

• 临床检验研究论著 •

# 非侵入性诊断筛查甲状腺恶性肿瘤的可行性探讨

冯琳琳, 梁 英, 曹丽侠, 郑艳颖, 任秀梅, 李桂杰

(北京小汤山医院检验科, 北京 102211)

**摘要:**目的 应用可用于健康筛查的甲状腺恶性肿瘤标志物模型, 探讨非侵入性诊断甲状腺恶性肿瘤的可行性, 以为健康体检筛查提供特异性较强的肿瘤标志物。方法 采用表面增强激光解析电离-飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)对 30 例高度怀疑甲状腺恶性肿瘤患者及 43 例健康者进行血清蛋白质质谱分析, 应用生物标志物模型软件(BPS)建立判别模型, 筛查具有一定特异性的标志物模型, 以留一法进行交叉验证。结果 标志物模型交叉验证灵敏度为 86.7%, 特异度为 91.2%, 总符合率为 93.75%。结论 采用 SELDI-TOF-MS 技术和生物信息技术建立标志物模型, 是非侵入性诊断甲状腺恶性肿瘤的有益尝试, 有助于完善健康体检筛查模式。

**关键词:** 甲状腺肿瘤; 肿瘤标记, 生物学; 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离; 血蛋白质类

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)22-2706-02

## Study on the non-invasive diagnostic screening of thyroid malignancies

Feng Linlin, Liang Ying, Cao Lixia, Zheng Yanyin, Ren Xiumei, Li Guijie

(Clinical Laboratory, Beijing Xiaotangshan Hospital, Beijing 102211, China)

**Abstract: Objective** To establish serum marker pattern for thyroid malignancy and discuss the feasibility of non-traumatic diagnosis for thyroid malignancy to investigate sensitive markers for the screening of thyroid malignancy. **Methods** Surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) was used to analyze serum protein profile of 30 cases highly suspected thyroid malignancy and 43 cases of healthy control. The data were analyzed by Biomarkers Pattern Soft (BPS) to establish diagnosis model. **Results** With the 5 markers, the training set could differentiate the highly suspected thyroid malignancy from the healthy control with the sensibility of 86.7%, specialty of 91.2% and total accuracy of 93.75%. **Conclusion** SELDI-TOF-MS and bioinformatics technology might be helpful to establish a biomarker pattern for more consummate medical examination.

**Key words:** thyroid neoplasms; tumor markers, biological; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; blood proteins

建立甲状腺肿瘤血清学标志物诊断模型有利于疾病诊断及良、恶性鉴别, 更有利于健康体检筛查。表面增强激光解析电离-飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)可检出传统方法难以鉴定的蛋白质和多肽<sup>[1-2]</sup>, 已广泛应用于肿瘤标志物筛查<sup>[3-5]</sup>。本研究分析了高度怀疑恶性肿瘤患者和健康者血清蛋白指纹图谱变化, 旨在筛选出一组特异的标志蛋白, 从而建立甲状腺恶性肿瘤筛查模型, 为健康体检提供可靠的检测指标。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 30 例高度怀疑甲状腺恶性肿瘤者(疑似组), B 超检查示甲状腺结节性质、大小、内部回声、周边血流信号等参数及血清学检查三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>)、甲状腺素(T<sub>4</sub>)、促甲状腺素(TSH)结果异常; 与疑似组年龄、性别相匹配的 43 例健康体检健康者纳入对照组。疑似组及对照组均采集晨起空腹静脉血, 分离血清后 -80 °C 保存待测。

**1.2 仪器与试剂** 3-[(3-胆固醇乙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、尿素(Urea)、二硫苏糖醇(DTT)、乙酸钠(NaAc)、芥子酸(SPA)购自美国 Sigma 公司。BioRadPBS II + SELDI-TOF-MS 分析仪和弱阳离子 CM10 蛋白芯片购自美国 BioRad 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 蛋白芯片的处理** 冰浴中解冻血清标本, 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 5 min。取 96 孔板置冰盒上, 每孔加 U9(U-

rea 9 mol/L, CHAPS 20 g/L, DTT 10 g/L) 20 μL, 血清 10 μL, 4 °C 层析柜 600 r/min 振荡 30 min。在振荡结束前 15 min 将芯片装入生物处理器中, 记录芯片号, 每孔加 NaAc 200 μL, 层析柜中 600 r/min 振荡 2 min。加 100 μL 经处理血清至芯片上, 层析柜中 600 r/min 结合 60 min, 甩去残液, 快速拍干。加 NaAc 200 μL, 600 r/min 振荡 5 min, 甩去残液, 拍干, 重复 3 次。200 μL 去离子水冲洗各孔 2 次, 甩去残液, 自然干燥。每孔分 2 次加入饱和 SPA 1 μL, 干燥后上机检测。

**1.3.2 数据采集** 用标准相对分子质量蛋白芯片将 SELDI-TOF-MS 系统校正至相对分子质量误差小于 0.1%。采用蛋白飞行质谱仪对结合在 CM10 芯片上的血清蛋白进行读取分析。每个标本收集总点数 130 次。收集数据范围为相对分子质量 0~50 000, 优化范围为 2 000~15 000, 激光强度为 160, 检测敏感度为 8, 所有标本均使用相同参数, 用 Proteinchip Software 3.1 软件收集质谱信号。

**1.4 统计学处理** 所有数据用 Proteinchip Software 3.1 校正, 去掉质荷比 1 000 以下的干扰峰后将原始数据用离散小波分析去除噪音, 并减掉基线。选取 S/N > 5 的峰。聚类分析以 0 作为最小阈值, 将质荷比差异小于 0.3% 的峰聚为一类。对初筛获得的质荷比峰行 Mann-Whitney u 检验, 利用生物标记物模型软件(BPS)模型建立判别模型(见图 1)。用留一法交叉验证评估模型判别效果, 盲法测试确定诊断模型总准确率、特

异度、敏感度。

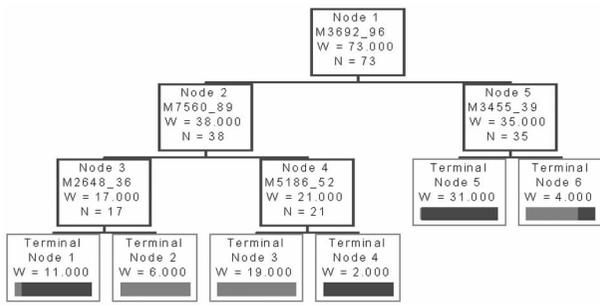


图 1 BPS 模型建立判别模型

## 2 结果

2.1 血清标本质谱仪检测峰值分析 血清标本质谱仪检测总峰重复性(质荷比 2 000~10 000 的峰值及其丰度分布)见图 2。

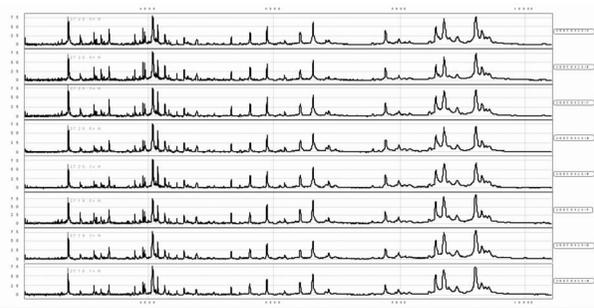


图 2 血清标本质谱仪检测峰值图

2.2 疑似组与对照组检测结果比较 共检测 170 个峰,其中 35 个峰在疑似组和对照组间存在差异( $P < 0.05$ ),通过质荷比为 5 个峰值(5 186,3 692,3 455,2 648,7 560)建立模型,结果显示这几个标志物在疑似组高表达,在对照组低表达。通过双盲法对疑似组及对照组血清标本进行检测,30 例疑似组标本有 26 例被正确预测,34 例对照组中有 31 例被正确预测。建模组与验证组决定树模型的灵敏度和特异度见表 1。

表 1 建模组与验证组决定树模型的灵敏度和特异度[n(%)]

根据入选标准分组	决定树进行的分组	
	疑似组	对照组
建模组		
疑似组(n=30)	28(93.3)	2(6.7)
对照组(n=43)	1(2.3)	42(97.7)
验证组		
疑似组(n=30)	26(86.7)	4(13.3)
对照组(n=34)	3(8.8)	31(91.2)

## 3 讨论

病理学诊断是恶性肿瘤诊断金标准,但作为一种侵入性检查,在健康体检筛查中受到很大限制。关于 B 超定性诊断甲状腺肿瘤的文献报道不一:有研究认为 B 超主要用于囊性、实性病变的诊断和随访检查,对于定性诊断价值不大;另有研究认为 B 超对甲状腺肿瘤的定性诊断有一定价值,是甲状腺疾病普查、癌症筛查的最佳方法之一<sup>[6-8]</sup>。常规生化及免疫检测

结果异常只能反映甲状腺功能的改变,也不能对病变进行定性诊断<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究分析了建立血清学生物标志物模型的可行性,探索对健康体检人群进行甲状腺肿瘤非侵入性筛查的有效手段<sup>[11]</sup>。如果能够得到理想的初步峰(具有高度统计学意义的峰值及相应丰度),则可做进一步的蛋白质或多肽鉴定以获得临床诊断的特异性指标。本研究作为非侵入性诊断的一种有益尝试<sup>[12]</sup>,为 B 超及相关生化、免疫指标联合检测的深入研究提供了一定的借鉴。本研究中的 5 个有意义峰值在高度怀疑甲状腺恶性肿瘤患者中呈高表达( $P < 0.05$ ),对上述分子簇蛋白进行纯化和多肽鉴定可为甲状腺恶性肿瘤的临床诊断提供相关参考指标,最终实现“一站式”血清学标志物筛查。基于标本量限制及相对宽泛的标本入选标准,仍需扩大标本量以完善模型并作进一步验证工作。

## 参考文献

- Paron I, D'Ambrosio C, Scaloni A, et al. A differential proteomic approach to identify proteins associated with thyroid cell transformation[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(1): 199-207.
- Moretz WH 3rd, Gourin CG, Terris DJ, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma with serum protein profile analysis[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 134(2): 198-202.
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. Lancet, 2002 (9306): 572-577.
- Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men[J]. Cancer Res, 2002, 62(13): 3609-3614.
- Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, et al. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility[J]. Clin Chem, 2005, 51(1): 102-112.
- Krause K, Karger S, Schierhorn A, et al. Proteomic profiling of cold thyroid nodules[J]. Endocrinology, 2007, 148(4): 1754-1763.
- Wong KT, Ahuja AT. Ultrasound of thyroid cancer[J]. Cancer Imaging, 2005, 5(1): 157-166.
- Lane H, Jones MK. Management of nodular thyroid disease[J]. Practitioner, 2002, 246(1633): 266-269.
- Turken O, NarIn Y, DemIrbas S, et al. Breast cancer in association with thyroid disorders[J]. Breast Cancer Res, 2003, 5(5): 110-113.
- Giani C, Fierabracci P, Bonacci R, et al. Relationship between breast cancer and thyroid disease: Relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(7): 990-994.
- Gul K, Ersoy R, Dirikoc A, et al. Association of thyroid function tests with thyroid malignancy[C]. Istanbul, Turkey: European Congress of Endocrinology, 2009: 111.
- Agarwal DP, Soni TP, Sharma OP, et al. Synchronous malignancies of breast and thyroid gland: a case report and review of literature[J]. J Cancer Res Ther, 2007, 3(3): 172-173.