

MALDI-TOF-MS 在 HBV 相关肝癌蛋白质组学中的应用价值

孙菲 王刚 张金仿 苏建荣

首都医科大学附属北京友谊医院检验科, 北京 100050

通信作者: 苏建荣, Email: 214726746@qq.com, 电话: 010-63158550

【摘要】 目的 探究基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)在 HBV 相关肝癌蛋白质组学中的应用价值。**方法** 选取 2018 年 1 月—2018 年 6 月在我院就诊的 HBV 相关肝癌患者 30 例,健康自愿者 25 例,弱阳离子磁珠捕获技术血清蛋白,运用 MALDI-TOF-MS 技术以及相关软件进行蛋白质分析,检测 HBV 相关肝癌的血清标志蛋白质,建立肝癌诊断模型,进行盲法验证。**结果** 共筛选出 81 个蛋白质峰,而具有统计学差异的有 27 个($P < 0.05$),其中 17 个差异蛋白呈现高表达上调,10 个差异蛋白呈现低表达下调。经 BPS5.0 软件筛选出 3 个差异蛋白峰(质荷比 M/Z 为 9179.55, 7789.00, 4097.00)建模,后经盲法验证,其敏感性 90.91%,特异性为 77.78%。**结论** MALDI-TOF-MS 技术为 HBV 相关肝癌的诊断和治疗提供了重要的依据。

【关键词】 MALDI-TOF-MS; 肝炎病毒,乙型;肝癌;蛋白质组学

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.021

Application value of MALDI-TOF-MS in proteomics of hepatitis B virus-related liver cancer

Sun Fei, Wang Gang, Zhang Jinfang, Su Jianrong

Clinical Laboratory, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: Su Jianrong, Email: 214726746@qq.com, Tel: 0086-10-63158550

【Abstract】 Objective To explore the application value of matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in proteomics of HBV-related liver cancer. **Methods** Thirty patients with HBV-related liver cancer, and 25 healthy volunteers were selected from January 2018 to June 2018 in our hospital. The serum proteins of these participants were captured by weak cation exchange (WCX) beads. MALDI-TOF-MS and related software were used to analyze the proteins, detect the marker of serum proteins in HBV-related liver cancer, establish the liver cancer diagnosis model and perform blind test. **Results** Totally 81 protein peaks were screened out, and 27 protein peaks had significant difference ($P < 0.05$), of which 17 were up-regulated, 10 were down-regulated. Three differential protein peaks (M/Z 9179.55, 7789.00, 4097.00) were screened by BPS5.0 software to establish the model. Further blind test showed that the sensitivity and specificity of the protein peaks were 90.91% and 77.78%, respectively. **Conclusions** MALDI-TOF-MS provided an important basis for the diagnosis and treatment of HBV-related liver cancer.

【Key words】 MALDI-TOF-MS; Hepatitis B virus; Liver cancer; Proteomics

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.021

肝癌是一种比较严重发生于肝脏的恶性肿瘤,其病死率较高,而且有研究表明,50%~80%的肝癌病例与 HBV 密切相关^[1]。我国是乙肝大国,HBV 感染又是我国肝癌发病的首要危险因素,所以对于 HBV 相关肝癌患者来说,早期发现和早期治疗尤为关键,也是降低病死率的关键^[2]。蛋白质组学是一

种对蛋白质的整体水平进行分析,从而对 HBV 相关肝癌的发病机制、细胞模式以及功能练习等进行研究^[3]。目前认为质谱技术是鉴定蛋白质的一种手段,随着基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)以及电喷

雾电离质谱技术 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI) 等技术的兴起, 质谱技术得到了飞速的发展, 也为蛋白质组学的研究提供了技术支持^[4]。因此本文使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF-MS) 对 HBV 相关肝癌的蛋白质组学进行分析, 探究其在 HBV 相关肝癌蛋白质组学中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 研究对象: 选取 2018 年 1 月份—6 月份在首都医科大学附属北京友谊医院就诊的肝癌患者 30 例, 年龄 38~56 岁, 平均年龄 (47.50±8.50) 岁, 男性 16 例, 女性 14 例; 另外选取健康自愿者 25 例, 年龄同肝癌组, 男性 12 例, 女性 13 例。所有研究对象在性别、年龄等一般资料中对比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。选取的肝癌患者均经组织病理学证实的原发性 HBV 相关肝癌患者, 未接受放化疗, 无手术史; 健康自愿者也选择的是身体健康, 无肝病史, 肝功能正常的。本研究所有研究对象及其家属均知情, 签署家属知情通知书, 并经过我院伦理委员会批准。

1.2 排除标准 非乙型肝炎病毒感染者; 心、肺功能不全的患者; 肝转移癌患者; 并发其他恶性肿瘤的患者; 妊娠期、哺乳期妇女。

1.3 方法

1.3.1 样本采集: 抽取所有研究对象清晨空腹静脉血 5 ml, 在抗凝管中保存, 之后使用转速为 1 006.2×g, 离心 20 min, 放入洁净的 EP 试管中, 分离上层血清, 在 -80 °C 环境中保存, 待用。

1.3.2 样品处理: 将样品血清从 -80 °C 环境中取出, 在冰盒上溶解, 进行离心操作, 半径 13.50 cm, 20 000 r/min, 4 °C 离心 2 min。取 10 μl 的血清样本, 加入 20 μl 的 U9 裂解液 (9 mmol/L 尿素, 2% CHAPS, 1% 二硫苏糖醇 (DDT), 50 mmol/L Tris-HCl, pH9.0), 混匀后室温静置 30 min, 加入 170 μl 的洗涤缓冲液 (50 mmol/L 醋酸钠, pH4.0) 稀释。

1.3.3 磁珠操作: ①吸取 10 μl 磁珠结合缓冲液 (BB) 加入到 200 μl 的 PCR 管中, 加入 10 μl 磁珠, 吸打混匀, 加入 5 μl 血清, 再次吸打混匀, 静置 5 min; ②将样品放入磁珠分离器, 贴壁 1 min, 吸去悬浮液, 再加入 100 μl 磁珠清洗缓冲液 (WB), 于磁珠分离器上反复移动 PCR 管 10 次, 吸去悬浮液, 以上步骤重复 2 次; ③向 PCR 管中加入 5 μl 磁珠洗脱缓

冲液 (EB), 反复混匀, 室温静置 2 min, 然后放入磁珠分离器中, 贴壁 2 min, 吸取上清液放入新的 PCR 管中待检。

1.3.4 MALDI-TOF-MS 实验: 在测定样品之前, 先取 1 μl 标准品与 10 μl 基质 (α-氰基-4-羟基肉桂酸, HCCA) 混合, 取 1 μl 混合液点样于靶板上, 待晾干后即可上机检测。采用 Autoflex 质谱仪进行多点采集, 累加 5~10 个结晶点数据。取磁珠处理后的样品, 同标准品点样方法进行检测。质谱仪参数设置如下: 阳离子线性模式; 质量检测范围: 相对分子质量 $1\times 10^3\sim 20\times 10^3$; 激光强度 60%。

1.3.5 数据采集: 使用 Clinpro tools 软件采集数据并加以分析。

1.3.6 诊断模型的建立与盲法验证: 运用 Biomarker Pattern 5.0 (BPS 5.0) 软件自带的 TEST 模式随机将数据分为两组——建模组和盲测组。选取最佳组合建模, 并用盲测组样本进行盲法验证。

1.4 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析处理。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。采用 Biomarker Pattern 5.0 (BPS 5.0) 软件对差异蛋白进行筛选验证; 采用 SPSS19.0 软件进行敏感性以及特异性评价。

2 结果

2.1 样本蛋白峰数据分析与比较 将 1 μl 经磁珠处理后样品加入 MALDI-TOF 质谱仪中检测和分析, 我们共检测出 81 个峰, 其中 27 个蛋白质峰有统计学意义 ($P<0.05$)。而这 27 个蛋白峰中, 其中 17 个差异蛋白呈现上调 (质荷比 *M/Z*: 8 943.00、4 477.00、8 489.48、6 662.31、16 200.17、13 761.00、7 789.00、4 856.19、9 645.48、9 292.5、15 504.5、9 179.55、4 760.91、7 895.66、6 315.22、8 593.75、8 720.23), 10 个差异蛋白呈现下调 (质荷比 *M/Z*: 7 777.27、9 550.00、4 097.00、4 177.00、4 700.91、5 317.22、8 282.61、3 960.65、5 701.52、5 916.07)。比较这 27 个蛋白质峰, 质荷比 (*M/Z*) 为 9 179.55、7 789.00 的两种蛋白在癌症组呈高表达, 而在正常组呈低表达; 质荷比 (*M/Z*) 为 4 097.00 的蛋白在正常组呈高表达, 而在癌症组呈低表达; 而且它们的表达差异具有统计学意义 ($P<0.001$), 见表 1。

表 1 HBV 相关肝癌患者与正常对照的差异蛋白峰浓度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of differential peak protein concentration between patients with HBV-related liver cancer and normal control

| 肝癌组 | 正常组 | 质荷比 (M/Z) | t | P |
|------------|------------|-----------|-------|----------|
| 9.29±1.56 | 1.05±0.12 | 8 943.00 | 26.30 | 0.006 83 |
| 1.20±0.10 | 0.30±0.01 | 4 477.00 | 44.74 | 0.004 34 |
| 10.77±3.58 | 6.87±1.01 | 8 489.48 | 17.42 | 0.007 73 |
| 12.82±3.89 | 8.06±1.08 | 6 662.31 | 17.97 | 0.009 12 |
| 8.83±1.32 | 7.63±0.67 | 16 200.17 | 4.12 | 0.006 22 |
| 0.62±0.02 | 0.23±0.01 | 13 761.00 | 88.61 | 0.003 45 |
| 17.23±2.89 | 3.55±0.82 | 7 789.00* | 14.52 | 0.000 32 |
| 3.14±0.58 | 2.28±0.23 | 4 856.19 | 6.96 | 0.006 64 |
| 8.10±4.28 | 4.95±0.98 | 9 645.48 | 26.43 | 0.009 02 |
| 27.25±4.01 | 15.93±2.67 | 9 292.50 | 12.05 | 0.027 78 |
| 0.33±0.02 | 0.14±0.01 | 15 504.50 | 43.17 | 0.002 39 |
| 18.11±1.12 | 3.96±1.11 | 9 179.55* | 3.81 | 0.000 23 |
| 4.39±0.99 | 2.85±0.14 | 4 760.91 | 7.70 | 0.009 87 |
| 5.49±2.01 | 3.27±0.32 | 7 895.66 | 20.20 | 0.017 83 |
| 10.54±2.00 | 6.96±1.04 | 6 315.22 | 8.08 | 0.002 22 |
| 11.45±2.06 | 3.21±0.78 | 8 593.75 | 18.88 | 0.007 85 |
| 13.69±2.59 | 4.32±0.99 | 8 720.23 | 17.06 | 0.002 34 |
| 4.09±0.98 | 15.87±2.97 | 7 777.27 | 20.46 | 0.004 35 |
| 4.51±0.72 | 5.15±4.05 | 9 550.00 | 27.45 | 0.007 96 |
| 3.42±0.58 | 16.12±1.03 | 4 097.00* | 12.23 | 0.000 78 |
| 6.95±0.24 | 11.36±2.12 | 4 177.00 | 24.17 | 0.036 74 |
| 1.13±0.03 | 3.62±0.66 | 4 700.91 | 20.68 | 0.029 87 |
| 4.65±0.98 | 8.04±1.58 | 5 317.22 | 9.73 | 0.033 36 |
| 4.12±0.97 | 6.16±1.01 | 8 282.61 | 7.62 | 0.006 67 |
| 0.27±0.01 | 3.58±0.57 | 3 960.65 | 31.86 | 0.007 83 |
| 2.71±0.26 | 4.92±0.95 | 5 701.52 | 12.17 | 0.005 64 |
| 3.35±0.67 | 6.65±2.01 | 5 916.07 | 18.71 | 0.005 32 |

注:组成诊断模型的差异蛋白峰用 * 标记

Note: The differential peaks that make up the diagnostic model are marked with “*”

2.2 肝癌诊断模型及盲法验证 运用 Biomarker Pattern 5.0(BPS 5.0)软件自带的 TEST 模式随机将数据分为两组——建模组 (35 例)和盲测组 (20 例),以 ROC 曲线下面积最大的组合为最佳诊断组合建立模型。通过 BPS5.0 软件比较与筛选,发现质荷比 (M/Z)分别为 9179.55、7789.00、4097.00 的 3 个差异蛋白有统计学意义 ($P < 0.001$),可以正确的将 HBV 相关肝癌患者和健康自愿者区分开。联合应用它们建立的诊断模型,其敏感性为 85.00% (17/20),特异性为 93.33% (14/15)。再对此模型进行盲法验证,结果显示:盲测组的 20 例样本中,有 17 例判断正确,3 例判断错误。其中 12 例 HBV 相关肝癌患者中,10 例判断为癌症,2 例判断为正常,而 8 例正常样本中 7 例判断为正常,1 例判断为癌

表 2 HBV 相关肝癌诊断模型及其盲法验证

Tab.2 The diagnosis model and blind test of HBV-related liver cancer

| 蛋白组学判定 | 肝癌诊断模型 | | 合计 (n) | 盲证验证 | | 合计 (n) |
|----------|----------|-----|--------|----------|-----|--------|
| | HBV 相关肝癌 | 正常人 | | HBV 相关肝癌 | 正常人 | |
| 病理结果 (n) | 17 | 3 | 20 | 10 | 1 | 11 |
| 验证结果 (n) | 1 | 14 | 15 | 2 | 7 | 9 |
| 合计 (n) | 18 | 17 | 35 | 12 | 8 | 20 |

症,其敏感性 90.91% (10/11),特异性为 77.78% (7/9),见表 2。

3 讨论

肝癌是在全世界范围内发病率较高的恶性肿瘤之一,而我国是乙肝大国,HBV 感染的肝癌又是重中之重。目前临床上为了降低其发病率和病死率,大多致力于对 HBV 相关肝癌的防治研究上,寻找有效的发病标志物也是对其防治的关键所在。现阶段对于 HBV 相关肝癌的发病标志物的研究具有一定的缺陷,因此临床上致力于通过对 HBV 相关肝癌的蛋白质组学的研究来解决其生物标志物研究上存在的缺陷。临床上最先是对基因水平进行研究,随着现代基因测序计划的完成,人类逐渐认识到仅仅通过 DNA 基因序列是不能完全得到基因的全部信息的,因此要研究基因进行表达的最终产物——蛋白质^[5]。在本研究实验中,运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对 HBV 相关肝癌的蛋白组学进行研究检测,探究其在 HBV 相关肝癌蛋白组学中的应用价值。

蛋白质组的概念最先是由 Marc Wilkins 提出的,其主要是指在特定的环境下,一个基因组或者一个细胞、一种生物所表达出来的所有的蛋白质,因此对于蛋白质组所有的研究被称为蛋白质组学^[6]。蛋白质组学是对蛋白质组性质进行全面研究,其技术主要包括生物信息学、蛋白质分离以及蛋白质鉴定等三个方面,对于其研究是以双相电泳为核心的结合质谱技术来对蛋白进行分离、分析以及鉴定序列^[7-8]。近年来随着质谱技术的快速发展,其在生物大分子的应用中,为蛋白质组的研究提供了一种快速、准确以及高通量、灵敏的检测方法支撑,目前生物质谱技术已经成为研究蛋白质组学的支撑技术^[9]。

MALDI-TOF-MS 作为近年来医学发展的先进技术,因其高通量、高灵敏度等特点,为蛋白质组学的

研究提供了一种高效的方法。虽然质谱技术与蛋白芯片联合使用可用于分析血清蛋白/多肽,但是蛋白芯片的表面积小,对于低丰度蛋白的富集不完全,而低丰度蛋白含有许多尚未研究的生物信息,其表达水平是机体对疾病状态的反映,对疾病的诊断有一定作用。因此,寻找疾病的标志物首先必须对样本进行预处理,尽量去除高丰度的白蛋白等。弱阳离子磁珠(WCX)分离提取是近年来使用较多的一种样品预分离提取方法,因其表面积大,吸附力强,磁珠表面可以进行不同的修饰,使其表可逆性结合具有某些特性的分子,能很好地捕获人血清中低丰度蛋白质和多肽,消除大分子蛋白的干扰,十分适用于临床检测^[10]。

MALDI-TOF-MS 技术的原理是将具有一定波长激光的小分子物质作为基质,使分析物分散于基质分子与其进行一定比例的混合形成晶体,然后通过激光照射晶体,最后导致基质晶体升华,最终使干燥的基质和分析物膨胀,最终进入气相^[11-12]。陈兵等^[13]在其研究实验中运用 MALDI-TOF-MS 技术分析原发性肝癌骨转移患者血清多肽差异谱,成功鉴定出了 7 条肽段,这些肽段可能成为潜在的诊断 HCC 骨转移的分子标志物。有研究显示,将双向电泳和 MALDI-TOF-MS 相结合,检测出 19 个差异蛋白,经与数据库比对后,DNAJB11 在 HCC 组织中表达上调,PSMA3 在 HCC 组织中表达下调^[3]。盛恒炜等^[14]采用 MALDI-TOF-MS 技术分析 HCC 与正常肝组织的蛋白表达差异,发现 27 个具有统计学差异的蛋白点,其中 Actin, cytoplasmic 1 和 Ras 相关蛋白可能是潜在的肝癌标记物,且可能为肝癌的发生机制和干预治疗研究提供新的靶点。

本研究中发现,使用 MALDI-TOF-MS 技术检测鉴定出了较多种蛋白峰,并从中筛选出 27 种差异具有统计学意义的蛋白质峰($P < 0.05$);后用软件筛出 3 种差异具有统计学意义的蛋白质峰($P < 0.001$),建立了肝癌诊断模型,盲法验证此模型的特异性以及敏感性均较高。

综上所述,运用 MALDI-TOF-MS 对 HBV 相关肝癌蛋白质组学进行检测分析,可以有效检测出具有差异的血清差异蛋白,为 HBV 相关肝癌的诊断和治疗提供了重要的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孙菲:实验操作、论文撰写;王刚、张金仿:数据处理、统计学分析;苏建荣:研究指导、论文修改

参考文献

- [1] 董绍斌,王富珍,张爽,等.原发性肝癌合并 HBV 感染者的 HBV 基因特征分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2017,31(2):92-97. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2017.02.002.
- [2] 王若帆,立众,立鑫,等.肝细胞癌病因及发病机制的研究进展[J].山东医药,2018,58(17):107-112. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2018.17.033.
- [3] 王江红,李启英,石洋,等.人原发性肝癌相关抗原的蛋白质组学初步研究[J].第三军医大学学报,2017,39(1):72-78. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201606108.
- [4] 任锋,王媛媛,段钟平,等.MALDI-TOF-MS 技术应用于肝细胞癌蛋白质组学的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2008,17(12):962-965,970. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2008.12.002.
- [5] 姜颖,肖井仁,韩俊伟,等.蛋白质组学在肝癌研究中的应用进展[J].国际免疫学杂志,2015,38(2):161-163,172. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2015.02.014.
- [6] 刘伟,刘书广,韩留福.蛋白质组学及其研究技术概述[J].生物学教学,2018,43(5):4-6. DOI: 10.3969/j.issn:1004-7549.2018.05.002.
- [7] 梁劲松,梁中夏.蛋白质组学技术在肝病学研究中的应用进展[J].内科,2015,10(2):260-263. DOI: 10.16121/j.cnki.cn45-1347/r.2015.02.49.
- [8] Lădaru A, Bălănescu P, Stan M, et al. Candidate proteomic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease (steatosis and non-alcoholic steatohepatitis) discovered with mass-spectrometry: a systematic review[J].Biomarkers. 2016,21(2):102-114. DOI: 10.3109/1354750X.2016.1118542.
- [9] 杨倩,王丹,常丽丽,等.生物质谱技术研究进展及其在蛋白质组学中的应用[J].中国农学通报,2015,31(1):239-246. DOI: 10.11924/j.issn.1000-6850.2014-0018. DOI: 10.11924/j.issn.1000-6850.2014-0018.
- [10] 朱宁,谭米多,李震,等.三种磁珠提取血清低分子蛋白质/肽比较[J].中国医药指南,2012,10(21):474-475. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2012.21.352.
- [11] Wang J, Qiu S, Chen S, et al. MALDI-TOF MS imaging of metabolites with a N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride matrix and its application to colorectal cancer liver metastasis[J]. Anal Chem, 2015,87(1):422-430. DOI: 10.1021/ac504294s.
- [12] 王沧海,吴静,宿慧,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术筛选乙型肝炎肝硬化至肝癌过程中血清标志蛋白的初步研究[J].中国全科医学,2017,20(20):2551-2554. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2017.06.y04.
- [13] 陈兵,何健,曾昭冲,等.应用 MALDI-TOF-MS 检测原发性肝癌骨转移患者血清的多肽差异谱[J].肿瘤,2012,32(8):643-649. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2012.08.014.
- [14] 盛恒炜,屠伟峰,霍枫.肝细胞癌亚细胞器蛋白质组学初步探讨[J].肝胆胰外科杂志,2013,25(3):215-218. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1954.2013.03.012.

(收稿日期:2018-11-21)

(本文编辑:陈培莉)