

文章编号:1005-6947(2008)03-0242-04

· 基础研究 ·

# 应用 SELDI 质谱技术筛选胰腺癌患者的血清标志蛋白

马宁<sup>1</sup>, 葛春林<sup>1</sup>, 栾凤鸣<sup>1</sup>, 胡朝军<sup>2</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 刘永锋<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院 普通外科教研室肝胆外科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院 检验科, 北京 100730)

**摘要:**目的 探讨应用 SELDI 质谱技术对胰腺癌患者血清中特异性标志蛋白的筛选方法。方法 采用表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 技术, 选择 WCX 磁珠及蛋白芯片阅读机对胰腺癌及健康人 (对照组) 和胰腺良性疾病组的血清进行检测, 以筛选胰腺癌患者血清中特异表达差异蛋白。结果 发现胰腺癌血清表达差异的潜在标志物 (蛋白) 4 个, 相对分子质量分别为 5 705 Da, 4 935 Da, 5 318 Da 和 3 243 Da, 其中 4 935 Da, 3 243 Da 差异表达蛋白质在对照组中低表达, 而在胰腺癌组中高表达, 5 705 Da 和 5 318 Da 差异表达蛋白质在胰腺癌组中低表达而对照组中高表达。结论 应用 SELDI 技术筛选胰腺癌患者血清中的特异性生物标记物的方法快速、有效; 检测到的 4 个差异蛋白质可能是胰腺癌患者血清特异性生物标记物。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 242-245]

**关键词:** 胰腺肿瘤; 蛋白质组学; SELDI 技术; 生物标记物

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

## A screening for specific biomarkers in serum of pancreatic cancer patients by SELDI technology

MA Ning<sup>1</sup>, GE Chunlin<sup>1</sup>, LUAN Fengming<sup>1</sup>, HU Chaojun<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, LIU Yongfeng<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the method to screen for relatively specific markers in serum of pancreatic cancer patients using surface-enhanced laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). **Methods** Serum samples from 20 pancreatic cancer patients, 20 healthy volunteers and 18 patients with other pancreatic diseases were examined. WCX magnetic beads and PBS II-C protein chips reader (CIPHERGEN Biosystems Inc.) were used to detect the protein fingerprint expression of all the serum samples, and the resulting profiles were analyzed with Biomarker Wizard system. **Results** Four differently expressed potential biomarkers were identified with the relative molecular weights of 5 705 Da, 4 935 Da, 5 318 Da and 3 243 Da respectively. Compared with control group, two proteins with m/z 5 705 Da and 5 318 Da were down-regulated, and two proteins with m/z 4 935 Da and 3 243 Da were up-regulated in pancreatic cancers. **Conclusions** SELDI technology is a quick, easy and practical method to screen for specific biomarkers in serum of patients with pancreatic cancer. Four different proteins identified in this study

**基金项目:** 辽宁省科技攻关课题 (2005225003-3)。

**收稿日期:** 2007-11-01; **修订日期:** 2008-02-02。

**作者简介:** 马宁, 男, 中国医科大学附属第一医院医师, 主要从事胰腺癌早期诊断及鉴别诊断方面的研究。

**通讯作者:** 葛春林 E-mail: chunlinge@yahoo.com.cn

may be as specific serum biomarkers of pancreatic cancer.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3):242-245 ]

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; Proteomic; SELDI Technology; Biological Markers

**CLC number:** R 735.9

**Document code:** A

表面增强激光解析/离子化飞行时间质谱仪 (surface-enhanced laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 是近年发展起来的一种新的蛋白质组学研究技术<sup>[1]</sup>。它根据不同质荷比的蛋白质分子在真空电场中飞行时间的差别,绘制出质谱图。可以简便、快捷地获得各种蛋白质的相对分子质量和峰度等信息。本研究应用 SELDI 质谱技术检测分析已明确诊断的胰腺癌、胰腺良性疾病患者和健康对照者的血清样本,绘制蛋白质质谱图,筛选出胰腺癌差异表达的潜在标志物(蛋白)4个,现报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病例分组及一般资料

(1)胰腺癌组:20例,为本院2006年6月—2007年7月经病理学证实的胰腺癌患者,年龄46~70(平均62.3)岁,男12例,女8例。(2)胰腺良性疾病组:18例,年龄18~75(平均60.6)岁,男11例,女7例。(3)健康对照组:20例,年龄45~72(平均62.3)岁,男12例,女8例。3组的年龄及性别匹配。

### 1.2 主要仪器和试剂

PBSII-C型蛋白质芯片阅读仪,为美国CIPHERGEN公司生产。弱阳离子WCX(weak cation exchanger)型磁珠,购自北京赛尔迪生物技术有限公司(Beijing SED Science and Technology, Ltd.)。尿素,乙腈,三氟乙酸(TFA),醋酸钠(NaAc),Tris-HCl pH9.0,CHAPS,DTT,水(HPLC级),Hepes,饱和白芥子酸SPA等试剂均购自Sigma公司。

### 1.3 血清样品采集

空腹采集全血5 mL,真空负压管未抗凝,立即放入4℃冰箱静置1h,然后在4℃下3 000 r/min离心30 min后,吸取血清按100 μL/管分装,置于-80℃保存。血清标本的采集时间均在患者手术前完成。

### 1.4 样品检测操作规程

(1)血清样品处理:从-80℃冰箱中取出血清,冰浴融化后4℃下10 000 r/min离心2 min,去除残留的细胞碎片。取10 μL血清,加20 μL

U9缓冲液(9 mol/L尿素,20 g/L CHAPS,10 g/L DTT,50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0),混合孵育30 min后,加入370 μL 50 mmol/L 醋酸钠(pH 4.0),立即混匀。(2)洗涤活化磁珠:每管中加入50 mg/mL WCX磁珠50 μL后加入50 mmol/L醋酸钠100 μL洗脱5 min,磁铁上孵育2 min,去除上清液,反复2次。(3)上样及洗脱:每份弃上清液活化的磁珠中加入100 μL处理好的血清样品置于室温孵育30 min,放于磁铁上孵育2 min,弃上清液,加入100 μL醋酸钠洗脱5 min,反复3次。用0.5%(V/V)的三氟乙酸(TFA)10 μL将结合在磁珠上的蛋白洗脱5 min。(4)获能:取5 μL蛋白洗脱液加入5 μL饱和SPA(50% CAN + 0.5% TFA),充分混匀。取1 μL混合溶液加样到金芯片(仅起载体作用,Au-chip, Ciphergen),自然晾干,时间大约5 min。(5)数据采集:采用蛋白飞行质谱仪对结合在弱阳离子WCX磁珠结合的血清蛋白进行读取分析。设定最高检测分子质量为50 kD,优化范围为2~20 kD,激光强度205,检测敏感度为8。考虑到基质峰的存在,将1 kD以下的峰滤去,以免基质峰对结果造成干扰。每条芯片上各有一个点采用同一正常人的血清作为内参照。结果表明芯片间的变异系数不大于10%。仪器每天用塞弗吉公司提供的ALL-IN-ONE蛋白质标准分子校正,系统的质量偏差≤0.1%。

### 1.5 统计学处理

采用Ciphergen ProteinChip3.1软件和BioMarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白指纹图谱进行统计学处理。胰腺癌患者与胰腺良性疾病组和健康对照组血清之间蛋白质峰的比较采用*t*检验, $P < 0.01$ 具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 血清蛋白质指纹图谱检测结果

3组中每例血清标本原始蛋白指纹图谱标准化后,在相对分子质量1 000~50 000 Da的范围内检测出约为150个蛋白质峰(图1),表明SELDI技术分离低分子质量蛋白质(<10 000 Da)有效。

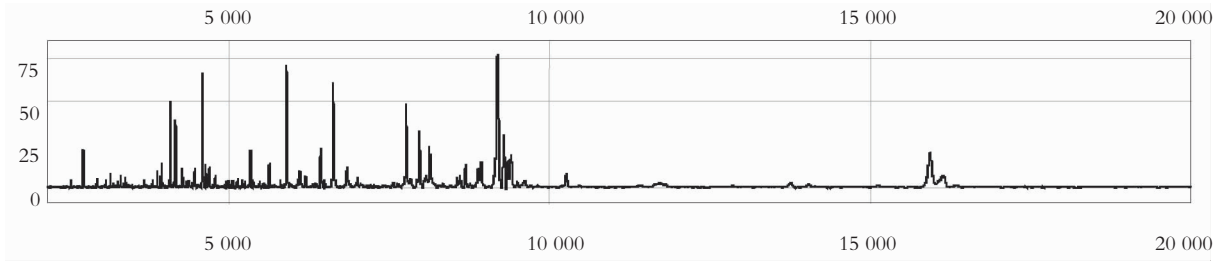


图1 SELDI 检测样品所得蛋白质指纹图谱

## 2.2 胰腺癌血清差异表达蛋白质的筛选

胰腺癌组与胰腺良性疾病组及对照组血清标本蛋白质指纹图谱比较共获得表达差异有统计学意义的蛋白质峰 26 个 ( $P < 0.01$ ), 导入 Biomarker Patterns Software 分析软件判别分析得出对胰腺癌诊断最佳潜在特异性标志蛋白 4 个, 相对分子质量分别为 5 705 Da, 4 935 Da, 5 318 Da 和 3 243 Da, 其中 4 935 Da 和 3 243 Da 在对照组低表达在胰腺癌组中高表达, 而 5 705 Da 和 5 318 Da 在胰腺癌组中低表达在对照组中高表达(表 1)(图 2)。

表 1 胰腺组、胰腺良性疾病和健康组之间存在的潜在差异标记蛋白

分组	差异蛋白(M/Z)			
	5705	5318	4935	3243
胰腺癌组	↓	↓	↑	↑
对照组	↑	↑	↓	↓
P 值	9.2E-07	2.5E-06	3.0E-05	1.4E-03

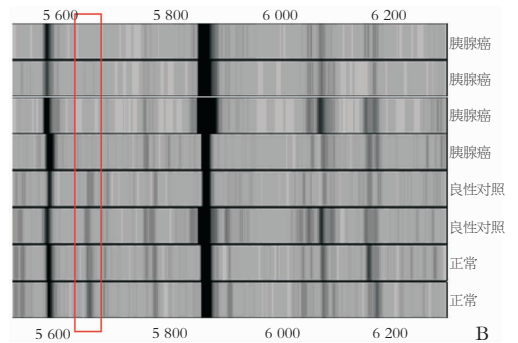
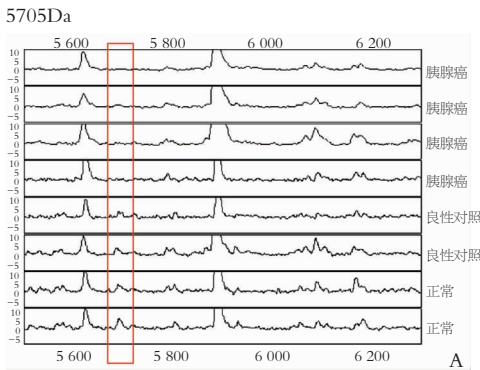


图2 胰腺良性疾病,胰腺癌,健康人之间血清差异蛋白的典型图谱 A:分子质量为 5 705Da 的蛋白在胰腺癌患者中含量显著低于胰腺良性疾病和正常人; B:上述结果的模拟电泳图谱

## 3 讨论

研究表明,血清、尿液等体液中含有大量疾病标志物,尤其血液中可能含有大量未被发现的可用作疾病标志物的蛋白质或多肽<sup>[2]</sup>。可能与任何疾病在出现病理变化时,细胞内的蛋白质在成分和数量上有相应的改变有关,所以理论上通过蛋白质的动态观察可以筛选出疾病早期变化的指标和征兆。随着蛋白质组学的开展,可以从复杂的生物样品中进行大量蛋白质全景式的搜索,从而极大地提高了以蛋白质的改变为诊断指标预测疾病的可能性<sup>[3]</sup>。同时也大大地提高了血

清,尿液等更广泛的疾病诊断材料的应用价值。

SELDI 技术与双向凝胶电泳、色谱分离纯化等传统的蛋白质学研究方法相比<sup>[4]</sup>,具有操作简便、可直接分析原始生物样本(如血清、尿液、胸腹水等)及样本用量小等特点,同时适合多样本平行检测和直接进行蛋白质全景式的搜索和分析,特别是对小分子质量蛋白和低峰度蛋白具有较高的捕获效果<sup>[5]</sup>。目前世界上许多实验室已将此技术应用于肿瘤诊断标记物的研究,包括肝癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>、膀胱癌<sup>[9]</sup>等,均获得了很好的结果。

目前临床普遍采用胰腺癌的血清标志物如癌

胚抗原(CEA,分子质量150~300 KD),糖蛋白抗原(CA19-9,分子质量200 KD),其敏感性及特异性均较差,对于早期胰腺癌的敏感性更低;直径 $\leq 2$  cm以下的早期肿瘤其阳性率仅为37.5%<sup>[10]</sup>。胰腺癌患者早期肿瘤细胞仅局限于黏膜组织内,未侵及周围血管组织。理论上,无论是其分泌的或是代谢所产生的蛋白质或多肽类物质中,大分子蛋白不易渗透进入血液,而小分子蛋白则易于进入外周血循环。这也为笔者发现的这些小分子蛋白的可靠性提供了有力证据。由于 SELDI 技术检测的高敏感性可达1 fmol,故在肿瘤发生的极早期便可检测到某些蛋白质的变化。因此认为该技术用于肿瘤的早期预警是可行的。

本实验应用 SELDI 技术在胰腺癌患者中筛选出具有代表性的特异性蛋白质5 705 Da,4 935 Da,5 318 Da和3 243 Da,它们的相对分子质量均较小。目前尚不清楚其性质,推测可能为含有40~70个氨基酸的特异性多肽或特异性蛋白片段。然而,就 SELDI 技术而言,每个M/Z值对应的可能是很多分子质量相近的多肽,因此不能对体液中的蛋白质进行鉴定<sup>[11]</sup>。故该蛋白质的结构、功能及是否为已知蛋白等均不清楚,需要在下一步实验中予以解决。与传统蛋白芯片相比,本实验的采用WCX磁珠由于具有强大的表面积,因此它能更好的捕获血清中的小分子多肽或蛋白<sup>[12]</sup>,而且所捕获的蛋白可以在不同的质谱仪上检测,甚至是用于电泳检测,为下一步的蛋白质鉴定提供了便利条件,同时也使其验证性和重复性进一步加强。

本文结果表明,应用 SELDI 技术快速、有效,检测到的4个代表性差异蛋白很可能是胰腺癌血清特异性生物标记物(蛋白)。但要从根本上了解这些蛋白在胰腺癌的发生,发展过程中的作用,还需在今后的研究工作中扩大样本例数和对得到的差异蛋白作进一步的分析和鉴定。

#### 参考文献:

- [1] Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1164 - 1177.
- [2] Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood [J]. *Nature*, 2003, 425(6961): 905.
- [3] 田锐,魏黎明,李延,等.人胰腺导管腺癌组织及癌旁组织双向电泳图谱的差异分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(5): 433 - 437.
- [4] Issaq HJ. The role of separation science in proteomics research [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(17): 3629 - 3638.
- [5] Rodland KD. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(7): 579 - 583.
- [6] Paradis V, Degos F, Dargère D, et al. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases [J]. *Hepatology*, 2005, 41(1): 40 - 47.
- [7] Somiari RI, Somiari S, Russell S, et al. Proteomics of breast carcinoma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815(1-2): 215 - 225.
- [8] Malik G, Ward MD, Gupta SK, et al. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1073 - 1085.
- [9] Langhein S, Lehmann J, Harder A, et al. Protein profiling of bladder cancer using the 2D-PAGE and SELDI-TOF-MS technique [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2006, 5(1): 67 - 72.
- [10] Kim JE, Lee KT, Lee JK, et al. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(2): 182 - 186.
- [11] Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, et al. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(3): 587 - 592.
- [12] Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, et al. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers [J]. *Anal Biochem*, 2007, 362(1): 44 - 54.