

肺鳞癌患者与健康人血清的差异蛋白质组学研究*

聂贇娟^{1)**} 周建华^{2)**} 李茂玉¹⁾ 张鹏飞¹⁾ 段朝军¹⁾ 李 萃¹⁾ 易 红¹⁾
汤参娥¹⁾ 冯雪萍¹⁾ 彭 芳¹⁾ 陈主初¹⁾ 肖志强^{1)***}

(¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;

²⁾中南大学湘雅医学院病理学系, 长沙 410078)

摘要 为筛选肺鳞癌的血清标志物, 采用二维凝胶电泳(2-DE)技术分离 I 期肺鳞癌患者和健康人的血清蛋白质, PDquest 图像分析软件识别差异蛋白质点, 电喷雾串联质谱(ESI-Q-TOF MS/MS)鉴定差异蛋白, 然后应用蛋白质印迹和免疫组化方法分别检测差异蛋白——结合珠蛋白-2(haptoglobin-2, HP-2)在肺鳞癌患者血清和健康人血清以及肺鳞癌组织和癌旁正常支气管上皮组织中的表达。建立了肺鳞癌患者和健康人血清的 2-DE 图谱, 图像分析软件识别了 10 个差异蛋白质点, 质谱鉴定了 4 种差异蛋白; 蛋白质印迹分析显示, HP-2 在肺鳞癌血清中的表达水平显著高于健康人($P < 0.05$), 但其表达水平与肺鳞癌的临床分期无明显相关性; 免疫组化结果显示, HP-2 在肺鳞癌组织中的表达水平高于癌旁正常支气管上皮组织($P < 0.05$)。研究结果提示: HP-2 是候选的肺鳞癌血清分子标志物, 血清中 HP-2 水平对肺鳞癌诊断可能具有一定的参考价值; 肺鳞癌组织中 HP-2 表达上调可能是患者血清中 HP-2 表达升高的原因之一。

关键词 肺癌, 血清, 蛋白质组学, 分子标志物

学科分类号 R730.3

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 全球肺癌发病率和死亡率均居恶性肿瘤的首位。我国肺癌的发病率和死亡率也逐年上升, 在城市居恶性肿瘤的首位, 在农村居第三位。有研究预测: 如果吸烟和空气污染得不到控制, 21 世纪我国将成为世界第一肺癌大国^[1]。肺癌分为鳞癌、腺癌、大细胞癌和小细胞癌 4 类, 其中以肺鳞癌最为常见, 约占肺癌总数的 30%~50%^[1,2]。由于肺癌患者在早期没有明显症状, 70%~80%的病人在就诊时已处于晚期, 失去了最佳治疗时机, 5 年生存率低于 10%。而 I 期肺癌不伴转移, 容易切除, 手术后 5 年生存率高达 80%。因此, 早期诊断是成功治疗肺癌、改善预后和提高患者生存率至关重要的环节。

肿瘤在生长增殖过程中与周围环境不断发生物质交换, 它们分泌的各种物质不仅是肿瘤细胞自身生长、侵袭和转移所必需, 而且这些蛋白质自肿瘤细胞分泌后, 可到达血液等体液中而成为肿瘤标志物。因此, 以血清作为研究对象来寻求肿瘤血清标志物, 越来越受到研究者的关注和重视。另外, 肿瘤血清标志物检测具有无创、能动态监测、易普及和推广等优点, 在肿瘤的筛查、早期诊断、病情监

测、疗效评价、预后判断等方面占有至关重要的位置。目前筛选到的肺癌相关标志物主要有: 神经元特异的烯醇酶(NES)、癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 的片段(CYFRA 21-1)、鳞状细胞癌抗原(SCCAg)、糖类抗原 19-9(CA19-9)等^[3]。虽然这些血清标志物在肺癌病情与疗效监测方面有一定的参考价值, 但由于其特异性或敏感性不够理想, 均不能早期诊断肺癌^[4,5]。因此, 寻找新的肺癌标志物已成为肺癌早期诊断的关键。

蛋白质组学的出现及其技术的发展和完善为生命科学研究、人类疾病的防治带来了新的革命。高通量的蛋白质组学技术能够同时分析组织或体液中数千个蛋白质表达的变化, 使我们从蛋白质整体水平上筛选肿瘤血清标志物成为现实, 为肿瘤标志物

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB510207), 芙蓉学者特聘教授科研奖励基金(湘教通[2007]362 号), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教育部科技函[2002]48)和湖南省科技厅重大科技专项(04XK1001, 05SK1004)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327332

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-20, 接受日期: 2007-09-27

的筛选提供了一种全新的手段^[6,7]。为此,本研究以健康人和 I 期肺鳞癌患者的血清为样本,采用二维凝胶电泳和质谱技术分离、鉴定 2 种血清样本的差异蛋白质,筛选肺鳞癌的血清分子标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清和组织样本. 用于差异蛋白质筛选的 5 例 I 期肺鳞癌患者血清以及用于蛋白质印迹分析的 18 例肺鳞癌患者血清(I 期和 III 期肺鳞癌各 9 例)均为手术前、未经任何治疗病人的血清,取自湖南省肿瘤医院胸外科,患者均为男性,年龄范围为 42~68 岁。年龄和性别匹配的 14 例健康人血清由志愿者提供。30 例肺鳞癌组织和 20 例癌旁正常支气管上皮组织石蜡切片由中南大学湘雅二医院病理科提供。

1.1.2 试剂. 丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、CHAPS、硫脲、过硫酸铵、IPG 缓冲液 pH3~10、24 cm 固相化 pH 梯度干胶条、2D Quant 蛋白质定量试剂盒、考马斯亮蓝 G-250、ECL 发光试剂盒购自 Amersham Pharmacia 公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、乙腈购自 Sigma 公司;鼠抗人 Haptoglobin-2(HP-2)单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;S-P 免疫组化试剂盒购自迈新生物公司;磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠为国产分析纯。

1.1.3 仪器. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪均为 Amersham Biosciences 公司产品;Micro Q-TOF 质谱仪(Micromass)为 Waters 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 血清蛋白样品的制备. 采集健康人和肺鳞癌患者空腹静脉血 5 ml,室温下凝固待血清析出,吸出血清以 2 000 r/min、4℃离心 15 min,取上层血清,分装后-70℃冰箱保存。取等体积的 5 例健康人和 5 例 I 期肺鳞癌患者血清,分别混合健康人和患者血清,采用蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)测定蛋白质的浓度,用于二维凝胶电泳分析。因血清蛋白的浓度很高(60~80 g/L),故在测定蛋白质浓度前需先用蛋白质抽提液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% NP-40, 1% Triton X-100, 100 mmol/L

DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte)稀释 10 倍,使其浓度在蛋白质浓度测定的线性范围内。

1.2.2 二维凝胶电泳. 操作步骤主要按照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行。0.8 mg 血清蛋白与水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG pH3~10 缓冲液,痕量溴酚蓝)混合至总体积为 450 μ l。蛋白质样本于 IPGphor 等电聚焦仪(Amersham Biosciences)上,按如下条件:30V 水化 14 h 后经 500V 1 h、1 000V 1 h、8 000V 10 h 进行等电聚焦。等电聚焦结束后,分别于 10 ml 平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和 10 ml 平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 3%碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)各平衡 15 min。平衡后的 IPG 胶条转移至 12.5% SDS-PAGE 胶上端,在 Ettan DALT II 垂直电泳槽上进行第二向垂直电泳。电泳结束后,对 2-DE 胶进行考马斯亮蓝染色。实验重复 3 次。

1.2.3 凝胶图像分析. 应用 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件扫描考马斯亮蓝染胶获取图像,PDQuest 2-DE 软件比较分析健康人和肺鳞癌患者血清蛋白二维电泳图谱的差异,选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点进行质谱分析。

1.2.4 质谱分析. 从胶中切取差异蛋白质点于 1.5 ml Eppendorf 管中,50%乙腈和 100 mmol/L 碳酸氢铵脱色 30 min,乙腈脱水冷冻抽干。加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 60 min,37℃酶解 12 h,30 μ l 萃取液(100%乙腈:5%甲酸 1:1)萃取 60 min,重复萃取 1 次。将萃取液收集于 0.5 ml Eppendorf 管,冷冻浓缩至完全冻干。制备好的样品在 ESI-Q-TOF 电喷雾串联质谱仪上进行分析,所有测定均在正离子方式下进行。雾化气体为氮气,碰撞气体为氩气。源温 80℃,锥孔电压 50 V。TOF 加速电压为 0.2 kV, MCP 检测器电压为 2.7 kV,当进行 LC-ESI-MS/MS 自动分析时,毛细管电压为 3 000 V。测定结果仪器以 peaklist 文件形式给出,利用 Mascot 软件检索 NCBI 数据库鉴定蛋白质。

1.2.5 蛋白质印迹. 以健康人、I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞癌血清各 9 例为样本,用电泳缓冲液(25 mmol/L Tris pH8.0, 250 mmol/L 甘氨酸 pH8.0, 0.1% SDS)稀释 10 倍,以确保其浓度在蛋白质浓度测定的线性范围内,然后用 BCA 蛋白定量试剂

盒测定蛋白质的浓度. 50 μ g 血清蛋白进行 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 蛋白质电转移至 PVDF 膜上, 印迹膜用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:2000 稀释的鼠抗人 HP-2 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 试剂发光及显影. 以用于转膜的胶中非目的蛋白质带作为上样量对照. 应用图像扫描仪获取目的条带 HP-2 和对照蛋白质条带的图像, 使用 Band Leader 3.0 图像分析软件确定其灰度值, 分析 HP-2 的表达水平.

1.2.6 免疫组织化学染色. 30 例石蜡包埋肺鳞癌组织和 20 例石蜡包埋癌旁正常支气管上皮组织连续切片, 按福州迈新生物技术公司的 S-P 染色试剂盒说明进行免疫组化染色. 一抗为鼠抗人 HP-2 抗体, 稀释度为 1:100, 用 PBS 代替一抗为阴性对照. 免疫组织化学染色评分参照 Axiotis 等^[8]方法, 随机选取至少 10 个高倍镜视野($\times 200$), 至少计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 不着色 0 分; 黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着

色细胞比例: 阳性细胞数 <10% 者 0 分; 10%~40% 者 1 分; 40%~70% 者 2 分; $\geq 70\%$ 者 3 分. 2 种评分相加, 0~1 分为(-); 2 分为(+); 3~4 分为(++); 5~6 分为(+++). 统计学方法采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结 果

2.1 血清二维电泳图谱的建立和图像分析

应用 2-DE 技术分别分离 5 例健康人和 5 例 I 期肺鳞癌患者的混合血清蛋白. 考马斯亮蓝 G-250 染色后, 得到了健康人和 I 期肺鳞癌患者血清的 2-DE 图谱. 为了保证结果的可靠性, 在相同的条件下重复 2-DE 两次, 获得两种血清的 2-DE 图谱各 3 张. 采用 PDquest 图像分析软件对 2-DE 图像进行分析, 结果显示: 健康人血清平均蛋白质点数为 317 ± 10 , I 期肺鳞癌血清平均蛋白质点数为 320 ± 5 , 匹配率为 $(96.5 \pm 2.0)\%$. 2 种血清样本共有 10 个差异点, 其中在 I 期肺鳞癌血清中表达上调点 9 个, 下调的点 1 个. 图 1 为代表性的 I 期肺鳞癌患者血清和健康人血清蛋白质的 2-DE 图谱.

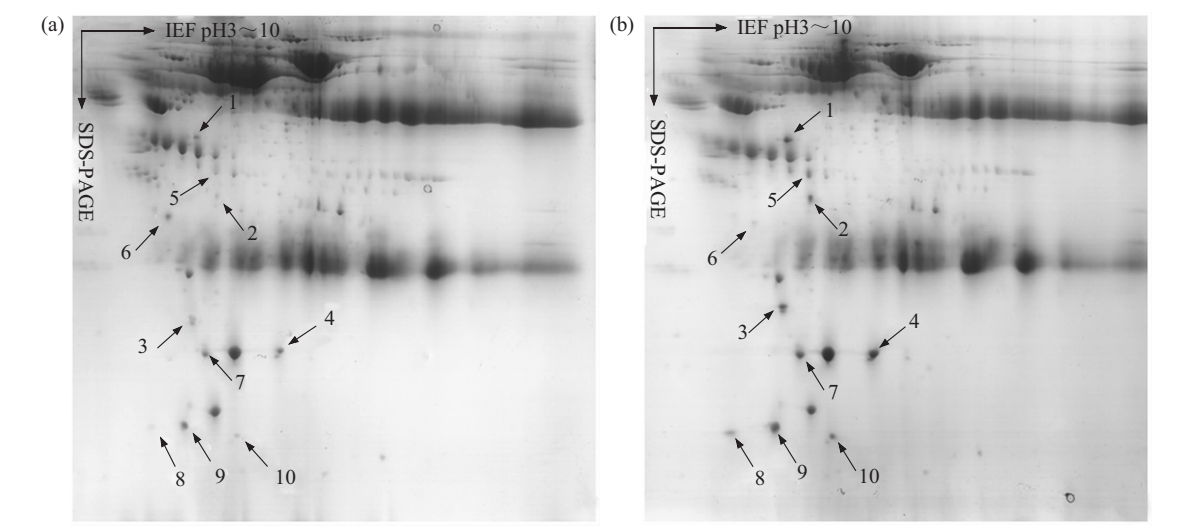


Fig. 1 Representative 2-DE maps of serum proteins
(a) Healthy individual. (b) Stage 1 lung squamous carcinoma (LSC) patient. 10 differential expression proteins spots are labeled with arrows.

2.2 差异蛋白质点的鉴定

从胶中切取所有 10 个差异蛋白质点, 进行 ESI-Q-TOF MS/MS 质谱分析. 利用 Mascot 查询 NCBI 数据库, 如果 Mascot 分数 > 63 分($P < 0.05$)则认为得到鉴定, 否则视为未得到鉴定. 在 10 个蛋白质点中有 4 个蛋白质点得到鉴定, 即巨噬细胞表达的凋亡抑制因子(AIM), 转甲状腺素蛋白相关

蛋白(transferrin-related protein), 视黄醇结合蛋白(retinol binding protein), 结合珠蛋白-2(haptoglobin-2, HP-2), 它们在 I 期肺鳞癌患者血清中的表达水平平均高于健康人. 4 个鉴定蛋白质的详细信息见表 1. 4 号蛋白质点质谱鉴定结果见图 2. 该差异蛋白的氨基酸序列图查询 NCBI 数据库显示为 HP-2.

Table 1 Differential serum proteins between healthy individuals and stage 1 LSC patients identified by ESI-Q-TOF MS/MS

Spot	Protein name	Expression level (Patient/Control)	NCBI accession No.	M(ku)	pI	Protein score
1	AIM	↑	gi 4102235	39.6	5.28	302
2	Transthyretin-related protein	↑	gi 255208	13.8	5.35	191
3	Retinol binding protein	↑	gi 230284	21.3	5.27	97
4	Haptoglobin-2	↑	gi 223976	42.3	6.23	92

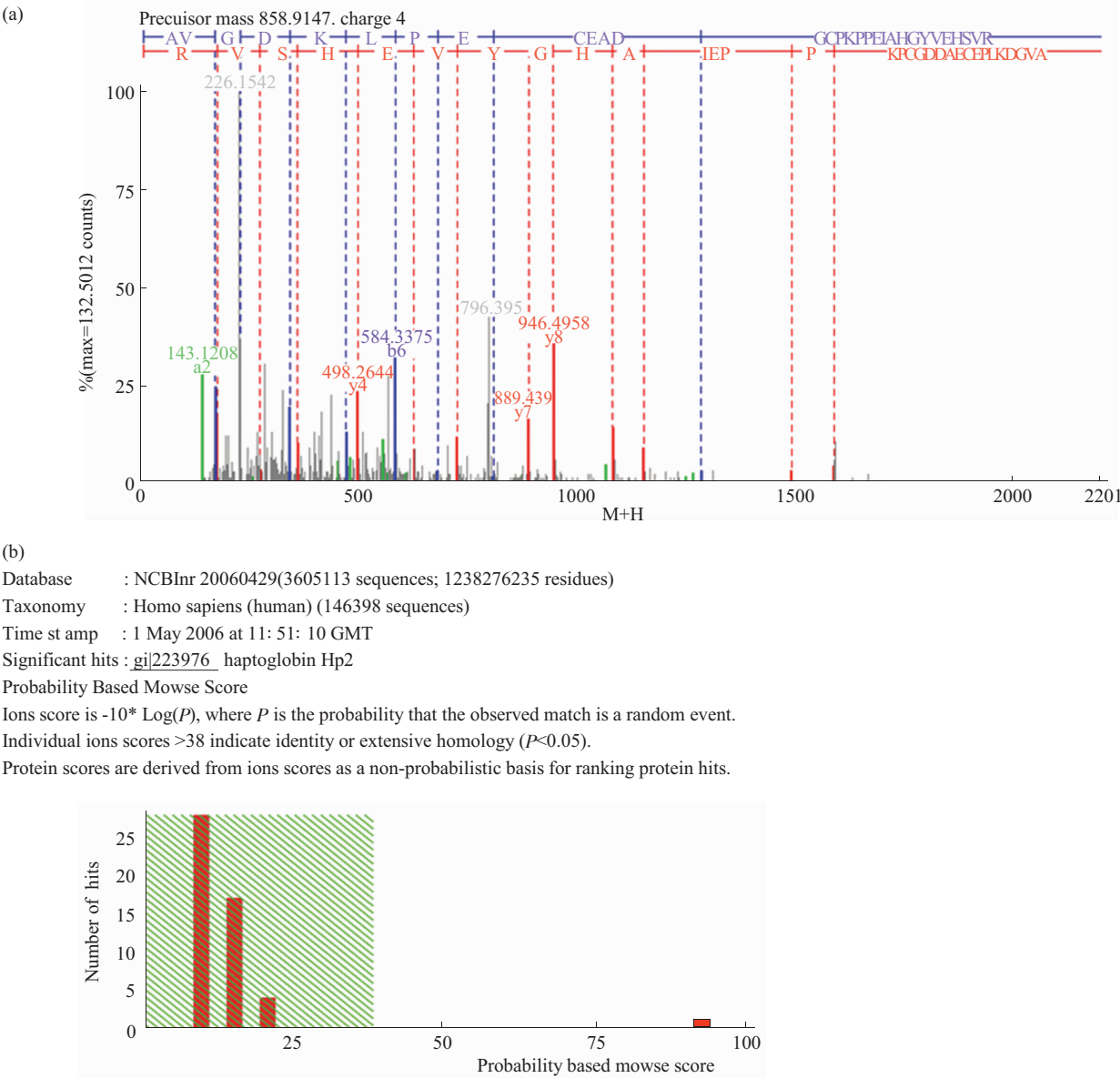


Fig. 2 ESI-Q-TOF MS/MS analysis of spot 4

(a) The amino acid sequence of spot 4. (b) Mascot database query result and scores of spot 4.

2.3 蛋白质印迹检测 HP-2 在血清中的表达

为探讨 HP-2 的临床应用价值, 选取年龄和性别匹配的健康人(normal)、I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞

癌患者血清各 9 例, 应用蛋白质印迹方法检测 HP-2 在肺鳞癌患者和健康人血清中的表达水平, 采用 Bandleader 图像分析软件对 HP-2 表达水平进

行灰度分析, 应用单因素方差分析 (one-way ANOVA)对结果进行统计学分析. 结果显示: HP-2 在 I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞癌血清中的表达水平高于健康人($P < 0.05$), HP-2 在 I 期肺鳞癌和 III 期肺鳞癌血清中的表达水平无明显差异(图 3).

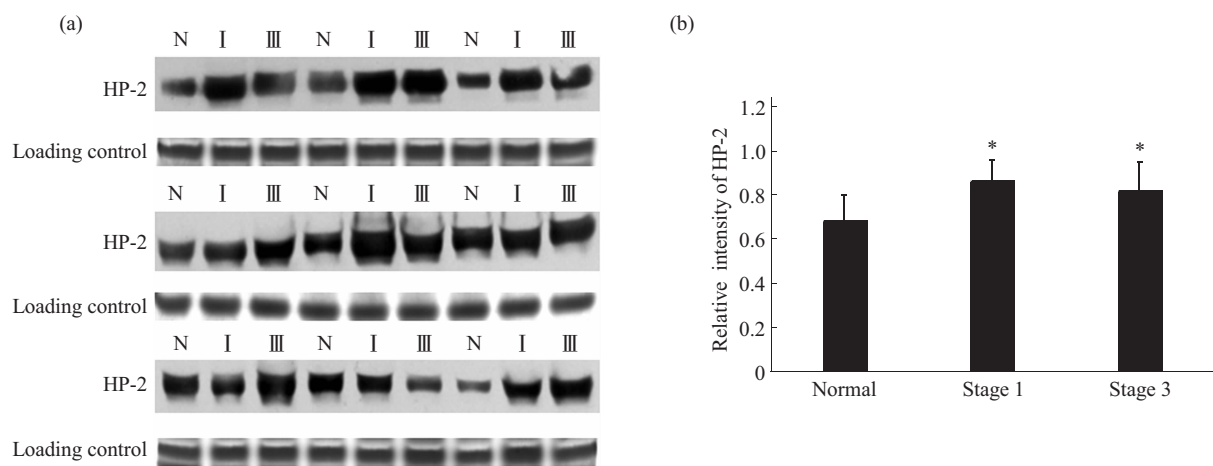


Fig. 3 Western blot analysis of the expression level of HP-2 in the normal and LSC patient sera
(a) Western blot shows changes in expression levels of HP-2 in the normal(N), stage 1(I) and stage 3(III) LSC patient sera. (b) Histogram shows the serum expression levels of HP-2 in normal and LSC patient sera as determined by densitometric analysis (* $P < 0.05$).

2.4 免疫组化检测 HP-2 在组织中的表达

为了探讨 HP-2 在肺鳞癌患者血清中表达升高的原因, 采用免疫组化方法检测 HP-2 在 30例肺鳞癌(lung squamous cancer, LSC)组织和 20 例癌旁正常支气管上皮组织中的表达情况. 结果显示: HP-2 定位在胞浆内, 它在肺鳞癌组织中有较强的

表达, 而在癌旁正常支气管上皮组织中表达明显降低(图 4). 对 HP-2 在肺鳞癌组织和癌旁正常支气管上皮组织免疫组化染色结果进行半定量分析, 统计学分析表明, 两者 HP-2 的表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$) (表 2).

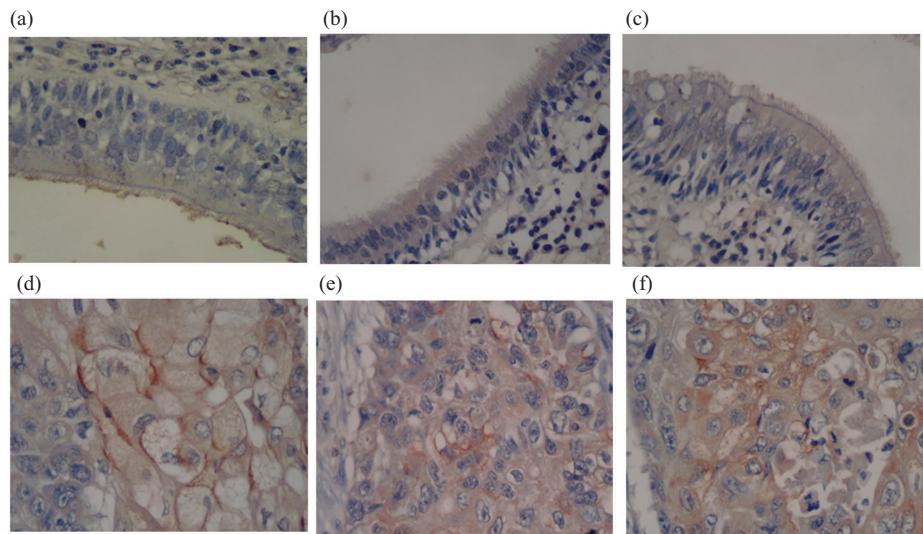


Fig.4 Representative immunohistochemistry staining of HP-2 expression in the normal bronchial epithelial tissues adjacent to tumors (a, b, c) and LSC tissues (d, e, f)
Hematoxylin counterstain. Original magnification: $\times 400$

Table 2 Expression of HP-2 in the normal and tumor tissues

Group	Staining degree*				Total
	-	+	++	+++	
Normal tissue	15	3	2	0	20
Tumor tissue	3	10	9	8	30

* The staining degree of HP-2 (- : negative; +: weak; ++: intermediate; +++: strong) in the normal bronchial epithelial tissues adjacent to tumors and LSC tissues was determined, the number of cases in each category is shown, and statistical analysis (Wilcoxon rank sum test) shows a different degree of HP-2 staining in normal tissues versus tumor tissues ($P < 0.05$).

3 讨 论

肿瘤发生发展过程中分泌的蛋白质、肿瘤抗原及其自身抗体等均可通过循环进入血液, 这些蛋白质是挖掘肿瘤血清标志物的重要源泉. 传统的筛选肿瘤血清标志物的方法是“一次一个”(one-at-a-time)的方法, 即逐个寻找与肿瘤发生发展相关的蛋白质. 这种逐个地分离鉴定每一个蛋白质的方法不仅费时、费力, 而且效果不佳. 随着人类基因组计划的完成, 一个以“蛋白质组”为研究重点的生命科学新时代已经到来. 2-DE 技术凭借其高通量、高灵敏度、高分辨率和重复性好, 便于计算机进行图像分析处理, 可以很好地与质谱分析等鉴定方法匹配的优点, 已成为蛋白质组学研究中最常用的蛋白质分离技术. 血清作为一种复杂的体液, 蕴涵着与生命相关的巨大信息, 蛋白质组学技术为探讨血清与疾病相关的奥秘提供了新的思路和技术平台. 筛选血清肿瘤标志物已成为目前肿瘤蛋白质研究的热点, 并取得了大量有意义的结果. 如应用二维凝胶电泳联合质谱的方法发现 HSP27、Clusterin 和 SAA 等血清蛋白质在肝癌, 食道癌和鼻咽癌血清中高表达^[9~11], 并可望作为潜在的肿瘤血清标志物.

本研究采用二维凝胶电泳联合质谱技术分析健康人和 I 期肺鳞癌患者的血清差异蛋白, 识别了 10 个差异蛋白质点, 鉴定了 4 种差异蛋白, 即巨噬细胞表达的凋亡抑制因子、转甲状腺素蛋白相关蛋白、视黄醇结合蛋白和结合珠蛋白 -2(HP-2). 为探讨差异蛋白质的临床应用价值, 采用蛋白质印迹方法检测差异蛋白之一 HP-2 在健康人、I 期和 III 期肺鳞癌患者血清中的表达水平, 结果显示: HP-2 在肺鳞癌血清中的表达水平高于健康人, 提示检测血清 HP-2 水平在肺鳞癌诊断方面具有参考

价值. 为探讨 HP-2 在肺鳞癌患者血清中升高的可能原因, 采用免疫组化方法检测 HP-2 在肺鳞癌组织和癌旁正常支气管上皮组织中的表达, 结果显示: HP-2 在肺鳞癌组织中的表达水平高于癌旁正常支气管上皮组织, 推测肺鳞癌组织中 HP-2 表达上调并分泌到血液中可能是患者血清中 HP-2 水平升高的原因之一.

结合珠蛋白(HP)是一种血浆糖蛋白, 有 6 种结合珠蛋白异构体, 它们能结合游离的血红素以防止肾脏、脉管系统受游离血红素诱导的氧化损伤, 并促进血红素铁的循环^[12, 13]. 在肿瘤的发生发展过程中 HP 具有参与上皮细胞的恶性转化, 免疫抑制和血管生成等作用^[14]. 已有研究报道, HP 在卵巢癌^[15]、乳腺癌^[16]等肿瘤患者血清中均存在表达水平上调, 为潜在的肿瘤血清标志物. 本研究发现 HP-2 在肺鳞癌患者血清和癌组织中表达均升高, 提示 HP-2 不仅在肺鳞癌诊断方面具有潜在的临床应用价值, 而且在肺鳞癌发病中可能具有重要的作用, 但有待进一步研究证实.

参 考 文 献

- 1 Lopez A D. Counting the dead in China: measuring tobacco's impact in the developing world. *British Medical Journal*, 1998, **317** (7170): 1399~1400
- 2 Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 1999, **49**(1): 33~64
- 3 Stieber P, Aronsson A C, Bialk P. Tumor markers in lung cancer: EGTM recommendations. *Anticancer Res*, 1999, **19** (4A): 2817~2819
- 4 Schneider J, Velcovsky H G, Morr H, *et al.* Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *Anticancer Res*, 2000, **20** (6D): 5053~5058
- 5 Schneider J, Bitterlich N, Velcovsky H G, *et al.* Fuzzy logic-based tumor-marker profiles improved sensitivity in the diagnosis of lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 2002, **7**(3): 145~151
- 6 Omenn G S. Advancement of biomarker discovery and validation through the HUPO plasma proteome project. *Dis Markers*, 2004, **20** (3): 131~134
- 7 Hanash S. HUPO initiatives relevant to clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3**(4): 298~301
- 8 Axiotis C A, Monteagudo C, Merino M J, *et al.* Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 1991, **138**(4): 799~806
- 9 Feng J T, Liu Y K, Song H Y, *et al.* Heat-shock protein 27: A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics*, 2005, **5**(17): 4581~4588
- 10 Zhang L Y, Ying W T, Mao Y S, *et al.* Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal

- squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol*, 2003, **9**(4): 650~654
- 11 Cho W C, Yip T T, Yip C, *et al.* Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal carcinoma by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res*, 2004, **10** (1 Pt 1): 43~52
 - 12 Langlois M R, Delanghe J R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*, 1996, **42** (10), 1589~1600
 - 13 Melamed-Frank M, Lache O, Enav B I, *et al.* Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*, 2001, **98**(13), 3693~3698
 - 14 Juan H F, Chen J H, Hsu W T, *et al.* Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: from mouse to human. *Proteomics*, 2004, **4**(9): 2766~2775
 - 15 Ahmed N, Barker G, Oliva K T, *et al.* Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2004, **91**(1): 129~140
 - 16 Huang H L, Stasyk T, Morandell S, *et al.* Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*, 2006, **27**(8): 1641~1650

Differential Proteomic Analysis of Sera From Lung Squamous Carcinoma Patients and Healthy Individuals *

NIE Gan-Juan^{1)**}, ZHOU Jian-Hua^{2)**}, LI Mao-Yu¹⁾, ZHANG Peng-Fei¹⁾, DUAN Chao-Jun¹⁾, LI Cui¹⁾,
YI Hong¹⁾, TANG Cen-E¹⁾, FENG Xue-Ping¹⁾, PENG Fang¹⁾, CHEN Zhu-Chu¹⁾, XIAO Zhi-Qiang^{1)***}

¹⁾ Key Laboratory of Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To screen for serum biomarkers for lung squamous carcinoma, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed to separate serum proteins from healthy individuals and stage 1 lung squamous carcinoma (LSC) patients, respectively. PDquest software was used to analyze 2-DE images, and the differential serum protein spots between the healthy individuals and LSC patients were identified by ESI-Q-TOF MS/MS. Then Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of haptoglobin-2 (HP-2), one of the differential proteins, in the sera and tumor tissues in the patients with LSC, respectively. 2-DE maps of serum proteins from healthy individuals and stage 1 LSC patients were established. Ten differential serum protein spots were detected, four proteins of which were identified by MS/MS. Western blot showed that the serum level of HP-2 in the LSC patients was significantly higher than that in healthy individuals, but was not associated with LSC staging. Immunohistochemistry showed that the expression level of HP-2 in the LSC tissues was significantly higher than that in the normal bronchial epithelial tissues adjacent to tumors. The results indicated that serum HP-2 protein is a candidate biomarker for LSC, and might be useful for diagnosis of LSC. Up-regulation of HP-2 in the LSC tissues may contribute to the high serum level of HP-2 in the patients.

Key words lung cancer, serum, proteomics, biomarker

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB510207), Ministry of Education of China for Outstanding Scholars of New Era (2002-48) and Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan(04XK1001, 05SK1004).

** NIE Gan-Juan and ZHOU Jian-Hua contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-4327239, Fax:86-731-4327332, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn.

Received: July 20, 2007 Accepted: September 27, 2007