

血清差异表达多肽谱用于人卵巢癌诊断的研究

仇志琴¹, 黄玉政^{2*}, 陶永辉², 张英², 虞丰^{1*}

(¹南京医科大学附属无锡第二人民医院妇产科, 江苏 无锡 214002; ²江苏省血吸虫病防治研究所卫生部重点实验室, 江苏 无锡 214064)

[摘要] 目的: 建立卵巢癌患者血清差异表达多肽谱, 并探讨其潜在诊断价值。方法: 应用磁珠富集多肽结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)检测方法, 筛选上皮性卵巢癌组和健康对照组差异表达多肽峰, 利用 ClinProTools 软件比较两组血清多肽表达差异并建立差异表达多肽谱及早期诊断模型。结果: 在卵巢癌组血清中, m/z 2 662.02, 2 653.68, 5 859.21, 5 901.69, 5 937.06 表达显著上调; m/z 1 857.82, 2 074.28, 2 856.33 表达显著下调。差异表达图谱建立的诊断模型预测早期卵巢癌的准确率达到 81.8%(9/11), 利用 9 例宫颈癌血清验证均为阴性, 特异性达 100%(0/9)。结论: 磁珠富集-质谱结合 ClinProTools 生物信息学分析技术, 有望成为新的人卵巢癌辅助诊断技术。

[关键词] 卵巢癌; 磁珠富集; 时间飞行质谱; 血清多肽

[中图分类号] R737.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-1029-04

Mass spectrometry analysis of sera peptides in diagnosis of ovarian cancer

QIU Zhi-qin¹, HUANG Yu-zheng^{2*}, TAO Yong-hui², ZHANG Yin², YU Feng^{1*}

(¹Department of Gynecology and Obstetrics, Wuxi Second Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²Key Laboratory on Technology for Parasitic Diseases Prevention and Control, Ministry of Health, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the expression profiles of peptides in sera of ovarian cancer and explore the early-diagnosis value of expression profiles of peptides in ovarian cancer. **Methods:** Magnetic binding-weak cation exchange beads (MB-WCX) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis were used to detect expression files of peptides. The early-diagnosis pattern was established by differential peptides peaks using the ClinProTool data analysis program. **Results:** In the mass range from 1 000 to 15 000 Da, 8 peaks with clear differences in amplitude between the patients and health controls were detected, 5 peaks with mass charge ratio (m/z) of 2 662.02, 2 653.68, 5 859.21, 5 901.69 and 5 937.06 were up-regulated notably, and 3 peaks with m/z of 1 857.82, 2 074.28 and 2 856.33 were markedly down-regulated in patients with ovarian cancer. In specimens of early-stage ovarian cancer, the accuracy of characteristic proteomic patterns detection could be 81.8% (9/11), and the specificity showed 100%. **Conclusion:** MB-WCX separation coupled with MALDI-TOF-MS and ClinProTools analysis could be a desired method to find bio-markers in ovarian cancer, and could have a potential value in the early diagnosis of ovarian cancer.

[Key words] ovarian cancer; magnetic binding; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; serum peptides

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 1029-1032]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2011164); 江苏省卫生厅科研项目(X201110)

*通讯作者, E-mail: yzhyz01@163.com; qzq5310@sina.com

卵巢癌病死率居妇科肿瘤首位^[1], 加之卵巢恶性肿瘤早期无典型症状及体征, 临床确诊仍以详细询问病史及妇科检查为主, 免疫学检查主要以 CA125 肿瘤标志物的检测为主, 但其敏感性和特异

性均不能满足早期诊断的需求^[2]。因此,研究卵巢癌的特征,建立快速、准确的检测方法,对卵巢肿瘤患者的及时治疗及预后意义重大。

磁珠富集多肽结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)可用于检测大量多肽和蛋白质的复合物,在识别生物反应机制和细胞途径状况的复杂蛋白质组图谱方面成效显著^[3]。因其具有灵敏度高、测定快速、样本需求少和检测高通量等优势,是血清蛋白质组学研究的主要技术之一^[4-5]。本研究拟采用磁珠富集血清多肽,结合质谱检测与 ClinProTool 分析,初步建立以差异表达多肽为基础的卵巢癌早期诊断方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

卵巢癌组:筛选 2007 年 10 月~2011 年 3 月南京医科大学附属无锡第二人民医院妇科接诊的患者,经病理确诊的晚期原发性上皮卵巢癌(按国际妇产科联盟 FIGO 标准进行临床分期,分为 III、IV 期),无其他合并症,均为初始病例,共计 55 例,年龄 48~82 岁,平均年龄 58.6 岁,11 例早期卵巢癌患者(FIGO 分期 I、II 期),年龄 51~78 岁,平均年龄 57.6 岁。

健康对照组:同期在南京医科大学附属无锡第二人民医院行健康体检的健康妇女 50 例。年龄 42~77 岁,平均年龄 58.6 岁。与患者组年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

宫颈癌组:同期在妇科接诊的患者,无其他合并症,均为初始病例,共计 9 例,年龄 50~78 岁,中位年龄 58 岁。

1.1.2 试剂与耗材

MB-WCX(magnetic beads based weak cation exchange chromatography)弱阳离子磁珠纯化试剂盒(批号:223983,德国 Bruker Daltonics 公司),Anchorchip 800/384 样品靶(批号:209514,德国 Bruker Daltonics 公司)。基质为 α -氰-4-羟肉桂酸(HCCA,德国 Bruker Daltonics 公司),0.3 mg/ml,溶于乙醇:丙酮(2:1),现配现用。丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为 HPLC 级。

1.2 方法

1.2.1 血清样本采集

采集卵巢癌患者、健康人群和宫颈癌患者空腹

血,置于 4℃ 2 h,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上层血清于聚丙烯离心管中,-80℃保存备用。

1.2.2 血清处理

完全混匀磁珠悬浮液;取 10 μ l MB-WCX 结合液与 10 μ l MB-WCX 磁珠至 200 μ l PCR 管,加 5 μ l 血清后混匀。静置 2 min,将 PCR 管放入磁珠富集器,使磁珠贴壁 1 min,弃上清液;加 100 μ l MB-WCX 冲洗液,前后移动 PCR 管 10 次以充分洗涤,磁珠贴壁,弃上清液,重复 2 次后加 5 μ l MB-WCX 洗脱液洗涤贴壁磁珠,充分将磁珠富集的多肽洗脱到上清液,弃磁珠;在上清液中加入 5 μ l MB-WCX 稳定液并混匀,磁珠洗脱液 1 μ l 与基质 10 μ l 完全混合取 0.5~1.0 μ l 混悬液点靶,室温干燥。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 检测

应用时间飞行质谱(Autoflex III,德国 Bruker Daltonics 公司)对样本进行检测,选择检测方法为 LP_Clinprot.par,激光能量设定 50%~70%,检测质荷比(mass-to-charge ratio, m/z)范围为 1 000~15 000,应用 FlexControl 与 FlexAnalysis(德国 Bruker Daltonics 公司)软件对样本进行多肽指纹图谱采集与初步分析。样本检测前,利用多肽与蛋白标准品对仪器进行校准,保证不同批次间的一致性。

1.2.4 ClinProTool 分析与模型建立

应用疾病组与健康组之间的表达差异峰,可区分患者和健康人。使用 ClinProTools 软件的基因算法,分析两组样本(卵巢癌患者和健康对照人群)的多肽指纹图谱,经软件自动处理产生的优化模型可用于实验样本的鉴定或诊断。

1.2.5 重复性与特异性试验

以相同的实验方法分别取 10 例卵巢癌患者与健康组 10 例血清进行重复性试验,检测多肽指纹图谱是否一致。将宫颈癌患者血清多肽指纹图谱导入诊断模型,验证模型的特异性。

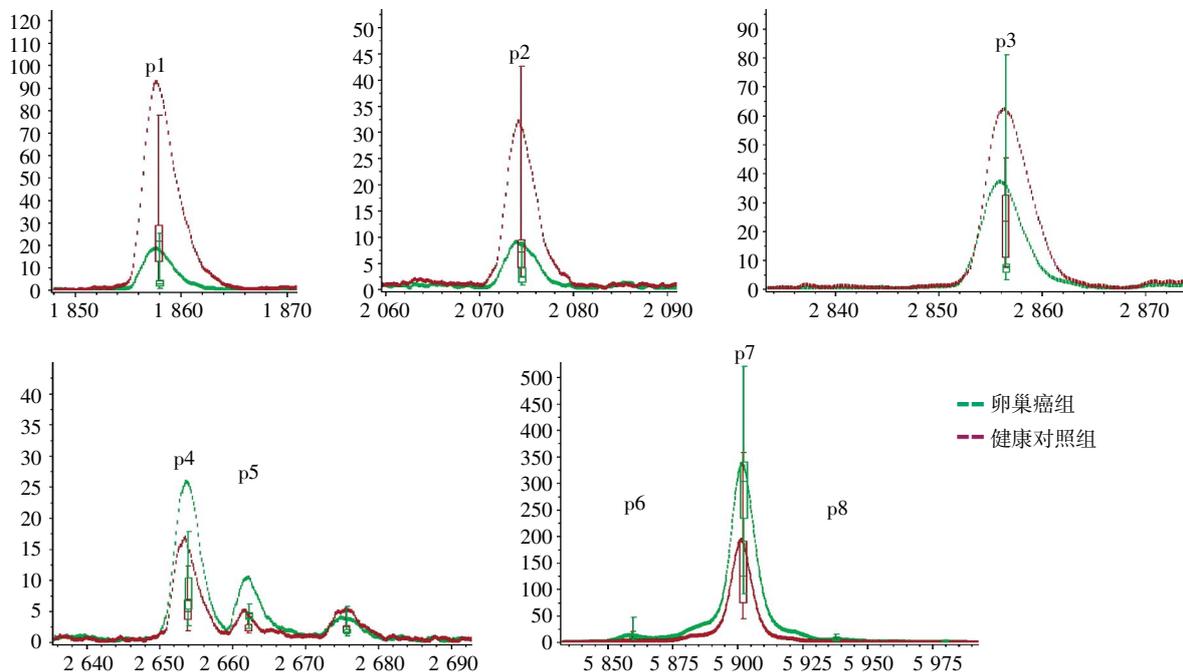
2 结果

2.1 多肽指纹图谱和检测模型的建立

经 ClinProTool 软件分析,在 m/z 1 000-15 000 区间,在 55 例晚期卵巢癌患者血清中共富集 173 个多肽峰,与对照健康人血清相比,卵巢癌患者血清多肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)中有 3 个表达下调($P < 0.05$),即 m/z 1 857.82(p1)、2 074.28(p2)、2 856.33(p3);有 5 个峰表达上调($P < 0.05$),即 m/z 2 653.68(p4)、2 662.02(p5)、5 859.21(p6)、5 901.69(p7)、5 937.06(p8);对 PMF

图进行基线平滑、均值化及 Box-Whisker 分析结果见图 1。基于疾病组与对照组差异表达多肽,运用软

件自动化的 Genetic Algorithm(GA)运算,建立检测模型。



表达下调多肽峰,分别为 p1:m/z 1 857.82、p2:m/z 2 074.28、p3:m/z 2 856.33;表达上调多肽峰,分别为 p4:m/z 2 653.68、p5:m/z 2 662.02、p6:m/z 5 859.21、p7:m/z 5 901.69、p8:m/z 5 937.06。红色曲线代表健康对照组,绿色曲线代表卵巢癌组。

图 1 健康对照与卵巢癌组血清差异表达均值及 Box-Whisker 分析图

Figure 1 Peak amplitudes and Box-Whisker analysis in sera from control and ovarian cancer using MALDI-TOF-MS combined with MB-WCX profiling

2.2 检测模型的验证和应用

此检测模型的敏感性达到 92.7%(51/55),准确性达 94.0%(47/50)。收集 11 例早期卵巢癌患者血清,以同样的实验方法处理血清并应用该检测模型进行预测,结果 9 例报告阳性,即为卵巢癌患者,准确率达 81.8%。

2.3 质谱检测重复性与特异性试验

应用日间检测、反复冻融方法,在实验条件一致的前提下,利用磁珠富集血清多肽、质谱检测等方法重复检测样本 3 次,所获得 PMF 图谱呈现一致性。特异性试验结果显示,9 例宫颈癌在卵巢癌模型中均显示非阳性。

3 讨论

近年来,以表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF)蛋白芯片技术为主的卵巢癌早期诊断方法研究,成为一大热点,国内外学者均有报道。Petricoin 等^[6]利用此技术检测卵巢癌血清蛋白质谱,发现在质荷比为 534、989、2 111、2 251 和 2 465 处的 5 个质谱峰的同时变化,对于卵巢癌诊断具有

重要意义。应用该模型行盲法分析预测 50 例卵巢癌样品,被全部准确检出为肿瘤,其中包括 18 例 I 期患者,66 例非卵巢癌对照组中有 63 例确定为非恶性肿瘤,此结果表明该方法的灵敏度为 100%,特异性为 95%,阳性预测值为 94%。王静等^[7]对 33 例晚期卵巢癌和 20 例子宫颈癌患者和 11 例健康人群血浆标本进行的对照检测,结合支持向量机(support vector machines, SVM)方法,成功建立了由晚期卵巢癌 7 个差异蛋白峰组成的蛋白质谱诊断模型(m/z 为 4 099、5 488、4 144、4 478、3 940 的蛋白在晚期卵巢癌中表达上调,m/z 为 13 783、8 588 的蛋白表达下调),对 11 例早期卵巢癌进行盲法测试,预测准确率为 9/11(81.82%)。此技术虽然取得了一些进展,但也有争议,认为 SELDI-TOF 蛋白芯片技术存在内部缺陷,如测试结果不精确、数据分析技术不成熟,导致结果可重复性差^[8-9]。彭小宁等^[10]认为采用 MALDI-TOF 技术具有高通量、高灵敏度和简易测定的优势^[4],实现血清蛋白谱的测试可避免上述缺点。本研究所采用的磁珠富集多肽方法,其原理是使用磁珠吸附原理分离纯化蛋白,应用飞行

时间质谱和自动化软件进行分析以寻找新的肿瘤早期标志物,与双向电泳等技术相比,具有简便、样本用量少、可直接对粗样本(血清、组织、细胞裂解液、尿液等)进行检测的特点。采用MALDI-TOF-MS技术从许多不同样本中寻找诊断疾病潜在标志物的研究已在许多方面被报道,如血清^[11]、尿液^[12]、脑脊液^[13]、唾液^[14]和泪液^[15]等。

本研究采用弱阳离子磁珠纯化技术和MALDI-TOF-MS技术相结合,对55例晚期卵巢癌(Ⅲ、Ⅵ期)患者、50例健康人群对照血清标本进行检测,筛选出8个差异表达多肽峰,其对卵巢癌诊断的敏感性和特异性分别为92.7%(51/55)和94.0%(47/50),对11例早期卵巢癌患者的盲法测试结果显示,本研究所建立的诊断模型对早期卵巢癌患者具有较高的预测率9/11(81.82%),这一结果与王静等^[7]一致;重复性试验证明该方法受环境等因素影响较小,结果可靠,显示其较SELDI-TOF有更好的重复性,更适合临床血清多肽与蛋白质组学分析;特异性实验结果也表明,应用ClinProTool软件分析建立起的诊断模型有较好的特异性。

本研究应用ClinProTool系统建立了一种新的卵巢癌早期诊断模型,作为前期研究的补充^[16],对卵巢癌的早期辅助诊断及干预提供了理论依据。但是,此模型还需要扩大样本量进一步进行验证,尚不能直接用于临床大规模的妇女健康检查。同时,研究血清差异表达多肽峰的来源和性质,也将对卵巢癌早期诊断有极大的推动作用。

[参考文献]

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版.北京:人民卫生出版社, 2008:300-310
- [2] 董丽华,孙玮,傅士龙,等. 人正常卵巢组织中成纤维细胞的培养[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011,31(10):1527-1532
- [3] Villanueva J, Philip J, Entenberg D, et al. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2004, 76(6): 1560-1570
- [4] Zeng XH, Huang HQ, Chen DS, et al. Proteomic study of serum using gel chromatography and MALDI-TOF MS reveals diagnostic biomarkers in male patients with liver-cancer [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2007, 261(2-3): 108-114
- [5] Li P, Zhang D, Guo C. Serum biomarker screening for the diagnosis of early gastric cancer using SELDI-TOF-MS [J]. Mol Med Report, 2012, 5(6): 1531-1535
- [6] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer [J]. Lancet, 2002, 359(9306): 572-577
- [7] 王静, 张小为, 葛晓慧, 等. 晚期卵巢癌的血浆蛋白质组学模型用于早期卵巢癌诊断的初步研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2008, 9(2): 124-127
- [8] Hays JL, Kim G, Giuroiu I, et al. Proteomics and ovarian cancer: integrating proteomics information into clinical care [J]. J Proteomics, 2010, 73(10): 1864-1872
- [9] Jeong HJ, Kim YG, Yang YH, et al. High-throughput quantitative analysis of total N-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2012, 84(7): 3453-3460
- [10] 彭小宁, 彭司华, 曾小敏. 卵巢癌早期诊断方法的研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(6): 489-492
- [11] Huang Y, Yang G, Kurian D, et al. Proteomic patterns as biomarkers for the early detection of schistosomiasis japonica in a rabbit model [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2011, 299(2-3): 191-195
- [12] Robijn ML, Planken J, Kornelis D, et al. Mass spectrometric detection of urinary oligosaccharides as markers of Schistosoma mansoni infection [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(1): 79-83
- [13] Pan JY, Wang Q, Shao Q, et al. Development and validation of a column-switching LC-ESI-MS assay for determination of huperzine A in rat plasma and cerebrospinal fluid [J]. Chromatographia, 2009, 69(5): 445-451
- [14] Chevalier F, Hirtz C, Chay S, et al. Proteomic studies of saliva: a proposal for a standardized handling of clinical samples [J]. Clin Proteom, 2007, 3(1): 13-21
- [15] Nguyen-Khuong T, Fitzgerald A, Zhao Z, et al. Improvements for the visualization of low-molecular weight protein and peptides of human tears using MALDI [J]. Proteomics, 2008, 8(17): 3424-3432
- [16] 仇志琴, 陶永辉, 黄玉政, 等. 人乳铁蛋白对卵巢上皮性癌细胞增殖及细胞免疫调节的作用 [J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(6): 467-469

[收稿日期] 2012-03-21