

文章编号:1000-5404(2012)18-1835-04

论著

利用2DE-MS技术筛选和鉴定大肠癌血清标志物

何渝军^{1,2}, 牟芝蓉², 黎万玲², 刘宝华¹, 吴玉章² (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科¹; 400038 重庆, 第三军医大学基础部全军免疫学研究所²)

[摘要] 目的 利用2DE-MS技术对大肠癌患者血清和正常人血清蛋白进行比较分析, 筛选和鉴定差异蛋白。方法 收集正常人($n=10$)和结肠癌患者($n=15$)术前血清, 进行去除白蛋白和免疫球蛋白及脱盐浓缩预处理, 应用2DE-PAGE分离处理后血清蛋白, 比较两者的差异蛋白质点, 采用MALDI-TOF分析鉴定差异蛋白质。结果 血清经预处理后, 可提高样品的上样量, 2DE-PAGE图谱的蛋白质点数明显增加, 水平条带明显减少。大肠癌患者血清中共筛选2个差异的蛋白点, 经质谱鉴定为转甲状腺素蛋白(transferrin, TTR)和细胞角蛋白1(cytokeratin-1, CK-1)。其中TTR在大肠癌患者血清中为低表达, 而CK-1为高表达。大肠癌患者血清中TTR含量为(245.87 ± 60.72) mg/L, 明显低于大肠腺瘤组和正常血清组[分别为(299.53 ± 67.91)、(311.31 ± 67.01) mg/L, $P < 0.01$]。结论 2DE-MS技术是筛选和鉴定疾病血清标志物的良好工具, TTR可能是大肠癌潜在的血清标志物。

[关键词] 大肠癌; 蛋白质组学; 二维电泳; 血清标志物

[中图分类号] R446; R730.43; R735.34

[文献标志码] A

Screening and identification of serum markers of colorectal cancer by two-dimensional electrophoresis mass spectrometry

He Yujun^{1,2}, Mou Zhirong², Li Wanling², Liu Baohua¹, Wu Yuzhang² (¹Department of General Surgery, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Institute of Immunology College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To screen the differentially expressed proteins and peptides in the serum of patients with colorectal cancer (CRC) using two-dimensional electrophoresis mass spectrometry (2DE-MS). **Methods** Serum samples were obtained from 15 CRC patients (CRC group) before operation and 10 healthy volunteers (control group), and then pretreated for removing albumins and immunoglobulins and desalting. The differentially expressed protein spots were observed by comparing 2DE-PAGE gel maps between the CRC group and control group, and were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. **Results** Compared with that of the serum samples without pretreatment, the volume of the pretreated serum samples increased, and more protein spots were detected. The comparison of the 2DE-PAGE gel maps between the CRC group and control group showed two differentially expressed protein spots, which were identified as transferrin (TTR) and cytokeratin-1 (CK-1) by MS. TTR was lowly expressed and CK-1 was highly expressed in the serum of the CRC group. The serum level of TTR in the CRC group (245.87 ± 60.72 mg/L) was significantly lower than that in the colorectal adenoma group (299.53 ± 67.91 mg/L) and control group (311.31 ± 67.01 mg/L) ($P < 0.01$). **Conclusion** 2DE-MS is a useful tool for screening and identifying disease serum markers. TTR may be a potential serum marker of CRC.

[Key words] colorectal cancer; proteomics; two-dimensional electrophoresis; serum biomarker

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5032). Corresponding author: Wu Yuzhang, Tel: 86-23-68755235, E-mail: wuyuzhang@yahoo.com; Liu Baohua, Tel: 86-23-68757956, E-mail: lbh57168@163.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5032)

[通信作者] 吴玉章, 电话: (023)68755235, E-mail: wuyuzhang@yahoo.com

刘宝华, 电话: (023)68757956, E-mail: lbh57168@163.com

筛选和鉴定用于早期诊断和监测肿瘤复发转移的肿瘤标志物一直是肿瘤防治研究的一个热点,而蛋白质组学技术为肿瘤标志物的筛选提供了新的希望^[1-3]。在肿瘤的发生、发展过程中,机体分泌的一些关键蛋白在血清中可能存在量和质的变化。利用蛋白质组学技术能够对血清全蛋白质进行分析和鉴定,有助于了解肿瘤发生、发展过程中血清蛋白质组的变化,比较肿瘤患者与正常人血清蛋白的差异,有望从中筛选出新的可作为肿瘤诊断及预后判断的标志物。本实验收集大肠癌患者血清,首先去除血清中高丰度的白蛋白和免疫球蛋白,然后利用2DE-MS技术对大肠癌患者和正常人血清蛋白进行比较分析,从中筛选出2个差异蛋白质点,经质谱鉴定为转甲状腺素蛋白(transferrin, TTR)和细胞角蛋白1(cytokeratin-1, CK-1),进一步采用免疫透射比浊法对大肠癌、大肠腺瘤患者和正常人血清中TTR的含量进行检测,以筛选和鉴定新的大肠癌血清肿瘤标志物。

1 资料与方法

1.1 实验材料

收集我院2005年2月至2006年2月15例大肠癌患者术前血清标本,10例正常人血清。另收集90例血清标本用于筛选出的血清标志物的验证实验,包括15例正常人血清,15例大肠腺瘤患者血清,60例大肠癌患者血清(表1),-70℃冰箱保存。大肠癌患者均经病理学检查证实,大肠癌分化程度和Dukes'分期参照2002年《全国大肠癌病理研究统一规范》,各组间性别、年龄、肿瘤部位及临床分期均无统计学差异。

表1 血清标本的临床资料

| 组别 | n | 性别(男/女) | 平均年龄(岁) |
|------|----|---------|---------|
| 筛选实验 | | | |
| 正常 | 10 | 6/4 | 43.8 |
| 大肠癌 | 15 | 9/6 | 52.6 |
| 验证实验 | | | |
| 正常 | 15 | 9/6 | 45.6 |
| 大肠腺瘤 | 15 | 5/10 | 47.1 |
| 大肠癌 | 60 | 36/24 | 57.3 |

1.2 主要试剂

Aurum™ Serum Protein Mini Kit购自Bio-Rad公司,二维电泳试剂和IPG胶条均购自Amersham Pharmacia Biotech公司,TTR检测试剂盒购自四川省迈克科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血清标本的预处理 大肠癌患者和正常人血清每例各取40 μl,按5例为1组进行混合,分装后置-70℃冻存。按照 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 试剂盒说明书操作去除血清

中白蛋白和免疫球蛋白。处理后的血清样品采用YM-3K超滤管进行除盐和浓缩。配制8%分离胶溶液和5%积层胶溶液,将血清样品煮沸5 min后加样,上样量为100 μg。电泳分离,考马斯亮蓝染色。

1.3.2 2DE-PAGE和图像分析 血清样品上样量为60 μg/250 μl,IPG胶条为13 cm(pH 3~10)。IEF总电压-时间积(total Volt-hours, Vh)为40 000~45 000 Vh。采用质谱兼容的改良银染法染色^[4]。利用GS-800图像分析系统对二维电泳凝胶扫描,利用PDQuest 7.0软件(Bio-Rad)进行凝胶图像分析。用蛋白点的相对强度百分比进行组间比较,升高或降低5倍以上的点被确定为差异蛋白点。

1.3.3 MALDI-TOF质谱鉴定 将酶切好的样品送北京华大基因组公司,采用MALDI-TOF质谱的方法分析鉴定。

1.3.4 血清TTR水平检测 采用免疫透射比浊法检测,具体按说明书使用方法进行操作,使用LX20全自动生化分析仪上样检测。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 血清标本的预处理

血清经 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 试剂盒及脱盐和浓缩处理后,可明显去除大量的白蛋白和免疫球蛋白,提高血清样品的上样量。2D-PAGE图谱的蛋白质点数由262增加到338个,白蛋白和免疫球蛋白对其他蛋白点显示的影响明显下降,水平条带明显减少,见图1。

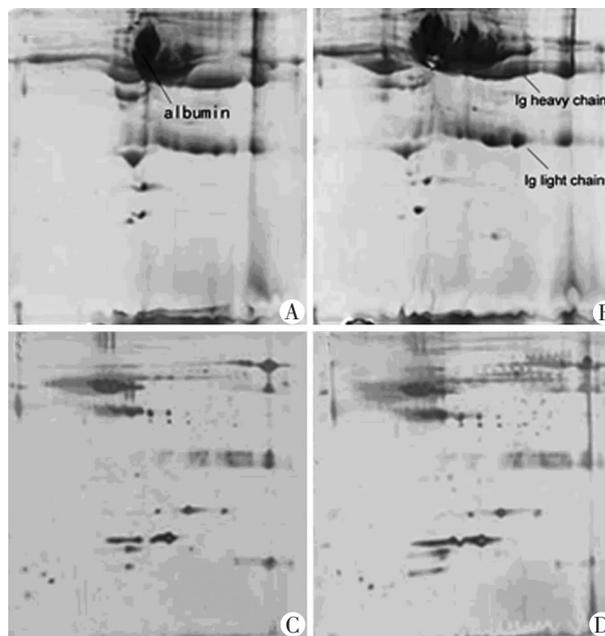
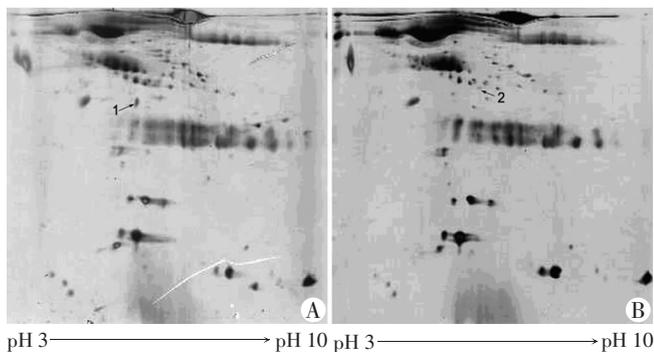


图1 各血清标本预处理前后2DE-PAGE图谱
A:未预处理正常血清;B:未预处理大肠癌患者血清;C:预处理后正常血清;D:预处理后大肠癌患者血清

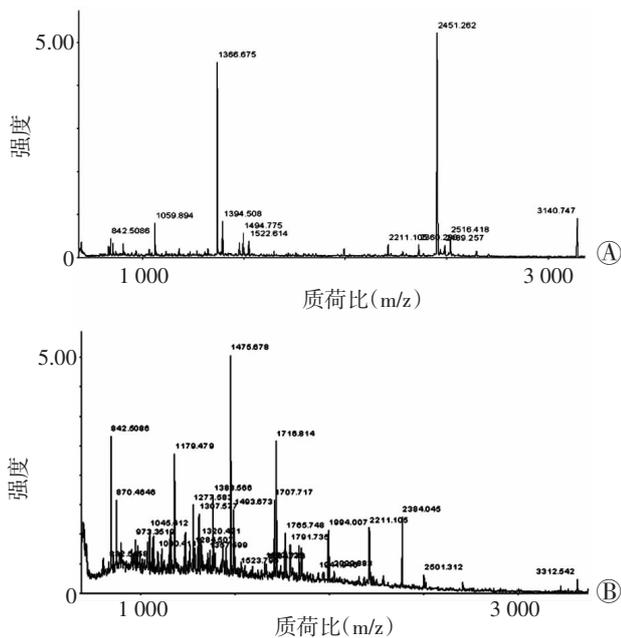
图1 各血清标本预处理前后2DE-PAGE图谱

2.2 差异蛋白的质谱鉴定

血清经预处理后进行2DE-PAGE分析,与正常血清2DE-PAGE图谱比较,大肠癌患者血清2DE-PAGE图谱中共有2个差异的蛋白点(图2)。差异蛋白点经MALDI-TOF质谱鉴定,采用数据库搜索,共鉴定出2个蛋白。差异蛋白点1为转甲状腺素蛋白B链(Chain B, Human Transthyretin, TTR),差异蛋白点2为细胞角蛋白1(cytokeratin-1, CK-1),其中TTR在大肠癌患者血清中低表达,而CK-1为高表达(图3)。



A: 正常血清; B: 大肠癌患者血清; 1, 2: 差异蛋白点
图2 正常血清和结肠癌患者血清2DE-PAGE图谱



A: 转甲状腺素蛋白B链; B: 细胞角蛋白1
图3 大肠癌患者血清差异蛋白点的MALDI-TOF质谱鉴定

2.3 血清TTR检测

免疫透射比浊法检测显示:大肠癌患者血清中TTR含量明显低于大肠腺瘤组和正常血清组($P < 0.01$),正常血清组与大肠腺瘤组无显著性差异($P > 0.05$,表2)。Dukes' C期和D期大肠癌患者血清TTR含量明显低于Dukes' A期患者($P < 0.05$, $P < 0.01$,表3),其中5例大肠癌伴有肝脏转移患者血清

TTR含量明显降低,仅为(172.54 ± 36.36)mg/L。TTR水平与大肠癌患者年龄、性别及分化程度无显著性关系。

表2 大肠肿瘤患者血清和正常血清TTR水平的比较

| 组别 | n | TTR含量(mg/L) |
|------|----|-----------------------------|
| 正常血清 | 15 | 311.31 ± 67.01 |
| 大肠腺瘤 | 15 | 299.53 ± 67.91 |
| 大肠癌 | 60 | 245.87 ± 60.72 ^a |

a: $P < 0.01$,与正常血清和结肠腺瘤比较

表3 大肠癌患者血清TTR含量与临床病理因素间的关系

| 组别 | n | TTR含量(mg/L) |
|----------|----|-----------------------------|
| 分化程度 | | |
| 高分化 | 25 | 253.64 ± 52.87 |
| 中分化 | 19 | 231.71 ± 59.51 |
| 低分化 | 16 | 242.43 ± 60.90 |
| Dukes'分期 | | |
| A期 | 5 | 304.48 ± 54.34 |
| B期 | 13 | 270.98 ± 64.49 |
| C期 | 33 | 248.39 ± 49.93 ^b |
| D期 | 9 | 209.09 ± 50.28 ^a |

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$,与Dukes' A期比较

3 讨论

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居肿瘤的前3位^[5]。尽管目前采用了手术、化疗、放疗等多种治疗方法,但治疗效果仍不尽理想。早期诊断和有效治疗是提高大肠癌治疗效果的关键,而有效的肿瘤标志物对大肠癌早期诊断和预后监测具有十分重要的意义^[6]。随着蛋白质组学技术的出现和发展为肿瘤标志物的筛选提供了新的希望,利用该技术可以对肿瘤患者组织及体液标本中蛋白质表达差异进行比较,从中可寻找出一些有效的标志物蛋白^[1-3]。蛋白质组学技术能够对血清全蛋白质进行分析和鉴定,比较肿瘤患者血清与正常人血清之间的蛋白质表达、表达数量和修饰状态上的差异,有望筛选出新的、可作为肿瘤诊断及预后判断的标志物和临床药物作用的靶蛋白。但目前血清蛋白质组分析还存在许多需要解决的问题,首先是要排除血清中一些高丰度蛋白对低丰度蛋白检测的影响。血清蛋白成分十分复杂,而其中一些高丰度的蛋白会影响低丰度蛋白检测。高丰度蛋白主要包括白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白等,其占到血清总蛋白的60%~97%,而在仅占1%的低丰度蛋白中却潜在许多可作为疾病相关标志物的蛋白质^[7-8]。本研究采用Aurum™ Serum Protein Mini Kit试剂盒对血清进行预处理,同时对处理后样品进行脱盐和浓缩处理,结果显示可明显去除大量的白蛋白和

免疫球蛋白等,提高血清样品的上样量,增加 2DE-PAGE 检测的蛋白质点数量,水平条带明显减少。

本研究利用 2DE-MS 技术对大肠癌患者血清和正常人血清蛋白进行比较分析,从中筛选出 2 个差异蛋白质点,经 MALDI-TOF 质谱鉴定分别为 TTR 和 CK-1,其中 TTR 在大肠癌患者血清中为低表达,而 CK-1 为高表达。TTR 是主要在肝细胞合成的一种血清蛋白质,相对分子质量为 55×10^3 ,由 4 个相同的亚单位组成,其主要的生理功能是在体内运输甲状腺素和维生素 A。Zhang 等^[9]应用蛋白质组学技术在卵巢癌患者血清中鉴定了 3 个标志物,分别为 apolipoprotein A1、TTR 和 inter-trypsin inhibitor heavy chain H4,进一步检测发现在卵巢癌和结肠癌患者血清中 TTR 水平明显低于正常人血清。研究^[10]发现 TTR、apolipoprotein A1 等与 CA125 相结合可提高早期卵巢癌检测的敏感性。Goufman 等^[11]应用 2DE/MALDI-TOF 技术研究发现,在卵巢癌患者血清中 TTR 水平明显下降。同样在肺癌患者的血清中也发现 TTR 表达明显降低^[12]。我们采用免疫透射比浊法对患者血清 TTR 进行进一步验证,结果发现大肠癌患者血清中 TTR 含量明显低于大肠腺瘤组和正常血清组。血清 TTR 水平与大肠癌临床 Dukes' 分期有关,Dukes' C 期和 D 期大肠癌患者血清 TTR 含量明显低于 Dukes' A 期患者,而且在伴有肝脏转移的晚期大肠癌患者中血清 TTR 含量明显降低。目前关于血清 TTR 在肿瘤患者中降低的具体机制尚不清楚,我们推测可能与肿瘤患者肝脏功能和机体蛋白质代谢异常导致肝脏合成 TTR 减少有关,同时可能与患者炎症、应激反应及营养状态有关。CK 是构成细胞骨架中间丝状体的主要家族之一,广泛存在于上皮来源的细胞中。恶性肿瘤细胞通常保持其前期细胞类型的中间丝,因此不同的 CK 可在多种不同的上皮源性肿瘤细胞中存在异常表达,同时部分 CK 小片段可以渗透入血液,而且由于肿瘤引起细胞骨架重建,也可导致部分 CK 入血,因而在多种肿瘤患者血液中 CK 浓度增加^[13]。目前细胞角蛋白不仅是区分腺癌、鳞状细胞癌和移行细胞癌的重要指标,也是上皮来源恶性肿瘤患者疗效及预后监测的指标之一^[14]。

总之,2DE-MS 技术是筛选和鉴定疾病相关血清标志物的良好工具,它可以为大肠癌等多种疾病的诊断提供更多潜在的血清标志物。本研究通过 2DE-MS 技术对大肠癌患者血清进行了分析,发现了 TTR 和 CK-1 2 个差异表达的蛋白质,并对 TTR 进行了进一步验证,结果提示 TTR 可能是大肠癌潜在的血清标志

物,但其临床应用价值有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘国红,杨继要,呼琳,等.人胃贲门腺癌组织和正常胃黏膜组织蛋白质组双向电泳图谱的差异分析[J].第三军医大学学报,2009,31(17):1712-1713.
- [2] Umemura H, Togawa A, Sogawa K, et al. Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(5): 577-585.
- [3] 张磊,杨闯,王颖,等.高效液相色谱-质谱法在筛选胆管癌肿瘤标志物中的应用[J].第三军医大学学报,2011,33(10):1028-1031.
- [4] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels [J]. Anal Chem, 1996, 68(5): 850-858.
- [5] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [6] 龙驰,胡义德,曹正怀.血清多肿瘤标志物蛋白芯片检测结果在结直肠癌诊断中的价值[J].第三军医大学学报,2012,34(1):13-15.
- [7] Tirumalai R S, Chan K C, Prieto D A, et al. Characterization of the low molecular weight human serum proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2(10): 1096-1103.
- [8] Gundry R L, White M Y, Nogue J, et al. Assessment of albumin removal from an immunoaffinity spin column: critical implications for proteomic examination of the albuminome and albumin-depleted samples [J]. Proteomics, 2009, 9(7): 2021-2028.
- [9] Zhang Z, Bast R C Jr, Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2004, 64(16): 5882-5890.
- [10] Clarke C H, Yip C, Badgwell D, et al. Proteomic biomarkers apolipoprotein A1, truncated transthyretin and connective tissue activating protein III enhance the sensitivity of CA125 for detecting early stage epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(3): 548-553.
- [11] Goufman E I, Moshkovskii S A, Tikhonova O V, et al. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions [J]. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(4): 354-360.
- [12] Liu L, Liu J, Dai S, et al. Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer [J]. Cancer Sci, 2007, 98(10): 1617-1624.
- [13] Chu P G, Weiss L M. Keratin expression in human tissues and neoplasms [J]. Histopathology, 2002, 40(5): 403-439.
- [14] Kawabata Y, Tanaka T, Nishisaka T, et al. Cytokeratin 20 (CK20) and apomucin 1 (MUC1) expression in ampullary carcinoma: Correlation with tumor progression and prognosis [J]. Diagn Pathol, 2010, 5: 75.

(收稿:2012-02-29;修回:2012-03-30)

(编辑 龙 亮)