论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1842-05

SELDI-TOF-MS 筛选微小病变型肾病综合征尿液生物标志物

林 青[1],郑 健[2],陈蓉艳[1],艾 斯[2] (350004 福州,福建中医学院附属人民医院:检验科[1],儿科[2])

【摘要】 目的 探讨应用优化的表面增强激光解析电离-飞行时间-质谱(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)进行微小病变型肾病综合征(minimal-changed nephrotic syndrome,MCNS)大鼠尿液生物标志物筛选的意义。方法 SD大鼠30只随机分为正常对照组($n=10$)、模型对照组($n=10$)和强的松治疗组($n=10$)。除正常对照组外,其余大鼠经尾静脉一次性注射阿霉素5.5 mg/kg复制MCNS模型,造模10 d后分别予以强的松和蒸馏水灌胃治疗。21 d后收集大鼠尿液,经弱阳离子交换芯片CM10捕获蛋白质,应用SELDI-TOF-MS获取3组大鼠的尿液蛋白质指纹图谱,采用Biomarker wizard软件比对分析差异蛋白。结果 优化实验条件后获得较理想的尿液蛋白质指纹图谱,质控峰强度的平均*CV*值为18.0%(7.50%~35.89%)。在模型对照组与正常对照组之间检测到不同质荷比处有33个具统计学意义的差异蛋白峰($P<0.05$),其中21个蛋白表达上调,12个蛋白表达下调。在正常对照组、模型对照组与强的松治疗组之间有6个蛋白质表达存在差异($P<0.05$),这些差异蛋白峰在模型对照组中高表达,而在强的松治疗组中蛋白表达下调,峰强度接近正常对照组。结论 通过优化实验条件并实行质量控制,SELDI-TOF-MS可为MCNS大鼠尿液生物标志物的筛选提供一个可行的检测途径。所获得的差异性蛋白峰对MCNS的早期诊断、治疗监测和寻找药物治疗的靶目标具有重要的意义。

【关键词】 表面增强激光解析电离-飞行时间-质谱;微小病变型肾病综合征;尿液;生物标志物;质控
【中图法分类号】 R446;R446.12;R692 【文献标志码】 A

Screening of biomarkers in urine of rats with minimally-changed nephrotic syndrome by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry

Lin Qing[1], Zheng Jian[2], Chen Rongyan[1], Ai Si[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Pediatrics, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian Province, 350004, China)

【Abstract】 Objective To detect the biomarkers in urine of rats with minimally-changed nephrotic syndrome (MCNS) by optimal surface enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Methods Thirty SD rats were randomly divided into normal control group, untreated group and prednisone treatment group. Except for the normal control group, rats were injected with adriamycin (5.5 mg/kg once) *via* caudal vein to induce MCNS. Ten days later, the rats were administered with prednisone or distilled water, respectively, for 21 d. Urine was collected from rats. Urinary peptide or protein peaks were detected by SELDI-TOF-MS and weak cation exchange protein chip CM10, respectively. Differentially expressed protein and polypeptides were analyzed with Biomarker Wizard Software. Results Under optimal experimental conditions, the average variation coefficient for relative peak intensity in control group was 18.0% (7.50% – 35.89%). In different ranges of m/z values, the number of mean peak intensities was 33 in untreated group, which was significantly greater than that in normal control group ($P<0.05$). Of the 33 mean peak intensities, 21 were up-expressed and 12 were down-expressed. The expression level of the 6 differentially expressed proteins was higher in untreated group than in prednisone treatment group ($P<0.05$) with a mean peak intensity similar to that in normal control group. Conclusion By optimizing the experimental conditions and controlling quality, SELDI-TOF-MS can be used as a tool to detect potential biomarkers in urine of rats with MCNS. Differentially expressed proteins contribute to the early diagnosis and treatment of MCNS.

【Key words】 surface enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry; minimally-changed nephrotic syndrome; urine; biomarker; quality control

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian (2007J0307, 2008J0093). Corresponding author: Lin Qing, E-mail: fjlinqing@126.com

【基金项目】 福建省自然科学基金(2007J0307,2008J0093)
【通信作者】 林 青,E-mail:fjlinqing@126.com

表面增强激光解析电离-飞行时间-质谱(surface-enhanced laser desorption/ ionization time of flight-mass spectrometry,SELDI-TOF-MS)是高灵敏度、高通量和高速度的蛋白质组学分析技术,可直接用于分析粗样本,已成为一种易于采用的分析手段和诊断工具[1-3]。但由于各实验室在进行质谱检测时缺乏质量控制手段,导致检测的重复性下降,使 SELDI-TOF-MS 的应用受到了限制。本研究以微小病变型肾病综合征(minimal-changed nephrotic syndrome,MCNS)大鼠的尿液为研究对象,优化实验条件,对样品的收集、储存及分析过程实行质量控制,以弱阳离子交换芯片 CM10 捕获蛋白质,用 SELDI-TOF-MS 对蛋白质进行检测,获取 MCNS 大鼠及健康大鼠的尿液蛋白质指纹图谱,采用 Biomarker wizard 软件比对分析差异蛋白,初步筛选 MCNS 大鼠尿液生物标志物,为今后确定疾病早期诊断和预后判断的特异性标志物以及药物治疗的靶目标提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,10~12 周龄,体质量 200~250 g,SPF 级,由中国科学院上海实验动物中心提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。实验动物均饲养于福建中医药研究所的 SPF 级动物室内(医学实验动物环境设施合格证书:SYXK(闽)2008-0004)。分笼喂养,每笼 5 只。饲养条件:室温(22±2)℃,湿度 65%,光照:黑暗=12 h:12 h,自由摄取饲料和饮水。

1.1.2 模型制备和动物分组 将大鼠随机分为 3 组:①模型对照组 10 只,经尾静脉一次性注射阿霉素 5.5 mg/kg 复制 MCNS 模型,大鼠注射阿霉素后第 10 天时尿蛋白定量≥50 mg/24 h 提示模型复制成功。实验第 11 天开始予以 3 ml 蒸馏水灌胃;②强的松治疗组 10 只,造模方式同模型对照组,实验第 11 天开始予以强的松 5.5 mg/kg 灌胃治疗;③正常对照组 10 只,经尾静脉一次性注射等量生理盐水,治疗方式同模型对照组。各组连续灌胃 21 d。

1.1.3 主要仪器与试剂 美国 Ciphergen 公司的 PBS Ⅱ C 型 SELDI-TOF-MS。CM10 捕获芯片为 BIORAD 公司产品。芥子酸(sinapinic acid,SPA),α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid,CHCA),二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT),3-环乙胺-1-丙磺酸{3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate,CHAPS},醋酸钠(sodium acetate,NaAc)等为美国 Sigma 公司产品。注射用盐酸阿霉素购自意大利法玛西亚普强公司,强的松片购自浙江仙居制药股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 尿液样本收集 于实验第 32 天将大鼠置于已高压灭菌的代谢笼中用无菌容器(置于冰盒中)在 2 h 内收集大鼠的尿液 1~2 ml,立即于 4 ℃ 13 000×*g* 离心 10 min 后分装存放于 -80℃冰箱中备用;同日收集大鼠 24 h 尿液采用连苯三酚红法测定尿蛋白排泄量。

1.2.2 尿液样本处理 从 -80 ℃冰箱中取出尿液样本,置冰盒上融解,于 4 ℃ 13 000×*g* 离心 2 min,取上清液 160 μl 加入含 60 μl U9 缓冲液(9 mol/L 尿素,2% CHAPS,1% DTT)的样品管中,充分混匀,4 ℃振荡 30 min,分装 40 μl 裂解后的尿液,加入 160 μl NaAC 结合缓冲液(50 mmol/L,pH 4.0),立即混匀,4 ℃保存备用。

1.2.3 芯片处理 采用 CM10 芯片检测尿液蛋白质。取出 CM10 的芯片,在芯片背面作好标记,将芯片装入生物芯片处理器(Bioprocessor)。每孔加入 200 μl NaAC 结合缓冲液,室温 400~600 r/min 振荡洗涤 2 次,每次 5 min,用力甩去孔中液体。

1.2.4 上样和洗脱 每孔分别加入 150 μl 处理好的尿液样本,4 ℃ 400~600 r/min 振荡孵育 1 h。甩去尿液样本溶液,每孔加入 200 μl NaAc 结合缓冲液,室温 400~600 r/min 振荡洗涤 2 次,每次 5 min。每孔再加入 200 μl HPLC H_2O 洗涤 2 次,立刻甩出。立刻拆开芯片处理器,取出芯片,室温干燥 20 min,在每个加样孔上加 2 次 0.5 μl CHCA,待芯片表面自然干燥后,应用 PBS Ⅱ C 型蛋白质芯片阅读机进行蛋白质谱分析。

1.2.5 仪器校准及数据收集 ①外标校准:采用 All-in-one 标准蛋白多肽[包括 Vasopressin(1 084.3)、Somatostatin(1 638.0)、Insulin β-chain(3 496.2)、Insulin(human recombinant,5 808.1)、Hirudin(7 033.2)]芯片进行仪器外标校准,确保系统的质量偏差在 0.5% 以内。②内标校准:将所有质谱按照总离子流校正到同一水平,用 normalize 的方法将所有质谱图中的 4 094 和 6 650 左右的蛋白峰都校正到其实际相对分子质量 4 091.1 和 6 634.0,使质谱图每个蛋白峰的质荷比误差降到 0.1% 以下。③参数设置:最高相对分子质量为 50 000,最佳分辨率范围从 2 000 到 10 000,最佳激光强度 175,最佳检测灵敏度 7。聚焦到最佳中心 5 000。设预热位置用 2 个 spots,选择激光强度为最佳激光强度 +5,数据收集不包括预热点。

1.2.6 质控 为保证芯片间以及不同批次试验数据间的可比性,在每张芯片的 8 个点中随机选一个点作为质控芯池做平行试验,通过计算质控的峰值平均 CV 值来检测试验的重复性。

1.2.7 肾脏病理学检查 用 3% 戊二醛、1% 锇酸固定,脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,透射电镜观察、摄影。

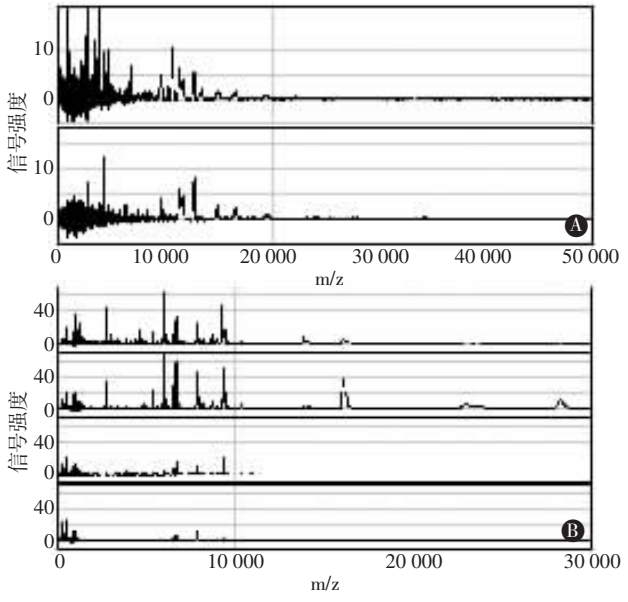
1.3 统计学分析

采用 Biomarker Wizard 软件对标准化后的蛋白质峰进行分析,设定 S/N>5 和所在所有图谱中出现频率>20% 的峰作为有效蛋白质峰,另将 S/N>2 和相对分子质量偏差<0.3% 的峰也作为有效蛋白质峰,用 Excel 表输出差异蛋白的相对分子质量和相对强度,采用方差分析比较组间蛋白质峰差异。

2 结果

2.1 最佳工作条件选择

根据尿液质谱图峰的数量和相对强度,将尿液样本的裂解方法(先裂解后稀释和先稀释后裂解 2 种方法)选定为先裂解后稀释的方法(图 1A);从 pH 4.0、pH 5.5、pH 7.0、pH 8.5 四种 NaAc 缓冲液中选定最佳反应 pH 为 4.0(图 1B)。



A：不同裂解方法；上图先裂解后稀释；下图：先稀释后裂解；B：不同 pH 值的 NaAc 缓冲液由上至下 pH 值分别为 4、5.5、7、8.5

图 1　不同的裂解方法和不同 pH 值的 NaAc 缓冲液的尿液蛋白质谱分析

2.2　质控

随机设不同芯片上的一个点作为质控芯池进行平行实验评价芯片间的重复性，由 Biomarker Wizard 计算得到质控品的峰值平均 *CV* 值为 18.0 %（7.50 % ~35.89 %），见图 2。

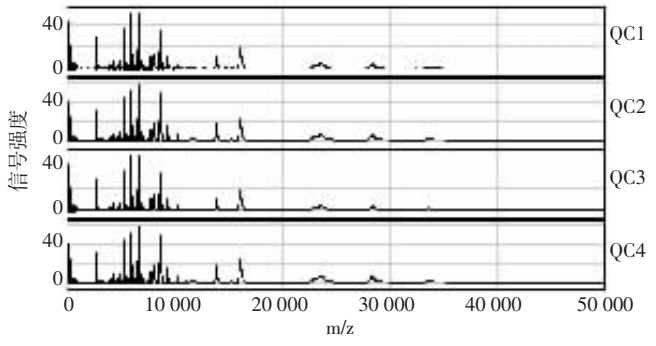


图 2　质控品在不同芯片间的检测结果

2.3　24 h 尿蛋白定量结果和电镜观察

2.3.1　24 h 尿蛋白定量结果　注射阿霉素后第 10 天，大鼠尿蛋白排泄量为（95.08 ± 16.40）mg/24 h，均≥50 mg /24 h，与正常对照组（5.15 ± 1.27）mg/24 h 比较差异具有统计学意义（t = 18.34，P < 0.01），提示造模成功。治疗 3 周后强的松治疗组的尿蛋白排泄量［（93.95 ± 12.86）mg/24 h］较模型对照组［（149.32 ± 29.33）mg/24 h］降低（t = 16.1，P < 0.01）。

2.3.2　电镜观察　治疗 3 周后正常对照组大鼠肾小球足突大小一致，排列紧密；模型对照组大鼠肾小球足突呈弥漫性融合，足突间闭合连接形成；强的松治疗组足突部分恢复正常，部分仍融合。

2.4　MCNS 大鼠尿蛋白质谱分析

2.4.1　模型对照组与正常对照组的尿液差异蛋白质分析　两组尿液样本的有效差异波谱均在质荷比（m/z）为 0 ~25 000 范围内，考虑到基质干扰，将 m/z 位于 0 ~2 000 内的峰去除。大体上差异蛋白峰出现在 m/z 为 2 000 ~5 000 及 8 500 ~9 600 之间，在 12 000 和 13 000 附近。共有 33 种蛋白质表达存在差异（P < 0.05），其中 21 个在模型对照组中蛋白表达上调，12 个蛋白表达下调。图 3 列出了 m/z 为 1 000 ~25 000 范围内不同蛋白峰在两组之间的聚类差异模式。部分具有代表性的差异蛋白的相对含量见表 1。

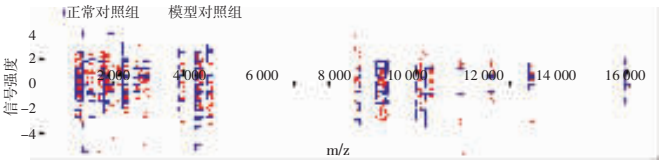


图 3　模型对照组和正常对照组的蛋白质峰相对强度聚类差异示意图

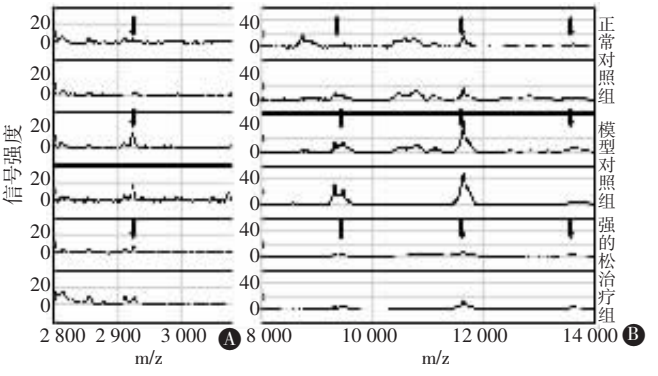
表 1　模型对照组和正常对照组差异显著的部分蛋白峰相对表达

m/z	正常对照组	模型对照组	P
2 926.496	3.73 ± 5.52	11.36 ± 5.01	0.005
4 348.013	6.89 ± 5.09	2.99 ± 4.87	0.044
4 698.286	2.19 ± 2.34	8.01 ± 7.19	0.013
8 737.554	13.94 ± 5.60	2.06 ± 3.22	0.004
8 809.043	6.30 ± 5.76	2.24 ± 1.58	0.044
9 321.026	5.79 ± 4.56	15.93 ± 10.31	0.016
9 393.144	4.12 ± 2.25	9.49 ± 5.42	0.025
9 477.535	6.38 ± 5.13	14.24 ± 6.81	0.010
9 548.392	2.34 ± 2.26	5.42 ± 2.95	0.020
11 639.340	23.67 ± 15.01	36.58 ± 19.72	0.032
13 607.190	4.18 ± 2.96	6.23 ± 1.62	0.028

2.4.2　治疗前后差异表达蛋白的筛选　将正常对照组、模型对照组与强的松治疗组 3 组的尿蛋白质表达谱进行比较分析后发现，共有 6 个蛋白峰在 3 组间差异显著（P < 0.05），见表 2。图 4 分别显示了 3 组间不同的蛋白表达谱，以上 6 个差异蛋白峰在正常对照组和强的松治疗组中表达相似，而在模型对照组中出现高表达。

表 2　3 组在不同质荷比处差异蛋白质的相对含量

m/z	正常对照组	模型对照组	强的松治疗组	P
2 926.496	3.73 ± 5.52	11.36 ± 5.01	6.42 ± 8.80	0.018
9 321.026	5.79 ± 4.56	15.93 ± 10.31	5.78 ± 4.74	0.031
9 393.144	4.12 ± 2.25	9.49 ± 5.42	3.61 ± 2.62	0.027
9 477.535	6.38 ± 5.13	14.24 ± 6.81	6.69 ± 4.61	0.018
11 639.340	23.67 ± 15.01	36.58 ± 19.72	14.50 ± 10.88	0.041
13 607.190	4.18 ± 2.96	6.23 ± 1.62	4.07 ± 1.11	0.043



A：m/z 为 2926.496 的蛋白峰；B：m/z 为 9321.026、9393.144、9477.535、11639.340 及 13607.190 的蛋白峰，前三者为融合峰

图 4　3 组之间的差异蛋白峰相对强度示意图

2.4.3 差异表达蛋白的数据搜索结果 分别对以上 6 个差异蛋白峰进行数据库(http://www.expasy.org/tools/tagident.html)搜索,得到 6 种与以上差异蛋白相对分子质量最为接近的蛋白质,见表 3。

表 3 6 个差异蛋白的数据库搜索结果

差异蛋白质(m/z)	数据库代码	蛋白质名称	相对分子质量	等电点
2 926.496	O55232	Orexin-B	2 937	12.31
9 321.026	P06866	Haptoglobin alpha chain	9 317	5.00
9 393.144	B2RZD7	UPF0631 protein HSD24 homolog	9 379	9.34
9 477.535	B9TQX4	Unique cartilage matrix-associated protein C-terminal fragment	9 475	4.73
11 639.340	P07151	Beta-2-microglobulin	11 636	7.08
13 607.190	Q5PPK1	Brain protein I3	13 613	8.78

3 讨论

经典的蛋白质组学研究常用双向电泳联合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在复合物中进行蛋白质的鉴定和量化,但此方法复杂耗时、昂贵、结果重现性差,只适合用于鉴定目标蛋白,而不适用于从大量的病人和健康人样本中筛选生物标志物[4,5]。SELDI-TOF-MS 与其他蛋白质分离技术相比最大的优点是测定过程快速、高通量,不需进行生物样本的预处理就可直接对天然蛋白质进行分析,通过使用特定的芯片,可以对不同选择范围内的蛋白质和多肽进行优先分析[6-8]。尿液样本成分复杂,由于在样本收集、储存和分析过程中缺乏标准化和质量控制,严重影响了应用 SELDI-TOF-MS 进行可靠的尿液生物标志物的发现。

本研究在收集 MCNS 大鼠尿液时将时间控制在 2 h 内,Papale 等[9]报道尿液样本在室温储存 2 h 后质谱峰强度逐渐降低,即使加入蛋白酶抑制剂也无法抑制尿液蛋白降解,并推测时间依赖的蛋白降解可能与酶裂解无关[10]。尿液样本在储存前先于 4℃ 13 000 ×g 离心 10 min,以去除其中含有的细胞及不溶解的颗粒对实验的干扰。实验证明离心后的尿液样本质谱峰的数量比未经离心的样本增多,峰强度也增高 2~3 倍[9]。本结果表明尿液样本的裂解方法也影响质谱图中峰的数量和相对强度,选择先裂解后稀释的方法能获得较理想的实验图谱。实验选择弱阳离子交换芯片 CM10,通过离子交换的方式与蛋白质及多肽进行可逆结合。因蛋白质和多肽表面含有弱酸和碱性氨基酸,所以 NaAc 缓冲液的 pH 值会显著影响蛋白质与芯片的结合,其中 pH 值为 4.0 的 NaAc 缓冲液得到的蛋白峰数量最多,峰的相对强度最好,证实 CM10 芯片表面的羧酸盐在低 pH 值的缓冲液中可传递所有的正电荷给样本中的蛋白质,从而有利于蛋白质与芯片的结合[9]。优化实验条件后质控峰强度的平均 CV 值为 18.0 %(7.50 %~35.89 %),重复性良好,与 Vanhoutte 等[11,12]报道的结果相近。因此,通过优化实验条件并实行质量控制,SELDI-TOF-MS 对于在大样本中进行尿液生物标志物的筛选仍是一种可行且必需的检测手段[1,5,13]。

MCNS 是一种以选择性蛋白尿及低血浆白蛋白为特征的肾脏疾病,多发于儿童,电镜下的改变主要表现为肾小球足细胞足突的融合,其发病机制尚未完全明确,临床缺乏特异、灵敏的诊断方法。目前有关 MCNS 尿蛋白质表达谱的研究国内外尚少见报道,本研究在相对分子质量为 2 000~25 000 范围内发现了具有统计学意义的可以区分 MCNS 大鼠和健康大鼠的生物标志物群,由 33 种蛋白质组成,其中 21 个在模型对照组中蛋白表达上调,12 个蛋白表达下调。这些差异蛋白质组显示了在低分子质量范围内尿液蛋白的复杂性及两组尿液蛋白质谱之间的显著差别,也从另一个侧面反应了 MCNS 模型复制成功。对 3 组尿蛋白质表达谱进行比较分析发现,共有 6 个蛋白峰在 3 组间差异有统计学意义($P<0.05$),其 m/z 分别为 2 926.496、9 321.026、9 393.144、9 477.535、11 639.340 及 13 607.190。这些差异蛋白峰在模型对照组中较正常对照组高表达,而在强的松治疗组中蛋白表达下调,峰强度接近正常对照组的水平。强的松作为糖皮质激素类药物在临床上广泛用于治疗 MCNS,先前的研究证实强的松可能通过在细胞核内阻止核转录因子-κB 与 DNA 结合来下调核转录因子-κB 活化,从而阻断受其调控的免疫炎症反应蛋白的产生[14,15],本研究从蛋白质水平上说明 MCNS 大鼠经强的松治疗后,尿液中有 6 种蛋白表达趋于正常,这 6 个差异蛋白峰可能是强的松治疗 MCNS 的药物靶点,并对 MCNS 的治疗监测和预后判断具有重要意义。生物信息学分析结果表明这 6 个差异蛋白分别为 Orexin-B、Haptoglobin alpha chain、UPF0631 protein HSD24 homolog、Unique cartilage matrix-associated protein C-terminal fragment、Beta-2-microglobulin 和 Brain protein I3。其中 m/z 为 11639.340 的蛋白经数据库搜索证实为近端肾小管损害的标志蛋白——β_2微球蛋白[11],提示虽然 MCNS 形态学改变主要表现为肾小球足细胞足突的融合,但病变同样也造成肾小管的损害[14,15]。对这些差异蛋白质进行鉴定并研究其生物学功能,可进一步确定 MCNS 尿液生物标志物,这对早期诊断、治疗监测和寻找药物治疗的靶目标具有重要的意义。

志谢 诚挚感谢南京军区福州总医院检验中心赵猛老师、福建中医学院附属第二人民医院中心实验室江敏主任,福建中医药研究所吴华嵩老师对本研究的大力支持

参考文献:

[1] Huang F, Clifton J, Yang X, *et al*. SELDI-TOF as a method for biomarker discovery in the urine of aristolochic-acid-treated mice[J]. Electrophoresis, 2009, 30(7):1168-1174.

[2] Albrethsen J, Kaas A, Schonle E, *et al*. Evaluation of a type 1 diabetes serum cohort by SELDI-TOF MS protein profiling[J]. Proteomics,

2009,3(3):383-393.
[3] Cadieux P A,Beiko D T,Watterson J D,*et al*. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS):a new proteomic urinary test for patients with urolithiasis[J]. J Clin Lab Anal,2004,18(3):170-175.
[4] Gonzalez E, Neuhaus T, Kemper M J, *et al*. Proteomic analysis of mononuclear cells of patients with minimal-change nephrotic syndrome of childhood[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(1):149-155.
[5] Lebrecht A, Boehm D, Schmidt M, *et al*. Surface-enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-oF-flight Mass Spectrometry to Detect Breast Cancer Markers in Tears and Serum[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2009,16(2):75-83.
[6] Mohamedali A, Guinn B A, Sahu S, *et al*. Serum profiling reveals distinctive proteomic markers in chronic myeloid leukaemia patients[J]. Br J Haematol, 2009, 144(2):263-265.
[7] Braunschweig T, Krieg R C, Bar-Or R,*et al*. Protein profiling of non-malignant and malignant ascites by SELDI-TOF MS:proof of principle [J]. Int J Mol Med, 2009, 23(1):3-8.
[8] Giannakis E, Macris M, Chan L, *et al*. Evaluation of relaxin's antifibrotic action by SELDI-TOF mass spectrometry-based profiling of relaxin knockout mice, a model of progressive fibrosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1160:350-352.
[9] Papale M, Pedicillo M C, Thatcher B J, *et al*. Urine profiling by SELDI-TOF/MS:monitoring of the critical steps in sample collection, handling and analysis[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007,856(1/2):205-213.
[10] Traum A Z, Wells M P, Aivado M, *et al*. SELDI-TOF MS of quadruplicate urine and serum samples to evaluate changes related to storage conditions[J]. Proteomics, 2006, 6(5):1676-1680.
[11] Vanhoutte K J, Laarakkers C, Marchiori E, *et al*. Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury:evaluation with computational analytical tools[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(10):2932-2943.
[12] Purohit S, Podolsky R, Schatz D, *et al*. Assessing the utility of SELDI-TOF and model averaging for serum proteomic biomarker discovery [J]. Proteomics, 2006, 6(24):6405-6415.
[13] Altamura S, Kiss J, Blattmann C, *et al*. SELDI-TOF MS detection of urinary hepcidin [J]. Biochimie, 2009,91(10):1335-1338.
[14] 林青,郑健,艾斯,等.肾康灵汤剂联合强的松治疗阿霉素肾病大鼠的作用机制[J].中西医结合学报,2009,7(7):661-666.
[15] 林青,郑健,陈宇新,等.人外周血中NF-κB p65定量检测方法的建立及临床应用[J].第三军医大学学报,2010,32(7):728-730.

(收稿:2010-02-12 修回:2010-03-31)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)17-1846-01

足月妊娠合并急性粒细胞性白血病1例

吴晓华,李 真 (400038 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科)

【关键词】 妊娠;急性粒细胞性白血病;急性髓系白血病
【中图法分类号】 R733.7 【文献标志码】 B

1 临床资料

患者,31岁,G_5P_1,因"停经37^{+6}周,发现全血细胞减少17 d,发热6 d"由外院急诊转入。末次月经2006-08-12。妊娠35^{+3}周时在当地医院多次查血常规皆提示"全血细胞减少",因无症状未治疗。患者一直从事皮鞋制造和销售。第1胎为足月顺产,小孩7岁,体健。

入院查体:体温37.8 ℃,脉搏84/min,呼吸20/min,血压120/70 mmHg,神志清楚,全身皮肤有散在红斑,双下肢可见瘀斑,咽部充血,扁桃体无肿大,胸骨无压痛,呼吸音增粗,无干湿啰音,余无异常。产检及产科B超:胎儿符合孕周,脐带绕颈。腹部B超:肝脾无肿大。血常规:WBC 1.68×10^9/L,中性粒细胞56%,淋巴细胞16%,HGB 69 g/L,RBC 2.05×10^{12}/L,Hct 19%,PLT 42×10^9/L。K^+ 3.2 mmol/L。骨穿:"急性粒细胞性白血病部分分化型(M2a),考虑为骨髓异常增生综合征转化而来",其余相关检查均正常。予加强抗感染、输红细胞悬液、新鲜冰冻血小板等治疗,复查WBC 3.01×10^9/L,中性粒细胞40.6%,淋巴细胞36.5%,HGB 100 g/L,Hct 27.7%,PLT 54×10^9/L。于妊娠38^{+4}周时在腰麻下行剖宫产术,术中失血约300 ml,输红细胞400 ml,新鲜冰冻血小板200 ml。新生儿评分均10分,转儿科观察。术后第2天体温达38.4 ℃,WBC 4.37×10^9/L,中性粒细胞54.5%,淋巴细胞27.9%,HGB 104 g/L,Hct 29.6%,PLT 78×10^9/L,白蛋白23 g/L,总蛋白49 g/L,其余皆正常,术后第3天转血液科继续治疗。

2 讨论

妊娠合并白血病在临床上比较少见,发生率为1/75 000,其中急性髓系白血病占60%,急性淋巴细胞白血病占28%,孕妇及胎儿的死亡率都很高[1,2],而妊娠晚期发病并足月分娩者更少见,患者是我院自建院以来的首例。

白血病对母儿影响主要有不同程度的贫血、血小板减少、难以控制的产时产后出血、弥散性血管内凝血、严重的产褥感染等,均可危及产妇的生命,还可至胎儿流产、早产、死胎、死产及新生儿死亡等[3,4]。妊娠会延误白血病的治疗。多数学者认为,白血病在妊娠中发病较妊娠前发病预后差,且越是延迟治疗者治疗效果越不理想[5-8]。患者是在妊娠35+周时发现全血细胞减少,妊娠足月才确诊,考虑其随时有分娩的可能,未行化疗,经过短期对症支持治疗后终止妊娠。患者虽然是经产妇,但产后子宫创面大,发生大出血和感染的机会很大,且孕

(下转1860页)

【通信作者】 李 真,电话:(023)68774542,E-mail:drlizhen@yahoo.com.cn