

· 基础研究 ·

# 弱阳离子磁珠分离技术和基质辅助激光解吸电离 飞行时间质谱技术在原发性 I 型骨质疏松症 血清标志蛋白筛选中的应用

史晓林<sup>1</sup>, 李春雯<sup>2</sup>, 张志强<sup>2</sup>

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005;

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要 目的:**探讨弱阳离子磁珠分离技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在原发性 I 型骨质疏松症血清标志蛋白筛选中的应用价值, 寻找对原发性 I 型骨质疏松症进行筛查和早期诊断的新方法。**方法:**应用弱阳离子磁珠分离技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对 16 例绝经后骨质疏松症患者及 9 例绝经后健康妇女的血清蛋白进行筛选、分析, 将经支持向量机模型预测的约登指数最高的差异蛋白峰作为候选标志物建立诊断模型, 并对模型的判别效果进行验证。**结果:**2 组血清蛋白标本共初选出 123 个递加质谱蛋白质峰。筛选出强度差异具有统计学意义的蛋白质峰 16 组, 约登指数最高的 4 组差异蛋白质峰的质荷比分别为 8 909.047、8 690.658、13 745.48、15 114.52。以这 4 个标志物作为候选标志物建立诊断模型, 模型特异性、敏感性均为 100%。2 组标本在支持向量机结果散点图上可清晰区分。**结论:**采用弱阳离子磁珠分离技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术可筛选出原发性 I 型骨质疏松症血清标志蛋白、建立诊断模型, 为骨质疏松症的筛查和诊断提供了一种全新的血清学方法。

**关键词** 骨质疏松, 绝经后 弱阳离子磁珠 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离 蛋白质组学

**Application of magnetic beads based weak cation exchange separation technology and matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry technology in screening serum protein markers of primary type- I osteoporosis** Shi Xiaolin\*, Li Chunwen, Zhang Zhiqiang. \* The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the value of magnetic beads based weak cation exchange separation technology and matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technology in screening serum protein markers of primary type- I osteoporosis, so as to find new methods for screening and early diagnosis of primary type- I osteoporosis. **Methods:** The serum protein of 16 patients with postmenopausal osteoporosis and 9 postmenopausal healthy women were screened and analyzed using magnetic beads based weak cation exchange separation technology and MALDI-TOF-MS technology, and the differential protein peaks with the highest Youden index that predicted by support vector machine (SVM) model were chosen as candidate markers to build the diagnostic model, and then the distinguish effectiveness of the model was checked. **Results:** Totally 123 progressive protein peaks were originally selected from the protein peaks of 2 groups of serum protein specimens in the mass spectrogram. There was statistical differences in the intensity between 16 groups of protein peaks, and the mass charge ratio of 4 groups of differential protein peaks with the highest Youden index were 8 909.047, 8 690.658, 13 745.48 and 15 114.52 respectively. Then the 4 markers were used as candidate markers to build diagnostic model, and the specificity and sensitivity of the model were both 100%. The specimen in the 2 groups could be clearly distinguished by using scatterplot of SVM results. **Conclusion:** By using magnetic beads based weak cation exchange separation technology and MALDI-TOF-MS technology, serum protein markers of primary type- I osteoporosis can be selected to build the diagnostic model, which provide a brand-new serological method for screening and diagnosis of osteoporosis.

**Key words** Osteoporosis, Postmenopausal; Magnetic beads based weak cation exchange; Spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; Proteomics

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373878); 2012 年浙江省自然科学基金项目 (LY12H29007), 2013 年浙江省自然科学基金项目 (LY13H290009)

通讯作者: 李春雯 E-mail: chunwen2007@163.com

骨质疏松症是以骨量降低、骨组织微结构退变为特征的一种全身性骨代谢疾病。随着老龄化社会的到来,骨质疏松症的发病率呈快速上升的趋势,严重威胁了中老年人的健康。随着人类基因组计划的完成,后基因组时代到来,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明人体生理、病理变化机制,应用蛋白质组学技术可迅速筛选出疾病特异性生物标志,明确疾病的发病机制,从而探索出新的治疗方法<sup>[1]</sup>。笔者应用弱阳离子磁珠分离技术捕获血清蛋白组分联合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术,筛选原发性 I 型骨质疏松症血清标志蛋白,以期为骨质疏松症的筛查和诊治提供新思路、新方法。

## 1 临床资料

**1.1 研究对象** 2012 年 6 月至 2013 年 1 月,在浙江中医药大学附属第二医院骨科门诊就医的绝经后骨质疏松症患者。

**1.2 诊断标准** 参照世界卫生组织推荐的骨质疏松症诊断标准<sup>[2-3]</sup>:经双能 X 线骨密度测量仪测定腰椎正位骨密度,与同性别、同种族正常成人相比, $T \leq -2.5$  即诊断为骨质疏松症 $[T = (\text{测定值} - \text{骨峰值}) / \text{正常成人骨密度的标准差}]$ 。

**1.3 纳入标准** ①符合骨质疏松症诊断标准;②绝经后女性;③年龄 50 ~ 70 岁。

**1.4 排除标准** ①合并糖尿病、Cushing 综合征、甲状腺或甲状旁腺功能改变、骨软化症、类风湿关节炎、多发性骨髓瘤、骨肿瘤、骨关节病、Paget 病、成骨不全等严重影响骨或钙代谢的疾病;②合并心血管、脑血管及造血系统严重原发性疾病;③合并严重肝、肾功能不全;④近 6 个月内服用过雌激素、类固醇激素、降钙素、甲状旁腺激素、双磷酸盐、氟化物、维生素 D、抗惊厥药、利尿剂等影响骨代谢的药物;⑤有精神病史;⑥老年痴呆患者。

## 2 方法

**2.1 分组方法** 共纳入绝经后骨质疏松症患者 16

例为骨质疏松组,年龄匹配、骨密度正常的绝经后健康妇女 9 例为正常对照组。

**2.2 标本采集方法** 晨起安静空腹状态下抽取静脉血 5 mL,4 ℃ 静置 1 ~ 2 h,3 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min (离心半径 13.5 cm),分离血清,-80 ℃ 冰箱保存备用。

**2.3 血清蛋白制备方法** 弱阳离子磁珠悬浮液 1 管,完全混匀,在 200  $\mu\text{L}$  样品管中加入 10  $\mu\text{L}$  磁珠结合缓冲液后,再加入 10  $\mu\text{L}$  混匀的磁珠悬浮液,然后加入 5  $\mu\text{L}$  血清,用加样枪上下吸打混匀至少 5 次,室温静置 5 min。然后将样品管放入磁珠分离器,使磁珠贴壁 1 min,磁珠与液体分离后,用加样枪吸去液体,再向样品管中加入 100  $\mu\text{L}$  磁珠清洗缓冲液,在磁珠分离器前后相邻的 2 孔间反复移动样品管 10 次,静置,磁珠贴壁后再次用加样枪吸去上清液,重复清洗 2 次;从磁珠分离器上取下样品管,并向样品管中加入 5  $\mu\text{L}$  磁珠洗脱缓冲液,反复吹打;再将样品管放入磁珠分离器,静置 2 min,磁珠完全贴壁后,将上清液移入干净的 0.5 mL 样品管,并加入 5  $\mu\text{L}$  磁珠稳定缓冲液,用加样枪小心吹打混匀后,将 1  $\mu\text{L}$  样本点到靶上,待干燥后加基质溶液 10  $\mu\text{L}$ ,再干燥后进行蛋白质质谱检测。

**2.4 数据处理和生物信息分析方法** 采用 SPSS13.0 软件对 2 组患者基线资料数据进行处理,两组年龄、体质量、身高、绝经年限的组间比较采用  $t$  检验;检验水准  $\alpha = 0.05$ 。采用浙江大学肿瘤研究所蛋白芯片数据分析系统对蛋白图谱进行均一化处理和数据分析。对 2 组血清蛋白标本的蛋白质峰强度作均一化处理后,采用 Wilcoxon 秩和检验(检验水准  $\alpha = 0.05$ )筛选出 2 组标本中强度有差异的蛋白质峰。将差异蛋白质峰随机组合,用遗传算法<sup>[4]</sup>结合支持向量机(support vector machine, SVM)运算<sup>[5]</sup>进一步分析, SVM 模型预测的约登指数最高的组合作为候选标志物建立诊断模型,留一法<sup>[6]</sup>验证模型判别效果。

## 3 结果

**3.1 分组结果** 2 组受试者年龄、体质量、身高及绝经年限的组间差异无统计学意义,具有可比性(表 1)。

表 1 2 组绝经期妇女基线资料比较

组别	年龄(岁)	体质量(kg)	身高(cm)	绝经年限(年)
骨质疏松组	61.32 ± 6.41	54.04 ± 5.15	151.46 ± 10.07	5.34 ± 2.53
正常对照组	58.00 ± 3.48	51.24 ± 3.26	158.52 ± 11.61	4.89 ± 1.45
$t$ 值	4.022	4.371	4.151	4.017
$P$ 值	0.062	0.053	0.059	0.069

**3.2 检测分析结果** 2 组血清蛋白标本共初选出 123 个递加质谱蛋白质峰(图 1)。筛选出强度差异有统计意义的蛋白质峰 16 组,经进一步分析约登指数最高的 4 组差异蛋白质峰,质荷比分别为 8 909.047、8 690.658、13 745.48、15 114.52(表 2)。以这 4 个标志物作为候选标志物建立诊断模型(图 2)。模型特异性、敏感性均为 100%(表 3)。2 组标本在 SVM 判别结果散点图上可清晰区分(图 3)。

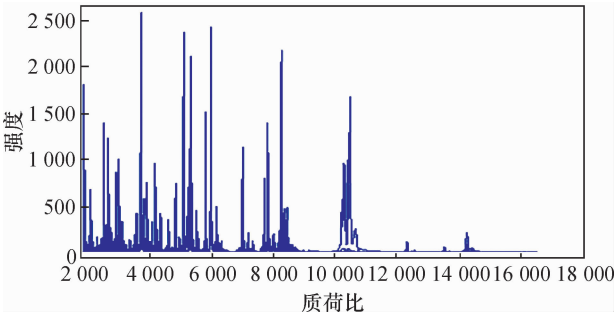


图 1 2 组绝经期妇女血清标本递加质谱蛋白质峰分布图

表 2 2 组绝经期妇女血清标本差异蛋白质峰

质荷比	骨质疏松组	正常对照组	P 值
8 909.047	1 315.214 ± 395.182	904.730 ± 282.261	0.012
8 690.658	8 685.821 ± 3 252.091	5 888.973 ± 1 716.977	0.026
15 114.520	201.115 ± 261.768	78.747 ± 142.429	0.027
13 745.480	518.442 ± 308.736	277.820 ± 207.656	0.049

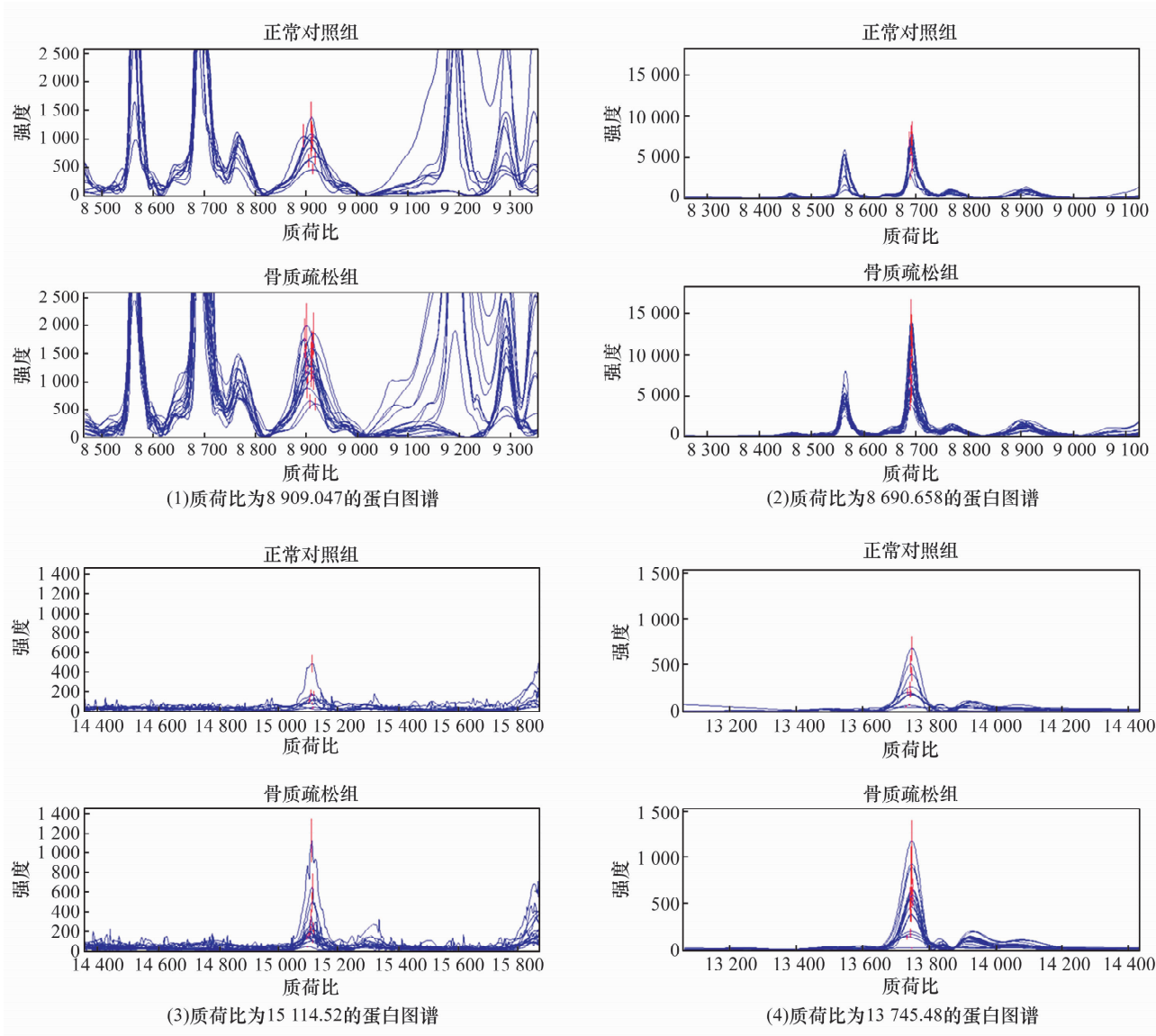


图 2 原发性 I 型骨质疏松症血清标志蛋白图谱

表 3 诊断模型交叉验证的结果

组别	骨质疏松组	正常对照组	合计
骨质疏松组	16	0	16
正常对照组	0	9	9
合计	16	9	25

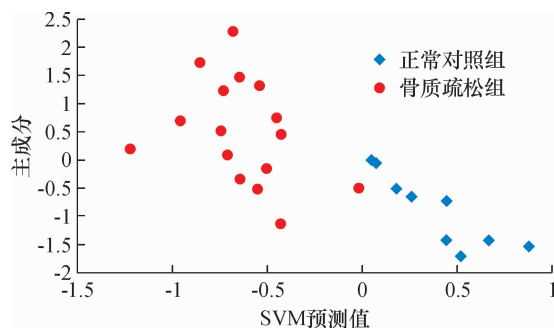


图 3 2 组绝经期妇女血清标本 SVM 判别结果散点图

## 4 讨论

MALDI-TOF-MS 技术是应用较广泛的蛋白质组学技术之一,在肿瘤标志物的筛选等研究领域具有较大的优势<sup>[7]</sup>。原发性 I 型骨质疏松症的早期筛查和诊断具有非常重要的临床意义,寻找准确、敏感的疾病标志物,有利于对易患人群进行早期筛选和早期诊断。本研究应用弱阳离子磁珠捕获血清蛋白组分联合 MALDI-TOF-MS 技术,筛选原发性 I 型骨质疏松症患者与正常绝经期妇女的血清差异蛋白峰,寻找原发性 I 型骨质疏松症血清蛋白标志物,并对建立的诊断模型进行验证,确保了诊断模型的准确性和严谨性。

应用弱阳离子磁珠分离技术和 MALDI-TOF-MS 技术可筛选出原发性 I 型骨质疏松症血清标志蛋白、

建立诊断模型,为骨质疏松症的筛选和诊断提供了一种全新的血清学方法。进一步进行差异蛋白的鉴定,明确相关差异蛋白在骨质疏松症发病机制中的作用,从中找到特异性标记物,为易患人群的筛查、早期诊断、治疗选择和随访提供临床参考,将是下一步研究的重点。

## 5 参考文献

- [1] Beloosesky Y, HersHKovitz A, Guz A, et al. Clinical characteristics and long-term mortality of occult hip fracture elderly patients[J]. Injury, 2010, 41(4): 343-347.
- [2] Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, et al. The assessment of fracture risk[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(3): 743-753.
- [3] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Osteoporosis is markedly underdiagnosed: a nationwide study from Denmark[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(2): 134-141.
- [4] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [5] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium[J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090-1094.
- [6] Tan X, Cai D, Wu Y, et al. Comparative analysis of serum proteomes: discovery of proteins associated with osteonecrosis of the femoral head[J]. Transl Res, 2006, 148(3): 114-119.
- [7] Niforou KM, Anagnostopoulos AK, Vougas K, et al. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2008, 5(1): 63-78.