

· 综 述 ·

ITRAQ 蛋白技术在消化系肿瘤研究中的应用*

王 鸣 综述, 王志强[△] 审校

(中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科, 北京 100853)

关键词: 蛋白质组学; 肿瘤; 消化; 定量

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)10-1170-03

蛋白质组学研究策略能高通量地、动态地对比分析健康和疾病不同状态下蛋白质表达谱的改变, 可有效地应用于肿瘤标志物的筛选、鉴定、肿瘤分类、治疗效果的评价及肿瘤发生机制等方面的研究, 使得肿瘤的诊断、分类、疗效评价由过去应用单一的肿瘤标志物进行判断发展成为现在的应用蛋白质组学或基因表达谱的改变来进行综合判断。

蛋白质组学研究技术中双向凝胶电泳技术是目前使用较为广泛的、发展最为成熟的蛋白质组学研究方法。双向凝胶电泳技术及其他蛋白质组学研究技术无法进行多组样本的同时研究, 也无法进行定量蛋白质组学研究, 即便是此后出现的同位素标记亲和和标签技术也只能对蛋白质进行相对定量研究。2004 年美国应用生物系统公司推出了一项新的同位素标记技术: 同位素标记相对和绝对定量(isobaric tag for relative and absolute quantitation, ITRAQ), 可真正实现对蛋白质的绝对定量检测, 其关键是 iTRAQ 试剂。该试剂由三部分组成, 一端为指示基团, 中间为中性平衡基团, 另一端为反应基团, 指示基团的相对分子质量有 4 种, 分别为 114.1×10^3 、 115.1×10^3 、 116.1×10^3 和 117.1×10^3 , 与之相对应的平衡基团相对分子质量依次为 31×10^3 、 30×10^3 、 29×10^3 和 28×10^3 , 4 种指示基团及其相对应的平衡基团的相对分子质量和都为 145.1×10^3 , 故 iTRAQ 技术有 4 个试剂, 即 114、115、116、117, 可以同时研究 4 组样品; 而反应基团能与氨基酸 N 端及赖氨酸侧链连接的胺标记同重元素, 亦可以标记修饰后的氨基酸, 故可对磷酸化蛋白、糖基化蛋白等翻译后修饰蛋白进行定量、定性研究。ITRAQ 联合液相串联质谱技术(liquid chromatography coupled mass spectrum)可同时检测 4 组或者 8 组的样品, 为多个不同时间段的样品分析、膜蛋白研究、疾病标志物的发现与鉴定提供定量信息, 并可感兴趣的目标蛋白进行绝对定量, 且比其他蛋白质组学定量方法更加得敏感^[1-3]。iTRAQ 技术的大体流程为: 样品先经胰蛋白酶裂解、烷基化、酶解成肽段, 随后用 iTRAQ 试剂多重标签进行差异标记, 再将标记样本相混合, 最后用 LC-MS/MS 进行检测, 检测后得到的数据采用生物信息学进行分析^[2]。

本文综述了 iTRAQ 技术在消化系肿瘤研究中的应用, 主要从标志物筛查、肿瘤发生、发展机制及肿瘤治疗研究三方面进行阐述。

1 标志物筛查研究

蛋白质组学技术早先是主要被应用于寻找肿瘤标志物, 科学家们期待能够通过蛋白质组学研究寻找到能够应用于肿瘤诊断、甚至早期诊断的标志物。iTRAQ 技术自应用来, 也是

如此。

Pawar 等^[4] 采用了 iTRAQ 结合液相质谱技术比较了食管癌及癌旁组织的蛋白差异, 共发现 257 个蛋白在两组间存在差异, 其中包含一些既往已被证实食管癌组织中升高的蛋白质, 如凝血酶敏感蛋白 1、骨膜蛋白 1 及热休克蛋白 70 等, 此外还发现并通过免疫组化证实一些新的蛋白在食管癌组织中高表达, 如前列腺血清酸性磷酸酶、网格蛋白 1、二硫键异构酶 A4; 证实 iTRAQ 技术用于寻找肿瘤标志物可靠, 且能有新的发现。

Loei 等^[5] 通过对胃癌细胞系 AGS and MKN7 分泌物蛋白质组学检测, 并从中筛选出胃癌细胞分泌蛋白, 并对蛋白进行免疫组化验证, 发现颗粒体蛋白(GRN)在胃癌组织中显著升高, 且在血清中得到进一步验证; 用血清血清颗粒体蛋白诊断胃癌 ROC 曲线下面积可达 0.64, 认为这一指标可以用于胃癌诊断。Chong 等^[6] 比较健康人、早期胃癌、晚期胃癌患者血清蛋白差异, 发现血浆 C9 蛋白在胃癌患者中显著升高, 且在晚期胃癌中升高高于早期胃癌, 盲法检测显示 C9 用于诊断胃癌的灵敏度可达 90%, 特异度可达 74%, 血浆 C9 检测有望能够改善胃癌的筛查。而 Chong 等^[7] 同时也通过胃癌动物模型和细胞系研究, 发现 α 胰蛋白酶抑制剂 H3 重链在胃癌动物模型血清中显著升高, 随后在胃癌患者及对照血清中的检测证实, 血清 α 胰蛋白酶抑制剂 H3 重链可用于胃癌诊断, 用于诊断胃癌的灵敏度可达 96%、特异度可达 66%。

在肝癌标志物研究中, 许多研究者都用 iTRAQ 技术通过不同的标本路径入手, 得到了很多新的发现。Chaerkady 等^[8] 从肝癌组织标本入手, 找到了一些新的蛋白如干扰素诱导蛋白、蛋白乳表皮生长因子 8、骨髓相关分化标志物、纤维介素等在肝癌组织中高表达, 而几乎所有涉及尿素代谢途径的蛋白都显著降低, 证实定量蛋白质组学技术用于寻找肿瘤标志物是可行的, 且有新的发现。Lee 等^[9] 则选择血清样本研究, 以和肝癌的起源、进展相关 N-聚糖蛋白为筛寻目标, 采用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术检测肝癌和健康人血浆蛋白, 找到了 14 个差异的 N-聚糖蛋白, 其中玻连蛋白及抗凝血酶 III 在肝癌患者血清中升高, 在肝癌组织中也发现同步升高。除肝癌标志物外, Wang 等^[10] 通过对动物肝癌转移肿瘤模型研究发现转醛醇酶在肝癌转移动物模型组织和血清中升高, 并在人肝癌患者血清中得以证实, 转醛醇酶用于诊断转移肝癌和非转移肝癌其灵敏度为 77.8%, 特异度为 86.1%。

Jankova 等^[11] 用 iTRAQ 结合质谱比较了结肠癌肿瘤黏膜及癌旁正常黏膜的蛋白差异, 其中涉及糖酵解、钙结合及蛋白

* 基金项目: 2011 年国家青年科学基金项目资助(81101644)。

作者简介: 王鸣(1979~), 主管技师, 本科, 主要从事蛋白质组学技术研究。

[△] 通讯作者, E-mail: wazq301@263.net.

酶抑制等方面蛋白在结肠癌组织中升高,而这些蛋白可能成为结肠癌的肿瘤标志物。为了研究更加精确,得到纯度更加高的肿瘤标本,通过显微切割结肠癌组织获取结肠癌细胞,经 iTRAQ 检测鉴定发现嗅球蛋白 4 在腺瘤及早期结肠癌组织中高表达, Besson 等^[12]认为嗅球蛋白 4 可能作为早期的结肠癌标志物。以上研究结果均在组织中得以证实,但未在血清中得以验证,其结果作为诊断的标志物效果则有待商榷。而 Fan 等^[13]采用 iTRAQ 技术结合质谱技术检测结肠癌及癌旁组织,发现 SEC61 β 表达于癌组织中 3 倍高于癌旁正常组织,研究发现 SEC61 β 用于诊断结肠癌的灵敏度可达 79%, 特异度可达 75%, 这一结果将来可能改善结肠癌的临床诊断。

2 肿瘤机制研究

肿瘤生长受到多种因素的调节,其中就受到肿瘤细胞的分泌蛋白调节。iTRAQ 蛋白技术被用于研究胃癌不同分化能力的细胞系分泌蛋白。研究发现并已验证组织蛋白酶 S 在胃癌细胞分泌物中高表达。组织蛋白酶 S 涉及胃癌细胞分化迁移侵袭,大约 197 种蛋白和组织蛋白酶 S 途径相关。组织蛋白酶 S 与胃癌转移密切相关,而这一结果将为后续的研究奠定基础^[14]。为研究结肠癌中 Smad4 调节转化生长因子 β 传导 (TGF- β) 途径, Ali 等^[15]运用 iTRAQ 技术比较 Smad4 阴性和 Smad4 阳性的结肠癌细胞系蛋白差异,发现 TGF- β 途径中 S100 A4 蛋白的表达与 Smad4 相关。Ghosh 等^[16]通过比较结肠癌淋巴转移细胞系和原位细胞系的蛋白差异,发现在结肠癌高转移细胞系中 β -连环蛋白低表达伴随钙结合蛋白(一种 β -连环蛋白降解蛋白)高表达;提示钙结合蛋白高表达和肿瘤的高转移相关,且钙结合蛋白高表达细胞系细胞黏附功能降低,这一结果的发现将有助于人们更好的理解结肠癌转移。类似 iTRAQ 技术应用于消化系肿瘤机制的研究不多,但随着研究深入,这类研究会给人们越来越多的惊喜。

3 肿瘤治疗探索

肝癌多重耐药性一直是肝癌治疗的障碍,其耐药的原因错综复杂。iTRAQ 技术比较 BEL7402 肝癌细胞系 5-FU 耐药和非耐药细胞株的蛋白差异,发现在耐药细胞株中 ANXA3 蛋白高度表达,有助于进一步理解肝癌耐药原因,为肝癌药物治疗提供新思路^[17]。

短链脂肪酸被证实能够通过诱导细胞成熟,抑制肿瘤细胞生长,分化及凋亡。Tan 等^[18]通过比较经丁酸盐短期干预后的结肠癌细胞及未干预的结肠癌细胞蛋白差异,发现一批与丁酸盐作用相关蛋白,这些蛋白涉及肿瘤细胞生长、凋亡和转移方面,明确丁酸盐治疗结肠癌的机制,也提供了结肠癌化疗和新药物治疗的新靶点。而 Kilner 等^[19]则通过 iTRAQ 技术进一步证实短链脂肪酸中除丁酸盐外戊酸盐、丙酸盐均有相类似作用,但具体作用方式略有不同。丁酸盐作用靶点主要在于角蛋白和中间丝,而戊酸盐位点在 β 微管蛋白亚型表达和微管,丙酸盐则涉及中间丝,这些研究结果为治疗提供了更加明确的方向。抗肿瘤药物 LY294002 抑制结肠癌磷酸肌醇 3 激酶途径,但其具体机制一直不明。通过比较结肠癌细胞系经 LY294002 处理前后蛋白差异,研究者发现结肠癌细胞 LY294002 处理后氨酰基-tRNA 合成酶、分子伴侣及糖酵解酶等显著减少,而这些酶与 P53 基因相关,故 LY294002 抗血管生成作用可能通过 P53 基因作用,故抑制 P53 基因突变在结肠癌磷酸肌醇 3 激酶途径治疗中起重要作用^[20]。

iTRAQ 技术的出现大大促进了蛋白质组学的发展,但其中也存在一定的缺点性,如:由于 iTRAQ 试剂几乎可以与样

本中的所有蛋白结合,易受样本中杂质蛋白及样本处理过程中缓冲液污染;因此对待测样本进行预处理,并尽量减少操作过程中的污染,操作的精细和质量控制尤为重要,另外, iTRAQ 试剂昂贵;但无论如何 iTRAQ 技术大大促进了消化系肿瘤蛋白质组学研究,随着后续技术的完善和研究投入增加, iTRAQ 必将更加广泛地应用在消化系肿瘤的各个方面,且研究将会更加的精细和完善。

参考文献:

- [1] Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, et al. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research [J]. *Proteomics*, 2007, 7 (3): 340-350.
- [2] Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(7): 1501-1508.
- [3] Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags [J]. *Brief Funct Genomic Proteomics*, 2006, 5(2): 112-120.
- [4] Pawar H, Kashyap MK, Sahasrabudhe NA, et al. Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(6): 510-522.
- [5] Loei H, Tan HT, Lim TK, et al. Mining the gastric cancer secretome: identification of GRN as a potential diagnostic marker for early gastric cancer [J]. *J Proteome Res*, 2011, 11(3): 1759-1772.
- [6] Chong PK, Lee H, Loh MC, et al. Upregulation of plasma C9 protein in gastric cancer patients [J]. *Proteomics*, 2010, 10(18): 3210-3221.
- [7] Chong PK, Lee H, Zhou J, et al. ITIH3 is a potential biomarker for early detection of gastric cancer [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3671-3679.
- [8] Chaerkady R, Harsha HC, Nalli A, et al. A quantitative proteomic approach for identification of potential biomarkers in hepatocellular carcinoma [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(10): 4289-4298.
- [9] Lee HJ, Na K, Choi EY, et al. Simple method for quantitative analysis of N-linked glycoproteins in hepatocellular carcinoma specimens [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 308-318.
- [10] Wang C, Guo K, Gao D, et al. Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples [J]. *Cancer Lett*, 2011, 313(2): 154-166.
- [11] Jankova L, Chan C, Fung CL, et al. Proteomic comparison of colorectal tumours and non-neoplastic mucosa from paired patient samples using iTRAQ mass spectrometry [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(11): 2997-3005.
- [12] Besson D, Pavageau AH, Valo I, et al. A Quantitative Proteomic Approach of the Different Stages of Colorectal Cancer Establishes OLFM4 as a New Nonmetastatic Tumor Marker [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(12): M111.
- [13] Fan CW, Chan CC, Chen KT, et al. Identification of

- SEC61 β and its autoantibody as biomarkers for colorectal cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(11/12): 887-893.
- [14] Yang Y, Lim SK, Choong LY, et al. Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4767-4778.
- [15] Ali NA, McKay MJ, Molloy MP. Proteomics of Smad4 regulated transforming growth factor-beta signalling in colon cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(11): 2332-2338.
- [16] Ghosh D, Yu H, Tan XF, et al. Identification of key players for colorectal cancer metastasis by iTRAQ quantitative proteomics profiling of isogenic SW480 and SW620 cell lines[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(10): 4373-4387.
- [17] Tong SW, Yang YX, Hu HD, et al. Proteomic investigation of 5-fluorouracil resistance in a human hepatocellular carcinoma cell line[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 113(5): 1671-1680.
- [18] Tan HT, Tan S, Lin Q, et al. Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(6): 1174-1185.
- [19] Kilner J, Waby JS, Chowdry J, et al. A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2011, 8(4): 1146-1156.
- [20] Mallawaarachy DM, Mactier S, Kaufman KL, et al. The phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002, decreases aminoacyl-tRNA synthetases, chaperones and glycolytic enzymes in human HT-29 colorectal cancer cells[J]. *J Proteomics*, 2011, 75(5): 1590-1599.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-22)

· 综 述 ·

股骨粗隆间骨折内固定手术治疗的研究进展

李 意 综述, 李新志 Δ 审校

(三峡大学仁和医院骨科, 湖北宜昌 443001)

关键词: 股骨粗隆间骨折; 内固定; 分型; 手术治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)10-1172-04

股骨粗隆间骨折, 又称股骨转子间骨折, 是指股骨颈基底至小粗隆水平之间的骨折, 属于关节囊外骨折, 好发于老年患者^[1]。对于青壮年患者而言, 股骨粗隆间骨折多因高能量损伤所致, 多合并有其他部位损伤。老年患者常合并有骨质疏松症, 轻微外力即可造成股骨粗隆间骨折并且骨折大多为不稳定骨折, 保守治疗需长期卧床, 容易导致深静脉血栓、坠积性肺炎、褥疮等一系列并发症, 对老年患者远期生活质量造成重大影响。Lin 等^[2]报道保守治疗所引起的髓内翻等并发症发生率高达 50%, 死亡率也高达 35%。如今随着内固定器械不断发展进步和治疗方法的不断改进, 以及围手术期诊疗水平的不断提高, 股骨粗隆间骨折越来越趋向于手术治疗^[3-4]。目前, 临床应用于股骨粗隆间骨折的固定材料较多, 总体上可以分为髓外钉板系统和髓内固定系统^[24]; 髓外钉板系统有 Jewett 钉及麦氏鹅头钉、AO/ASIF 角度钢板、动力髌螺钉(DHS)、动力髁螺钉(DCS)、经皮加压钢板(PCCP)、锁定加压钢板(LCP); 髓内固定系统有 Ender 钉、Gamma 钉(DN)、股骨近端髓内钉(PFN)、股骨近端防旋髓内钉(PFNA)、Intertan 髓内钉。学界对于不同类型股骨粗隆间骨折如何选择最佳内固定物, 意见尚不统一。本文现就内固定系统治疗进展综述如下。

1 髓外钉板系统

1.1 Jewett 钉和麦氏鹅头钉 Jewett 钉是 70 年代以前主要的内固定器械, 后改用麦氏鹅头钉, 它是在三翼钉与侧钢板之间用 1 枚螺丝钉固定, 这类钉板虽然在调节颈干角方面较方便, 但是其连接结构大大降低了该部位的机械强度, 容易出现尾钉穿破股骨头和断钉可能, 造成骨折畸形愈合, 延迟愈合甚至骨不连, 目前临床上已极少使用。

1.2 AO/ASIF 角度钢板 90 年代 AO 学派首先应用角度钢板治疗股骨粗隆间骨折, 其主要适应证为 Evans 分类 I 型的 I c 型、I d 型及 II 型骨折。但由于其配套器械设备较为复杂, 使用不方便, 且须配有透视设备辅助, 角度钢板对术者的操作技术要求非常高, 要求一次性打入成功, 反复操作可使角钢板刀刃部松动, 而且角度不可调。特别对于股骨小转子撕脱性移位、第 1 根螺钉无法使其固定的不稳定性骨折, 在应用时须谨慎操作。

1.3 DHS DHS 又称 Richards 钉, 20 世纪 70 年代以来广泛应用于临床, 目前已成为治疗股骨粗隆间骨折的标准内固定方式。其特点是加压拉力螺钉可在套筒内随着向下拧入使螺钉向外下方滑移, 促使骨折断端间尽可能相互靠近, 达到解剖复位, 有利于骨折愈合, 起到“加压”作用, 符合髋部生物力学要求^[5]。Jacobs 等^[6]通过生物力学研究与临床应用, 证实 DHS 有动、静力加压及张力带作用, 能保持良好的颈干角, 以达到坚强内固定效果。但 DHS 最大的缺点是无有效的抗旋转能力, 有研究证实其抗旋转强度仅为 3.3 kg/m, 且由于 DHS 是髓外固定系统, 钢板贴附于股骨负重线外侧, 若股骨内侧皮质骨缺损丢失易使内翻应力全部施加于外侧钢板, 可能发生近端螺钉松动切割股骨头, 甚至使钢板断裂、髓内翻畸形以致肢体短缩等并发症的发生, 以致需行二次手术^[7]。Hrubina 等^[8]通过回顾性分析应用 DHS 治疗 341 例股骨近端骨折患者(其中双侧骨折患者例数为 26 例), 39 例(约占 11%)出现了术中(17 例)和术后(22)并发症: 术中并发症包括固定不牢靠(10 例)、克氏针穿破顶端(3 例)、操作程序的失误(2 例)及远端骨折(2 例); 而术后并发症包括螺钉穿出股骨头(6 例)、股骨头缺血性坏死

作者简介: 李意(1986~), 住院医师, 在读硕士研究生, 主要从事创伤、关节疾病的治疗工作。 Δ 通讯作者, Tel: 13972518057; E-mail: lixy@163.com.