应用 SELDI-TOF-MS 技术分析不同中医证型肝癌血清标志物的研究

The application of SELDI-TOF-MS technology in analyzing different TCM syndromes of liver cancer serum markers

黄争荣! 王 泳! 叶韵斌! 陈慧菁! 陈 强² 林雪娟3 杨爱莲!

(1.福建省肿瘤医院,福建 福州,350014;2.福建医科大学附属协和医院,福建 福州,350001;3.福建中医药大学,福建 福州,350122)

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2012) 21-0028-03 证型: IDGA

【摘 要】目的:应用表面加强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)检测不同中医证型肝癌患者血清蛋白质指纹图谱,筛选特异性相关血清生物学标志物。方法:应用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术检测 5 种中医证型(气滞证、脾虚证、湿热证、血瘀证、阴虚证)肝癌患者血清,获得 CM10 蛋白质芯片蛋白表达图谱,用 Marker Wizard 软件分析差异蛋白并经数据库搜索初步鉴定。结果:应用弱阳离子交换芯片(CM10)在不同中医证型肝癌血清中检测到在不同质荷比(M/Z)差异蛋白质峰,气滞证组 M/Z 为 4182Da、6589Da 及湿热证组 M/Z 为 5710Da 的血清蛋白质峰下调,脾虚证组 M/Z 为 5816Da、血瘀证组 M/Z 为 4297Da、阴虚证组 M/Z 为 6992Da 的血清蛋白质峰上调,上述蛋白质含量差异均有统计学意义(P<0.01)。结论:应用 SEIDI-TOF-MS 可以筛选不同中医证型肝癌患者血清特异性生物标志物,检测到的差异蛋白质可能是鉴别肝癌不同中医证型的血清生物学指标。

【关键词】 原发性肝癌; 证型; SELDI-TOF-MS; 蛋白质组

【Abstract】 Objective: Surface-enhanced laser desorption/inionation-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) was used to study the serum proteome of hepatocellular carcinoma (HCC) with different syndrome of TCM. Methods: The serum of normal people and patients with different syndrome HCC were collected and tested by CM10 protein chip and SELDI-TOF-MS technology. The data of spectra were analyzed by bioinformatics tools and biomarker pattern discrimination software. Results: Compared with normal group, the peak intensity of M/Z 4182Da、6589Da protein of Qi stagnation syndrome, M/Z 5710Da of Damp heat syndrome were reduced significantly (*P*<0.01), while the peak intensity of M/Z 5816Da of Spleen deficiency syndrome, M/Z 4297Da of blood stasis syndrome, M/Z 6992Da of Yin deficiency syndrome were increased (*P*<0.01). Conclusion: These proteins might be related to HCC with different TCM syndrome, and could become candidate biomarkers for clinic differentiation of syndromes in HCC.

Keywords Hepatocellular carcinoma; Syndrome; SELDI-TOF-MS; Proteome doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2012.21.011

原发性肝细胞癌(以下简称肝癌)是临床上常见的消化系统恶性肿瘤之一,在世界范围内,其发病率呈现上升的趋势。我国是肝癌大国,全球新发肝癌病例中 50%发生于中国[1],死亡仅次于肺癌,位居第二位[2]。由于大多数肝癌诊断时已属中晚期,预后差,中位生存期仅为 6 个月,严重威胁着人们的健康及生命。目前,中医药在中晚期肝癌治疗发挥重要的作用。辨证论治是中医临床诊治疾病最重要的方法,辨证正确与否直接关系到诊断准确性及治疗的效果。因此,本研究结合肝癌临床辨证分型,利用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术从蛋白质水平筛选中医证型相关的血清标记物,为肝癌证型的微观辨证标准提供依据。

1 资 料

1.1 诊断标准

临床收集于 2009 年 1 月~2010 年 8 月在福建省肿瘤医院 初诊的肝癌患者,全部病例均符合 2001 年中国抗癌协会肝癌 专业委员会修订《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》^[3],部分病例经组织学或细胞学确诊为肝细胞癌。根据《中药新药临床研究指导原则》^[4]的中医辨证标准将肝癌患者确定为 5 型:

气滞证、血瘀证、脾虚证、湿热证及阴虚证。

1.2 临床资料

将 154 例肝癌患者被纳入本临床研究中,其中气滞型 37 例、血瘀型 28 例、脾虚型 45 例、湿热型 18 例及阴虚型 26 例。同期收集福建省肿瘤医院体检中心健康志愿者 46 例为健康对照组。经统计学分析,6 组性别、年龄分布比较差异无显著性。

2 方 法

2.1 标本采集

清晨空腹取外周血 3~5ml,置 4℃冰箱放置 2h,2000rpm 离心 5min,取血清以 50μ l 分装放置-80℃冰箱保存待用。

2.2 主要仪器和试剂

Protein Chip Biology System (PBS II-C)型质谱仪、弱阳离子交换型蛋白质芯片(CM10)、能量吸收分子 SPA、Bio marker Wizard 3.2 及 Bio marker Pattern Software 5.01 分析软件均为美国 Ciphergen 公司产品。乙腈、三氟乙酸、尿素、Tris-HCL等试剂均购自美国 Sigma 公司。

2.3 实验方法

将 CM10 芯片装在生物芯片处理器 Bioprocessor 架上,每

010-59420369

CJCM 中医临床研究 2012 年第 4 卷 第 21 期

孔加入缓冲液(50mM pH4.0 NaAC)200µl 置于水平摇床振荡5min, 弃溶液, 重复上述步骤一次。取 5µl 血清, 加 10µlU9处理液(9M Urea, 2%CHAPS, 1%DTT, 50mM Tris-HCL, pH9.0), 充分混匀, 水平振荡器上冰浴振荡 30min(400~600 rpm), 加 180µl 缓冲液混匀。将稀释好的血清样品 100µl 加入平衡好的芯片, 摇床振荡孵育 1h, 甩去样品, 用 200µl 缓冲液室温振荡洗涤 2 次, 每次 5min。取出芯片, 晾干后,每孔加 SPA 1µl,滴加 2 次。

2.4 数据采集和分析

按 SELDI-TOF-MS 操作规程将蛋白芯片插入到样品槽,设定仪器参数,本试验芯片阅读的主要参数设定为:激光强度205,检测灵敏度10,优化分子质量范围2000~20000。采用Ciphergen protein chip3.0.2、Biomarker Wizard和 BioMarker Pattern Softwar 软件对数据进行统计学处理,确定组间蛋白质

峰值的差异。当 P<0.05 时, 具有统计学意义。

2.5 蛋白质数据库搜索

对差异蛋白质进行蛋白质数据库 Tagldent tool 搜索,以寻找与它们分子量最为接近的蛋白质。

3 结 果

3.1 采用 Biomarker Wizard 软件对不同中医证型组肝癌与健康对照的血清蛋白质谱图进行比较和统计学分析

与健康对照组对比,气滞证组 M/Z 为 4182Da、6589Da 的 血清蛋白质峰下调,脾虚证组 M/Z 为 5816Da 的血清蛋白质峰上调;湿热证组 M/Z 为 5710Da 的血清蛋白质峰下调;血瘀证组 M/Z 为 4297Da 的血清蛋白质峰上调;阴虚证组 M/Z 为 6992Da 的血清蛋白质峰上调。上述各差异蛋白质峰表达相对含量均具有显著性差异(P<0.01),见表 1。

表 1 不同中医证型肝癌患者的差异蛋白质表达的相对含量(均数土标准差)

证型	质荷比(Da)	对照组	肝癌组
气滞证	4182	9.641 ± 4.830	3.277±3.478**
	6589	32.500 ± 11.512	$10.753 \pm 6.145^{**}$
脾虚证	5816	4.766 ± 2.537	$9.790 \pm 5.86^{**}$
湿热证	5710	5.296 ± 1.533	$2.372 \pm 1.524^{**}$
血瘀证	4297	2.946 ± 2.393	$7.133 \pm 3.178^{**}$
阴虚证	6992	3.371 ± 1.952	$7.215 \pm 3.012^{**}$

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

3.2 对差异蛋白质峰进行数据库搜索,分别得到与之分子量最 为接近的蛋白质 见表 2。

表 2 差异蛋白质的数据库搜索结果

证型	质荷比(Da)	Swiss-Prot 代码	等电点	蛋白质名称
气滞证	4182	Q9XD13	11.14	核糖体蛋白 L36 家族蛋白
	6589	Q35537	9.52	三磷酸腺苷合成酶蛋白8
脾虚证	5816	Q8NET1	7.79	β-防御素 108B
湿热证	5710	C3K6U0	12.31	膜蛋白 PFLU-0090
血瘀证	4297	A5UDS6	10.70	核糖体蛋白 L36 家族蛋白
阴虚证	6992	A9BG00	9.77	核糖体蛋白 L30

4 讨论

在中医学古籍文献中,尚无肝癌病名,但根据其临床表现,属于"积聚"、"瘕瘕"、"黄疸"、"鼓胀"等病证范畴。辨证论治是中医临床诊治的核心,准确辨证分析疾病不同病机阶段的动态变化特点,才能有效提高临床疗效。中医证型是疾病发展过程中某一阶段的病机概括,是机体内因和外因综合作用的反映状态,随着病程的发展而发生相应的变化。肝癌的发病是一个复杂的过程,不同的发展阶段呈现了不同的临床特点和病机特色,同时受医者主观因素影响,目前有关肝癌中医辨证分型尚不统一,临床上多以医者的临证经验划分证型。随着科学技术的进步,将现代医学检测技术融合到传统肝癌辨证中,从而建立一种更具可重复性、可检验性的微观辨证体系,可显著提高了辨证的准确率[5],有利于推动中医药的临床研究。

1994 年澳大利亚的 Wasinger 等首次提出了蛋白质组的概念。蛋白质组指基因组所表达的全部蛋白质,可以是细胞、组

织或机体在特定的时间和空间上基因组所表达的全部蛋白质^[6]。蛋白质组学则是研究某一层次所有蛋白质及其动态变化规律的科学,包括蛋白质的定性、定量、动态变化和整体演变规律等^[7]。由于蛋白质组学的研究思路、方法与中医基础理论的整体观有趋同性,因此,将蛋白质组学应用于中医证型的研究具有可行性^[8]。以蛋白质作为证型客观化研究的物质基础,用蛋白质组学研究手段和方法对特定的物质基础进行定量和定性,揭示其变化规律,对了解中医证型实质及临床辨证的规范化具有重要的意义。

在肝癌的发生发展过程中,由于肝细胞遭受破坏,诱发机体免疫反应,不同中医证型的肝癌细胞及机体免疫细胞表达的蛋白质谱可以发生变化。应用蛋白质组学技术分析、比较不同中医证型蛋白质谱的变化,可以发现中医证型相关的生物学蛋白质标志物,为证型的早期诊断提供依据。近年出现的表面增

(下转31页)

理后的液体剂型,微量元素则会有较多变化或损失。在制剂过程中的一系列反应,如络合作用的产生等,影响了重金属元素在制剂中的存在状态、溶出率,从而直接影响了制剂的生物活性。

重金属元素存在状态研究的定义:研究中成药中重金属元素存在状态是揭示其生物活性的核心和关键,只有通过研究探讨重金属元素发挥药效或不良反应的机理,才能进一步地去利用其治疗疾病或降低毒性。现在随着科学的发展和研究的深入,已有许多成功的例子。如:铜与芦丁本身对癌细胞并无杀伤作用,但是芦丁和铜的络合物对癌细胞的杀伤作用却较大。又如:硒是一种稀散元素,近年来人们发现硒和人体有密切关系。一方面,硒及其化合物都是剧毒的,硒的氢化物毒性更强,长期大量吸入,可引起急性和慢性中毒,如肝大,对细胞代谢氧化也有抑制作用。另一方面,硒又有营养价值和特殊功能,是谷胱甘肽过氧化酶的组成部分,是人类必须的微量元素之一,可以对抗各种金属的毒性,对抗化学致癌,保护放谢性造成的损失。最近又发现硒是具有生命功能的酶系统蛋白的关键成分。人们因此研制出硒酵母,既降低了毒性,又可用于防癌。

总之,通地对中成药重金属元素状态的研究,有助于我们 发现中成药及其重金属元素的作用机理,从而为我们进一步提 高疗效,降低毒性,开发新药提供了机会。中药重金属研究尤 其对有毒重金属的存在状态研究才刚刚开始,笔者认为如果按 前述指导原则和方法论进行工作,尤其在我们所提出的重金属 元素的正确研究思路和中药有效化学成分的配位化学学说指 引下,重金属元素的研究必将逐步深入,不断取得丰硕成果, 为中医药做出更大贡献。

参考文献:

[1]刘冬莲.中草药及其生长土壤中 6 种重金属元素含量相关性初探[J].理化 检验(化学分册)杂志,2010(7)

[2]高学敏.中药学[M].北京:人民卫生出版社,2000

作者简介:

王辉珠, 中药师。

编辑: 王艳娟 编号: EA-12080475 (修回: 2012-11-07)

(上接29页)

强激光解吸离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 技术是一种全新的蛋白质组学研究手段,具有高通量、快速、敏感等特点,可在少量生物粗样本中同时发现多个低丰度的未知标记物^[9],其原理是利用经过特殊处理的固相支持物或芯片的基质表面,制成蛋白芯片。根据蛋白质生化特性不同,选择性地从待测生物样品中捕获配体,将其结合在芯片的固相基质表面上,利用激光脉冲辐射使芯片表面的分析物解析成带电离子。质荷比不同的离子在电场中飞行时间不同,据此绘制出质谱图,检测结果经过软件处理后可直接显示样品中各种蛋白质的相对分子质量、含量等信息,可将正常人或某些疾病患者的蛋白质指纹图谱甚至基因库中的指纹图谱进行相互对照比较,从而发现和捕获到疾病中新的特异性相关蛋白质及标志物^[10-11]。

本研究利用 SELDI-TOF-MS 技术,检测肝癌不同中医证型患者的血清蛋白质谱,将血清蛋白质谱建立数据库,利用软件分析不同中医证型肝癌患者血清蛋白质谱间的差异,结果发现不同中医证型肝癌患者血清蛋白与健康对照组比较均有不同差异的蛋白质峰,说明这些差异蛋白质可以作为鉴别不同中医证型的血清蛋白质生物学标记。但对于 SELDI-TOF-MS 技术来说,每个 M/Z 值对应的可能是很多分子量相近的多肽,因此不能对体液蛋白质进行鉴定^[12],故该蛋白质的结构、功能及是否是已知蛋白等均不清楚,需要在下一步的实验中结合双向凝胶电泳(2-DE)等技术予以解决。

总之,运用 SELDI-TOF-MS 技术对不同证型肝癌的的蛋白质组学进行研究,探寻不同证型的相关性蛋白质,可为肝癌中医辨证的客观化提供定量化、客观化蛋白质组学依据。利用蛋白质组学、生物信息学技术,结合统计学的比较分析,建立肝癌证型特定的蛋白质数据库,探索证型、蛋白质组学之间的关系,制订出标准参照物,从而确立一个中医辨证蛋白指纹图谱诊断模式,使得肝癌的辨证分型具有客观性、准确性及重复性,必将极大地推动肝癌中医辨证客观化的发展。

参考文献:

[1]Parkin DM,Bray F,Ferkay J,et al.Global Cancer statistics[J].2002,CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.

[2]陈建国,宋新明.中国肝癌发病水平的估算及分析[J].中国肿瘤,2005,14(1): 28-31

[3]中国抗癌协会肝癌专业委员会.原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J].肿瘤防治研究.2002.29(1):83

[4]郑莜萸.中药新药临床研究指导原则[S].北京:中国医药科技出版社,2002: 211

[5]郭振球.微观辨证学的研究现状与发展趋势[J].中华中医药学刊,2003,21 (5):645-646

[6]Humphery-Smith I,Cordwell S,Blachstock W,et a1.Proteome research:comp1 ementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds[J]. Electrophoresis,1997,18(8):1217-1242

[7]Dove A. Proteomics:translating genomics into products?[J].Nature Biotechnol, 1999,17(3):233-236

[8]刘喜平.蛋白质组学与中医方证研究思考[J].中医杂志,2004,45(4):217-218 [9]Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, et al.Clinical proteomics:searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry[J].Trends Pharmacol Sci,2006,27(5):251-259

[10]Tang N, Tornatore P, Weinberger S, et al. Current developments in SELDI affinity technology[J].Mass Spectrom Rev,2004,23:34-44

[11]Wright GL. SEIDI proteinchip MS:a platform for biomarker discovery and cancer diagnosis[J].Expert Rev Mol Diagn,2002,2(6):549

[12]Boguski MS, McIntosh MW. Biomedical informatics for proteomics[J]. Nature,2003,422(6928):233

基金项目:

福建省中医药科研重点课题(WZZZ0913)。

编辑: 王艳娟 编号: EA-12080583 (修回: 2012-11-09)