

蛋白质组学及其在肿瘤研究中的应用*

李 峰 关勇军 陈主初**

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 简要介绍了蛋白质组学的概念、研究方法及其在肿瘤研究中的应用。蛋白质组学研究直接定位于蛋白质水平, 从整体、动态、定量的角度去研究基因的功能, 是后基因组计划的一个重要组成部分。恶性肿瘤是一种多基因参与的复杂疾病, 从蛋白质整体水平上研究恶性肿瘤将有助于进一步揭示恶性肿瘤的发病机制, 发现恶性肿瘤特异性的标志物及其药物治疗的靶标。

关键词 蛋白质组学, 恶性肿瘤, 研究

学科分类号 Q71

1 蛋白质组学的概念和研究方法

人类基因组计划的顺利实施使生命科学研究的重心正逐渐转移至生物功能的整体研究。基于基因组学本身的局限性, 它不能回答诸如: 蛋白质的表达水平和表达时间, 翻译后修饰, 蛋白质和蛋白质分子或其他生物分子的相互作用等问题^[1]。澳大利亚的两位学者 Wilkins 和 Williams 在 1994 年首先提出了蛋白质组 (proteome) 的概念: 即基因组所表达的全部蛋白质, 更为清楚地表述是细胞或组织或机体在特定时间和空间上表达的所有蛋白质^[2]。从此, 人们进入了一个全新的领域——蛋白质组学 (Proteomics) 来考察生命活动的规律。蛋白质组学是一门新兴学科, 它以蛋白质组为研究对象, 在整体水平上研究蛋白质的组成与调控的活动规律。蛋白质组学研究技术主要由双向凝胶电泳、微量蛋白质化学和生物信息学三个部分组成。1975 年 O'Farrell 等首先建立了双向凝胶电泳的方法学。双向凝胶电泳的第一向是等电聚焦 (IEF), 第二向是 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。其中第一向电泳经历了从最初载体两性电解质管胶电泳到 80 年代中期出现的固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG) 凝胶电泳的发展, 从而避免了因载体两性电解质引起的聚胶时间延长、梯度不稳、阴极漂移等现象。微量蛋白质化学是蛋白质组学研究的主要鉴定技术。80 年代末, 由于质谱软电离方法的出现, 如电喷雾质谱 (ESI-MS) 和基质辅助的激光解析飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS), 使得质谱鉴定生物大分子成

为可能。1993 年, 有 5 个研究小组独立地提出了肽质量指纹 (peptide mass fingerprint, PMF) 的研究思路, 即蛋白质通过酶或化学裂解所形成的一系列肽片段经质谱检测后其质量可做为特征性的标记 (指纹) 搜索数据库而鉴定蛋白质^[3]。采用源后衰变的基质辅助的激光解析飞行时间质谱 (PSD-MALDI-TOF-MS) 或串联质谱 (Tandem-MS) 可以进一步测定肽的部分序列称为肽序列标签 (peptide sequence tag, PST) 或蛋白质梯状测序 (protein ladder sequencing), 所得结果通过软件搜索数据库也能鉴定蛋白质^[4,5]。生物信息学是随着计算机技术、网络技术和生命科学研究三者发展相互融合而形成的一门新兴学科, 它是蛋白质组学研究的一个不可缺少的组成部分, 其在蛋白质组学研究中有二个重要应用: 一是构建与分析双向电泳凝胶图谱; 二是数据库的构建与搜索。

2 肿瘤蛋白质组学研究进展

恶性肿瘤是严重危害人类生命健康的一种难治性疾病。一般认为恶性肿瘤是由环境与遗传因素相互作用而导致的一种多基因复杂疾病。蛋白质组学研究因其直接从生物功能的执行者——蛋白质入手, 能够动态、整体、定量地考察肿瘤发生过程中蛋白质种类、数量的改变, 有助于研究者寻找到肿

* 国家自然科学基金项目 (30000028) 和湖南省自然科学基金项目 (00JJY2028) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805447, E-mail: tcbl@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2000-04-18, 接受日期: 2000-06-07

瘤诊断和预后的特异性标志物, 以及药物治疗的靶标. 蛋白质组学研究现已在多种人类肿瘤组织或细胞系中, 如膀胱癌、结肠癌、肾癌中开展, 并取得了一些成果.

Celis 等在研究膀胱癌时, 在膀胱癌病人的尿液中找到 4 种蛋白质: 银屑病 (psoriasis)、银屑病相关脂肪酸结合蛋白 5 (psoriasis-associated fatty acid binding protein 5)、凝胶溶素片段 (gelsolin fragment) 和前列腺素 D2 合成酶 (prostaglandin D2 synthetase). 已知银屑病是一种钙结合蛋白质, 并且是一种中性白细胞诱导剂, 主要由鳞状上皮细胞表达, 在银屑病角质细胞中表达增高. 它只发现在膀胱鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 病人的组织及尿液中, 在纯移行细胞癌 (TCC) 中难以检测其表达^[6], 因此认为 psoriasis 可以作为 SCC 病人的随访标志. 在对 TCC 的研究中, 作者发现 α -烯醇酶 (α enolase), 丙糖磷酸异构体酶 (triosephosphate isomerase) 和延长因子-2 (elongation factor 2) 可以作为路标校正凝胶, 并发现脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白 (adipocyte type fatty acid binding protein) 和角蛋白 13 (keratin13) 可以作为肿瘤不同阶段的标志物^[7].

结肠癌的发生发展是一个抑癌基因失活和癌基因激活的多步骤过程. Jungblut 等^[8]将 15 个结肠癌标本和 13 个正常结肠粘膜进行比较, 用 Melanie I 2-DE 软件进行分析, 发现一个相对分子质量为 13 000 和等电点 5.6 的蛋白质, 其表达仅限于肿瘤组织, 并且在 87% (13/15) 的病人中表达上调. 为了进一步证实这个蛋白质在癌前病变中的表达, 又分析了 7 例不同分化程度的腺瘤样息肉, 发现在低度和中度分化的病人都有过度表达. 切下该点, 酪氨酸酶水解, HPLC 分离, Edman 测序得到两个序列 LGHPDTLNQ 和 VIEHMEDLDTNADK, 数据库匹配分析表明这两个肽段来自 Calgrnulin B, 进一步用 MALDI-TOF-MS 分析 HPLC 分离的肽段获得了证实, 但其在结肠癌中的确切作用仍有待进一步阐明. Stulik 等^[9]在对结肠癌和配对的结肠粘膜进行分析时发现肝脂肪酸结合蛋白 (L-FABP) 和肌动蛋白结合蛋白/平滑肌蛋白 22- α (SM22- α) 在肿瘤组织中表达下调, 而钙结合蛋白 S100 家族中的几种蛋白质: S100A9、S100A8、S100A11 的表达是上调的, 且有统计学意义.

在肾细胞癌的研究中, 有人发现癌组织中辅酶

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 I (NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I) 缺失, 有趣的是这两个基因位点都在 19 号染色体, 一个是 19p12, 一个是 19p13.3^[10]. Sarto 等^[11]将 10 个肾细胞癌病人的癌组织和 10 个正常肾组织的双向凝胶电泳图谱用 Melanie II 软件进行分析, 经 MALDI-TOF-MS 和 Edman 测序, 发现血浆谷胱甘肽过氧化酶的两种异构体和锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) 的两种单体只出现在正常组织中, 而 Mn-SOD 多体只出现在肿瘤组织中, 现已知编码这两种金属酶的基因分别位于 5q32 和 6q25, 而肾癌的细胞遗传学研究表明在 5q21-qter 和 6q21-q27 容易发生缺失和转位, 故认为这两种蛋白质可作为肾细胞癌的诊断标志物.

Müller 等^[12]用高分辨率的双向凝胶电泳和纳摩尔电喷雾质谱 (nanoelectrospray mass spectrometry) 研究了伯基特淋巴瘤细胞系 BL60, 检测了核裂解物中的 36 个蛋白质, 其中 3 个是未知蛋白质, 在其余 33 个蛋白质中, 一些蛋白质参与了凋亡过程, 一些蛋白质则是真核细胞内的常见蛋白质.

Lin 等^[13]用 2-D 电泳分析了人甲状腺组织和四株甲状腺癌细胞系. 其中包括了高分化甲状腺胶质癌细胞系 RO 82W-1, 从转移性甲状腺胶质癌和乳头状癌而来的细胞系 CGTH W-1、CGTH W-3 和甲状腺癌细胞系 SW579. 根据双向凝胶电泳结果分析, 认为出现在 CGTH W-1、RO 82W-1 细胞系中特异性的蛋白点 (相对分子质量 98 000, 等电点 4.8) 可作为胶质癌的肿瘤标志物.

Rasmussen 等^[14]以乳腺癌细胞系 MDA-MB231 为材料, 系统地研究了其蛋白质的表达情况, 鉴定了 31 种蛋白质, 其中包括 27 种胞浆蛋白和 4 种膜蛋白. 在 Triton X-114 溶解的 4 种膜蛋白中, 蛋白点 1 即线粒体膜 ATP 合成酶 β 链, 蛋白点 6 和蛋白点 7 均为 GTP 结合蛋白, 分别是 RAB-6 和 HYPT-3. RAB-6 位于胞浆膜, HYPT-3 分布于高尔基体膜上, 另外还有一个蛋白质, 它的两段序列在 SWISS-PROT 数据库中没有找到与之匹配的蛋白质, 而发现几个人类 EST 中却与这一个或二个肽段有同源性, 提示这些 EST 编码了部分这个新的蛋白质的序列, 它的相对分子质量是 41 000, 等电点是 5.9.

Hanash 等^[15]用 5 年的时间建立了淋巴组织双

向凝胶电泳数据库,发现磷酸化的癌蛋白 18 (oncoprotein18, Op18) 与白血病的肿瘤负荷显著相关,磷酸化的 Op18 在细胞周期中能够调节微管蛋白的运动且与 S 期细胞的比例相关,可能具有增殖活性,此外还发现复发病人的非磷酸化 Op18 的水平显著降低.

3 问题与展望

虽然肿瘤蛋白质组学研究正在蓬勃开展,但仍然面临不少问题.首先是蛋白质组学研究技术上的问题:因为蛋白质本身结构的复杂性,对于极端酸性、碱性、低拷贝、难溶性蛋白质的分离目前仍是难点,需要技术上的突破.目前常规双向凝胶电泳一块胶上只能分辨到 3 000~ 4 000 个蛋白质点,这离估计的细胞总蛋白质数目还相差太远,所以有必要大力发展蛋白质的分离技术.其次是肿瘤组织的复杂性,由于肿瘤组织内含有多细胞成分,这给图谱分析带来一定的困难.原代培养虽然可使细胞成分单一,但是 Celis 等^[16]的工作表明即便只经短暂的体外培养,细胞内的关键蛋白质也可发生明显地改变.新近发展起来的激光捕获显微切割技术 (laser capture microdissection, LCM) 可望克服这一困难,即利用激光捕获纯的肿瘤细胞, Banks 等^[17]用 LCM 验证了该方法的可行性.蛋白质组学因为是对细胞内的总蛋白同时进行研究,所以需要高通量鉴定蛋白质点,且自动化程度越高越好,对样品的需要量越少越好.纳摩尔技术 (nanotechnology) 如纳摩尔电喷雾质谱和蛋白质芯片 (protein chip) 技术将会是新的支持技术^[3, 18].

参 考 文 献

- 1 Dove A. Proteomics: translating genomics into product?. *Nature Biotech*, 1999, **17** (3): 233~ 236
- 2 Gauss C, Kalkum M, Lowe M, *et al.* Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis*, 1999, **20** (3): 575~ 600
- 3 Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis*, 1999, **20** (3): 664~ 677
- 4 Chait B T, Wang R, Beavis R C, *et al.* Protein ladder sequencing. *Science*, 1993, **262** (5130): 89~ 92
- 5 Mann M, Wilm M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem*, 1994, **66** (24): 4390~ 4399
- 6 Celis J E, Ostergaard M, Rasmussen H H, *et al.* A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *Electrophoresis*, 1999, **20** (2): 300~ 309
- 7 Rasmussen H H, Orntoft T F. Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J Urology*, 1996, **155** (6): 2113~ 2119
- 8 Jungblut P R, Zimny-Arndt U, Zeindt-Eberhart E, *et al.* Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, 1999, **20** (10): 2100~ 2110
- 9 Stulik J, Koupilova K, Osterreicher J, *et al.* Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma. *Electrophoresis*, 1999, **20** (18): 3638~ 3646
- 10 Unwin R D, Knowles M A, Selby P J, *et al.* Urological malignancies and the proteomic genomic interface. *Electrophoresis*, 1999, **20** (18): 3629~ 3637
- 11 Sarto C, Frutiger S, Cappellano F, *et al.* Modified expression of plasma glutathione peroxidase and manganese superoxide dismutase in human renal cell carcinoma. *Electrophoresis*, 1999, **20** (17): 3458~ 3466
- 12 Müller E C, Schümann M, Rickers A, *et al.* Study of Burkitt lymphoma cell line proteins by high resolution two-dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1999, **20** (2): 320~ 330
- 13 Lin J D, Chan E C, Weng H F, *et al.* Two-dimensional electrophoretic analysis of membranous protein from human thyroid tissues and cancer cell lines. *Electrophoresis*, 1998, **19** (18): 3213~ 3216
- 14 Rasmussen R K, Ji Hong, Eddes J S, *et al.* Two-dimensional gel database of human breast carcinoma cell expressed proteins: An update. *Electrophoresis*, 1998, **19** (5): 818~ 828
- 15 Hanash S M, Teichrow D. Mining the human proteome: experience with the human lymphoid protein database. *Electrophoresis*, 1998, **19** (11): 2004~ 2009
- 16 Celis A, Rasmussen H H, Celis P, *et al.* Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinoma leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis*, 1999, **20** (2): 355~ 361
- 17 Banks R E, Dunn M J, Forbes M A, *et al.* The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~ 5): 689~ 700
- 18 Dalton R, Abbott A. Can researchers find recipe for proteins and chips?. *Nature*, 1999, **402** (6763): 718~ 719

Proteomics in Cancer Research^{*}

LI Feng, GUAN Yong-Jun, CHEN Zhu-Chu^{**}

(Cancer Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

Abstract The proteomics definition, investigation method and its application in cancer research were simply introduced. Proteomic research is to reveal the function of genes from an integrated, kinetic and quantitative view at the global protein level, which is an important component of post-genome project. Cancer is a kind of complex disease involved by multi-genes. Proteomic research will be helpful to discover the mechanism of cancer development, to find special malignant tumor markers and targets of drug treatment.

Key words proteomics, cancer, research

^{*} This work was supported by grants from National Natural Sciences Foundation of China (30000028) and Natural Science Foundation of Hunan Province (00JJY2028).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4805447, E-mail: tcb1@public.cs.hn.cn

Received: April 18, 2000 Accepted: June 7, 2000