

• 论 著 •

慢性肾小球肾炎唾液蛋白质组无创伤分子诊断模型的研究*

曹美群^{1,3}, 袁媛^{1#}, 孙珂焕^{1,3}, 黄飞娟¹, 陈嫚茵¹, 李仲秋^{1,3}, 吴正治^{1,2,3△}

(1. 深圳大学第一附属医院, 广东深圳 5180352; 2. 广东医学院附属福田医院, 广东深圳 518033;

3. 广东省深圳市老年医学研究所 518020)

摘要:目的 探讨液相色谱结合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术筛选慢性肾小球肾炎(CG N)患者的唾液蛋白质标记物并建立诊断模型,为 CG N 临床诊断提供依据。**方法** 采集 43 例 CG N 患者和 45 例健康体检者的唾液标本,采用液相色谱(WCX 磁珠)制备唾液样品,并结合 MALDI-TOF-MS 质谱仪对唾液标本进行蛋白质检测,筛选出 2 组间特异性表达差异蛋白,并结合生物信息学方法建立诊断模型。**结果** 比较 2 组唾液蛋白质指纹图谱数据,共获得 116 个差异有统计学意义的蛋白峰($P < 0.05$),选择质荷比(m/z)为 2 499.11、2 159.09、3 622.30 Da 的 3 个蛋白质峰用于构建最佳决策树模型,该诊断模型测试组总准确率为 85.23%(75/88),灵敏度为 83.72%(36/43),特异度为 86.67%(39/45)。**结论** 初步建立了 CG N 唾液蛋白质组诊断模型,为 CG N 的早期诊断提供了新的方法和途径。

关键词:肾小球肾炎; 分子诊断模型; 唾液; 蛋白质组; 无创伤诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)04-0455-04

Study on non-invasive molecular diagnostic model of saliva proteomics in patients with chronic glomerulonephritis*

CAO Meiqun^{1,3}, YUAN Yuan^{1#}, SUN Kehuan^{1,3}, HUANG Feijuan¹, CHEN Manyin¹, LI Zhongqiu^{1,3}, WU Zhengzhi^{1,2,3△}

(1. the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518035, China;

2. Futian Affiliated Hospital of Guangdong Medical Institute, Shenzhen, Guangdong 518033, China;

3. China Shenzhen Institute of Geriatrics, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To explore the specific biomarkers in saliva of Chronic Glomerulonephritis patients using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS(MALDI-TOF-MS) technique and to establish diagnostic model. **Methods** The saliva protein fingerprints of 43 Chronic Glomerulonephritis cases and 45 healthy controls were detected by weak cationic-exchange magnetic beads(MB-WCX) and then analyzed by MALDI-TOF-MS. Then the specifically expressed differential proteins in two groups were used to establish the diagnostic model combined with bioinformatic methods. **Results** The saliva protein fingerprint data of the two groups were compared and 116 discrepant protein peaks were found($P < 0.05$). The 3 peaks of m/z 2 499.11 Da, 2 159.09 Da and 3 622.30 Da were used to build the best decision tree model. The accuracy, sensitivity and specificity of the diagnostic model were 85.23%(75/88), 83.72%(36/43) and 86.67%(39/45) respectively. **Conclusion** Preliminary saliva proteome diagnosis model of chronic glomerulonephritis was set up providing new ways and means for the early diagnosis of chronic glomerulonephritis.

Key words: chronic glomerulonephritis; molecular diagnostic model; saliva; proteomics; non-invasive diagnosis

慢性肾小球肾炎(CG N)是临床常见病和多发病,以不同程度蛋白尿、血尿、水肿和高血压,以及可能肾功能不全为其基本临床表现,起病隐匿,病程迁延,患者可伴有不同程度的慢性肾功能减退,最终发展为慢性肾衰竭^[1]。患者年龄跨度较大,早期诊断对疾病的早期预防和治疗有重要意义。

唾液中含有 2 300 多种蛋白质,利用唾液进行疾病诊断具有无创、微量、易于收集和储存、操作简便快捷、易于被患者接受等明显优势^[2-3]。本研究应用液相色谱结合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)联合蛋白芯片技术检测慢性肾小球肾炎和健康者的唾液蛋白质指纹图谱,以筛选出慢性肾小球肾炎早期诊断的特异性唾液蛋白质标记物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月至 2015 年 2 月在深圳大学第一附属医院住院部肾内科初次住院经肾脏组织病理检查明确诊断为慢性肾小球肾炎的 43 例患者(患者组),诊断标准按《慢

性肾小球肾炎的疾病诊断标准》^[4],均经肾脏组织病理检查确诊。男 30 例,女 13 例;45 例健康对照组为该院体检科体检健康者,男 27 例,女 18 例。2 组研究对象的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 纳入及排除标准 纳入标准:符合慢性肾小球肾炎诊断标准,无并发症,无肾功能不全。自愿参加且能够配合的受试对象。排除标准:排除口腔局部及唾液腺的炎性、肿瘤及先天性疾病;排除舍格伦综合征、囊性纤维化病;排除其他系统严重并发症。

1.3 仪器与试剂 蛋白指纹图谱(液体芯片)试剂盒(WCX 磁珠、Wash Buffer、Elution Buffer、U9 裂解液)及 MALDI-TOF-MS(蛋白指纹图谱仪 I 型),均为湖州赛尔迪生物医药科技有限公司产品,试剂盒批号 K20150501; dH₂O(HPLC 级)、CHCA 为 Sigma 公司产品,唾液收集管(Salivette)由北京中创先锋科技有限责任公司提供。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273665);国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2014AA020900)。

作者简介:曹美群,女,副研究员,主要从事蛋白质组学研究。 # 共同第一作者。 △ 通信作者, E-mail: szwz001@163.com。

1.4 方法 (1)唾液样品的收集及处理:取材前 1 d 晚上嘱患者临睡前清水漱口 3 次(漱口后不再进行任何食物和药物),第 2 天清晨起床漱口后空腹取材,前 5 min 唾液自然吞下,然后将无菌唾液管棉球含于口里,约 10~20 min,再将棉球吐回 50 mL 经过预冷的具塞离心管内,每个标本采集唾液 2~3 mL,并置于冰上低温保存,2 h 内 3 000 r/min,4 ℃ 低温离心 10 min,取上清液分装后于一 80 ℃ 保存备用。实验时取出标本,常温解冻。(2)纳米磁珠活化、上样和洗脱:取 WCX 磁珠 50 μL 加入 200 μL-PCR Tube,在 PCR Tube 磁珠上孵育 1 min,去上清液,再加入 100 μL Wash Buffer,洗脱 5 min,并重复 1 次;每个标本取 5 μL 加 10 μL Lysis Buffer 混合孵育 30 min 后,加入 185 μL Wash Buffer 稀释。向含有活化磁珠的 PCR Tube 加入 100 μL 处理好的唾液样品,室温孵育 30 min,置于 PCR-Tube 磁珠上孵育 1min,去上清液,加入 100 μL Wash Buffer,洗脱 5 min,磁珠上孵育 1 min,去上清液,重复上述步骤 1 次;每个 PCR Tube 加入 10 μL Elution Buffer,洗脱 5 min,放置于 PCR-Tube 磁珠上孵育 1min,取 5 μL 上清液移至另一个 PCR Tube 中,加入 5 μL CHCA 饱和溶液混匀,取 2 μL 混合溶液加样到 Au 芯片上,风干后上机读取芯片,收集数据。

1.5 数据收集 设定检样激光强度为 190,灵敏度为 5,收集数据质荷比范围是 2 000~25 000 m/z,信号 40~60,平均每点收集 20 次,收集总点数为 100 次。实验前用 All-in-one 多肽标准芯片校正仪器,激光离子流为 0.5。

1.6 统计学处理 所有原始数据先用 Proteinchip Software 3.2.1 做总离子强度及相对分子质量校正,使其达到均一。对位于 2 000~250 000 M/Z 峰值,用 Biomarker Wizard3.0 软件过滤噪音。设置初始的噪音过滤值为 5,2 次信噪比为 2,以 10% 为最小阈值进行聚类,经上述数据预处理后,采用 *t* 检验比较 2 组唾液蛋白质质谱数据(由 Biomarker Wizard3.0 软件完成),找出 2 组之间表达差异有统计学意义的蛋白质峰。使用 Biomaker Pattern Software5.0.2 决策树算法计算出多个变量(m/z 蛋白质质谱峰)变化对 2 样本的分类价值,确定最佳的筛选模型,即诊断模型。

2 结 果

2.1 唾液蛋白质质谱分析 对所有标本检测质谱图进行分析比较,2 个组共得到蛋白质峰为 414 个,其中 116 个蛋白峰差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 44 个蛋白质峰在患者组表达下调,72 个蛋白质峰表达上调。见图 1、表 1。

表 1 2 组研究对象的唾液蛋白质峰强度比较($\bar{x} \pm s$)

M/Z	患者组	健康对照组	P	上调/下调
2116.181	14.36 ± 15.55	38.89 ± 39.32	0.000 4	下调
2159.097	14.45 ± 9.45	2.98 ± 3.82	0	上调
2343.382	4.29 ± 4.99	0.66 ± 3.56	0.000 1	上调
2499.112	8.96 ± 12.68	38.26 ± 27.14	0	下调
2611.123	4.54 ± 6.17	1.44 ± 2.27	0.002 7	上调
2708.746	7.13 ± 7.26	16.61 ± 16.49	0.006 3	下调
3230.187	3.99 ± 4.39	1.18 ± 3.00	0.001 4	上调
3494.737	8.76 ± 10.52	4.30 ± 3.24	0.019 2	上调
3515.642	5.60 ± 5.55	2.58 ± 3.18	0.001 5	上调
3622.302	6.93 ± 7.27	2.64 ± 2.97	0.000 5	上调

续表 1 2 组研究对象的唾液蛋白质峰强度比较($\bar{x} \pm s$)

M/Z	患者组	健康对照组	P	上调/下调
3776.999	7.69 ± 10.16	16.74 ± 14.79	0	下调
3931.962	4.73 ± 3.63	2.31 ± 2.08	0.000 2	上调
4027.486	6.69 ± 9.23	2.98 ± 2.07	0.006 8	上调
6601.776	1.50 ± 2.59	6.02 ± 3.53	0	下调
7101.905	0.57 ± 1.18	5.99 ± 5.13	0	下调

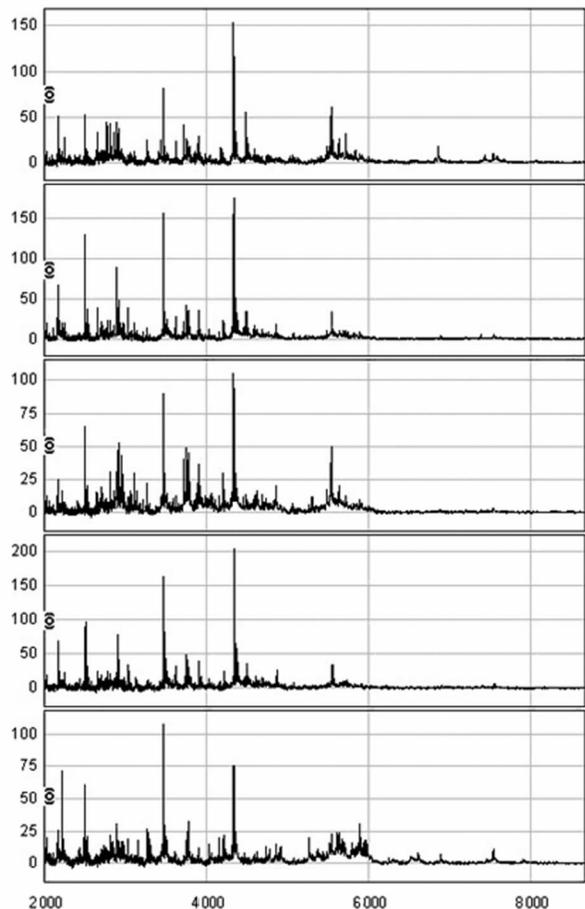


图 1 代表性蛋白指纹图谱

2.2 诊断模型建立 经 Biomarker Pattern Software 5.0.2 软件分析,从差异蛋白质峰中选出 m/z 为 2 499.11,2 159.09,3 622.30 Da 的 3 个蛋白质峰构建决策树分类诊断模型。其中 m/z 为 2 159.09 Da 和 3 622.30 Da 在患者组中表达量明显上调,2 499.11 Da 明显下调。当 2 499.11 m/z ≤ 17.227 且 2 159.09 m/z ≤ 5.616,3 622.30 m/z ≤ 9.212 或 2 499.11 m/z > 17.227 且 2 159.09 m/z ≤ 16.447 时,该模型诊断为 CGN,当 2 499.11 m/z ≤ 17.227 且 2 159.09 m/z > 5.616 或者 2 499.11 m/z ≤ 17.227 且 2 159.09 m/z ≤ 5.616、3 622.30 m/z > 9.212 或者 2 499.11 m/z > 17.227 且 2 159.09 m/z > 16.447 时,则判为正常。见图 2。

2.3 受试者工作特征(ROC)曲线 该模型分 5 个终结点,结果显示,43 例 CGN 患者有 36 例被准确判断为 CGN,45 例健康对照者有 39 例被准确检出为非慢性肾小球肾炎。该诊断模型的准确率为 85.23%(75/88),灵敏度为 83.72%(36/43),特异度为 86.67%(39/45),计算该模型的 ROC 曲线下面积为 0.985,提示该模型具有较好的诊断价值。见图 3。

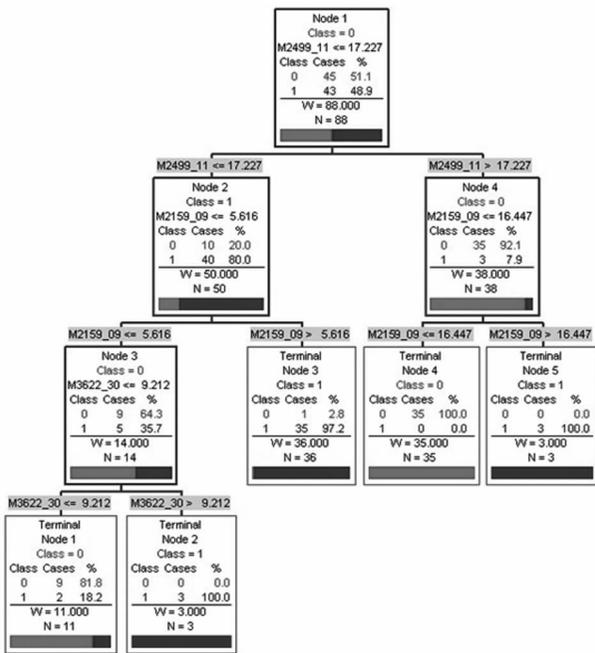


图 2 患者组与健康对照组诊断模型

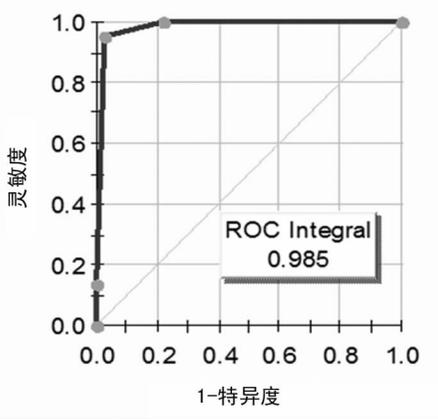


图 3 ROC 曲线图

3 讨 论

MALDI-TOF-MS 是近年来发展的用于生物分子研究领域的高新技术,它具有高灵敏度、快速、准确等特点,已成功应用于蛋白质、DNA/RNA、多糖等生物大分子的检测,并获得 2002 年的诺贝尔化学奖^[5-6]。MALDI-TOF-MS 的基本原理是使用预先设定强度的激光照射检测标本与基质所形成的共同结晶体,基质吸收激光中的能量,传递给检测标本,使标本获得高能量并瞬间汽化,同时基质将质子转移至标本,使标本分子发生电离,电离的标本在电场作用下高速进入飞行时间质量分析器,标本分子则因到达检测器的飞行时间不同而被检测,即通过测定离子的质量电荷之比(m/z)测得蛋白质和多肽的相对分子质量,并按大小排列,形成独特的蛋白质指纹图谱,通过软件将之与数据库中的蛋白质指纹图谱进行比较鉴定其差异性^[7-8]。运用 MALDI-TOF-MS 技术检测蛋白质组表达图谱,筛选最佳诊断效果的蛋白质峰进行组合,并构建分子诊断模型,该技术方法并不局限于最佳诊断组合中所列出的几个蛋白质,而是着眼于表达差异具有统计学意义的全部蛋白峰^[9]。

近年来,随着现代科学及生物化学的微量检测分析技术的发展创新,唾液作为一种临床容易采集而且操作过程完全没有创伤性的体液逐渐进入了人们研究的视角,具有无法估计的科

研潜力及临床应用前景^[10-11]。与血清标本比较,唾液标本的采集更安全,无创采集,患者无痛苦,易接受,且无血源性疾病传播的风险;与尿液标本比较,唾液标本具有可实时采样、更方便的优点。此外,唾液检测需要的样本量小、成本低、易于储存和运输^[12-13]。最重要的是,唾液标本成分与血液、尿液等体液成分具有极高的相似性,对疾病诊断具有极强的灵敏度和特异度。

本研究运用液态芯片结合 MALDI-TOF-MS 技术检测 CGN 患者与健康对照者的唾液蛋白质表达谱,共得到蛋白质峰 414 个,其中 116 个蛋白峰差异有统计学意义($P < 0.05$),44 个蛋白质峰在患者组表达下调,72 个蛋白质峰表达上调。选择 m/z 为 2 499.11、2 159.09、3 622.30 Da 的 3 个蛋白质峰构建决策树分类诊断模型,结果表明,该诊断模型的准确率为 85.23%(75/88),灵敏度为 83.72%(36/43),特异度为 86.67%(39/45),计算该模型的 ROC 曲线下面积为 0.985,提示该模型具有较好的诊断价值。该方法与传统的疾病生物标志物相关的检测方法比较,具有无创伤性、操作简便、快捷、灵敏度及特异度高等特点,其筛选出的生物标志物对于疾病准确快速诊断、预后判断均具有重要的临床意义,值得进一步深入探究。

参考文献

- [1] 王吉耀. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:234.
- [2] Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2011, 31(6): 347-357.
- [3] 倪睿, 王满才, 张有成. 基于唾液生物信息诊断胰腺癌的现状分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 10(5): 678-680.
- [4] 中华中医药学会肾病分会. 慢性肾小球肾炎的诊断、辨证分型及疗效评定[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(6): 8-9.
- [5] Kuda T, Izawa Y, Yoshida S. Rapid identification of Tetragenococcus halophilus and Tetragenococcus muriticus, important species in the production of salted and fermented foods, by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS)[J]. Food Control, 2014, 35(8): 419-425.
- [6] Usbeck JC, Kern CC. Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions[J]. Food Microbiology, 2013, 36(11): 379-387.
- [7] Wang C, Zhan P, Liu WD. Advances in the application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically pathogenic fungi[J]. Chinese Journal of Mycology, 2013, 8(6): 369-373.
- [8] 欧燕飞, 林志为. 难溶有机化合物分子质量的测定[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(1): 60-62.
- [9] Papale M, Pedicillo MC, Di Paolo S, et al. Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(SELDI-TOF/MS): from sample collection to data analysis[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(1): 89-99.
- [10] Malon RS, Sadir S, Balakrishnan M, et (下转第 460 页)

即白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌^[10]。本研究数据表明念珠菌血症最常见的念珠菌为白色念珠菌,为 16 株(30.19%),其次为热带念珠菌 12 株(22.64%),新生隐球菌 12 株(22.64%),近平滑念珠菌 8 株(15.09%),光滑念珠菌 4 株(7.55%),仅有 1 株(1.89%)为酿酒酵母菌。有研究报道 40%念珠菌血症病例病原菌是白色念珠菌,其后依次是近平滑念珠菌(23%),光滑念珠菌(15%),热带念珠菌(9%),其他念珠菌(13%)。本研究与相关报道相似。新生隐球菌则与研究期间隐球菌感染病例相关,提示隐球菌感染可采集血培养用于辅助诊断。本研究非白色念珠菌 37 株(69.81%),提示血流感染中非白色念珠菌需引起重视。近年来,非白色念珠菌引起的念珠菌血症逐渐增加,部分原因是由于唑类抗真菌药物的大量用于预防性或经验性治疗^[8]。因此,应严格规范氟康唑的使用,以避免大量耐药菌的产生及菌种转变。

TTP 是指从血培养瓶装载入全自动血培养仪开始,至血培养仪出现阳性报警信号的时间,与标本的初始菌量有关,同时与菌种也有相关性。本研究发现热带念珠菌的 TTP 最短,而新生隐球菌的 TTP 最长,白色念珠菌与近平滑念珠菌的 TTP 介于中间。光滑念珠菌的 TTP 由于只有 4 个数据而未显示统计学差异。热带念珠菌的 TTP 在 24 h 内,其他的均超过 36 h。提示念珠菌血症 TTP 通常较长,若临床遇到血培养瓶需氧瓶单瓶阳性且 TTP 大于 36 h,考虑念珠菌感染的可能,原因可能由于念珠菌生长缓慢,抑或是念珠菌感染时血流中菌量较低。

念珠菌血症患者最常见于血液内科,其次是肝胆外科与神经外科。可能与患者免疫功能受损有关,同时与外科患者置管等操作有关。本研究对念珠菌血症患者其他部位培养结果进行收集,发现其中 18 株标本出现了其他部位培养出与血培养相同的念珠菌。最常见的是尿液,提示泌尿系感染可能是念珠菌血症的重要来源。同时导管与引流液引起的念珠菌血症也不容忽视。

氟康唑与两性霉素 B 在世界上应用广泛,然而由于两性霉素 B 的不良反应较大而使其在临床使用受限制。相比之下,唑类抗真菌药安全许多,但是念珠菌对唑类抗真菌药物的耐药性日益显现,耐药株或非敏感株已经有报道在流行^[11]。本研究分离的念珠菌对氟康唑均敏感,未出现耐药菌株。1997 年美国真菌血症每例医保患者平均医疗费用是 34 123 美元,个人保险患者费用为 44 536 美元。真菌血症最主要的费用增加来自于住院时间延长,随着更加昂贵与安全有效抗真菌治疗的应用,未来的费用会发生变化^[1]。与其他念珠菌比较,氟康唑的预防性治疗导致了热带念珠菌与白色念珠菌所致感染的比例升高,对克柔念珠菌与光滑念珠菌的相对增加也有重要作用。近年来,念珠菌血症流行病学中念珠菌种类分布发生了重大的转变,氟康唑在其中扮演了重要的角色^[2]。

参考文献

[1] Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness[J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(4): 781-788.

[2] Abisaid D, Anaissie E, Uzun O, et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different Candida species[J]. Clin Infect Dis, 1997, 26(6): 1122-1128.

[3] Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, et al. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992 - 1993: results of population-based laboratory active surveillance[J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(5): 1138-1147.

[4] Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity[J]. Acta Trop, 2002, 81(2): 101-110.

[5] Samonis G, Gikas A, Anaissie EJ, et al. Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonization of humans[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(13): 51-53.

[6] Pittet D, Monod M, Suter PM, et al. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients[J]. Ann Surg, 1994, 220(6): 751-758.

[7] Al-Jasser AM, Elkhizzi NA. Distribution of Candida species among bloodstream isolates[J]. Saudi Med J, 2004, 25(9): 566-569.

[8] Bassetti M, Righi E, Costa A, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care[J]. BMC Infect Dis, 2006, 6(2): 21-22.

[9] Kess I, Jain N, Hasan F, et al. Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of North India, 5-year study[J]. Infection, 2007, 35(4): 256-259.

[10] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the artemis DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007; a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1366-1377.

[11] Cheng YR, Lin LC, Young TG, et al. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical center in central Taiwan[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(12): 155-161.

(收稿日期:2016-08-22 修回日期:2016-11-15)

(上接第 457 页)

al. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics[J]. Biomed Res Int, 2014, 9(8): 62-69.

[11] Denny P, Hagen FK, Hardt M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland saliva's collected as the ductal secretions[J]. J Proteome Res, 2008, 7(10): 1994-2006.

[12] Yan W, Apweiler R, Balgley BM, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes[J]. Proteomics Clin Appl, 2009, 3(1): 116-134.

[13] 袁雅琪, 汪悦. 唾液基因组学进展及对干燥综合征的研究[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 11-13.

(收稿日期:2016-08-12 修回日期:2016-10-18)