

蛋白质组学技术在乳腺癌研究中的应用

王晓庆 综述 张瑾 审校

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤,尽管筛查、诊断、治疗方面有巨大的进展,但发病机制仍不清楚。蛋白质组学是一个迅速发展的领域,可以探索乳腺癌的异质性并同时从基因组中提供大量的信息。蛋白质组学为寻找与乳腺癌诊断和预后密切相关的特异性生物学标志物、探讨乳腺癌的发生机制及早期临床治疗提供了研究平台。

1 蛋白组学概述

蛋白质组(proteome)的概念最早由澳大利亚的 Wikins 和 Williams 在 1994 年首次提出,并于 1995 年 7 月在《Electrophoresis》上发表^[1]。蛋白质组是蛋白质和基因组两个词的结合,指基因组所表达的全部蛋白质,或理解为 1 个细胞在特定生理或病理状态下表达的所有种类蛋白质。从研究目标看,蛋白质组学可分为表达蛋白质组学和结构蛋白质组学,前者是对蛋白质功能模式(目前主要集中在蛋白质相互作用网络关系)的研究,后者是对蛋白质表达模式(或蛋白质组组成)的研究。研究流程大体可分为分离、鉴定、分析三步。

蛋白质是基因的主要功能分子,也是医药工业重要的分子靶标^[2-4],对蛋白质组的研究因此受到巨大的关注。蛋白质组学的研究试图比较细胞在不同生理或病理条件下蛋白质表达的异同,对相关蛋白质进行分类和鉴定。传统的蛋白质研究注重研究单一蛋白质,而蛋白质组学注重研究参与特定生理或病理状态所有的蛋白质种类及其与周围环境的关系。二维聚丙烯酰胺凝胶电泳、质谱技术是蛋白质组学最常用的两大技术。

2 技术进展

以二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)为基础的蛋白质组学技术,在阐明乳腺癌潜在的发生机制、寻找与诊断、治疗、预后、耐药等有关分子靶标的研究中占有重要地位。目前常用的样本主要有乳腺癌组织、细胞株、乳头吸出液、细胞间质及血清等,研究样本的选择确定了蛋白质组的研究范围,对某一样本的研究,是蛋白质组

研究时实际工作的体现。

常用的质谱有电喷雾电离质谱(ESI)和基质辅助的激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF)。这两种质谱可成功地用于蛋白质等生物大分子分子质量的测定,肽图的测定和蛋白质及多糖序列以及翻译后修饰的测定等方面。其中在 MALDI 基础上进行改进发展了表面增强激光解析离子化-飞行时间-质谱技术(SELDI-TOF-MS)。其最大的特色在于样本无须进行精细分离,粗样本可直接滴加到表面经过特殊修饰的芯片上,即可同时检测几千种蛋白质,还可以发现样本中许多被掩盖的低浓度蛋白质,增加发现生物标记物的机会,所以 SELDI-TOF-MS 技术更加适用于乳腺癌的研究,是近几年发展的更新的技术,具有高灵敏度、高准确度、自动化等特点。

3 蛋白质组学进展

3.1 血清蛋白质组学在乳腺癌早期诊断中的应用

Villanueva 等^[5]利用一种包裹有 C8 相的磁珠来结合血清中的蛋白,然后用 MALDI-TOF-MS 方法得到血清蛋白质组图谱,用此图谱不仅可以区分 21 例乳腺癌患者和 33 例健康志愿者,还同时能区分乳腺癌、前列腺癌和膀胱癌。将得到的诊断图谱(包括 61 种差异蛋白)进行鉴定后发现,这些蛋白是一些血清中高丰度蛋白降解后的肽段,在血清形成过程中、凝血反应及补体激活过程中会产生一些降解产物例如 C3f、C4a、凝血因子 VII 等,它们可能被肿瘤所释放出来的蛋白酶所切割,从而形成特定的降解片段。也就是说,得到的诊断图谱可能是肿瘤特异蛋白酶通过切割高丰度蛋白将信号放大后产生的降解组图谱。

血清蛋白质组学用于预测乳腺癌预后。Goncalves 等^[6]应用 SELDI-TOF-MS 研究了 81 例早期乳腺癌患者的血清蛋白质组图谱,其中 40 个蛋白质在有转移组和无转移组中有显著性差异表达。采用偏最小二乘法,最终得到了一个由 40 个蛋白组成的蛋白质组预后预测图谱,其预测的灵敏度和特异度分别是 87%和 76%;用留一法交叉验证法得到的灵敏度和特异性分别是 87%和 76%。Goncalves 等^[6]又经鉴定认为,质量与电荷比值(M/Z 值)为 9192、81763 的蛋白分别是结合珠蛋白 α 和转铁蛋白,它们在转移组中高表达;M/Z 值为 28284、6647 的蛋白分别是阿朴脂蛋白 A1 和阿朴脂蛋白 C1,它们在转移组中低表达;M/Z 值为 8936 的蛋白属于补体 C3a 的片段,它在转移组中低表达,和文献数据中的 BC3^[7-8]是一致的。Goncalves 等^[9]的一项回顾性研究显示,对 81 例早期乳腺癌患者手术后、辅助化疗前采集的血清进行蛋白质组学分析后发现,与无瘤生存的患者相比较,已发生复发或转移的患者中,M/Z 值为 9179 的蛋白高表达,

而 M/Z 值为 8936 的蛋白低表达,提示这两种蛋白是独立的预后指标。Ricolleau 等^[10]对 60 例淋巴结阴性早期乳腺癌(大多数没有接受辅助化疗)患者进行随访研究,术后 30 例发生复发或转移,30 例仍处于无瘤状态,他们使用 SELDI 技术对肿瘤细胞提取液进行分析,发现了 2 个蛋白峰,经鉴定,分别是泛素和铁蛋白轻链,当它们联合运用时具有良好的预后判断价值。

3.2 细胞株在乳腺癌研究中的广泛应用

乳腺癌细胞株为体外培养的乳腺癌细胞疾病模型,乳腺癌细胞株作为研究模型,其细胞成分单一,蛋白质样本获得容易,杂质少,分离鉴定较容易,并且便于结果分析。乳腺癌细胞株是研究乳腺癌发病机制、寻找与临床有关的重要生物学标记时使用最多的疾病模型。细胞凋亡是化疗药物发挥作用的关键程序,与肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导的配体(TRAIL)可诱导许多肿瘤细胞发生细胞凋亡。有些化疗药物与 TRAIL 可产生协同作用,减少肿瘤生长并诱导细胞凋亡,但有些肿瘤细胞对这些治疗应答性较差,所以有必要研究预测治疗应答性的生物标志物。Leong 等^[11]使用 SELDI-TOF-MS 研究 TRAIL 和依托泊苷作用于 MDA-MB-231 和 ZR-75-1 乳腺癌细胞以及未转化的 MCF-10A 细胞发现,TRAIL 和依托泊苷可诱导细胞凋亡,在所有细胞系中 4~8 h 后可见细胞凋亡蛋白酶-3 升高,M/Z 值为 10090 和 8560 的两个蛋白显著下降,经鉴定分别为 S100A6 和泛素。说明 S100A6 和泛素可能是潜在的预测细胞凋亡的指标,可用于监测抗肿瘤药物的疗效。Smith 等^[12]应用体外细胞模型,对两组患者(MCF-7 乳腺癌细胞组和顺铂耐药组)进行 MALDI-TOF-MS 分析,发现有 15 种蛋白有表达差异。在顺铂耐药组,细胞角蛋白 17、热休克蛋白、核糖体蛋白等 9 种蛋白低表达,基质金属蛋白酶 9、 β 1 蛋白酶体等 6 种蛋白高表达,这些生物学标记物有待进一步临床验证。

3.3 乳腺组织用于乳腺癌蛋白质组学研究

Luo 等^[13]使用 2-DE 复合质谱分析有表达差异的浸润性导管癌与正常乳腺组织的蛋白质,结果发现在乳腺癌中 39 个蛋白点可重复发生变化,通过质谱及数据库搜寻进行鉴定,这些蛋白点代表 25 个不同的蛋白质,包括细胞防御蛋白、与能量代谢及稳态有关的酶、蛋白质折叠与结构蛋白、细胞骨架与细胞运动相关蛋白以及与其它功能相关的蛋白。另外,28 个具有不同功能的非差异表达蛋白也被鉴定,这可建立一个人类乳腺癌 2-DE 参照图谱。此外,在 2-DE 及质谱技术研究结果基础上,进一步使用限制片段差异显示聚合酶链式反应(RFDD-PCR)对泛素-蛋白酶体系统组成部分进行观察,发现乳腺癌组织中该系统中多个组成部分在基因(如 SMT3A、PSMA1、PSMB5、PSMD1、PSMD2、PSMD8、PSMD11、USP9X、USP9Y、USP10、USP25 及 UBE3A)与

蛋白质水平表达上调^[14],证实乳腺癌中泛素-蛋白酶体系统活动明显增强,乳腺癌的发生发展可能与泛素-蛋白酶体系统对 p53 蛋白等肿瘤发生因子的降解加强有关,但具体的机制目前尚不完全清楚。Zhang 等^[15]对 97 例乳腺癌患者的组织进行蛋白质组学分析,发现抗细胞角蛋白 19 抗体(CK19 抗体)在 *cerbB-2* 基因阳性与阴性肿瘤中表达率分别为 76.9% 和 48.0%,CK19 抗体在 *cerbB-2* 基因阳性者明显高,说明 CK19 可能与细胞内和细胞间的信号传递有关,进而导致肿瘤容易侵袭和转移。Vydra 等^[16]对 23 例乳腺癌患者上皮细胞体外培养标本进行比较蛋白质组学分析,根据患者 3 年随访期内是否出现远处转移,分为转移阳性组(7 例)和阴性组,发现两组患者有 3 种蛋白表达有显著差异,在发生远处转移的患者中,核磷蛋白升高,而 2,3 反式烯酰辅酶 A 异构酶、谷胱甘肽过氧化物酶 1 下降。

3.4 乳腺分泌物尤其是乳头抽取液(nipple aspirate fluid,NAF)在乳腺癌蛋白质组学分析中的重要作用

Pawlik 等^[17]运用 SELDI-TOF 技术对 28 份 NAF(23 例 I ~ II 期单侧乳腺癌患者,5 例健康妇女)分析后发现,在乳腺癌患者的患侧乳腺和健侧乳腺之间未发现显著差异;与健康志愿者相比,患侧乳腺有 17 个蛋白峰过表达($P < 0.0005$),对侧乳腺也发现有 2 个蛋白峰过表达和 1 个蛋白峰低表达($P < 0.0027$)。Alexander 等^[18]对 10 例乳腺癌患者以及 10 例非乳腺癌妇女的 NAF 检测后发现 3 个蛋白峰在乳腺癌患者中呈正调节,并且被鉴定出分别是巨囊性病液状蛋白(GCDFP-15)、载脂蛋白 D(apoD)和 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白(AAG)。有报道认为,乳头吸出液蛋白是乳腺特异蛋白,浓度常比血液更高,相对分子质量在 6500~15940 之间的蛋白有很高的敏感性与特异性,正常与乳腺癌乳头吸出液间蛋白质表达存在明显差异,有意义的差异蛋白可预测乳腺癌是否存在,因而乳头吸出液是乳腺癌早期检测的一种重要方式^[19-20]。Alexander 等^[18]对正常乳腺与乳腺癌来源乳头吸出液样本进行蛋白质组比较分析及 ELISA 验证,发现 3 个蛋白质在乳腺癌中表达上调,其中包括叶状蛋白(GCDFP-15)与 $\alpha 1$ 酸糖蛋白(AAG),并认为这两个蛋白表达与疾病的发生和分期有关。乳头吸出液与其它样本来源蛋白质表达谱存在很大的差异,在患有单侧浸润性乳腺癌妇女中,癌与非癌乳腺蛋白质表达模式是高度保守的,独特的表达模式可能与病变范围有关,乳头吸出液高通量的蛋白质组学分析可发现与乳腺癌发生发展相关的重要功能蛋白^[21]。

3.5 其他方面

最近有报道将乳腺癌患者的唾液作为研究对象。Streckfus 等^[22]对 3 组人群(健康人群组、乳腺良性疾病组和乳腺原位导管癌组)的唾液进行蛋白质

谱分析,共发现约130种蛋白,其中49种蛋白在健康组与乳腺癌和乳腺良性疾病组之间表达有差异,提示唾液可能也是乳腺癌诊断的一个潜在标本。

4 结语

蛋白质组学应用于乳腺癌仍处于起步阶段,蛋白质组学研究是近年兴起的肿瘤研究的最前沿领域和热点之一,为肿瘤的研究提供了强有力的工具。乳腺癌蛋白质组学的研究成果为发现对其早期诊断特异的肿瘤标志物、筛选出敏感的药物治疗靶标以及研究细胞内信号转导通路得以阐释肿瘤的发病机制提供重要的依据。它有一个光明的未来:(1)它可以鉴别具体治疗的目标。(2)蛋白质是良好的标志。(3)蛋白质组学可轻易加上功能测试。抗体阵列或细胞阵列都是对此的良好例证。(4)蛋白质组学适用于细胞的部分组成,如核、膜和细胞器,这些组成值得特别关注。

在蛋白质组学可进入临床实践中之前一些问题仍然有待解决。首先是技术本身的局限性;其次由于肿瘤组织内含有多种细胞成分,自身的复杂性给图谱分析带来了极大的困难;另外缺少合适的正常组织和细胞与肿瘤组织和细胞作对照。因此,发展高通量、高灵敏度、高准确性的研究技术平台是现在乃至相当一段时间内蛋白质组学研究中的主要任务,更强调各种方法间的整合和互补,以适应不同蛋白质的不同特征。

【关键词】 乳腺肿瘤;蛋白质组学

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1090-1094.
- [2] Alaoui-Jamali MA, Xu YJ. Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J Zhejiang Univ SciB*, 2006, 7: 411-420.
- [3] Fu Q, Van Eyk JE. Proteomics and heart disease: identifying biomarkers of clinical utility. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3: 237-249.
- [4] Hsieh SY, Chen RK, Pan YH, et al. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low molecular weight serum /plasma proteome profiling. *Proteomics*, 2006, 6: 3189-3198.
- [5] Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest*, 2006, 116: 271-284.
- [6] Goncalves A, Esterni B, Bertucci F, et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene*, 2006, 23: 291-292.
- [7] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for indentification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, 2002, 48: 1296-1304.
- [8] Li J, Orlandi R, White CN, et al. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. *Clin Chem*, 2005, 51: 2229-2235.
- [9] Goncalves A, Esterni B, Bertucci F, et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene*, 2006, 25: 981-989.

- [10] 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.
- [11] Leong S, Christopherson RI, Baxter RC. Profiling of apoptotic changes in human breast cancer cells using SELDI-TOF mass spectrometry. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20:579-590.
- [12] Smith L, Welham KJ, Watson MB, et al. The proteomic analysis of cisplatin resistance in breast cancer cells. *Oncol Res*, 2007, 16:497-506.
- [13] Luo Y, Zhang J, Liu Y, et al. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. *Mol Biotechnol*, 2005, 29: 233-244.
- [14] Deng S, Zhou H, Xiong R, et al. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSS) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat*, 2007,104: 21-30.
- [15] Zhang DH, Tai LK, Wong LL, et al. Proteomics of breast cancer: enhanced expression of cytokeratin19 in human epidermal growth factor receptor type 2 positive breast tumors. *Proteomics*, 2005, 5: 1797-1805.
- [16] Vydra J, Selicharová I, Smutná K, et al. Two-dimensional electrophoretic comparison of metastatic and nonmetastatic human breast tumors using in vitro cultured epithelial cells derived from the cancer tissues. *BMC Cancer*,2008, 8:107.
- [17] 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.
- [18] Alexander H, Stegner AL, Wagner-Mann C, et al. Proteomic analysis to identify breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid. *Clin Cancer Res*,2004,10:7500-7510.
- [19] Sauter ER, Zhu W, Fan XJ, et al. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid to detect biologic markers of breast cancer. *Br J Cancer*, 2002, 86: 1440 -1443.
- [20] Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, et al. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF; potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers*, 2001, 17: 301-307.
- [21] Kuerer HM, Coombes KR, Chen JN, et al. Association between ductal fluid proteomic expression profiles and the presence of lymph node metastases in women with breast cancer. *Surgery*, 2004, 136:1061-6019.
- [22] Streckfus CF, Mayorga-Wark O, Arreola D, et al. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Invest*, 2008, 26:159-167.

(收稿日期:2009-08-10)

(本文编辑:赵彬)

王晓庆,张瑾. 蛋白质组学技术在乳腺癌研究中的应用[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2010,4 (6):741-746