食管癌血清差异表达蛋白图谱和诊断模型的建立

Establishment of Serum Differential Expression Protein Map and Diagnostic Model for Esophageal Cancer // *ZHANG Xu, SHAO Qian-wen, ZHOU Xiao-ning*

张　旭[1],邵倩雯[2],周小宁[3]

(1. 盐城师范学院药学院,江苏 盐城 224002;2. 南京医科大学第一附属医院,江苏 南京 210029;3. 盐城市第一人民医院,江苏 盐城 224006)

摘　要:[目的] 比较食管癌患者和健康人的血清差异表达蛋白图谱，建立食管癌诊断模型。[方法] 收集 38 食管癌患者血清和 40 健康人血清,用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测血清蛋白表达,并用 ProteinChip Software、Biomarker Patterns Software 和 SPSS16.0 软件分析和筛选差异蛋白。[结果] 在 1kDa~10kDa 范围内,得到差异蛋白 144 个(P<0.05),用荷质比为 M/Z 8926.478、8136.185 和 4476.086 的峰(P<0.000001)作为食管癌的诊断模型,其灵敏度为 95.0%,特异度为 97.5%,准确率为 97.5%,阳性预测值为 100%,阴性预测值为 95.2%,ROC 曲线下面积(AUC)为 97.5%,对食管癌癌诊断效率最大时的界值(cut-off 值)为 2.5%。[结论] SELDI-TOF-MS 技术可以准确筛选食管癌血清差异表达蛋白,建立的诊断模型准确性高,特异性好。

主题词:食管肿瘤;SELDI-TOFMS;差异表达蛋白;诊断模型

中图分类号:R735.1　　**文献标识码**:B　　**文章编号**:1671-170X(2018)10-1022-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2018.10.B017

食管癌的早期症状不明显,绝大部分食管癌患者确诊时已是中晚期，且术后 5 年生存率约为 10%[1]。因而,确立食管癌诊断标志物,做到食管癌的早诊断非常必要[2]。目前已知的食管癌标志物有鳞状上皮细胞癌相关抗原 (SCC)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 片段抗原(CYFRA21-1)、p53 蛋白以及 p53 蛋白抗体(p53-Ab)[3];但是,上述指标诊断灵敏度、特异性均较低,如 CEA 的灵敏度约 14%,SCC 的灵敏度 26.8%~50.0%,CYFRA21-1 的灵敏度 43.0%~76.9%,p53-Ab 的灵敏度 28%~60%,单独应用于食管癌的诊断价值不大,联合诊断可提高灵敏度至 83%左右，但仍小于 90%[4]。因此,寻找高灵敏度、高特异性的食管癌诊断标志物是目前研究、应用的目标之一。本研究利用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)分析食管癌患者和健康人血清蛋白指纹图谱[5],确定食管癌的诊断标志物,并建立食管癌诊断模型。

基金项目:江苏省人力资源和保障厅资助项目(swyy-030)

通讯作者:周小宁,副主任医师,硕士;盐城市第一人民医院肿瘤科,江苏省盐城市亭湖区毓龙西路 166 号(224006);E-mail:yczxn@qq.com

收稿日期:2017-06-25;**修回日期**:2018-03-20

1　材料与方法

1.1　一般材料

选取 2014 年 9 月至 2015 年 9 月在盐城市第一人民医院治疗的 38 例食管癌患者作为观察组,化疗前血常规、肝肾功能、心电图均正常,无化疗禁忌证,所有患者予 TCF 方案化疗,即紫杉醇(生产单位:亚宝药业集团股份有限公司，批准文号：国药准字 H20084099,2008-09-12)135mg/m^2 静脉点滴,第 1d;顺铂(生产单位:山东凤凰制药股份有限公司,批准文号:国药准字 H20056422,2010-09-30)20mg/m^2 静脉点滴,第 1~5d;氟尿嘧啶(生产单位:上海通用药业股份有限公司，批准文号：国药准字 H31021276,2002-09-13)500mg/m^2 静脉点滴，第 1~5d;2 周期后复查食管癌血清肿瘤标志物的变化。38 例患者中男性 21 例,女性 17 例;年龄 36~68 岁,平均年龄 57.6±4.3 岁;Ⅲ期 14 例,Ⅳ期 24 例;肝转移 19 例,肺转移 23 例,骨转移 17 例;Karnofsky 评分≥70 分。将在南京医科大学第一附属医院体检的 40 名健康者列为对照组,男性 26 例,女性 14 例,年龄

37~65 岁，平均年龄 55.4±5.1 岁，排除心、肺不全和肿瘤、精神类疾病；均签署知情同意书，两组性别、年龄等一般资料差异无统计学意义（P>0.05），有可比性。

1.1.1 主要试剂

CM10 蛋白芯片购自 Biorad 公司，乙腈（HPLC 级）、三氟乙酸（TFA）、无水醋酸钠（NaAc）、3-[3-（胆酰氨丙基）二甲胺基]丙磺酸内盐（CHAPS）、Tris 碱、氯化氢（HCl）、去离子水（HPLC）、氢氧化钠（NaOH）、羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）和二硫基苏糖醇（DTT）均购自 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器

PBSIIC 型蛋白质芯片飞行时间质谱仪（SELDI-TOF-MS）出自于 Ciphergen 公司。

1.1.3 主要软件

ProteinChip Software 和 Biomarker Patterns Software 来自 Biorad 公司；SPSS16.0 来自 SPSS 公司。

1.2 方 法

1.2.1 血清样品采集

两组血清的采集均是清晨空腹、无抗凝剂的 5ml 采血试管，–80℃低温保存，采集时间从 2014 年 11 月至 2015 年 5 月份；加样枪枪头 P20、P200、P1000 以及 0.5ml、1.5ml 微型离心管均购自于 AXYGEN 公司。

1.2.2 血清样品处理

将血清样品从–80℃冰箱中取出，放在冰上解冻，待血清完全融化，放入 4℃离心机以 10 000rpm 的速率离心 2min；将血清用 2 倍体积的 U9 反冲液稀释，放置在冰上震荡 30min；将 9μl 上述变性后的样品加入 108μl 50mM NaAc（pH4.0）的结合反冲液，快速混匀，并将上述血清样品上样到芯片上，用 PBSIIC 型蛋白质芯片飞行时间质谱仪读取芯片信息，得到质谱图原始数据，Biomarker Wizard Software 把图形数据按标准化格式导出成为数字格式 EXCEL 进行统计分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析，各组计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验；运用 ROC 曲线对检测结果进行分析，确定其 cut-off 值。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管癌患者和健康人血清蛋白图谱

在分子量为 1kDa~10kDa 范围内，食管癌患者血清共检测到 253 个蛋白峰，与健康人血清差异有统计学意义的共 144 个（P<0.05），与健康人（对照组）相比，食管癌患者有 56 个蛋白高表达，88 个蛋白低表达。见 Figure 1。

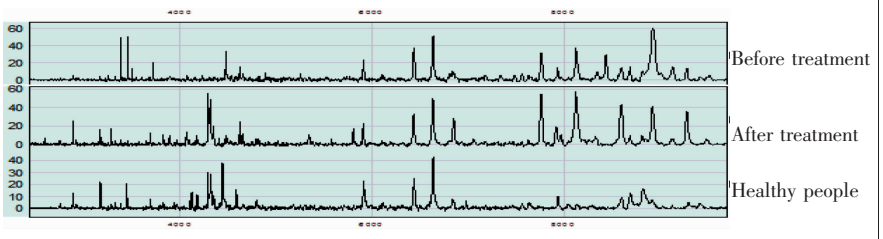


Figure 1 The protein peak graph of the esophageal carcinoma patients and healthy people

2.2 诊断模型的建立

为了便于建立诊断模型，从与对照组的差异具有统计学意义的蛋白峰中，选取 P<0.000001 的荷质比峰值，共有 7 个（Table 1）。为了消除系统误差，在这 7 个峰值中，挑选出信噪比较好（峰高大于 2）的 3 个峰作为最具有潜在诊断价值的标志蛋白，它们是荷质比分别为 4476.086（P=8.52×10^{-7}）、8136.185（P=6.45×10^{-7}）以及 8926.478（P=7.33×10^{-8}），这 3 个蛋白峰在食管癌患者中相对于健康组均高表达（Table 1）。用这 3 个蛋白质峰建立食管癌的诊断模型，该诊断模型的灵敏度为 95.0%，特异度为 97.5%，准确率

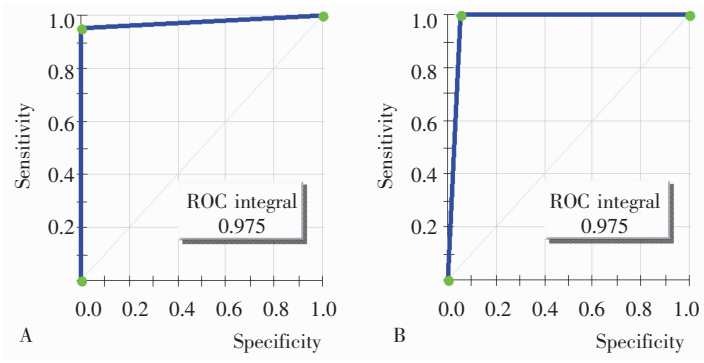
Table 1 The different differential protein peaks in the two groups

Groups	n	Differential protein peak / abundance						
		2748.873	4119.315	4425.942	4476.086	4798.629	8136.185	8926.478
Observation group	38	1.261±0.32	0.142±0.04	0.873±0.14	17.109±3.15	2.322±0.75	29.258±4.32	46.006±5.47
Control group	40	8.841±1.24	17.258±2.45	6.452±1.32	3.466±0.68	15.062±3.12	4.613±1.02	10.208±2.15
t	–	36.53	43.05	25.91	26.75	24.50	35.08	38.40
P	–	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

为 97.5%,阳性预测值为 100%,阴性预测值为 95.2%,ROC 曲线下面积（AUC)为 97.5%,对食管癌癌诊断效率最大时的界值(cut-off 值)为 2.5%。见 Figure 2。

2.3 诊断模型的 3 个标志蛋白在治疗前、治疗后以及健康人的比较

3 个标志蛋白在食管癌患者中均高表达,有 2 个蛋白的表达在治疗后降低,M/Z 4476.08 的丰度由治疗前的 33.31386 降到治疗后的 18.592（健康人的平均值为 3.4664),M/Z 8926.478 的丰度由治疗前的 60.68546 降到治疗后的 43.39402(健康人的平均值为 6.8052),而 M/Z 8136.185 的丰度由治疗前的 37.34336 经治疗反而升高到 53.97962(健康人的平均值为 4.6130)。见 Table 2。



A:Diagnostic model for esophageal carcinoma patients
B:Diagnostic model for healthy people

Figure 2 ROC curve of the diagnostic model for esophageal cancer and health control group

Table 2 Comparison of the 3 markers of the diagnostic model before and after treatment

Groups	n	Differential protein peak / abundance		
		4476.08	8136.185	8926.478
Observation group				
Before treatment	38	33.314±4.26*	37.343±4.12*	60.685±6.37*
After treatment	38	18.593±3.16*	53.979±5.37*	43.394±5.46*
Control group	40	3.466±0.68	4.613±1.02	10.208±2.15

Note:*:compared with the control group,P<0.0001

3 讨 论

我国食管癌发病占世界 50%以上[6],我国食管癌病例主要集中在六大区域,其中苏北地区(淮安和盐城区域)是六大食管癌高发区之一(死亡率 110/10 万)[7]。男性患者居多,男女比例为 1.6:1;农村高于城市,比例为 3:1[8]。发病年龄多在 50~69 之间,约占患者的 60%;苏北地区发病率高于全国最低的云南 30 倍。早期食管癌患者经治疗,其 5 年生存率高达 90%以上。因而,食管癌如能做到早诊断,早治疗,能大大提高患者的生存率[9]。

表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术被广泛地应用于癌症血清蛋白的筛选[10],如乳腺癌[11]、卵巢癌、原发性肝癌、原发性结肠癌、宫颈癌[12]、食管癌等,以及建立诊断模型[13]。

我们应用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测 38 例食管癌患者的血清和 40 名健康人血清,结果显示具有统计学意义的差异表达蛋白共有 144 个(P<0.05),并筛选 8926.478、8136.185 和 4476.086(P<0.000001)3 个质谱峰建立食管癌的诊断模型。该诊断模型对于食管癌患者的灵敏度和特异性分别为 95.0%和 97.5%，对于健康人的灵敏度和特异性分别为 100%和 97.5%,阳性预测值为 100%,阴性预测值为 95.2%,ROC 曲线下面积(AUC 值)为 97.5%,对食管癌癌诊断效率最大时的界值(cut-off 值)为 2.5%。对比 Zheng 等[14]研究,他们用荷质比为 9368.63、5342.59 和 5254.43 的蛋白峰作为诊断模型,也取得非常好的诊断效果,峰值与本研究有差异，一是他们采用了不一样的芯片,另外,可能研究条件也有所差异。刘荼珍等[15]应用 WCX2 芯片自动选择 M/Z 为 2545、3371、3746、5009、5021 和 15886 的 6 个差异蛋白峰作为诊断模型，但灵敏度和特异性均不理想。

综上所述,SELDI-TOF-MS 技术可以准确筛选食管癌血清差异表达蛋白，建立的诊断模型准确性高,特异性好。

参考文献:

[1] Chen L,Huang XJ,Sun Y. Endoscopic diagnosis of early esophageal carcinoma [J]. World Chinese Journal of Digestology,2016,24(1): 51-58.[陈鹭,黄晓俊,孙洋. 早期食管癌的内镜诊断进展[J]. 世界华人消化杂志,2016,24

(1):51-58.]

[2] Okamoto K,Matsui S,Watanabe T,et al. Clinical analysis of esophageal stricture in patients treated with intralesional triamcinolone injection after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer[J]. Oncology, 2017,93 Suppl 1:9-14.

[3] Shen H,Yang X,Fu PF. To Evaluate the combined detection of multiple tumor markers in early diagnosis of esophageal cancer[J]. Journal of Clinical Research,2005, 22(2):186-188.[沈华,杨霞,付佩芬. 多种肿瘤标志物联合检测在食管癌早期诊断中的价值[J]. 医学临床研究, 2005,22(2):186-188.]

[4] Shi H. Diagnostic value of combined detection of four tumor markers for esophageal cancer[J]. Journal of Radioimmunology,2011,24(4):405.[施华. 四种肿瘤标志物联检对食管癌的诊断价值[J]. 放射免疫学杂志,2011,24(4):405.]

[5] Maher SG,McDowell DT,Collins BC,et al. Serum proteomic profiling reveals that pretreatment complement protein levels are predictive of esophageal cancer patient response to neoadjuvant chemoradiation[J]. Ann Surg,2011, 254(5):809-816.

[6] Jiang QL,Shen SS,Zhang Y,et al. Progress in the diagnosis and treatment of early esophageal cancer[J]. Jilin Medical Journal,2012,33(29):6403-6405.[姜庆玲,沈双双,张扬,等. 早期食管癌诊断与治疗进展[J]. 吉林医学,2012, 33(29):6403-6405.]

[7] Ceng HY,Yuan SH,Meng X,et al. Prevention and treatments of esophageal perforation during or after radiotherapy in esophageal carcinoma: a review of literature[J].Chinese Journal of Cancer Prevention and Control,2017,24 (7): 501-506.[曾海燕,袁双虎,孟雪,等. 食管癌放疗穿孔防治研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2017,24(7): 501-506.]

[8] Chen W,Zhou SL. The value of DWI in the quantitative and staging evaluation of esophageal cancer [J]. Journal of Clinical Radiology,2014,33(3): 388-393.[陈伟,周胜利. DWI 在食管癌定量及定期诊断中的价值[J]. 临床放射学杂志,2014,33(3):388-393.]

[9] Sun J,Yuan X,Li X,et al. Comparative transcriptome analysis of the global circular RNAs expression profiles between SHEE and SHEEC cell lines [J]. Am J Transl Res,2017,9(11):5169-5179.

[10] Martins C,Sousa P,Araújo T,et al. Mediastinal mass in a patient with colorectal cancer: a diagnostic challenge[J]. GE Port J Gastroenterol,2017,24(4):193-197.

[11] Yun XX ,Yang JC,Jiang W,et al. Screening for differential proteins of cell nuclear among breast cancer[J]. Modern Preventive Medicine,2012,39 (24):6442-6445.[韵雪雪,杨永长,姜伟,等. 乳腺癌细胞核差异蛋白筛选[J]. 现代预防医学,2012,39(24):6442-6445.]

[12] Chen R,Shi Y,Peng JQ,et al. Analysis on proteome among cervical cancer patients of Uighur nationality in Xinjiang [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2013,28(6):1013-1015.[陈锐,石瑛,彭靖淇,等. 新疆维吾尔族宫颈癌蛋白质组图谱分析 [J]. 中国妇幼保健, 2013,28(6):1013-1015.]

[13] Liu CZ,Zhu PY,Shi MX,et al. Screening of serum proteome biomarker of esophageal squamous cell carcinoma by WCX2 protein chip [J]. China Oncology,2007,17(9): 701-705.[刘茶珍,朱佩云,施民新,等. WCX2 蛋白芯片筛选食管鳞癌血清标志蛋白的研究[J]. 中国癌症杂志, 2007,17(9):701-705.]

[14] Zheng GB,Gao CF,Wang XL,et al. Study on serum proteomic features in patients with and without recurrence or metastasis after surgical resection of esophageal carcinoma [J]. Genet Mol Res,2014,13(1):538-545.

[15] Liu CZ,Zhu PY,Shi MX,et al. Serum proteomic spectra of esophageal squamous cell carcinoma patients analyzed with IMAC3 protein chip [J]. Chinese Journal of Cancer, 2008,27(3):272-278.[刘茶珍,朱佩云,施民新,等. 应用 IMAC3 蛋白芯片分析食管鳞癌患者血清蛋白质谱的变化[J]. 癌症,2008,27(3):272-278.]