

双向电泳-质谱技术筛选肝癌血清标记物*

冯钜涛¹⁾ 刘银坤¹⁾ MOHAMAD RADWAN ALMOFTI²⁾ 代智¹⁾

周海君¹⁾ 宋海燕¹⁾ 陆豪杰²⁾ 汤钊猷^{1)**}

(¹⁾复旦大学中山医院肝癌研究所, 上海 200032; ²⁾复旦大学蛋白质组研究中心, 上海 200032)

摘要 采用双向电泳-质谱技术筛选肝癌特异的血清蛋白标记物, 以利于肝癌的早期诊断和治疗. 肝癌、肝炎和正常三组各 20 例血清先采用超声、高丰度蛋白去除、脱盐预处理以优化双向电泳, 图像分析三组血清图谱寻找差异点, 基质辅助激光解吸飞行时间质谱对差异点进行鉴定. 结果显示, 通过样品预处理, 血清上样体积平均增加 3~4 倍, 参考胶点数由 218 个增至 332 个, 白蛋白和免疫球蛋白明显减弱, 水平条带明显减少. 图谱比较所得 37 个差异点, 经鉴定为 7 种蛋白. 与正常组比较, 转铁蛋白、甲状腺素运载蛋白在肝炎和肝癌组低表达, α -1 抗胰蛋白酶、凝聚素、铜蓝蛋白、触珠蛋白在肝炎和肝癌组均高表达. α -1 抗胰蛋白酶在肝癌组较肝炎组高表达, 而热休克蛋白 27 只在肝癌组表达. 上述结果提示, 双向电泳-质谱技术可发现肝癌发生发展过程中血清蛋白表达谱质的变化, 从而为肝癌的早期诊断及治疗奠定基础.

关键词 肝癌, 蛋白质组学, 急性反应蛋白, 热休克蛋白

学科分类号 Q51

我国是肝癌大国, 肝癌病死率占恶性肿瘤病死率第二位, 占全球肝癌死亡人数的 53%^[1]. 其主要原因是我国较高的乙肝感染率, 而甲胎蛋白等传统肝癌血清标记物在筛选有乙肝背景下的肝癌时特异性和灵敏性均不高, 现急需筛选新的血清标记物以利于早期诊断肝癌. 蛋白质组学是后基因组时代生物学研究新的方向, 本研究拟采用蛋白质组学的双向电泳-质谱技术筛选用于肝癌早期诊断及预后判断的蛋白质标记物, 同时也为进一步治疗提供靶标参考.

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌、肝炎和正常血清三组各 20 例均来自上海复旦大学附属中山医院肝癌研究所标本库. 所有血清均来自 40 岁以上中国男性, 病人血清均采于治疗前. 丙烯酰胺、N, N-甲叉双丙烯酰胺、硫脲、十二烷基磺酸钠、蛋白 G 琼脂糖购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺购自 Fluka 公司; 测序级胰蛋白酶购自 Roche 公司; MontageTM 白蛋白去除试剂盒和 YM-3 超滤器购自 Millipore 公司; Tris 碱、尿素、CHAPS、二硫苏糖醇、过硫酸铵、TEMED 等试剂和固相 pH 梯度胶条(pH3-10NL, 18 cm)、IPGphor 等电聚焦仪、Hoefer SE 600 垂直电泳仪、ImageScanner 光学扫描仪、ImageMaster 2D Elite

4.01c 图像分析软件、Ettan 自动切胶仪均购自 Amersham Biosciences 公司. 4700 Proteomics Analyzer 质谱仪购自 ABI 公司. 其他常用试剂为国产分析纯市售商品.

1.2 方法

1.2.1 血清预处理. 同组血清混合后每组取 30 μ l 用白蛋白去除试剂盒中的平衡液稀释后间断超声 4 次 (15 s / 次), 据说明书操作去除白蛋白后采用 YM-3 超滤器浓缩蛋白质. 浓缩样品 PBS 稀释后与 50 μ l 蛋白 G 琼脂糖 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育以去除 IgG. 再次用 YM-3 超滤器脱盐并浓缩蛋白质. 改良 Bradford 法检测蛋白质浓度, -80 $^{\circ}$ C 分装保存.

1.2.2 双向电泳. 按 Amersham 公司双向电泳手册和 Gorg 等^[2]方法进行. 等电聚焦仪 IPGphor 进行 IPG 胶条水化和聚焦, 蛋白质上样量 700 μ g (350 μ l), 总伏小时 46 kVh. 平衡好的胶条转移至 12.5% 均匀胶上进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 15 mA 恒流 30 min, 再 30 mA 恒流至结束. 凝胶采用质谱兼容银染法染色^[3].

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB510202)和国家自然科学基金资助项目(30170416).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041990, E-mail: zytang@srcap.stc.sh.cn

收稿日期: 2005-02-18, 接受日期: 2005-03-30

1.2.3 图像分析. 染色凝胶采用 LabScan 3.0 软件控制的 ImageScanner 光学扫描仪扫描并储存. ImageMaster 2D Elite 4.01c 软件对凝胶进行强度校正、点检测、背景消减、均一化和匹配等分析. 蛋白质点的相对强度百分比用来进行组间比较, 升高或降低 200% 者被定义为差异点.

1.2.4 蛋白酶解及质谱鉴定. Ettan Spotpicker 自动切胶仪切取差异点并转移至 96 孔板中, 按胶内酶解方法酶解蛋白, 将提取肽段溶于 α - 氰基 - 4 - 羟基肉桂酸基质饱和溶液中心样于不锈钢靶板. 采用 4700 Proteomics Analyzer 进行, 激光波长 355 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 20 ns, 肌球蛋白作外标校正, 每个蛋白质点自动选取 6 个最强肽段峰作串联质谱分析. 所得肽指纹图谱及肽序列采用 Mascot 搜索引擎搜索 NCBI 数据库.

2 结 果

2.1 血清双向电泳图谱的优化

经过样品预处理后, 血清的双向电泳图谱有明显改善(图 1). 血清上样体积平均增加 3~4 倍, 由 9 μ l 增至 30 μ l. 在同等蛋白质上样量的条件下, 处理后的参考胶图谱点数由 218 个点增至 332 个点, 白蛋白和免疫球蛋白明显下降, 水平条带明显减少.

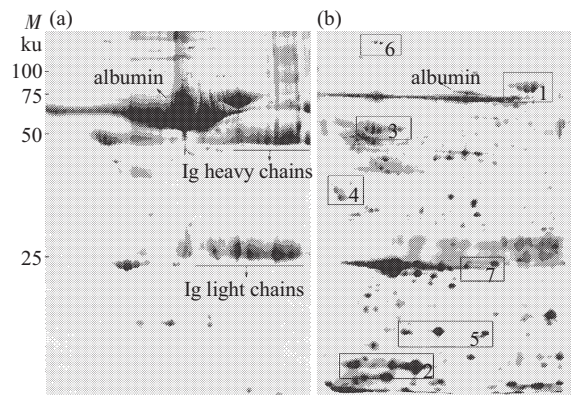


Fig.1 Comparison of the 2-DE map of unpretreated sera (a) and pretreated sera (b) from healthy group with equal protein loading (700 μ g protein)

2.2 差异蛋白点的筛选及鉴定

与正常血清双向电泳图谱比较, 肝癌及肝炎血清图谱共有 37 个差异点(图 2a), 分布于图谱的 7 个不同区域(图 1b), 质谱鉴定证实同一区域内的差异点均为同一蛋白质. 用蛋白质点的相对强度百分比代表蛋白质表达丰度的图谱定量比较发现(图 2b): 与正常组比较, 转铁蛋白、甲状腺素运载蛋白在肝炎和肝癌组低表达, α -1 抗胰蛋白酶、凝集素、铜蓝蛋白、触珠蛋白在肝炎和肝癌组均高表达. α -1 抗胰蛋白酶在肝癌组较肝炎组高表达而热休克蛋白 27 只在肝癌组表达. 7 种差异蛋白的质谱鉴定结果及热休克蛋白 27 的质谱鉴定图谱分别见表 1 和图 3.

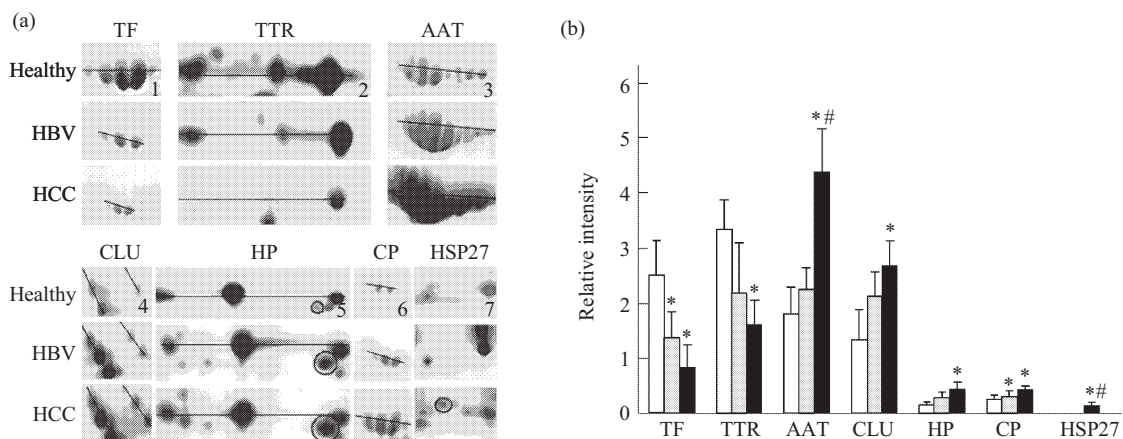


Fig.2 Detailed 2-DE patterns (a) and quantitative comparison (b) of the seven differentially expressed proteins among healthy, HBV and HCC groups

(a) Corresponding gel areas are shown boxed in Figure 1b. (b) Each bar represents the ($\bar{x} \pm s$) of relative intensity and significant differences between groups are found by two-tailed student's test. *: $P < 0.05$, compared to healthy group; #: $P < 0.05$, compared to HBV group.

□: healthy; ▤: HBV; ■: HCC.

Table 1 Identification of the seven differentially expressed proteins among healthy, HBV and HCC groups

Area	Protein name	Accession No.	Protein score	Sequence coverage /%	Experimental M_r (ku)/ pI
1	Transferrin	P02787	64~86	29~43	76.9/6.81
2	Transthyretin	P02766	67~87	55~62	15.8/5.52
3	α 1-antitrypsin	P01009	86~269	34~45	46.7/5.37
4	Clusterin	P10909	74~154	38~47	37.2/4.89
5	Haptoglobin α 2 chain	P00738	55~88	28~38	45.2/6.13
6	Ceruloplasmin	P00450	84~101	36~45	157.2/5.27
7	Heat shock protein 27	P04792	134	41	22.8/5.98

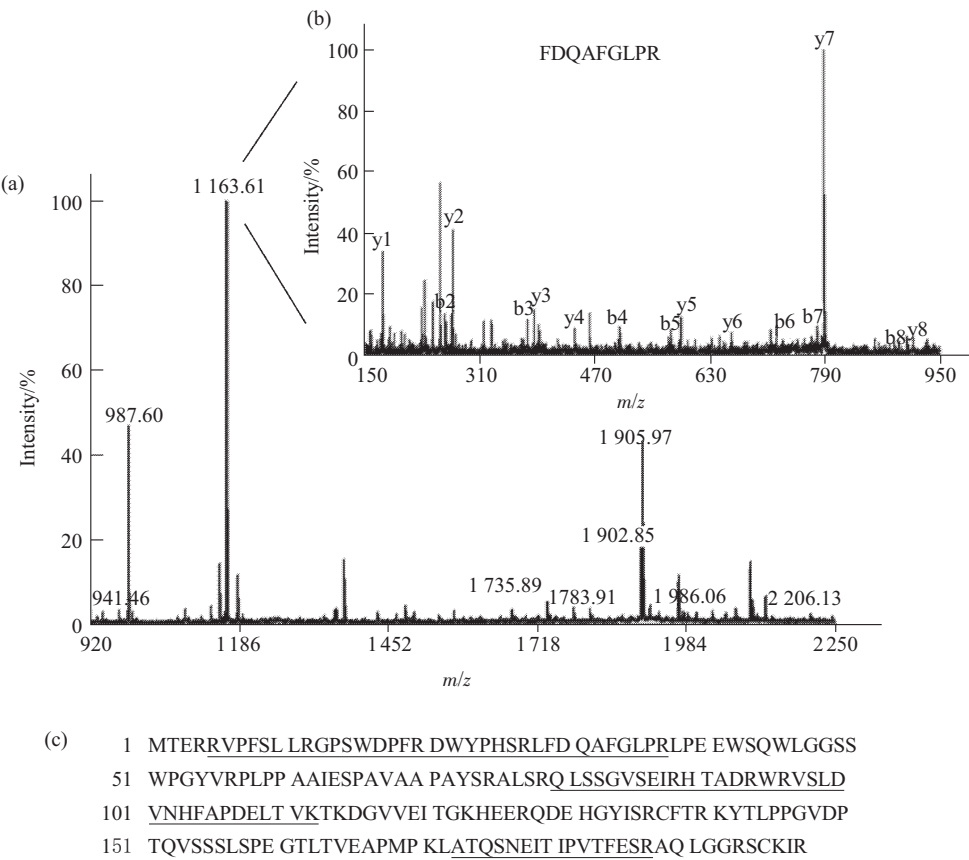


Fig.3 Identification of HSP27 by MALDI-TOF MS/MS

(a) The MALDI-TOF MS map of HSP27 in which matched peptide peaks are labeled out with mass value. (b) The tandem MS spectrum of peptide m/z 1163.61 in which the tryptic peptide sequences were confirmed from the labeled b- and y-ions. (c) The amino acid sequences of HSP27 in which matched peptide sequences are underlined.

3 讨 论

血清中约有 10 000 种蛋白质，血清蛋白表达谱的变化可充分反映机体的生理、病理过程. 然而进行血清的蛋白质组学研究有很多困难，如仅白蛋白和免疫球蛋白就占血清总蛋白的 60%~97%，而可作为疾病潜在标记物的蛋白却不足 1%. 所以去

除血清中的高丰度蛋白是进行血清蛋白表达谱分析的首要关键. 同时，白蛋白和免疫球蛋白又是多种蛋白质的载体^[4]，故本实验在去除白蛋白和免疫球蛋白之前，先通过超声解离可能与其结合的蛋白质或多肽，以尽可能在去除高丰度蛋白的同时保留与其结合的低丰度蛋白. 最后再对样品进行脱盐以减少水平条带，结果明显优化了血清双向电泳图谱.

图像分析发现 37 个蛋白质差异点均匀分布于图谱不同的 7 个区域. 质谱鉴定发现同区域的多数蛋白质点为同一个蛋白质, 这一现象在其他研究中亦有发现, 可能是由于蛋白质的各种翻译后修饰引起蛋白质分子质量及等电点的连续改变^[9]. 7 种差异蛋白质中除热休克蛋白 27 外均是肝脏合成的急性反应蛋白, 这些蛋白质在肝炎和肝癌中的表达变化已有文献报道^[6,7], 其中 α -1 抗胰蛋白酶和凝聚素被认为是肝癌的潜在标记物^[8,9]. 而本实验只发现 α -1 抗胰蛋白酶在肝癌组较肝炎组有明显升高. 所以, 我们推测大部分急性反应蛋白在肝癌或肝炎中的表达变化主要是由于病毒感染、肿瘤坏死及出血等所激发的机体反应, 而 α -1 抗胰蛋白酶则可能与肿瘤组织的直接分泌有关^[10].

热休克蛋白 27 也是一种在多种组织中表达的应激蛋白, 可能参与细胞增生与凋亡、信号转导、雌激素反应和分子伴侣等多种生物过程. 近来, 有报道发现在多种肿瘤组织中存在热休克蛋白 27 的过表达, 且和脑星形细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、恶性纤维瘤、骨肉瘤及肝癌的预后密切相关^[11-15]. 本研究通过双向电泳 - 质谱技术报道热休克蛋白 27 在肝癌血清中高表达, 证实该技术是筛选疾病相关血清标记物的有力工具. 对筛选出的差异蛋白, 尤其是热休克蛋白 27 的验证工作正在进行中, 相信蛋白质组学技术可以为肝癌等疾病的早期诊断提供潜在的血清标记物.

参 考 文 献

- 1 张思维, 李连弟, 鲁凤珠, 等. 中国 1990—1992 年原发性肝癌死亡调查分析. 中华肿瘤杂志, 1999, **21** (4): 245~249
Zhang S W, Li L D, Lu F Z, *et al.* Chin J Oncol, 1999, **21** (4): 245~249
- 2 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 2000, **21** (6): 1037~1053
- 3 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem., 1996, **68** (5): 850~858
- 4 Curry S. Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. Vox Sang, 2002, **83** (Suppl 1): 315~319
- 5 He Q Y, Lau G K, Zhou Y, *et al.* Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study. Proteomics, 2003, **3** (5): 666~674
- 6 Volchkova E V, Pak S G, Malov V A, *et al.* Changes in the levels of acute phase proteins in viral hepatitis. Ter Arkh, 2000, **72** (11): 18~21
- 7 Meliconi R, Parracino O, Facchini A, *et al.* Acute phase proteins in chronic and malignant liver diseases. Liver, 1988, **8** (2): 65~74
- 8 Lee H B, Yoo O J, Ham J S, *et al.* Serum α -1-antitrypsin in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Chim Acta, 1992, **206** (3): 225~300
- 9 Casaril M, Capra F, Marchiori L, *et al.* serum copper and ceruloplasmin in early and in advanced hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic relevance. Tumori, 1989, **75** (5): 498~502
- 10 Turner B M, Turner V S. Secretion of α 1-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. Somatic Cell Genet, 1980, **6** (1): 1~4
- 11 Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, *et al.* Prognostic significance of Hsp-27 in astrocytic brain tumors: an immunohistochemical study. Anticancer Res, 1997, **17** (4A): 2677~2682
- 12 Storm F K, Gilchrist K W, Warner T F, *et al.* Distribution of Hsp-27 and HER-2/neu *in situ* and invasive ductal breast carcinomas. Ann Surg Oncol, 1995, **2** (1): 43~48
- 13 Geisler J P, Geisler H E, Tammela J, *et al.* Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. Gynecol Oncol, 1998, **69** (1): 14~16
- 14 Tetu B, Lacasse B, Bouchard H L, *et al.* Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. Cancer Res, 1992, **52** (8): 2325~2328
- 15 King K L, Li A F, Chau G Y, *et al.* Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. Cancer, 2000, **88** (11): 2464~2470

Screening Serum Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma by Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry*

FENG Ju-Tao¹⁾, LIU Yin-Kun¹⁾, MOHAMAD RADWAN ALMOFTI²⁾,

DAI Zhi¹⁾, SONG Hai-Yan¹⁾, LU Hao-Jie²⁾, TANG Zhao-You^{1)**}

¹⁾ Liver Cancer Institute & Zhong Shan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾ Proteomics Research Center, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To improve the early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC), two-dimensional electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was employed to screen serum biomarkers specific to HCC sera from 20 healthy volunteers, 20 hepatitis B virus (HBV) infected patients and 20 HCC patients were collected. After pretreatment including sonication, albumin and immunoglobulin (IgG) depletion and desalting, sera were subjected to 2-DE and thereafter image analysis. At last, the differentially expressed protein spots were identified by MALDI-TOF-MS. After sera pretreatment, 3~4 times more sera were loaded and more protein spots (332 vs. 218) were detected on reference gel because of the depletion of albumin and IgG. From optimized 2-DE gel images, thirty-seven spots were differentially expressed and identified by MALDI-TOF-MS to be seven proteins. Overall, tranferrin and transthyretin were under expressed and α -1 antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and clusterin were over expressed in HBV infection and HCC group compared to healthy group. Only a significant overexpression of α -1 antitrypsin in HCC group was revealed compared to HBV group and heat shock protein 27 expressed significantly and constantly only in HCC group. Thus, 2-DE based serum proteome analysis can be useful in detecting protein expression alteration which resulted from the carcinogenesis and development of HCC, and new discovered biomarkers might be an aid in the diagnosis of HCC though further validation is needed.

Key words hepatoma, proteomics, acute phase proteins, heat shock protein

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic of China (001CB510202) and The National Natural Sciences Foundation of China (30170416).

**Corresponding author . Tel: 86-21-64041990, E-mail: zytang@srcap.stc.sh.cn

Received: February 18, 2005 Accepted: March 30, 2005