

• 综述 •

基于质谱的蛋白组学在转移性骨肿瘤应用中的研究进展

罗加乔, 陈剑明

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.09.040

【中图分类号】 R730.4;R318 【文献标志码】 C 【文章编号】 1671-0800(2024)09-1257-04

近年来,转移性骨肿瘤的发病率逐渐上升,但目前针对各种恶性肿瘤骨转移的治疗效果并不理想。因此,寻找转移性骨肿瘤的早期标志物已成为新的临床目标。随着基于质谱(mass spectrometry, MS)的蛋白质组学技术的快速发展,使用蛋白质组学方法寻找新的肿瘤生物标志物已成为新的研究热点。本文总结了基于MS的蛋白质组学在筛查转移性骨肿瘤标志物方面的研究进展,并对乳腺癌(breast cancer, BC)、前列腺癌(prostate cancer, PC)和肝癌(hepato-cellular carcinoma, HCC)等常见骨转移恶性肿瘤中通过蛋白质组学技术发现的可能用于早期诊断和治疗靶点的蛋白质进行了系统归纳和分析,旨在为实现恶性肿瘤骨转移的早期诊断和治疗提供新的理论依据,现报道如下。

1 转移性骨肿瘤

转移性骨肿瘤是骨肿瘤疾病中的一种,是指原发癌症细胞从癌症病灶通过血液或淋巴系统传播到骨骼部位形成的恶性肿瘤。骨骼是转移癌症的好发部位,而一旦转移到骨骼,疾病基本上难以治愈^[1]。转移性骨肿瘤多为溶骨性破坏,常见症状为剧烈骨痛,可引起一系列病理性骨折、高钙血症和脊髓压缩等并发症,严重影响患者生存质量。目前,对于大多数患者,可以通过标准化诊断确定原发肿瘤,但对于转移性骨肿瘤,临床上通常需要全面的病史、体格检

查、活组织检查和CT、MRI来诊断。其中CT检查容易造成漏诊现象,而MRI经济成本较高,且信号变化有差异性,还需要与感染相鉴别等^[2-3]。到目前为止,恶性肿瘤骨转移的分子机制尚未完全阐明,这给治疗带来了巨大的挑战。因此,深入探讨恶性肿瘤骨转移的发病机制,寻找潜在的新的生物标志物,对骨转移的早期诊断具有重要意义。

2 常用的基于MS的蛋白质组学的技术

早期的蛋白质组学方法主要用于定性分析,但现在的需求更倾向于高灵敏度、高分辨率、全面性及能够检测蛋白质修饰且可重复性好的定量蛋白质组学,这些特点使其成为关注的热点。

基于MS的定量蛋白质组学技术通过液相色谱分离和质谱分析肽段来实现定量,见图1。根据是否设定特定蛋白目标,MS蛋白质组学定量技术可分为非靶向定量蛋白质组学和靶向定量蛋白质组学^[4]。根据是否对样品中的多肽或蛋白进行标记,可分为非标记和标记定量技术。常用的非标记定量技术包括无标记定量和基于数据非依赖采集(DIA)技术,

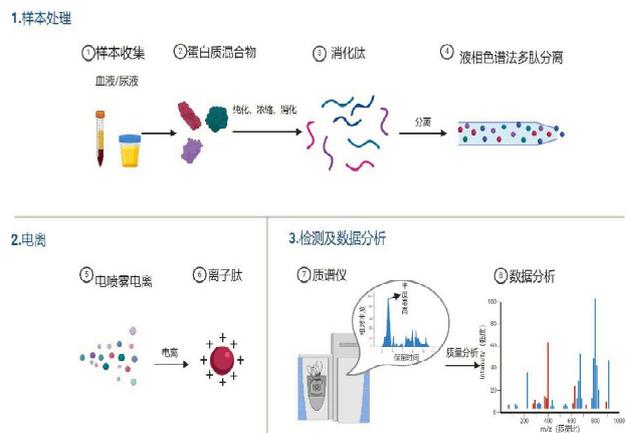


图1 蛋白质肽质谱分析简易流程图

基金项目: 2023年度宁波市重点研发计划暨“揭榜挂帅”(2023Z161)

作者单位: 315100 宁波,宁波大学医学部(罗加乔);宁波市第六医院(陈剑明)

通信作者: 陈剑明, Email: cjmdn01710@163.com

其中 DIA 与基于数据依赖采集 (DDA) 技术相比, DIA 提供更高的通量和更准确的定量结果, 适用于大规模的定量蛋白质组学研究, 而 DDA 主要用于定性的蛋白质组学^[5]。DDA 在通量和便捷度上优势明显且操作更简便, 而 DIA 重复性好且单次 MS 鉴定蛋白数较高^[6]。标记定量技术主要包括同位素亲和标签 (ICAT) 技术、同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术、胞培养稳定同位素标记 (SILAC) 技术, 即氨基酸编码质量标记是一种计算上更简便的方法、串联质量标签技术^[7]。目前, 靶向定量主要有反应监测技术 (MRM), 即选择反应监测技术和平行反应监测技术。该技术在使用同位素标记的多肽/蛋白质作为内部标准时能够提供了最佳的绝对定量性能^[8], 具有高度的选择性和灵敏性, 可以实现准确的蛋白质定量。靶向蛋白质组学适用于对已知目标蛋白的精确定量, 而非靶向蛋白质组学适用于全面、高通量地研究蛋白质组, 发现新的标志物。在转移性骨肿瘤早期生物标志物研究中, 首先使用非靶向蛋白质组学进行全面筛查, 随后用靶向蛋白质组学深入研究特定标志物的功能和调控机制。

3 常见恶性肿瘤骨转移生物标志物变化的研究进展

3.1 MS 蛋白质组学在 BC 骨转移中的应用 BC 是全世界女性中最常见的恶性肿瘤之一, 也是大多数癌症相关死亡的主要原因, 而骨转移在 BC 患者中极为常见, 晚期 BC 患者骨转移可以高达 75%^[9]。目前临床上 BC 患者发生骨转移后治疗效果不佳, 尽早发现并干预显得更为重要。BC 骨转移早期诊断常用碱性磷酸酶 (ALP)、骨特异性碱性磷酸酶 (BAP) 等。Jiang 等^[10]通过 Meta 分析得出 ALP/BAP 对早期发现 BC 骨转移有一定诊断价值, 但前景并不好。为了提高诊断准确率, 避免假阴性结果, 临床上亟需更加准确的早期诊断生化标志物, 旨在实现早期骨转移精准诊疗提供新的理论依据。

Esposito 等^[11]发现 DACT1 是一种促进骨转移的蛋白, DACT1 的升高可能是 BC、PC 发生骨转移的潜在生物标志物。不仅如此, 白介素 1B (IL-1B) 其在原发肿瘤中的表达已被认为是预测 BC 患者发生骨转移风险增加的潜在生物标志物^[12]。DACT1 和 IL-1B 作为潜在生物标志物, 可为 BC、PC 等肿瘤患者

的骨转移风险评估提供重要依据。

研究显示, 通过细胞培养稳定同位素标记-质谱 (SILAC-MS) 技术, 发现 BC 骨转移后细胞中的胞质分裂蛋白 4 (DOCK4) 表达上调^[13]。其进一步的临床试验表明, 高 DOCK4 表达的肿瘤在使用抗骨质疏松 (唑来膦酸) 治疗时, 其导致骨转移的较高风险可能得到抵消。Dumont 等^[14]基于二维液相色谱技术, 对原发 BC 患者尸体的相关骨转移瘤组织进行分析。研究结果显示, Fiblin-1 和 Sushi 结构域包含蛋白 2 在骨转移细胞中的表达有所降低。这项研究通过基于 MS 的蛋白质组学方法揭示了在原发 BC 患者尸体中相关骨转移瘤样本中的蛋白表达的差异, 为骨转移的诊断和治疗提供了可能潜在的生物标志物和靶点。然而, 需要进一步指出的是, 这些研究结果仍需进行更广泛的验证和研究, 以确定这些蛋白在 BC 骨转移中的确切作用机制, 并评估它们在临床上的应用前景。

3.2 MS 蛋白质组学在 PC 骨转移中的应用 PC 是最常见的男性恶性肿瘤。目前诊断 PC 主要通过前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原分析和前列腺活检、直肠指检。通常发现 PC 转移到骨骼时, 表示疾病已进展至晚期^[15]。

有研究结果发现, 一些特定蛋白质如 PSA、血清标志物 ProGRP、Spondin-2、血浆纤维蛋白原^[16-17]等在 PC 的发展和骨转移过程中扮演着重要的角色。Sung 等^[18]基于 LC-MS/MS 对 PC 骨转移细胞系 PC-3 和正常前列腺细胞系 RWPE-1 的分泌蛋白进行了蛋白质组学分析, 最后通过对 917 个蛋白质进行了定量分析, 并且经 Western blotting 验证了发现 PC-3 条件培养液中丝氨酸蛋白酶 B3 是高水平分泌。这项研究结果表明, 在 PC 骨转移过程中, 特定蛋白质的分泌水平发生了变化, 尤其是丝氨酸蛋白酶 B3。这些发现可能有助于我们更好地理解 PC 骨转移的分子机制, 并为相关疾病的诊断和治疗提供新的线索和靶点。

Yan 等^[19]通过基于 iTRAQ 的蛋白质组学方法, 比较 PC 骨转移患者和无骨转移患者血清中蛋白质组的差异。最终发现 CD59、结合珠蛋白在骨转移患者中表现出显著的倍增变化。此外通过表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 技术,

对 PC 患者的血清蛋白进行分析。结果显示共鉴定 18 个差异表达蛋白可用于鉴别侵袭性与惰性 PC, 且敏感性与特异性分别为 70%、62.5%^[20]。可以发现以上研究通过基于 MS 的蛋白质组学对筛查出的骨转移前后差异蛋白进行分析。例如, 通过 SELDI-TOF-MS 技术发现的 18 个差异表达蛋白可用于鉴别侵袭性与惰性 PC, 提高了诊断的敏感性和特异性最后不同的蛋白质表达水平等信息, 为早期诊断和治疗提供更准确的依据, 最后可能有助于指导 PC 骨转移早期诊断。

结合上述, 临床可以利用蛋白质组学技术, 结合传统诊断方法, 更全面地评估 PC 患者的病情, 提高早期骨转移的检测率, 临床上从而提高对 PC 骨转移的早期诊断能力。

3.3 MS 蛋白质组学在 HCC 骨转移中的应用 HCC 骨转移不仅严重影响患者生命质量且缩短生存时间, 并伴有严重并发症。HCC 骨转移患者接受外照射治疗远期预后差。临床上, HCC 骨转移的诊断主要依赖于临床影像检查, 但其敏感性和特异性均较低。值得注意的是, 当出现骨转移影像时, 患者通常已经出现疼痛、功能障碍和全身瘫痪等症状。Feng 等^[21]通过临床组织和组织芯片, 研究发现拓扑异构酶 2A (TOP2A) 在 HCC 中异常高表达, 并证实了 TOP2A 参与了 HCC 的骨转移, 能够促进其骨转移潜能和肿瘤诱导的骨溶解。TOP2A 作为一个重要的生物标志物在 HCC 骨转移中的作用机制逐渐被揭示, 利用 MS 技术对蛋白质组学相关研究为早期诊断转移性骨肿瘤提供了新的方向和可能性, 为临床实践中的个性化治疗带来了希望。至今, 针对 HCC 骨转移尚未有明确的生物标志物可供利用。这些因素使得对该病的诊断和治疗面临着一定的挑战。

近来有研究基于 MS 的蛋白质组学, 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS) 分析出骨转移的 HCC 患者的差异血清多肽图谱, 以确定潜在的诊断骨转移的血清生物标志物。Chen 等^[22]通过每例血清样本经过 MALDI-TOF-MS 技术的检测, 发现其中 7 条差异多肽的序列和所属蛋白名称分别为: 丝甘蛋白聚糖、纤维蛋白 β 链、转甲状腺素蛋白、自噬相关蛋白 16-2 异构体 1、交联- α -胰蛋白酶抑制剂 H4 重链异构体 2、甲胎蛋白 (AFP)

及凝血酶原。其中发现 AFP 与凝血酶原相对于骨转移患者肽段表达水平下调, 而转甲状腺素蛋白、自噬相关蛋白 16-2 异构体 1 等相对骨转移患者肽段的表达水平相对上调。该研究表明, 早期 HCC 患者血清中这 7 个肽段表达水平的改变, 可能提示 HCC 患者骨转移的风险增大。总的来说, 基于 MS 技术的蛋白质组学研究在寻找早期 HCC 骨转移的生物标志物方面具有潜力, 但由于样本量相对较少, 未来需要扩大样本规模, 以确保生物标志物在 HCC 骨转移中的灵敏度和特异性。

4 小结与展望

转移性骨肿瘤的早期诊断对于改善治疗效果和预后至关重要。MS 蛋白质组学技术在筛查早期生物标志物方面已取得显著进展。该技术能够在肿瘤早期或症状出现前辅助诊断、监控治疗效果及预警复发。有研究表明, MS 分析技术在多发性骨髓瘤患者中对预后监测具有重要意义, 并且 MS 优于传统的反应监测, 具有成为诊断 MS 成为新标准的潜力^[23]。特别是多重反应监测 (MRM)^[24], 它已被证实能够在血液和尿液样本中进行微量蛋白质的高度定量分析, 对早期肿瘤标志物的识别尤为关键。

尽管如此, 该领域仍面临挑战, 如肿瘤蛋白标志物的异质性、样品处理复杂性、大规模数据分析需求以及设备成本高昂。因此, 未来研究应专注于提高样品处理效率、优化数据分析算法, 并降低设备成本。

综上所述, MS 技术在转移性骨肿瘤早期标志物筛查中展现出广阔前景。新兴技术如基于 MS 的成像技术为蛋白质的空间分布及功能研究提供了新视角。未来, 非侵入性检测 (如血液或尿液中外泌体蛋白质分析) 有望进一步推动肿瘤早期标志物的发现和临床应用, 从而使更多的肿瘤患者受益。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] KREPS L M, ADDISON C L. Targeting intercellular communication in the bone microenvironment to prevent disseminated tumor cell escape from dormancy and bone metastatic tumor growth[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2911.
- [2] 田蒙, 董艳秋. CT 及 MRI 对转移性骨肿瘤的诊断价值及误、漏诊原因分析[J]. 中文科技期刊数据库 (全文版) 医药卫生, 2021(9): 0102-0103.

- [3] 潘喜鹏.SPECT/CT、MRI及X线在转移性骨肿瘤中的价值对比[J]. 现代医用影像学,2021,30(05):894-896.
- [4] 牟永莹,顾培明,马博,等.基于质谱的定量蛋白质组学技术发展现状[J].生物技术通报,2017,33(9):73-84.
- [5] BARKOVITS K, PACHARRA S, PFEIFFER K, et al. Reproducibility, specificity and accuracy of relative quantification using spectral library-based data-independent acquisition[J]. Mol Cell Proteomics, 2020, 19(1): 181-197.
- [6] 王智博,王道平,苗兰等.血液样本蛋白质组分析方法的比较研究[J].生物技术通报,2021,37(08):307-318.
- [7] 宁思明,胡思隽,田苗苗,等.基于质谱的尿蛋白质组学在肿瘤生物标志物发现中的研究进展[J].中国肿瘤临床,2022,49(16):819-827.
- [8] RAUNIYAR N. Parallel reaction monitoring: A targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 28566-28581.
- [9] BROOK N, BROOK E, DHARMARAJAN A, et al. Breast cancer bone metastases: Pathogenesis and therapeutic targets[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 96: 63-78.
- [10] JIANG C, HU F, LI J, et al. Diagnostic value of alkaline phosphatase and bone-specific alkaline phosphatase for metastases in breast cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2023, 202(2): 233-244.
- [11] ESPOSITO M, FANG C, COOK K C, et al. TGF- β -induced DACT1 biomolecular condensates repress Wnt signalling to promote bone metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2021, 23(3): 257-267.
- [12] TULOTTA C, OTTEWELL P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis[J]. Endocr Relat Cancer, 2018, 25(7): R421-R434.
- [13] WESTBROOK J A, WOOD S L, CAIRNS D A, et al. Identification and validation of DOCK4 as a potential biomarker for risk of bone metastasis development in patients with early breast cancer[J]. J Pathol, 2019, 247(3): 381-391.
- [14] DUMONT B, CASTRONOVO V, PEULEN O, et al. Differential proteomic analysis of a human breast tumor and its matched bone metastasis identifies cell membrane and extracellular proteins associated with bone metastasis[J]. J Proteome Res, 2012, 11(4): 2247-2260.
- [15] SEKHOACHA M, RIET K, MOTLOUNG P, et al. Prostate cancer review: Genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5730.
- [16] 王莹莹,陶绍能,刘小岑,等.血清标志物 ProGRP、Spondin-2、PSA联合 SPECT 检查对前列腺癌骨转移的诊断价值[J].皖南医学院学报,2021,40(5):448-450,454.
- [17] 李伟,宋娟,常钰玲,等.前列腺癌患者发生骨转移的危险因素及血浆纤维蛋白原诊断前列腺癌骨转移的价值[J].中国当代医药,2023,30(22):124-127.
- [18] SUNG E, KWON O K, LEE J M, et al. Proteomics approach to identify novel metastatic bone markers from the secretome of PC-3 prostate cancer cells[J]. Electrophoresis, 2017, 38(20): 2638-2645.
- [19] YAN B, CHEN B, MIN S, et al. iTRAQ-based comparative serum proteomic analysis of prostate cancer patients with or without bone metastasis[J]. J Cancer, 2019, 10(18): 4165-4177.
- [20] 逢瑗博,李博安.基于质谱的蛋白质组学技术在泌尿生殖系统肿瘤标志物检测中的研究进展[J].武警医学,2021,32(2):167-171.
- [21] FENG J, WEI X, LIU Y, et al. Identification of topoisomerase 2A as a novel bone metastasis-related gene in liver hepatocellular carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2023, 15(22): 13010-13040.
- [22] 陈兵,何健,曾昭冲,等.应用 MALDI-TOF-MS 检测原发性肝癌骨转移患者血清的多肽差异谱[J].肿瘤,2012,32(8):643-649.
- [23] MAI E K, HUHNS S, MIAH K, et al. Implications and prognostic impact of mass spectrometry in patients with newly-diagnosed multiple myeloma[J]. Blood Cancer J, 2023, 13: 1.
- [24] MOORE J L, CHARKOFTAKI G. A guide to MALDI imaging mass spectrometry for tissues[J]. J Proteome Res, 2023, 22(11): 3401-3417.

收稿日期:2024-03-20

(本文编辑:方能)