

应用表面加强激光解吸 - 电离飞行时间质谱技术 筛选特发性肺纤维化的差异蛋白

魏路清 李学任 刘斌 彭守春

【摘要】目的 筛查特发性肺纤维化(IPF)患者支气管肺泡灌洗液(BALF)和血清中的差异蛋白,以期发现对诊断有价值的生物标志物。**方法** 应用表面加强激光解吸 - 电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术对 34 例 IPF 患者(IPF 组)和 25 例非吸烟健康者(对照组)血清和 BALF 进行检测获得蛋白质指纹图谱,用生物标志物模式软件、生物标志物导向软件对测得的数据进行处理。**结果** BALF 中共检测出 247 个蛋白峰,与对照组比较,IPF 组 13 个蛋白质峰差异有统计学意义,其中 7 个标志物峰强度显著增加,质荷比分别为 2240.57、3459.32、3501.78、4146.50、4516.51、4615.88、5651.26(均 $P < 0.01$);6 个标志物峰强度显著下降,质荷比分别为 4989.91、5043.68、6968.76、11 687.70、11 782.10、14 733.30(均 $P < 0.01$)。血清中共检测出 142 个蛋白峰,与对照组比较,IPF 组 9 个蛋白质峰差异有统计学意义,且 9 个标志物峰强度均显著增加,质荷比分别为 3382.59、3453.39、4608.28、5825.48、8936.76、9164.27、11 525.30、11 689.40、11 886.00($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** SELDI-TOF-MS 技术用于 IPF 患者 BALF 和血清蛋白质谱分析可筛选出有意义的差异表达蛋白,为进一步发现对 IPF 诊断有价值的生物标志物提供了实验基础。

【关键词】 特发性肺纤维化; 支气管肺泡灌洗液; 血清; 表面加强激光解吸 - 电离飞行时间质谱技术; 蛋白质组学

Screening of potential proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis by using of surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrum WEI Lu-qing, LI Xue-ren, LIU Bin, PENG Shou-chun. Department of Respirology and Critical Care Medicine, Pingjin Hospital, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
Corresponding author: WEI Lu-qing, Email: luqing-wei@163.com

【Abstract】Objective To screen potential proteins in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum samples obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), for the purpose of discovering candidate biomarkers. **Methods** BALF and serum samples from 34 patients diagnosed IPF (IPF group) and 25 non-smoker healthy controls (control group) were collected. Surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) was used to obtain protein fingerprints from BALF and serum samples. Biomarker Wizard and Biomarker Pattern were introduced in bioinformatics analysis. **Results** A total of 247 protein peaks were detected in BALF, and 13 peaks with statistical difference compared with control group. Among 13 detected protein peaks, 7 with mass/charge ratio (M/Z) values of 2240.57, 3459.32, 3501.78, 4146.50, 4516.51, 4615.88, 5651.26 were statistically up-regulated (all $P < 0.01$); and 6 peaks with M/Z values of 4989.91, 5043.68, 6968.76, 11 687.70, 11 782.10, 14 733.30 were significantly down-regulated (all $P < 0.01$). In addition, 142 protein peaks were differentially expressed in serum samples, and 9 peaks with statistical differences. Among them, 9 peaks with M/Z values of 3382.59, 3453.39, 4608.28, 5825.48, 8936.76, 9164.27, 11 525.30, 11 689.40 and 11 886.00 were significantly up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), compared with control group. **Conclusions** The present work demonstrated that SELDI-TOF-MS technology be capable of detecting differentially expressed protein peaks in BALF and serum samples from IPF patients. Further investigations were guaranteed to elucidate their potential diagnostic value in clinical practice.

【Key words】 Idiopathic pulmonary fibrosis; Bronchoalveolar lavage fluid; Serum; Surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; Proteomics

特发性肺纤维化(IPF)是一种原因不明的、局限于肺部的、慢性、进行性纤维化间质性肺炎的一种

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.07.013

基金项目: 天津市应用技术研究与前沿技术研究计划项目(11JCYBJC11800); 武警医学院博士启动基金(WBS200808)

作者单位: 300162 天津, 武警后勤学院附属医院呼吸科

通信作者: 魏路清, Email: luqing-wei@163.com

特殊形式, 主要发生于老年人, 组织学或影像学表现为常见型间质性肺炎(UIP)^[1]。2011 年 IPF 诊治循证指南强调胸部薄层 CT(HRCT)是诊断 IPF 的最主要依据, 但 HRCT 显示的 UIP 样表现主要是蜂窝肺, 而蜂窝肺又是许多不同原因间质性肺疾病(ILD)晚期的共同改变, 因此临床上迫切需要找到

早期诊断 IPF 的特异性生物标志物^[2]。经气管镜获取的支气管肺泡灌洗液(BALF)能够提供支气管和肺泡中的细胞及可溶性成分,可以为发生在肺泡水平的免疫学、炎症、感染等过程以及肺部疾病的诊断提供重要信息^[3]。目前,表面加强激光解吸-电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术已经广泛应用于多种疾病的生物标志物的研究^[4-6]。因此,本研究中采用 SELDI-TOF-MS 技术筛选 IPF 患者 BALF 和血清中的差异蛋白,为进一步发现对 IPF 诊断有价值的生物标志物提供线索。

1 对象与方法

1.1 对象:选择本院呼吸科 2008 年 1 月至 2010 年 12 月诊治的 IPF 患者作为研究对象,最初纳入的患者按照中华医学会呼吸病学分会、美国欧洲呼吸协会关于 IPF 诊断和治疗指南^[7-8]的诊断标准入选,以后再对照 2011 年由美国胸科学会、欧洲呼吸学会、日本呼吸学会和拉丁美洲胸科学会共同制定的 IPF 诊治指南^[1],将不符合新指南标准的患者剔除,其中有 3 例经开胸肺活检诊断,并排除慢性过敏性肺炎、石棉肺、血管炎、结缔组织病、嗜酸粒细胞性肺炎、药物等因素所致的 ILD。对照组入选标准:①胸部影像学正常的咳嗽或胸闷患者,为筛查支气管疾病而行气管镜检查、检查未见明显异常,而且 BALF 细胞学常规检查无嗜酸粒细胞升高者;②因其他原因自愿行气管镜检查、检查结果正常且无心肺疾病者;③非吸烟者。最终 IPF 组 34 例,其中男性 28 例,女性 6 例;年龄 48~78 岁,平均(65.63±8.90)岁;对照组 25 例,其中男性 15 例,女性 10 例;年龄 22~74 岁,平均(46.00±19.10)岁。

本研究符合医学伦理学标准,经过医院伦理委员会批准,所有研究对象签署了支气管镜检查知情同意书。

1.2 实验仪器与试剂:生物标志物模式分析软件(BPS 软件)、SELDI-TOF-MS 仪、CM10 蛋白捕获芯片、奥林巴斯 CV260 电子纤维支气管镜、BALF 收集瓶、离心机、冰柜。实验所用试剂购自美国 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250 蛋白测定试剂盒购自上海宝曼生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 血清的收集和处理:抽取全血,未抗凝离心提取血清 5 ml, -80℃冻存备用。实验前取血清样品,4℃溶解,离心 2 min,取血清 10 μl,用 2 倍体积 U9 缓冲液稀释,冰浴振荡 30 min,30 μl 变性后样品加入 370 μl 相应的结合缓冲液(血清的总稀释倍数

达到 40 倍)混匀,上机。

1.3.2 BALF 的收集和处理:按照 2002 年 BALF 细胞学检测技术规范(草案)^[9]及 Leroy 等^[10]的方法收集 BALF,经离心去细胞沉着过滤后,再离心,考马斯亮蓝法测定上清中蛋白质浓度,调整最终浓度为 1 g/L,为了防止蛋白溶解,在上清液中加入蛋白酶抑制剂后 -86℃冰箱保存。在检测前取 BALF 样品溶解,每个芯片点需要 BALF 40 μl,用 1 倍体积的 U9 缓冲液稀释,将样品充分混匀,冰浴振荡 30 min,80 μl 变性后样品加入 120 μl 相应的结合缓冲液(BALF 总稀释倍数达到 5 倍)混匀,上机。

1.3.3 芯片处理及上机检测:取出 CM10 芯片,标记后将芯片装入生物芯片处理器;每孔加入 200 μl 结合缓冲液,离心振荡,甩掉缓冲液(重复操作 1 次);上样,在芯片处理器每孔中加入 100 μl 处理好的样品,离心振荡;每孔加入 200 μl 结合缓冲液,离心振荡,甩去孔中液体,再次加入结合缓冲液 200 μl(重复操作 1 次);每孔加入 200 μl 高效液相色谱法(HPLC)用水,甩干,晾干后,在每个加样孔上加芥子酸 0.5 μl(重复操作 1 次);晾干,即可上机测定。

1.4 统计学处理:采用蛋白质芯片阅读仪 II-C 型(美国 Ciphergen 公司)读取芯片信息,构建指纹图谱,输入生物标志物导向软件和 BPS 软件对获得的蛋白质质谱进行统计学分析。数据以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验。应用 SPSS 13.0 软件计算参与建模的差异蛋白的敏感度、特异度、正确率,用 χ^2 检验比较不同诊断模型上述指标的差异。用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下面积(AUC)评价诊断模型的正确性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中 SELDI-TOF-MS 结果(表 1):CM10 芯片在质荷比 1000~50 000 共检测出 247 个蛋白峰。与对照组相比,IPF 组 BALF 中有 13 个蛋白质峰差异有统计学意义,其中有 7 个标志物峰强度显著增加(均 $P < 0.01$),其质荷比分别为 2240.57、3459.32、3501.78、4146.50、4516.51、4615.88、5651.26;而 6 个标志物峰强度显著下降(均 $P < 0.01$),其质荷比分别为 4989.91、5043.68、6968.76、11 687.70、11 782.10、14 733.30。以上述 13 个差异蛋白建立诊断分类树,结果发现质荷比 3459.32、4516.51、4989.91、14 733.30 组合的 AUC 最高,为 0.949(图 1),经验证其敏感度为 91.2%(31/34),特异度为 92.0%(23/25),正确率为 89.8%(44/49)。

表 1 对照组与 IPF 组 BALF 中差异蛋白峰强度比较[M(Q_L, Q_U)]

组别	例数	不同质荷比差异蛋白峰强度						
		2240.57	3459.32	3501.78	4146.50	4516.51	4615.88	4989.91
对照组	25	1.22(0.51, 3.42)	1.39(0.34, 2.73)	1.48(0.88, 2.60)	1.05(0.40, 4.28)	0.01(-0.29, 0.49)	0.01(-0.49, 0.24)	6.01(2.74, 14.80)
IPF 组	34	2.86(2.10, 4.96)	6.70(3.32, 12.79)	5.48(1.39, 10.82)	4.89(2.40, 9.44)	0.43(-0.05, 1.41)	0.42(0.05, 0.95)	2.05(0.64, 4.34)
P 值		0.0045	0.0007	0.0066	0.0076	0.0087	0.0023	0.0009
表达变化		上调	上调	上调	上调	上调	上调	下调

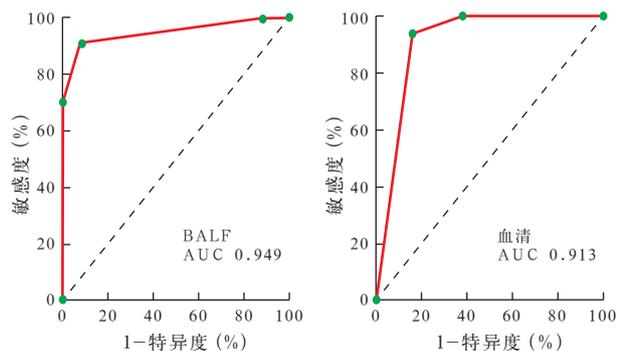
组别	例数	不同质荷比差异蛋白峰强度					
		5043.68	5651.26	6968.76	11 687.70	11 782.10	14 733.30
对照组	25	1.57(0.12, 3.69)	0.18(-0.24, 0.58)	0.65(0.17, 1.50)	0.61(0.32, 1.17)	0.83(0.43, 1.86)	0.48(0.24, 0.90)
IPF 组	34	-0.12(-0.37, 0.70)	0.89(0.20, 1.73)	0.14(-0.12, 0.58)	0.31(0.18, 0.67)	0.41(0.16, 0.79)	0.14(0.03, 0.25)
P 值		0.0012	0.0011	0.0073	0.0050	0.0041	0.0000
表达变化		下调	上调	下调	下调	下调	下调

注: IPF: 特发性肺纤维化, BALF: 支气管肺泡灌洗液

表 2 对照组与 IPF 组血清中差异蛋白峰强度比较[M(Q_L, Q_U)]

组别	例数	不同质荷比差异蛋白峰强度								
		3382.59	3453.39	4608.28	5825.48	8936.76	9164.27	11 525.30	11 689.40	11 886.00
对照组	25	2.59(1.43, 4.23)	1.59(0.89, 2.78)	0.14(-0.17, 0.41)	1.52(-0.03, 1.95)	3.66(2.72, 6.63)	0.36(0.29, 1.40)	0.29(0.07, 0.50)	0.61(0.44, 1.03)	0.07(0.02, 0.35)
IPF 组	34	4.29(3.10, 6.48)	3.59(1.82, 5.91)	0.96(0.54, 17.56)	2.86(0.82, 6.03)	6.47(4.55, 10.58)	1.54(0.89, 6.66)	1.15(0.25, 3.72)	1.56(0.73, 7.67)	0.37(0.19, 1.24)
P 值		0.0197	0.0220	0.0197	0.0140	0.0449	0.0052	0.0125	0.0040	0.0017
表达变化		上调	上调	上调	上调	上调	上调	上调	上调	上调

注: IPF: 特发性肺纤维化



注: IPF: 特发性肺纤维化, BALF: 支气管肺泡灌洗液, ROC 曲线: 受试者工作特征曲线

图 1 IPF 患者 BALF 和血清诊断分类树的 ROC 曲线

2.2 血清中 SELDI-TOF-MS 结果(表 2):CM10 芯片在质荷比 1000 ~ 50 000 共检测出 142 个蛋白峰。与对照组相比, IPF 组血清中有 9 个蛋白质峰差异有统计学意义, 且 9 个标志物峰强度均显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其质荷比分别为 3382.59、3453.39、4608.28、5825.48、8936.76、9164.27、11 525.30、11 689.40、11 886.00。以上述 9 个差异蛋白建立诊断分类树, 发现质荷比 3453.39、5825.48、11 886.00 组合的 AUC 最高, 为 0.913(图 1), 其敏感度为 94.7%(18/19), 特异度为 84.6%(11/13), 正确率为 90.6%(29/32)。

2.3 诊断分类树的比较:比较血清与 BALF 诊断分

类树发现, 二者的敏感度、特异度、正确率无明显差异。

3 讨论

目前 IPF 诊断主要依据临床、病理、影像学等资料, 一经诊断, 多数是中晚期, 预后差, 尽管研究发现某些细胞因子、肺表面活性蛋白 A(SP-A)、II 型肺泡表面抗原等与 IPF 有关^[2,11], 但尚缺乏特异度、敏感度高的早期诊断标志物。

血清中蛋白含量丰富, 部分蛋白能够体现疾病的全身反应。而肺泡上皮细胞分泌的部分物质可在血清中找到, 这些蛋白的变化同样能够体现肺部疾病的全身反应^[12]。IPF 血清蛋白质组学研究集中于细胞因子的表达, 近年来研究发现 SP-A、SP-D 及趋化因子配体 18(CCL18)变化与疾病预后有关, 乳酸脱氢酶(LDH)、白细胞介素 -6 能反映 IPF 治疗效果^[5]。这些研究表明部分细胞因子水平的变化与 IPF 的发生、治疗、预后相关, 但是单个细胞因子对于疾病诊断的特异度和敏感度并不高。

肺细胞灌洗是反映肺泡表面上皮细胞分泌功能最常用、准确性高、相对无创的方法。BALF 成分的变化一直是 IPF 研究的重点。经过多年努力, 2000 年人类 BALF 蛋白质库初步建立^[13]。之后, 国内外一些学者采用二维凝胶电泳技术对 IPF 开展部分研究。洗慧仪等^[14]应用二维凝胶电泳联合质谱技术、生物信息学发现了特发性间质性肺炎(IIP)热休克

蛋白 70、膜联蛋白 II 和触珠蛋白等的表达差异。2010 年 Kim 等^[15]发现 16 个差异蛋白点,表明许多炎症、抗炎蛋白可能与 IPF 的发病机制有关。但他们采用的技术都是二维凝胶电泳技术,发现的蛋白质绝大多数是高丰度蛋白,由于技术的限制,现有的方法对低丰度蛋白不敏感,尚没有发现对 IPF 诊断意义较大的单个蛋白或蛋白质组。

SELDI-TOF-MS 技术较其他蛋白质组学技术的优势体现在实验所需样品用量少,获得的图谱较单一,对低丰度蛋白分子检测敏感度高、重复性好,集蛋白质分离、纯化、鉴定、检测和数据分析为一体。有利于对 IPF 患者低丰度蛋白的筛查,弥补了二维凝胶电泳技术的不足,可发现更多的差异蛋白。

本研究发现,与对照组相比,IPF 组患者 BALF 中 7 个标志物峰强度显著增加,6 个标志物峰强度显著下降,以质荷比 3459.32、4516.51、4989.91、14 733.30 建立诊断分类树,敏感度为 91.2%,特异度为 92.0%,AUC 为 0.949;而血清中 9 个标志物峰强度均显著增加,以质荷比 3453.39、5825.48、11 886.00 建立诊断分类树,敏感度为 94.7%,特异度为 84.6%,AUC 为 0.913。与以往研究相比,本研究中检测蛋白质丰度范围为 1000 ~ 50 000,优化蛋白丰度检测范围为 2000 ~ 15 000,集中于低丰度蛋白质筛查,通过统计学分析后由部分差异蛋白初步构建的分类树特异度和敏感度均很高,有深入研究的价值。本实验发现,IPF 患者 BALF 中存在的质荷比 4615.88、3459.32 上调,血清中质荷比 4608.28、3453.39 也上调,这一结果引起我们的思考:血清和 BALF 中是否存在同源性的差异蛋白?这种差异蛋白如果得到鉴定、并在血清和 BALF 中共同存在,就有可能获得对 IPF 诊断有价值的生物标志物,而且只需要进行血清学检查就可以明确,标本来源容易获得,如果把这一指标用于影像学表现为间质性改变,并非 IPF 典型表现患者的筛查,就可能为 IPF 的早期诊断提供有价值的指标。

综上,本研究中利用 SELDI-TOF-MS 技术筛选出了 IPF 的 BALF 和血清中差异蛋白,部分差异蛋白建立 IPF 诊断分类树验证后发现其特异度和敏感度很高,值得进行更深入的研究。但由于样本数的限制、以及尚未进行进一步鉴定,目前还不能得出对临床诊断有价值的结论,但为进一步发现对 IPF 诊断有价值的生物标志物提供了实验基础。

参考文献

- [1] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS / ERS / JRS / ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183: 788-824.
- [2] 梁贤凯, 葛玉霞, 王秀杰. 肺纤维化生物标志物. *中国危重病急救医学*, 2012, 24: 125-128.
- [3] Pesci A, Ricchiuti E, Ruggiero R, et al. Bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis: what does it tell us?. *Respir Med*, 2010, 104 Suppl 1: S70-73.
- [4] Reddy G, Dalmaso EA. SELDI ProteinChip® Array Technology: protein-based predictive medicine and drug discovery applications. *J Biomed Biotechnol*, 2003, 2003: 237-241.
- [5] MacGregor G, Gray RD, Hilliard TN, et al. Biomarkers for cystic fibrosis lung disease: application of SELDI-TOF mass spectrometry to BAL fluid. *J Cyst Fibros*, 2008, 7: 352-358.
- [6] Gray RD, MacGregor G, Noble D, et al. Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178: 444-452.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会. 特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案). *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25: 387-389.
- [8] American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias: this joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165: 277-304.
- [9] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范(草案). *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25: 390-391.
- [10] Leroy B, Falmagne P, Wattiez R. Sample preparation of bronchoalveolar lavage fluid. *Methods Mol Biol*, 2008, 425: 67-75.
- [11] 吴晓梅, 王欣燕, 陈复辉. 两种细胞因子与特发性肺纤维化的关系. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 362-364.
- [12] Wattiez R, Hermans C, Cruyt C, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis*, 2000, 21: 2703-2712.
- [13] Wattiez R, Falmagne P. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815: 169-178.
- [14] 沈慧仪, 顾莹莹, 廖东江, 等. 特发性间质性肺炎蛋白质组学初步研究. *广东医学*, 2008, 29: 1468-1471.
- [15] Kim TH, Lee YH, Kim KH, et al. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: anti-inflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182: 633-642.

(收稿日期: 2012-02-03)

(本文编辑: 李银平)