

基于非标记定量技术的肝细胞癌血浆蛋白质组学研究

王曼¹, 鄢丹^{1,2}, 孟波³, 荣维淇⁴, 戴新华³, 赵洋³

(1.成都中医药大学药学院,成都 611130;2.首都医科大学附属北京友谊医院,北京 100050;

3.中国计量科学研究院 前沿计量科学中心,北京 100013;4.中国医学科学院肿瘤医院,北京 100021)

摘要:采用非标记定量蛋白质组学技术获得 10 例肝细胞癌患者和 10 例健康人的血浆样本蛋白质组表达谱数据,并对其细胞定位与功能进行注释分析.利用修正 *t*-检验算法对差异蛋白质进行筛选,通过 DAVID 平台分析软件对差异蛋白质进行功能注释分析,发现了一系列潜在的肝细胞癌血浆诊断生物标志物,包括 16 个肝细胞癌血浆上调蛋白质和 15 个下调蛋白质.此外,还发现了一系列新的候选生物标志物,如 EFEMP1, ITH3, CRP, SAA1, LBP 和 MBL2 等.这些肝细胞癌的血浆蛋白质候选标志物可作为临床诊断标志物进行应用,然而由于样本数量较少,仍需开展大队列样本进行验证.

关键词:肝细胞癌;血浆;蛋白质组;LC-MS/MS

中图分类号:Q592

文献标志码:A

肝癌是威胁人类健康的重大疾病,是第 6 大常见的恶性肿瘤疾病,其死亡率仅次于肺癌,排在第 2 位^[1].中国是肝病大国,也是肝癌大国.据统计,全球每年约有 84 万例新发肝癌病人,其中一半以上都在中国^[1-2].肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌类型,约占肝癌患者的 90%.目前,HCC 诊断方法主要包括医学影像、组织活检、血清甲胎蛋白检测等方法,但其检测灵敏度和特异性尚不能满足临床诊断的需求,亟须寻找新的高灵敏度、高特异性的 HCC 诊断方法,提高 HCC 诊断准确性和检出率,提升患者 5 年生存率.

生物标志物具有客观测量和评价生理过程,以及病理过程的特征^[3],如 DNA, RNA, 蛋白质或代谢分子等均可作为生物标志物,其变化与疾病状态的发生密切相关.作为临床诊断技术的核心,生物标志物的研究与发现对于肝癌病人的治疗和改善其预后具有重要价值.然而,目前尚未发现令人满意的早期肝细胞癌诊断性生物标志物.蛋白质作为细胞功能活性的直接执行者,是影响机体病理发生发展的关键分子,也是最为重要的生物标志物来源.随着高分辨质谱技术的进步,蛋白质组学的高度发展为高通量发现疾病诊断生物标志物提供了可能^[4-6].目前,蛋白质组学技术已初步实现细胞、组织和血液等临床样本的蛋白质组深度覆盖,是发现肿瘤标志物的重要方法^[4,7-8].因此,以高分辨质谱技术为基础开展肝细胞癌的血浆蛋白质组学系统性研究,对于探索和发现早期肝细胞癌诊断标志物是非常必要的.

血液作为临床疾病诊断最常用的生物标本,具有稳定性好、创伤性小、易获取、易保存等优点,可普遍反映个体生理病理状态,在临床疾病(如癌症疾病等)的早期发现、诊断、治疗与预后等方面具有重大应用价值^[9-10].截至目前,仍然缺乏高灵敏且特异性好的 HCC 临床血液诊断蛋白质类生物标志物.因此,本研究将利用液质串联质谱的非标记定量蛋白质组学技术对 10 例 HCC 患者和 10 例健康人的血浆样本进行蛋白质组学研究,探讨 HCC 患者血浆蛋白质组的变化,为鉴定出灵敏度高、特异性强和易于筛查检测的微创生物标志物,以及为 HCC 的早期诊断和预后筛查提供分子病理依据.

收稿日期:2021-03-23;修回日期:2021-11-09.

基金项目:国家自然科学基金(21927812);中国计量科学研究院基本科研项目(AKYZD2111;AKY1934).

作者简介:王曼(1995-),女,四川巴中人,成都中医药大学硕士研究生,研究方向为蛋白质组学,E-mail:1063209851@qq.com.

通信作者:赵洋,E-mail:zhaoy@nim.ac.cn;鄢丹,E-mail:danyan@ccmu.edu.cn.

1 资料与方法

1.1 实验材料与仪器

二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、尿素(Urea)、甲酸(FA)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)和三氟乙酸(TFA)购自美国 Sigma 公司;测序级胰蛋白酶(Trypsin)购自美国 Promega 公司;30 kDa 超滤管购自美国 Millipore 公司;去离子水由实验室自备 Milli-Q 纯水系统制备(Millipore, USA).EASY-nLC 1200 液相色谱系统、Thermo Orbitrap Fusion Lumos 高分辨质谱仪、高速离心机和微量紫外分光光度计(NanoDrop OneC)均购自美国 Thermo Fisher 公司;高精度分析天平(BP211D)购自德国赛多利斯公司;涡旋振荡器(Vortex-Genie)购自 Scientific Industries 公司;真空离心浓缩干燥仪(Concentrator plus)购于德国 Eppendorf 公司; $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱购于日本 Sanyo 公司.

1.2 研究对象

HCC 患者和健康人的血浆样本均由中国医学科学院肿瘤医院荣维淇医生提供,本研究经中国医学科学院肿瘤医院伦理委员会审批,所有参与本项研究的受试者均签署书面知情同意书.血浆样品经过静脉采血,置于 10 mL 真空管中,加入抗凝剂室温静置 30 min,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 2 500 r/min 离心 10 min 后,收集上清液分装储存于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,直至使用.

1.3 蛋白质样品前处理

用过滤器辅助样品制备方案(Filter-aided sample preparation, FASP)酶切蛋白质^[11].首先配置浓度为 0.1 mol/L Tris-HCl 尿素缓冲溶液(含有浓度为 8 mol/L 的尿素),将 pH 调节到 8.5.将冻存的血浆样品取出于室温融化并离心,取 5 μL 血浆并用尿素缓冲溶液稀释至 200 μL ,将其转移至 30 kDa 超滤管中 12 000 r/min 离心 15 min,移除套管内废液.加入 200 μL 尿素缓冲溶液清洗,12 000 r/min 离心 15 min,重复操作一次.然后向超滤管中加入 100 μL 浓度为 0.02 mol/L DTT 溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h.12 000 r/min 离心 15 min 后,加入 100 μL 0.05 mol/L IAA 室温避光放置 30 min,离心后再次加入 100 μL 浓度为 0.02 mol/L DTT 溶液室温避光放置 20 min.离心,加入 200 μL 尿素缓冲溶液和 200 μL 浓度为 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液(NH_4HCO_3)分别清洗 3 次.更换套管,加入 180 μL 浓度为 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液,并加入 20 μL Trypsin 胰蛋白酶进行酶切反应, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 16 h.过夜后 12 000 r/min 离心 15 min 收集酶切后的肽段溶液,并用 100 μL 双蒸水(ddH_2O)和 200 μL 浓度为 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液清洗 FASP 管各一次,收集洗脱液.合并洗脱液在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 真空离心机中热干回收肽段,回收的肽段放于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存,用于后续 LC-MS/MS 分析.

1.4 LC-MS/MS 质谱检测分析

NanoDrop OneC 分光光度计测定肽段质量分数,取 500 ng 用于质谱分析.仪器为 Easy nLC-1200 纳升级液相色谱系统串联 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪.分析柱为自制 C18 毛细管直喷柱(内径 100 μm ,柱长 25 cm,C18 填料直径为 1.9 μm).液相流动相组成:流动相 A 体积分数为 0.1% FA(99.9% ddH_2O),流动相 B 体积分数为 0.1% FA(80% ACN+19.9% ddH_2O).质谱采集时流动相梯度如下:0~16 min,流动相 B 体积分数 3%~10%;16~76 min,流动相 B 体积分数 10%~22%;76~106 min,流动相 B 体积分数 22%~30%;106~118 min,流动相 B 体积分数 30%~90%;118~120 min,流动相 B 体积分数 90%.质谱采集条件设置:碎裂方式为高能碰撞解离(Higher-energy collision dissociation, HCD),电离方式为纳升级电喷雾电离(Nano-ESI),采用正离子模式进行扫描;一级质谱参数,离子扫描的范围为 300~1 550 m/z,分辨率为 120 000,自动增益控制(Automated gain control, AGC)为 4×10^5 ,离子最大注入时间为 50 ms;二级质谱,分辨率为 15 000,AGC 为 5×10^4 ,最大离子注入时间为 30 ms,质量数据由 XCalibur 进行实时采集.

1.5 质谱数据处理

对于 LC-MS/MS 产生的质谱检测原始文件,采用 MaxQuant^[12](版本 1.6.12.0)软件进行搜库检索,所用的检索数据库为 Human Uniprot(version 20200911, 20 375 sequences).搜库检索参数设置为:水解酶类型为胰蛋白酶,最大漏切位点为 2,固定修饰设置为 Carbamidomethylation(C);可变修饰为 Acetyl(Protein N-

term), Oxidation(M);母离子质量偏差(Mass tolerance)为 2×10^{-5} ,子离子质量偏差(Peptide tolerance)为 4.5×10^{-6} ;FDR 值(False discovery rates)小于 1%;其他设置参数选择默认值。

1.6 统计学方法

采用 R 语言(版本 3.5.4)进行分析^[13].蛋白质组表达谱数据利用 FOT 方法归一化处理,缺失值采用最小值进行填充.为筛选早期肝细胞癌的差异表达蛋白,利用 R 语言 limma 软件包(版本 3.24.15)中的修正 *t* 检验(Moderated *t*-statistics)算法对癌和癌旁组织间的蛋白质表达谱进行统计分析,并用经验贝叶斯算法对计算后的概率进行调整,选择“趋势”参数使分析更加稳健,减少方差小的基因的假阳性数量,提高识别具有较大方差的重要基因的能力.最后,利用 Benjamini-Hochberg(BH)算法对修正 *t* 检验计算结果中的 *P* 值进行多重检验获得 BH 矫正 *P* 值(BH-*P* 值).蛋白质组表达谱的细胞定位与功能注释则利用 Cytoscape 软件(版本 3.5.1),基于 ClueGo 插件,对基因本体数据库(Gene Ontology,GO)的细胞组分(Cellular Component,CC)和生物过程(Biological Process,BP)进行富集分析^[14-16].差异蛋白质功能富集分析则主要采用 DAVID 网页软件对基因本体的生物学过程进行富集分析.所有图均使用 R 语言进行绘制。

2 结 果

2.1 临床资料

共收集肝细胞癌患者血浆样本 10 例,健康人血浆样本 10 例.在肝细胞癌患者血浆样本中,男性患者 5 例,占比 50%,女性患者 5 例,占比 50%,平均年龄(56.7 ± 10.07)岁;健康组,男性 3 例,占比 30%,女性 7 例,占比 70%,平均年龄(52.2 ± 16.39)岁(表 1).肝细胞癌患者的临床病理指标,AFP,CEA,CA199,ALT,AST,GGT 含量如表 2 所示。

表 1 肝细胞癌患者和健康人基本临床信息

Tab. 1 The basic clinical information of patients with hepatocellular carcinoma and healthy people

指标	肝细胞癌患者(<i>n</i> =10)	健康人(<i>n</i> =10)
男性(比例)	5(50%)	3(30%)
年龄/岁	56.7 ± 10.07	52.2 ± 16.39

表 2 肝细胞癌患者的临床病理信息

Tab. 2 The clinicopathological information of patients with hepatocellular carcinoma

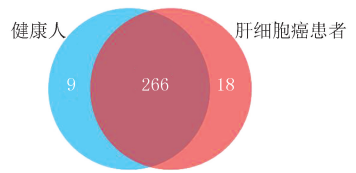
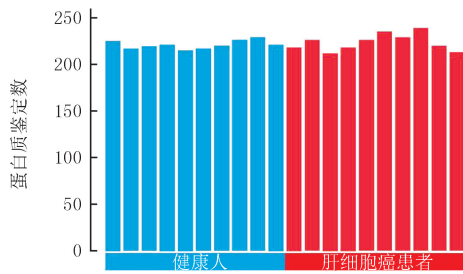
AFP/(ng · mL ⁻¹)	CEA/(ng · mL ⁻¹)	CA199/(ng · mL ⁻¹)	ALT/(U · L ⁻¹)	AST/(U · L ⁻¹)	LDH/(U · L ⁻¹)	GGT/(U · L ⁻¹)
1.62	1.60	168.10	36.00	25.00	203.00	17.00
3.20	1.91	47.41	36.60	43.50	160.00	66.60
3.78	7.05	10.96	13.00	18.00	205.00	18.00
3.85	173.50	117.30	369.60	350.40	2 204.50	720.50
10.69	4.12	82.32	46.20	34.30	160.10	145.30
36.39	2.07	36.39	19.80	30.70	316.40	393.90
49.08	2.51	36.47	32.00	28.00	183.00	30.00
240.00	1.40	18.66	61.00	30.00	160.00	69.00
1 318.00	0.96	9.69	26.20	33.20	217.00	53.00
3 692.00	2.13	32.60	15.20	68.10	204.40	314.20

2.2 HCC 血浆蛋白质组定性分析

通过血浆蛋白质组表达谱数据分析,本研究在 20 例血浆样本中共鉴定了 292 个蛋白质,蛋白质数量鉴定范围在 212~239 之间,平均蛋白质鉴定量为 221 个(图 1(A)).其中,HCC 血浆中特异性鉴定了 18 个蛋白质,健康人血浆样本中鉴定了 9 个蛋白质,共同鉴定了 266 个蛋白质(图 1(B)).

2.3 HCC 血浆蛋白质组表达谱的细胞定位与功能注释

通过细胞定位富集分析,本研究鉴定的血浆蛋白质主要集中富集于 35 条细胞成分模块,共形成了 7 个



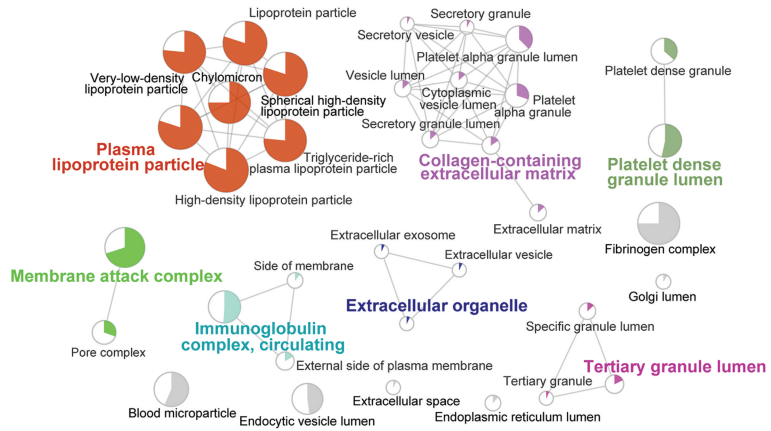
(A) 各样本蛋白质鉴定数情况统计图

(B) 肝细胞癌和健康人总体蛋白质鉴定数韦恩图

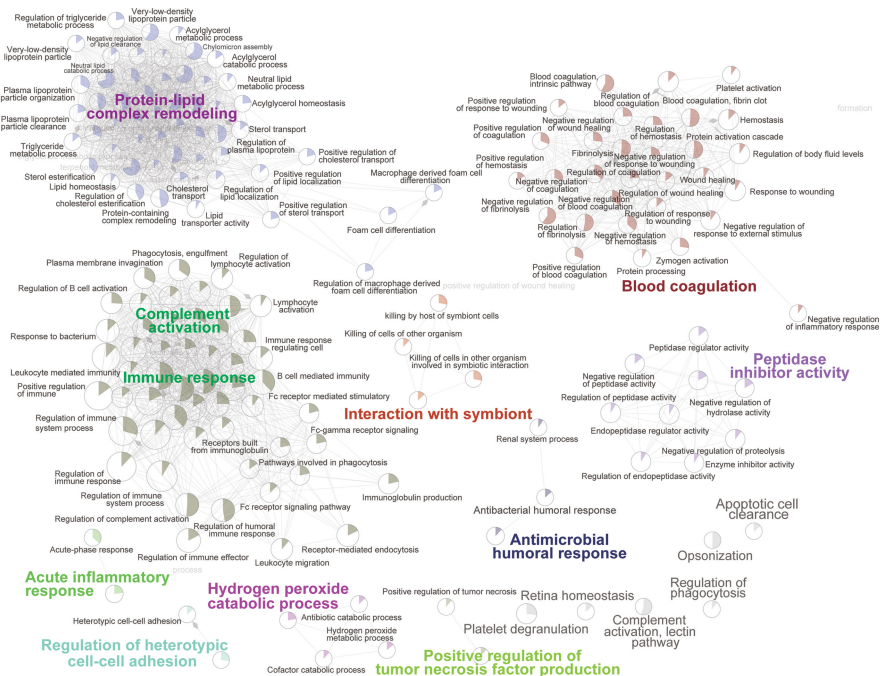
图1 血浆蛋白质组定性分析结果

Fig.1 Qualitative analysis of plasma proteome

相似网络模块(图 2 (A)). 大部分蛋白质主要定位于血浆脂蛋白颗粒、含胶原细胞外基质、致密颗粒腔、膜攻击复合物、循环免疫球蛋白复合物、循环免疫球蛋白复合物、细胞外细胞器、三级颗粒腔等细胞位置. 通过生物学过程富集分析, 鉴定的血浆蛋白质主要富集于 146 条信号通路, 共形成 10 个相似网络模块, 主要涉及蛋白脂质复合物重塑、凝血、补体活化、肽酶抑制剂活性、抗菌体液反应、共生作用、急性炎症反应、细胞异质性黏附调节、过氧化氢分解代谢过程、肿瘤坏死因子产生的正调控等一系列生物学过程(图 2(B)).



(A) 全蛋白质组的细胞定位网络图



(B) 全蛋白质组的生物学过程注释网络图

注: 不同颜色表示不同网络模块, 各网络模块最显著富集的信号通路用加粗颜色字体标注. 灰色表示未形成网络模块的信号通路.

图2 HCC血浆蛋白质组表达谱的细胞定位与功能注释

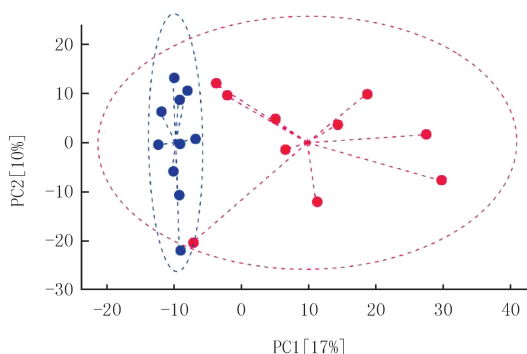
Fig.2 Cellular localization and functional annotation of plasma proteome expression profile of HCC

2.4 HCC 血浆蛋白质生物标志物筛查

基于血浆蛋白质组表达谱数据, 通过无监督的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)分析了 20 例样本的前 3 个主成分, 并对第 1 主成分和第 2 主成分进行了展示, 结

果如图 3 所示.第 1 主成分和第 2 主成分分别能表征 17%和 10%的蛋白质变量.通过第 1 主成分和第 2 主成分,HCC 患者和健康人群有明显区分,预示着通过血浆蛋白质组研究可以将 HCC 患者与健康人进行有效区分,表明通过差异蛋白质分析,可以筛查到有效的 HCC 患者血浆诊断生物标志物.

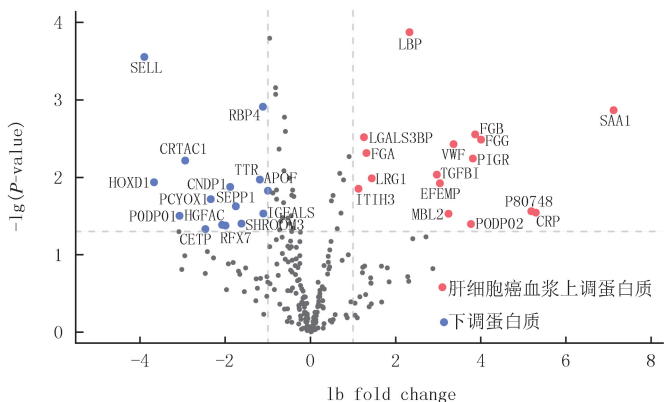
随后,本研究利用有监督的修正 *t* 检验算法对血浆蛋白质分子特征进行了筛选,结果见图 4.依据 *P* 值小于 0.01,差异倍数大于 2 倍的卡值标准,共鉴定了 31 个差异表达的血浆蛋白质,16 个蛋白质表现为上调表达,主要包括 CRP,EFEMP1,FGA, FGB, FGG, ITIH3, LBP, LGALS3BP, LRG1, MBL2, IGHV3-30, IGLV3-21, PIGR, SAA1, TGFB1 和 VWF 等蛋白质;15 个蛋白质表现为下调表达,主要包括 SELL, RBP4, CRTAC1, TTR, HOXD1, CNCP1, APOF, PCYC, SHROOM3, P0DPO1, P80748, IGFALS, HGFAC, RFX7 和 CETP 等蛋白质.其中, FGB 和 FGG 为肝细胞癌血液中特异性表达蛋白质, SELL 为健康人血液中特异性表达蛋白质.



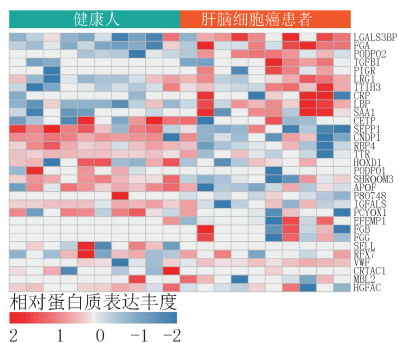
红色表示肝细胞癌样本,蓝色表示健康人样本.

图3 PCA第一主成分和第二主成分分析结果

Fig.3 The first two principal components of PCA result



(A) 火山图展示差异表达蛋白质



(B) 热图展示差异表达蛋白质相对表达丰度

图4 HCC血浆差异表达蛋白质

Fig.4 Differentially expressed proteins in plasma of HCC

2.5 血浆生物标志物功能注释

利用 DAVID 网站对生物标志物所参与的细胞生物学过程进行了富集分析.通过富集分析发现上调蛋白质主要参与了血小板脱颗粒过程 (Platelet degranulation)、血小板激活 (Platelet activation)、急性期反应 (Acute phase response)、细胞外基质组成 (Extracellular matrix organization)、细胞调理反应 (Opsonization)、纤维蛋白溶解 (Fibrinolysis)、天然免疫应答 (Innate immune response)、细胞基质黏附 (Cell-matrix adhesion)、ERK1 和 ERK2 反应 (ERK1 and ERK2 cascade)、EGFR 信号通路 (EGFR signaling pathway)、细胞黏附 (Cell adhesion) 等生物学过程 (图 5).而下调生物标志物则主要参与了一系列代谢反应过程,如视黄醇代谢过程 (Retinol metabolic process)、类维生素 A 代谢过程 (Retinoid metabolic process)、胆固醇代谢过程 (Cholesterol metabolic process) 等.其中,EGFR 信号通路、细胞黏附、细胞基质黏附、ERK1 和 ERK2 等信号通路已明确报道与肿瘤发生发展有直接或间接相关性^[17-20].

3 讨论

本研究发现了 31 个潜在的肝细胞癌临床诊断生物标志物,包括 16 个上调蛋白质和 15 个下调蛋白质.其中, VWF, LGALS3BP, FGG, FGB, FGG, PIGR, IGFALS, APOF (Apolipoprotein F, APOF) 等差异表达

蛋白质均已报道与肝癌相关。血管性血友病因子(Von Willebrand Factor, VWF)已明确报道是诊断严重肝纤维化和预测肝细胞癌发生发展的潜在生物标志物^[21-22],在严重肝纤维化或肝细胞癌患者的血浆中明确上调表达,预示着 VWF 不仅可作为诊断标志物,还可作为预防和治疗

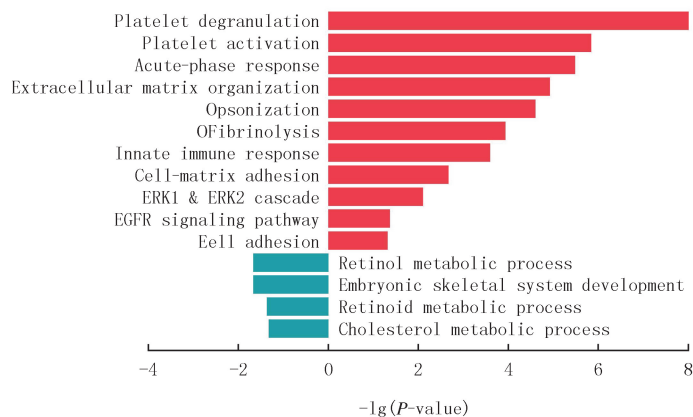


图5 血浆生物标志物功能注释分析结果

Fig.5 Results of functional annotation analysis of plasma biomarkers

肝细胞癌与 HBV 感染肝纤维化治疗的一个重要治疗靶点^[23].FGA, FGB 和 FG 等蛋白质是纤维蛋白原的主要组成部分,参与了血小板脱颗粒过程、细胞基质黏附、ERK1 和 ERK2 等生物学过程,多项研究也表明它们在肝细胞癌的细胞或组织中显著上调表达,提示它们可能是肝癌诊断或预后的潜在生物标志物^[24-26].FGA, FGB 和 FG 蛋白质在肝细胞癌患者血液中显著上调表达,证明了该类蛋白质作为未来临床诊断生物标志物的潜能.半乳糖凝集素-3 结合蛋白(Galectin-3-binding protein, LGALS3BP),是已被报道的肝硬化患者标志物^[27].LIU 等^[28]发现 LGALS3BP 或将具有比 AFP 更好的临床诊断潜能.聚合物免疫球蛋白受体(Polymeric immunoglobulin receptor, PIGR)的过度表达已被证明会促进肝细胞癌发生发展,具有作为肝细胞癌临床诊断标志物的潜能^[29].在本研究中,以上蛋白质同样被证明在肝细胞癌患者中显著上调表达,进一步证实了该类蛋白质组为肝细胞癌临床诊断生物标志物的潜能.

在肝细胞癌血浆下调表达的基因中,胰岛素生长因子亚基(Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit, IGFALS)与载脂蛋白 F 等已报道与肝细胞癌或其他肿瘤有明确相关性.MARQUARDT 等^[30]通过转录组研究发现 IGFALS 是肝细胞癌发生时优先下调表达的关键基因,表明 IGFALS 可能是一个潜在临床诊断或治疗的关键靶点.WANG 等^[31]发现在肝细胞癌组织中, APOF 基因在 mRNA 和蛋白质水平均显著下调,并通过细胞和动物实验证明了 APOF 的过表达可以抑制癌细胞增殖和转移,预示着 APOF 可作为肝细胞癌的抑癌因子,具有重大临床应用价值.本研究在血液层面进一步证明了该类蛋白质具有作为临床诊断生物标志物的重大潜能,值得后期继续关注与研究.

本研究与先前肝细胞癌的研究结果的一致性证明了血浆蛋白质组研究的稳健性与可靠性.除已报道的生物标志物外,本研究还发现了一系列新的潜在生物标志物,如:EGFR 信号通路相关蛋白质,PIGR 和 EFEMP1 等;血小板脱颗粒信号通路相关蛋白质, ITH3 等;免疫反应相关蛋白质, CRP, SAA1, LBP 和 MBL2 等.它们与肝细胞癌发生发展的联系与机制值得进一步深入探索.综上所述,基于非标记的蛋白质组学技术,发现了一系列潜在的肝细胞癌临床诊断候选生物标志物,为探索肝细胞癌的疾病分子病理机制提供了新的线索.然而,由于研究样本数量较少,该研究结论仍需在大规模队列中进行验证和讨论.此外,本研究采用了常规的非标记定量蛋白质组技术探讨了肝细胞癌的血浆蛋白质组变化水平,虽然在一定程度上减少了实验误差,提升检测准确率,但由于血浆中存在高丰度蛋白质的掩盖效应,会导致一部分低丰度蛋白质不能被有效检出,后续需引入高丰度蛋白质去除技术,加强低丰度蛋白质的检出率,完善肝细胞癌的血浆蛋白质组研究,为肝细胞癌精准医疗提供分子病理线索.

参 考 文 献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):

- 115-132.
- [3] ATKINSON A I, COLBURN W A, DEGRUTTOLA V G, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2001, 69(3): 89-95.
- [4] JIANG Y, SUN A H, ZHAO Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261.
- [5] ZHANG Y, ZHAO W J, ZHAO Y, et al. Comparative glycoproteomic profiling of human body fluid between healthy controls and patients with papillary thyroid carcinoma[J]. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(7): 2539-2552.
- [6] ECKERT M A, COSCIA F, CHRYPLEWICZ A, et al. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts[J]. *Nature*, 2019, 569(7758): 723-728.
- [7] GEYER P E, HOLDT L M, TEUPSER D, et al. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics[J]. *Molecular Systems Biology*, 2017, 13(9): 942.
- [8] HU Y W, PAN J B, SHAH P, et al. Integrated proteomic and glycoproteomic characterization of human high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(3): 108276.
- [9] ISSAQ H J, XIAO Z, VEENSTRA T D. Serum and plasma proteomics[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(8): 3601-3620.
- [10] HANASH S M, PITTERI S J, FACA V M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 571-579.
- [11] WIŚNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [12] COX J, MANN M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(12): 1367-1372.
- [13] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria[EB/OL]. [2021-02-22]. <http://www.R-project.org/>.
- [14] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [15] BINDEA G, MLECNIK B, HACKL H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [16] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [17] JUTTEN B, ROUSCHOP K. EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(1): 42-51.
- [18] MEVES A, NIKOLOVA E, HEIM J B, et al. Tumor cell adhesion as a risk factor for sentinel lymph node metastasis in primary cutaneous melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(23): 2509-2515.
- [19] MURAI T, KAWASHIMA H, NAOR D. Editorial: cell-cell and cell-matrix adhesion in immunobiology and cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 3126.
- [20] ROSKOSKI R. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 142: 151-168.
- [21] TAKAYA H, KAWARATANI H, TSUJI Y, et al. Von Willebrand factor is a useful biomarker for liver fibrosis and prediction of hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B and C[J]. *UEG Journal*, 2018, 6(9): 1401-1409.
- [22] TAKAYA H, NAMISAKI T, KITADE M, et al. VWF/ADAMTS13 ratio as a potential biomarker for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Gastroenterology*, 2019, 19(1): 167.
- [23] LIU Y, WANG X W, LI S L, et al. The role of von Willebrand factor as a biomarker of tumor development in hepatitis B virus-associated human hepatocellular carcinoma: a quantitative proteomic based study[J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 106: 99-112.
- [24] FERRÍN G, RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ M, AGUILAR-MELERO P, et al. Plasma protein biomarkers of hepatocellular carcinoma in HCV-infected alcoholic patients with cirrhosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118527.
- [25] ZHU W L, FAN B L, LIU D L, et al. Abnormal expression of fibrinogen gamma(FGG) and plasma level of fibrinogen in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(7): 2531-2534.
- [26] ZHANG X, WANG F, HUANG Y B, et al. FGG promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells through activating epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cancer Management and Research*, 2019, 11: 1653-1665.
- [27] CHEUNG K J, LIBBRECHT L, TILLEMANN K, et al. Galectin-3-binding protein: a serological and histological assessment in accordance with hepatitis C-related liver fibrosis[J]. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2010, 22(9): 1066-1073.
- [28] LIU T H, LIU D H, LIU R Q, et al. Discovering potential serological biomarker for chronic Hepatitis B Virus-related hepatocellular carcinoma in Chinese population by MAL-associated serum glycoproteomics analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 38918.
- [29] YUE X H, AI J, XU Y, et al. Polymeric immunoglobulin receptor promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2017, 65(6): 1948-1962.

- [30] MARQUARDT J U, SEO D, ANDERSEN J B, et al. Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits[J]. *Journal of Hepatology*, 2014, 60(2): 346-353.
- [31] WANG Y B, ZHOU B X, LING Y B, et al. Decreased expression of ApoF associates with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology Report*, 2019, 7(5): 354-360.

Plasma proteomic analysis of hepatocellular carcinoma based on label-free quantitative technology

Wang Man¹, Yan Dan^{1,2}, Meng Bo³, Rong Weiqi⁴, Dai Xinhua³, Zhao Yang³

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611130, China; 2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 102206, China; 4. Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Plasma samples of 10 patients with hepatocellular carcinoma and 10 healthy individuals were collected based on label-free quantitative technology of proteomics. The data of proteome profile were obtained by using label free quantitative technology, and the cellular localization and functional annotation were performed. Then, the modified t-test algorithm was used to screen differentially expressed proteins, and the functional annotation analysis was conducted by David platform analysis software, to obtain potential protein biomarker for clinical diagnosis. A series of potential plasma biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis were found, including 16 up-regulated proteins and 15 down-regulated proteins. Furthermore, a series of novel biomarkers were found, such as ITH3, CRP, SAA1, LBP and MBL2, etc. Candidate plasma protein biomarkers could be used as clinical diagnostic markers of hepatocellular carcinoma, while large-scale sample validation was needed due to the small number of samples.

Keywords: hepatocellular carcinoma; plasma; proteomics; LC-MS/MS

[责任编辑 刘洋 杨浦]