

锌 $\alpha 2$ 糖蛋白在输尿管癌患者血清中的 差异性表达及意义

闫泽晨 张俊杰 郭飞 赵伟 余捷凯 郑树 顾朝辉 杨锦建 曾甫清 王家祥

【摘要】 目的 采用表面增强激光解析电离飞行时间质谱 (SELDI-TOF MS) 技术筛选并鉴定输尿管癌的差异性表达蛋白。**方法** 选取输尿管癌患者血清标本 20 例 (输尿管癌组), 正常对照血清标本 (对照组) 20 例, 采用 SELDI-TOF MS 技术检测并收集相关数据, 并应用基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF MS) 对筛选出的差异性表达蛋白进行鉴定。**结果** 应用生物信息学方法对所得数据进行分析, 得到差异性峰 14 个 ($P < 0.01$)。对比各组差异性表达蛋白质峰值数据, 筛选出质子数/电荷数 (m/z) 为 4 222 Da 的差异性表达蛋白 1 个, 其在对照组及输尿管癌组中表达强度分别为 $12\,003.33 \pm 3\,234.93$ 、 $18\,144.66 \pm 2\,047.05$, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。应用 MALDI-TOF/TOF MS 技术鉴定此差异性表达蛋白为锌 $\alpha 2$ 糖蛋白 (ZAG)。**结论** 应用蛋白质组学技术成功筛选出输尿管癌的血清差异性表达蛋白 ZAG, 该蛋白对输尿管癌的诊断和判断预后方面具有良好的价值。

【关键词】 锌 $\alpha 2$ 糖蛋白; 生物学标记; 输尿管癌; 蛋白质组学

The expression and significance of Zinc - Alpha2 glycoprotein in serum of ureteral carcinoma patients Yan Zechen*, Zhang Junjie, Guo Fei, Zhao Wei, Yu Jiekai, Zheng Shu, Gu Chaohui, Yang Jinjian, Zeng Fuqing, Wang Jiaxiang. * Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Wang Jiaxiang, Email: wjxzzu@126.com

【Abstract】 Objective To screen and identify the differentially expressed proteins of ureteral carcinoma by using surface - enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI - TOF MS). **Methods** A total of 20 serum samples from adults with ureteral carcinoma (ureteral carcinoma group), and 20 serum samples from healthy adults (control group) were selected. SELDI - TOF MS technology was applied to detect the differentially expressed proteins. The differential spot was identified by matrix - assisted laser desorption/ionization tandem time of flight mass spectrometry (MALDI - TOF/TOF MS). **Results** Fourteen different proteins peaks were found ($P < 0.01$). The highest Youden's index was obtained, selecting one differentially expressed protein with m/z of 4 222 Da. The selected expression protein in control group and ureteral carcinoma group was $12\,003.33 \pm 3\,234.93$ and $18\,144.66 \pm 2\,047.05$ respectively ($P < 0.01$). MALDI - TOF/TOF MS was used for identification of the peak spot, and the peak was further identified as Zinc - Alpha2 glycoprotein (ZAG). **Conclusion** A differentially expressed protein of ZAG of ureteral carcinoma was successfully obtained through proteomics technology. ZAG is expected to be a new marker for the early diagnosis and prognosis of ureteral carcinoma.

【Key words】 Zinc - Alpha2 glycoprotein; Biological markers; Ureteral carcinoma; Proteomics

我们分别采集了输尿管癌患者及正常儿童的血清样本, 并采用表面增强激光解析电离飞行时间质谱 (SELDI-TOF MS) 技术对输尿管癌患者血清中的差异性表达蛋白进行筛选, 旨在寻找一种与输尿管癌相关的差异性表达蛋白质^[1]。

材料与方法

1. 试剂与仪器: 尿素、醋酸钠、1,4 二硫苏糖醇、甲基氰、3-环己胺-1-丙磺酸、三氟乙酸、芥子酸及胰蛋白酶等购于 Sigma 公司。精密电子天平购于 Mettler 公司。去离子纯水机购于 Millipore 公司。雪花制冰机购于 Ross Temp 公司。冷冻高速离心机、-80℃ 超低温冰箱、微量移液器、蛋白 Marker 及一体化离心浓缩系统等购自 Thermo 公司。SELDI-TOF MS 分析仪及弱阳离子交换芯片等购自 Ciphergen Biosystem 公司。过硫酸铵、 $2 \times / 4 \times$ Laemmli 样品缓冲、 $10 \times$ 三羟甲基氨基甲烷/甘氨酸/

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.06.021

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172085/H1608)

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院外科 河南省泌尿外科研究所 (闫泽晨、张俊杰、郭飞、赵伟、顾朝辉、杨锦建、王家祥); 浙江大学第二医院肿瘤研究所 (余捷凯、郑树); 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科 (曾甫清)

通信作者: 王家祥, Email: wjxzzu@126.com

十二烷基硫酸钠、四甲基乙二胺、电泳仪及小型垂直电泳槽等购于 Bio-rad 公司。Uhraflex III 基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析仪等购自 Bruker 公司。

2. 一般资料:于 2013 年 1 月至 2014 年 6 月清晨空腹状态下分别采集 40 例受试者血清样本,其中 20 例为输尿管癌患者血清(输尿管癌组)、20 例为正常成人血清(对照组)。所采集的血清样本于室温静置 1 ~ 2 h 后,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,分装于 Ep 管中,于 -80 ℃ 冰箱保存。

3. 差异性蛋白筛选:两组血清在冰浴上缓慢融解(30 ~ 60 min),融解后 4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,取 5 μl 血清,加入 10 μl U9 血清处理液中,4 ℃ 条件下摇床上振荡使其充分混合(600 次/分,共振荡 30 min);用联结缓冲液将 U9 处理后的血清稀释至 200 μl,4 ℃ 摇床上振荡(600 次/分,振荡 2 min)后于 WCX2 蛋白芯片上样^[2]。先用已知相对分子质量的标准蛋白芯片 All-in-One 将 SELDI 质谱系统的相对分子质量误差校正至 <0.1%,再将结合好蛋白质的芯片放入质谱仪中检测^[3]。应用 Ciphergen Biosystems(Version 3.1)软件对采集到的数据进行校正,使总离子强度与相对分子质量均一化。再使用 Biomarker Wizard 和 ZUCI 蛋白质芯片数据分析系统进行非抽样离散小波转换法对原始数据并进行信号降噪处理。根据标记好的出现在所有选定光谱中的 3 个峰值,调整信号的强度标记。采用对齐单调的最小曲线和质量校正的方法对光谱进行基线校正。过滤信噪比(S/N) > 2 的峰值^[4]。聚类分析的最小阈值设定为 10%,并将各个样本中质子数/电荷数(m/z)差异 <0.3% 的峰值聚为同一类^[5]。

4. 统计学方法:将数据进行过滤噪音及聚类分析处理后,对筛选出的 m/z 峰值进行 Wilcoxon 秩和检验,各组数据两两比较采用 t 检验。检验标准设为 α = 0.01。

5. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离目标蛋白质:组装电泳仪并配制浓缩胶、分离胶及电泳液;制胶成功后,拔出齿梳,将胶架放入电泳槽,加入电泳液,准备上样;在胶体第一泳道加入蛋白 Marker[(1.7 ~ 40.0) × 10³],在其他泳道加入输尿管癌组与对照组的血清样品,每个泳道加 5 μl;连接电源,样品在浓缩胶内前进时调整电压为 30 V,进入分离胶后调整电压为 90 V,直到样本到达胶体底端,关闭电源;取出胶片,剥离浓缩胶,考马斯亮蓝染色剂染色后,摇床振荡过夜,脱色 1.5 h,倒掉脱色液,继续脱色 2.5 h;无菌条件下切取对应的目标蛋白质条带,切碎后分装保存,以供蛋白质鉴定使用^[6-7]。

6. MALDI-TOF/TOF MS 确定差异性蛋白:将纯化出的各时间段蛋白液分别置入一体化离心浓缩系统(SPD SpeedVac)中冻干至 20 μl。冻干后的蛋白液各取 1.5 μl 分别与 1.5 μl α-氰基-4-羟基肉桂(CCA)混合后,点靶后待干。同时用细胞色素 C(相对分子质量为 12 361.96) + CHCA 和胰岛素(相对分子质量为 5 734.51) + CHCA 校样。将靶板置入 MALDI-TOF/TOF MS 中进行检测,再次跟踪目标蛋白质峰。

7. 目标蛋白质的酶解:含有目标蛋白质的蛋白液加入超纯水至 40 μl,再加入配好的浓度为 0.1 mol 的二巯基苏糖醇(DTT)溶液 4 μl 后,置于 37 ℃ 温水中水浴 1 h。向上述混合液中加入 IAM 1.6 μl 后避光放置 1 h。依次加入 1.6 μl 的 1 mol 的 DTT 溶液,150 μl 的 0.1 mol 的碳酸氢铵(NH₄HCO₃)溶液和 2 μl 的胰蛋白酶。然后置于 37 ℃ 温水中过夜(6 ~ 8 h)。

8. 目标蛋白质的鉴定:胰蛋白酶酶解后的样品和基质 CCA 混合后点于样品靶上待其自然干燥,将蛋白芯片装入 MALDI-TOF/TOF MS 检测酶解后的的肽段,应用 Mascot 搜索软件,在 SwissProt 数据库中检索与鉴定出的肽段及氨基酸匹配的可能蛋白质。

结 果

1. SELDI-TOF MS 筛选血清差异蛋白标志物:使用 SELDI-TOF MS 对各组血清样本进行筛选,得到一系列蛋白质表达强度的数据。再将输尿管癌组及正常对照组的数据进行 Wilcoxon 秩和检验,筛选出差异性表达蛋白的 m/z 的峰 14 个。其中,9 个在输尿管癌组中高表达,5 个在正常对照组中高表达。比较上述各组差异性表达蛋白峰值数据,筛选出 m/z 为 4 222 Da 的差异性表达蛋白,其在输尿管癌组、对照组中表达强度分别为 18 144.66 ± 2 047.05、12 003.33 ± 3 234.93。

2. 目标肽段/蛋白质的鉴定:将检测出的 m/z 位于 4 222 Da 的肽段/蛋白质样品分别酶解及检测肽段(表 1)。通过将肽段导入 SEQUEST 检索程序并在 Bioworks 数据库检索,此肽段为锌 α2 糖蛋白(ZAG),其覆盖率达到 49.24%。

表 1 m/z 位于 4222 Da 的差异性表达肽段/蛋白质鉴定结果

m/z (Da)	蛋白名称	肽段序列	覆盖率 (%)	得分
4 222	人锌 α2 糖蛋白	RYSLTYYITGLSKHVEDV PAFQALGSLNDLQFFRYN	49.24	59.80

讨 论

输尿管癌多见于 40 ~ 70 岁,男性多于女性,约为

3:1。研究结果显示,该病的病因主要有吸烟、职业因素、遗传因素、镇痛药滥用等。其诊断主要依靠超声、CT 等辅助检查手段,但仍有一定的漏诊率、误诊率。输尿管癌的预后较差,其术后 5 年总生存率为 53.1%,10 年总生存率为 30.5%^[8]。对输尿管癌的相关肿瘤标志物的研究等够提高患者的预后,但目前尚无针对输尿管癌的肿瘤标志物的报道。因此,为了提高输尿管癌的早期确诊率及提高患者的预后情况,寻找出一种输尿管癌的差异性表达蛋白就显得尤为必要^[9]。

蛋白质组学是指基因组表达的全部蛋白质及其存在方式。SELDI-TOF MS 技术能够检测出待测样品中各种蛋白质的相对分子质量与表达水平,而 MALDI-TOF/TOF MS 技术能够检测出待测样本的蛋白质相对分子质量及结构等信息。这些技术在肿瘤标志物检测方面均具有广泛的前景。而该技术的出现及发展为我们寻找输尿管癌的差异性表达蛋白提供了新的思路与方法。

对比各组差异性表达蛋白质峰值数据,筛选 m/z 为 4 222 Da 的差异性表达蛋白 1 个,其在输尿管癌组及对照组中表达强度分别为 $18\,144.66 \pm 2\,047.05$ 、 $12\,003.33 \pm 3\,234.93$,两组比较,差异有统计学意义。应用 MALDI-TOF/TOF MS 技术鉴定此差异性表达蛋白为 ZAG,该蛋白在输尿管癌患者血清中高表达。

ZAG 是 Burgi 等^[10]于 1961 年在血浆中发现的一种蛋白,血清中的 ZAG 是肝脏产生分泌的,因其能和锌盐发生沉淀,且与血浆 α_2 球蛋白的电泳特性类似而得名。ZAG 的二级结构中包含两条 α 螺旋形成的一个沟槽,含有疏水配基结合位点,可与脂肪酸结合,被认为是其在脂代谢方面具有作用的重要结构,是一种脂类动员因子,能够促进降脂作用。同时,脂质代谢状态对肿瘤患者的生存率具有重要影响,而 ZAG 作为一种脂质降解因子在癌性恶病质形成中起作用^[11]。而输尿管癌患者血清中 ZAG 的表达量明显高于正常对照组,且尚未发现该蛋白与输尿管其他疾病有所关

联。故 ZAG 与输尿管癌的发生发展可能存在某种联系。

本研究结果显示,ZAG 在输尿管癌患者与正常健康者的血清中存在显著差异,为进一步寻找出一种输尿管癌的特异性诊断标志物奠定了基础,具有很好的价值与广泛的应用前景。同时,MALDI-TOF/TOF MS 技术为蛋白质的鉴定提供了可靠有效的技术手段。但是,本研究选取的样本量较少,ZAG 与输尿管癌发生发展之间可能有着某种密切联系。故该差异性表达蛋白的可靠性仍有待于进一步研究验证。

参 考 文 献

[1] 黄澄如,孙宁,张潍平,等. 双侧肾母细胞瘤的诊治——附 11 例报告[J]. 中华小儿外科杂志,2012,33(3):161-164.

[2] 陈炯,武文,汤厚阔,等. 胰腺癌患者术前与术后血清蛋白质组学研究[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(12):2577-2579.

[3] Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Canalis E. Nephroblastoma overexpressed (Nov) induces gremlin in ST-2 stromal cell lines by post-transcriptional mechanisms[J]. J Cell Biochem,2011,112(2):715-722.

[4] 闫泽晨,代醒,杨锦建,等. 儿童双侧肾母细胞瘤差异性表达蛋白的筛选[J]. 山东医药,2015,55(2):8-10.

[5] 庞艳丽,王磊,赵伟,等. 肾母细胞瘤血清非炎症标记物 SAA1 和载脂蛋白 C-Ⅲ的筛选、鉴定及验证[J]. 中华小儿外科杂志,2013,34(6):424-429.

[6] 顾士欣,杨德林,车晓明,等. 应用三维鸟枪法串联质谱技术研究脊髓室管膜瘤及正常脊髓室管膜的蛋白表达谱[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(7):1349-1351.

[7] Zhang Q, Wang J, Dong R, et al. Identification of novel serum biomarkers in child nephroblastoma using proteomics technology. Mol Biol Rep,2011,38(1):631-638.

[8] 潘柏年,张争,刘玉立,等. 174 例原发性输尿管癌的临床分析[J]. 中华外科杂志,2004,42(23):1447-1449.

[9] Cisowska A, Bugla-Płoskońska G. Analysis of the SDS-PAGE patterns of outer membrane proteins from Escherichia coli strains that have lost the ability to form K1 antigen and varied in the susceptibility to normal human serum[J]. Folia Microbiol (Praha),2014,59(1):37-43.

[10] Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn- α_2 -glycoprotein of normal human plasma[J]. J Biol Chem,1961,236:1066-1074.

[11] Somporn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, et al. Urinary proteomics revealed prostaglandin H(2) D-isomerase, not Zn- α_2 -glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis[J]. J Proteomics,2012,75(11):3240-3247.

(收稿日期:2015-03-16)

• 读者 • 作者 • 编者 •

关于关键词的标引

本刊要求论著类文章需标引 2~5 个关键词。请使用中国医学科学院医学信息研究所的《中文医学主题词表》(CmeSH)所列的词,或登录万方医学网:<http://med.wanfangdata.com.cn/Mesh/Mesh.aspx> 查找。如果查不到相应的关键词,处理方法有:(1)可选用直接相关的几个主题词进行组配。(2)可根据树状结构表选用最直接的上位主题词。(3)必要时,可采用习用的自由词并排列于最后。每个英文关键词第一个字母大写,各词汇之间空 2 个字。

本刊编辑部