

乳腺癌术后骨转移患者血清差异蛋白的质谱分析*

张朋¹, 锡林宝勒日^{2△}, 白靖平², 江仁兵², 陈勇忠¹, 黄哲¹, 李星³

(1. 南京军区福州总院四七六医院骨科, 福州 350000; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院骨与软组织肿瘤科, 乌鲁木齐 830011; 3. 凡星博奥北京科技有限公司, 北京 100080)

摘要:目的 获取乳腺癌术后骨转移患者和无转移患者的血清肽质量指纹图谱(PMF), 筛选并鉴定与乳腺癌骨转移相关的血清差异蛋白, 同时建立乳腺癌骨转移的诊断模型。方法 采用 Clinprot 液体芯片飞行时间质谱系统(Clinprot™ MALDI-TOF MS)获得两组血清标本(单纯骨转移及无转移患者各 18 例)的 PMF, 然后使用内嵌的统计分析软件筛选两组血清标本中有统计意义的差异蛋白峰。每组样品检测 2 次。结果 所有标本 5 d 后重复检测, 2 次质谱图基本一致, 随机选择 4 个蛋白峰计算变异系数(CV)均小于 30%, 说明该系统具有良好的可重复性。两组患者血清的 PMF 相比较, 蛋白峰差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 乳腺癌术后单纯骨转移与无转移患者无血清差异蛋白存在, 不能通过检测外周血的方法筛选乳腺癌骨转移差异蛋白。

关键词:乳腺肿瘤; 骨转移; 差异蛋白; Clinprot 系统

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)05-0566-03

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry analysis of differential serum proteins in breast cancer patients with bone metastasis*

Zhang Peng¹, Xilin Baoleri^{2△}, Bai Jingping², Jiang Renbing², Chen Yongzhong¹, Huang zhe¹, Li Xing³

(1. Department of Orthopedics, 476 Hospital of Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou, Fujian 350000, China; 2. Department of Bone and Soft Tissue Oncology, the Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3. Fanxing Biological Technology CO., Ltd., Beijing 100080, China)

Abstract: Objective To obtain the peptide mass fingerprintings(PMF) of serums of the patients with bone metastasis and without metastasis and to filtrate and identify the differential serum proteins of patients with bone metastasis after radical mastectomy. To establish diagnostic models for diagnosis of bone metastasis after breast cancer operation. **Methods** Two groups of serum samples were analyzed by Clinprot™ MALDI-TOF MS and gain PMF, 18 samples from patients with merely bone metastasis and 18 samples from patients without metastasis. Characteristic protein peaks were analyzed and selected by analyses software within Clinprot system. Every group was repeated 2 times. **Results** All serum samples were repeated after 5 days and the fingerprintings were similar to the former. 4 protein peaks were selected randomly to compute coefficient of variation which are less than 30%. The Clinprot system has excellent repeatability. No differential protein was detected by analyzing PMF($P > 0.05$). **Conclusion** No differential serum protein exists in patients with bone metastasis and without metastasis and detecting differential protein in peripheral blood may be impossible.

Key words: breast neoplasms; bone metastasis; differential protein; Clinprot system

术后肿瘤复发和转移是乳腺癌患者死亡的主要原因, 其中骨转移的发生率为 65%~75%, 首发症状为骨转移的患者占 27%~50%^[1-2]。乳癌患者一旦发生骨转移, 5 年生存率仅为 20%, 并且还可引起一系列的并发症, 比如骨痛、骨损伤以及骨相关事件(SEE_s)^[3], 是目前临床上降低乳腺癌患者生活质量和影响患者生存的重要因素。本研究采用 Clinprot 液体芯片飞行时间质谱系统(Clinprot™ MALDI-TOF MS)分析并筛选乳腺癌术后骨转移与无转移患者的血清差异蛋白, 为寻找乳腺癌骨转移相关的血清标志物提供实验依据, 同时为进一步阐明乳癌骨转移的分子机制以及开发逆转骨转移的靶向药物提供理论基础, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 2 月至 2010 年 10 月在新疆医科大学附属肿瘤医院住院复查的女性乳腺癌改良根治术后患

者 36 例, 术后病理组织学诊断均为乳腺浸润性导管癌。分组: (1)乳腺癌改良根治术后单纯骨转移(M 组)共 18 例。其中原发乳癌分期Ⅱ期 6 例, Ⅲ期 12 例。年龄 37~77 岁, 平均(52.72±11.89)岁; 术后至骨转移时间为 9~122 个月, 平均 33.7 个月; 所有患者均已行足疗程化疗, 其中 5 例 ER(+), PR(+), 9 例 ER/PR(+)均行内分泌治疗。入组者均经 ECT 及局部 CT、MRI 3 项检查诊断, 其中 4 例因椎体破坏疼痛剧烈行经皮穿刺椎体成形术, 术后病灶组织病理结果支持诊断; 且经 B 超等相关检查未发现重要脏器转移。抽血时间为诊断次日晨。(2)乳腺癌改良根治术后无转移组(S 组), 共 18 例。组织学病理分期及术后时间与 M 组相匹配的患者, 年龄 34~74 岁, 平均(52.89±12.37)岁; 所有患者均已行足疗程化疗, 其中 6 例 ER(+), PR(+), 9 例 ER/PR(+)均行内分泌治疗。入组者均经骨放射性核素扫描(ECT)检查未见明显异常; B 超

等相关检查未发现重要脏器转移。两组患者年龄等一般资料差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性, 本研究经患者知情同意和并经新疆医科大学伦理委员会通过。

1.2 主要试剂与仪器 丙酮、乙腈、乙醇、醋酸铵 (NH_4Ac)、Peptide Calibration Standard、Protein Calibration Standard I、弱阳离子交换磁珠 (MB-WCX)、三氟乙酸 (TFA)、Tris-HCL 等均购自 Sigma 公司; MALDI-TOF-MS 质谱仪及配套的 ClinProTools 分析软件购自 Bruker Daltonik 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及处理 空腹抽取 36 例患者全血 3 mL, 室温下静置 1 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入对应标号的冷冻管中, 每 20 μL 一管分装, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.3 试验方法

1.3.3.1 弱阳离子磁珠 (MB-WCX) 的处理 (1) 取 10 μL 磁珠和 10 μL 磁珠结合缓冲液 (BB), 混匀; (2) 加入 5 μL 血清, 吹打混匀; (3) 置于磁珠分离器, 静置 1 min, 移去上清液; (4) 加入 100 μL 磁珠清洗缓冲液 (WB), 静置 1 min, 移去上清液; (5) 重复步骤 (4) 2 次; (6) 加入 5 μL 磁珠洗脱缓冲液 (EB), 混匀; 静置 2 min, 将洗脱液移入样品管; (7) 向洗脱液中加入 5 μL 磁珠稳定缓冲液 (SB) 混匀, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存至质谱分析。

1.3.3.2 标准血清质控 标准血清经磁珠处理得到洗脱液, 用质谱采集数据, 每批数据采集完毕, 与数据库已有对应的相同磁珠相同采集方法的标准血清数据比较, 变异系数 (CV) $< 30\%$ 。

1.3.3.3 样品点靶 取 5 μL 的 0.4 mg/mL HCCA 基质, 加入 1 μL 的样品洗脱液, 吹打混匀; 取 1 μL 上述混合液体, 点在 600 μm Anchorchip 上, 室温干燥。

1.3.3.4 样品谱图的生成 采用 Clinprot 液体芯片飞行时间质谱系统获取两组患者血清肽质量指定图谱 (PMF)。(1) 在 Clinprot Standard 校正方法下, 对累加标准品图谱进行校正, 平均分子质量偏差应小于 100 ppm。(2) 将样品靶板放入 Microflex 质谱仪, 设定采集范围: $(1\sim 20) \times 10^3\text{ Da}$, 激光能量: 采用高激光能量轰一下结晶点 8 shots, 再用低于高激光能量 10%~20% 的能量采集 50 shots; (3) 同一样品同一结晶点, 调整采集点, 累加 8 个点的数据 (400 shots)。保存累加的 PMF。

1.4 统计学处理 采用 ClinProTools 软件分析前先对样品原始质谱图进行处理, 然后选择软件内嵌的统计算法对数据进行统计学分析, 获得两组血清的差异表达蛋白, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱检测的重复性验证 试验前将所有标本分成 2 份, 5 d 后重复检测, 试剂材料、方法步骤同前。结果显示两次 PMF 基本一致, 随机选择 4 个蛋白峰计算 CV 均小于 30%, 该系统具有良好的可重复性, 见图 1、2。

2.2 蛋白质谱分析 采用 Biomarker Wizard 软件进行数据分析, 未检测到有统计学意义的蛋白质峰谱差异, 未能建立诊断模型, 见表 1。

表 1 蛋白质谱统计学分析

检测峰序号	蛋白质峰 (m/z)	M 组蛋白平均丰度	S 组蛋白平均丰度	P
99	8 063.25	267.21 \pm 281.75	479.70 \pm 259.49	0.133
104	9 772.81	53.40 \pm 40.17	104.92 \pm 66.00	0.133

续表 1 蛋白质谱统计学分析

检测峰序号	蛋白质峰 (m/z)	M 组蛋白平均丰度	S 组蛋白平均丰度	P
85	5 467.83	13.82 \pm 5.49	19.39 \pm 4.63	0.133
98	7 844.70	14.25 \pm 7.22	23.49 \pm 10.47	0.241
100	8 237.93	100.45 \pm 78.38	108.67 \pm 76.42	0.293
43	3 140.31	45.79 \pm 7.90	53.69 \pm 9.38	0.293
90	5 925.73	49.13 \pm 25.73	63.58 \pm 23.84	0.457
74	4 695.45	41.57 \pm 15.50	50.79 \pm 14.79	0.457
84	5 447.45	15.89 \pm 9.22	22.50 \pm 11.05	0.457
34	2 221.96	21.80 \pm 12.79	15.98 \pm 6.23	0.457

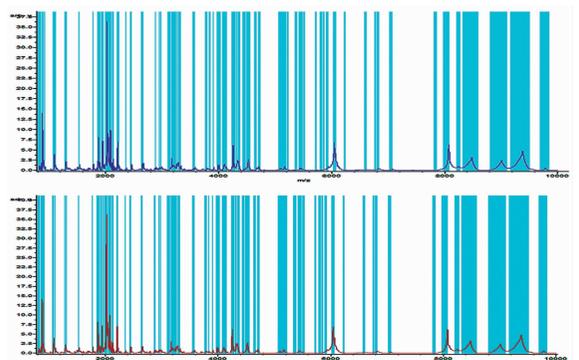


图 1 M 组 2 次重复试验的 PMF

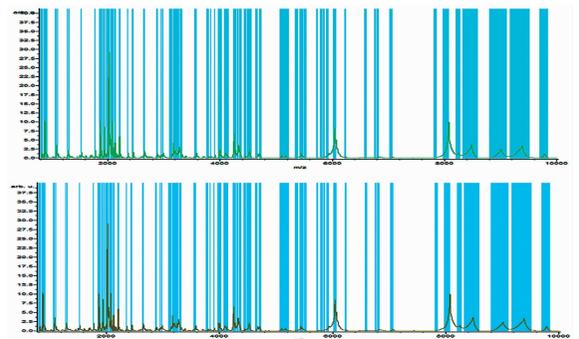


图 2 S 组 2 次重复试验的 PMF

2.3 对差异最显著的 M8063.25Da 和 M9772.81Da 进行分析 在 M 组各个样品谱图中 M8063.25Da 和 M9772.81Da 的丰度大部分低于 S 组。平均图谱中 M 组的 M8063.25Da 和 M9772.81Da 蛋白峰明显低于 S 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3~5。

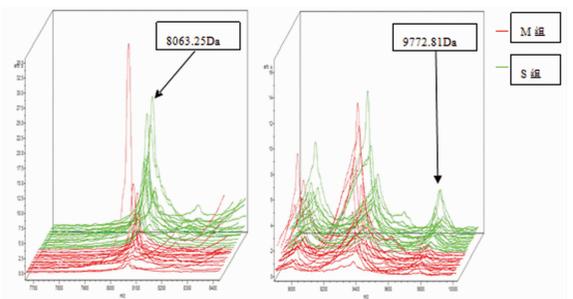


图 3 两组样本中 M8063.25Da 和 M9772.81Da 的质谱堆积图

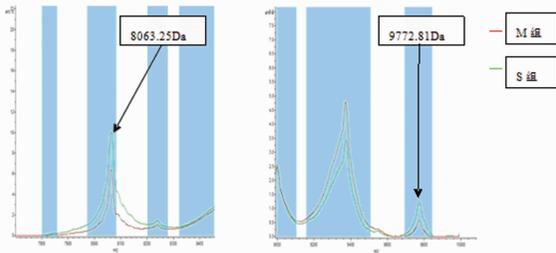


图 4 两组样本中 M8063.25Da 和 M9772.81Da 的平均质谱图

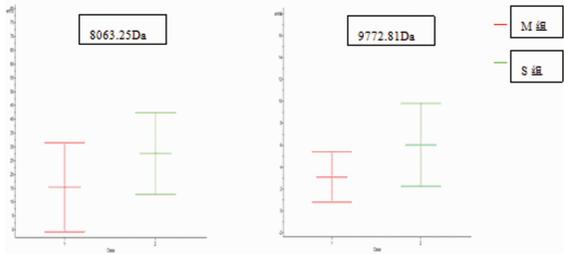


图 5 两组样本中 M8063.25Da 和 M9772.81Da 的平均值标准差比较图

3 讨论

Clinprot™ 液体芯片飞行时间质谱系统由功能磁珠、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)、ANCHORCHIP 技术和 ClinProTools 的生物信息学方法组成,已广泛应用于肿瘤标志物的筛选、鉴定和疾病诊断模型的建立,如口腔癌^[3]、卵巢癌^[4]、肾细胞癌^[5]、肺癌^[6]、食管癌^[7]、胃癌^[8]、胰腺癌^[9]、头颈部恶性肿瘤^[10]等疾病,并获得了令人满意的效果。

本研究采用 Clinprot 系统获得乳腺癌术后骨转移与无转移患者血清 PMF,发现两组血清蛋白的表达在一定程度上存在差异,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究没有检测到两组间的差异蛋白,未能建立乳腺癌骨转移的诊断模型。分析其原因可能为:(1)骨髓微转移(BMM)的影响。BMM 理论:乳腺癌是一种全身性疾病,肿瘤细胞在早期就经血流播散出现远处转移,即便原发肿瘤被切除,隐匿在体内的微小转移灶仍继续发展。患者常无任何临床表现,常规影像学检查及常规病理检查均难以发现。Slade 等^[11]对 23 例原发性乳腺癌外周血及骨髓进行微转移检测,外周血阳性率为 13%,骨髓检出率为 61%。提示在乳腺癌 BMM 的诊断中,外周血的检出率明显低于骨髓检出率,外周血检测不能替代骨髓检测。之后,Slade 等^[12]报道应用定量 PCR 及免疫组织化学检查外周血细胞角蛋白 19(CK-19)发现,手术前 51% 患者存在 BMM。收集的 91 例标本中,采用定量 PCR、免疫组织化学分别发现 87% 和 65% 的患者在随访期间出现 BMM 现象。因本研究患者均由 CT、MRI 或 ECT 等常规检查确定诊断,不排除 BMM 对试验结果的影响。(2)全身化疗的影响。化疗可减少或消灭微转移灶,抑制微转移灶的扩展,减少生长刺激因子的释放,减少甚至杀灭肿瘤细胞。国内外均有试验证实乳腺癌患者化疗后外周血微转移因子水平明显下降。Manhani 等^[13]利用 RT-PCR 检测乳腺癌患者 CK-19,阳性率由化疗前的 43.0% 降至 14.3% (3 周期化疗)和 18.9% (6 周期化疗)。Zheng 等^[14]采用巢式 RT-PCR 方法检测乳腺癌患者外周血中泌乳素诱导蛋白(PIP)mRNA 的表达变化发现,PIP 表达阳性的患者中有 76.5% 化疗后转为阴性。Zhang 等^[15]经

半定量 RT-PCR 检测乳腺癌患者 CK-20 mRNA,化疗后 31.8% 转为阴性,47.7% 表达明显下降。本研究中两组患者均已接受化疗,均可能对试验结果产生一定影响。(3)内分泌治疗的影响。乳腺癌的发生与雌激素的水平有关,内分泌治疗可改变激素依赖性肿瘤生长所需的内分泌微环境,使肿瘤细胞增殖停滞于 G₀ 或 G₁ 期,从而抑制肿瘤细胞的生长、增殖。两组中均有部分患者接受内分泌治疗,不排除治疗对试验结果的影响。(4)由于研究经费及时间限制,有限的血清样品只重复检测了 2 次。

综上所述,乳腺浸润性导管癌改良根治术后单纯骨转移与无转移患者不存在血清差异蛋白,不能通过检测外周血的方法筛选乳腺癌骨转移差异蛋白。通过上述研究,为笔者下一步加入骨髓进行对照检测,增加样本量及重复检测次数奠定了基础。笔者希望能够筛选出敏感性高、特异性强的肿瘤标志物,最终能广泛应用于乳腺癌骨转移的筛查。

参考文献:

- [1] 孙燕,于世英,江泽飞,等. 恶性骨肿瘤骨转移及骨相关疾病临床诊疗专家共识[M]. 北京:北京大学医学出版社,2010:1-10.
- [2] Akhtari M, Mensuri J, Newman KA, et al. Biology of breast cancer bone metastasis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(1):3-9.
- [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):2236-2244.
- [4] Ziganshin RK, Alekseev DG, Arapidi GP, et al. Serum proteome profiling for ovarian cancer diagnosis using ClinProt magnetic bead technique and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Biomed Khim*, 2008,54(4):408-419.
- [5] Chinello C, Gianazza E, Zoppis I, et al. Serum biomarkers of renal cell carcinoma assessed using a protein profiling approach based on ClinProt technique[J]. *Urology*, 2010,75(4):842-847.
- [6] Du J, Yang S, Lin X, et al. Use of anchorchip-time-of-flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2010,5:60.
- [7] Liu LH, Shan BE, Tian ZQ, et al. Potential biomarkers for esophageal carcinoma detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010,48(6):855-861.
- [8] Liu W, Gao X, Cai Q, et al. Identification of novel serum biomarkers for gastric cancer by magnetic bead[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2010,2:961-971.
- [9] Kojima K, Asmellash S, Klug CA, et al. Applying proteomic-based biomarker tools for the accurate diagnosis of pancreatic cancer[J]. *J Gastrointest Surg*, 2008,12(10):1683-1690.
- [10] Freed GL, Cazares LH, Fichandler CE, et al. Differential capture of serum proteins for expression profiling and biomarker discovery in pre-and posttreatment head and neck cancer samples[J]. *Laryngoscope*, (下转第 571 页)

胞发生过度自噬时,将导致滋养细胞死亡。由于滋养细胞一半遗传物质来源于父系,因此细胞自噬所致的细胞裂解,将释放出具有父源性物质的部分,而这部分物质作为抗原,可诱发母体免疫反应,从而使母体血液淋巴细胞被激活,进而攻击滋养细胞,滋养细胞受损将导致胎盘着床过浅、微细梗死灶、小面积早剥点等。从而导致胎儿与母体营养交换障碍,进而导致子痫前期患者胎儿宫内一系列发育问题。本研究应用激光共聚焦检测的方法,证实了经缺氧处理后,滋养细胞可发生明显的自噬,这也为自噬与子痫前期发病关系的研究奠定了一定的理论基础。

激光共聚焦显微检测是自噬研究的重要手段^[10-11],由于自噬体本身呈现酸性,与细胞质物质及细胞质内其他亚细胞器的酸碱度不一致,因此在染料染色后所呈现的颜色也不同,而普通荧光显微镜波长有限,不能很好地区分两种不同颜色的物质成分,因而也不能很好地将自噬体与亚细胞器等正常结构区别开来,而激光共聚焦显微检测则很好地解决了这一问题。同时 LC3 是自噬的标志物之一,其中 LC3-I 是 LC3 的细胞质形式,通过翻译后修饰转变为 LC3-II。而 LC3-II 是自噬体膜构成的关键蛋白^[12-13]。本研究激光共聚焦显微检测结果与 LC3-II 的 PCR 测试结果相符合。因此,激光共聚焦显微检测是自噬研究的重要形态学方法之一,随着自噬研究的广泛开展,激光共聚焦显微检测也必将得到进一步发展及价值体现,将激光共聚焦显微检测技术应用于子痫前期重度的发病机理和病理生理的应用研究,有利于探索子痫前期重度的临床诊疗效果。

参考文献:

- [1] Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells[J]. *World J Biol Chem*, 2012, 3(1): 1-6.
- [2] Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2405-2419.
- [3] 陈国庆, 张华, 漆洪波, 等. 滋养细胞自噬在重度子痫前期发病中的作用与分子机制[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(3): 294-296.
- [4] Papageorghiou AT, Yu CK, Bindra R, et al. Multicenter screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine artery Doppler at 23 weeks of gestation[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001, 18(2): 441-449.
- [5] Plasencia W, Maiz N, Bonino S, et al. Uterine artery

Doppler at 11⁺⁰ to 13⁺⁶ weeks in the prediction of pre-eclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007, 30(4): 742-749.

- [6] Yu CK, Smith GC, Papageorghiou AT, et al. An integrated model for the prediction of pre-eclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(1): 429-436.
- [7] Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1 [J]. *Oncogene*, 2010, 29(19): 2831-2842.
- [8] Yu J, Deshmukh H, Payton JE, et al. Array-based comparative genomic hybridization identifies CDK4 and FOXM1 alterations as independent predictors of survival in malignant peripheral nerve sheath tumor [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1924-1934.
- [9] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy[J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914-922.
- [10] Indelicato M, Pucci B, Schito L, et al. Role of hypoxia and autophagy in MDA-MB-231 invasiveness[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2): 359-368.
- [11] Han J, Pan XY, Xu Y, et al. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage[J]. *Autophagy*, 2012, 8(5): 812-825.
- [12] Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion[J]. *Cell*, 2007, 130(6): 165-178.
- [13] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3 [J]. *Autophagy*, 2007, 3(5): 452-460.

(收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-11-04)

(上接第 568 页)

- 2008, 118(1): 61-68.
- [11] Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3): 870-879.
- [12] Slade M, Singh A, Smith BM, et al. Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years [J]. *Int J Cancer*, 2005, 14(1): 94-100.
- [13] Manhani AR, Manhani R, Soares HP, et al. CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast

cancer patients correlates with response to chemotherapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66(3): 249-254.

- [14] Zheng ZD, Yu GZ, Wang JJ. Research on changes of PIP mRNA expression in the peripheral blood of patients with breast cancer before and after adjuvant chemotherapy[J]. *Chinese Clin Oncol*, 2009, 14(3): 203-206.
- [15] Zhang JL, Wang L, Ling R, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood of patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2008, 15(1): 44-46.

(收稿日期: 2013-09-15 修回日期: 2013-11-04)