

肾癌患者血清差异蛋白的初步实验研究

张 涛¹, 木拉提·热夏提², 威力江·赛买提², 王玉杰²

(1. 新疆医科大学第二附属医院泌尿外科, 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆医科大学第一附属医院泌尿外科, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】目的:通过探索新疆地区肾癌患者与健康者之间血清蛋白表达谱的变化,筛选并建立新疆地区肾癌血清标志物诊断模型。**方法:**采用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术和弱阳离子交换蛋白芯片(CM10)对新疆地区 44 例健康对照与 40 例肾癌患者血清蛋白表达谱进行检测分析。**结果:**相比于健康对照组血清蛋白质荷比(mass to charge ratio, M/Z)峰值图谱,肾癌组表现出明显差异。其中 10 个差异性最大的蛋白($P<0.05$),均在健康对照组中低表达,而在肾癌组呈高表达,质荷比分别为 5 914、5 940、8 087、8 155、5 949、8 067、5 986、5 346、15 946、6 116。建立的诊断模型是由 10 个蛋白(M/Z 分别为:5 914、5 940、8 087、8 155、5 949、8 067、5 986、5 346、15 946、6 116)构成。应用十倍交叉留一法进行验证,结果此诊断模型的敏感度为 92.50% (37/40),特异度为 93.18% (41/44)。**结论:**将表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术以及生物信息学分析软件的联合运用是找到肾癌肿瘤标志物的一种有效的方法,建立的诊断模型能够较准确灵敏的区分健康对照与肾癌人群。其中 M/Z 5 914、5 940、8 067、6 116 对应的蛋白质可能为 β -淀粉样蛋白、人体 β -防御素、胃泌素释放前体肽以及金属硫蛋白。

【关键词】肾癌;表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术;蛋白组学

【中图分类号】R699.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-07

Initial study of distinct expression of serum proteins of patients with renal carcinoma

Zhang Tao¹, Mu Lati·ReXiat², Wei Lijiang·Sai Maiti², Wang Yujie²

(1. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University;

2. Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To explore changes in serum protein expression between patients with renal carcinoma and the healthy people so as to screen out and construct diagnostic model of renal carcinoma in Xinjiang. **Methods:** Weak cation exchange and hydrophobic surface protein chip (CM10) and surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) were used to detect the serum protein. Serum specimens from 40 renal carcinoma patients and 44 healthy controls were analyzed in order to screen out the serum differentially expressing proteins of renal carcinoma and to construct renal carcinoma diagnostic model. **Results:** Significantly differences were existed between healthy controls and renal carcinoma patients with renal carcinoma ($P<0.05$). Total ten protein peaks (mass to charge ratio (M/Z) being 5 914, 5 940, 8 087, 8 155, 5 949, 8 067, 5 986, 5 346, 15 946 and 6 116) were all high-expressed in patients with renal carcinoma and all of them were low-expressed in healthy controls. After cross validation, diagnostic model was composed and established by the above ten proteins. Specificity and sensitivity were 93.18% (41/44) and 92.50% (37/40). **Conclusion:** Bioinformatics software analysis combined with SELDI-TOF-MS is effective in looking for biomarkers of renal carcinoma. Patients with renal carcinoma and healthy controls in Xinjiang can be accurately distinguished by constitutive sensitive diagnostic model. Four (M/Z 5 914, 5 940, 8 067, 6 116) protein peaks may be β -amyloid protein, human β -defensin, ProGRP and metallothionein.

【Key words】 renal carcinoma; surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; proteomics

作为最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一的肾癌,早期尚没有特异性的临床症状与体征,然而肾癌早

期经手术治疗便可达到治愈,对于晚期肾癌目前缺乏治愈的手段。所以在临床工作中非常的需要一种敏感的检测手段可以早期及时的诊断肾癌从而最终达到治愈的目的。本研究应用表面增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)技术,通过检测肾癌患者与正常对照者的

作者介绍:张 涛, Email: 13999990532@163.com,

研究方向:泌尿系肿瘤的诊治。

通信作者:王玉杰, Email: wangyj-mr@vip.sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81060210)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000095.html>

蛋白质图谱, 寻找出 2 组人群之间有显著差异的血清肿瘤标志物, 为能够早期诊断肾癌提供一种全新的、有效的方法。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 9 月至 2011 年 9 月新疆医科大学第一临床医学院泌尿外科诊断(由术后病理切片确诊)为肾癌的 40 例患者作为肾癌组, 其中汉族 20 例, 维吾尔族 15 例, 哈萨克族 3 例, 回族 2 例, 男性 22 例, 女性 18 例, 年龄 36~75 岁, 中位年龄 51 岁, 其中 I 期 36 例, II 期 4 例; 无其他任何合并疾病, 患者经胸部平片和腹部 B 超检查证实均无远处脏器转移, 而且手术前没有做任何治疗。健康对照组来自 44 例选取肝肾功能均正常(同时对于过敏、自身免疫性疾病、急性感染者排除)的健康体检者, 肾癌组与健康对照组间在年龄、性别及族别的构成比没有统计学差异。全部受试者均同意采血并在知情同意书上签字, 而且在新疆医科大学第一临床医学院伦理委员会备案。

1.2 血清样本的处理

所有血样均于清晨空腹留取, 收集前臂静脉全血 3 ml 于无抗凝剂的普通 5 ml 采血试管并在 30 min 内放入 4℃ 冰箱静置 30 min 使血液凝固析出血清, 4℃ 条件下 3 000 r/min 离心 20 min 后置 -80℃ 冰箱冻存备用。依次向 96 孔细胞培养板的每孔中加入 U9 缓冲液(9 mol/L 尿素, 2% 3-环乙胺-1-丙磺酸, 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, pH 9.0, 1% 1, 4-二硫苏糖醇)10 μl 后再迅速向每孔中加入 5 μl 血清。稀释血清样品冰浴 30 min 震荡, 充分变性蛋白质, 用手指轻弹混匀每隔 5 min 1 次, 然后把醋酸钠缓冲液 185 μl(50 mmol/L 醋酸钠, pH 4.0)加入至稀释血清样品 15 μl 中, 混匀于震荡器上。在加样器内把 CM10 蛋白芯片安装好, 把醋酸钠缓冲液 200 μl 加入至每孔中, 在 4℃ 环境下持续 5 min 震荡, 最好将缓冲液弃去, 上述操作重复 2 次。加入超纯水 200 μl 于每孔中, 马上弃去。把加样器卸下, 等芯片的表面自然晾干后, 在芯片的每点各加饱和 SPA 1 μl(乙腈 75 μl, 1% TFA 混合液中 75 μl 加入 SPA 5 mg, 充分溶解后离心 10 000 r/min 5 min, 取上清液)2 次, 每次 0.5 μl。芯片处理好后用 SELDI-TOF-MS 蛋白芯片阅读仪检测。采用 PBS II 2c 型蛋白芯片阅读仪读取芯片信息, 芯片检测前以标准蛋白质芯片校正分子量, 使分子量误差小于 0.1% 后读取芯片。

1.3 统计学方法

本课题中得到的全部数据均使用浙江大学肿瘤研究所研发的蛋白质谱数据分析系统软件(ZUCI-PDAS)采集数据的预处理、筛选差异蛋白质峰以及诊断模型的建立。筛选差异蛋白质峰以及诊断模型的建立是由 ZUCI-PDAS 利用支持向量机(support vector machine, SVM)以及遗传算法(genetic algorithm, GA)来完成的, 而模型预测效果的评价是由十倍留一法交叉验证进行。

根据查阅文献获得所需的样本含量或通过预试验所得的特异度(specificity, Spe)、灵敏度(sensitivity, Sen)由统计学公式 $N_1 = \frac{Z\alpha Sen(1-Sen)}{\Delta^2}$, $N_2 = \frac{Z\alpha Spe(1-Spe)}{\Delta^2}$ 计算获得样本含量(N_1 为病例组样本量, N_2 为对照组样本量, Z 为统计量, 置信度为 95% 时, $Z=1.96$, 置信度为 90% 时, $Z=1.64$, α 为抽样误差=0.05)。

SVM 的参数设置如图 1。

Wavelet threshold	20	Smoothing window	100
Calibration coefficient (%)	0.40	Minimal M/Z	1 000
Cluster factor (%)	0.30	Excluded spectra threshold (%)	20
Minimal peak threshold (%)	10.00	Minimal signal/noise ratio (%)	3
Minimal intensity	300.00	Peaks filtering factor	0.01
Algorithm	SVM	Algorithm parameters	Default
Statistic method	Wilcoxon	Evaluation	Leave one
Test sample percent (%)	None	GA population	50
GA generation	20	GA mutation rate	0.01

图 1 SVM 的参数设置

Fig.1 Parameter setting of SVM

2 结果

2.1 肾癌组与健康对照组蛋白质指纹图谱数据比较

在 2 000~20 000 D 相对分子质量范围内, 肾癌患者与健康对照血清蛋白质荷比(mass to charge ratio, M/Z)峰值图谱明显不同, 发现 2 组间差异具有统计学意义($P<0.05$)的 10 个蛋白质峰(M/Z 为 5 914, 5 940, 8 087, 8 155, 5 949, 8 067, 5 986, 5 346, 15 946, 6 116)均在肾癌组高表达, 在健康对照组低表达(表 1)。

表 1 肾癌组血清中呈高表达的蛋白质

Tab.1 High-expressed serum protein in renal carcinoma group

蛋白峰 (M/Z)	肾癌组 ($\bar{x} \pm s$)	健康对照组 ($\bar{x} \pm s$)	P 值 (Wilcoxon)
5 914	9 938.22 ± 3 571.44	6 111.99 ± 3 976.83	0.000
5 940	1 301.46 ± 611.83	765.60 ± 510.66	0.000
8 087	964.25 ± 1 164.33	500.56 ± 456.01	0.001
8 155	599.20 ± 534.40	353.92 ± 241.09	0.001
5 949	781.20 ± 262.84	513.27 ± 309.63	0.000
8 067	929.58 ± 1 047.86	479.72 ± 391.13	0.001
5 986	550.54 ± 226.59	367.00 ± 219.20	0.000
5 346	523.84 ± 629.65	262.67 ± 321.15	0.005
15 946	4 856.36 ± 3 691.89	1 730.62 ± 3 310.26	0.000
6 116	481.92 ± 200.63	336.53 ± 216.59	0.002

2.2 肾癌诊断模型的建立以及交叉验证

从上述蛋白质峰的任意组合中, 采用 SVM 筛选出预测值的指数最高的组合模型。建立了由上述 10 个蛋白质峰组成的诊断模型, 以此来区分肾癌与非肾癌人群。10 个差异蛋白质峰在健康对照组(组 1)和肾癌组(组 0)的表达情况见图 2。其中横轴代表 M/Z, 纵轴代表蛋白含量的相对强度。图中

的红色竖线标明了筛选的蛋白峰位置,一根蓝线就代表着一个样本的检测结果。

采用十倍交叉留一法验证该诊断模型。该诊断模型对 40 例肾癌组中 37 例判定正确,3 例误判;对 44 健康对照组 41 例判断正确,3 例误判,模型的 Sen 为 92.50%(37/40),Spe 为 93.18%(41/44)(表 2)。

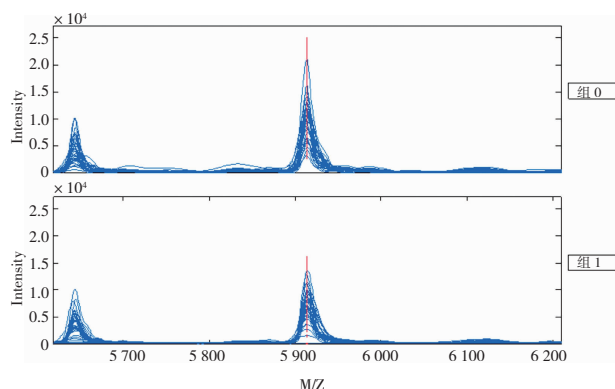


图 2 M/Z 为 5 914 的蛋白在 2 组中的表达

Fig.2 Peaks at the M/Z 5 914 between patients with renal carcinoma and healthy persons

表 2 肾癌模型预测的交叉验证结果

Tab.2 Cross validation result of renal carcinoma model

组别	测试集	
	肾癌	健康对照
预测肾癌组	37	3
预测健康对照组	3	41
Spe	93.18%	
Sen	92.50%	

2.3 差异蛋白的检索结果

在Expasy的SWISS-PROT蛋白质数据库中利用 TagIdent tool 工具,根据分子量在蛋白质数据库中检索血清蛋白。

3 讨 论

在泌尿系统肿瘤中肾细胞癌是最致命的,预后也是最差的。因为肾脏的解剖位置比较深,肾癌发病隐匿,无特异的早期临床症状和体征。晚期临床进展的肾癌缺乏治愈的方法,而早期肾癌通过手术治疗可能获得治愈。所以在临床工作中非常的需要一种敏感的检测手段可以早期及时的诊断肾癌从而达到治愈的目的。

SELDI-TOF-MS 是近些年来兴起的一种新技术,能够对原始生物样本进行直接分析,特别是能够不经处理的各种体液和分泌物等^[1-3]进行直接检测。当前,此技术已经应用于肺癌^[4]、肝癌^[5]、结肠癌^[6-7]、下咽癌^[8]等全身各种恶性肿瘤的早期诊断中。

本研究采用 SELDI-TOF-MS 技术检测 40 例肾癌患者和 44 例健康对照的血清的蛋白质谱,研究结果发现肾癌患者与健康对照相比较,两者血清中共存在 10 个有统计学差异的蛋白峰。通过本实验发现的部分蛋白质峰(M/Z 为:5 914、6 114)与其他学者研究结果相近,考虑其确为肾癌的发生过程中出现的异常代谢物质,其意义分析如下:①M/Z 为 5 914 与郝强等^[9]发现的 M/Z 为 5 917 相接近,进一步通过查询 Expasy 蛋白质数据库发现与 M/Z 5 914 对应的可能的蛋白质为 β -淀粉样蛋白。于飞等^[10]学者研究发现在卵巢恶性肿瘤中 β -淀粉样蛋白表达量明显增高。Arvidsson 等^[11]经研究发现在小肠神经内分泌癌中 β -淀粉样蛋白表达量明显增高,同时发现 β -淀粉样蛋白在癌转移灶中比原发癌灶表达量增高。由此,这提示 M/Z 5 914 对应的 β -淀粉样蛋白很有可能就是本研究寻找的肾癌的血清肿瘤标记物。②M/Z 为 6 116 蛋白峰与郝强等^[9]现的 M/Z 为 6 344 差异蛋白及张强等^[12]发现的 M/Z 为 6 282 差异蛋白相接近。进一步通过查询 Expasy 蛋白质数据库发现与 M/Z 6 116 对应的可能的蛋白质为金属硫蛋白(metallothionein, MT)。近几年来人们运用免疫组化的研究方法发现,金属硫蛋白影响了肿瘤细胞的凋亡与细胞增殖。由此可见,MT 极有可能就是影响肾癌细胞的增殖与凋亡,参与肾癌发生发展的血清肿瘤标记物。③本实验通过 Expasy 蛋白质数据库发现与 5 940、8 067、对应的可能的蛋白质为人体 β -防御素、胃泌素释放前体肽。而这 2 种蛋白在目前的肿瘤相关系列研究报道中证实与肿瘤的发生相关,有可能就是要寻找的血清肿瘤标记物。

而本研究经留一法交叉验证,所建立的诊断模型对肾癌诊断的 Sen 为 92.50%(37/40),Spe 为 93.18%(41/44),Sen 及 Spe 均明显高于其他研究者研究结果,说明所建立的模型更具有优势,能够更好的去区别肾癌患者与健康人群。作者准备下一步仍将继续扩增样本的含量,让诊断模型更加可信并不断的完善,使模型更具有实用推广性。最后应该深入研究表达的差异蛋白质,对这些峰所代表的蛋白及其功能进行详细的了解并对差异蛋白进行鉴定。

SELDI-TOF-MS 在筛选差异蛋白方面充分展示了其广阔的应用前景。目前 SELDI-TOF-MS 仍然有一些不足之处:筛选出的蛋白直接特征是 M/Z,而不是蛋白质的序列构象和特性。如果想对蛋白进行结构鉴定及定性还需要分离提纯再鉴定,确定其性质和序列。尽管如此,SELDI-TOF-MS 仍然是目前首选的高通量系统检测蛋白质的良好技术平台,

5-氮杂胞嘧啶核苷联合 hepaCAM 腺病毒通过抑制 p-AKT 诱导膀胱癌细胞 T24 凋亡

王晓荣¹, 杨雪¹, 王胤¹, 吴小候², 唐敏¹, 罗春丽¹

(1. 重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-azacytidine, azac)联合肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)腺病毒对膀胱癌细胞 T24 凋亡的影响及可能机制的探讨。**方法:**7 种不同因素分别处理培养的膀胱癌细胞 T24, hoechst 33258 染色检测各处理组细胞凋亡率, 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞早期凋亡率, RT-PCR 检测 hepaCAM 及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, bcl-2)mRNA 的表达, Western blot 检测 hepaCAM、p-AKT、total-AKT、bcl-2 蛋白的表达。**结果:**hoechst 33258 显示, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组细胞凋亡率为 $(45.21 \pm 0.06)\%$, 明显高于 hepaCAM 腺病毒组 $(15.60 \pm 0.02)\%$ 和 azac 组 $(26.30 \pm 0.02)\%$, 差异有统计学意义 ($P=0.003$, $P=0.008$); FCM 显示, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组细胞早期凋亡率为 $(16.05 \pm 0.06)\%$, 明显高于 hepaCAM 腺病毒组 $(3.90 \pm 0.02)\%$ 和 azac 组 $(9.67 \pm 0.02)\%$, 差异有统计学意义 ($P=0.002$, $P=0.043$); RT-PCR 显示, 与单独 hepaCAM 腺病毒组和 azac 组相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以上调 hepaCAM mRNA 的表达 ($P=0.004$, $P=0.000$), 下调 bcl-2 mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P=0.026$, $P=0.030$); Western blot 显示, 与单独 hepaCAM 腺病毒组和 azac 组相比, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组可上调 hepaCAM 蛋白的表达 ($P=0.003$, $P=0.003$), 同时下调 p-AKT ($P=0.001$, $P=0.005$) 和 bcl-2 ($P=0.000$, $P=0.002$) 蛋白的表达, 差异有统计学意义。**结论:**azac 联合 hepaCAM 腺病毒可能通过抑制 p-AKT 的磷酸化水平加速诱导 T24 细胞凋亡, 可为膀胱癌的治疗提供新的思路。

【关键词】5-氮杂胞嘧啶核苷; 肝细胞黏附分子; 膀胱癌细胞 T24; p-AKT; 细胞凋亡

【中图分类号】R737.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-04-12

作者介绍: 王晓荣, Email: XIAORONGWANG89@126.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤的分子发生机制及干预措施。

通信作者: 罗春丽, Email: luochunli79@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81072086)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000307.html>

SELDI-TOF-MS 的不断进步与完善必将在功能基因组时代发挥出巨大的潜能。

参 考 文 献

- [1] Takano M, Kikuchi Y, Asakawa T, et al. Identification of potential [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(3): 475-481.
- [2] De Bock M, de Seny D, Meuwis MA, et al. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 906082.
- [3] Gomes AP, Imrie M, Gray RD, et al. SELDI-TOF biomarker signatures for cystic fibrosis, asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Biochem, 2010, 43(1-2): 168-177.
- [4] 卜丽娜, 杨拴盈, 杜洁, 等. 应用液体芯片-质谱技术筛选肺鳞癌患者血清标志蛋白[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(24): 1662-1666.
- [5] 邱继刚, 樊嘉, 刘银坤, 等. 肝癌门静脉癌栓相关小分子的比较蛋白质组学分析[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(2): 181-183.
- [6] 盛新华, 范乃军, 高春芳. SELDI 蛋白质芯片技术在结直肠癌中的应用进展[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(3): 405-406.
- [7] 魏东, 蔡丰波, 王秀丽. 遗传性非息肉病性结直肠癌患者血清蛋白质谱的变化[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(2): 154-155.
- [8] 田文栋, 曾宗渊, 于文斌, 等. 下咽鳞癌患者血清比较蛋白质组学研究[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(6): 829-831.
- [9] 郝强, 赵继懋, 杜林栋. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肾细胞癌患者血清标志物[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(8): 596-599.
- [10] 于飞, 李力, 王琪, 等. β -淀粉样蛋白在卵巢癌组织中的表达及与临床关系研究[J]. 中国癌症防治杂志, 2009, 1(2): 109-113.
- [11] Arvidsson Y, Andersson E, Bergstrom A, et al. Amyloid precursor-like protein 1 is differentially upregulated in neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract[J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(2): 569-581.
- [12] 张强, 刘勇, 任禹菲. SELDI-TOF-MS 检测正常肾细胞株与肾癌细胞株的差异表达蛋白[J]. 实用全科医学杂志, 2008, 6(4): 333-334.

(责任编辑: 关蕴良)