

血清蛋白质指纹图谱模型在子宫内膜异位症诊断中的应用

王 良¹ 郑 伟¹ 余捷凯² 蒋文智² 穆 林¹ 张苏展^{3*}

(浙江大学医学院附属二院,¹妇科,²肿瘤研究所,³肿瘤科, 杭州 310006)

摘要 用表面加强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)和蛋白质芯片检测子宫内膜异位症(endometriosis, EM)患者血清蛋白质指纹图谱, 探讨诊断模型在EM诊断中的临床应用价值。用 SELDI-TOF-MS 技术和 H4 蛋白质芯片检测 16 例 EM 和 16 例正常女性的血清蛋白质指纹图谱, 并建立诊断模型。然后, 对 16 名健康人和 16 例 EM 患者样本进行盲法测试验证该模型。筛选出 4 个有明显表达差异的蛋白质, 其质荷比(m/z)分别为 8 141、6 096、5 894、3 269。建立的诊断模型对 EM 检测的灵敏度为 87.5%(14/16), 特异性为 93.75%(15/16), 总准确率为 90.625%(29/32)。SELDI-TOF-MS 对小样本的 EM 诊断具有较高的敏感性和特异性, 在 EM 的诊断及标志物筛选等方面具有较好的诊断价值。

关键词 子宫内膜异位症; 表面加强激光解析电离飞行时间质谱

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是子宫内膜细胞生长在子宫腔以外部位的病变, 复发率高, 发病率逐年呈上升趋势^[1], 但其发病机制仍不清楚, 目前尚无有效的早期筛查和特异的诊断方法。表面加强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)是一种全新的蛋白质组学研究手段^[2], 它克服了传统蛋白质组学研究方法存在的诸多问题, 能同时检测样本中上千个蛋白质峰。本研究用 SELDI-TOF-MS 仪及配套蛋白质芯片检测 EM 患者和正常女性血清蛋白质指纹图谱, 建立 EM 诊断模型, 探讨临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 对象

2005 年 8 月~2006 年 1 月本院就诊的 EM 患者 16 例, 年龄 19~53 岁, 其中卵巢巧克力囊肿 14 例, 盆腔 EM2 例; 腹腔镜手术后按美国生育协会修正分期法(AFS-r)分期, I~II 期 10 例, III~IV 期 6 例, 都经手术后病理确诊。16 例正常对照, 均为在我院体检的女性健康志愿者, 年龄 20~55 岁。各采集清晨空腹静脉血 4 ml, 标本取出后 30 min 内, 5 000 r/min 离心 5 min, 分离血清, -80 °C 保存。

1.2 试剂和仪器

Biomarker Patterns™ 分析软件、PBS-II SELDI-TOF-MS 仪和 H4 蛋白质芯片为美国 CIPHERGEN

Biosystems 公司产品。

1.3 方法

血清标本冰浴中解冻后 5 000 r/min 离心 5 min, 取 10 μ l 与 90 μ l 0.5%CHAPS (pH 7.4)溶液充分混匀 (10 min)。加入白蛋白亲和树脂(Cibacron Blue 3GA, Sigma 公司), 4 °C 振荡反应 60 min, 去除白蛋白后, 沉淀取上清液 50 μ l 备用。H4 芯片置 96 孔支架中, 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)溶液平衡芯片 5 min, 重复 2 次, 已去除白蛋白的血清加 20 mmol/L HEPES(pH 7.4)稀释至 200 μ l, 加至芯片上, 4 °C 振荡反应 60 min。反应结束甩干芯片表面液体, 依次以 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)清洗芯片 5 min, 重复 3 次, 去离子水清洗 1 min, 重复 2 次。芯片自然干燥后加 0.5 μ l 能量吸收分子 CHCA (美国 CIPHERGEN 公司)于已结合上蛋白质的 H4 芯片上。干燥后再重复加 1 次 CHCA。待再次干燥后行质谱仪检测。

1.4 数据收集和处理

用 PBS-II SELDI-TOF-MS 仪和蛋白质芯片软件 3.0 版分析软件。将 SELDI-TOF-MS 系统校正到蛋白质分子量误差小于 0.1 %, 激光强度设定为 190, 灵敏度为 7, 收集数据的优化分子量范围为 2 000~20 000。所有的样本用相同的参数。用蛋白质芯片

收稿日期: 2006-07-03 接受日期: 2006-10-10

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-87783956, E-mail: zhangscy@tom.com

软件提供的过滤噪音工具 Biomarker Wizard(美国 Ciphergen 公司) 软件初步筛选差异蛋白质, 同时将所有样本的质谱图在 2 000~30 000 质荷比(m/z)时, 进行 2 次信噪比过滤, 使蛋白质荷比峰在 10% 以上的样本中同时存在, 且同一蛋白质荷比峰在不同的样本中的偏差小于 0.3%。经上述数据预处理后, 用 Biomarker Wizard 3.1 软件对 EM 患者组与正常对照组(健康志愿者组)血清蛋白质指纹图谱数据进行处理。

1.5 统计学处理

对初步筛选出的蛋白质荷比峰进行 t 检验, 偏态分布数据用 Mann-Whitney 检验。

2 结果

本研究通过对 EM 患者和健康志愿者的血清分析预测, 结果共发现 288 个峰, 两者表达差异有显著意义的蛋白质峰 10 个, 其中 m/z 比为 8 141、6 096、5 894、3 269 的 4 个蛋白质荷比峰同时变化对于诊

断 EM 具有重要意义(表 1)。 m/z 为 6 096、5 894 和 3 269 的 3 个峰在 EM 患者血清中表达高于健康人; m/z 为 8 141 的蛋白质峰在 EM 患者血清中表达低于健康人(图 1, 图 2)。

再用这 32 份样本做盲法测试, 通过这 4 个蛋白质峰的鉴别, 本研究中 16 例 EM 的样品中有 14 例被准确的检出为 EM, 其中未能准确检出的 2 例均为 I 期 EM 患者; 16 例健康志愿者中有 15 例确定为健康者, 结果表明, 该方法的灵敏度为 87.5%(14/16), 特异性为 93.75%(15/16), 总准确率为 90.625%(29/32)(表 2)。

3 讨论

EM 是生育期妇女的常见疾病, 治愈率低, 复发率高, 严重影响患者的生活质量。长期以来, EM 的诊断和治疗, 是妇科医生最棘手的问题之一。目前, 腹腔镜是子宫内膜异位症确诊和治疗最主要和有

表 1 EM 患者与健康志愿者 4 个蛋白质峰的比较

蛋白质峰(m/z)	P 值	健康志愿者组	EM 患者组
8 141	0.0000550586	4 727.91 $\pm$ 1 691.37	950.66 $\pm$ 474.93
6 096	0.0001311544	365.27 $\pm$ 230.51	1 194.30 $\pm$ 307.31
5 894	0.0001396888	629.57 $\pm$ 222.58	1 681.24 $\pm$ 425.12
3 269	0.0001666113	1 123.53 $\pm$ 532.46	5 813.41 $\pm$ 2 066.79

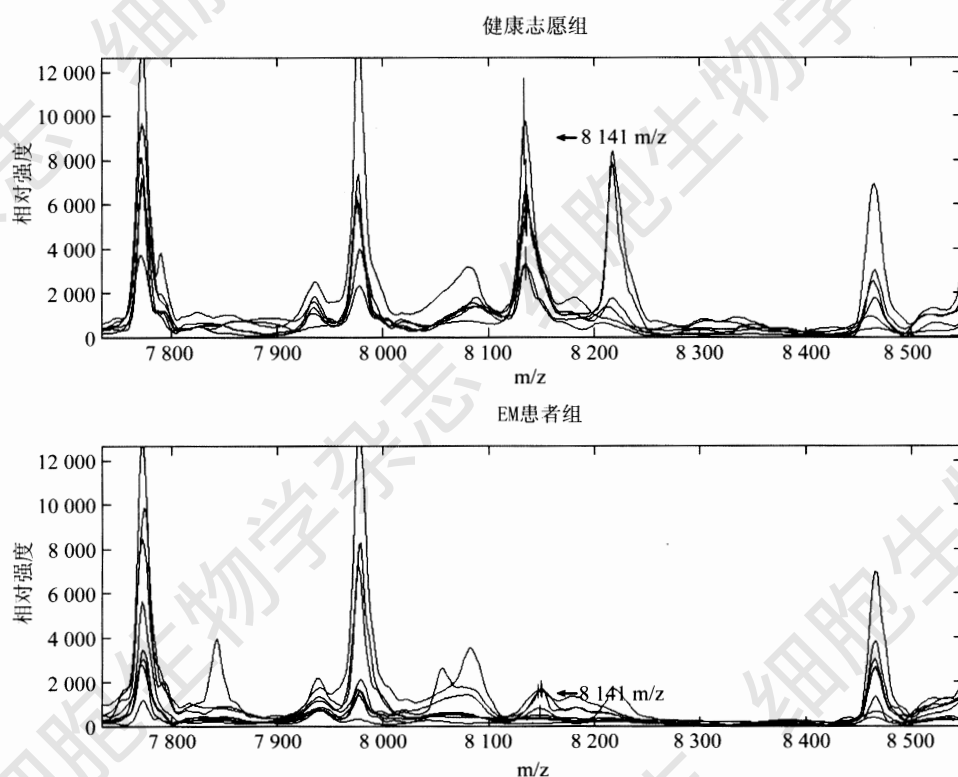


图 1 EM 患者在 m/z 比为 8 141 处出现明显低于健康对照组的蛋白质峰

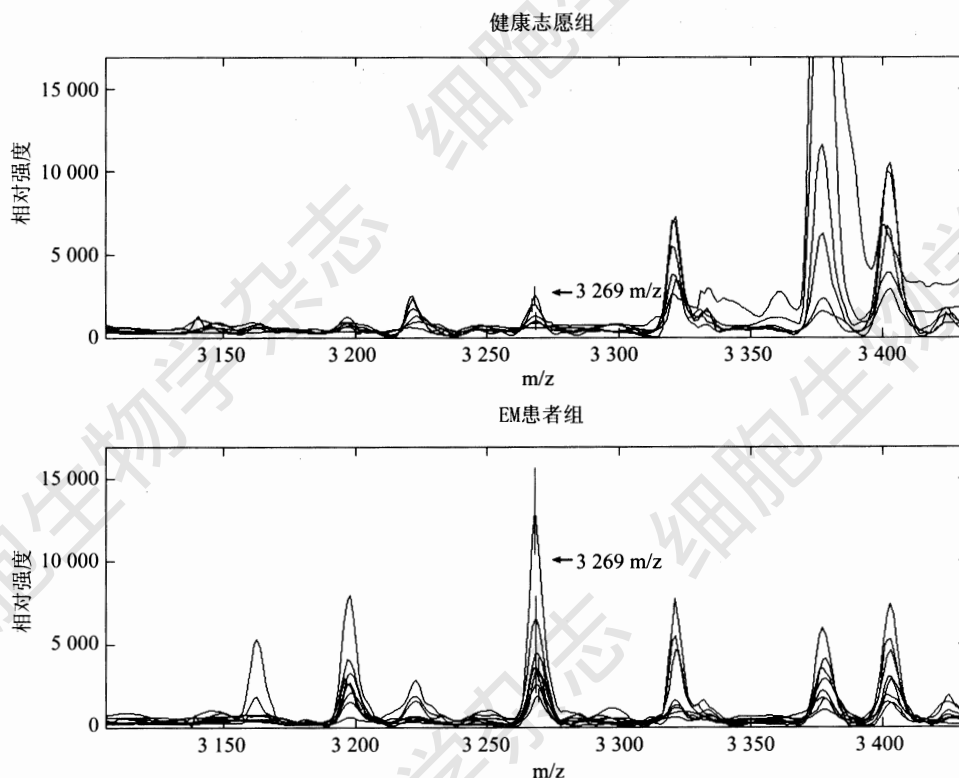


图2 EM患者在m/z比为3269处出现明显高于健康对照组的蛋白质峰

表2 盲法测试EM样本预测结果

组别	例数	预测EM患者	预测健康人	预测百分比(%)
EM患者	16	14	2	87.5(灵敏度)
健康志愿者	16	1	15	93.75(特异性)
合计	32	15	17	90.625(准确率)

效的方法之一^[3]。但腹腔镜是有创伤性,且手术费用较大,在很大程度上限制了它单纯在临床诊断上的应用。SELDI-TOF-MS和蛋白质芯片技术结合为寻找多个EM差异蛋白质提供了高通量的方法和临床诊断的新的技术平台^[4,5]。

本试验用32份样本做蛋白质谱分析,筛选出了4个有价值的差异蛋白质峰,这4个峰同时变化对于诊断EM具有重要意义。与健康志愿者比较,m/z为8141的蛋白质峰在EM中低表达;而m/z为6096、5894和3269的3个峰在EM中高表达。再用这32份样本做盲法测试,其灵敏度为87.5%(14/16),特异性为93.75%(15/16),总准确率为90.625%(29/32),结

果满意,提示该方法对EM具有较好的诊断价值。该方法特异性、敏感性、阳性率较高,而且对早期样本也可准确识别。所筛选的差异表达蛋白质将有可能用于EM的临床检测,建立高敏感性和特异性的EM诊断模型。

综上所述,SELDI-TOF-MS技术对EM的诊断、差异表达蛋白质筛选等方面具有较好的临床价值。但由于我们建立的模型所用样本量较少,因此,需增加病例数,扩大样本量进行完善,有助于更客观的评价其应用价值和其检测准确率。并需要对EM患者手术及药物治疗后进行随访检测,进一步开发其在术后复发的监测上的临床应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Vercellini P et al. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2003, **30**: 163
- [2] Issaq HJ et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**: 587
- [3] Scarselli G et al. *Minerva Ginecol*, 2005, **57**: 55
- [4] Taylor RN. *Gynecol Obstet Invest*, 2004, **57**: 47
- [5] Polinass AE et al. *Proteomics*, 2004, **4**: 1897

Establishment of Serum Proteomic Patterns for Screening Endometriosis by SELDI-TOF-MS

Liang Wang¹, Wei Zheng¹, Jie-Kai Yu², Wen-Zhi Jiang², Lin Mu¹, Su-Zhan Zhang^{3*}

(¹Department of Gynecology, ²Cancer Institute, ³Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

Abstract To detect the serum proteomic patterns in endometriosis patients by using SELDI-TOF-MS protein chip array, build diagnostic models and evaluate its clinical significance. SELDI-TOF-MS protein chip was used to detect the serum proteomic patterns of 16 patients with endometriosis and 16 normal women, and the diagnostic models were developed. Then, the blinding test was performed on those endometriosis patients and healthy individuals. Four potential biomarkers were found (8 141, 6 096, 5 894, 3 269 m/z), and the diagnostic system separated the endometriosis from the healthy samples with a sensitivity of 87.5% (14/16) and a specificity of 93.75% (15/16). The method showed high sensitivity and specificity and great potential for the detection and screening better biomarkers for endometriosis.

Key words endometriosis; SELDI-TOF-MS

Received: July 3, 2006 Accepted: October 10, 2006

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-87783956, E-mail: zhangscy@tom.com

细 胞 生 物 学 杂 志

双月刊 1979年创刊

第29卷 第1期 2007年2月

Chinese Journal of Cell Biology

Bimonthly Established in 1979

Vol. 29 No. 1 February 2007

主 办 中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协 办 南方医科大学珠江医院肿瘤中心
编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
岳阳路319号31B楼405室, 上海200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54922810
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: //www.cjcb.org

主 编 郭 礼 和

出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020

印 刷 上海图字印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

订 阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by Oncology Center, Zhujiang Hospital,
The Southern Medical University

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
Room 405, Building 31B, 319 Yue-Yang Road,
Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950 Fax: 86-21-54922810
E-mail: cjcb@sibs.ac.cn Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices