



·论 著·

特发性肺间质纤维化患者血清蛋白指纹图谱研究

陈磊通讯作者 翁恒 李红艳 毛雅云 潘建光 黄进宝 陈璐璐 黄艳生 黄明祥

(福建医科大学教学医院福州肺科医院 呼吸科 350008)

摘要:目的:比较特发性肺间质纤维化(IPF)患者与其他呼吸系统疾病患者及健康人群的血清蛋白指纹图谱的差异,筛选出特发性肺间质纤维化患者的标志蛋白峰。方法:IPF患者134例为病例组,选取相同年龄、性别的134例其他呼吸系统疾病患者(16例弥漫性泛细支气管炎、25例支气管扩张、54例慢性阻塞性肺疾病、39例肺结核)为对照组、134例健康人群为健康组,应用表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)检测血清蛋白,应用Biomarker Wizard 5.0软件进行比较分析其相关血清蛋白峰值并进行统计学处理。结果:病例组与其他2组对比,存在8个差异有统计学意义的蛋白峰,质荷比为5326、5335、5340、7828、11635、11649、11693、11731,其中5326、7828、11635、11649 4个蛋白峰建立诊断模型,灵敏度79.9%,特异度84.3%。结论:应用蛋白指纹图谱技术分析IPF患者血清可能建立一种新的IPF诊断方法。

Study on Serum Protein Fingerprint of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Chen Lei, Weng Heng, Li Hong-yan, Mao Ya-yun, Pan Jian-guang, Huang Jin-bao, Chen Lu-lu, Huang Yan-sheng, Huang Ming-xiang

Abstract

Objective: Comparing the differences in serum protein biomarkers between patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and other respiratory diseases and healthy people, to screen the marker protein peaks in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

Method: 134 patients with IPF were selected as the case group, 134 patients with other respiratory diseases of the same age and gender (16 patients with diffuse panbronchiolitis, 25 patients with bronchiectasis, 54 patients with chronic obstructive pulmonary disease, and 39 patients with pulmonary tuberculosis) were selected as control groups, 134 healthy people with the same age and gender were selected as the healthy group. The serum protein was detected by surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and analyzed by Biomarker Wizard 5.0 software.

Result: In the case group, compared with the other two groups, there were 8 protein peaks (proteins with mass-to-charge ratios of 5326, 5335, 5340, 7828, 11635, 11649, 11693, and 11731) with statistical significance. A diagnostic model was established using 4 protein peaks (proteins with mass-to-charge ratios of 5326, 7828, 11635, 11649) with sensitivity of 79.9% and specificity of 84.3%.

Conclusion: The use of SELDI-TOF-MS techniques to analyze the serum of patients with IPF may be a new diagnostic method for IPF.

关键词: 特发性肺间质纤维化 血清 蛋白指纹图谱

基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题项目 (2012-2-70)

福建省临床重点专科建设项目呼吸内科 (闽卫医政函 2018-145 号)

中图分类号: R256.12

文献标识码: A

文章编号: 1009-5187 (2018) 08-004-02

特发性肺间质纤维化 (IPF) 是一种病因不明的, 局限于肺部的, 慢性、进行性肺间质纤维化的严重呼吸系统疾病, 主要发生于中老年人, 主要表现为进行性加重的呼吸困难, 伴限制性通气功能障碍和气体交换功能障碍。IPF 病因不明, 发病机制不完全清楚, 导致诊断及治疗较困难, 严重威胁着人们的健康, 努力进行有关该病的基础与临床研究, 已经成为呼吸科医师共同面对的紧迫而艰巨的任务。现今蛋白质组学的发展为从蛋白质水平上研究 IPF 提供了新的方法。本课题主要通过蛋白质指纹图谱的研究方法, 对 IPF 患者与其他呼吸疾病及健康人群的血液标本进行蛋白指纹图谱检测, 发现差异蛋白峰, 了解 IPF 的发病机理及诊断提供蛋白质组学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 方案设计 采用病例对照研究, 对所有入选样本检测血清蛋白指纹图谱, 分析不同组别间的血清蛋白质指纹图谱特征, 找出 IPF 患者特异蛋白峰。

1.2 研究对象

1.2.1 病例来源

IPF 病例组: 2012.1-2014.12 年于肺科医院临床确诊的 IPF 患者。

对照组: 据 IPF 病例组入选样本的性别、年龄配对选取同期肺科医院其他呼吸系统疾病患者 (包括肺结核、弥漫性泛细支气管炎、支

气管扩张、慢性阻塞性肺疾病)。

健康组: 根据 IPF 病例组入选样本的性别、年龄配对选取 2009.1.1-2014.12 期间健康体检人群作为健康组。

1.2.2 IPF 的诊断: 2011 版 ATS/ERS/JRS/ALAT 特发性肺纤维化 (IPF) 诊治指南中的诊断标准 [1]。其他疾病患者根据内科学诊断标准诊断。

1.2.3 纳入标准

(1) IPF 病例组纳入标准: 符合 IPF 的诊断标准。

(2) 对照组纳入标准: 根据 IPF 病例组样本性别、年龄配对选取同期住院的符合上述诊断标准的其他呼吸系统疾病患者 (包括肺结核、弥漫性泛细支气管炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病)。

(3) 健康组纳入标准: 根据病例组样本性别、年龄配对选取健康人群。

1.2.4 排除标准: (1) 结缔组织疾病患者。(2) 肝、肾、心功能不全患者。

1.3 血液标本采集及检测

1.3.1 标本采集: 3 组人群分别抽取清晨空腹时前臂静脉全血标本 5ml, 4℃ 下 3000 r/min 离心机离心 10min, 取上层血清, 分装后保存于 -80℃ 冰箱备用。



1.3.2 血清蛋白指纹图谱检测

1.3.2.1 主要仪器选用美国 Ciphergen 公司产品 Ciphergen protein chip System (CPCS, 型号 PBS II/c 型) 蛋白指纹图谱仪, 弱阳离子蛋白磁珠 (WCX magnetic beads) 由湖州赛尔迪生物医药科技有限公司提供。

1.3.2.2 血液标本检测步骤

1.3.2.2.1 血清样品处理 取 5 μ l 血清样品加 10 μ l 裂解液(湖州赛尔迪生物医药科技有限公司提供) 混合孵育 30min 后, 加入 185 μ l 缓冲液(磷酸盐缓冲液, PH=7.4) 稀释。取磁珠 (WCX magnetic beads) 50 μ l 加入 200 μ l PCR 管中, 磁铁上孵育 1min, 去除上清液; PCR 管加入 50 μ l 缓冲液洗脱 5min 后, 磁铁上孵育 1min, 去除上清液; PCR 管再次加入 100 μ l 缓冲液洗脱 5min, PCR 管磁铁上孵育 1min, PCR 管加入 100 μ l 处理好的血清样品。加入血清样品的 PCR 管置于室温孵育 30min, PCR 管磁铁上孵育 1min, 去除上清液, PCR 管加入 100 μ l 缓冲液洗脱 5min, PCR 管磁铁上孵育 1min, 去除上清液, PCR 管加入 10 μ l 洗脱缓冲液, 洗脱 5min, PCR 管磁铁上孵育 1min, 取 5 μ l 上清液移至另一 PCR 管中, PCR 管加入 5 μ l 人葡萄球菌蛋白 A (SPA) 饱和溶液充分混匀, 取 1 μ l 混合溶液加样到全钢 (Au/Steel) 芯片上风干。待芯片干燥后, 放入 Proteinchip Biomarker System II 质谱仪进行数据收集, Ciphergen protein chip 3.2.1 软件自动采集数据。

1.4 统计学分析 应用 Ciphergen protein chip 3.2.1 系统自带的 Biomarker Wizard 5.0 软件对芯片检测得到的蛋白质相对含量及蛋白质质荷比数据进行处理, 计算蛋白质的质荷比 (m/z) 及强度、相同质荷比蛋白质在各组间峰值差异, 计算 $\bar{x} \pm s$ 和 P 值, $P < 0.05$ 为有统计学意义。用 SPSS 19.0 软件进行卡方检验和评估灵敏度、特异性。

2 结果

本研究每组各入选 134 例, 男性 80 例, 女性 54 例, 平均年龄 61.2 岁。对照组包括 7 例弥漫性泛细支气管炎、25 例支气管扩张、53 例慢性阻塞性肺疾病、49 例肺结核患者。病例组共获得 297 个蛋白峰, 其中 48 个与其他组有差异, 其中 8 个差异蛋白峰有统计学意义, 质荷比 (m/z) 分别为 5326、5335、5340、7828、11635、11649、11693、11731。(见表 1) (蛋白峰图谱见图 1, 以 5326 为例)。

表 1 各组有统计学差异的蛋白峰

蛋白峰 (m/z)	P	普丰度 (均数 $\bar{x} \pm s$)		
		病例组	对照组	健康组
5326	<0.01	6.94 $\pm$ 2.04	2.21 $\pm$ 1.64	0.86 $\pm$ 0.95
5335	<0.01	3.97 $\pm$ 2.65	3.28 $\pm$ 2.13	2.84 $\pm$ 2.07
5340	<0.01	1.75 $\pm$ 0.86	1.31 $\pm$ 0.70	1.2 $\pm$ 0.72
7828	<0.01	7.82 $\pm$ 3.97	6.44 $\pm$ 4.01	3.34 $\pm$ 1.86
11635	<0.01	1.94 $\pm$ 1.23	1.33 $\pm$ 0.96	1.21 $\pm$ 0.81
11649	<0.01	9.21 $\pm$ 6.89	6.17 $\pm$ 4.81	3.10 $\pm$ 2.13

11693	<0.01	1.57 $\pm$ 0.67	1.27 $\pm$ 0.54	0.81 $\pm$ 0.37
11731	<0.01	2.97 $\pm$ 1.34	2.43 $\pm$ 1.20	1.74 $\pm$ 0.81

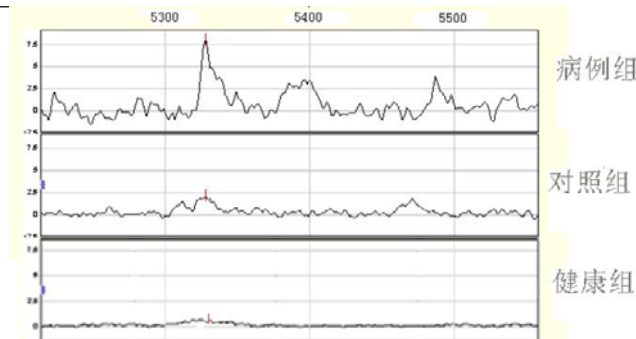


图 1 各组代表性样本的 5326m/z 蛋白峰

但是任何一个单一的蛋白峰都无法完全鉴别出病例组, 通过 Biomarker Wizard 5.0 软件筛选出 5326、7828、11635、11649 4 个蛋白峰进行综合评估, 各组阴性、阳性数值见表 2, 卡方值 161.837, P 值 0.000, 诊断灵敏度 79.9%, 特异度 84.3%。

表 2 3 组 4 个差异蛋白峰组合筛选结果

	阳性	阴性	总计
病例组	107	27	134
对照组	29	105	134
健康组	13	121	134
总计	149	253	

卡方值 161.837, P 值 0.000

3 讨论

IPF 是一种进行性加重的弥漫性肺泡炎和 / 或肺泡结构紊乱, 最终导致肺泡结构破坏, 形成肺泡腔内完全型纤维化和囊泡状的蜂窝肺。IPF 的发病率以每年约 11% 的速度增长[2], 发病率随年龄增加而增长[3], 中位生存期约 2.5-5 年, 5 年生存率约 20%-30%[4]。目前, IPF 的确切病因及发病机制尚不明确, 从慢性炎症假说, 到上皮细胞损伤后病理性异常修复等[5], 尚无定论, 可能与自身免疫、遗传因素等有关。IPF 发病过程中极其复杂, 涉及诸多细胞、细胞因子、趋化因子、基因表型、蛋白质表达等等。

随着人类基因组计划的实施和完成, 科学研究的重点便进入到后基因组时代, 即研究的重点转移到功能基因组学上, 主要体现物质是蛋白质。蛋白指纹图谱技术是近年发展起来的实验诊断新技术, 在对临床疾病检测时, 抓住绝大多数疾病都有特异的生物标志的本质, 从而进行疾病监测和识别, 故优于其他间接测定生物标志的方法。同时, 由于有一套灵敏的监测系统来检测和识别这些微量生物标志, 因而决定了它的敏感度和准确性。由于具有在分子或基因水平早期诊断的特点, 已用于多种疾病如肿瘤的早期检测等。

国外有研究通过对支气管肺泡灌洗液等进行蛋白检测发现, 表面蛋白 A[6-7]、钙细胞周期蛋白、钙血管蛋白、组织蛋白酶 D、GTP 环水解反馈调节蛋白酶、肠内三叶因子[7]、P 物质、 α 2 巨球蛋白、移



• 论 著 •

行抑制因子、钙粒蛋白 A、钙粒蛋白 D、硫氧还蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶、铜蓝蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶[8]、 α 平滑肌蛋白、波形蛋白[9-10]等蛋白质与特发性肺间质纤维化有关,这些蛋白参与肺泡 II 型上皮细胞损伤、影响细胞增殖调控、炎症、纤维化、抗氧化等过程。由于国外人群与国内在遗传基因等方面存在差异,导致蛋白种类、含量等方面可能存在差异,故建立我国人群的蛋白指纹图谱库能更好地指导对我国患者的诊断和治疗。国内李时悦等采用对开胸取肺组织进行蛋白指纹图谱检测分析,发现热休克蛋白 70、膜联蛋白 II 和触珠蛋白等蛋白与特发性肺间质纤维化有关[11],但开胸取肺组织进行检测创伤大,不易推广,本研究采用易获取的血液标本进行检测,发现质荷比为 5326、5335、5340、7828、11635、11649、11693、11731 的蛋白可能与 IPF 有关,特别是 5326、7828、11635、11649 这 4 个蛋白。但是这些蛋白在 IPF 发病机制中的具体作用及精确诊断方面的帮助还需要后续进一步研究。

[1]ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 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]J Gribbin, R B Hubbard, I Le Jeune, C J P Smith, J West, L J Tata. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK [J]. *Thorax*. 2006 Nov; 61(11): 980-985.

[3]Luba Nalysnyk, Javier Cid-Ruzafa, Philip Rotella and Dirk Esser. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature [J]. *Eur Respir Rev* 2012; 21(126): 126, 355-361

[4]Kristin D Kistler, Luba Nalysnyk, Philip Rotella and

Dirk Esser. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review of the literature [J]. *BMC Pulm Med* 2014 14:139.

[5]Paolo Spagnolo, Giulio Rossi, Alberto Cavazza. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and its clinical implications [J]. *Expert Review of Clinical Immunology* 2014 10(8):1005-1017.

[6]Lenz AG, Meyer B, Weber H, Maier K, et al. Two-dimensional electrophoresis of dog bronchoalveolar lavage fluid proteins [J]. *Electrophoresis*. 1990 Jun; 11(6):510-513.

[7]Wattiez R, Hermans C, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases [J]. *Electrophoresis*. 2000 Jun; 21(13):2703-2712.

[8]Wattiez R, Hermans C, Bernard A, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid: two-dimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins. *Electrophoresis*. 1999 Jun; 20(7):1634-1645.

[9]Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Aug; 4(8):657-665.

[10]DeMaio L, Buckley ST, Krishnaveni MS, et al. Ligand-independent transforming growth factor- β type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Pathol*. 2012 Mar; 226(4):633-644.

[11]洗慧仪, 顾莹莹, 廖东江, 等. 特发性肺间质纤维化蛋白质组学初步研究 [J]. *广东医学*, 2008, 29(9):1468-1471.

(上接第3页)

在治疗上, 西医采用奥美拉唑作为主要的治疗药物, 这是一种高选择性胃酸分泌抑制剂, 可作用于胃壁细胞的氢离子 ATP 酶, 与之相互结合, 并使其失去活性, 从而达到抑制胃酸分泌, 相对于其他药物, 奥美拉唑具有较强的抑制胃酸的作用, 其作用不仅强大, 且持久, 是目前较为有效的治疗消化道溃疡的药物之一[4]。药理研究指出, 患者服用奥美拉唑 24h 内, 在壁细胞内仅有 1/3 氢离子 ATP 合成, 恢复分泌功能; 但血清胃泌素水平升高, 胃黏膜血流量增加, 胃肠细胞营养作用加强, 胃黏膜电位升高, 维护细胞膜稳定性增强, 有效保护胃黏膜屏障功能, 抑制 Hp, 达到促进胃、十二指肠病变黏膜的修复、愈合、止血, 控制溃疡出血等症状[5]。但是, 近几年临床应用指出, 虽然较多患者应用奥美拉唑后取得了较好的临床疗效, 但奥美拉唑同样存在疗效不稳定, 易出现不良反应, 复发率较高等问题。

消化道溃疡属中医“胃脘痛”、“痞满”、“呃逆”等范畴。中医认为, 脾胃虚弱是消化道溃疡的内在因素, 饮食不节、情志所伤等为其诱发因素, 气机不畅、郁滞胃脘、升降失常是其基本病机。胃为五脏六腑之大源, 受纳腐熟水谷, 寒热湿邪袭内, 胃失调和, 失各降; 七情刺激, 使肝气郁滞, 横逆犯胃, 气滞血瘀, 胃络不畅; 饮食不节, 劳倦内伤, 致脾胃虚弱, 气虚不运, 血行不畅, 胃膜失养溃疡形成, 且病情缠绵。由于消化道溃疡病发以脾胃为主, 与肝相关, 肝与胃木土相克, 脾与胃互为表里, 在治疗上宜采用疏肝理气、止胃痛为原则, 兼用中医辨证分型的方法, 以达到有效治疗的目的[2-3]。

本组研究中, 在西医治疗的基础上, 采用自拟中药方加以治疗, 方中黄芪、白芨、白术、炒白芍疏肝解郁、举中焦阳气、行气止痛; 乌贼骨、浙贝母、元胡收敛、消肿、生肌。同时, 现代药理研究证明, 乌贼骨、白芨均具有中和胃酸之功效, 同时根据患者中医辨证分型, 对方剂进行适当加减。诸药合用, 中气立、阳气升, 可达消肿止痛, 治愈溃疡之作用。本组研究发现, 采用中西医结合的方法在治疗消化道溃疡方面临床疗效优于单纯采用西医治疗的患者, 且复发率也低于对照组, 临床疗效较为满意。

总之, 采用中西医结合的方法治疗消化道溃疡具有较好的临床疗效, 可推广应用。

参考文献:

[1]方勤华, 富玲芬. 中西医结合治疗消化道溃疡 100 例的体会 [J]. *中医临床研究*. 2014, 4(2): 100.

[2]王月蓉, 施亚玲. 中西医结合治疗上消化道溃疡出血 50 例 [J]. *中国中医急症*. 2015, 21(9): 1479.

[3]杜昆玉, 叶少锋, 叶柱均. 中西医结合治疗上消化道溃疡的临床观察 [J]. *亚太传统医药*. 2012, 5(7): 52-53.

[4]张兵萍, 马敏. 奥美拉唑、甲硝唑、阿莫西林联合治疗消化道溃疡 100 例分析 [J]. *吉林医学*. 2012, 33(35): 7689-7690.

[5]王广成, 张艳楠, 徐枫. 奥美拉唑镁肠溶片治疗上消化道溃疡出血的疗效及不良反应评价 [J]. *中国医药导报*. 2015, 7(31): 58-59