

· 论 著 ·

## 肝癌血清高表达多肽——人血纤肽 A 的发现及生物信息学分析\*

章 健<sup>1</sup>, 何 敏<sup>2</sup>, 张志勇<sup>1△</sup>, 臧 宁<sup>2</sup>

(广西医科大学:1. 公共卫生学院职业卫生与环境卫生教研室;2. 医学科学实验中心, 南宁 530021)

**摘要:**目的 筛选和鉴定肝癌血清高表达的蛋白分子,并对筛选出的人血纤肽(fibrinopeptide)A 进行初步分析。方法 运用 ClinProt 技术系统筛选并鉴定出肝癌血清高表达的蛋白分子,应用生物信息学方法对该蛋白进行分析。结果 一个在肝癌患者血清中高表达的 m/z 为 1465 的多肽,经鉴定为 fibrinopeptide A,其在肝癌等多种肿瘤中表达上调。结论 fibrinopeptide A 可能是肝癌候选血清标志物。

**关键词:**原发性肝癌;人血纤肽 A;生物信息学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.003

中图分类号:R735.7;R730.43

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3007-02

**Discovery and bioinformatic analysis of fibrinopeptide A: a high expression of protein in serum of primary hepatic carcinoma**

QIN Jian<sup>1</sup>, HE Min<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-yong<sup>1△</sup>, et al.

(1. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health;

2. Medical Scientific Experimental Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract: Objectives** To screen and identify the high expression of protein in the serum of primary hepatic carcinoma, and to perform an initial bioinformatics analysis. **Methods** Using MALDI-TOF mass spectrometry after pre-fractionation of sera with ClinProt magnetic bead enrichment sera from 6 patients with primary hepatic carcinoma and 6 healthy controls mass spectra were generated. Some characters of fibrinopeptide A were analyzed by bioinformatics. **Results** A peptide fragment with mass charge ratio (m/z) 1465 u was found to be highly elevated in cancer sera and was identified as fibrinopeptide A. Up-regulated expression of fibrinopeptide A was in primary hepatic carcinoma and other cancers. **Conclusion** Fibrinopeptide A may be a candidate biomarker of primary hepatic carcinoma.

**Key words:** primary hepatic carcinoma; fibrinopeptide A; bioinformatics

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)为我国常见恶性肿瘤之一,其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第3位,仅次于胃癌和食管癌<sup>[1]</sup>。为尽早降低其发病率和死亡率,诸多学者长期致力于防治肝癌的研究,而寻找肝癌标志物一直是肝癌研究的热点。

近年来蛋白质组学的出现,特别是质谱技术的发展为寻找新的肿瘤标志物带来了新的机遇和挑战,也使寻找新的肿瘤标志物成为可能<sup>[2]</sup>。ClinProt 技术系统是近年来发展起来的一项蛋白组学研究技术,由磁珠分离系统、质谱系统、分析软件和可选的体液样品自动处理系统组成。因其具有较好的灵敏度和重复性,目前应用于肿瘤蛋白质表达谱的研究及肿瘤标志物的筛选。

本实验利用 ClinProt 技术系统筛选并鉴定出肝癌血清高表达的蛋白分子,在此基础上对其进行生物信息学分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验样品** 血清来自 2008 年 10 月广西医科大学附属肿瘤医院临床诊断为原发性肝癌的患者及同期门诊进行体检的健康者的晨空腹全血 2 mL,置于非抗凝试管,4 ℃静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,装入 1.5 mL EP 管,

-80 ℃保存备用。

**1.1.2 主要试剂和仪器** Cu<sup>2+</sup>螯合(IMAC-Cu)磁珠、检测仪器 MALDI-AUTO FLEX II TOF/TOF 均为美国布鲁克道尔顿公司产品。

### 1.2 方 法

**1.2.1 磁珠分选** 取肝癌患者血清及健康者血清各 6 例(按年龄、性别进行 1:1 配对),用 Cu<sup>2+</sup>螯合磁珠进行分选。铜螯合磁珠分选步骤:取出 5 μL 磁珠加入 200 μL 样品管中,加入 50 μL 铜螯合磁珠结合缓冲液(BS)洗涤磁珠,加 5 μL 血清,混匀,经清洗、洗脱后,将洗脱下来的多肽样品溶液移入干净的 0.5 mL 样品管中,用于直接质谱分析或冻存-20 ℃24 h 之内质谱分析。

**1.2.2 MALDI-AUTO FLEX II TOF/TOF 质谱分析** 将 1 μL 洗脱液(WS)与 10 μL 基质(0.3%的 α-氰基-4-羟基肉桂酸、HCCA)混匀,取 1 μL 点在 Anchorchip 靶板上,室温干燥;将靶板放入质谱仪(Bruker Daltonics);用标准品校正仪器后,检测样品,获得由不同质荷比的蛋白峰构成的质谱图。

**1.2.3 应用 ClinProTools(CPT)软件分析肝癌的差异蛋白质表达谱** 在用 CPT 软件正式分析前先对样品原始质谱图进行处理,包括基线消减,并进行校正和归一化。随后,选择软件内

\* 基金项目:广西自然科学基金项目(桂科攻 0592007-1C,桂科能 0630006-5E,桂科攻 0993003C-13)。△ 通讯作者,电话:0771-5358804;E-mail:rpazz@163.com。

嵌的统计算法进行统计学分析,获得肝癌的差异表达蛋白质。

**1.2.4 数据库的检索** MALDI-MS/MS 图谱通过 Mascot 软件搜索蛋白数据库进行蛋白质的鉴定,数据库选择 NCBI,一级质谱质量容差为  $10 \times 10^{-5}$ ,肽片段分子量最大容许误差(peptide tol)控制在  $\pm 0.2$  d,物种来源(taxonomy)选择人类,离子选择[M+H]<sup>+</sup>和平均(average)。

**1.2.5 生物信息学分析** 登录 <http://cn.expasy.org/tools> 网站,选择 ProtParam、ProtScale 等工具进行蛋白质的理化性质、亲水性轮廓等分析;登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站,获取多肽的 mRNA 序列和登录号,选择搜索 UniGene,获取多肽不同健康状态表达丰度信息。

## 2 结 果

**2.1 ClinProt 技术系统检测结果** 在两组样品蛋白图谱的对比中,发现一个差异明显的 m/z 为 1465 的多肽,其在肝癌患者血清中高表达,而在健康者血清中无表达。经进一步的二级质谱分析和数据库检索,鉴定为人血纤肽 A (fibrinopeptide A)。

**2.2 人血纤肽 A 生物信息学分析** 人血纤肽 A 的前体蛋白为 Fibrinogen。Fibrinogen 中含有一信号肽,由 19 个氨基酸组成,位于原蛋白的 1~19 区域。因为含有信号肽的蛋白质一般能够被分泌到胞外,作为细胞因子起作用,所以可以认为 Fibrinogen 是一个分泌蛋白。原蛋白被分泌到胞外时,信号肽被剪切留在胞内,剩下的位于 20~664 区域的氨基酸链则被分泌到胞外成为两个成熟蛋白,分别为 20~35 的人血纤肽 A 和 35~664 的 Fibrinogen, alpha chain, isoform alpha。人血纤肽 A 的氨基酸数目为 16 个,相对分子质量为 1 536.5,等电点为 3.92;负电荷残基总数(Asp+Glu)为 4;正电荷残基总数(Arg+Lys)为 1;半衰期为 4.4 h;不稳定系数为 22.11,该蛋白分类为稳定蛋白;脂肪系数为 55.00;亲水性评估为 -0.431。用 TargetP 对人血纤肽 A 进行亚细胞定位预测,发现其并不定位于核内,跨膜区域预测显示不存在跨膜区域,蛋白全部位于膜外。

NCBI 的 UniGene 查询结果显示,人血纤肽 A 的 mRNA 在人体不同健康状况下表达丰度依次为肝脏肿瘤、白血病、胃肠肿瘤、肾肿瘤、淋巴瘤、软骨肉瘤、子宫肿瘤、肺癌、生殖细胞瘤,在其他肿瘤中无表达。

## 3 讨 论

蛋白质组学研究技术已成为发现新的生物标记物的有力工具,质谱技术与蛋白质组学的结合也为这项研究提供了广阔前景<sup>[2]</sup>。

ClinProt 技术是近年来发展起来的一项蛋白质组学研究技术,其将本来在芯片上进行的样品纯化和富集过程改为用磁珠来进行。这种技术得到纯化和富集后的蛋白既可以用于生物标志物发现阶段的质谱检测,也可以用于生物标志物发现后的鉴定等研究,克服了 SELDI 技术的缺点<sup>[3]</sup>。

作者应用 ClinProt 技术系统检测并对比肝癌患者与健康者的血清蛋白表达谱时,发现人血纤肽 A 在肝癌患者血清中高表达。近年研究发现,在一些消化道癌症患者血清中发现人血纤肽 A 的表达<sup>[4]</sup>,Orvisky 等<sup>[5]</sup>在肝癌患者的血清中也发现了人血纤肽 A 呈高表达。

运用生物信息学对人血纤肽 A 进行综合分析,发现人血纤肽 A 为亲水蛋白<sup>[6]</sup>。对人血纤肽 A 的亚细胞定位分析,发现其亚细胞定位不在核内,很有可能定位于细胞外。这和作者在肝癌患者血清中发现人血纤肽 A 的结果相符。

研究基因和其表达的蛋白在包括肿瘤在内的不同疾病状态下的表达差异已成为深入研究基因结构和蛋白功能的最重要的策略之一。通过 NCBI 的 UniGene 查询结果显示,人血纤肽 A 在人体多种不同健康状况下均有表达,如胃肠系统肿瘤、软骨肉瘤、子宫肿瘤等,特别在肝脏肿瘤、白血病等中存在显著的表达上调,提示人血纤肽 A 可能与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关,可作为肝癌等肿瘤标志物。

总之,人血纤肽 A 是本次研究中通过 ClinProt 技术检测发现在肝癌患者血清中高表达的蛋白,并在此基础上运用生物信息学对其进行了分析,表明人血纤肽 A 可作为肝癌的候选血清标志物。

## 参考文献:

- [1] 张思维,鲁凤珠,孙秀娣,等. 中国 1990~1992 年原发性肝癌死亡调查分析[J]. 中华肿瘤杂志,1999,21(04):245.
- [2] 宋湖平,陈红伟,洪涛. 蛋白质组学在缝隙连接中的研究进展[J]. 重庆医学,2009,38(22):2896.
- [3] Cheng AJ, Chen LC, Chien KY, et al. Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology[J]. Clin Chem, 2005, 51(12): 2236.
- [4] Ebert MP, Niemeyer D, Deininger SO, et al. Identification and confirmation of increased fibrinopeptide A serum protein levels in gastric cancer sera by magnet bead assisted MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2006, 5(9): 2152.
- [5] Orvisky E, Drake SK, Martin BM, et al. Enrichment of low molecular weight fraction of serum for MS analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma[J]. Proteomics, 2006, 6(9): 2895.
- [6] 白晓苏,任伟,张素华. 蛋白质组学在糖尿病研究中的应用[J]. 重庆医学,2006,35(9):804.

(收稿日期:2010-03-10 修回日期:2010-06-01)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。