

· 基础研究 ·

## 非创伤性股骨头缺血性坏死差异表达蛋白的鉴定和分析

张雷<sup>1</sup>, 杨国敬<sup>1</sup>, 王珺<sup>2</sup>, 郑进佑<sup>1</sup>, 吴立东<sup>3</sup>, 严世贵<sup>3</sup>, 林标杨<sup>2</sup>

(1. 温州医学院附属第三医院, 浙江 瑞安 325200; 2. 浙江大学浙江加州国际纳米技术研究院, 浙江 杭州 310029; 3. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

**摘要 目的:**应用组织蛋白质组学方法寻找与成人非创伤性股骨头缺血性坏死相关的蛋白质。**方法:**分别于非创伤性股骨头缺血性坏死患者和新鲜股骨颈骨折患者的股骨头中采集坏死骨组织样本与正常骨组织样本 8 份, 采用四种不同的溶剂提取骨组织中的总蛋白, 应用多维液相色谱与串联质谱联用技术对组织蛋白进行分离鉴定和生物信息学分析。**结果:**坏死组织样本和正常组织样本中鉴定二肽段以上的高可信度蛋白质数量分别为 1233 个和 999 个, 假阳性率为 0.9%。共鉴定 154 种 3 倍以上的差异蛋白质。基因本体论蛋白功能分析和文献检索显示 34 种蛋白质与股骨头缺血性坏死密切相关。Western 免疫印迹证实了 ONFH 患者骨组织中 GPCR26 和 ChST2 表达量下调, 与质谱结果一致。**结论:**非创伤性股骨头缺血性坏死存在复杂的病理生理学过程。研究发现的 34 个差异表达蛋白可能成为股骨头缺血性坏死早期临床诊断的候选生物学标志物。

**关键词** 股骨头坏死 蛋白质组学 多维色谱 质谱 差异表达蛋白质

**Proteomic analysis of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head** ZHANG Lei\*, YANG Guo-jing, WANG Jun, et al. \* The Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Rui'an 325200, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To explore proteins associated with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in adults by using high throughput proteomic approach. **Methods:** Eight necrotic bone tissue samples were harvested from the femoral head of patients with osteonecrosis of the femoral head, and 8 normal bone tissue samples were collected as the control group in the same patients. After bone tissues were demineralized by HCl solution, total bone proteins were extracted sequentially by using four different lysis buffers. Thereafter, multi-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MDLC-MS/MS) were applied to separate and identify the extracted proteins, and bioinformatics analysis was carried out then by the software tools such as TurboSEQUEST and GoMiner. **Results:** The in-depth proteome analysis of necrotic and normal bone tissue revealed 1233 and 999 high-confidence proteins respectively based on two peptides minimum, with the a false-positive rate of 0.9%. 154 differential expressed proteins, the level of which were upregulated or downregulated at least 3 fold were identified by spectral counting, as compared with the normal samples. Enrichment analysis in Gene Ontology categories of the differentially expressed gene found that 34 differential expressed proteins were highly associated with osteonecrosis of the femoral head. Downregulated expression of GPCR26 and ChST2 was confirmed by Western Blot on the samples of ONFH. **Conclusion:** The pathogenesis of the non-traumatic osteonecrosis of the femoral head has been proved complicated and remains unknown. These identified differential expressed proteins might be promising biomarker candidates for early diagnosis of the devastating disease. The results of this study will affirmatively provide a new approach to understand the etiopathogenesis of the osteonecrosis of the femoral head.

**Key words** Femur Head Necrosis; Proteomics; Multi-dimensional liquid chromatography; Mass spectrometry; Differential expressed protein

股骨头缺血性坏死 (Osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是骨科领域中最常见的中青年髋关节疾病<sup>[1]</sup>。尽管文献报道非创伤性 ONFH 与多种因素密切相关, 但其确切的病因和发病机制仍不明确。近年来多项研究结果发现, ONFH 存在极高的遗传背景和

基因多态性<sup>[1-3]</sup>, 从而成为研究的热点。少数血清蛋白质组学研究发现 ONFH 与多种蛋白的高表达密切相关<sup>[4-5]</sup>。然而, 以往的血清蛋白质组学研究大多基于双向凝胶电泳 (2-DE) 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术, 存在低通量、低分子量检测和低丰度蛋白质的灵敏性不强等问题; 此外, 血清蛋白质成分不稳定, 极易受机体内外环境的

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金 (2007B207) 温州市科技计划项目 (Y20080006)

背景干扰,实验重复性较差。研究发现,骨组织蛋白质组学可以最大程度地避免上述缺点,全面揭示骨与关节疾病的蛋白质组变化。但由于骨组织特殊的深度矿化结构,传统的组织蛋白提取方法无法有效地从骨组织中提取高纯度的蛋白质进行大规模鉴定。为此,本实验借鉴目前最高效的蛋白提取方法<sup>[6]</sup>,采用鸟枪法(Shotgun)和多维液相色谱与串联质谱联用(MDLC-MS/MS)的高通量蛋白质组技术,分析成人非创伤性 ONFH 的蛋白质表达情况,获得了满意的结果,现报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** Ettan 多维色谱 nanoflow/capillary 层析系统、Finnigan LTQ-Orbitrap 质谱仪及 BioBasic SCX 离子交换柱(0.3 × 30 mm)均购自美国热电公司。Trap 柱(Dionex/LC Packings  $\mu$ -Precolumn Cartridge P/N 160454 C18 PepMap 100, 5 $\mu$ m, 100Å, 300 $\mu$ m × 5mm)和 RPC 柱(Dionex/LC Packings P/N 160321 150 × 0.075 mm, C18 PepMap, 3  $\mu$ m, 100Å)均为美国 Dionex 公司产品。Speedvac Labconco Centrivap Concentrator 真空离心干燥系统购自美国 Labconco 公司。Amicon ultra-15 过滤离心管(ultracel-3 超滤膜)购自美国 Millipore 公司。实验用水均经过电阻率 18.2M $\Omega$ .cm 的 ELGA LabWater 纯化系统(High Wycombe, UK)纯化。

HPLC 级乙腈(ACN)购自韩国 Burdick & Jackson 公司。盐酸胍和碳酸氢铵均购自于日本 FLUKA 公司。蛋白酶抑制剂混合物购自德国罗氏公司。三羧乙基磷(TCEP)、考马斯亮蓝 G-250 和碘乙酰胺(IAA)购自美国 Sigma 公司。测序级胰蛋白酶购自于美国 Promega 公司。ECL 超敏发光液购自美国 Pierce 公司。Isoform 1 of Carbohydrate sulfotransferase 2 (ChST 2)抗体试剂盒购自瑞典 Atlas 公司, Probable G-protein coupled receptor 26(GPCR26)抗体购自英国 Abcam 公司。PVDF 膜购自瑞典 Amersham Pharmacia 公司。

**1.2 临床样本收集** 于 2008 年 5 月至 2008 年 12 月住院手术的 23 例合乎标准的非创伤性 ONFH 患者中随机抽取 8 例纳入本项实验。纳入标准:所有由非创伤性因素引起,术前影像学提示 ARCO 1~3 期<sup>[7]</sup>的 ONFH,并经术后病理证实的成人患者。剔除标准:外伤因素引起、既往有髋关节手术史或合并全身代谢性

疾病如 Paget 病、骨质疏松症、肿瘤伴骨转移的患者。8 例中女 3 例,男 5 例;平均年龄 49 岁;ARCO 1 期 2 例,2 期 3 例,3 期 3 例。

根据术前影像学检查在股骨头坏死区域获取坏死骨组织块(10 mm × 10 mm × 2 mm),于新鲜股骨颈骨折患者股骨头中获取相似大小的正常骨组织块作为对照。样本采集均于术中即刻进行,并在术后经病理组织学证实采样的准确性。所有骨组织样本立即经液氮速冻, -80 °C 保存备用。

**1.3 组织蛋白提取** 采用四步蛋白提取法分别提取坏死骨和对照骨样本的组织蛋白:取 200 mg 骨组织样本,用含蛋白酶抑制剂的 PBS 液(pH 7.4)冲洗去除杂质,4 °C 冰箱过夜。1.2 M HCl 脱矿,4 °C 冰箱培育过夜,离心后取上清液为提取物 1。剩余液加入含蛋白酶抑制剂的 100 mM Tris, 6 M 盐酸胍(pH 7.4)4 °C 冰箱培育 72 h。离心后取上清液为提取物 2。剩余液再加入 pH 7.4 含蛋白酶抑制剂的 100 mM Tris, 6 M 盐酸胍, 0.5 M 乙二胺四醋酸四钠, 4 °C 冰箱培育 72 h。离心后取上清液为提取物 3。最后残余液加入 6 M HCl 4 °C 冰箱过夜,离心后取上清液为提取物 4。收集所有提取物,由 Amicon Ultra-15 离心过滤器收集并浓缩。BCA 法蛋白定量。

**1.4 SDS-PAGE 和胶内酶解** 取 40  $\mu$ g 样本 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,将凝胶用考马斯亮蓝 G-250 染色,室温下振摇脱色。将蛋白质凝胶斑点切成 1 mm<sup>3</sup> 小胶块,加入 30  $\mu$ L 200 mmol · L<sup>-1</sup> IAA 储液烷基化,室温避光反应 1 h。加入 50  $\mu$ L CAN 并在 Speedvac 真空离心干燥系统加热干燥。加入 2  $\mu$ L 测序级胰蛋白酶室温静置 15 min, 37 °C 温育过夜。再加入 50  $\mu$ L 蛋白提取液(50% ACN, 5% 甲酸)超声波振荡 10 min,离心后收集并保存上清液。重复上述操作 3 次,取上清液以 Speedvac 浓缩干燥后 -20 °C 保存。

**1.5 质谱分析** 质谱分析前重悬样本在含 0.1% 甲酸的 30  $\mu$ L 水中, 15 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min。用二维液相色谱串联质谱(2D-LC-MS/MS)技术实现多肽的分离和鉴定。在 2D-LC 的离线设置中,样本被吸附在 SCX 离子交换柱,用逐步增加的盐浓度梯度(10, 50, 100 and 500 mM of NH<sub>4</sub>Cl)依次洗脱到 trap 柱上并进一步在 RPC 柱上分离。分离所得的肽段转入 LTQ-Orbitrap 质谱仪进行蛋白质分析鉴定。在

LTQ 对  $m/z$  400 的离子富集到  $1 \times 10^6$  个的目标数后, Orbitrap 质量分析器在分辨率 60 000 的条件下进行全扫描( $m/z$  300 - 2000)。挑选 5 个最高峰值的离子打碎扫描,离子碎片由 Orbitrap 质量分析器在分辨率为 15 000( $m/z$  400)的条件下记录。

**1.6 生物信息学处理** 用 Xcalibur Qual Browser 2.0 软件(Thermo Finnigan, Bremen, Germany) 计算肽段的峰值目录。将所得的串联质谱数用 BioWorks3.2 软件组套(Thermo Electron, Inc., Waltham, MA USA) 中的 Turbo SEQUEST 软件在人类 International Protein Index 蛋白质数据库(ipi. HUMAN. v3. 34. fasta) (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>) 中查询蛋白质种类。Turbo SEQUEST 软件的参数中设置“Fragment Mass Tolerance”设置为“1Da”;“Xcorr”最小值在设置为“1.5”、“2.0”和“2.5”时分别被认为单电荷肽段、双电荷肽段和三电荷肽段,设置“ $\Delta Cn$ ”临界值为“0.1”。在“Mascot Search”中选择“Decoy 随机序列数据库”以计算检测的假阳性率。

LTQ-Orbitrap 鉴定所得的 RAW 格式文件通过 Trans-Proteomic Pipeline (TPP) 网络界面工具转换为 mzXML 格式。Turbo SEQUEST 查询结果的 SRF 文件用 Bioworks 软件转换为 DTA 和 OUT 格式。坏死骨组织样本和正常对照样本的 MS/MS 数据用 TPP 软件包中的 PeptideProphet 和 ProteinProphet 软件进行分析。

**1.7 Spectral counting 和基因本体论分析** 总和坏死组织样本和正常组织样本的质谱数,并用已鉴定蛋白质的质谱数作为标准对照,spectral counting 计算坏死组和对照组样本之间的比值。用 GoMiner 软件挖掘实验数据的生物学意义,用等级化结构化的词汇表“基因本体论”(Gene Ontology, GO) 和相关的数据库在对蛋白质表达谱进行功能注释的基础上给出蛋白质功能的分布,同时给出感兴趣功能分类的统计学信息。

**1.8 Western 免疫印迹** 坏死组织样本和正常组织样本中提取的所有蛋白质均在 SDS-PAGE 凝胶上分离并转移到 PVDF 膜上。将膜移至 25 mL 含 5% 脱脂奶的 TBST 缓冲液中封闭,室温摇匀加入 ChST2 和 GPCR26 一抗 4 °C 培育过夜。再用 TBST 缓冲液室温下洗涤 3 次,加入 1:1500 的辣根过氧化物酶标记的二抗于室温培育 1 h。ECL 超敏发光液显色并与内参  $\beta$ -actin 的蛋白表达水平比较。

## 2 结果

经 Protein Prophet 软件鉴定,坏死组织样本和正常组织样本中二肽段以上的高可信度蛋白质数分别为 1 233 个和 999 个(见表 1),假阳性率为 0.9%。应用 spectral counting 共鉴定差异表达蛋白质共 189 个,其中在坏死组中相对于对照组表达量上调 3 倍以上的蛋白点 104 个,下调 3 倍以上 50 个。生物信息学分析发现这些差异表达蛋白属分泌蛋白,大多数为机体组织和细胞分泌、脱落到血液中的功能蛋白质。按照与 ONFH 相关的生理和病理功能并结合相关文献,发现其中 34 种蛋白质与 ONFH 密切相关(表 2)。这些蛋白质按 GO 功能可分为 8 类:与调控细胞凋亡有关,如 IL1B Interleukin-1 beta precursor、Isoform 3 of Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 2-like protein 等;与细胞信号传导通路有关,如 Zinc finger protein 409、Probable G-protein coupled receptor 26、Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain precursor、Isoform 2 of PX domain-containing protein SNX29 等;与细胞粘附有关,如 Hemicentin 1、Contactin associated protein-like 5 isoform 1、Sushi domain-containing protein 5 等;与细胞骨架形成有关,如 Lumican precursor、Chondroadherin、Keratin, type II cytoskeletal 8、Collagen alpha-1(I) chain 等;与骨骼发育有关,如 Annexin A2 isoform 1、Prolargin precursor、Isoform 1 of Periostin precursor、Parathyroid hormone precursor 等;与糖脂代谢有关,如 Isoform 7 of Titin、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide precursor、Isoform 1 of Carbohydrate sulfotransferase 2、Apolipoprotein A-I precursor、Triosephosphate isomerase 1 等;与血液凝聚有关,如 Thrombospondin 1、

表 1 四种不同溶剂提取所得的骨组织蛋白量、肽段数及二肽段以上蛋白数

蛋白提取物	蛋白质量/骨组织质量 ( $mg \cdot g^{-1}$ )	肽段数	蛋白数 <sup>1)</sup>	
ONFH 组	提取物 1	3.01	1664	708
	提取物 2	2.88	1246	314
	提取物 3	0.44	642	232
	提取物 4	1.35	733	183
对照组	提取物 1	1.63	2308	811
	提取物 2	2.04	458	174
	提取物 3	0.23	310	72
	提取物 4	1.92	216	32

注 1) Xcorr 在单、双、三电荷肽段最小值设置为 1.5、2.0 和 2.5,  $\Delta Cn$  为 0.1;假阳性率小于 5%,二肽段以上的蛋白质

Alpha-1-antitrypsin precursor、Antithrombin III variant 等;与血管生成有关,如 Pigment epithelium-derived factor precursor、Neuropilin 1 等。此外,本项研究中 GPCR26 和 ChST2 在坏死组表达量明显降低。West-

ern 印迹检测结果也显示,相对于正常组骨组织,ONFH 患者骨组织中 GPCR26 和 ChST2 表达量下调,与质谱分析结果一致,进一步证实了本研究质谱数据的准确性。

表 2 与非创伤性股骨头缺血性坏死高度相关的差异表达蛋白质

IPI 代码	差异表达蛋白质	所属基因
表达上调的差异表达蛋白质		
IPI00045337	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	TNFRSF13C
IPI00759542	Isoform 8 of Titin	TTN
IPI00307223	IL1B Interleukin-1 beta precursor	IL1B
IPI00107433	Isoform 3 of Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interactingprotein 2-like protein	BNIP1
IPI00021891	Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain precursor	FGG
IPI00166504	Isoform 2 of PX domain-containing protein SNX29	LOC92017
IPI00292300	Contactin associated protein-like 5 isoform 1	CNTNAP5
IPI00297224	Sushi domain-containing protein 5	SUSD5
IPI00554648	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8
IPI00418169	Annexin A2 isoform 1	ANXA2
IPI00020987	Prolargin precursor	PRELP
IPI00179357	Isoform 7 of Titin	TTN
IPI00219018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
IPI00744115	Propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide precursor	PCCA
IPI00021841	Apolipoprotein A-I precursor	APOA1
IPI00451401	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	TPI1
IPI00296099	Thrombospondin-1 precursor	THBS1
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin precursor	SERPINA1
IPI00006114	Pigment epithelium-derived factor precursor	SERPINF1
IPI00412224	Bromodomain and WD repeat domain-containing protein 2	BRWD2
IPI00018246	Isoform 1 of Hexokinase-1	HK1
表达下调的差异表达蛋白质		
IPI00007109	Zinc finger protein 409	ZNF409
IPI00168597	Probable G-protein coupled receptor 26	GPR26
IPI00045512	Hemicentin 1	HMCN1
IPI00022434	Lumican precursor	LUM
IPI00014592	Chondroadherin precursor	CHAD
IPI00297646	Collagen alpha-1(I) chain precursor	COL1A1
IPI00007960	Isoform 1 of Periostin precursor	POSTN
IPI00000940	Parathyroid hormone precursor	PTH
IPI00098769	Isoform 1 of Carbohydrate sulfotransferase 2	ChST2
IPI00032179	Antithrombin III variant	SERPINC1
IPI00398715	Neuropilin 1	NRP1
IPI00303343	Serine arginine-rich pre-mRNA splicing factor SR-A1	SCAF1
IPI00328091	Isoform 1 of Netrin-4 precursor	NTN4

### 3 讨论

**3.1 骨组织蛋白的提取** 近年来对 ONFH 的蛋白质组学研究大多都基于动物实验或血清学研究,主要原因在于骨组织存在特殊的矿化结构。由于骨组织蛋白被严密包裹于大量无机成分中,有效完整地提取骨组织的蛋白质显得十分困难;传统的研磨等物理方法

容易破坏蛋白质结构造成实验数据丢失,因此,骨组织蛋白的有效提取已成为 ONFH 蛋白质组学研究的瓶颈。Jiang 等<sup>[6]</sup>利用四种不同的溶剂提取骨组织蛋白质的方法在狗的颅骨组织中鉴定了二肽段以上的高可信度蛋白质 816 个。迄今为止还没有人体骨组织蛋白质组分离鉴定的相关报道。我们的研究首次

在 ONFH 的坏死组织样本和正常组织样本中分别鉴定了 1 233 和 999 个蛋白质,远远高于上述报道;其中假阳性率仅 0.9%,具有良好的重复性和可信度。两项研究中蛋白质数量的差异可能是由不同物种之间骨组织结构的不同所致。我们在比较两项研究实验数据时也发现骨组织蛋白成分及蛋白含量均存在一定的差别,说明不同的生物链等级和负重方式可能导致骨生长发育和结构特点的明显变化。

### 3.2 与股骨头坏死高度相关的部分差异表达蛋白

过去的动物实验证实,ONFH 与脂肪代谢异常显著相关。Motomura 等<sup>[8]</sup>在尸体活检中也发现 ONFH 患者的股骨头骨髓脂肪细胞明显增大、增多,这与我们在提取股骨头骨组织蛋白时见到大量淡黄油膩的脂肪样物质相吻合。我们的研究发现,ONFH 骨组织中存在 Propionyl-CoA carboxylase 的高表达。Propionyl-CoA carboxylase 是一种生物素依赖性的线粒体酶,在脂肪酸代谢中起关键作用,但在 ONFH 中的生物学地位尚未明确。Propionyl-CoA carboxylase 的高表达也进一步提示了在 ONFH 的发病过程中有异常的脂肪代谢参与。

Carbohydrate sulfotransferase 家族是由 ChST 基因表达的高尔基相关硫转移酶,在骨髓、血管内皮细胞以及发育中的非骨化软骨中高度表达。ChST3 可催化软骨素 6 位 N-乙酰氨基半乳糖发生磺基化产生硫酸软骨素,而后者又是构成软骨的主要成分,具有调节软骨细胞生长、发育,修复损伤软骨等作用。ChST3 缺乏可以引起 Omani 型脊椎骨骺发育不良和骨发育不良<sup>[9-10]</sup>。最近 Hermanns 等<sup>[11]</sup>报道了 6 例由于 ChST3 缺乏导致的先天性关节脱位患儿。而同属 ChST 家族的 ChST2 被认为在血管内皮细胞迁移过程中起调控作用。在本实验中 ONFH 的 ChST2 表达水平降低,我们推测早期 ONFH 由于 ChST2 下调导致抑制血管内皮细胞迁移、增殖,血管新生作用减少,同时由于股骨头特殊的局部血液供应特点,最终诱导坏死发生。

Annexin A2 是 Annexins 超家族中 A 亚家族的重要成员,与人类许多疾病的发生发展相关,尤其在肿瘤、心血管疾病中起重要作用。而 Annexin A2 与骨细胞代谢和 ONFH 的关系已被阐明。Takahashi 等<sup>[12]</sup>在研究中发现缺乏 1,25(OH)<sub>2</sub> 维生素 D<sub>3</sub> 的骨髓环境中,Annexin A2 增加破骨细胞样的多核细胞数量

并促进了骨的溶解。Baldwin 等<sup>[13]</sup>在镰状细胞病合并 ONFH 的病例中发现了 Annexin A2 基因多态性与镰状细胞病导致的 ONFH 有密切的关系。我们发现 ONFH 中 Annexin A2 表达上调,进一步证实了 Annexin A2 在 ONFH 自然病史中的作用,但 Annexin A2 具体生物学机制还不清楚,我们推测 Annexin A2 可能继发于多种致病因素从而增强破骨细胞活性,增加股骨头骨质破坏,最终导致股骨头塌陷。而 Annexin A2 是否可作为预测股骨头塌陷的生物学指标还有待于进一步研究。

Chondroadherin 是软骨细胞的主要成分蛋白之一,一般只能从软骨组织中分离得到。但最近有学者通过免疫学方法在骨基质中也检测到 Chondroadherin,并已于去矿化骨组织中提取得到<sup>[14]</sup>。Mizuno 等<sup>[15]</sup>发现 Chondroadherin 还与胶原蛋白的代谢有关,它通过其特有的 10 个富含亮氨酸重复序列与骨组织中的胶原纤维结合。Lumican 是富含亮氨酸低分子蛋白多糖,最初发现于角膜。但近来发现 Lumican 基因在骨细胞外基质及成熟成骨细胞中也有表达,它与细胞因子和胶原蛋白结合,组织胶原空间<sup>[16-17]</sup>。ONFH 中两者表达量降低,与 I、II 型胶原结合减少并从而可能影响胶原蛋白代谢,导致细胞外基质中胶原纤维空间结构变化,骨与软骨组织形态异常而引起股骨头坏死。

II 型胶原基因(COL2A1)被发现为遗传性 ONFH 的致病基因<sup>[1]</sup>,而我们在所有样本中并未发现 II 型胶原蛋白表达,这可能与以 II 型胶原为主要基质成分的软骨成份在取样时被完全剔除有关。我们在坏死骨组织中发现 COL1A1 合成减少,而在对照组 COL1A1 和 COL1A2 的表达水平明显增高,结果表明参与骨空间结构的 I 型胶原基因在 ONFH 发病过程中可能与 Chondroadherin 和 Lumican 起协同作用。

**3.3 本项研究的局限性和意义** 尽管本项研究成功地鉴定了数十个与 ONFH 的生物学功能高度相关的差异表达蛋白,但是实验过程仍存在着一定的局限性,如样本含量较少、部分差异表达蛋白质临床意义不大等。研究发现,34 个差异蛋白点大部分属于分泌蛋白,在细胞质核糖体上合成后被分泌到外周血和组织间液,因此这些蛋白质极有可能作为 ONFH 早期诊断的生物学标志物,该方法也为组织蛋白质组学在骨与关节疾病中的进一步应用奠定了基础。

#### 4 参考文献

- [1] Liu YF, Chen WM, Lin YF, et al. Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352:2294 - 2301.
- [2] Chang JD, Hur M, Lee SS, et al. Genetic background of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in the Korean population [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466: 1041 - 1046.
- [3] Lee HJ, Choi SJ, Hong JM, et al. Association of a polymorphism in the intron 7 of the SREBF1 gene with osteonecrosis of the femoral head in Koreans [J]. *Ann Hum Genet*, 2009, 73:34 - 41.
- [4] 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: 114 - 119.
- [5] Wu RW, Wang FS, Ko JY, et al. Comparative serum proteome expression of osteonecrosis of the femoral head in adults [J]. *Bone*, 2008, 43:561 - 566.
- [6] Jiang X, Ye M, Liu G, et al. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6:2287 - 2294.
- [7] ARCO (Association Research Circulation Osseous): Committee on terminology and classification [M]. *ARCO News*, 1992:41 - 46.
- [8] Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, et al. Bone marrow fat - cell enlargement in early steroid - induced osteonecrosis - a histomorphometric study of autopsy cases [J]. *Pathol Res Pract*, 2005, 200:807 - 811.
- [9] Rajab A, Kunze J, Mundlos S. Spondyloepiphyseal dysplasia Omani type: a new recessive type of SED with progressive spinal involvement [J]. *Am J Med Genet A*, 2004, 126A: 413 - 419.
- [10] Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, et al. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(27):10155 - 10160.
- [11] Hermanns P, Unger S, Rossi A, et al. Congenital joint dislocations caused by carbohydrate sulfotransferase 3 deficiency in recessive Larsen syndrome and humero-spinal dysostosis [J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82:1368 - 1374.
- [12] Takahashi S, Reddy SV, Chirgwin JM, et al. Cloning and identification of annexin II as an autocrine/paracrine factor that increases osteoclast formation and bone resorption [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269:28696 - 28701.
- [13] Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, et al. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis [J]. *Blood*, 2005, 106:372 - 375.
- [14] Larsson T, Sommarin Y, Paulsson M, et al. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 20428 - 20433.
- [15] Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Bone chondroadherin promotes attachment of osteoblastic cells to solid-state substrates and shows affinity to collagen [J]. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59:163 - 167.
- [16] Raouf A, Ganss B, McMahon C, et al. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix [J]. *Matrix Biol*, 2002, 21:361 - 367.
- [17] Svensson L, Narlid I, Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils [J]. *FEBS Lett*, 2000, 470:178 - 182.

(2010-07-27 收稿 2010-11-19 修回)

(上接第 12 页)

内部一致性信度量表各个项目间相关的程度, 这些项目应该反映同一独立概念的不同侧面。用 Cronbach's  $\alpha$  系数测量,  $\alpha$  系数表示问卷调查结果总变异中由不同被试者导致的比例占多少, Cronbach's  $\alpha$  系数值介于 0 与 1 之间,  $\alpha$  值越大表示问卷项目间相关性越好, 内部一致性可信度越高。一般而言,  $\alpha$  大于 0.8 表示内部一致性极好, 在 0.6 ~ 0.8 表示较好, 而低于 0.6 表示内部一致性较差<sup>[2]</sup>。研究结果表明, 辨病分量表、整体指标分量表以及各四种中医证型因子的内部一致性信都较好, 然而作为辨病分量表因子的体征试验因子和上肢运动感觉因子的 Cronbach's  $\alpha$  系数小于 0.6, 进一步研究可考虑增加这两项因子相应的条目数并扩大样本量来测评。

若删除相应条目后该条目所在因子或分量表的 Cronbach's  $\alpha$  系数有较大增加, 则说明该条目的存在有降低其内部一致性的作用, 可考虑删除。本次研究证明, “压项试验”“颈椎侧屈检查”“上肢肌力”“上肢感觉”“上肢麻木”“遇寒痛剧, 得温痛减”“舌有瘀点”“耳鸣”“素体虚弱”及“睡眠差”这些条目删除后其所在因子或分量表的 Cronbach's  $\alpha$  系数有所增加, 但增幅较小, 因此暂不考虑删除, 有待扩大样本进一步研究。

#### 5 参考文献

- [1] 彭迎春, 常文虎, 沈艳红. 如何测量问卷的信度 [J]. *中华医院管理杂志*, 2004, 20(6):383 - 384.
- [2] 吴明隆. *SPSS 统计应用实务* [M]. 北京: 中国铁道出版社, 2000:47.

(2010-05-06 收稿 2010-11-12 修回)