

· 综述 ·

血清蛋白质组学在肿瘤研究中的现状及展望

柴凡 姜军

随着人类基因组计划(Human genomic project, HGP)的完成,生命科学的研究进入了一个崭新的后基因组时代。分子医学的研究重点已从结构基因组学转向功能基因组学,而蛋白质组学(proteomics)正是功能基因组学研究的重要支柱之一,在 20 世纪 90 年代逐渐兴起^[1]。使用蛋白质组学技术,鉴定血清中与肿瘤相关蛋白质表达情况,对揭示肿瘤发生发展机制、肿瘤早期诊断及分型、抗肿瘤药靶寻找、肿瘤个体化治疗和预后观察等方面都具有非常重要的意义。现对肿瘤血清蛋白质组学研究现状做一综述。

1 血清蛋白研究概况

1.1 血清蛋白及其分类

血清是一种复杂的体液成分。它与血浆的组成十分相近,区别在于前者缺乏纤维蛋白原和少量参与凝血的血浆蛋白,但又增添了少量凝血时由血小板释放的物质(是未经抗凝剂处理过的凝固血液中的上清物质)。因此对血清蛋白成分进行研究可以避免抗凝剂对蛋白质理化性质的影响。正常人每毫升血清中含蛋白约 60 ~ 80 mg,其组成和功能各异。血清蛋白质组学的研究对象是血清中出现的全部蛋白质,根据其来源与功能的不同可分为以下几类^[2]:①组织分泌蛋白:这类蛋白大多是由肝脏和肠道分泌,在血清中发挥作用;②免疫球蛋白:抗体也是在血清中发挥作用,但由于其极端的复杂性而成为一个特殊的种类,血清中的抗体可多达几百万种;③远程配体与受体蛋白:这类蛋白主要是各种激素,它们在血清中的浓度有一定的时效性,如胰岛素;④局部配体与受体蛋白:细胞因子和一些短距离细胞反应调节因子属于这类;⑤一过性蛋白:如溶酶体蛋白;⑥组织漏出蛋白:这类蛋白在正常情况下存在于组织细胞中,但由于各种原因被异常释放入血液;⑦异常分泌蛋白:如 PSA 等肿瘤相关蛋白;⑧外源性蛋白:某些有传染性的生物体,如病毒、寄生虫分泌或直接暴露于血液中的蛋白。其中,前两类是血清蛋白的主要成分,属于高丰度、大分子质量和易于检测的蛋白质。目前被分离、鉴定并

用于临床诊断的血清蛋白也多属于这两类。后几类血清蛋白多为低丰度蛋白。它们种类繁多且性质各异,分离和鉴定相对比较困难。

1.2 血清蛋白的研究历史

人类对血清原始成分的研究可以追溯到百年前。早在 19 世纪 Liebig 和 Schmidt 等人^[3]应用理化方法分离得到了清白蛋白和球蛋白。在第二次世界大战中,Cohn 和 Edsall^[4]开始将从血清分馏得到的大量清蛋白和 γ -球蛋白用于临床治疗。1955 年,有科学家用生物化学方法从心肌梗死病人的血清中分离鉴定出了天冬氨酸转氨酶,使血清蛋白的研究又前进了一大步。随着分子生物学技术的发展,特别是 1975 年 Kohler 和 Milstein^[5]获得了小鼠的单克隆抗体,使在血清中寻找特定蛋白成为可能。而 2-D 聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱等蛋白质组学新技术的出现,使得快速、高通量、大范围研究血清蛋白成为可能。

1.3 血清蛋白质组学

蛋白质组(proteome)是指一组基因所表达的全部蛋白质,在时间和空间的变化上是一个整体。蛋白质组的概念最初由澳大利亚学者 Wilkins 和其导师 Williams 于 1994 年在意大利 Siena 的一次 2-DE 电泳会议上首次提出,并于 1995 年首次在 Electrophoresis 上公开地使用“proteome”一词^[1]。蛋白质组学(proteomics)旨在认识细胞、组织、器官内全部表达的蛋白,包括数目、水平和表达蛋白的更新,它们的序列和一切转译后对序列的修饰,以及蛋白与蛋白、蛋白与其他分子之间在细胞内、细胞膜和细胞外的相互作用。血清因其取材容易、临床应用广泛、富含蛋白质、蛋白水平的变化与多种疾病有关联等特点,近年来逐渐成为蛋白质组学的研究热点之一。血清蛋白质组学是在整体水平上研究血清蛋白质的表达水平、翻译后修饰、相互间作用等,并由此在蛋白质水平获得疾病发生、发展、转归过程中的综合信息,对医学基础研究和临床实际应用都有着十分重要的意义。

2 血清蛋白质组学研究技术

DNA 虽然可以提供很多的信息,但是蛋白质才是细胞功能的真正体现者。血清蛋白质组按研究内容可分为结构蛋白质组和功能蛋白质组两大类。前者是研究血清蛋白质的组成,即对血清中所有蛋白质的表达状况的分析;而后者是研究血清蛋白质的功能。

2.1 结构蛋白质组

虽然有许多方法可用于结构蛋白质组研究,但目前最常用的主要包括蛋白质样品分离技术、双向凝胶电泳(two dimensional electrophoresis, 2-DE)技术、质谱(mass spectrometry, MS)分析技术和生物信息学(Bioinformatics)技术。

2.1.1 蛋白质样品分离技术 在基于 2-DE 的血清蛋白质图谱中,相对分子质量为 45 000 ~ 80 000,等电点为 4.5 ~ 6 的蛋白点堆积严重^[6],此外高丰度蛋白也影响了许多低含量蛋白的检出。所有依赖于分离的蛋白质组学方法都会面临这一问题。为解决这一问题,人们想了蛋白质样品分离预处理,主要方法包括:①超滤离心法:Georgiou 等^[7]使用超滤离心去除白蛋白等高丰度蛋白时,发现蛋白丢失现象很严重。Tirumalai 等^[8]对蛋白质超速离心分离技术加以改进,在血清中加入了破坏白蛋白对低分子量物质的载体作用的溶剂,减少了离心后小分子量蛋白随白蛋白分离而丢失现象,使得低分子量血清蛋白得以保留,再经胰酶消化、强阳离子交换柱分离,用毛细管液相色谱和串联质谱实时分析后鉴定了 340 多个血清蛋白质,而且证明没有一个肽段来自血清白蛋白。②免疫亲和层析法:在去除血清中的白蛋白方面,免疫亲和层析法在有效性和特异性方面均较染料亲和层析法强。用抗人血清白蛋白(HSA)的单克隆抗体免疫亲和柱对血清样品处理,可以有效去除血清中全部的白蛋白和白蛋白片段^[9]。理论上只要能找到特异性的抗体,就可以清除任何蛋白质。用这种经免疫亲和消减层析法去除高丰度蛋白制备得到的血清样品再行 2-DE,可在胶上显现出更多的低丰度蛋白。③等电聚焦预分离:除了利用分子量和抗原抗体反应清除血浆中高丰度蛋白外,还可根据蛋白质等电点的不同,用微量溶液等电聚焦进行初步分馏,将血清蛋白划分为一系列连续 pH 值的部分后再行 2-DE,这样做使 2-DE 的上样量至少提高了 6 ~ 30 倍^[10],对于分辨低丰度蛋白检测极为有利。④多维分离质谱鉴定:Adkins 等^[11]用蛋白 A/G 去除血清免疫球蛋白,将余下的蛋白酶切,获得的肽段用强阳离子交换柱分成不同组分,再用反相毛细管液相色谱以及离子阱质谱在线鉴定了 490 个蛋白质,使检测到的蛋白量比以往增加了 3 ~ 5 倍,并且检测到 $\mu\text{g/L}$ 范围的低丰度蛋白。

2.1.2 双向凝胶电泳技术 1975 年,O'Farrell^[12]首先建立了 2-DE 的方法学。他利用等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)和十二硫酸烷基钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)联合的 2-DE 分离了大肠杆菌中的蛋白质。双向凝胶电泳技术是依据蛋白质的等电点和相对分子质量的不同在电场中将其分开,在平面聚丙烯酰胺凝胶上形成一个双向图谱,故又被称为双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gelelectrophoresis, 2D-PAGE),是蛋白质分离的核心技术。其第一向是等电聚焦(isoelectric focusing, IEF),根据等电点的不同将蛋白质进行分离;第二向是十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。随着双向电泳技术的不断发展,样品制备过程的完

善以及固相酸碱梯度(immobolized pH gradient, IPG)的发明和完善及染色方法的改进,克服了载体两性电解质引起的凝胶时间延长、梯度不稳和阴极漂移等现象,使得 2-DE 的稳定性和可重复性得以明显改善。目前,一张 2-DE 图谱可以分辨出 10 000 多个蛋白质斑点。

2.1.3 质谱分析技术 蛋白质组学研究中最为关键的一步就是对分离的蛋白质样品进行鉴定。这其中最大的突破就是质谱技术的引入。它是对蛋白质进行鉴定的基本手段,已成为蛋白质鉴定的核心技术。其基本原理是带电粒子在磁场中运动的速度和轨迹依粒子的质荷比的不同而变化,从而可以根据其变化的不同判断粒子的质量及其特性。目前常用的方法有:①基质辅助激光解吸附电离质谱(matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-MS)是利用基质吸收激光的能量使得固相的多肽样品离子化^[13];②电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)是通过喷射过程中的电场对样品进行离子化。经质谱技术可得到肽质指纹图(peptide mass fingerprinting, PMF)和肽序列标签(peptide sequence tag, PST)后再进行数据库的搜索,从而实现了对蛋白质的定性、定量鉴定^[14]。③表面增强激光解吸离子化(surface enhanced laser desorption ionization, SELDI)是一种基于 MS 的蛋白质组分析技术。SELDI 蛋白质芯片技术在蛋白质组学中多应用在筛选和确定肿瘤标志物方面,是利用具有不同化学或生物表面修饰的芯片,选择性地富集一组蛋白质,在添加能量吸收分子后,送入蛋白质芯片阅读机,用飞行时间质谱检测被富集到样品上的所有蛋白质^[15]。SELDI 蛋白质芯片技术的优点是不需要双向电泳预先分离蛋白质,其灵敏度高,可直接检测到传统方法检测不到的蛋白质和多肽,并可快速找出新的肿瘤标记物,获得尽可能多的蛋白质组学信息,所以使用价值更高。

2.1.4 二维液相分离-质谱鉴定 由于二维电泳还存在一些局限,如不易完成:低丰度蛋白质的检测;相对分子质量过大或过小蛋白质的检测;极酸或极碱性蛋白质的分离;高疏水性蛋白质的检测等。为了解决上述问题,研究者们也在积极发展通过非二维电泳的方法来获得图谱。主要有两种技术:一种是液相色谱和串联质谱联用(liquid chromatography and tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。该方法将复杂的蛋白质样品酶解消化后,再通过一维或多维色谱预分离,然后用串联质谱对多肽混合物进行鉴定分析。虽然目前该技术还不能替代 2-DE-MS 在蛋白质组学研究中的核心位置,但由于 LC-MS/MS 能够弥补 2-DE-MS 的上述缺陷,使得蛋白质分离、质谱分析、蛋白回收只需几个小时,分析速度快且实现自动化,展现了极大的应用前景^[16]。另一种近年来发展很快的快速筛检复杂蛋白质

样品的方法是蛋白质芯片技术。蛋白质芯片是一种含有多种微量纯化多肽、抗体等蛋白质的微阵列,能够高通量地测定这些蛋白质的生物活性以及蛋白质与生物大分子间的相互作用。由于蛋白质芯片具有这些优点,在蛋白组学研究中的应用越来越广泛^[17]。

2.1.5 生物信息学技术 是以生物大分子为研究对象,依托高速发展的计算机技术,运用数学和信息学的观点、理论和方法去研究生命现象,组织和分析数量极其庞大且呈指数增大的生物信息数据的一种研究方法^[18]。蛋白质组学研究中,生物信息学的核心是蛋白质数据库。无论是作为蛋白质组研究核心的双向电泳分离技术,还是作为其支柱的质谱鉴定技术都离不开生物信息学的发展。蛋白质数据库(protein data bank, PDB)已经创立了一个系统。用这个系统可以对高度完整的结构基因组数据进行处理、交换、询问和分配^[19]。从 1994 年起每年第一期《核酸研究》(Nucleic Acids Research)是分子生物学数据库专刊,由 Andreas D. Baxevanis 综述当前的在线分子生物学数据库资源。主要的蛋白质数据库有: SWISS-PROT/TrEMBL^[20] (<http://www.expasy.ch/sprot> 或 <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)、Protein Information Resource (PIR) (<http://pir.georgetown.edu/>), 以及 NCBI nr、dbEST、OWL、UniGene 等;主要的蛋白质组数据库有: AAindex^[21] (<http://www.genome.ad.jp/dbget/>)、GELBANK (<http://gelbank.anl.gov>) 以及 Predictome、Proteome Analysis Database、REBASE、SWISS-2DPAGE、YPL.db 等;蛋白质序列基序数据库有: Blocks (<http://blocks.flhrc.org>)、CluSTr (<http://www.ebi.ac.uk/clustr>)、以及 CDD、InterPro、Pfam、PROSITE 等。此外,近年来还出现了一些蛋白质三维结构和相关数据库,例如用 X 射线晶体学和核磁共振法(NMR)得到的结构数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/PDB/>)、将实验测得的三维结构连接到 NCBI 的 Entrez 构建的 MMDB (<http://www.sander.ebi.ac.uk/>) 以及大量在线蛋白工具。随着生物信息学的发展,会有更多的数据库涌现出来。这将大大地方便蛋白质组学的研究。利用这些数据库,我们不仅可以得到已知蛋白质的结构相关信息,如表观分子量、等电点、蛋白质名称和鉴定方法等,而且还可以通过数据库搜索、比对分析,对未知蛋白质的功能进行预测。

2.2 功能蛋白质组

功能蛋白质组学综合使用各种分子生物学技术,研究蛋白质间或其上游水平的蛋白质-DNA、RNA 之间的相互作用,和蛋白质的转录后修饰等,有助于了解在整体系统中蛋白质之间的相互作用方式及其在复杂的细胞信号通路中的作用,以及活细胞对内部和外部信号做出反应的机制。通过传统的蛋白质研究方法,

如免疫沉淀、Western Blot、酵母双杂交系统^[22-23]和先进的蛋白质组学研究方法,如激光捕获微分离(laser capture microdissection, LCM)、抗体芯片、组织芯片、反相蛋白质芯片等对蛋白质进行功能鉴定,并进行组织细胞内的蛋白定位,进行蛋白质的合成和活性分析,从而构建比较完整、全面的蛋白质数据库。例如 Wulfschlegel 等^[24]首次应用激光捕获显微分离(LCM)技术从正常乳腺导管上皮中分离出肌动蛋白连接蛋白,其表达量明显高于乳腺导管原位癌,有作为生物标志物的可能。Jungblut 等^[25]用双向凝胶电泳与氨基酸测序相结合的方法,发现一种低分子蛋白 Calgranulin B,见于 57% 的结肠癌,可能成为诊断结肠癌的有力标志物。Prasanna 等^[26]鉴定 23 个神经母细胞瘤患者血清中蛋白的变化,对照其他的 12 个实体瘤患者和 13 名正常人血清,用 Western Blot 分析,筛选抗神经母细胞瘤的 IgG 和 IgM 自身抗体。结果提示,在神经母细胞瘤中有免疫原性 β -微管蛋白多肽的存在,而且可能会用于神经母细胞瘤的诊断和免疫治疗。

3 血清蛋白质组学研究内容

3.1 发现肿瘤标志物

Chen 等^[27]对肺腺癌进行了蛋白组分析,运用固相 pH 梯度双向凝胶电泳方法检测 93 例肺腺癌和 10 份非肺癌标本,进而用 MALDI-MS 进行肽段分析,结果发现有 9 例蛋白中的单一亚型在肺腺癌中表达,有助于成为该种肿瘤的生物标记^[28]。Adam 等^[29]用 SELDI 蛋白质芯片系统从血清中筛选出前列腺癌的特异性生物标记物,并用于诊断,当用其中 21 个蛋白作为一个诊断组来诊断前列腺癌与非前列腺癌时特异性和敏感性可达 97%。

3.2 肿瘤早期诊断、良恶性判断

在对浸润性乳腺癌、乳腺纤维腺瘤、前列腺癌、儿童白血病及进展阶段神经母细胞瘤等^[30, 31]多种肿瘤的蛋白质组表达谱的研究中发现,许多恶性肿瘤相关分子表达是相似的,如 PCNA、HSP、OP18 (oncoprotein 18)、核苷酸脱磷酸酶 A (nm23-H1) 等与细胞增殖活性、抗凋亡、促进细胞转移相关的分子,一般是高表达。原肌凝蛋白和角蛋白(cytokeratin, CK)大部分低表达,说明不同肿瘤的生物特性有相似之处,其发生发展可能有类似的过程和共同的信号通路,寻找肿瘤共有的特征性诊断分子标志物是可行的。将这些蛋白质组成恶性肿瘤蛋白谱,联合多种分子标志物进行分析,将有利于对肿瘤作出早期诊断。

3.3 揭示肿瘤发病机制

有研究表明,从蛋白质组学角度可认为肿瘤是一种蛋白质表达缺陷病,其发生过程中有多种蛋白质发生异常变化。这种变化不仅反应出蛋白质表达量的增

加或减少,也包括蛋白质翻译后修饰方面的改变,并构成肿瘤组织蛋白质表达谱的改变^[32-33]。Hu 等^[34]使用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片检测 49 例乳腺癌患者,51 例新发乳腺癌患者和 33 例正常人血清,使用生物信息学和人工智能网络方法综合分析,发现了 4 个新的乳腺癌候选基因。Stierum 等^[35]用 2-DE 质谱技术分析了大肠癌 Caco-2 细胞系的蛋白质组,发现有 11 种蛋白质与其增殖和分化有关,推测与蛋白质的折叠、二硫键形成、细胞骨架形成和维持及核酸代谢等有关。研究还发现 CH60 等其他 4 种蛋白质与结肠癌的发生密切相关。这些发现有助于进一步探明肿瘤的发生发展机制。

3.4 肿瘤治疗、药物靶标寻找

通过寻找蛋白质靶标,可以进行肿瘤靶向治疗,还能促进新药的开发和利用。Melhem 等^[36]对 177 例儿童急性白血病研究发现,Op18 的磷酸化程度与肿瘤负荷明显相关,并与 S 期的细胞数相关。复发患者中非磷酸化 Op18 少而磷酸化 Op18 比例升高,因此对 Op18 的表达或磷酸化的调节,可抑制白血病细胞的增殖,作为白血病治疗的一个切入点。Sinha^[37]等研究了人类黑素瘤细胞系 MeWo 和长春地辛等药物诱导的耐药株,通过双向电泳发现了 4 种新的与耐药有关的蛋白质: TCTP、翻译控制肿瘤蛋白、E1 δ 和 14-3-3 蛋白 δ ,它们的高表达干扰 chaperone 系统,影响转录机制,对这些蛋白作用机理的进一步研究有助于开发更有效的化疗药物。

3.5 抗肿瘤治疗预后判断

蛋白质组学的研究在整个蛋白质组水平上提供了研究细胞通路以及疾病与干预药物相互作用和一些生物刺激引起的功能紊乱的可能性,因此用蛋白质组学技术可以作为肿瘤治疗评价、预后判断的强有力手段之一。Chen 等^[38]研究了多柔比星作用于乳腺癌细胞前后 MCF27(巨噬细胞趋化因子)的蛋白表达发现 DOX 引起 HSP27 的三种亚型明显下降,而其他的关键相关蛋白(HSP60,钙网蛋白和二硫化物异构酶)没有显著变化。且认为 DOX 对乳腺癌的作用可能与 HSP27 的表达调节不良有关,HSP27 水平的调节也许对抗肿瘤药物设计和控制乳腺癌的生长是一个临床有用的潜在目标。Ross 等^[39]通过对 HER-2/neu 相关血清蛋白的研究发现,HER-2/neu 可以作为预测新辅助化疗、细胞毒性治疗和放疗的预后观察指标。

4 存在的问题及发展方向

血清蛋白质组学作为跨越基因组与临床应用之间鸿沟的桥梁,在诞生后的几年中已经取得了突飞猛进的发展。蛋白质组学研究的新方法、新技术、新观点不

断涌现,展现出广阔的应用前景。人们在憧憬蛋白质组研究美好未来的同时,也应看到蛋白质组学作为新生领域,在很多方面还显得很稚嫩:①2-DE 灵敏度虽已达到飞摩(10^{-12} mol)级水平,但一些低丰度或极酸性、极碱性蛋白质仍难检测。而在肿瘤发生发展过程中,这些蛋白质往往具有重要作用,甚至较其他高丰度蛋白质意义更大。②现有质谱技术虽然在蛋白质组分鉴定中高效、灵敏、特异,但所用仪器价格十分昂贵,一般十倍于 DNA 自动测序仪,国内外只有少数单位有能力购买。因此其开展受到很大限制,而且因条件不同、环境不同,实验室得到的结果间可比及、可重复性较差。③研究不能仅局限于对已完成基因组计划的理论预测蛋白质进行实证分析,还要进行前瞻性蛋白质组学研究以推动蛋白质组学的学科发展,但理论和技术上还存在很多尚待解决的问题。此外,蛋白质数据库目前还不成熟、完善,建立完整的蛋白质数据库还需要很长一段时间。如何管理和利用蛋白质芯片技术测定得到的大量表达数据?哪些蛋白质可以作为候选者进行下一步研究?如何确定某个蛋白表达与肿瘤发生的因果关系?蛋白表达与其上游的 RNA、基因调控间的关系……都有待于进一步深入的研究。

5 结语

人类基因组测序草图显示,人类基因约有 $(31 \sim 31.5) \times 10^5$ 个,而与蛋白质合成相关的基因只占基因组的 2%^[40],Nature 和 Science 在 2001 年 2 月公布人类基因组草图的同时发表了“*And now for the proteome*”^[41]、“*Proteomics in genome-land*”^[42]的评述与展望,更是将蛋白质组学的地位提到前所未有的高度。事实表明,蛋白质组学研究已经成为新世纪生命科学研究的“主战场”之一。可以预见,随着人类血清蛋白质组学研究方法的更新和研究数据的不断积累,我们会在肿瘤早期诊断分型、临床个体化治疗、抗肿瘤靶向药物设计以及疗效预后判。

【关键词】 血清;蛋白质组学;肿瘤

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Wasinger V C, Humphery Smith I, Willams K L, *et al*. Progress with gene product mapping of the molicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1090 - 1094.
- [2] Anderson N L, Anderson N G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 845 - 867.
- [3] Putnam F W. Perspectives past, present and future. In: Putnam FW, ed. *The plasma proteins structure, function, and genetic control*. New York Academic Press, (1975 - 1987): 1 - 55.
- [4] Cohn E J. The history of plasma fractionation. *Advances in Military Medicine*, 1948, 1: 364 - 443.
- [5] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 49 - 57.

- [6] Pieper R, Su Q, Gatlin C L, *et al*. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomic*, 2003, 3:422 – 432.
- [7] Georgiou H M, Rice G E, Baker M S. Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins. *Proteomics*, 2001, 1:1503 – 1506.
- [8] Tirumalai R S, Chan K C, Prieto D A, *et al*. Characterization of the low molecular weight human serumproteome. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2:1096 – 1103.
- [9] Steel L F, Trotter M G, Nakajima P B, *et al*. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2:262 – 270.
- [10] Zuo X, Speicher D W. Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two – dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 2002, 2:58 – 68.
- [11] Adkins J N, Varnum S M, Auberry K J, *et al*. Toward a human blood serumproteome: analysis by multi – dimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1:947 – 955.
- [12] O'Farrell P H. High resolution two – dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250:4007 – 4021.
- [13] Stuhler K, Meyer H E. MALDI: more than peptide mass fingerprints. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6:239 – 248.
- [14] Conrads T P, Hood B L, Issaq H J, *et al*. Proteomic patterns as a diagnostic tool for early-stage cancer: a review of its progress to a clinically relevant tool. *Mol Diagn*, 2004, 8:77 – 85.
- [15] Issaq H J, Veenstra T D, Conrads T P, *et al*. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292:587 – 592.
- [16] Wall D B, Berger S J, Finch J W, *et al*. Continuous sample deposition from reversed-phase liquid chromatography to tracks on a matrix-assisted laser desorption/ionization precoated target for the analysis of protein digests. *Electrophoresis*, 2002, 23:3193 – 3204.
- [17] Macbeat H G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays for high – throughput function determination. *Science*, 2000, 278(5485):1760 – 1763.
- [18] O'Donovan C, Apweiler R, Bairoch A. The human proteomics initiative (HPI). *Trends Biotechnol*, 2001, 19:178 – 181.
- [19] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, *et al*. The protein data bank. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28:235 – 242. .
- [20] Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28:45 – 48.
- [21] Kawashima S, Kanehisa M. AAindex: amino acid index database. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1):374.
- [22] Gavin A C, Bosche M, Krause R, *et al*. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, 415:141 – 147. .
- [23] Ho Y, Gruhler A, Bader G D, *et al*. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 2002, 415:180 – 183.
- [24] Wulfkuhle J D, Sgroi D C, Krutzsch H, *et al*. Proteomics of humanbreast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*, 2002, 62:6740 – 6749. .
- [25] Jungblut P R, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, *et al*. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious disease. *Electrophoresis*, 1999, 20(10):2100 – 2110.
- [26] Prasanna L, Misek D E, Hinderer R, *et al*. Identification of betatubulin isoforms as tumour antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:3949 – 3956. .
- [27] Chen G, Gharib T G, Huang C C, *et al*. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:2298 – 2305. .
- [28] Birchory F, Beer D, Hanash S, *et al*. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Research*, 2001, 61:7908 – 7912. .
- [29] Adam B L, Qu Y, Davis J W, *et al*. Serum protein fingerprinting coupled with a patternmatching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*, 2002, 62:3609 – 3614.
- [30] Bergman A C, Benjamin T, Alaiya A. Identification of gel-separated tumor marker protein by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21:679.
- [31] Alaiya A A, Franen B, Auer G, *et al*. Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning

- models for tumor classification. Electrophoresis,2000,21:1210.
- [32] Smith R A, Cokkinides V, Eyre H J. American cancer society guidelines for the early detection of cancer. CA Cancer J Clin, 2003,53:27.
- [33] Petricoin E F, Liotta L A. Proteomic analysis at the bedside; early detection of cancer. Trends Biotechnol,2002,12:S30.
- [34] Hu Y, Zhang S, Yu J, *et al* . SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer. Breast,2005,14:250 – 255.
- [35] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, *et al* . Proteome analysis reveal novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. Biochim Biophys Acta,2003,1605:73.
- [36] Melhem R, Hailat N, Kuick R, *et al* . Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. Leukemia, 1997,11:1690.
- [37] Sinha P, Kohl S, Fischer J. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two – dimensional electrophoresis. Electrophoresis,2000,21:3048.
- [38] Chen S T, Pan T L, Tsai Y C, *et al* . Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin treated MCF 27 human breast cancer cells. Cancer Lett,2002,181:95 – 107.
- [39] Ross J S, Fletcher J A, Bloom K J, *et al* . Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. Mol Cell Proteomics,2004,3:379 – 398.
- [40] Venter J C, Adams M D, Myers E W, *et al* . The sequence of the human genome. Science,2001,291:1304 – 1351.
- [41] Abbott A. And now for the proteome. Nature,2001,409:747.
- [42] Fields S. Proteomics in genomeland. Science,2001,291:122.

(收稿日期:2006-12-10)

(本文编辑:周艳)