

思路与方法

浅谈蛋白质组学在中医药治疗肺癌研究中的应用

孙玺媛* 孙建立* 指导:刘嘉湘*

主题词 肺肿瘤/中医药疗法 蛋白质组学/方法

肺癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,其发病与环境因素及遗传因素的相互作用密切相关,涉及机体多个原癌基因被激活及抑癌基因失活,是细胞失去原有的生长分化调节而异常增生的结果,在这一转化过程中,有多种基因与蛋白质参与。由于基因的功能除了由排序决定外,还受多种因素的影响,而蛋白质不仅代表了基因的信息,而且是机体生理、病理功能的执行者,是生命活动的直接体现者。蛋白质功能一旦出现异常即可直接引发疾病,使机体表现出不同的症状及相应的理化指标的改变。原因在于一个细胞所使用的蛋白质处于不断变化之中,而药物作用的模式亦是蛋白质。近年来,在肺癌的蛋白质组学研究方面已经取得了令人欣慰的成绩。因此,在中医药治疗肺癌的研究过程中,应用蛋白质组学技术探讨肺癌的辨证分型标准、研究其作用机理及疗效评价具有十分重要的意义,为其提供科学、客观的现代医学生物学物质证据。

1 蛋白质组学及其技术

蛋白质组意指一个细胞或组织所表达的全部蛋白质。蛋白质组学是通过生物化学方法对蛋白质在特定的时间或特定的条件下的表达进行大规模研究的科学,从组织细胞的整体蛋白质水平揭示生命活动的基本规律,获得对细胞生理、病理过程及调控网络的全面而深入的认识。蛋白质是细胞的功能单位,其表达反映细胞当前功能状态,除了细胞基因组成可决定蛋白质表达,细胞内因素及机体内环境因素均可通过影响基因而调控蛋白质表达,也可直接影响蛋白质表达。由 DNA 转录的 mRNA 丰度与 mRNA 翻译成的蛋白质间的相关性不明显, mRNA 表达水平不能代表细胞中活化蛋白的数量,这是由于转录能由多种方式修饰而产生不同类型蛋白,并且翻译后修饰对蛋白质的功能和活性有重要作用,因此,蛋白质的表达或功能常不能

通过分析核酸来预测。研究表明一个基因的蛋白质产物数量在人类有 3 个以至 6 个以上,应用蛋白质分析技术分析全蛋白质组,对细胞的生理、病理状态将会有更本质的了解。

蛋白质组学所应用的核心技术目前主要是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)和质谱分析及生物信息分析技术。

蛋白质组学的分离技术首先是制备蛋白质样品,包括细胞制备与纯化,细胞裂解,蛋白质溶解、变性与还原以及取出非蛋白质组分等过程。而在肿瘤的蛋白质组学研究中,制备好的蛋白质样品是非常关键的,较好的方法是采用荧光标记的流式细胞术和激光捕获显微切割技术取材。蛋白质分离的核心技术是二维聚丙烯酰胺凝胶电泳,一维分离是以蛋白质电荷差异为基础而二维分离是以分子量不同为基础。蛋白质样品经过变性、分离后,再进行染色(考马斯亮兰染色、银染、荧光染色),通常每块胶可显示 1000~3000 蛋白点,最好的胶可以得到 10000 个以上蛋白质样点。

将双向凝胶电泳得到的蛋白斑点切下,经脱色、洗涤、脱水、胰蛋白酶消化,然后上样于质谱仪分析,经特殊的软件和因特网上蛋白质组数据库进行分析鉴定。通过差减处理,可展示不同来源的蛋白质样本间的差异,如生理和病理状态下以及治疗前后一些蛋白质表达差异,对感兴趣的蛋白质可根据其等电点和分子量及质谱技术加以确认,获得肽质指纹图,再与数据库中理论上蛋白质消化后所预测的肽质量比较,可推测该蛋白质种类。如蛋白质或多肽不能与数据库中已知序列相配,则需设计核苷酸探针以发现新的蛋白质和相应的基因。

由于蛋白质组具有“整体性”和“动态性”的特点,其研究对象的数量大、种类多,所积累的研究数据复杂多样,因此,数据库、计算机网络和软件工具用于这些数据的存储、管理与分析,是蛋白质组的研究不可缺少的信息学手段,即蛋白质组信息学。数据库包括蛋白质氨基酸序列数据库;蛋白质结构域与家族数据库;蛋白质高级结构及分类数据库;蛋白质 2DE 图谱数据库等

* 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科 上海市徐汇区宛平南路 725 号(200032)

收稿日期:2006-03-16

综合性²DE数据库和不同生物、不同器官、组织、细胞的专一性²DE数据库以及蛋白质相互作用数据库,并且还建立了蛋白质组学专门网站。蛋白质组研究中用到的软件工具主要有蛋白质双向电泳图谱分析软件、蛋白质鉴定工具、蛋白质的结构分析与功能预测工具等。

2 蛋白质组学在肺癌研究中的应用

蛋白质组学研究直接从蛋白质入手,可以全面、动态、定量地去观察肿瘤发生、发展过程中及治疗前后蛋白质种类、数量以及蛋白质空间结构的变化。肿瘤蛋白质组学研究不仅有助于进一步揭示恶性肿瘤的发病机制,亦可应用于发现能进行早期临床诊断的肿瘤标记物和寻找新的治疗靶标,便于疗效评价。

在肺癌蛋白质组学研究方面,已经取得了可喜的进步。国内的詹显全、陈主初等通过蛋白质组技术分析获得了人肺磷癌细胞NCI-H520蛋白组成分^[1]。W Ying等应用蛋白质组技术建立了R15细胞系蛋白质表达图,用于对比研究照射后诱导的BEP2D细胞系蛋白质组学分析^[2]。S Hanash等建立了肺癌和其他肿瘤的数据库^[3]。JM Oh等建立了肺癌的蛋白表达及其它相关的包括DNA微阵列来源的数据库^[4]。

蛋白质组学技术不仅应用于肺癌蛋白质组数据库的建立,而且已经应用于肺癌细胞蛋白质组学、组织蛋白质学、血浆和体液蛋白质学的研究,进而寻找肺癌早期标志物^[5,6],探讨肺癌的发病机制^[7]、病理分型、以及疗效评价、判断预后^[8,9]、寻找新的有效的治疗药物^[10]。

3 蛋白质组学技术在中医药治疗肺癌研究中的应用

蛋白质组学技术具有高通量、高精确、高灵敏的优点。中医理论认为,疾病的发生主要是人体整体功能的失调,强调应从整体观上认识疾病和进行辨证论治,蛋白质组学对于机体或组织,细胞全部蛋白质表达和功能进行研究,具有整体性,这个思路与概念和中医认识疾病的整体观有着趋同性,并且蛋白质组学技术已经用于中医证候学的研究即证候蛋白质组学,初步显示出良好的应用前景。谢文光^[11]应用蛋白质组学技术研究发现,热毒血瘀证大鼠血清与正常鼠血清比较,发现了13个差异蛋白点,用赤芍干预后,有6个点与正常组比较无显著性差异。马增春^[12]应用蛋白质组学技术研究表明,四物汤可使血虚证小鼠血清中下降的DNA依赖蛋白激酶、肌细胞增强蛋白、马达蛋白、肌动蛋白结合蛋白有所恢复。

因此,在中医药治疗肺癌研究中,在以下几个方面应用蛋白质组学技术能更好全面地体现中医学整体观

的特点,为中医药治疗肺癌提供新的科学依据,推动中医药治疗肺癌的现代化研究。

3.1 用于肺癌辨证分型的研究,为肺癌的辨证分型提供现代医学生物学的依据:辨证论治是中医药的精髓所在,而证候是辨证论治的依据。对于同一个肺癌患者,在疾病发展的不同阶段,即在不同的生理、病理状态下,表现为不同的证候,即同病异证。证候是疾病发展过程中某一阶段的病理实质概括,是机体内因和环境外因综合作用的机体反应状态,并随着病情的发展而相应的变化,证候有着明显的整体性和动态变化。证候变化必然有其特殊的物质基础,蛋白质或多肽是机体生理、病理等生命活动的执行者,因此,证候的变化必然是由蛋白质或多肽的变化而引起,如蛋白质或多肽的质、量以及空间构象的变化。中医药治疗疾病特色在于从整体上调节机体的功能状态,调节脏腑阴阳、气血的平衡,发挥机体的抗病能力,整个治疗过程是辨证的整体性与证候的动态性相结合、相互作用的过程,蛋白质或多肽的变化是证候动态变化的执行者。

导师刘嘉湘教授深入研究肺癌生理病理特点及证候演变规律,将肺癌分为阴虚内热型、气阴两虚型、脾虚痰湿型、阴阳两虚型、气滞血瘀型,并发现气虚以Ⅱ期患者为多,气阴两虚以Ⅲ期患者为主,阴虚及阴阳两虚以Ⅳ期患者为多,体现了根据证候学进行辨证分型与肺癌病情的进展及病理分期的不谋而合。由于蛋白质组学和证候学同样具有整体性和动态变化的特点,如果应用蛋白质组学技术研究临床各证型的血清或血浆蛋白质组学的变化,将为肺癌的辨证分型提供科学的、客观的物质依据。

3.2 用于中医药治疗肺癌机理的研究及疗效评价,开发新药:中医药治疗恶性肿瘤的疗效已经得到肿瘤学者的肯定,肿瘤的发生涉及癌基因的激活、抑癌基因的失活、凋亡抑制、免疫逃逸等多基因、多步骤、多层次的变化,是多种基因及其蛋白质相互作用的结果。但对中医药治疗肺癌及其它肿瘤的机理探讨往往是在生理学、病理学、免疫学等某一方面、某一角度指标改变的研究,缺乏整体性和全面性,而应用蛋白质组学技术研究肺癌宿主蛋白质组学的变化就克服了这一缺点,可从整体上全面地反应了中医药治疗肺癌的作用机理及作用的多靶点变化。中药复方是中医药治疗疾病的主要方法,也是中医学辨证观的具体体现,尤其是中药复方组分多,成分复杂,决定了其作用的靶点多。无论是西药还是中药,都必须通过作用于蛋白质而调节机体的生理、病理状态,使机体恢复协调、平衡、统一,使机

体的阴阳、气血恢复平衡。而中药复方在中医药治疗肺癌过程中应用最为广泛,通过蛋白质组学技术的高通量特点,能全面反映中药复方治疗肺癌的多靶点变化。通过对中医药干预前后,治疗组与对照组进行血清或血浆蛋白质组学,以及瘤组织蛋白质组学、细胞蛋白质组学进行比较,甚至瘤组织蛋白质组学与正常组织或细胞蛋白质组学进行比较,寻找差异蛋白或蛋白质表达量或空间构象的差异,从而发现中医药作用的靶点并对其机理进行探讨,判断疗效,更好地从整体观体现中医药治疗肺癌的多靶点,并以此为基础,设计开发治疗肺癌的新药。总之,蛋白质组学技术为探索中医药治疗肺癌的机理研究及疗效评价提供有力的工具和技术平台。

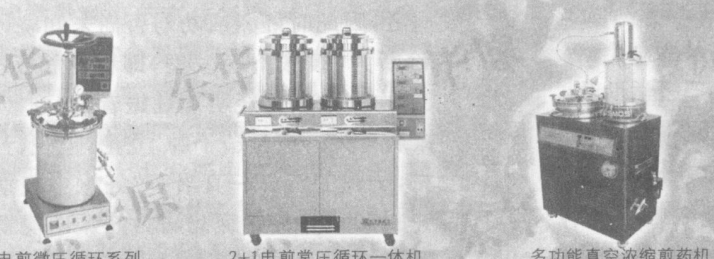
4 结语

蛋白质组学是继基因组研究之后的又一核心和具有广泛应用价值的学科,称为后基因组时代的“主力军”。蛋白质组学技术在中医药治疗肿瘤研究中的应用的报道很少,但蛋白质组学在寻找肿瘤标志物、发病机制的探讨、疗效评价方面已经取得了良好的成果。虽然在蛋白质提纯以及低丰度蛋白、疏水性蛋白的分离等方面,还存在着技术上的不足,相信伴随技术的进步及生命科学、生物信息学的发展,蛋白质组学技术在中医药治疗肺癌的研究中将发挥更好的作用。

参考文献

- 1 詹显全,程主初.双向凝胶电泳-飞行时间质谱法分析人肺鳞癌细胞 NCI-H520 蛋白质组成分.癌症,2001,20(6):575~582.

- 2 Ying Wantao, Zhang Kaitai, Qian Xiaohong, et al. Proteome analysis on an early transformed human bronchial epithelial cell line, BEP2D, after α -particle irradiation. Proteomics, 2003, 3(1):64~72.
- 3 Hanash S, Brichory F, Beer D. A proteomic approach to the identification of lung cancer markers. Dis Markers, 2001, 17(4):295~300.
- 4 Oh JM, Brichory F, Puravs E, et al. A database of protein expression in lung cancer. Proteomics, 2001, 1(10):1303~1319.
- 5 Chen Guoan, Gharib TG, Thoma DG, et al. Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. Proteomics, 2003, 3(4):496~504.
- 6 Chen Guoan, Gharib TG, Huang Chiangching, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. Clin Cancer Res, 2002, 8(7):2298~2305.
- 7 Chang JW, Jeon HB, Lee JH, et al. Augmented Expression of peroxiredoxin I in Lung Cancer. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(2):507~512.
- 8 Gharib TG, Chen Guoan, Wang Hong, et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. Neoplasia, 2002, 4(5):440~448.
- 9 Yanagisawa K, Shyr Y, Xu Baogang, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small cell lung cancer. Lancet, 2003, 362(9382):433~439.
- 10 Verrills NM, Kavallaries M. Drug resistance mechanisms in cancer cells: a proteomics perspective. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5(3):258~265.
- 11 谢文光,马晓昌,邵宁生,等.赤芍治疗热毒血瘀证的血清蛋白质组变化的初步研究.中国中西医结合杂志,2005,25(6):520~524.
- 12 马增春,高月,谭洪玲,等.四物汤对辐射致血虚证小鼠血清蛋白质表达的影响.中国中药杂志,2003,28(11):1050~1053.



电煎微压循环系列 2+1电煎常压循环一体机 多功能真空浓缩煎药机



煎药机
以旧换新

活动时间: 2006年7月1日—12月31日
活动范围: 任何品牌的客户均可参加此次活动



1+1型电煎常压循环一体机



电动挤压煎药机



2+1电煎微压综合台机

煎藥 國藥好伴侶 財源滾滾來

通过ISO9001:2000和ISO13485:2003认证的企业

● 国内煎药机行业的领军品牌

● 完善的产品营销体系

● 坚实的售后服务保障

● 低投入、高回报

● 稳定增长的用户群体

北京东华原医疗设备有限责任公司

电话: 010-89718013

传真: 010-89718021

地址: 北京市昌平科技园区振超路1号

邮编: 102200

网址: www.donghuagroup.com

全国免费垂询热线: 800-810-0359