

## · 临床研究 ·

# 吉非替尼治疗前后肺腺癌患者血清蛋白质谱的变化

杨学宁 张绪超 杨衿记 黄玉娟 郭爱林 林嘉颖 安社娟 唐红艳 陈世良 黄迎 吴一龙

**【摘要】** 背景与目的 表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 治疗晚期NSCLC患者最终都会出现耐药。本研究目的是检测耐药前后血清蛋白质谱的变化, 探索可能用于预测TKI治疗后出现耐药的血清预测因子。方法 收集9例晚期NSCLC患者接受吉非替尼 (gefitinib) 治疗前后自身配对的血清样本20份, 即入组口服吉非替尼前及临床评价为疾病进展前两周所采集的外周血血清。所有的患者对吉非替尼的最佳总疗效评价为疾病稳定或部分缓解。所有样本用弱阳离子微珠进行预分离后, 在Bruker Autoflex™基质辅助激光解析离子化-时间飞行质谱仪 (MALDI-TOF-MS) 上进行血清蛋白质谱检测。以ClinProTools (Version: 2.1) 软件进行数据采集分析。结果 自身配对分析发现有7个血清蛋白质表达水平在肺癌患者耐药前后的血清中有统计学差异。该7个血清蛋白质谱峰为3 242.09、8 690.36、2 952.64、3 224.04、1 450.51、1 887.8及3 935.73 (m/z)。有3个血清蛋白 (3 242.09、2 952.64及3 224.04) 在耐药血清中下调, 其余4个血清蛋白 (8 690.36、1 450.51、1 887.8及3 935.73) 则出现上调。结论 特定的血清差异蛋白可能与吉非替尼治疗有效患者在治疗过程中出现耐药相关。这些差异蛋白的特性及其与吉非替尼治疗耐药的分子机制有待进一步研究。

**【关键词】** 肺肿瘤; 表皮细胞生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 血清蛋白; 生物标记物; 吉非替尼; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

**【中图分类号】** R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.07.018

## Analysis of Differentially Expressed Proteins in Self-Paired Sera of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients Responsive to Gefitinib

Xuening YANG, Xuchao ZHANG, Jinji YANG, Yujuan HUANG, Ailin GUO, Jiaying LIN, Shejuan AN, Hongyan TANG, Shiliang CHEN, Ying HUANG, Yilong WU

Guangdong General Hospital, Guangdong Lung Cancer Research Institute, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Yilong WU, E-mail: [syylwu@live.cn](mailto:syylwu@live.cn)

**【Abstract】** **Background and objective** All the advanced NSCLC patients that received EGFR-TKI therapy will eventually relapse after a period of efficacy. The aim of this study is to investigate the serum biomarkers as potential predictive factors for the efficacy of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI) targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. **Methods** Twenty self-paired serum samples were collected from 9 advanced NSCLC patients that evaluated as disease control (SD or PR) after gefitinib therapy, at the time points of before and after gefitinib treatment but 2 weeks before being evaluated as disease progress. All samples were pre-separated by WCX microbeads, and then detected on the MALDI-TOF-MS platform of Bruker Autoflex™. ClinProTools (Version: 2.1) was used to analyze the differentially expressed proteins. **Results** There were 7 protein peaks (m/z), 3 242.09, 8 690.36, 2 952.64, 3 224.04, 1 450.51, 1 887.8 and 3 935.73 found statistically differentially expressed between the self-paired samples. Three proteins (3 242.09, 2 952.64 and 3 224.04) were down-regulated and four proteins (8 690.36, 1 450.51, 1 887.8 and 3 935.73) up-regulated in gefitinib treated sera. **Conclusion** The data here suggest that several specific protein peaks might indicate gefitinib resistance, yet the identities of these proteins and the mechanisms underlying the responsiveness to gefitinib treatment need further investigation.

**【Key words】** Lung neoplasms; Epidermal growth factor receptor; Tyrosine kinase inhibitor; Serum protein; Biomarker; Gefitinib; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

This study was supported by a grant from the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (to Xuening YANG)(No.A2005023).

本研究受广东省医学科研基金项目 (No.A2005023) 资助

作者单位: 510080 广州, 广东省人民医院肿瘤中心, 广东省肺癌研究所, 广东省医学科学院 (通讯作者: 吴一龙, E-mail: [syylwu@live.cn](mailto:syylwu@live.cn))

以表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 为代表的靶向治疗是近年来非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 全身性治疗的最大进展之一。EGFR-TKI的出现为晚期NSCLC患者的治疗带来新的治疗获益, 然而多数对EGFR-TKI有反应的患者最终仍会出现耐药而使得疾病进展<sup>[1-3]</sup>。如何预测在TKI治疗过程中患者出现进展, 并及时检测进展而更换治疗方案具有重要的治疗参考意义。蛋白质谱技术平台的进步使得自动化和高度平行检测分析血清蛋白质谱变化成为可能<sup>[4]</sup>。

本研究以基质辅助激光解析离子化-时间飞行质谱仪 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析EGFR-TKI治疗获益的NSCLC患者在治疗前后的血清蛋白质谱的变化, 探索能够反映EGFR-TKI最终出现耐药时的血清标志物, 为临床中EGFR-TKI的疗效监测及预测提供有效的候选血清标志物。

### 1 材料和方法

**1.1 病例选择** 2004年6月-2005年11月, 在广东省肺癌研究所就诊的晚期非小细胞肺癌患者初次接受EGFR-TKI吉非替尼 (gefitinib) 治疗, 且在吉非替尼治疗后按实体瘤疗效评价RECIST标准最佳总疗效 (best overall response) 评价为部分缓解 (partial response, PR) 或者疾病稳定 (stable disease, SD) 的患者 (见表1), 随后出现疾病进展 (progression disease, PD)。本研究中没有完全缓解患

者。所有患者随访至2008年12月1日。

**1.2 样本采集** 按照标准血清蛋白质谱研究方法采集血清, 即在患者知情同意入组后, 服药前的早上9点空腹采集外周血, 静置凝血后取血清分装放置-80℃冰箱保存。患者一直服用吉非替尼直至临床评价为PD, 在此过程中每两周按照同样程序采集外周血样一次。本研究所用自身配对外周血清则为出现进展前最近一次的血清。

**1.3 血清蛋白质谱检测** 样本检测先按照弱阳离子微珠预分离试剂说明书操作, 要求将血清样本解冻后立即取5 μL加入相应的磁珠中, 所有的纯化步骤要一步完成。将经过WCX微珠处理后的样本按照MALDI-TOF质谱检测操作程序点样上质谱仪进行检测<sup>[5]</sup>。结果由随机软件ClinProTools (Version: 2.1) 采集信号并进行数据分析。血清蛋白峰信号组间分析统计方法用配对样本t检验, 以P<0.05为有统计学差异。

### 2 结果

共有9例晚期NSCLC患者符合病例选择标准。9例患者共收集20个血清 (2例患者有3个血清样本, 见表1)。20份自身配对血清样本均成功进行质谱检测分析。分析结果如下:

**2.1 患者临床特征资料及血清样本对应关系** 如表1所示, 患者病理组织学诊断均为腺癌, 接受吉非替尼治疗前均接受过一个方案的化疗, 对吉非替尼的最佳总疗效均为疾病稳定 (stable disease, SD) 或部分缓解 (partial response, PR), 所有的患者随后均出现疾病进展 (pro-

表1 NSCLC患者临床特征和MALDI-TOF MS分析的配对血清样本数

Tab 1 Clinical characteristics and numbering of pairs of serum samples of NSCLC patients sent for MALDI-TOF MS analysis

Characteristics	Patients								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Sex	Female	Male	Female	Female	Female	Male	Female	Female	Female
Age (years)	57	56	49	44	56	76	52	70	50
Smoking status (pack-year)	Never	Never	Never	Never	Never	30	Never	Never	Never
Best overall response									
Previous chemotherapy	PR	PD	PR	PD	PD	SD	PD	PR	PD
TKI	PR	PR	PR	SD	PR	SD	SD	SD	PR
Serum sampling time									
One week before TKI therapy	20	15	19	17	16	8	5	7	/
First week after TKI	9	/	2	/	/	/	/	/	13
Timepoint of PD after TKI therapy	10	1	6	18	12	11	3	14	4
Censor	0	0	0	0	0	0	1	0	1

PR: partial response; PD: progression disease; SD: stable disease. \*almost the same as the samples No.20 and No.19 respectively.

表2 EGFR-TKI治疗前后自身配对血清样本中差异显著的蛋白质峰

Tab 2 Significant proteomic peaks between the self-matched serum samples before and after EGFR-TKI therapy

Protein Peaks (m/z)	Substracted intensity of protein peaks in sera before by that after TKI therapy but closely to resistance									P
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
3 242.09*	-67.98	-87.68	-56.32	8.87	-39.79	5.08	-14.44	-65.86	-24.43	0.0167
8 690.36*	-0.65	1.54	9.76	4.94	4.32	1.80	5.19	1.50	8.23	0.0169
2 952.64*	-158.69	-91.18	-176.14	-18.59	-116.14	-100.47	68.93	-93.83	-45.32	0.0176
3 224.04	-5.70	-8.32	-5.13	4.21	-3.69	-2.88	-3.60	-5.13	-10.32	0.0218
1 450.51*	9.43	8.54	11.68	0.98	12.70	4.44	-6.80	6.98	13.42	0.0332
1 887.8*	1.63	7.88	5.40	7.61	3.98	-1.45	-1.18	2.64	6.32	0.0349
3 935.73*	5.62	0.92	6.91	20.55	-1.74	11.25	0.98	25.43	12.98	0.0391
TTP (days)	378	172	377	165	127	273	168	168	361	
OS (days)	700	290	754	191	429	562	273	801	268	

\* indicates significant correlation with TTP (P<0.02), but not with OS.

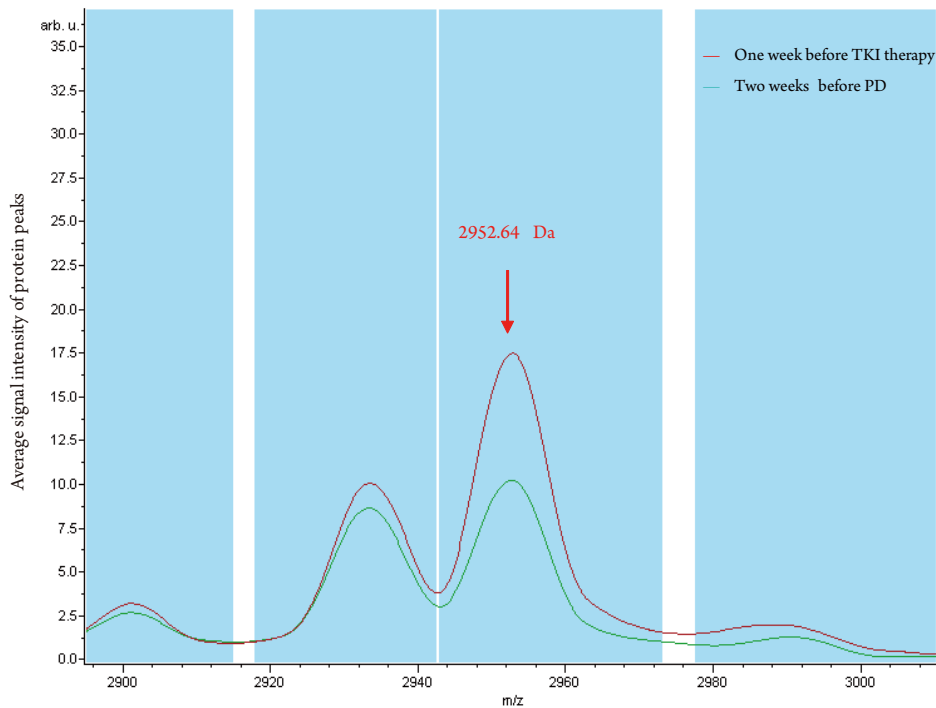


图1 蛋白峰[2 952.64 Da (m/z)]在耐药前后样本中差异表达水平比较

Fig 1 Significantly differential expression of protein peak of 2 952.64 Da (m/z) between paired serum samples

gression disease, PD)。中位年龄为57岁，治疗开始时的功能状态 (performance status, PS) 评分均为1分。从开始口服吉非替尼治疗起计算，中位无进展生存时间 (time to progression, TTP) 为172天，中位生存期为429天。随访至2008年12月1日，共有7例患者死亡，2例带瘤生存。

2.2 NSCLC患者血清样本蛋白质谱检测结果 患者自身配对血清的蛋白质峰下面积 (信号强度) 差值见表2，可见该7个血清蛋白质谱峰信号强度变化有统计学差异

(P<0.05)。差异表达蛋白分别是3 242.09、8 690.36、2 952.64、3 224.04、1 450.51、1 887.8及3 935.73 (m/z)。其中3个血清蛋白 (3 242.09、2 952.64及3 224.04) 在即将出现耐药时血清中下调，另4个血清蛋白 (8 690.36、1 450.51、1 887.8及3 935.73) 则出现上调。图1为蛋白峰 (2 952.64 m/z) 在耐药前后样本中表达水平比较。结合临床预后参数TTP及总生存时间 (overall survival, OS) 进行相关分析发现6个蛋白峰与TTP均有相关性，而与OS无统计

学意义的相关。

### 3 讨论

以EGFR-TKI吉非替尼和厄洛替尼为代表的口服小分子靶向药物的出现进一步延长了肺癌患者的生存,其有别于细胞毒性化疗的低毒性和对EGFR基因突变人群的高效性等特点受到肿瘤学界的关注<sup>[1-3]</sup>。然而,从EGFR-TKI治疗中临床获益(PR或SD)的患者多数最终仍会发展成耐药而出现疾病进展。在临床实践中如果能尽早预测或监测患者何时出现耐药对于改善治疗方案及探讨TKI耐药的分子机制有重要的研究意义<sup>[6]</sup>。

可用于预测EGFR-TKI疗效的指标包括性别、是否吸烟、腺癌、EGFR和KRAS基因突变等<sup>[3,7]</sup>。其中,目前检测肿瘤组织中的EGFR和KRAS基因突变被认为较为可靠的方法。然而,检测EGFR基因突变除了方法复杂以外,还需要获得足够多的病理组织,这在晚期病人中往往很难做到,而且也不利于在患者治疗过程中重复多次检测。如能通过检测外周血达到预测目的,将极大方便临床应用。此外,对于TKI治疗获益的患者,以上这些临床或者肿瘤标志物都无法在临床上出现疾病进展或者耐药之前进行有效预测或者监测。因此,临床应用中需要有一种可与现有的分子预测方法相互补充而且具有易于获得标本(如血清)的临床检测方法。

蛋白质谱技术平台的进步已使高通量检测分析血清蛋白质谱变化成为可能<sup>[4,5]</sup>。通过蛋白质谱技术分析肿瘤患者血清对肿瘤进行诊断和预后已有大量的报道,但早期的报道中存在着可重复性差的问题,这些研究多使用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术<sup>[8,9]</sup>。MALDI-TOF-MS是更为稳定的平台,分析结果可重复性好<sup>[10]</sup>。其检测原理是去除高峰度已知蛋白的血清样本,在质谱仪中受激光轰击时,在基质辅助条件下结合的蛋白质会被激发而形成气化离子。根据不同质荷比的离子在电场中飞行时间长短不一,接收装置可将质荷比的不同及量的多寡不同的蛋白分子用直观的位置、强弱不同的峰表现出来,进而形成相应图谱用于分析、判别<sup>[5]</sup>。

Taguchi等<sup>[4]</sup>利用MALDI-MS检测139例接受TKI治疗的NSCLC患者治疗前的血清。研究结果显示,通过该方法建立的模型可以有效地将来自ECOG-E3503研究接受EGFR-TKI治疗的96例患者分为“好”(good,中

位生存期为306天)和“差”(poor,中位生存期为107天)两组,且这两组EGFR-TKI治疗后的TTP也有明显差异,“好”组和“差”组分别为3.2个月和1.9个月(HR=0.53, 95%CI=0.33-0.85, Log-rank P=0.007)。Taguchi等<sup>[4]</sup>认为该模型可以预测EGFR-TKI治疗的敏感性,而且通过多个中心的样本显示了该模型具有较好的可重复性,提示MALDI-MS平台的可重复性要优于SELDI-TOF-MS。但该研究仅获得患者接受EGFR-TKI前的血清,因此难以明确该模型是预测EGFR-TKI的疗效还是预后。当然,该模型也不能预测耐药。

本研究针对晚期肺腺癌患者对吉非替尼治疗前和临床获益后PD前血清样本的血清蛋白标志物进行差异分析。为减少因样本采集时间、患者不同饮食状态等因素影响血清蛋白的差异水平,在收集样本时尽量做到同样条件下收集和保存处理。同时在同一批样本操作条件下进行MALDI-TOF分析。并采用自身配对样本进行研究以减少个体代谢等生物学差异对结果的解释偏倚。

本研究结果发现7个血清蛋白质谱峰信号强度变化有统计学显著差异( $P<0.05$ )。差异表达蛋白分别是3 242.09、8 690.36、2 952.64、3 224.04、1 450.51、1 887.8及3 935.73 (m/z)。其中3个蛋白(3 242.09、2 952.64及3 224.04)在即将出现耐药时血清中下调,另4个血清蛋白(8 690.36、1 450.51、1 887.8及3 935.73)则出现上调。且发现6个蛋白差异峰与患者服吉非替尼后的TTP相关,而与OS无关,提示这几个蛋白分子可能与肺癌患者产生吉非替尼耐药或者疾病进展相关,即是耐药或者疾病进展的预测因子,而不是疾病的预后因子。但限于本研究的病例数不足,需要扩大样本量进一步进行检测分析并探索这些差异蛋白质的身份及具体的分子机制。

综上,本研究发现MALDI-TOF技术可被用于晚期肺癌患者的血清标志物检测,初步发现7个血清标志物可能应用于对吉非替尼疗效的预测。这些标志物预测方法的建立及其敏感性和特异性仍有待于进一步研究。

### 参考文献

- 1 Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet*, 2008, 372(9652): 1809-1818.
- 2 Kima HS, Parka K, Juna HJ, et al. Comparison of survival in advanced non-small cell lung cancer patients in the pre- and post-gefitinib eras. *Oncology*, 2009, 76(4): 239-246.
- 3 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 786-792.



- 4 Taguchi F, Solomon B, Gregorc V, *et al.* Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(11): 838-846.
- 5 Villanueva J, Philip J, DeNoyer L, *et al.* Data analysis of assorted serum peptidome profiles. *Nat Prot*, 2007, 2(3): 588-602.
- 6 Tsao MS, Liu G, Shepherd FA. Serum proteomic classifier for predicting response to epidermal growth factor receptor inhibitor therapy: have we built a better mousetrap? *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(11): 826-827.
- 7 Zhong WZ, Wu YL. The bottleneck of EGFR-TKI application in non-small cell lung cancer-acquired resistance. *J Evidence-based Med*, 2008, 8(4): 193-197. [钟文昭, 吴一龙. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂在非小细胞肺癌应用的瓶颈-获得性耐药. *循证医学*, 2008, 8(4): 193-197.]
- 8 Poon TC. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(1): 51-65.
- 9 Diamandis EP. Serum proteomic profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for cancer diagnosis: next steps. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5540-5541.
- 10 Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*, 2007, 53(5): 852-858.

(收稿: 2009-03-09 修回: 2009-03-16)

(本文编辑 南娟)

## · 消息 ·

# 第十一届全国肺癌学术大会即将隆重召开

由中国抗癌协会肺癌专业委员会主办, 天津市抗癌协会和天津医科大学附属肿瘤医院承办, 天津医科大学总医院协办的第十一届全国肺癌学术大会, 即将于2009年8月27-29日在天津万丽-泰达酒店及会议中心举行。

### 大会主席及秘书长

名誉主席: 郝希山

主席: 吴一龙

执行主席: 王长利 周清华

秘书长: 王长利(兼)

副秘书长: 任秀宝 李凯 杨学宁

大会秘书: 阚学峰 宁晓梅 李瑞娜

### 学术委员会

主任: 廖美琳 蒋国梁

副主任: 陆舜 傅渝

委员: (按姓氏拼音字母顺序排列)

陈刚 陈公琰 陈振东 程颖 程庆书 丁梯 董信春  
傅小龙 高平 韩宝惠 赫捷 胡成平 黄诚 黄云超  
匡裕康 李强 卢冰 马胜林 毛伟敏 孟宪利 莫树锦  
曲家骥 申屠阳 宋启斌 宋向群 汤鹏 王洁 王俊  
王洲 王建军 王绿化 王思愚 王雪峰 吴怀申 吴明拜  
徐世东 许峰 许林 许金良 许绍发 杨和平 杨鲲鹏  
于雁 于世英 张力 张国庆 张力建 赵君慧 周彩存

### 学术大会征稿通知

1、征稿内容

肺癌临床和基础研究相关领域的学术论文。

主要内容包括: 01) 肺癌流行病学研究; 02) 肺癌相关基础研究; 03) 肺癌病理、影像学诊断研究; 04) 肺癌外科治疗进展、新技术; 05) 肺癌化疗、生物靶向治疗进展、新技术; 06) 肺癌临床护理; 07) 其它

2、稿件要求

1) 在国内外学术期刊尚未公开发表过的学术论文

2) 本次会议只接受网上投稿, 一律以word文档形式用附件发送,

E-mail: kanxf@126.com

3) 论文按正式发表之格式撰写, 并附300字左右的中英文论文摘要: 必须包括目的、方法、结果、结论。

4) 于论文首页右上角标明学科代码, 代码见征稿内容之01~07。

5) 发送稿件时请注明通讯作者联系信息: 单位科室, 通讯地址, E-mail, 手机和/或办公电话。

3、论文截止日期

2008年7月10日

4、论文录用:

经肺癌学术大会学术委员会审稿后确定优秀论文并大会发言、和/或收录编入论文集。

联系人: 天津医科大学附属肿瘤医院肺部肿瘤科 阚学峰 022-23340123-3032 13502023663

天津医科大学附属肿瘤医院科教处 宁晓梅 022-23537796

E-mail: kanxf@126.com