

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 05. 004

应用二维电泳、液相色谱串联质谱技术筛选前列腺癌骨转移相关血清蛋白

程志强,王 扬,何 旺,李 鸣

Identification of Osseous Metastasis Associated Serum Protein in Prostate Cancer by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Capillary Liquid Chromatography and Mass Spectrometry

CHENG Zhi-qiang, WANG Yang, HE Wang, LI Ming

Department of Urology, Peking University School of Oncology, Beijing 100142, China

Corresponding Author: LI Ming, E-mail: mingli98@hotmail.com

Abstract: Objective To identify biomarkers which can be used of estimating the biological behaviors of prostate cancer with osseous metastasis. **Methods** Collecting the sera of prostate cancer patients with and without osseous metastasis, and pooling the two group of serum respectively. Using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by capillary liquid chromatography (Cap LC) and tandem mass spectrometry (MS/MS) to detect the differential serum proteins between prostate cancer patients with and without osseous metastasis. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to validate differential serum proteins. **Results** Serum amyloid A (SAA) and cytokeratin 10 (CK10) were higher expression level in prostate cancer patients with osseous metastasis, while apolipoprotein A- I (ApoA- I) was determined to be down-regulated in this group. And the expression level of ApoA- I was confirmed by ELISA analysis. **Conclusion** Our experiment indicated that the expression level of serum protein ApoA- I, SAA and CK10 was correlated to the osseous metastasis of prostate cancer.

Key words: Prostate cancer; Osseous metastasis; Two-dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry; Enzyme linked immunosorbent assay

摘 要:目的 筛选前列腺癌骨转移患者和无骨转移患者血清中的差异蛋白质。**方法** 收集前列腺癌骨转移患者和无骨转移患者的血清,分别将两组血清混合并进行二维电泳,随后用液相色谱串联质谱技术进行差异蛋白的进一步分离和鉴定。最后用酶联免疫吸附试验进行验证。**结果** 发现了两组患者血清中表达水平有显著差异的三个蛋白质:载脂蛋白 A- I、血清淀粉样蛋白 A 和细胞角蛋白 10,其中血清淀粉样蛋白 A- I 和细胞角蛋白 10 在骨转移组表达升高;载脂蛋白 A- I 在骨转移组表达降低。免疫吸附试验分析显示:骨转移的前列腺癌患者血清中载脂蛋白 A- I 的表达率显著低于无骨转移的患者。**结论** 载脂蛋白 A- I、血清淀粉样蛋白 A 和细胞角蛋白 10 与前列腺癌骨转移相关,可能作为前列腺癌骨转移的诊断或预测标志。

关键词: 前列腺癌;骨转移;二维电泳;质谱;酶联免疫吸附试验

中图分类号: R737. 25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)05-0372-03

0 引言

目前,前列腺癌已成为严重威胁我国老年男性健康的恶性肿瘤之一。骨转移为晚期前列腺癌患者最常见的全身并发症之一,其骨相关事件不但严重

影响患者的生活质量而且会加速患者死亡。本实验旨在寻找前列腺癌骨转移相关血清生物标志物,为前列腺癌骨转移患者的早期预防及有效治疗提供靶点。

1 资料与方法

1.1 样本

本实验所有样本均取自北京大学第一医院泌尿外科研究所 2006 年 2 月~2007 年 8 月间住院患者。其中前列腺癌骨转移患者 12 例,无骨转移患者 15

收稿日期:2008-12-30;修回日期:2009-02-05
作者单位:100142 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所泌尿外科,恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室
通信作者:李鸣, E-mail: mingli98@hotmail.com
作者简介:程志强(1971-),男,硕士,主治医师,主要从事泌尿系肿瘤的诊治工作

例,年龄 54~81 岁,平均年龄(70.2±7.6)岁。所有患者均有前列腺穿刺活检诊断证据,骨转移患者经 MRI 和同位素骨扫描诊断。患者入选标准为无心脑血管疾病、糖尿病、高血脂、高血压、严重肝肾疾病、甲状腺疾病及其他良、恶性肿瘤。27 例患者均为初诊。所有患者均在治疗前采取清晨空腹静脉血,经促凝、离心、分离血清、分装、-80℃ 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

IPG 预制胶条、等电聚焦上样缓冲液、CHAPS、Tris、DTT、溴酚蓝、SDS、碘乙酰胺、甲叉双丙烯酰胺、矿物油、丙烯酰胺、考马斯亮蓝染料 G-250 等均购自美国 Bio-Rad 公司。测序级胰蛋白酶、甘油、尿素为 Sigma 公司产品。ApoA-I ELISA 试剂盒为瑞典 Mabtech AB 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

IPGphor 等电聚焦电泳仪、Protean II 垂直板电泳槽、Gel Doc2000 凝胶成像仪、PDQUEST2-DE 图像分析软件均为 ABI 公司产品。毛细管液相色谱仪(Capillary liquid chromatography system)及四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF Ultima Global mass spectrometer)为美国 Waters 公司产品。

1.4 双向电泳

操作严格按照 Bio-Rad 公司双向电泳实验操作手册进行。采用 IPG 预制胶条 17 cm pH 值 3~10。分别取两个实验组混合血清各 350 μl 进行电泳,每组实验重复 3 次。用两组血清蛋白质点数最多的胶图为参考胶,对六幅胶图进行虚拟重建,再利用 PDQUEST2-DE 软件将两张胶图中的斑点进行匹配,匹配不上的斑点视为差异点。

1.5 液相色谱-串联质谱分析

将凝胶中的差异蛋白点,用胰酶消化、冻干后,溶于 0.1%三氟乙酸水溶液,用毛细管液相色谱仪及四极杆飞行时间质谱仪进行 Cap LC-ESI-MS/MS 全自动分析。MS/MS 的结果用 ProteinLynx 2.0

(Waters) 软件处理后,通过 Mascot(<http://www.matrixscience.com>)查询 NCBI 数据库进行蛋白质鉴定。

1.6 ELISA 分析

用双抗体夹心酶标免疫分析法测定样本血清中 ApoA-I 的含量,严格按 Mabtech AB 公司 Human ApoA-I ELISA Kit 说明书进行。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),同时用试剂盒中提供的标准品制作标准曲线,根据样品的 OD 值用标准曲线计算样品浓度。

1.7 统计学方法

利用统计分析软件 SPSS10.0,通过 χ^2 分析对两组凝胶图像的结果进行组内和组间差异性分析。

2 结果

2.1 双向电泳及图像分析结果

对两块虚拟重建胶图进行蛋白质点差异分析,两组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 3.168, P = 0.046$),说明两块胶图分辨率好,可以用来进行比较。经 PDQUEST2-DE 软件分析,将三倍差异表达定为具有显著性标准,共检测出 4 个差异点,其中第 4 号蛋白质点在无骨转移组高表达,第 1~3 号在骨转移组高表达,见图 1。

2.2 串联质谱结果

差异蛋白点经 Cap LC-ESI-MS/MS 分析后利用 Mascot 查询 NCBI 数据库,4 个差异蛋白点共鉴定得到三种蛋白质(蛋白 2 和蛋白 3 为同一种蛋白)。其中第 1 号点为 CK10、第 2 号点和第 3 号点同为 SAA、第 4 号点为 ApoA-I。这些蛋白中 SAA 和 CK10 在骨转移患者中相对高表达,而 ApoA-I 在骨转移患者相对低表达,见表 1。

2.3 ELISA 结果

ELISA 测定所有 27 例样本后经统计分析发现 ApoA-I 在这两组患者之间的表达差异有统计学意

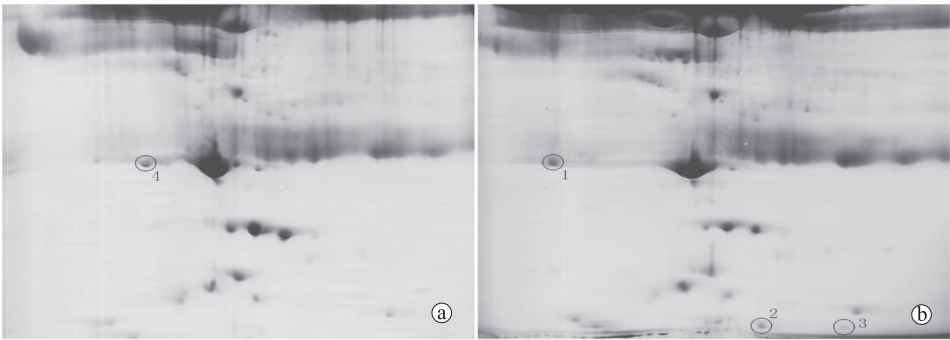


图 1 前列腺癌骨转移组与无骨转移组患者血清蛋白二维电泳图及部分差异点
Figure 1 The 2-D electrophoretogram and partial disparate points in the serum of prostate cancer patients with and without osseous metastasis

表 1 前列腺癌骨转移组与无骨转移组患者血清中差异表达的蛋白质鉴定结果

Table 1 The outcomes of identification of the differential expression proteins in the serum of prostate cancer patients with and without osseous metastasis

Protein	Registration number	Mascot score	Expression level in the osseous metastasis group
cytokeratin10	gi 147744568	1121	↑
SAA	gi 10438214	155	↑
SAA	gi 10438214	214	↑
ApoA- I	gi 34534379	766	↓

义($P<0.001$),有骨转移的患者血清中 ApoA- I 的浓度低于无骨转移的患者。有骨转移患者血清中 ApoA- I 的浓度为(324.3 ± 6.9) ng/ml;无骨转移患者血清中 ApoA- I 的浓度为(343.6 ± 6.6) ng/ml,见图 2。

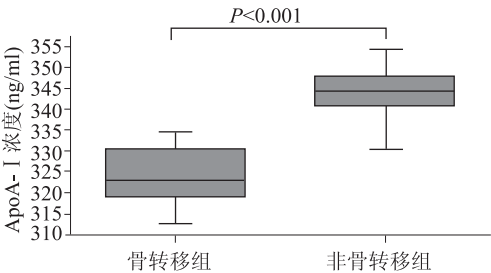


图 2 ELISA 测定的 ApoA- I 在前列腺癌骨转移和无骨转移组患者血清中浓度的统计分析

Figure 2 The statistical analysis of the density of the ApoA- I in the patients of prostate cancer with and without osseous metastasis

3 讨论

ApoA-I 是 高 密 度 脂 蛋 白 (High-density lipoprotein, HDL) 的 主 要 蛋 白 质 组 分,是 一 种 急 性 时 相 反 应 蛋 白,具 有 抑 制 炎 症 细 胞 因 子 释 放^[1]和 延 缓 动 脉 粥 样 硬 化 (atherosclerosis, AS) 发 生 发 展^[2] 的 作 用。2008 年 刘 桂 芝 等^[3] 报 道 ApoA- I 在 人 I 期 肺 癌 组 织 及 正 常 癌 旁 组 织 中 具 有 差 异 表 达。2004 年 Zhang 等^[4] 报 道 前 列 腺 癌 患 者 血 清 载 脂 蛋 白 A- I 浓 度 较 正 常 对 照 者 显 著 降 低。2005 年 Malik 等^[5] 还 报 道 HDL 的 另 一 个 载 脂 蛋 白 成 分 载 脂 蛋 白 A- II (ApoA- II) 在 前 列 腺 癌 患 者 血 清 中 浓 度 较 正 常 对 照 者 显 著 升 高。

SAA 也 是 一 种 急 性 时 相 反 应 蛋 白。在 急 性 炎 症 反 应 期 SAA 置 换 与 HDL 结 合 的 载 脂 蛋 白 A-I 形 成 SAA/HDL 复 合 体,促 进 AS 的 形 成 和 发 展^[6]。有 文 献 报 道 SAA 与 乳 腺 癌 患 者 的 预 后^[7] 以 及 脂 肪 肝 的 发 生 发 展^[8] 具 有 相 关 性。2005 年 Lyly 等^[9] 应 用 与 本 实 验 相 同 的 技 术 手 段 发 现 前 列 腺 癌 骨 转 移 患 者 SAA 血 清 浓 度 显 著 高 于 无 骨 转 移 的 患 者。综 上 所 述,笔 者 认 为 SAA、ApoA-I、ApoA-II 在 前 列 腺 肿 瘤 的 发 生 发 展

中 可 能 存 在 紧 密 关 联,其 机 制 有 待 揭 示。

角 蛋 白 家 族 是 一 种 细 胞 支 架 蛋 白。2001 年 Geert 等^[11] 曾 用 免 疫 学 方 法 证 实 细 胞 角 蛋 白 18 在 前 列 腺 癌 骨 转 移 灶 中 有 高 表 达。目 前 将 角 蛋 白 作 为 检 测 循 环 中 肿 瘤 微 转 移 的 标 记 物 已 在 如 胃 癌、乳 腺 癌、胰 腺 癌 及 结 直 肠 癌 中 得 到 肯 定。本 实 验 检 测 到 前 列 腺 癌 骨 转 移 患 者 血 清 中 角 蛋 白 10 较 无 骨 转 移 患 者 显 著 升 高,因 样 本 量 不 足 本 实 验 未 做 CK10 的 免 疫 学 验 证 实 验。

本 实 验 利 用 二 维 电 泳、毛 细 管 液 相 色 谱 及 串 联 质 谱 技 术 检 测 了 前 列 腺 癌 骨 转 移 患 者 和 无 骨 转 移 患 者 血 清 蛋 白 质,证 实 了 两 组 间 以 前 确 定 的 差 异 表 达 蛋 白 质 SAA,同 时 又 发 现 了 新 的 差 异 蛋 白 ApoA- I 和 CK10。我 们 将 针 对 新 发 现 的 三 种 差 异 表 达 蛋 白 进 行 大 样 本 研 究,以 期 发 现 有 价 值 的 前 列 腺 癌 骨 转 移 血 清 标 志 物。

参 考 文 献:

[1] Henning MF, Garda HA, Bakas L, et al. Biophysical Characterization of Interaction between Apolipoprotein A- I and Bacterial Lipopolysaccharide [J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2006, 44(3): 490-496.

[2] Jonas H G, Jacob M L, Mikkil H A, et al. Trimerization of Apolipoprotein A- I Retards Plasma Clearance and Preserves Antiatherosclerotic Properties [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2008, 51(2): 273-375.

[3] 刘桂芝, 吴逸明. 人 I 期肺癌及癌旁组织蛋白质双向电泳图谱的差异分析[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(8): 551-557.

[4] Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, et al. Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer [J]. Cancer Research, 2004, 64 (15): 5882-5890.

[5] Malik G, Ward MD, Gupta SK, et al. Serum Levels of an Isoform of Apolipoprotein A-II as a Potential Marker for Prostate Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(1): 1073-1085.

[6] Xu YY, Yamada T, Satoh T, et al. Measurement of serum amyloid A-1 (SAA1), a major isotype of acute phase SAA [J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2006, 44(1): 59-63.

[7] Brandon L, Neuhaus M L, Wener M H, et al. Correlates of circulating C-reactive protein and serum amyloid A concentrations in breast cancer survivors[J]. Breast Cancer Research & Treatment, 2009, 114(1): 155-167.

[8] Lim KH, Ward SC, Roayaie S, et al. Multiple Inflammatory and Serum Amyloid A Positive Telangiectatic Hepatic Adenomas with Glycogenated Nuclei Arising in a Background of Nonalcoholic Steatohepatitis [J]. Seminars in Liver Disease, 2008, 28(4): 434-439.

[9] Lyly L, Kim C, Scott T, et al. Identification of Serum Amyloid A as a Biomarker to Distinguish Prostate Cancer Patients with Bone Lesions [J]. Clinical Chemistry, 2005, 51(4): 695-707.

[10] Geert J L, Hvan L T, Walders' C A, et al. Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines [J]. Journal of Pathology, 2001, 19(5): 563-570.