

血小板裂解液差异蛋白在原发免疫性血小板减少症诊断中的临床应用研究*

吴鹏强, 汤计瑞, 韩丽英[△] (泸州医学院附属医院血液科, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 通过对原发免疫性血小板减少症(ITP)患者血小板裂解液差异蛋白的研究,了解其与 ITP 发病的关系,为 ITP 的诊断建立一种简便快速、灵敏度高、特异性好的实验方法。**方法** 应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测 64 例 ITP 患者及 42 例健康者血小板裂解液,获得血小板蛋白质谱图,筛选出差异蛋白,结合人工神经网络(ANN),建立 ITP 诊断模型。**结果** 质荷比(m/z)为 3 549.17、7 678.09 的蛋白在 ITP 组中高表达,质荷比为 5 328.29、7 894.32 的蛋白低表达。诊断模型的灵敏度 93.3%,特异度 82.6%。**结论** 基于血小板蛋白质谱建立的 ANN 模型可能对 ITP 的诊断具有一定的临床价值。

【关键词】 原发免疫性血小板减少症; 蛋白质组学; 表面增强激光解吸电离飞行时间质谱

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)16-2346-03

Study of clinical study of platelet lysate differential protein in diagnosis of primary immune thrombocytopenia* WU Peng-qiang, TANG Ji-rui, HAN Li-ying[△] (Department of Hematology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To establish a quick and simple diagnostic laboratory method with high sensitivity and good specificity for the diagnosis of primary immune thrombocytopenia ITP by studying platelet lysate differential protein in the patients with ITP for understanding its relationship with the onset of ITP. **Methods** The platelet lysate was detected in 64 cases of ITP and 42 cases of healthy people by surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry(SELDI-TOF-MS) technology for obtaining the platelet protein mass spectrum. The differential protein was screened and combined with the artificial neural network(ANN) for establishing the diagnostic model of ITP. **Results** The protein with the mass electron ratio(m/z) of 3 549.17 and 7 678.09 was highly expressed in the ITP group and which of m/z 5 328.29 and 7 894.32 was lowly expressed. The sensitivity and specificity of the diagnostic model were 93.3% and 82.6% respectively. **Conclusion** The established ANN model on the basis of platelet protein mass spectrum may have some clinical value for the diagnosis of ITP.

【Key words】 primary immune thrombocytopenia; proteomics; SELDI-TOF-MS

原发免疫性血小板减少症(ITP)是一种常见的由抗血小板膜抗体导致外周血小板破坏而引起的出血性疾病,2007 年国际工作组(IWG)召集 ITP 专家在意大利举行会议,强调其为免疫机制所介导。成人发病率为 1/20 000~1/10 000,临床上以皮肤、黏膜及内脏出血较多见。在 ITP 发病过程中血小板膜抗原性发生改变是疾病的根本所在,检测血小板表面的抗原,寻找差异蛋白,可能更易了解疾病的本质特征。由于血小板无细胞核,与其他有核细胞及血清相比蛋白成分简单,因此检测血小板裂解液可以直接获得 ITP 的疾病特征,避免血清中高丰度蛋白质的干扰。采用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)-蛋白质芯片技术检测 ITP 患者和健康者血小板裂解液,在血小板蛋白质水平全景式比较指纹图谱,寻找差异蛋白,作为 ITP 诊断的生物标志物,进一步完善 ITP 诊断模型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 10 月至 2012 年 11 月本院血液科收治的按 IWG2009 年 ITP 诊断标准诊断为 ITP 的住院患者,所有患者均为初诊^[1]。健康对照组均来自本院健康体检中心。ITP 组:ITP 患者 64 例,男 22 例,女 42 例,年龄 15~78 岁,血小板(2~30)×10⁹/L。健康对照组:健康体检者 42 例,男 20 例,女 22 例,年龄 18~65 岁,血小板(100~300)×

10⁹/L,组间年龄、性别差异无统计学意义(P>0.05)。

1.2 仪器与试剂 前列环素应用液、乙腈、复方枸橼酸钠(ACD)液、芥子酸(SPA)、三羟甲基氨基甲烷(tris-HCl)缓冲液、3-环乙胺-1-丙磺酸 3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲氨基基]-1-丙磺酸盐(CHAPS)、磷酸盐缓冲液(×10)、高效液相色谱液(HPLC H₂O)等均购自美国 Sigma 公司。蛋白质芯片时间质谱分析仪(PBS II/C)、Au 蛋白芯片由美国 CIPHERGEN 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 样本采集与制备 抽取清晨空腹静脉血 2~3 mL,置于枸橼酸抗凝管内,立即加入前列环素应用液(Sigma-Aldrich 公司,美国)2~3 μL,放平颠倒混匀,动作要轻柔。离心 15 min,用移液管将上层富血小板血浆(PRP)置于新试管内,加 2~3 μL 前列环素应用液。混匀后,离心 20 min,弃上层血浆(注意不要吸到贴壁的蛋白),加入(ACD)液(Sigma-Aldrich 公司,美国)0.5 mL,使血小板重悬。离心 20 min,弃上清,加入 0.1 mL 去离子水。在-80 与 37℃之间反复快速冻融 5 次,离心 20 min。获得的上清液即为血小板裂解液,每 30 μL 分装一管,每个样本分装 3 管,-80℃冰箱保存备用。所有操作均在低温下进行,分装时不能吸入下层的细胞,发生溶血的样本应舍弃。

* 基金项目:泸州医学院青年基金项目(12065)。

作者简介:吴鹏强,男,主治医师,硕士,主要从事血液系统疾病方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:LYHLY@sina.com。

1.3.2 上样及质谱检测 将血小板裂解液置于冰盒表面融化后,取 5 μ L 裂解液、5 μ L SPA 于新离心管(0.2 mL)底,将血小板裂解液与 SPA 混合后点样,每个点加 2 μ L,晾干;待芯片表面晾干后,点加 1 μ L 加能量吸收分子(EAM),室温晾干约 15 min,重复点加 1 μ L,晾干后,每孔加入 200 μ L 结合缓冲液,室温振荡洗涤 3 次,每次 5 min,甩掉缓冲液,拍干后再加入 200 μ L HPLC 液,洗脱 2 次,快速倾去,拍干。晾干后点加 1 μ L SPA,10 min 后重复一次,晾干后即可上机测量。采用 PBS II /C 型蛋白质指纹图谱仪对结合蛋白质的金芯片进行检测,Ciphergen Proteinehip 软件自动采集质谱数据。

1.4 采集数据 用已知相对分子质量的标准蛋白质芯片 All-in-one(peptide or protein)(塞弗吉公司,美国)将获得的蛋白质分子量误差校正到小于 0.01,作好内标。根据 *P* 值小、均值差异大、标准差小的原则,采用 Biomarker Wizard 3.1 软件筛选出差异蛋白。结合人工神经网络,以 32 例 ITP 患者和 21 例健康者训练组建立诊断模型,诊断模型采用输入层含 5 个神经元,隐含层含 5 个神经元和输出层含 1 个神经元。设定训练组 ITP 患者的输出值为 1,健康者的输出值为 0,以 0.5 为界。学习率为 0.01,训练 1 000 次,建立并储存 ANN 诊断模型。采用验证组盲法检测诊断模型,进行模拟仿真计算,得出模型的诊断效能。

2 结 果

2.1 差异蛋白的筛选 通过 SELDI-TOF-MS 质谱仪对结合在蛋白质芯片上的血小板蛋白质进行检测,获得 64 例 ITP 组和 42 例健康对照组的小血小板裂解液指纹图谱。将 ITP 组与健康对照组蛋白峰强度的均值 \bar{x} 、标准差 *s*、*P* 值比较,其中有 4 个蛋白表达差异有统计学意义(*P* < 0.01),质荷比分别为 3 549.17、5 328.29、7 678.09、7 894.32,在 ITP 组高表达的蛋白质为 3 549.17、7 678.09,低表达的为 5 328.29、7 894.32,在蛋白质谱图上作标记,导出 4 个蛋白质的峰强度,并建立 ITP 的诊断模型 1。见表 1。

表 1 ITP 组和健康对照组差异蛋白质的平均值、标准差及 *P* 值比较

质荷比(m/z)	ITP 组($\bar{x} \pm s$)	健康对照组($\bar{x} \pm s$)	<i>P</i>
7 894.32	10.99 \pm 7.72	18.66 \pm 6.01	4.47 $\times 10^{-7}$
7 678.09	8.58 \pm 5.13	4.00 \pm 1.89	1.16 $\times 10^{-6}$
3 549.17	7.48 \pm 5.55	3.63 \pm 3.44	1.14 $\times 10^{-5}$
5 328.39	3.24 \pm 1.97	5.66 \pm 2.65	1.50 $\times 10^{-5}$

注:按质荷比的 *P* 值升序排列。

2.2 诊断模型的建立和效能评价 将训练组(包含 32 例 ITP 患者、21 例健康者)的上述 4 个蛋白质峰强度输入 BP 神经网络,建立 ITP 诊断模型。输入层有 4 个神经元,隐含层有 5 个神经元,输出层有 1 个神经元。输出值越接近 1,诊断 ITP 的可能性越大,以 0.5 为界。此模型的学习率设为 0.01,学习次数为 1 000 次。用验证组(包括另 32 例 ITP 和 21 例健康者)进行盲法测试,结果显示,32 例 ITP 样本有 4 例误判,21 例健康者有 2 例误判。该模型诊断 ITP 的灵敏度 93.3%,特异度 82.6%,阳性预测值 87.5%,阴性预测值 82.6%。见表 2。

表 2 诊断模型 1 效率分析(n)

分组	预测 ITP 组 (预测值 > 0.5)	预测正常组 (预测值 \leq 0.5)	合计
ITP 组	28	4	32
健康对照组	2	19	21
合计	30	23	53

2.3 差异蛋白的初步鉴定 根据获得差异蛋白质质荷比,在

SWISS Prot 蛋白质数据库中查询相对应的蛋白质。网址为: <http://web.expasy.org/tagident/>,查询结果如下:m/z 3 543 的蛋白质对应为神经肽 W-30,m/z 7 681 对应的为血小板第 4 因子,m/z 5 322 对应的为 β -防御素,m/z 7 894 对应的为促性腺释放素前体。

3 讨 论

ITP 是最常见的出血性疾病之一,以皮肤黏膜、内脏出血较常见。目前,ITP 的发病机制不明,大多数研究表明免疫机制在 ITP 的发病过程中起关键作用^[2]。血小板自身抗体导致血小板破坏增加,也可抑制骨髓巨核细胞,使其数量减少、形态变化、成熟障碍,导致血小板更新减少,无效血小板生成^[3]。有报道称血小板自身抗体不仅破坏血小板,还可引起血小板功能障碍。

近年来,蛋白质组学的研究越来越受到重视。蛋白质组是指细胞、组织或器官的基因组所表达的全部蛋白质^[4]。作为生命活动的执行者,蛋白质表达水平的高低与疾病发展、转归、药物作用或毒素作用直接相关。疾病的发生引起蛋白质的改变,研究蛋白质可为获得疾病的特征提供线索。SELDI-TOF-MS 技术结合蛋白质组学最早用于恶性肿瘤生物标志物筛选,广泛应用于卵巢癌、肝癌、乳腺癌等多种疾病,对筛选和鉴定肿瘤特异性标志物提供有力工具,是研究蛋白质组学的理想平台^[5]。Craddock 等^[6]应用该技术发现 α -防御素是精神分裂症易感性标志物。Rolland^[7]应用 SELDI-TOF-MS 技术检测非霍奇金淋巴瘤不同亚型,获得 3 个有意义的差异蛋白质,经免疫组化鉴定其中有两个蛋白质分别为组蛋白 H4 和 H2B,具有促进细胞增殖的作用,可以将套细胞淋巴瘤与小淋巴细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤区分开。Tumblin^[8]对镰状红细胞贫血的血浆蛋白质进行研究,质荷比为 28.1×10^3 、 11.7×10^3 为显著差异蛋白质,经免疫测定法证实分别为载脂蛋白 A1、血清淀粉样蛋白 A,因此,临床上可以通过检测这 2 个蛋白质来预测患者的急性疼痛发作期。

本实验采用 SELDI-TOF-MS 技术直接对血小板裂解液进行研究,采用差异蛋白质组学方法,获得 4 个差异蛋白。m/z 3 543 的蛋白质对应为神经肽 W-30,脑垂体腺苷环化酶激活肽(PACAP)和血管活性肠通过肽负调控使巨核细胞和血小板生成受损^[9-10]。m/z 7 681 对应的为血小板第 4 因子,Pötschke 等^[11]认为在心肺旁路术后第 6 天易产生抗血小板因子 4/肝素复合物 IgG 抗体,这些抗体是有免疫介导的药物不良反应,肝素介导的血小板减少症。m/z 5 322 对应的为 β -防御素,García 等^[12]采用蛋白质点阵法发现 10 个生物标志物,通过多变量逻辑回归分析,其中 β -防御素 2 和白细胞介素-4 受体(IL-4R)可以作为急性缺血性脑卒中恶化的独立的危险因素。m/z 7 894 对应的为促性腺释放素前体。Pazaitou 等^[13]认为促性腺释放激素和神经肽受体在乳腺癌中表达提示预后不良。

本研究的优点在于能够从小样本量中同时检测大量的蛋白质,从蛋白质的整体水平研究机体的复杂变化,是其他检测技术不能替代的。这个诊断模型的诊断效能高,比单一的蛋白质峰更具说服力,灵敏度和特异度均比传统的单一诊断方法较理想,为 ITP 的诊断提供了另一种参考。缺点主要是实验样本量较小,诊断模型还需要扩大样本量进一步验证。虽然尽量做到操作均衡,但是研究中仍然存在许多不可控因素,样本中血小板计数较少,尽可能多的从中提取血小板单一成分的技术还有待进一步提高。对于 SELDI-TOF-MS 技术来说,每个质荷比对应的可能是很多相对分子质量相近的多肽,不能明确 C 末端、N 末端的序列,无法鉴定蛋白的结构、功能和生物学特性,下一步的工作将筛选出的差异蛋白质提纯,PCR 基因检

测,鉴定蛋白质结构及功能研究。将诊断模型中的蛋白质纯化后制备成探针或试剂盒,可以临床推广应用。

参考文献

- [1] Stasi R, Newland AC. ITP: a historical perspective[J]. *Br J Haematol*, 2011, 153(4):437-450.
- [2] Nugent D, Mcmillan R, Nichol JL, et al. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production[J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(6):585-596.
- [3] Rodeghiero F. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. *Blood*, 2009, 113(11):2386-2393.
- [4] He Y, Zhao YX, Zhu MQ, et al. Detection of autoantibodies against platelet glycoproteins in patients with immune thrombocytopenic purpura by flow cytometric immunobead array[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 415(1):176-180.
- [5] De BM, De SD, Meuwis MA, et al. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS[J]. *Biomed Biotechnol*, 2010, 2010:906082.
- [6] Craddock RM, Huang JT, Jackson E, et al. Increased alpha-defensins as a blood marker for schizophrenia susceptibility[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(7):1204-1213.
- [7] Rolland D. Identification of proteomic signatures of mantle cell lymphoma, small lymphocytic lymphoma, and marginal zone lymphoma biopsies by surface enhanced laser

desorption/ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(4):648-658.

- [8] Tumblin A. Apolipoprotein A-I and serum amyloid A plasma levels are biomarkers of acute painful episodes in patients with sickle cell disease[J]. *Haematologica*, 2010, 95(9):1467-1472.
- [9] Ono A, Naito T, Ito I, et al. Correlations between serial pro-gastrin-releasing peptide and neuron-specific enolase levels, and the radiological response to treatment and survival of patients with small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3):439-444.
- [10] Peeters K, Loyen S, Van Kerckhoven S, et al. Thrombopoietic effect of VPAC1 inhibition during megakaryopoiesis[J]. *Br J Haematol*, 2010, 151(1):54-61.
- [11] Pötschke C, Selleng S, Bröker BM, et al. Heparin-induced thrombocytopenia; further evidence for a unique immune response[J]. *Blood*, 2012, 120(20):4238-4245.
- [12] García BT, Giralt D, Bustamante A, et al. Role of beta-defensin 2 and interleukin-4 receptor as stroke outcome biomarkers[J]. *J Neurochem*, 2014, 129(3):463-472.
- [13] Pazaitou PK, Chemonidou C, Poupri A, et al. Gonadotropin-releasing hormone neuropeptides and receptor in human breast cancer: correlation to poor prognosis parameters[J]. *Peptides*, 2013, 42(4):15-24.

(收稿日期:2015-03-05 修回日期:2015-04-15)

(上接第 2345 页)

康复提供依据,并根据检查结果采用个性化的指导和干预措施,能够明显改善患者的心绞痛状态,提高患者的术后生活质量。在 ECG 监测基础上能够了解患者的生理状态,对患者病情严重程度进行判断和评估,并根据患者的生理状态制定合理的护理和干预策略。在考虑生物因素的基础上,充分考虑社会因素和心理因素的影响,制定相应的干预策略,改善患者心理状态,加强患者的社会支持环境,使患者在生理护理基础上得到家属和社会的有效支持,不仅能够改善患者的生存环境和状态,使患者获得精神上的鼓励和安慰,消除恐惧和紧张情绪,也可使患者得到长期、有效的照顾,有利于患者的康复^[8-9]。通过术后个性化护理、康复运动、心理干预促进患者缺血心肌侧支循环的建立,改善患者冠状动脉的储备能力,增强心功能,患者生存质量的提高可显著增强患者信心,进一步积极治疗,促进身体和精神的恢复^[10]。

综上所述,ACS 介入术后根据不同 ECG 结果对患者进行干预具有较好的临床疗效,能够明显改善患者心绞痛状况,提高患者生活质量及满意度,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 徐亮,杨庆坤. 急性冠状动脉综合征患者介入治疗的近期疗效评价[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(5):96-97.
- [2] Collet JP, Silvain J, Bellemain-Appaix A, et al. Pretreatment with P2Y12 inhibitors in Non-ST-Segment-Eleva-

tion acute coronary syndrome: an outdated and harmful strategy[J]. *Circulation*, 2014, 130(21):1904-1914.

- [3] 郭望英,彭丽容,孙红梅,等. 急性冠状动脉综合征介入术后心电图变化与生存质量的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(13):2199-2202.
- [4] 田娟. 家属同步施教对急性冠状动脉综合征 PCI 术后患者生活质量的影响[J]. *当代护士*, 2012, 20(3):164-165.
- [5] Berent R, Berent T, Karkutli E, et al. Influence of high-dose highly efficient statins on short-term mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting for acute coronary syndromes[J]. *Am J Cardiol*, 2014, 114(7):1128-1129.
- [6] 颜羽. 急性冠状动脉综合征的急救与护理干预进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2014, 35(12):1813-1814.
- [7] 王如珠,殷屹岗,朱莉,等. 介入术后影响急性冠状动脉综合征恢复的危险因素以及预防措施[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(7):793-794.
- [8] 朱丽萍,苏纯音. 急性冠状动脉综合征介入术后患者康复护理进展[J]. *中国护理管理*, 2014, 14(9):994-997.
- [9] 牛娜. 急性冠状动脉综合征介入术后心电图变化与生存质量的相关性[J]. *临床医学*, 2014, 34(11):38-39.
- [10] 戴月. 循证护理在急性冠状动脉综合征介入术后的应用[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(19):107-109.

(收稿日期:2015-02-21 修回日期:2015-05-15)