乙腈预处理血清寻找肝细胞癌发病相关的蛋白质

张剑文[1]，刘 炜[1,2]，傅斌生[1]，胡坤华[3]，刘少军[3]，李 华[1]，张 琪[1,2]，黎明涛[3]，陈规划[1,2*]
（中山大学 1. 附属第三医院肝脏移植中心，2. 附属第三医院广东省肝脏疾病研究重点实验室；
3. 中山医学院蛋白质组学研究中心，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】应用乙腈(ACN)预处理血清的方法，对肝细胞癌(HCC)患者的血清进行蛋白质组分析，寻找与 HCC 发病相关的蛋白质。【方法】收集原发性 HCC 患者和健康人的血清各 12 例，首先使用乙腈预处理，然后去除白蛋白和免疫球蛋白等高丰度蛋白质，再进行双向电泳(2-DE)分析，筛选 HCC 与健康对照血清中有显著性差异的蛋白质斑点，并进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。【结果】血清经 0%、20%和 30%浓度的乙腈预处理后，进行 2-DE 分析发现蛋白质斑点的检出数量分别为 532 ± 96、623 ± 102 和 674 ± 123；对预处理后 HCC 患者和正常人的血清进行差异分析，发现甲状腺素(Tetraiodo-*L*-Thyronine)和 Proapolipoprotein 的表达上调，而维生素 D 结合蛋白(Vitamin D-binding Protein)和铁传递蛋白(Transferrin)的表达下调。【结论】对血清样本的蛋白质组分析，应用乙腈预处理会增加与白蛋白非特异性结合的蛋白质的检出；HCC 患者血清中甲状腺素等 4 个蛋白的表达异常与 HCC 相关。

关键词：乙腈预处理；蛋白质组学；肝细胞癌；血清
中图分类号：R735.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2010)02-0288-05

Proteomic Screening of Serum Hepatocellular Carcinoma-associated Proteins by an Acetonitrile-pretreatment Method

ZHANG Jian-wen[1], LIU Wei[1,2], FU Bin-sheng[1], HU Kun-hua[3], LIU Shao-jun[3], LI Hua[1], ZHANG Qi[1,2], LI Ming-tao[3], CHEN Gui-hua[1,2*]
(1. Liver Transplantation Center, The Third Affiliated Hospital;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Liver Disease, The Third Affiliated Hospital;
3. Proteomics Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To apply an acetonitrile-pretreatment method for proteomic analysis of serum of patient with hepatocellular carcinoma (HCC), searching for the proteins that might be related to occurrence and development of HCC. 【Methods】Serum samples were recruited from 12 patients with primary HCC and 12 health adult. Firstly, the sera were pretreated with acetonitrile (ACN), and the high-abundance proteins were removed, then two-dimensional electrophoresis (2-DE) was performed to screen the differentially expressed proteins between the patient with HCC and health control. Finally, the differentially expressed proteins in the 2-DE gel were identified by a MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. 【Results】After the sera were pretreated with 0%, 20% and 30% ACN, 2-DE analysis showed that the number of the protein spots in the gels were 532 ± 96, 623 ± 102, and 674 ± 123, respectively. By the proteomic analysis of the ACN-pretreatment sera of patient with HCC and health control, we found that tetraiodo-L-thyronine and proapolipoproteinin were up-regulated, vitamin D-binding protein precursor and transferrin were down-regulated in the HCC serum. 【Conclusion】Proteomic analysis of serum using the ACN-pretreatment method can improve the detection of proteins which were non-specifically binding to the albumin. Abnormal expression of tetraiodo-L-thyronine,

收稿日期：2009-07-28
基金项目：国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2009CB522404)；国家十一五科技重大专项课题(2008ZX10209)；2007-2009 年度卫生部部属(管)医院临床学科重点项目；广东省科技计划项目重大专项(2007A032000001)；中国博士后科学基金(20070420794)
作者简介：张剑文，肝脏外科博士生，E-mail：kevin_zhang_md@163.com；* 通信作者：陈规划，教授，博士导师，中华外科学会常委，E-mail：chgh1955@263.net

proapolipoproteinin, vitamin D-binding protein precursor and transferrin in the serum are related to HCC.

Key words: acetonitrile pretreatment; hepatocellular carcinoma; serum

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(2):288-292]

原发性肝癌（绝大部分是肝细胞癌,hepatocellular carcinoma,HCC)的癌症死亡率在我国居前三位[1]，由于起病隐匿、早期诊断困难等原因,很多患者在就诊时已处于肿瘤的中晚期,预后很差。寻找与肝细胞癌发病相关的蛋白质仍是当今研究 HCC 发生、发展的重要工作。血清富含人体各种组织、细胞来源的蛋白质，血清蛋白的变化可以反映出人体的各种生理和病理状态，因此血清蛋白是临床疾病诊断、病情监控、预后判断的重要检测对象。蛋白质组学,如双向电泳分离(two-dimensional gel electrophoresis，2-DE）+ 质谱(mass spectrometry，MS)鉴定的技术,以其高通量、高灵敏度等特点,已被广泛应用于筛选血液中与肿瘤相关的蛋白质组的研究中[2]。然而,血清中各种蛋白质的含量差异极大，其中高丰度蛋白质如白蛋白和免疫球蛋白约占血清蛋白总量的 60% ~ 80%[3]，能反映机体状况的血清蛋白质多属于低丰度蛋白质，这些低丰度蛋白质往往又是与白蛋白等结合在一起在血清中被转运[4]。对血清进行蛋白质组分析时,尤其是应用 2-DE 技术,需要将血清中的高丰度蛋白质先行去除后才能进行分析[3-4]。然而,这种单纯去除高丰度蛋白的方法会使部分与白蛋白结合的蛋白质或多肽在去除高丰度蛋白的同时也被除去,造成低丰度蛋白质的检出率下降,从而遗失了一些可能与疾病相关的蛋白质信息。在本研究中,我们收集了正常人、原发性肝细胞癌患者的血清,使用乙腈(acetonitrile，ACN)对血清蛋白质样品进行“温和的”预处理变性[4-5],使得某些结合在高丰度蛋白上的低丰度蛋白释放出来以提高血清蛋白质组分析时蛋白质的检出率。通过该预处理方法,联合双向电泳(2-DE)分离和 MALDI-TOF/TOF 质谱分析,我们对 HCC 患者血清以及正常人血清进行了差异蛋白质组学分析，以寻找可能与 HCC 发病相关的血清蛋白质。

1　材料与方法

1.1　材　料

本研究所用的血清标本均采集于中山大学附属第三医院肝脏移植科、肝胆外科收治的男性住院病人,年龄 40 ~ 60 岁;HBsAg 阳性;所有病例均经病理证实为肝细胞癌(HCC),且未发现肝内及肝外转移;患者采血前均未接受过化疗或放疗;除原发病外,无合并其他疾病。正常健康对照为随机获取的 40 ~ 60 岁的男性健康体检者,HBsAg 阴性,肝功能无异常,无合并其他疾病。HCC 组和对照组各 12 例样本。

1.2　主要仪器及试剂

IPGphor Ⅱ等电聚焦仪、Ettan DALTsix 垂直电泳系统、Typhoon 9400 型激光扫描仪、ImageMaster 图谱分析软件、全自动凝胶斑点处理工作站(Spot handling workstation)为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品；基质辅助激光解吸/离子化-串联飞行时间(MALDI-TOF/TOF)质谱仪为美国 ABI 公司产品;DU-530 型核酸/蛋白分析仪为美国 Beckman公司产品;固相 pH 值干胶条(IPG strip)(pH 4 ~ 7,24 cm)、IPG buffer、蛋白质纯化试剂盒(Clean-up Kit)、定量试剂盒(Quant Kit)、深紫荧光染色试剂盒均购自美国 GE 公司;HPLC 级 ACN 购自美国 Fisher 公司；去除血清高丰度蛋白试剂盒（ProteoPrep Blue Albumin & IgG Depletion Kit）购自美国 Sigma 公司。

1.3　血清样本预处理

血清样本各取 50 μL,分别溶于含不同量乙腈的 PBS 溶液中，使样本溶液中乙腈的终体积分数分别为 0、20%和 30%,震荡后室温静置 10 min;按照 ProteoPrep Blue Albumin & IgG Depletion Kit 说明书方法将不同浓度乙腈处理后的血清中的白蛋白和 IgG 去除；再使用蛋白质纯化试剂盒(Clean-up Kit)去除剩余蛋白中的其它杂质;最后,使用 Quant Kit 定量试剂盒检测样本中蛋白质的含量。

1.4　双向电泳和图谱分析

按以前报道的方法[6]进行。乙腈预处理后的蛋白质样本各取 500 μg,在固相 pH 胶条和 12.5%质量浓度的 SDS-PAGE 凝胶上分别进行等电聚焦(isoelectric focusing，IEF)电泳和垂直电泳。电泳质量结束后对 2-DE 凝胶进行深紫荧光染色,并使用 Typhoon 9400 型扫描仪采集凝胶图像。通过

Image Master 图谱分析软件对凝胶图像进行斑点检测、匹配和差异统计分析;选取蛋白斑点丰度差异大于 2 倍、Student's *t*-test $P < 0.05$ 的斑点作为有显著性差异的蛋白质。

1.5 凝胶中蛋白质斑点的处理和质谱分析

按以前报道的方法[7]进行。对有差异的蛋白质斑点使用 Spot handling workstation 进行自动化的切取、胰酶消化和肽段抽提,肽段再经手工脱盐后进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析,分别获得蛋白质的肽质量指纹(peptidemass fingerprint, PMF)图谱和肽段的 MS/MS 图谱; 使用 Mascot 软件在 NCB Inr 数据库中检索质谱数据,最终鉴定出目的蛋白质。

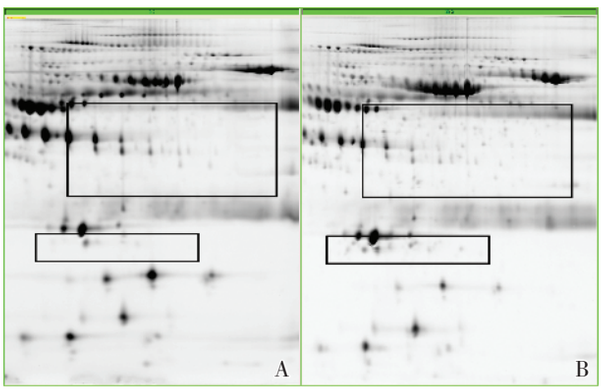

图 1 HCC 患者血清蛋白的 2-DE 图谱

Fig.1 2-DE patterns of serum protein in patient with HCC

A: Untreated with ACN; B: Pretreated with 30% ACN

2 结 果

2.1 肝细胞癌患者的血清经不同浓度乙腈预处理后的 2-DE 图谱比较

首先取 3 个 HCC 患者的血清,每个样本都分别进行体积分数 0、20%、30%的乙腈预处理和去除高丰度蛋白质,再进行 2-DE 和凝胶图谱分析。结果发现 3 种浓度乙腈预处理后检测到的蛋白质斑点数分别为 532 ± 96、623 ± 102 和 674 ± 123。图 1 显示了 0 (未经乙腈预处理) 和 30% 乙腈预处理后的 HCC 患者血清的 2-DE 图谱。

2.2 乙腈预处理后肝细胞癌患者与正常人血清的蛋白质组差异分析

按上述的方法,对 HCC 患者和健康对照的血清使用 30% 乙腈预处理和 2-DE 分析,每组 12 个样本。通过图谱分析发现,正常人和 HCC 患者的血清 2-DE 图谱中平均蛋白质斑点数分别为 708 和 772,图谱斑点平均匹配率为 71.6%;与正常人的血清蛋白质斑点相比,HCC 血清中共有 11 个蛋白质斑点差异大于 2 倍(*t*-test $P < 0.05$)。这些有显著性差异的斑点经 MALDI-TOF/TOF 分析和数据库检索, 共鉴定出 4 种蛋白质。其中甲状腺素(Tetraiodo-*L*-Thyronine)和 Proapolipoprotein 的表达量上调,而维生素 D 结合蛋白前体(Vitamin D-binding Protein precursor)和铁传递蛋白(Transferrin)的表达量下调(表 1)。图 2 显示了质谱分析维生素 D 结合蛋白前体的 PMF 图谱。

3 讨 论

3.1 使用乙腈预处理血清可提高血清中低丰度蛋白的检出率

血液中的某些低丰度蛋白质,如激素和脂蛋白等, 通过与白蛋白结合的方式实现在血液中的转运,从而到人体各处发挥作用。因此,在进行血清蛋白质组分析时,仅采用去除高丰度蛋白的单一方法,有可能同时除去了一些与疾病相关的重要蛋白

表 1 差异蛋白质的质谱鉴定

Table 1 Identification of the differentially expressed proteins

Protein Name	NCBInr Access No.	PMF Score	MS/MS Score	Molecular mass(u)	PI	*P* value	Abundance Ratio
Up-regulated							
Tetraiodo-*L*-Thyronine	gil31615330	326	213	68405.6	5.66	0.006	2.00
Proapolipoprotein	gil178775	94	73	28943.9	5.45	0.02	2.05
Down-regulated							
Vitamin D-binding protein precursor	gil32483410	665	480	54479.5	5.32	0.001	−2.2
Transferrin	gil339486	73	56	16009.9	8.43	0.012	−2.3

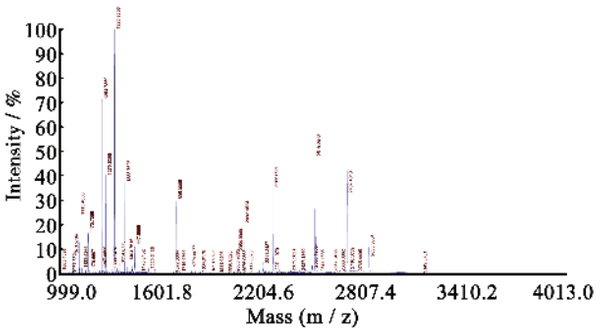

图 2　维生素 D 结合蛋白前体的质谱分析(PMF 图谱)

Fig.2　Mass spectrometric analysis of Vitamin D-binding protein precursor (PMF)

或多肽。目前已经实现商业化的多种去除血清中高丰度蛋白的方法，如亲和层析、免疫亲和吸附等[8]，都没有很好解决低丰度蛋白质丢失的问题。

在本研究中，我们使用了低浓度的乙腈对血清样品进行预处理。低浓度乙腈作为一种“温和”的变性剂，可以破坏蛋白质与蛋白质间的相互作用，使得与白蛋白等高丰度蛋白结合的低丰度蛋白或多肽变性解离，从而在去除高丰度蛋白时不会被同时去除。经过我们的实验对比，先经乙腈预处理的血清样本在去除白蛋白和 IgG 等高丰度后，比单纯去除高丰度蛋白质的方法能检测出更多的蛋白斑点。进一步对正常人和 HCC 患者血清的蛋白质组进行差异分析，我们鉴定出了甲状腺素、Proapolipoprotein、维生素 D 结合蛋白前体和铁传递蛋白 4 种蛋白质在两组间有差异表达，而这 4 个蛋白质都是已知的白蛋白结合蛋白，这也说明我们乙腈预处理血清的方法是有效的。同时，与国外类似的血清蛋白质组分析所用的处理方法[4-5]相比，我们发现 30%的乙腈预处理血清结合使用去除血清高丰度蛋白试剂盒得到的实验效果最佳，且不需要借助贵重的色谱设备，不仅可检测出较多的蛋白斑点，且不影响后续的双向电泳分析及质谱鉴定。我们采用的这种预变性处理血清的方法简单、有效，稳定性和重复性较好且成本低廉，适用于以血清或其它体液蛋白为研究对象的蛋白质组研究。

3.2　经乙腈预处理后的 HCC 患者血清蛋白质组分析

采用乙腈预处理血清的方法，我们对正常人和 HCC 患者血清中的蛋白质进行了差异对比分析，共鉴定出 4 种蛋白质。这 4 个蛋白中，已知 Proapolipoprotein、维生素 D 结合蛋白前体和铁传递蛋白都主要是由肝脏合成，故可认为它们的表达异常与 HCC 有关。

Proapolipoprotein 是载脂蛋白的前体蛋白，它与肝脏的功能和状态以及癌变与其水平变化有密切关系[9]，如载脂蛋白 E(Apolipoprotein E)与乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等相关[10-12]，且可作为 HCC 的一个组织学标记物[13]。

维生素 D 结合蛋白是一种具有多种功能的蛋白质，主要参与维生素 D 的转运和清除肌动蛋白，并具有免疫调节作用。目前已报道其与前列腺癌、肺癌的发生发展有关[14-15]，并且体外培养的人 HCC 癌细胞株表达此蛋白异常[16]。

铁传递蛋白是一种金属结合糖蛋白，它主要参与血清铁离子的转运，并具有调节细胞生长和增殖的功能，同时它也被认为是负性急性期反应蛋白。目前该蛋白在各种肿瘤中表达水平的报道结果不一，有升高亦有降低，但是也有报道发现铁传递蛋白与恶性淋巴瘤[17]、肾细胞癌[18]有关，并且可以作为肝细胞癌[19]的血清学标记物。

甲状腺素是一种激素类蛋白，它具有通过影响 DNA 转录和蛋白质合成来刺激代谢和调控生长发育的功能。目前，其与肿瘤的关系目前尚不明确，仍需要进一步探讨。

综上所述，我们这种采用乙腈预处理血清的方法，能提高血清蛋白质组分析时血清中低丰度蛋白质的检出率；同时，对肝细胞癌患者血清的分析，发现了甲状腺素、Proapolipoprotein、维生素 D 结合蛋白前体和铁传递蛋白的异常表达与 HCC 相关，有可能作为诊断肝细胞癌的潜在血清学标志物，从而有助于早期发现和有效治疗肝癌。

参考文献：

[1] 张伟东，苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析[J]. 中国健康教育，2009，25(4)：246-248.

[2] Thadikkaran L，Siegenthaler MA，Crettaz D，et al. Recent advances in blood-related proteomics [J]. Proteomics，2005，5(12)：3019-3034.

[3] Ahmed N，Barker G，Oliva K，et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum[J]. Proteomics，2003，3(10)：1980-1987.

[4] Huang HL，Stasyk T，Morandell S，et al. Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/

immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions[J]. Electrophoresis, 2005, 26(14): 2843-2849.

[5] Orvisky E, Drake SK, Martin BM, et al. Enrichment of low molecular weight fraction of serum for MS analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma[J]. Proteomics, 2006, 6(9): 2895-2902.

[6] 朱永华, 刘 炜, 石钟松, 等. 颅内动脉瘤患者血清蛋白质组变化的研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(6): 652-656.

[7] 崔 冀, 汪建平, 蔡世荣, 等. 运用蛋白质组学技术研究结肠黏膜、腺瘤及腺癌组织蛋白的表达差异[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(6): 744-748.

[8] Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, et al. Characterization of the low molecular weight human serum proteome[J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2(10): 1096-1103.

[9] Ahaneku JE, Taylor GO, Olubuyide IO, et al. Abnormal lipid and lipoprotein patterns in liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma [J]. J Pak Med Assoc, 1992, 42(11): 260-263.

[10] Chang SJ, Hou MF, Tsai SM, et al. Association between the apolipoprotein E genotypes and breast cancer patients in Taiwanese [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(1): 109-113.

[11] Chen YC, Pohl G, Wang TL, et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(1): 331-337.

[12] Wessel N, Liestol K, Maehlen J, et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele is no risk factor for prostate cancer in the Norwegian population [J]. Br J Cancer, 2001, 85(9): 1418.

[13] Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, et al. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2006, 28(3): 625-631.

[14] Kidd LC, Paltoo DN, Wang S, et al. Sequence variation within the 5′ regulatory regions of the vitamin D binding protein and receptor genes and prostate cancer risk [J]. Prostate, 2005, 64(3): 272-282.

[15] Watanabe H, Imaizumi M, Ojika T, et al. Evaluation of biological characteristics of lung cancer by the human 28 kDa vitamin D-dependent calcium binding protein, calbindin-D28k[J]. Jpn J Clin Oncol, 1994, 24(3): 121-127.

[16] Egawa T, Yamamoto H, Kishimoto S. Vitamin D-binding protein synthesized by a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. Clin Chim Acta, 1987, 167(3): 273-284.

[17] Hann HW, Lange B, Stahlhut MW, et al. Prognostic importance of serum transferrin and ferritin in childhood Hodgkin's disease[J]. Cancer, 1990, 66(2): 313-316.

[18] Frohlander N, Ljungberg B, Roos G. Genetic variation of haptoglobin and transferrin in relation to DNA content and stage in renal cell carcinoma [J]. Cancer, 1989, 63(6): 1138-1142.

[19] Suzuki Y, Aoyagi Y, Mori S, et al. Microheterogeneity of serum transferrin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1996, 11(4): 358-365.

(编辑 张恩健)

(上接第287页 from page 287)

27899 (Ziracin) against Legionella species[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999, 33(1): 59-62.

[17] Rhomberg PR, Biedenbach DJ, Jones RN. Activity of BMS284756 (T-3811) tested against anaerobic bacteria, Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori and Legionella spp[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001, 40(1-2): 45-49.

[18] Marco F, Biedenbach DJ, Jones RN. Anti-Legionella activity of trovafloxacin compared with seven other antimicrobial agents including an intermethod evaluation [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1997, 29(1): 55-57.

(编辑 孙慧兰)