

## 基于蛋白质组学的胸腔积液蛋白标志物筛选与验证

李志斌 束军 孟静

**摘要** 目的 用蛋白质组学技术对比分析良、恶性胸腔积液标本,寻找蛋白标志物为其鉴别诊断提供帮助和新线索。方法 采用双向电泳分离、搜寻蛋白,基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定蛋白,ELISA验证蛋白在良恶性胸腔积液样本中具体含量。结果 恶性组胶图对比良性组共显示明显差异蛋白点(上调或下调 $\geq 2$ 倍)43个,上调9个,下调34个;对其中7个显著差异点(上调或下调 $\geq 3$ 倍)质谱鉴定明确了具体类型;挑选显著差异点中免疫球蛋白 $\lambda$ (Ig $\lambda$ )、结合珠蛋白(Hp)进行ELISA验证,结果表明Ig $\lambda$ 在良、恶性胸腔积液中含量差异无统计学意义,Hp含量组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。进一步评估显示诊断标准为胸腔积液中Hp  $< 389.02 \mu\text{g/L}$ 时,诊断恶性胸腔积液灵敏度为75.00%,特异度为52.38%。结论 蛋白质组学技术的应用对胸腔积液蛋白标志物搜寻具有较大帮助,本研究搜寻到的标志物Hp对于良、恶性胸腔积液鉴别诊断具有一定

价值,值得进一步研究。

**关键词** 免疫球蛋白 $\lambda$ ; 结合珠蛋白; 蛋白质组学; 胸腔积液; 诊断

中图分类号 Q 51; R 561.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0700-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.017

胸腔积液是肺、胸膜疾病或其他多种全身疾病的常见临床表现之一。根据病因的不同,胸腔积液可分为恶性胸腔积液和良性胸腔积液。恶性胸腔积液最常见病因为肺癌,尤以肺腺癌多见,良性胸腔积液最常见病因为肺结核和肺部感染<sup>[1]</sup>。不同病因导致的胸腔积液在治疗方案和预后上具有显著不同,因此病因的鉴别诊断对胸腔积液的诊治具有重要临床意义。但是,目前临床上对于两者的鉴别诊断有一定困难,一旦出现漏诊和误诊后果严重。蛋白质组学(proteomics)是一门大规模、高通量、系统化研究某一类型细胞、组织或体液中所有蛋白质组成及其功能的新兴学科<sup>[2]</sup>。目前,蛋白质组学已在研究生物体及其器官的蛋白质组成、发现蛋白质相互作用网络及关系、探索疾病的发病机制与治疗途

2017-01-11 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);

安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A173)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230032

作者简介:李志斌,男,硕士研究生;

束军,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: J. Shu

@126.com

## Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Dunhuang, Gansu province

Fang Yuan, Xu Changqing, Zhou Chang, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract** **Objective** To estimate the seroprevalence and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infection in the general population in Dunhuang, Gansu province. **Methods** We examined 1 000 sera specimens using an ELISA-based assay that measured antibodies to one KSHV latent antigen (ORF73) and two KSHV lytic proteins (ORF65 and ORF K8.1). **Results** Of the 1000 subjects, the seroprevalence of KSHV in the general population was 19% and slightly higher in the male than that in the female (22.9% vs 16.6%,  $P = 0.016$ ). Statistical analysis showed that seroprevalence of KSHV had significant associations with syphilis ( $P = 0.004$ ) and hepatitis C virus infection ( $P = 0.027$ ), but it had no differences with the age, hepatitis B virus infection. **Conclusion** These results indicate that the infection rates of KSHV in Dunhuang, Gansu province are higher than that in other areas in China. The infection of KSHV is significantly associated with the gender. Syphilis infection is the most important independent risk factor for KSHV infection in this area.

**Key words** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; seroprevalence; risk factor; Dunhuang; Gansu

径等领域取得了诸多成果<sup>[3-4]</sup>。将蛋白质组学应用于胸腔积液研究,也具有可观的前景<sup>[5]</sup>。该研究利用双向凝胶电泳技术对良、恶性胸腔积液样本中大量蛋白质进行分离、相对定量,比较筛选出差异明显的蛋白质,并进行质谱鉴定和初步的诊断价值验证,试图寻找到价值较大的蛋白标志物,为良、恶性胸腔积液的鉴别诊断提供帮助和新线索。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取2015年10月~2016年5月,安徽医科大学第四附属医院内科41例胸腔积液患者的临床病例资料及胸腔积液标本。其中,良性组21例,包括男17例,女4例,年龄24~96(65.62±18.13)岁,其中肺部感染9例,肺结核8例,心力衰竭3例,肝硬化1例;恶性组20例,包括男13例,女7例,年龄41~88(60.70±15.35)岁,其中非小细胞肺癌18例(肺腺癌13例,肺鳞癌2例,类型不明确3例),小细胞肺癌2例。结核性胸腔积液诊断需符合以下至少一项:①痰涂片或胸腔积液中找到抗酸杆菌;②组织或胸膜活检发现抗酸杆菌;③结核中毒症状、结核菌素试验阳性、胸片提示结核活动病灶,抗结核治疗有效;其他良性病例诊断通过结合临床表现、影像学检查及疗效观察明确。恶性胸腔积液诊断:通过胸腔积液脱落细胞学检查或者组织病理学检查明确。双向电泳时标本取自以上队列中两例年龄相近的男性患者,恶性组为69岁肺腺癌患者,良性组为60岁肺部感染患者。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本收集** 于患者入院首次行胸腔穿刺时,留取胸腔积液标本10 ml。标本收集后在4℃条件下2 500 r/min离心10 min,吸取上清液,分装上清液于1.8 ml冻存管中,-80℃保存,保存期间避免反复冻融,留待检测。

**1.2.2 双向电泳前标本去高丰度蛋白预处理** 标本在未去除高丰度蛋白前,含大量高丰度蛋白,限制了低丰度蛋白的检出,尽管低丰度蛋白含量低,但其种类却十分丰富,并且提供了相当重要的信息。去高丰度蛋白使用专用试剂盒(ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit,德国Merck公司),遵循说明书进行操作。

**1.2.3 双向电泳** 标本取自2例年龄相近的男性患者,恶性组为69岁肺腺癌患者,良性组为60岁肺

部感染患者。双向电泳第一向等电聚焦采用pH 3~10,长度24 cm的IPG胶条(美国GE Healthcare公司),参数及程序设定为:温度20℃、最大电流设定在50 μA/胶条,聚焦程序50 V×8 h、100 V×1 h、200 V×1 h、500 V×1 h、1 000 V×1 h、1 000~10 000 V×1 h、100 000 V×12 h、500 V×12 h。双向电泳第二向采用SDS-PAGE电泳,参数设定为:Ettan-DALT-Six系统,水浴循环仪设定温度为15℃,电泳设置为100 V×45 min、200 V电泳至溴酚蓝前沿刚好跑出凝胶。电泳结束后染色使用硝酸银染色法。

**1.2.4 凝胶图像获取及差异蛋白点分析** 应用Image Scanner(美国GE Healthcare公司)扫描仪进行扫描(灰度模式,光密度值为300 dp)获得图像,使用PDquest 8.0软件对图像进行分析,操作步骤为凝胶蛋白点检测、图像背景处理、蛋白点灰度值标准化、不同凝胶间蛋白点匹配。分别将良性胸水组和恶性胸水组分析后的图片进行比较,进行差异蛋白点筛选,胶点光密度倍数变化>2或<0.5认为是差异蛋白,满足要求的蛋白即被列出和统计,并将不同比较组中表达量上调的蛋白点标注到对应的双向电泳图谱上。

**1.2.5 胶点蛋白酶解和质谱鉴定** 选择上一步差异点分析中差异非常显著的胶点,经过切胶、脱色、干胶、酶切、肽段提取多个步骤,最后进行质谱鉴定,所用仪器为ABI5 800串联飞行时间质谱仪。

**1.2.6 候选标志物的ELISA验证** 选取结合珠蛋白(haptoglobin, Hp)和免疫球蛋白λ(immunoglobulin λ, Igλ)这两个与免疫炎症及肿瘤过程密切相关、在不同类型胸水中表达差异较大的蛋白,在20例恶性标本和21例良性标本中使用ELISA法进行验证。标本首先于室温下重分解冻混匀,之后遵循试剂盒说明书对胸腔积液中Hp和Igλ进行测定,最后使用酶标仪在450 nm波长下读数,并根据吸光度(optical density value, OD)值计算样品浓度。本实验所用ELISA试剂盒由安徽欣乐生物技术有限公司提供,酶标仪为雷杜公司产品。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 16.0软件对实验数据进行相关统计学分析。采用Kolmogorov-Smirnov test以确定所得数据是否符合正态分布。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较使用t检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。采用受试者工作特征曲线

( receiver operating characteristic curves ,ROC) 用以分析和评价试验所得数据。

### 2 结果

2.1 双向凝胶电泳结果 经双向电泳、硝酸银染色、扫描仪灰度模式扫描 ,所得电泳图片如图 1 所示。

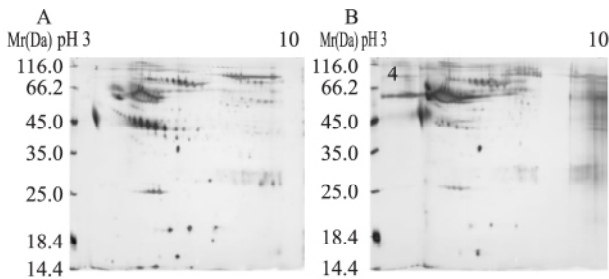


图 1 双向凝胶电泳图

A: 良性组双向凝胶电泳图; B: 恶性组双向凝胶电泳图

2.2 良、恶性凝胶图谱差异点分析结果 双向电泳凝胶图像经软件及人工比对 ,恶性组与良性组相比较 ,共显示表达差异明显的蛋白点( 表达上调或者下调≥2 倍的蛋白点) 43 个 ,其中上调 2 倍及以上的蛋白点 9 个 ,下调 2 倍及以上的蛋白点 34 个 ,如图 2 所示。

2.3 质谱鉴定结果 在 43 个差异蛋白点中 ,选择 7 个差异非常显著的点进行质谱鉴定( 选择标准: ① 3 倍以上或者 3 倍以下上调或者下调的点; ② 在条件①的基础上结合凝胶图谱比对胶点的深浅和大小; ③ 避免选择位于凝胶极边缘的胶点 ,防止因蛋白分离不佳对质谱鉴定造成影响) 。经质谱鉴定所获得的 7 个蛋白的具体信息见表 1。

2.4 ELISA 验证结果 经 ELISA 验证 ,Igλ 在良性组与恶性组间含量差异无统计学意义 ,Hp 在两组间含量差异有统计学意义( P < 0. 05) ,如表 2 所示。

对于在良性组与恶性组间含量差异有显著性的 Hp 的临床价值进行初步探讨 ,绘制 ROC 曲线( 图 3) ,并得出灵敏度和特异度。选取约登指数为 0. 27 ,胸腔积液中 Hp < 389. 02 μg/L 为临界点判断胸腔积液为恶性 ,此时的灵敏度为 75. 00% ,特异度为 52. 38% 。

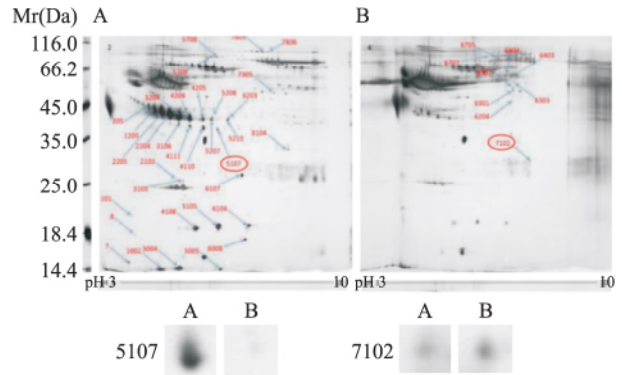


图 2 差异蛋白点标注与胶点局部放大图

A: 良性组双向凝胶电泳图及下调差异点标注; B: 恶性组双向凝胶电泳图及上调差异点标注

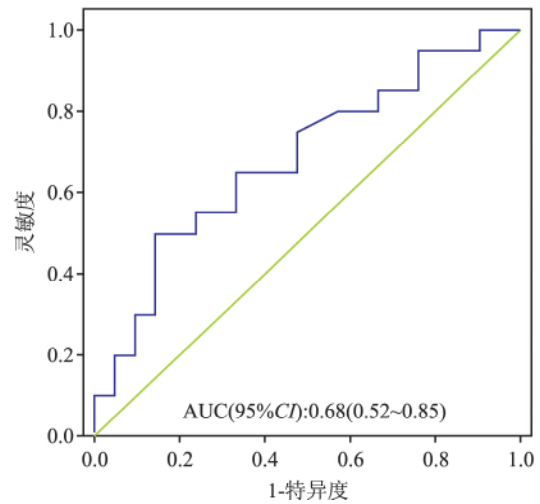


图 3 恶性胸腔积液 Hp ROC 曲线

表 1 质谱鉴定 7 个蛋白具体信息

| 差异点编号 | 差异点蛋白名称       | 蛋白分子量  | 蛋白等电点 | 上调或下调 |
|-------|---------------|--------|-------|-------|
| 7102  | 免疫球蛋白 λ       | 11 500 | 6. 02 | ↑     |
| 6403  | 异构核 L 核糖核蛋白   | 64 720 | 8. 46 | ↑     |
| 6404  | 免疫球蛋白 alpha-1 | 38 486 | 6. 08 | ↑     |
| 6301  | 血红素结合蛋白       | 52 385 | 6. 55 | ↑     |
| 6008  | 角蛋白           | 66 170 | 8. 15 | ↓     |
| 5107  | 结合珠蛋白         | 45 861 | 6. 13 | ↓     |
| 5105  | 结合珠相关蛋白       | 39 518 | 6. 63 | ↓     |

表2 胸腔积液中 Igλ 和 Hp 浓度( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目           | 良性组( $n=21$ )  | 恶性组( $n=20$ )   | P 值   | t 值   |
|--------------|----------------|-----------------|-------|-------|
| 免疫球蛋白 λ(U/L) | 413.12 ± 99.92 | 448.01 ± 103.10 | 0.28  | -1.10 |
| 结合珠蛋白(μg/L)  | 386.85 ± 51.58 | 344.93 ± 67.51  | <0.05 | 2.24  |

### 3 讨论

对于双向电泳的结果而言,通过良、恶性胸腔积液凝胶电泳的软件及人工比对分析,共显示 43 个表达差异明显的蛋白点,且恶性胸腔积液相对良性而言下调蛋白的数量多于上调蛋白的数量(下调 34 个,上调 9 个)。结合图 2 分析显示,下调蛋白较为平均的在等电点 3~10、分子量 14~116 ku 的区域内,而上调蛋白则较为集中的分布在等电点 5~8、分子量 45~116 ku 的区域内。这些信息提示了恶性胸腔积液中上调蛋白在分子量、等电点两个维度上具有分布比较集中的特点,缩小了搜寻上调蛋白的范围,为进一步研究提供了新的线索。在接下来的实验中,若重点放在搜寻更多上调蛋白的方向上,则双向电泳第一向等电聚焦可采用和本次相同长度(24 cm) pH 4~7(本次 pH 3~10)的 IPG 胶条,在凝胶面积相同的情况下,提高了分辨率,增大了搜寻到更多上调差异蛋白的可能性。

在质谱鉴定的 7 个显著差异蛋白中,Igλ、Hp 这两个蛋白与肿瘤关系密切。相关文献<sup>[6-8]</sup>报道,这两个蛋白与多种类型的消化道肿瘤密切相关,但是在呼吸系统肿瘤,特别是在胸腔积液中的相关研究却少见。采用 ELISA 法进一步验证表明,Hp 对于恶性胸腔积液的诊断具有更高的价值。相关文献<sup>[9]</sup>报道显示,Hp 由两个氨基酸序列不同的 α 链和 β 链组成的,不同表型的触珠蛋白 β 链相同而 α 链不同,因此可以根据 α 链的不同分为多个亚型。Hp 的不同亚型在疾病中所起到的作用也不完全相同,例如在呼吸系统疾病中,不同的亚型在小细胞肺癌、肺结核中的表达程度各不相同,甚至不同亚型的含量变化直接影响到疾病的预后<sup>[9-11]</sup>。因此,明确 Hp 在不同种类胸腔积液中表达的亚型,不同亚型在疾病中发挥的作用,将不同亚型分开加以研究,在此基础上建立更好的诊断模型,其灵敏度和特异度都会有所提升。更值得关注的是,Hp 不仅参与了急性炎症反应,并且在肿瘤微环境中参与了和巨噬细胞、肿瘤细胞的相互作用<sup>[12]</sup>,还在瘤体胞外间质的降解、肿瘤细胞迁移过程中起到一定作用<sup>[13]</sup>。但是,

当前已有研究<sup>[9-13]</sup>更多关注的是血浆和组织中的 Hp,而对胸腔积液中 Hp 的研究较少,因此对于胸腔积液中 Hp 的进一步研究具有较为重要的意义和前景。

总之,本次研究使用蛋白质组学经典的双向电泳技术对良、恶性胸腔积液进行了蛋白标志物搜寻,获得了大量差异蛋白信息,结合质谱鉴定和 ELISA 进一步验证,找到了对于恶性胸腔积液的诊断具有一定价值与应用前景的 Hp。研究所获结果提示,基于蛋白质组学方法搜寻差异蛋白具有较高效率,结合其他方法进一步验证差异蛋白,能筛选出比较可靠的蛋白标志物。

在本次研究中,也存在一些问题需要改进。在蛋白的分离、鉴定和定量环节,本次采用的双向电泳技术虽然作为一项经典技术应用多年,但也存在一些局限性。双向电泳实验操作过程难以自动化,工作量较大,因此本次研究未能在更多样本中对更多数量的蛋白进行分离和鉴定。而且,电泳之后需要进行染色处理,不同蛋白质与染料的结合有所差异,可能使蛋白相对定量的结果出现一定的误差。在今后的研究中,使用更为先进的蛋白质组学技术,如自动化程度更高的液相色谱串联质谱技术,将会分离并鉴定出更多蛋白。对于蛋白定量而言,如果采用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术,可减小蛋白定量的误差,使得数据更为准确和可信。在差异蛋白的验证环节,使用 ELISA 法和其他验证方法(如 Western blot 法)共同验证,并扩大良、恶性胸腔积液组的样本含量,可找到更为可靠的蛋白标志物。随着蛋白质组学技术的不断改进与在胸腔积液领域更深入的应用,将对蛋白标志物的搜寻提供越来越多的便利,并对良、恶性胸腔积液的鉴别诊断提供越来越大的帮助。

### 参考文献

- [1] Thomas J M, Musani A I. Malignant pleural effusions: A review [J]. Clin Chest Med, 2013, 34(3): 459-71.
- [2] 尹稳,伏旭,李平. 蛋白质组学的应用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014, 30(1): 32-8.
- [3] Li N, Xu Z, Zhai L, et al. Rapid development of proteomics in

- china: From the perspective of the human liver proteome project and technology development [J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57( 12): 1162 – 71.
- [4] 程娟, 马华林, 戴勇. 系统性红斑狼疮外周血单个核细胞磷酸化蛋白质组学研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49( 7): 962 – 5.
- [5] Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, et al. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2013, 32( 2): 129 – 42.
- [6] Yang S B, Chen X, Wu B Y, et al. Immunoglobulin kappa and immunoglobulin lambda are required for expression of the anti-apoptotic molecule bcl-xl in human colorectal cancer tissue [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44( 12): 1443 – 51.
- [7] Shu H, Kang X, Guo K, et al. Diagnostic value of serum haptoglobin protein as hepatocellular carcinoma candidate marker complementary to alpha fetoprotein [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24( 5): 1271 – 6.
- [8] Lin Z, Simeone D M, Anderson M A, et al. Mass spectrometric assay for analysis of haptoglobin fucosylation in pancreatic cancer [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10( 5): 2602 – 11.
- [9] Shah A, Singh H, Sachdev V, et al. Differential serum level of specific haptoglobin isoforms in small cell lung cancer [J]. *Curr Proteomics*, 2010, 7( 1): 49 – 65.
- [10] Kasvosve I, Gomo Z A, Mvundura E, et al. Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000, 4( 8): 771 – 5.
- [11] Pavan Kumar N, Anuradha R, Andrade B B, et al. Circulating biomarkers of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in children [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20( 5): 704 – 11.
- [12] Dempsey E, Rudd P M. Acute phase glycoproteins: Bystanders or participants in carcinogenesis? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1253: 122 – 32.
- [13] Smeets M B, Fontijn J, Kavelaars A, et al. The acute phase protein haptoglobin is locally expressed in arthritic and oncological tissues [J]. *Int J Exp Pathol*, 2003, 84( 2): 69 – 74.

## Proteomic techniques based protein biomarkers searching and validation in pleural effusion

Li Zhibin, Shu Jun, Meng Jing

(*Dept of Respiratory Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** Through analyzing benign and malignant pleural effusion samples by proteomic techniques, finding protein biomarkers to provide help and new clues for effusion differential diagnosis. **Methods** Two-dimensional electrophoresis( 2-DE) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry( MALDI-TOF-MS) were used to search and identify protein biomarkers, enzyme linked immunosorbent assay( ELISA) was to validate the biomarkers. **Results** By comparing malignant group with benign group, 43 significantly different protein spots( Up or down regulated  $\geq 2$  times) were found. Including 9 up regulated spots and 34 down regulated spots. And 7 spots were identified( Up or down regulated  $\geq 3$  times) by MALDI-TOF-MS and validated 2 spots immunoglobulin  $\lambda$ ( Ig $\lambda$ ) and haptoglobin( Hp) by ELISA. The results showed that Ig $\lambda$  showed no statistical significance between two groups, while Hp showed the statistical significance(  $P < 0.05$ ). The diagnostic sensitivity and specificity of Hp in malignant pleural effusion were 75.00% and 52.38% at diagnostic cut-off point of 389.02  $\mu\text{g/L}$ . **Conclusion** The application of proteomics technology has a great help with protein biomarkers searching in pleural effusion. HP has a certain value for the differential diagnosis of benign and malignant pleural effusion and worthy of further study.

**Key words** immunoglobulin  $\lambda$ ; haptoglobin; proteomics; pleural effusion; diagnosis