

应用SELDI-TOF-MS技术筛选肝癌遗传性血清蛋白标志物

邓敬桓, 陈智平, 李山, 秦雪, 黄东萍

■背景资料

广西是全国乃至全球肝癌高发区之一, 乙型肝炎病毒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, 存在许多肝癌易发家系, 也有大量无癌家系。

邓敬桓, 陈智平, 黄东萍, 广西医科大学公共卫生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

李山, 秦雪, 广西医科大学第一附属医院检验科 广西壮族自治区南宁市 530021

邓敬桓, 助理研究员, 硕士, 主要从事肝病蛋白组学的研究。

广西自然科学基金资助项目, No. 2011GXNSFA018271

作者贡献分布: 论文写作与质谱分析由邓敬桓完成; 课题设计由陈智平完成; 试剂由秦雪提供; 数据分析由李山与黄东萍完成。

通讯作者: 陈智平, 教授, 硕士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学公共卫生学院。

nanyangtang@yahoo.com.cn

电话: 0771-5358877

收稿日期: 2013-12-06 修回日期: 2013-12-30

接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-02-18

Detection of hereditary serum markers for liver cancer using SELDI-TOF-MS protein chip technology

Jing-Huan Deng, Zhi-Ping Chen, Shan Li, Xue Qin, Dong-Ping Huang

Jing-Huan Deng, Zhi-Ping Chen, Dong-Ping Huang, College of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Shan Li, Xue Qin, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Guangxi Natural Science Foundation, No. 2011GXNSFA018271

Correspondence to: Zhi-Ping Chen, Professor, College of Public Health, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. nanyangtang@yahoo.com.cn

Received: 2013-12-06 Revised: 2013-12-30

Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To detect specific serum biomarkers for liver cancer using surface enhanced laser desorption inhibition time-of-flight ionization mass spectrometry (SELDI-TOF-MS), and establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families.

METHODS: Serum samples collected from 30 patients from liver cancer prone families and 30 patients from liver cancer-free families were

detected by SELDI-TOF-MS. The data were analyzed was Biomarker Wizard and BPS software to establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families. The pattern was evaluated by a blind test.

RESULTS: A total of 20 peaks showed significant differences between the two groups, among which 4 (9645.48, 3960.65, 7895.66, 5916.07 kDa) were chosen to establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families. The accuracy, sensitivity and specificity of the pattern were 92% (55/60), 93% (28/30) and 90% (27/30), respectively. The blind test showed that the sensitivity and specificity were 92% (23/25) and 90% (18/20), respectively.

CONCLUSION: SELDI-TOF-MS has a high sensitivity and specificity in screening specific hereditary serum biomarkers for liver cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver cancer; Familial pedigree; Surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; Serum biomarker

Deng JH, Chen ZP, Li S, Qin X, Huang DP. Detection of hereditary serum markers for liver cancer using SELDI-TOF-MS protein chip technology. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 690-694 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/690.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.690>

摘要

目的: 采用表面增强激光解析/电离飞行时间质谱技术(surface enhanced laser desorption inhibition time of flight ionization mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)检测肝癌易发家系患者和无癌家系患者血清蛋白生物标志物, 比较两者间的蛋白差异, 建立筛选血清蛋白质图谱模型并初步验证。

方法: 选择30例肝癌易发家系患者, 30例无癌

■同行评议者

程树群, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

家系患者,应用SELDI-TOF-MS技术及相应的计算机软件进行比较分析,检测肝癌易发家系患者血清蛋白质的特异性生物标志,建立肝癌易发家系患者的筛选模型,并对其进行了双盲法验证。

结果:肝癌易发家系组与对照组共有20个蛋白质差异有显著性,以其中4个蛋白标志物(9645.48、3960.65、7895.66和5916.07 kDa),建立的筛选模型检测灵敏度为93%(28/30),特异性为90%(27/30),准确率为92%(55/60)。盲法验证,灵敏度为92%(23/25),特异性为90%(18/20)。

结论:SELDI-TOF-MS技术具有高灵敏度和特异性,在肝癌易发家系的血清蛋白特异性生物标志物的筛选等方面具有较好的应用前景。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝癌; 家系; 表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱; 血清蛋白标志物

核心提示: 本研究筛选出的20个有统计学意义的差异性蛋白峰可能就是我们要寻找的遗传性蛋白峰,肝癌易发家系组与无癌家系组在血清蛋白组学方面确实存在差异,再次验证原发性肝癌的发生与遗传具有密切相关性。

邓敬恒, 陈智平, 李山, 秦雪, 黄东萍. 应用SELDI-TOF-MS技术筛选肝癌遗传性血清蛋白标志物. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 690-694 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/690.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i5.690>

0 引言

肝癌易发家系包括肝癌高发家系和肝癌非高发家系,相关研究表明^[1],肝癌的发生发展是多因素参与的多环节的病理过程,除了与病毒寄生虫和细菌的感染、黄曲霉毒素的摄入、水源污染以及吸烟喝酒这些外环境致癌因素有关,自身遗传因素也具有一定的相关性。本实验采用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱技术,以肝癌无癌家系为参照,筛选出肝癌遗传性的血清蛋白标志物,为将来建立能够判断肝癌易发家系发生肝癌危险性的预测体系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌易发家系包含肝癌高发家系和肝癌非高发家系两类。肝癌高发家系: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。肝癌非高发家系:直系亲属中发生过1例原发性肝癌病例的家系。无癌家系: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、肝癌非高发家系和无癌家系成员名单,在患者经病理或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,在2010-01/2013-03期间,采集到肝癌高发家系患者30例血清,肝癌非高发家系患者25例血清,肝癌无癌家系患者50例血清。其中以相同的生活环境、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,选取肝癌高发家系患者15例,肝癌非高发家系患者15例作为肝癌易发家系组,对照组肝癌无癌家系患者30例,用于筛选模型的建立,剩余样本用于所建模型的双盲法验证。尿素、3-环乙胺-1-丙磺酸、乙腈、二硫苏糖醇、醋酸钠、三氟乙酸、羟乙基哌嗪乙磺酸、芥子酸、超纯水均购自美国西格玛(Sigma)公司;蛋白芯片生物系统及CM10芯片购自美国赛弗吉(Ciphergen)公司。

1.2 方法

1.2.1 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2 h后,1000 r/min离心10 min,冰浴上分装血清于-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1000 r/min,4℃离心2 min;取血清10 μL,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 μL上述变性后样品加入360 μL的50 mmol/L NaAC(pH 4.0)缓冲液,立即混匀。

1.2.2 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 μL 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 μL处理好的样品,4℃震荡1 h;弃去未结合样品,每孔加入200 μL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 μL 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 μL;待干后,重复加SPA一次。

1.2.3 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

■ 研发前沿

蛋白质的差异表达与肝癌发生发展存在着密切关系,这些易发家系家庭成员遗传的不同基因所表达的不同蛋白质本身可能具有发生肝癌的危险性。

■相关报道

肖开银等对101例家族聚集性肝癌家族史和临床进行分析,显示肝癌是遗传和环境因素相互作用的结果。

表 1 CM10芯片筛选肝癌易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值	蛋白质平均强度		差异蛋白质的 表达变化
		肝癌易发 家系组	肝癌无癌 家系组	
4700.91	0.00	1.13	3.62	↓
9125.89	0.00	1.89	3.21	↓
5317.22	0.00	4.65	8.04	↓
4856.19	0.00	3.14	2.28	↑
9645.48	0.00	28.1	4.95	↑
8282.61	0.00	4.12	6.16	↓
7679.40	0.00	3.74	4.11	↓
3960.65	0.00	0.27	3.58	↓
9179.55	0.00	8.11	6.96	↑
4760.91	0.00	4.39	2.85	↑
5916.07	0.00	3.35	10.65	↓
7554.67	0.00	1.95	1.15	↑
7895.66	0.00	11.49	3.27	↑
4598.00	0.00	23.47	27.60	↓
6315.22	0.00	10.54	6.96	↑
2742.85	0.00	8.05	5.29	↑
4681.23	0.00	1.18	2.47	↓
7847.62	0.00	3.14	1.57	↑
3565.86	0.00	3.89	1.78	↑
5701.52	0.01	2.71	4.92	↓

敏度8, 优化范围2000-10000, 最高相对分子质量50000, 芯片上的每个点采集130次。

1.2.4 分析差异蛋白: 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肝癌易发家系组与对照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。

1.2.5 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。

1.2.6 盲筛法验证诊断模型用剩余样本: 肝癌易发家系25例, 其中肝癌高发家系15例、肝癌非高发家系10例, 肝癌无癌家系组20例, 对上述建立的诊断模型进行盲法验证(masked analysis), 验证该模型的特异性和灵敏度。

统计学处理 数据的统计分析由统计软件包

表 2 模型中的4个蛋白所占的重要分值

Variable(变量)	Score(分值)	蛋白所占分值具体图示
M9645_48	100.00	
M3960_65	87.62	
M5916_07	67.40	
M7895_66	44.83	

SPSS10.0完成。两组间比较用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白质峰的初步筛选和评价 在相对分子质量2000-50000范围内共检测到45个蛋白质峰, 其中20个在两组间的比较差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.2 诊断模型的建立与验证 将这些差异峰用BPS软件进行分析, 自动选取其中4个差异峰(9645.48、3960.65、5916.07、7895.66 kDa), 模型中的4个蛋白所占的重要分值(表2), 建立了筛选肝癌易发家系的诊断模型(图1), 此模型的根节点为9645.48 kDa, 首先根据此峰值强度, 28例标本被划分到左侧的枝结点, 32例被划分到右侧的枝结点, 又根据3960.65、5916.07、7895.66 kDa的峰值强度, 将标本进一步划分, 最终将60例标本划分开。经交叉验证该模型区分肝癌易发家系组和肝癌无癌家系组, 30例肝癌易发家系组有28例被正确划分, 30例肝癌无癌家系组有27例被正确划分, 该模型检测灵敏度为93%(28/30), 特异性为90%(27/30), 准确率为92%(55/60)。用该模型对肝癌易发家系25例(其中肝癌高发家系15例、肝癌非高发家系10例), 肝癌无癌家系组20例进行盲法验证, 23例肝癌易发家系, 18例肝癌无癌家系被区分正确, 盲法验证, 灵敏度为92%(23/25), 特异性为90%(18/20)。

3 讨论

蛋白质组是连接基因序列与细胞功能的桥梁。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, 蛋白质才是生命功能的主要执行者。而蛋白质组的研究方法现已广泛应用于临床各领域的研究^[2]。特别是对原发性肝癌的发生、发展等方面的相关研究。

原发性肝癌的发生是多因素相互作用, 多途径多步骤长期作用的结果, 有外部的环境因素包

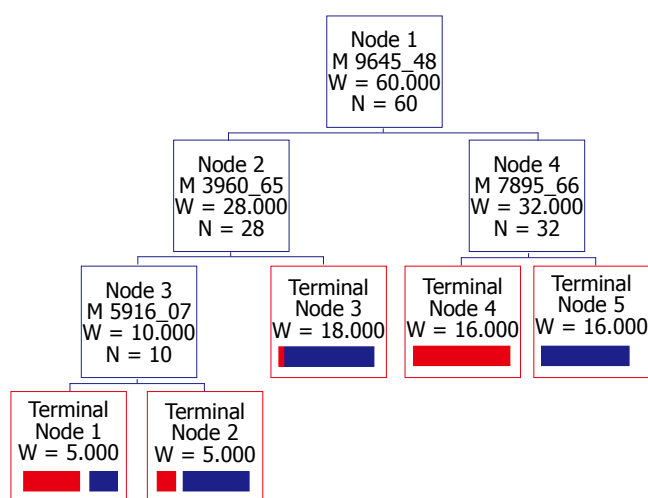


图 1 肝癌易发家系血清诊断筛选模型。

■创新盘点

本研究采用SELDI-TOF-MS蛋白芯片技术分析广西肝癌高发区肝癌易发家系和无癌家系肝癌发展过程的血清蛋白质组,并鉴定出蛋白质谱中差异蛋白,探寻肝癌遗传性相关的蛋白标志。

括病毒感染, 黄曲霉毒素, 农村饮用水的污染, 饮酒、吸烟, 幽门螺旋杆菌肝吸虫感染等^[3-8]; 而内部因素如自身的遗传因素, 在原发性肝癌的发生机制方面也起了非常重要的作用。广西医科大学在承担国家“六五”和“七五”攻关课题以及进行的一系列研究中发现, 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, 出现癌家族聚集性^[9], 为揭示这一流行病学现象。本实验从蛋白质组水平进行研究, 以30例肝癌易发家系患者、30例无癌家系患者作为研究对象, 采用(SELDI-TOF-MS)及CM10蛋白芯片筛选血清中蛋白质的差异表达, 并找到表达明显改变的标志蛋白, 实验结果发现肝癌易发家系组与无癌家系组在相对分子质量2000-50000范围内共检测到45个蛋白质峰, 其中20个在两组间的比较差异, 有统计学意义($P < 0.05$), 筛选出的这些有统计学意义的蛋白质峰可能就是我们要寻找的遗传性蛋白质峰。运用BPS软件筛选出其中的4个蛋白标志物(9645.48、3960.65、7895.66和5916.07 kDa), 建立的血清蛋白质图谱诊断模型, 检测的灵敏度为93%(28/30), 特异性为90%(27/30), 准确率为92%(55/60), 能较好地将两组区分开来, 且经过盲筛将25例肝癌易发家系, 20例肝癌无癌家系组对建立的血清蛋白质图谱诊断模型进行验证, 得到较高灵敏度92%(23/25)与特异性(23/25), 说明模型的合理性和可操作性, 同时这也表明肝癌易发家系组与无癌家系组在血清蛋白组学方面确实存在差异, 原发性肝癌的发生与遗传具有密切相关性。肝癌易发家系的遗传基因可能在抑癌基因和癌基因上出现失衡或出现遗传易感性^[10], 陈圆圆等^[11]和肖开银等^[12]对广西扶绥县肝癌高

发家系遗传基因的相关研究显示谷胱甘肽转硫酶M1(glutathione-S-transferase M1, *GSTM1*)和谷胱甘肽转硫酶T1(glutathione-S-transferase T1, *GSTT1*)基因多态性与肝癌家族聚集性相关;*GSTM1*和*GSTT1*基因联合缺失与肝癌的发生呈显著正相关, 诸如*GST*基因多态性、第10号染色体缺失^[13]、*p53*、*p21*基因表达差异^[14]、细胞色素*P4501A*基因多态性、乙醛脱氢酶2基因多态性^[15]等与肝癌之间存在密切相关, 其表达的相关蛋白质就可能异于无癌家系患者, 增加了原发性肝癌发生的危险性。

为了使筛选的遗传性的血清蛋白标志物更具有代表性, 做者将继续收集标本, 扩大样本例数, 验证其准确性, 并做相关性的生物学功能进行鉴定, 为将来建立能够判断肝癌易发家系发生肝癌危险性的预测体系奠定基础。

4 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855]
- 牟文凤, 王亚秋, 孙佰秀, 王斌. SELDI蛋白质芯片技术检测膝骨性关节炎患者黏附关节液中蛋白质的差异改变. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 2097-2099
- 吴江南, 陈裕明, 王翠玲. 丙型、乙型肝炎病毒对原发性肝癌影响的荟萃分析. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 137-140
- 李媛, 苏建家, 曹骥, 欧超, 仇效坤, 班克臣, 杨春, 覃柳亮, 罗丹, 岳惠芬, 张丽生, 万大方, 顾健人. 用cDNA阵列技术研究黄曲霉毒素B1诱发树鼯肝癌形成过程中的基因变化. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 96-99
- 苏德隆. 饮水中蓝绿藻毒素与肝癌的研究. *医学研究通讯* 2001; 30: 19-20
- 汤伯明, 张竹梅, 王其军, 王启敏, 朱鑫, 樊巍巍, 张小燕, 边建超. 饮酒与肝癌的病例对照研究. *实用肿瘤学杂志* 2002; 16: 88-91
- 方俊, 刘伯齐, 张庆镐, 蔡英姬. 吸烟与肝癌关系的病例对照研究. *延边大学医学学报* 2003; 26: 106-108
- 黎学铭, 谭裕光, 张鸿满, 欧阳颐, 阮廷清, 许洪波. 广西华支睾吸虫病流行及危险因素分析. *应用预防医学*

■同行评价

肝癌发生与家属遗传性有相当的关系,本研究科学性强,研究方法正确,数据可靠,结论可信,通过采用表面增强激光解析/电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)检测肝癌易发家系患者和无癌家系患者血清蛋白生物标志物,是目前研究的热点,从蛋白组学方面寻找肝癌发生相关蛋白对临床和基础研究都起重要作用。

- 2006; 12: 334-337
- 9 肖开银, 黎乐群, 彭民浩, 梁水庭, 覃晓, 陈希刚, 郭雅, 覃忠, 彭涛, 陈滨, 苏智雄, 尚丽明. 家族聚集性肝癌101例家族史和临床分析. 广西医科大学学报 2005; 22: 224-226
- 10 靳磊, 袁晨光. 肝癌相关新基因的研究进展. 临床医学工程 2013; 20: 380-382
- 11 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. 中国癌症防治杂志 2012; 4: 140-144
- 12 肖开银, 黎乐群, 彭民浩, 覃晓, 彭涛, 郭雅, 陈滨, 卢景宁, 秦权林, 桂文波. GSTM1、GSTT1基因多态性与家族聚集性肝癌的遗传易感性研究. 中国癌症防治杂志 2011; 3: 287-290
- 13 颜见, 姚志成, 钟跃思, 李明亮, 陈骋, 许瑞云, 邓美海. 第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因在家族聚集性肝癌组织中的表达及临床意义. 中华实验外科杂志 2012; 29: 1892-1895
- 14 林源, 莫显伟. 家族聚集性肝癌组织p53、p21、C-erbB-2基因表达分析. 广西医科大学学报 2006; 23: 94-95
- 15 崔美兰, 朴熙绪, 金永日, 李成浩, 金爱花. 延边地区朝鲜族及汉族男性乙醛脱氢酶2基因多态性与酒精性肝病的关系. 延边大学医报 2011; 34: 51-54

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种,统计到的文献数量共计221177余万篇次,涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此,向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者,表示衷心的感谢!(《世界华人消化杂志》编辑部)。