

SELDI-TOF-MS 在筛选肝癌高发家系与无癌家系血清蛋白差异中的应用

邓敬桓, 陈智平, 李 山, 秦 雪, 黄东萍

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018271)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学公共卫生学院(邓敬桓, 陈智平, 黄东萍); 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院临床实验部(李 山, 秦 雪)

作者简介: 邓敬桓(1980-), 男, 医学硕士, 助理研究员, 研究方向: 临床免疫学。E-mail: dengjinghuan123123@126.com

通讯作者: 陈智平(1960-), 男, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 流行病学。E-mail: dengjinghuan123123@126.com

【摘要】 目的 比较肝癌高发家系患者和无癌家系患者血清蛋白质谱图, 探寻两者间的血清蛋白差异。

方法 用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)及 CM10 蛋白芯片对 25 例肝癌高发家系患者和 25 例无癌家系患者血清样本进行分析, 将获得的血清蛋白质指纹图谱, 用计算机软件进行比较分析, 建立高发家系患者和无癌家系患者的比较筛选模型。**结果** 肝癌高发家系组与无癌家系组共有 15 个蛋白质差异有统计学意义。筛选出 4 个蛋白峰建立诊断模型的灵敏度为 96.0% (24/25), 特异度为 88.0% (22/25), 准确率为 92.0% (46/50)。**结论** 肝癌高发家系患者组和无癌家系患者组的血清存在一定的差异蛋白, SELDI 技术在特异性蛋白生物标志分子的筛选等方面具有较好的临床应用前景。

【关键词】 肝癌; 家系; 表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱; 血清蛋白标记物

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2014)03-0185-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.03.01

Screening serum differential proteins with relation to the high-risk and no-risk familial pedigree for liver cancer by SELDI-TOF-MS DENG Jing-huan, CHEN Zhi-ping, LI Shan, et al. The Public Health of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To compare serum protein pattern of patients with liver cancer from high-risk families for liver cancer with that of patients with liver cancer from no-risk familial pedigree for liver cancer and detect specific biomarkers in serum between two groups. **Methods** SELDI-TOF-MS Protein Chip was used to detect serum protein patterns of 25 patients with liver cancer from high-risk familial pedigree for liver cancer and 25 patients with liver cancer from no-risk families for liver cancer. Diagnostic model was developed and validated by using BPS. **Results** At the molecular weight range from 2 000 to 50 000, 15 protein peaks were obviously different between two groups. Analyzed by BPS, the diagnostic model's accuracy was 92.0% (46/50), sensitivity was 96.0% (24/25) and specificity was 88.0% (22/25). **Conclusion** There are amount of the special serum differential proteins between two groups, SELDI-TOF-MS Protein Chip array technology has better clinical value in detecting the special serum protein biomarkers.

【Key words】 Liver cancer; Familial pedigree; Surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS); Serum protein biomarker

经流行病学研究表明, 广西肝癌高发区除了与 HBV 感染、黄曲霉毒素和饮用水源的污染存在密切关系外, 还存在明显的肝癌高发家系。另外, 遗传因素也起了非常重要的作用^[1]。本实验采用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱技术 (SELDI-TOF-MS), 以肝癌无癌家系为参照, 检测特异的血清蛋白

标志, 以期从中筛选出遗传性蛋白, 为肝癌高危人群的监测、预防和肝癌早期诊治以及相关药物开发等提供新的研究思路。

1 资料与方法

1.1 病例选择 肝癌高发家系指直系亲属中发生过 2 例或 2 例以上原发性肝癌病例的家系。无癌家

系指直系亲属中未发生过任何恶性肿瘤病例的家系。广西医科大学在承担国家“六五”和“七五”攻关课题时,已在肝癌高发区建立了癌症登记网,掌握了肝癌高发区中肝癌高发家系和无癌家系成员名单,在患者经病理和临床诊断确诊且未经治疗的情况下说明了采血的要求,给予知情权,并征得研究对象同意。以相同的生活环境、生活习惯、相同职业、相同民族、相同性别、年龄 ± 5 岁作为配对条件,在2010-01~2012-12期间,采集到肝癌高发家系患者组25例血清,肝癌无癌家系组25例血清。50例均为原发性肝癌患者。

1.2 试剂及仪器 尿素(Urea)、3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)乙腈、二硫苏糖醇(DTT)、醋酸钠(NaAC)、三氟乙酸(TFA)、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、芥子酸(SPA)、HPLC水。以上试剂购自美国Sigma公司,蛋白芯片生物系统(PBS II c)及CM10芯片购自美国Ciphergen公司。自制超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 样品收集与预处理 所有血样均于清晨空腹采集,放置4℃冰箱2h后,1 000 r/min离心10 min,冰浴后分装血清于-80℃低温冰箱保存备用。检测前取出血清样品,置冰盒上溶解;以1 000 r/min,4℃离心2 min;取血清10 μ l,加入2倍体积9 mol/L Urea缓冲液(含DTT)稀释,将样品冰浴震荡30 min;将30 μ l上述变性后样品加入360 μ l的50 mmol/L NaAC(pH 4.0)缓冲液,立即混匀。

1.3.2 芯片预处理、上样和洗脱 将CM10芯片装入生物芯片处理器,每孔加入200 μ l 50 mmol/L NaAC(pH 4.0)缓冲液,震荡5 min,甩掉缓冲液。重复上述操作一次。在芯片处理器每孔中加入100 μ l处理好的样品,4℃震荡1 h;弃去未结合样品,每孔加入200 μ l的NaAC缓冲液,震荡5 min,甩去孔中液体,重复操作一次;每孔加入200 μ l 1 mmol/L HEPES,然后立刻甩出;取出芯片待干后,在每个加样孔上加SPA 0.5 μ l;待干后,重复加SPA一次。

1.3.3 芯片检测、数据采集和参数设置 采用PBS II C型蛋白芯片生物系统读取芯片信息。用加有标准蛋白质的All-in-one芯片校正仪器。芯片阅读仪参数设置如下:激光强度185,检测灵敏度8,优化范围2 000~10 000,最高相对分子质量50 000,芯片上的每个点采集130次。

1.4 统计学方法 应用Proteinehip Software3.2 Software(BPS)对图谱进行标准化后,筛选出有统计学意义的差异蛋白峰,然后用Biomarker Wizard软

件快速计算出有统计学意义相同相对分子质量的蛋白在两组间峰值差异的表达强度,最后以肝癌无癌家系组的蛋白质平均强度数值为参照进行比对两组差异蛋白质的表达变化。

1.5 诊断模型的建立与验证 用Biomarker Pattern软件对两组间相同相对分子质量的差异表达蛋白峰值做线性分类分析,经过进一步优化实验参数,确定最佳的分类模型,即诊断模型并输出原始判别结果,用BPS进行交叉验证并输出结果,以交叉验证为最终结果。

2 结果

2.1 蛋白质峰的初步筛选和评价 在相对分子质量2 000~50 000范围内共检测到40个蛋白质峰,其中15个在两组间的比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。肝癌高发家系组和肝癌无癌家系组血清差异蛋白的表达见表1,图1。

表1 CM10芯片筛选肝癌高发家系组和肝癌无癌家系组血清差异蛋白的表达

差异蛋白峰 的相对 分子质量	P	蛋白质平均强度		差异蛋白 质的表达 变化
		肝癌高发家系组	肝癌无癌家系组	
9735.16	0.00	27.4	5.65	↑
5823.81	0.00	3.89	1.32	↑
3960.65	0.00	0.27	3.78	↓
5317.22	0.00	3.65	8.14	↓
7895.66	0.00	6.25	4.49	↑
4700.91	0.00	1.03	3.64	↓
5916.07	0.00	0.32	1.53	↓
6400.18	0.00	4.68	2.56	↑
7323.65	0.00	0.64	1.72	↓
5081.22	0.00	0.32	2.51	↓
5894.78	0.00	2.65	1.46	↑
5197.27	0.00	0.71	1.65	↓
3962.47	0.00	1.49	2.67	↓
6970.57	0.00	0.17	1.53	↓
8980.67	0.01	2.56	3.97	↓

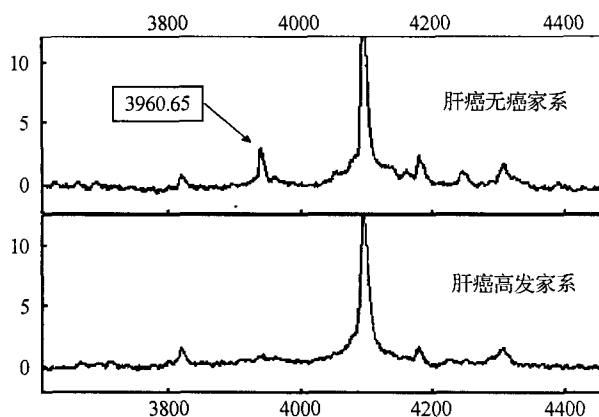


图1 下幅显示随机抽取的肝癌高发家系组;上幅3 960.65蛋白峰较肝癌无癌家系组明显下调

2.2 诊断模型的建立与验证 以筛选出的 4 个蛋白峰得到一个比较合理的诊断模型,模型中 4 个蛋白所占的重要分值见表 2。经交叉验证该模型区分肝癌高发家系组和肝癌无癌家系组的,其中 25 例肝癌高发家系组患者中有 24 例被判断准确,25 例肝癌无癌家系组中有 22 例被正确分到对照组,该模型诊断的灵敏度为 96.0% (24/25),特异度为 88.0% (22/25),准确率为 92.0% (46/50)。

表 2 模型中的 4 个蛋白所占的重要分值

Variable(变异)	Score 分值)	
M3960_65	100.00	
M9735_16	86.21	
M4700_91	62.40	
M5317_22	56.82	

3 讨论

3.1 肝癌的发生发展是多因素参与的多环节病理过程,传统的单基因研究模式限制了肝癌相关因素的研究发展^[2-4]。近年来,人们认识到仅通过 DNA 序列来解释生物功能是不可能的,这是由于基因的产物是蛋白质,蛋白质是生命功能的主要执行者,细胞的功能要通过蛋白质来完成而非 DNA 或 RNA,单从基因序列是不能判断一个基因最终是翻译成蛋白质还是作为 RNA 发挥作用^[5,6]。只有通过从整体水平上研究细胞内外的蛋白质组成及其活动规律才能更准确地了解疾病的发生、发展过程的相关机理。而这正是蛋白组学这一新兴学科的研究内容^[7]。它是连接基因序列与细胞功能的桥梁。

3.2 广西是全国乃至全球原发性肝癌高发区之一,经研究发现,HBV 感染是广西肝癌高发的主要致病因子,在相同民族、相同生活环境、生活水平、生活习惯和生活条件下,存在许多肝癌高发家系,也存在大量无癌家系;在肝癌病例中,发生 2 例以上肝癌病人的家庭占 48.8%^[8]。肖开银^[9]等对 101 例广西肝癌家庭聚集性的家族史和临床分析认为,在相似的生活背景下存在的肝癌家庭聚集现象可能与遗传因素有很大关系。

3.3 本实验运用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱技术 (SELDI-TOF-MS) 及 CM10 蛋白芯片对 25 例肝癌高发家系患者和 25 例无癌家系患者血清样本进行分析,结果发现肝癌高发家系组与无癌家系组共有 15 个蛋白质差异有统计学意义,建立诊断模型的灵敏度为 96.0% (24/25),特异度为 88.0% (22/25),准确率为 92.0% (46/50)。这验证了肖开银等^[9]对广西肝癌家庭聚集性的现象可能与遗传因

素有关的假设。虽两组患者经病理和临床诊断上均为原发性肝癌,但是筛选出一定数量的差异蛋白和得出较高灵敏度和特异度的诊断模型可以看出两组在蛋白水平上还是有一定的区别,在肝癌高发家系,其家庭成员遗传的基因所表达的相关蛋白质本身可能具有发生原发性肝癌的危险性,或者其遗传基因多态性如 GSTM1 和 GSTT1 基因的多态性^[10]、基因出现缺失如 GSTM1 和 GSTT1 基因联合缺失^[11],造成表达相关蛋白缺失,增加了罹患原发性肝癌的几率,这就解释了在相同民族、相同生活环境、生活水平、生活习惯和生活条件下,同是 HBV 感染者,为何肝癌高发家系家庭成员易发生肝癌,有肝癌家族聚集性的原因。

3.4 后续研究,我们将扩大样本例数,对筛选出的蛋白验证其准确性,并对其生物学功能进行鉴定,探寻与肝癌发生密切相关的遗传性特异蛋白,以便将来为疾病预防、诊断、治疗和相关药物研发提供一定的帮助。

参考文献

- 1 吴继周,叶馥荪,莫志纯. 广西原发性肝细胞癌病因探讨 - 118 例配对病例 - 对照的条件 Logistic 回归分析[J]. 癌症,1990,9(1): 25 - 27.
- 2 耿鑫,李悦国,朱国平,等. 应用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术筛选肝细胞性肝癌血清标志物的研究[J]. 中国肿瘤临床,2006,33(20):1161 - 1164.
- 3 刘丽杰,王文静,王占峰. 乙型肝炎病毒相关肝癌血清差异表达蛋白的筛选、鉴定及其诊断价值[J]. 第二军医大学学报,2008,29(1):6 - 10.
- 4 苏乃伦,牟文凤,王斌. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肝癌血清蛋白标记物[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(13):53 - 56.
- 5 张谦,单岩,王家祥,等. 应用 SELDI-TOF-MS 对先天性巨结肠血清蛋白质标记物检测[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(2):164 - 167,171.
- 6 Wu W, Hu W, Kavanagh JJ. Proteomics in cancer research[J]. Int J Gynecol Cancer, 2002,5(12):409 - 423.
- 7 Kavallaris M, Marshall GM. Proteomics and disease: opportunities and challenges[J]. Med J Aust, 2005, 182(11):575 - 579.
- 8 吴继周,钟世聪,刘启福,等. 广西肝癌高发区五项危险因素与原发性肝癌关系的定群研究[J]. 广西医学院学报,1992,9(3):12 - 14.
- 9 肖开银,黎乐群,彭民浩,等. 家族聚集性肝癌 101 例家族史和临床分析[J]. 广西医科大学学报, 2005,22(2):224 - 226.
- 10 陈圆圆,丁飞,谢裕安. 广西扶绥县肝癌高发家系谷胱甘肽转硫酶 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性的研究[J]. 中国癌症防治杂志,2012,4(2):140 - 144.
- 11 杨志国,谢裕安,匡志鹏,等. 广西扶绥人群 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与肝癌易感性关系的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2009,16(13):970 - 973.

[收稿日期 2013 - 12 - 31][本文编辑 黄晓红 韦颖]