

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.22.015

证候 · 诊断

胃癌脾虚证唾液蛋白指纹图谱分子诊断模型研究

谢梦洲^{1,2}, 贺佐梅¹, 黄飞娟³, 周小青¹, 吴正治^{1,3,4*}

(1. 湖南中医药大学中医诊断研究所/湖南 2011 数字中医药协同创新中心, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410007;
2. 抗肿瘤中药创制技术湖南省工程研究中心; 3. 深圳大学第一附属医院; 4. 广东医学院附属福田医院)

摘要 目的 研究建立胃癌脾虚证唾液蛋白质指纹图谱新型分子诊断模型。方法 采集未经手术和放化疗治疗的 57 例胃癌患者(脾虚证组 40 例, 非脾虚证组 17 例)、45 例健康志愿者(正常对照组)的唾液标本, 用弱阳离子交换型(WCX)纳米磁珠联合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术进行检测, 获得各组标本的蛋白指纹图谱。比较各组唾液蛋白质质谱数据, 找出胃癌脾虚证组与正常对照组、胃癌脾虚证组与胃癌非脾虚证组之间具有统计学意义的差异表达蛋白质峰; 采用决策树算法计算出多个变量即质荷比(m/z)变化对两组样本的判别价值, 确定最优化的诊断模型。结果 胃癌脾虚证组与正常对照组唾液蛋白质质谱比较共有 106 个差异蛋白质峰有统计学意义, 胃癌脾虚证组与胃癌非脾虚证组唾液蛋白质质谱比较共有 6 个差异蛋白质峰有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。筛选建立了由 m/z 为 5439.67、2411.67、3619.18 共 3 个主要差异蛋白峰组成的胃癌脾虚证诊断模型; 临床回代检验该模型的灵敏度和特异度分别达 100% 和 93%; 交叉验证法进一步验证诊断模型的灵敏度和特异度分别为 87% 和 89%。结论 基于 WCX 纳米磁珠结合 MALDI-TOF-MS 技术建立的胃癌脾虚证唾液蛋白质组无创性分子诊断模型敏感性高、特异性强, 对胃癌脾虚证的诊断具有良好效率。

关键词 胃癌; 脾虚证; 唾液; 分子诊断模型; 蛋白指纹图谱

胃癌在亚洲地区乃至全世界发病率均较高, 且有报道称其致死率在所有肿瘤中位于第二^[1-2]。胃癌的早期诊断是减少死亡率的根本措施, 其早期诊断研究方法研究一直为国内外所瞩目^[3]。唾液中含有 2400 多种蛋白质^[4], 利用唾液进行疾病诊断具有无创、微量、易于收集和储存、操作简便快捷、易于被患者接受等明显优势^[5]; 同时唾液检测不仅可特异性地监测相关唾液腺的疾病, 还可对人整体机能状态进行评估^[6]。脾虚证是中医临床最常见的证候之一, 中医学认为唾液为脾脏所化生, 故本研究运用弱阳离子交换型(WCX)纳米磁珠芯片联合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术, 从唾液蛋白质组学的变化探索脾虚的分子基础并建立诊断模型。

1 临床资料

1.1 诊断及辨证标准

胃癌的诊断根据《内科学》^[7]中的诊断标准。胃癌脾虚证辨证标准参照文献^[8]中标准。

1.2 纳入标准

符合以上诊断标准且未经手术和放化疗治疗者; 年龄 20 ~ 75 岁; 自愿且能够配合试验, 签署知情同意书。

1.3 排除标准

先天性疾病患者; 伴有口腔局部及唾液腺炎症、消化道溃疡者; 舍格伦综合征、囊性纤维病及其他系统严重并发疾病者。

1.4 一般资料

纳入 2014 年 12 月至 2015 年 4 月湖南省肿瘤医院胃十二指肠胰腺外科胃癌患者 57 例, 其中 40 例为胃癌脾虚证组, 17 例为胃癌非脾虚证组, 另设正常对照组 45 例, 均来自于同时期湖南中医药

基金项目: 国家自然科学基金(81273665); 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金(201401)

* 通讯作者: szwz001@163.com

大学附属第一医院体检科健康志愿者。胃癌脾虚证组中男 25 例,女 15 例;年龄 24 ~ 73 岁,平均年龄 (52.27 ± 11.37) 岁。胃癌非脾虚证组中男 14 例,女 3 例;年龄 36 ~ 68 岁,平均年龄 (54.41 ± 10.32) 岁。正常对照组中男 28 例,女 17 例;年龄 23 ~ 72 岁,平均年龄 (53.17 ± 11.52) 岁。各组受试者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

1.5 主要仪器和试剂

蛋白指纹图谱 (液体芯片) 试剂盒 (WCX 磁珠、Wash Buffer、Elution Buffer、U9 裂解液) 及 MALDI-TOF-MS (蛋白指纹图谱仪 I 型),均为湖州赛尔迪生物医药科技有限公司产品,试剂盒批号为 K20150501。 dH_2O (HPLC 级)、CHCA 为 Sigma 公司产品。

2 方法

2.1 样品收集与预处理

按照本课题专用临床观察表进行临床观察记录。取材前 1 天晚上临睡前清水漱口 3 次 (不再进任何食物和药物),采用非刺激性唾液采集方式,第 2 天晨起后漱口前空腹取材。由经过培训的课题组专人取材,前 5 min 内的唾液自然吞下后开始收集,患者将已经过消毒的无菌小圆柱形棉花含入口中,口腔唾液积聚至一定量后将棉花吐入置于冰浴中的 15 ml 唾液离心管内,4℃ 下静置 1 h 后,3000 r/min、4℃ 下离心 10 min,冰浴上分装在 1 ml EP 管中,每管 200 μl ,于 -80℃ 冰箱冷冻保存。实验时取出样本,冰上解冻,所有检测唾液样本均 1 次冻融。取 5 μl 唾液加入 10 μl U9 裂解液,混合孵育 30 min 后,加入 185 μl Wash Buffer 稀释 (唾液最终上样量为 2.5 μl)。

2.2 纳米磁珠预处理、上样和洗脱

1) 取 WCX 纳米磁珠 50 μl 加入到 200 μl -PCR 管,置于磁铁上孵育 1 min,去除上清液。2) 依次加入 100 μl Wash Buffer 洗脱 5 min,在磁铁上孵育 1 min,去除上清液;重复该步骤 1 次。3) 向每个装有纳米磁珠的 PCR 管中加入 100 μl 处理好的唾液样品,混匀后,置于室温孵育 30 min,将 PCR 管置于磁铁上孵育 1 min,去除上清液。4) 每管加入 100 μl Wash Buffer 洗脱 5 min,然后将 PCR 管置于磁铁上孵育 1 min,去除上清液;重复该步骤 1 次。5) 在 PCR 管中加入 10 μl Elution Buffer 洗脱 5 min (不能少于 5 min),将 PCR 管置于磁铁上孵育

1 min,取 5 μl 上清液移至另一个 PCR 管中。6) 装有 5 μl 上清液的 PCR 管中加入 5 μl CHCA (基质) 饱和溶液,充分混匀,取 2 μl 混合溶液加样到 Au/Steel 芯片上,待干后放入仪器读取。

2.3 芯片检测、数据采集和参数设置

采用蛋白指纹图谱仪 I 型质谱仪读取芯片信息。设置激光强度为 190,灵敏度为 5,收集数据的质荷比 (m/z) 范围为 2000 ~ 25000 m/z ,优化范围为 2000 ~ 15000 m/z ,信号收集位置 40 ~ 60,平均每点收集 20 次,收集总点为 100 次。已知多肽标准芯片标准 (all-in-one),激光离子流 0.5。用 Ciphergen Proteinchip Software 3.2.1 软件自动采集数据,纵坐标为峰强度 (蛋白相对含量),横坐标为蛋白质质荷比 (m/z)。

2.4 数据分析

对位于 2000 ~ 25000 m/z 峰值,用 Biomarker Wizard 软件过滤噪音。设置初始噪音过滤值为 5,二次信噪比为 2,以 10% 为最小阈值进行聚类,经上述数据预处理后,采用 t 检验比较两组唾液蛋白质质谱数据,找出两组之间具有统计学意义的差异表达蛋白质峰。用 Biomarker Pattern Software 5.0.2 采用决策树算法计算出多个变量 (m/z 蛋白质质谱峰) 变化对两组样本的判别价值 (诊断贡献度),确定最优化的诊断模型。

3 结果

3.1 胃癌脾虚证组与正常对照组唾液蛋白质质谱比较

两组共 85 份唾液标本,经过标准化后,在相对分子质量为 2000 ~ 25000 Da 范围内共检测到 375 个蛋白质峰,两组间比较,符合 m/z 强度平均值的比值 > 2 的条件,共有 106 个差异蛋白质峰有统计学意义 ($P < 0.05$),26 个质峰在胃癌脾虚证组表达下调,80 个质峰表达上调。胃癌脾虚证组与正常对照组之间 ratio > 4 差异有统计学意义的蛋白质峰具体见表 1。

3.2 胃癌脾虚证组与胃癌非脾虚证组唾液蛋白质质谱比较

两组共 57 份唾液标本,经过标准化后,在相对分子质量为 2000 ~ 25000 m/z 范围内共检测到 375 个蛋白质峰,质峰多集中在 0 ~ 15000 m/z 。满足 $P < 0.05$,且两组 m/z 强度平均值比值 > 2 的条件,两组间比较,共有 6 个差异蛋白质峰有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。胃癌脾虚证组与

表 1 胃癌脾虚证组与正常对照组比较差异有统计学意义的蛋白质峰 (ratio > 4)

质荷比 (M/Z)	胃癌脾虚证组 (M ± SD)	正常对照组 (M ± SD)	胃癌脾虚证组/ 正常对照组	正常对照组/ 胃癌脾虚证组	P 值	胃癌脾虚证组 上调/下调
2101.128	0.21 ± 1.56	1.36 ± 1.42	0.155	6.448	<0.001	下调
2081.701	0.95 ± 2.22	5.19 ± 3.41	0.181	5.530	<0.001	下调
2310.217	0.57 ± 1.60	2.55 ± 2.17	0.224	4.459	<0.001	下调
7101.905	0.52 ± 1.54	2.18 ± 2.04	0.237	4.223	<0.001	下调
3536.491	5.04 ± 8.92	1.25 ± 1.35	4.042	0.247	<0.001	上调
3641.129	2.10 ± 2.33	0.52 ± 0.59	4.043	0.247	<0.001	上调
5370.111	7.40 ± 6.87	1.80 ± 4.69	4.106	0.244	<0.001	上调
3619.186	4.92 ± 4.97	1.08 ± 1.42	4.574	0.219	<0.001	上调
4551.617	2.02 ± 2.25	0.44 ± 0.59	4.589	0.218	<0.001	上调
2344.326	2.60 ± 3.01	0.56 ± 1.80	4.661	0.215	<0.001	上调
6294.777	3.59 ± 3.11	0.76 ± 2.05	4.729	0.211	<0.001	上调
3663.999	4.57 ± 5.68	0.91 ± 0.95	5.040	0.198	0.006	上调
5355.632	4.92 ± 6.50	0.95 ± 2.37	5.201	0.192	<0.001	上调
3580.434	2.95 ± 2.74	0.56 ± 1.12	5.282	0.189	<0.001	上调
5439.673	4.40 ± 4.17	0.77 ± 1.30	5.750	0.174	<0.001	上调
2351.534	0.86 ± 1.32	0.12 ± 0.89	7.159	0.140	0.009	上调
3677.940	2.62 ± 3.55	0.34 ± 0.77	7.752	0.129	<0.001	上调

表 2 胃癌脾虚证组与胃癌非脾虚证组比较差异有统计学意义的蛋白质峰 (ratio > 2)

质荷比 (M/Z)	胃癌脾虚证组 (M ± SD)	胃癌非脾虚证组 (M ± SD)	P 值	胃癌脾虚证组/ 胃癌非脾虚证组	胃癌非脾虚证组/ 胃癌脾虚证组	胃癌脾虚证组 上调/下调
3225.359	0.58 ± 1.66	1.65 ± 1.83	0.030546	0.35295	2.833259	下调
2493.291	0.96 ± 1.73	2.35 ± 2.45	0.044862	0.408343	2.448921	下调
5380.163	6.94 ± 7.01	3.38 ± 4.91	0.008017	2.05392	0.486874	上调
5306.461	1.80 ± 1.77	0.82 ± 0.86	0.013914	2.206095	0.45329	上调
5355.632	4.92 ± 6.50	2.21 ± 2.22	0.026742	2.225231	0.449392	上调
5439.673	4.40 ± 4.17	1.56 ± 1.85	0.000327	2.822350	0.354315	上调

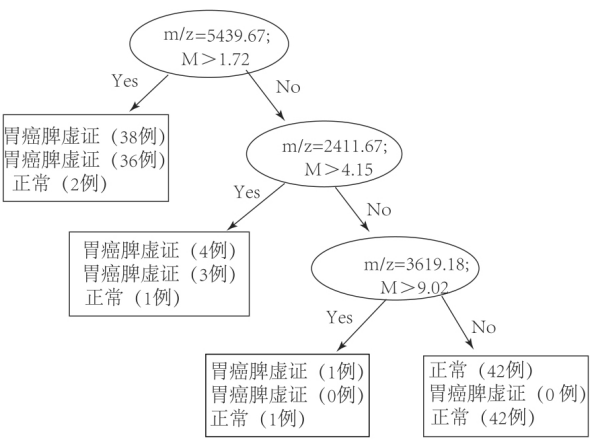
胃癌非脾虚证组之间 ratio > 2 差异有统计学意义的蛋白质峰具体见表 2，其中 2 个质峰在胃癌脾虚证组表达下调，4 个质峰表达上调。

3.3 胃癌脾虚证分子诊断模型的建立

采用决策树算法计算出多个变量 (m/z 蛋白质质谱峰) 变化对两组样本的判别价值，最终选定 m/z 为 5439.67、2411.67、3619.18 建立胃癌脾虚证唾液无创分子诊断模型，具体见图 1。当 5439.67 m/z > 1.72，或者 5439.67 m/z ≤ 1.72 且 2411.67 m/z > 4.15，或者 5439.67 m/z ≤ 1.72 且 2411.67 m/z ≤ 4.15 且 3619.18 m/z > 9.02，提示为早期胃癌脾虚证患者；当 5439.67 m/z ≤ 1.72 且 2411.67 m/z ≤ 4.15 且 3619.18 m/z ≤ 9.02，提示为正常。

3.4 胃癌脾虚证分子诊断模型的验证

表 3 示，经临床回代检验，胃癌脾虚证分子诊断模型的灵敏度和特异度分别为 100% 和 93%。表 4 示，采用十字交叉法进行验证，胃癌脾虚证分子诊断模型的灵敏度和特异度分别 87% 和 89%；计



注：m/z：质荷比；M：质谱峰相对强度

图 1 胃癌脾虚证唾液无创分子诊断模型

算十字交叉验证的 ROC 曲线值为 0.976，进一步分析验证了所建立模型的准确性。

表 3 胃癌脾虚证分子诊断模型的临床回代验证结果

组别	例数	正确诊断 (例)	错误诊断 (例)	正确率 (%)
胃癌脾虚证组	40	40	0	100
正常对照组	45	42	3	93

表 4 胃癌脾虚证分子诊断模型的交叉交叉法验证结果

组别	例数	正确诊断 (例)	错误诊断 (例)	正确率 (%)
胃癌脾虚证组	40	35	5	87
正常对照组	45	40	5	89

4 讨论

唾液检测已广泛应用于感染性疾病、内分泌疾病等各系统疾病的研究^[9-11]。唾液中含有大量蛋白质,而蛋白质是生命活动的执行者和体现者^[11],因而不同的疾病间具有蛋白质组学水平上的差异。已有研究证明,唾液中含有幽门螺杆菌(Hp)、Hp 抗体 IgG、硫酸还原菌(SRP)、犬尿喹啉酸(KYNA)等 180 种生物标志物^[12-14]。质谱蛋白质组学技术的发展促进了唾液生物标志物的探索进程,目前 MALDI-TOF 蛋白质组学技术已较多应用于胃癌的病因、诊断、治疗、预后以及是否发生转移的判断等多方面的研究,如 Ding 等^[15]发现,胃上皮 AGS 细胞癌变与 Epstein-Barrvirus(EB)病毒感染有关;Oya-Ito 等^[16]通过该技术发现,热休克蛋白 27 的翻译后修饰在胃肠肿瘤上皮细胞损伤的过程中发挥着重要作用;Repetto 等^[17]发现胃癌与自身免疫性胃炎存在 27 个差异蛋白点;Zhu 等^[18]研究显示,南蛇藤可使胃癌患者 HSP 蛋白表达显著下调,而过度表达的 HSP 蛋白也可降低南蛇藤的疗效。

胃癌为本虚标实之证,以痰凝、气滞、血瘀、邪热为标,脾虚为本^[21]。脾胃虚弱是胃癌发生、发展的基础,存在于胃癌前疾病→癌前病变→胃癌的整个过程^[22]。脾虚失运可致痰饮内生,痰湿交阻易在局部结聚形成肿块,且痰饮随气流行,机体内外无所不至,以致肿瘤易于复发、转移。江澄等^[23]对 500 例胃癌患者进行调查,结果显示胃癌手术前后单一证型以脾虚所占的比率最多。赵群等^[24]根据中医辨证标准,将 102 例患者分为胃癌无脾虚证和有脾虚证两组,分析统计脾虚证的有无与胃癌浸润深度、分化程度、淋巴结转移以及 PT-NM 分期等生物学行为的关系,结果显示胃癌患者脾虚证与其临床生物学行为之间有密切的关系,脾虚证患者的预后比非脾虚证患者差。

病证结合已经成为现代中西医结合临床的主要模式。鉴于不同疾病的特征性病理实质不同,开展病证结合的证候诊断客观化研究是十分必要的。脾虚是中医临床最常见的基本证候之一,也是胃癌的重要病机和常见证候。本研究运用 WCX 与 MALDI-TOF-MS 蛋白质组学技术,基于唾液蛋白质组开

展胃癌脾虚证病证结合分子诊断研究,结果发现胃癌脾虚证与非脾虚证比较,有 6 个差异蛋白峰具有统计学意义。采用诊断模型软件筛选出 m/z 为 5439.67、2411.67、3619.18 等 3 个差异蛋白质峰建立胃癌脾虚证与正常对照组的诊断判别模型,经临床回代检验,该模型的灵敏度和特异度分别达 100% 和 93%;通过交叉验证法进一步验证诊断模型的可靠性,结果该模型的灵敏度和特异度分别为 87% 和 89%,这一结果说明该模型对胃癌脾虚证的诊断效率优良,灵敏度高、特异性强。今后我们拟将进行多地区、多中心、大样本临床试验,以放大实验验证所发现的差异蛋白质,并进一步鉴定、研究未知差异蛋白质的分子结构及其生物学意义。

参考文献

- [1] HE CZ, ZHANG KH. Serum protein and genetic tumor markers of gastric carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(6): 3437-3442.
- [2] LUO G, ZHOU Y, YI W, et al. Lactotransferrin expression is down regulated and affects the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer [J]. Oncol Lett, 2015, 9(5): 2409-2413.
- [3] KILINÇALP S, EKİZ F, BASAR O, et al. Mean platelet volume could be possible biomarker in early diagnosis and monitoring of gastric cancer [J]. Platelets, 2014, 25(8): 592-594.
- [4] CASTAGNOLA M, PICCIOTTI PM, MESSANA I, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid [J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2011, 31(6): 347-357.
- [5] 倪睿,王满才,张有成. 基于唾液生物信息诊断胰腺癌的现状分析 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(5): 678-680.
- [6] 曹美群,吴正治. 基于 iTRAQ 和生物信息学技术筛选乳腺癌肝郁气滞证和肝肾阴虚证唾液差异表达蛋白 [J]. 中华中医药学会. 朱文锋学术思想研讨会暨中医诊断师资班 30 周年纪念大会论文集. 北京: 中华中医药学会, 2012: 6.
- [7] 陆再英,钟南山. 内科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 382-385, 396-400.
- [8] 林乾树,唐福康. 慢性胃炎脾虚、湿热蕴脾证型与“三联”根除幽门螺旋杆菌的关系研究 [J]. 中医教育, 1999, 18(3): 52-53.
- [9] HARIRIAN H, ANDRUKHOV O, BERTL K, et al. Microbial analysis of subgingival plaque samples compared to that of whole saliva in patients with periodontitis [J]. J Periodontol, 2014, 85(6): 819-828.
- [10] CHAN HH, RAHIM ZH, JESSIE K, et al. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(4): 4652-4654.

- 〔1〕 张新颖. 人淋巴管内皮细胞对卵巢癌淋巴结定向高转移细胞分泌蛋白的影响及候选蛋白的分析与验证〔J〕. 桂林: 广西医科大学, 2014.
- 〔2〕 SILVA DG, TINOCO EM, ROCHA GA, et al. Helicobacter pylori transiently in the mouth may participate in the transmission of infection〔J〕. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010, 105(5): 657-660.
- 〔3〕 KRISHNASWAMY RT, DAVID CM, GOVINDAIAH S, et al. Salivary IgG assay to detect Helicobacter pylori infection in an Indian adult population〔J〕. Indian J Dent Res, 2012, 23(5): 694-695.
- 〔4〕 HEGGENDORN FL, GONÇALVES LS, DIAS EP, et al. Detection of sulphate-reducing bacteria in human saliva〔J〕. Acta Odontol Scand, 2013, 71(6): 1458-1463.
- 〔5〕 WALCZAK K, DABROWSKI W, LANGNER E, et al. Kynurenic acid synthesis and kynurenine aminotransferases expression in colon derived normal and cancer cells〔J〕. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(7/8): 903-912.
- 〔6〕 AL-TARAWNEH SK, BORDER MB, DIBBLE CF, et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review〔J〕. OMICS, 2011, 15(6): 353-361.
- 〔7〕 DING Y, LI XR, YANG KY, et al. Proteomics analysis of gastric epithelial AGS cells infected with Epstein-Barr virus〔J〕. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(1): 367-372.
- 〔8〕 OYA-ITO T, NAITO Y, TAKAGI T, et al. Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer〔J〕. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(7): 769-781.
- 〔9〕 REPETTO O, ZANUSSI S, CASAROTTO M. Differential proteomics of Helicobacter pylori associated with autoimmune atrophic gastritis〔J〕. Mol Med, 2014, 20: 57-71. doi: 10. 2119/molmed. 2013. 00076.
- 〔10〕 ZHU Y, LIU Y, QIAN Y, et al. Research on the efficacy of Celastrus Orbiculatus in suppressing TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting HSP27 and TNF-α-induced NF-κB/Snail signaling pathway in human gastric adenocarcinoma〔J〕. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 433. doi: 10. 1186/1472 - 6882 - 14 - 433.
- 〔11〕 钱香, 徐康. 胃癌中医证型与预后相关因素关系的临床研究〔J〕. 吉林中医药, 2012, 32(11): 1088-1091.
- 〔12〕 陈静, 赵爱光, 曹妮达, 等. 胃癌前疾病、癌前病变、胃癌与脾虚证的研究进展〔J〕. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1654-1657.
- 〔13〕 江澄, 林胜友, 赵磊. 胃癌中医证型动态演变的回顾性研究〔J〕. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1): 44-46.
- 〔14〕 赵群, 李勇, 杨进强, 等. 胃癌患者脾虚证与生物学行为的关系及健脾益气中药对其的影响〔J〕. 北京中医药大学学报, 2003, 26(4): 68-71.

Molecular Diagnostic Model of Saliva Protein Fingerprints in Gastric Cancer Patients with Spleen Deficiency XIE Mengzhou^{1,2}, HE Zuomei¹, HUANG Feijuan³, ZHOU Xiaoqing¹, WU Zhengzhi^{1,3,4}

(1. Institute of Chinese Medicine Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. Engineering Research Center in Antitumor Chinese Herb Innovation Technology in Hunan Province; 3. First Affiliated Hospital of Shenzhen University; 4. Fudan Hospital Affiliated to Guangdong Medical University)

ABSTRACT Objective To study and establish a new molecular diagnostic model of saliva protein fingerprints in gastric cancer patients with spleen deficiency. **Methods** Saliva samples of 57 gastric cancer patients with no surgery and chemoradiotherapy (40 cases of spleen deficiency, 17 non-spleen deficiency) and 45 healthy volunteers were collected and tested by weak cation exchange (WCX) magnetic nanoparticles combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to get the protein fingerprints of each group. Then the data were compared to figure out the differentially expressed protein peaks with statistical significance between gastric cancer spleen deficiency group and normal control group as well as that between gastric cancer spleen deficiency group and gastric cancer non-spleen deficiency group. The discriminant value of the variation of several variables, including mass-to-charge ratios (m/z), to two group samples were calculated by decision tree algorithm, and the optimal diagnostic model was determined. **Results** There were 106 differentially expressed protein peaks with statistical significance in the saliva protein mass spectrum comparison between gastric cancer spleen deficiency group and normal control group, and 6 between gastric cancer spleen deficiency group and gastric cancer non-spleen-deficiency group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Three main different protein peaks with m/z 5439.67, 2411.67, 3619.18 were screened to establish the diagnostic model of gastric cancer spleen deficiency. The sensibility and specificity of the model are 100% and 93% respectively in clinical regression tests, which are further validated to be 87% and 89% in cross-validation. **Conclusions** Based on WCX magnetic nanoparticles combined with MALDI-TOF MS technology, the non-invasive saliva protein molecular diagnostic model of gastric cancer spleen deficiency has high sensibility and specificity, and it seems to have excellent efficiency to diagnose gastric cancer spleen deficiency.

Keywords gastric cancer; spleen deficiency; saliva; molecular diagnostic model; protein fingerprint

(收稿日期: 2015 - 12 - 25; 修回日期: 2016 - 05 - 05)

编辑: 崔京艳