

新发展晚期血吸虫病患者血清肽谱分析

黄玉政¹, 华海涌^{1*}, 殷安华², 徐敏皋², 周正元², 尤璐¹

(¹江苏省血吸虫病防治研究所, 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 江苏省寄生虫分子生物学重点实验室, 江苏无锡 214064; ²常熟市疾病预防控制中心, 江苏常熟 215500)

[摘要] 目的: 分析新发展晚期血吸虫病患者血清多肽, 筛选有潜在应用价值的标志蛋白, 为其诊断与发病机制研究奠定基础。方法: 采集新发展晚期血吸虫病患者与健康人血清, 利用包被有弱阳离子的磁珠富集纯化血清多肽, 应用基质辅助激光解吸电离飞行质谱(MALDI-TOF-MS)Flex 分析技术结合 Mascot 生物信息学分析血清多肽指纹图谱。结果: 与健康对照组比较, 在0.8~13.0 ku 区段, 新发展晚期血吸虫病患者血清中 m/z 2 082, 4 282 多肽表达上调($P < 0.01$), 2 661, 2 991, 3 241, 5 337, 5 906 多肽表达下调($P < 0.05$); 常规晚期血吸虫病患者血清中 m/z 2 662, 4 209, 5 337 与 5 906 处显著下调, 2 082 处显著上调。结论: m/z 3 241, 4 282 血清差异多肽对新发展晚期血吸虫病患者的诊断可能具有潜在应用价值, 对该病发生发展的机制也奠定了理论基础。

[关键词] 新发展晚期血吸虫病; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 血清多肽

[中图分类号] R532.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-576-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150427

Peptides analysis from sera of newly-developed advanced schistosomiasis patients

Huang Yuzheng¹, Hua Haiyong^{1*}, Yin Anhua², Xu Mingao², Zhou Zhengyuan², You Lu¹

(¹Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Key Laboratory on Technology for Parasitic Diseases Prevention and Control, Ministry of Health, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Molecular Biology of Parasites, Jiangsu Provincial Key Subject on Parasitic Diseases, Wuxi 214064; ²Center for Disease Control and Prevention of Changshu, Changshu 215500, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the peptides biomarker from sera of the newly-developed advanced schistosomiasis (NDAS) patients and to lay the foundation for schistosomiasis diagnosis and pathogenesis. **Methods:** Peptides were collected from the sera of NDAS patients and health control by MB-WCX kit (Bruker Daltonics GmbH), followed by analysis with Flex-Analysis, ClinProTool algorithm and MASCOT using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Results:** In the mass range from 0.8 to 13 ku, 7 peaks with a clear difference in amplitude between the NDAS patients and control groups were detected, 5 peaks with mass charge ratio (m/z) of 2 661, 2 991, 3 241, 5 337 and 5 906 were down-regulated and 2 peaks with a m/z of 2 082, 4 282 were up-regulated in NDAS patients. Furthermore, m/z of 2 662, 4 209, 5 337, 5 906 were down-regulated and 2 082 was up-regulated in advanced schistosomiasis patients. **Conclusion:** m/z 3 241, 4 282 could give a potential application value for NDAS patients diagnosis and lay the foundation for schistosomiasis pathogenesis.

[Key words] newly-developed advanced schistosomiasis; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; serum peptide

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 576-579]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31201893); 江苏省临床医学专项(BL2014020); 江苏省自然科学基金项目(BK2011164); 江苏省卫生科研项目(X201104, X201110, X201416); 江苏省临床医学中心项目(201108); 江苏省动物预防医学重点实验室开放课题(K13045)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: huahaiyong@hotmail.com

晚期血吸虫病(简称晚血)是血吸虫病的终末形式,对患者生理健康构成严重威胁,甚至危及生命^[1]。随着血吸虫病综合防治措施的不断实施,尤其是晚血患者治疗救助项目的开展,使得患者的病情得到了较好控制^[2]。但有资料显示,在已达到传播阻断标准较长时间的地区仍出现新的晚血患者,2013年,该现象由血吸虫病专家组会议定名为新发展晚期血吸虫病,但其与传统的晚血发生发展机制有何异同,需要进一步研究^[1,3]。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS,简称质谱)技术具有重复性好、高通量、灵敏度高等优点,适合多肽与蛋白生物标志物的筛选与相关组学研究^[4],该技术在诸多疾病的标志物研究中已被采用并已用于临床诊断^[5-6]。而新发展晚期血吸虫病患者血清多肽指纹图谱的建立及其特异性多肽标志物的研究,有望为揭示新发展晚血患者的发生机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

弱阳离子磁珠纯化试剂盒(MB-WCX, No. 223983)、MTP-ground steel 点样靶均为德国 Bruker Daltonics 公司产品;丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为进口 HPLC 级,购自美国 TEDIA 公司和西班牙 Scharlau 公司;基质 HCCA(Bruker Daltonics 公司,德国)0.3 mg/ml,溶于乙醇/丙酮(2/1)中,新鲜配置;其他试剂与耗材购自德国 Eppendorf 公司。德国布鲁克道尔顿公司 Autoflex III MALDI-TOF/TOF 质谱仪,Autoflex 操作与分析软件。

1.2 方法

1.2.1 分组

受试对象为新发展晚血患者 75 例(新发晚血组)、有血吸虫病史治愈者 75 例(有史治愈组)与无血吸虫感染史者 30 例(正常对照组),新发晚血组含切脾者 39 例。所有入组对象均核对常熟市《查治血吸虫病户口清册》,并经腹部超声、血常规、肝功能、HBsAg 及抗血吸虫特异性抗体等项目检查均符合上述各组的入选标准。

1.2.2 血清弱阳离子吸附磁珠处理

静脉抽取受试人群血液,30 min 内于 4℃ 以 12 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,取血清,置于 Eppendorf 管中,-80℃ 以下保存备用。

按照磁珠试剂盒操作说明,简要流程是磁珠与结合液预处理,然后与血清混合,待血清多肽富集

于磁珠后,用 WS 冲洗液(wash solution)洗磁珠 3 次,最后用 ES 洗脱液(elution solution)洗脱多肽并与基质混合待检测。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 检测

应用 Autoflex control 软件采集多肽指纹图谱。参数设置:检测方法为 LP_Clinprot.par,激光能量在 25% 左右,检测分子质量单位范围为 0.8~13.0 ku,选择靶点为 MTP-ground steel。

1.2.4 谱图解析

应用 Autoflex analysis 与 ClinProTools 软件对采集图谱进行分析;将采集到的多肽指纹图谱进行基线平滑与优化,利用 ClinProTools 软件的组间比较功能,筛选不同组间的差异表达多肽,绘制多肽指纹图谱。

1.2.5 TOF-TOF 检测

选取特定峰作为母离子,MALDI-TOF/TOF 质谱 LIFT 打碎进行检测。

1.3 统计学方法

ClinProTools 软件自带统计学分析功能,差异峰值以组内峰值均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为统计学上具有显著差异,所有差异峰按 P 值大小进行排列。

2 结果

根据软件分析结果结合组内峰值的统计分析,新发晚血组中切脾与否在血清肽谱(0.8~13.0 ku)无显著差异($P > 0.05$)。ClinProTools 组间比对发现,与正常对照组相比,新发晚血组在 m/z 2 082 与 4 282 处均显著上调($P < 0.01$,图 1),在 m/z 2 662、2 991、3 241、5 337 与 5 906 处均显著下调($P < 0.05$,图 2);而有史治愈组与正常对照组比较发现,在 m/z 2 662、4 209、5 337 与 5 906 处显著下调($P < 0.05$),2 082 处显著上调($P < 0.05$)。新发晚血组与有史治愈组相比,在 m/z 3 241 处显著下调($P < 0.05$)。提示 3 241 显著下调、4 282 显著上调可以作为判定新发晚血的指征,在图 1、2 中箭头指示峰为正常对照组的样本峰。

根据 ClinProTools 软件分析结果,将 m/z 3 241 与 4 282 作为母离子进行二级质谱分析,并导入 BioTool 分析,3 241、4 282 可能为免疫球蛋白的轻重链部分。

3 讨论

蛋白质组学是继基因组学后,在多肽与蛋白质

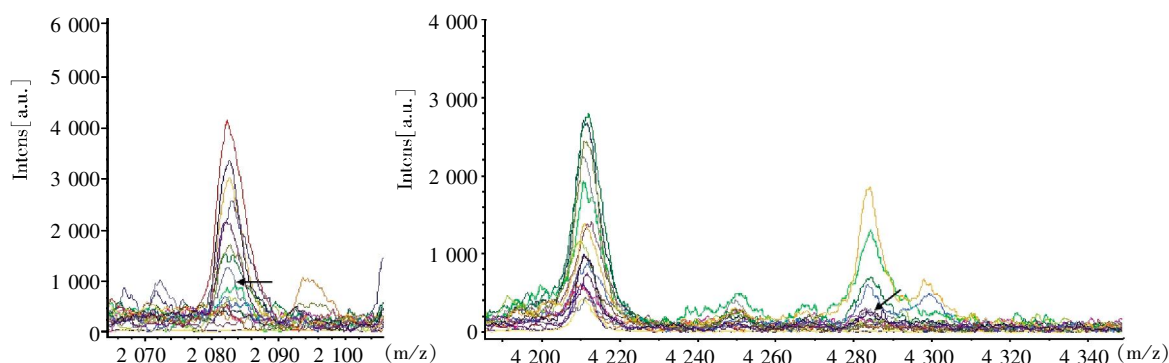


图 1 新发晚血组与正常对照相比表达上调峰 m/z 2 082,4 282(箭头所指为正常对照组单例)

Figure 1 Up regulation peaks m/z 2 082,4 282 of newly-developed advanced schistosomiasis patients (Single case of health group by arrow)

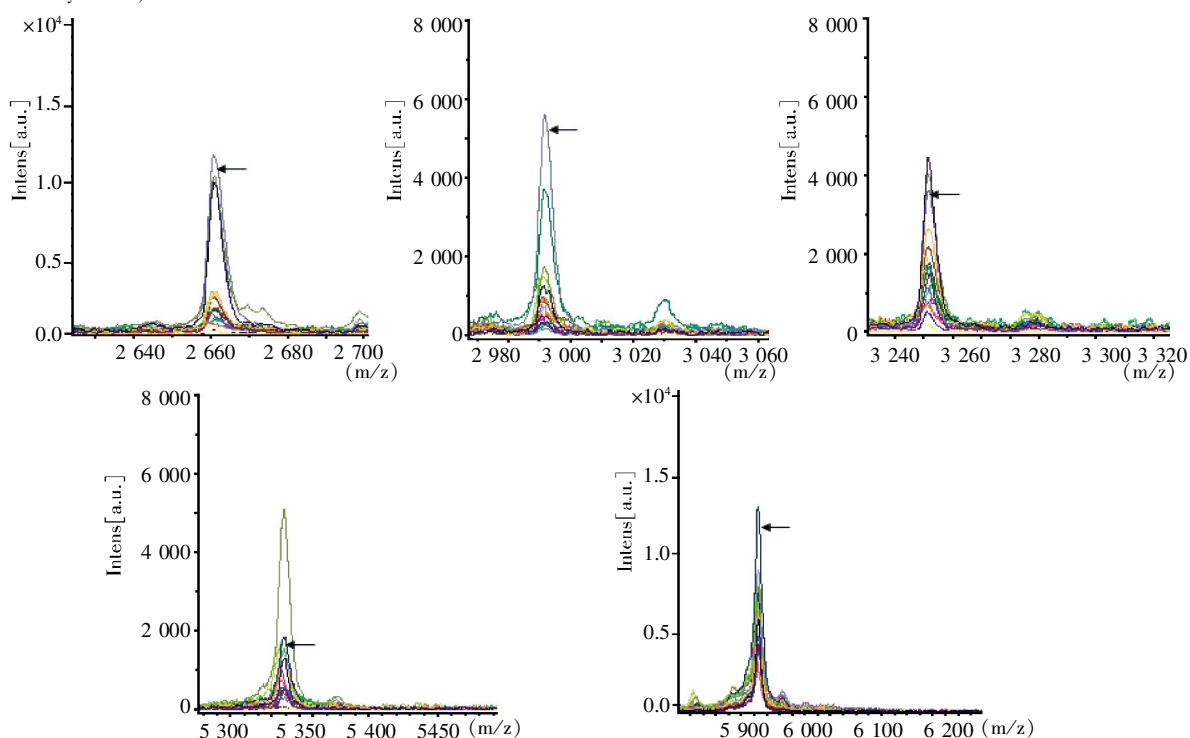


图 2 新发晚血组与正常对照组相比表达下调峰 m/z 2 662,2 991,3 241,5 337与 5 906(箭头所指为正常对照组单例)

Figure 2 Down regulation peaks m/z 2 662,2 991,3 241,5 337,5 906 of newly-developed advanced schistosomiasis patients(Single case of health group by arrow)

水平上对机体所有蛋白进行研究的一项应用科学,近年来在疾病诊断、抗原表位筛选、疾病标志物寻找等方面应用广泛,如肿瘤^[7-8]、神经系统疾病^[9-10]、药物中毒病^[11]、寄生虫病^[12-13]等方面,本课题组在血吸虫的动物实验中,通过确定标志性多肽,建立了早期快速的检测方法^[14-15]。本研究通过不同组人群的血清肽谱比较,发现在 m/z 3241 与 4282 处呈现显著下调与上调,提示这 2 种多肽具有作为判断新发展晚血特征峰的可能性,二级质谱检测结合 MASCOT 搜库表明,它们可能来源于免疫球蛋白,从而提示新发展晚血患者的形成机制可能与其免疫学改变相关,这一数据部分支持了细胞因子网络

失调所致的免疫学变化的观点,也与此前显示的有 40% 患者的球蛋白升高相符。但本实验并未弄清该蛋白的性质,需要进一步研究。也有报道指出^[16],新发晚血可能是由于吡喹酮不能对虫卵杀灭,导致病原学治疗后未成熟虫卵继续发育,引起肝肉芽肿与纤维化病变,本实验中发现的指征性多肽峰是否与虫卵抗原的抗体相关,还需要进一步验证。实验结果同时显示,切脾与否在新发晚期血吸虫患者血清肽谱(0.8~13.0 ku)无显著差异,说明手术治疗后,患者的血清在此检测肽范围内没有变化,对于手术效果的考察,应考虑其他方法。

新发展晚血患者发生在传播阻断地区的部分

血吸虫历史感染者,可以判定患者体内无活虫,但病情持续发展,病程迁延最终成为晚血,其与传统意义上的晚血患者在发病成因、发病形式与发病时间上存在差异,发病过程更为隐蔽,患者往往得不到及时、有效的治疗,对机体造成极大危害;同时,病情的隐匿性,也给血吸虫病综合治理及晚血救助工作带来一定的困惑。目前,常规的临床检查与实验室诊断方法均不能得以区别,对其病理病因的分析尚无更好方法,迫切需要应用多种手段来对其发展机制进行研究。本研究发现的指征峰可能有助于新发晚血的诊断,同时也奠定了对其发生发展机制的研究基础。

[参考文献]

- [1] 殷安华,华海涌,孙国祥,等. 传播阻断地区新发展晚期血吸虫病病人情况调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013,25(5):477-480
- [2] 李石柱,郑浩,高婧,等. 2012 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2013,25(6):557-563
- [3] 华海涌,田增喜,梁幼生. 江苏省晚期血吸虫病现况调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2009,21(5):400-403
- [4] Ketterlinus R,Hsieh SY,Teng SH,et al. Fishing for biomarkers:analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software[J]. Biotechniques,2005,Suppl:37-40
- [5] Clerc O,Prod'hom G,Vogne C,et al. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia;a prospective observational study[J]. Clin Infect Dis,2013,56(8):1101-1107
- [6] Kok J,Chen SC,Dwyer DE,et al. Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory [J]. Pathology,2013,45(1):4-17
- [7] Shah FD,Begum R,Vajaria BN,et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer [J]. Indian J Clin Biochem,2011,26(4):326-334
- [8] 仇志琴,黄玉政,陶永辉,等. 血清差异表达多肽谱用于人卵巢癌诊断的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(7):1029-1032
- [9] Zurbig P,Jahn H. Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research[J]. Electrophoresis,2012,33(24):3617-3630
- [10] Tang W,Shi YQ,Zou JJ,et al. Serum biomarker of diabetic peripheral neuropathy indentified by differential proteomics[J]. Front Biosci(Landmark Ed),2011,16:2671-2681
- [11] Savino R,Paduano S,Preiano M,et al. The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery [J]. Int J Mol Sci,2012,13(11):13926-13948
- [12] Huang Z,Yang GY,Kurian D,et al. Proteomic patterns as biomarkers for the early detection of Schistosomiasis japonica in a rabbit model [J]. Int J Mass Spectrometry,2011,299(2):191-195
- [13] 田玉娜 田喜凤. 蓝氏贾第鞭毛虫的蛋白质组学研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(7):544-546
- [14] 黄玉政,徐明,王玠,等. 日本血吸虫感染兔血清蛋白质质谱分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2008,20(5):346-349
- [15] 黄玉政,徐明,顾振华,等. 日本血吸虫急性感染小鼠血清肽谱分析[J]. 中国病原生物学杂志,2013,8(4):328-330
- [16] Gryseels B,Polman K,Clerinx J,et al. Human schistosomiasis[J]. Lancet,2006,368(9541):1106-1118

[收稿日期] 2014-11-04