

## 抗体芯片筛选上皮性卵巢癌组织的差异表达蛋白

陈 飞, 杨佳欣, 吴 鸣, 沈 铿

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院妇产科, 北京 100730

通信作者: 沈铿 电话: 010-65296218, 电子邮件: shenkeng@vip.com.cn

**摘要:** **目的** 采用蛋白抗体芯片筛查上皮性卵巢癌的差异表达蛋白。**方法** 选取 11 例卵巢上皮性癌混合样品及其配对的正常卵巢组织混合样品, 经 Cy3 和 Cy5 双色荧光标记后与含有 512 种已知蛋白质的单克隆抗体芯片杂交, 根据杂交荧光信号强度计算内源标准化信噪比 (INR), 以  $INR > 2.0$  或  $< 0.7$  为临界值, 筛选出卵巢癌与正常卵巢组织间的差异表达蛋白群。**结果** 发现 31 个正常卵巢与卵巢癌组织间明显差异表达的蛋白质, 多数参与了细胞的转录、增殖、信号传导和凋亡等过程, 其中 17 个为高表达, 14 个为低表达。**结论** 卵巢癌的发生发展是一系列分子变化累积的结果, 涉及到多个分子和信号通路的异常改变。

**关键词:** 抗体芯片; 卵巢上皮性癌; 差异表达蛋白

**中图分类号:** R711.75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2009)03-0378-03

**DOI:** 10.3881/j.issn.1000-503X.2009.03.031

### Differentially Expressed Proteins between Normal Ovaries and Ovarian Cancer Tissues Screened by the Protein Chips

CHEN Fei, YANG Jia-xin, WU Ming, SHEN Keng

Department of Obstetrics and Gynecology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: SHEN Keng Tel: 010-65296218, E-mail: shenkeng@vip.com.cn

**ABSTRACT: Objective** To explore the differentially expressed proteins between normal ovaries and ovarian cancer tissues using the protein chips. **Methods** Tissues of 11 epithelial ovarian cancer (EOC) and 11 matched normal ovaries were labeled with cy3 and cy5 fluorescent dyes and then were hybridized with 512 monoclonal protein antibody chips. The internally normalized ratio (INR) was calculated according to the intensity of fluorescence of each protein spots. The value of  $INR > 2.0$  or  $< 0.7$  was considered as the cut-value to filtrate the differentially expressed proteins between tissues of EOC and normal ovaries. **Results** Thirty one differentially expressed proteins were found between tissues of EOC and normal ovaries, in which 17 up-regulated and 14 down-regulated proteins involved in the transcription, proliferation, signal conduction, and apoptosis of cells. **Conclusion** Antibody chips can effectively screen the differentially expressed proteins between normal ovaries and ovarian cancer tissues.

**Key words:** protein chips; epithelial ovarian cancer; differentially expressed proteins

*Acta Acad Med Sin*, 2009, 31(3):378-380

卵巢癌发生是一个多基因参与, 涉及多步骤、多阶段控制的复杂生物学过程<sup>[1]</sup>。在非疾病状态转变为肿瘤过程中, 细胞内会发生一系列蛋白表达

变化, 采用蛋白质组分析技术有助于认识肿瘤发生机理, 加快对肿瘤标志分子及治疗靶标的寻找速度。高效、快捷和高通量的蛋白质芯片为开展肿瘤蛋白

质组学研究提供了强有力的技术平台, 抗体芯片是其中主要类型, 也是发展最快的芯片, 技术上已经日益成熟, 能够在一次实验中平行高通量地比较几百种细胞中重要功能蛋白质的表达变化。本研究采用蛋白抗体芯片技术筛查了上皮性卵巢癌的差异表达蛋白, 以期从细胞整体水平上显示卵巢癌发生、发展过程中的蛋白表达谱变化。

## 材料和方法

**标本来源及取材** 2005年3月~10月在北京协和医院妇产科接受肿瘤细胞减灭术治疗的11例卵巢癌初治患者, 中位年龄53岁(31~69岁); 其中浆乳癌4例, 黏液癌1例, 内膜样癌1例, 透明细胞癌3例, 腺癌2例; FIGO分期IIc期1例, IIIc期9例, IVa期1例。同期在北京协和医院妇产科接受手术治疗的11例妇科良性肿瘤患者(对照组), 与研究组患者的年龄和体重等相匹配。手术切下标本后在5 min内取材, 用4℃预冷的1×PBS(pH7.4)清洗后置于液氮中速冻后, -80℃保存。

**方法** 采用美国BD Clontech公司的BD Clontech™ 500抗体(Catalog No. 631790, Lot No. 5100646), 每张芯片包含1024个点, 共包含512个抗体, 其中每个抗体在芯片上有2个点。将11例卵巢癌组织及其配对的正常卵巢组织标本制成混合样品后分别使用Cy5和Cy3两种荧光染料进行双向标记, 与2张同样包含512个抗体的蛋白芯片进行杂交, 使用GenePix 4000B扫描仪扫描。根据两张平行杂交抗体芯片所获得的荧光数据, 采用GenePix Pro4.0软件提取数据并进行均一化处理, 计算两张芯片对应点的内源标准化信噪比(internally normalized ratio, INR), 以INR>2.0或<0.7为临界值, 筛选出卵巢癌与正常卵巢组织间的差异表达蛋白群。

## 结果

共发现31种差异明显的蛋白质, 其中17种在卵巢癌组织中为高表达, 分别为ARNT、LCK、MAPK1、TGFβ1、RAP1A、TP53、TP73、KCNMA1、CYBB、RANBP3、SEMA4D、EIF5、STXBP5、SRP54、PSME3、IL5和G3BP; 14种在卵巢癌组织中为低表达, 分别为ARHGDI B、CSK、BUB3、STK24、PLEK、BTF、FADD、FP37、cholinergic re-

ceptor、HMOX1、PEX1、UBE2E1、MYO5B和SIP1。

## 讨论

本研究发现了17种在卵巢癌组织中为高表达的蛋白, 其中与细胞信号传导相关的转录蛋白为ARNT、LCK、MAPK1和TGFβ1, 属于抑癌基因的蛋白产物为RAP1A、TP53和TP73, 与运输、传导相关的蛋白质为KCNMA1、CYBB、RANBP3和SEMA4D, 参与细胞内蛋白质生物合成、降解和转运的蛋白质为EIF5、STXBP5、SRP54和PSME3, 与凋亡以及细胞周期调控相关的蛋白质为IL5和G3BP。RAP1A定位于在常染色体1p12~p13, 是原癌基因*ras*超家族成员之一, 该家族许多成员具有相近的作用, 在多种肿瘤中有较高的突变。*p53*基因是迄今为止发现的最常见的抑癌基因, 约50%以上的人类肿瘤与*p53*基因突变有关。多项研究结果显示, *p53*在卵巢恶性肿瘤中呈现高表达状态<sup>[2-6]</sup>, 与本研究结果一致, 表明*p53*基因突变在卵巢癌中是一普遍现象, 可作为判断卵巢良、恶性肿瘤的指标之一。*p73*基因是*p53*基因家族新成员, 但与*p53*基因的功能有明显不同。本研究结果显示*p73*和*p53*蛋白同时高表达, 推测可能是*p53*功能丧失导致替代性或损伤性*p73*蛋白表达上调所致。

此外本研究还发现了14种在卵巢癌组织中为低表达的蛋白质, 其中与细胞周期调控或细胞内信号传导相关的蛋白激酶或磷酸酶为ARHGDI B、CSK、BUB3、STK24和PLEK, 与凋亡相关的转录调控蛋白为BTF、FADD和ZFP37, 与发育相关的蛋白质为cholinergic receptor、HMOX1和PEX1, 与细胞内新陈代谢相关的蛋白质为UBE2E1和MYO5B, 与RNA结合相关的蛋白质为SIP1。

综上所述, 本研究采用第二代蛋白抗体芯片技术对卵巢癌组织进行了比较蛋白质组学研究, 共筛选出31个卵巢癌与正常卵巢组织间差异表达的蛋白质, 其中多数参与了细胞的转录、增殖、信号传导和凋亡等重要的生物过程, 提示卵巢癌的致癌过程不是某个基因或蛋白独立完成, 其发生发展是一系列分子变化累积的结果, 涉及到多个分子和信号通路的异常改变。

## 参考文献

[1] Baggerly KA, Morris JS, Edmonson SR, et al. Signal in

- noise: evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(4):307-309.
- [2] Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, *et al.* Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132(8):521-528.
- [3] Lassus H, Sihto H, Leminen A, *et al.* Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma [J]. *J Mol Med*, 2006, 84(8):671-681.
- [4] Santos AM, Sousa H, Pinto D, *et al.* Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(7):958-963.
- [5] Gomes CP, Andrade LA. PTEN and p53 expression in primary ovarian carcinomas: immunohistochemical study and discussion of pathogenetic mechanisms [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(Suppl1):254-258.
- [6] Goodell V, Salazar LG, Urban N, *et al.* Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(5):762-768.

(2009-04-03 收稿)