

· 临床研究 ·

# 基于蛋白质组学方法分析绝经后骨质疏松症全血差异蛋白

史晓林<sup>1</sup>, 杨依然<sup>2</sup>, 刘钟<sup>2</sup>, 李春雯<sup>3</sup>, 梁博程<sup>1</sup>, 刘康<sup>1</sup>, 何伟涛<sup>4</sup>, 胡炯<sup>1</sup>

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005;

2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

3. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053;

4. 海盐县中医院, 浙江 海盐 314300)

**摘要** 目的: 基于蛋白质组学方法筛选绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 全血差异蛋白。方法: 选择 7 例 PMOP 患者 (骨质疏松组) 和 7 例绝经后骨量正常女性 (骨量正常组) 作为研究对象。空腹抽取静脉血, 采用高效液相色谱-串联质谱技术筛选 PMOP 全血差异蛋白, 选取其中发生显著变化的差异蛋白进行生物信息学分析。结果: ①差异蛋白鉴定及筛选结果。应用高效液相色谱-串联质谱技术共定量检测到 102 个 PMOP 差异蛋白质, 其中 25 个蛋白质位点表达上调, 77 个蛋白质位点表达下调。68 个蛋白质两组差异倍数超过 2.0, 其中 39 个蛋白质两组差异倍数有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。②生物信息学分析结果。基因功能注释发现, 差异蛋白主要参与的细胞活动为单一生物过程、细胞代谢过程、细胞生物调节、对刺激和代谢过程的反应, 主要的分子功能为催化活性和结构分子活动。亚细胞定位分析发现, 102 个差异蛋白质中, 位点表达上调的 25 个差异蛋白全部位于细胞内, 位点表达下调的 77 个差异蛋白中, 19 个在细胞外, 其他均在细胞内。39 个目标差异蛋白相互作用网络图显示, 蛋白酶体亚基  $\alpha$  型-7 (proteasome subunit alpha type-7, PSMA7)、蛋白酶体亚基  $\beta$  型-7 (proteasome subunit beta type-7, PSMB7)、蛋白酶体亚基  $\beta$  型-3 (proteasome subunit beta type-3, PSMB3)、蛋白酶体亚基  $\alpha$  型-1 (proteasome subunit alpha type-1, PSMA1)、神经前体细胞表达发育下调因子 8 (neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 8, NEDD8)、DNA 损伤结合蛋白 1 (DNA damage-binding protein 1, DDB1)、RAD23A、UBA52 等蛋白位于相互作用网络节点的中心。结论: 以全血作为样本采用蛋白质组学方法可筛选出数量丰富的 PMOP 差异蛋白, 其中 PSMA7、PSMB7、PSMB3、PSMA1、NEDD8、DDB1、RAD23A、UBA52 可能是 PMOP 的潜在有效血液标志物。

**关键词** 骨质疏松; 绝经后; 蛋白质组学; 色谱法; 高压液相; 串联质谱法; 差异蛋白

## Analysis of proteins which are differentially expressed in whole blood of patients with postmenopausal osteoporosis using proteomics approach

SHI Xiaolin<sup>1</sup>, YANG Yiran<sup>2</sup>, LIU Zhong<sup>2</sup>, LI Chunwen<sup>3</sup>, LIANG Bochong<sup>1</sup>, LIU Kang<sup>1</sup>, HE Weitao<sup>4</sup>, HU Jiong<sup>1</sup>

1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, Zhejiang, China;

2. The Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China;

3. The basic Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China;

4. Traditional Chinese Medical Hospital of Haiyan county, Haiyan 314300, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To select the proteins which are differentially expressed in whole blood of patients with postmenopausal osteoporosis (PMOP) using proteomics approach. **Methods:** Seven females with PMOP (osteoporosis group) and seven postmenopausal females with normal bone mass (normal bone mass group) were selected out as the subjects. The fasting blood were fetched out from vein. The proteins which were differentially expressed in whole blood of patients with PMOP were selected out by using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), and those proteins which were obviously differentially expressed in whole blood were picked out for further bioinformatic analysis. **Results:** A total of 102 differentially expressed proteins were found out by HPLC-MS/MS, in which the expressions of 25 protein loci were up-regulated and the expressions of 77 protein loci were down-regulated. The fold change of 68 proteins exceeded 2.0, while there was statistical significance in fold change of 39 out of 68 proteins ( $P < 0.01$ ). The results of gene annotation demonstrated that the differentially expressed proteins were mainly involved in 4 kinds of cell activities, including single biological process,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573754; 81873129); “十三五”浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科建设计划项目 (2017-XK-A16)

通讯作者: 史晓林 E-mail: xslshi-2002@163.com

cell metabolism process, cell biological regulation and response to stimulation and metabolism process, and their main molecular functions included catalytic activities and structural molecular activities. The results of subcellular positioning analysis demonstrated that 25 differentially expressed proteins with up-regulated loci expressions were inside the cells, and out of 77 differentially expressed proteins with down-regulated loci expressions 19 were outside the cells and the others were inside the cells. The network diagram of interaction between 39 differentially expressed proteins showed that proteasome subunit alpha type-7 (PSMA7), proteasome subunit beta type-7 (PSMB7), proteasome subunit beta type-3 (PSMB3), proteasome subunit alpha type-1 (PSMA1), neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8 (NEDD8), DNA damage-binding protein 1 (DDB1), RAD23A and UBA52 were located at the center of the interaction network nodes. **Conclusion:** Abundant differentially expressed proteins of PMOP in whole blood can be identified using proteomics approach, and PSMA7, PSMB7, PSMB3, PSMA1, NEDD8, DDB1, RAD23A and UBA52 may be the potential effective blood markers of PMOP.

**Keywords** osteoporosis, postmenopausal; proteomics; chromatography, high pressure liquid; tandem mass spectrometry; differentially expressed protein

目前很多研究表明,绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的发病是多种因素相互作用的结果,可能与免疫<sup>[1]</sup>、肠道菌群失调、氧化应激<sup>[2]</sup>、昼夜节律<sup>[3]</sup>等多种因素有关。作为原发性骨质疏松症,PMOP起病隐匿、早期临床症状少。外周血是临床最容易取得的检测样本,血液标志物检测不良反应少、灵敏度高,但目前尚无针对PMOP的特异性血液检测标志物<sup>[4]</sup>。为探索PMOP可能的潜在血液检测标志物,本研究应用蛋白质组学方法分析了PMOP患者的全血差异蛋白,现总结报告如下。

## 1 临床资料

**1.1 一般资料** 从2017年6月至2018年6月在浙江中医药大学附属第二医院骨科门诊就诊的患者中选择7例PMOP患者(骨质疏松组),同时选择7例绝经后骨量正常女性(骨量正常组)作为对照。试验方案经浙江中医药大学附属第二医院医学伦理委员会审查通过。

### 1.2 纳入标准

**1.2.1 骨质疏松组** ①符合原发性骨质疏松症诊断标准<sup>[5]</sup>;②绝经时间 $\geq 12$ 个月;③年龄60~75岁;④自愿参与本研究,签署知情同意书。

**1.2.2 骨量正常组** ①骨量正常;②绝经时间 $\geq 12$ 个月;③年龄60~75岁;④自愿参与本研究,签署知情同意书。

### 1.3 排除标准

**1.3.1 骨质疏松组** ①合并其他影响骨代谢的疾病者;②已行卵巢摘除手术者;③近2年内使用过激素、降钙素或其他影响骨代谢的药物者;④合并可能引起继发性骨质疏松症的疾病者;⑤合并其他严重疾病,可能影响此次试验者。

**1.3.2 骨量正常组** ①合并影响骨代谢或可能引起继发性骨质疏松症的疾病者;②已行卵巢摘除手术者;③近2年内使用过激素、降钙素或其他影响骨代谢的药物者;④合并其他严重疾病,可能影响此次试验者。

## 2 方法

**2.1 样本收集及处理** 待所有受试者入组后,统一在同一天清晨空腹抽取静脉血15 mL。向收集到的血液样品中加入 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素(Sigma-Aldrich公司)调整体积一致,然后加入二硫苏糖醇(Sigma-Aldrich公司)调整样品中尿素浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 $56^\circ\text{C}$ 还原30 min后,加入碘代乙酰胺(Sigma-Aldrich公司)使样品中尿素浓度为 $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,室温避光孵育15 min,再次加入碘代乙酰胺,将样品的尿素浓度稀释至低于 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按1:50的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶(Promega公司), $37^\circ\text{C}$ 酶解过夜。再按照1:100的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶,继续酶解4 h。肽段用高pH反向高效液相色谱分级,按照文献[6]中的方法设置色谱柱。经真空冷冻干燥后进行亲和富集、抽干、除盐操作,真空冷冻抽干后进行高效液相色谱-串联质谱分析。

**2.2 高效液相色谱-串联质谱分析** 流动相A为0.1%甲酸(Sigma-Aldrich公司)和2%乙腈(ThermoFisher Scientific公司)的水溶液;缓冲液B为0.1%甲酸和90%乙腈的水溶液。肽段用液相色谱流动相A溶解后,用EASY-nLC1000超高效液相系统(ThermoFisher Scientific公司)进行分离。肽段分离后进行电离,然后按照文献[6]中的方法,用Orbitrap Fusion质谱仪(ThermoFisher Scientific公司)进行质谱分析。一级质谱扫描范围 $350 \sim 1550 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ ,扫描分辨率60 000;二级

质谱扫描范围固定起点为  $100 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ , 扫描分辨率 15 000。

将二级质谱分析数据导入 MaxQuant (v1. 5. 2. 8) 软件, 进行鉴定和定量。选定骨质疏松组和骨量正常组中差异倍数超过 2.0 的蛋白质进行差异倍数的组间比较 (检验水准  $\alpha = 0.01$ ), 确定目标差异蛋白。

**2.3 生物信息学分析** 对所有定量到的差异蛋白通过 UniProt - GOA 数据库和 InterProScan 软件进行基因功能注释, 通过 Wolf Psort 软件进行亚细胞定位。利用 STRING 数据库构建目标差异蛋白相互作用网络, 根据度和中心度的重要性, 定位出位于关键网络节点的蛋白质。

### 3 结果

**3.1 差异蛋白鉴定及筛选结果** 应用高效液相色谱 - 串联质谱技术共定量检测到 102 个 PMOP 差异蛋白质, 其中 25 个蛋白质位点表达上调、77 个蛋白质位点表达下调。68 个蛋白质两组差异倍数超过 2.0, 其中 19 个蛋白质上的 23 个位点表达上调、49 个蛋白质上的 59 个位点表达下调; 39 个蛋白质两组差异倍数有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

**3.2 生物信息学分析结果** 基因功能注释发现, 差异蛋白主要参与的细胞活动为单一生物过程、细胞代谢过程、细胞生物调节、对刺激和代谢过程的反应, 主要的分子功能为催化活性和结构分子活动。对定量检测到的 102 个差异蛋白质进行亚细胞定位分析发现, 位点表达上调的 25 个差异蛋白全部位于细胞内, 其中 15 个在细胞质内、6 个在细胞核、2 个在细胞质和细胞核、1 个在细胞质膜、1 个在线粒体; 位点表达下调的 77 个差异蛋白中, 19 个在细胞外, 其他均在细胞内, 其中 32 个在细胞质内、8 个在细胞核、7 个在细胞质和细胞核、5 个在细胞质膜、5 个在线粒体、1 个在细胞骨架。

通过 STRING 数据库分析 39 个目标差异蛋白的相互作用关系, 调节最低要求的互动分数为最低 (low confidence 0.15), 发现各目标差异蛋白之间在基因融合、共同表达、文本注释等方面均有不同程度的相互联系和作用; 调节最低要求的互动分数为最高 (highest confidence 0.9), 发现蛋白酶体亚基  $\alpha$  型 - 7 (proteasome subunit alpha type - 7, PSMA7)、蛋白酶体亚基  $\beta$  型 - 7 (proteasome subunit beta type - 7, PSMB7)、蛋白酶体亚基  $\beta$  型 - 3 (proteasome subunit beta type -

3, PSMB3)、蛋白酶体亚基  $\alpha$  型 - 1 (proteasome subunit alpha type - 1, PSMA1)、神经前体细胞表达发育下调因子 8 (neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 8, NEDD8)、DNA 损伤结合蛋白 1 (DNA damage - binding protein 1, DDB1)、RAD23A、UBA52 等蛋白位于相互作用网络节点的中心 (图 1)。PSMA7、PSMA1、PSMB3、PSMB7、NEDD8 都位于细胞质中, 并且都参与了细胞的单一生物过程、细胞生物调节、对刺激的反应、信号传导等细胞活动, UBA52 位于细胞外、DDB1 位于细胞核内、RAD23A 位于线粒体。

### 4 讨论

本试验为了获得更加丰富、全面的血液蛋白组学研究结果, 选用全血作为样本。与人类血清<sup>[7-8]</sup>、外周血单核细胞<sup>[9]</sup>、血浆<sup>[10]</sup>、动物尿液蛋白质<sup>[11]</sup>等样本来源的骨质疏松症蛋白组学研究结果相比, 可以获得数量更加丰富的差异蛋白; 与取人类椎体源性脊髓上清液<sup>[12]</sup>作为蛋白组学研究样本相比, 外周血取材更简单, 且具有可重复性, 并且可以获得同样丰富的差异蛋白。

本研究通过蛋白组学方法分析发现, 在蛋白相互作用网络中处于作用节点中心的蛋白质中, PSMA7、PSMA1、PSMB3、PSMB7、NEDD8 亚细胞分析定位都位于细胞质中, 并且都参与了细胞的单一生物过程、细胞生物调节、对刺激的反应、信号传导等细胞活动, 而 UBA52 位于细胞外、DDB1 位于细胞核内、RAD23A 位于线粒体中。差异蛋白亚细胞定位结果显示, 位点表达上调的蛋白几乎全部在细胞内, 而位点表达下调的蛋白中有 19 个 (25%) 在细胞外, 这提示了位点表达上调和下调的差异蛋白参与的细胞活动可能具有较大差异。在差异蛋白交互作用网络中处于节点中心的部分蛋白质基因已经被证明与骨代谢有关系。如 NEDD8 可以通过泛素系统抑制 Hippo 通路<sup>[13]</sup>, 而 Hippo 通路在骨稳态中有重要调节作用<sup>[14]</sup>; UBA52 被认为可以作为早期糖尿病肾病血清标志物<sup>[15-17]</sup>, 也有研究报道认为它与牙槽的骨吸收有关<sup>[18]</sup>; 有基因组学研究结果显示 PSMA1 与甲状腺的血液循环有关<sup>[19]</sup>, 而甲状腺的分泌功能与骨代谢密切相关。

综上所述, 以全血作为样本采用蛋白质组学方法可筛选出数量丰富的 PMOP 差异蛋白, 其中 PSMA7、PSMB7、PSMB3、PSMA1、NEDD8、DDB1、RAD23A、UBA52 可能是 PMOP 的潜在有效血液标志物。

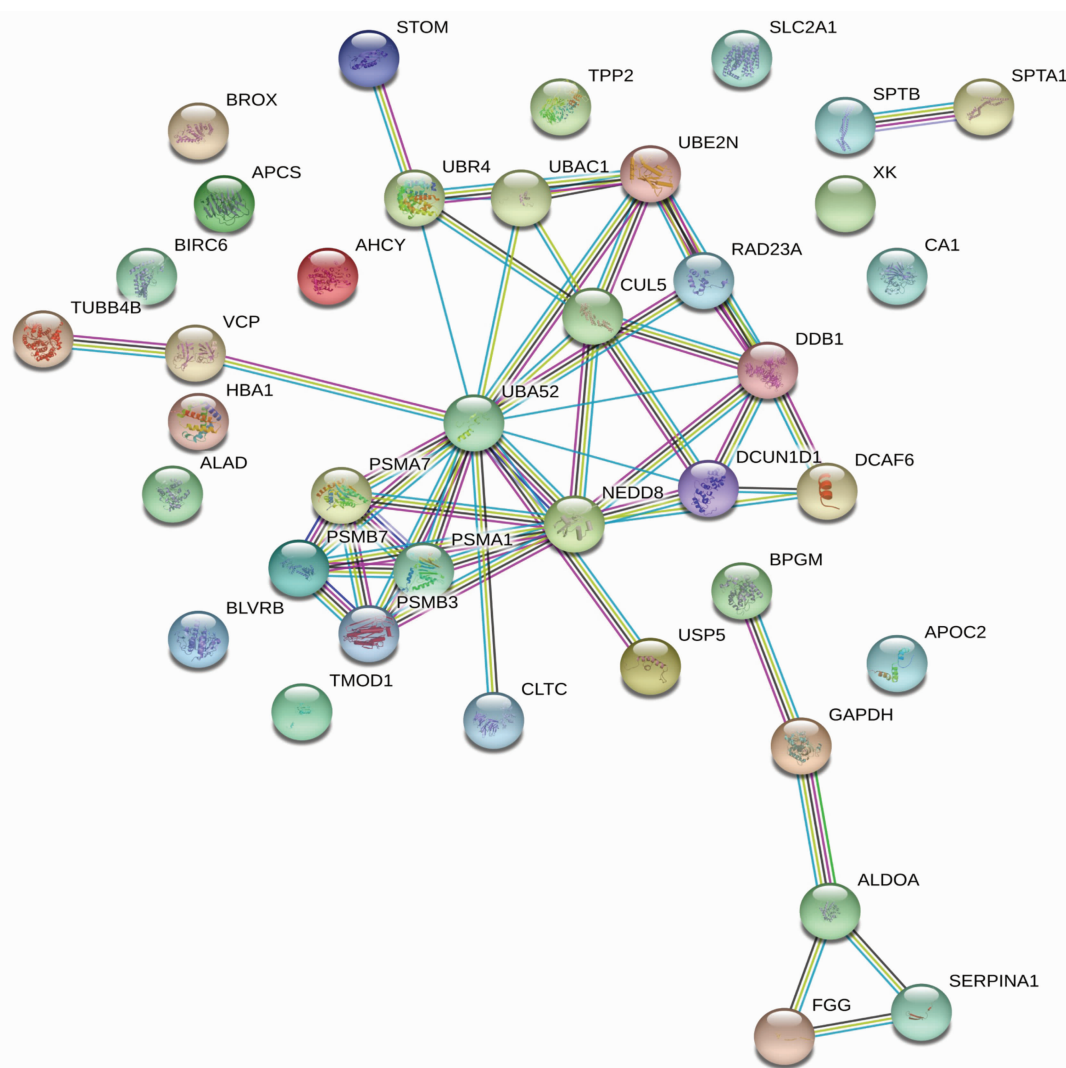


图 1 筛选出的绝经后骨质疏松症 39 个全血目标差异蛋白相互作用网络图

## 5 参考文献

- [1] 欧国峰,刘鑫,董博,等. 绝经后骨质疏松症的免疫学研究进展[J]. 中医正骨, 2016, 28(8): 70-72.
- [2] 刘晨,李兴勇,姚兴璋,等. 绝经后骨质疏松症的流行病学概况及发病机制研究进展[J]. 中医正骨, 2018, 30(3): 52-55.
- [3] SONG C, WANG J, KIM B, et al. Insights into the role of circadian rhythms in bone metabolism: a promising intervention target? [J/OL]. Biomed Res Int, 2018[2019-01-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180976>.
- [4] CANO A, GARCÍA-PÉREZ MÁ. Menopause[M]. Cham: Springer, 1997: 129.
- [5] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10(5): 413-444.
- [6] 蔡丹丹. 硅对镉胁迫欧美杨无性系 1-214 酶活性及蛋白质组的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [7] NIELSON C M, WIEDRICK J, SHEN J, et al. Identification of hip BMD loss and fracture risk markers through Population-Based serum proteomics[J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(7): 1559-1567.
- [8] XIE Y, GAO Y, ZHANG L, et al. Involvement of serum-derived exosomes of elderly patients with bone loss in failure of bone remodeling via alteration of exosomal bone-related proteins[J]. Aging Cell, 2018, 17(3): e12758.
- [9] ZHANG L, LIU Y Z, ZENG Y, et al. Network-based proteomic analysis for postmenopausal osteoporosis in Caucasian females[J]. Proteomics, 2016, 16(1): 12-28.
- [10] QUNDOS U, DROBIN K, MATTSOON C, et al. Affinity proteomics discovers decreased levels of AMFR in plasma from osteoporosis patients[J]. Proteomics Clin Appl, 2016, 10(6): 681-690.
- [11] LIM J, HWANG S. Identification of Osteoporosis-Associated protein biomarkers from ovariectomized rat urine[J]. Curr Proteomics, 2017, 14(2): 130-137.
- [12] ZHOU Q, XIE F, ZHOU B, et al. Differentially expressed

- proteins identified by TMT proteomics analysis in bone marrow microenvironment of osteoporotic patients[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(5):1089-1098.
- [13] ZOU J, MA W, LI J, et al. Neddylation mediates ventricular chamber maturation through repression of Hippo signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(17):E4101-E4110.
- [14] YANG W, HAN W, QIN A, et al. The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(6):4606-4617.
- [15] SUN L, PAN X, WADA J, et al. Isolation and functional analysis of mouse Uba52 gene and its relevance to diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33):29953-29962.
- [16] 张艳, 任荣, 张蕾. 早期糖尿病肾病患者血糖、肾小球率过滤、NAG 酶与尿 UBA52 的关系研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(7):887-890.
- [17] 杨旭升, 张蕾. 泛素-核糖体融合蛋白 52——糖尿病肾病的早期生物标志物[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2014, 23(2):176-178.
- [18] ABBASZADEH H A, PEYVANDI A A, SADEGHI Y, et al. Er:YAG laser and cyclosporin a effect on cell cycle regulation of human gingival fibroblast cells[J]. J Lasers Med Sci, 2017, 8(3):143-149.
- [19] BUDNY B, SZCZEPANEK - PARULSKA E, ZEMOJTEL T, et al. Mutations in proteasome-related genes are associated with thyroid hemiagenesis[J]. Endocrine, 2017, 56(2):279-285.
- (收稿日期:2019-04-06 本文编辑:李晓乐)

## · 通 知 ·

# 中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第十二届学术年会暨第四届专业委员会换届会议通知(第一轮)

各位中西医脊柱外科医学界同仁:

为了进一步推动我国中西医结合脊柱医学的发展,由中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会主办,甘肃省中医院和甘肃省陇中正骨医院承办,中日友好医院和中国中医科学院望京医院协办的中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第十二届学术年会暨第四届专业委员会换届会议定于 2019 年 10 月 18—20 日在兰州召开。

在此,中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会和第十二届学术年会筹备委员会,诚挚地邀请广大致力于中西医脊柱外科的同道,热心支持和参与我们自己的学术活动,共享这场精彩纷呈的学术盛宴,交流经验,增进友谊,共同推进中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会的学术事业发展,造福人民群众的脊柱健康!

本次会议还将同期举办国家级继续教育项目“脊柱脊髓复合创伤新进展学习班”(项目编号:T20192820008),参会者将授予国家 I 类继续教育项目 10 学分。

期待与您相聚在美丽的金城兰州!

## 大会征文

**征文内容:**①中西医结合脊柱相关疾病及上颈椎伤病的基础和临床研究;②脊柱脊髓损伤的康复和功能重建、脊柱微创及非融合新技术、椎间盘源性疾病的非手术诊疗手段;③脊柱外科常见并发症及处理;④脊柱外科中西医诊疗技术及其对比研究(脊柱骨折的手术与非手术治疗、脊柱感染中西医诊疗等);⑤脊柱相关疾病预防与康复科普。

**征文要求:**①论文必须具有科学性、先进性和实用性,论点明确,论据充分;②论文要求 500 字左右摘要,包括研究目的、方法、结果及结论;③论文请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮编、手机、工作电话及 E-mail 地址。

**截稿日期:**2019 年 9 月 1 日。

**投稿方式:**在线邮件投稿,邮件主题格式:【大会投稿】姓名+单位+题目,投稿至大会会务组邮箱:longz\_spine@163.com

## 联系方式

**大会秘书长:**张彦军(13893295828),叶丙霖(13619327728)

**大会秘书:**郭铁峰,王鹏,朱宝,李军杰

中国中西医结合学会

脊柱医学专业委员会

2019 年 5 月 27 日