

• 证候诊断 •

基于 SELDI-TOF-MS 技术的慢性胃炎患者
腻苔相关蛋白标志物研究郝一鸣¹ 赵 洁¹ 王文静² 李福凤¹ 王忆勤^{1*}(1. 上海中医药大学中医四诊信息化实验室, 国家中医药管理局中医诊断学重点学科,
上海市浦东新区蔡伦路 1200 号, 201203; 2. 上海市疾病预防控制中心公共卫生分子生物学实验室)

* 通讯作者: wangyiqin2380@vip.sina.com, (021)51322447

[摘要] 目的 研究慢性胃炎患者腻苔相关蛋白标志物。方法 采集慢性胃炎患者的舌苔 100 例、正常人的舌苔 38 例, 根据舌苔色质将慢性胃炎患者分为腻苔组 50 例, 非腻苔组 50 例, 其中腻苔组又分为白腻苔组 17 例, 黄腻苔组 33 例。采用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术对舌苔进行蛋白质组学研究。利用 NP20 蛋白芯片技术进行舌苔蛋白质组学研究, 用蛋白芯片阅读器 PBSII 对芯片进行扫描、分析。结果 在质荷比 1000~20000 范围内, 腻苔组与正常对照组有 69 个差异蛋白峰 ($P<0.01$), 非腻苔组与正常对照组有 63 个差异蛋白峰 ($P<0.01$), 腻苔组与非腻苔组有 4 个差异蛋白峰 ($P<0.01$), 白腻苔组与正常对照组有 52 个差异蛋白峰 ($P<0.01$), 黄腻苔组与正常对照组有 62 个差异蛋白峰 ($P<0.01$), 白腻苔组与黄腻苔组有 2 个差异蛋白峰 ($P<0.01$)。结论 该研究初步筛选出了慢性胃炎患者腻苔的蛋白标志物, 为慢性胃炎中医舌诊的客观化研究提供了一定的实验依据。

[关键词] 慢性胃炎; 腻苔; 蛋白; SELDI-TOF-MS

Research on Associated Protein Markers in Greasy Tongue Coating of Chronic Gastritis Patients with SELDI-TOF-MS Technique
HAO Yiming¹, ZHAO Jie¹, WANG Wenjing², LI Fufeng¹, WANG Yiqin¹

(1. Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention)

ABSTRACT Objective To investigate the associated protein markers in tongue coating of chronic gastritis patients. **Methods**

The tongue coating was taken from 100 chronic gastritis patients and 38 healthy persons. The patients were divided to the greasy tongue coating group (50 cases) and non-greasy tongue coating group (50 cases also), and the greasy tongue coating group were further grouped into the white-greasy tongue coating group (17 cases) and the yellow-greasy tongue coating group (33 cases). Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technique was applied for proteomic study on the tongue coatings. **Results** Within the range of 1000 to 20000 M/Z, there were 69 different protein peaks identified between the greasy tongue coating group and the control group ($P<0.01$). Between the non-greasy tongue coating group and the control group, 63 different protein peaks were identified ($P<0.01$). Between the greasy tongue coating group and non-greasy tongue coating group, 4 different protein peaks were identified ($P<0.01$). Between the white-greasy tongue coating group and the control group, 52 different protein peaks were identified ($P<0.01$). Between the yellow-greasy tongue coating group and the control group, 62 different protein peaks were identified ($P<0.01$). Between the white-greasy tongue coating group and yellow-greasy tongue coating group, 2 different protein peaks were identified ($P<0.01$).

Conclusion The research screens the protein markers in greasy tongue coating of chronic gastritis patients and provides experimental evidence for the tongue diagnosis study of chronic gastritis.

Keywords chronic gastritis; greasy tongue coating; protein; SELDI-TOF-MS

慢性胃炎是指胃黏膜的慢性炎症性病变。历代医家根据其临床表现将本病归属于“痞满”、“胃痛”、“胃脘痛”等范畴。中医药治疗本病具有一定优势, 但临床辨证诊断缺乏有中医特色的客观指标。慢性胃炎患者的舌苔多见腻苔、黄苔^[1-4]。因此, 围绕这两种舌苔进行慢性胃炎中医客观指标的研究具有一

定的意义。表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术 (surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 作为一种新兴的蛋白质组学研究技术, 适用于筛选疾病标志物^[5]。本研究利用此技术对慢性胃炎患者腻苔相关蛋白标志物的差异进行了探索性研究,

旨在寻找慢性胃炎的生物标志物,从而为慢性胃炎中医舌诊的客观化研究提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

依据《内科学》^[6]中慢性胃炎的诊断标准,于2008年6月至2009年6月在上海中医药大学附属龙华医院消化科采集慢性胃炎患者舌苔样本124例。分为腻苔组(含薄腻苔、厚腻苔)和非腻苔组(含薄苔、厚苔)。其中,腻苔组又分为白腻苔组(含薄白腻苔、厚白腻苔)和黄腻苔组(含薄黄腻苔、厚黄腻苔)。正常对照组为明确排除各种疾病的上海中医药大学在校教师的舌苔样本50例,均为薄白苔。本研究经本院伦理委员会批准。受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 仪器 SELDI 质谱仪:美国 Ciphergen 公司;高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;奥林巴斯显微镜:日本奥林巴斯公司;超低温冰箱:日本三洋电机株式会社。

1.2.2 样本采集 参考课题组原有舌苔采集方法^[7],用氯化钠注射液200ml漱口3~5次,经高温消毒不锈钢金属小匙适当用力,在舌表面舌苔较厚的部位适量刮取舌苔样本,溶于装有2ml氯化钠注射液的离心管中,密封,-80℃保存备用。

1.2.3 样本处理 舌苔样本采用1500r/min离心2min后取上清液。对上清液进行光学显微镜下细胞计数后,以细胞浓度 $(1.6 \pm 0.2) \times 10^6/\text{ml}$ 为标准,排除细胞浓度偏低的样本,使用氯化钠注射液将细胞浓度偏高的样本稀释至标准,最终得到细胞浓度基本一致的100例舌苔上清液。腻苔组50例,其中男23例,女27例,平均年龄 (50.21 ± 10.22) 岁;在腻苔组中,白腻苔组17例,其中男7例,女10例,平均年龄 (49.95 ± 10.05) 岁;黄腻苔组33例,其中男性16例,女性17例,平均年龄 (51.12 ± 10.48) 岁。非腻苔组50例,其中男26例,女24例,平均年龄 (48.54 ± 12.35) 岁。正常对照组38例,其中男20例,女18例,平均年龄 (51.35 ± 12.24) 岁。各组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2.4 样本检测 取舌苔上清液样本,选用 NP20 蛋白芯片加样,将芯片置于 SELDI 质谱仪中,用加有 All-in-one 标准蛋白质的 NP20 芯片校正仪器至0.1%范围内。芯片阅读仪参数设置如下:激光强度

155,探测器检测灵敏度7,信号噪声比(S/N)>5为有效波峰,优化范围质荷比(M/Z)在1000—20000之间,芯片上的每个点采集130次。

1.2.5 数据分析 ①指纹图谱标准化:用总离子流校正所有图谱,以减少不同芯片、仪器状态波动等因素引起的实验误差。②用 Biomarker Wizard 软件计算相同 M/Z 的蛋白在腻苔组、非腻苔组、白腻苔组、黄腻苔组与正常对照组峰值差异的 P 值。选择所有图谱中出现频率>10%的峰作为有效蛋白峰。③使用统计软件 MATLAB 7.5,利用秩和检验进行差异蛋白峰分析。④主成分分析(PCA):分析差异蛋白峰,把高维的芯片数据投射到三维空间中,每一个样本可用三维空间的一个点来表示,相同组分的样本形成的点将彼此靠近。⑤受试者工作特征(ROC)曲线分析:ROC 曲线是反映敏感性和特异性连续变量的综合指标。通过改变诊断临界值,获得多对灵敏度与特异度值,以1-特异度为横坐标,灵敏度为纵坐标,绘制 ROC 曲线,通过计算 ROC 曲线下面积来评价诊断效率。

2 结果

2.1 腻苔组、非腻苔组与正常对照组差异蛋白峰分析

在 M/Z 1000—20000 范围内,腻苔组与正常对照组有69个差异蛋白峰有统计学意义($P < 0.01$),其中 M/Z 1726.32 等33个差异蛋白峰在腻苔组中呈高表达,M/Z 6783.47 等36个差异蛋白峰在腻苔组中呈低表达,见表1;非腻苔组与正常对照组有63个差异蛋白峰有统计学意义($P < 0.01$),其中 M/Z 1676.88 等31个差异蛋白峰在非腻苔组中呈高表达,M/Z 5261.64 等32个差异蛋白峰在非腻苔组中呈低表达,见表2;腻苔组与非腻苔组有4个差异蛋白

表1 腻苔组与正常对照组中 P 值最小的前10个差异蛋白峰

M/Z	腻苔组	正常对照组	P 值
1726.32	3.20±2.25	0.59±0.57	0.000001
1762.21	2.67±2.11	0.23±0.29	0.000001
1776.51	2.91±1.93	0.35±0.44	0.000001
6783.47	0.15±0.26	0.70±0.57	0.000001
9594.04	0.08±0.14	0.65±0.75	0.000001
1705.31	3.27±2.19	0.57±0.67	0.000001
1670.55	2.98±2.01	0.52±0.50	0.000001
1676.88	2.85±1.98	0.44±0.61	0.000001
3244.77	0.20±0.39	1.20±0.86	0.000001
1733.00	3.20±2.11	0.55±0.71	0.000001

表 2 非腧腧组与正常对照组中 P 值最小的
前 10 个差异蛋白峰

M/Z	非腧腧组	正常对照组	P 值
1676.88	3.30±1.98	0.44±0.61	0.000001
1705.31	3.84±1.94	0.57±0.67	0.000001
1717.58	3.37±1.93	0.41±0.48	0.000001
1726.32	3.45±1.95	0.59±0.57	0.000001
1762.21	2.77±1.80	0.23±0.29	0.000001
1733.00	3.34±1.97	0.55±0.71	0.000001
1776.51	2.83±1.79	0.35±0.44	0.000001
1687.42	3.85±1.99	0.98±0.92	0.000001
5261.64	0.13±0.31	1.30±2.43	0.000001
1746.02	3.34±1.92	0.74±0.99	0.000001

表 3 腧腧组与非腧腧组中的差异蛋白峰

M/Z	腧腧组	非腧腧组	P 值
14385.10	0.29±0.28	0.66±0.88	0.000063
8281.52	0.29±0.20	0.18±0.16	0.008713
8359.92	0.34±0.33	0.16±0.18	0.001943
8789.84	0.71±0.67	0.36±0.30	0.003584

峰有统计学意义($P<0.01$),其中 M/Z 8281.52 等 3 个差异蛋白峰在腧腧组中呈高表达, M/Z 14385.1 的差异蛋白峰在腧腧组中呈低表达,见表 3。

2.2 白腧腧组、黄腧腧组与正常对照组差异蛋白峰分析

在 M/Z 1000—20000 范围内,白腧腧组与正常对照组有 52 个差异蛋白峰有统计学意义($P<0.01$),其中 M/Z 1762.21 等 28 个差异蛋白峰在白腧腧组中呈高表达, M/Z 13194.1 等 24 个差异蛋白峰在白腧腧组中呈低表达,见表 4;黄腧腧组与正常对照组有 63 个差异蛋白峰有统计学意义($P<0.01$),其中 M/Z 1670.55 等 31 个差异蛋白峰在黄腧腧组中呈高表达, M/Z 6783.47 等 32 个差异蛋白峰在黄腧腧组中呈低表达,见表 5;白腧腧组与黄腧腧组有 2 个差异蛋白峰有统计学意义($P<0.01$),

表 4 白腧腧组与正常对照组中 P 值最小的
前 10 个差异蛋白峰

M/Z	白腧腧组	正常对照组	P 值
13194.10	0.27±0.14	0.67±0.37	0.000002
1762.21	2.62±2.27	0.23±0.29	0.000002
1776.51	2.46±1.77	0.35±0.44	0.000001
3325.56	0.93±0.61	3.39±2.04	0.000001
5261.64	0.14±0.27	1.30±2.43	0.000002
6783.47	0.20±0.39	0.70±0.57	0.000001
3244.77	0.16±0.42	1.20±0.86	0.000003
13989.70	0.04±0.05	0.38±0.45	0.000004
13007.00	0.32±0.20	0.87±0.49	0.000004
3395.42	1.21±0.96	3.73±2.13	0.000006

表 5 黄腧腧组与正常对照组中 P 值最小的
前 10 个差异蛋白峰

M/Z	黄腧腧组	正常对照组	P 值
1670.55	3.31±1.96	0.52±0.50	0.00
1733.00	3.51±1.96	0.55±0.71	0.00
1762.21	2.70±2.06	0.23±0.29	0.00
1776.51	3.14±1.99	0.35±0.44	0.00
6783.47	0.13±0.16	0.70±0.57	0.00
9594.04	0.07±0.15	0.65±0.75	0.00
1726.32	3.69±2.30	0.59±0.57	0.00
1676.88	3.19±1.99	0.44±0.61	0.00
1705.31	3.44±2.16	0.57±0.67	0.00
1835.14	1.63±1.58	0.04±0.36	0.00

表 6 白腧腧组与黄腧腧组中的差异蛋白峰

M/Z	白腧腧组	黄腧腧组	P 值
11355.10	0.82±0.38	0.53±0.33	0.008882
3308.36	4.91±3.71	9.22±6.11	0.003961

其中 M/Z 11355.10 这个差异蛋白峰在白腧腧组中呈高表达, M/Z 3308.36 这个差异蛋白峰在白腧腧组中呈低表达,见表 6。

2.3 PCA

各组间 PCA 图显示:腧腧组、非腧腧组、白腧腧组、黄腧腧组与正常对照组样本分离度较好,存在小部分重叠;腧腧组与非腧腧组、白腧腧组与黄腧腧组样本分离度一般,存在部分重叠。

2.4 ROC 曲线分析

各组间 ROC 曲线下面积(AUC,最大为 1)显示:腧腧组与正常对照组 AUC=0.97684,非腧腧组与正常对照组 AUC=0.98,白腧腧组与正常对照组 AUC=0.97678,黄腧腧组与正常对照组 AUC=0.97687,差异度均较明显($AUC>0.8$);腧腧组与非腧腧组 AUC=0.7872、白腧腧组与黄腧腧组 AUC=0.79323,差异度均一般($AUC>0.7$,但 <0.8)。

3 讨论

舌苔乃胃气所生,《形色外诊简摩·舌质舌苔辨》云:“至于苔,乃胃气之所熏蒸”。因此,胃的病变可通过舌苔体现于外,判断病邪深浅也有赖于诊查舌苔的变化,如《伤寒本旨·辨舌苔》所云:“更可知舌苔,由胃中生气所现……故观舌本,可验其阴阳虚实,审苔垢,即知其邪之寒热浅深也。”从现代医学角度来看,舌的上皮来源于口凹处的内胚层,舌根来源于咽壁的外胚层,消化道的大部分上皮(包括胃肠)

(下转第 1229 页)

用,这些细胞因子又促进 CIK 细胞增殖、分化并分泌细胞因子,CIK 细胞分泌细胞因子是以旁分泌或自分泌形式作用于附近细胞或细胞因子作用于细胞本身,这是参芪扶正注射液对脐血 CIK 细胞体外增殖及杀瘤的机理。这种分泌作用从第 4 天开始,但要到 12~14 天才达到高峰,提示在临床应用时,回输时间最好在 12 天以后进行。

Schmidt-Wolf 采用细胞因子诱导杀伤细胞操作复杂、试剂昂贵。本研究中参芪扶正注射液组只用一种参芪扶正注射液与 Schmidt-Wolf 诱导 CIK 细胞的细胞因子组进行对照研究,结果差异无统计学意义($P>0.05$),说明参芪扶正注射液在诱导 CIK 细胞方面具有与细胞因子相同的作用,且实验操作简单、价格低廉。本研究为脐血 CIK 细胞免疫治疗提供了依据,为 CIK 细胞的体外培养提供了新的路径和方法,同时为中药参芪扶正注射液的扶正作用提供了理论根据。本研究未与外周血作对照研究,需进一步探讨。

参考文献

[1] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cyto-

kine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. J Exp Med, 1991,174(1):139-149.

[2] 郝希山. 生物治疗 肿瘤治疗的新希望[J]. 中国医药生物技术,2008,3(6):401-403.

[3] 陆益,陆益线. 参芪扶正注射液的药理作用和临床应用[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):2083-2085.

[4] Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, et al. Large-scale expansion of CD3⁺CD56⁺ lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants [J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(8): 440-448.

[5] Lopez RD, Waller EK, Lu PH, et al. CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56⁺ T cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 49(12):629-640.

[6] Laderach D, Movassagh M, Johnson A, et al. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8⁺ T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8⁺ T cells[J]. Int Immunol, 2002, 14(10):1155-1167.

[7] 蒋永新,王熙才,金从国,等. 体外 CK 细胞分泌细胞因子水平动态观察[J]. 临床肿瘤学杂志,2006,11(11):806-809.

(收稿日期:2011-10-31;修回日期:2012-03-24)

[编辑:王利芬]

(上接第 1225 页)

来自原肠内胚层,舌前 2/3 的部分和胃上皮的病变有密切的关系^[8]。由上可知,舌与脾胃密切相关,若脾胃有病,多能体现于舌上,可见舌诊在慢性胃炎诊疗中是十分重要的。

本研究结果显示,各组之间存在的差异蛋白峰能在一定程度上反映各组之间的区别,能从舌苔蛋白质组学的角度反映慢性胃炎与正常对照组之间的差别,可见慢性胃炎不同类型舌苔之间存在不同的生物学特点,这可能是胃的病变以及机体病理状态下人体整体机能改变在舌苔上的反映,说明 SELDI-TOF-MS 技术对慢性胃炎不同类型舌苔蛋白的研究具有一定的特异性。PCA 图分析发现,腻苔组与非腻苔组、白腻苔组与黄腻苔组之间存在部分重叠。ROC 曲线分析发现,腻苔组与非腻苔组、白腻苔组与黄腻苔组之间的差异度一般,可能由于慢性胃炎患者病情复杂,两组间的舌苔蛋白组成有部分相同,需进一步研究。这些差异蛋白峰的具体功能有待进一步确定。

这些差异蛋白峰的出现,为慢性胃炎的临床诊断与辨证治疗提供了一定的实验依据,具有较好的临床意义,也为中医舌诊的客观化发展提供了研究思

路。另外,SELDI-TOF-MS 技术的灵敏度较高,可以在疾病发生的极早期就检测到某些蛋白质的变化。

参考文献

[1] 李萍,刘卫红,张蕾,等. 657 例慢性浅表性胃炎患者经舌象分析仪观察的舌象分布规律探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(2):132-135.

[2] 王毅. 慢性胃炎与舌象关系的探讨——附:2103 例临床资料分析[J]. 成都中医学院学报,1989,12(4):22-24.

[3] 庞宁海,马文香. 226 例慢性胃十二指肠病及舌象与胃镜象观察[J]. 中医杂志,1985,26(12):53-55.

[4] 王忆勤,郎庆波,李果刚,等. 慢性胃炎中医湿证证候诊断标准研究[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(11):975-979.

[5] 王文静,陆晔,张云英,等. 蛋白质组学及其在公共卫生学领域中的应用[J]. 环境与职业医学,2003,20(5):374-376.

[6] 徐蓉娟. 内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:175-179.

[7] 王忆勤,李福凤,李琴韵,等. 慢性胃炎湿证患者舌苔液、胃液高效毛细管电泳图谱分析[J]. 上海中医药大学学报,2004,18(4):41-43.

[8] 戴豪良. 舌诊研究与临床应用[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:187.

(收稿日期:2011-10-31;修回日期:2012-01-18)

[编辑:王利芬]