

利用两种蛋白质组学工作流程鉴定和定量直肠癌潜在的生物标记物

Helena Nordvang, Johan Axelman, Jesper Hedberg, Ola Rönn, Rita Marouga, Henrik Wadensten, Daniel Haid
GE Healthcare Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden.

前言

本工作采用了两条途径对同一病人的正常组织和肿瘤组织的蛋白表达水平进行定量差异分析,该病人已被诊断为早期结肠直肠癌(T1/T2)。一条途径是采用 Ettan™ DIGE™ 系统(双向荧光差异凝胶电泳)并用 MALDI-ToF 做后续鉴定;另一条途径是基于 Ettan MDLC 多维液相色谱系统,连接 Finnigan™ LTQ 离子阱质谱,并采用无需预先标记的定量分析软件 DeCyder™ MS 进行差异分析。

研究背景简要介绍:直肠癌和结肠癌常被看作同一类型肿瘤,因此结肠直肠癌覆盖了从良性到恶性转移等多种亚型。不同亚型肿瘤的背后必定有着不同的分子机制。本研究采用两种并行的蛋白质组工作流程对中度分化腺癌进行分析,以期找到潜在的生物标记,使得我们能够对这些肿瘤进行预测、诊断和治疗。

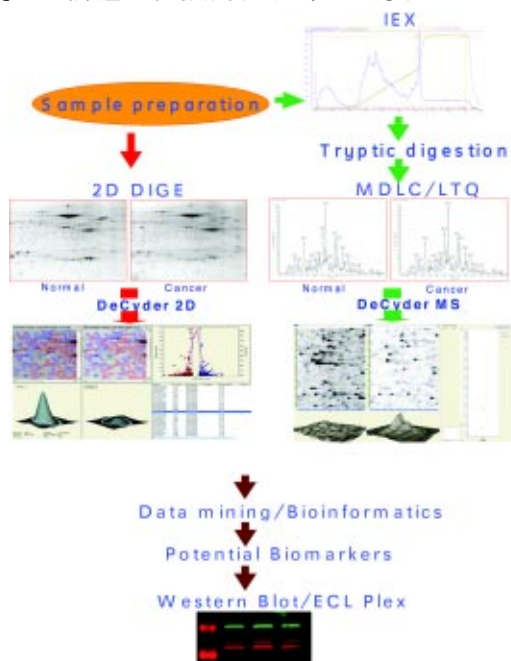


图 1. 实验流程简图

方法

来源于5名年龄在57-72岁的白种病人的约150 mg 冷冻结肠组织(癌组织和正常邻近组织)采用 Ettan 样品研磨试剂盒裂解于 2M 硫脲, 7M 尿素和 30mM pH8.5 的 Tris 缓冲液中。对于 Ettan DIGE 系统, 经过 CyDye™

DIGE 染料预先标记后, 蛋白样品采用 pH 3-7 和 pH 7-11NL 两种胶条用双向电泳分离。经过 Typhoon™ 9410 多功能激光扫描成像系统扫描成像, 并采用 DeCyder™ 2D V6.5 差异分析软件进行自动化图像分析, 得到的差异点采用 Ettan 全自动斑点处理工作站自动进行挖点、酶解和点靶, 最后采用 Ettan MALDI-ToF-Pro 进行质谱分析。通过内建的 Profound™ 搜索引擎对蛋白进行鉴定。鉴定后的蛋白采用 DeCyder EDA 扩展数据分析软件进行了进一步的分析。对于 MDLC/DeCyder MS 系统, 蛋白抽提物通过在 Ettan LC 系统上进行强阳离子交换预分离, 每个组分经胰蛋白酶消化后, 在连接有 Finnigan™ LTQ 线性离子阱质谱的 Ettan MDLC 系统进行分析。采用 TurboSEQUEST® 搜索引擎对蛋白进行鉴定然后采用最新的 DeCyder MS 全自动差异分析软件进行差异表达分析。

结果

Ettan DIGE 系统——双向荧光差异凝胶电泳

在 2 个 pH 范围中, 找到了 65 个 p 值小于 0.01 的有表达差异的蛋白点, 在 30 个被鉴定出来的蛋白点中有 15 个蛋白是之前在不同肿瘤类型中有报道的。通过 DeCyder 2D EDA 可将这些蛋白分成 3 组: 1. 结构蛋白; 2. 信号传导蛋白; 3. 核酸结合蛋白(图 3A)。在 DeCyder 2D EDA 中初步分析发现, 从肿瘤组织样品得到的点图(Spot Maps)比正常组织有更大的差异, 说明这 5 个病人的肿瘤样本可能有不同的分子分型(图 3B)。

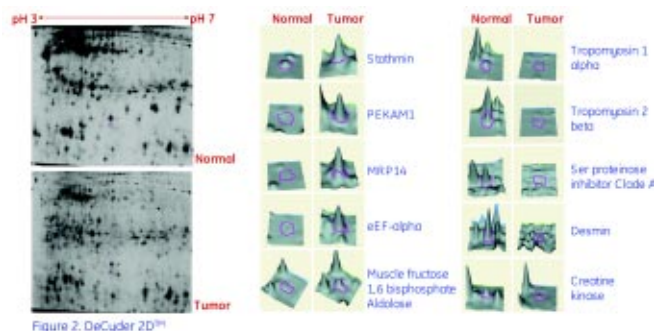


图 2. 采用 DeCyder 2D™ BVA 生物学差异分析软件对正常组织(上)和肿瘤组织(下)的分析结果。左侧为从 pH 3-7 的凝胶图像, 右侧为差异表达蛋白的三维结果显示

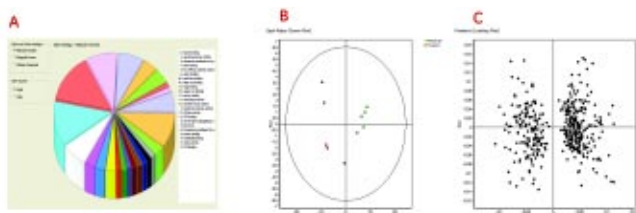


图 3. 采用 DeCyder 2D™ EDA 扩展数据分析软件对正常组织和肿瘤组织的分析结果。饼状图 A 显示差异表达蛋白生物学功能的基因分布。分布图 B 显示肿瘤组织（红色）和正常组织（绿色）的点图的 PCA（主成分分析，Principal Component Analysis）分析结果

Protein	p-value independent	p-value paired	Regulation In tumor
Desmin	0.0000038	0.0000053	↓
Tropomyosin 1 alpha	0.0000045	0.000207	↓
Tropomyosin 2 beta	0.000011	0.00335	↓
Creatine kinase	0.000012	0.000909	↓
Calponin	0.000047	N.D	↓
Glutathione S-transferase	0.000081	0.00334	↑

Protein	p-value independent	p-value paired	Regulation
Stathmin	0.00024	0.00189	↑
Ser or Cys proteinase inhibitor Clade A	0.00077	0.00503	↓
eEF alpha	0.00084	0.00381	↑
ACTB (actin beta)	0.00087	0.00376	↓
Enigma protein 2	0.0026	N.D	↓
Muscle fructose 1,6-bisphosphate Aldolase	0.0037	0.0269	↑

表 1. 采用 Ettan™ DIGE™ 系统通过 Ettan™ MALDI ToF MS 鉴定的一些差异表达蛋白的列表

MDLC/DeCyder MS——多维液相色谱系统

初步分析结果显示有 10 个 p 值小于 0.001 的差异表达蛋白，其中 5 个为上调蛋白，另外 5 个为下调蛋白，而且其中有 3 个蛋白已经被报道参与各种肿瘤发生（见表 2）。如果把 p 值设定为 0.01 则有报道的蛋白数增至 8 个。

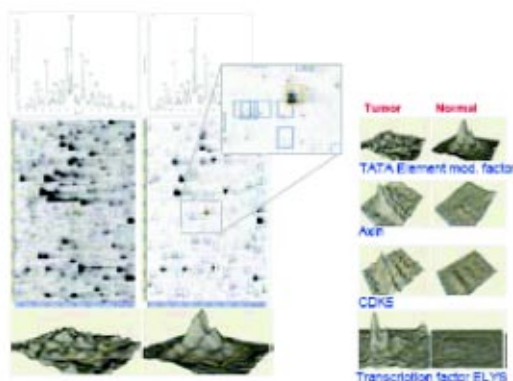


图 4. 左侧显示对肿瘤组织和正常组织的 LC-MS 数据比对后 DeCyder™ MS 的 PepMatch 模块的结果；右侧显示一些参与在不同类型肿瘤发生中的蛋白的 3D 结果

Protein	P-value	Regulation
TATA element modulatory factor 1	0.000218	↑
Desmin	0.000398	↓
Interleukin 12B	0.00149	↓
Vimentin	0.00153	↑
Axin 1	0.00857	↑
Cyclin-dependent kinase 6	0.00554	↑
Transcription factor ELYS	0.000275	↓
Cysteine and glycine-rich protein 1	0.000298	↑

表 2. 表中所列蛋白为一些参与在不同类型肿瘤发生中同时通过 DeCyder MS 检测到有差异表达的蛋白。箭头显示出这些蛋白在本研究中直肠癌组织中表达的上调或下调情况

结论:

- 采用 2D DIGE™ 系统，找到了 30 个 p 值小于 0.01 的有表达差异的蛋白，有 15 个蛋白是之前在不同肿瘤类型中有报道的，而且其中肌酸激酶已被报道在结肠直肠癌组织中有差异表达(Balasubramani M et al, Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):763-9)。
- 采用 MDLC 系统，400 多个蛋白被鉴定出来，其中通过 DeCyder MS 检测到有差异表达的蛋白 10 个（p 值小于 0.001）。
- 在这些被检测到的差异蛋白中，仅有 2 个蛋白同时被两套系统检测出来，揭示两套系统存在很强的互补性。