

不同疗效的非霍奇金淋巴瘤血清蛋白质质谱分析

张明智,付晓瑞,孙振昌,南飞飞,王瑞林,宋 敏

Analysis of Serum Proteome Profiles of Subjects with Complete Response and Refractoriness Non-hodgkin's Lymphoma

ZHANG Ming-zhi, FU Xiao-rui, SUN Zhen-chang, NAN Fei-fei, WANG Rui-lin, SONG Min
Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** Through the analysis of the serum differentially expressed proteins of the health adults, the Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) with complete response (CR) after 6 cycles chemotherapy and the NHL without CR or recrudescence in 3 months after 6 cycles chemotherapy, the research is endeavored to provide a theoretical foundation for the serological index in screening, establishing the clinical therapeutic effect monitoring and prognosis evaluation of NHL. **Methods** The research applied SELDI-TOF MS and IMAC-Cu chip to detection the differentially expressed serum proteins of the health adults, the NHL patients with CR after six cycles chemotherapy and the NHL patients with no remission or recrudescence in three months after six cycles chemotherapy who are 35 cases respectively, and to constitute the decision tree classification model. **Results** (1) Between the health adults and the NHL with CR after 6 cycles chemotherapy, six kinds of differentially expressed proteins were found to have the categorizing significance, whose M/Z are M8 778.14 u, M8 887.83 u, M8 529.39 u, M9 076.76 u, M9 242.75 u, M5 848.92 u respectively, and the protein with the M/Z M5 848.92 u was selected by the software system to establish the decision tree classification model with the sensitivity of 88.57 % and the specificity of 100 %. (2) Between the health adults and the NHL without CR or recrudescence in 3 months after 6 cycles chemotherapy, six kinds of differentially expressed proteins were found to have the categorizing significance, whose M/Z are M8 890.26 u, M5 853.70 u, M5 444.38 u, M8 784.58 u, M6 354.26 u, M8 539.28 u respectively, and the protein with the M/Z M5 444.38 u was selected by the software system to establish the decision tree classification model with the sensitivity of 85.71 %, and the specificity of 100 %. (3) Between the NHL with CR after 6 cycles chemotherapy and the NHL without CR or recrudescence in 3 months after 6 cycles chemotherapy, six kinds of differentially expressed proteins were found to have the categorizing significance, whose M/Z are M6 436.04 u, M5 509.43 u, M6 633.93 u, M14 047.6 u, M7 769.91 u, M6 009.63 u respectively, and the protein with the M/Z M6 436.04 u was selected by the software system to establish the decision tree classification model with the sensitivity of 77.14 %, and the specificity of 100 %. **Conclusion** These 18 differentially expressed proteins which hold categorizing significance might potentially be a group of biomarkers for monitoring clinical effect and directing clinical treatment of NHL.

Key words: Non-Hodgkin's Lymphoma; SELDI-TOF MS; Proteomics; Differentially Expressed Proteins

摘 要: **目的** 分析正常组、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 化疗 6 周期后完全缓解 (CR) 及 NHL 化疗 6 周期后未完全缓解或缓解后 3 月内复发患者的血清差异表达蛋白质, 为筛选和建立 NHL 临床疗效监测及预后评估的血清学指标提供理论依据。 **方法** 采用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF MS) 技术, 应用铜离子结合芯片 (IMAC-Cu) 以及配套软件, 对 35 例正常组, 35 例 NHL 化疗 6 周期后 CR 患者组, 35 例 NHL 化疗 6 周期后未完全缓解或缓解后 3 月内复发患者组的血清差异表达蛋白质进行检测分析, 构建决策树分类模型。 **结果** (1) 正常组和 NHL 化疗 6 周期后 CR 患者组共有 6 种差异

表达蛋白质有分类意义, 质荷比分别为 M8 778.14 u、M8 887.83 u、M8 529.39 u、M9 076.76 u、M9 242.75 u、M5 848.92 u, M/Z 为 M5 848.2 u 的一种蛋白质被软件系统选取建立决策树分类模型, 灵敏度

收稿日期: 2008-03-19; 修回日期: 2008-06-27
基金项目: 郑州市科技攻关资助项目 (04BA60AB YD07)、
河南省卫生厅科技攻关资助项目 (200703041)
作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院肿瘤内科
作者简介: 张明智 (1959-), 男, 博士, 教授, 主要从事恶性肿瘤淋巴瘤的基础和临床研究

和特异性分别为 88.57 % 和 100 %; (2) 正常组和 NHL 化疗 6 周期后未 CR 或缓解后 3 月内复发患者组共有 6 种差异表达蛋白质有分类意义, 质荷比分别为 M8 890.26 u、M5 853.70 u、M5 444.38 u、M8 784.58 u、M6 354.26 u、M8 539.28 u, 其中 M/Z 为 M5 444.38 u 的一种蛋白质被软件系统选取建立决策树分类模型, 灵敏度和特异性分别为 85.71 % 和 100 %; (3) NHL 化疗 6 周期后 CR 患者和 NHL 化疗 6 周期后未 CR 或缓解后 3 月内复发患者组共有 6 种差异表达蛋白质有分类意义, 质荷比分别为 M6 436.04 u、M5 509.43 u、M6 633.93 u、M14 047.6 u、M7 769.91 u、M6 009.63 u, 其中 M/Z 为 M6 436.04 u 的一种蛋白质被软件系统选取建立决策树分类模型, 灵敏度和特异性分别为 77.14 % 和 100 %。结论 有分类意义的 18 种差异表达蛋白质有可能成为 NHL 临床疗效监测及指导临床治疗的一组分子学指标。

关键词: 非霍奇金淋巴瘤; SELDI-TOF MS; 蛋白质组学; 差异表达蛋白质

中图分类号: R733 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2008)09-0639-04

0 引言

血清蛋白质质谱分析技术有助于筛选病变相关的差异表达蛋白质。近年来对于恶性淋巴瘤分子生物学指标的研究较多, 但能够用于临床的较少, 其主要原因是敏感性和特异性较低, 并且恶性淋巴瘤的发生是多因素所致, 因此难以用某一种生物学指标来评价。表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术 (SELDI-TOF MS) 是一种新的可高通量检测蛋白质的技术, 其芯片表面可结合特异的蛋白质, 对肿瘤标志物进行定量检测^[1], 目前已广泛应用于临床肿瘤的研究, 如乳腺癌^[2]、前列腺癌^[3]、消化系统恶性肿瘤^[4] 以及卵巢癌^[5] 等。本实验采用该技术对 NHL 化疗 6 周期后完全缓解组, NHL 化疗 6 周期后未完全缓解或缓解后 3 月内复发患者组及正常组血清中的差异表达蛋白质进行了分析, 以寻找与 NHL 疗效相关的差异表达蛋白质。

1 资料与方法

1.1 标本采集 2006 年 8 月 ~ 2007 年 4 月取自郑州大学第一附属医院; 郑州大学第二附属医院; 河南省肿瘤医院; 中位年龄 46 岁 (15 ~ 72 岁)。所有检查对象均排除急性感染、过敏、自身免疫性疾病等影响血清蛋白质表达的疾病, 所有标本均按 2001 年 WHO 分类标准确定病理组织学类型为中、高度侵袭性 (弥漫大 B 29 例、套细胞 21 例、NK/T 8 例、外周 T 细胞 7 例、间变大 B 细胞 5 例)。实验标本为空腹取静脉血 5 ml 放至离心管中, 室温下静置 30 min, 离心 20 min (2 000 r/min) 取上清, 每管 100 μ l 分装, 液氮保存。

1.2 蛋白质检测

1.2.1 试剂和仪器

尿素、乙腈、三氟乙酸、饱和白芥子酸、3-环乙胺-1-丙磺酸、Tris-HCl 等均购自 Sigma 公司, SELDI-TOF MS 仪、铜离子结合 (IMAC3-Cu) 芯片及配套的 ProteinChip Biology System (PBS+) 软件购于美国 Ciphergen Biosystems 公司。

1.2.2 标本的准备

血清样本的处理自 -80 °C 冰箱内取出样本, 冰盒上溶解, 取 50 μ l 到离心管中, 4 °C 离心 5 min (10 000 r/min); 取 10 μ l 血清加 20 μ l U9 缓冲液稀释混匀 4 °C 振荡 30 min, 取上清液 10 μ l 加 110 μ l 结合缓冲液 (50 mmol/L NaAC, pH 3.5) 稀释振荡混匀 5 min 加样备用。

1.2.3 IMAC3-Cu 芯片的预处理

将 IMAC3-Cu 芯片置于操作平台, 每孔加 50 μ l 100 mmol/L 硫酸铜, 振荡 5 min, 倒去硫酸铜, 去离子水冲洗 5 次, 甩干; 每孔中加入 50 μ l 的 100 mmol/L 醋酸钠 (pH 4.0) 使之中和, 振荡 5 min, 去离子水冲洗 5 次, 甩干; 每孔加入结合缓冲液 150 μ l (pH 7.0) 使之平衡, 振荡器振荡 5 min 后除去缓冲液, 重复 1 次。

1.2.4 蛋白质结合反应

在处理好的芯片中每孔加入 50 μ l 处理好的样品, 4 °C 振荡 60 min; 每孔加入 150 μ l 结合缓冲液, 振荡 5 min, 弃去缓冲液, 重复 1 次; 每孔分 2 次加入能量吸收分子饱和溶液, 每次 0.5 μ l, 2 次之间允许各孔风干。干燥待测。

1.2.5 数据收集和初步处理设定

SELDI-TOF MS 激光强度为 170, 敏感度为 6, 优化分子量范围为 2 000 ~ 16 000 u, 每个样本平均收集 65 个点的信息。样本芯片阅读检测前, 采用已知分子量的标准蛋白质芯片校正质谱仪, 使分子量检测误差 < 0.1 %, 再以质控蛋白芯片做重复性检测, 其峰值大小及峰强度的变异系数分别控制在 0.05 % 和 15 % 以下。在 Ciphergen Protein Chip 3.1 软件支持下自动收集信息并绘出相应蛋白质的质谱图。

1.2.6 生物信息学处理

本研究采用 Biomarker Pattern Ys Software (BPS, Ciphergen Biosystems, Inc) 建立决策树分类模型 (classification model for decision tree)^[6-7], 即将初步筛选出的不同 M/Z 的蛋白质质谱信息资料输入 BPS 软件系统, 软件读取及分析后, 找出具有分类意义的蛋白质, 建立最大决策树分类模型及源于该模型的修剪后的小的分类模型, 再以 BPS 软件推荐的方法对这些分类模型进行验证和测试, 最终得到对疾病有高度灵敏

度和特异性的最佳分类模型。

2 结果

2.1 血清蛋白质质谱图

正常组和 NHL 化疗6周期后完全缓解患者组共有48种蛋白质被标记,38种蛋白质质谱峰的相对强度在两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中在 NHL 化疗6周期后完全缓解患者人群中升高的有35种,降低的3种。有分类意义的差异表达蛋白质有6种,它们的质荷比分别为M8 778.14 u、M8 887.83 u、M8 529.39 u、M9 076.76 u、M9 242.75 u、M5 848.92 u,其中6种明显升高,无明显降低。正常组和 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者组共有46种蛋白质被标记,33种蛋白质质谱峰相对强度在两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中在 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者人群中升高的有29种,降低的有4种。有分类意义的差异表达蛋白质有6种,它们的质荷比分别为M8 890.26 u、M5 853.70 u、M5 444.38 u、M8 784.58 u、M6 354.26 u、M8 539.28 u,其中6种明显升高,无明显降低的。NHL 化疗6周期后完全缓解患者和 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者组共有39种蛋白质被标记,16种蛋白质质谱峰相对强度在两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中在 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者人群中降低的有16种,无升高。有分类意义的差异表达蛋白质有6种,它们的质荷比分别为M6 436.04 u、M5 509.43 u、M6 633.93 u、M14 047.6 u、M7 769.91 u、M6 009.63 u,其中6种明显降低,无明显升高的。

2.2 决策树分类模型的建立

采用BPS软件对来源于Biomarker Wizard的数据进行生物信息学处理,正常组和 NHL 化疗6周期后完全缓解患者组 M/Z 为 M 5 848.92 u 的一种蛋白质,正常组和 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者组则有 M/Z 为 M5 444.38 u 的一种蛋白质,NHL 化疗6周期后完全缓解患者和 NHL 化疗6周期后未完全缓解或缓解后3月内复发患者组 M/Z 为 M6 436.04 u 的一种蛋白质,分别被软件系统选取建立的决策树分类模型与其他模型相比交叉验证的相对错误率最低,为最优分类模型。三组人群中表达的质谱图及模拟胶图,见图1~3,3种蛋白质的决策树分类模式图,见图4~6。三组的灵敏度分别为88.57%(31/35)、85.71%(30/35)和77.14%(27/35),特异性均为100%(35/35)。

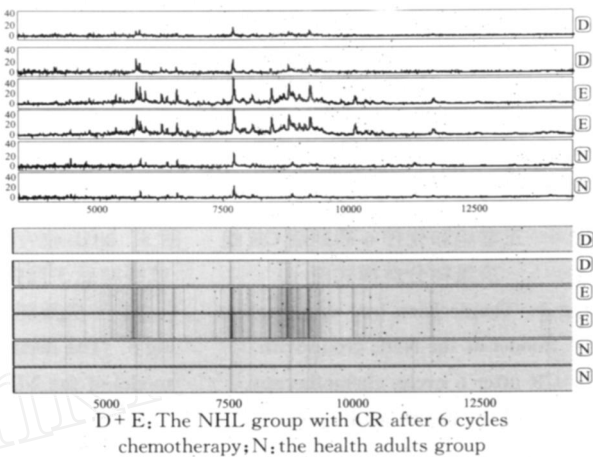


图1 N和D+E组之间M5 848.92的血清蛋白表达的质谱图及模拟胶图

Fig 1 The mass spectra and simulating gel maps of serum protein of M5 848.92 between N and D+E

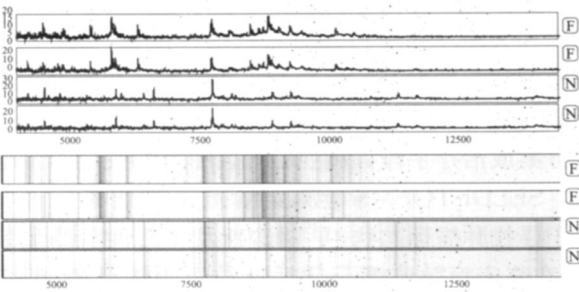


图2 N和F组之间M5 444.38 u的血清蛋白表达的质谱图及模拟胶图

Fig 2 The mass spectra and simulating gel maps of serum protein of M5 444.38 u between N and F

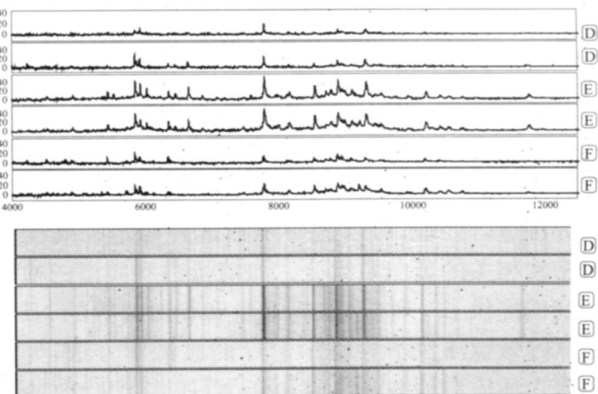


图3 D+E和F组之间M7 769.91 u的血清蛋白表达的质谱图及模拟胶图

Fig 3 The mass spectra and simulating gel maps of serum protein of M7 769.91 u between F and D+E

3 讨论

复发或难治性 NHL 患者一直是困扰临床肿瘤医生的一大难题。如果能在患者接受治疗前的发病初期预测出同一亚类或亚型的NHL患者的疗效好

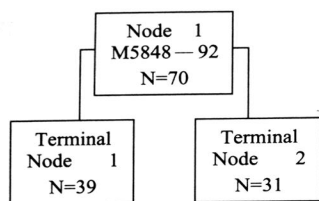


图 4 正常组和化疗 6 周期后 CR 组
决策树分类模式图

Fig 4 The decision tree classification
model of the NHL group with
CR after 6 cycles chemotherapy
and the health adults group

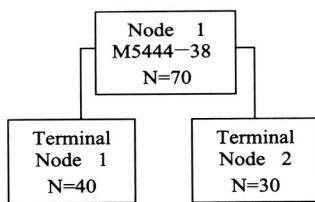


图 5 NHL 化疗 6 周期后未完全缓解
或缓解后 3 月内复发患者和正常组
决策树分类模式图

Fig 5 The decision tree classification
model of the NHL group without CR
or recurrence in three months
after 6 cycles chemotherapy
and the health adults group

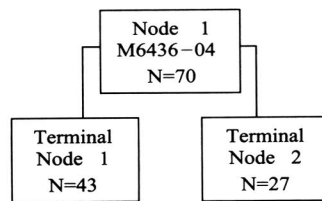


图 6 NHL 化疗 6 周期后完全缓解患者
和 NHL 化疗 6 周期后未完全缓解或缓解后
3 月内复发患者组决策树分类模式图

Fig 6 The decision tree classification
model of the NHL group with CR and
the NHL group without CR or recurrence
in three months after 6 cycles chemotherapy

或差,从治疗初期就给予个体化治疗,疗效好的患者给予常规治疗方案,疗效差的患者根据患者的具体情况加大治疗强度和(或)延长治疗周期,或采用特异性的和非特异性的生物免疫干预治疗以预防原发或继发耐药;这样就可以采用适合每个人的最佳治疗方案或治疗手段,以达到最佳治疗效果。

SELDI-TOFMS 检测血清蛋白质质谱目前常用于寻找肿瘤标志物、早期诊断及良恶性疾病鉴别等,在临床疗效监测及预后评估上报道尚不多见。Chong 等^[8]研究提示乳腺癌与癌前细胞系的蛋白质组有一定的差异。Petricoin 等^[9]应用 SELDI 技术找到了血清中能鉴别卵巢良恶性病变的特征性的恶性蛋白质组合,并用于卵巢癌的早期诊断。SELDI 作为基础蛋白质组学方法已被成功应用于发现前列腺癌^[3]、结肠癌^[4]、胰腺癌及肝癌等恶性肿瘤生物学标记物的研究^[10-11]。

在 SELDI-TOF MS 检测的患者血清中,蛋白质表达反映的是病灶及机体病理状态下代谢功能变化所致的血清蛋白质的复杂变化。依靠生物信息学的方法进行处理,可以进一步筛选并确定与病变本身密切相关的蛋白质组合。血清蛋白质质谱的检测为我们提供了一种快速、高通量和相对特异的 NHL 临床疗效监测及指导临床治疗的血清学方法,为血清蛋白质质谱检测最终应用于 NHL 临床疗效监测及预后评估提供了良好的技术平台。

我们应用 SELDI-TOF MS 技术对正常组、NHL 化疗 6 周期后完全缓解患者和 NHL 化疗 6 周期后未完全缓解或缓解后 3 月内复发患者血清中的蛋白质进行对比分析发现他们均有 6 种差异表达蛋白质有分类意义。说明利用 SELDI-TOF MS 技术筛选出的具有分类意义的 18 种差异表达蛋白质,有可能成为 NHL 临床疗效监测及预后评估的一组分子生物学指标。本研究因样本数有限,尚需进一

步扩大样本量、完善生存资料进一步验证以确保灵敏度和特异性的可信度。

参考文献:

- [1] 孙振昌,张明智,吴广银,等. 蛋白质芯片质谱仪及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中原医刊,2006,33(7):60-61.
- [2] Leong S, Christopherson RI, Baxter RC. Profiling of apoptotic changes in human breast cancer cells using SELDI TOF mass spectrometry[J]. Cell Physiol Biochem, 2007, 20(5):579-590.
- [3] Gross M, Top I, Laux I, et al. Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7):1979-1986.
- [4] Chen CD, Wang CS, Huang YH, et al. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance[J]. Proteomics, 2007, 7(1):155-167.
- [5] Kong F, Nicole WC, Xiao X, et al. Using proteomic approaches to identify new biomarkers for detection and monitoring of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(2):247.
- [6] Seiberta V, Wiesner A, Buschmann T, et al. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) and ProteinChip technology in proteomics research[J]. Pathol Res Pract, 2004, 200(2):83-94.
- [7] Breimann LJ, Friedmann RO, Sone C. Classification and regression trees[M]. 1st Edition. New York:Chapman & Hall (Wadsworth, Inc), 1984:87-90.
- [8] Chong BE, Hamler RL, Lubman DM, et al. Differential screening and mass mapping of proteins from premalignant and cancer cell lines using nonporous reversed-phase HPLC coupled with mass spectrometric analysis[J]. Anal Chem, 2001, 73(6):1219-1227.
- [9] 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.
- [10] Sun ZL, Zhu Y, Wang FQ, et al. Serum proteomic-based analysis of pancreatic carcinoma for the identification of potential cancer biomarkers[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1774(6):764-771.
- [11] Cui J, Kang X, Dai Z, et al. Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(11):825-834.

[编辑:周永红;校对:杨卉]