

· 临床研究 ·

乳腺癌血清蛋白质芯片检测在预测乳腺癌预后中的应用

王曦 杨名添 谢泽明 唐军 周中梅 曾益新 朱振宇

【摘要】 目的 通过乳腺癌血清蛋白质芯片检测来分析乳腺癌的预后差异,寻找新的判断预后的指标,以期为临床治疗方案的选择提供有价值的依据。**方法** 采用美国 Ciphergen 公司生产的蛋白质芯片阅读机,选择 IMAC-3 和 WCX-2 两种芯片,对 64 例乳腺癌患者血清进行研究。64 例乳腺癌患者全部随访 5 年,死亡 13 例。采用 Ciphergen proteinchip3.0 软件分析乳腺癌患者血清的蛋白质谱。将 13 例死亡患者的蛋白质图谱与其余患者的进行比对,差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。**结果** 在 WCX-2 蛋白芯片,有 2 个位点,相对分子质量(M_r)分别为 9405 和 6424 的位置,死亡与生存乳腺癌患者的血清蛋白峰表达有差异,在 M_r 9405 的位置,生存乳腺癌患者低表达;在 M_r 6424 的位置,生存乳腺癌患者高表达,敏感性为 76.9% ~ 84.6%, 特异性为 76.4% ~ 80.3%。在 IMAC-3 蛋白芯片,发现有 2 个位点, M_r 分别为 4643 和 5910 的位置,死亡与生存的乳腺癌患者血清蛋白峰表达有差异,生存乳腺癌患者高表达,敏感性为 61.5% ~ 76.9%, 特异性为 68.6% ~ 74.5%。**结论** 死亡与生存乳腺癌患者血清蛋白峰表达存在差异,有可能成为新的判断乳腺癌预后的指标。

【关键词】 乳腺肿瘤;蛋白质芯片

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Proteome analysis for the identification of tumor-associated biomarkers to predict breast cancer prognosis WANG Xi, YANG Ming-tian, XIE Ze-ming, TANG Jun, ZHOU Zhong-mei, ZENG Yi-xin, ZHU Zhen-yu. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China

【Abstract】 Objective To find new biomarkers that can estimate the prognosis of breast cancer patients, for the patients who have the similar staging and accept same treatment get different treatment results. **Methods** Protein expression differences of serum samples of 64 breast cancer patients were analyzed with IMAC - 3 and WCX - 2

基金项目:2003 年广东省科学计划项目(2003 - 245)

作者单位:510060 广州,华南肿瘤学国家重点实验室(王曦、杨名添、谢泽明、唐军、周中梅、曾益新);510060 广州,中山大学肿瘤防治中心胸科(王曦、杨名添、谢泽明、唐军),内科(周中梅),实验研究部(曾益新);510089 广州,中山大学医学部生化教研室(朱振宇)

通讯作者:杨名添, E-mail: ymt988@medmail.com.cn

Ciphergen Protein Chip Arrays. Five-year follow-up of all the 64 breast cancer patients showed 13 patients died. The protein atlas of the 13 dead patients was compared with that of the other patients. **Results** On WCX-2 chip, a panel of two proteins (M_r 9405 and M_r 6424) was selected based on their collective contribution to the optimal separation between the dead patients and alive patients after 5-year follow-up. On M_r 9405 site survived breast cancer patients had low expression, on M_r 6424 site survived breast cancer patients had high expression, with sensitivity of 76.9% – 84.6% and specificity of 76.4% – 80.3%. On IMAC-3 chip, another two proteins (M_r 4643 and M_r 5910) had the ability to distinguish between the dead patients and alive patients after 5-year follow-up. Survived breast cancer patients had high expression, with sensitivity of 61.5% ~ 76.9% and specificity of 68.6% ~ 74.5%. **Conclusion** Protein expression in dead patients after 5-year follow-up is different from that of alive patients after 5-year follow-up, and those proteins with different expressions can be used as new biomarkers to predict breast cancer prognosis.

【Key words】 Breast neoplasms; Proteome analysis

目前认为,肿瘤的分期尤其是腋窝淋巴结状况对乳腺癌患者预后的影响最大。但就目前的 TNM 分期,我们发现:相同分期、相似治疗模式的患者会有不同的治疗效果;早期(I 期)患者中近 8% 生存不超过 5 年,而中、晚期(III 期)患者中又有近 47% 生存超过 5 年^[1]。因此,如何更准确地预测乳腺癌患者的预后并选择相应的治疗方案,便成为乳腺癌研究的热点。近年来由于分子生物学的进展,为寻找新的判断肿瘤预后的指标提供了线索。本研究通过乳腺癌血清蛋白质芯片检测,分析乳腺癌预后差异,以期能在临床治疗方案选择上提供有价值的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

己氰,三氟乙酸,尿素,蛋白酶抑制剂,N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(Hepes), Tris-HCl,3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS) 和 OGP。IMAC-3 蛋白质芯片和 WCX-2 蛋白质芯片购于美国 Ciphergen 公司。

1.2 标本来源

64 例乳腺癌患者血清由中山大学肿瘤中心标本库提供。64 例乳腺癌患者,年龄 21 ~ 59 岁,中位年龄 41 岁,其中 I 期乳腺癌 19 例,II 期乳腺癌 24 例,III 期乳腺癌 21 例。64 例均为 2001 年收治的乳腺癌患者,随访 5 年后死亡患者 13 例,其中,II 期乳腺癌 6 例,III 期乳腺癌 7 例。

1.3 蛋白质芯片阅读机

蛋白质芯片阅读机(美国 Ciphergen 公司生产)实际上是一台激光解吸电离

飞行时间质谱仪。它可检测 M_r 1000 的小分子物质以及多肽,也可检测 M_r 500 000 以下的蛋白质大分子。它与蛋白质芯片结合在一起构成了蛋白质芯片检测系统。

1.4 蛋白质芯片

采用两种化学修饰的蛋白质芯片:IMAC-3 芯片(固定金属亲和芯片),其表面结合有亚硝基,可螯合金属离子(如 Cu, Ni, Ga 等),加到芯片表面结合点上的蛋白质通过半胱氨酸和色氨酸位点上的磷酸化氨基酸等与金属离子结合,主要用于检测磷酸化蛋白及生物标记分子;WCX-2 芯片(弱阳离子交换芯片),其表面结合有弱型阴离子羧基,可和被分析物表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)而捕获蛋白,可用于检测高等电点的蛋白质和生物标记分子。

1.5 标本采集

分别采集全血 4 ~ 5 ml 立即放入 4 °C 冰箱静置 3 h, 4 °C 1000 r/min 离心 30 min, 吸取血清按每管 100 μ l 分装置 -70 °C 保存。

1.6 标本准备

用 Cibacron Blue 除去血清白蛋白后,取 20 μ l, 按 1 : 7 用 pH7.0 缓冲液(100 mmol/L 磷酸钠, 250 mmol/L 氯化钠)稀释至 150 μ l。

1.7 芯片的预处理

芯片每孔加 100 mmol/L 硫酸 50 μ l, 室温下 200 r/min 振荡 5 min, 弃硫酸铜, 用去离子水冲洗 5 次后甩干, 每孔中加入 100 mmol/L 醋酸钠 50 μ l (pH4.0) 室温下 200 r/min 振荡 5 min, 弃除未结合的铜离子。芯片每孔加入 150 μ l 结合洗脱缓冲液(50 mmol/L, HEPES pH7.0)后置振荡器上, 室温孵育 5 min 后, 弃缓冲液重复 1 次。每孔加入 50 μ l 稀释标本, 置振荡器上, 4 °C 孵育 60 min 后, 弃缓冲液。然后用 150 μ l 结合洗脱缓冲液冲洗 3 次, 每次振荡 5 min, 最后 1 次用 1 mmol/L HEPES pH7.0 快速冲洗, 取出芯片在每孔周围用疏水笔圈样品孔并风干, 在能量吸收分子 EAM (SPA) 中加 75 μ l 乙氰和 1% 三氟乙酸 75 μ l, 充分振荡 5 min 确保 SPA 全部溶解, 离心 1 min; 每孔分 2 次加 SPA (1 μ l/次, 2 次之间允许各孔风干)。

1.8 芯片检测

1.8.1 IMAC-3 蛋白芯片实验步骤:在 IMAC-3 蛋白芯片 8 个点(A-H)的表面加 10 μ l 100 mmol/L CuSO_4 , 置入湿盒内孵育 15 min, 吸去剩余的 CuSO_4 , 加 5 μ l 结合缓冲液(100 mmol/L NaCl, pH 7.0)于芯片各点上, 孵育 5 min, 吸去芯片各点上的液体, 将芯片安装于 Bioprocessor 上, 每点分别加 20 μ l 不同组分的流出液和 80 μ l 结合缓冲液, 振荡孵育 30 min, 弃液体, 各点用 200 μ l 洗脱缓冲液(100 mmol/L NaCl, pH 7.0)洗涤 2 次, 每次 5 min, 卸去 Bioprocessor, 取出芯片用 M-Q 液洗涤 2 次, 待芯片表面自然晾干后, 各点加 2 次 0.5 μ l SPA, 芯片表面干后, 用蛋白质芯片阅读机(PBS II 型)进行蛋白质谱分析。

1.8.2 WCX-2 蛋白芯片实验步骤:用 5 μl 10 mmol/L HCl 预处理 WCX-2 蛋白芯片上 A-H 点 10 min, 用 M-Q 液洗涤芯片 3 次, 将芯片安装于 Bioprocessor 上, 芯片 A-H 点加 150 μl 结合缓冲液(100 mmol/L 乙酸钠, pH 4.0), 室温下振荡孵育 5 min, 弃液体, 每点分别加 10 μl 不同组分流液和 90 μl 结合缓冲液, 振荡孵育 30 min, 弃掉液体, 用 150 μl 洗脱缓冲液(100 mmol/L 乙酸钠, pH 4.0)洗涤芯片 2 次, 每次 5 min, 卸去 Bioprocessor, 芯片用 M-Q 水洗涤 2 次, 待芯片表面自然晾干后, 各点加 2 次 0.5 μl SPA, 芯片表面干后, 用蛋白质芯片阅读机(PBS II 型)进行蛋白质谱分析。

1.8.3 蛋白质谱及统计学分析:用加有 Ciphergen 公司 All-in-one 标准蛋白质的 NP20 芯片校正质谱仪, 设定仪器参数, 在 Ciphergen ProteinChip 软件中设定读片程序, 激光强度 190, 检测敏感度 10, 采用 Ciphergen proteinchip 机带分析软件自动采集数据, 结果采用 Ciphergen proteinchip 3.0 软件分析乳腺癌患者血清的蛋白质谱。本研究将 13 例死亡患者的蛋白质图谱与其余患者的进行比对, 差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。计算机以每秒 1 GHz 的速度, 从所获得的原始数据快速精确的绘制出蛋白质质谱图。

2 结果

本研究发现:在 WCX-2 蛋白芯片上, 有 2 个位点, M_r 分别为 9405 和 M_r 6424 的位置, 死亡与生存乳腺癌患者血清蛋白峰表达有差异, 在 M_r 9405 的位置, 生存乳腺癌患者低表达; 在 M_r 6424 的位置, 生存乳腺癌患者高表达, 敏感性为 76.9% ~ 84.6%, 特异性为 76.4% ~ 80.3% (表 1)。在 IMAC-3 蛋白芯片上, 也有 2 个位点, M_r 分别为 4643 和 5910 的位置, 死亡与生存乳腺癌患者血清蛋白峰表达也有差异, 生存乳腺癌患者高表达, 敏感性为 61.5% ~ 76.9%, 特异性为 68.6% ~ 74.5% (表 1)。

表 1 蛋白芯片上生存乳腺癌患者蛋白峰表达的敏感性和特异性

蛋白质芯片	蛋白相对分子质量	敏感性/(%)	特异性/(%)
WCX-2	9405	76.9 (10/13)	80.3 (41/51)
	6424	84.6 (11/13)	76.4 (39/51)
IMAC-3	4643	61.5 (8/13)	68.6 (35/51)
	5910	76.9 (10/13)	74.5 (38/51)

3 讨论

用蛋白质芯片技术对癌症相关蛋白进行研究发展较快。2002 年 Li 等^[2]对 103 例乳腺癌患者, 41 例健康妇女及 25 例乳腺非癌患者血清采用 SELDI 蛋白质

芯片技术进行研究,结果发现在乳腺癌患者和对照者之间有明显差异,敏感性 93%,特异性 91%。他们认为所发现的差异蛋白是很好的乳腺癌早期诊断的生物标志物。后来又有多位学者采用 SELDI 蛋白质芯片技术将乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌、头颈部恶性肿瘤、膀胱癌患者与非癌对照者的血清或排泄物样品通过蛋白质芯片进行了研究,根据特定条件下检测出的不同图谱,发现在癌症患者和正常人之间有多种差异蛋白。然后他们又从这些蛋白中选择出几个估计有判别价值的蛋白在其他癌症患者及健康人中加以验证。此后他们在不同类型、不同阶段的恶性病变及良性病变中进行比较性研究,以确定这一蛋白的临床意义^[3-11]。作者采用 SELDI 技术的研究也发现,在 WCX-2 蛋白芯片上, M_r 为 8749、8905、9116、9470 和 9692 的 5 个位点,在乳腺癌患者与乳腺非癌患者及正常妇女血清之间蛋白峰表达有差异,乳腺癌患者蛋白质峰的表达较乳腺非癌患者及正常妇女表达高;在 IMAC-3 蛋白芯片上, M_r 分别为 5063、5213、5236、5334、5374、7464、7623、7756 和 7823 的 9 个位点位置,乳腺癌患者与乳腺非癌患者及正常妇女血清蛋白峰表达有差异,蛋白质峰的表达乳腺癌患者较乳腺非癌患者和正常妇女表达低^[12]。

近年来,有研究报道不同分期乳腺癌蛋白峰表达的差异,以及这些差异在预后判断中所起的作用。Pusztai 等^[13]对 69 例 I ~ III 期乳腺癌患者化疗前后血清以及 15 例健康志愿者妇女血清进行研究,发现 5 个蛋白峰在乳腺癌患者和正常妇女间存在差异;在紫杉醇类药物术前新辅助化疗的患者中发现 1 个蛋白峰(M/Z 2790),有 80% 的患者在治疗前后存在差异。他们认为,SELDI 技术不仅能准确地区分乳腺癌患者和正常妇女,而且可作为判断术后出现微转移的指标。

Ricolleau 等^[14]对 30 例无复发的腋淋巴结阴性患者和 30 例出现复发转移的腋淋巴结阴性患者进行蛋白质表达的差异比较,总共收集了 73 个蛋白峰,发现其中 2 个蛋白峰能明确区分上述两组患者。本研究发现:经过 5 年随访的 64 例乳腺癌患者中,13 例死亡的乳腺癌患者和 51 例生存患者的血清蛋白质表达有差异;在 WCX-2 蛋白芯片,有 2 个位点, M_r 分别为 9405 和 6424 的位置,死亡与生存乳腺癌患者血清蛋白峰表达有差异,敏感性为 76.9% ~ 84.6%,特异性为 76.4% ~ 80.3%;在 IMAC-3 蛋白芯片,也有 2 个位点, M_r 分别为 4643 和 5910 位置,死亡与生存乳腺癌患者血清蛋白峰表达有差异,敏感性为 61.5% ~ 76.9%,特异性为 68.6% ~ 74.5%。上述蛋白质位点可能成为判断乳腺癌预后的新指标,从而有可能为乳腺癌患者治疗方案的选择提供重要的依据。

目前,应用 SELDI 蛋白质芯片技术对乳腺癌预后预测的研究越来越多。然而,SELDI 蛋白质芯片技术只提示蛋白峰表达的位点,并不能明确此位点究竟为何种蛋白。因此,对有差异的分子质量位点蛋白的分离、纯化需进一步研究,以便进一步了解其影响乳腺癌预后的相关机制。

参考文献

- [1] 杨名添, 戎铁华, 黄植蕃, 等. 可手术乳腺癌 6 263 例临床分析. 癌症, 2005, 24(3): 327 – 331.
- [2] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clin Chem, 2002, 48:1296 – 1304.
- [3] Wulfskuhle J D, Pawletz C P, Steeg P S, *et al.* Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. Adv Exp Med Biol, 2003, 532: 59 – 68.
- [4] Tang N, Tornatore P, Weinberger S R. Current developments in SELDI affinity technology. Mass Spectrom Rev, 2004, 23:34 – 44.
- [5] Vlahou A, Laronga C, Wilson L, *et al.* A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. Clin Breast Cancer, 2003, 4:203 – 209.
- [6] Abramovita M, Leyland Jones B. A systems approach to clinical oncology: Focus on breast cancer. Proteome Sci, 2006, 4: 4 – 5.
- [7] Mathelin C, Cromer A, Wendling C, *et al.* Serum biomarkers for detection of breast cancers: a prospective study. Breast Cancer Res Treat, 2006, 96: 83 – 90.
- [8] Li J, Zhao J, Yu X, *et al.* Identification of biomarkers for breast cancer in nipple aspiration and ductal lavage fluid. Clin Cancer Res, 2005, 11:8312 – 8320.
- [9] Traub F, Feist H, Kreipe H H, *et al.* SELDI-MS-based expression profiling of ductal invasive and lobular invasive human breast carcinomas. Pathol Res Pract, 2005, 201:763 – 770.
- [10] Pawlik TM, Fritsche H, Coombes KR, *et al.* Significant differences in nipple aspirate fluid protein expression between healthy women and those with breast cancer demonstrated by time-of-flight mass spectrometry. Breast Cancer Res Treat, 2005, 89: 149 – 157.
- [11] Laronga C, Becker S, Watson P, *et al.* SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers. Dis Markers, 2003/2004, 19:229 – 238.
- [12] 王曦, 梁卫江, 朱振宇, 等. 乳腺癌患者血清蛋白质芯片检测. 癌症, 2004, 23:1577 – 1581.
- [13] Pusztai L, Gregory B W, Baggerly K A, *et al.* Pharmacoproteomic analysis of prechemotherapy and postchemotherapy plasma samples from patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. Cancer, 2004, 100:1814 – 1822.
- [14] Ricolleau G, Charbonnel C, Lode L, *et al.* Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. Proteomics, 2006, 6: 1963 – 1975.

(收稿日期:2007-02-15)

(本文编辑:谢竞)