

常见妇科肿瘤患者血清中唾液酸化糖蛋白标志物的筛选分析

肖超强¹,裴丽丽¹,何 为²

摘要 建立一个用于血清中唾液酸化蛋白通量化分析的策略,首先去除血清中高丰度的白蛋白和 IgG 蛋白,然后用黑接骨木凝集素(SNA)选择性地富集血清中的唾液酸化糖蛋白,通过同位素标记相对与绝对定量技术(iTRAQ)并结合纳升级液相色谱和串联质谱技术对蛋白进行分离鉴定。并将其应用于常见妇科肿瘤标志物的研究,共鉴定到 169 个糖蛋白,与健康对照组相比,乳腺癌病例组共鉴定到 11 个差异表达蛋白,宫颈癌病例组共鉴定到 8 个差异表达蛋白,卵巢癌病例组共鉴定到 19 个差异蛋白。

关键词 定量蛋白质组学;唾液酸化糖蛋白;质谱;妇科肿瘤中图分类号 R 446.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1689-04

研究^[1-3]表明,蛋白质的糖基化修饰与肿瘤的发生和发展密切相关。在前期的研究^[4]中,利用凝集素芯片技术对乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌患者和健康对照者的血清样本进行了筛选分析,结果显示黑接骨木凝集素(sambucus nigra elderberry bark, SNA)对不同样本组呈现出较强的响应信号并在肿瘤组与健康对照组之间差异有统计学意义。为了寻找新的肿瘤诊断标志物,该研究拟对血清样本中的唾液酸化蛋白的表达水平进行定量研究,筛选并鉴定在各种肿瘤样本组中差异表达的唾液酸化糖蛋白,为妇科肿瘤诊断标志物的发现提供线索。

1 材料与方法

1.1 样本来源 123 例血清样本均由北京大学肿瘤医院检验科提供,病例均为明确的初诊病例,未经任何治疗。其中,乳腺癌组 31 例,年龄 30 ~ 65 (47 ± 5) 岁;宫颈癌组 24 例,年龄 30 ~ 73 (51 ± 5)

岁;卵巢癌组 19 例,年龄 28 ~ 73 (50 ± 5) 岁;健康对照组 49 例均来自同院的健康体检者,年龄 31 ~ 69 (50 ± 5) 岁。

1.2 试剂与仪器 ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit 购自德国 Merck 公司;HEPES 购自美国 Sigma 公司;Bradford 蛋白定量试剂盒、蛋白酶抑制剂混合物均购自北京康为世纪公司;乳糖购自德国美剂乐公司;离心超滤管(3 ku)购自美国 Millipore 公司;高效液相色谱仪(RIGOL 3220)购自北京普源精电公司;微型离心分离柱 Bio-Spin6 购自美国 Bio-Rad 公司;同位素标记相对与绝对定量技术(iTRAQ)试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司;其他试剂为国产的分析纯。

1.3 方法

1.3.1 血清样本高丰度蛋白的去除 将采集到的样本分别进行组内等体积混合,共得到 4 份混合血清,再分别从中取 40 μl 按 ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit 的说明操作,收集已去除白蛋白和 IgG 的滤过液 1 600 μl,用 3K 离心超滤管、置换缓冲液为 A (10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物, 0.1 mmol/L MnCl₂, 0.1 mmol/L CaCl₂, pH 7.2) 进行浓缩, -20 °C 保存备用。

1.3.2 SNA 凝集素亲和层析柱的制备及糖蛋白提取 将 1 ml 偶联有 SNA 凝集素的琼脂糖(美国 Vector Laboratories 公司)填充于微型离心分离柱,然后用 10 ml 缓冲液 A 平衡柱子;去除高丰度蛋白的血清蛋白溶液上样,于旋转摇床上室温孵育 10 min, 500 r/min 离心 2 min,缓冲液 A 洗涤 5 次,每次 1 ml,除去柱中的非特异吸附蛋白;加 1 ml 洗脱缓冲液(0.5 mol/L 乳糖, 0.2 mol/L 乙酸, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物)于旋转摇床室温孵育 3 min, 500 r/min 离心 2 min,收集滤过液,重复 3 次操作,合并滤过液;3K 离心超滤管浓缩,得到糖蛋白样品溶液,冻干后 -80 °C 保存、备用。

1.3.3 iTRAQ 标记及 HPLC 分离肽段 冻干的糖蛋白样品复溶后,用 Bradford 法进行蛋白定量,调整每组蛋白样品量为 100 μg,体积 20 μl;分别加入 1% SDS 1 μl 充分混悬溶解样品,加入还原试剂 2 μl,混匀,60 °C 反应 1 h;加入半胱氨酸封闭试剂 1

2014-06-27 接收

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(编号: 2012AA020203)

作者单位:¹安徽医科大学军事医学科学院放射与辐射研究所,合肥 230032

²蛋白质组学国家重点实验室,北京蛋白质组研究中心与军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 102206

作者简介:肖超强,男,硕士研究生;

何 为,男,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: he-wei1012@263.net

μL , 室温反应 10 min; 按照酶: 蛋白质 = 1 : 50 的比例加入胰蛋白酶, 37 °C 酶解过夜; 各管标记试剂中加入 70 μL 乙醇, 混匀后与相应标记试剂混合 (标记试剂: 114、115、116、117 分别标记健康对照组、乳腺癌组、宫颈癌组和卵巢癌组), 室温反应 1 h。用高 pH 值反相液相系统分离肽段, C18 色谱柱 (250 $\times$ 4.6 mm i. d., 填料颗粒直径 5 μm , Agela); 流动相 A: 2% ACN-98% H_2O (氨水调 pH 10.0); 流动相 B: 98% ACN-2% H_2O (氨水调 pH 10.0); 溶剂梯度: 5% ~ 8% B, 1 min; 8% ~ 32% B, 24 min; 32% ~ 95% B, 2 min; 95% ~ 5% B, 1 min; 柱温 45 °C; 流速: 0.7 ml/min; 检测波长: 214 nm。在 6% ~ 35% 有效梯度内, 每分钟收集一个组分, 共得到 24 个组分, 真空干燥。

1.3.4 蛋白的质谱鉴定与定量 取干燥的各组分样本, 用 A 液 (1.9% 乙腈, 98% 水, 0.1% 甲酸) 复溶后合并为 17 个样本, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清液进行分析; 使用纳升级电喷雾高效液相仪 (Eksigent) 联合 TripleTOF 5600 质谱仪 (AB SCIEX) 进行肽段的分离与质谱检测, 流动相为 A 液、B 液 (98% 乙腈、1.9% 水、0.1% 甲酸), 流速 330 nL/min, 梯度洗脱 (5% ~ 12% B, 5 min; 12% ~ 22% B, 16 min; 22% ~ 32% B, 10.5 min; 90% ~ 5% B, 4 min); 质谱数据采集时间 40 min, 喷雾电压 2.3 kV, 毛细管温度 23.92 °C, 碰撞能量 45 eV, 采集质量范围 350 ~ 1 250 Da。

1.4 统计学处理 使用 ProteinPilot 4.2 软件, Paragon 算法进行肽段的匹配、蛋白质的鉴定与定量, 以 114 为对照, 计算 115、116、117 与 114 的比值, 选取比值 ≥ 2 (上调) 或比值 ≤ 0.5 (下调)。

2 结果

共鉴定到 169 个蛋白, 经与健康对照组比较, 获得各病例组的血清差异表达蛋白情况如下: 乳腺癌组鉴定到 11 个差异表达蛋白, 其中 2 个上调、9 个下调, 见表 1; 宫颈癌组鉴定到 8 个差异表达蛋白, 其中 3 个上调、5 个下调, 见表 2; 卵巢癌组鉴定到 19 个差异蛋白, 其中 9 个上调、10 个下调, 见表 3。

3 讨论

iTRAQ 技术联合液相色谱串联质谱技术是近年来开发的一种新的差异蛋白质组学定量研究技术, 已在肿瘤等疾病的蛋白质组学研究以及差异表达蛋白质的鉴定、蛋白标志物的筛查方面得到使用^[5-8]。

表 1 乳腺癌组的血清差异表达蛋白

编号	蛋白质名称	iTRAQ 比值		P 值	蛋白质覆盖率 (%)
		115 : 114	115 : 114		
gi 73858564	corticosteroid-binding globulin precursor	2.937 6	0.005 2	26.7	
gi 50659080	alpha-1-antichymotrypsin precursor	2.333 5	0.001 4	38.8	
gi 115298678	complement C3 precursor	0.496 6	0.000 0	79.3	
gi 4557871	serotransferrin precursor	0.487 5	0.000 0	80.9	
gi 11321561	hemopexin precursor	0.478 6	0.000 2	74.7	
gi 324021745	vitamin D-binding protein isoform 3	0.457 1	0.000 0	53.4	
gi 67782358	complement factor B preproprotein	0.432 5	0.000 4	53.3	
gi 4501987	afamin precursor	0.346 7	0.000 2	47.9	
gi 29171717	phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D precursor	0.337 3	0.005 9	21.4	
gi 32130518	apolipoprotein C-II precursor	0.319 2	0.006 4	75.2	
gi 4507725	transferrin precursor	0.272 9	0.000 0	83.7	

表 2 宫颈癌组的血清差异表达蛋白

编号	蛋白质名称	iTRAQ 比值		P 值	蛋白质覆盖率 (%)
		116 : 114	116 : 114		
gi 16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	2.754 2	0.001 9	34.9	
gi 62739186	complement factor H isoform a precursor	2.167 7	0.000 1	36.1	
gi 4502511	complement component C9 precursor	2.089 3	0.000 4	31.1	
gi 195972866	keratin, type I cytoskeletal 10	0.492 0	0.007 6	35.4	
gi 4557871	serotransferrin precursor	0.440 6	0.001 9	80.9	
gi 66932947	alpha-2-macroglobulin precursor	0.383 7	0.000 0	76.2	
gi 4502027	serum albumin preproprotein	0.334 2	0.000 1	71.9	
gi 105990532	apolipoprotein B-100 precursor	0.302 0	0.000 0	44.8	

表 3 卵巢癌组的血清差异表达蛋白

编号	蛋白质名称	iTRAQ 比值		P 值	蛋白质覆盖率 (%)
		117 : 114	117 : 114		
gi 4557389	complement component C8 alpha chain	4.2855	0.0055	17.5	
gi 73858564	corticosteroid-binding globulin precursor	3.3729	0.0023	26.7	
gi 62739186	complement factor H isoform a precursor	2.4660	0.0000	36.1	
gi 50659080	alpha-1-antichymotrypsin precursor	2.4210	0.0002	38.8	
gi 4502511	complement component C9 precursor	2.2909	0.0003	31.1	
gi 4504893	kininogen-1 isoform 2 precursor	2.2080	0.0039	54.6	
gi 39725934	pigment epithelium-derived factor precursor	2.1677	0.0009	31.1	
gi 4501885	actin, cytoplasmic 1	2.1281	0.0091	45.3	
gi 4826762	haptoglobin isoform 1 preproprotein	2.0137	0.0020	87.2	
gi 4507725	transferrin precursor	0.4446	0.0016	83.7	
gi 4502261	antithrombin-III precursor	0.4365	0.0000	51.7	
gi 4557871	serotransferrin precursor	0.4325	0.0000	80.9	
gi 119395750	keratin, type II cytoskeletal 1	0.4169	0.0002	35.4	
gi 66932947	alpha-2-macroglobulin precursor	0.3767	0.0000	76.2	
gi 4557321	apolipoprotein A-I preproprotein	0.3733	0.0000	90.3	
gi 71773110	apolipoprotein A-IV precursor	0.3698	0.0000	80.0	
gi 195972866	keratin, type I cytoskeletal 10	0.3698	0.0009	35.4	
gi 4501987	afamin precursor	0.3631	0.0009	47.9	
gi 47132620	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.3436	0.0002	46.3	

开展血清蛋白质组学研究面临的一个首要问题是血清蛋白浓度分布的动态范围大, 一些高丰度蛋

白的存在严重地干扰了对低丰度蛋白的质谱鉴定与定量检测。为了尽可能多地保留血清蛋白的糖信息,本研究只是去除了血清中的白蛋白(非糖基化蛋白)、IgG(糖基化蛋白)两种高丰度蛋白。

所鉴定到的差异表达蛋白中,部分已有研究报告与肿瘤相关。Zeng et al^[1]对乳腺癌和健康对照血清样本的糖蛋白质组进行了检测分析,发现 α -1-B-glycoprotein、complement C3、 α -1-antitrypsin 和 transferrin 等蛋白为潜在的乳腺癌标志物,本研究显示 complement C3 和 transferrin 在乳腺癌血清中的表达显著下调。文献^[8]报道,在晚期宫颈癌患者血清中 apolipoprotein C-II 的表达水平是下调的,而在本研究中的结果是表达无差异的,其可能的原因是所研究样本的疾病进程不同;Apolipoprotein C-II 在乳腺癌血清中的表达水平是下调的。在卵巢癌血清样本中,表达下调的唾液酸化蛋白有:afamin^[9]、apolipoprotein A-IV^[9-10]、transthyretin^[11]、transferrin^[11]、apolipoprotein A-I^[11]、complement factor H^[12],表达上调的有:haptoglobin β -chain 和 α 1-antichymotrypsin^[8],本研究结果与之完全一致,表明本研究结果的真实可靠,也说明所建立起的唾液酸化糖蛋白的差异表达筛选与鉴定方法是一种有效的发现与肿瘤相关的血清糖蛋白标志物的研究策略。

但是,也有文献^[13]报道 PEDF 在许多肿瘤中的表达水平都是下降的,并与肿瘤的发生有着相关性,在卵巢癌组织中 PEDF 的表达也常常下降,而本研究在卵巢癌血清中测得的 PEDF 表达水平是上调的,表明 PEDF 可能在肿瘤组织和血清中的表达分布不同,这有待进一步研究确认。

研究^[14]表明唾液酸在细胞间识别、黏附,在炎症反应和肿瘤细胞转移中起着重要作用,与疾病及肿瘤的发生发展都有着密切的关联。本研究通过对乳腺癌、宫颈癌和卵巢癌病例组样本中的差异表达唾液酸化蛋白的比较分析显示:只有 transferrin 在3种病例组中的表达水平均为显著下调;在乳腺癌和卵巢癌病例组中,corticosteroid-binding globulin 和 α -1-antichymotrypsin 的表达水平均上调,afamin 和 transthyretin 的表达水平均下调;在宫颈癌和卵巢癌病例组中,complement factor H isoform 和 complement component C9 的表达水平均上调,keratin type I cytoskeletal 10 和 α -2-macroglobulin 的表达水平均下调。这表明乳腺癌、宫颈癌和卵巢癌3种疾病的血清中唾液酸化蛋白的表达水平方面既有共性,又

存在差异,为进一步探讨肿瘤的发生机制以及筛选具有肿瘤特异性的标志物提供了线索。

参考文献

- [1] Zhao J, Simeone D M, Heidt D, et al. Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: application to pancreatic cancer serum [J]. J Proteome Res, 2006, 5(7):1792-802.
- [2] Saldo R, Wormald M R, Dwek R A, et al. Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis [J]. Dis Markers, 2008, 25(4-5):219-32.
- [3] Kim H J, Kim S C, Ju W, et al. Aberrant sialylation and fucosylation of intracellular proteins in cervical tissue are critical markers of cervical carcinogenesis [J]. Oncol Rep, 2014, 31(3):1417-22.
- [4] 裴丽丽,肖超强,何 为.凝集素芯片技术在常见妇科肿瘤诊断中的应用 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(11):1348-51.
- [5] Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R, et al. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis [J]. J Proteome Res, 2009, 8(1):362-73.
- [6] Boylan K L, Andersen J D, Anderson L B, et al. Quantitative proteomic analysis by iTRAQ for the identification of candidate biomarkers in ovarian cancer serum [J]. Proteome Sci, 2010, 8:31.
- [7] Zeng Z, Hincapie M, Haab B B. The development of an integrated platform to identify breast cancer glycoproteome changes in human serum [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(19):3307-15.
- [8] Harima Y, Ikeda K, Utsunomiya K, et al. Apolipoprotein C-II is a potential serum biomarker as a prognostic factor of locally advanced cervical cancer [J]. Int J Radiation Oncol Biol Phys, 2013, 87(5):1155-61.
- [9] Dieplinger H, Ankerst D P, Burges A, et al. Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(4):1127-33.
- [10] 李 莉,唐 杰,于春霞,等.基于 iTRAQ 标记结合 2D nano HPLC-ESI-OrbiTrap MS/MS 技术筛选卵巢癌血清标记物 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(24):2075-9.
- [11] Nguyen L, Cardenas - Goicoechea S J, Gordon P, et al. Biomarkers for early detection of ovarian cancer [J]. Womens Health (Lond Engl), 2013, 9(2):171-85.
- [12] Wu J, Xie X, Nie S, et al. Altered expression of sialylated glycoproteins in ovarian cancer sera using lectin-based ELISA assay and quantitative glycoproteomics analysis [J]. J Proteome Res, 2013, 12(7):3342-52.
- [13] 向江东,周莉娜,席晓薇. PEDF 在肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(4):812-5.
- [14] Nie H, Li Y, Sun X L. Recent advances in sialic acid focused glycomics [J]. J Proteomics, 2012, 75(11):3098-112.

Discovery and identification of serum sialylated glycoproteins biomarkers for common gynecological tumors

Xiao Chaoqiang¹, Pei Lili¹, He Wei²

(¹*Institute of Radiation Medicine of the Academy of Military Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206*)

Abstract A strategy was developed for identifying sialylated glycoprotein in human serum. Two highly abundant proteins of albumin and IgG were removed from the serum, then sialylated glycoproteins were enriched using SNA lectin affinity column. The differentially expressed sialylated glycoproteins were analyzed based on the quantitative proteomics methods incorporated iTRAQ stable isotope labeling, liquid chromatography, nanoelectrospray ionization and high resolution tandem mass spectrometry. And this strategy was successfully applied to the discovery of novel biomarkers for common gynecological tumors diagnosis, 169 serum sialylated glycoproteins were identified, a quantitative comparison analysis with healthy control revealed that 11 proteins were in breast tumor, 8 proteins were in cervical tumor and 19 proteins were in ovarian tumor.

Key words quantitative proteomics; sialylated glycoprotein; mass spectrometry; gynecological tumors

(上接第 1661 页)

[2] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging [J]. *Cell*, 2005, 120(4):483–95.

[3] Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 77:21–49.

The analysis of the clinical outcome and ultrastructure of the oocytes with ovarian high response

Xu Huili, Xu Bo, Shi Wei, et al

(*Center for Reproductive Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001*)

Abstract Objective To investigate the effects of high ovarian response on oocyte quality, embryo quality and pregnancy outcome in controlled ovarian hyperstimulation cycles. **Methods** A retrospective study was designed covering 326 infertile patients with male and (or) tubal factor who were admitted first *in vitro* fertilization and embryo transfer / intracytoplasmic sperm injection (IVF-ET/ICSI) treatment from January 2011 to December 2012. The oocyte and embryo parameters and pregnancy outcome were compared between high responder group (peak $E_2 > 3\,000$ pg/ml on the day of HCG administration or the number of oocytes retrieved > 15 , $n = 146$) and normal responder group (500 pg/ml $\leq$ peak $E_2 \leq 3\,000$ pg/ml on the day of HCG administration or $5 \leq$ the number of oocytes retrieved ≤ 15 , $n = 180$). The ultrastructures of oocytes between two groups were observed using transmission electron microscope, including zona pellucida, perivitelline space, oocyte organelles. **Results** The numbers of oocytes, good-quality embryos, the cycle cancellation rate in high responder group were significantly higher than those of normal responder group ($P < 0.05$), but the MII oocytes rate, fertilization rate, high-grade embryo rate, implantation rate and clinical pregnancy rate were significantly lower than those of normal responder group ($P < 0.05$). There were no statistical differences in cleavage rate, miscarriage rates, the incidence of moderate and severe ovarian hyperstimulation between two groups ($P > 0.05$). The ultrastructure showed that abnormal mitochondria increased significantly in the high responder group. **Conclusion** The high ovarian response can affect the oocytes quality and embryo development potentiality, ultimately reduce the pregnancy outcome.

Key words high ovarian response; oocytes; embryo development; pregnancy outcome; TEM; mitochondria