

2 型糖尿病肾病血清蛋白质谱图人工神经网络诊断模型研究

黄 波(四川省内江市第一人民医院检验科 641000)

【摘要】 目的 通过比较 2 型糖尿病肾病和对照人群血清蛋白指纹图谱的差异,建立 2 型糖尿病肾病诊断模型,并探讨其在该病诊断中的应用价值。**方法** 采用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测 51 例 2 型糖尿病肾病患者的和 66 例对照人群血清,获得蛋白指纹图谱。结合人工神经网络软件建立诊断模型并进行验证。**结果** 在相对分子质量 2 000~30 000 共检测到 175 个蛋白峰,其中有 17 个明显表达差异的蛋白峰($P < 0.01$)。筛选其中质荷比(m/z)分别为 5 420、5 782、6 472、6 666、10 277 和 11 770 的 6 个蛋白峰作为标志蛋白建立人工神经网络诊断模型。利用该模型对 2 型糖尿病肾病进行盲法预测,结果表明其对该病的诊断灵敏性和特异性分别为 81.0% 和 96.2%。**结论** 利用 SELDI-TOF-MS 和生物信息学技术建立了敏感性和特异性均较高的 2 型糖尿病肾病诊断模型,为该病诊断提供了新途径。

【关键词】 蛋白指纹图谱; 糖尿病肾病; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.13.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)13-1686-02

Serum protein profiling study on type 2 diabetic nephropathy with artificial neural network diagnosis model HUANG Bo (Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China)

【Abstract】 Objective To compare the serum protein fingerprint difference between type 2 diabetic nephropathy and controls, establish diagnostic model and explore the application of it in diagnosis of type 2 diabetic nephropathy. **Methods** Surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technology was used to analyze serum including 51 cases of type 2 diabetic nephropathy patients and 66 cases of controls. Diagnostic model was developed, and validated using artificial neural network software. **Results** 175 protein peaks were detected at the molecular weight range of 2 000 to 30 000, among which 17 ones were significantly difference between type 2 diabetic nephropathy and controls ($P < 0.01$). Among them, 6 proteins mass-to-charge ratio (m/z) at 5 420, 5 782, 6 472, 6 666, 10 277 and 11 770 were chosen to develop artificial neural network diagnostic model. The model was blindly tested with the testing set for diagnosing type 2 diabetic nephropathy. The sensitivity and specificity was 81.0% and 96.2%, respectively. **Conclusion** Diagnostic model with high sensitivity and specificity based on SELDI-TOF-MS and bioinformatics technology is a new approach for the clinical diagnosis of patients with type 2 diabetic nephropathy.

【Key words】 protein fingerprinting; diabetic nephropathy; diagnosis

糖尿病肾病(DN)发病率高,预后差,但如果在早期出现微量清蛋白尿时即进行干预治疗,可防止向大量蛋白尿发展或延缓其发展速度,甚至可以逆转,故早期诊断非常重要^[1]。寻找糖尿病肾病相关分子标志物,早期诊断和预测糖尿病肾病,是目前研究的重要方向。现有的研究表明表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术可用于很多疾病的早期诊断,如肿瘤、神经性疾病、感染性疾病和自身免疫性疾病^[2-6]。本研究应用 SELDI-TOF-MS 技术对 2 型糖尿病肾病患者和对照人群血清标本进行分析,并建立区分二者的诊断模型,以探讨其在该病诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为本院住院患者和体检人群,糖尿病诊断采用 1999 年 WHO 标准^[7],其中 2 型糖尿病肾病患者(T2DN)51 例;2 型糖尿病不伴肾病患者(T2DM)23 例;其他肾病患者 15 例(包括:高血压肾病 9 例、紫癜性肾病 2 例、IgA 肾病 2 例、狼疮性肾病 2 例);28 例健康体检者为健康对照。所有受试者血肾功和肝功检查均正常。随机抽取 30 例 2 型糖尿病肾病患者和 40 例对照(包括:10 例 2 型糖尿病不伴肾病患者、10 例其他肾病患者、20 例健康体检者)组成训练集;21 例 2 型糖尿病肾病患者和 26 例对照(包括:13 例 2 型糖尿病不伴肾病患者、5 例其他肾病患者、8 例健康体检者)组成测试集。详细临床资料和分组信息见表 1。

表 1 117 例研究对象临床资料和分组信息

分组	n	男/女	年龄(岁)	中位年龄(岁)	训练集	测试集
T2DN 组	51	27/24	46~82	63	30	21
T2DM 组	23	13/10	42~85	65	10	13
其他肾病组	15	8/7	34~86	57	10	5
健康对照组	28	15/13	44~72	60	20	8

1.2 主要试剂与仪器 乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)、NaAc(50 mmol/L, pH 4.0)、HPLC H₂O 等均购自 Sigma(美国)公司。PBS II/C 型蛋白指纹图谱仪、CM10(弱阳离子交换)蛋白芯片、能量吸收分子 SPA(含饱和芥子酸溶于 50% ACN 和 0.5% TFA)由美国 CIPHERGEN 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 标本收集与处理 全部血清标本均在清晨空腹抽取,4℃ 4 000 r/min,离心 10 min,取上清液分装-80℃ 冰箱保存,避免反复冻融。

1.3.2 制备样品混合液 -80℃ 冰箱取出标本,冰浴解冻。所有标本均用 NaAc(50 mmol/L, pH 4.0)1:5 稀释。

1.3.3 上样及洗脱 将 CM10 芯片装入芯片处理器中,每孔加入 150 μL NaAc(50 mmol/L, pH 4.0)缓冲液,室温振荡洗涤 2 次,每次 5 min。甩去缓冲液,拍干。每孔分别加入 80 μL 稀

释标本, 4 ℃ 600 r/min 振荡孵育 1 h。甩去样品, 拍干。每孔用 150 μL NaAc(50 mmol/L, pH4.0) 缓冲液室温振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。甩掉缓冲液, 拍干。每孔加入 150 μL HPLC H₂O, 洗涤 2 次, 快速倾去, 拍干。取出芯片, 室温放置 20 min, 晾干。每孔加 1 μL SPA, 5 min 后再加 1 μL, 自然干燥后上机检测。

1.3.4 芯片检测及采集数据 利用 PBSII/C 型蛋白指纹图谱仪检测结合在 CM10 芯片表面的血清蛋白, 设定最高检测相对分子质量为 50 × 10³, 优化范围为 2 000 ~ 30 000, 激光强度 190, 检测敏感度为 8。考虑到基质峰的存在, 将 2 × 10³ 以下的峰滤去。每条芯片上均有一孔采用多个混合血清作为内参照, 结果表明芯片间的变异系数不大于 10%。仪器每次实验用 CIPHERGEN 公司提供的 All-in-one 多肽标准分子进行校正, 系统的质量偏差小于或等于 0.1%。采用 CIPHERGEN Proteinehip 软件自动采集实验数据。

1.3.5 建立诊断模型 采用基于误差反传原理的多层前馈神经网络, 其输入层、隐含层 1、隐含层 2、输出层的节点分别设置为 6、5、5、1。以筛选的差异蛋白峰强度作为输入节点, 设定训练集 2 型糖尿病肾病患者的目标输出值为 1, 对照的目标输出值为 0, 训练次数为 1 000, 学习率为 0.01, 采用反向传播算法, 建立并存储人工神经网络诊断模型。

1.3.6 盲法验证 将测试集 2 型糖尿病肾病和对照血清蛋白标志质谱数据输入模型并进行模拟仿真计算, 设定 cut-off 值为 0.5。当输出值在 0.5 ~ 1 时, 归为 2 型糖尿病肾病; 当输出值在 0 ~ 0.5 时, 归为对照。对模拟计算的结果进行方法学评价。

1.4 统计学处理 数据结果采用 SPSS13.0 进行统计分析, 计数方法采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 型糖尿病肾病患者和健康对照组血清差异表达蛋白血清标本经蛋白指纹图谱标准化后, 在相对分子量 2 000 ~ 30 000 范围内共检测到 175 个蛋白峰, 其中 17 个蛋白峰在两组间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。选择其中 m/z 为 5 420、5 782、6 472、6 666、10 277 和 11 770 的 6 个蛋白峰 ($P < 0.01$) 作为候选蛋白标志物, 见表 2。

2.2 建立人工神经网络模型 将具有明显表达差异的 6 个蛋白峰作为区分 2 型糖尿病肾病的候选标志蛋白分别组合, 利用训练集样本建立人工神经网络诊断模型并进行模拟训练。结果显示, 以 m/z 为 5 420、5 782、6 472、6 666、10 277 和 11 770 的 6 个蛋白峰作为输入节点建立的模型, 在多次训练后其仿真计算的效能最高, 能正确区分开训练集中 2 型糖尿病肾病患者和健康对照者。

表 2 两组 6 个候选蛋白峰值的比较

m/z	糖尿病肾病	健康对照组
5 420	1.68 ± 1.12 ^a	5.13 ± 2.78
5 782	11.07 ± 9.28 ^a	3.32 ± 1.64
6 472	7.16 ± 4.58 ^a	2.05 ± 1.13
6 666	22.34 ± 15.22 ^a	7.87 ± 4.46
10 277	8.26 ± 5.95 ^a	12.81 ± 6.71
11 770	14.49 ± 10.58 ^a	7.11 ± 6.15

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

2.3 诊断模型盲法验证结果 利用建立的模型对测试中的样本进行盲法测试, 结果显示: 21 例 2 型糖尿病肾病中有 4 例判错; 26 例对照中有 1 例判错。方法学评价结果表明, 该诊断模型检测 2 型糖尿病肾病的灵敏性为 81.0%, 特异性为 96.2%。

3 讨论

糖尿病肾病起病隐匿, 早期无明显的临床表现。肾活检是早期诊断最可靠的方法, 然而, 很多患者不愿意接受这种具有创伤性的检查, 很多接受检查的患者肾脏组织病理活检并不能找到特征性的病理改变^[8]。目前被广泛认可的早期实验室诊断标准是持续性微量清蛋白尿, 但 2 型糖尿病患者大年龄较大, 常伴有高血压、冠心病等, 微量清蛋白尿也可由这些并发症引起^[9]。目前也有研究表明尿转铁蛋白、铜蓝蛋白以及血清胱抑素 C 等指标在诊断早期糖尿病肾病中具有较高的敏感性和特异性, 但在该病早期并不是单一指标就能明确诊断^[10-11]。因此糖尿病肾病的早期诊断迫切需要寻找新的生物标志物。

SELDI-TOF-MS 具有操作简单, 样品用量少和高通量等特点, 可直接对原始生物样品进行分析, 特别适合于相对分子质量低、低丰度蛋白质的捕获, 目前已广泛用于人类重大疾病包括糖尿病肾病生物标志物的研究。Otu 等^[12]报道利用尿液蛋白质谱可以预测正常清蛋白尿的 2 型糖尿病患者 10 年后是否发展为肾病。研究提示有 12 个蛋白峰有预测作用, 敏感性和特异性可达到 71% 和 76%。Dihazi 等^[13]发现质荷比为 6 188 的蛋白峰在糖尿病肾病患者显著降低, 质荷比为 11 774 和 14 766 的蛋白峰在糖尿病肾病患者显著升高。

采用 SELDI-TOF-MS 技术结合人工神经网络生物信息学分析方法, 检测 51 例 2 型糖尿病肾病患者、23 例 2 型糖尿病不伴肾病患者、15 例其他肾病患者和 28 名健康体检人群血清, 获得 CM10 蛋白芯片指纹图谱, 建立了较为满意的 2 型糖尿病肾病诊断模型。该模型对 2 型糖尿病肾病盲法验证结果敏感性为 81.0%, 特异性为 96.2%。研究结果显示, 相对分子质量 m/z 为 5 420、5 782、6 472、6 666、10 277 和 11 770 的蛋白是诊断 2 型糖尿病肾病的最佳标志物, 6 个蛋白组合建立的模型能很好的诊断 2 型糖尿病肾病患者, 这为 2 型糖尿病肾病的诊断提供了一条崭新的途径和方法。由于糖尿病肾病是一个多因素的复杂疾病, 发现和鉴定该病相关的标志物不仅可以促进在分子层面上对该病发病机制、疾病过程的理解, 而且多标志物联合诊断模式的建立对于诊断这种复杂疾病也更可靠。目前这些多标志物联合诊断模式的建立都是基于一些神经网络软件实现, 因此, 应用于临床之前还需要大量的临床验证来证实其实可靠性。由于患者的标本收集较为困难, 本研究病例数有限, 发现的 6 个诊断标志物需要扩大标本量来做进一步验证, 以确定其临床实用价值。对于 SELDI-TOF-MS 技术而言, 每个 m/z 值对应很多相对分子质量相近的蛋白质片段, 因此不能直接对所测蛋白质进行鉴定, 将进一步纯化及鉴定筛选出的 m/z 为 5 420、5 782、6 472、6 666、10 277 和 11 770 的 6 种蛋白质以确定其性质和序列。

SELDI-TOF-MS 技术在蛋白质水平研究对疾病的诊疗、防治有着广泛的应用前景^[14]。各种疾病都有蛋白质指纹图谱的动态变化, 疾病发生的不同阶段, 相关症状出现之前, 蛋白质水平可能已经发生了变化。因此, 应用此技术可以提供大量、完善、动态的蛋白质指纹图谱, 在各种疾病的诊断和疗效监测方面发挥一定的辅助作用, 随着技术的不断改进和操作规程的标准化, 这一技术有望最终用于临床, 在人类战胜恶性疾病中发挥重要作用。

参考文献

[1] Susztak K, Böttinger EP. Diabetic nephropathy: a frontier for personalized medicine[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17 (2): 361-367.

除。如患者深部结构受侵可行肿瘤内切除或联合内外减压术,并辅助放射治疗或化疗。本组 65 例患者术后均给予常规放射治疗,其中 58 例无异常反应,7 例患者出现轻度脑水肿,3 例患者出现严重脑水肿而终止放射治疗。

手术治疗过程中必须对患者颅内高压症状予以纠正。如患者肿瘤累及脑部重要功能区,应避免功能区自皮下行肿瘤切除。小脑幕小肿瘤在切除的同时应尽量一并解决患者梗阻性脑积水,如手术操作困难,则于术后进行分流手术缓解患者颅内压增高症状^[11]。在实施显微外科手术的过程中应注意以下几个问题:(1)如患者肿瘤体积过大,骨瓣设计则不宜过小。(2)显微镜下开放脑池过程中,缓慢释放脑脊液,以降低颅内压。(3)显微镜下仔细分离与肿瘤粘连的颅内血管,为预防血管痉挛,术中可采用浸有罂粟碱的棉片予以湿敷,防止患者术后出现脑梗死。(4)术中一般肿瘤外侧边界清晰,易于分辨,内侧边界位置较深,需要在显微镜下仔细分辨。(5)如患者肿瘤组织累及岛叶或继发性癫痫频繁发作,应切除岛叶和岛盖周围皮质以更好地控制癫痫症状的发生^[12]。本组 65 例行显微外科手术治疗低级别胶质瘤患者,手术均顺利进行,无死亡病例,全切除率为 46.2%,临床疗效满意,表明对颅内低级别胶质瘤采取显微外科手术能够在最大限度切除肿瘤组织的基础上,为患者进一步治疗获取时机,是低级别胶质瘤首选的治疗方法。

参考文献

[1] 任晓辉,林松,王忠诚.低级别胶质肿瘤的 1p/19q 缺失研究[J].中国神经肿瘤杂志,2009,7(3):171-174.
 [2] Signorelli F, Guyotat J, Elisevich K, et al. Review of current microsurgical management of insular gliomas[J]. Acta Neurochir(Wien), 2010, 152(1):19-26.
 [3] 舒凯,肖群根,蒋伟,等.以癫痫起病岛叶低级别胶质瘤的

显微外科治疗[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,06(9):162-163.

[4] Sanai N, Polley MY, Berger MS. Insular glioma resection: assessment of patient morbidity, survival, and tumor progression[J]. J Neurosurg, 2010, 112(1):1-9.
 [5] von Lehe M, Wellmer J, Urbach H, et al. Insular lesionectomy for refractory epilepsy: management and outcome[J]. Brain, 2009, 132(Pt 4):1048-1056.
 [6] Nguyen DK, Nguyen DB, Malak R, et al. Revisiting the role of the insula in refractory partial epilepsy[J]. Epilepsia, 2009, 50(3):510-520.
 [7] 江涛,刘福生.脑胶质瘤[M].北京:人民卫生出版社,2007.
 [8] 桑林,马延山,游赣,等.合并癫痫的低级别胶质瘤手术治疗效果分析[J].中国全科医学,2012,15(3):313-315.
 [9] 张冬,邹利光,文利,等.MRI 弥散加权成像对胶质瘤分级的临床价值[J].重庆医学,2008,37(14):1557-1558.
 [10] Schulner M, Carmel PW. Intraoperative magnetic resonance imaging: impact on brain tumor surgery[J]. Cancer Control, 2003, 10(2):115-124.
 [11] 冯建文,邹洁冰,张中英.开放性颅脑损伤早期应用高压氧预防晚期癫痫疗效观察[J].河北医药,2008,30(9):1359.
 [12] 朱侗明,章文斌,刘翔,等.成人低级别致痫性胶质瘤的手术治疗[J].中华神经外科疾病研究杂志,2010,9(6):539-541.

(收稿日期:2013-03-04 修回日期:2013-03-12)

(上接第 1687 页)

[2] Stranneheim H, Orre LM, Lehtiö J, et al. A comparison between protein profiles of B cell subpopulations and mantle cell lymphoma cells[J]. Proteome Sci, 2009, 23(7):43-47.
 [3] Araki Y, Yoshikawa K, Okamoto S, et al. Identification of novel biomarker candidates by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with moyamoya disease using SELDI-TOF-MS[J]. BMC Neurol, 2010, 10(10):112-117.
 [4] Gast MC, Zapatka M, van Tinteren H, et al. Postoperative serum proteomic profiles May predict recurrence-free survival in high-risk primary breast Cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(12):1773-1783.
 [5] Scott PA, Zeidan B, Ng LL, et al. Proteomic profiling to identify prognostic biomarkers in heart failure[J]. In Vivo, 2012, 26(6):875-882.
 [6] Colquhoun DR, Hartmann EM, Halden RU. Proteomic profiling of the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 40(2):86-90.
 [7] 叶任高,陆再英,内科学[M].北京:人民卫生出版社,2004:797-798.
 [8] Persson F, Rossing P. Renal disease by type 2 diabetes[J]. Ugeskr Laeger, 2012, 174(37):2150-2154.
 [9] Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, et al.

Effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes[J]. Ugeskr Laeger, 2001, 163(40):5519-5524.

[10] Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? [J]. Diabetes, 2000, 49(9):1399-1408.
 [11] Gross ML, Dikow R, Ritz E. Diabetic nephropathy: recent insights into the pathophysiology and the progression of diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2005(94):S50-S53.
 [12] Otu HH, Can H, Spentzos D, et al. Prediction of diabetic nephropathy using urine proteomic profiling 10 years prior to development of nephropathy [J]. Diabetes Care, 2007, 30(3):638-643.
 [13] Dihazi H, Müller GA, Lindner S, et al. Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients[J]. Clin Chem, 2007, 53(9):1636-1645.
 [14] Lau BF, Aminudin N, Abdullah N. Comparative SELDI-TOF-MS profiling of low-molecular-mass proteins from *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden grown under stirred and static conditions of liquid fermentation[J]. J Microbiol Methods, 2011, 87(1):56-63.

(收稿日期:2013-01-05 修回日期:2013-02-12)