

# 蛋白质组学技术的研究进展及其在肺部疾病诊断中的应用

李学任 魏路清(审校)

作者单位:300162 天津市,武警医学院研究生 18 队(李学任)

300162 天津市,武警医学院附属医院(魏路清)

通讯作者:魏路清,E-mail:luqing-wei@163.com

1994 年,澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 在《Electrophoresis》杂志上首次提出蛋白质组的概念<sup>[1]</sup>。随着人类基因组计划的完成,生命科学进入功能基因时代,研究重点也集中在对生物功能的整体研究。蛋白质组学是基因组学中后兴起的一项新的研究领域,蛋白质不仅能为生命活动规律提供物质基础,而且以其为基础的基因蛋白质组学研究也能为多种疾病机理的阐明及攻克提供理论根据和解决途径。通过对正常个体及病理个体间的蛋白质组比较分析,我们可以找到某些“特异性标志物”,为临床早期诊断及药物靶向治疗提供帮助。

## 1 蛋白质组学

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,对机体或细胞的所有蛋白质进行鉴定和结构功能分析。蛋白质组学研究包括样品的制备,蛋白质的分离和鉴定。常用的技术包括二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术、生物信息学技术、质谱(mass spectrometry, MS)技术等。目前,蛋白质组学主要围绕三个方面开展研究,首先是蛋白库的建立,进行蛋白质大规模鉴定和分类,并阐明其转录后修饰的特征;其次是蛋白质指纹图的建立,显示机体在不同疾病状态、药物、理化因素的作用下的差异表达等;第三是研究蛋白质间的相互作用,并绘制蛋白质作用的图谱。而蛋白质组学的分支学科临床蛋白组学,则侧重于临床疾病相关的差异表达的蛋白质,围绕疾病的预防、发病机制、疾病的早期诊断和治疗等方面进行研究。由于恶性肿瘤对人类生活和生命的严重危害,肿瘤早期诊断的生物标志物成为临床蛋白质组学研究的重点。

## 2 蛋白质组学常用的技术

**2.1 2-DE 技术** 1975 年 O'Farrel 等人创立了 2-DE 技术,至今该技术已被证明是一种可靠而有效的分离蛋白质的方法,是目前蛋白质分离最常用、最重要的方法。其基本原理是根据不同蛋白质的等电点和分子量不同的特征将蛋白质分离。经过多年的改进,采用该技术分离蛋白质的范围逐渐扩

大,但仍存在许多局限性,如对低丰度蛋白的分辨率低,而低丰度蛋白往往具有比高丰度蛋白更为重要的生理功能。近几年一系列以非凝胶为介质的多维色谱联用分离技术因其高效、快速、高灵敏度的特点而成为双向电泳技术的有力补充。最近,有学者<sup>[2]</sup>利用荧光染料标记的双向电泳技术即凝胶内差异显示电泳可以全面地观察到两种样品蛋白质表达间的差异,实验组样品和对照组样品分别用荧光染料 Cy3 和 Cy5 标记在同一块凝胶上,通过二维电泳分离蛋白质进行差异比较,结果表明,该技术在比较蛋白质的表达差异研究方面前景广阔。

**2.2 生物信息学技术** 生物信息学是生物科学在计算机技术、应用数学等多门学科的基础上构建起来的一门新兴学科。它将计算机科学的分析理论和实用工具联系起来,通过对生物学实验数据的获取、加工、存储、检索与分析,达到解释数据所蕴含的生物学意义的目的,是蛋白质组学研究必不可少的技术平台。生物信息学作为一项平台技术,一方面能够分析和构建双向电泳数据库蛋白质质谱分析数据,另一方面可以搜索与构建蛋白质组数据库。

**2.3 MS 技术** MS 技术分析蛋白质的原理是通过电离源将蛋白质分子转化为离子,利用 MS 分析仪的电场、磁场将具有特定质量与电荷比值的蛋白质离子分离开来,经过离子检测器收集分离的离子,确定蛋白质的分子量。MS 技术是蛋白质鉴别的核心技术,常用的有电喷雾电离技术、基质辅助激光解吸电离技术以及基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术改进的表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 技术。

**2.3.1 SELDI 技术** SELDI 技术是一种广泛用于组织、血浆和血清生物标志物筛查的技术平台,近年来,其高通量和操作简便的特点使其成为生物标志物研究的重要工具<sup>[3]</sup>。它主

要由蛋白质芯片、飞行时间质谱仪及相关软件组成,其中蛋白质芯片是该技术的核心,根据表面物质的不同,可将其划分为化学型和生物型两类<sup>[4]</sup>。原理是利用激光脉冲辐射,使芯池中的分析物解析形成荷电离子,根据不同质荷比在检测端检测到的信号不同的原理,经数字化处理后绘制出一张质谱图,该图经计算机软件处理还可形成模拟谱图与正常人或某种疾病患者的谱图,能从中发现和捕获新的疾病特异性相关蛋白及其特征。

**2.4 SELDI 技术与 2-DE 技术的比较** 2-DE 技术分析相对分子质量在  $30 \times 10^3$  以上的蛋白质时电泳图谱较清楚,这就使与疾病相关性更强的低丰度蛋白的分离受到局限。另外,2-DE 凝胶上的蛋白质斑点很大一部分包含一种以上的蛋白质,且耗时长,工作量大,对于染色转移等技术要求高。而 SELDI 技术对相对分子质量  $0.2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  区间的蛋白质都可以给出很好的质谱图,对一个样本的分析在几十分钟内就可以完成,处理的信息量远远快于 2-DE。对于低丰度物质,只要与表面探针结合,就可以检测到,这也是 2-DE 技术所不具备的。

2-DE 虽然以高分辨率、简单、快速等优点成为目前蛋白质组学研究的核心手段,但是样品制备、电泳和蛋白质的定量、蛋白质检测的可重复性依然是制约其应用的瓶颈<sup>[5]</sup>。目前,针对 2-DE 技术的不足,对其进行了补充和改进,主要集中在蛋白质的分离过程中,例如:采用激光捕获显微切割技术对样品预切割获得小片段含目标样本,固相化 pH 胶条以及荧光染料的使用使得蛋白质的分离更加准确清晰。而 SELDI 技术仅能给出蛋白质的相对分子质量,在蛋白质的序列、构象、特性等方面还需要和 2-DE、酵母双杂交、生物信息学技术等结合使用。尽管这种诊断模式还需进一步的完善,但应用前景非常可观。

### 3 蛋白质组学技术在肺部疾病诊断中的应用

**3.1 在间质性肺疾病方面的应用** 多年来,国内外学者对蛋白质组学技术在间质性肺疾病中的应用研究取得了许多成果。1979 年, BELL 小组第一个显示支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中可溶性蛋白质的双向电泳图谱出版, 鉴定了 23 种血清来源的蛋白质, 随后开展了大量研究, 不断丰富人类 BALF 蛋白质电泳图谱。进入 21 世纪以来, 人类 BALF 2-DE 凝胶电泳网络数据库相继建立, 蛋白质组学技术在间质性肺疾病方面的研究也有了很大进展。

2008 年 9 月, 广东呼吸系统疾病研究所的沈慧仪等<sup>[6]</sup>采用固相 pH 梯度的 2-DE 技术分离组织总蛋白, 图象分析软件识别差异表达的蛋白质点, 运用 MALDI-TOF-MS 技术获取肽质量指纹图谱, 检索数据库鉴定差异表达的蛋白质点, 明确其生物学功能, 建立 2-DE 图谱, 并鉴定出一些与特发性间质性肺炎的发病机制相关的蛋白质。2010 年, Kim 等<sup>[7]</sup>发现

16 个差异蛋白点, 许多炎症、抗炎蛋白可能与特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的发病机制有关。2011 年, Korfei 等<sup>[8]</sup>利用 MALDI-TOF-MS 技术比较了 IPF 患者和肺捐赠患者的肺组织, 研究发现未折叠蛋白、热休克蛋白过度表达。而对于 IPF 急性加重的研究, Collard 等<sup>[9]</sup>测量了细胞活性/损伤的生物标志物, 全身炎症反应急性肺损伤患者血浆 (IL-6) 和凝血/纤溶 (蛋白 C、血栓调节蛋白、纤溶酶原激活物抑制物-1) 等指标, 结果发现上述指标在 IPF 的急性发作期具有鲜明的急性肺损伤血浆生物标志物的特征。

综合分析蛋白质组学在弥漫性间质性肺疾病方面的研究, 发现大多数集中于对 BALF 的研究, 采用的途径主要是基于 2-DE 分离之上的相关生物化学方法, 所发现的有意义的差异分子均为大分子, 而对于低丰度蛋白的分离鉴定仍有很广阔的研究前景。

**3.2 在肺部肿瘤方面的应用** 早在 2002 年, Chen 等<sup>[10]</sup>就对肺腺癌进行了蛋白质组学分析, 运用固相 pH 梯度的 2-DE 技术发现有 9 种蛋白质中的单一亚型在肺腺癌中过度表达, 其对应的临床变量和表达规律有助于成为该肿瘤的生物标记。随后由于 MS 技术的出现极大地促进了临床蛋白质组学的研究, 特别是基于 MALDI 技术改进的 SELDI-MS-TOF 技术的出现, 拓展了临床疾病研究的领域, 在肺部肿瘤方面也有许多突破。Yang、王秀丽、周继红等<sup>[11-13]</sup>先后采用 SELDI-TOF-MS 技术检测肺癌患者和正常人血清蛋白质质谱, 筛选出差异蛋白质峰作为一个肿瘤标志物组合模式, 建立分类树模型, 表明该技术给肺癌的筛查、早期诊断治疗、术后随访提供了新的有效工具。Carcereny 等<sup>[14]</sup>运用联合激光捕获显微切割和蛋白质芯片 SELDI-TOF-MS 技术对正常肺组织、非典型腺瘤样增生和恶性肿瘤的冰冻切片进行激光捕获显微切割, 发现的差异蛋白有助于早期发现肺癌和癌前病变, 并可以对肺癌的高危人群进行监测及肺癌化疗后疗效的评估。罗晓阳等<sup>[15]</sup>使用 SELDI-TOF-MS 技术对肺癌组学类型腺癌进行了研究, 筛选出 5 个可作为肿瘤标志物的差异蛋白。

**3.3 在支气管哮喘方面的应用** 支气管哮喘是多细胞参与的炎症反应, 以气道炎症和气道高反应形成的可逆性气流受限为其特征, 发病机制尚未明确。Lindahl 等<sup>[16]</sup>第一个研究报告了患者 BALF 和鼻腔灌洗液的蛋白质, 结果显示哮喘及其气道激惹与脂质运载蛋白 1、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 S、免疫球蛋白结合因子、转甲状腺素蛋白水平有关。2001 年 Malmstrom 等<sup>[17]</sup>通过用蛋白质组学方法研究哮喘发病过程中的气道重构和纤维化的发生机制, 发现血小板衍生生长因子及其信号转导途径在哮喘气道平滑肌重构及纤维化的过程中起到重要作用。而在 2004 年 Fajardo 等<sup>[18]</sup>利用 2-DE 和 MS 法对模型组和对照组动物进行的分析发现, 模型动物的组织和 BALF 中糖醇解酶、葡萄糖调节蛋白、脯氨酰 4-羟化酶、精

氨酸酶等与组织缺氧相关的蛋白表达显著增高,炎症组织中组织蛋白酶 S 明显增高,由此推断上述蛋白质可能是哮喘发生机制中缺氧相关基因表达的产物。同年 Signor 等<sup>[19]</sup>通过小鼠哮喘模型发现蛋白成分主要来源于血浆以及局部炎症反应所致。2008 年,袁东等<sup>[20]</sup>采用 SELDI-TOF-MS 技术筛选出哮喘患儿、正常儿童 15 个差异表达蛋白。此外,Verrills 等<sup>[21]</sup>采用二维差异凝胶电泳联合 MALDI-TOF-MS 技术筛选出哮喘、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者和健康成人血浆蛋白中四个生物标记物,并通过免疫学验证,研究表明外周血中的生物标志物亦可用于疾病临床评估。

**3.4 在其它肺部疾病中的应用** 2009 年,Gomes-Alves 等<sup>[22]</sup>进行了疾病间的多对照实验,采用 SELDI-TOF-MS 技术探寻囊性纤维患者与健康人群、哮喘患者、COPD 患者之间的鼻上皮细胞和血清中的特异性生物标志物,发现一些蛋白质在疾病的诊断、预后等方面起重要作用,为下一步进行差异蛋白质的鉴定奠定了基础。欧阳卿等<sup>[23]</sup>运用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 技术对吸烟的 COPD 患者和非 COPD 吸烟者肺组织表达的差异蛋白进行筛选和鉴定,共鉴定出 24 种差异蛋白,涉及基本代谢酶类、氧化应激相关酶类、凝血纤溶相关蛋白、蛋白降解相关酶以及细胞生长分化相关蛋白等。此研究为进一步探索 COPD 的发病机制提供了新的线索。

#### 4 结束语

随着人类蛋白质组学技术的快速发展,特别是蛋白质分离和鉴定技术的联合应用,目前该技术已逐步应用到临床的各种疾病用来筛选疾病早期诊断的生物标记物,同时为药物靶向治疗的研究提供依据。而在肺部疾病方面,通过研究,发现了部分蛋白质或蛋白质组与疾病的发生发展有关,但是各项研究仍处于起步阶段。我们相信随着蛋白质组学技术的不断发展,蛋白质组学将会为肺部疾病的研究、诊断和治疗带来新的革命。

#### 5 参考文献

- 1 Matsumoto N, Ezaki J, Komatsu M, et al. Comprehensive proteomics analysis of autophagy-deficient mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368: 643-649.
- 2 高宇,陈利珍,梁革梅,等. 差异凝胶电泳技术的发展及其在生物学领域的应用. *生物技术通报*, 2010, 26: 65-69.
- 3 Gemoll T, Roblick UJ, Auer G, et al. SELDI-TOF serum proteomics and colorectal cancer: a current overview. *Arch Physiol Biochem*, 2010, 116: 188-196.
- 4 Tang N, Tomatore P, Weinberger S. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrum Rev*, 2004, 23: 34-44.
- 5 冯海燕,景志忠,房永祥,等. 双向凝胶电泳技术及其应用. *生物技术通报*, 2009, 25: 59-68.

- 6 沈慧仪,顾莹莹,廖东江,等. 特发性间质性肺炎蛋白质组学初步研究. *广东医学*, 2008, 29: 1468-1471.
- 7 Kim TH, Lee YH, Kim KH, et al. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: antiinflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182: 633-642.
- 8 Korfei M, Schmitt S, Ruppert C, et al. Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *J Proteome Res*, 2011, 10: 2185-2205.
- 9 Collard HR, Calfee CS, Wolters PJ, et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299: L3-L7.
- 10 Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 2298-2305.
- 11 Yang SY, Xiao XY, Zhang GW, et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer*, 2005, 20: 83.
- 12 王秀丽,高春芳,梁延春,等. 肺癌血清蛋白质指纹图谱诊断模型的建立. *中国实验诊断学*, 2008, 12: 1413-1415.
- 13 周继红,柳广南,黄斯明,等. 表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术对周围型肺癌差异蛋白表达的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34: 30-33.
- 14 Carcereny E, Ramirez JL, Sanchez-Ronco M, et al. Blood-based CHRNA3 single nucleotide polymorphism and outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2010, 68: 491-497.
- 15 罗晓阳,陈海泉,王文静,等. 表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术筛选肺腺癌血清肿瘤标记物. *中国癌症杂志*, 2006, 16: 14-16.
- 16 Lindahl M, Stahlbom B, Tagesson C. Two-dimensional gel electrophoresis of nasal and bronchoalveolar lavage fluids after occupational exposure. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1199-1204.
- 17 Malmstrom J, Westergren Thorsson G, Marko Varga G. A proteomic approach to mimic fibrosis disease evolution by an in vitro cell line. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1776-1784.
- 18 Fajardo I, Svensson L, Bucht A, et al. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170: 477-484.
- 19 Signor L, Tigani B, Beckmann N, et al. Two-dimensional electrophoresis protein profiling and identification in rat bronchoalveolar lavage fluid following allergen and endotoxin challenge. *Proteomics*, 2004, 4: 2101-2110.

20 袁东,沈春琳,姜智海,等. 儿童哮喘血清生物标志物的筛选. 环境与职业医学,2008,25:528-531.

21 Verrills NM, Irwin JA, He XY, et al. Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med,2011,183:1633-1643.

22 Gomes-Alves P, Imrie M, Gray RD, et al. SELDI-TOF biomarker sig-

natures for cystic fibrosis, asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Clin Biochem,2010,43:168-177.

23 欧阳卿,胡瑞成,戴爱国,等. 慢性阻塞性肺疾病与非慢性阻塞性肺疾病吸烟者肺组织蛋白质组学比较分析. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26:81-87.

(收稿日期:2011-05-03)

(本文编辑:杨军)

## 消 息

### 2011(厦门)全国抗菌药物临床新进展与规范应用研讨会暨高级学习班

为提高抗菌药物的疗效、规范抗菌药物的应用,进一步落实卫生部《多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南》,为即将颁布的《抗菌药物临床应用管理办法(征求意见稿)》的实施,减少药源性疾病的发生,保障医疗安全,中华医学会继续教育部研究决定于 2011 年 12 月上旬在福建省厦门市召开“2011 全国抗菌药物临床新进展与规范应用研讨会暨高级学习班”。欢迎各级医院有关人员积极参加征文或报名参会。本活动为国家级继续教育项目[项目编号:2011-13-01-102,10 分]。

#### 1 会议时间及地点

报到日期:2011 年 12 月 8 日

会议日期:2011 年 12 月 9 日-13 日

会议地点:厦门金宝大酒店银楼(厦门东渡路 124 号)

电话:0592-6015300 总机转

#### 2 乘车路线

火车站:乘 43 路或 26 路公交车商检站下车即到;火车站乘出租车至酒店约 25 元;

飞机场:乘出租车约 22 元。

#### 3 征文内容及要求

征文内容:各类抗菌药物应用,临床各科微生物感染报告与治疗(包括细菌、真菌、结核杆菌、非结核分枝杆菌、支原体、衣原体、螺旋体、病毒等),抗菌药物不良反应,抗菌药物应用适应症与并发症,抗菌药物联合使用,抗菌药物合理应用,微生物耐药,微生物实验室的建设,微生物检测、质检、培养与药敏试验等内容。

论文可以是论著、经验总结、个案报道等形式。

征文要求:全文 2000 字论文一份,或只寄 600 字左右摘

要一份,论文题目下注明省市、工作单位、科室、姓名及邮编。自留底稿,恕不退回。

来稿请发至信箱:jxjy@vip.163.com,发稿时务必注明“厦门抗菌会议”字样。征文截止期:11 月 24 日前;收到征文经审录用后补发会议论文录用及大会交流通知。

本次会议还将从征文中选出 5~10 篇优秀论文在大会上专题发言,也可在报名时申请发言,一经采纳将减免一半会务费,欢迎积极参与,拟申请发言的代表在投稿时请注明联系电话及职称。请您尽早投稿,以便提前做出安排。

本次会议时间、地点已确定,经电话报名后,可按时前去报到,如需补发最后一轮通知请电话告知。

#### 4 联系方式

杨桂芳:010-51798200(带传真);51798255;88820399

梁 鸿:010-85158402

短信或 E-mail 报名:13611002300;jxjy@vip.163.com [请务必注明会议名称、会议地点、参会代表姓名、省(市)、工作单位及科室、电话及邮编]

注:本活动开展六年来已召开十八期,得到该领域知名专家和同仁的大力支持,在此表示衷心感谢。为进一步做好研讨,我们将充分发挥学会优势,加强专家队伍和课程设置,结合卫生部新的精神,传递目前我国抗菌药物研究与临床应用最新动向,努力提高医务工作者抗菌药物合理应用水平。研讨会将以专家讲学为主,代表交流相结合的形式进行,同时给予一定时间观摩学习。欢迎新老朋友光临与支持!

中华医学会继续教育部

2011 年 10 月