

· 论 著 ·

## 复发性卵巢癌血清蛋白质质谱分析

余 玲<sup>1</sup>, 余进进<sup>1△</sup>, 黄玉政<sup>2</sup>, 徐 明<sup>2</sup>, 浦 红<sup>1</sup>

(1. 苏州大学附属第四医院妇产科, 无锡 214062; 2. 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064)

**摘要:**目的 探讨复发性卵巢癌早期筛查的血清标志物。方法 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术分析 21 例复发性卵巢癌和 18 例完全临床缓解期卵巢癌的血清蛋白质质谱差异。结果 在 Mr 1 000~12 000 D 区段, Mr 1944、1980、2080、2661、2993、4450、4659、5359 的蛋白质峰显著上调, Mr 1897 蛋白质峰显著下调, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 MALDI-TOF-MS 技术可发现复发性卵巢癌具有潜能的早期筛查的血清标志物。

**关键词:**卵巢肿瘤; 复发; 蛋白质组; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)01-0027-03

## Mass spectrometry analysis of serum proteins from patients with recurrent ovarian cancer

Yu Ling<sup>1</sup>, Yu Jinjin<sup>1△</sup>, Huang Yuzheng<sup>2</sup>, Xu Ming<sup>2</sup>, Pu Hong<sup>1</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Fourth Affiliated Hospital of Suzhou University, Wuxi 214062, China; 2. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

**Abstract:** Objective To search for the biomarkers from the serum of patients with recurrent ovarian cancer for early diagnosis.

**Methods** The serum proteins of twenty-one patients with recurrent disease and eighteen patients with complete clinical remission were generated and analyzed by the technique of MALDI-TOF-MS. **Results** In the mass range from 1000 to 12000 D, 1944, 1980, 2080, 2661, 2993, 4450, 4659, 5359 D protein expressions were increased significantly, and 1897 D were decreased. **Conclusion** The technology of MALDI-TOF-MS can be a desired method in detecting the biological markers in the earlier period of recurrent ovarian cancer.

**Key words:** ovarian neoplasm; recurrence; proteome; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤之一,其病死率居妇科恶性肿瘤之首,约 70% 患者在发现卵巢癌时已处于晚期(Ⅲ、Ⅳ期),虽经过肿瘤细胞减灭术和化疗,但其中 70% 患者仍将复发。及时、准确地诊断复发性卵巢癌是进行合理个体化治疗的基础。本研究选择 2007 年 7 月至 2009 年 7 月在苏州大学附属第四医院住院治疗及门诊随访的卵巢癌患者,应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术分析复发性卵巢癌与完全临床缓解期卵巢癌血清蛋白质质谱图,试图获得复发性卵巢癌早期筛查的血清学指标。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集在苏州大学附属第四医院经综合治疗获完全临床缓解至少 6 个月后复发的卵巢癌患者 21 例为复发组,年龄 34~82 岁,平均 53 岁。临床分期: I 期 3 例, II 期 4 例, III 期 8 例, IV 期 6 例。病理类型:浆液性囊腺癌 9 例,黏液性囊腺癌 4 例,透明细胞癌 4 例,未分化癌 4 例。分级:中分化 12 例,低分化 9 例。所有患者确诊后即行卵巢肿瘤细胞减灭术(有 3 例肿瘤灶残留大于或等于 2 cm,余皆小于 1 cm),术后至少行 6 个疗程的以铂类为基础的规范联合化疗。化疗完成之后对患者进行化疗反应的评估及长期并发症的监测。同期选取于门诊随访的完全临床缓解的卵巢癌患者 18 例为对照组,年龄 42~70 岁,平均 61 岁,均经术后病理检查证实。复发组与对照组的年龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 复发性卵巢癌诊断标准**<sup>[1]</sup> (1) CA125 升高; (2) 出现胸、腹腔积液; (3) 体检发现肿块; (4) 影像学检查发现肿块;

(5) 不明原因肠梗阻。只要存在上述中的 2 项即考虑为肿瘤复发。

**1.3 试剂与仪器** MB-WCX 磁珠纯化试剂盒(NO. 223983), MTP-Anchorchip800/384 点样靶; 丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为进口 HPLC 级; 基质: HCCA(0.3 mg/mL, 溶于乙醇: 丙酮=2:1), 新鲜配制。

**1.4 标本采集** 在采取化疗、手术等治疗措施前,采集两组患者清晨空腹血 2~5 mL,于 4 °C 冰箱静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 20 min,分离血清,于冰盒上分装至新离心管,每管 100 μL, -80 °C 冰箱保存。

**1.5 蛋白质检测** BS 为结合液, WS 为冲洗液, ES 为洗脱液, SS 为稳定液。手动颠倒完全混匀磁珠悬浮液 1 min; 取 10 μL MB-WCX BS 和 10 μL MB-WCX-beads 至 200 μL PCR 管中,用加样器轻轻混匀; 加 5 μL 血清,用加样器混匀至少 5 次,静置 5 min; 将 PCR-tube 放入 MBS(磁珠富集器),贴壁 1 min,弃上清液; 加 100 μL MB-WCX WS,在 MBS 上前后移动 PCR-tube 10 次,磁珠贴壁,弃上清液; 重复两次后加 5 μL MB-WCX ES 洗涤贴壁的磁珠,并反复吹打 10 次,贴壁 2 min,将上清液移入干净的离心管; 再加 5 μL MB-WCX SS 至离心管并混匀,磁珠洗脱液 1 μL 与基质 10 μL 完全混合,取 0.5~1 μL 混悬液点靶,室温干燥后上机检测。Autoflex control 参数设置如下: 选择方法 LP\_Clinprot. par, 靶 MTP-Anchorchip800/384, 激光能量在 60% 左右,检测相对分子质量范围为 1 000~12 000 D; 应用 Autoflex analysis 与 ClinProTools 软件对采集

△ 通讯作者, 电话: 15951580901; E-mail: yujjwx@126.com。

图谱进行分析,同时软件自动对数据进行统计学处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 质谱图分析** 在 1 000~12 000 D 区段,有明显差异的蛋白质峰 9 个( $P < 0.05$ ),见图 1、2、3。其中 Mr 1944、1980、2080、2661、2993、4450、4659、5359 的蛋白质峰显著上调( $P < 0.05$ ),Mr 1897 的蛋白质峰则显著下调( $P < 0.05$ )。组间比较,蛋白质峰的平均值见表 1。

**2.2 MASCOT 搜库分析** 选择哺乳动物类为搜索源,对 9 个差异蛋白质峰进行搜库分析。下列蛋白质可能性大:Mr 1897 的蛋白可能为 C4a,Mr 1944 可能为 GTP 酶活化蛋白,Mr 1980 可能为免疫球蛋白重链,Mr 2661 可能为鳞状细胞癌抗原,其他蛋白质分子未搜索到,提示可能为新的蛋白质。

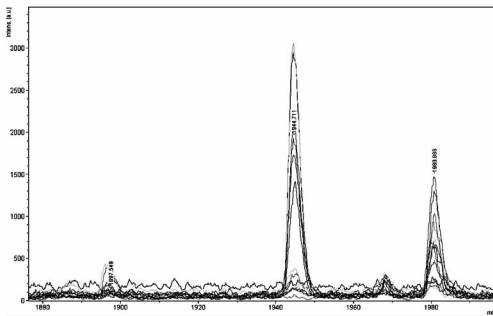


图 1 Mr 1897、r 1944、r 1980 的多组比较

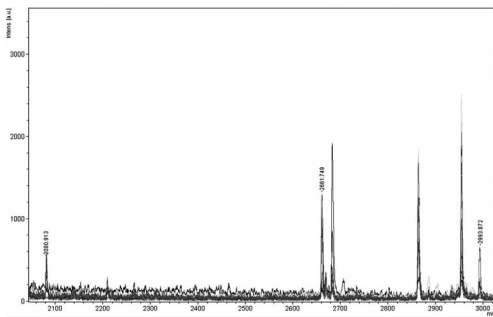


图 2 Mr 2080、r 2661、r 2993 的多组比较

表 1 质谱分析结果

Mr(D)	对照组/复发组 蛋白峰的平均值	趋势 P	可能蛋白分子
1897	29.29/17.68	0.007 7 ↓	C4a
1944	29.59/282.30	0.001 3 ↑	GTP 酶活化蛋白
1980	79.55/148.67	0.036 6 ↑	免疫球蛋白重链
2080	31.80/69.83	0.002 4 ↑	—
2661	22.78/48.69	0.006 7 ↑	鳞状细胞癌抗原
2993	19.63/73.76	0.037 8 ↑	—
4450	13.24/22.01	0.0048 ↑	—
4659	105.76/206.79	0.005 2 ↑	—
5359	47.82/156.52	0.004 1 ↑	—
7868	2.58/1.42	0.002 4 ↓	—

—:表示无数据。

**2.3 复发性卵巢癌血清蛋白标志物模板的建立和分析** 将 Biomarker Wizard 软件分析所得到的有差异的蛋白质峰建立

数据库,导入 Biomarker Patten 智能统计分析软件,选择相应条件,对复发组与对照组进行分组统计,从而建立监测卵巢癌复发的诊断模板。盲法检测复发组与对照组共 19 例,可将 91.40%的复发癌和 82.75%的缓解患者正确划分。研究结果表明,该模板诊断复发性卵巢癌的敏感性达 91.40%,特异性达 82.75%。

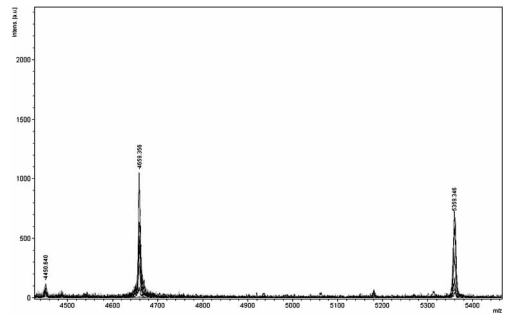


图 3 Mr 4450、r 4659、r 5359 的多组比较

## 3 讨论

容易复发是卵巢癌预后差的主要原因。复发是多基因参与的多步骤过程,已知有大量蛋白质分子的参与<sup>[2-3]</sup>。蛋白质组学直接定位于分子水平,可应用于疾病的早期诊断。寻找具有诊断价值的肿瘤标志物,成为当前肿瘤蛋白质组学研究的热点<sup>[4-7]</sup>。刘伟杰等<sup>[8]</sup>应用蛋白质组学技术分析发现热休克蛋白 27 等在大肠癌组织黏膜中差异表达,有望成为大肠癌早期诊断的分子标志物。Luftner 和 Possinger<sup>[9]</sup>鉴定核基质蛋白 66 (NMP 66) 为诊断乳腺癌的一种潜在血清标志物。李玉华等<sup>[10]</sup>发现在卵巢癌组织中,结合珠蛋白(HP)的表达显著上调,提示其在卵巢癌的发生、发展中可能起重要作用。目前新发现了一些卵巢肿瘤标志物,如巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、多形性上皮黏蛋白等<sup>[11]</sup>,但诊断复发的价值尚待研究。动态监测血清可溶性血管细胞黏附分子(sVCAM-1)也有望用来监测卵巢癌复发<sup>[12]</sup>。

当体液流经肿瘤微环境时,血清蛋白质组中可能产生许多轻微的未知组分的变化,因此,使用复合标志物更为有效。目前诊断卵巢癌复发最常用的肿瘤标志物是 CA125,但即使随诊中 CA125 水平正常,也不能完全排除复发,必须结合其他方法进行诊断。Bandera 和 Christina<sup>[13]</sup>发现结合珠蛋白  $\alpha$  链在卵巢癌的表达高于对照组 2 倍多,诊断敏感性达 84%,如与 CA125 联合检测,敏感性可增加到 94%,特异性达 100%。仲召阳等<sup>[14]</sup>应用多项肿瘤标志物联合检测消化系统肿瘤,证实联合检测的准确率更高;乔正蓉<sup>[15]</sup>联合甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)鉴别原发性、转移性肝癌及肝良性肿瘤,提示联合检测明显提高诊断灵敏度及准确率。

本实验证实复发性卵巢癌患者血清中存在差异蛋白,其作用机制可能为:在补体经典激活途径中,若 C4a 表达下降,清除凋亡细胞及下调活化 B 细胞的功能可能发生障碍,反映免疫系统受损可能促使卵巢癌复发。免疫球蛋白在复发癌血清中表达上调,可能为机体清除“异己”,代偿性引发高表达。Beneduce 等<sup>[16]</sup>报道,鳞状细胞癌抗原(SCCA)在肝癌细胞中显著高表达,有望成为除 AFP 外又一肝癌肿瘤标志物。SCCA 能否成为卵巢癌标志物有待更多实验证实。Rho GTP 酶广泛参与多种恶性肿瘤发生、发展过程,表达阳性者生存率明显降低。三磷酸鸟苷(GTP)酶活化蛋白作为负向调节因子加速该酶水

解使其失活。但是本实验显示该蛋白高表达的趋势与复发癌侵袭转移的理论并不吻合,其原因可能与实验误差有关,但具体机制还需进一步探讨。

#### 参考文献:

[1] 薛凤霞,赵敬.复发性卵巢癌的诊断[J].中国实用妇科与产科杂志,2005,21(7):385-386.

[2] Duelli DM, Lazebnik YA. Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(11): 859-862.

[3] Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis[J]. Oncogene, 1999, 18(45): 6094-6103.

[4] Pusch W, Kostrzewa M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in screening and diagnostic research [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(20): 2577-2591.

[5] Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, et al. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility[J]. Clin Chem, 2005, 51(1): 102-112.

[6] De Noo ME, Tollenaar RA, Ozalp A, et al. Reliability of human serum protein profiles generated with C8 magnetic beads assisted MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2005, 77(22): 7232-7241.

[7] Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, et al. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software [J]. BioTechniques, 2005, Suppl: S37-40.

[8] 刘伟杰,秦环龙,马延磊.大肠癌患者肠黏膜的蛋白质组学研究[J].山东医药,2008,48(40):1-3.

[9] Luftner D, Possinger K. Nuclear matrix proteins as biomarkers for breast cancer[J]. Exp Rev Mol, Diagn, 2002, 2(1): 23.

[10] 李玉华,杨留才,孙炯,等.卵巢癌组织的差异蛋白质研究[J].苏州大学学报:医学版,2009,29(3):483-486.

[11] Tammela J, Lele S. New modalities in detection of recurrent ovarian cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(1): 5-9.

[12] 张淑兰,王丹波,任凤岩.肿瘤标志物检测在复发性卵巢癌诊治中的意义[J].中国实用妇科与产科杂志,2005,21(7):389-391.

[13] Bandera CA, Ye B, Mok SC. New technologies for the identification of markers for early detection of ovarian cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(1): 51.

[14] 仲召阳,王东,李增鹏,等.多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统对结直肠癌诊断的临床意义[J].重庆医学,2007,36(23):2406-2408.

[15] 乔正蓉.甲胎蛋白与癌胚抗原肿瘤标志物联合检测在原发性肝癌鉴别诊断中的应用[J].重庆医学,2008,37(12):1333-1335.

[16] Beneduce L, Castaldi F, Marino M, et al. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2005, 103(12): 2558-2565.

(收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-10)

(上接第 26 页)

鼠心肌抗氧化能力、抑制脂质过氧化物产生、减轻脂质过氧化所致心肌细胞膜的损伤等有关。

#### 参考文献:

[1] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, et al. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(3): 369-387.

[2] 程虹,刘惟堯.姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2005,21(10):1238-1241.

[3] 杨家荣,杨慧,潘铁军.姜黄素对膀胱肿瘤细胞组织蛋白酶 D 表达的影响[J].重庆医学,2008,37(14):1540-1543.

[4] Flaherty JT, Zweier JL. Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: experimental and clinical evidence[J]. Klin Wochenschr, 1991, 69(21-23): 1061-1065.

[5] 邵耕.现代冠心病学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995:8.

[6] Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular disease[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2005, 130(50): 2904-2909.

[7] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular diseases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 29-38.

[8] Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, et al. Role of phenolic HO-1 and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin[J]. Free Rad Biol Med, 2003, 35(5): 475-784.

[9] Huang MT, Lysz T, Ferraro T, et al. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis[J]. Cancer Res, 1991, 51(3): 813-819.

[10] Lin JK, Shih CA. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/xidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH 3T3 cells [J]. Carcinogenesis, 1994, 15(8): 1717-1721.

[11] Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an antitumor promoter and antiinflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206(2): 533-540.

[12] Srivastava R. Inhibition of neutrophil response by curcumin[J]. Agents Actions, 1998, 28(3/4): 298-303.

(收稿日期:2010-01-08 修回日期:2010-05-10)