

膝关节骨关节炎患者与正常人群的血清差异表达蛋白

陈瑞强, 曾春, 王昆, 谢沛根, 戎利民, 徐义春, 蔡道章*

(中山大学附属第三医院骨科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】用蛋白组学方法,通过对膝关节骨关节炎患者及正常人群血清蛋白的比较,寻找差异表达蛋白并探讨其与骨关节炎致病机理的关系。【方法】选取2007年10月到12月10例在中山大学附属第三医院骨科住院治疗的膝关节骨关节炎患者为实验组;10名性别相同,年龄、身体质量指数值相约的健康志愿者为对照组,分析2组双向电泳结果,并对差异表达蛋白进行质谱鉴定。【结果】通过双向电泳图谱比较发现7个差异表达蛋白,其中6个在关节炎组中呈低表达,1个呈高表达。经质谱鉴定分别为:6个低表达蛋白分别为对氧磷酶1、对氧磷酶3、 α -1-微球蛋白/bikunin前体蛋白、载脂蛋白M、免疫球蛋白轻链、四连接素,高表达蛋白为载脂蛋白L1。【结论】膝关节骨关节炎血清表达差异蛋白:对氧磷酶1、对氧磷酶3、 α -1-微球蛋白/bikunin前体蛋白、载脂蛋白M、免疫球蛋白轻链、四连接素、载脂蛋白L1可能与骨关节炎的发病或病情进展具有一定的相关性。

关键词: 骨关节炎; 膝关节; 蛋白质组

中图分类号: R6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)03-0308-05

Differentially Expressed Serum Proteins in Knee Osteoarthritis Patients Compared with Normal Subjects

CHEN Rui-qiang, ZENG Chun, WANG Kun, XIE Pei-gen, RONG Li-min, XU Yi-chun, CAI Dao-zhang*

(Department of Orthopedics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To seek the differentially expressed proteins in the serum of the patients with knee osteoarthritis compared with normal subjects in control groups by proteomic analysis and to discuss the pathogenesis of osteoarthritis. 【Methods】 Ten patients with knee osteoarthritis, who hospitalized at the Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University from October to December 2007, were selected as the experimental group. Ten normal volunteers with matched gender, similar age, and body mass index (BMI) value were selected as the control group. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) patterns of human sera from the 2 groups were analyzed. The differentially expressed spots were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). 【Results】 Seven expression of proteins on dielectrophoretogram were detected to be of significant difference between the two groups. The 6 down-regulated spots were identified as paraoxonase 1 (PON1), paraoxonase 3 (PON3), Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBP), apolipoprotein M (APOM), immunoglobulin light chain (IgL), and tetranectin (TNA). The up-regulated spot was apolipoprotein-L1. 【Conclusion】 These results imply that serum PON1, PON3, AMBP, APOM, IgL, TNA and APOL1 may be relative to the pathogenesis or progression of osteoarthritis.

Key words: osteoarthritis; knee; proteomics

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3):308-312]

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)指由多种因素引起关节软骨纤维化、皴裂、溃疡、脱失而导致的

关节疾病。病因尚不明确,其发生与年龄、肥胖、炎症、创伤及遗传因素等有关^[1,2]。蛋白质组学技术

收稿日期: 2008-11-30

基金项目: 国家 863 项目(2008AA02Z437); 中山大学青年教师基金(3171915)

作者简介: 陈瑞强, 硕士, 主治医师, 研究方向: 骨与关节疾病、损伤, E-mail: reachon@163.com; * 通讯作者, 蔡道章, E-mail: dao Zhang@medmail.com.cn

作为一项强大的工具可望为研究 OA 的发病机制提供更详细的信息。因此,本研究应用蛋白质组技术寻找骨关节炎患者和正常人的血清差异蛋白,希望所发现的差异蛋白能为解析 OA 的致病机制有所帮助,并进而发现 OA 的生物标志物以及提供该疾病靶向治疗的位点。

1 材料与方法

1.1 病例资料

10 名符合诊断标准^[1-3]的膝关节 OA 患者(1 名男性和 9 名女性,平均年龄 60.6 ($S = 7.4$), BMI 25.8($S = 4.4$))和 10 名正常志愿者[1 名男性和 9 名女性,平均年龄 55.3($S = 4.5$)岁, BMI 25.5 ($S = 3.5$)]分别组成病例组与对照组,两组性别相匹配,年龄、BMI 相当以减少混杂因素。本实验符合相关卫生部门的伦理委员会的原则。严格执行赫尔辛基宣言的相关规定,征得知情同意。

1.2 实验方法

对所有研究对象收集静脉血,在每个样本上加入蛋白酶抑制剂,然后分离血清样本保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。将 $30\text{ }\mu\text{L}$ 血清样本放入 1 mL 的离心管里面,根据 ProteoPrep Blue Albumin & IgG Depletion Kit (SIGMA)试剂盒和 2-D clean up kit (Amersham Biosciences)试剂盒的说明分别用于清除样本中的白蛋白与球蛋白和盐与脂。然后利用牛血清作为标准运用 Bradford 法测定浓度。按照 Görg 等^[4]方法和 Bio-Rad 仪器操作手册进行双向电泳。第一相等电聚焦(IEF),血清的上样量总体积为 0.35 mL , (含总蛋白质 0.3 mg)。 50 V 重泡胀 12 h 后进行等电聚焦,依次经过 $150\text{ V } 1\text{ h}$ 、 $500\text{ V } 3\text{ h}$ 、 $1\text{ }000\text{ V } 1\text{ h}$ 、 $5\text{ }000\text{ V } 1\text{ h}$ 、 $7\text{ }000\text{ V } 2\text{ h}$ 、 $10\text{ }000\text{ V}$ 至总电压积为 $50\text{ }000\text{ Vh}$ 。等电聚焦结束后,迅速取出 IPG 胶条,分别置于平衡液 A (6 mmol/L Urea , $2\% \text{ SDS}$, $50\text{ mmol/L Tris-HCL pH } 8.8$, $30\% \text{ 甘油}$, $2\% \text{ DTT}$)、平衡液 B (6 mmol/L Urea , $2\% \text{ SDS}$, $50\text{ mmol/L Tris-HCL pH } 8.8$, $30\% \text{ 甘油}$, $2.5\% \text{ 碘乙酰胺}$)中各平衡 15 min 。将平衡好的胶条转入 protean xi cell 垂直电泳槽中进行第二向电泳,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12% ,电泳条件为:每胶 3 W 电泳 30 min ,然后每胶 7 W 恒功率,直至溴酚蓝指示线到达凝胶底部停止电泳,对凝胶进行银染。凝胶通过 Image Scanner 透射扫描

仪及 Labscan 扫描软件进行扫描获取图像,软件找出差异点后沿边缘切取凝胶上的差异蛋白质点(表达量差异在 3 倍以上),置于 1.5 mL EP 管内。 $50\% \text{ 乙腈}$ 和 50 mmol/L 碳酸氢铵脱色 20 min ,乙腈脱水,冷冻抽干。加入 $5\sim 10\text{ }\mu\text{L}$ TPCK 处理的胰蛋白酶 ($12.5\text{ ng}/\mu\text{L}$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中约 30 min ,取出后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中酶解过夜。加入 $50\% \text{ 乙腈}$ 和 $0.1\% \text{ TFA}$ 混合液 $60\text{ }\mu\text{L}$, 轻微振荡萃取 $30\sim 40\text{ min}$ 后,将溶液转移到新的 96 孔板内,重复 3 次。将肽段溶液在 N_2 流下吹干浓缩,然后将完全干燥的肽段重新溶解于 $0.7\text{ }\mu\text{L}$ CHCA 溶液 (0.5 g/L , 由 $0.1\% \text{ TFA}$ 和 $50\% \text{ CAN}$ 配制)中,并将其全部点到不锈钢 MALDI 靶板上并分析。MALDI-TOF-MS 分析采用反射模式,正离子谱测定,激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加速电压为 20 kV 。仪器先用 myoglobin 酶解肽段进行外标校正。基质和样品的 PMF 质量扫描范围为 $700\sim 3\text{ }500\text{ u}$ 。然后直接选择与对照基质的 PMF 图有差异的肽段离子进行 MS/MS 分析。所有实验样品的质谱图均用默认模式获得。利用软件 Mascot distiller 过滤基线峰、识别信号峰。利用 Matrixscience 公司的 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库 (<http://www.matrixscience.com>),寻找匹配的相关蛋白质,同时查询其功能,来明确鉴定的蛋白质为何种蛋白质。

1.3 统计学方法

正态分布计量资料采用均数 \pm 标准差描述。电泳图分析利用 ImageMaster 2D Elite 5.0 分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配。所有数据的统计分析在 SPSS 15.0 软件上进行。

2 结果

2.1 差异表达蛋白查找

在实验组与对照组中蛋白点数量分别为 (950 ± 50)和 (920 ± 50)。大部分点均集中在分子质量 10 到 120 ku 及等电点 $\text{I}4$ 到 7 之间。各双向电泳图蛋白分布样式相似,匹配性好。在所用的膝关节 OA 病例组出线的上调或下调大于 3 倍的蛋白点共 7 个,如图 1 及表 1 所示。

2.2 差异表达蛋白鉴定结果

经过质谱鉴定,7 个差异表达蛋白的可能身份如表 2 所示。如蛋白点具有越高的分数 (≥ 58 认为差异显著),结果的可靠性则更高。

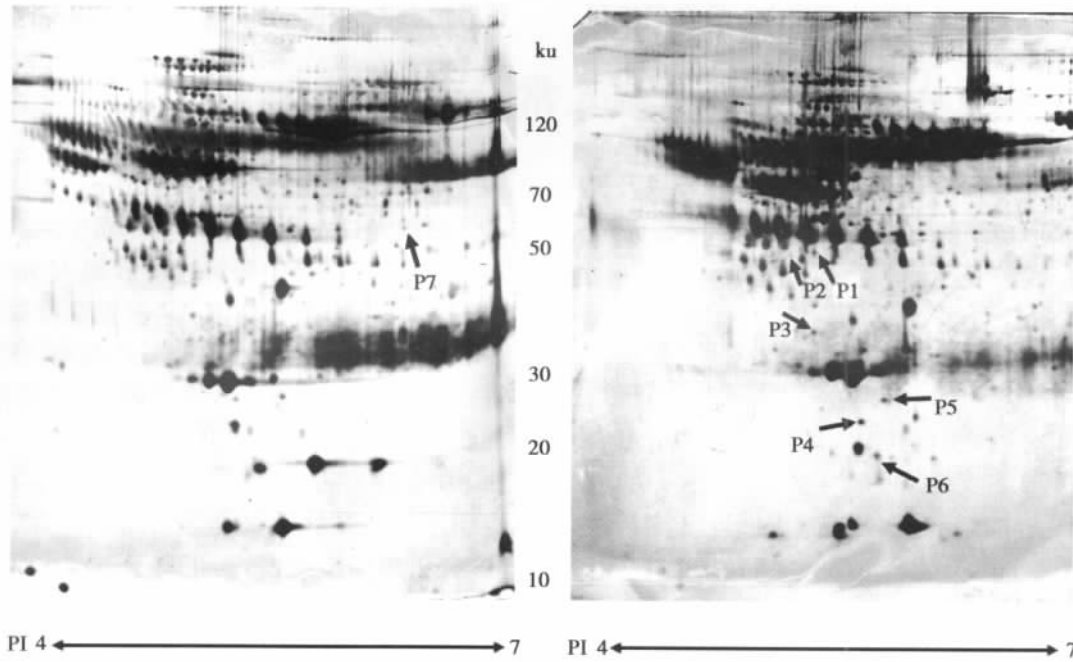


图 1 膝关节 OA 患者与正常对照血清蛋白电泳图

Fig.1 Human serum proteins separated on 2-DE gels from a OA patient and a normal subject

A; from one of the OA patients; B; from one of the normal control subjects; Arrows showed 7 distinctly expressed protein spots; PI stands for equipotential point.

表 1 骨关节炎差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in AO group

Spot No.	PI	MM	Volume difference (fold)
P1	5.08	39724.2	↓ 9.06
P2	5.24	39582.3	↓ N1
P3	5.95	38974.0	↓ N1
P4	7.66	13042.4	↓ 20.7
P5	6.27	14669.1	↓ N1
P6	5.52	22552.3	↓ 3.52
P7	5.84	43900.0	↑ N2

PI: equipotential point; MM: molecular mass; ↓: increase in expression; ↑: decrease in expression; N1: no expression detected in AO group; N2: no expression detected in control group

表 2 7 个血清差异表达蛋白 Mascot 检索结果

Table 2 Mascot search results of 7 differentially expressed proteins

Spot No.	Protein score	Accession NO.	Protein name
P1	145	218732	PON1
P2	90	299778	PON3
P3	117	22426	AMBP
P4	210	645213	Apolipoprotein M
P5	207	796167	IgL
P6	307	9028	Tetranectin
P7	234	514475	Apolipoprotein L1

二乙基对硝基苯基酯(paraoxon)的作用。已有研究表明,在肝细胞系 HepG2 中加入氧化的低密度脂蛋白,氧化的脂质体,白细胞介素(interleukin, IL) IL-1β, 肿瘤坏死因子α (tumor necrosis factor α, TNF-α)中的任一种进行孵育,均能降低 PON1 基因的表达[5]。而 IL-1β、TNF-α 均在关节的炎症反应中起重要作用[6],在类风湿性关节炎的患者的血清中,PON1 的活性也明显下降[7]。就目前所查及的资料而言,PON1 的活性在氧化压力(oxidative stress)升高的情况下均下降[8]。另一方面,氧化压力能导致软骨细胞内端粒的不稳定,使软骨细胞

3 讨论

OA的致病可能有多种因素参与,目前的研究表明 OA 的致病是多种生化因素参与的复杂的网络状的病理变化过程,本研究不拘束于任何一种致病假说,通过蛋白组学的方法以希望发现参与其致病机制中的重要的蛋白质成分。

对氧磷酶 1(PON1)具有水解对氧磷,即磷酸

合成粘多糖的功能下降^[9],在OA的致病和进展中起重要的作用。本研究中PON1在OA患者中的表达下调可能与关节的炎症及氧化压力升高有关。

对氧磷酶3(PON3)具有与PON1的类似抗氧化特性,Draganov的研究发现,兔子的PON3纯化血清可以抑制体外的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)的铜介导氧化^[10]。本实验结果显示OA患者血清PON1、PON3表达下降,这种现象说明三种可能:①在OA病程中,可能存在以上两种蛋白的过度消耗;②以上两种蛋白的表达下调,导致OA关节微环境中氧化压力的升高,从而加速OA的致病和进展;③以上2种蛋白表达下调与OA没有直接联系。要阐明OA与PON1、PON3的确切联系,尚需进一步研究。

α -1-微球蛋白/bikunin前体蛋白(AMBP)是 α -1-微球蛋白及bikunin(即Inter-alpha-trypsin inhibitor light chain(ITI-LC))的蛋白前体。可抑制多种丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、粒细胞弹性蛋白酶和纤溶酶等;还可通过抑制脂多糖诱导的细胞因子合成发挥抗炎作用^[11]。在OA病变过程中,软骨细胞外基质的合成与分解失去平衡,基本结构遭到破坏,其中I型胶原和蛋白多糖的破坏最为显著。所以,本实验发现OA患者血清AMBP的低表达有可能与OA致病机制中的炎症反应有密切的关系。

人类载脂蛋白M(APOM)最初于1999年由Xu和Dahlbäck在乳糜颗粒中分离出来^[12]。通过免疫组化染色及原位APOM的mRNA杂交的方法均说明APOM由肝实质细胞肾小管上皮细胞分泌。因为APOM基因位于6号染色体组织相容性复合体III区域^[13],大多数在该区域的基因均与免疫反应有关。APOM基因位点与TNF- α 和淋巴细胞毒素基因位点非常接近^[12],因此APOM可能与免疫系统相关,或者受一些细胞因子和炎症因子调控。目前,已有学者提出APOM具有抗炎功能的假说^[14]。Kenneth^[15]的研究发现,在感染和炎症反应中,APOM表达减少,与本研究中OA患者APOM表达下调的结果相类似。

免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)是指具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白。Ig的基本结构是四条肽链的对称结构,包括两条相同的重链(heavy chain)及两条相同的轻链(light chain)。Samuels^[16]发现一定数量的类风湿性关节炎患者的

异常的IgL目录显现出受损的二次重组的调控。这表明,在类风湿性关节炎患者中,作为确保B细胞容许的机制之一的受体调控,往往可能有缺陷。目前已有研究^[17]支持免疫系统可能参与OA的致病机制,本实验结果提示血清IgL水平下降,究其原因可能与免疫应答有关,但具体的意义则尚不清楚。

四连接素(TNA)于1986年首先被Clemmensen^[18]所描述。已有研究说明TNA存在于软骨及发育和再生中的肌肉的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)中,由此提示TNA修复重建的生理学作用^[19]。TNA的血浆浓度下降可见于类风湿性关节炎及肿瘤患者^[20-21]。Valdes^[22]的研究发现,膝关节OA患者关节软骨及滑液中的TNA表达上调,并发现TNA的上调与OA病情的进展相关。Hogdall^[21]认为:在炎症反应增强的情况下,TNA在血液循环中的清除加快及在病变局部ECM中的沉积增加。本研究中膝关节OA患者血清TNA降低,但这与OA病情的相关性有待进一步研究。

载脂蛋白L1(APOL1)于1997年以一种人类的高密度脂蛋白被描述^[23]。Horrevoets的研究提示ApoL蛋白特征地表达于动脉粥样硬化患者的髂动脉和腹主动脉的内皮细胞,且对肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor-alpha,TNF- α)水平变化敏感^[24]。已有大量研究表明,TNF- α 在OA病理变化中的重要作用^[6]。Okabe的研究^[25]表明,APOL1 Messenger Ribonucleic Acids(mRNAs)在对照组(创伤性关节炎)及部分OA样本中的表达较OA其他样本减弱,进而认为APOL1在OA的致病机制中起重要作用。本研究结果显示OA患者APOL1表达而对照组不表达,与Okabe的研究结果有相互参考及补充的意义。

本实验结果提示APOL1、APOM、TNA、IgL、PON1、PON3七种蛋白在OA患者及正常人群血清中差异表达,这种差异可能与OA致病机制中的炎症过程及细胞外基质代谢异常相关,但其具体意义及具体作用途径尚需进一步研究以阐明。

参考文献:

- [1] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版)[J]. 中华骨科杂志,2007,27(10):793-796.
- [2] 张凤山,孙 铀. 骨性关节炎的诊断及防治进展[J]. 新医学,2002,33(9):526-527.

- [3] Altman R, Asch E, Bloch D, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee [J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(8):1039-1049.
- [4] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6):1037-1053.
- [5] Van Lenten B J, Wagner A C, Navab M, et al. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(3):1923-1929.
- [6] Rachakonda PS, Rai MF, Schmidt MF. Application of inflammation-responsive promoter for an in vitro arthritis model [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7):2088-2097.
- [7] Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis [J]. *Life Sci*, 2003, 72(25):2877-2885.
- [8] Selek S, Cosar N, Kocyigit A, et al. PON1 activity and total oxidant status in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(3):140-144.
- [9] Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, et al. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(2):R380-391.
- [10] Draganov D, Stetson P, Watson C, et al. Rabbit serum paraoxonase3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43):33435-33442.
- [11] Kobayashi H. Endogenous anti-inflammatory substances, inter-alpha-inhibitor and bikunin [J]. *Biol Chem*, 2006, 387(12):1545-1549.
- [12] Xu N, Dahlbäck B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44):31286-1290.
- [13] Luo G, Zhang X, Nilsson-Ehle, et al. Apolipoprotein M [J/OL]. *Lipids in Health and Disease*, 2004; 3:21 [2004-10-04]. <http://www.lipidworld.com/content/3/1/21>
- [14] Huang XS, Zhao SP, Hu M, et al. Apolipoprotein M likely extends its anti-atherogenesis via anti-inflammation [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(1):136-140.
- [15] Feingold KR, Shigenaga JK, Chui LG, et al. Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 199(1):19-26.
- [16] Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, et al. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(10):1659-1667.
- [17] Da RR, Qin Y, Baeten D, et al. B cell clonal expansion and somatic hypermutation of Ig variable heavy chain genes in the synovial membrane of patients with osteoarthritis [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1):557-565.
- [18] Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C. Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin [J]. *Eur J Biochem*, 1986, 156(2):327-333.
- [19] Wewer UM, Iba K, Durkin ME, et al. Tetranectin is a novel marker for myogenesis during embryonic development, muscle regeneration, and muscle cell differentiation in vitro [J]. *Dev Biol*, 1998, 200(2):247-259.
- [20] Kamper EF, Kopeikina LT, Koutsoukos V, et al. Plasma tetranectin levels and disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 1997, 24(2):262-268.
- [21] Høgdall CK, Høgdall EV, Hørding U, et al. Plasma tetranectin and ovarian neoplasms [J]. *Gynecol Oncol*, 1991, 43(2):103-107.
- [22] Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, et al. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(8):2497-2507.
- [23] Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, et al. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L [J]. *Biol Chem*, 1997, 272(41):25576-25582.
- [24] Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, et al. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes [J]. *Blood*, 1999, 93(10):3418-3431.
- [25] Okabe T, Ohmori Y, Tanigami A, et al. Detection of gene expression in synovium of patients with osteoarthritis using a random sequencing method [J]. *Acta Orthop*, 2007, 78(5):687-692.

(编辑 刘清海)