

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.12.002

论著 · 临床研究

儿童肝母细胞瘤潜在标志物载脂蛋白 A-I 的筛选及鉴定

郭立华 赵伟 张俊杰 张谦 范应中 王家祥

(郑州大学第一附属医院小儿外科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 筛选并鉴定出小儿肝母细胞瘤(HB)血清生物学标记物, 以助 HB 的早期诊断。**方法** 使用弱阳离子磁珠技术处理 30 例 HB 患儿、20 例全身炎症反应综合征(SIRS)患儿和 20 例正常儿童的血清样品, 利用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)平台筛选出肿瘤组和正常组的差异性蛋白。SDS-PAGE 纯化分离出目标蛋白质后, 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定出目标蛋白质的氨基酸序列, 并通过 SwissProt 数据库查找与之匹配的蛋白质。最后使用 Real-time PCR 和 ELISA 技术验证该蛋白质的表达情况。**结果** SELDI-TOF-MS 筛选并排除炎症因子干扰后, 发现 HB 组和正常组存在质荷比为 9 348 Da 的差异性蛋白质, 在 HB 组的表达较低 ($P < 0.05$)。经鉴定此蛋白为载脂蛋白 A-I (Apo A-I)。Real-time PCR 和 ELISA 验证 Apo A-I 基因和蛋白在 HB 组均低表达, 在正常组高表达。**结论** Apo A-I 可作为 HB 非炎症性蛋白质标记物, 对其早期诊断有意义。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1205-1210]

[关键词] 肝母细胞瘤; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 载脂蛋白; 蛋白质生物学标记物; 儿童

Screening and identification of apolipoprotein A-I as a potential marker for hepatoblastoma in children

GUO Li-Hua, ZHAO Wei, ZHANG Jun-Jie, ZHANG Qian, FAN Ying-Zhong, WANG Jia-Xiang. Department of Pediatric Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Wang J-X, Email: wjiaxiang@zzu.edu.cn)

Abstract: Objective To screen and identify serum biomarkers for childhood hepatoblastoma (HB). **Methods** The serum samples from 30 children with hepatoblastoma (HB), 20 children with systemic inflammatory response syndrome, and 20 normal children were treated with magnetic bead-based weak cation exchange chromatography. The platform of surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) was used to eliminate the interference of inflammatory factors and to screen out the differentially expressed proteins in serum between tumor group and normal group. After the purification and separation of target proteins were performed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry was used to determine their amino acid sequences. The SwissProt database was searched for matched proteins. Finally, real-time PCR and ELISA were used to verify and measure the expression of target proteins. **Results** After SELDI-TOF-MS was used for screening and elimination of the interference of inflammatory factors, a differentially expression protein with a mass-to-charge ratio of 9348 Da was found in serum between HB group and normal group, and the HB group had significantly lower expression of this protein than the normal group ($P < 0.05$). This protein was identified as apolipoprotein A-1 (Apo A-I). Real-time PCR and ELISA verified the low mRNA and protein expression of Apo A-I in serum in the HB group and high expression in serum in the normal group. **Conclusions** Apo A-I can be used as a non-inflammatory protein marker for HB and has a certain value in the early diagnosis of HB.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(12): 1205-1210]

Key words: Hepatoblastoma; Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; Apolipoprotein; Protein biomarker; Child

[收稿日期] 2016-06-07; [接受日期] 2016-08-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81172085)。

[作者简介] 郭立华, 男, 博士研究生, 主治医师。

[通信作者] 王家祥, 男, 主任医师, 教授。

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是小儿最常见的肝脏恶性肿瘤, 占小儿肝脏恶性肿瘤的50%~79%^[1]。HB是可治愈的小儿恶性肿瘤, 早期诊断和治疗可以显著提高其生存率^[2]。但HB瘤体生长迅速, 大多数患儿就诊时已处于II期及以上, 甚至远处转移, 预后较差^[3]。凭借彩超、CT等影像学辅助检查方法均无法做到肝母细胞瘤的早期诊断。蛋白质组学技术如表面增强激光解吸电离飞行时间质谱 (surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight, SELDI-TOF-MS)、高效液相色谱技术 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和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) 在肿瘤中的应用主要是寻找并鉴定可作为肿瘤早期诊断工具的相关标记物^[4]。在恶性肿瘤病人的血清样本中, 可检测到因局部或系统炎症反应产生的一些蛋白质, 这些炎症因子或炎性蛋白大部分都是恶性肿瘤生物学标记物的干扰因素^[5]。故在进行恶性肿瘤生物学标记物的检测时, 应当排除这些炎症反应带来的干扰。

本研究对HB患儿、全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 患儿及正常儿童血清进行检测, 在排除炎症因子的干扰下, 筛选出准确度更高的肝母细胞瘤血清生物学标记物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究血清样本 (2012年12月至2014年12月) 均在我院收集, 清晨空腹状态下采集静脉血, 室温静置1h, 3000 r/min离心20 min, 取上清-80℃冰箱保存待用。HB组患儿30例, 均经病理确诊, 其中男19例、女11例, 年龄2~70个月, 平均 40 ± 16 个月, 采样前未接受任何治疗; SIRS组患儿20例, 男12例、女8例, 年龄6~84个月, 平均 47 ± 20 个月; 正常组儿童20例, 男10例、女10例, 年龄6~72个月, 平均 38 ± 18 个月。3组的年龄、性别构成比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

1.2 SELDI-TOF-MS 筛选血清差异性蛋白质

弱阳离子磁珠 (MB-WCX) 处理血清样本后, 设置SELDI-TOF-MS参数: 最高分子量为30000Da, 最佳状态为2000~20000 Da、最佳激光强度为190、最佳灵敏度为7。将结合好待测样品的蛋白质芯片装入SELDI-TOF-MS中进行检测, 对血清差异性蛋白质进行筛选。在Bioprocessor平台分析, 得到样本中蛋白质的质合比 (m/z) 及其对应的蛋白质峰值, 将 m/z 差异 $<0.3\%$ 的归为同一类。对所得数据进行Wilcoxon秩和检验, 分析HB组与正常组之间的数据, 得到 m/z 相同、对应峰值不同的差异性蛋白质; 同时分析正常组与炎症组之间的数据, 得到 m/z 相同、对应峰值不同的差异性炎症蛋白质, 排除炎症因子对HB组与正常组结果的干扰。

1.3 MALDI-TOF-MS 鉴定目标蛋白质

SDS-PAGE分离出目标蛋白质后, 酶解目标蛋白质, 抽取上清液。使用Nano HPLC将上清液打在蛋白芯片上, 将蛋白芯片装入MALDI-TOF-MS, 检测酶解后的肽段, 应用Mascot搜索软件, 在SwissProt数据库中查找相匹配的蛋白。

1.4 RT-PCR 和 ELISA 验证目标蛋白质的表达

提取HB组和正常组血清的RNA, 使用Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, 以RNA为模板合成first-strand cDNA。在Real-time PCR过程中使用Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes检测两组的first-strand cDNA扩增情况, 分析目标蛋白质表达。PCR过程中目标蛋白载脂蛋白A-I (Apo A-I) 的引物: Forward ACAGCGTGACCTCCACCTT; Reverse CTTGCTCATCTCCTGCCTCA。PCR反应使用两步法, 计算目标蛋白基因/ β -actin的比值。

ELISA检测HB组和正常组血清中Apo A-I蛋白质表达。首先配制Apo A-I冻干标准品, 两组各取10个血清样品进行检测。酶标仪调整到450 nm, 读出各孔吸光值, 根据标准品的吸光值绘制出标准曲线, 计算待测样品的实际浓度。

1.5 统计学分析

使用SPSS 17.0软件进行统计学处理。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理采用 t 检验、Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HB组与正常组的筛选结果

HB组和正常组质谱数据经过标准化处理,得到各自的m/z及其峰值,采用Wilcoxon秩和检验对两组数据进行分析,得到差异性峰值10个:HB组高表达的蛋白质峰值有4个,低表达的蛋白质峰值有6个。经过SVM筛选出Youden指数最高的组合模型,得到m/z 9348 Da的蛋白标记物,该标记物在HB组的表达强度(29 ± 20)低于正常组(2037 ± 882),差异有统计学意义($t=2.8841, P<0.05$)。见图1。

2.2 炎症组与正常组的筛选结果

炎症组与正常组的质谱数据经过统计学分析,得到差异性峰值10个:炎症组高表达的峰值6个,低表达的4个。经过SVM筛选出Youden指数最高的组合模型,得到m/z 5833Da的蛋白质标记物,它在炎症组表达强度(1283 ± 943)高于正常组($78 \pm 75; t=2.9891, P<0.01$)。见图2。

2.3 排除炎症因子的干扰

应用SELDI-TOF-MAS分别在HB组与正常组、炎症组与正常组得到差异性峰值,通过比较,m/z 9348Da的蛋白质标记物在炎症组未找到相似值,表明m/z 9348Da的蛋白质为肝母细胞瘤血清生物学标记物。

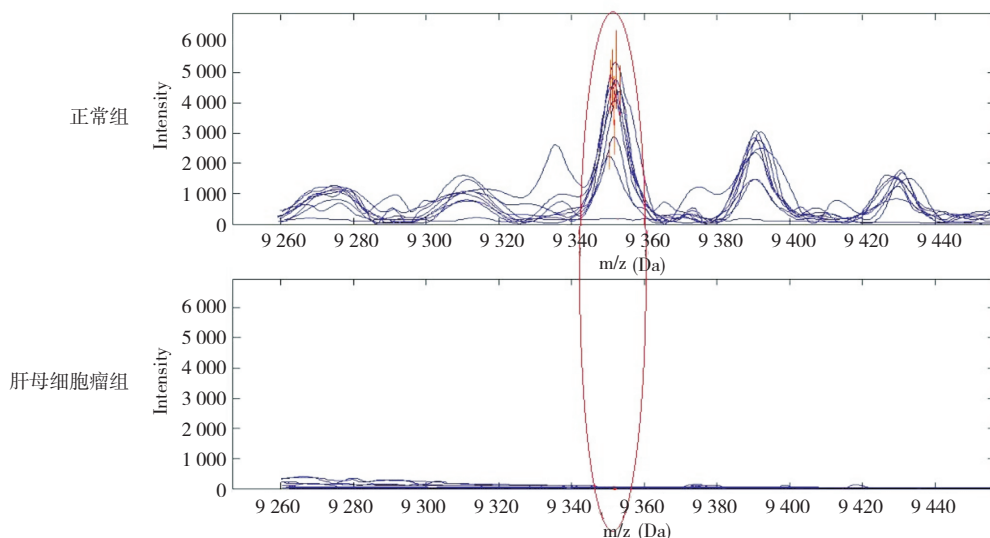


图1 肝母细胞瘤组与正常组的筛选结果 质合比峰值9348Da的蛋白质(红色椭圆形标示)在肝母细胞瘤组低表达;在正常组高表达。

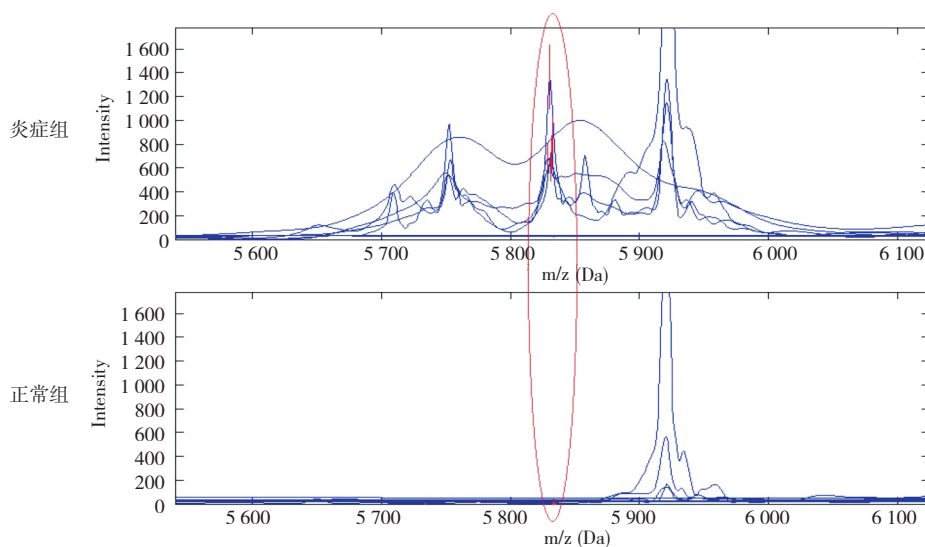


图2 炎症组与正常组的筛选结果 质合比峰值5833Da的蛋白质(红色椭圆形标示)在炎症组高表达,在正常组低表达。

2.4 目标蛋白质的鉴定

凝胶电泳分离血清标本中 m/z 9348Da 的目标蛋白质后,于胶体上显示目标条带,根据筛选所得峰值结果,切除相应目标条带,进行酶解,应用 MALDI-TOF-TOF 对酶解后的蛋白质片段进行质谱分析,获得各种蛋白质片段的氨基酸序列(表

1),将这些蛋白质片段的氨基酸序列进行匹配重组,获得完整的氨基酸序列(表 2)。应用 Mascot 搜索软件,在 SwissProt 数据库中查找与之相匹配的蛋白质,结果显示 m/z 9348Da 的蛋白质与 Apo A-I 的覆盖率为 45.0%,匹配得分 88 分。

表 1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析目标蛋白质片段的氨基酸序列

质合比(Da)	蛋白名称	鉴定的蛋白肽段	蛋白序列
9348	Apolipoprotein A-I	K.WQEEMELYRQK.V	KWQEEMELYRQKVEPLRAE
		R.QKVEPLR.A	LQEGARQKLHELQEKLSPLGE
		R.AELQEGARQK.L	EMRDRARAHVDALRTHLAPY
		K.LSPLGEEMR.D	SDELQRQLAARLEALKENG
		R.AHVDALR.T	
		R.THLAPYSDEL.R.Q	
		R.LAARLEALK.E	

表 2 目标蛋白质的完整序列

质合比(Da)	蛋白名称	蛋白序列	覆盖率	得分
9348	Apolipoprotein A-I	WQEEMELYRQKVEPLRAELQ EGARQKLHELQEKLSPLGEE MRDRARAHVDALRTHLAPYS DELQRQLAARLEALK	45.0%	88

2.5 RT-PCR 和 ELISA 验证 Apo A-I 的表达

为了验证 MALDI-TOF-TOF 鉴定的目标蛋白质,选取 HB 组及正常组各 15 例,使用实时荧光定量 PCR 对其血清标本的 Apo A-I 基因进行检测。Real-time PCR 分析显示, Apo A-I 基因在肿瘤组低表达,在正常组高表达;通过相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,正常组表达量设为 1, HB 组表达量则为

0.5 ± 0.2 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

同时,本研究从肿瘤组及正常组各选取 15 例血清标本,使用 ELISA 法进行 Apo A-I 蛋白表达检测, HB 组 Apo A-I 蛋白质浓度 [(0.19 ± 0.04) mg/mL] 低于正常组 [(1.00 ± 0.24) mg/mL], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

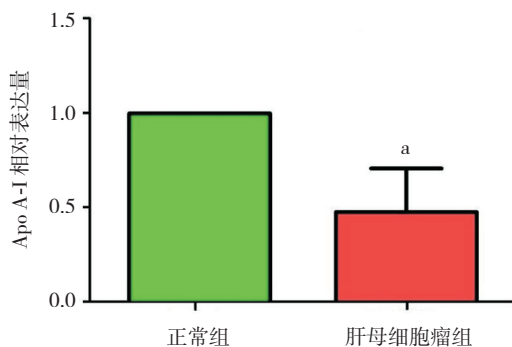


图 3 Real-time PCR 检测 Apo A-I 基因表达 a 示与正常组比较, $P < 0.05$ (PCR 数据使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析,故正常组表达量为 1)。

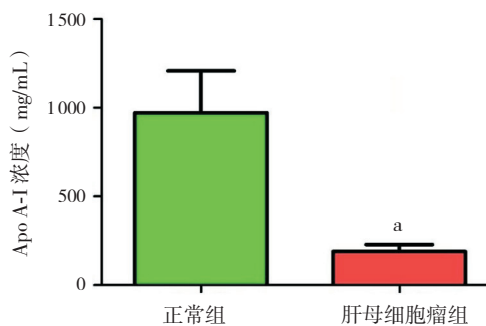


图 4 ELISA 检测 Apo A-I 蛋白质浓度 a 示与正常组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

蛋白质组学研究的目的是发现新的肿瘤标记物,将之应用于癌症发生发展机制研究,并为肿瘤防治提供最有效的手段。目前蛋白质组学已实现对复杂的蛋白质类物质进行定性和定量的研究。已有多种方法成功检测出肾母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌和乳腺癌等肿瘤的特异性标记物。血清蛋白质标记物可以提高肿瘤性疾病的早期诊断率以及治疗的安全性。

众多的炎症因子或炎性蛋白促进了肿瘤的发生发展,同时肿瘤的发生发展亦进一步诱导炎症反应,两者之间形成错综复杂的联系^[6-7]。炎症因子或炎性蛋白成为肾母细胞瘤等肿瘤的特异性蛋白标记物的干扰因素^[5],如血清高水平的 IL-10、IL-1、IL-6、TNF- α 与肾癌、结肠癌、口腔癌等有关^[8-10]。为克服此类难题,我们在进行肿瘤特异性标记物的研究时,需进一步排除炎症因子或炎性蛋白的干扰。

Apo A-I 是 Apo A 的一个亚类, HDL 中最重要的结构蛋白, Apo A 家族中最多的组分,占 HDL 的 80%~90%。人类的 Apo A-I 分子量为 28 kDa,是由 243 个氨基酸残基组成的多肽,主要由肝脏合成,部分由小肠合成,广泛表达于所有组织中。Apo A-I 参与脂类代谢的多个步骤,并影响人体的代谢和慢性疾病的发展过程。Apo A-I 可稳定脂蛋白的结构,调节脂蛋白的代谢,其结构与含量的异常可引起血脂代谢紊乱,并引发高血压、胰岛素抵抗等多种病理变化。研究发现,早期卵巢癌血清中存在特异性生物学标记物 Apo A-I,经验证这种标记物能够作为早期卵巢癌的诊断指标^[11]。使用这种标记物干预卵巢癌裸鼠模型,能够提高裸鼠的生存率^[12]。以此为基础,该机构设计了一组长度为 18 个氨基酸的短肽,称之为 Apo A-I 模拟肽^[13],这组模拟肽包含几种亚型(2F, 3F, 4F, 5F, 6F 和 7F),它们的螺旋结构与 Apo A-I 相同,都能够衍生抗氧化和结合油脂。进一步研究发现^[14],名为 L-4F 的 Apo A-I 模拟肽通过调节缺氧诱导因子的表达,抑制血管内皮生长因子和肿瘤血管的生成,诱导卵巢癌细胞的凋亡,达到治疗卵巢癌的目的。Apo A-I 已经作为早期卵巢癌的血清生物学标记物,那么它是否有可能用于儿童肝母细胞

瘤的早期诊断呢?

我们应用 SELDI-TOF-MS 技术,对 HB 患儿、炎症患儿及正常儿童血清进行检测,排除炎症因子和炎性蛋白的干扰后,筛选出 m/z 峰值为 9 348Da 的肝母细胞瘤血清蛋白质生物标记物,并发现此种蛋白质在肝母细胞瘤患儿低表达,在正常儿童高表达。SDS-PAGE 技术分离血清中的目标蛋白质,获得 m/z 9 348Da 的目标蛋白质;酶解该蛋白质得到相关肽段,通过 MALDI-TOF-MS 技术鉴定这些肽段的序列,在 SwissProt 数据库中进行比对分析,与之相匹配的蛋白质是 Apo A-I。通过 RT-PCR 检测术前肝母细胞瘤患儿和正常儿童血清中 Apo A-I 基因的表达,以及 ELISA 技术检测两者血清中 Apo A-I 蛋白表达,进一步验证了 Apo A-I 在肝母细胞瘤患儿低表达,在正常儿童高表达。由此可见, Apo A-I 能够作为肝母细胞瘤的血清蛋白质生物标记物,这种生物标记物对于肝母细胞瘤的早期诊断可能有着重大的意义。

本研究筛选、确定了 Apo A-I 可能作为 HB 的血清特异性蛋白质标记物,尚需要进一步的临床实践证实其特异性与敏感性,并进一步研究 Apo A-I 与肝母细胞瘤发生发展的关系,以确定 Apo A-I 在肝母细胞瘤发病机制中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Xiong XL, Qin H, Yan SQ, et al. Expression of glypican-3 is highly associated with pediatric hepatoblastoma: a systemic analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(3): 1029-1031.
- [2] Ismail H, Broniszczak D, Kaliciński P, et al. Changing treatment and outcome of children with hepatoblastoma: analysis of a single center experience over the last 20 years[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(7): 1331-1339.
- [3] Baertschiger RM, Ozsahin H, Rougemont AL, et al. Cure of multifocal panhepatic hepatoblastoma: is liver transplantation always necessary[J]. *J Pediatr Surg*, 2010, 45(5): 1030-1036.
- [4] Silberring J, Ciborowski P. Biomarker discovery and clinical proteomics[J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2010, 29(2): 128-140.
- [5] Kelly-Spratt KS, Pitteri SJ, Gurley KE, et al. Plasma proteome profiles associated with inflammation, angiogenesis, and cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19721.
- [6] Chechlinska M, Kowalewska M, Nowak R. Systemic inflammation as a confounding factor in cancer biomarker discovery and validation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1): 2-3.
- [7] Hou JM, Zhao X, Tian L, et al. Immunotherapy of tumors with recombinant adenovirus encoding macrophage inflammatory protein 3b induces tumor-specific immune response in

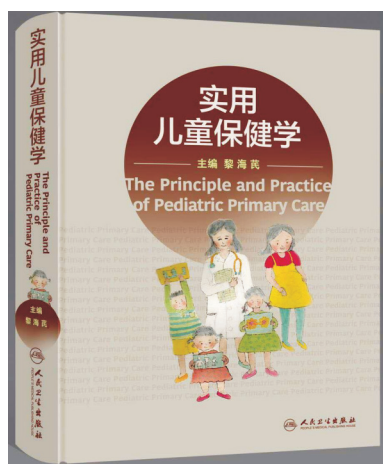
- immunocompetent tumor-bearing mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(3): 355-363.
- [8] Yoo KH, Lee DG, Won KY, et al. Expression of CC chemokine receptor 5 in clear cell renal cell carcinoma and its clinical significance[J]. Oncol Lett, 2015, 9(5): 2085-2089.
- [9] van Grevenstein WM, Hofland LJ, van Rossen ME, et al. Inflammatory cytokines stimulate the adhesion of colon carcinoma cells to mesothelial monolayers [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52 (10): 2775-2783.
- [10] Kotowicz B1, Kaminska J, Fuksiewicz M, et al. Clinical significance of serum CA-125 and soluble tumor necrosis factor receptor type I in cervical adenocarcinoma patients[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(4): 588-592.
- [11] Zhang J, Guo F, Wang L, et al. Identification of apolipoprotein C-I as a potential Wilms' tumor marker after excluding inflammatory factors[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 16186-16195.
- [12] Su F, Kozak KR, Imaizumi S, et al. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(46): 19997-20002.
- [13] Zhang J, Hu Q, Guo F, et al. Screening and identification of post-traumatic stress-related serum factors in children with Wilms' tumors[J]. Oncol Lett, 2016, 11(2): 1299-1304.
- [14] Gao F, Chattopadhyay A, Navab M, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides inhibit expression and activity of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cell lines and a mouse ovarian cancer model[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 342(2): 255-262.

(本文编辑: 俞燕)

· 消息 ·

《实用儿童保健学》新书出版

主编: 黎海芪
副主编: 毛萌、李辉、徐秀、金星明
秘书: 胡燕



北京·人民卫生出版社

全书较全面涉及适合儿童保健临床实际内容, 约100万字, 共七篇三十三章, 设立总论、体格生长育与相关疾病、神经心理行为发育与相关疾病、儿科遗传性疾病诊断与鉴别儿童营养、环境与健康与疾病预防等内容, 约480幅图(多为彩图)、360个表格。为让读者概念清晰, 增加“研究状况与发展史”、“流行病学资料”、

“保健措施”、“健康教育”等内容; 为保证本书质量, 编委专家教授亲自撰写、确认书稿内容; 以最新、最权威文献、指南为本书的理论与操作依据, 更新部分概念或补充内容。按年龄分期描述儿童体格生长、神经心理行为发育与儿童营养特点; 临床症状、疾病诊断尽可能采用流程图、表格描述, 或图、表格结合, 更能体现“实用”, 便于读者学习形象直观; 基础知识与临床结合, 强调预防与健康教育, 协助专科医生加强社区的疾病管理, 体现儿童保健专业的学术水平; 撰写形式增加“导读”与“专家意见”, 有助读者了解重点内容与误区; 启发性思维, 将专家多年的经验和理论写入本书, 帮助识别疾病, 了解预后(或严重性)、积极处理(包括转诊), 减少误诊、漏诊。

参加撰写的专家均为国内顶级专家, 编委阵容强大, 15位儿童保健专家、6位发育-行为儿科专家外; 因儿童保健专业与其他专业有知识交叉, 特聘请8位相关专业的领军教授与专家参与本书撰写, 如新生儿专业、儿科神经专业、儿科消化专业、儿科皮肤科专业、儿科内分泌专业、儿科免疫学专业以及营养学专业等。专家们精心撰写, 反复修改、补充, 历时30月, 将由人民卫生出版社出版。

网购: 当当、京东网站