

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2018.07.05

应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选早期胃癌的血清诊断标志物

陈海莲¹, 纪托², 周中银³

(¹湖北省黄石市疾病预防控制中心,湖北 黄石 435000;

²湖北省黄石市人福医院,湖北 黄石 435004;

³湖北省人民医院,湖北 武汉 430000)

摘要:[目的]筛选早期胃癌可能存在的特异性蛋白标记物。[方法]采用 CM10 蛋白质芯片和表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术,对胃黏膜高级别上皮内瘤变(HGIEN)患者,Ⅰ/Ⅱ期胃癌患者及Ⅲ/Ⅳ期胃癌患者各 24 例的血清蛋白质谱进行分析。[结果]与高级别上皮内瘤变(HGIEN)患者对比,胃癌组有 37 种蛋白存在表达差异。这 37 种蛋白中有 9 种在Ⅰ/Ⅱ期胃癌组与Ⅲ/Ⅳ期胃癌组存在不同丰度的表达($P<0.05$),其中 2687.5 Da、6271.2 Da 及 6779.3 Da 表达差异显著($P<0.01$),2687.5 Da 在高级别上皮内瘤变(HGIEN)组、Ⅰ/Ⅱ期胃癌组及Ⅲ/Ⅳ期胃癌组中表达上调,6271.2 Da 及 6779.3 Da 在高级别上皮内瘤变(HGIEN)组、Ⅰ/Ⅱ期胃癌组及Ⅲ/Ⅳ期胃癌组中表达下调。以这三个蛋白质构建预测诊断模型,经盲法验证,该模型的灵敏度为 77.78%,特异度为 88.89%。[结论]这 3 个蛋白或将成为早期胃癌诊断的特异性生物蛋白标志物。

关键词:SELDI-TOF-MS 技术;高级别上皮内瘤变(HGIEN);胃癌

中图分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2018)07-0570-05

Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry used to screen serum diagnostic markers of early gastric cancer

CHEN Hai-lian¹, JI Tuo², ZHOU Zhong-yin³

(¹ Huangshi Manicipal Center for Disease Control and Prevention, Huangshi 435000, China; ² Huangshi Ren-fu Hospital, Huangshi 435004, China; ³ Hubei Provincial People's Hospital, Wuhan 430000, China)

Corresponding author: JI Tuo, E-mail: 17976376@qq.com

Abstract: [Objective] To screen specific protein markers in patients with early gastric cancer. [Methods] CM10 protein chip and Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) were used to analyze the serum protein profiles of patients ($n=24$) with gastric high-grade intraepithelial neoplasia (HGIEN), I/II gastric cancer and III/IV gastric cancer. [Results] Compared with patients of high-grade intraepithelial neoplasia (HGIEN), there were 37 protein expression differences in the gastric cancer group. Nine of the 37 proteins showed different abundance expression in stage I/II gastric cancer group and stage III/IV gastric cancer group ($P<0.05$), among which 2687.5 Da, 6271.2 Da and 6779.3 Da were significantly different ($P<0.01$), 2687.5 Da was up-regulated, 6271.2 Da and 6779.3 Da were down-regulated in high-grade intraepithelial neoplasia (HGIEN) group, I/II gastric cancer group and III/IV gastric cancer group. With these three proteins, a predictive diagnostic model was constructed and verified by blind method. The sensitivity and specificity of the model were 77.78% and 88.89% respectively. [Conclusion] These three proteins may be specific biological protein markers for the diagnosis of early gastric cancer.

Key words: SELDI-TOF-MS; High-grade intraepithelial neoplasia (HGIEN); gastric cancer

收稿日期: 2018-03-15

作者简介: 陈海莲, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 普内科专业

通讯作者: 纪托, E-mail: 17976376@qq.com

胃癌是临床上最常见的消化系统恶性肿瘤之一,全球发病率位居第4位^[1],死亡率占我国癌症相关死亡的23.2%^[2]。早期胃癌往往没有特异性症状和体征,检出率低,84%患者发现时已经处于进展期^[3]。因此,胃癌的早期诊断和治疗对提高治愈率及降低死亡率具有重要意义,而胃癌前病变的检测、监控和追踪是发现早期胃癌的重要手段。本研究旨在为早期胃癌的检测设计一种高灵敏度,高特异性的新型诊断工具。我们采取表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术,对高级别上皮内瘤变(HGIEN)患者和胃癌患者的血清蛋白质组进行分析,筛选早期胃癌特异性蛋白质生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2016年6月~2017年6月在湖北省人民医院门诊或住院的患者,其中高级别上皮内瘤变患者34例,I/II期胃癌患者36例,III/IV期胃癌患者28例,3组各随机抽取24例作为研究对象。将高级别上皮内瘤变患者和I/II期胃癌患者随机分为训练组和验证组,前者包括随机抽取的24例高级别上皮内瘤变患者和24例I/II期胃癌患者,后者包括随机抽样后余下的10例高级别上皮内瘤变患者和12例I/II期胃癌患者。样本均取得了患者的知情同意书以及机构审查委员会的批准。高级别上皮内瘤变及胃癌的诊断均经内镜及病理检查确诊,病检标本来源于胃内镜下黏膜剥离(ESD)术。胃癌各期的诊断符合AJCC2010(第7版)TNM分期诊断标准。所有血液样本在清晨空腹时段采集,之后静置,离心以分离血清,并将之保存于一80℃冰箱备用。所有患者均没有非甾体抗炎药及糖皮质激素等药物的长期服用史,胃癌患者术前均未接受过放、化疗,且没有影响血清中蛋白质表达的相关疾病(如肝脏疾病、肾脏疾病、内分泌疾病等)。所有样本提供者的基本情况详见表1,各组间平均年龄及男女比较差异有统计学意义。

表1 患者基本情况表

	高级别上皮内 瘤变(n=24)	I/II期胃癌 (n=24)	III/IV期胃癌 (n=24)
男	13	17	15
女	11	7	9
平均年龄/岁	63	54	65

1.2 蛋白芯片的制备处理

蛋白质谱分析平台:蛋白质芯片生物标志物系

统(Bio-Rad,Japan)。

蛋白质芯片:CM10 阳离子交换芯片和 Q10 阴离子交换芯片。将芯片安装在 Bioprocessor 上,4℃冰浴下将芯片经 LHEPES 结合/洗涤缓冲液(PH7.05)预处理平衡3次,每次5min。

从-80℃冰箱中取出血清样本,在冰浴下充分溶解,以1/100的比例稀释,稀释液分别为CM10:50mmol/L乙酸钠,pH4;Q10:50mmol/L Tris-HCl,pH9。将血清样品分为一式两份进行检测,取平均值用于分析。取稀释的血清样品,加入 Bioprocessor 孔,振荡孵育60min,之后用 LHEPES 结合/洗涤缓冲液对每个孔洗涤3次,每次5min,再用100μl MilliQ 去离子水(Millipore, Billerica, MA)漂洗两次,室温干燥,然后取 CHCA 饱和溶液0.5μl应用于每个孔,干燥后重复该步骤1次。自然干燥后将芯片置于阅读仪中进行检测。

1.3 蛋白芯片的检测和数据采集

将处理好的蛋白芯片在 Protein Chip 软件的辅助下进行分析检测。数据读取前用标准多肽对仪器进行校正,以使系统的分子量误差小于0.1%。芯片阅读参数设置如下:激光强度230,检测敏感度7,优化分子质量范围2000~20000Da。把质谱峰强度差值 $P<0.05$ 、经过再次滤过噪音(二次信噪比为2)的蛋白峰定义为差异蛋白。 m/z 值小于2000的部分谱图自动摒弃以排除干扰。以质控芯片重复性检测。

1.4 统计学处理

为了识别区分高级别上皮内瘤变患者,I/II期胃癌患者和III/IV期胃癌患者的蛋白质,我们对蛋白质谱进行了比较。对于各种峰,基于 Student's t-检验(CiphergenExpress Data Manager 3.0)计算 P 值, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。应用 Mann-Whitney 检验(Wilcoxon 检验)来比较小数据集。应用 Biomarker Patterns Software 系统(BPS)建立预测模型,并进行盲法验证。

2 结果

2.1 筛选差异蛋白质峰,并建立预测诊断模型

蛋白质的分子质量设定在2000~20000Da,小于2000Da蛋白质峰值的实验结果会被自动清除,以便排除某些化学成分如芥子酸、乙酸钠和三氟乙酸盐等对实验结果的影响。对高级别上皮内瘤变组、I/II期胃癌组及III/IV期胃癌组血清进行分析,检测到238个蛋白质峰。与高级别上皮内瘤变组对比,胃癌组有37种蛋白存在表达差异。这37种蛋白中有9种在I/II期胃癌组与III/IV期胃癌组存在不同程度的表达($P<0.05$,见表2),其中2687.5

Da、6 271.2 Da 及 6 779.3 Da 表达差异显著($P < 0.01$), 2 687.5 Da 在高级别上皮内瘤变组、I/II 期胃癌组及 III/IV 期胃癌组中表达上调(见图 1), 6 271.2 Da 及 6 779.3 Da 在高级别上皮内瘤变组、I/II 期胃癌组及 III/IV 期胃癌组中表达下调(见图 2)。以 3 者建立早期胃癌预测诊断模型。

表 2 高级别上皮内瘤变组与胃癌组血清蛋白指纹图谱中差异蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

质荷比 (M/Z)	P 值	胃癌	高级别上皮 内瘤变组
2687.5 ¹⁾	0.040157	1.66 ± 2.29	1.42 ± 1.09
4506.1	0.033146	0.50 ± 0.34	0.64 ± 0.26
6271.2 ¹⁾	0.001652	3.10 ± 1.29	4.95 ± 2.62
6779.3 ¹⁾	0.002152	1.59 ± 0.64	4.04 ± 4.26
7731.3	0.030053	1.14 ± 0.74	0.67 ± 0.40
8266.5	0.019012	0.60 ± 0.23	0.76 ± 0.32
8969.7	0.024604	14.90 ± 6.69	18.96 ± 7.76
12408.1	0.048387	6.21 ± 3.12	4.25 ± 1.42
18257.6	0.014565	16.44 ± 6.12	12.76 ± 5.62

¹⁾ $P < 0.01$ 。

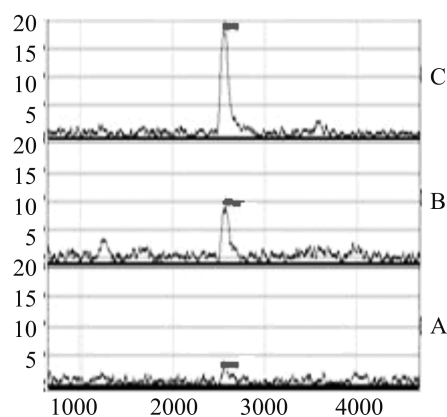


图 1 2 687.5 Da 在 3 组中的表达差异

2.2 I/II 期胃癌预测模型训练结果

该模型所判断的 48 例中 26 例为高级别上皮内瘤变患者, 22 例为 I/II 期胃癌患者, 通过和临床结果实际结果比较, 24 例 I/II 期胃癌患者中 20 例被准确判断, 4 例被错判为高级别上皮内瘤变; 而 24 例高级别上皮内瘤变组 22 例被准确判断, 2 例被错判为 I/II 期胃癌。敏感性 83.3% (20/24), 特异性 91.67% (22/24) (见表 3)。

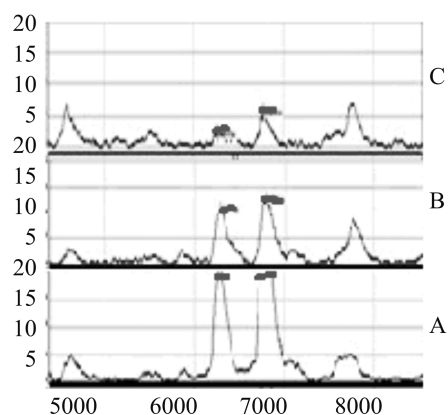


图 2 6 271.2 Da 及 6 779.3 Da 在 3 组中的表达差异

表 3 I/II 期胃癌预测模型训练结果 例

	总例数	预测为 I/II 期胃癌	预测为高级别 上皮内瘤变	准确率 /%
I/II 期胃癌组	24	20	4	83.3
高级别上皮 内瘤变组	24	2	22	91.67

2.3 预测模型验证结果

将上述所得到的预测诊断模型在随机抽样后余下的 12 例 I/II 期胃癌患者和 10 例高级别上皮内瘤变患者中进行盲法验证, 判断认为 22 例中 10 例为 I/II 期胃癌患者, 12 例为高级别上皮内瘤变患者, 通过和临床结果比较, 12 例 I/II 期胃癌患者中有 9 例被准确判断, 3 例被错判为高级别上皮内瘤变; 而 10 例高级别上皮内瘤变患者中有 9 例判断准确, 有 1 例被误判为 I/II 期胃癌。诊断 I/II 期胃癌敏感性为 75% (9/12), 特异性为 90% (9/10)。盲法测试模型总正确率为 81.82% (18/22) (见表 4)。

表 4 预测模型盲法验证结果 例

	总例数	预测为 I/II 期胃癌	预测为高级别 上皮内瘤变	准确率 /%
I/II 期胃癌组	12	9	3	75
高级别上皮 内瘤变组	10	1	9	90

3 讨论

作为胃癌的高发国家, 我国每年的新发病例有 40.5 万, 在全球胃癌的发病中占 43%, 死亡病例有 32.5 万, 死亡率占 21.9/10 万^[4], 我国胃癌不管在发病率还是死亡率上均超过了世界平均水平。胃癌

现已经成为了威胁我国国民健康的主要恶性肿瘤之一。

由于胃癌的病因和发病机制还不完全清楚,一级预防在实施上还比较困难,因此对癌前病变的相关研究就成了二级预防的重要内容^[5]。在各种致病因素的长期作用下,胃黏膜可发生慢性炎症改变,进一步可演变为慢性萎缩性胃炎(CAG)—肠上皮化生(IM)—上皮内瘤变(IN),甚至最终进展为胃癌(GC)^[6-7]。

而胃癌的发生是多因素、多因子共同参与的结果,目前的临床诊断方法其灵敏度和特异性不高,因此,迫切需要探索和建立一种更简便,更快速,具有更高灵敏度和特异性的早期诊断方法。近几年,蛋白质组学技术飞速发展,能够较准确地监测疾病过程中各种相关蛋白质的变化,这就为癌症机制的阐明及有效防治提供了有力的工具和手段^[8-9]。作为一种新兴的蛋白质组学技术,自 2002 年发明以来 SELDI-TOF-MS 技术就广泛地应用于肿瘤标志物的筛查和临床检测^[10-11]。该技术可以检测到肿瘤发生发展过程中与之密切相关的小分子蛋白质。多方研究表明,SELDI-TOF-MS 技术已成为当今最有希望的肿瘤早期检测方法之一^[12]。到目前为止,已经鉴定了许多广泛使用的胃癌生物标志物,例如癌胚抗原,CA 19-9,CA 50 和 CA 72-4^[13-15]。虽然已建立的肿瘤标志物的测量由于其缺乏灵敏性和特异性^[16],还不足以精确检测早期胃癌,但对识别新一代的生物标志物来说它仍然是一个强大而有前途的工具。再者,在使用单一生物标志物时也存在缺点,例如弱特异性和低阳性率。因此,改善胃癌早期诊断的逻辑发展应该是同时筛选多种生物标志物以增加检测的概率^[17-19]。

本研究运用 SELDI-TOF-MS 技术对比分析高级别上皮内瘤变患者、I/II 期胃癌患者和 III/IV 期胃癌的血清蛋白指纹图谱。运用 Biomarker Wizard 软件对数据进行统计分析后发现,与高级别上皮内瘤变患者比较,胃癌组有 37 种蛋白存在表达差异。这 37 种蛋白中有 9 种在 I/II 期胃癌组与 III/IV 期胃癌组存在不同程度的表达($P < 0.05$)。值得注意的是,与 III/IV 期病例相比,在 I/II 期胃癌中显著存在 3 个峰的表达差异,分别是 2687.5 Da, 6271.2 Da 及 6779.3 Da ($P < 0.01$)。其中,2687.5 Da 在高级别上皮内瘤变组、I/II 期胃癌组及 III/IV 期胃癌组中表达上调,6271.2 Da 及 6779.3 Da 在高级别上皮内瘤变组、I/II 期胃癌组及 III/IV 期胃癌组中表达下调。这 3 个蛋白在 I/II 期胃癌中都有很高的表达程度,说明可能与胃癌的早期进展有关,对预测

早期胃癌有重要意义,为寻找早期胃癌的标志物提供了资料。以这 3 个蛋白质建立预测诊断模型,经盲法验证,该模型的灵敏度为 75%,特异度为 90%,盲法验证总正确率为 81.82%,说明该模型具有较高的诊断正确率和较好的诊断意义。同时应该看到,本研究检测到的早期胃癌潜在生物标志物的蛋白峰与以往的报道不尽相同。这种差异可能是由不同的病理学类型,样本量的大小或蛋白质芯片的不同所导致的。对蛋白质的进一步鉴定以比较各种 SELDI-TOF-MS 技术研究的结果可能就成了必要,也有助于揭示早期胃癌的发生发展机制。未来我们还计划对这些蛋白质进行大样本量的鉴定、对比和研究,并通过定期随访、复查以进一步提高早期胃癌的检出率以及预后的评估。

参考文献

- [1] Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3):354—362.
- [2] 纪托, 陈海莲, 周中银. 胃癌腹膜转移的血清蛋白质特异性生物标志物的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(9):702—708.
- [3] 梁玉屏, 刘维花, 杨落落等. 早期胃癌的筛查[J]. 中华内科杂志, 2014, 53(4):325—326.
- [4] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):359—386.
- [5] Li B, Liu H Y, Guo S H, et al. Microsatellite instability of gastric cancer and precancerous lesions[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):21138—21144.
- [6] Zhang H, Hou Y, Xu L, et al. Cytoplasmic Droscha Is Aberrant in Precancerous Lesions of Gastric Carcinoma and Its Loss Predicts Worse Outcome for Gastric Cancer Patients[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(4):1080—1090.
- [7] Wang X W, Wu Y, Wang D, et al. MicroRNA network analysis identifies key microRNAs and genes associated with precancerous lesions of gastric cancer [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(4):8695—8703.
- [8] Stengel F, Aebersold R, Robinson CV. Joining forces: integrating proteomics and cross-linking with the mass spectrometry of intact complexes[J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11(3):R111.014027.
- [9] Xu S Y, Liu Z, Ma W J, et al. New potential biomarkers in the diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Biomarkers, 2009, 14(5):340—346.
- [10] 郑顺贞, 邹声泉. 比较蛋白质组学在肿瘤标志物研究中的应用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 17(2):147—149.
- [11] Bakry R, Rainer M, Huck C W, et al. Protein profiling

- for cancer biomarker discovery using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and infrared imaging:a review[J]. *Anal Chim Acta.*, 2011, 690(1):26—34.
- [12] Boggio K J, Obasuyi E, Sugino K, et al. Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2011, 8(5):591—604.
- [13] Qiu M Z, Lin J Z, Wang Z Q, et al. Cutoff value of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 elevation levels for monitoring recurrence in patients with resectable gastric adenocarcinoma[J]. *Int J Biol Markers*, 2009, 24(4):258—264.
- [14] Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, et al. Prognostic significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma[J]. *Oncology*, 1999, 57(1):55—62.
- [15] Carpelan-Holmstorm M, Louhimo J, Stenman U H, Alfthan H and Haglund C;CEA, CA 19-9 and CA72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4):2311—2316.
- [16] Koike H, Ichikawa D, Ikoma H, et al. Comparison of serum aberrant methylation and conventional tumor markers in gastric cancer patients[J]. *Hepatogastroenterology*, 2005, 52(64):1293—1296.
- [17] Fung E T, Weinberger S R, Gavin E, et al. Bioinformatics approaches in clinical proteomics[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2005, 2(6):847—862.
- [18] Roboz J. Mass spectrometry in diagnostic oncoproteomics[J]. *Cancer Invest*, 2005, 23(5):465—478.
- [19] Posadas E M, Simpkins F, Liotta L A, et al. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer-realistic hope? [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(1):16—22.
-
- (上接第 569 页)
- [15] 何占坤, 张国梁, 唐方, 等. 陈皮、藿香不同提取物对胃肠动力障碍大鼠胃肠平滑肌收缩活动及胃肠激素的影响[J]. *天津医药*, 2017, 45(11):1175—1179.
- [16] 史继静, 刘朝奇, 陈晶, 等. 紫苏提取液对小鼠急性酒精中毒的作用及机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(36):4098—4101.
- [17] 邱赛红, 陈立峰, 柳克玲, 等. 芳香化湿药开胃作用机理的实验研究[J]. *中药药理与临床* 1995, 11(4):24—27.
- [18] 郭建生, 刘红艳, 王小娟, 等. 檀香不同提取部位对小肠推进和胃排空的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2):139—143.
- [19] 邹忠杰, 龚梦鹃, 谢媛媛, 等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤保护作用的代谢组学研究[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(3):807—810.