

原发性肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的血清蛋白表达差异

杨素芳

摘要 目的 探讨原发性肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的血清蛋白差异表达,并分析其意义。**方法** 将 154 例原发性肝癌患者按中医辨证分为肝郁证(37 例)、脾虚证(45 例)、湿热证(18 例)、血瘀证(28 例)及阴虚证(26 例),应用表面加强激光解析电离化飞行时间质谱法(surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)分析其血清蛋白指纹图谱,并结合中医证候特点,探讨肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的血清蛋白差异表达。**结果** 介入前 1 周, M/Z 为 3 392、4 970、5 911、6 200、8 575 Da 的血清蛋白峰在各证型间的表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);上述 5 个差异蛋白峰同时出现于脾虚证和血瘀证中。介入后 1 周,阴虚证 M/Z 为 8 575 Da 的血清蛋白峰表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 肝癌介入治疗围手术期不同证型间出现血清差异蛋白峰。

关键词 原发性肝癌;蛋白组学;表面加强激光解析电离化飞行时间质谱法;介入治疗;中医证型

Differentially Expressed Proteins in Serum among Different Chinese Medical Syndrome Types of Primary Liver Cancer in the Perioperative Period of Interventional Treatment YANG Su-fang
College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108), China

ABSTRACT Objective To explore different expressions of serum proteins among different Chinese medical syndrome types of primary liver cancer (PLC) in the perioperative period of interventional treatment, and to explore its significance. **Methods** Totally 154 PLC patients were assigned to Gan depression syndrome (GDS, 37 cases), Pi deficiency syndrome (PDS, 45 cases), dampness heat syndrome (DHS, 18 cases), blood stasis syndrome (BSS, 28 cases), and yin deficiency syndrome (YDS, 26 cases). The mass spectra of serum proteins were analyzed by using surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). By combining the features of Chinese medical syndromes, the different expressions of serum proteins among different Chinese medical syndrome types of PLC in the perioperative period of interventional treatment were explored. **Results** One week before interventional treatment, there was statistical difference in the expression of serum protein peak with mass-to-charge ratio (M/Z) being 3 392, 4 970, 5 911, 6 200, and 8 575 Da ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The aforesaid differentially expressed protein peaks occurred simultaneously in PDS and BSS. One week after interventional treatment, the expression of the serum protein peak was down-regulated in YDS syndrome with M/Z being 8 575 Da, showing statistical difference ($P < 0.01$). **Conclusion** Different peaks of serum proteins occurred in different Chinese medical syndrome types of PLC in the perioperative period of interventional treatment.

KEYWORDS primary liver cancer; proteomics; surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; interventional treatment; Chinese medical syndrome type

表面加强激光解析电离化飞行时间质谱法(surface enhanced laser desorption ionization time of

flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)蛋白芯片技术操作简便,且能发现和捕获肝癌新的或未知的特异性相关蛋白,有利于肝癌的早期诊断和个体化治疗,目前成为监测肝癌的热潮并初见端倪^[1-3]。本研究初步分析原发性肝癌介入治疗围手术期不同中医证

基金项目:福建省科技厅资助项目(No. 2011J01204)

作者单位:福建中医药大学药学院(福州 350108)

Tel:13950417843, E-mail:miss-ysf@126.com

型的血清蛋白差异表达,并尝试探讨其临床意义。

资料与方法

1 诊断标准 原发性肝癌诊断参照《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》^[4]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:(1)符合原发性肝癌诊断标准;(2)中国分期 I ~ IIIA 期无远处转移或巴塞罗那(BCLC)分期 A/B/C 无肝外转移者;(3)所有具备经导管肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗适应症的 II 期患者和部分 III 期患者;(4)预计生存期在 3 个月以上,生活质量 Karnofsky 评分 ≥ 60 分者;(5)签署知情同意书。排除标准:(1)年龄 < 18 岁;(2)妊娠期或哺乳期妇女;(3)凡已接受过抗癌治疗者(包括全身化疗、动脉插管化疗及栓塞治疗),局部放疗、已行手术者,冰冻或无水酒精注射有效未超过 3 个月者。

3 中医辨证分型标准 按照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[5]进行中医辨证分型。(1)肝郁证,主症:右胁闷胀窜痛,胸闷,喜太息,情志抑郁,易怒,右肋肋下痞块;次症:纳呆食少,脘闷暖气,时有恶呕、腹泻;舌苔薄腻,脉弦。(2)血瘀证,主症:肋下痞块巨大,胁痛引背,痛处不移,拒按,脘腹胀满,面色晦暗;次症:纳呆食少,神疲乏力,形体消瘦,暖气,大便溏结不调;舌质紫暗,有瘀斑、瘀点;脉沉细或弦涩。(3)脾虚证(或兼湿困),主症:神疲乏力,纳呆食少,腹胀,食后尤甚,大便溏泄,肋下痞块;次症:少气懒言,口黏不欲饮,恶心、呕吐;舌淡,舌边有压迹,舌苔厚腻;脉细弦或滑濡。(4)湿热证(或热毒),主症:心烦易怒,口苦口干,胁肋胀痛灼热,黄疸,溲赤便干,肋下痞块;次症:纳呆食少,发热烦渴,脘腹胀满,头晕耳鸣;舌红或绛,苔黄腻;脉弦滑或滑数。(5)阴虚证,主症:胁肋灼痛,腰膝酸软,五心烦热,头晕失眠,口苦咽燥,形体消瘦,肋下痞块;次症:食少,腹鼓胀,青筋暴露,出血,低热盗汗;舌质少苔或光剥,脉细而数。

4 一般资料 选择 2008 年 9 月—2011 年 12 月期间收治于福建省第二人民医院介入科病理确诊的肝癌患者 154 例,均符合纳入标准。收集患者的四诊信息资料,对介入前 154 例肝癌患者进行辨证,其中肝郁证 37 例,脾虚证 45 例,湿热证 18 例,血瘀证 28 例及阴虚证 26 例。

5 SELDI 蛋白芯片技术检测

5.1 标本采集 清晨 5:00 时空腹抽取患者介入治疗前后各 1 周时外周血 3 ~ 5 mL,置 4 °C 冰箱放置 2 h,2 000 r/min 离心(离心半径 6.7 cm)5 min,取上清液以 50 μ L 分装放置 -80 °C 冰箱保存待用。

5.2 芯片预平衡 取弱阳离子交换芯片 CM10 (美国 Ciphergen 公司)装在生物芯片处理器(Bioprocessor)加样架上,每孔加入 CHAPS 缓冲液(50 mmol/L NaAC, pH 4.0, 美国 Sigma)200 μ L 置于水平摇床振荡 5 min,弃溶液,重复上述步骤 1 次。

5.3 血清样品稀释 取 5 μ L 血清,加 10 μ L U9 处理液(9 mol/L Urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 50 mmol/L Tris-HCL, pH 9.0),充分混匀,水平振荡器上冰浴振荡 30 min(400 ~ 600 r/min),加 180 μ L 缓冲液混匀。

5.4 上样及洗脱 取稀释好的血清样品 100 μ L 加入平衡好的芯片,摇床振荡孵育 1 h,甩去样品,用 200 μ L 缓冲液室温振荡洗涤 2 次,每次 5 min。

5.5 加能量吸收分子 取出芯片,晾干后,每孔加能量吸收分子、芥子酸(美国 Ciphergen 公司)1 μ L,滴加 2 次。

5.6 数据收集 制备好的芯片放入 PBSII-C 型蛋白芯片阅读机读取芯片信息,用 Ciphergen proteinchip3.0.2 版本的分析软件(芯片及软件购自美国 Ciphergen 公司)采集数据。

5.7 统计学方法 将所读取的图谱进行归一化处理,采用 Biomarker Wizard 软件分析肝癌患者不同证型间介入治疗围手术期外周血清蛋白指纹图谱的差异。其出现频率阈值为 20%,信噪比最低为 5,对不同组中相同质荷比(M/Z)的蛋白质含量数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 介入治疗前肝癌患者不同证型间血清差异蛋白峰(表 1) 采用 Biomarker Wizard 软件对介入前 1 周肝癌患者不同中医证型间外周血清蛋白质谱图进行比较和统计学分析。结果显示: M/Z 为 3 392、4 970、5 911、6 200、8 575 Da 的血清蛋白质峰在不同证型间的表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);上述 5 个差异蛋白峰同时出现于脾虚证和血瘀证中。

2 肝癌介入治疗围手术期不同中医证型血清蛋白指纹图谱的差异性分析(表 2, 图 1) 针对介入前 154 例肝癌患者不同证型间出现的 5 个血清差异蛋白,应用 Biomarker Wizard 软件于术后 1 周对比研究各自相同质荷比的蛋白表达差异。结果显示:阴虚证中 M/Z 为 8 575 Da 的差异蛋白峰表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余证型介入前后差异蛋白峰表达无明显改变($P > 0.05$)。

表 1 介入治疗前肝癌患者不同证型间
血清蛋白峰差异表达 ($\bar{x} \pm s$)

M/Z (Da)	证型	血清蛋白峰	证型	血清蛋白峰	两两比较 P值
4 970	肝郁证	2.250 ± 1.725	血瘀证	5.717 ± 4.162	0.000
4 970	脾虚证	2.082 ± 1.863	血瘀证	5.717 ± 4.162	0.000
4 970	阴虚证	5.717 ± 4.162	血瘀证	1.899 ± 1.953	0.000
3 392	肝郁证	10.294 ± 9.886	血瘀证	16.167 ± 9.650	0.005
3 392	脾虚证	9.230 ± 8.347	血瘀证	16.167 ± 9.650	0.002
3 392	阴虚证	16.167 ± 9.645	血瘀证	7.284 ± 5.859	0.001
5 911	肝郁证	51.372 ± 18.239	血瘀证	33.884 ± 20.763	0.008
5 911	脾虚证	54.488 ± 25.232	血瘀证	33.884 ± 20.763	0.004
6 200	肝郁证	4.537 ± 2.260	血瘀证	6.447 ± 3.493	0.018
6 200	肝郁证	4.537 ± 2.260	脾虚证	3.148 ± 2.159	0.007
6 200	肝郁证	4.537 ± 2.260	阴虚证	3.217 ± 1.946	0.035
6 200	脾虚证	3.148 ± 2.159	血瘀证	6.447 ± 3.494	0.000
6 200	阴虚证	6.447 ± 3.494	血瘀证	3.217 ± 1.945	0.003
8 575	肝郁证	12.170 ± 6.017	血瘀证	17.322 ± 7.320	0.020
8 575	脾虚证	10.296 ± 6.400	湿热证	15.424 ± 6.769	0.042
8 575	脾虚证	10.296 ± 6.400	血瘀证	17.322 ± 7.320	0.001
8 575	阴虚证	17.322 ± 7.320	血瘀证	11.970 ± 7.237	0.027

表 2 肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的
血清蛋白峰差异表达 ($\bar{x} \pm s$)

M/Z (Da)	证型	血清蛋白峰		P值
		介入前	介入后	
4 970	肝郁证	1.880 ± 1.422	2.265 ± 2.618	0.567
4 970	脾虚证	3.658 ± 2.323	3.825 ± 2.427	0.809
4 970	阴虚证	2.143 ± 1.300	3.443 ± 2.081	0.071
4 970	血瘀证	17.350 ± 12.357	13.650 ± 11.856	0.608
3 392	肝郁证	2.005 ± 1.384	2.635 ± 1.955	0.247
3 392	脾虚证	5.975 ± 3.531	6.100 ± 5.099	0.922
3 392	阴虚证	7.529 ± 3.963	7.386 ± 6.074	0.622
3 392	血瘀证	2.600 ± 0.925	1.883 ± 1.245	0.284
5 911	肝郁证	8.830 ± 4.878	7.615 ± 3.351	0.364
5 911	脾虚证	52.833 ± 25.684	50.438 ± 20.572	0.723
5 911	血瘀证	41.133 ± 23.398	51.583 ± 14.997	0.379
6 200	肝郁证	3.790 ± 1.815	2.870 ± 2.826	0.228
6 200	脾虚证	1.650 ± 1.656	1.333 ± 1.586	0.502
6 200	阴虚证	2.700 ± 2.123	2.357 ± 1.776	0.446
6 200	血瘀证	6.167 ± 4.524	6.233 ± 4.079	0.979
8 575	肝郁证	11.505 ± 7.273	8.570 ± 7.619	0.220
8 575	脾虚证	8.679 ± 6.100	7.929 ± 6.050	0.671
8 575	湿热证	19.475 ± 6.271	15.050 ± 6.006	0.347
8 575	阴虚证	12.771 ± 3.603	6.571 ± 3.371	0.006
8 575	血瘀证	17.300 ± 10.373	13.883 ± 12.357	0.615

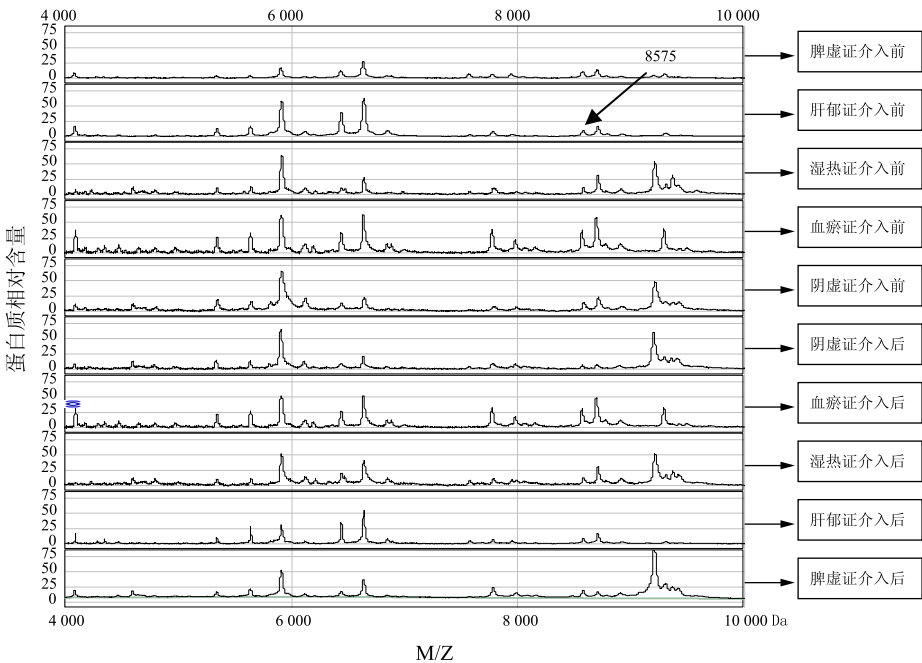


图 1 肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的血清蛋白指纹图谱示例 (M/Z 为 8 575 Da)

讨 论

SELDI 蛋白芯片技术以其高通量、快速、平行、自动化等优点,为蛋白质组学研究肝癌提供了强大的技术支持。苏乃伦等^[6]经 SELDI 检测到肝癌组(30 例)、HBV 阳性携带者(20 例)及正常人(20 名)中共有 25 个蛋白质差异有统计学意义,并以其中 5 个蛋白标志物(M/Z 为 6 888、13 764、6 487、3 450 和

6 814 Da)建立了筛选模型。司少艳等^[7]运用质谱分析共筛选出 13 个肝癌小鼠血清差异蛋白,其中 M/Z 为 2 687.6、2 800.8、8 532.9、9 298.1 Da 的蛋白具有早期诊断价值;M/Z 为 3 006.7、6 432.0、6 650.9、9 637.2、1 283.8、1 520.0、1 536.5、1 546.4 Da 的蛋白可能与肝癌的发生、发展密切相关。张志勇等^[8]通过对肝癌患者术前血清与慢性肝病患者血清蛋白质谱分析发现共有 38 个蛋白质表达量有明显差异,并获得相

对分子质量为 M3 815、M4 678、M4 703、M4 881、M5 304、M5 716、M6 203、M7 789、M7 988、M8 168、M9 312 这 11 个蛋白质组成的模型。

本研究发现原发性肝癌患者介入前不同证型间存在着 M/Z 为 3 392、4 970、5 911、6 200、8 575 Da 等 5 个差异蛋白峰,介入后阴虚证的 M/Z 为 8 575 Da 的血清蛋白表达明显下调,说明肝癌介入治疗围手术期不同中医证型的血清蛋白指纹图谱有明显差异,在蛋白组学水平上进一步促进了肝癌中医辨证分型客观化研究的发展。

近年来与肝癌中医证型较密切的肝功能、免疫功能、肿瘤标志物、影像学等指标的研究报道屡见不鲜,这些成果对阐述肝癌的病机传变、指导辨证论治和分析预后具有一定的意义^[9]。张红等^[10]发现肝癌患者血清甲胎蛋白(AFP)、 γ -谷氨酰基转移酶(γ -GT)、癌胚抗原(CEA)、碱性磷酸酶(AKP)、铁蛋白(SFe)水平显著高于健康人,且脾气虚证、肝郁脾虚兼瘀血阻络证患者血清 AFP、CEA 高于肝气郁结证、瘀血阻络证。本研究发现介入治疗前脾虚证和血瘀证有 5 个差异蛋白峰与其他 4 个证型存在明显差异,提示脾虚、血瘀是肝癌的主要病机之一。所以《医林绳墨·积聚》说:“积者,……血之积也”;又如《景岳全书》曰:“凡脾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”。

本研究将继续跟踪肝癌患者介入治疗后与健康对照组、二次以上介入治疗围手术期、中医辨证虚实夹杂证、数型并见证等既有的 5 个蛋白峰差异表达,扩大临床病例数并分析此模型的灵敏度及特异性,以期更全面更准确地阐述肝癌的病机传变及各证型之间的差异与联系。

参 考 文 献

- [1] 徐明辉,李若林,何亚妮,等. SELDI-TOF-MS 蛋白芯片技术在原发性肝癌诊断中的应用研究[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(6): 843-845.
- [2] 胡育斌,林海澜,郝明志,等. SELDI-TOF-MS 技术在肝癌诊断和介入治疗评价中的价值[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(13): 1107-1111.
- [3] 李长煜,王小林. SELDI 蛋白质芯片技术在肝癌研究中的进展[J]. 复旦学报(医学版), 2010, 37(3): 374-376.
- [4] 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]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(6): 324.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:210-212.
- [6] 苏乃伦,牟文凤,王斌. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肝癌血清蛋白标记物[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(13): 53-56.
- [7] 司少艳,张军,杨鹤鸣,等. 应用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术筛选正常和肝癌小鼠血清差异蛋白[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(7): 644-648.
- [8] 张志勇,覃健,何敏,等. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肝癌血清标志物的研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(24): 4609-4611.
- [9] 张艳玲,李永浩. 肝癌中医证型与客观指标关系的研究进展[J]. 中医药导报, 2007, 13(5): 95-96.
- [10] 张红,曾柏荣,陈孟溪,等. 原发性肝癌血清肿瘤标志物水平的变化与中医辨证分型的关系研究[J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(12): 600-601.

(收稿:2012-09-24 修回:2012-12-05)

《Chinese Journal of Integrative Medicine》

获 2012 年度中国最具国际影响力学术期刊

2012 年 12 月 26 日,《中国学术期刊国际引证报告(2012 版)》(简称《CAJ-IJCR》)对外公布,同时 2012 年度“中国最具国际影响力学术期刊”和“中国国际影响力优秀学术期刊”名单也新鲜出炉。《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志)获得“中国最具国际影响力学术期刊”。

该项成果由中国学术期刊电子杂志社、中国科学文献计量评价研究中心与清华大学图书馆共同发布。报告统计对象为我国正式出版的学术期刊,利用 Web of Science 的数据,旨在建立健全适合反映我国学术期刊国际影响的文献调查和科学分析体系。