

表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术在肝细胞癌血清学诊断中的应用

田字彬, 刘华, 孙桂荣, 孔心涓, 张翠萍, 王斌

田字彬, 孔心涓, 张翠萍, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003
刘华, 青岛大学医学院附属医院内镜中心 山东省青岛市 266003
孙桂荣, 青岛大学医学院附属医院临床免疫检验中心 山东省青岛市 266003
王斌, 青岛大学医学院微生物教研室 山东省青岛市 266021
田字彬, 1995年上海第二医科大学博士, 1989-2003日本福井医科大学访问学者, 主任医师, 教授, 从事消化系统疾病的诊治研究。青州市科技局资助项目, No. 2004-11
通讯作者: 田字彬, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。tianzb@qdumh.qd.sd.cn
电话: 0532-82911304 传真: 0532-82911999
收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-10

Application of surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in the diagnosis of hepatocellular carcinoma

Zi-Bin Tian, Hua Liu, Gui-Rong Sun, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Bin Wang

Zi-Bin Tian, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Hua Liu, Department of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Gui-Rong Sun, Clinical Immunologic Center, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Bin Wang, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by Qingdao Technology Agency, No. 2004-11
Correspondence to: Dr. Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn
Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To explore tumor markers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) through detecting the serum protein spectrum differently expressed between hepatitis B virus (HBV) carriers and HCC patients.

METHODS: We detected the serum protein spectrum in 27 HCC patients, 27 HBV carriers and 25 healthy controls using surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technique, and the diagnosis model was established through analyzing the detected data by biomarker patterns software (BPS) 5.0.

RESULTS: The protein peaks, which could discriminate HBV carriers from HCC patients and healthy individuals, as well as healthy individuals from HCC patients, were detected. A diagnosis model based on the detected data was established with the specificity of 93%, 96%, 84%, and sensitivity of 85%, 96%, 89%, respectively. In addition, the 8141-Da protein in HCC patients had a higher expression than that in HBV carriers ($P < 10^{-5}$); the expression of 3448-Da protein was higher both in HCC patients and HBV carriers than that in healthy controls ($P < 10^{-5}$), but it had no significant difference between HCC patients and HBV carriers ($P > 0.05$), indicating that 3448-Da protein might be a potential marker for HBV infection; 7771-Da protein was differently expressed between the three groups of patients.

CONCLUSION: With a high specificity and sensitivity, the detection of serum protein spectrum can be performed easily and quickly by SELDI-TOF-MS technique, which provides a serological way for the diagnosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Proteomics; Tumor marker; Surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

Tian ZB, Liu H, Sun GR, Kong XJ, Zhang CP, Wang B. Application of surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2499-2503

摘要

目的: 检测HBV感染携带者与肝细胞癌(HCC)患者血清蛋白质的差异性表达, 以发现HCC

■背景资料

我国是一个肝炎大国, 原发性肝癌的发病率高且预后差, 目前尚无单一的敏感且特异的标志物能诊断所有肝癌。SELDI蛋白质芯片技术是近年来新兴的蛋白质组学技术, 本研究利用其具有快捷、简单、灵敏、可同时检测多种蛋白质, 并且可检测微量蛋白等特点, 用以筛选HCC的标志蛋白, 为HCC的诊治开辟新的途径。

■ 研发前沿

SELDI蛋白质芯片技术的运用为发现肿瘤相关的多蛋白生物标记物标记提供了一种全新的蛋白质组学方法,目前国内外研究聚焦于探索早期肿瘤标志物以及选择肿瘤的治疗靶点,但是其研究技术仍难以实现鉴定细胞和组织的每一个蛋白质,蛋白质数据库尚待完善.目前集蛋白质分离和鉴定于一体的蛋白质芯片的研究正在迅速发展,相信蛋白质组学技术将最终成为人类重大疾病机制阐明和诊断的有利武器.

的肿瘤诊断标志物.

方法: 用表面增强的激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测27例HCC患者, 27例HBV感染携带者, 25例健康对照血清中的蛋白质谱, 并用Biomarker Patterns System 5.0软件分析, 建立诊断模型.

结果: 检测HCC患者与HBV感染携带者, 正常对照与HCC患者, 正常对照与HBV感染携带者的差异性蛋白分子, 据此构建分类模型, 得到的灵敏度和特异度分别为93%, 85%; 96%, 96%; 84%, 89%. 其中相对分子质量为8141 Da的蛋白峰在HCC组明显高于HBV感染组($P < 10^{-5}$); 相对分子质量为3448 Da的蛋白峰在HCC及HBV感染携带组表达均较正常组显著增高($P < 10^{-5}$), 而在HCC-HBV组无明显差异($P > 0.05$), 提示其可能为HBV感染的一种标志蛋白; 相对分子质量为7771 Da的蛋白峰在3组中均有差异性表达.

结论: SELDI蛋白芯片技术检测血清蛋白质谱法诊断HCC具有较高的灵敏度和特异度, 操作简单快捷, 临床应用前景广阔, 为HCC诊断提供了新的血清学方法.

关键词: 肝细胞癌; 蛋白质组学; 肿瘤标志物; 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱

田宇彬, 刘华, 孙桂荣, 孔心滢, 张翠萍, 王斌. 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术在肝细胞癌血清学诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2499-2503
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2499.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤, 其死亡率位居第二, 由于HCC患者早期常无明显症状, 发现时已属中晚期, 患者预后差. 其中约90%是乙型肝炎病毒(HBV)感染者经过15-25 a的慢性过程转化而来的. HBV感染致HCC发生的详细机制尚不十分清楚, 因此, 对高危人群筛查发现早期HCC并给予干预治疗和跟踪随访是降低HCC发生的有效方法. AFP及CT检查是发现HCC的主要检查手段, 但对发现早期HCC特别是对监测HBV感染者何时发生癌变尚无可靠预测作用. 因此, 迫切需要探索一种快速、简单、灵敏度高、特异性好的早期诊断方法.

许多疾病即使在没有任何症状的早期, 细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有一定程

度改变, 并通过血清蛋白质水平反映出来. 因此, 通过比较不同人群血清中差异蛋白质的表达, 可能筛选出肿瘤相关的标志分子或特异性的蛋白质谱. SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization)蛋白质芯片技术^[1-2]是近年来新兴的一种蛋白质组研究技术, 可以对体液和血清中的蛋白质进行检测, 为寻找肿瘤相关蛋白质标志物提供了重要的技术手段. 目前已陆续报道采用SELDI蛋白质芯片技术检测膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌等^[3-6]患者血清中特异的标志分子. 我们运用该技术检测HCC患者、HBV携带者及健康对照的血清蛋白质差异性表达, 通过分别比较各组之间蛋白质谱表达的差异, 筛选HCC的标志蛋白, 为HCC的诊断、治疗以及发病机制的探讨提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HBV阳性且未治疗的HCC患者27(男22, 女5)例, 平均年龄55岁, 均经病理或临床诊断确诊; 单纯HBV感染携带者27(男20, 女7)例, 平均年龄50岁; 健康对照25(男14, 女11)例, 平均年龄49岁. 标本均取自青岛大学医学院附属医院, 各组年龄及性别均匹配(χ^2 检验, $P > 0.05$). 50 mmol/L醋酸钠(NaAc, pH 4.0), 9 mmol/L尿素(U9, 含DTT), HPLC水, 乙氰, 三氟乙酸, 饱和芥子酸(SPA), Triton均购自美国Sigma公司, 蛋白质芯片时间质谱分析仪(PBS II C)及弱阳离子交换(WCX-2)蛋白质芯片由美国CIPHERGEN Biosystems公司提供, 低温离心机购自日本日立公司. 采集空腹全血标本5 mL, 立即放入4℃, 静置3 h, 4℃ 4000 r/min离心10 min, 吸取血清按每管50 μ L分装后置-86℃冰箱保存备用.

1.2 方法 取血清10 μ L加入U9 20 μ L混匀后冰浴300 r/min震荡30 min, 然后加入WCX-2 buffer (50 mmol/L NaAc, pH 4.0) 360 μ L. 将芯片装入生物芯片处理器(Bioprocessor), 每孔加入WCX-2 buffer (50 mmol/L NaAc, pH 4.0) 200 μ L预处理芯片, 置于振荡器(MS1 Minishaker) 300 r/min约5 min, 重复上述操作1次. 在芯片处理器每孔中加入处理好的血清样100 μ L, 置振荡器300 r/min, 1 h. 甩出样品, 每孔加入WCX-2 buffer 200 μ L, 室温置振荡器300 r/min, 震荡5 min, 甩去孔中液体, 再次加入WCX-2 buffer 200 μ L, 重复操作1次. 每孔加入HEPES (1 mmol/L, pH 4.0) 200 μ L, 立刻甩出. 立刻拆开芯片处理器, 取出芯片, 风干后, 立刻

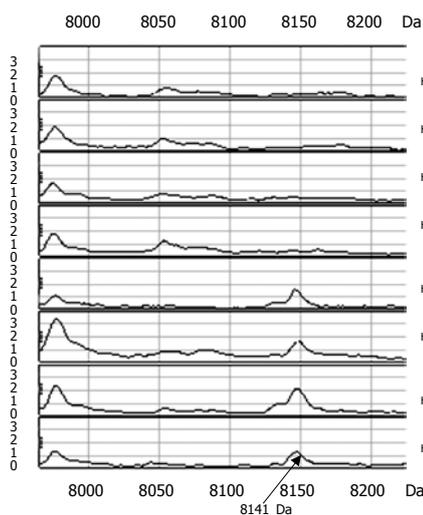


图1 蛋白峰8141 Da在HBV组中表达下降, 在HCC中表达升高.

在每个加样孔上加SPA 0.5 μ L并重复1次. 然后行质谱分析. 蛋白质芯片采用PBS II C型蛋白质芯片时间飞行质谱仪读取数据, 仪器每天用标准多肽和低于200 kDa的蛋白质标准分子校正: 系统的质量偏差为0.1%. 检测芯片时参数设置如下: 激光强度210, 检测敏感度10, 优化分子质量范围为2-10 kDa, 最高分子质量为50 kDa.

统计学处理 采用CIPHERGEN proteinchip 3.0版本的分析软件自动采集数据, 结果用Biomarker Wizard软件转化为Excel表后用BPS 5.0 (biomarker patterns systems 5.0)软件分析HCC患者、HBV携带者、正常对照的蛋白质谱差异, 并将差异蛋白分子构建分类模型, 从而得出特异度和灵敏度.

2 结果

2.1 质谱分析 用CIPHERGEN proteinchip 3.0软件在分子质量为1.2-30 kDa范围内对3组样品进行质谱分析, 用Biomarker Wizard软件对分子质量及能量校正后共得出92个有意义峰, 将其转入BPS 5.0分析, 分别对HBV感染携带者样本与HCC样本(HBV-HCC)、正常样本与HCC样本(N-HCC)、正常样本与HBV感染携带者进行比较(N-HBV), 检测出差异蛋白峰(表1). 将全部92个峰在分子质量为1.2-30 kDa范围内构建分类模型, 分别选择有意义的峰构建结构图, 根据此分类模式得出其灵敏度和特异度(表2).

2.2 蛋白表达差异 通过BPS 5.0软件统计分析, 显示相对分子质量8141 Da的蛋白峰为HBV-HCC组差别最显著的蛋白峰, 其在HCC组表达显

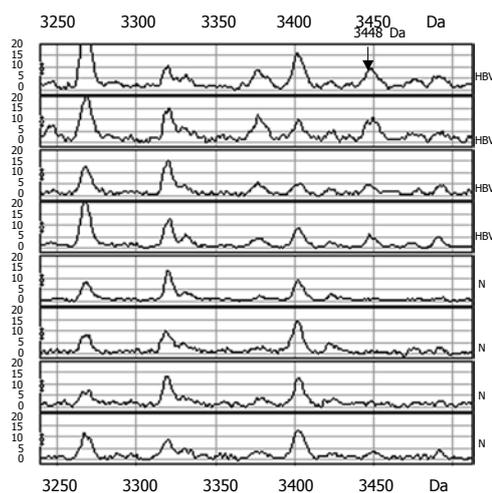


图2 蛋白峰3448 Da在HBV组中表达升高, 在N组表达下降.

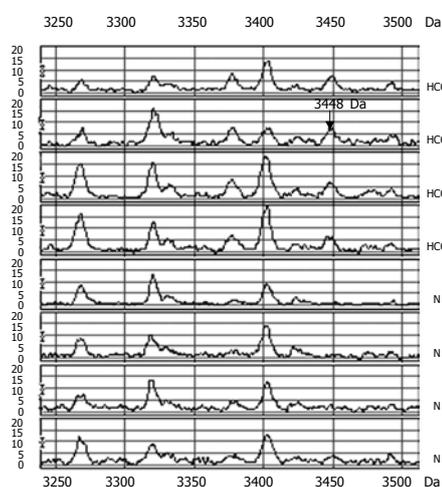


图3 蛋白峰3448 Da在HCC组中表达升高, 在N组表达下降.

著高于HBV组(图1); 3448 Da的蛋白峰为区别N-HCC, N-HBV组最有意义的蛋白峰, 其在HBV, HCC组均高于N组, 而在HBV-HCC组无明显差别(图2, 3); 另外, 7771 Da的蛋白峰在3组中表达均有差异, 其在正常对照组中表达最高, 在HCC组表达次之, 在HBV感染携带组中表达最低(图4).

3 讨论

癌症的发生是一个多因素诱导、多事件参与、多基因突变的漫长的多阶段过程. HCC也不例外, 其中HBV的感染在HCC发生过程中具有重要的意义. 目前关于HBV的致癌机制在基因水平研究最多的是关于X基因的整合引起肝细胞一系列的功能变化^[7]. 在肝细胞癌变过程中某些癌变相关的基因表达异常, 合成并分泌一些微

■ 创新盘点

本研究运用新兴的蛋白质组学技术寻找HCC的肿瘤标志物, 为HCC的诊断开辟了新的途径.

■ 应用要点

8141 Da, 3448 Da, 7771 Da等蛋白标志分子可望为HCC的标志分子, 分离并鉴定这些分子将对HCC的诊断治及发病机制的探索提供理论依据.

■名词解释

SELDI-TOF-MS

技术:表面增强的激光解吸电离飞行时间质谱技术,主要用于蛋白质的研究,工作原理是当激光到达蛋白样品表面时,样品结晶发生离子化和解吸附,结果使分析物电离,并转变为气相,在电场中快速运动即“飞行”,带正电荷的蛋白质被排斥而正极飞离金属片,当一定电压下的电场能量施加在蛋白质分子上时,其飞行速度取决于质量,蛋白芯片阅读器精确记录被检分子的飞行时间并据此得出分子量。

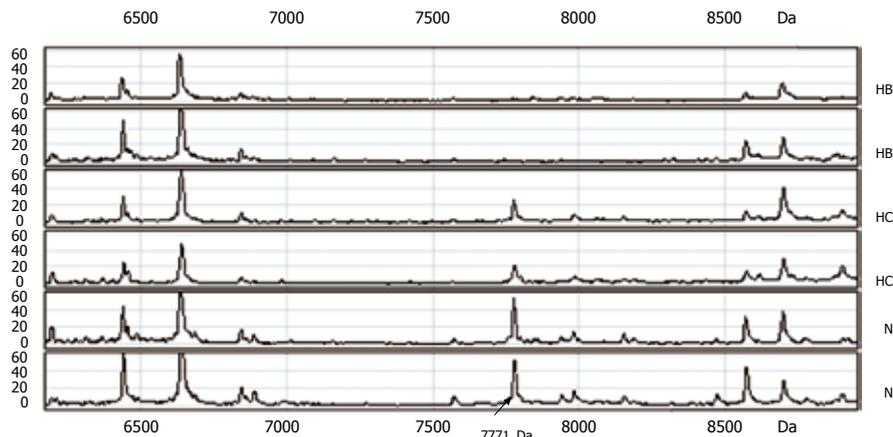


图 4 SELDI-TOF 质谱: 7771 Da 的蛋白峰在 HBV, HCC 及正常对照组之间的蛋白峰图, 可见其在 HCC 中表达明显高于 HBV 患者, 而正常对照中表达则最高。

表 1 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 组的差异蛋白峰 (Da)

HBV-HCC	8141	7771 ¹	10 267 ²	9288	3939			
N-HCC	3448 ²	13 756	13 968	6884	3377	7771 ¹	8566	7934
N-HBV	3448 ²	3377	3890	7771 ¹	7934	10 267 ²		

¹表示此蛋白峰在 3 组中均有差异表达; ²表示其在 2 组中有差异性表达。

量蛋白进入外周血, 通常难以检测到或处于极低水平, 临床上现有的 HCC 标志物众多, 尚无单一标志物能够诊断所有 HCC。敏感而特异的如 AFP-L3, HCC 特异性 GGT 和 TGF- β 1 等, 他们间无相关性并起互补作用, 这就需要探索一种新的技术以发现早期肿瘤标志物。

SELDI 蛋白质芯片技术是近年发展起来的先进的蛋白质组学技术, 可检测疾病进展中不同阶段血清中多肽量的变化, 翻译后修饰的改变或某些多肽的聚糖结构变化, 为 HCC 肿瘤标志物的进展提供了一个新的方法, 他以灵敏度高、特异性好、重复性强、操作简单、可同时检测血清中的多种蛋白质等优势, 已被应用于检测血清、尿液、细胞裂解液、脑脊液、组织等^[3,8-10]多种生物样品。我们运用 SELDI 蛋白质芯片结合生物信息学技术, 检测了 27 例 HCC 患者, 27 例 HBV 感染携带者, 25 例正常人血清中蛋白质的差异性表达, 从中筛选出各自的相关性标志分子, 使用此标志分子检测 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 得出的灵敏度, 特异度分别为 85%, 93%; 96%, 96%; 89%, 84%。研究显示, 8141 Da 的蛋白峰为 HBV-HCC 组差别最显著的蛋白峰, 其在 HCC 组表达显著高于 HBV 组, 检测并鉴定此分子的表达对 HCC 的诊断具有重要意义; 3448 Da 的蛋白峰在 HCC 组及 HBV 感染携带组均较正常组显著增高, 而在 HBV-HCC 组无明显差异, 提示其可能为 HBV 感染的一种标志蛋

表 2 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 组的灵敏度和特异度 (%)

	HBV-HCC	N-HCC	N-HBV
灵敏度	85	96	89
特异度	93	96	84

白; 而 7771 Da 的蛋白峰在三组中均有差异性表达, 其在正常对照中表达则最高, HCC 中表达次之, 而在 HBV 组表达最低。为此, 我们据其分子量进行检索 (<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>), 查得其与血小板因子-4 (PF-4) 前体的分子量最为接近, PF-4 具有抑制内皮细胞增殖和细胞周期中的作用, 可通过干扰血管生成而抑制肿瘤细胞生长^[11], 而该蛋白是否为 PF-4 及其在肝癌发生、进展过程中的具体作用尚待进一步探讨。因此, 鉴定出这些蛋白分子, 并进一步研究其构象、氨基酸组成及生物学功能, 将有助于探讨疾病发生的机制, 并为设计治疗靶点提供依据, 对蛋白质数据库的完善具有重要意义。

由于我们采集和处理要求较高, 故可以用于分析的样本量相对较少, 对本实验相关标志分子的敏感性和特异性的提高有影响。因此, 我们将在今后的研究中扩大样本量, 并对一部分样本进行盲筛, 进一步确认本实验筛选出蛋白质分子的特异性和敏感性, 同时还要对 HCC 发展不同阶段, 不同类型患者进行蛋白质谱分析, 以期发现 HCC 分期分类的标志分子。在临床

检测中, 运用多个标志分子代替单一标志分子鉴定肿瘤早期出现的微小蛋白, 可望早期诊断 HCC. 研究表明, SELDI蛋白质芯片结合生物信息学技术可检测出HCC患者血清中肿瘤特异性蛋白质图谱, 可以作为潜在的检测和分类癌症及癌症分型的临床工具, 有高度敏感性和特异性, 为HCC的诊断提供了崭新的途径和方法, 具有广阔的临床应用前景. 此外, 鉴定出相关蛋白标志分子将有助于了解HCC的产生及预后.

4 参考文献

- 1 Robinson JC, Kerjan P, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* 2000; 304: 983-994
- 2 Stoop AA, Jespers L, Lasters I, Eldering E, Pannekoek H. High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). *J Mol Biol* 2000; 301: 1135-1147
- 3 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinou S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502
- 4 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 5 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 6 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1296-1304
- 7 曹基辉, 张静. 乙肝病毒X基因与肝细胞肝癌. 国外医学病毒学分册 2003; 10: 28-31
- 8 Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics* 2003; 3: 1486-1494
- 9 Hayman MW, Przyborski SA. Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 918-923
- 10 Melle C, Kaufmann R, Hommann M, Bleul A, Driesch D, Ernst G, von Eggeling F. Proteomic profiling in microdissected hepatocellular carcinoma tissue using ProteinChip technology. *Int J Oncol* 2004; 24: 885-891
- 11 Gupta SK, Singh JP. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 1994; 127: 1121-1127

■同行评价

本文采用SELDI蛋白芯片技术检测HBV了感染携带者与HCC患者血清蛋白质的差异性表达, 以发现HCC的肿瘤诊断标志物, 实验结果可信, 具有较高学术价值及实用价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006中国结直肠肛门外科学术会议通知

本刊讯 为了加强与世界同行的交流与接轨, 将我国直肠肛门外科的专利化发展到一个新的台阶, 由“中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组”、“中国抗癌协会大肠癌专业委员会”、“中国中医药学会肛肠分会”和“中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会”共同主办的“2006中国结直肠肛门外科学术会议”将于2006-11-09/12在珠海国际会议中心大酒店举行. 届时结直肠肛门外科的专家、同行将共聚一堂, 规划我国结直肠肛门外科协作研究、共同发展的前景. 大会将邀请国际最著名的美国、欧洲、新加坡、日本、香港及台湾的专家和我国外科界、中医界、肿瘤界以及相关领域的专家就本专业进展作专题报告. 大会同时还采用手术录像、提问、讨论、争鸣、答疑、展板等多种方式进行研究交流. 这将是我国结直肠肛门外科学界的一次盛会. 诚邀普通外科、结直肠肛门外科的专家、同行参会, 参会者可获得中华医学会 I 类继续教育学分.

联系电话: 020-87331428, 87332200-86698