

蛋白质组学技术在筛选生物标志物方面的应用研究进展

李林蔚¹, 丁德馨², 李广悦², 胡南², 易岚^{1,2,3*}

(1. 南华大学药学与生物科学学院生物研究所, 湖南衡阳 421001;

2. 南华大学矿业工程博士后科研流动站; 3. 南华大学铀矿冶生物技术国防重点学科实验室)

摘要: 随着蛋白质组学技术的不断发展, 蛋白质作为生物标志物在肿瘤的早期诊断以及治疗效果评价等方面的应用日益广泛。近年来, 蛋白质组学技术在环境污染预警方面的作用也日益受到关注。本文就几种常用的蛋白质组学分离分析技术及其在肿瘤相关生物标志物、环境污染预警生物标志物筛选中的应用做一综述。

关键词: 蛋白质组学; 生物标志物; 肿瘤; 环境污染

中图分类号: Q81 **文献标识码:** B

生物标志物(biomarker)是指可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生的改变的生化指标, 如 DNA、RNA、蛋白质、酶、脂类、糖类、代谢物等都可以作为生物标志物用于研究。生物标志物可应用于疾病的早期诊断和监测治疗效果, 发现治疗药物靶位^[1-2]; 可以阐明各种污染物的作用机理, 确定各种污染物与生物体之间已发生的相互作用; 此外, 标志物还可以用于流行病学或毒理学研究, 以判断生物是否暴露于某些环境因素中。筛选出有用的生物标志物不但对疾病的诊断和治疗有着重大的意义, 并可以与生态学效应相联系, 从而制定研究解决环境问题的方案。以前常用于筛选生物标志物的方法是基因组学, 随着人类基因组测序的完成, 人们发现基因的表达方式错综复杂, 基因组学不能回答人类关于生命活动的许多问题, 而蛋白质才是基因功能的实施者, 了解蛋白质的结构、定位和蛋白质间相互作用和蛋白质的功能则明显更有利于了解生命现象的本质, 这便是蛋白质组学(proteomics)^[3]。本文就蛋白质组学在筛选生物标志物中的研究进展综述如下。

1 蛋白质组学技术

1.1 蛋白质组学分离标记技术 基于质谱数据统计分析的非标记分离方法利用蛋白质分子量和等电点不同来分离蛋白质的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)和双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)。基于和液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)联用的同位素标记技术利用同位素编码亲和标签(ICAT)、细胞培养氨基酸稳定同位素标记(SILAC)或同位素标记相对和绝对定量标记(iTRAQ)^[4]等。

1.2 蛋白质组学分析技术

1.2.1 质谱技术(MS) 质谱分析是一种测量离子荷质比(电荷—质量比)的分析方法, 其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离, 生成不同荷质比的带正电荷的离子, 经加速电场的作用形成离子束进入质量分析器, 在质量分析器中, 再利用电场和磁场使发生相反的速度色散, 将它们分别聚焦而得到质谱图, 从而确定其质量。MS 是不可或缺的核心蛋白质组技术, 可以高度敏感和高通量鉴定蛋白质或多肽以及转录后修饰。最常用的 MS 技术包括: 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS、表面增强激光解吸电离飞行时间质谱 SELDI-TOF-MS、MS/MS(串联 MS)等。近几年 MS 技术发生了巨大的变化, 出现新一代的质量分析器和复杂的多级仪器如四极杆飞行时间串联质谱技术(Q-Q-TOF)和飞行时间串联质谱仪(TOF-TOF)等^[5]。

1.2.2 定向蛋白质组学 定向蛋白质组学(targeted

收稿日期: 2015-01-07; 修回日期: 2015-3-10

基金项目: 国家自然科学基金(81400117), 国防基础科研重点项目(B3720132001), 中国博士后基金(2014M562115), 湖南省自然科学基金(2015JJ4042)。

* 通讯作者, E-mail: yilanyok@126.com.

proteomics)技术是利用质谱仪对一组经过预筛选的蛋白质样品进行分析。这种预筛选过程是通过选择反应监控技术(selected reaction monitoring, SRM)实现的,SRM 根据待分析的目标蛋白氨基酸序列,选择对应的蛋白质特异性肽段(proteotypic peptide, PTP)及 PTP 对应的高响应离子,最后用高响应离子的信号强度来反映该蛋白质的表达丰度。这些信号强度大且能够确定唯一目标蛋白的肽段被称为 PTP,并与对应的高响应离子组成一个母离子—子离子对。SRM 实验通常基于三重四极杆(triple quadrupole, QQQ)串联质谱仪,也可以在线性离子阱(linear ion trap)质谱仪或者四极杆—飞行时间(Q-TOF)质谱仪上进行^[6]。与目前仍占主导地位的鸟枪法蛋白质组学技术相比,使用了 SRM 的蛋白质探测技术速度更快,更直接。因此,以质谱为基础的定向质谱技术的应用在更广泛的范围内迅速攀升,正在迅速成为一个可以替代或互补 ELISA(目前蛋白质定量的金标准)的技术,并且能缩短实验室发现的生物标志物和临床应用之间差距^[7-8]。

1.2.3 蛋白质微阵列(蛋白质芯片) 蛋白质微阵列(protein microarrays)的基本原理是将抗原、抗体、小肽、受体和配体、蛋白质-DNA 和蛋白质-RNA 复合物等蛋白质有序地固定于滴定板、载玻片等各种载体上制成芯片,然后,用标记了特定荧光的蛋白质或其他成分与芯片作用,洗去未能与芯片上的蛋白质互补结合的成分,再利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术,测定芯片上各点的荧光强度,通过荧光强度分析蛋白质与蛋白质之间相互作用的关系,由此达到测定各种蛋白质的目的。蛋白质微阵列可分蛋白检测芯片和蛋白功能芯片。蛋白检测芯片将具有高度亲和特异性的探针分子(如单克隆抗体)固定在基片上,用于识别复杂生物样品中的目标蛋白/多肽。蛋白质功能微阵列是在阵列上包含完整的功能蛋白质/域,可以研究蛋白质的一个特殊亚型或整个蛋白质组的生物化学活性^[4,9]。

2 蛋白质组学在肿瘤相关生物标志物筛选中的应用

2.1 蛋白质组学在肺癌相关生物标志物筛选中的应用

肺癌是癌症死亡的最常见原因之一,5 年存活率在所有癌症中是最低的,只有 15%。肺癌的死亡率高,不仅是由于晚期诊断,而且即使被诊断为

I 期肺癌患者也缺乏有效的治疗方法。因此,迫切需要发现新的生物标志物用于肺癌的诊断、预后评估以及打开新的治疗途径。

2.1.1 肺癌的诊断 Ding 等^[10]通过研究 92 例肺癌患者、38 例细菌性肺炎患者和 42 例健康对照的血清和胸腔积液,发现肺癌患者中胸腔积液/血清的转甲状素蛋白 TTR 比值较细菌性肺炎患者的更高,应用 MALDITOFMS 分析发现肺癌患者和细菌性肺炎患者的血清中有 4 个对应 TTR、Sul-TTR、Cys-TTR 和 Cysgly-TTR 的主要峰,肺癌患者胸腔积液中的 Cysgly-TTR 比例增高,研究数据表明,结合胸腔积液/血清 TTR 比值和修饰后 TTR 能更有效的区别诊断肺癌患者与细菌性肺炎患者。

2.1.2 肺癌的预后评估 化疗是大多数肺癌患者的标准治疗方法,而只有少数晚期非小细胞肺癌(NSCLC)患者化疗有效,所以通过生物标志物评估肺癌患者化疗治疗的预后尤为重要,Voortman 等^[11]应用 MALDI-TOF-MS 研究 27 例 NSCLC 患者用顺铂—吉西他滨和硼替佐米化学治疗的血清肽质谱,从血清肽丰度的动态变化发现,一种 13 肽标志物在区别患者治疗后是短的无恶化存活期(PFS)还是长的无恶化存活期上具有 86% 准确率、100% 灵敏度和 73% 特异性,一种 5 肽标志物在区分患者对治疗是部分应答还是不应答具有 89% 准确率、100% 灵敏度和 83% 特异性。由于长的 PFS 和较长的总生存率相关,所以分析这些血清多肽组可能有助于预测晚期 NSCLC 患者的化疗治疗效果。

2.1.3 肺癌的新治疗靶点 由于肺癌的 80% 以上都是 NSCLC,所以找到治疗 NSCLC 的靶点可以有效提高肺癌的 5 年存活率,Shaomin 等^[12]在三位手术 NSCLC 患者中取得约 250 mg 的肿瘤组织和非肿瘤邻近组织,并用 2D-DIGE 技术从这两种组织的组织间质液(TIF)中得到 24 个差异蛋白质点,应用 LC-MS/MS 技术分析这 24 个差异蛋白质后,发现肿瘤组织的 TIF 过氧化物酶基因 1 (PRDX1) 的表达上调,最后用 ELISA 验证了 40 例 NSCLC 患者平均为 36 ng/mL 的 PRDX1 明显高于 20 例肺良性疾病患者平均 6.26 ng/mL 的 PRDX1,研究表明,PRDX1 可能与 NSCLC 的淋巴结转移及分化程度相关,PRDX1 可以归因于恶性转化的 NSCLC,并且可能成为 NSCLC 的治疗靶点。

2.2 蛋白质组学在胰腺癌相关生物标志物筛选中的应用 胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一个治

疗方法有限的致命恶性肿瘤,具有非常高的死亡率,降低 PC 的死亡率不仅需要技术的进步,而且需要检测出对 PC 具有高特异性的新生物标志物。由于晚期 PC 的 5 年存活率低,所以可以检测出疾病蔓延前阶段的早期诊断标记就可以改变 PC 患者的命运^[13-14]。Pan 等^[15]应用基于 SRM 技术的定向蛋白质组学研究 PC 患者,慢性胰腺炎患者和正常人的血浆样本中一组候选癌症生物标志物的含量,这 5 个候选癌症生物标志物包括人分层蛋白(14-3-3 protein sigma)、凝溶胶蛋白(gelsolin)、光蛋白聚糖(lumican)、谷氨酰胺转移酶 2(transglutaminase 2)和组织金属蛋白酶抑制 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1)。研究发现,凝溶胶蛋白、光蛋白聚糖及组织抑制剂金属蛋白酶 1 可能比 CA19-9 更能分辨 PC 患者和慢性胰腺炎患者或正常人。除此之外,结合相补充的个体生物标记物可能在原有的特异性上提高生物标志物的灵敏度,比如,虽然光蛋白聚糖可以很好的区分癌症和健康对照者,但难区分癌症和胰腺炎,凝溶胶蛋白能更好的区分癌症和胰腺炎。比起光蛋白聚糖或凝溶胶蛋白各自单独作为生物标志物,两者一起,作为一个联合生物标志物小组,可以表现出更高的灵敏度同时有 95% 特异性。所以,定向蛋白质组学可以补充 ELISA 方法应用于验证这些候选生物标志物在临床应用中的潜在实用性^[16]。

2.3 蛋白质组学在肝癌相关生物标志物筛选中的应用

肝细胞癌(HCC)是全球主要的致命癌症,尽管有很多诊断方法,然而小肝结节等疾病与 HCC 的鉴别诊断仍然困难。先进的成像技术,联合辅助生物标志物磷脂酰肌醇聚糖 3(GPC3)、谷氨酰胺合成酶(GS)和热休克蛋白 70(HSP70)可以增强诊断的准确性,但是,仍需准确性灵敏性更高的生物标志物来辅助鉴别诊断。Reis 等^[17]用非标记技术和凝胶型蛋白质组学筛选出 HCC(18 例)和对应的非肿瘤肝组织(NTLT)的一批差异候选蛋白质,进一步在 HCC(78 例),肝细胞腺瘤(25 例;HCA),局灶性结节性增生(28 例;FNH),肝硬化(28 例)中比较这些已知蛋白质生物标志物的诊断准确率,发现 14-3-3 Sigma(14-3-3S)显示出最显著上调(58.8 倍),并相对 GPC3(64.7%)和 GS(45.4%)有着更好的诊断准确率(73.0%),且具有高灵敏度(96.0%)。所以,14-3-3S 是一个有潜力的蛋白质生物标志物,可以进一步改善肝细胞肿瘤鉴别诊断过程的准确性。

3 蛋白质组学在环境污染预警生物标志物筛选中的应用

3.1 空气污染预警生物标志物筛选 随着生活质量越来越好,人们的生存环境却越来越差,各种工业过程、供热、烹调过程中燃煤与燃气或燃油排放的烟尘、交通工具向大气中排放的尾气等污染造成城市空气质量下降,对人类健康造成巨大的危害。颗粒物 PM(particulate matter)可以通过呼吸进入人体危害健康引发疾病,粗颗粒 PM10(直径 2.5 ~ 10.0 μm)就可以吸入肺部,通常沉积在上呼吸道;细颗粒 PM2.5(直径 < 2.5 μm)可深入到细支气管和肺泡;而超细颗粒(UFPs)和纳米颗粒 NP(直径 < 0.1 μm)为人的危害更大^[18]。Kang 等^[19]用蛋白质组学分析对比正常环境下小鼠哮喘模型和暴露在含有多环芳香烃(PAH)的 UFP 环境下小鼠哮喘模型的支气管肺泡灌洗液蛋白组,发现实验组支气管肺泡灌洗液蛋白组有蛋白质表现出显著增强的上调,分别是多聚免疫球蛋白受体、补体 C3、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、几丁质酶 3 样蛋白 3、几丁质酶 3 样蛋白 4 和酸性哺乳动物几丁质酶,研究中发现 NGAL 也许可以修复 UFP 引起的毒性,并可能是确定呼吸道氧化应激状态的有效生物标志物。所以生物标志物的研究将发现这些不利健康的颗粒对人体产生相关临床表现前的早期生物事件提供有价值的预警信息^[20]。

3.2 核污染预警生物标志物筛选 随着放射性物质和电离辐射设备在国民经济各领域中的广泛应用,这些放射性物质本身或者其遗留物对生物环境和人类造成的破坏也日益受到关注。这些核辐射物质可以通过多种途径进入生物体内,成为“隐形杀手”,对生物物种造成各种损害^[21]。因此,筛选出检测速度快、对辐照敏感核污染预警生物标志物,不仅为核污染的生物防护工作打下基础,而且对生物物种甚至人类起到保护作用。

近年,公众越来越关注低剂量辐射对健康的影响。虽然高剂量率辐射暴露细胞反应的分子事件已得到充分的研究,但是长期暴露于极低剂量率辐射的影响目前尚不清楚。Nakajima 等^[22]通过二维电泳分析在低剂量率(0.032 $\mu\text{Gy}/\text{min}$ 、0.65 $\mu\text{Gy}/\text{min}$ 和 13 $\mu\text{Gy}/\text{min}$)照射 485 天的小鼠肝脏中蛋白的表达,发现其中一种蛋白质表现出显著的表达变化,被确定为硫氰酸酶(硫代硫酸硫转移酶),研究结果表

明,硫氰酸酶是一种由低剂量率辐射引起的新蛋白质,并进一步分析能够提供发现极低剂量率辐射暴露的影响。这种蛋白可能成为明确低剂量辐射效应和新防御系统的关键^[22]。

随着蛋白质组学研究方法的更新和研究数据的不断积累,越来越多的生物标志物被发现,但是,筛选出来的生物标志物是否能达到实际应用的要求,还需要大量的研究和验证。

参考文献:

- [1] Lee JM, Han JJ, Altwerger G, et al. Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development[J]. *J Proteomics*, 2011, 74(12):2632-2641.
- [2] Savino R, Paduano S, Preianò M, et al. The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11):13926-13948.
- [3] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes[J]. *Nature*, 2000, 405(6788):837-846.
- [4] Haqqani AS, Kelly JF, Stanimirovic DB. Quantitative protein profiling by mass spectrometry using isotope-coded affinity tags[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 439:225-240.
- [5] Alex P, Gucek M, Li X. Applications of proteomics in the study of inflammatory Bowel Diseases: current status and future directions with available technologies[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15(4):616-629.
- [6] 常乘, 吴松锋, 马洁, 等. 基于质谱的选择反应监测技术相关策略和方法的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(11):1118-1127.
- [7] Doerr A. Mass spectrometry-based targeted proteomics [J]. *Nat Methods*, 2012, 10(1):23-23.
- [8] Korte EA, Gaffney PM, Powell DW. Contributions of mass spectrometry-based proteomics to defining cellular mechanisms and diagnostic markers for systemic lupus Erythematosus[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(1):204.
- [9] Sutandy FX, Qian J, Chen CS, et al. Overview of protein microarrays[M]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, 27: 271.
- [10] Ding H, Liu J, Xue R, et al. Transthyretin as a potential biomarker for the differential diagnosis between lung cancer and lung infection[J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(5):765-769.
- [11] Voortman J, Pham TV, Knol JC, et al. Prediction of outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy and bortezomib by timecourse MALDI-TOF-MS serum peptide profiling[J]. *Proteome Sci*, 2009, 7:34.
- [12] Li S, Wang R, Zhang M, et al. Proteomic analysis of non-small cell lung cancer tissue interstitial fluid[J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11:173.
- [13] Kaur S, Baine MJ, Jain M, et al. Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments[J]. *Biomark Med*, 2012, 6(5):597-612.
- [14] Bhat K, Wang F, Ma Q, et al. Advances in biomarker research for pancreatic cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(17):2439-2451.
- [15] Pan S, Chen R, Brand RE, et al. Multiplex targeted proteomic assay for biomarker detection in plasma: a pancreatic cancer biomarker case study[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3):1937-1948.
- [16] Paulo JA, Lee LS, Wu B, et al. Mass spectrometry-based proteomics of endoscopically collected pancreatic fluid in chronic pancreatitis research[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2011, 5(3-4):109-120.
- [17] Reis H, Pütter C, Megger DA, et al. A structured proteomic approach identifies 14-3-3Sigma as a novel and reliable protein biomarker in panel based differential diagnostics of liver tumors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1857(6):641-650.
- [18] Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss SH, et al. The adverse effects of air pollution on the nervous system[J]. *J Toxicol*, 2012, 2012:782462.
- [19] Kang X, Li N, Wang M, et al. Adjuvant effects of ambient particulate matter monitored by proteomics of bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Proteomics*, 2010, 10(3):520-531.
- [20] Li N, Nel AE. Feasibility of biomarker studies for engineered nanoparticles: What can be learned from air pollution research [J]. *J Occup Environ Med*, 2011, 53(6 suppl):S74-S79.
- [21] Icrp, Khong PL, Ringertz H, et al. ICRP PUBLICATION 121: Radiological protection in paediatric diagnostic and interventional radiology[J]. *Ann ICRP*, 2013, 42(2):1-63.
- [22] Nakajima T, Taki K, Wang B, et al. Induction of rhodanese, a detoxification enzyme, in livers from mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays[J]. *J Radiat Res*, 2008, 49(6):661-666.

(此文编辑:朱雯霞)