

应用 MALDI-TOF-MS 技术分析转移和非转移黑色素瘤患者外周血清蛋白的差异表达

王耀聪, 刘林嶠

(郑州大学第一附属医院整形外科, 郑州 450052)

【摘要】目的:应用蛋白质组学技术分析转移性和非转移性黑色素瘤患者外周血清中差异表达的蛋白质,初步探讨其对转移性黑色素瘤患者的诊断及治疗指导意义。**方法:**共收集 101 例患者外周血清,包括 25 例转移性黑色素瘤患者及 76 例对照组(31 例非转移性患者和 45 例健康者)。从中随机抽取 73 例(18 例转移患者,20 例非转移患者和 35 例健康者)用于建立区分模型,其余 28 例(7 例转移患者,11 例非转移患者和 10 例健康者)用来对区分模型进行盲法验证。运用基质辅助激光解离飞行时间质谱技术,对外周血清蛋白质进行检测,应用 Ciphergen 蛋白质芯片软件对蛋白质谱进行分析。**结果:**黑色素瘤转移患者外周血清与对照组外周血清蛋白质谱相比,质荷比为 2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 m/z 和 9 598.82 m/z,共 6 个蛋白质峰呈表达有明显差异(P 均=0.000),以此构建出转移性黑色素瘤的诊断模型,它的诊断敏感性为 83.33%,特异性为 74.55%。另外对该模型进行了盲法验证,其诊断转移性黑色素瘤的敏感性为 71.43%,特异性为 76.19%。**结论:**黑色素瘤转移患者外周血清蛋白质表达谱与对照组相比有明显变化,相对分子质量为 2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 m/z 和 9 598.82 m/z 的蛋白质点可以作为黑色素瘤转移患者诊断的潜在生物学标志物。

【关键词】转移性黑色素瘤肿瘤标志物;蛋白质组学;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)

【中国图书分类法分类号】R739.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-07

Differential expressions of peripheral serum protein in patients with metastatic and non-metastatic melanoma analyzed by MALDI-TOF-MS

WANG Yaocong, LIU Linbo

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To analyze the differential expressions of peripheral serum protein in patients with metastatic and non-metastatic melanoma by proteomic technology and to explore its clinical significance in the treatment of patients with metastatic melanoma. **Methods:** Totally 101 patients were selected and divided into metastatic melanoma group ($n=25$) and control group ($n=76$, 31 cases of non-metastatic melanoma and 45 healthy cases). Seventy-three cases (18 cases of metastatic melanoma, 20 cases of non-metastatic melanoma and 35 healthy cases) were randomly extracted as diagnostic model group, the rest 28 cases (7 cases of metastatic melanoma, 11 cases of non-metastatic melanoma and 10 healthy cases) were used to verify for model group by blind tests. Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was applied to test peripheral serum protein. Ciphergen protein chips were used to analyze protein profiling. **Results:** Mass-to-charge ratios of peripheral serum of patients with metastatic melanoma against that of control group were 2 598.33, 3 646.79, 4 605.48, 8 603.10, 7 756.64 m/z and 9 598.82 m/z. Differences in expressions of six protein peaks were statistically significant (all $P=0.000$). Diagnostic model of metastatic melanoma was built according to the statics above. Sensitivity of diagnostic model group was 83.33% and specificity was 74.55%. In addition, validation groups were used for this model by blind tests. Sensitivity of metastatic melanoma was 71.43% and specificity was 74.55% based on the model. **Conclusions:** There are significant changes in expression profile of peripheral serum protein between patients with metastatic melanoma and controls; proteins with relative molecular mass of 1 528.33, 2 046.79, 3 685.48, 4 392.10, 5 756.64 m/z and 11 670.82 m/z can be used as biological markers in the treatment of early metastatic melanoma.

【Key words】metastatic melanoma tumor marker; proteomics; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

作者介绍:王耀聪, Email: wangyaocong66@163.com,

研究方向: 体表肿瘤。

通信作者:刘林嶠, Email: liulinbobo@163.com。

恶性黑色素瘤是一种容易发生转移、恶性程度极高的肿瘤,死亡率位居皮肤恶性肿瘤之首^[1]。该病在我国的发病率有明显上升趋势,年增长率约 3%~5%^[2]。目前,对黑色素瘤最有效的治疗手段是早期诊断并进行外科手术,然而肿瘤一旦发生转移对现在的治疗手段常不敏感,总体中位生存期仅为 6~9 个月,5 年生存率降至 5.5%^[3-4]。因此,深入研究恶性黑色素瘤早期诊断技术,对于提高患者生存率有重要意义。

许多疾病在出现临床表现甚至是病理变化之前,细胞内的某些蛋白质在成分和数量上就已经产生了相应的变化,并可以通过血清中蛋白质的水平反映出来。因此,比较不同疾病人群血清中差异蛋白质的表达对于临床上疾病的早期诊断、药物靶标寻找、治疗监测、细胞调控分子的鉴别有着极大的实际意义。

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)是近年来发展起来的一种蛋白质组学研究技术。可在短时间内利用 0.5~400.0 μl 样本得到 fmol(10^{-15} mol)数量级的质荷比在 500~500 000 m/z 的蛋白质肽质量指纹图谱,具有所需标本量少、高通量、高敏感性、快速检测等特点,已成为目前检测和鉴定多肽、蛋白质、多糖、核苷酸、糖蛋白、高聚物以及多种合成聚合物的强有力工具^[5-6]。该技术适用于混合物及生物大分子的测定,通过质谱仪检测蛋白质样品,经过计算机软件分析,取得蛋白质的一级结构信息,筛选建立模型,辅助寻找目标蛋白^[7-9]。MALDI-TOF-MS 具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点,已成为新抗肿瘤目标蛋白检测的重要实验技术^[10-11]。

本研究通过 MALDI-TOF-MS 技术,分析转移和非转移黑色素瘤患者以及健康者外周血清蛋白的表达谱,并找出相关的差异蛋白,为转移性黑色素瘤的诊断和治疗提供有意义的潜在标志物和靶向蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2009 年 3 月至 2012 年 6 月间在郑州大学第一附属医院确诊为皮肤恶性黑色素瘤的患者 56 例,包括转移性

黑色素瘤患者 25 名(肺转移 9 例,脑转移 6 例,肝转移 6 例,骨转移 4 例)和非转移性黑色素瘤患者 31 名。另外选取在体检中心年龄性别匹配的健康者 45 名,年龄 43~78 岁,平均年龄 56.4 岁。从以上样本中采用抽签法随机选取 73 例(18 例转移患者,20 例非转移患者和 35 例健康者)用于建立区分模型,其余 28 例(7 例转移患者,11 例非转移患者和 10 例健康者)用来对模型进行盲法验证。

乙腈(色谱级)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、尿素、 H_2O (色谱级)、Tris 碱、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)、二巯基苏糖醇(DTT)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -CCA)购自 Sigma 公司。WCX 磁珠购自北京赛尔迪生物技术有限公司。蛋白质芯片阅读机构自美国 Ciphergen 公司。

1.2 标本的采集

清晨空腹采集患者全血 5 ml,置于真空负压管中,不加抗凝剂,室温静置 1 h, $2\,000 \times g$ 离心 20 min,取上清。分装为 50 μl /管, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 样本的制备

从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱取出血清,置于冰上溶解。10 000 r/min 离心 20 min。取上清 10 μl 与 20 μl 的 U9 缓冲液(9 mol/L 尿素, 20 g/L CHAPS, 10 g/L DTT, 50 mmol Tris-HCl, pH 9.0)混合。4 $^\circ\text{C}$ 振荡孵育 30 min 后加入 370 μl 醋酸钠缓冲液(100 mmol/L 醋酸钠, pH 4.5)。

1.4 WCX 磁珠的活化

分取 WCX 纳米磁珠混悬液 50 μl ,用 100 μl 醋酸钠缓冲液洗涤磁珠 2 次, 5 min/次。

1.5 WCX 磁珠捕获血清蛋白质

向活化的磁珠中加入 100 μl 处理好的血清样品,振荡孵育 1 h。置于磁性分离板上 2 min,弃上清液。加入 100 μl 醋酸钠缓冲液洗涤 2 次, 5 min/次。用 10 μl 0.5%(v/v)的 TFA 洗脱磁珠 5 min。取 5 μl 洗脱液与等量的 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液(含饱和的 α -CCA, 50%乙腈, 0.5%TFA)充分混合,吸取 2 μl 混合物点样于 600 nm Anchorchip 上,室温下自然干燥。

1.6 获取蛋白质图谱

对芯片进行阅读前先对仪器进行校正,系统偏差保持在 0.1%以内。机器阅读时参数设置如下:激光强度 195,检测灵敏度 9 fmol 蛋白质,选取质荷比(m/z)在 2 000 到 20 000 之间的蛋白峰进行分析,在此范围内蛋白受干扰最少。

1.7 统计学方法

采用 Ciphergen 3.0.2 版本的分析软件自动采集数据,采用 Biomarker Wizard 软件分析所有患者外周血清蛋白质谱,其蛋白峰值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。软件自动进行单因素方差分析比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。应用 Biomarker Pattern 软件建立诊断模型。

2 结 果

2.1 转移组与对照组差异蛋白峰的筛选

对建模组的 73 例样本的蛋白质谱分析显示,共有 123 个有差异的蛋白质峰,其中有 6 个蛋白峰(图 1),2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 和 9 598.82 m/z, 其质谱信号强度差异有统计学意义(P 均=0.000)(表 1)。通过这 6 个蛋白峰结点建立了诊断模型(图 2);在结点 1,如果 m/z 2 528.33 $\leq$ 8.388 7,向右分流至结点 6;反之,如果 m/z 2 528.33 $>$ 8.388 7,则向左分流至结点 2;在结点 6,如果 m/z 7 756.64 $\leq$ 14.538 5,向右分流至终结点 7,该结点判为健康者;

反之, m/z 7 756.64 $>$ 14.538 5,则向左分流至终结点 6,该结点判为非转移患者;以此类推,满足结点所设条件的向右分流,与条件相反的向左分流。最终,终结点 1 和 5 归类于转移者;2 和 6 归类于非转移者;3、4 和 7 归类于健康者。对于模型组,该模型可以准确地诊断出 15 名转移患者,其灵敏度为 83.33%,特异度为 74.55%。

2.2 盲法验证

对 28 例验证组群(7 例转移患者,11 例非转移患者和10 例健康者)的蛋白质图谱进行分析,并用盲法验证区分模型的准确性。该模型可以准确地判断出 5 名转移患者,同时判断出 9 例非转移患者和 7 例健康者,判断黑色素瘤转移患者的灵敏性达 71.43%,特异性达 76.19%。见表 2。

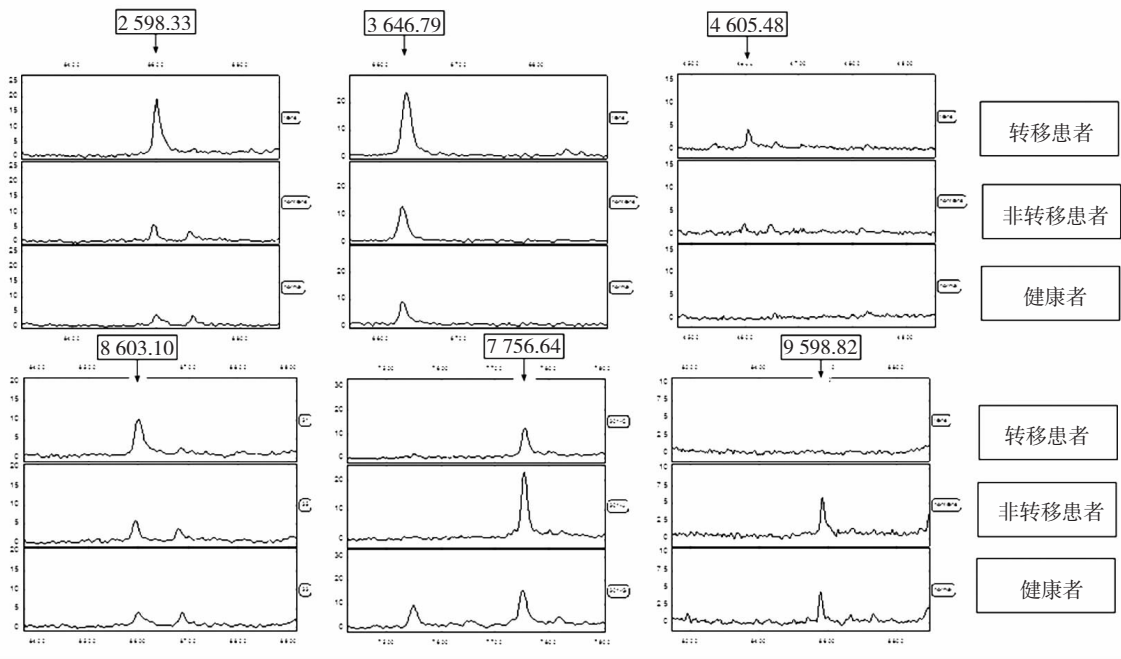


图 1 黑色素瘤转移患者、非转移患者和健康者血清中的差异蛋白峰
(2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 m/z 和 9 598.82 m/z)

Fig.1 Different serum protein peaks among patients with metastatic melanoma,non-metastatic melanoma and health people
(2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 m/zand 9 598.82 m/z)

表 1 6 个差异蛋白峰在 3 组患者之间的表达及方差分析

Tab.1 Expressions of six differential protein peaks among three groups and ANOVA analysis

组别	2 598.33 m/z	3 646.79 m/z	4 605.48 m/z	8 603.10 m/z	7 756.64 m/z	9 598.82 m/z
转移患组	10.29 ± 4.37	15.98 ± 7.23	2.59 ± 1.85	7.73 ± 3.56	10.93 ± 4.85	1.27 ± 0.42
非转移患组	3.18 ± 2.83	13.48 ± 6.62	2.08 ± 0.90	4.21 ± 2.93	19.39 ± 6.47	4.39 ± 1.01
健康组	4.07 ± 3.12	11.90 ± 4.32	1.16 ± 0.37	3.84 ± 2.76	15.98 ± 4.92	3.68 ± 1.72
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 使用模型盲法判断验证组群的结果

Tab.2 Results of groups validated by bind test

组别	总计	判为转移组 (n)	判为非转移组 (n)	判为健康组 (n)	准确率 (%)
转移组	7	5	2	0	71.43
非转移组	11	1	9	1	81.82
健康组	10	1	2	7	70.00

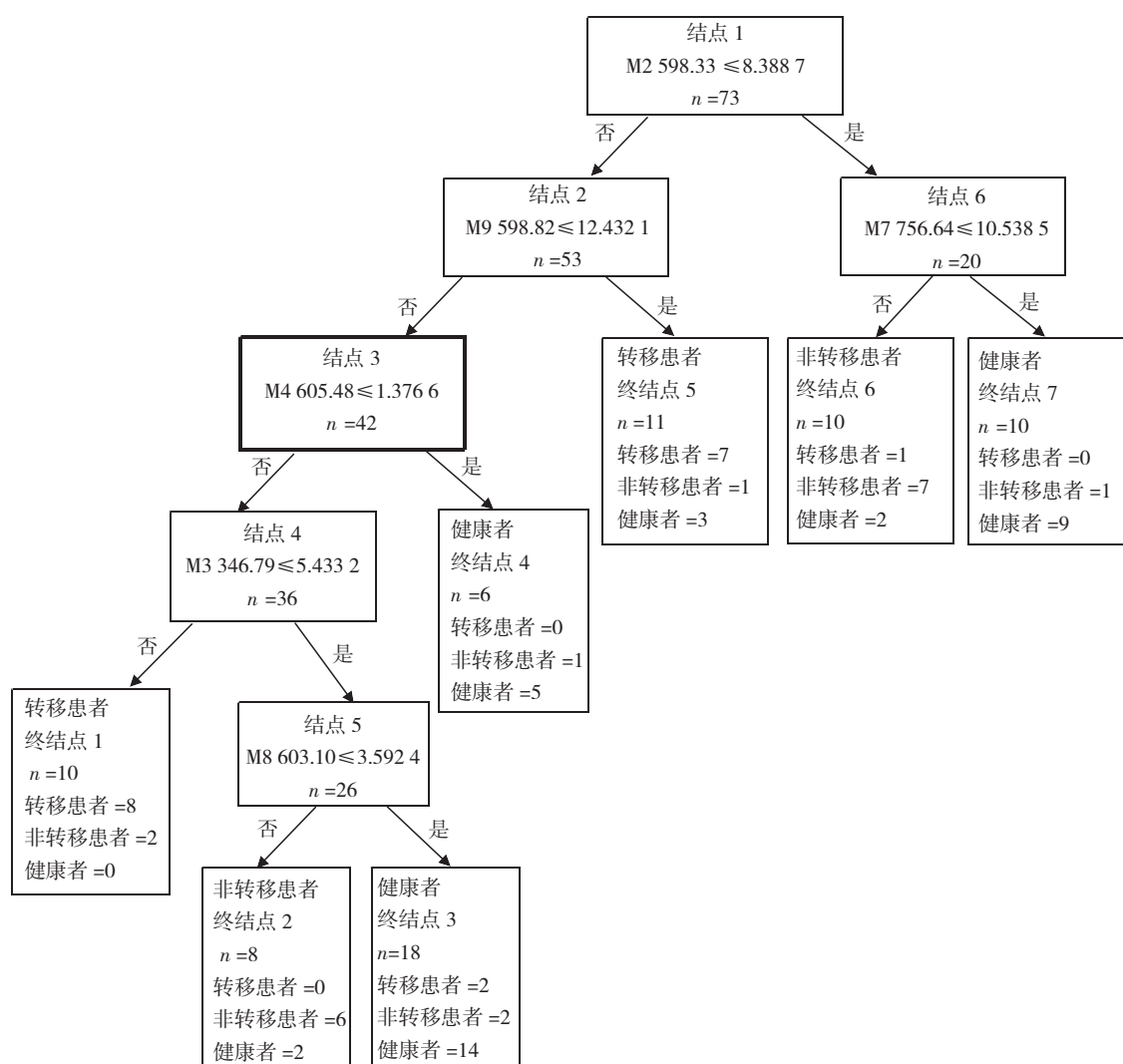


图 2 由 6 个差异蛋白峰建立的黑色素瘤转移区分模型

Fig.2 Metastatic melanoma diagnostic model established by six different protein peaks

3 讨论

恶性黑色素瘤是目前研究进展最快、预后最为不良的恶性肿瘤之一,目前对于转移性黑色素瘤还没有有效的预防治疗方法。进展期黑色素瘤患者平均生存期仅6~9个月,这种预后不良性主要是由于它较高的远处转移发生率及侵袭、转移能力,导致其对常规治疗的手段如化疗、放疗及免疫治疗等敏感性较低。因此,恶性黑色素瘤的早期诊断显得至关重要,尤其对于具有潜在转移能力的恶性肿瘤。

由于肿瘤发生的早期即可引起蛋白质表达的变化,而肿瘤的发展、局部浸润及转移过程中都可能会有蛋白质表达的变化。近年来,国内外在血清蛋白组学方面的研究日益受到关注。本实验通过筛选与肿瘤相关的正常人血清所没有的病理性蛋白或正常人血清含量甚微的功能性蛋白,可将其作为

诊断性肿瘤标志物,用于肿瘤的诊断和筛查。纳米磁珠结合MALDI-TOF-MS技术是目前研究蛋白质组学的新方法^[12-14]。这一技术通过筛选患者的血液、组织提取液、尿液、乳管流出液等多种体液中的标志蛋白,已经广泛应用于乳腺癌^[15]、卵巢癌^[16]、前列腺癌^[17]、肾癌^[18]、膀胱癌^[19-20]、胰腺癌^[21]、结直肠癌^[22-23]等肿瘤疾病的研究中。

本研究采用纳米磁珠结合MALDI-TOF-MS技术检测黑色素瘤转移患者与对照组外周血清中蛋白质的差异表达,建立了由2 598.33、3 646.79、4 605.48、8 603.10、7 756.64 m/z和9 598.82 m/z,6种蛋白峰组成的区分模型。该模型对转移性黑色素瘤的敏感性为83.33%,特异性为74.55%。扩大样本对该模型进行盲法验证,其诊断转移性黑色素瘤的敏感性为71.43%,特异性为76.19%。说明该模型具有很好的准确性和重复性。本研究所收集的黑色素

瘤未转移病人处于 I B~III A 的中危和高危组,而转移病人都是临床分期在 III B~IV 之间的区域淋巴结转移和移行转移组。由于患者处于肿瘤发展的不同阶段,这些差异表达的蛋白可能在疾病的发展演化过程中起到重要的作用。它们有可能是肿瘤细胞表面脱落的膜受体/配基,或者机体对肿瘤反应所产生的细胞或体液免疫因子。对这些差异蛋白的深入研究可能为寻找药物治疗靶点提供线索,甚至发现新的生物学治疗方法。

本实验也存在一些相对不足之处。如分析的蛋白峰质荷比在 2 000~20 000 之间,可能会遗漏了此范围之外的某些有意义的蛋白质。另外,蛋白质指纹图谱中的蛋白峰只是蛋白质/多肽的片段,若要确证致病蛋白质,还需要进一步的鉴定。

综上所述,本研究所发现的 6 个蛋白峰,可能成为转移性黑色素瘤新的分子生物学标志。对这些蛋白进行追踪和研究,也有助于更深入地了解肿瘤发展,局部浸润及远处转移的机理。

参 考 文 献

- [1] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy[J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 851-857.
- [2] 郭 军. 黑色素瘤治疗现状与进展[C]//中国临床肿瘤学教育专刊(2007). 2007; 541-548.
- [3] Guo J. Melanoma treatment status and progress[C]//China's Clinical Oncology Education Album(2007). 2007; 541-548.
- [4] Keller G, Schally A V, Nagy A, et al. Effective therapy of experimental human malignant melanomas with a targeted cytotoxic somatostatin analogue without induction of multi-drug resistance proteins[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(6): 1507-1513.
- [5] Sarnaik A A, Weber J S. Recent advances using anti-CTLA-4 for the treatment of melanoma[J]. *Cancer J*, 2009, 15(3): 169-173.
- [6] Fehm T, Beck V, Banys M, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw(ONJ): incidence and risk factors in patients with breast cancer and gynecological malignancies[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(3): 605-609.
- [7] 王 娜, 温新宇, 王 杰. 乳腺癌血清多肽图研究[J]. *科学通报*, 2009, 54(1): 121.
- [8] Wang N, Wen X Y, Wang J. Breast cancer serum peptides figure study[J]. *Journal of the Chinese science bulletin*, 2009, 54(1): 121.
- [9] Stuhler K, Meyer H E. MALDI: more than peptide mass fingerprints[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6(3): 239-248.
- [10] Conrads T P, Hood B L, Issaq H J, et al. Proteomic patterns as a diagnostic tool for early-stage cancer: a review of its progress to a clinically relevant tool[J]. *Mol Diagn*, 2004, 8(2): 77-85.
- [11] Issaq H J, Veenstra T D, Conrads T P, et al. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(3): 587-592.
- [12] Baumann S, Ceglarek U, Fiedler G M, et al. Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(6): 973-980.
- [13] Hamler R L, Zhu K, Buchanan N S, et al. A two-dimensional liquid-phase separation method coupled with mass spectrometry for proteomic studies of breast cancer and biomarker identification[J]. *Proteomics*, 2004, 4(3): 562-577.
- [14] Mathelin C, Cromer A, Wendling C, et al. Serum biomarkers for detection of breast cancers: a prospective study[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 96(1): 83-90.
- [15] Villanueva J, Philip J, Entenberg D, et al. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(6): 1560-1570.
- [16] Cho W C, Cheng C H. Oncoproteomics: current trends and future perspectives[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(3): 401-410.
- [17] Mazouni C, Baggerly K, Hawke D, et al. Evaluation of changes in serum protein profiles during neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer using an LC-MALDI-TOF/MS procedure[J]. *Proteomics*, 2010, 10(19): 3525-3532.
- [18] Petricoin E F, Ardekani A M, Hitt B A, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2002, 359(9306): 572-577.
- [19] Adam B L, Qu Y, Davis J W, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13): 3609-3614.
- [20] Won Y, Song H J, Kang T W, et al. Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons[J]. *Proteomics*, 2003, 3(12): 2310-2316.
- [21] Zhang Y F, Wu D L, Guan M, et al. Tree analysis of mass spectral urine profiles discriminates transitional cell carcinoma of the bladder from noncancer patient[J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(9): 772-779.
- [22] Bryan R T, Wei W, Shimwell N J, et al. Assessment of high-throughput high-resolution MALDI-TOF-MS of urinary peptides for the detection of muscle-invasive bladder cancer[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2011, 5(9-10): 493-503.
- [23] Padoan A, Seraglia R, Basso D, et al. Usefulness of MALDI-TOF/MS identification of low-MW fragments in sera for the differential diagnosis of pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012. doi: 10.1097/MPA.0b013e318273096c[Epub ahead of time].
- [24] Peng Y, Li X, Wu M, et al. New prognosis biomarkers identified by dynamic proteomic analysis of colorectal cancer[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(11): 3077-3088.
- [25] Xing J D, Zhang L H, Li J J, et al. Application of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry in detecting K-ras gene mutation of colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2013, 16(1): 80-83.

(责任编辑: 冉明会)