

·论著·

基于支持向量机神经母细胞瘤血清蛋白质标记物的检测及临床应用

陈新让¹ 王家祥² 余捷凯¹ 郑树³

【摘要】目的 寻找神经母细胞瘤特异血清蛋白标记物,构建初步诊断模型,并探讨其临床应用价值。**方法** 收集 47 例神经母细胞瘤患儿血清标本,30 例其它恶性肿瘤患儿血清标本以及健康儿童血清标本 10 例;用 ZUCI-Protein Chip Data Analyze System 分析软件进行数据处理;经留一法交叉验证,分类器评价模型的预测效果。**结果** 构建 3 个模型并筛选出 10 个蛋白标记物,能够成功区分神经母细胞瘤和健康儿童蛋白质谱的差异,表达模型的敏感性为 100%,特异性为 100%,区分神经母细胞瘤术前和术后蛋白质谱差异表达模型的敏感性为 100%,特异性为 100%,区分神经母细胞瘤与其它小儿恶性肿瘤血清蛋白质指纹图谱模型的敏感性为 88.89%,特异性为 100%。**结论** 用 SELDI-TOF-MS 及生物信息学技术并结合支持向量机(SVM)初步建立的模型可作为神经母细胞瘤的另一种特异性强、敏感性高的辅助检查手段。

【关键词】 神经母细胞瘤;诊断模型;SELDI-TOF-MS;SVM;肿瘤标记物

Detection and clinical application of serum protein markers in neuroblastoma with SVM. CHEN Xin Rang, WANG Jia Xiang*, YU Jie Kai, et al. Department of surgery, the pediatric Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, 450052, China

【Abstract】 Objective To search the specific protein biomarkers which can construct the serum protein markers in the earlier diagnosis of Neuroblastoma and in the clinical study. **Methods** Eighty-seven serum samples (including 47 Neuroblastoma patients, 30 children malignant solid tumor 10 healthy children) were detected by SELDI-TOF-MS and proceeded by ZUCI-protein chip Data Analyze System Software to be identified by Jackknife and evaluate the model's predictive effect. **Results** To analyze all the serum protein icon by cluster analysis can find a proteomics model. The detective model in combined with 10 biomarkers could separate neuroblastoma from the healthy group with sensitivity of 100.00%, specificity of 100.00%; separate preoperative neuroblastoma from postoperative neuroblastoma with sensitivity of 100.00%, specificity of 100.00%;The diagnosis model combined with 5 biomarkers could separate neuroblastoma from other children malignant solid tumors with sensitivity of 88.89%, specificity of 100.00%. **Conclusions** The model of neuroblastoma combined by SELDI-TOF-MS with SVM and bio-information technique can be regarded as another more specificity and sensitivity auxiliary examination mean.

【Key Words】 neuroblastoma; diagnosis model; SELDI-TOF-MS; SVM; tumor marker

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)在儿童恶性肿瘤发病率中占第四位,我国每年新发病例约 3 000 例,是最常见的外周神经系统恶性肿瘤。1 岁以上患儿恶性程度高,明确诊断时大部分已为晚期,预后差。近年来,通过基础与临床研究确定了许多与神经母细胞瘤相关的遗传与生物学标记,这些标

记可以帮助早期诊断、预测预后和对肿瘤进行分层^[1]。基于 SELDI-TOF-MS 质谱技术在恶性肿瘤诊治中的进展以及支持向量机(SVM)所具有的小样本、推广性能和全局最优的优点^[2], SVM 算法在膜蛋白类型预测方面效果明显。一致测试对每类预测得到的准确率比交叉校验、独立测试都要高^[3]。因此,本研究拟通过 SELDI-TOF-MS 结合 SVM 技术来寻找神经母细胞瘤患者血清蛋白质标记物,以协助早期其诊断。

作者单位:1. 郑州市儿童医院(450052); 2. 郑州大学第一附属医院(450052); 3. 浙江大学肿瘤研究所(310000); 通讯作者: 陈新让, Email: chen66608@126.com

材料与方法

一、实验对象

本实验血清样本共 87 例,均来自郑州大学第一附属医院小儿外科,其中神经母细胞瘤 37 例(1 例已化疗 4 个疗程);其它恶性实体肿瘤 30 例(肾母细胞瘤 21 例,肝母细胞瘤 3 例,肾横纹肌肉瘤 3 例,恶性畸胎瘤 2 例,胰母细胞瘤 1 例);正常对照组 10 例,均为经体检的健康小儿。所有恶性肿瘤均经免疫组化证实后由 2 名以上病理学教授证实。

神经母细胞瘤中,男 22 例,女 15 例,平均年龄 1.9 ± 0.21 岁。其它恶性实体肿瘤中,男 21 例,女 9 例,平均年龄 3.7 ± 0.15 岁。正常对照组与神经母细胞瘤组年龄性别配对。所有全血标本均于术前清晨空腹下抽取,于 4°C 下静置 1 h 后 3 000 rpm 离心 10 min,分离血清后储存于 -80°C 低温冰箱中。

二、主要仪器和试剂

所用主要仪器包括:Ross Temp Inc, CIPHERGEN PBS II SELDI-TOF-MS 和 WCX2 蛋白芯片、ORBIT 300 Nuair, Bioprocessor, Wallac 129 - 003 DELFI-APLATESHAKE; 试剂:CHAPS、Urea、DTT、NaAc、SPA。

三、SELDI 操作的技术路线

样本冰融, 4°C 10 000 rpm 离心 2 min; 取 96 孔板, 放冰盒上, 每孔加 U9(9M Urea, 2%CHAPS, 1%DTT) 10 μl , 血清 5 μl , 4°C 层析柜 600 rpm 振荡 30 min, 振荡结束前 15 min 做芯片预处理, 芯片装入 Bioprocessor 中并记下芯片号; 每孔加 NaAC(100 Mm, pH4) 200 μl , 层析柜中 600 rpm, 5 min, 重复 1 次; U9 处理后 96 孔板放冰上, 快速加入 NaAC 185 μl 在层析柜中 6 000 rpm 振荡 2 min, 加已处理好的样本 100 μl 到芯片, 层析柜 4°C 600 rpm 振荡 1 h, 甩干, 重复 3 次; 用 hplc 水 200 μl 洗 2 次快速甩干; 用 50%饱和的 SPA 1 μl 重复 2 次; 上机检测; 将芯片放入 Ciphergen 读谱仪中检测。

四、数据收集与处理

使用 protein chip software 3.1 统计软件做校正, 应用 ZUCI-Protein Chip Data Analyze System 软件包进行统计分析。原始数据用离散小波(undecimated discrete wavelet transform)分析去噪。聚类分析将各个样本中 m/z 的差异小于 0.3% 的峰聚为一类。支持向量机特征向量的选取采用统计过滤结合模型依赖性筛选的方法建立判别模型, 用留一法交叉验证

作为评估模型判别效果。

五、统计学分析

对所有初步筛选出的质荷比峰做 Wilconxon 秩和检验, 选出 P 值最小的 10 个峰进一步分析。检验标准设 $\alpha = 0.01$ 。

结 果

一、神经母细胞瘤组与正常对照组

神经母细胞瘤组和正常对照组的质谱经过初步过滤筛选得到 535 个 M/Z 峰, 对其相对强度做 Wilconxon 秩和检验分析得到 P 值小于 0.01 的 M/Z 峰 2 个, 从差异显著蛋白质峰的任意组合中, 采用 SVM 筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型, 筛选出 M/Z 位于 4450.2、6439.4 和 7693.2 的标志物 3 个(表 1), 在神经母细胞瘤组低表达, 正常对照组高表达(图 1)。联合两个潜在标记物作为输入值, 用留一法交叉检验, 在测试集上判别模型的敏感性为 100.00%, 特异性为 100.00%。

二、神经母细胞瘤术前组与术后组

神经母细胞瘤组和正常对照组的质谱经过初步过滤筛选得到 508 个 M/Z 峰, 对其相对强度做 Wilconxon 秩和检验分析得到 P 值小于 0.01 的 M/Z 峰 3 个, 从差异显著蛋白质峰的任意组合中, 采用 SVM 筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型, 筛选出 M/Z 位于 4244.3 和 7619.4 的标志物 2 个(表 1), 在神经母细胞瘤术前组低表达, 在神经母细胞瘤术后组高表达(图 2)。联合两个潜在标记物作为输入值, 用留一法交叉检验, 在测试集上判别模型的敏感性为 100.00%, 特异性为 100.00%。

三、神经母细胞瘤组与其它小儿恶性实体瘤组

神经母细胞瘤组和其它小儿恶性实体瘤组质谱经过初步过滤筛选得到 520 个 M/Z 峰, 对其相对强度做 Wilconxon 秩和检验分析得到 P 值小于 0.01 的 M/Z 峰 4 个, 从差异显著蛋白质峰的任意组合中, 采用 SVM 筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型, 筛选出 M/Z 位于 3414.50, 4634.14, 4715.97, 6616.45 和 9309.98 的标志物 5 个(表 2), 显示神经母细胞瘤组低表达, 其它小儿恶性实体瘤组高表达(图 3)。联合两个潜在标记物作为输入值, 用留一法分类器评价模型的预测效果, 在测试集上判别模型的敏感性为 88.89%, 特异性为 100.00%。

表 1 神经母细胞瘤组与正常对照组的 M/Z 位于 4450.2、6439.4、7693.2 的统计资料

M/Z	Mean-N	SD-N	Mean-D	SD-D	P
4450.213	1427.84	119.58	850.67	86.65	0.00020759671
6439.426	4961.89	990.86	1518.03	801.35	0.00038350408
7693.237	2760.66	221.31	876.23	91.35	0.00049785231

注:N 为神经母细胞瘤组,D 为正常小儿

表 2 神经母细胞瘤术前组与术后组的 M/Z 位于 4244.3、7619.4 的统计资料

M/Z	Mean-N	SD-N	Mean-D	SD-D	P
4244.343	1427.84	119.58	950.67	76.65	0.00012075867
7619.412	4961.89	1060.66	1518.03	301.35	0.00453514392

注:N 为神经母细胞瘤术前组,D 为神经母细胞瘤术后组

表 3 神经母细胞瘤组与其它小儿恶性实体肿瘤组的 M/Z 位于 3414.50、4634.14、4715.97、6616.45、9309.98 的统计资料

M/Z	Mean-N	SD-N	Mean-D	SD-D	P
3414.4976	1093.94	71.78	1389.41	99.31	0.00112439695
4634.14 32	849.78	50.23	1118.43	76.95	0.00121535460
4715.9682	222.54	51.95	306.31	71.34	0.00136131496
6616.4457	927.91	62.77	1147.96	99.91	0.00150660005
9309.9843	1191.52	78.93	2479.14	81.42	0.00183106729

注:N 为神经母细胞瘤术前组,D 为其它小儿恶性实体肿瘤

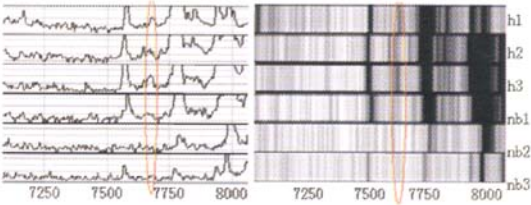


图 1 M/Z 位于 7693.2 的蛋白质的质谱差别(nb 是神经母细胞瘤,h 是正常小儿)

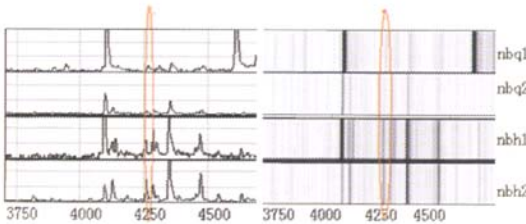


图 2 M/Z 位于 4244.3 的蛋白质的质谱差别(nbq 是神经母细胞瘤术前组,nbh 是神经母细胞瘤术后组)

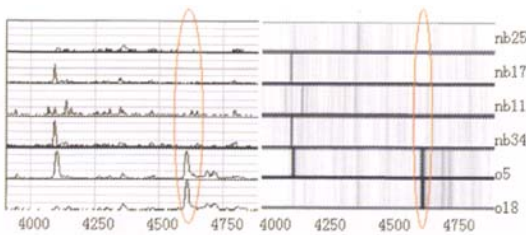


图 3 M/Z 位于 4634.14 的蛋白质的质谱差别(nb 是神经母细胞瘤术前组,o 是其它小儿恶性实体肿瘤)

讨 论

神经母细胞瘤在儿童肿瘤死亡率中高居第一位^[4]。因肿瘤原发部位隐蔽,早期无特殊症状,易误诊误治。香草扁桃酸(VMA)浓度测定是早期诊断本病的可靠依据之一。B 超与 CT 检查也有较好相关性,但确诊必须依靠病理学检查。

不同疾病在症状出现之前及不同疾病阶段都有独特的蛋白质变化,分析疾病早期的蛋白质变化有望获得临床早期诊断的生物标志物^[5]。SELDI-TOF-MS 技术已在肝癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、结(直)肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、肾母细胞瘤和泌尿系肿瘤生物标志物的筛选方面取得突破性进展^[6-17]。

我们将 SELDI-TOF-MS 和分子生物信息学结合,应用 SVM 分析方法对神经母细胞瘤、小儿实体肿瘤和健康儿童的血清蛋白质进行筛查,筛选出特异性强、敏感性高的血清肿瘤标记物,在建立的 2 个蛋白指纹图诊断模型中均有高表达和低表达的 2 个候选标志物群,其对应的功能群可能为癌基因产物的高表达及抑癌基因产物的低表达,提示神经母细胞瘤发生发展过程是癌基因的激活、过度表达和抑癌基因的失活、功能受抑制相互作用的结果。由于 NB 的基因已经发生了某种改变,必然会导致蛋白质的表达异常,异常表达蛋白质标记物为神经母细胞

瘤的早期诊断提供了理论依据。

本试验运用 SELDI-TOF-MS 技术寻找血清标记物,然后用 Wilcoxon 秩和检验分析评价各个峰对区分样本的相对重要性。将差异显著的质荷峰随机组合输入 SVM,筛选特异性强、敏感性高的血清标记物,并进行盲法测试。建立的血清蛋白指纹图谱模型以灵敏性 100.00%, 特异性 100.00%成功地区分神经细胞瘤和正常小儿以及术前神经母细胞瘤和术后神经母细胞瘤;盲法验证以灵敏性 88.89%、特异性 100.00%成功区分神经母细胞瘤与其它小儿恶性实体瘤。

SELDI-TOF-MS 技术寻找血清标记物高效、快速,特异性优于传统的辅助检查,为神经母细胞瘤早期的临床诊断和准确分期提供了一种新的方法,可用于指导临床并制定出合理的治疗方案。

SVM 方法是 Vapnik 等^[18-20]提出的一种分类技术,SVM 的预测算法只是基于氨基酸组成预测膜蛋白类型^[21],没有考虑蛋白质多肽链上氨基酸残基的序列特性。在后续工作中,除了可以考虑膜蛋白氨基酸组成外,还可以引入其他的组成膜蛋白序列的氨基酸残基之间的特征,如疏水性、带电荷性、分子间相互作用力等;本研究因样本收集有限,仅检测出能够反映早期血清蛋白质谱变化的模型,尚需扩大样本量以进一步完善模型。

参 考 文 献

- 1 郭春宝,王珊,金先庆,等. Cochrane 系统评价方法对神经母细胞瘤分子与生物标记物的 Meta 分析 [J]. 临床小儿外科杂志, 2008, 7(1):4.
- 2 Guo Y, Yu L, et al. Using support vector machine combined with auto covariance to predict protein-protein interactions from protein sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 1-15.
- 3 Jorissen RN, Gilson MK. Virtual screening of molecular databases using a support vector machine [J]. Chem Inf Model, 2005, 45(3):549-561.
- 4 Eggert A, Grotzer MA. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression [J]. Cancer Res, 2001, 61 (4):1314-1319.
- 5 Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: Written in blood[J]. Nature, 2003, 425 (6961):905.
- 6 Rodland KD. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry [J]. Clinical Biochemistry, 2004, 37(7):579-583.
- 7 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[J]. Clin Chem, 2002, 48 (8):1296-1304.
- 8 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. Lancet, 2002, 359(9306):572-577.
- 9 Poon TCW, Yip TT, Yasui Y, et al. Comprehensive proteomic Profiling Identifies Serum proteomic signatures for detection of Hepatocellular Carcinoma and its subtypes[J]. Clin Chem, 2003, 49(5):752-760.
- 10 Li J, White N, Zhang Z, et al. Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histological confirmed population[J]. J Urol, 2004, 171(5):1782-1787.
- 11 Petricoin EF, Liotta LA. Proteomic approaches in cancer risk and response assessment [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(2):59-64.
- 12 Zhan g Z, Bast RC Jr, Yu YH, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2004, 64 (16):5882-5890.
- 13 Zhang Bo, Suyongping, Wangfengchao, et al. Identification of differentially expresses proteins of gamma ray irradiated rat intestinal epithelial IEC6 cells by two dimension algal electrophoresis and matrix assisted laser sorption/ionization time of flight mass spectrometry [J]. Proteomics, 2005, 5(2):426-432.
- 14 Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improve -ed resolution in proteomics[J]. Proteomics, 2005, 5(1):307-317.
- 15 Dai J, Zhang Y, Wang J, et al. Identification of degradation products formed during per formic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix -assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(9):1130-1138.
- 16 Wang JX, Wang L, et al. Application of serum protein fingerprint model and support vector machine in diagnosis of thyroid cancer [J]. Zhonghua Yixue Zazhi, 2006, 11:86 (14):979-982.
- 17 王家祥,陈新让等. 肾母细胞瘤血清蛋白质标记物检测与分期模型构建研究 [J]. 中华小儿外科杂志. 2007, 28(2):90-94.
- 18 Wang XD, Wang JQ. A survey on support vector machines training and testing algorithms [J]. Computer engineering and application, 2004, 13:75-79.
- 19 Byvatov E, Schneider G. Support vector machine applications in bioinformatics [J]. Appl Bioinformatics, 2003, 2(2):67-77.
- 20 Hyeran B, Lee SW. Application of support vector machines for pattern recognition: a survey. In Lee SW, Verri A, eds. Pattern recognition with support vector machines [J]. Heidelberg. Berlin; Springer verlag 2002. 213-236.
- 21 Wiesner A. Detection of tumor markers with protein chip technology[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5:45-67.

基于支持向量机神经母细胞瘤血清蛋白质标记物的检测及临床应用

作者: 陈新让, 王家祥, 余捷凯, 郑树
作者单位: 陈新让, 余捷凯(郑州市儿童医院, 450052), 王家祥(郑州大学第一附属医院, 450052), 郑树(浙江大学肿瘤研究所, 310000)
刊名: 临床小儿外科杂志 
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2008, 7(2)
被引用次数: 0次

参考文献(21条)

1. [Poon TCW;Yip Tr;Yasui Y Comprehensive proteomic Profiling Identifies Serum proteomic signatures for detection of Hepatocellular Carcinoma and its subtypes](#) 2003(05)
2. [Petricoin EF;Ardekani AM;Hitt BA Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer](#) 2002(9306)
3. [Li J;Zhang Z;Rosenzweig J Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer](#) 2002(08)
4. [Rodland KD Proteomics and cancer diagnosis:the potential of mss spectrometry](#) 2004(07)
5. [Liotta LA;Ferrari M;PetricoinE Clinical proteomics:Written in blood](#) 2003(6961)
6. [Dai J;Zhang Y;Wang J Identification of degradation products formed during per formic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix -assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry](#) 2005(09)
7. [Bjorhall K;Miliotis T;Davidsson P Comparison of different depletion strategies for improve -ed resolution in proteomics](#) 2005(01)
8. [ZhangBo;Suyongping;Wangfengchao Identification of differentially expresses proteins of gamma ray irradiated rat intestinal epithelial IEC6 cells by two dimension algal electrophoresis and matrix assisted laser sorption/ionization time of flight mass spectromet -ry](#) 2005(02)
9. [Byvatov E;Schneider G Support vector machine applications in bioinformatics](#) 2003(02)
10. [Wang XD;Wang JQ A survey on support vector machines training and testing algorithms](#)[期刊论文]-[Computer Engineering and Applications](#) 2004(13)
11. [王家祥;陈新让 肾母细胞瘤血清蛋白质标记物检测与分期模型构建研究](#)[期刊论文]-[中华小儿外科杂志](#) 2007(02)
12. [Wang JX;Wang L Application of serum protein fingerprint model and support vector machine in diagnosis of thyroid cancer](#)[期刊论文]-[ZHONGHUA YIXUE ZAZHI](#) 2006(14)
13. [Zhan g Z;Bast RC Jr;Yu YH Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer](#) 2004(16)
14. [Petreoin EF;Liotta LA Proteomic approaches in cancer risk and response assessment](#) 2004(02)
15. [Eggert A;Grotzer MA Resistance to tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand \(TRAIL\)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression](#) 2001(04)
16. [Jorissen RN;Gilson MK Virtual screening of molecular databases using a support vector machine](#) 2005(03)

17. [Guo Y;Yu L Using support vector machine combined with auto cnvariance to predict protein-protein interactions from protein sequences](#) 2008

18. [Wiesner A Detection of tumor markers with protein chip technology](#) 2004(1)

19. [Hyeran B;Lee SW Application of support vector machines for pattern recognition:a survey](#) 2002

20. [Li J;White N;Zhang Z Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histological confirmed population](#) 2004(05)

21. 郭春宝;王珊;金先庆 [Cochrane系统评价方法对神经母细胞瘤分子与生物标记物的Meta分析](#)[期刊论文]-[临床小儿外科杂志](#) 2008(01)

相似文献(1条)

1. 学位论文 陈新让 [肾母细胞瘤血清蛋白质标记物检测与分期模型构建研究](#) 2007

背景与目的:

肾母细胞瘤是儿童最常见的恶性肿瘤之一,全世界15岁以下儿童的发病率约为1/10,000。德国医师Wilms于1899年首次报告此病,因此多数作者称之为Wilms瘤。肾母细胞瘤是小儿最常见的由肾胚基发生的恶性肿瘤,2岁以下发病率最高。儿童恶性肿瘤的死亡率由20世纪80年代的8%上升到了10.7%,小儿肾母细胞瘤已经成为小儿病死的主要原因之一。肾母细胞瘤的临床病理分期和治疗方法的选择与患儿预后有直接的关系,NWTS在其2001年的总结中提到:在目前的影像学技术条件下(依靠CT等)仍有7.0%的漏诊率Ⅲ,主要是直径小于3cm的肾母细胞瘤。而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)是近年发展起来的一种新的蛋白质研究技术,具有快速、简便、高通量及对多样本平行检验的优点,质谱技术及生物信息学方法的出现提供了有效筛选特异性标记物的方法。Ciphergen公司研发的SELDI-TOF-MS技术是一项全新的蛋白质组学研究方法,该技术通过应用少量天然蛋白质提取物来进行快速分析,克服了传统分析方法的局限性。具有样品用量小、操作简便、灵敏度高、高通量等优点,已成功将其应用于卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、直肠癌等恶性肿瘤的诊断、肿瘤标志物的筛选及其他蛋白质组学研究中。本组应用该技术在肝癌,甲状腺癌及肾母细胞瘤前期研究中获得满意效果。应用SELDI-TOF-MS技术结合生物信息学和支持向量机(support vector machine, SVM)方法,筛选出肾母细胞瘤患儿特异性蛋白质标记物,建立肾母细胞瘤临床分期血清蛋白质指纹图谱模型并与CT分期进行对照分析。

材料与方法:

(1)血清标本共80例均来自郑州大学第一附属医院小儿外科,其中术前肾母细胞瘤30例,其它小儿腹恶性实体肿瘤30例(神经母细胞瘤16例,肝母细胞瘤4例,肾横纹肌肉瘤4例,恶性畸胎瘤4例,腺母细胞瘤2例),正常对照组20例均来自体检的健康小儿。

(2)样本冰融,4℃10000rpm离心2min;取96孔板,放冰盒上,每孔加U9(9M Urea, 2% CHAPS, 1% DTT) 10μl,血清5μl,4℃层析柜600rpm振荡30min;振荡结束前15min做芯片预处理,芯片装入Bioprocessor中并记下芯片号;每孔加NaAc(100mm, pH4)200μl,层析柜中600rpm,5min,重复1次;U9处理后96孔板放冰上,快速加入NaAc185μl在层析柜中6000rpm振荡2min;加已处理好的样本100μl到芯片,层析柜4℃600rpm振荡1h,甩干,重复3次;用hplc水200μl洗2次快速甩干;用50%饱和的SPA 1μl重复2次;上机检测;将芯片放入Ciphergen读谱仪中检测。

(3)用protein chip software 3.1做校正,使总离子的强度及分子量均一化。应用ZUCI-Protein Chip Data Analyze System软件包进行分析。原始数据用离散小波(undecimated discrete wavelet transform)分析去除噪音,并减掉基线。聚类分析以10%为最小阈值,将各个样本中m/z的差异小于0.3%的峰聚为一类。支持向量机(support vector machine, SVM)特征向量的选取采用统计过滤结合模型依赖性筛选的方法建立判别模型,用留一法交叉验证作为评估模型判别效果。

(4)统计学分析所有的蛋白质质谱原始数据经过过滤掉信噪和聚类分析处理后,对所有初步筛选出的质谱峰做Wilcoxon秩和检验,选出p值最小的10个峰进一步分析。将10个峰的任意组合(共175种组合)用于支持向量机模型的输入,用留一法评估模型的预测效果,检验标准设α=0.01

结果1. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 II 期组肾母细胞瘤 I 期组和肾母细胞瘤 II 期的质谱经过初步过滤筛选得到483个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰5个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于7965.4、5022.4和8469.6的标志物3个,在肾母细胞瘤 II 期低表达,在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100%,特异性为100%。2. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III 期组肾母细胞瘤 I 组和肾母细胞瘤 III 期的质谱经过初步过滤筛选得到496个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰4个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于4263.1、4122.8、4330.7和4303.7的标志物4个,在肾母细胞瘤 III 期组低表达,在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100.00%,特异性为100.00%。

3. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 IV 期组肾母细胞瘤 I 组和肾母细胞瘤 IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到565个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰4个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于10836.6和8179.1的标志物2个,在肾母细胞瘤 IV 期低表达,在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为88.89%,特异性为100.00%。

4. 肾母细胞瘤 II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III 期组肾母细胞瘤 II 组和肾母细胞瘤 III 期的质谱经过初步过滤筛选得到490个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰3个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于5019.2和4143.2的标志物2个,在肾母细胞瘤 III 期组低表达,在肾母细胞瘤 II 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为88.89%,特异性为100.00%。

5. 肾母细胞瘤 II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 IV 期组肾母细胞瘤 II 组和肾母细胞瘤 IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到508个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰20个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于7976.5的标志物1个,在肾母细胞瘤 IV 期组低表达,在肾母细胞瘤 II 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100.00%,特异性为100.00%。

6. 肾母细胞瘤 III 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 IV 期组肾母细胞瘤 III 组和肾母细胞瘤 IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到504个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰12个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于8194.4的标志物1个,在肾母细胞瘤 IV 期组低表达,在肾母细胞瘤 III 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为93.75%,特异性为100.00%。

7. 肾母细胞瘤 I + II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III + IV 期组肾母细胞瘤 I + II 期组和肾母细胞瘤 III + IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到519个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰3个,从差异显著蛋白质峰的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于4153.9、3257.6和3290.7的标志物3个,在肾母细胞瘤 III + IV 期低表达,在肾母细胞瘤 I + II 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为83.33%,特异性为93.75%。

8. 临床各分期的对照:通过肾母细胞瘤早期诊断模型中的2个m/z(6984.4, 6455.5)血清标记物进行分析得出肾母细胞瘤各期情况如下:IV期相对于III期低表达;III期相对于II期低表达;II期相对于I期低表达;I期相对于正常儿童低表达;后者相对高表达;临床分期越晚M/Z强度就越低表达。

9. 盲法验证CT与蛋白质芯片分期的准确性: 蛋白芯片分期如下: I 期6例, II 期10例, III期10例, IV期4例, 30例肾母细胞瘤各期均与病理分期相一致, 各期符合率均为100.00%, CT分期与手术病理分期的对照: 各期均被手术及病理所证实CT把病理III期1例列入II 期, 把病理IV期1例列入III期, 各期符合率依次为100.00%, 85.00%, 85.00%, 75.00%。

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200802012.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院 (gnnzsfxy), 授权号: e6ff95e7-20db-4307-b25b-9ed400928aaf

下载时间: 2011年4月29日