

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.004

基于液相色谱 - 质谱技术的早期胃癌血清多肽组学研究 *

祝青青¹ 金 杰¹ 徐 敏¹ 李记坤² 靖大道^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院消化内科 上海 200080;

2 上海交通大学附属第一人民医院胃肠外科 上海 200080)

摘要 目的:建立早期胃癌外周血清特征性多肽谱,分析其生物学特征,以探索一种特异且敏感的早期胃癌血清学诊断方法。**方法:**采集 10 例早期胃癌和 10 例正常对照血清,使用蛋白沉淀法去除高丰度血清蛋白质后,通过液相色谱 - 质谱联用技术重复三次进行多肽分离、离子化、质谱检测,将原始数据应用 Label free 方法中 MaxQuant 算法对肽段进行相对定量,分析两组差异多肽及差异多肽匹配蛋白。**结果:**EGC 组和 N 组重复三次所得色谱图总体比较一致,多肽重复检出率分别为 87.54%和 85.67%。其中 EGC 组可重复检测到的 Unique peptide 有 65 条,匹配对应 31 个蛋白;在 EGC 组和 N 组血清中显著差异的 Unique peptide 有 22 条,匹配对应 11 个蛋白。对血清显著差异多肽所匹配蛋白进行生物学分析,发现这些蛋白质多数位于细胞外,功能类别主要涉及分子水平的序列变换、信号肽、N-糖基化位点等,信号通路主要富集在凝血级联通路和补体级联通路。**结论:**早期胃癌血清特异性多肽谱图的建立可望成为胃癌早期诊断的血清学标志物,后续试验将进一步针对这些差异多肽进一步分析验证,筛选出早期胃癌标志性多肽,同时应用大样本进行验证,筛选出特异高效的早期胃癌血清标志物。

关键词:早期胃癌;血清;液相色谱 - 质谱联用;多肽组学

中图分类号:R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)09-1616-08

The Serum Polypeptide Study of Early Gastric Cancer Based on Liquid Chromatography-mass Spectrometry*

ZHU Qing-qing¹, JIN Jie¹, XU Min¹, LI Ji-kun², JING Da-dao^{1Δ}

(1 Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To establish the specific serum polypeptide spectra and explore specific and sensitive serum markers for diagnosis of early gastric cancer. **Methods:** Serum samples of 10 early gastric cancer cases and 10 normal cases were enrolled, using protein precipitation to remove out high abundance ratios serum protein. Mass spectrometry detection for peptides repeated three times by liquid chromatography tandem-mass spectrometry technology (LC-MS/MS), and applied MaxQuant algorithm of Label free method to quantitate peptides relatively, and analysed the differential polypeptides and the matching protein between the two groups. **Results:** Three repeated mass spectrograms in EGC group and N group are consistent generally, and the detected polypeptide repeated rates are 87.54% and 85.67% respectively. There were 65 unique serum peptides that were detected in EGC group, matching with 31 proteins, and there were 22 differential unique serum peptides between the EGC group and N group, matching 11 proteins. Biological analysis of the serum different polypeptides matched proteins showed most of these proteins were found in extracellular domain, and the functional categories mainly involved sequence variant, signal peptide, glycosylation site: N-linked, etc. The signal pathways were mainly enriched in the coagulation cascade pathway and the complement cascade pathway. **Conclusion:** Establishing the early gastric cancer serum specificity polypeptide spectra is expected to become serological markers in diagnosis of early gastric cancer. The following experiments will further analyse these differential peptides and screen early gastric cancer signal peptides, after verificating with large sample, then screen out specific and effective serum markers for early gastric cancer.

Key words: Early gastric cancer; Serum; LC-MS/MS; Peptidomics

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1616-08

前言

胃癌(Gastric cancer, GC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别位居恶性肿瘤的第二位和第三位^[1]。大

* 基金项目:上海市科学技术委员会基金项目(134119a3100)

作者简介:祝青青,硕士研究生,研究方向:早期胃癌的血清学诊断,E-mail: ann223@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者:靖大道,硕士生导师,教授,研究方向:胃肠道肿瘤的早期诊断与治疗,E-mail: dadaojing@126.com

(收稿日期:2017-12-19 接受日期:2018-01-23)

多数胃癌患者确诊时已处于中晚期,5年相对生存率低于30%^[2],而早期胃癌患者的5年存活率可超过90%^[3]。目前早期胃癌的确诊主要依靠内镜检查及黏膜病理组织学检查,但是由于早期胃癌临床表现不明显,内镜检查花费较高且具有侵入性,内镜筛查胃癌很难广泛普及。而临床常用的胃癌相关肿瘤标志物如CA724、CA199和CEA,在早期胃癌中三者阳性率只有10%左右^[4]。因此,探索一种有效的早期胃癌血清标志物具有重要意义。血清多肽是分子量小于10 kDa的低分子量多肽或蛋白质水解片段,同蛋白质一样,作为细胞合成、调控和降解过程的中心,能够反映机体基因表达的任何变化,也能引起相应新陈代谢活动的改变。多肽组学作为研究多肽组的结构、功能、变化规律及相关关系的学科,是蛋白组学的重要补充,也是目前的热点研究领域。截止2008年,FDA已批准了109个蛋白质及62个多肽等物质作为临床标记物^[5]。血清多肽分子量较少,一般方法较难进行检测。液相色谱-质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)联用技术采用两个串联的质量分析器进行离子扫描,通过测定待测物质的m/z来定性分析待测物,是多肽组学一种重要的分析方法,其具有非常高的分析特异性和选择性。近来多个研究小组将LC-MS/MS方法用于定量蛋白质或多肽,并成功应用于临床试验。本文应用LC-MS/MS技术建立早期胃癌外周血清特征性多肽谱,并分析

其生物学特征及意义,以探索一种特异且敏感的早期胃癌血清学诊断方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 早期胃癌组 选取2016年11月到2017年6月上海市第一人民医院消化内科和胃肠外科收治的早期胃癌患者10例作为早期胃癌(EGC)组。所有病例均经胃镜+病理学诊断确诊为早期胃癌,未接受手术治疗或放化疗,无其他组织器官的恶性肿瘤病史,无急性感染情况,肝肾心肺功能正常。由于胃恶性肿瘤中95%是胃腺癌,在样本选择中,EGC组样本均选择腺癌病人血清。

1.1.2 对照组 同期随机选取上海市第一人民医院健康体检中心正常健康对照10例作为正常对照(N)组,两组纳入对象年龄、性别无明显差异(具体信息详见表1)。入选对象均经胃镜检查无异常或仅提示为慢性浅表性胃炎,同时各项体检指标无明显异常,肝心肺肾功能正常,无慢性感染史,近2周内无任何服药史。本试验设计通过上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会审核。血清及临床资料采集均得到患者本人的知情同意并签署知情同意书。

表1 两组血清样本信息表

Table 1 Information table of two sets of serum sample

Group	Number	Age			Sex	
		<40	40-60	>60	Male	Female
EGC	10	1	4	5	8	2
N	10	2	5	3	7	3

1.2 仪器及试剂

1.2.1 仪器设备 4℃离心机、Pico21 常温离心机、SPD111V型真空干燥离心机、Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪和纳升流速 HPLC 液相系统 EASY-nLC 1000 均购于美国 Thermo Scientific 公司, Vortex 5 型涡旋振荡器(QILINBER, China)。

1.2.2 试剂 乙腈(A9984, Thermo HPLC); 10 kD 超滤管(85034-538-74, Satorius); 碳酸氢铵(Sigma, A6141); DTT(D0632-10G, Sigma); IAA(L1149-5G, Sigma); Ziptip 脱盐柱。

1.3 试验方法

1.3.1 血清标本采集 所有患者签署知情同意书后取清晨空腹静脉血4 mL,置于5 mL真空促凝管内,常温静置1小时后,以4000 r/min离心10 min,吸取血清分装到EP管中,每份EP管100 μL,编号后储存于-80℃冰箱。

1.3.2 血清样本前处理 将EGC组10例样本中每例各取100 μL,混合至1 mL,同样方式取N组每例样本100 μL,混合至1 mL。分别向两组血清样品加入3 mL的25%乙腈,4℃放置40 min。继续加入100%乙腈,使终体积与水相之比为2.5:1,-20℃沉淀2 h后,4℃下,12000 rpm离心30 min,分别收集上清和沉淀。上清离心浓缩干燥后得到沉淀,用300 μL左右的50 mM NH₄HCO₃重溶。

1.3.3 超滤 在4℃环境下,12000 rpm离心10 min后,取上清,加入10 kD超滤管进行超滤。12000 rpm收集滤液。

1.3.4 还原烷基化与脱盐 按每2 μL二巯苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)加入100 μL多肽溶液的比例,加入相应剂量DTT,56℃水浴40 min。再按照每10 μL碘乙酰胺(Iodacetamide, IAM)加入100 μL多肽溶液的比例,加入相应剂量IAM,避光20 min。将多肽溶液离心浓缩干燥后,Ziptip® C18柱脱盐,干燥。

1.3.5 质谱分析 将每份样本重复进样三次,每次进样2 μL,样本采用纳升流速 HPLC 液相系统 EASY-nLC 1000(Thermo Scientific, USA)进行分离,经捕集柱(Trap柱),再经C18分析柱分离,经高效液相色谱脱盐及分离后用Q Exactive™ 组合型四极杆-Orbitrap 质谱仪进行分析。流动相A为0.1% Formic acid (FA)+99.9% H₂O,流动相B为0.1% FA+99.9% Acetonitrile (ACN)。质谱检测采用的是数据依赖扫描(Data Dependent Acquisition, DDA)模式。扫描分辨率为140,000(FWHM),峰高超过100 cps(Counts/Second),且电荷为+2至+4的10个丰度最大的多肽选择被MS/MS分析,质荷比范围为m/z 300-1800。EGC组的三次进样数据分别记作EGC1、EGC2和EGC3;N组的三次进样数据分别记作N1、N2和N3,具体色谱图见图1。

1.4 数据处理及统计学方法

原始数据文件首先需要用 Proteome Discoverer(Version1.4)软件转换为 mgf 文件,用 Proteome Discoverer(Version1.4)软件进行数据检索分析,检索数据库为 Uniprot database。本研究用 Label free 相对定量分析,通过 MaxQuant(Version 1.5)软件进行谱图校正和归一化处理,并对肽段进行相对定量分析,以 MS1 为基础,计算每个肽段的信号强度在 LC-MS 色谱上的积分。用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,两样本之间均数比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

根据 Proteome Discoverer 搜库结果,EGC1 检出 3938 条多肽,其中 351 个 Unique peptide;EGC2 检出 3873 条多肽,其中 355 个 Unique peptide;EGC3 检出 3929 条多肽,其中 358 个 Unique peptide。N1 检出 3782 条多肽,其中 403 个 Unique peptide;N2 检出 3849 条多肽,其中 413 个 Unique peptide;N3 检出 3755 条多肽,其中 417 个 Unique peptide。

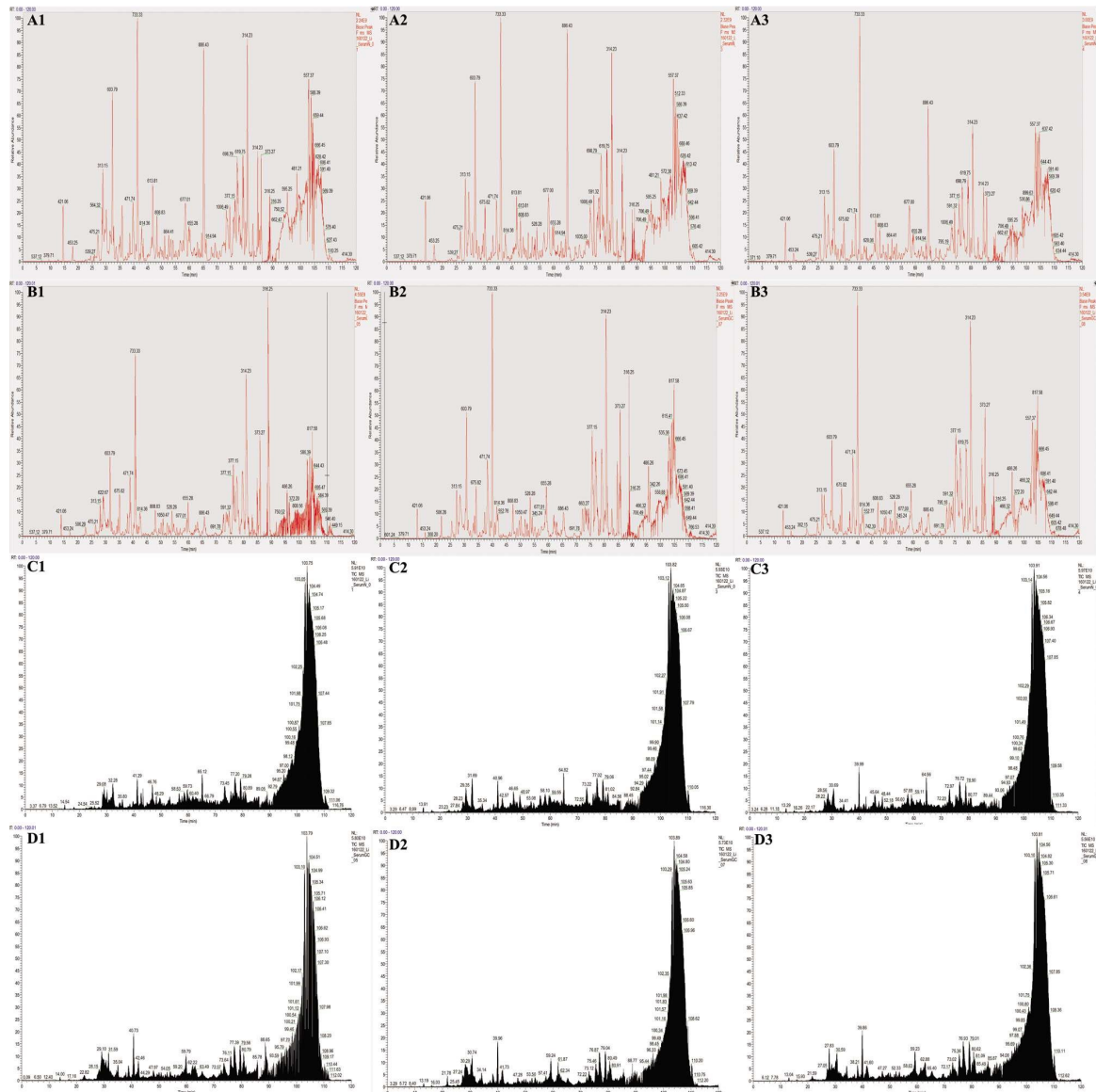


图1 正常对照组和早期胃癌组外周血清多肽基础峰色谱图及总离子色谱图

A1-3.正常对照组 N1-N3 基峰色谱图;B1-3.早期胃癌组 EGC1-EGC3 基峰色谱图;

C1-3.正常对照组 N1-N3 总离子色谱图;D1-3.早期胃癌组 EGC1-EGC3 总离子色谱图

Fig.1 Base peak chromatogram and total ions chromatograph of early gastric cancer group and normal group

A1-3. Base peak chromatogram of N1-N3 in normal group; B1-3. Base peak chromatogram of EGC1-EGC3 in EGC group;

C1-3. Total ions chromatograph of N1-3normal group; D1-3. Total ions chromatograph of EGC1-EGC3 in EGC group

N 组和 EGC 组内的三次基础峰色谱图和总离子色谱图总体一致,其中 N 组三次多肽重复检出率 87.54%,EGC 组多肽重复检出率 85.67%。根据谱图和结果数据,临床收集到的血清样本中存在一些未知小分子或者 PEG 类多聚物,主要集中在保留时间(RT)>90 min 这一液相梯度的区段,其原因推测应

该是使用环氧乙烷灭菌的采血器械的多聚物大分子析出引起。多肽在保留时间 20 到 90 min 之间,总体分布均匀。

2.1 仅在早期胃癌组检测到的血清多肽谱

根据质谱检测结果显示仅在 EGC 组血清样品中检测到的多肽有 145 条,去除非 unique peptide,保留 3 次检测中至少 2

次被检出的多肽共 65 条,匹配 31 个蛋白,具体详见表 2。

表 2 仅在早期胃癌组检测到的多肽及所匹配的蛋白

Table 2 Polypeptides and matched proteins only detected in the early gastric cancer group

Uniprot	Peptide Sequence	Protein Description
A6NL88	PGANGTRTGPA	Protein shisa-7
O00391	EQEQPLGQWHLS	Sulfhydryl oxidase 1
O00391	NEQEQPLGQWHL	Sulfhydryl oxidase 1
O75563	ELYDDVDHPLPISNPLTS	Src kinase-associated phosphoprotein 2
O95810	ALTSEEAERSDGDVPVQPAVLQVHQT	Caveolae-associated protein 2
O95810	ASALVEGEIAEEAAEKAT	Caveolae-associated protein 2
P00488	AEDDLPTVELQGVPVR	Coagulation factor XIII A chain
P00734	FGSGEADCGLRPLF	Prothrombin
P00734	RTFGSGEADGLRPLFE	Prothrombin
P00734	TERELLESYIDGR	Prothrombin
P00734	TFGSGEADCGLRPL	Prothrombin
P00734	TFGSGEADCGLRPLF	Prothrombin
P00734	TSEYQTFF	Prothrombin
P01024	SKITHRIHWE	Complement C3
P01024	SKITHRIHWESA	Complement C3
P01024	SSKITHRIHWE	Complement C3
P01024	SSKITHRIHWESA	Complement C3
P01024	THRIHWESA	Complement C3
P01344	GHVLAKELEAF	Insulin-like growth factor II
P01344	HVLAKELEAFREA	Insulin-like growth factor II
P02452	RGPAGPQGPR	Collagen alpha-1(I) chain
P02647	LSALEEYTKKLNTQ	Apolipoprotein A-I
P02656	WDLDPVVRPTSAVAA	Apolipoprotein C-III
P02671	DEAGSEADHEGTH	Fibrinogen alpha chain
P02671	DLVPGNF	Fibrinogen alpha chain
P02671	DSGEGDFLAEGGG	Fibrinogen alpha chain
P02671	DSHSLTTNImEILRGDFSSANN	Fibrinogen alpha chain
P02671	EILRGDFSSANN	Fibrinogen alpha chain
P02671	ELERPGGNEIT	Fibrinogen alpha chain
P02671	ELERPGGNEITR	Fibrinogen alpha chain
P02671	MADEAGSEADHEGTHST	Fibrinogen alpha chain
P02671	PNNPDWGTFEVSGNVSPGTR	Fibrinogen alpha chain
P02671	QFTSSTSYPNRDSTFES	Fibrinogen alpha chain
P02671	QLQKVPPEWK	Fibrinogen alpha chain
P02671	SETESRGSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPS	Fibrinogen alpha chain
P02671	SKQFTSSTSYPNR	Fibrinogen alpha chain
P02671	SSHHPGIAEFPSRG	Fibrinogen alpha chain
P02671	SSSYSKQFTSSTSYPNRG	Fibrinogen alpha chain
P02671	VPDLVPGNF	Fibrinogen alpha chain
P02675	QGVNDNEEGFFSAR	Fibrinogen beta chain
P02766	GSPAINVAVHVFR	Transthyreti
P02766	INVAVHV	Transthyreti

P02766	KAADDTWEPF	Transthyreti
P02768	FTFHADicTLS	Serum albumin
P04114	TPALHF	Apolipoprotein B-100
P05546	GSKGPLDQLEKGGETAQSADPQWEQLNN	Heparin cofactor 2
P06727	ADEFKVKIDQTVEELR	Apolipoprotein A-IV
P08697	FPRGDKLFGPDL	Alpha-2-antiplasmin
P08697	NQEQVSPLTLLKLGN	Alpha-3-antiplasmin
P35579	DLPFVVPR	Myosin-9
P43490	KQKMWSIENIAFGSGGGLL	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
P68366	AVFVDLEPTVIDEIR	Tubulin alpha-4A chain
P68366	TIGKEIIDPVL	Tubulin alpha-5A chain
Q13683	TLDPADRL	Integrin alpha-7
Q14624	MNFRPGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
Q14624	PGVLSSRQLGLPGPPDVPDHA	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5
Q15942	GPPASSAPAPKFSPTPKFTPVAS	Zyxin
Q49A17	HNEGWTSLLR Polypeptide	N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6
Q92833	RHGWNLTVLPNNTGSILR	Protein Jumonji
Q96AK3	FRGPVL	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3D
Q9BZZ2	DAGVYTCQAENG	Sialoadhesin
Q9H4B7	DINEFGEAENNIHDLV	Tubulin beta-1 chain
Q9ULI3	ALSLAPLAGAGLELQLER	Protein HEG homolog 1
Q9ULI3	SLAPLAGAGLELQLER	Protein HEG homolog 2

2.2 早期胃癌组与对照组显著差异性多肽谱

2.2.1 筛选 EGC 组与 N 组显著差异多肽

使用 Maxquant (Vision 1.5)软件分别对 EGC 组和 N 组的 3 次检测结果,进行谱图校正和归一化处理,共对 95 条 Unique peptide 进行了相对

定量分析。通过计算两组样品中同一多肽的 Fold change,并且用 T 检验对两组样品进行了筛选,保留 $P \leq 0.05$ 的多肽,以 Fold Change GC vs N 为 2.0 倍作为临界值,筛选出在 EGC 组和对照组中有显著差异的多肽共 22 条,匹配 11 个蛋白。

表 3 早期胃癌组与对照组血清显著差异多肽及所匹配的蛋白

Table 3 Significantly different polypeptides and the matched proteins between early gastric cancer group and control group serum

Uniprot	Sequence	Description	Fold change EGC/N	P value
P01024	IHWESASLLR	Complement C3	3.22	<0.0001
P01024	ITHRIHWESASLLR	Complement C3	4.08	<0.0001
P01024	SSKITHRIHWESASLLR	Complement C3	4.55	0.0223
P02452	GPAGPQGPR	Collagen alpha-1(I) chain	7.88	<0.0001
P02671	HRHPDEAAFFDTASTGK	Fibrinogen alpha chain	2.96	0.0030
O95810	YEGSYALTSEEAEERSDGPVQ-PAVLQVHQTS	Serum deprivation-response protein	2.07	0.0015
Q9Y278	THVQIDPEVIDQLR	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	2.46	0.0305
P00488	RAVPPNNSNAAED-DLPTVELQGVPVR	Coagulation factor XIII A chain	0.44	<0.0001
P01009	SASLHLPKLSITGYDLK	Alpha-1-antitrypsin	0.16	<0.0001
P01023	AIGYLNTGYQR	Alpha-2-macroglobulin	0.47	<0.0001
P01023	AIGYLNTGYQRQLNYK	Alpha-2-macroglobulin	0.27	<0.0001
P01023	SLNEEAVKK	Alpha-2-macroglobulin	0.38	0.0117
P02766	AADDTWEPFASGK	Transthyretin	0.45	0.0004
P02766	ALGISPFHEHAEEVFTANDSGPR	Transthyretin	0.02	<0.0001
P02766	ALGISPFHEHAEEVFTANDSGPRR	Transthyretin	0.06	<0.0001

P02766	RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE	Transthyretin	0.05	<0.0001
P02766	YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE	Transthyretin	0.23	<0.0001
P0C0L5/P0C0L4	GLEEELQFSLGSKINVK	Complement C4-B/C4-A	0.3	0.0008
P0C0L5/P0C0L4	NGFKSHALQLNNRQIR	Complement C4-B/C4-A	0.35	0.0015
Q14624	SPEQQETVLDGNLIIRYDVDR	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.23	0.0047

2.2.2 PCA 主成分分析 针对 $P \leq 0.05$ 有相对定量信息的 22 条多肽进行 PCA 主成分分析, 将试验 6 针质谱检测的信号强度进行 PCA 三维分析(图 2), 可见这 22 条多肽的质谱信号强度在 EGC 组和 N 组之间存在明显差异。

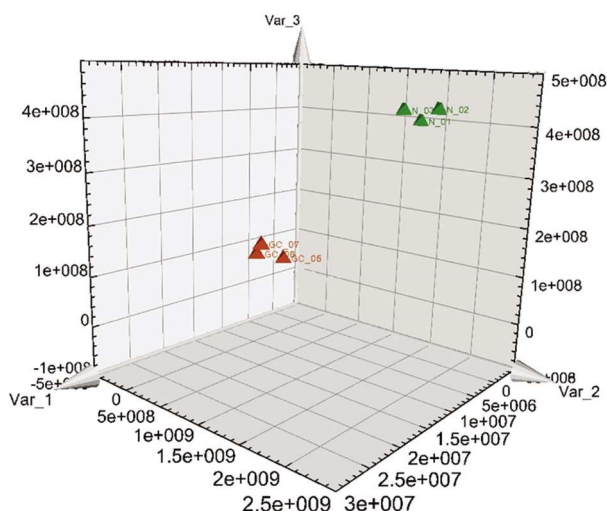


图 2 EGC 组和 N 组差异多肽的 PCA 分析

Fig.2 PCA analysis of difference peptides in EGC and N groups

2.3 血清显著差异多肽所匹配蛋白的生物学分析

2.3.1 GO David 分析 将研究发现的所有血清差异多肽(包括仅在 EGC 组中检测到的多肽和 EGC 组与 N 组显著差异的多肽)匹配的蛋白通过在线数据库 DAVID 进行功能注释汇总后的 Functional Categories 分析(图 3)和 Gene Ontology 分析(图 4), 发现这些蛋白质多数位于细胞外, 功能类别主要有分子水平的序列变换、信号肽、N-糖基化位点等。

2.3.2 KEGG 分析 血清差异多肽匹配蛋白通过在线数据库 KEGG 进行信号通路分析, 结果显示 9 个差异蛋白在 2 条信号通路上富集, 分别是凝血级联通路(Coagulation cascade)和补体级联通路(Complement cascade)(图 5)。

3 讨论

液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术, 以液相色谱作为分离系统, 质谱为检测系统。样品在质谱部分和流动相分离, 被离子化后, 经质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开, 经检测器得到质谱图。液质联用将色谱和质谱优势互补, 将色谱对复杂样品的高分离能力, 与 MS 的高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来, 在药物分析、生物分析等许多领域得到了广泛应用。

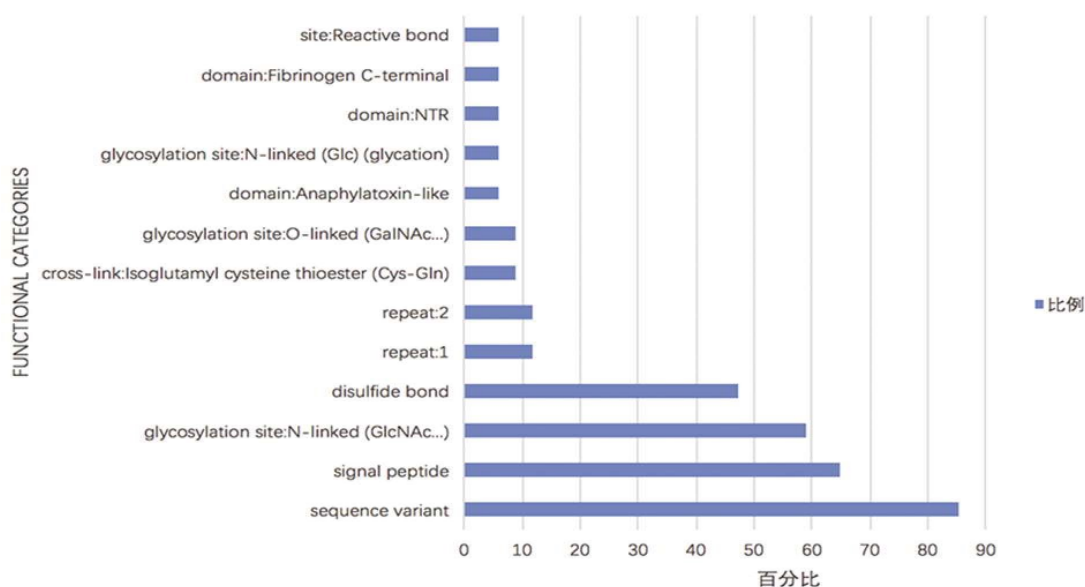


图 3 血清差异多肽匹配蛋白的功能类别分析

Fig.3 Functional categories analysis of serum different peptides matched proteins

本研究取 10 例早期胃癌患者与 10 例健康成人血清, 未经任何酶解, 使用蛋白沉淀法去除高丰度血清蛋白, 使用 LC-MS/MS 技术分离血清中多肽, 对显著差异多肽进行分析与比较, EGC 组和 N 组分别获得的三次质谱图均比较一致, 多肽重复检出率高。仅在 EGC 组中可重复检测到的 unique peptide 有 65 条, 匹配对应 31 个蛋白, 在 EGC 组和 N 组血清中显著

差异的 unique peptide 有 22 条, 匹配对应 11 个蛋白。血清中的多肽主要有两个来源, 一是有基因编码合成, 二是体内蛋白质降解, 故所检测的显著差异多肽可能由差异蛋白降解产生, 也可能由肿瘤细胞基因突变后转录合成。本研究筛选出的多肽均为 Unique peptide, 即每段多肽序列都特异性对应一种蛋白质, 针对匹配蛋白质进行生物学分析, GO 分析显示这些蛋白质多

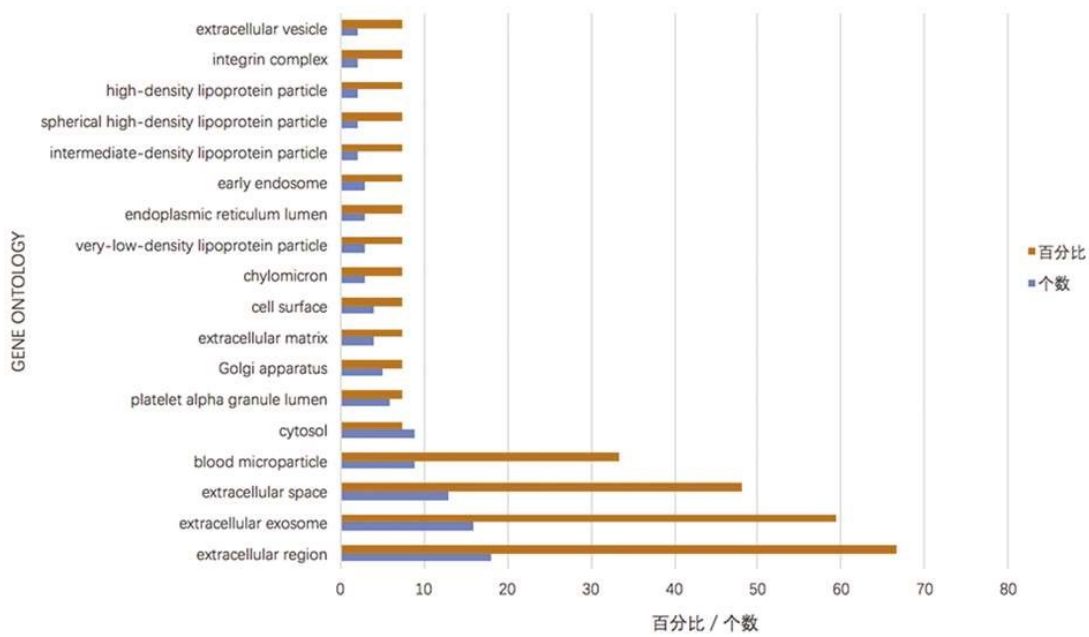


图 4 血清差异多肽匹配蛋白的 GO 分析

Fig.4 Gene ontology analysis of serum different peptides matched proteins

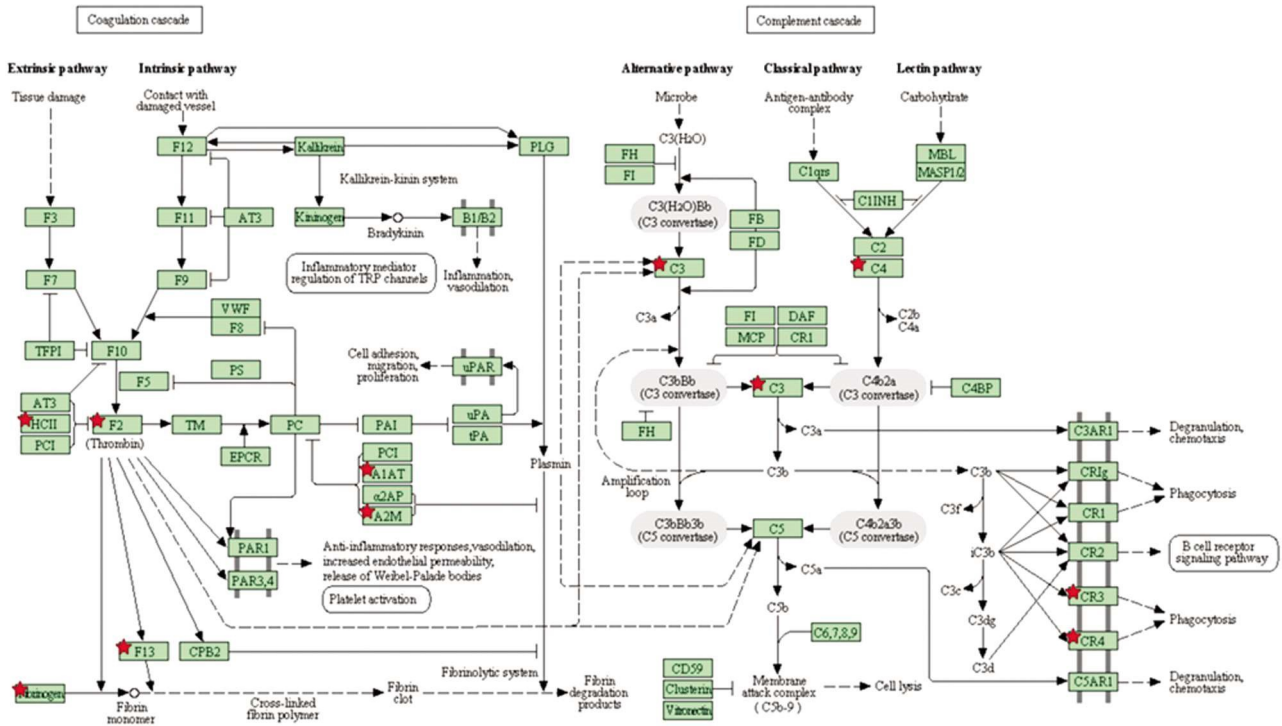


图 5 血清差异多肽匹配蛋白富集的 KEGG 信号通路

Fig.5 Riched KEGG signal pathway of different polypeptides matched proteins

数位于细胞外,功能类别主要有分子水平的序列变换、信号肽、N-糖基化位点等,主要涉及的信号通路是凝血级联通路和补体级联通路,主要参与的生物代谢途径有免疫系统代谢途径、凝血代谢途径、信号传导代谢途径和蛋白质代谢途径,早期胃癌的发生发展可能与上述 4 种代谢途径的改变密切相关。

针对本研究中的匹配蛋白进一步生物学功能分析发现,其中 A1AT、A2M 和 ITIH4 均为蛋白酶抑制剂,且均为急性时相反应蛋白。其中 α_1 -抗胰蛋白酶(A1AT)是人体最主要的蛋白酶抑制剂,参与血管形成、细胞凋亡和肿瘤形成等多种病理生理过程^[6],研究发现蛋白酶通过降解胞外基质和基底膜参与胃

癌的发生、侵袭和转移,机体为中和、抑制蛋白水解酶活性,A1AT 代偿性增加^[7]。Kwon 等通过体外侵袭试验证实 A1AT 高表达时可增加癌细胞侵袭性,而当 A1AT 表达下降时癌细胞的侵袭性降低^[8]。 α_2 -巨球蛋白(A2M)同属于蛋白酶抑制剂,主要清除组织中外源性和过量内源性蛋白酶,同时也能够与重要的细胞因子结合并调节其生物活性^[9]。有研究显示 A2M 能够抑制肿瘤生长,最早 Arenne 等^[10]在白血病株培养基中加入生理浓度的 A2M 后,白血病细胞的分裂增值被抑制;Koo 等^[11,12]后来通过体内及体外试验均证实 A2M 对人、鼠肿瘤细胞有抑制作用。A2M 具体的抗肿瘤机制尚不明确,或许与抑制蛋白酶活性

有关,同时通过调节各种细胞因子参与肿瘤的增殖、转移。间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 4 (ITIH4)是新发现的间 α 胰蛋白酶抑制剂重链家族成员,在一项 ITI 基因家族在实体瘤组织标本的表达研究发现,ITIH4 在 95%肾肿瘤、57%卵巢肿瘤、63%胃肿瘤和 75%前列腺癌中表达下调^[13],与其他家族成员不同,ITIH4 以重链亚型的形式存在血液中,是一个急性期反应蛋白,与急性反应期的细胞增殖和迁移有关,在感染和炎症发展中发挥重要作用^[14]。已有很多学者强调炎症与肿瘤的发生发展相关,当机体收到损伤或病原体感染,炎症微环境中持续的氧化应激以及炎症细胞及细胞因子诱导 DNA 损伤并抑制损伤后修复,导致基因组不稳定及基因突变,细胞增殖分化及凋亡失去调控,使肿瘤细胞形成^[15]。

在早期胃癌组表达上调多肽匹配的蛋白中,我们发现较多与肿瘤细胞迁移、侵袭相关的蛋白,如 QSOX1、SKAP2、MYH9、NAMPT、ITGA7 和 GALNTL6。其中巯基蛋白酶 1 (QSOX1),最早在 1993 年 Coppock^[16]研究 WI38 成纤维细胞株时发现的一种参与蛋白质折叠时氧化巯基的酶,是巯基氧化酶家族中的一员,可以通过还原分子氧生成过氧化氢。QSOX1 过表达产生的大量过氧化氢可以通过改变细胞内部微环境,促进肿瘤的发生发展^[17],研究发现 QSOX1 在胰腺癌、前列腺癌、肝癌等恶性肿瘤中高表达^[18-20]。Src 激酶相关蛋白 2 (SKAP2)是 SRC 家族激酶的底物, SRC 家族包括 Src 在内的 9 个具有相似结构和功能的非受体酪氨酸激酶,在细胞的黏附、增殖和侵入,以及细胞的运动和细胞因子受体的激活方面发挥重要作用。许多研究发现 SRC 激酶家族超活化或过度表达是引发各种癌症的关键因素,SKAP2 通过促进伪足的形成,进而促进肿瘤相关巨噬细胞的浸润和转移^[21];Kuranami 等^[22]发现非小细胞肺癌组织中 SKAP2 的过度表达与预后差、生存时间段相关,认为 SKAP2 可能是恶性肿瘤治疗的潜在分子靶点。非肌肉肌球蛋白重链 9 基因(MYH-9)属于肌球蛋白超家族中的一种,有助于细胞极化、连接、分离和转移^[23],胃癌组织 MYH-9 高表达是预测胃癌不良预后的独立指标^[24],通过 MicroRNA let-7f 靶向抑制 MYH-9 基因的表达,发现可影响体外胃恶性肿瘤细胞的侵袭和转移^[25],MYH-9 可能成为胃癌基因治疗的新靶点。烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)是 NAD 生物补救合成途径中的关键限速酶,主要分布于胞浆、胞核和线粒体, NAMPT 可以通过改变细胞内 NAD 的含量调节细胞周期,影响细胞分化及 DNA 修复,组织细胞死亡等^[26]。Nampt 高表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期相关^[27],有研究提出由于恶性肿瘤细胞有较高的代谢速度,需要维持高水平的 NAD 消耗和生存速率,可通过抑制 NAMPT 导致 NAD 水平下降,诱导肿瘤细胞的凋亡, NAMPT 抑制剂可能是治疗恶性肿瘤的一个方向^[28]。血清表达差异蛋白中,如 SHISA7、APOBEC3D 和 HEG-1 在 EGC 组的表达均高于正常组,但是目前关于这些蛋白的研究较少,还需更多研究明确。

综上所述,早期胃癌血清特异性多肽谱图的建立提示早期胃癌血清多肽组学可望成为胃癌早期诊断的血清学标志物,后续试验我们将针对这些差异多肽进一步分析验证,筛选出早期胃癌标志多肽,同时应用大样本进行验证,筛选出特异高效的早期胃癌血清标志物。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-386
- [2] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58
Zuo Ting-ting, Zheng Rong-shou, Zeng Hong-mei, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 44(1): 52-58
- [3] Oliveira FJ, Ferrao H, Furtado E, et al. Early gastric cancer: Report of 58 cases[J]. *Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 1998, 1(1): 51-56
- [4] Shimada H, Noie T, Ohashi M, et al. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association[J]. *Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 2014, 17(1): 26-33
- [5] Anderson NL. The Clinical Plasma Proteome: A Survey of Clinical Assays for Proteins in Plasma and Serum [J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(2): 177-185
- [6] Hiemstra PS, Stolk J. From gene disease; alpha1-antitrypsin deficiency [J]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 2003, 147(16): 758-760
- [7] Kereszturi E, Sahin-Toth M. Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(48): 33392-33399
- [8] Kwon CH, Park HJ, Lee JR, et al. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(10): 1993-2002
- [9] Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. Alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(8): 1665-1675
- [10] Von Ardenne M, Chaplain RA. The inhibitory effect of alpha-2-macroglobulin on tumor growth [J]. *Experientia*, 1973, 29 (10): 1271-1272
- [11] Koo PH. Human alpha 2-macroglobulin: a major serum factor cytotoxic for tumor cells[J]. *Cancer Lett*, 1983, 18(2): 169-177
- [12] Koo PH. Tumor inhibition by human alpha 2-macroglobulin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1983, 421: 388-390
- [13] Hamm A, Veeck J, Bektas N, et al. Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 25
- [14] Yang MH, Yang YH, Lu CY, et al. Activity-dependent neuroprotector homeobox protein: A candidate protein identified in serum as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease [J]. *J Proteomics*, 2012, 75 (12): 3617-3629
- [15] Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(1): 85-93
- [16] Coppock DL, Cina-Poppe D, Gilleran S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1[J]. *Genomics*, 1998, 54(3): 460-468
- [17] Berquist BR, Wilson DM. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions [J]. *Cancer Lett*, 2012, 327(1-2): 61-72

- 损伤的作用机制[J].临床与病理杂志, 2017, 37(2): 353-358
- Wang Jian, Chen Wei-dong, Liu Xing-zhou, et al. Lidantang attenuates severe acute cholangitis induced hepatic injury [J]. Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2017, 37(2): 353-358
- [17] 洗健元. 胆管引流术对急性重症胆管炎患者血清促炎因子的影响[J].医学综述, 2015, 21(2): 353-354
- Xian Jian-yuan. Influence of Endoscopic Naso-biliary Drainage on Serum Cytokines in Patients with Acute Severe Cholangitis[J]. Medical Recapitulate, 2015, 21(2): 353-354
- [18] Murayama KM. Acute Cholangitis Management: Prevention of Organ Failure and Death[J]. JAMA Surg, 2016, 151(11): 1045
- [19] Wannhoff A, Rupp C, Friedrich K, et al. Inflammation But Not Biliary Obstruction Is Associated With Carbohydrate Antigen 19-9 Levels in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(13): 2372-2379
- [20] Wang LZ, Luo MY, Zhang JS, et al. Effect of ulinastatin on serum inflammatory factors in Asian patients with acute pancreatitis before and after treatment: a meta-analysis [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2016, 54(11): 890-898
- [21] Zhang C, Wang Y, Fu W, et al. A Meta-analysis on the Effect of Ulinastatin on Serum Levels of C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Asian Patients with Acute Pancreatitis [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(3): 118-124
- [22] 范志勇,李晖,孙中杰,等.损伤控制在重症胆管炎合并多脏器功能不全治疗中的应用[J].实用医学杂志, 2016, 32(7): 1139-1141
- Fan Zhi-yong, Li Hui, Sun Zhong-jie, et al. Application of damage control in the treatment of severe cholangitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome [J]. Journal of Practical Medicine, 2016, 32(7): 1139-1141
- [23] 曹才文,何旋,李莉,等.重症中暑早期肠黏膜屏障功能损害与全身炎症反应的相关性研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(4): 303-307
- Cao Cai-wen, He Xuan, Li Li, et al. The correlation analysis of intestinal mucosal barrier function damage with systemic inflammation reaction during severe heatstroke [J]. Chinese Critical Care Medicine, 2016, 28(4): 303-307
- [24] Ma CL, Wang LP, Qiao S, et al. Risk Factors for Death of Elderly Patients with Acute Obstructive Suppurative Cholangitis[J]. West Indian Med J, 2015, 65(2): 316-319
- [25] Eto K, Kawakami H, Haba S, et al. Single-stage endoscopic treatment for mild to moderate acute cholangitis associated with choledocholithiasis: a multicenter, non-randomized, open-label and exploratory clinical trial[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22(12): 825-830
- [26] Tabibian JH, Yang JD, Baron TH, et al. Weekend Admission for Acute Cholangitis Does Not Adversely Impact Clinical or Endoscopic Outcomes[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(1): 53-61
- [27] Luo Y, Che W, Zhao M. Ulinastatin post-treatment attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and human alveolar epithelial cells[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(2): 297-306
- [28] Tao Z, Hu FQ, Li CF, et al. Effect of ulinastatin, a human urinary protease inhibitor, on heatstroke-induced apoptosis and inflammatory responses in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(1): 335-341
- [29] 刘彦西,高大宽,马亚玲,等.乌司他丁对大鼠脑缺血再灌注损伤后的保护作用及其机制研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(23): 4462-4466
- Liu Yan-xi, Gao Da-kuan, Ma Ya-ling, et al. A Study on the Protective Effect and Its Mechanism of Ulinastatin in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(23): 4462-4466
- [30] 张慧慧,蔡国龙,胡才宝,等.乌司他丁对脓毒症大鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究[J].中华危重症医学杂志(电子版), 2017, 10(3): 153-158
- Zhang Hui-hui, Cai Guo-long, Hu Cai-bao, et al. Protective effect of ulinastatin on acute lung injury in sepsis rats and its mechanism[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine (Electronic Edition), 2017, 10(3): 153-158
-
- (上接第 1623 页)
- [18] Song H, Zhang B, Watson MA, et al. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis[J]. Oncogene, 2009, 28(37): 3307-3319
- [19] Shi CY, Fan Y, Liu B, et al. HIF1 contributes to hypoxia-induced pancreatic cancer cells invasion via promoting QSOX1 expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(3): 561-568
- [20] 谢维,黄天壬,李云西,等.肝癌进展过程中 QSOX-1 的动态变化及意义[J].中国热带医学, 2015, (04): 389-392
- Xie Wei, Huang Tian-ren, Li Yun-xi, et al. Expression and significance of QSOX1 in a population with high risk of primary liver cancer in Guangxi[J]. China Tropical Medicine, 2015, (04): 389-392
- [21] Tanaka M, Shimamura S, Kuriyama S, et al. SKAP2 Promotes Podosome Formation to Facilitate Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Metastatic Progression[J]. Cancer Res, 2016, 76(2): 358-369
- [22] Kuranami S, Yokobori T, Mogi A, et al. Src kinase-associated phosphoprotein2 expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2015, 35(4): 2411-2415
- [23] Conti MA, Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 1): 11-18
- [24] Liu D, Zhang L, Shen Z, et al. Clinicopathological significance of NMIIA overexpression in human gastric cancer [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11): 15291-15304
- [25] Liang S, He L, Zhao X, et al. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18409
- [26] Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, et al. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis [J]. Science, 2009, 324(5927): 651-654
- [27] 李亮,陈锐,刘俊松,等.突变型 p53 与 Nampt 在胃癌组织中的表达及其与预后的关系[J].中国普通外科杂志, 2015, (04): 505-510
- Li Liang, Chen Rui, Liu Jun-song, et al. Expressions of mutant p53 and Nampt in gastric cancer tissue and their relations with prognosis [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, (04): 505-510
- [28] Zhang LQ, Heruth DP, Ye SQ. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases[J]. J Bioanal Biomed, 2011, 3: 13-25