

· 基础研究 ·

口腔鳞癌肿瘤标记物血清蛋白组学的初步研究*

马洪¹, 赵天江¹, 王金生¹, 曹星华¹, 潘卫²

(贵阳医学院, 1. 口腔医学系口腔颌面外科学教研室; 2. 医学检验系蛋白组学实验室 550004)

摘要:目的 筛选口腔鳞癌及健康人血清表达差异的蛋白质, 为进一步研究口腔鳞癌发生机制和建立口腔癌标记物体系奠定基础。方法 收集口腔鳞癌患者外周血清 17 例, 健康人外周血清 17 例, 采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳、质谱鉴定和生物信息学分析, 筛选在口腔鳞癌患者血清中差异表达的蛋白质。结果 口腔鳞癌患者和健康人血清中有 7 个蛋白点差异表达明显, 其中 2 个蛋白点分别为触珠蛋白、触珠蛋白同型前原蛋白, 它们在口腔鳞癌患者的血清中均高表达。结论 触珠蛋白在口腔鳞癌患者外周血和健康人外周血中的表达发生了改变。

关键词: 蛋白质组学; 电泳, 凝胶, 双向; 质谱法; 触珠蛋白类; 口腔肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.015

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)08-0766-03

A preliminary study on serum proteomics for tumor markers of oral squamous cell carcinoma*

Ma Hong¹, Zhao Tianjiang¹, Wang Jinsheng¹, Cao Xinghua¹, Pan Wei²

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Stomatology; 2. Laboratory of Proteomics, Faculty of Medical Laboratory Science, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: **Objective** To screen the differentially expressed proteins in serums of patients with oral squamous cell carcinoma and healthy people, and to lay a foundation for further study on genesis mechanism of oral squamous cell carcinoma and establishment of oral tumor marker system. **Methods** Peripheral serum samples of 17 patients with oral squamous cell carcinoma and 17 healthy people were collected. Two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients, mass spectrometry and bioinformatics analysis were employed to screen the differentially expressed proteins in serums of patients with oral squamous cell carcinoma. **Results** Seven protein spots were found significantly differential expression in serums of patients with oral squamous cell carcinoma and healthy people, and two of them were haptoglobin and haptoglobin isoform 1 preproprotein, respectively, which were both highly expressed in the serums of patients with oral squamous cell carcinoma. **Conclusion** Expression of haptoglobin in peripheral serum is vary from patients with oral squamous cell carcinoma to healthy people.

Key words: proteomics; electrophoresis, gel, two-dimensional; mass spectrometry; haptoglobins; mouth neoplasms

肿瘤严重威胁人类的健康, 大量研究证实, 早期诊断和早期治疗是防治肿瘤, 降低病死率的有效措施。因此, 为提高肿瘤的早期诊断而对肿瘤标记物的研究成为人们关注的焦点^[1]。蛋白质组学(proteomics)是从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间的相互作用与联系, 从而揭示生物学行为以及基因表达调控机制的一个新的研究领域, 为肿瘤研究提供了强有力的技术平台。应用蛋白质组学技术, 分析肿瘤细胞与正常细胞内不同蛋白质在其表达、表达数量、表达位置和修饰状态上的差异, 是发现新的肿瘤标记物的有效途径^[2]。本研究采用双向凝胶电泳技术分离口腔鳞癌患者和健康人外周血清总蛋白, 比较口腔鳞癌患者和健康人差异表达明显的蛋白点, 再应用质谱技术以及生物信息学分析, 鉴定出这些差异表达的蛋白质种类和性质, 以期发现具有早期诊断和治疗评估价值的肿瘤标记物。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 主要试剂: 考马斯亮蓝 R-250 与 G-250 购自 Sigma 公司, 碘乙酰胺购自 ACROS 公司, 小牛血清为 GibcoBRL 公司的产品, 固相 pH 梯度 (immobilized pH gradients, IPG) 缓冲液、IPG 胶条 (13 cm, 线性, pH 3~10)、甘氨酸、2D Quant 蛋白质定量试剂盒、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、蛋白质分子量标准、2D-clean up 试剂盒

等购自 AmershamPharmacia Biotech 公司; 主要仪器: UV-2401PC 紫外可见分光光度计 (日本岛津仪器有限公司)、超低温冷冻离心机 (sigma 公司)、Image Scanner 扫描仪 (Amersham Bio sciences 公司)、Ettan IPGphor II 等电聚焦仪 (Amersham Biosciences 公司)、Electrophoresis Power Supply-EPS 601 垂直电泳仪 (Amersham 公司)、Image Master 2D platinum 6.0 图像分析软件 (Amersham 公司)。

1.2 标本 17 例鳞癌血清标本 (鳞癌组) 来自 2007 年 1 月至 2009 年 2 月于贵阳医学院附属医院口腔颌面外科就诊的口腔鳞癌患者, 其中, 男 13 例, 女 4 例; 年龄 50~68 岁, 平均 59.3 岁; 病理分级: 高分化鳞癌 11 例, 中分化鳞癌 6 例; 均经病理证实且未接受任何针对肿瘤的治疗如手术、放射治疗及化疗等。17 例对照血清 (对照组) 来自贵阳医学院 2008、2009 级身体健康的口腔颌面外科研究生, 既往无肿瘤史。

1.3 标本采集及蛋白质样本制备 所有标本均为清晨空腹静脉血, 静置待血清析出后离心 5 min (离心半径 8 cm, 4 000 r/min), -80 °C 保存待用。实验前将 -80 °C 保存的血清融解, 根据清蛋白和 IgG 去除试剂盒说明书的操作步骤去除高丰度蛋白。将 100 μL 样品加入 3 倍体积的沉淀剂及 100 μL 的裂解液中室温孵育, 室温下 (20 °C) 离心 2~5 min (离心半径 8 cm, 12 000 r/min), 收集上清液储存样品至 1 mL 环氧树脂管中。

* 基金项目: 2007 年贵州省优秀人才省长基金资助项目 [黔省专合字 (2006) 116 号]。

表 1 7 个差异蛋白点质谱分析和数据库查询结果

蛋白点	NCBI 登录号	蛋白质名称	相对分子质量	等电点	匹配肽段数目	氨基酸覆盖率(%)	综合得分(分)	表达情况
1	179665	complement component C3[Homo sapiens]	187 046.9	6.02	5	3.79	198.2	↑
2	2914175	chain A,crystal structure of human apolipoprotein A-I	23 390.1	5.55	6	76.62	1310.3	↑
3	1620396	haptoglobin[Homo sapiens]	38 983.7	6.41	7	9.20	602.2	↑
4	4826762	haptoglobin isoform1 preproprotein[Homo sapiens]	45 177.6	6.13	8	14.78	140.3	↑
5	219978	prealbumin[Homo sapiens]	15 910.0	5.52	6	60.54	458.3	↑
6	4504351	hemoglobin subunit delta[Homo sapiens]	16 046.3	7.84	7	34.01	410.2	↑
7	61679604	chain B, T-To-T(High) quaternary transitions in humant hemoglobin;deshis146beta deoxy low-sal	15 721.2	6.76	3	39.31	98.3	↓

1.4 Bradford 法检测蛋白浓度 在核酸蛋白分析仪中,以考马斯亮兰 G-250 调零,于 595 nm 波长处检测样本的吸光度值,绘制标准曲线。标准曲线在 0.25~16 mg/mL 范围内呈线性,将蛋白样本用超纯水 10 倍稀释后测定,测定方法与标准曲线相同,同一样本平行检测 3 次后取其平均吸光度值,通过标准曲线计算样本的蛋白质浓度。

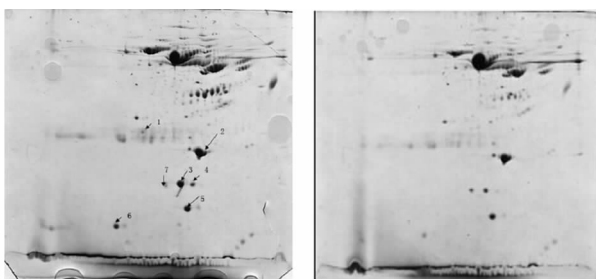
1.5 双向凝胶电泳分离蛋白 13 cm,线性, pH3~10 IPG 胶条等电聚焦;胶条平衡;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE);染色、脱色。

1.6 凝胶图像分析 染色、干燥后的电泳凝胶用 Image scanner 扫描仪进行扫描,获取血清蛋白质电泳图像,然后用 Image Master 2D Platinum 6.0 软件进行图像分析,筛选差异蛋白斑点。

1.7 液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析及数据检索^[3] 样品蛋白被酶切成若干肽段,经高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分离后,逐一流入质谱中进行肽段检测,肽段检测后(一级质谱),该肽段又通过与氦气分子的碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID),断裂成许多肽段碎片,这些碎片的质量也被质谱检测记录下来(二级质谱);检测后的肽段质量与碎片质量,通过专用软件与特定蛋白数据库中蛋白序列的理论酶切肽段及其碎片进行比对,对蛋白质进行鉴定。

2 结 果

鳞癌组和对照组血清进行双向凝胶电泳,发现有 7 个蛋白点差异表达明显,结果见图 1。将这 7 个差异蛋白点进行 LC-MS/MS 鉴定以及数据库检索,见表 1,综合得分均超过 30.0 分。3 号样品经过氨基酸覆盖率及二级质谱鉴定为触珠蛋白[haptoglobin(Homo sapiens)],综合得分为 602.2 分,4 号样品为触珠蛋白同型前原蛋白(haptoglobin isoform 1 preproprotein),综合得分为 140.3 分。



左:鳞癌组;右:对照组。

图 1 血清双向凝胶电泳图谱(考马斯亮蓝 R250 染色)

3 讨 论

口腔肿瘤的蛋白质组学研究一方面能建立口腔肿瘤的全

蛋白表达谱,用于肿瘤的分选鉴定;另一方面通过分析肿瘤组织蛋白与正常组织蛋白的差异表达,筛选出各种病损的特异蛋白,构建肿瘤发生、发展的蛋白质组谱和分子机制,发现并评估组织、血清及唾液中的特异蛋白作为生物标记,有利于临床的无创伤早期诊断及分级^[4-5]。国内有学者对口腔鳞癌组织和口腔正常黏膜组织中差异表达的蛋白质进行研究,发现 β 纤维蛋白、磷酸丙糖异构酶等在口腔鳞癌的发生、发展过程中发生了改变^[6]。有人对具有不同侵袭力的口腔鳞癌细胞系培养液中的差异蛋白质进行检测,发现在高侵袭口腔鳞癌细胞系中,23 个蛋白质表达上调,1 个表达下调,并认为蛋白质组学技术在筛选不同侵袭力细胞系之间的差异蛋白质方面也有应用价值^[7]。

本实验采用双向凝胶电泳,结合 LC-MS/MS 鉴定技术,比较口腔鳞癌患者和正常人血清中差异蛋白的表达情况,结果发现触珠蛋白在口腔鳞癌血清中高表达。触珠蛋白又叫结合珠蛋白,是血清 α₂ 球蛋白组中的一种酸性糖蛋白,相对分子质量为 85 000,广泛存在于人类和许多哺乳动物的血清和其他体液中,主要在肝脏中合成。触珠蛋白是一种急性期蛋白(acute phase protein, APP),肿瘤患者,特别是伴癌细胞坏死时,触珠蛋白的表达水平明显升高。其主要生理功能是通过与游离血红蛋白结合形成触珠蛋白-血红蛋白复合物,将血红蛋白转运至肝脏中代谢,从而避免血红蛋白和铁从肾脏丢失及其对肾脏的损伤。此外还参与宿主抗感染、损伤组织的修复以及内环境的稳定。除以上的功能外,还有抗氧化、抑制前列腺素合成、抑制细菌、促进血管生成及重要的免疫作用^[8]。血清触珠蛋白含量在感染、创伤、炎症、肿瘤及心肌梗死等病理状态时显著升高。研究指出,不同基因型触珠蛋白由于结构不同,功能上存在差异,触珠蛋白 HP2-2 基因型糖尿病患者的心血管并发症的发生率显著高于其他基因型,这可能与其体内较高的氧化应激状态有关^[9]。也有研究发现,乙型肝炎患者血清触珠蛋白和补体因子 B(complement factor B, CFB)水平随着肝功能损害的加重而逐渐下降,触珠蛋白和 CFB 血清水平在一定程度上可以反映肝细胞受损的严重程度^[10]。

应用蛋白质组学技术对卵巢癌患者与正常人血清中差异蛋白的一项研究提示触珠蛋白在病理血清中表达上调^[11];后续研究发现,卵巢癌患者血清中触珠蛋白、糖链抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125)水平异常升高,触珠蛋白升高尤为明显,因此,有学者认为它可作为卵巢癌的辅助诊断指标^[12];同样在对卵巢癌患者癌组织、癌旁组织及正常卵巢黏膜组织双向凝胶电泳的蛋白质表达图谱研究中也发现癌组织中有 8 种蛋白质差异表达,其中有 4 种为结合珠蛋白的亚型^[13];对阿尔茨海默病患者与正常人血清差异蛋白的研究也表明触珠蛋白在所有病理血清中均为高表达^[14];对肺鳞癌患者和健康人的血清蛋白质的一项研究提示触珠蛋白-2 是肺鳞癌的血清候选

分子标记物,提出血清中触珠蛋白-2 水平对肺鳞癌诊断可能具有一定的参考价值^[15];同样一项对胰腺癌患者与健康人血清的蛋白质组学研究显示在胰腺癌组中共有 78 个蛋白点有显著性改变,其中,成功鉴定 55 个蛋白点,29 个蛋白点在胰腺癌组高表达,其中含触珠蛋白^[16]。不过国内有学者在肾母细胞瘤患儿血清蛋白质标记物的筛选及鉴定的研究中发现触珠蛋白在肾母细胞瘤患儿血清中低表达,在术后及正常小儿血清中高表达,提示肾母细胞瘤对肝脏合成触珠蛋白可能有抑制作用^[17]。

本实验对口腔鳞癌患者血清蛋白中表达明显的 7 个蛋白点进行质谱鉴定,根据数据库的搜索结果,成功鉴定了其中 2 个蛋白质点,分别为触珠蛋白及其同型前原蛋白,它们在口腔鳞癌患者血清中均呈高表达,这表明触珠蛋白可能成为口腔鳞癌的血清肿瘤标志物之一,但其机制及特异性研究还远远不够,口腔鳞癌蛋白质组学研究任重道远。

(本研究中 LC-MS/MS 质谱分析及检索由中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室完成。特别感谢!)

参考文献:

- [1] 刘婷. 肿瘤标志物的检测及临床应用[J]. 当代医学, 2009,15(24):24-25.
- [2] 何伟伟,陈海泉. 蛋白质组学技术和肺癌诊断[J]. 肿瘤, 2007,27(4):327-329.
- [3] 聂贻娟,李茂玉,张鹏飞,等. 肺鳞癌患者和健康人血清的差异蛋白质组学研究[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007,27(6):470-475.
- [4] Hu S, Arellano M, Boontheung P, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery [J]. Clin Cancer Res, 2008,14(19):6246-6252.
- [5] Schaaaij-Visser TB, Graveland AP, Gauci S, et al. Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(24):7666-7675.
- [6] 王文梅,郑春兰,胡勤刚,等. 口腔鳞癌组织与口腔正常黏

膜组织蛋白质差异表达的初步研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2009,25(4):540-543.

- [7] Mlynarek AM, Balys RL, Su J, et al. A cell proteomic approach for the detection of secretable biomarkers of invasiveness in oral squamous cell carcinoma [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007,133(9):910-918.
- [8] 谭丽娜,黄进华. 结合珠蛋白的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006,26(1):43-47.
- [9] 王平,刘红,李一石,等. 触珠蛋白基因型与糖尿病患者心血管并发症的关系[J]. 基础医学与临床, 2011,31(8):949-950.
- [10] 王冯滨,杨海英,欧强,等. 乙型肝炎患者血浆中触珠蛋白和补体 B 因子的检测及临床意义[J]. 肝脏, 2009,14(4):313-314.
- [11] 赵群,段微,吴玉梅,等. CA125 阴性卵巢癌血清标志物差异蛋白质组学的研究[J]. 现代妇产科进展, 2008,17(5):337-341.
- [12] 邓洪宇. 血清触珠蛋白检测在卵巢癌诊断中的意义[J]. 河北医药, 2011,33(15):2356-2357.
- [13] 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.
- [14] 王春玉,钱采韵,黎明,等. 触珠蛋白可能是阿尔茨海默病患者血清生物标志[J]. 中华神经科杂志, 2006,39(8):559-561.
- [15] 聂贻娟,周建华,李茂玉,等. 肺鳞癌患者与健康人血清的差异蛋白质组学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008,35(3):349-355.
- [16] 徐树建,徐泽宽,王富强,等. 应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌血清肿瘤标志物[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2009,29(4):534-538.
- [17] 王家祥,杨少波,刘秋亮,等. 肾母细胞瘤患儿血清蛋白质标志物的筛选及鉴定[J]. 中华医学杂志, 2009,89(18):1259-1263.

(收稿日期:2011-04-03 修回日期:2011-12-19)

(上接第 765 页)

- 中国医学科学院学报, 2010,32(3):347-351.
- [7] 梁祚仁,刘长晖,刘超. 广西 3 个少数民族 17 个 Y-STR 位点的遗传多态性[J]. 基础医学与临床, 2009,29(5):488-494.
- [8] 霍婧,刘全华,华丽,等. RANTES 和 Eotaxin-3 基因单核苷酸多态性与儿童哮喘的关系[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2010,30(2):129-131.
- [9] Kennedy MJ, Loehle JA, Griffin AR, et al. Association of the histamine N-methyltransferase C314T (Thr105Ile) polymorphism with atopic dermatitis in Caucasian children [J]. Pharmacotherapy, 2008,28(12):1495-1501.
- [10] Wu C, Hu Z, Yu D, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations [J]. Cancer Res, 2009,69(12):5065-5072.
- [11] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010,60(5):277-300.
- [12] 段纪俊,陈万青,张思维. 中国恶性肿瘤死亡率的国际比较[J]. 中国社会医学杂志, 2009,26(6):377-378.

- [13] Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25 [J]. Nature, 2008,452(7187):633-637.
- [14] Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease [J]. Nature, 2008,452(7187):638-642.
- [15] Amos CI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25. 1 [J]. Nat Genet, 2008,40(5):616-622.
- [16] 杨磊,吕潇潇,凌晓璇,等. 尼古丁受体 3 基因启动子多态与被动吸烟者发生肺癌的易感性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010,17(13):972-975.
- [17] 杨建强,徐生新. 一种从口腔拭子中提取 DNA 的简易方法[J]. 第三军医大学学报, 2010,32(7):731-732.

(收稿日期:2011-11-14 修回日期:2011-12-20)