

• 临床探讨 •

基于血清肽谱的乳腺癌诊断模型的初步建立^{*}

夏冰¹, 王钢², 张晨芳³, 王丽¹, 宋丽杰¹, 刘仲明¹, 王捷¹

(广州军区广州总医院: 1. 医学实验科, 2. 干部病房一科, 3. 普通外科, 广州 510010)

摘要:目的 为了提高乳腺癌诊断的准确率, 建立新的血清学诊断平台。方法 收集 50 例乳腺癌患者和 50 例健康对照者的血清标本, 随机抽取一部分作为训练集, 用于构建诊断模型; 其余作为验证集, 用于验证模型的诊断能力。使用弱阳离子磁珠分离血清多肽, MALDI-TOF MS 进行质谱检测。结果 通过对训练集 27 例乳腺癌患者和 30 例健康对照者的血清标本进行质谱分析, 建立了一个八肽诊断模型, 然后用验证集 23 例乳腺癌和 20 例健康对照者的血清标本进行检验, 得到该模型的灵敏度为 95.7%, 特异度为 95.0%。并应用生物信息学方法预测出模型中的 4 个肽片段分别来自间- α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4、纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体和核磷蛋白亚型 2。结论 初步建立了一个基于血清肽质谱分析方法的用于诊断乳腺癌的八肽模型, 具有高度灵敏度和特异度。

关键词: 乳腺癌; 质谱分析法; 诊断模型; 血清肽

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 12. 035 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)12-1777-03

乳腺癌是女性发病率最高和病死率居第 2 位的恶性肿瘤。目前的筛查方法已经使乳腺癌病死率下降 15%, 但是同时过度诊断与过度治疗的风险增加 30%^[1]。因此, 为了提高诊断的准确率、进一步改善患者预后和生活质量, 有必要建立新的更精准的乳腺癌诊断技术。特征性乳腺癌生物标志物分子的发现, 将为乳腺癌的诊断提供有力的帮助。蛋白质作为细胞主要的生物效应因子, 一直是生物标志物的重要来源; 而血清由于其非侵入性的获取途径和简便的分离方法, 一向是最理想的临床标本。近年来随着质谱分析技术的发展, 血清蛋白图谱已成为鉴定标志物分子的一个重要工具。因此, 本研究拟通过对血清蛋白进行质谱分析来筛选具有乳腺癌诊断价值的生物标志物, 以建立高准确性的乳腺癌诊断新模型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 9 月至 2016 年 2 月在广州军区广州总医院经病理诊断确诊为乳腺癌的女性患者 50 例作为乳腺癌组, 年龄 32~71 岁, 平均(50.7±9.6)岁; 同时选择年龄匹配的健康女性体检者 50 例作为健康对照组, 年龄 29~66 岁, 平均(50.7±11.2)岁, 均无重要脏器疾病, 血清生化指标正常。随机抽取 27 例乳腺癌和 30 例健康对照者作为训练集, 用于诊断模型的构建; 其余 23 例乳腺癌和 20 例健康对照者作为验证集, 用于诊断模型的验证。本研究经患者和体检者知情同意并经广州军区广州总医院医学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 弱阳离子交换磁珠(MB-WCX)试剂盒(德国 Bruker Daltonics 公司), 高效液相色谱级乙腈和三氟乙酸(德国 Merk 公司), α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、丙酮、乙醇(美国 Aldrich-Sigma 公司); 磁珠分离器、600/384Anchorchip 靶板、Autoflex III 基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱仪及 ClinPro Tools 软件(德国 Bruker Daltonics 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清标本收集 早晨空腹抽取研究对象全血 3 mL, 室温静置 2 h, 室温离心 3 000 r/min×10 min, 将上清液分装成每管 50 μ L, -80 $^{\circ}$ C 保存。每例标本冻存期不超过 20 个月。

1.3.2 多肽提取 根据厂商提供的说明书, 应用弱阳离子交换磁珠试剂盒, 按照标准程序将血清标本中的多肽进行分离。步骤简要记载如下: 在 200 μ L 样品管中加入 10 μ L 磁珠结合

缓冲液和 10 μ L 磁珠悬浮液磁珠, 吹打均匀; 加入 5 μ L 血清, 吹打均匀, 室温静置 5 min。置于磁珠分离器中 1 min, 使磁珠贴于管壁上, 吸弃上清液; 加入 100 μ L 清洗缓冲液清洗磁珠两次; 加入 5 μ L 洗脱缓冲液, 混匀磁珠。置于磁珠分离器中 2 min 后, 吸取上清液移入 0.5 mL 干净样品管内, 加 5 μ L 稳定缓冲液混匀, 即可行 MALDI-TOF 质谱分析。

1.3.3 质谱检测和蛋白预测 将 5 μ L HCCA 基质液(0.4 g/L, 溶于丙酮和乙醇)与 1.0 μ L 多肽样品进行混合, 从中取 1.0 μ L 点于靶板上, 室温干燥。将干燥后的靶立即用 MALDI-TOF 质谱仪进行检测, 并优化检测步骤。应用 ClinPro Tools 软件来进行基线平滑、图谱标准化并确定峰的荷质比(m/z)值与强度。在相对分子质量 1 000~10 000 得到多肽分子量, 信噪比设为大于 3。一共经过 400 次打靶, 获得多肽图谱。根据 m/z 值检索 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库, 采用 TagIdent 检索程序对差异表达多肽进行初步鉴定。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS19.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVA 分析、Student's *t* 检验(正态分布资料)和 Wilcoxon 检验(非正态分布资料)进行数据比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。GA、SNN 和 QC 算法用于构建区分乳腺癌与健康对照者的诊断模型。

2 结果

2.1 质谱检测得到血清多肽谱 检验本研究中质谱检测数据的可重复性。将同一例患者的同一份血清标本重复测定 3 次, 可见变异率很低, 重复性良好。然后, 将乳腺癌组和健康对照组的血清多肽经过磁珠分离和 MALDI-TOF 质谱检测后进行对比分析, 得到相对分子质量 1 000~10 000 的多肽图谱, 然后通过主成分分析绘制出两组数据的双变量图(图 1)。

2.2 筛选差异表达多肽和构建诊断模型 应用 ClinProTools 软件, 以差异大于 1.5 倍、 $P < 0.05$ 为标准对训练集质谱检测数据进行分析, 初步筛选出在乳腺癌组和健康对照组之间有显著性表达差异的多肽峰 55 个。之后, 应用软件中镶嵌的统计学算法来构建能够区分乳腺癌和健康对照的诊断模型。通过 GA、SNN 和 QC 算法, 分别筛出 5 个、21 个和 8 个差异多肽, 从中找出至少被两种算法选中的一共 8 个多肽峰构成乳腺癌诊断模型。与健康对照组比较, 8 个多肽中有 4 个在乳腺癌组

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2013B021800052)。

明显上调,荷质比(m/z)分别是 7 448.32、7 578.56、7 652.30 和 7 938.14 Da;另外 4 个多肽显著下调, m/z 分别是 2 026.76、2 105.06、2 975.95 和 4 475.10 Da。各多肽质谱峰的情况详见表 1。然后,应用该模型对验证集质谱检测数据进行盲筛选验证,结果 23 例乳腺癌患者血清标本中有 22 例被准确判断,1 例被误判为健康对照,灵敏度 95.7%;20 例健康对照女性标本中有 19 例被准确判断,1 例被误判为乳腺癌,特异度 95.0%,说明这个联合应用 8 种肽的诊断模型具有区分乳腺癌患者与健康女性的理想效能。

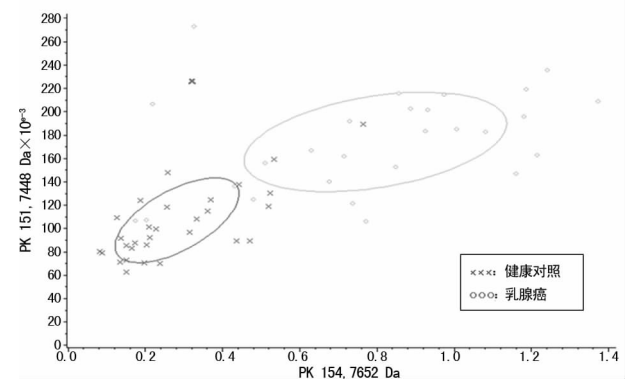


图 1 健康对照组和乳腺癌组血清多肽谱的主成分分析图

2.3 预测候选标志物蛋白 通过生物信息学检索,初步鉴定 m/z 2 026.76 和 4 475.10 的多肽分别为间- α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4(ITIH4) 和 核磷蛋白亚型 2 的片段,而 m/z 2 105.06 和 2 975.95 的多肽均来源于纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体。与以上信号峰相匹配的蛋白名称和序列详见表 1。相对分子质量为 7 448.32、7 578.56、7 652.30 及 7 938.14 的肽没有查到相应蛋白。

表 1 乳腺癌诊断模型中的 8 个多肽峰数据			
峰序号	m/z	乳腺癌组峰强度 与对照组比较	预测蛋白名称
51	2 026.76	下降	间- α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4
55	2 105.06	下降	纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体
77	2 975.95	下降	纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体
114	4 475.10	下降	核磷蛋白亚型 2
151	7 448.32	升高	未查到
153	7 578.56	升高	未查到
154	7 652.30	升高	未查到
157	7 938.14	升高	未查到

3 讨 论

学者们多年来一直致力于研发诊断乳腺癌的血液检查新技术,但是迄今没有明显进展。主要原因是血液中尚未发现既敏感又特异的乳腺癌标志物。由于乳腺癌具有高度的异质性,尽管迄今已报道了大量的乳腺癌标志物候选分子,却均因重复性差而未能应用于临床。在本研究中,通过质谱分析法找到了 8 个乳腺癌特征性血清多肽,初步建立了一个高灵敏性和高特异性的乳腺癌诊断模型。在这个模型中,乳腺癌组有 4 个峰比健康对照组明显降低,其来源蛋白可能分别是 ITIH4、纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体和核磷蛋白。经文献检索发现这 3 种蛋白都与乳腺癌相关,下面分别进行讨论。

首先,本研究发现乳腺癌患者血清中 ITIH4 片段的水平比健康对照组减少。ITIH4 是一种 120×10^3 的急性期糖蛋白,主要由肝脏产生,分泌入血之后可被蛋白酶水解成多个不同大小的片段^[2]。2006 年一项前瞻性研究报道乳腺癌患者术前血清中 ITIH4 (m/z 4292)多肽峰的表达强度降低^[3]。随后

Gast 等^[4]也报道乳腺癌患者术前血清 ITIH4 水平与健康人群相比是下降的。以上研究结果均与本研究数据相一致。但是,也存在许多不同的报道,认为术前乳腺癌患者 ITIH4 血清水平是升高的。Mohamed 等^[5]用质谱分析发现乳腺癌患者血清 ITIH4 水平显著升高。van den Broek 等^[6]用液相色谱-串联质谱对乳腺癌患者血清中 8 个 ITIH4 来源的多肽进行绝对定量,发现多数在乳腺肿瘤存在时有升高趋势,尤其是 ITIH(4)-25 和-29 血清水平明显升高。甚至有研究表明 ITIH4 血清水平在患者被诊断为乳腺癌的 3 年前就已升高^[7]。

其次,本研究发现乳腺癌患者的纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体血清水平下降。纤维蛋白原是一种由肝脏合成的具有凝血功能的球蛋白,其分子是由 3 对多肽链(一对 α 链、一对 β 链、一对 γ 链)以二硫键连接而成的二聚物。大量文献报道,与良性疾病/健康对照比较,多种类型肿瘤患者(如肾细胞癌、子宫内膜癌、结肠癌、宫颈癌等)术前血浆/清纤维蛋白原水平升高,且与差的预后有关^[8-10]。乳腺癌患者术前血浆凝血酶原水平也升高,且与患者的低生存率有关^[11]。不过,具体到该蛋白的 α 链、 α 链亚型 1 的前体或者该亚型本身表达变化的报道相对非常少。Shi 等^[12]应用 SELDI-TOF 质谱分析法在纵向研究中证实,乳腺癌患者凝血酶原 α 链片段的术前血浆水平降低,与本研究结果一致。表面看来,本研究报道的乳腺癌患者血清纤维蛋白原 α 链亚型 1 前体水平下降与前文提到的纤维蛋白原水平升高似乎是不一致的,其实可能并不矛盾。因为虽然纤维蛋白原前体的减少可能会导致成熟的纤维蛋白原生成减少,但是,如果该成熟蛋白的降解也减少、且减少程度更大,则纤维蛋白原水平可以表现为升高。

第三,本研究发现乳腺癌患者核磷蛋白亚型 2 的血清水平降低。核磷蛋白又被称为 NPM1 或 B23,主要有 2 个亚型。亚型 1 由 294 个氨基酸组成,亚型 2 的 C 端比亚型 1 缺少 35 个氨基酸。亚型 1 主要定位于细胞核内,表达量高,而亚型 2 同时出现在细胞核和细胞质,表达量很低^[13]。文献通常对 2 个亚型不进行严格区分而统称为核磷蛋白。核磷蛋白在细胞中的功能十分复杂多样。目前,关于其在乳腺癌中作用的研究结果很不一致。一些文献认为核磷蛋白对乳腺肿瘤具有促进作用。例如 Vydra 等^[14]从 23 例乳腺癌组织标本中原代培养出上皮细胞,根据临床资料分为转移阳性组和转移阴性组,经比较蛋白质组学分析发现转移阳性组细胞中核磷蛋白的表达量比转移阴性组的高,提示该蛋白是乳腺癌的促进因子。同时,另一些文献支持核磷蛋白对乳腺肿瘤发挥抑制作用。例如,应用组织芯片技术检测 1 160 例乳腺癌标本中核磷蛋白的表达,发现核磷蛋白在乳腺癌组织中低表达水平与差的预后相关,而且该蛋白在正常腔上皮细胞中高表达,在强侵袭性的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中过表达核磷蛋白能抑制其在软琼脂上的生长^[15]。这些证据都支持核磷蛋白是乳腺癌的抑制因子,或许可以解释本研究的结果。本研究数据显示,乳腺癌患者 NPM 亚型 2 的血清水平比健康对照组下降,可能导致该蛋白抑制肿瘤的作用弱化,从而促进了乳腺癌的发生、发展。

可见,乳腺癌患者血清中上述 3 种蛋白的水平是升高还是降低,各家报道很不一致,主要可能与选取的患者人群不同、血样的采集时间以及保存时间不同等因素有关。另外,遗憾的是,新建的乳腺癌诊断模型中有 4 个表达上调的肽尚未能被软件 and 数据库预测出为何种蛋白,这是由于其相对分子质量太大,都超过 7×10^3 ,以至于数据库中检索不到相应蛋白。

综上所述,本研究采用蛋白质组学方法分析了 27 例乳腺癌患者和 30 个健康对照的血清标本,建立了一个八肽诊断模型,可将乳腺癌患者与健康人区分开来;并用另外独立的 23 例

乳腺癌和 20 例健康对照的血清标本进行验证,发现该模型的灵敏度为 95.7%,特异度为 95.0%,有望将来用于乳腺癌的实验室诊断。本研究的局限性主要是样本量比较少而且缺乏动态检测,因此未来将收集更多的系列标本以进一步验证该模型的诊断效能。此外,应用生物信息学预测的蛋白也有待用测序方法进行最终鉴定。

参考文献

- [1] Gøtzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2006 (4):CD001877.
- [2] Chandler KB, Brnakova Z, Sanda M, et al. Site-specific glycan microheterogeneity of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4[J]. J Proteome Res, 2014, 13(7):3314-3329.
- [3] Mathelin C, Cromer A, Wendling C, et al. Serum biomarkers for detection of breast cancers; A prospective study [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 96(1):83-90.
- [4] Gast MC, Van Gils CH, Wessels LF, et al. Serum protein profiling for diagnosis of breast cancer using SELDI-TOF MS[J]. Oncol Rep, 2009, 22(1):205-213.
- [5] Mohamed E, Abdul-Rahman PS, Doustjalali SR, et al. Lectin-based electrophoretic analysis of the expression of the 35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 fragment in sera of patients with five different malignancies[J]. Electrophoresis, 2008, 29(12):2645-2650.
- [6] van den Broek I, Sparidans RW, van Winden AW, et al. The absolute quantification of eight inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4)-derived peptides in serum from breast cancer patients[J]. Proteomics Clin Appl, 2010, 4 (12):931-939.
- [7] Opstal-van Winden AW, Krop EJ, Kåredal MH, et al. Searching for early breast cancer biomarkers by serum protein profiling of pre-diagnostic serum; a nested case-control study[J]. BMC Cancer, 2011, 11:381.

• 临床探讨 •

- [8] Pichler M, Hutterer GC, Stojakovic T, et al. High plasma fibrinogen level represents an independent negative prognostic factor regarding cancer-specific, metastasis-free, as well as overall survival in a European cohort of non-metastatic renal cell carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 2013, 109(5):1123-1129.
- [9] Seebacher V, Polterauer S, Grimm C, et al. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer; a multi-centre trial[J]. Br J Cancer, 2010, 102 (6):952-956.
- [10] Sun ZQ, Han XN, Wang HJ, et al. Prognostic significance of preoperative fibrinogen in patients with colon cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(26):8583-8591.
- [11] Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Stojakovic T, et al. An elevated preoperative plasma fibrinogen level is associated with poor disease-specific and overall survival in breast cancer patients[J]. Breast, 2015, 24(5):667-672.
- [12] Shi Q, Harris LN, Lu X, et al. Declining plasma fibrinogen alpha fragment identifies HER2-positive breast cancer patients and reverts to normal levels after surgery[J]. J Proteome Res, 2006, 5(11):2947-2955.
- [13] Di Matteo A, Franceschini M, Chiarella S, et al. Molecules that target nucleophosmin for cancer treatment; an update [J]. Oncotarget, 2016, 7(28):44821-44840.
- [14] Vydra J, Selicharová I, Smutná K, et al. Two-dimensional electrophoretic comparison of metastatic and non-metastatic human breast tumors using in vitro cultured epithelial cells derived from the cancer tissues[J]. BMC Cancer, 2008, 8:107.
- [15] Karhemo PR, Rivinoja A, Lundin J, et al. An extensive tumor array analysis supports tumor suppressive role for nucleophosmin in breast cancer[J]. Am J Pathol, 2011, 179(2):1004-1014.

(收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-03-19)

多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌 6 种耐药基因及其临床意义*

王江元, 卢念红, 王子浔, 艾清[△]

(吉林大学第一医院二部检验科, 长春 130031)

摘要:目的 探索多重聚合酶链反应(PCR)检测鲍曼不动杆菌多种耐药基因的方法,并指导临床用药。方法 用多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌 6 种耐药基因,并统计分析 82 例鲍曼不动杆菌耐药基因与相应抗生素的关联,比对耐药基因检出率及抗生素耐药率对应情况。结果 多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌灵敏性高、稳定性强;可尽早、快速、高效地指导临床用药。结论 多重 PCR 可以同时检测鲍曼不动杆菌 6 种耐药基因,并及时、高效地指导临床用药,有效治疗感染,控制医院内感染。

关键词:鲍曼不动杆菌; 多重聚合酶链反应; 院内感染; 耐药基因; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.036 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)12-1779-04

鲍曼不动杆菌是不动杆菌中最常见的临床感染菌,属于条件致病菌,不仅广泛存在于自然界的水、土壤和医院环境,还存在于人体皮肤、呼吸道、消化道和泌尿生殖道中。近年来该菌

感染率在上升及耐药性日益严重,已成为是全球重要的医院获得性病原菌,引起医疗工作者的高度重视^[1]。鲍曼不动杆菌主要引起呼吸道感染,但也可引发继发性脑膜炎、败血症、泌尿系

* 基金项目:吉林大学第一医院二部科研专项基金(A10)。

[△] 通信作者, E-mail: aiqing@jlu.edu.cn。