

• 论 著 •

iTRAQ 多重标记串联质谱技术在乳腺癌细胞侵袭患者 HGF 表达中的应用*

何树泉, 匡文斌, 舒少伟, 刘为东

(广东省深圳市龙华区中心医院检验科, 广东深圳 518110)

摘要:目的 探讨 iTRAQ 多重标记串联质谱技术应用于检测乳腺癌细胞侵袭患者肝细胞生长因子(HGF)表达差异的临床价值。方法 选择该院 2014 年 1 月至 2016 年 10 月收治的 35 例乳腺癌患者与 30 例健康者为研究对象,通过 iTRAQ 标记、质谱检测、搜库以及 Scqfold 软件分析不同临床分期乳腺癌患者与健康者血清 HGF 表达差异,并用 Western blot 验证 HGF 的差异表达。结果 该研究血清样品中共鉴定出蛋白 237 个,达到严格定量标准的蛋白 89 个,乳腺癌患者与健康者共筛选出包括 HGF 在内的差异表达蛋白 17 个;iTRAQ 多重标记串联质谱图谱显示,乳腺癌患者血清 HGF 表达水平显著高于健康者,差异有统计学意义($P < 0.05$);Western blot 结果显示,不同临床分期 HGF 相对表达水平显著高于健康者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 iTRAQ 多重标记串联质谱技术有助于发现乳腺癌患者癌细胞高表达 HGF,对指导临床治疗乳腺癌具有重要意义。

关键词:乳腺癌; iTRAQ 标记; HGF; 蛋白质组学; Western blot

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)19-2683-03

Application of iTRAQ multiplex tandem mass spectrometry in the expression of HGF in breast cancer cell invasion*

HE Shuquan, KUANG Wenbin, SHU Shaowei, LIU Weidong

(Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Longhua District of Shenzhen City in Guangdong Province, Shenzhen, Guangdong 518110, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of iTRAQ multiplex tandem mass spectrometry in the detection of the expression of hepatocyte growth factor(HGF) in patients with invasive breast cancer. Methods A total of 35 patients with breast cancer and 30 healthy subjects were selected from January 2014 to October 2016 in this hospital, the expression of serum HGF in breast cancer patients with different clinical stages and healthy subjects was analyzed by iTRAQ labeling, mass spectrometry, library searching and Scqfold software, and the differential expression of HGF was verified by Western blot. Results A total of 237 proteins were identified in the serum samples of this study, and 89 proteins with strict quantitative criteria, 17 differentially expressed proteins, included HGF, were screened for breast cancer patients and healthy controls. iTRAQ markers showed that the expression level of serum HGF in different clinical stage of breast cancer patients was significantly higher than that in healthy subjects($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the relative expression level of serum HGF in breast cancer patients was significantly higher than that in healthy subjects($P < 0.05$). Conclusion iTRAQ multiplex tandem mass spectrometry is useful for the detection of breast cancer patients with high expression of HGF, which is of great significance in guiding the clinical treatment of breast cancer.

Key words: breast cancer; iTRAQ marker; HGF; proteomics; Western blot

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,且发病率呈逐年上升趋势。临床观察发现,多数患者首次就诊时肿瘤已经发生了侵袭和转移,临床分期处于中晚期,给临床治疗带来困难的同时,患者存活率也受到明显影响^[1]。在目前已有的研究报道中,乳腺癌细胞发生侵袭与转移的具体机制尚无明确解释。多数学者认为,揭示乳腺癌发生侵袭与转移的相关机制对治疗乳腺癌具有重要意义^[2]。相关研究发现,由细胞间质产生的多功能细胞因子——肝细胞生长因子(HGF)通过特异性结合其受体 c-Met,在包括乳腺癌在内的许多实体瘤的生长、侵袭以及转移中扮演重要角色,HGF 的高表达可能与乳腺癌细胞的侵袭、转移以及患者预后关系紧密^[3-4]。本研究基于 iTRAQ 多重标记串联质谱技术和生物信息学,对 HGF 促进乳腺癌细胞侵袭进行了鉴定和分析,旨在阐明其表观遗传调控机制,为乳腺癌的基因治疗提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入对象为本院在 2014 年 1 月至 2016 年 10 月收治的 35 例乳腺癌患者与同期在本院进行健康体检的 30 例健康者。35 例乳腺癌患者均为女性,年龄 31~54 岁,平均(38.4±4.2)岁,TNM 肿瘤分期:I 期 11 例,II 期 14 例,III 期 6 例,IV 期 4 例。纳入标准:(1)符合乳腺癌诊断标准;(2)经实验室和病理检验确诊;(3)浸润性导管癌者;(4)能够配合本研究者。排除标准:(1)合并心脑血管病者;(2)合并神经系统疾病者;(3)合并精神疾病者;(4)合并血液系统疾病者;(5)不能配合完成本研究者。30 例健康者均为女性,年龄 18~60 岁,平均(39.0±6.7)岁。比较乳腺癌患者与健康者的年龄等基本资料,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 试剂与仪器 Genway Seppro-TM 层析柱, Ziptip 层析柱, Agilent 1100 series 液相色谱仪, Magic C18AQ 反相色谱

* 基金项目:广东省深圳市龙华新区科技计划项目(2013087)。

作者简介:何树泉,男,主管技师,主要从事免疫检验学研究。

柱,伯乐凝胶成像系统,三氯乙酸 TCA,胰蛋白酶,丙酮。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质提取、浓度测定及消化 用层析柱(型号:Genway Seppro-TM, 厂家:Genway Biotech, Inc)去除高峰蛋白,加入三氯乙酸 TCA 使蛋白变性沉淀;采用 Bradford 法测定蛋白浓度;定量后进行还原烷基化,加入丙酮使蛋白沉淀,复融后加入胰蛋白酶酶解。

1.3.2 iTRAQ 标记和高效液相色谱法(HPLC)肽段分离 将纳入的研究对象分为 5 组,即 iTRAQ-健康组($n=30$)、iTRAQ-I 期乳腺癌组($n=11$)、iTRAQ-II 期乳腺癌组($n=14$)、iTRAQ-III 期乳腺癌组($n=6$)、iTRAQ-IV 期乳腺癌组($n=4$),每组样品对应 1 相对分子质量;加入适当体积异丙醇混匀,然后加入样品液中于室温下反应 2 h 完成标记,合并标记好的样品;标记后的样品除盐后加入缓冲液 A(25% 乙腈含 10 mmol KH_2PO_4 , pH 3.0),用 Agilent 1100 series 液相色谱仪进行自动梯度洗脱;得到的组分加入至强阳离子交换层析柱(SCX, 200 A, 4.6 mm, 250.0 mm)分离。

1.3.3 MS/MS 鉴定 样品用层析柱(Ziptip)脱盐,然后使用 Magic C18AQ 反相色谱柱(200 A, 0.2 mm, 150.0 mm)分离,ESI-QTOF-MS 分析;数据分析采用 Data Analysis 4.0 软件(Bruker);采用 MASCOT 2.2 搜库以及 Scaffold 软件分析,变化倍数 >2.0 为显著差异。

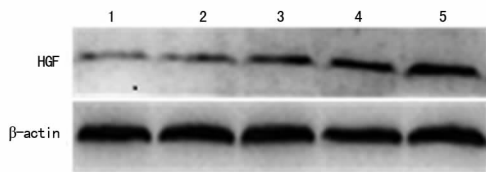
1.3.4 Western blot 验证 提取蛋白后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),依次进行转膜、封闭、抗体反应、ECL 显色、凝胶成像系统显像,最后进行数据收集。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 对研究所得数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白鉴定结果 本研究血清样品中鉴定出蛋白 237 个,其中 89 个蛋白达到严格定量标准。乳腺癌患者与健康者共筛选出差异表达蛋白 17 个,HGF 为其中表达差异较大的一个蛋白验证。

2.2 iTRAQ 多重标记串联质谱图谱结果 iTRAQ 多重标记串联质谱图谱结果显示,不同临床分期乳腺癌患者血清 HGF 表达水平显著高于健康者,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



注:1 表示健康者;2 表示 iTRAQ-I 期乳腺癌;3 表示 iTRAQ-II 期乳腺癌;4 表示 iTRAQ-III 期乳腺癌;5 表示 iTRAQ-IV 期乳腺癌。

图 1 iTRAQ 多重标记串联质谱图谱结果

2.3 Western blot 验证结果 健康者血清 HGF 相对表达量为 1.41 ± 0.05 ,iTRAQ-I 期乳腺癌患者血清 HGF 相对表达量为 6.04 ± 0.21 ,iTRAQ-II 期乳腺癌患者血清 HGF 相对表达量为 6.45 ± 0.37 ,iTRAQ-III 期乳腺癌患者血清 HGF 相对表达量为 7.11 ± 0.53 ,iTRAQ-IV 期乳腺癌患者血清 HGF 相对表达量为 8.04 ± 0.47 。不同临床分期乳腺癌患者 HGF 相对表达量均明显高于健康者,差异均有统计学意义($P<$

0.05)。

3 结论

随着人们生活方式的改变以及临床诊断技术的不断进步,乳腺癌的发病率与确诊率呈现出不断上升的趋势。但由于乳腺癌发生转移、侵袭的相关生理机制尚无准确定论,因此,乳腺癌的早期诊断和治疗面临较大困难。近年来相关研究指出,许多细胞因子参与了乳腺癌的生长、侵袭以及转移过程,可能为乳腺癌的早期诊断以及治疗提供参考意见^[5]。

HGF 作为其中一种细胞因子研究较多。有研究表明,HGF 在肿瘤细胞生长、侵袭、转移以及肿瘤血管形成中具有促进作用^[6-7]。国外学者报道指出,乳腺癌患者与健康者相比,其组织以及血液中 HGF 表达水平明显升高,其中又以淋巴结转移患者和肝转移患者 HGF 为最高^[8]。已有研究证实,乳腺癌组织中 HGF 的表达明显高于癌旁组织和正常组织,且 HGF 表达水平与肿瘤的复发以及患者预后具有密切关系^[9]。众所周知,肿瘤的生长和转移依靠血管的形成,而 HGF 对上皮细胞的增生以及运动都具有较强的促进作用,从而促进新生血管的形成,因此,有研究通过体外实验证实了 HGF 参与并促进肿瘤细胞侵袭的过程。如 Lee 等^[10] 研究显示,HGF 促进膀胱癌细胞侵袭的过程。c-Met 是 HGF 的特异性受体,在肿瘤中 HGF 主要与肿瘤细胞的 c-Met 结合,通过 HGF/c-Met 信号途径,激活受体酪氨酸激酶,发挥促进肿瘤生长及血管形成的作用^[11]。因此,临床推断 HGF 和 c-Met 参与了肿瘤的发生和发展,并起到了重要作用,阻断 HGF/c-Met 系统的信号转导可能成为抗肿瘤基因治疗潜在的新策略^[12]。

目前,关于 HGF 促进乳腺癌细胞侵袭的具体调控网络机制尚不清楚,有待进一步的研究。为系统性研究 HGF 促进乳腺癌细胞侵袭的具体调控作用,本研究采用 iTRAQ 多重标记串联质谱技术探讨乳腺癌细胞侵袭患者 HGF 表达的差异。iTRAQ 多重标记串联质谱技术是一种新的、高通量的蛋白质鉴定技术,可同时对 8 种样品进行蛋白质分析,蛋白质水解后的肽段则可通过 iTRAQ 试剂进行标记,串联质谱方法则可以对肽段进行鉴别和定量^[13]。研究指出,iTRAQ 多重标记串联质谱技术能够得到 500~600 种蛋白和不同样本间蛋白质表达差异并分析蛋白功能^[14-15]。

本研究中,iTRAQ 标记图谱结果显示,乳腺癌患者血清 HGF 表达水平显著高于健康者,Western blot 亦对乳腺癌患者血清 HGF 与健康者血清 HGF 表达水平进行了验证,显示二者结果互相吻合,提示 HGF 在乳腺癌细胞的侵袭过程中扮演重要作用。因此,基于 iTRAQ 多重标记串联质谱技术的乳腺癌细胞侵袭全基因组蛋白组学研究,有助于充分了解乳腺癌的病理机制,从而为乳腺癌新的治疗靶点的选择、靶向治疗药物的开发提供参考价值。

参考文献

- [1] 陈万青,郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床,2015,42(13):668-674.
- [2] 张开炯,罗政莲,张毅,等. 长链非编码 RNA 在乳腺癌侵袭转移中的研究进展[J]. 临床检验杂志,2016,34(1):45-48.
- [3] Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine[J]. Proc JP Acad Ser (下转第 2687 页)

明丙泊酚麻醉后能减轻免疫功能抑制,能尽早恢复至麻醉前状态。有研究显示,丙泊酚对机体有抑制应激反应,能抑制癌细胞破坏肝癌单核细胞,减少癌细胞转移率^[7-8]。

IL-2 使 T 细胞产生免疫调节因子,其能直接作用于肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长,而本研究结果显示 IL-2 水平无明显变化,说明在应激状态大小上两种麻醉方法相近。IL-6 诱使淋巴细胞、单核巨噬细胞产生,能促进肿瘤增殖,作为神经-内分泌-免疫功能重要介质,在启动内源性全身炎性反应上有重要作用,但其水平和炎性反应程度及持续时间呈正相关^[9]。本研究结果显示,随着麻醉时间延长,IL-6 水平显著增高,但丙泊酚麻醉后 IL-6 水平在术后 24 h 显著下降,这可能是由于丙泊酚能刺激外周血单核细胞合成,释放 IL-6,抑制 IL-6 中性粒细胞凋亡障碍,避免机体炎性反应过度增加^[10-11]。

TNF- α 能直接造成肿瘤细胞死亡,和干扰素有协同作用,能共同杀死肿瘤细胞,麻醉后因应激反应激活单核巨噬细胞^[12],造成其水平增高,但丙泊酚升高不显著,麻醉 24 h 后基本恢复至麻醉诱导前,这说明丙泊酚麻醉对肝癌患者免疫功能影响较低。

综上所述,七氟醚和丙泊酚对原发性肝癌围术期免疫功能均有抑制作用,能激活应激反应,但丙泊酚静脉麻醉在抑制免疫功能程度上相对较轻,应激反应较小,故可作为原发性肝癌常规麻醉方法。

参考文献

[1] 刘江,王素洁,王景丰. 两种麻醉方法对原发性肝癌围术期免疫学指标的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(3): 382-384.

[2] 钟国成,吴超群,陈青,等. 高强度聚焦超声治疗肝癌的免疫学效应及影像学评估[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2014, 36(9): 709-713.

[3] 王明鑫,袁庆忠,赵希学,等. 射频联合脐血细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肝癌免疫学分析[J]. 中国医疗前沿, 2012, 1(16): 7-8.

[4] 原志军,殷振奎,原志芳,等. 全凭静脉麻醉与吸入麻醉对口腔恶性肿瘤患者免疫细胞的影响研究[J]. 中国医师杂志, 2012, 14(5): 628-630.

[5] 吴寒. 全麻联合硬膜外麻对结肠癌手术患者免疫功能的影响[J]. 医学临床研究, 2016, 33(9): 1764-1766.

[6] 王有恒. 不同麻醉方式对恶性肿瘤患者围麻醉期 T 淋巴细胞亚群的影响分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(11): 1991-1992.

[7] 王臻,李晓帆,王晖,等. 深麻醉对行腹腔镜胃癌根治术患者血气及免疫功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(14): 1577-1579.

[8] 武苗. 七氟醚对老年胃癌患者围术期免疫功能的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2015.

[9] 段立杰. 不同麻醉方法对胃癌手术患者细胞免疫功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(4): 374-375.

[10] 任凌云,杨进国,曾文强. 七氟烷吸入和丙泊酚静脉维持对腹部手术老年患者免疫功能及血流动力学的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(9): 927-928.

[11] 王言武. 2 种不同麻醉方法对腹腔镜结肠癌患者围术期细胞免疫及 IL-6 的影响[J]. 实用癌症杂志, 2015, 9(3): 355-358.

[12] 高峰,吴震. 不同麻醉方式对胃癌根治术患者 Th1/Th2 平衡的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 7(4): 405-408.

(收稿日期:2017-04-03 修回日期:2017-05-21)

(上接第 2684 页)

B Phys Biol Sci, 2010, 86(6): 588-610.

[4] Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice[J]. Hepatology, 2012, 55(4): 1215-1226.

[5] 斯诚. 血清肝细胞生长因子和转化生长因子- β 在乳腺癌血清中的表达及临床意义[J]. 实用预防医学, 2014, 21(6): 747-749.

[6] Scagliotti GV, Novello S, von Pawel J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology[J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(7): 793-801.

[7] 谷光福,朱正秋. MACC1, HGF, c-Met 与妇科恶性肿瘤的相关性研究[J]. 徐州医学院学报, 2016, 36(1): 208-210.

[8] Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer[J]. Br J Cancer, 2012, 107(5): 793-799.

[9] Veenstra C, Pérez-Tenorio G, Stelling A, et al. Met and its ligand HGF are associated with clinical outcome in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 1-15.

[10] Lee YH, Apolo AB, Agarwal PK, et al. Characterization of HGF/Met signaling in cell lines derived from urothelial carcinoma of the bladder[J]. Cancers, 2014, 6(4): 2313-2329.

[11] Miekus K. The Met tyrosine kinase receptor as a therapeutic target and a potential cancer stem cell factor responsible for therapy resistance (Review)[J]. Oncol Rep, 2017, 37(2): 647-656.

[12] Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(6): 553-572.

[13] 孟永梅. iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术在蛋白质组学中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(4): 795-798.

[14] 李鹏飞,王燕,陶蓓蓓,等. 稳定同位素 iTRAQ 标记/高效液相色谱-串联质谱法同时定量分析人体中 42 种氨基酸及典型病例[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 762-767.

[15] 杨铭,林芳,和婷,等. Stathmin 表达水平与乳腺癌细胞侵袭能力相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 14-17.

(收稿日期:2017-04-01 修回日期:2017-05-19)