

基于蛋白质组学技术筛查维吾尔族妇女宫颈癌前病变患者血浆蛋白预警标志物

郭霞¹, 郝轶², 吐尔逊帕夏·吾布力卡斯木¹, 哈丽丹·热依木¹, 纳菲沙·卡德尔³, 武贵臻¹, 阿布力孜·阿布杜拉¹

1. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学基础医学院生物教研室, 乌鲁木齐 830011

摘要 依托蛋白质二维液相色谱和质谱技术, 寻找与新疆维吾尔族妇女宫颈癌前病变高度宫颈鳞状上皮内瘤样变(HSIL)相关的水浆预警蛋白标志物, 旨在对宫颈癌做到早期预防和诊断。收集维吾尔族 HSIL(21例)和宫颈炎(22例)患者血浆标本并制备血浆低丰度蛋白质组样品, 通过对蛋白质二维液相色谱系统的分离与鉴别分析, 筛选出差异表达的组分, 并运用质谱和生物信息技术进行鉴定和功能识别分析。确定了宫颈炎和 HSIL 患者的基于蛋白质等电点和疏水性特征的血浆低丰度蛋白质组图谱, 筛选出 10 个差异表达蛋白组分。结果表明, 在 HSIL 患者血浆中 3 个低丰度蛋白组分含量明显上升, 1 个组分含量下降; 而通过质谱技术鉴定出 31 种蛋白质, 其中 4 种蛋白质与肿瘤进程密切相关, 分别是代谢相关蛋白(APOA1)、信号转导相关蛋白(mTOR、EphA3)和免疫功能相关蛋白(HLA-DQB1)。本文针对维吾尔族妇女这一宫颈癌高发人群, 展开癌前病变患者血浆低丰度蛋白组表达水平的研究, 鉴定出多种差异表达血浆蛋白预警标志物, 为本区宫颈癌的预防和早期鉴别诊断及癌变机制研究提供了依据。

关键词 维吾尔族妇女; 高度宫颈鳞状上皮内瘤样变; 血浆蛋白质组; 二维液相色谱; 质谱

中图分类号 R917

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.09.004

Early-warning Plasma Biomarkers Screening for the Uighur Women Patients with Cervical Precancerous Lesion Based on Proteomic Techniques

GUO Xia¹, HAO Yi², WUBULIKASIMU Tuerxunpaxia¹, REYIMU Halidan¹, KADEER Nafeisha³, WU Guizhen¹, ABUDULA Abulizi¹

1. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. The Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. Department of Biology, College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract The early-warning plasma biomarkers screening of High-grade cervical Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) for the Uighur women patients by using two-dimensional liquid phase chromatography and mass spectrometry is aimed. The plasma samples from Uighur women with cervical lesions (21 cases with HSIL and 22 cases with cervicitis) were collected and low abundant plasma proteins were prepared. After the establishment of a differential proteome profile by two-dimensional liquid phase chromatography, mass spectrometry and bioinformatics technology were used to identify and analyze differential proteins. Based on the protein isoelectric point gradient and hydrophobic features of low abundant plasma proteins, a differential proteome profile was established for the Uighur women with cervicitis and HSIL; it is found that three peak constituents are upregulated and one is downregulated in the patients with HSIL. Identification of these proteins by mass spectrometry shows that a total of 31 plasma proteins are differentially expressed, four proteins that closely associated with tumor progress including metabolome-related proteins (APOA1), signal transduction-related proteins (mTOR,

收稿日期: 2011-12-19; 修回日期: 2012-03-11

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目(2010211B15)

作者简介: 郭霞, 博士研究生, 研究方向为维吾尔族宫颈癌早期预警与发病机制, 电子信箱: myshow0504@163.com; 阿布力孜·阿布杜拉(通信作者), 教授, 研究方向为维吾尔族宫颈癌早期预警与发病机制, 电子信箱: abulizi_de@126.com

EphA3), and immune-related proteins (HLA-DQB1) are selected. By focusing on the early-warning low abundant plasma proteome biomarker of Uighur women with precancerous lesion, the evidence for prevention, early diagnosis, and canceration mechanism understanding of cervical cancer in Xinjiang Autonomous Region is provided.

Keywords Uighur women; high-grade cervical squamous intraepithelial lesion; plasma proteome; two-dimensional liquid phase chromatography; mass spectrometry

0 引言

宫颈癌从异型增生到浸润性癌(Invasive Cervical Cancer, ICC)的演变过程是一个连续的组织学事件,而宫颈上皮内瘤变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)是与宫颈浸润癌密切相关的一组癌前病变^[1]。中度至重度宫颈上皮内瘤变(CIN II、III)和原位癌又统称为高度宫颈上皮内瘤样变(High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL),40%—100%的早期宫颈癌可能由 HSIL 导致,目前临床均采用手术治疗。而 HSIL 患者确诊需要进行细胞学、阴道镜以及最后宫颈活组织病理学检查决定治疗方法^[2],而临床常出现 HSIL 患者手术前后病检结果大相径庭的情况,究其原因,除了取材的限制,比较重要的一点是对宫颈慢性炎症、反应性增生以及不同级别 CIN 的良、恶性判断缺乏有价值的客观分子指标。

蛋白质水平变化的时空性和加工修饰代表基因表达调控的最高层次,其动态信息不仅包含在肿瘤细胞自身的调控网络中,更可能隐藏在肿瘤患者血液中,表现为血浆蛋白标志物(Plasma Protein Marker)^[3-5]。运用蛋白质组学技术筛选与监测血浆蛋白标志物存在与否或含量变化,对疾病的早期预防诊断、病程分析、复发或转移监测、治疗指导及预后判断均具有很大意义。近年来,国内外研究组开展了卵巢癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、宫颈癌等恶性肿瘤患者血清的蛋白质组学研究,初步提出肿瘤早期预警、预后或动态监控等方面的血清诊断指标^[6-13]。但是在宫颈癌研究方面,只是仅仅建立了血清蛋白质组的指纹图谱鉴别模型,而对宫颈癌前病变 HSIL 的报道甚少。

本文联合运用二维液相色谱和质谱技术,旨在筛选出新疆宫颈癌高发人群维吾尔族妇女 HSIL 患者血浆中的与肿瘤发生相关的特异性蛋白,寻找对 HSIL 诊断有价值的候选标志物,这对宫颈癌的早期预防、鉴别诊断以及指导临床治疗具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

二维液相色谱仪(ProteomeLab™ PF-2D)和二维液相色谱专用试剂(包括 start buffer, elution buffer、一维二维层析柱)购自 Beckman Coulter 公司;特异性低丰度蛋白富集试剂盒(ProteMiner Protein Enrichment Kits)购自 Biorad 公司;纯水、乙腈、三氟乙酸(TFA)、亚氨基二乙酸和甲醇等色谱纯级别试剂购自 Merck 公司;胰蛋白酶购自 Promega 公司;NH₄HCO₃、DTT、尿素均为 Sigma-Aldrich 产品;BCA 蛋白定量试剂盒购

自 Novagen 公司。

1.2 血液标本收集

采集新疆医科大学第三附属肿瘤医院在 2008 年 1 月—2010 年 9 月期间收治的维吾尔族妇女患者血浆标本共 43 例,包括慢性宫颈炎患者 22 例,HSIL 患者(包括 CIN I 和 CIN II)21 例。所有宫颈病变诊断均行细胞学或阴道镜,最后以宫颈活组织病理学结果作为诊断标准,对 HSIL 患者标本需手术后进行病理检查最后确诊。纳入病例时排除已接受过肿瘤手术切除或放疗的患者,同时排除患有子宫切除或骨盆放射治疗史、其他恶性肿瘤以及呼吸系统、心血管和代谢性疾病等其他严重疾病的患者。患者年龄分布为 25—62 岁,平均年龄为(50±1.56)岁。采集患者早晨空腹血液 2—3mL,经离心分离血浆,分装成 0.5mL 的冻存管(避免反复冻融),-80℃下保存备用。

1.3 低丰度蛋白组样品制备和蛋白质二维液相色谱分析

以往研究表明,多例样品混合可以消除个体差异,进而发现更多的蛋白差异位点,因此将每组同类患者血浆等体积混合,构建代表 1 组患者群体的血浆样品 1500μL^[14]。利用低丰度蛋白富集试剂盒(多肽配体亲和层析柱)特异性吸附并制备血浆低丰度蛋白组,测定总蛋白含量。取 1.0mg 血浆低丰度蛋白质组样品,在 32 Karat 软件自动控制运行下,样品通过一维等电聚焦和二维反向 HPLC 色谱分离,同时系统自动记录和保存每个样品的 UV 光密度值数据,并且通过 Proteo Vue 软件进行分析。设定流速为 0.2mL/min,检测波长为 280nm,仪器在室温下恒温运行,当 pH 值开始下降时每间隔 0.3 个 pH 单元在 96 孔深孔板收集 1 份样品。将同一样品的同一 pI 组分进行 3 次二维 HPLC 分析,比较 3 次结果的重现性。

1.4 数据分析比较

应用二维液相色谱仪提供的 Delta Vue 软件,对不同血浆样品蛋白质组谱图进行模拟 pI/UV 胶图数据比较,绘出基于差异位点的蛋白质双向电泳模拟图。以差异大于 2 倍的差异蛋白峰相应的蛋白组分样品作为收集的目标蛋白组分,并运用 FC 204 (Fraction Collector)馏分收集仪进行分离收集。

1.5 质谱分析

将收集的差异蛋白组分溶液冻干至蛋白粉末,行全溶液酶切程序,按照胰酶与蛋白质量比 1:50 的比例将胰酶加至蛋白溶液中,37℃下孵育过夜 16h 以上。用 Millipore C18 柱除盐洗脱后冻干,待上质谱。使用 Eksigent LC-LTQ-MS 质谱仪进行分析,色谱柱为 Dionex C18 (PePMap300, 5μm, 300×10⁻¹⁰m; 内径 75μm, 长度 15cm),用自动进样器上样。流动相为 A:2%

ACN+98% H_2O +0.1%FA; B: 80%ACN+20% H_2O +0.1%FA, 流速为 0.3 μ L/min。质谱条件设定为 350—1600m/z 的全扫描(Full Scan), 二级扫描设定为全扫描中前 5 个最高峰的 MS/MS 扫描, 数据采集时间为 130min, 喷雾电压 (Spray Voltage) 为 2.2kV, 毛细管温度 (Capillary Temperature) 为 200 $^{\circ}C$, 碰撞能量(normalized collision energy) 为 35%。

1.6 生物信息学处理

用 Xcalibur Qual Browser 2.0 软件 (Thermo Finnigan, Bremen, Germany), 以 ICIS 峰值检测算法计算肽段的峰值目录, 同时将所得的串联质谱数据用 BioWorks 3.2 软件组套 (Thermo Electron, Inc., Waltham, MA USA) 中的 SEQUEST 软

件在人类 International Protein Index 蛋白质数据库 (ipi.HUMAN.v3.62.fasta, <http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>) 中查询蛋白质种类。

2 结果分析

2.1 一维等电聚焦分析结果

首先采用一维等点聚焦分析系统对 1.0mg 低丰度蛋白质组样品进行一维色谱聚焦分离, 分离时间为 200min, 收集 HSIL 患者血浆低丰度蛋白组共分 44 个, 宫颈炎患者血浆低丰度蛋白组共分 48 个, 各个组分的吸收峰图谱特征在宫颈癌早期和宫颈炎患者中基本相似(图 1)。

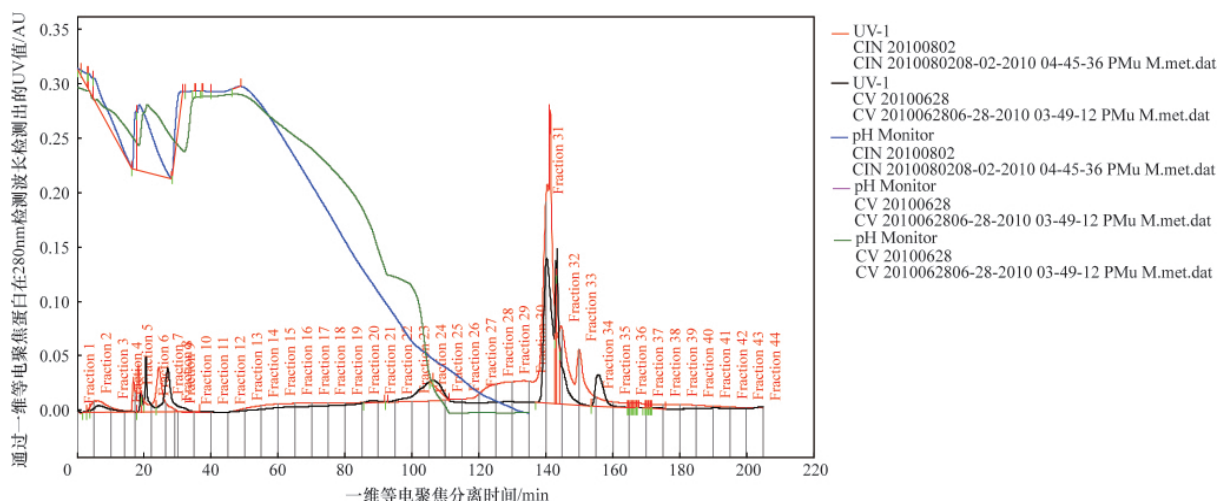


图 1 HSIL (CIN) 和宫颈炎 (CV) 患者血浆低丰度蛋白质组的一维色谱聚焦分离图

Fig. 1 One-dimensional chromatofocusing for low abundant plasma proteome of patients with HSIL (CIN) and cervicitis (CV)

2.2 宫颈癌早期患者特异性血浆低丰度蛋白组差异分析

利用二维液相色谱系统的 Delta Vue 专业软件分析不同血浆样品的 pI/UV 图谱数据(图 2), 可以获得 HSIL 和慢性宫颈炎患者之间的血液蛋白质组差异谱特征, 并模拟出一种双

向电泳差异位点图(图 3)。拟设 2 倍以上的含量差异作为蛋白质组分的定量差异标准, 并将宫颈炎患者设为对照, 在 pH 值 4.0—8.5 检测范围内发现 HSIL 患者血浆中有 3 个低丰度蛋白质组分含量上升, 4 个组分含量下降(表 1)。

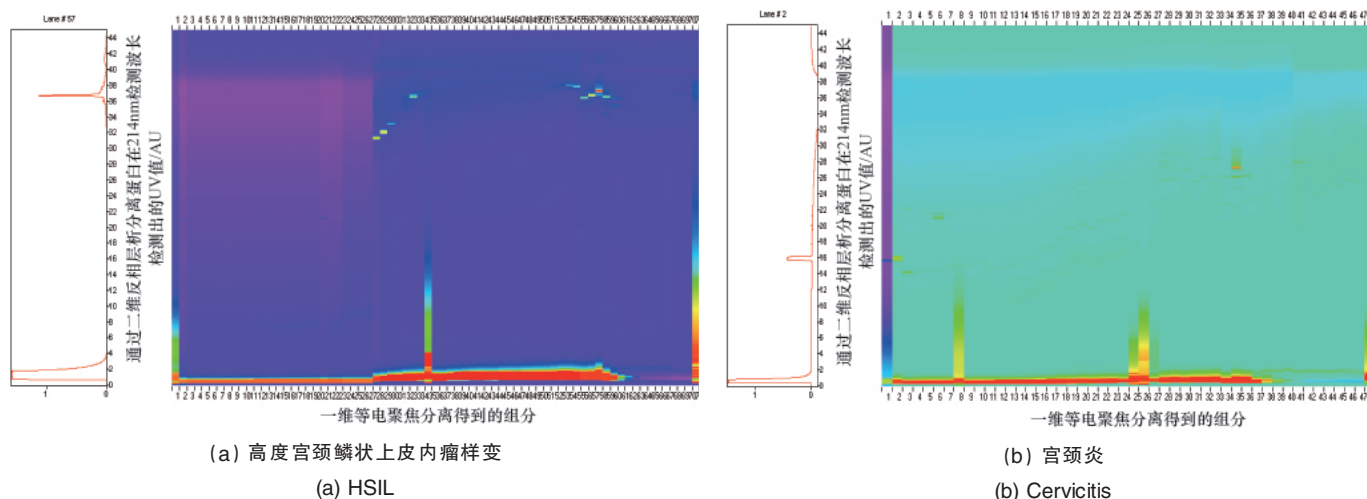
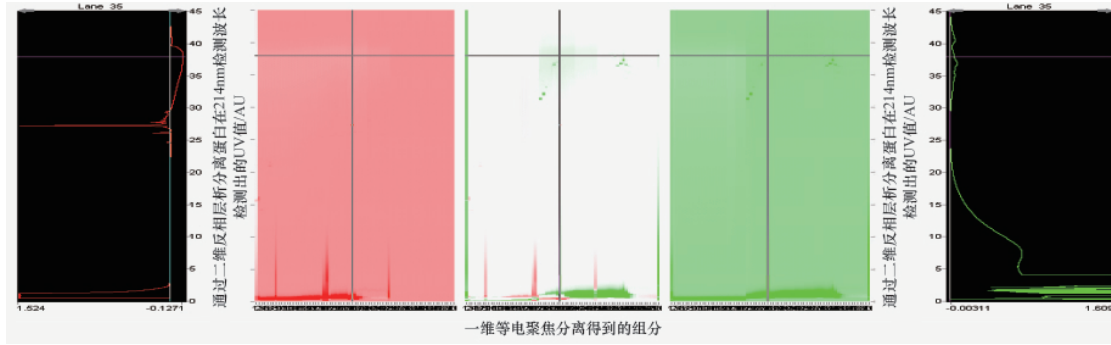


图 2 基于二维液相色谱的 HSIL 和宫颈炎患者血浆低丰度蛋白质组 pI/UV 胶图

Fig. 2 pI/UV diagram of low abundant plasma proteome for the patients with HSIL and cervicitis based on the analysis by two-dimensional liquid phase chromatography



(a) 高度宫颈鳞状上皮内瘤样变 (a) HSIL
(b) 高度宫颈鳞状上皮内瘤样变与宫颈炎 (b) HSIL and cervicitis
(c) 宫颈炎 (c) Cervicitis

图 3 基于二维液相色谱分析的 HSIL 患者和宫颈炎患者血浆低丰度蛋白质组差异谱

Fig. 3 Differential expression profile of low abundant plasma proteome between the patients with HSIL and cervicitis based on the analysis by two-dimensional liquid phase chromatography

表 1 HSIL 与宫颈炎患者之间血浆低丰度蛋白质组差异谱的比较分析

Table 1 Comparative analysis on the differential expression profile of low abundant plasma proteome between the patients with HSIL and cervicitis

| 差异蛋白组 分例数 | 差异蛋白组 分编号 | 宫颈癌早期患者血 浆蛋白洗脱时间/min | 宫颈癌早期患者血浆蛋 白通过 214nm 波长检 测出的 UV 值/AU | L/R | 宫颈炎患者血 浆蛋白洗脱时 间/min | 宫颈炎患者血浆蛋白 通过 214nm 波长检 测出的 UV 值/AU | R/L |
|--------------|--------------|-------------------------|--|----------|---------------------------|--|----------|
| 1 | 1 | 31.994 | 0.257 | -5.01* | 31.994 | -0.051 | -0.2 |
| 2 | 2 | 29.767 | 1.006 | -6.776* | 29.701 | -0.148 | -0.148 |
| 3 | 3 | 30.454 | 0.166 | -1.427 | 30.387 | -0.116 | -0.701 |
| 4 | 5 | 32.111 | 0.561 | -4.112* | 32.111 | -0.136 | -0.243 |
| 5 | 6 | 33.161 | 0.147 | -0.989 | 33.144 | -0.149 | -1.011 |
| 6 | 23 | 20.927 | 0.063 | -1.016 | 20.86 | -0.062 | -0.984 |
| 7 | 24 | 20.81 | 0.002 | -0.087 | 20.744 | -0.022 | -11.529* |
| 8 | 28 | 31.421 | -0.061 | -0.081 | 31.421 | 0.753 | -12.4* |
| 9 | 29 | 32.111 | -0.068 | -0.061 | 32.111 | 1.112 | -16.311* |
| 10 | 30 | 33.027 | -0.079 | -0.214 | 33.094 | 0.369 | -4.682* |
| 11 | 33 | 36.587 | -0.095 | -0.18 | 36.587 | 0.525 | -5.545* |
| 12 | 34 | 18.63 | 1.436 | -433.32* | 18.63 | -0.003 | -0.002 |
| 13 | 42 | 23.997 | 0.081 | -51.609* | 24.017 | -0.002 | -0.019 |

注:L/R 为宫颈癌早期患者与宫颈炎患者的血浆蛋白质组分蛋白吸收峰比值;R/L 为宫颈炎患者与宫颈癌早期患者的血浆蛋白质组分蛋白吸收峰比值;“*”表示 L/R 或 R/L 比值大于 2 倍;红色框表示 pH 值在 4.0—8.5 范围内检测出的用于质谱鉴定的点。

Notes: L/R means the ratio of plasma protein absorption for the patients with HSIL and cervicitis; R/L means the ratio of plasma protein absorption for the patients with cervicitis and HSIL; “*” means L/R or R/L is bigger than two; The peaks with the red boxes marked are analyzed by mass spectrometry in the range from pH=4.0 to pH=8.5.

2.3 LC-LTQ MS/MS 质谱鉴定和生物信息学分析结果

差异蛋白组分经 LC-LTQ MS/MS 鉴定后,对所获得的图谱用 SEQUEST 3.2 搜索引擎,进行数据库为 ipi.human.v3.62,置信度为 95%,鉴定结果见图 4。结合等电点、分子量、匹配肽段的多少和序列覆盖率等进行综合分析,选择 UniPepCount 为 2 以上,共鉴定出 31 个蛋白,其中与细胞周期、增殖、分化与凋亡作用相关的有 4 个蛋白(表 2)。

3 讨论

宫颈癌是一种妇科恶性肿瘤,研究区维吾尔族妇女宫颈癌发病率高(490—526/10 万),造成的死亡率是新疆其他民族平均水平的 3—4 倍,在全国少数民族中占第 1 位^[15-16]。临床资料显示,在新疆入院的恶性肿瘤患者中,宫颈癌患者所占比例高达 20%,其中维吾尔族妇女所占比例达 75%以上,而且中、晚期患者居多,治疗效果差^[17]。开展宫颈癌及癌前

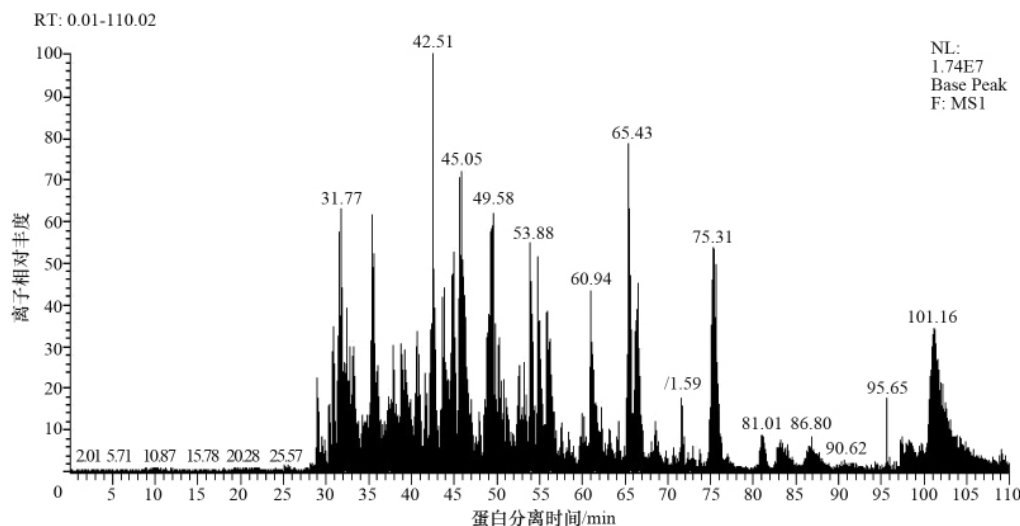


图 4 LC-LTQ MS/MS 鉴定的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram based on LC-LTQ MS/MS technique

表 2 维吾尔族 HSIL 与宫颈炎患者血浆中基于质谱技术鉴定并筛选出的差异表达蛋白

Table 2 Differential expression proteins of low abundant plasma proteome between the Uighur patients with HSIL and cervicitis based on the identification by mass spectrometry

| 序号 | 蛋白名称 | 简写 | 蛋白序列号 | 相对分子质量 | pI | 特异肽段数 | 升高表达的组分 |
|----|-------------------------|--------------|---------------|-----------|-------|-------|---------|
| 1 | 载脂蛋白 A-1 | APOA1 | IPI00021841.1 | 30777.91 | 5.56 | 45 | CV |
| 2 | 人类白细胞抗原 II 类 DQB1 | HLA-DQB1 | IPI00942595.1 | 47138.51 | 10.12 | 2 | CV |
| 3 | α-2-HS-糖蛋白 | AHSG | IPI00022431.2 | 46627.06 | 5.84 | 2 | CV |
| 4 | ANKFY1 类似于锚蛋白 | ANKFY1 类似物 | IPI00159899.9 | 132821.35 | 6.03 | 2 | CV |
| 5 | 重链动力蛋白 1 | DNAH1 | IPI00002127.8 | 485941.47 | 5.74 | 2 | CV |
| 6 | 核因子 kappa B 激活蛋白 | NKAP | IPI00296934.3 | 47138.51 | 10.12 | 2 | CV |
| 7 | ATP/GTP-结合蛋白 1 | AGTPBP1 | IPI00418530.2 | 138746.4 | 5.87 | 2 | HSIL |
| 8 | 碳分解产物抑制蛋白 4 | CCRN4L | IPI00744490.1 | 18205.17 | 9.81 | 2 | HSIL |
| 9 | 保守假设蛋白 | 保守假设蛋白 | IPI00929440.1 | 9237.71 | 9.81 | 2 | HSIL |
| 10 | COP9 信号复合小体亚单位 1 同型体 1 | COP9 同工型 1 | IPI00414289.1 | 55536.75 | 6.3 | 2 | HSIL |
| 11 | COP9 信号复合小体亚单位 1 同型体 2 | COP9 同工型 2 | IPI00156282.2 | 59050.46 | 5.91 | 2 | HSIL |
| 12 | 受体酪氨酸激酶家族 A 型受体 3 前体 | EPHA3 | IPI00418427.3 | 110130.64 | 6.33 | 2 | HSIL |
| 13 | 受体酪氨酸激酶家族 A 型受体 3 | EPHA3 | IPI00298105.4 | 110160.66 | 6.33 | 2 | HSIL |
| 14 | 人类翻译起始因子 2-激酶-2 | EIF2AK2 | IPI00807398.1 | 40680.3 | 9.4 | 2 | HSIL |
| 15 | 高度相似 ATP-依赖性 RNA 解旋酶 | DDX5 | IPI00798375.2 | 61516.46 | 9 | 2 | HSIL |
| 16 | Ig mu 链 C 区域 | IGHM | IPI00479708.6 | 41272.5 | 6.32 | 2 | HSIL |
| 17 | 干扰素诱导的双链 RNA-活化蛋白激酶同型 b | N/A(没有提供) | IPI00385404.2 | 57390.82 | 8.19 | 2 | HSIL |
| 18 | IQ 和 AAA 结构域包含蛋白 1 | N/A(没有提供) | IPI00916027.1 | 95341.08 | 9.48 | 2 | HSIL |
| 19 | 驱动蛋白 | KIF13B | IPI00021753.5 | 202667 | 5.56 | 2 | HSIL |
| 20 | LOC100288069 假设蛋白 | XP_002342058 | IPI00938229.1 | 39317.75 | 9.01 | 2 | HSIL |
| 21 | 缺乏夜蛋白 | NOC | IPI00015890.4 | 48196.1 | 6.85 | 2 | HSIL |
| 22 | 成对盒蛋白-1 | Pax-1 | IPI00013473.2 | 45118.4 | 9.61 | 2 | HSIL |
| 23 | ATP-依赖性 RNA 解旋酶 | DDX5 | IPI00017617.1 | 69148.13 | 9.06 | 2 | HSIL |
| 24 | 蛋白 RRP5 同族体 | PDCD11 | IPI00400922.5 | 208700.74 | 8.99 | 2 | HSIL |
| 25 | 短小杆菌结构域包含蛋白 | C14 或 f21 | IPI00216999.2 | 69438.05 | 6.9 | 2 | HSIL |
| 26 | rap 鸟嘌呤交换因子 4 同型体 a | RAPGEF4 | IPI00329560.5 | 115521.65 | 6.37 | 2 | HSIL |
| 27 | 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 | mTOR | IPI00031410.1 | 288891.9 | 6.73 | 2 | HSIL |
| 28 | SHC-翻译蛋白 1 同工型 4 | SHC1 | IPI00165135.4 | 56177.76 | 6.43 | 2 | HSIL |
| 29 | 肌联蛋白同型体 N2-A | TTN | IPI00759613.2 | 30777.91 | 5.56 | 2 | HSIL |
| 30 | 非典型蛋白 | N/A(没有提供) | IPI00924839.1 | 19608.26 | 10.55 | 2 | HSIL |
| 31 | WD 重复包含蛋白 | WRAP73 | IPI00293015.3 | 51588.56 | 6.37 | 2 | HSIL |

病变的基础和临床研究,建立特异、灵敏的预防和早期诊断指标是新疆高发肿瘤研究所面临的重大挑战。

本研究对宫颈癌前病变与宫颈炎正常对照组中差异表达蛋白质组分进行 LTQ-MS/MS 质谱分析,筛选出 31 个差异表达的蛋白质,通过对每个蛋白以往研究的分析,筛选出 4 个可能与宫颈癌发生、发展密切相关的蛋白。与宫颈炎组相比,癌前病变 HSIL 组中有 2 个蛋白上调(mTOR、EphA3),2 个蛋白下调(APOA1、HLA-DQB1)。这些差异表达的蛋白质涉及体内不同的功能过程和蛋白家族,主要包括代谢相关蛋白(APOA1)、信号转导相关蛋白(mTOR、EphA3)、免疫功能相关蛋白(HLA - DQB1)。

哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase, PIKK)蛋白家族,通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路途径来实现对细胞生长、增殖、细胞周期等多个方面的调控作用^[18]。目前多项研究已经报道此通路的过度活化与肿瘤的发生、发展密切相关,是肿瘤治疗的 1 个重要靶点。激活的靶蛋白 mTOR 可以引起肿瘤细胞的快速增殖、癌蛋白分泌增加、细胞周期加快、G1 期时程缩短,利于肿瘤的迅速发生和发展^[19-21]。有学者通过免疫组织化学法发现,在宫颈癌组织中 mTOR 及其底物激酶(P70S6K)表达均上调^[22]。本研究发现在 HSIL 阶段就有 mTOR 蛋白分泌至患者血液中,这与宫颈癌的发生和发展密切相关,mTOR 蛋白可能作为 HSIL 的蛋白标志物。

EphA3 隶属于受体酪氨酸激酶家族最大的 1 个分支 Eph (Erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma cell line)亚家族。最近的研究资料显示,此家族的多个成员能够促进血管系统发育,在免疫调节、骨稳态调节以及多种肿瘤的进展和转移中发挥作用,涉及到肿瘤细胞的增殖、血管发生、黏附及运动性等^[23-25]。EphA3 是第 1 个被克隆出来的 Eph 家族分子,对其功能的研究早期主要集中在神经系统当中,发现它可以引导轴突的导向。近年来的研究表明,EphA3 在结肠癌、肾癌、肝癌、黑色素瘤和肉瘤中表达上调^[8],在乳腺癌、肺癌和胰腺癌中发生突变^[26-27]。EphA3 的激活会引起 actin/lyosin 细胞骨架的重组从而导致细胞变圆、起泡和脱落^[28]。目前尚无 EphA3 在宫颈癌中作用的报道,本研究运用蛋白质组学技术在维吾尔族妇女 HSIL 患者的血浆中筛查出了差异表达的 EphA3,为后续的深入研究提供了有力依据。

在维吾尔族宫颈癌患者血浆中下调表达而在慢性宫颈炎患者血浆中上调表达的蛋白载脂蛋白 A-1(APOA1)是 1 个重要血浆高密度脂蛋白,对维持胆固醇的平衡发挥着重要作用,同时能够防止低密度脂蛋白(LDL)的氧化,是炎症因子的抑制剂^[29-31]。也有报道提出 APOA1 的低表达与前列腺癌和卵巢癌有关^[32-33]。人类白细胞抗原 II 类 DQB1(HLA-DQB1)属于 HLA-II 类 β 链旁系同源蛋白,在抗原提呈细胞中表达,作为 T 细胞受体的配体在清除感染细胞方面发挥了重要免疫功

能。HLA-DQB1 的缺失和突变会导致免疫缺陷和免疫逃逸,与多种病毒感染和癌症关联^[34-36]。因此,在维吾尔族宫颈癌癌变进程中,HPV 感染可能利用 HLA-DQB1 的低表达逃避免疫监视,与宫颈癌的发生和发展有关。

4 结论

本研究应用比较蛋白质组学方法对维吾尔族妇女宫颈癌前病变 HSIL 及宫颈炎良性对照患者血浆进行了分析。共有 31 个蛋白质被鉴定为差异表达,其中 4 个被筛选分析,通过酶联免疫吸附试验、免疫印迹试验等技术在血清样本中验证其特异性、灵敏性以及准确性。同时进一步运用生物信息学方法研究相关蛋白质功能、通路及其相互作用,为宫颈癌的癌变机制以及血浆肿瘤标志物的筛选提供理论依据,从而为宫颈癌的早期预警体系的建立打下了一定基础。

参考文献 (References)

- [1] Siddiqui N H. Tumors of the cervix [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(8): 1242.
- [2] Correa P. A human model of cervical carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(13): 3554-3560.
- [3] Cho W C, Cheng C H. Oncoproteomics: Current trends and future perspectives[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(3): 401-410.
- [4] Linkov F, Yurkovetsky Z, Lokshin A. Biomarker approaches to the development of cancer screening tests: Can cancer blood tests become a routine health check-up[J]. *Future Oncol*, 2007, 3(3): 295-298.
- [5] Yin P, Mohemaiti P, Chen J, et al. Serum metabolic profiling of abnormal savda by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2):322-327.
- [6] Wang H, Kachman T, Schwartz D, et al. Comprehensive proteome analysis of ovarian cancers using liquid phase separation, mass mapping and tandem mass spectrometry: A strategy for identification of candidate cancer biomarkers[J]. *Proteomics*, 2005, 4(8): 2476-2495.
- [7] Kim H J, Kang H J, Lee H, et al. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1368-1379.
- [8] Lai K K, Kolippakkam D, Beretta L. Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 1043-1051.
- [9] Pitteri S J, Faca V M, Kelly-Spratt K S, et al. Plasma proteome profiling of a mouse model of breast cancer identifies a set of up-regulated proteins in common with human breast cancer cells [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(4): 1481-1489.
- [10] Ali I U, Xiao Z, Malone W, et al. Plasma proteomic profiling: Search for lung cancer diagnostic and early detection markers[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(5): 1367-1372.
- [11] Wang Y S, Shen J, Yu J K, et al. Protein profiles of serum in gastric cancer at a high-risk area by SELDI-TOF mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2008, 42(9): 677-680.
- [12] Lin Y W, Lai H C, Lin C Y, et al. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(3): 1216-1224.
- [13] Xia T, Zheng Z G, Gao Y, et al. Application of SELDI-TOF serum proteome profiling in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Chin ese*

- Journal of Cancer*, 2008, 27(3): 279–282.
- [14] 郭霞, 阿布力孜·阿布杜拉, 武贵臻, 等. 维吾尔族妇女宫颈癌患者血清蛋白质组的二维液相色谱分析 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2009, 34(7): 624–629.
Guo Xia, Abudula Abulizi, Wu Guizhen, *et al.* *J Cent South Univ: Med Sci*, 2009, 34(7): 624–629.
- [15] 古扎丽努尔·阿不力孜, 彭芝兰, 郭英. HPV 及其亚型在四川西北地区汉族及新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中的差异表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(5): 406.
Guzalnur Abulizi, Peng Zhilan, Guo Ying. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2004, 24(5): 406.
- [16] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(7): 569–571.
Lalai Suzuke, Peng Yuhua, Zhou Kang, *et al.* *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(7): 569–571.
- [17] 张国庆, 刘开江, 赖小军, 等. 新医大附属肿瘤医院 1989–2002 年住院病人恶性肿瘤分布[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(4): 393–395.
Zhang Guoqing, Liu Kaijiang, Lai Xiaojun, *et al.* *Journal of Xinjiang Medical University*, 2003, 26(4): 393–395.
- [18] Heitman J, Movva N R, Hall M N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast [J]. *Science*, 1991, 253(5022): 905–909.
- [19] Nozawa H, Watanabe T, Nagapa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2007, 251(1): 105–113.
- [20] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Co-Lomer R, *et al.* Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tyk-erb) in human breast carcinoma cells [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(6): 1097–1109.
- [21] Patel R A, Ahmad I, Sheehan C E, *et al.* Expression of phosphorylated mTOR(p-mTOR) correlates with advanced stage in diffuse large-B-cell lymphomas [J]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2007, 110: 1573.
- [22] 冀静, 顾婷婷, 郑鹏生. mTOR /P70S6K 信号通路在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(1): 10–13.
Ji Jing, Gu Tingting, Zheng Pengsheng. *Journal of Xi'an Jiaotong University: Medical Sciences Edition*, 2010, 31(1): 10–13.
- [23] Katoh M, Katoh M. Comparative integromics on Eph family [J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 28(5): 1243–1247.
- [24] Stephen L J, Fawkes A L, Verhoeve A, *et al.* A critical role for the EphA3 receptor tyrosine kinase in heart development[J]. *Developmental Biology*, 2007, 302(1): 66–79.
- [25] Pasquale E B. Eph receptors and ephrins in cancer: Bidirectional signalling and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(3): 165–180.
- [26] Wimmer-Kleikamp S H, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis [J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(6): 421–431.
- [27] Wood L D, Calhoun E S, Silliman N, *et al.* Somatic mutations of GUCY2F, EPHA3, and NTRK3 in human cancers[J]. *Hum Mutat*, 2006, 27(10): 1060–1061.
- [28] Vearing C, Lee F T, Wimmer-Kleikamp S, *et al.* Concurrent binding of anti-EphA3 antibody and ephrin-A5 amplifies EphA3 signaling and downstream responses: Potential as EphA3-specific tumor-targeting reagents[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6745–6754.
- [29] Lawrenson I D, Wimmer-Kleikamp S H, Lock P, *et al.* Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(5): 1059–1072.
- [30] Flynn R, Qian K, Tang C, *et al.* Expression of apolipoprotein a-I in rabbit carotid endothelium protects against atherosclerosis[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(10): 1833–1841.
- [31] Yui Y, Aoyama T, Morishita H, *et al.* Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I[J]. *J Clin Invest*, 1998, 82(3): 803–807.
- [32] Zhang Z, Bast R C Jr, Yu Y, *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5882–5890.
- [33] Van Hemelrijck M, Walldius G, Jungner I, *et al.* Low levels of apolipoprotein A-I and HDL are associated with risk of prostate cancer in the Swedish AMORIS study[J]. *Cancer Causes and Control*, 2011, 22(7): 1011–1019.
- [34] Cangussu L O, Teixeira R, Campos E F, *et al.* HLA class II alleles and chronic hepatitis C virus infection [J]. *Scand J Immunol*, 2011, 74(3): 282–287.
- [35] Grubić Z, Peros-Golubčić T, Stingl K, *et al.* The investigation of HLA microsatellites influence in predisposition to sarcoidosis among Croatsians[J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2011, 28(1): 18–26.
- [36] Yılmaz E, Çekmen A, Akkuş E, *et al.* The relationship between human leukocyte antigens (HLA) and renal cell carcinoma [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2010, 10(4): 282–286.

(责任编辑 孙秀云, 马晓晓)

《科技导报》“研究论文”栏目征稿

“研究论文”栏目专门发表自然科学、工程技术领域具有创新性的研究论文,要求学术价值显著、实验数据完整、具有原始性和创造性,同时应重点突出、文字精炼、引证及数据准确、图表清晰,并附中、英文摘要以及作者姓名、所在单位、通信地址、关键词等信息。在线投稿: www.kjdb.org。