

蛋白质组学及其在重离子治癌应用中的探讨*

邴涛^{1,2}, 谢漪^{1,2}, 党秉荣², 杨媛³, 李文建², 张红²

(1 中国科学院研究生院, 北京 100039;

2 中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000;

3 兰州大学生命科学院, 甘肃兰州 730000)

摘要: 综述了蛋白质组学的主要方法和技术——双向凝胶电泳、生物质谱技术、蛋白质芯片技术, 及其在肿瘤标志物的筛选和鉴定、肿瘤治疗效果的评价及肿瘤发生机制研究等方面的应用状况, 并对蛋白质组学在重离子治疗中的应用进行了展望。

关键词: 蛋白质组学; 重离子治疗; 癌症

中图分类号: Q71; Q691 **文献标识码:** A

1 引言

随着人类基因组计划的完成, 生命科学的重心开始转移到对基因的功能性产物(即蛋白质)的研究, 并产生了一门新的学科——蛋白质组学。蛋白质组(proteome)的概念最早是由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 在 1994 年首先提出, 并首次于 1995 年 7 月年在“Electrophoresis”上发表^[1]。蛋白质组是指一个机体、组织、细胞或细胞器内表达的所有蛋白质的总和。蛋白质组学(proteomics)是研究蛋白质组的一个新领域, 它以蛋白质组为研究对象, 采用高分辨率的蛋白质分离手段, 结合高通量的蛋白质鉴定技术, 分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间的相互作用与联系, 在整体水平上研究蛋白质的组成与调控的活动规律, 全面研究在各种特定情况下的蛋白质表达谱。

肿瘤是当今人类生活中最危险的疾病之一, 肿瘤患者的死亡率一直处于前列。目前认为恶性肿瘤的发生是由环境与遗传因素相互作用而导致的多种基因和蛋白质参与的复杂疾病。蛋白质组学的形成为癌症的诊断、治疗及预后提供了条件, 在重离子治疗中也将有重要的意义。

2 蛋白质学的研究方法和技术

2.1 双向凝胶电泳

Klose 和 O' Farrell 于 1975 年分别在两个实验室独立建成了双向凝胶电泳(2-DE), 他们将高分辨率的等电聚焦电泳和 SDS-PAGE 电泳联合组成双向电泳。第一向是等电聚焦(IEF), 根据蛋白质等电点不同而将其分离。双向电泳的第二向是 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 根据蛋白质分子质量不同进一步分离等电点相同的蛋白质。

双向凝胶电泳是目前相对理想、常用于蛋白质组学研究的核心技术之一, 能对复杂蛋白质混合样本进行定性和定量分析。尽管该技术存在实验室的标准化、结果的重复性、标本的处理和分离纯化后的蛋白量是否适于下游质谱分析技术等一些问题, 但完善优化中的该技术在当前蛋白质组学的研究仍无法被取代^[2]。经双向凝胶电泳分离不同蛋白斑点, 经成像分析和蛋白质鉴定制成参考图, 建立蛋白质数据库或比较发现差异蛋白质分子是当前蛋白质组研究的基本路线。通过各种生理、病理状态下的蛋白质分子图的比较, 可以筛选出具有临床标志意义的蛋白质关键分子^[3], 提供药物作用的靶蛋白质分子^[4], 以及发现在信号传递中起重要作用的蛋白质

收稿日期: 2004-12-13; 修改日期: 2005-03-17

* 基金项目: 中国科学院西部之光基金资助项目(XB040602); 甘肃省青年科学基金资助项目

作者简介: 邴涛(1982-), 男(汉族), 山东滨州人, 在读硕士, 从事生物物理学与免疫学相关的研究;

E-mail: bingtiao@impcas.ac.cn

分子^[5]。也可比较不同组织、细胞蛋白质的异同,从而寻找特异蛋白和保守蛋白。配合银染、荧光染色或放射性标记等方法,目前一般可以分离到1 000—3 000个蛋白质样点,最多的可以分离得到11 000个左右蛋白质样点,分辨率可以达到ng量级^[6]。

2.2 生物质谱技术

生物质谱近年来取得了飞速发展,其中最为显著的进展是两种蛋白质离子化方式的发明及其研究者共同获得了2002年诺贝尔化学奖^[7,8]。质谱技术(MS)的基本原理是样品离子化后,根据不同离子间的质荷比(m/z)的差异来分离并确定相对分子量。早期的电子电离的方式不适合分析高极性、难挥发和热不稳定样品。20世纪80年代中期出现的以电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解析电离(MALDI)^[9]为代表的软电离技术,能高效地电离一些完整或片断的大分子生物聚合物,可以测定分子量达40万的生物大分子。通过肽质量指纹谱(PMF)、肽序列标签(PST)、源后衰变(PSD)和肽阶梯序列(PLS)等方法,结合蛋白质数据库检索可实现对蛋白质的快速鉴定和高通量筛选^[10]。新近出现的一种被称为基质辅助激光解析电离四级飞行时间质谱(MALDI quadruple time of flight)技术综合了肽指纹图谱方法的大规模和串联质谱直接获得肽序列两方面的优点^[11],可用于测定蛋白质或多肽的精确分子量,并能测定较大分子的分子量。

2.3 蛋白质芯片技术

1991年,美国Affymetrix公司的Fodor等^[12]成功地研制了世界上第一块DNA芯片,从此拉开了研究生物芯片技术的帷幕。蛋白质芯片(protein chip)是指以蛋白质分子作为配基,将其固定在固相载体的表面,形成的蛋白质微阵列。主要用于蛋白质间相互作用和差异显示蛋白质组的研究,是一种在高密度的方格上含有各种微量纯化的蛋白质,并能够高通量地测定这些蛋白质的生物活性,以及蛋白质与生物大分子之间相互作用。根据检测目的不同,作为配基的蛋白质分子可以是酶、受体、抗原、抗体或抗体片断等。主要分为:固相表面型芯片(plain-glass slide)、微孔型芯片(microwell chip)、毛细管电泳型芯片(chip-based capillary electrophoresis)、液相载体型芯片和细胞组织型芯片^[13]。

蛋白质芯片具有高通量、微型化、集成化和平行性检测等特点,逐渐应用于疾病检测、新药筛选等诸多领域。近几年,随着自动化要求的越来越高,一些实验室将蛋白质芯片技术与质谱联用起来,通过质谱直接显示反应结果,极大地提高了分析检测的灵敏度与自动化程度。这种技术具有极大的优越性,它不需要进行蛋白质分离,只是利用抗体或其他类型亲和探针构成的芯片进行检测,就可以一次同时检测几千种蛋白质,效率非常高^[14]。因此对分析蛋白质组的变化具有很大的应用潜力,使简单、经济及规模化检测成为可能。

3 肿瘤蛋白质组学研究进展

蛋白质组分析技术可以从整体水平上探讨多基因、多蛋白参与的疾病,具有时空动态性和可调节性的特点。目前认为恶性肿瘤的发生是由环境与遗传因素相互作用而导致的多种基因和蛋白质参与的复杂疾病。生物信息学成了蛋白质组研究不可缺少的信息学手段^[15]。蛋白质组技术结合生物学信息可以从整体上,全面、动态、定量地分析比较正常及病变标本中蛋白质种类和数量的改变,有助于阐明蛋白质间的调控网络,深化对肿瘤发病机制的认识,发现肿瘤诊断、治疗和预后的特异性标志物,加快肿瘤疫苗的研制和新药的开发。其中日内瓦大学医院的SWISS-DPAGE数据库含有人肝脏组织、HEPG2肝癌细胞及其分泌蛋白的双向电泳参考图^[16]。瑞士的SWISS-PROT和ExPASy都是很好的因特网蛋白质组数据库^[17]。蛋白质组技术对重离子杀伤癌细胞以及对正常组织的影响,阐述重离子辐照后蛋白质间的作用机理,都有重要的意义。

3.1 探讨肿瘤发生的机制及重离子杀伤癌细胞的机理

肿瘤的发生涉及到癌基因的激活、抑癌基因的失活、凋亡抑制及细胞周期失调等多种基因的变化,这种调控网络的失衡是多种基因及其产物相互作用的结果。双向凝胶电泳的应用,为从整体上探讨肿瘤发生的调控机制提供了有力的工具。Stierum等^[18]应用双向电泳和质谱分析了大肠癌Caco-2细胞系蛋白质组,发现有11种蛋白质与其增殖和分化有关。Caco-2细胞系在表型上与分化有关的变化

涉及到一系列生化通路的改变。故推测蛋白折叠、二硫键形成、细胞骨架形成和维持、核苷酸代谢、糖酵解及某些与肿瘤发生相关的蛋白可能参与了 Caco-2 细胞系的分化。现在重离子对细胞的损伤、杀伤的分子、基因调控机理还不是太清楚,如果应用蛋白质组学技术,将可能揭示它们的机理,为重离子治疗提供理论支持。

3.2 寻找肿瘤标志物

在肿瘤发生发展过程中,伴有不同的蛋白质表达或抑制。通过对正常及病变标本中蛋白质种类和数量的比较分析,有助于肿瘤诊断、治疗和预后的特异性标志物,目前已成为蛋白质组研究的重点和热点,并在多种人类肿瘤组织或细胞系中取得了一些成果。Seow 等^[19]通过电泳技术分析 HCC-M 细胞株和正常肝细胞株,鉴定出约 400 个肝癌细胞特异蛋白点,如乙醇脱氢酶、 α 烯醇化酶、天冬酰胺合成酶和异柠檬酸脱氢酶。丹麦的一个研究组利用蛋白质组研究技术结合组织冰冻切片技术分析 150 例膀胱癌病人组织,发现银屑素仅表达于膀胱鳞状细胞癌患者的组织及尿液中,而移行细胞癌中难以检测到,因此认为银屑素可以作为 SCC 患者的随访标志^[20]。这样,对于癌症的预防、诊断有着极其重要的意义,可以做到早发现早治疗。

3.3 肿瘤治疗方面的应用

Hanash 等^[21]首先运用 2-DE 方法研究儿童白血病和其他恶性血液系统疾病。他们发现,儿童急性白血病中 Op18 磷酸化程度明显的与细胞周期中 S 期细胞比例相关,同样发现该组病人的淋巴细胞中 non-metastasis 23 (nm23) 基因 H1 亚型 (nm23-H1) 表达增高。与 Op18 相似, nm23-H1 在正常细胞中可因有丝分裂而增加,这表明 nm23-H1 和细胞增殖状况相关。其他研究也表明,与良性病变相比,肿瘤组织中的 nm23-H1 蛋白产物表达水平增高。与局限期肿瘤相比,转移期肿瘤高表达 nm23-H1, nm23-H1 蛋白表达水平和癌抗原 N-myc 表达、肿瘤团块大小、转移呈正相关。这样可以利用蛋白质组学技术,根据肿瘤的蛋白表达情况,确定肿瘤的发展期,以有利于选择合适的治疗方案,确定重离子治疗最佳剂量与疗程。既要做到杀死癌细胞,

又要做到对正常组织损伤最小,提高治愈率和提高患者生存质量。

4 蛋白质组学在重离子治疗应用中的展望

目前,国外利用重离子在放射治疗中的特殊优势^[22],已经开展了相关的临床治疗,并取得了良好的效果。我国兰州也开展了重离子治疗癌症相关的工作,现在正在进行 1—2 年的浅层肿瘤治疗,积累临床经验,为实现“重离子束全体位治癌”做准备^[23]。但是重离子治疗相关的蛋白质组学研究国内外尚未见到相关报道。蛋白质组学的研究将对重离子治疗的诊断、治疗与预后将有重要的应用价值。通过对肿瘤的标志物进行蛋白质组学分析,可以确定癌症发展状况,进而选择合适的剂量与疗程;对肿瘤的蛋白质组学分析,可以确定重离子治疗后的效果;蛋白质组学可能为重离子治疗中的“旁效应”的研究提供新的思路,可能为重离子的治疗开辟一个新的方向;同时蛋白质组学技术可以快速、动态地检测整体免疫系统状态的变化,为面向生物学对象的重离子治疗提供了基础。蛋白质组学的另一大特色是从一开始就呈现出基础研究与实际应用并驾齐驱的趋势。蛋白质组学可能对重离子相关的辐射生物学、辐射防护学、太空生物学以及生命的起源将有重要的指导意义。作为一门新兴学科蛋白质组学给人类展示了一幅美好的前景,也许人类揭开生命科学的诸多奥秘的梦想已为期不远。

目前蛋白质组研究已成为后基因组时代研究的主流。随着蛋白质组学在技术和理论上的不断发展和完善,它将在肿瘤及生命科学的各个学科中发挥越来越重要的作用,从而成为揭示肿瘤发生本质、诊断和治疗肿瘤的有力武器。尽管蛋白质组研究还处于初期发展阶段,还存在很多不尽人意的地方,但是我们可以期望随着其深入地发展,蛋白质组学研究在揭示生命活动的规律上会有所突破,并对探讨重大疾病的机理、疾病诊断、疾病防治和新药开发提供重要的理论依据。现在由我国科学家贺福初领衔的肝脏蛋白质组计划已经顺利实施,这将有利地促进我国蛋白质组学的研究,包括重离子辐照相关的蛋白质组学的研究。

参 考 文 献:

- [1] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, *et al.* Electrophoresis, 1995, **16**(7): 1 090.
- [2] 崔杰峰, 刘银坤. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, **24**(5): 283.
- [3] Zeindl Eberhart E, Klugbauer S, Dimitrijevic N, *et al.* Eletrophoresis, 2001, **22**(14): 3 009.
- [4] Steiner S, Witzmann F A. Eletrophoresis, 2000, **21**(11): 2 099.
- [5] Soskic V, Grolach M, Poznanovic S, *et al.* Biochemistry, 1999, **38**(6): 1 757.
- [6] Wilkins M R, Casteiger E, Sanchez J C, *et al.* Electrophoresis, 1998, **19**: 1 501
- [7] Tanaka K, Waki H, Ido Y, *et al.* Rapid Commun Mass Spectrom, 1988, **2**: 151.
- [8] Fenn J B, Mann M, Meng C K, *et al.* Science, 1989, **246**(4 926): 64.
- [9] Scalf M, Westphall M S, Smith L M. Anal Chem, 2000, **72**: 52.
- [10] 应万涛, 钱小红. 军事医学科学院院刊, 2000, **6**(24): 259.
- [11] Paul R Graves, Timothy A J. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, **66**(1): 39.
- [12] Fodor S P, Read J L, Pirrung M C, *et al.* Science, 1991, **251**(4995): 767.
- [13] 张 萍, 杜贤宇, 徐振山等. 疾病控制杂志, 2004, **8**(3): 250.
- [14] Nelson R W, Nedelkov D, Tubbs K A. Electrophoresis, 2000, **21**: 1 155.
- [15] O'Donovan C, Apweiler R, Bairoch A. *et al.* Trends Biotech, 2001, **19**: 178.
- [16] Sanchez J C, Appel R D, Golaz O, *et al.* Electrophoresis, 1995, **16**: 1 131.
- [17] 郑广勇, 严 明, 周 利等. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34**(2): 209.
- [18] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, *et al.* BiochimBiophys Acta, 2003, **1 605**(122): 73.
- [19] Seow T K, Ong S E, Liang R C, *et al.* Electrophoresis, 2000, **21**: 1 787.
- [20] Ostergaard M, Rasmussen H H, Nielsen H V, *et al.* Cancer Res, 1997, **57**: 4 111.
- [21] Hanash S M, Teichroew D. Electrophoresis, 1998, **19**: 2 004.
- [22] 党秉荣, 卫增泉, 李文建等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, **21**(4): 255.
- [23] 李文建. 原子核物理评论, 2005, **22**(1): 39.

Research of Proteomics and Its Application in Tumour Treatment by Heavy Ion*

BING Tao^{1,2}, XIE Yi^{1,2}, DANG Bing-rong², YANG Yuan³, LI Wen-jian², ZHANG Hong²

(1 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

2 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3 Institute of Biological Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: With the accomplishment of the human genome project, proteomics becomes a new subject on the buildup of the whole proteins and their dynamic changes in cell emerges. Cancer is a kind of complex disease involved in multi-genes and proteins. Heavy ion therapy is an arising and potential radiation treatment nowadays. This paper reviews on the main methods and technology in proteomics —— two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), biological mass spectrometry, protein biochips, bioinformatics and its application on identification of cancer biomarkers, evaluation of curative effect on tumour and the mechanisms of tumour formation. This paper also presents some prospects on the application of proteomics in heavy ion therapy.

Key words: proteomics; heavy ion therapy; tumour

* **Foundation item:** Western Light Program of Talent Cultivation of Chinese Academy of Sciences (XB040602); Youth Sciences and Technology Foundation of Science Foundation of Gansu Province