不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱的观察

杨素芳　邱颂平　刘清华

摘要　目的　应用表面加强激光解析电离化飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry,SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片检测不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱的变化。**方法**　将 154 例原发性肝癌患者分为肝郁证、脾虚证、湿热证、血瘀证及阴虚证 5 组,应用 SELDI-TOF-MS 分析其血清蛋白指纹图谱,观察肝癌介入治疗前后不同中医证型与血清蛋白指纹图谱之间的关系。**结果**　与健康对照组比较,符合叶氏诊断模型者,肝郁证中质荷比(M/Z)为 4 182 Da 及 6 589 Da、湿热证中 M/Z 为5 710 Da、阴虚证中 M/Z 为6 992 Da的差异蛋白表达下调;脾虚证中 M/Z 为 5 816 Da、血瘀证中 M/Z 为 4 297 Da 的差异蛋白表达上调;差异均有统计学意义(P < 0.01);与介入前比较,符合叶氏诊断模型者,肝郁证中 M/Z 为 4 182 Da 及 6 589 Da、湿热证中 M/Z 为 5 710 Da、脾虚证中 M/Z 为 5 816 Da、血瘀证中 M/Z 为 4 297 Da 的差异蛋白表达下调;阴虚证中 M/Z 为 6 992 Da的差异蛋白表达上调;差异亦有统计学意义(P <0.05,P <0.01)。**结论**　不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后的血清蛋白指纹图谱变化有统计学意义。

关键词　原发性肝癌;蛋白组学;蛋白指纹图谱

Observation of Serum Protein Fingerprinting in Primary Liver Cancer Patients of Different Chinese Medical Syndromes before and after Interventional Treatment

YANG Su-fang, QIU Song-ping, and LIU Qing-hua　*College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108), China*

ABSTRACT　Objective　To explore changes of serum protein fingerprinting in primary liver cancer (PLC) patients of different Chinese medical syndromes before and after interventional treatment detected by surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Methods　Totally 154 PLC patients were assigned to 5 groups, i.e., Gan depression syndrome (GDS, 37 cases), Pi deficiency syndrome (PDS, 45 cases), dampness heat syndrome (DHS, 18 cases), blood stasis syndrome (BSS, 28 cases), yin deficiency syndrome (YDS, 26 cases). The mass spectra of serum proteins was analyzed by using SELDI-TOF-MS. Then the correlation between Chinese medical syndrome types and the mass spectra of serum proteins was explored before and after interventional treatment. Results　Compared with the healthy control group, the expression of serum proteins peak was down-regulated in GDS with M/Z being 6 589 and 4 182 Da, in DHS with M/Z being 5 710 Da, in YDS with M/Z being 6 992 Da, while it was up-regulated in PDS with M/Z being 5 816 Da and in BSS with M/Z being 4 297 Da, showing statistical difference (P <0.01). Compared with before intervention, the expression of serum proteins peak was down-regulated in GDS with M/Z being 6 589 and 4 182 Da, in PDS with M/Z being 5 816 Da, in DHS with M/Z being 5 710 Da in BSS with M/Z being 4 297 Da, while it was up-regulated in YDS with M/Z being 6 992 Da, showing statistical difference (P <0.05, P <0.01). Conclusion　There was statistical difference in changes of serum protein fingerprinting in PLC patients of different Chinese medical syndromes before and after interventional treatment.

KEYWORDS　primary liver cancer;proteomics;serum proteins mass spectra

---

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)
通讯作者:杨素芳,Tel:13950417843,E-mail:miss-ysf@126.com
DOI: 10.7661/CJIM.2013.10.1352

中国中西医结合杂志

目前肝癌中医证候与血清蛋白指纹图谱的关系尚未有报道。本试验拟为肝癌的辨证分型提供蛋白组学依据,旨在促进“证”的定量化、客观化,建立西医微观指标与中医证型的联系,探索“证”的实质,现报道如下。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 原发性肝癌的诊断标准 参照《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》[1]。

1.2 中医辨证标准 参照《中药新药临床研究指导原则》[2]将介入前 154 例肝癌患者分为肝郁证 37 例、脾虚证 45 例、湿热证 18 例、血瘀证 28 例及阴虚证 26 例。

2 纳入标准 (1)符合西医诊断标准及中医辨证分型;(2)中国分期[3] Ⅰ~ⅢA 期无远处转移或巴塞罗那(BCLC)分期[4] A/B/C 无肝外转移者;(3)具备经导管肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗适应症的Ⅱ期及部分Ⅲ期患者;(4)预计生存期在 3 个月以上,生活质量评分[5] ≥60 分;(5)签署知情同意书者。

3 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、手术者,冰冻或无水酒精注射有效未超过 3 个月者。

4 一般资料 154 例均为 2008 年 9 月—2011 年 12 月收治于福建省第二人民医院介入科经病理确诊的肝癌患者。其中肝癌患者男 128 例,年龄 19~81 岁,平均(53.93±12.00)岁;女 26 例,年龄18~82 岁,平均(49.34±10.73)岁。Ⅱ期患者的高发年龄段为 40~69岁,占 67.9%,其次是 30~39 岁,占 10.8%,两者合计占 78.7%。Ⅱ期患者与Ⅲ期患者的比例为 11∶1。另选同期福建省第二人民医院体检中心健康志愿者 146 名健康人作为对照组。其中男 119 名,年龄 21~79 岁,平均(54.50±4.39)岁;女 27 名,年龄 19~80 岁,平均(48.67±3.68)岁。

5 SELDI 蛋白芯片技术检测

5.1 标本采集 清晨 5:00 空腹抽取所有肝癌患者及健康对照组介入治疗前后各 1 周的外周血 3~5 mL,置 4 ℃冰箱放置 2 h, 2 000 r/min,离心 5 min,取上清液以 50 μL 分装放置 -80 ℃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 Bio-processor 加样架上,每孔加入 CHAPS 缓冲液(50 mmol/L NaAC, pH 值为 4.0)200 μL 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 μL 血清,加 10 μL U9 处理液(9 mol/L Urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 50 mol/L Tris-HCL,pH 值为 9.0),充分混匀,水平振荡器上冰浴振荡 30 min(400~600 r/min),加入 180 μL缓冲液混匀。

5.4 上样及洗脱 取稀释好的血清样品 100 μL 加入平衡好的芯片,摇床振荡孵育 1 h,甩去样品,用 200 μL 缓冲液室温振荡洗涤 2 次,每次 5 min。取出芯片,晾干后,每孔加能量吸收分子 SPA 1 μL,滴加 2 次。制备好的芯片放入 PBSⅡ-C 型蛋白芯片阅读机(美国 Ciphergen 公司)读取芯片信息,用 Ciphergen proteinchip 3.0.2 版本的分析软件采集数据。

6 肝癌标志蛋白峰诊断模型的应用 叶韵斌等[6]采用 SELDI 蛋白芯片技术检测了 57 例血清甲胎蛋白(AFP)阴性(<20 μg/L)肝癌患者和 55 名健康对照组外周血清,经 Biomarker Wizard 软件分析,筛选出特征性的蛋白峰质荷比(M/Z)为 4.2×10^3、4.1×10^3、6.7×10^3、5.7×10^3、6.5×10^3、6.9×10^3、5.8×10^3,利用差异蛋白峰对 17 例 AFP 阴性的肝癌患者和 13 名健康对照者进行盲筛,其灵敏度和特异度分别为 88.23% 和 92.31%,研究所得的叶氏诊断模型能有效避免对 AFP 阴性肝癌患者的漏诊。本实验中采用了与文献[6]完全相同的 SELDI 蛋白芯片,检测差异蛋白峰,并将其结果按叶氏诊断模型显示。

7 统计学方法 将所读取的图谱进行归一化处理,采用 Biomaker Wizard 软件分析肝癌患者及健康对照组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,对不同证型肝癌患者相同质荷比的蛋白质含量数据采用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 介入前不同中医证型肝癌患者与健康对照组的血清差异蛋白峰比较(表 1,图 1) 肝郁证中 M/Z 为 4 182 Da、6 589 Da 的差异蛋白峰表达下调;脾虚证中 M/Z 为 5 816 Da 的差异蛋白峰表达上调;湿热证中 M/Z 为 5 710 Da 的差异蛋白峰表达下调;血瘀证中 M/Z 为4 297 Da的差异蛋白峰表达上调;阴虚证中 M/Z 为6 992 Da的差异蛋白峰表达下调。上述血清蛋白峰的表达与健康对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2 不同中医证型肝癌患者介入治疗前后 1 周的血清蛋白峰比较(表 2,图 2) 介入治疗后,肝郁证中

表 1　介入前不同中医证型肝癌患者与健康对照组的血清蛋白表峰比较　($\bar{x} \pm s$)

相同 M/Z (Da)	血清蛋白峰					
	健康对照	肝郁证	脾虚证	血瘀证	阴虚证	湿热证
4 182	9.641 ±4.830(37)	3.277 ±3.478(37) *	—	—	—	—
6 589	32.500 ±11.512(37)	10.753 ±6.145(37) *	—	—	—	—
5 816	4.766 ±2.537(45)	—	9.790 ±5.861(45) *	—	—	—
5 710	5.296 ±1.533(18)	—	—	—	—	2.372 ±1.524(18) *
4 297	2.946 ±2.393(28)	—	—	7.133 ±3.178(28) *	—	—
6 992	7.215 ±3.012(26)	—	—	—	3.371 ±1.952(26) *	—

注:与相同 M/Z 的健康对照组比较,* $P<0.01$;( )内数据为例数

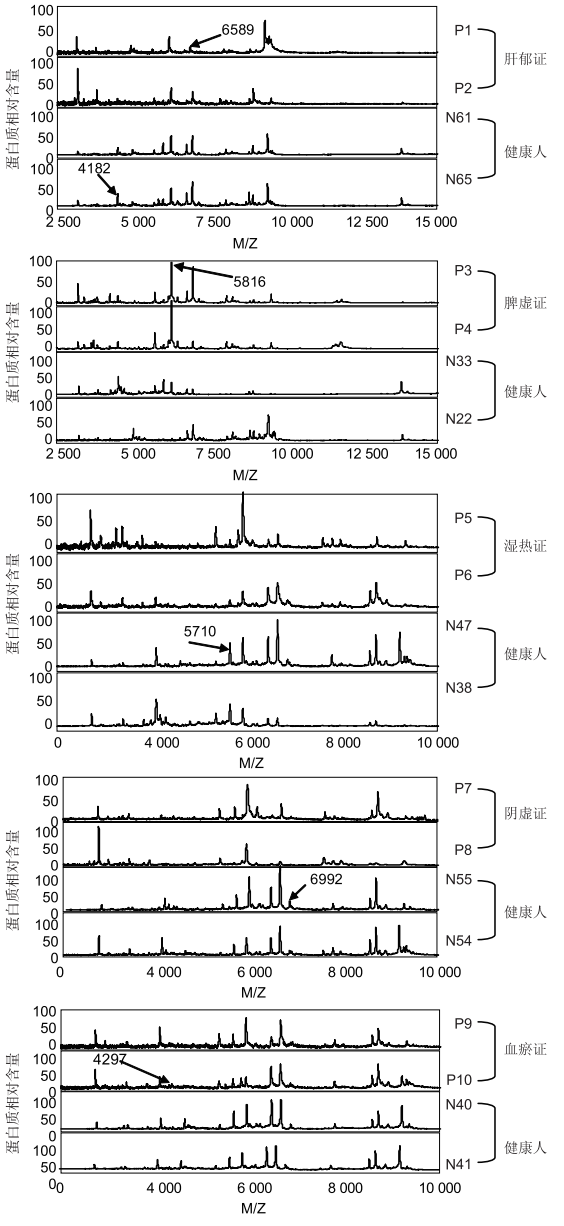

图 1　介入前不同中医证型肝癌患者与健康对照组的血清差异蛋白指纹图谱

M/Z 为 4 182 Da、6 589 Da 的差异蛋白峰表达继续下调;脾虚证中 M/Z 为 5 816 Da 的差异蛋白峰表达下调;湿热型中 M/Z 为 5 710 Da 的差异蛋白峰表达继续下调;血瘀型中 M/Z 为 4 297 Da 的差异蛋白峰表达下调;阴虚型中 M/Z 为 6 992 Da 的差异蛋白峰表达上调。上述血清蛋白峰与介入前比较,表达均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。

表 2　不同中医证型肝癌患者介入治疗前后 1 周的血清蛋白峰比较　($\bar{x} \pm s$)

符合叶氏模型的相同 M/Z (Da)	血清蛋白峰		
	证型	介入前	介入后
4 182	肝郁证(37)	9.660 ±6.405	5.135 ±3.281 *
6 589	肝郁证(37)	19.310 ±9.571	12.285 ±8.715 *
5 816	脾虚证(45)	33.796 ±17.052	21.9792 ±8.844 **
5 710	湿热证(18)	3.956 ±1.581	2.367 ±0.650 *
4 297	血瘀证(28)	4.367 ±2.055	1.867 ±0.920 *
6 992	阴虚证(26)	2.080 ±1.729	3.575 ±2.199 *

注:与相同荷质比同中医证型介入前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;( )内数据为例数

讨　论

肝癌的发生、发展是一个多因素联合作用的过程,只有多个标志物的结合应用才能有效地检测,因而产生了血清蛋白质组学模式诊断法[7]。黄成等[8]用 SELDI 技术对 135 名肝细胞癌患者进行蛋白质谱分析,筛选了 7 个蛋白峰(M/Z 为 3 478、2 022、8 901、9 415、8 773、2 766、2 745)建立预测门脉癌栓形成的模型。师越等[9]分析了介入治疗对肝癌患者血清中蛋白质含量的影响,检测到 3 个明显变化的差异蛋白质峰,分别为小诱导细胞因子 A15 前体、线粒体铰链蛋白、肌动蛋白 actin 相关蛋白。王秀丽等[10]通过对肝癌患者手术前血清与健康人血清蛋白质谱分析,发现共有 28 个蛋白质表达量差异有统计学意义($P<0.05$),并获得分子量为 9 492.93 Da 的蛋白质组成模板。

本试验中发现 M/Z 为 4 182 Da、6 589 Da、5 816 Da、4 297 Da、6 992 Da、5 710 Da 等 6 个差异蛋白完全符合叶氏肝癌诊断模型标准,说明不同中医证型的肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱差异明显,具有一定的临床意义。

对肝癌患者介入治疗前后的血清质谱分析,本研究

中国中西医结合杂志

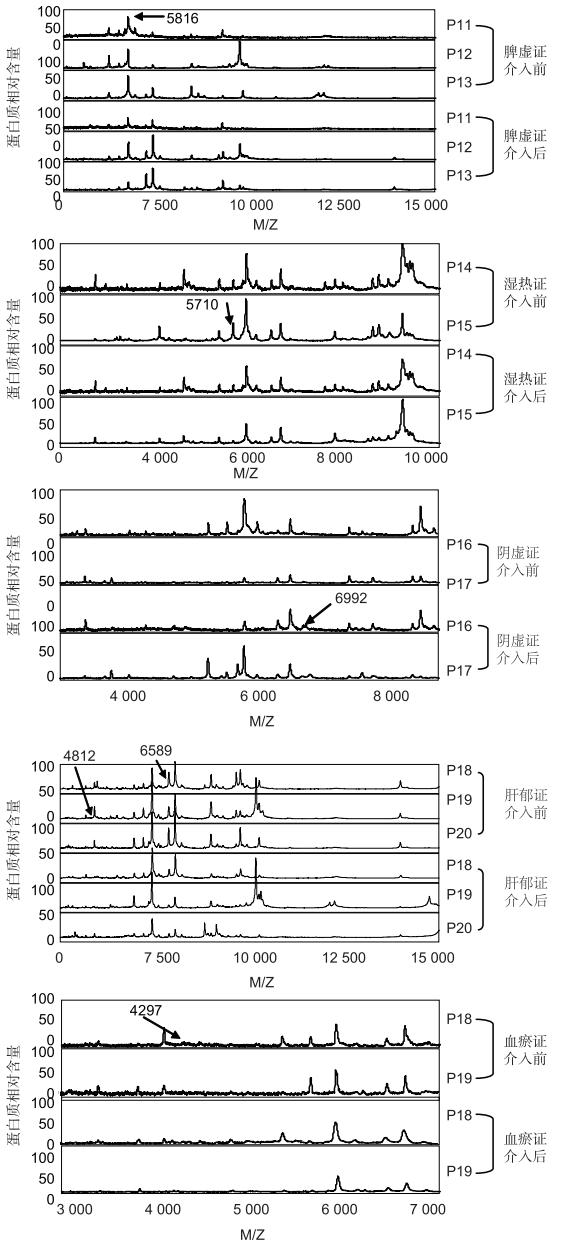

图 2 不同中医证型肝癌患者介入治疗前后的血清蛋白指纹图谱

中还发现同一证型存在 M/Z 为 7 943 Da(肝郁证)、8 585 Da(肝郁证)、5 348 Da(脾虚证)、3 271 Da(湿热证)、4 716 Da(阴虚证)、8 568 Da(阴虚证)等 6 个差异蛋白,而笔者前期试验[11]中则发现 5 证型相互间存在 M/Z 为 3 392 Da、4 970 Da、5 911 Da、6 200 Da、8 575 Da 等 5 个差异蛋白,此 11 个血清差异蛋白皆不符合叶氏诊断模型,有待临床进一步取例以建立筛选模型及经双盲法验证其准确率、敏感性和特异性。

在肝癌介入治疗围手术期,本研究发现,肝癌不同中医证型的 12 个血清蛋白会发生演变,说明肝癌的同一中医证型存有个性;而笔者前期在不同证型相互间获知的 5 个血清差异蛋白,则表明肝癌的不同证型之间相互关联;两者的研究层面不同,结果具有本质上的区别。所以说,证候在时空性、个体差异的多变性和复杂性与蛋白质组在数量、种类和含量上的动态性和多态性概念相吻合,通过 SELDI 技术研究肝癌中医证候具有一定的可行性[12]。

本研究缺乏肝癌患者介入治疗后与健康对照组、2 次以上介入治疗、中医辨证虚实夹杂证,数型并见证等的对照研究结果,若能对这些蛋白的差异表达进行全面研究,关注其在肝癌发生、发展中的动态变化,可能会为揭示肝癌中医证候的本质研究提供更有力的依据。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 郑莜英. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版, 2002: 210-212.

[3] 杨秉辉. 第四届全国肝癌学术会议概况及关于肝癌诊断标准及分期问题的讨论[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2000, 7(4): 封二.

[4] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会. 中华医学会肝病学分会肝癌学组原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3): 259-269.

[5] 牛玉坚,臧运金,陈新国,等. Ⅲ期或Ⅳa1 期肝癌肝移植的生活质量和生存率[J]. 癌症进展杂志, 2007, 5(1): 94-98.

[6] 叶韵斌,陈慧菁,周东,等. 蛋白芯片技术对甲胎蛋白阴性肝癌诊断的意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2009, 21(1): 17-18.

[7] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1296-1304.

[8] 黄成,樊嘉,周俭,等. 肝细胞癌门静脉癌栓形成相关的血清蛋白质分子标记物研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(11): 781-785.

[9] 师越,李悦国. 肝细胞性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白质组的变化[J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(2): 122-124.

[10] 王秀丽,高春芳,赵光,等. 应用 SELDI-TOF-MS 技术分析肝癌患者血清蛋白质谱的手术前后变化[J]. 实用医药杂志, 2010, 27(2): 97-99,102.

[11] 杨素芳. 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[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 314-317.

[12] 胡艳,陈锐深,王昌俊. 运用蛋白质组学研究原发性肝癌中医证型的探讨[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1547-1548.

(收稿:2012-09-14 修回:2013-07-23)

中国中西医结合杂志