

血清蛋白质指纹图谱诊断早期胃癌临床意义^{*}

陆海波¹ 赵长宏¹ 马彦² 鲁海玲¹ 白玉贤¹

(1 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内二科 哈尔滨 150040 2 黑龙江省肿瘤研究所 哈尔滨 150040)

摘要 目的:应用 SELDI 蛋白质芯片检测胃癌患者血清蛋白质指纹图谱,筛选候选肿瘤标志物以建立诊断模型。方法:表面加强激光解吸电离-飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术及其配套蛋白质芯片检测 34 例胃癌患者(I/II 期 12 例与 III/IV 期 22 例)和 30 例健康人的血清蛋白质组图谱,运用判别分析处理数据筛选标志物并建立诊断模型。结果:2046m/z、1179m/z、1817m/z、1752m/z 和 1588m/z 等 5 个蛋白质峰组合所构建的诊断模型能达到鉴别胃癌患者和健康人的最佳诊断效果,特异度 94.1% (32/34),灵敏度 93.3% (28/30)。单个 4665m/z 蛋白质峰诊断模型可达到鉴别 I/II 期与 III/IV 期胃癌效果,其特异度 91.6% (11/12),灵敏度 95.4% (21/22)。结论:该方法在胃癌的诊断尤其是早期诊断方面具有一定价值,值得进一步研究。

关键词: 早期胃癌; SELDI-TOF; 诊断; 蛋白质组学

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

Detection and evaluation of serum proteomic patterns by SELDI-TOF-MS in early gastric cancer

LU Hai-bo¹, ZHAO Chang-hong¹, MA Yu-yan², LU Hai-ling¹, BAI Yu-xian¹

(1 Department of oncology, The Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040;

2 Tumor Institute Heilongjiang Province, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

ABSTRACT Objective: To detect the serum proteomic patterns using SELDI-TOF-MS ProteinChip array technology in gastric cancer, screen biomarker candidates, build diagnostic models and evaluate its clinical significance in early gastric cancer. **Methods:** SELDI-TOF-MS ProteinChip was used to detect the serum proteomic patterns of 34 patients with gastric cancer (12 cases of I/II stage and 22 cases of III/IV stage) and 30 healthy people. The diagnostic models were developed and validated by discriminant analysis. **Results:** Five protein peaks at 2046m/z, 1179m/z, 1817m/z, 1752m/z and 1588m/z were automatically chosen as a biomarker pattern and it could do the best in the diagnosis of gastric cancer, compared with the proteomic patterns of 34 patients with gastric cancer and 30 healthy people. The specificity and sensitivity of it were 94.1% (32/34) and 93.3% (28/30), respectively. We also found that the single peak 4665m/z could distinguish stage I/II stage and III/IV stage gastric cancer. The specificity and sensitivity of it were 91.6% (11/12) and 95.4% (21/22). **Conclusions:** This method shows great potential in diagnosing gastric cancer, especially in diagnosing early gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; SELDI-TOF; Diagnosis; Proteinic; Discriminant analysis

前言:

胃癌是常见恶性肿瘤,在世界范围内是第二多发恶性肿瘤,是消化系统最多发肿瘤^[1,2]。

可能是胃癌临床的异质性表现,迄今为止胃癌尚缺乏理想的肿瘤标志物,从而也给其早期诊断、术后疗效评价、预后监测及胃癌患者的康复等造成了一定的困难。

表面加强激光解吸电离-飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry SELDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种全新的蛋白质组学研究手段,其基本原理是通过特定的化学表面结合蛋白质分子再以激光轰击,使蛋白质成为离子而飞行于电场中并被检测器所测得,进而用不同位置、强度的峰来表示各种不同的蛋白质及其相对含量,最终形成可用于分析的图谱。该方法克服了

传统蛋白质组学研究方法所存在的诸多问题,实现了质谱技术用于临床检测的飞跃^[3,4]。

本研究应用 SELDI 质谱仪及其配套蛋白质芯片检测了 34 例胃癌患者和 30 例健康人的血清蛋白质指纹图谱,筛选出若干个候选肿瘤标志物,探讨其对早期胃癌诊断的意义。

1 材料和方法

1.1 病例资料

2004 年 1 月至 8 月间我院收治的初诊胃癌患者共 34 例,中位年龄 52 岁(34~74 岁)。常规根治手术后按 UICC1997 年胃癌 PINM 分期法进行分期,其中 I 期患者 6 例,II 期 6 例,III 期 5 例,IV 17 例,诊断均经术后病理证实。健康人群来自我院经胃镜病理证实的无胃部疾病 30 例,中位年龄 49 岁(25~72 岁)。所有血样均于清晨空腹采集,静置离心分离血清,-

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金(D0349),哈尔滨市科学技术计划项目(2005AA9cs116-14)

作者简介:陆海波,(1969-),女,博士,硕士生导师,副主任医师,从事消化道肿瘤基础与临床研究。

E-MAIL: luhabo200@126.com,电话:0451-86906080

(收稿日期:2006-06-06 接受日期:2006-07-10)

80℃低温 冰箱保存。

1.2 主要仪器、软件及试剂

PBS- II 表面加强激光解吸电离- 飞行时间质谱仪(SEL- DI- TOF- MS)、能量吸收分子 SPA、CM10 型蛋白质芯片及相应分析软件 ProteinChip Software 3. 2. 1(美国 CIPHERGEN 公司); HEPES 缓冲盐(Sigma 公司); CHAPS 缓冲盐(Sigma 公司)。

1.3 方法

CM- 10 芯片(弱阳离子+ 疏水膜)

步骤: 用 HPLCH₂O 洗涤芯片, 400rpm, 震荡五分钟三次。先将 10mM/L HCL 倒入带盖试管中盖好后。震荡五分钟。在用去离子水冲洗数次, 再将芯片装入 HPLCH₂O 试管中震荡五分钟。将芯片架子, 胶垫超声清洗干净, 用去离子水冲洗数次晾干后, 将芯片装入处理器上。每孔加入 200ul 0. 1M NaAC 结合 buffer, 室温振荡 250rpm, 五分钟重复一次。甩干后再上样品。

样品处理: ①血清样品冰上溶解, 4 度离心 10000rpm, 五分钟。取上清 20ul 加入 30ulU9(含 DTT) 混匀, 4 度震荡 250rpm, 20min, 每孔用封口膜封好。②U1 配法: 100ulU9(含 DTT) + 900ul 50 mM Hepes pH 7. 0。③每孔加入 100ul U1 缓冲液混匀, 盖严振荡 250rpm, 30min。④从上述 150ul 变形样品中取出 50ul, 加入到 200ul 0. 1M NaAC 结合 buffer 中混匀, 取出 100ul 上样, 室温振荡 250rpm, 60min, 取出样品。⑤每孔加入 150ul 0. 1M NaAC buffer, 室温振荡 250rpm, 5min, 倒掉后加入 150ul NaACbuffer, 共三次。再用 1m M Hepes pH 4. 0 淋洗芯片 30s, 重复一次。除去芯片晾干。⑥将 SPA 高速离心 30s, 在 SPA 管中, 加入 200ul 乙腈, 200ul 1% TFA 充分振荡五分钟, 静止五分钟。离心 1000rpm 1min。⑦每孔加入 SPA 0. 5~ 1. 0ul/ 点, 重复一次。两次之间各点风干。

1.4 数据收集及统计学分析

质谱仪参数设定: 激光强度 190, 灵敏度 9, 数据收集范围 1500~ 20000 m/z(蛋白质质量和电荷比值, 以下简称质荷比), 每次收集数据前以标准蛋白质芯片校正分子量。原始数据先以 Proteinchip Software 3. 2. 1 软件校正, 使总离子强度及分子量达到均一, 并过滤噪音, 初始噪音过滤值 5, 二次噪音过滤值 2, 以 8% 为最小阈值进行聚类。经上述数据预处理后, t 检验或 Mann- Whitney 秩检验(用于处理偏态分布数据) 比较胃癌患者与健康人血清蛋白质质谱数据(由 Proteinchip Software 3. 2. 1 自带的 Biomarker Wizard 5. 0 软件完成), 寻找两组之间表达有差异的蛋白质峰, 列出差异有统计学意义(P< 0. 05) 的所有蛋白质峰, 结合各个峰的权重比较不同蛋白质峰排列组合的判别分析结果, 选出最佳排列组合, 最后同时输出原始判别和交叉验证的结果。

2 结果

2.1 胃癌患者与健康人的比较

通过对 34 例胃癌患者和 30 例健康人血清蛋白质质谱数据的比较, 判别分析显示其中 5 个蛋白质峰组合所构建的诊断模型(模型 I) 能达到最佳诊断效果: 2046m/z, 1179m/z, 1817m/z, 1752m/z 和 1588, 其中质荷比为 2046 m/z 的蛋白质峰如图 1 所示。原始判别的准确率为 93. 75(60/64), 特异度 94.

1%(32/34), 灵敏度 93. 3%(28/30)(表 1); 交叉验证的准确率为 76. 56%(49/64), 特异度 73. 5%(25/34), 灵敏度 80. 0%(24/30)(表 2)。交叉验证显示模型 I 对 34 例胃癌患者中的 25 例做出了准确预测。

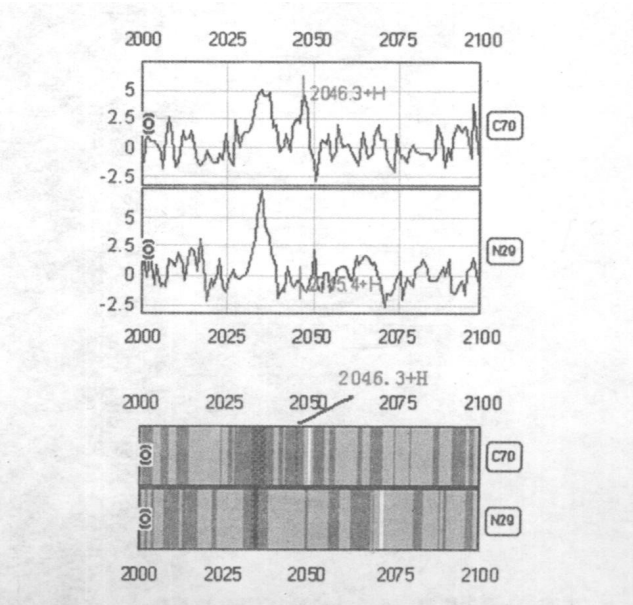


图1 质荷比为 2046m/z 的蛋白质峰(模拟电泳图和质谱图) 上为质谱图, 下为模拟电泳图, 均为 1 例胃癌患者和 1 例健康人的对照。可见该蛋白质在胃癌患者中表达高于健康人。

Figure 1 Differential expressions of the SELDI peaks at 2046m/z in the comparisons of gastric cancer and healthy control sera. C70: gastric cancer. N29: healthy control. The up figure is spectrometric, the down is electrophoresis.

表 1 模型 I 原始判别的结果

Table 1 The result of model I in the learning Sample Classification.

分组	胃癌患者(例)	健康人(例)	总计
胃癌患者	32.00	2.00	34.00
健康人	2.00	28.00	30.00
总计	34.00	30.00	64.00

Correct 0.941 0.933
Tot. Correct 0.9375
Specificity (True Ref): 0.941, Sensitivity (True Resp): 0.933

表 2 模型 I 交叉验证的结果

Table 2 The result of model I in the tested Sample Classification.

分组	胃癌患者(例)	健康人(例)	总计
胃癌患者	25.00	9.00	34.00
健康人	6.00	24.00	30.00
总计	31.00	33.00	64.00

Correct 0.735 0.800
Tot. Correct 0.7656
Specificity (True Ref): 0.735, Sensitivity (True Resp): 0.800

2.2 I / II 期与 III/ IV 期胃癌患者的比较

比较 12 例 I / II 期患者与 22 例 III/ IV 期患者的质谱数据, 其中 4665 m/z 的单个蛋白质峰的诊断模型(模型 II) 可达到鉴别 I / II 期与 III/ IV 期患者的最佳效果。其中质荷比为 4665m/z 的蛋白质峰如图 2 所示。原始判别, 总准确率 94. 1%(32/

34) (表 3), 特异度 91.7% (11/ 12), 灵敏度 95. 4% (21/ 22); 交叉验证结果, 特异度 91.7% (11/ 12), 灵敏度 86.3% (19/ 22), 总准确率 88.2% (30/ 34) (表 4)

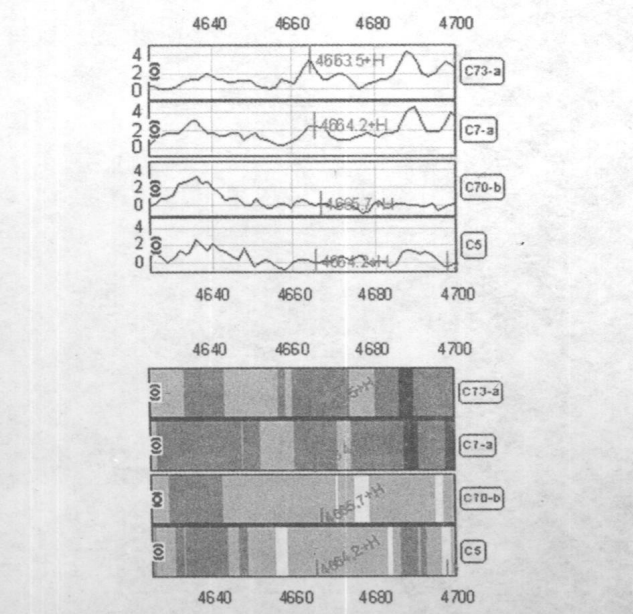


图 2 质荷比为 4665m/z 的蛋白质峰(模拟电泳图和质谱图) 上为质谱图, 下为电泳图, 均为 2 例早期胃癌患者(I / II) 和 2 例晚期胃癌(III/ IV) 患者, 可见该蛋白质在早期胃癌中表达高于晚期患者。
Figure 2 Differential expressions of the SELDI peaks at 4665m/z in the comparisons of I / II stage and III/ IV stage gastric cancer. C73a: I stage gastric cancer. C7- a: II stage gastric cancer. C70- b: IIIstage gastric cancer. C5: IV stage gastric cancer. The up figure is spectrometric, the down is electrophoresis.

表 3 模型 II 原始判别的结果

Table 3 The result of model II in the learning Sample Classification.

分组	I / II 期胃癌		总计
	患者(例)	患者(例)	
胃癌患者	11. 00	1. 00	12.00
健康人	1. 00	21. 00	22.00
总计	12. 00	22. 00	34.00
Correct	0. 917	0. 954	
Tot. Correct	0. 941		
Specificity (True Ref):	0. 917, Sensitivity (True Resp):		0. 954

表 4 模型 II 交叉验证的结果

Table 4 The result of model II in the tested Sample Classification.

分组	I / II 期胃癌		总计
	患者(例)	患者(例)	
胃癌患者	11. 00	1. 00	12.00
健康人	3. 00	19. 00	22.00
总计	14. 00	20. 00	34.00
Correct	0. 917	0. 863	
Tot. Correct	0. 882		
Specificity (True Ref):	0. 917, Sensitivity (True Resp):		0. 863

3 讨论

癌症早期诊断以及其后的治愈性或根治性治疗是提高患者生存率的重要因素。胃癌的诊断手段正从症状、临床体检、胃镜检查等经典手段向基因诊断、分子生物学检测手段发展^[1, 2], 但作为后者重要组成部分之一的胃癌血清肿瘤标志物, 近年来发展较缓, 不能满足临床实际应用的需要。运用 SELDI- TOF- MS 技术来分析鉴定肿瘤不同于非肿瘤的蛋白质表达谱的全貌, 从而获得内因、外因共同作用下肿瘤发生发展的较完整信息^[6], 正是针对目前研究现状的不足之处做出的有益尝试, 该方法已成功应用于卵巢癌以及前列腺癌^[7]。在胃癌方面的研究也偶见报道^[8, 9]。

判别分析是一种根据观察或测量到的若干变量值, 来判别研究对象如何分类的常用统计分析方法, 是应用计算机进行疾病辅助诊断的主要统计学基础。其基本原理是根据已知的分类(如属于胃癌组或是属于健康人组) 和表明特征的变量值(即各蛋白质峰的峰值数据) 建立判别函数, 再将某个个体的自变量值回代到判别函数, 得出判别分数或计算属于各类的概率, 从而判断该个体属于哪一类。本研究过程中的判别分析主要分两个步骤进行, 即原始判别和交叉验证。前者是将所有病例的峰值数据建立函数, 再逐一将每个病例代入函数进行判别; 后者则是利用除了某一病例外的其余所有病例的数据建立函数, 再把这一未参与函数构建的病例数据代入函数进行判别, 如此判别每一个病例。这种交叉验证的方法在统计学上称为“留一法”, 与原始判别相比更为真实、稳定、可靠, 所以我们选择了交叉验证的结果作为最终结果^[5, 10]。

本研究运用 SELDI- TOF- MS 蛋白质芯片技术, 得出了胃癌患者不同于健康人的血清蛋白质指纹图谱, 应用判别分析筛选出能达到最佳诊断效果的蛋白质峰组合并建立诊断模型 I , 交叉验证结果较满意, 其灵敏度和特异度均远高于现有的各种肿瘤标志物, 具有一定的诊断价值, 筛选出的差异表达蛋白质将有可能成为新的候选肿瘤标志物。通过比较其对不同分期胃癌患者的诊断准确率可见, 该模型对 I 、 II 期患者的诊断能力不亚于对 III、 IV 期的诊断, 提示本方法在胃癌早期诊断方面有一定价值, 所筛选出的候选肿瘤标志物也将有可能用于早期检测。而上文所提及的几种现有标志物, 目前仅认为其在胃癌复发和转移的监测中有一定参考价值, 而对早期诊断的价值则较低。比较 I / II 期患者和 III/ IV 期患者质谱数据构建的模型 II (单个蛋白质峰 4665m/z), 能够较为准确的区分某一个胃癌患者是 I / II 期还是 III/ IV 期, 有助于早期诊断、改善预后, 同时对术前治疗及手术方式的合理选择也具有一定的参考价值。需要指出的是, 运用判别分析建立诊断模型的基本思路是选择具有最佳诊断效力的蛋白质峰组合而不是评价单个蛋白质峰的诊断效力; 所得到的最佳组合也并非诊断效力由高到低排列的各个峰的简单叠加。因此, 利用这一方法筛选候选肿瘤标志物时, 不能仅局限于最佳诊断组合中所列出的几个蛋白质, 而应该着眼于所有表达差异具有统计学意义的蛋白质。

综上所述, SELDI- TOF- MS 技术在胃癌的诊断尤其是早期诊断、候选肿瘤标志物的筛选及术前分期等方面具有一定的价值。进一步的研究仍在进行中。

(下转第 18 页)

应而硬化^[5]。颅底骨质破坏的部位和范围与鼻咽癌原发灶部位和侵犯程度有关。一旦肿瘤发生颅底侵犯,其分期即属Ⅳ期,顾及及时、准确发现是否有颅底侵犯,并有效治疗对改善预后至关重要^[6]。本研究中鼻咽癌合并颅底骨质破坏时 p53 阳性表达率与无颅底骨质破坏组间有显著性差异($P < 0.05$),提示 p53 蛋白阳性时,鼻咽癌更易颅底侵犯。

p16 基因定位于人染色体 9p21 区,全长 8.5kb。p16 蛋白属 CDK4 和 CDK6 抑制因子,阻滞细胞进入 G1/S 期,导致细胞生长停滞。Lo 等研究发现 p16 基因的纯合性缺失在鼻咽癌发展中起作用,缺失率为 35%。陈莉等^[7]研究发现在鼻咽癌发生转移时, p16 表达显著减少,说明 p16 改变在鼻咽癌发生中是晚期事件。本研究鼻咽癌中 p16 阳性表达率为 32%,而鼻咽粘膜慢性炎症中 p16 阳性表达率为 85%, p16 蛋白在鼻咽粘膜慢性炎症与鼻咽癌中的表达差异有极显著性意义($P < 0.005$)。说明 p16 蛋白的表达异常与鼻咽癌的发生有关,与文献报道相符。另外, p16 产物的表达与生存期呈正相关,生存期大于等于 3 年的 p16 阳性表达率明显高于生存期小于 3 年组($P < 0.05$),表明 p16 基因的表达与鼻咽癌的预后有一定的联系, p16 蛋白表达缺失是鼻咽癌预后不良的标志。同时, Tam 等^[8]认为 p53 功能下调时, P21 同时下调, CDK 被激活,随之 Rb 蛋白磷酸化,抑制作用减弱,从而 p16 蛋白代偿性增加。这样就可以解释本研究中 p16 蛋白表达并未随鼻咽癌的分化程度增高而增多,虽然中分化组中 p16 蛋白表达明显高于低分化、未分化组,而未分化组中的 p16 蛋白表达并不比低分化组低,反而略高于它,这可能是未分化组中的 p53 突变蛋白表达增高、p53 的抑制作用减弱,从而 p16 蛋白代偿性增加有关。亦符合肿瘤的发生是多因素、多步骤、多阶段、各种癌基因和抑癌基因参与并相互作用的复杂病理过程之理论。

以免疫组化法研究 p16 蛋白表达与鼻咽癌 CT 表现之间的关系,国内尚未见报道。鼻咽癌 CT 表现为颈部淋巴结转移

很普遍,可高达 86%^[9]。莫武宁等^[10]发现 p16 低表达或缺失表达可能与鼻咽癌的颈部淋巴结转移有关,而与病灶大小、临床分期无关。本研究中,有颈部淋巴结转移组中 p16 阳性表达率与无颈部淋巴结组有显著性差异($P < 0.05$),在发生颈部淋巴结转移时, p16 表达显著减少,说明 p16 改变在鼻咽癌中是晚期事件,与文献报道相符。本研究中 P16 表达与鼻咽癌的分化程度及侵犯深度相关性不显著,提示 P16 表达可能与鼻咽癌的恶性程度无直接联系。

参 考 文 献

- [1] 陈仁武, 朱丹, 殷蔚伯, 等. p53 基因在鼻咽癌中的热点突变[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(6): 401~ 403
- [2] 李西融, 麻承勋, 贾太昌. 鼻咽癌中 P53 蛋白表达的研究[J]. 耳鼻喉头颈外科, 1996, 3(4): 231
- [3] 邱维加, 周英琼. 鼻咽癌的 CT 表现与 P53 蛋白异常表达的关系[J]. 中国医学影像学杂志, 1997, 5(3): 171
- [4] Chong VF, Fan YF, Khoo JB. Nasopharyngeal carcinoma with intracranial spread: CT and MR characteristics[J]. J Comput Assist Tomogr, 1996, 20(4): 563- 569
- [5] 陈炽贤. 实用放射学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1232- 1233
- [6] Altun M, Tenekeci N, Kaytan E. Locally advanced nasopharyngeal carcinoma: computed tomography findings, clinical evaluation, and treatment outcome[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000, 47(2): 401- 4
- [7] 陈莉, 王桂兰, 曹晓蕾. 鼻咽癌中 cyclin D1、p16、Rb 蛋白表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(4): 362
- [8] Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin- dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4[J]. Cancer Res, 1994 Nov 15; 54(22): 5816- 20
- [9] 周康荣. 胸部颈面部 CT[M]. 上海医科大学出版社, 1996, 4: 394
- [10] 莫武宁, 黄光武, 邝国乾, 等. E- cadherin 和 p16 基因蛋白在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 癌症, 2000, 19(1): 37

(上接第 14 页)

参 考 文 献

- [1] 金懋林. 胃癌, 内科肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 549
- [2] Howard, W, John, C, Paul, Neoplasms of the stomach, Cancer Medicine[M]. E5th, American Cancer Society, 2001: 1355
- [3] Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface- enhanced laser desorption / ionization- time of flight- mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 1164- 1177
- [4] Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, et al. The SELDI- TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292: 587- 592
- [5] 蒋知俭. 医学统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 281- 299
- [6] 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[J]. Lancet. 2002,

359: 572- 577. doi: 10. 1016/ S0140- 6736(02) 07746- 2

- [7] Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine[J]. Am J Pathol, 2001, 158: 1491- 1502
- [8] Ebert MP, Meuer J, Wiener JC, Schulz HU, et al. Identification of gastric cancer patients by serum protein profiling[J]. J Proteome Res. 2004 Nov- Dec; 3(6): 1261- 6
- [9] Melle C, Ernst G, Schimmel B, Biehl A, et al. Characterization of pepsinogen C as a potential biomarker for gastric cancer using a histoproteomic approach[J]. J Proteome Res. 2005 Sep- Oct; 4(5): 1799- 804
- [10] 三味工作室. 编写. 世界优秀统计软件 SPSS v10. 0 for Windows 实用基础教程[M]. 北京: 北京希望电子出版社, 2001: 303- 332