因子-2、SOD 等表达增高,而原肌凝蛋白-1、原肌凝蛋白-2 和细胞角蛋白 18 表达下降。

### 2.6 肾癌

Sarto 等<sup>[23]</sup>研究发现,肾癌组织中缺少辅酶 Q 细胞色素还原酶( ubiquinol cytochrome c reductase)和 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶复合物( NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I)两种蛋白质,而且它们的基因位点都在 19 号染色体,一个是 19p12,一个是 19p13.3。这两种蛋白质可作为肾癌的诊断标记物。

除了以上所述的几种肿瘤外,其它肿瘤如白血病、黑色素瘤、神经母细胞瘤、鼻咽癌等等也都开展了蛋白质组学的研究,并发现了一些新的肿瘤标记物。

## 3 结 语

蛋白质组学在近几年发展迅速,在生命科学的研究中也取得了许多好的成果,显示出强大的应用前景。但它仍存在不足之处,就方法学而言,目前双向电泳和质谱分析仍就是最常用的技术平台,而双向电泳每块胶上通常只能分辨到 3 000 ~ 4 000 个蛋白点,这与人类 10 万个基因表达的蛋白质相比相差甚远。另外在蛋白质样本的制备和鉴定方面也都需要进一步地改进完善。对于肿瘤蛋白质组学,研究人员运用比较蛋白质组学,即对肿瘤组织和正常组织的蛋白质组进行比较来发现两者间的不同,至今已发现多种肿瘤标记物,这对肿瘤的诊断、治疗、监控及肿瘤相关机制的探讨均有重要意义。相信随着技术的不断发展,蛋白质组学将会在肿瘤标记物筛选鉴定中发挥更加重要的作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan D, *et al.* Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues[ J ]. *Nat Med*, 2001, 7(4): 493 ~ 496.
- [ 2 ] Merchant M, Weinberger S. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry [ J ]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1164 ~ 1177.

- [ 3 ] McDonald WH, Yates JR. Shotgun proteomics and biomarker discovery[ J ]. *Dis Markers*, 2002, 18( 2 ): 99-105.
- [ 4 ] Weinberger SR, Dalmasso EA, Fung ET. Current achievements using protein chip array technology[ J ]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6( 1 ): 86-91.
- [ 5 ] Chen G, Gharib TG, Huang CC, *et al.* Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: Identification of a highly expressed set of proteins in tumors[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8( 7 ): 2298-2305.
- [ 6 ] Hirano T, Fujioka K, Franzen B, *et al.* Relationship between TA01 and TA02 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features[ J ]. *Br J Cancer*, 1997, 75( 5 ): 978-985.
- [ 7 ] Brichory F, Beer D, Le Naour F, *et al.* Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 21 ): 7908-7912.
- [ 8 ] Sauter ER, Zhu W, Fan XJ, *et al.* Proteomic analysis of nipple aspirate fluid to detect biologic markers of breast cancer[ J ]. *Br J Cancer*, 2002, 86( 9 ): 1440-1443.
- [ 9 ] Luftner D, Possinger K. Nuclear matrix proteins as biomarkers for breast cancer[ J ]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002, 2( 1 ): 23-31.
- [ 10 ] Franzen B, Linder S, Alaiya A, *et al.* Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions[ J ]. *Electrophoresis*, 1997, 18( 3 ~ 4 ): 582-587.
- [ 11 ] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[ J ]. *Clin Chem*, 2002, 48( 8 ): 1296-1304.
- [ 12 ] Williams K, Chubb C, Huberman E, *et al.* Analysis of differential protein expression in normal and neoplastic human breast epithelial cell lines[ J ]. *Electrophoresis*, 1998, 19( 2 ): 333-343.
- [ 13 ] Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Le-Bourhis X, *et al.* Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 1 ): 76-80.
- [ 14 ] Stulik M, Koupilova K, Osterreicher J, *et al.* Protein abundance alteration in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma[ J ]. *Electrophoresis*, 1999, 20( 18 ): 3638-3646.
- [ 15 ] Ji H, Moritz RL, Reid GE, *et al.* Electrophoretic analysis of the novel antigen for the gastrointestinal-specific monoclonal antibody A33[ J ]. *Electrophoresis*, 1997, 18( 3 ~ 4 ): 614-621.
- [ 16 ] Ji H, Reid GE, Moritz RL, *et al.* A two-dimensional gel database of human colon carcinoma protein[ J ]. *Electrophoresis*, 1997, 18( 3 ~ 4 ): 605-613.
- [ 17 ] Jungblunt PR, Zimny AU, Zeindl EE, *et al.* Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases[ J ]. *Electrophoresis*, 1999, 20( 10 ): 2100-2110.
- [ 18 ] Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinou S, *et al.* Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine[ J ]. *Am J Pathol*, 2001, 158( 4 ): 1491-1502.
- [ 19 ] Celis JE, Wolf H, Ostergaard M, *et al.* Bladder squamous cell carcinoma biomarkers derived from proteomics[ J ]. *Electrophoresis*, 2000, 21( 11 ): 2115-2121.
- [ 20 ] Meehan KL, Holland JW, Dawkins HJ. Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer[ J ]. *Prostate*, 2002, 50( 1 ): 54-63.
- [ 21 ] Senior K. Fingerprinting disease with protein chip arrays[ J ]. *Mol Med Today*, 1999, 5( 8 ): 326.
- [ 22 ] Alaiya A, Franzen B, Auer G, *et al.* Cancer proteomics: From identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification[ J ]. *Electrophoresis*, 2000, 21( 6 ): 1210-1217.
- [ 23 ] Sarto C, Deon C, Doro G, *et al.* Contribution of proteomics to the molecular analysis of renal cell carcinoma with an emphasis on manganese superoxide dismutase[ J ]. *Proteomics*, 2001, 1: 1288-1294.

[ 收稿日期 ] 2003 - 04 - 25

[ 修回日期 ] 2003 - 06 - 15

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》创刊于1994年,经国家科委和国家新闻出版署正式批准,由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家正式医学期刊(刊号为CN31-1725/R)。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要刊登与肿瘤生物治疗有关的基础理论与临床的研究论文、新实验技术及其研究成果等。《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价:8.00元,全年定价:32.00元,邮发代号:4-576,请通过邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将40.00元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码,本刊编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址:上海市翔殷路800号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人:厉永建

邮政编码:200433

联系电话:021-55620605×22; 021-25070316×22