

学术前沿专栏:肿瘤早期诊断蛋白质组生物标志物研究

肺癌血浆外泌体蛋白质组学研究

张勇,易观华,罗海欣,郑雅琳,刘雯婧,顾雨帆,苏涛,曾文娟

(四川大学 华西医院;华西临床医学院,成都 610041)

摘要:肺癌是全球范围内最常见且致命的恶性肿瘤之一,其高发病率和死亡率对人体健康构成了严重威胁.为了提高肺癌的早期诊断准确率和治疗效果,需要建立无创或微创、高灵敏度和高特异性的诊断方法.外泌体是一种胞外囊泡,携带多种生物大分子,广泛分布于体液中,并参与细胞间信息交换,对肿瘤的发生发展及侵袭转移有关键作用,可能成为肺癌生物标志物的重要来源.研究结合 Ti^{4+} -IMAC 快速分离纯化外泌体方法以及无标记定量蛋白质组学技术,对肺癌患者血浆样本中的外泌体蛋白质组进行了深入分析.结果鉴定出 41 个肺癌患者特异性上调或下调表达的血浆外泌体蛋白质,能够有效区分健康人群和肺癌患者.进一步的生信分析揭示,如 HDAC3、NAPA、ELP3、HAT1、RAB5B、PDIA5、SARAF 等外泌体蛋白质的特异性表达与肺癌的进展显著相关,为肺癌的早期诊断与筛查提供了重要数据支撑.

关键词:肺癌;血浆;外泌体;生物标志物;质谱;蛋白质组

中图分类号:Q592

文献标志码:A

文章编号:1000-2367(2025)04-0031-08

肺癌(lung cancer, LC)是最常见的肿瘤之一,也是一种极具威胁的恶性肿瘤,其发病率(11.4%)仅次于乳腺癌(11.7%);同时,肺癌也是全球范围内死亡率(18.0%)最高的肿瘤^[1].肺癌的发病机制目前尚不明确,研究发现有害气体(吸烟、木材燃烧产生的气体、汽车尾气、大气污染)的侵害是引起肺癌的主要因素^[2].肺癌按照组织病理学分型可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中 NSCLC 约占肺癌中的 85%^[3].由于 NSCLC 的发病率及死亡率均为最高,且大多数早期 NSCLC 患者并无典型症状,被诊断出来时往往已是癌症晚期^[4],因此,肺癌的早期确诊对于改善预后、提高生存率有极大的意义.目前,肺癌的诊断方法主要包括胸部 X 线、胸部 CT、肺组织穿刺活检、肿瘤标志物筛查等.其中,诊断的金标准是肺组织活检,但其存在有创性、未穿刺到肿瘤、增加肿瘤远处转移的风险等缺点^[5].因此,为了有效筛查肺癌患者,迫切需要建立无创或微创、高灵敏度和高特异性的诊断方法.

生物标志物是一种存在于血液中的,能被客观测量和评价,反映生理或病理过程,以及对暴露或治疗干预措施产生生物学效应的指标^[6].癌症生物标志物涵盖了多种生化分子,可应用于肿瘤的诊疗,为癌症的早期诊断和精准预后提供依据^[7].外泌体是由细胞分泌的直径为 30~100 nm 的一种封闭的脂质双分子层包裹的囊泡结构,其携带多种物质,广泛分布于体液中,如尿液、血浆、灌洗液、浆膜积液和脑脊液等^[8].研究发现外泌体可以增加肿瘤细胞的侵袭能力,促进肿瘤转移^[9].因此,外泌体可作为癌症临床治疗的重要对象,用作

收稿日期:2024-01-30;**修回日期:**2024-05-23.

基金项目:国家自然科学基金(22204108).

作者简介(通信作者):张勇(1989-),男,重庆人,四川大学副研究员,博士,研究方向为临床转化糖蛋白质组学, E-mail: nankai1989@foxmail.com.

引用本文:张勇,易观华,罗海欣,等.肺癌血浆外泌体蛋白质组学研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2025,53(4): 31-38.(Zhang Yong, Yi Guanhua, Luo Haixin, et al. Proteomic analysis of exosomal proteins in plasma as bio-markers for lung cancer[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2025, 53(4): 31-38. DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.01.30.0001.)

癌症患者的精确诊断和判断预后的生物标志物^[10].目前,基于质谱技术的外泌体蛋白质组学研究较为流行^[11].研究发现,通过联合使用密度梯度离心法和超速离心法可进一步提高外泌体的纯度^[12].但是,该方法存在样本起始量高、回收率低、时间长、成本高等缺点.目前,一些新材料(TiO_2 或 Ti^{4+} -IMAC)已被应用于富集外泌体,具有样本起始量低、回收率高、操作简单快速等优势.此外,随着质谱技术的快速发展,液相色谱-质谱分析的方法能够增加对癌症生物标志物鉴定的准确性^[13].因此,采用新方法分离纯化外泌体以及基于质谱技术的外泌体蛋白质组学分析方法,有望发现肺癌早期诊断新型标志物.综上所述,本研究首次结合 Ti^{4+} -IMAC 快速分离纯化外泌体的方法以及基于高分辨率质谱仪的分析技术,对肺癌患者的血浆样本进行了系统化的血浆外泌体蛋白质生物标志物研究,探索肺癌患者血浆外泌体蛋白质的变化情况,研究结果将有助于揭示一系列潜在的血浆来源的外泌体蛋白质生物标志物,为肺癌的早期诊断和预后筛查提供支持.

1 资料与方法

1.1 实验材料、仪器和研究对象

开展肺癌血浆外泌体蛋白质组学研究所用实验仪器和材料见附录表 S1.肺癌患者和健康人的血浆样本均由四川大学华西医院呼吸与危重症医学科提供.本研究经四川大学华西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.

1.2 外泌体蛋白质组样品制备及蛋白酶切

取 100 μL 血浆样品,利用 0.2 μm 滤膜去除细胞碎片、死亡小体和大的囊泡等.首先,取 2 mg 的 Ti^{4+} -IMAC,加入 200 μL 三氟乙酸(TFA,体积分数 0.1%)洗涤 5 min,5 000 r/min 室温离心 2 min 去除废液,加入 200 μL 磷酸盐缓冲剂(PBS,pH 7.5)洗涤 3 次,500 g 离心 1 min.将过滤后的样品用等量 PBS 稀释 1 倍,加入含有 Ti^{4+} -IMAC 的 1.5 mL 离心管中,置于室温旋转混合仪上孵育 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 000 r/min 离心 1 min 去除废液.加入 100 μL 的 PBS 洗涤 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 500 g 离心 1 min 去除废液,去除非特异性结合的蛋白质和分子.加入 20 μL 的 SDT 裂解液(体积分数 2% SDS,0.1 mol/L DTT,0.1 mol/L Tris/HCl,pH 7.6,含 1% 体积分数的蛋白酶抑制剂合成物),95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 5 min,超声 10 min 提取外泌体蛋白(非接触超声,4 $^{\circ}\text{C}$,100 W,超声 7 s,停 3 s),4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min 收集得到外泌体裂解液.

将得到的外泌体裂解液转移到 30 kDa 超滤管中,加入 280 μL 的 8 mol/L 的尿素溶液,离心收集上清.加入 6 μL 的 1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 1 h,加入 15 μL 的 1 mol/L 碘乙酰胺(IAM)室温避光孵育 30 min.加入 200 μL 的 8 mol/L 尿素溶液洗涤一次,加入 200 μL 的 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液洗涤 3 次,12 000 r/min 离心 10 min.加入 200 μL 的 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液,按 1 : 50 加入胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜.12 000 r/min 离心 10 min 回收肽段并定量.

1.3 液相二级质谱(LC-MS/MS)检测分析

外泌体肽段通过 Easy-nLC1200 液相联合含有纳升喷雾源的 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行分析.液相梯度由溶液 A 和溶液 B 构成,A 液为体积分数 0.1% 甲酸水溶液,B 液为体积分数 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈体积分数为 80%).每个多肽样品用体积分数 0.1% 甲酸重新溶解,取 1 μg 多肽通过 C18 色谱柱(75 $\mu\text{m}\times 24\text{ cm}$,1.9 μm 填料,Dr. Maisch)分离.液相分离梯度如下:0~5.0 min,B 液线性梯度从 3% 到 8%;5.0~69.0 min,B 液线性梯度从 8%~32%;69.0~70.5 min,B 液线性梯度从 32%~60%;70.5~71.0 min,B 液线性梯度从 60% 到 98%;71.0~78.0 min,B 液线性梯度维持在 98%.DIA 质谱分析,检测模式设置为正离子.一级质谱扫描范围为 350~1 500 m/z,质谱分辨率为 60 000,AGC target 为 1 000 000,Maximum IT 为 50 ms.MS2 设置 60 个 DIA 可变采集窗口进行 DIA 数据采集,质谱分辨率为 15 000,AGC 目标值为 500 000,Maximum IT 为 22 ms,MS2 Activation Type 为 HCD,Normalized collision energy 为 30.

1.4 质谱数据分析

Spectronaut 软件是一个专业的蛋白质鉴定及数据分析的软件,常被用于处理 DIA 分析后所获得的原始数据.所有原始数据均由 Spectronaut (Version 15,Biognosys AG)软件进行分析,使用非冗余人 UniProt-

KB/Swiss-Prot 蛋白数据库(包含 20 259 个蛋白序列),其他搜库参数均按照软件默认设置.

1.5 统计学方法

数据分析使用 Perseus^[14]完成.外泌体蛋白质的显著性阈值设置为 $P<0.05$,两者的倍数变化阈值 $\geq |1.5|$.筛选出的差异基因,使用 ClusterProfiler 4.0^[15]做基因本体(gene ontology)和 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)分析.使用 String 进行蛋白互作分析(PPI)^[16],PPI 网络使用 Cytoscape 优化,关键基因使用 cytoHubba 插件筛选.

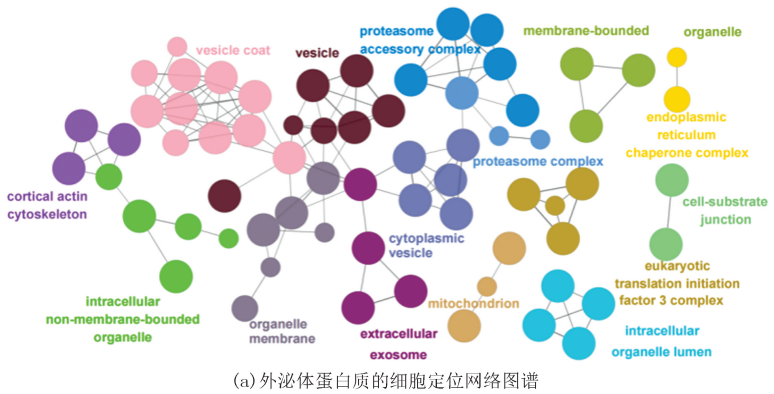
2 结果

2.1 外泌体蛋白质组数据采集和数据解析

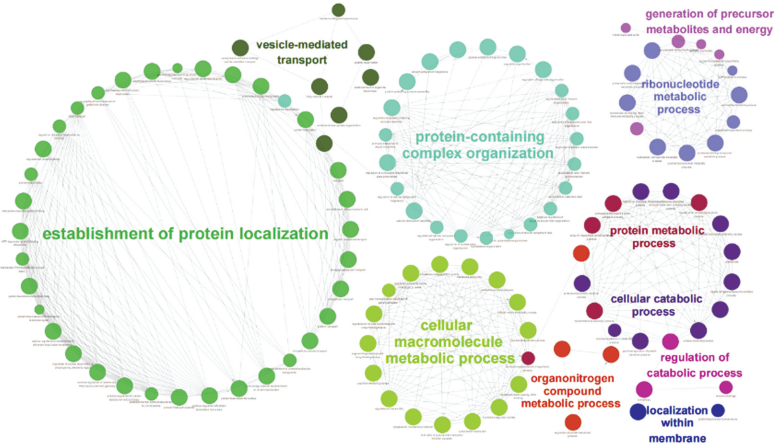
研究结合 Ti^{4+} -IMAC 快速分离纯化血浆外泌体方法以及无标记 DIA 定量蛋白质组学技术,针对5 例肺癌患者和 5 例健康人的血浆样本,进行了外泌体蛋白质组的系统性质谱数据采集.首先,用 $0.2\ \mu m$ 滤膜去除细胞碎片、死亡小体和大的囊泡,减小对后续外泌体分离纯化的影响.接下来,用 Ti^{4+} -IMAC 对外泌体进行富集并洗涤非特异性结合物质.随后,加入胰蛋白酶使外泌体蛋白质酶解完全.最终,基于 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪器,完成了肽段信息的质谱数据采集,并通过 Spectronaut 软件完成了质谱数据的定性定量分析.通过数据解析,本研究共鉴定出 5 020 个血浆来源的外泌体蛋白质(排除了 2 例存在异常值的 LC 样本),设定变异系数(CV)阈值为 0.3 对蛋白质定量数据进行质量控制,最终 614 个外泌体蛋白质定量数据被保留.

2.2 外泌体蛋白质组的细胞定位与功能

通过细胞定位的富集分析,鉴定到的 614 个血浆外泌体蛋白质主要聚焦在 67 个细胞组成的模块内.这些模块进一步归并为 15 个网络模块,它们主要定位于如下细胞结构:皮质肌动蛋白细胞骨架、囊泡包衣、细胞内无膜细胞器、囊泡、细胞质囊泡、细胞器膜、细胞外外泌体、蛋白酶体附属复合体、蛋白酶体复合体、膜结合细胞器、线粒体、胞内细胞器内腔、真核生物翻译起始因子 3 复合体、内质网伴侣复合体、细胞-基质结合处等,如图 1(a)所示.生物学过程的富集分析结果表明,所鉴定的血浆外泌体蛋白质主要集中于 151 条信号通路中,并被整合为 16 个相似的网络模块.这些模块主要与以下生物学过程有关:有机氮化合物代谢过程、核糖核苷酸代谢过程、前体代谢物和能量的产生、含蛋白质的复合体组装、细胞组件组装、含蛋白质的复合体组织、有机氮化合物的生物合成过程、细胞大分子代谢过程、蛋白质代谢过程、蛋白质分解代谢过程、细胞分解代谢过程、囊泡组织、内质网到高



(a) 外泌体蛋白质的细胞定位网络图谱



(b) 外泌体蛋白质的生物学过程网络图谱

注:不同颜色表示不同网络模块,各网络模块最显著的信号通路用加粗颜色字体标注.

图1 外泌体蛋白质的细胞定位与功能注释

Fig.1 Cellular localization and functional annotation of exosomal proteins

细胞大分子代谢过程、蛋白质代谢过程、蛋白质分解代谢过程、细胞分解代谢过程、囊泡组织、内质网到高

尔基体囊泡介导的运输、高尔基体囊泡运输、建立蛋白质定位、膜内定位等,如图 1(b)所示.

2.3 肺癌的血浆外泌体蛋白生物标志物

为了系统全面地筛查肺癌的血浆外泌体蛋白质生物标志物,对健康人和肺癌患者的血浆外泌体蛋白质组进行了对比分析,采用 *t*-检验(554 个外泌体蛋白质定量数据)和 Wilcoxon 秩和检验(60 个外泌体蛋白质定量数据)作为主要的评估工具.与健康人群相比,肺癌患者的血浆外泌体蛋白质组中鉴定出了 41 个差异表达的外泌体蛋白质,其中 13 个呈现上调表达趋势和 28 个呈现下调表达趋势,如图 2 及附录表 S2 所示.基于两组中差异表达的血浆外泌体蛋白质,利用无监督的主成分分析(PCA)分析可知(图 2(b)):第一主成分表征了 76.7%的完整血浆外泌体蛋白质变量,第二主成分表征了 8.1%的完整血浆外泌体蛋白质变量.结果表明,血浆外泌体蛋白质的差异表达可能作为肺癌早期诊断的有效指标.

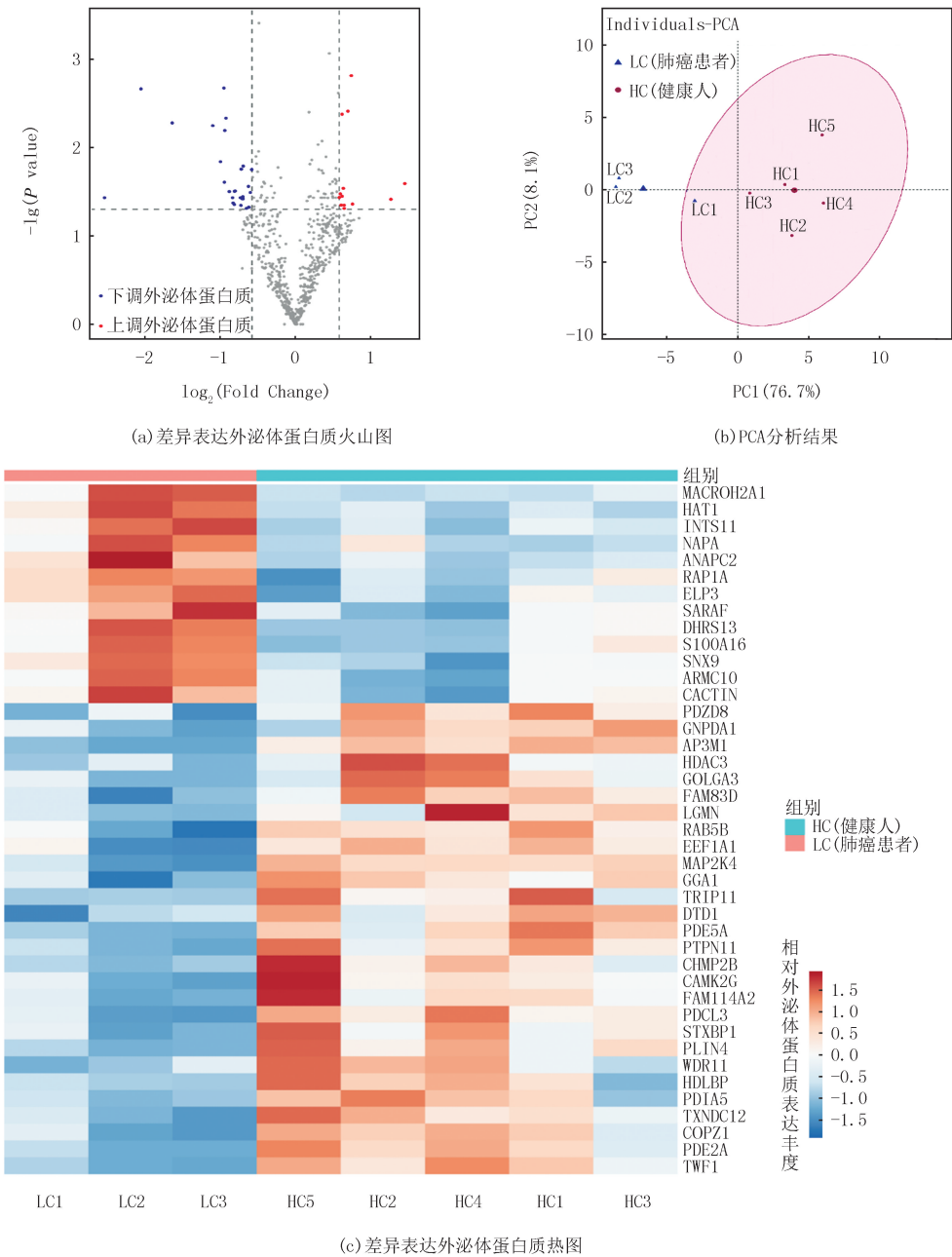


图2 肺癌的血浆差异表达外泌体蛋白质

Fig.2 Plasma differentially expressed exosomal proteins in lung cancer

2.4 外泌体蛋白生物标志物的功能注释

利用 ClusterProfiler 软件,我们针对差异表达的血浆外泌体蛋白质展开了功能富集分析,其中主要参照了基因本体(GO)和KEGG的信号通路.分析结果如图 3(a)所示,差异表达的血浆外泌体蛋白质在细胞结构上,显著富集在细胞质(cytoplasm),胞浆(cytosol),细胞核(nucleus),细胞外外泌体(extra-cellular exosome),质膜(plasma membrane)等结构中,主要参与了金属离子结合(metal ion binding),钙黏蛋白结合参与细胞-细胞黏附(cadherin binding involved in cell-cell adhesion),蛋白质同源二聚化活性(protein homodimerization activity),GTPase 活性(GTPase activity),ATP 结合(ATP binding)等分子功能.此外,差异表达的血浆外泌体蛋白质还参与了蛋白质转运(protein transport),细胞内蛋白质转运(intracellular protein transport),信号转导(signal transduction),RNA 聚合酶 II 对转录的负调控(negative regulation of transcription by RNA polymerase II),内高尔基囊泡介导的转运(intra-golgi vesicle-mediated transport)等生物学过程.在 KEGG 信号通路(图 3(b))中,差异表达的外泌体蛋白质主要参与了剪接体(spliceosome),核质运输(nucleocytoplasmic transport),mRNA 监测途径(mRNA surveillance pathway),代谢途径(metabolic pathways),肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)等信号通路.

2.5 外泌体蛋白质相互作用网络分析及典型标志物筛选

根据 String 数据库,采用蛋白质相互作用网络(PPI)分析方法,进一步对血浆来源的差异表达外泌体蛋白质相关性进行深入分析,拟获得具有典型代表性的外泌体蛋白质关键生物标志物.基于 Cytoscape 软件,采用 cytoHubba 插件对蛋白质相互作用网络(PPI)进行了系统性分析,筛查获得了 7 个具有典型代表性的血浆外泌体蛋白质生物标志物,主要包括 HDAC3、NAPA、ELP3、HAT1、RAB5B、PDIA5、SARAF 等蛋白质(图 4(a,b)).

3 讨 论

肺癌是一种广泛存在的致命恶性肿瘤,其高死亡率引起了广泛关注.早期诊断和有效治疗对于提高患者

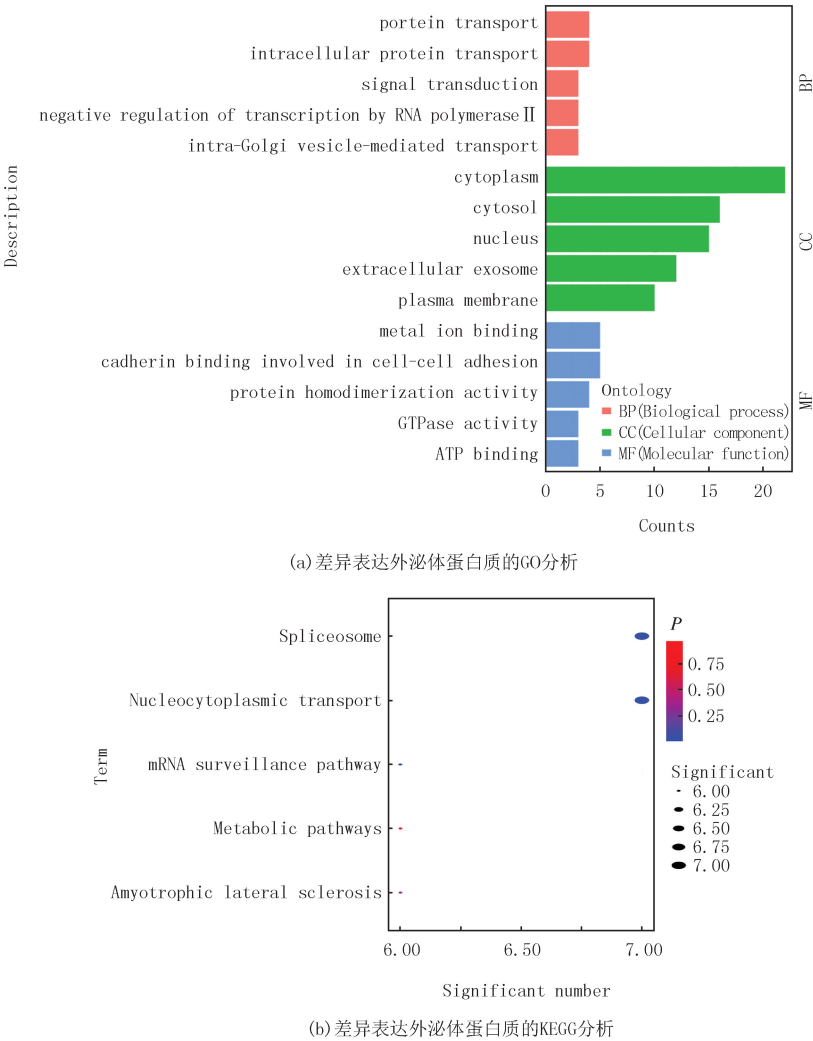


图3 外泌体蛋白质生物标志物功能注释分析结果
Fig.3 Results of functional annotation analysis of exosomal protein biomarkers

的生存率至关重要.目前,临床上常用的肺癌筛查方法包括胸部 X 射线、CT 扫描、痰液细胞学检查、支气管镜检查等^[5].在肺癌的诊断和监测中,癌胚抗原(CEA)是目前应用最广泛的血浆生物标志物之一^[17].此外,还有 CA125、NSE、ProGRP 等生物标志物也被用于肺癌的诊断和疾病监测,但它们的敏感性和特异性有限^[18].外泌体存在于包括血浆在内的多种体液中,凭借其丰富的内容物在细胞间通信和信号传递中发挥着关键作用,并且参与到肿瘤细胞的生长、黏附、转移以及免疫逃逸等重要过程^[19].近年来,多项研究发现肺癌患者血浆外泌体中某些特异性蛋白质或 miRNA 的表达水平与健康对照组相比存在显著差异,具有潜在的诊断价值^[20].SANDFELD-PAULSEN 等^[21]利用细胞外囊泡阵列分析肺癌患者和对照组的血浆外泌体,鉴定出 CD151、CD171 和 tetraspanin 8 可能是潜在的早期诊断标志物.另一项研究发现,与健康对照组相比,肺癌患者血清外泌体中 miR-17-5p 表达显著上调,提示其在肺癌诊断中可能具有相当的临床价值^[22].尽管肺癌血浆外泌体标志物研究取得了一定进展,但目前仍存在一些挑战,如标准化外泌体分离、检测方法和建立大样本量的临床验证队列等.未来,多中心合作的前瞻性研究有助于进一步评估和筛选出稳定、特异、灵敏度高的肺癌外泌体标志物组合,推动其在临床应用中的转化.因此,本研究结合 Ti^{4+} -IMAC 对血浆中的外泌体进行分离纯化,采用 LC-MS/MS 以及 DIA 定量技术,共鉴定了 614 个血浆来源的外泌体蛋白质,其中 13 个呈现上调表达趋势和 28 个呈现下调表达趋势.在 PCA 分析结果(图 3(b))中,肺癌患者组(LC1、LC2、LC3)聚集在左侧,而健康对照组(HC1、HC2、HC3、HC4、HC5)聚集在右侧,两组之间存在明显的区分.这一结果表明,肺癌患者和健康对照组的血浆外泌体蛋白质表达谱存在显著差异.此外,本实验筛选出 7 个典型标志物,分别是 HDAC3、NAPA、ELP3、HAT1、RAB5B、PDIA5 和 SARAF.其中,HDAC3、NAPA、HAT1 和 PDIA5 蛋白质的差异表达已被报道和肺癌相关.HDAC3 在研究中被证实 Kras 突变型非小细胞肺癌的肿瘤发展和治疗耐药性中至关重要^[23].WANG 等^[24]则发现 PD-L1 的表达在顺铂耐药的临床 NSCLC 样本中明显增加,并与 HDAC3 的表达呈负相关.NAPA 则是一种抗凋亡蛋白,通过诱导肿瘤抑制因子 p53 的降解来促进肺癌细胞对顺铂的耐药性^[25].组蛋白乙酰转移酶 1(HAT1)主要定位于细胞核,主要功能是乙酰化定位于细胞质的组蛋白 H4 的赖氨酸 5 和 12 以便其被转运到细胞核^[26].近年来,HAT1 引起了广泛的关注,因其参与了癌症,病毒感染和炎症疾病等多种病理过程^[27].并且有研究显示,与非肿瘤组织相比,HAT1 蛋白在肺癌肿瘤组织中过量表达,与肺癌患者的不良预后有关,是潜在的生物标志物^[28].另一项结合蛋白质组学的多组学分析发现,携带 L858R 点突变的肺腺癌细胞中 PDIA5 表达升高,提示 PDIA5 可能在 L858R 突变驱动的肺癌发生发展过程中发挥作用^[29].

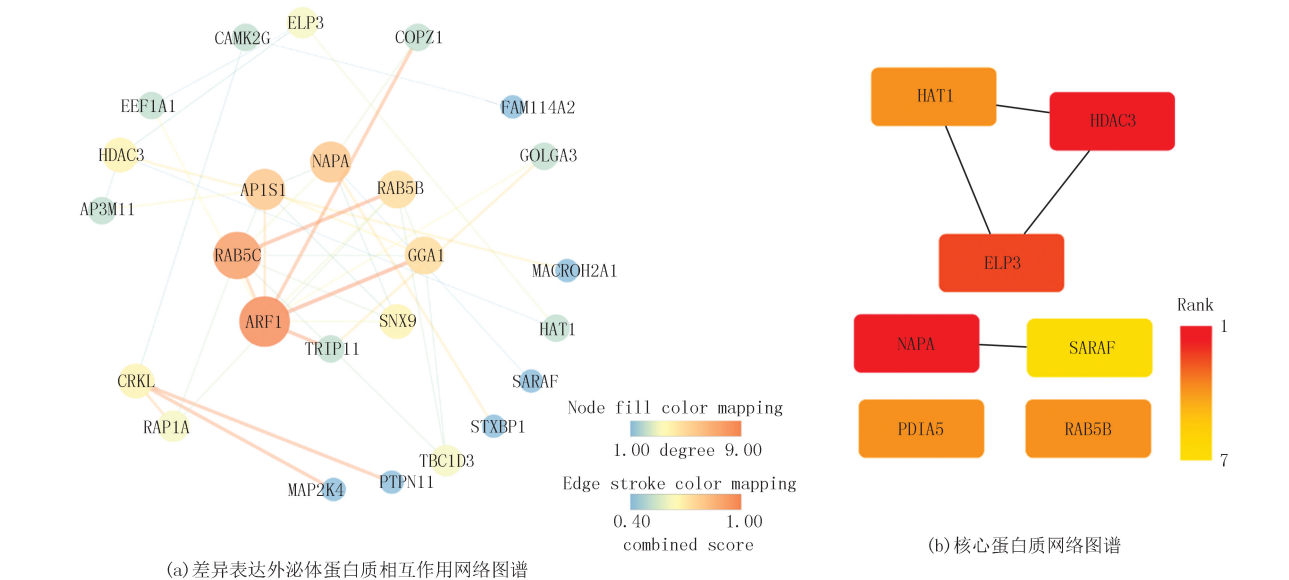


图4 蛋白质相互作用网络分析及典型外泌体蛋白质生物标志物

Fig.4 Protein interaction network analysis and typical exosomal protein biomarkers

本研究与先前肺癌研究结果的一致性证明了血浆外泌体蛋白质组研究的稳定性与可靠性.除了已报道

的生物标志物外,本研究还发现了 3 个新的潜在生物标志物,即 ELP3、RAB5B 和 SARAF 3 个血浆来源的外泌体蛋白质.ELP3 是 RNA 聚合酶 II (Pol II) 全酶的一个组成部分,参与转录延长,与自主神经功能障碍和某些神经性疾病相关^[30].RAB5B 是膜运输和外泌体形成的调节因子,可视作细胞外囊泡的一种标记蛋白^[31].相关研究表明 RAB5B 是由 miRNA-17 调控的靶基因之一,在蛋白质相互作用网络分析中被确认为与肺癌发生发展相关的核心基因^[32].SARAF 是一种内质网膜常驻蛋白,在调节细胞内钙离子的存储含量方面发挥关键作用^[33].HDAC3、NAPA、ELP3、HAT1、RAB5B、PDIA5 和 SARAF 与肺癌的发生发展关系值得进一步探索.综上所述,基于非标记定量的外泌体蛋白质组研究发现了一系列肺癌临床诊断的候选生物标志物,为该疾病的早期诊断和筛查提供了新的见解.

尽管本研究存在样本量小等局限性,但该研究首次结合了基于 Ti^{4+} -IMAC 快速分离纯化外泌体的方法以及基于 DIA 定量蛋白质组学方法,证实了血浆来源的外泌体蛋白质在肺癌早期诊断标志物筛查的潜力,为肺癌早期诊断的生物标志物发现提供了新的研究方向.

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.01.30.0001).

参 考 文 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] MILLER K D, NOGUEIRA L, DEVASIA T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2022, 72(5): 409-436.
- [3] HOU J P, MENG F, CHAN L W, et al. Circulating plasma microRNAs as diagnostic markers for NSCLC[J]. Frontiers in Genetics, 2016, 7: 193.
- [4] MITHOOWANI H, FEBBRARO M. Non-small-cell lung cancer in 2022: a review for general practitioners in oncology[J]. Current Oncology, 2022, 29(3): 1828-1839.
- [5] GOEBEL C, LOUDEN C L, MCKENNA R Jr, et al. Diagnosis of non-small cell lung cancer for early stage asymptomatic patients[J]. Cancer Genomics-Proteomics, 2019, 16(4): 229-244.
- [6] SEARS C R, MAZZONE P J. Biomarkers in lung cancer[J]. Clinics in Chest Medicine, 2020, 41(1): 115-127.
- [7] WU L, QU X G. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(10): 2963-2997.
- [8] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [9] WU M W, WANG G S, HU W L, et al. Emerging roles and therapeutic value of exosomes in cancer metastasis[J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 53.
- [10] YU W, HURLEY J, ROBERTS D, et al. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges[J]. Annals of Oncology, 2021, 32(4): 466-477.
- [11] PATEL G K, KHAN M A, ZUBAIR H, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 5335.
- [12] TAO L Y, ZHOU J T, YUAN C H, et al. Metabolomics identifies serum and exosomes metabolite markers of pancreatic cancer[J]. Metabolomics, 2019, 15(6): 86.
- [13] FAN T W M, ZHANG X F, WANG C, et al. Exosomal lipids for classifying early and late stage non-small cell lung cancer[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1037: 256-264.
- [14] TYANOVA S, TEMU T, SINITYN P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data[J]. Nature Methods, 2016, 13: 731-740.
- [15] WU T Z, HU E Q, XU S B, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. The Innovation, 2021, 2(3): 100141.
- [16] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein - protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1): D447-D452.
- [17] SEIJO L M, PELED N, AJONA D, et al. Biomarkers in lung cancer screening: achievements, promises, and challenges[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2019, 14(3): 343-357.
- [18] NOORELDEEN R, BACH H. Current and future development in lung cancer diagnosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8661.
- [19] DAI J, SU Y Z, ZHONG S Y, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy[J]. Signal Transduction and Target-

ted Therapy,2020,5(1):145.

[20] RAHIMIAN S,NAJAFI H,AFZALI B,et al.Extracellular vesicles and exosomes: novel insights and perspectives on lung cancer from early detection to targeted treatment[J].Biomedicines,2024,12(1):123.

[21] SANDFELD-PAULSEN B,JAKOBSEN K R,BÆK R,et al.Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer[J].Journal of Thoracic Oncology,2016,11(10):1701-1710.

[22] ZHANG Y,ZHANG Y M,YIN Y H,et al.Detection of circulating exosomal miR-17-5p serves as a novel non-invasive diagnostic marker for non-small cell lung cancer patients[J].Pathology,Research and Practice,2019,215(8):152466.

[23] EICHNER L J,CURTIS S D,BRUN S N,et al.HDAC3 is critical in tumor development and therapeutic resistance in Kras-mutant non-small cell lung cancer[J].Science Advances,2023,9(11):eadd3243.

[24] WANG H F,FU C,DU J,et al.Enhanced histone H3 acetylation of the PD-L1 promoter via the COP1/c-Jun/HDAC3 axis is required for PD-L1 expression in drug-resistant cancer cells[J].Journal of Experimental & Clinical Cancer Research,2020,39(1):29.

[25] WU Z Z,SUN N K,CHIEN K Y,et al.Silencing of the SNARE protein NAPA sensitizes cancer cells to cisplatin by inducing ERK1/2 signaling, synoviolin ubiquitination and p53 accumulation[J].Biochemical Pharmacology,2011,82(11):1630-1640.

[26] VERREAULT A,KAUFMAN P D,KOBAYASHI R,et al.Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase[J].Current Biology,1998,8(2):96-108.

[27] DEMYANENKO S,UZDENSKY A.Epigenetic alterations induced by photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex;deacetylation of histone h3, upregulation of histone deacetylases and histone acetyltransferases[J].International Journal of Molecular Sciences,2019,20(12):2882.

[28] ARAN D,CAMARDA R,ODEGAARD J,et al.Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes[J].Nature Communications,2017,8(1):1077.

[29] OCHI N,TAKEYAMA M,MIYAKE N,et al.The complexity of EGFR exon 19 deletion and L858R mutant cells as assessed by proteomics, transcriptomics, and metabolomics[J].Experimental Cell Research,2023,424(1):113503.

[30] KOJIC M,ABBASSI N E H,LIN T Y,et al.A novel ELP1 mutation impairs the function of the Elongator complex and causes a severe neurodevelopmental phenotype[J].Journal of Human Genetics,2023,68:445-453.

[31] YOSHIOKA Y,KONISHI Y,KOSAKA N,et al.Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types [J].Journal of Extracellular Vesicles,2013,2:20424.

[32] JIA E N,REN N,ZHANG R K,et al.Circulating miR-17 as a promising diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma: evidence from the Gene Expression Omnibus[J].Translational Cancer Research,2020,9(9):5544-5554.

[33] PALTY R,RAVEH A,KAMINSKY I,et al.SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium re-filling[J].Cell,2012,149(2):425-438.

Proteomic analysis of exosomal proteins in plasma as biomarkers for lung cancer

Zhang Yong, Yi Guanhua, Luo Haixin, Zheng Yalin, Liu Wenjing, Gu Yufan, Su Tao , Zeng Wenjuan

(West China Hospital; West China Clinical Medical College, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Lung cancer is a prevalent and fatal malignancy globally, which poses a serious threat to public health due to its high incidence and mortality rates. To improve the early diagnosis and treatment outcomes of lung cancer, it is essential to establish minimally invasive, highly sensitive, and specific diagnostic methods. Exosomes are extracellular structures that carry biomacromolecules. They are widely distributed in bodily fluids and play a crucial role in intercellular communication. Exosomes are significantly involved in the development, invasion, and metastasis of tumors and may serve as an important source of bio-markers for lung cancer. This study applied label-free quantitative proteomics technology was applied to perform an in-depth a-nalysis of the exosomal proteome in plasma samples from lung cancer patients. The results identified 41 exosomal proteins in the plasma that were either upregulated or downregulated specifically in lung cancer patients, effectively distinguishing them from the healthy population. Subsequent analysis has shown that the particular expression of exosomal proteins, including HDAC3, NAPA, ELP3, HAT1, RAB5B, PDIA5 and SARAF, is significantly linked to the progression of lung cancer. This provides crucial data to support early diagnosis and screening.

Keywords: lung cancer; plasma; exosomes; biomarkers; mass spectrometry; proteomics

附 录

表 S1 实验材料与仪器

Tab. S1 Experimental Materials and Instruments

材料/仪器名称	货号/批号	生产厂家
Ti ⁴⁺ -IMAC	ZQ5-6350	GL sciences Inc.
三氟乙酸(TFA)	LK60S11	北京百灵威科技有限公司
尿素(UA)	BCCB5332	
磷酸盐缓冲剂(PBS)	C0103	Bioss Antibodies
十二烷基磺酸钠(SDS)	STBH0712	Sigma-Aldrich
二巯苏糖醇(DTT)	WXBC7474V	Sigma-Aldrich
Tris-HCl 缓冲液	BCCD6838	Sigma-Aldrich
碘乙酰胺(IAM)	WXBD4602V	Sigma-Aldrich
碳酸氢铵(NH ₄ HCO ₃)	BCBV6730	Sigma-Aldrich
胰蛋白酶(Trypsin)	0000479627	Promega
30 kDa 超滤管	0000147627	Amicon

表 S2 41 个差异表达的外泌体蛋白质

Tab. S2 41 Differentially expressed exosomal proteins

Uniport Accession	Gene Symbol	<i>P</i> Value	Fold Change	Uniport Accession	Gene Symbol	<i>P</i> Value	Fold Change
O00408	PDE2A	0.004 626	0.527 214	Q8N2F6	ARMC10	0.033 342	1.514 872
O14929	HAT1	0.025 496	2.745 254	Q8NEN9	PDZD8	0.027 469	0.649 462
O15379	HDAC3	0.030 968	0.574 356	Q8TEA8	DTD1	0.006 386	0.522 138
O75367	MACROH2A1	0.044 767	1.526 460	Q8WUQ7	CACTIN	0.036 633	1.500 446
O76074	PDE5A	0.002 157	0.241 127	Q96BY9	SARAF	0.044 888	1.568 225
O95881	TXNDC12	0.014 424	0.501 675	Q96FQ6	S100A16	0.035 573	1.541 545
P45985	MAP2K4	0.024 630	0.520 187	Q96Q06	PLIN4	0.005 247	0.321 452
P46926	GNPDA1	0.047 283	0.651 683	Q99538	LGMN	0.035 974	0.616 450
P54920	NAPA	0.048 766	1.568 866	Q9BZH6	WDR11	0.032 205	0.660 687
P61764	STXBP1	0.044 089	0.569 515	Q9H2J4	PDCL3	0.037 899	0.612 623
P61923	COPZ1	0.031 213	0.570 843	Q9H4H8	FAM83D	0.038 017	0.617 045
P62834	RAP1A	0.004 181	1.539 053	Q9H9T3	ELP3	0.001 530	1.675 239
Q00341	HDLBP	0.037 285	0.610 275	Q9NRY5	FAM114A2	0.031 478	0.544 145
Q06124	PTPN11	0.005 639	0.467 250	Q9UJX6	ANAPC2	0.038 459	2.414 559
Q08378	GOLGA3	0.048 631	0.637 464	Q9UJY5	GGA1	0.045 112	0.605 768
Q12792	TWF1	0.002 111	0.517 748	Q9UQN3	CHMP2B	0.017 544	0.607 723
Q13555	CAMK2G	0.042 286	0.563 856	Q9Y5X1	SNX9	0.003 861	1.623 757
Q14554	PDIA5	0.017 706	0.669 097	P61020	RAB5B	0.036 888	0.560 897
Q15643	TRIP11	0.016 183	0.618 814	P68104	EEF1A1	0.036 888	0.602 745
Q5TA45	INTS11	0.043 515	1.694 565	Q9Y2T2	AP3M1	0.036 888	0.172 303
Q6UX07	DHRS13	0.028 915	1.557 511				