

胆管癌患者与健康志愿者血清样品蛋白质表达差异分析

练惠辉¹⁾ **, 韩鹏¹⁾ **, 邱乒乓¹⁾, 康劲翮¹⁾, 戴燕燕¹⁾,
李华亮¹⁾, 李文岗²⁾ *, 陈清西¹⁾ *

¹⁾ 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

²⁾ 福建医科大学附属厦门第一医院, 厦门 361004)

摘要 胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是一种难于早期诊断和治疗的恶性肿瘤. 利用蛋白质组学技术以期筛选出人血清中具有医学价值的胆管癌癌变的标志物. 利用白蛋白/IgG去除试剂盒去除血清中高丰度的白蛋白和IgG,再经丙酮沉淀得到高质量的血清样品. 样品经双向电泳(2-DE)得到了分辨率较好的胆管癌血清的蛋白点图谱. 利用Image Master 2D软件对比分析了胆管癌病人和正常健康对照组的2-DE图谱. 其中,表达上调蛋白有8个,表达下调蛋白有6个. 用质谱获得上述差异蛋白的肽质量指纹图谱,并经数据库检索共鉴定出了11种差异蛋白质,其中8种蛋白质的表达与胆管癌密切相关. 本研究为阐明胆管癌的机理提供了一条新途径.

关键词 胆管癌;双向电泳;蛋白质组学;血清

中图分类号 R135;TQ93

Comparative Proteomic Analysis of Serum from Cholangiocarcinoma Patients and Normal Cohorts

LIAN Hui-Hui¹⁾ **, HAN Peng¹⁾ **, QIU Ping-Ping¹⁾, KANG Jing-He¹⁾, DAI Yan-Yan¹⁾,
LI Hua-Liang¹⁾, LI Wen-Gang²⁾ *, CHEN Qing-Xi¹⁾ *

¹⁾ Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences,

Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²⁾ Xiamen First Hospital Attached to Fujian Medical University, Xiamen 361004, China)

Abstract The cholangiocarcinoma (CCA) is one of the prevalent cancers in China and often fails early diagnosis and medical intervention. We performed proteomic analyses of CCA serological profiles by protein precipitation with acetone after depleting high-abundant serum proteins using an Albumin/IgG Removal Kit. Compared with normal samples, 8 up-regulated and 6 down-regulated proteins were detected in the sera from CCA patients. Within the 11 proteins were identified with mass spectrometry, 8 proteins seemed to be related to CCA by bioinformatic database queries. The results might be for the diagnosis, treatment assessment and prognosis of CCA.

Key words cholangiocarcinoma; two-dimensional gel electrophoresis; proteomics; serum

收稿日期: 2008-09-05; 接受日期: 2008-12-30

福建省医学创新课题(No. 2007-CXB-9), 厦门市科技计划项目(No. 3502Z20063021)和厦门市卫生局资助项目(No. WSK0602)

* 联系人 Tel: +86-592-2185487; E-mail: chenqx@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-6593246; E-mail: lwg11861@163.com

** 共同第一作者

Received: September 5, 2008; Accepted: December 30, 2008

Supported by Medical Innovation Foundation of Fujian Province (No. 2007-CXB-9), Science and Technology Foundation of Xiamen (No. 3502Z20063021) and Health Bureau Project of Xiamen (No. WSK0602)

* Corresponding author Tel: +86-592-2185487; E-mail: chenqx@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-6593246; E-mail: lwg11861@163.com

** The two authors contributed equally to this work

胆管癌(cholangiocarcinoma)是一种恶性高、难于早期诊断和治疗的恶性肿瘤^[1]。从世界范围看,胆管癌占所有人类胃肠道肿瘤3%,是第二种多见的原发性肝癌。包括切除手术病人在内的全部胆管癌患者的5年生存率仅为5%,确实值得重视^[2]。

血清蛋白质组学是指研究选定的目标人群血清中表达的全部蛋白质,在建立正常蛋白质表达图谱(protein expression map, PEM)的基础上,寻找其差异蛋白质点,鉴定疾病相关蛋白质,进而研究其结构和功能,为研究重大疾病病理生理学机制、早期诊断的特异性标志物、药物作用靶点等开辟新的途径^[3]。

目前,在胆管癌细胞的蛋白质组学方面已有相关报道,而蛋白质组学在胆管癌血清中的研究还十分有限,国内没有发现有相关的报道。本文试图通过应用血清蛋白质组学技术对胆管癌的抗原进行筛选,寻找人血清中具有医学价值的胆管癌癌变的标志物^[4]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

超纯尿素(urea), Tris 购自 Amersco 公司。丙烯酰胺(acrylamide) 甲叉-双丙烯酰胺(*N,N*-methylenebisacrylamide) 购自 BIOASIA 公司, CHAPS, 四甲基乙二胺(TEMED), 过硫酸铵购自 Sangon 公司。SDS 分子量标准蛋白均购自 Amersham Bioscience 公司。白蛋白去除试剂盒(ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit)为 Merck Biosciences 产品。

1.2 样品及处理

样品来自福建省厦门市第一医院胆管癌患者和健康志愿者。其中胆管癌患者与健康志愿者样品各8例,胆管癌分级为一、二、三、四级各2例。通过静脉穿刺取病人晨血5 ml, 20℃ 凝血2 h后, 3 000 g, 4℃, 离心15 min, 取上清混合后, 等体积分装冻存^[5]。血清通过白蛋白去除试剂盒处理, 然后迅速经丙酮沉淀后用裂解液1:9直接裂解后制样。制备的样品用 Bradford 法测蛋白浓度。

1.3 双向凝胶电泳

第一向等电聚焦电泳(IEF): 参考文献[6], 电泳参数设置为: 400 V 电泳14 h后 800 V 电泳1 h。第二向 SDS-PAGE 采用不连续 SDS-PAGE。配制12.5%分离胶采用中板胶 16 cm × 14 cm 和 4% 浓缩胶, 电泳采用恒流每块胶 16 mA。待溴酚蓝迁移到离胶底边缘 1 cm 处停止电泳, 染色。

1.4 硝酸银染色法

采用非双胺化学显色银染法, 电泳凝胶经固定、敏化、银染、显色、终止步骤。具体操作方案见文献[7]。该方案优点为背景较浅, 显色时间长, 较易控制显色程度, 有利于双向电泳图谱显色的一致性, 且分辨率较高。

1.5 蛋白质胶内酶切

将选取的差异蛋白质点在图像上做好标记。用手术刀将银染蛋白点切下, 置于 600 μl Eppendorf 管中, 用含 30 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 和 100 mmol/L $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液进行脱色。直至胶粒无色。去上清 100 μl H_2O 水洗 5 min 3 次, 再加 100 μl 50 mmol/L NH_4HCO_3 振荡 20 min 后, 200 μl 水洗 1 min。 CH_3CN 溶液脱水后去上清, 胶粒真空离心干燥, 加入 10 mmol/L DTT, 57℃ 置于恒温水浴锅 45 min。去上清加入 55 mmol/L 碘乙酰胺进行烷基化, 避光 30 min。吸出上清液, 加入 CH_3CN 和 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液反复吸涨 2 次。胶粒真空离心干燥。加入适量胰蛋白酶液, 4℃ 冰盒中放置 45 min, 待酶液完全被吸收, 补充 25 mmol/L NH_4HCO_3 , 37℃ 保温 6~15 h。将萃取液吸出, 加入到另一 Eppendorf 管中保存, 向含有胶粒的 Eppendorf 管中加入 5% 三氟乙酸(TFA) 振荡 37℃ 放置 30 min, 上清液吸出合并。加入 2.5% TFA 和 50% CH_3CN 溶液, 振荡, 37℃ 放置 30 min, 与上述萃取液合并。真空离心干燥直至管中无液体。加入 0.5% TFA 1.5 μl 溶解, 取 1 μl 溶解液与 1 μl 饱和基质-羟基肉桂酸(HCCA) 混匀。用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS) 进行分析, 获得肽质量指纹图谱^[8]。

1.6 肽质量指纹图谱的分析和数据库检索

利用 MASCOT 网站提供的检索工具查询, 查询条件为: 肽片段分子质量最大允许误差控制在 100 ppm, 离子选择单同位素分子量 MH^+ , 酶解漏切位点 1 个, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰化 carbamidomethyl (C)^[9], 可变修饰为 oxidation (M)。在 MSDB 和 NCB Inr 数据库中检索。

1.7 凝胶扫描

凝胶图像通过紫光 D3000 扫描采集, 扫描结果用目前已被大多数研究者所采用的 GE 公司开发的 image master 双向分析软件分析。

2 结果

2.1 白蛋白和 IgG 的去除处理

参考文献[10], 在样品处理时, 采用 ProteoExtract

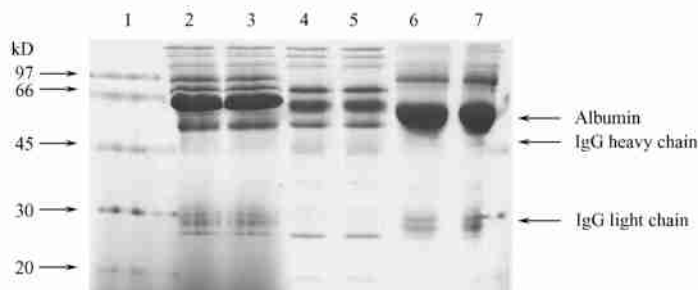


Fig. 1 Human serum proteins after depletion of high-abundant proteins using ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit

The proteins were separated on 12.5% SDS-PAGE. 1: Precision plus protein unstained standard (Amersham Biosciences, UK; 97, 66, 45, 30, 20.1 and 14.4kD); 2,3: Crude serum; 4,5: Depleted serum; 6,7: Bound proteins eluted from depletion columns

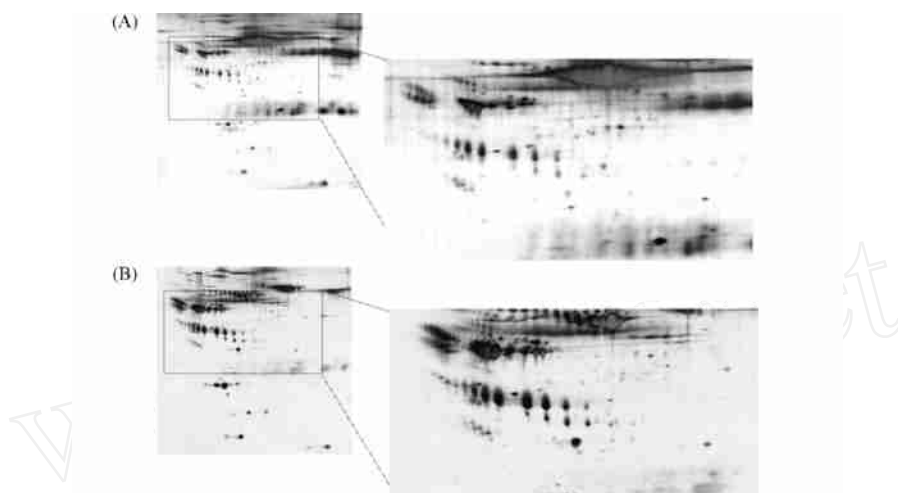


Fig. 2 Comparison of crude and depleted serum samples The depleted serum samples were prepared by the ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit, and all samples were isoelectric focused on 13.5 cm pH 3.5-10 NL strips in the first dimension and then separated on 12.5% SDS-PAGE. (A) Crude serum samples; (B) Depleted serum samples

Albumin/IgG Removal Kit 对样品进行合适的处理, 12.5% SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝 R-250 染色结果见 Fig. 1. 结果表明, 该试剂盒可以有效除去全血清中约 80% 白蛋白和 IgG, 非特异性吸附其它蛋白 < 5%. 增加了低丰度蛋白的上样量和提高了低丰度蛋白在双向电泳图谱中的呈现性, 减少了白蛋白和 IgG 对双向图谱蛋白呈现的影响, 实际效果见 Fig. 2.

2.2 2-DE 差异分析

本实验采用 pH 3.5 ~ 10 胶条和 12.5% 分离胶对血清样品进行双向电泳分析. 将健康组和病人组的血清样品分别混合消除个体差异性后, 对血清样品进行重复的多次双向电泳^[11]. 再各选取蛋白图谱较好的几张图谱用 ImageMaster 2D Platinum Trial 双向分析软件分析. 发现血清胆管癌血清样本组平均检出蛋白点 (339 ± 30) 个, 健康志愿者组平均检出蛋白点 (302 ± 25) 个. 相对于健康组, 病理状态时表达量上调显著的蛋白点有 8 个, 表达量下调的有 6 个^[12]. 健康组与胆

管癌病人组的典型 2-DE 图谱见 Fig. 3. Fig. 4 为胆管癌中表达上调的蛋白点局部放大图, Fig. 5 为胆管癌中表达下调的蛋白点局部放大图.

2.3 质谱鉴定

对 2-DE 所获得的 14 个差异点进行胶内酶解, 再用 MALDI-TOF 质谱分析, 得到蛋白的 PMF, 再与 Mascot Peptide Mass Fingerprint 数据库匹配, 成功鉴定出 11 种蛋白质^[10], 见 Table 1.

典型的质谱图及 MASCOT 得分见 Fig. 6 所示.

3 讨论

功能蛋白质组学研究过程中所需要的重要实验步骤之一就是复杂的体液样品进行逐一分离、分析与鉴定, 其分析结果用于筛选各种疾病的标志物. 由于血清是易从人体中直接获取的诊断疾病的标本, 尤其是血清含有反映人体各种健康与疾病发生、形成和突变等的丰富信息, 含有大量能诊断人类各

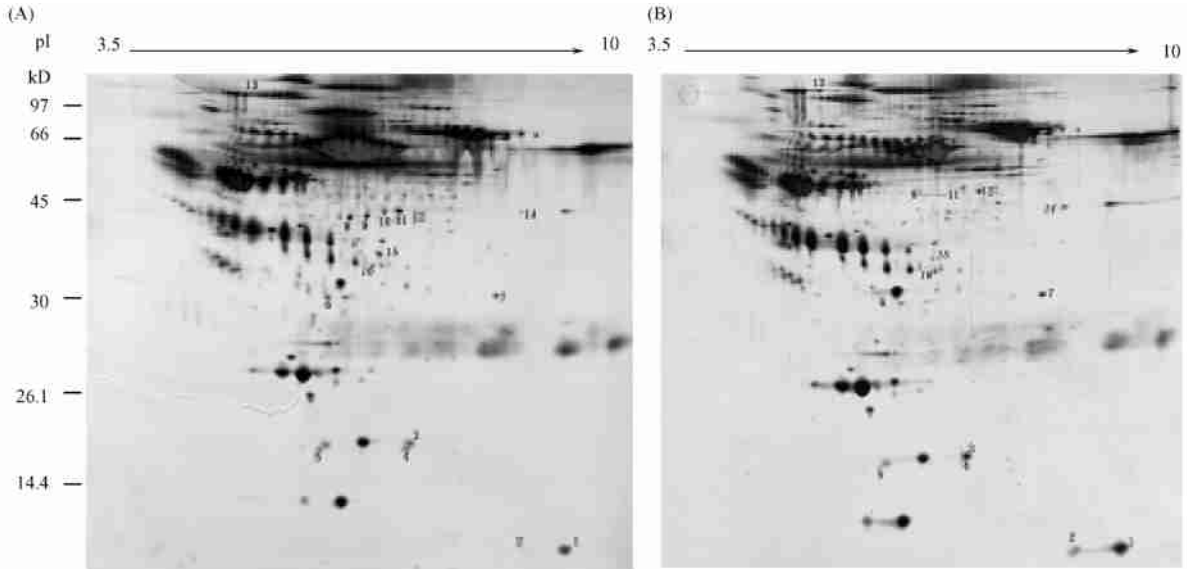


Fig. 3 Representative 2-DE image of normal volunteer (A) and patient serum (B) The protein extracts (100 μg) from serum samples were isoelectric focused on 13.5 cm pH 3.5-10 NL strips for 10 kV h and then separated on 12.5 % SDS-PAGE. Proteins were visualized by silver staining

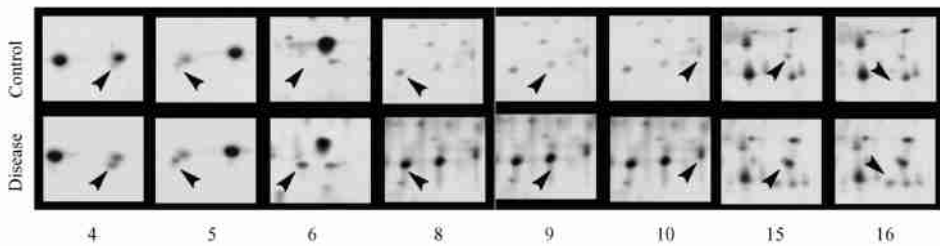


Fig. 4 The magnified areas of up-regulated protein spots on the 2-DE gels in the CCA patient serums compared with the normal serums Protein spots were indicated with arrows

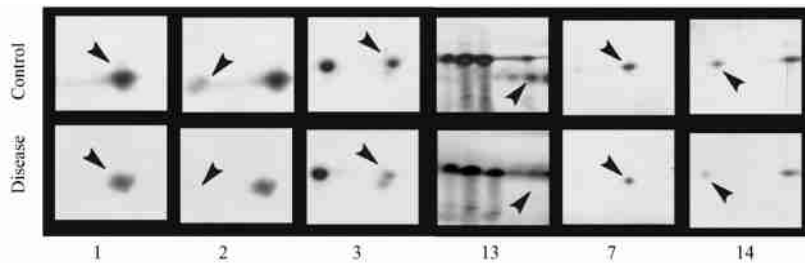


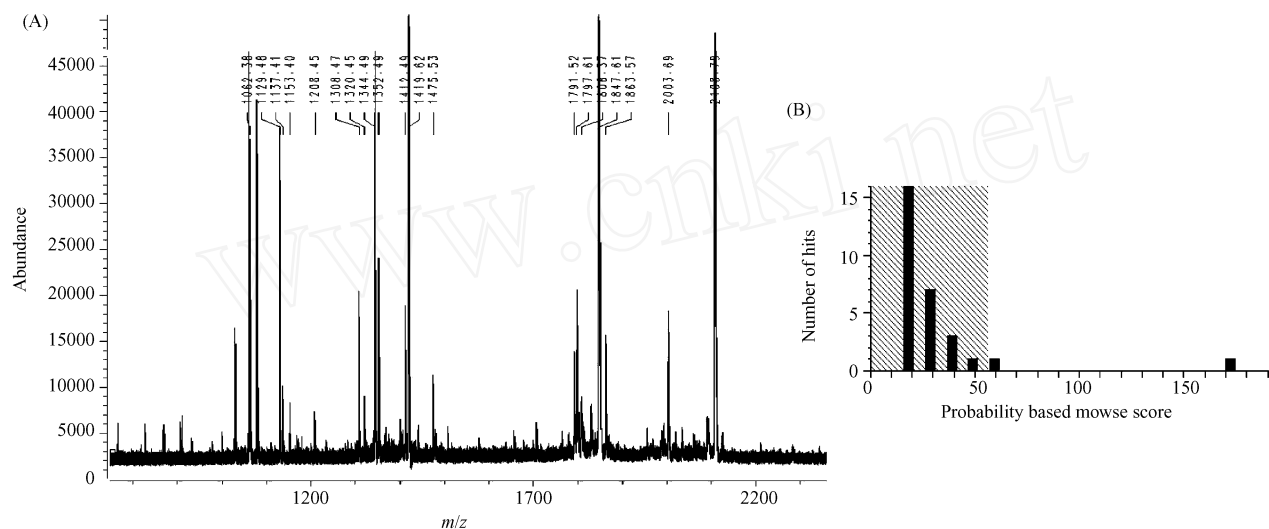
Fig. 5 The magnified areas of down-regulated protein spots on the 2-DE gels in the CCA patient serums compared with the normal serums Protein spots were indicated with arrows

种疾病的多肽与蛋白质,但由于血清生物组学极其复杂,易变化和组分之间的浓度差别很大等特点,目前,多数具有医学价值的多肽与蛋白质还有待于进一步分离与鉴定,拓展检测疾病的功能.因而利用蛋白质组技术筛选人血清中具有医学价值的蛋白质组具有重要的科学意义,尤其是诊断学意义.

已知人血清中含有成千上万种蛋白质,但蛋白质浓度的动态范围相差在 9-12 个数量级,含有大量的低丰度蛋白质,而这些低丰度蛋白质中有许多蛋白质是诊断各类疾病的标志物.因此,如何尽可能减少高丰度蛋白质的污染,又能显示出更多的低丰度蛋白质是至关重要的.我们选择了 Albumin/IgG

Table 1 Proteins in cholangiocarcinoma patient serums showing altered expression

Spot ID	Protein	Accession No.	Theoretical M_r /pI	Mascot score	Sequence coverage (%)
Downregulation					
1	Mutant hemoglobin beta chain	Q6V0K9	11524/6.17	80	51
2	Hemoglobin beta subunits are s-nitrosylated.	1BUWB	15622/6.76	72	41
3	Immunoglobulin heavy chain variable region precursor	AAC18179	15906/8.91	51	33
14	Keratin, 67K type II epidermal	A44861	66111/8.07	81	27
Upregulation					
5	Transthyretin, chain B	QABB	12995/5.53	71	50
8	Ka35 protein	Q6A163	57127/5.14	61	12
9	Alpha-1-B-glycoprotein	A02113	52479/5.65	66	18
10	Hypothetical protein TEK14	Q8WW24	51301/6.01	71	23
12	Cytokeratin 10	Q8N175	59020/5.09	73	17
15	KRT8	Q9610	41083/4.94	168	44
16	HUMAPOAIV NID	M14566	43358/5.22	95	17

**Fig. 6** Mass spectrometric characterization of cytokeratin 8 by MALDI TOF MS

(A) Matched peptide peaks were labeled with

mass values; (B) The MASCOT peptide and protein summary report score

Removal Kit 去除血清中高丰度的白蛋白和 IgG. 其去除原理是通过结合在介质上的单链抗体特异免疫吸附血清中的白蛋白和 IgG, 去除血清中最丰富的两类蛋白质, 其说明书介绍该试剂盒能够有效去除超过 90% 白蛋白和 IgG, 极少量的非特异吸附其他蛋白质, 去除效果较好, 蛋白质点的分辨率明显提高, 特别是蛋白质点增加很多, 一些低丰度蛋白质被分离出来. 本实验通过去除占血清总蛋白 80% 以上高丰度蛋白, 增加了蛋白质样品的上样量, 从而提高蛋白质分离效果.

目前, 蛋白质组学在胆管癌血清中的研究还十分有限, 国内没有发现有相关的报道. 2005 年, Svasti 等^[13]研究了 *Derris malaccensis* 中提取的物质对

胆管癌细胞的蛋白组学差异. 发现细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 7、18、19 等在胆管癌细胞中表达上调. 周福平等^[14]运用激光捕获显微切割技术, 建立了首张肝内胆管癌组织双向电泳图谱, 同时发现 78 个有差异蛋白点通过质谱鉴定, 20 个点仅在肝细胞癌中表达或者高表达, 而 8 个点仅在肝内胆管癌中表达或者高表达. 而本文关于胆管癌血清的蛋白质组学研究, 在国内尚属首例. 下面, 对一些质谱鉴定发现的与胆管癌相关的蛋白进行讨论.

CK 是角质细胞中的主要骨架蛋白, 主要在上皮细胞中表达^[15]. 目前研究发现, CK 具有高度保守性和组织分化特异性, 与上皮角质细胞的增殖分化密切相关, 对维持上皮细胞的形态和上皮连续性非常

重要。CK10为角化标志,通常表达于角化复层鳞状上皮的基底上层终末分化时具有角化能力和将要角化的细胞,它的表达与上皮角化状态有密切关系。有研究表明,CK10过度表达往往会导致上皮的分化和角化。Vanden Heuvel 等认为,CK19是胆管上皮标志物,可在多种肿瘤组织中表达,但确切的作用尚不完全清楚。近来发现,表达CK8和CK18的肝癌组织,邻近常见不典型增生的胆管上皮,提示CK8/CK18阳性的肝癌来源于胆管上皮^[16]。而我们研究证实,CK8和CK10与胆管癌密切相关。

转甲状腺素蛋白(transferrin, TTR)又称为前白蛋白(prealbumin, PA),维生素A运转蛋白,分子量大约为54 kD,由4个相同的亚单位组成。早年就发现,当转甲状腺素蛋白基因发生突变时,机体心肌及神经系统可发生广泛淀粉样病变^[17]。报道发现,人肝癌中TTR基因转录严重受阻。我们的研究发现,转甲状腺素蛋白在胆管癌中存在表达量升高的现象。TTR是一种肝脏、脉络丛和眼所产生的蛋白,已知它与转运甲状腺素和视黄醇(retinol)代谢相关,即TTR能与RBP形成复合物。视黄醇与上皮细胞分化有关,而胆管癌就是一种发生在胆管上皮的恶性肿瘤。

本实验结合MALDI-TOF鉴定出10个有意义的差异蛋白,这些蛋白可能成为鉴别胆管癌的肿瘤标记物,为进一步的研究提供依据。然而,关于它们的功能和在肿瘤发展中的作用有待于进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 李蓉,蔡中起,张静.胆管癌诊治进展[J].临床肝胆病杂志(Li Rong, Cai Zhong-Qi, Zhang Jing. The progress of cholangiocarcinoma [J]. Chin J Clin Hepatol, 2002, 18(4):204-205)
- [2] Malhi H, Gores G J. Cholangiocarcinoma: Modern advances in understanding a deadly old disease[J]. J Hepatol, 2006, 45(6):856-867
- [3] 廖秋林,陈晓东,丁彦青.血清蛋白质组学技术及研究进展[J].中国病理生理杂志(Liao Qiu-Lin, Chen Xiao-Dong, Ding Yan-Qing. Advance in serum proteomics research and technology[J]. Chin J Pathol, 2008, 24(2):402-407)
- [4] 母昭德,彭咏波,易发平,等.血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立[J].重庆医科大学学报(Mu Zhao-De, Peng Yong-Bo, Yi Fa-Ping, et al. Establishment of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for serum proteomics [J]. J Chongqing Med Univ, 2006, 31(6):821-823)
- [5] Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples[J]. Proteomics, 2005, 5(1):307-317
- [6] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem, 1975, 250(10):4007-4021
- [7] 郑伟,黄灵芝,赵莲,等.失血性休克大鼠肝脏蛋白质的差异分析[J].中国生物化学与分子生物学报(Zheng Wei, Huang Ling-Zhi, Zhao Lian, et al. Analysis of differential expression of proteins in rat liver under refractory hemorrhagic shock [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(4):316-322)
- [8] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6):1037-1053
- [9] 林建峰,田鸿宇,高霞,等.一种适合针刺活检样品的蛋白质组学分析方法[J].中国生物化学与分子生物学报(Lin Jian-Feng, Tian Hong-Yu, Gao Xia, et al. A proteomic method for core needle biopsy sample characterization [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2008, 24(3):221-230)
- [10] Chromy B A, Gonzales A D, Perkins J, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high abundant proteins [J]. J Proteome Rev, 2004, 3(6):1120-1127
- [11] 贾小芳,石倪,熊继先,等.鼻咽癌细胞系与永生化的鼻咽上皮细胞系蛋白质表达差异分析[J].中国生物化学与分子生物学报(Jia Xiao-Fang, Shi Ni, Xiong Ji-Xian, et al. Comparative proteome analysis of nasopharyngeal carcinoma cell lines with an immortalized nasopharyngeal epithelial cell line NP69 [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2008, 24(1):11-19)
- [12] 李薇,张一琼,王冠军,等.低剂量辐射后小鼠血清的蛋白质组学研究[J].中国实验血液学杂志(Li Wei, Zhang Yi-Qiong, Wang Guan-Jun, et al. Serum proteome in mice after low dose radiation [J]. J Exp Hematol, 2007, 15(1):191-194)
- [13] Svasti J, Srisomsap C, Subhasitanont P, et al. Proteomic profiling of cholangiocarcinoma cell line treated with pomiferin from *Derris malaccensis* [J]. Proteomics, 2005, 5(17):4504-4509)
- [14] 周福平,胡和平,艾建华,等.运用激光捕获显微切割对肝细胞癌与肝内胆管癌蛋白质组的分析[J].第二军医大学学报(Zhou Fu-Ping, Hu He-Ping, Ai Jian-Hua, et al. Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma by laser capture microdissection [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2005, 26(10):1111-1114)
- [15] 毛良军,古亚兰,聂敏海,等.细胞角蛋白10、13、14和19在OLP中的表达研究[J].临床口腔医学杂志(Mao Liang-Jun, Gu Ya-Lan, Nie Min-Hai, et al. Study on expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus [J]. J Clin Stomatol, 2007, 23(12):710-712)
- [16] 程瑞雪,梁英锐.肝内胆管癌角蛋白的免疫组化观察[J].湖南医科大学学报(Cheng Rui-Xue, Liang Ying-Rui. Immunohistochemistry of cytokeratin in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Bull Hunan Med Univ, 1989, 14(3):249-252)
- [17] Costa R, Gonçalves A, Saraiva MJ, et al. Transferrin binding to A-Beta peptide - impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity [J]. FEBS Lett, 2008, 582(6):936-942)