

文章编号:1005-6947(2008)04-0388-03

· 文献综述 ·

SELDI 蛋白质芯片平台在结直肠癌蛋白质组学研究中的应用

范乃军, 盛新华¹综述 高春芳²审校

(1. 第二军医大学硕士二〇〇六级五区队, 上海 200433; 2. 解放军第一五〇中心医院全军肛肠外科研究所, 河南 洛阳 471031)

摘要:表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectroscopy, SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片平台是蛋白质组学的主要技术平台之一, 笔者综述了 SELDI 蛋白质芯片平台的基本原理及其在结直肠癌蛋白质组学研究中的应用和展望。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 388-390]

关键词: 结直肠肿瘤; 蛋白质阵列分析; 蛋白质组学

中图分类号: R 735.3

文献标识码: A

早期诊断、及时治疗是改善结直肠癌预后的主要因素^[1-3], 但目前尚缺乏敏感度、特异度高、非侵入性且操作便利的早期诊断方法。蛋白质组学是一个迅速发展的领域, 为结直肠癌早期诊断和标志物鉴定提供了新思路。当前, 用于结直肠癌标志物研究的蛋白质组学技术主要包括凝胶电泳、液相色谱、质谱和蛋白质芯片。由美国 CIPHERGEN Biosystems 公司发明的表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectroscopy, SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片平台是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 主要由蛋白质芯片、芯片阅读器和生物信息学三大部分组成, 可直接分析患者血清、淋巴液、脑脊液、尿液、细胞分泌液等样品而无需复杂的样品制备。继 Petricoin 等^[4]利用 SELDI 蛋白质芯片平台分析了 116

例血清标本(其中卵巢癌 50 例, 正常对照 66 例)得出可以完全检出卵巢癌的血清蛋白质诊断模型之后, SELDI 蛋白质芯片平台广泛用于卵巢癌、前列腺癌、肝癌、食管癌、结直肠癌等多种肿瘤的研究, 已成为肿瘤蛋白质组学主要技术平台之一。本文就 SELDI 蛋白质芯片平台在结直肠癌蛋白质组学研究中的应用作一综述。

1 SELDI 蛋白质芯片平台在结直肠癌蛋白质组学研究中的应用

1.1 结直肠癌早期诊断模型

赵光等^[5]利用金属离子螯合(IMAC3-Cu²⁺)芯片和 SELDI-TOF-MS 分析了 240 例血清标本(随机分为训练集和测试集, 每个集合中包括大肠癌患者 73 例, 正常人 31 例, 结直肠良性病变患者 16 例)。训练集筛选出由 7 个蛋白质(m/z 为 4 467 Da, 8 131 Da, 8 939 Da, 9 192 Da, 9 134 Da, 8 221 Da, 5 928 Da, 8 324 Da 和 11 732 Da)组成的结直肠癌早期诊断模型, 测试评价其预测效果。结果表明, 该诊断模型准确率为 98.33%(118/120), 敏感度为 97.26%(71/73), 特异度 100%(47/47)。

另有多个研究小组^[6-9]分别利用 IMAC3, 疏水(H4), 弱阳离子交换(CM10)芯片和 SELDI-TOF-MS 及不同的统计分析软件, 分析结直肠癌、结直肠良性肿瘤和健康人的血清样本, 建立了不同的结直肠癌早期诊断模型, 其灵敏度、特异度为 65%~100%。

1.2 结直肠癌手术前分子分期模型

SELDI 蛋白质芯片平台可用于结直肠癌手术前分子分期, 对判断结直肠癌的淋巴结转移、远处转移有重要意义。徐文鸿等^[10]利用弱阳离子交换(CM10)芯片和 SELDI-TOF-MS 分析了 76 例结直肠癌患者的血清标本(其中 Dukes A 期 10 例, B 期 19 例, C 期 16 例和 D 期 31 例), 筛选了不同分期的 7 个模型, 由 6 个蛋白质(m/z 为 2 759.58 Da, 2 964.66 Da, 2 048.01 Da, 4 795.90 Da, 4 139.77 Da 和 37 761.60 Da)组成的模型 I 可以鉴别 A, B 期和 C 期, 准确率为 86.67%(39/45); 由 3 个蛋白质(m/z 为 6 885.30 Da, 2 058.32 Da 和 8 567.75 Da)组成的模型 II 可鉴别 A, B, C 期和 D 期, 准确率 75.00%(57/76); 模型 III-VII 分别可鉴别 AB 期 AC 期 BC 期 BD 期及 CD 期, 准确率为 78.72%~86.21%。

收稿日期: 2007-08-16;

修订日期: 2008-02-20。

作者简介: 范乃军, 男, 解放军第二军医大学硕士研究生(主治医师), 主要从事胃肠道肿瘤的分子诊断方面的研究。

通讯作者: 高春芳 E-mail: fandoc-tor123@163.com

1.3 结直肠癌蛋白质表达谱手术前后的变化

检测创伤、感染、药物治疗等对结直肠癌患者血清蛋白质表达的影响可能会发现对预测治疗效果有重要意义的蛋白质。王全晖等^[11]利用 IMAC3-Cu²⁺ 芯片和 SELDI-TOF-MS 分析了 104 例血清标本(其中结直肠癌 64 例,正常人 40 例),筛选出由 5 个蛋白质(m/z 为 5 972.67 Da, 5 927.21 Da, 6 113.48 Da, 5 908.55 Da 和 4 292.51 Da)组成的诊断模型,正确率为 87.50% (56/64),手术后血清蛋白质谱中原高表达的蛋白质明显下调,可用于预后判断。Roelofs-en H^[12] 等利用 SELDI-TOF-MS 比较分析了 4 例结直肠癌患者在行结直肠癌根治术术前、术中和术后 5 d 血清标本,检测到 146 种蛋白质,有 16 种蛋白质手术前后变化明显,经鉴定分子质量 11.4 和 11.6 kD 峰相应的蛋白质为 amyloid A (SAA) 的不同亚型。

1.4 结直肠癌复发、远处转移诊断模型

余捷凯等^[13] 利用 SELDI-TOF-MS 分析结直肠癌患者手术后 2 年的血清标本 55 例(其中转移或复发者 10 例,无瘤生存者 45 例),发现转移或复发组 m/z 为 5 509.8 Da 的蛋白质高表达, m/z 为 6 194.7 Da, 4 113.1 Da 和 3 534.1 Da 的 3 个蛋白质低表达。 m/z 为 5 509.8 Da 的蛋白质高表达与远处转移的结果一致,显示其与远处转移相关的可能性。余捷凯等^[13] 利用由 4 个蛋白质(m/z 为 5 911 Da, 8 930 Da, 4 476 Da 和 8 817 Da)组成的诊断模型对结直肠癌患者进行手术后每 3 个月 1 次的随访,发现模型中 4 个蛋白质手术后 3 个月均消失。但 m/z 为 5 911 Da 的蛋白质在手术后复查的患者中有 6 例相继于第 12, 15, 18 个月又复增高,其中有 4 例出现复发体征。表明该组标记可作为手术后随访估计复发。

1.5 发现结直肠癌特异蛋白质

SELDI 蛋白质芯片平台可为结直肠癌蛋白质标记物的鉴定提供靶蛋白质。Shiwa 等^[14] 分别利用蛋白芯片和 SELDI-TOF-MS 分析了 9 种组织的

39 个癌细胞系,发现结直肠癌细胞系特异蛋白质峰(m/z 为 12 kD),纯化后利用蛋白质芯片飞行时间质谱和串联质谱对蛋白质进行了鉴定。Melle C 等^[15] 则利用强阴离子交换(Q10)芯片和 SELDI-TOF-MS 分析了 62 例组织标本(其中结直肠癌 13 例、结直肠癌对应的正常黏膜 19 例、腺瘤 30 例),发现 18 个结直肠癌特异蛋白质峰,然后利用 2-DE 和质谱技术鉴定出分子质量 12 kD 峰相应的蛋白质是 calcizzarin (S100A11)。

1.6 免疫检测微阵列和免疫耗竭检测法

以 SELDI-TOF-MS 为基础的免疫检测微阵列和免疫耗竭检测法是快速、简便、易行、高通量的检测蛋白质的新方法。前者是蛋白质功能芯片的一种,以检测样本中靶蛋白质的表达率及其相对含量。后者是以特异性一抗与血清标本进行免疫共沉淀,形成抗原抗体复合物,离心后取其上清以 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片分析,其结果与未经耗竭的样本对比,靶蛋白质对应的峰消失或强度显著降低。Melle C 等^[15] 为进一步确认 S100A11 与分子质量为 12 kD 蛋白质的关系,以抗 S100A11 抗体与患者血清反应后,上清经 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片分析,发现分子质量为 12 kD 峰显著减低,阴性对照可以清楚检测到 12 kD 峰,证实了分子质量 12 kD 峰相应的蛋白质即是 S100A11。

1.7 结直肠癌疗效检测的研究

Smith 等^[16] 研究了局部进展期直肠癌对新辅助放疗(RCT)的组织学反应。他们利用 SELDI-TOF-MS 比较分析了 20 例结直肠癌患者在接受 RCT(其中 9 例反应良好,11 例反应较差)治疗前 1 d 和治疗后 24 h/48 h、第 1, 2, 3 周及第 5 周血清蛋白质表达谱的变化,共检测到 230 种蛋白质,支持向量机(SVM)分析显示,治疗后 24 h/48 h 血清蛋白质组的变化能准确预测患者的反应,由 14 个蛋白质组成的模型预测结直肠癌患者对 RCT 治疗反应效果的敏感性与特异性分别为 87.5% 和 80%。

2 存在的问题和展望

SELDI 蛋白质芯片平台在结直肠癌的蛋白质组学研究方面目前还有许多问题。例如在复杂生物样本标记物发现、不同疾病状态下蛋白质翻译后修饰的研究、蛋白质/肽的鉴定、蛋白质/肽的准确定量分析等方面存在局限性^[17],此外,细胞内不同表达形式的多种蛋白质的分析鉴定很难用一种芯片同时完成^[18],不同的实验室利用不同的蛋白质芯片和统计分析软件所得到的结果差异较大,以及价格昂贵等。然而,SELDI 蛋白质芯片平台技术上的优势预示其将在结直肠癌蛋白质组学研究中有着广泛的应用前景。今后,SELDI 蛋白质芯片平台的发展及其在结直肠癌蛋白质组学中的应用将主要集中在鉴定结直肠癌早期诊断模型中有诊断意义但未明确性质的蛋白质,阐明这些蛋白质在结直肠癌诊断、发病机制、靶向治疗、预后判断等的意义,以期建立结直肠癌早期诊断的高灵敏度、特异度的多个标志物联合检测的功能蛋白质芯片。

参考文献:

- [1] O'Connell JB, Maqqard MA, Liu JH, et al. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? [J]. Dis Colon Rectum, 2004, 47 (12): 2064 - 2069.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56 (2): 106 - 130.
- [3] Li S, Nie Z, Li N, et al. Colorectal cancer screening for the natural population of Beijing with sequential fecal occult blood test: a multi-center study [J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116 (2): 200 - 202.
- [4] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer [J]. Lancet, 2002, 359 (9306): 572 - 577.
- [5] 赵光, 高春芳, 宋国英, 等. 血清中蛋白质组构型对结直肠癌

- 的诊断意义[J]. 癌症, 2004, 23(6): 614-618.
- [6] 闫志勇, 钱冬萌, 丁守怡, 等. 应用 SELDI-TOF-MS 技术建立直肠癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(19): 2395-2398.
- [7] 陈益定, 郑树, 余捷凯, 等. 血清蛋白质质谱模型在直肠癌诊断中的应用[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(7): 417-420.
- [8] Engwegen JY, Helgason HH, Cats A, *et al.* Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry [J]. *World-J-Gastroenterol*, 2006, 12(10): 1536-1544.
- [9] Liu XP, Shen J, Li ZF, *et al.* A serum proteomic pattern for the detection of colorectal adenocarcinoma using surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry [J]. *Cancer Invest*, 2006, 24(8): 747-753.
- [10] 徐文鸿, 陈益定, 胡跃, 等. 激光解吸电离-飞行时间质谱技术与 CM10 蛋白质芯片检测术前大肠癌分期的意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 25(10): 753-757.
- [11] 王全晖, 高春芳, 王秀丽, 等. 大肠癌手术治疗前后血清蛋白质的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(10): 1896-1900.
- [12] Roelofsen H, Alvarez-Llamas G, Dijkstra M, *et al.* Analyses of intricate kinetics of the serum proteome during and after colon surgery by protein expression time series [J]. *Proteomics*, 2007, 7(17): 3219-3228.
- [13] 余捷凯, 陈益定. 蛋白质组学在大肠癌早期检测中的应用研究[A]. 见: 郑树. 结直肠肿瘤基础研究与临床实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 268-280.
- [14] Shiwa M, Nishimura Y, Wakatabe R, *et al.* Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2003, 309(1): 18-25.
- [15] Melle C, Ernst G, Schimmel B, *et al.* Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(1): 195-200.
- [16] Smith FM, Gallagher WM, Fox E, *et al.* Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy [J]. *Ann Surg*, 2007, 245(2): 259-266.
- [17] White MY, Gundry RL, Cordwell SJ. When does a fingerprint constitute a diagnostic? [J]. *Lancet*, 2006, 368(9540): 971-973.
- [18] Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, *et al.* Surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research [J]. *Pathol Res Pract*, 2004, 200(2): 83-94.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊决定采用汉语拼音姓名的新写法

编辑学报 2007 年第 5 期刊登了我国台湾省留美学者许仲平教授提出的中国人汉语拼音姓名写法的建议: 姓在前, 名在后, 姓的字母全大写, 名只首字母大写, 双名间不加连接号, 名字不缩写。

例如: “杨为民” 写作 “YANG Weimin”, 不写作 “Yang Weimin” 或 “YANG Wei - min” 或 “YANG W M” 或 “YANG W”。这是一个有助于解决西方人对中国人姓名误解的好建议。

这一建议符合中国人的姓名习惯, 与现行有效的国家标准的规范也基本一致, 差别只在于建议的姓字母全大写, 而国家标准仅规定姓的首字母大写, 而这样做确实便于西方人清楚区别中国人的姓和名。目前本刊实行的是姓字母全大写, 双名间加连接号。经慎重研究, 决定从 2008 年起采用姓的字母全大写、双名间不加连接号的建议。

中国普通外科杂志编辑部