

腰椎间盘突出症的血清蛋白质组学研究

谢沛根, 蔡道章*, 戎利民, 董健文, 刘斌, 曾春, 陈瑞强
(中山大学附属第三医院骨科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】找出有坐骨神经痛的腰椎间盘突出症患者血清蛋白质组最明显的改变,揭示椎间盘突出可能的病理机制。【方法】选择有坐骨神经痛的腰椎间盘突出症患者10例作为病例组,志愿者10例作为对照组,取血,提取分离纯化血清蛋白,双向电泳,找到表达上差异最明显蛋白质,进行质谱鉴定。所得差异蛋白应用酶联免疫吸附试验对另外10例腰椎间盘突出症患者及10例正常人血清表达浓度进行检测。【结果】在双向电泳图谱上有6个蛋白质的表达在两组间存在明显差异。其中载脂蛋白L1以及两个白蛋白前体表达升高,载脂蛋白M、四连接素、免疫球蛋白轻链表达降低,酶联免疫吸附试验证实6种蛋白中的4种在血清里高表达,并与正常人存在差异。【结论】实验结果提示载脂蛋白L1、载脂蛋白M、四连接素、免疫球蛋白轻链的血清学水平可能作为腰椎间盘突出症的生物标志物,并可能进一步揭示腰椎间盘突出症的发病机制。

关键词: 腰椎间盘突出症; 蛋白质组; 载脂蛋白L1; 四连接素; 载脂蛋白M

中图分类号: R6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)03-0313-05

Comparative Analysis of Serum Proteomes of Lumbar Intervertebral Disc Herniation

XIE Pei-gen, CAI Dao-zhang*, RONG Li-min, DONG Jian-wen, LIU Bin, ZENG Chun, CHEN Rui-qiang
(Department of Orthopedics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To use proteomic analysis of blood samples to establish if there are serum proteins associated with lumbar intervertebral disc herniation (LDH), which in addition, would elucidate the pathogenesis of LDH. 【Methods】 Ten LDH patients with sciatica were selected as the experimental group. Two ml of blood was drawn from each of the 10 patients in the experimental group as well as from 10 normal volunteers which constituted the control group. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) of the blood samples was conducted, distinct protein spots were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and six proteins associated with intervertebral disc herniation were detected. An enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) was developed to screen for these LDH proteins, and was tested on the serum of a second test group of ten patients with LDH, and a second control group of 10 normal subjects. 【Results】 The expression of 6 proteins on the dielectrophoretogram was found to be of significant association to the patients with LDH. The identities of these LDH up-regulated proteins were: up-regulated apolipoprotein-L1 and two types of serum albumin precursor, and down-regulated apolipoprotein M, tetranectin, and immunoglobulin light chain (IGL). Further ELISA confirmed that there were increased serum levels of 4 out of the 6 proteins in the patients with sciatica due to LDH, which were of statistical difference compared with those of normal subjects. 【Conclusion】 These results imply that serum APO-L1, tetranectin, APO-M, and IGL maybe serve as biomarkers for LDH, which would elucidate the pathogenesis of LDH.

Key words: LDH; proteomics; APO-L1; tetranectin; APO-M

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3):313-317]

腰椎间盘突出症是一种引起下腰痛和坐骨神经痛的常见骨科疾病。许多研究发现由腰椎间盘突出症引起的神经根性疼痛机制包括机械压迫和

化学炎症因子^[1]。然而,神经根性坐骨神经痛的具体机制仍然是临床上的难题。国内外从细胞因子上及遗传学上对腰椎间盘突出症机制的研究非常

收稿日期: 2009-03-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B34001003); 广东省科技计划项目(2008B030301129)

作者简介: 谢沛根, 博士生, 住院医师, E-mail: xiepeigen@21cn.com; * 通讯作者, 蔡道章, 教授, 博士生导师, E-mail: dao Zhang@medmail.com.cn

com.cn

多,目前主要认为退变是由于椎间盘物理因素改变引起一系列生物学反应,从而引起髓核细胞凋亡,引起多因子功能改变而引起一系列表现。国内外研究椎间盘退变多数从一两个基因或者细胞因子着手,而椎间盘退变即是多因素协同作用的结果,因此,至今椎间盘组织发生退变的详细机制目前尚不十分明了^[2]。蛋白质组学的产生,使人们能直接从蛋白质表达水平上揭示细胞、组织的表达丰度及其功能,克服了以往在DNA或RNA水平研究基因表达的缺陷——基因表达与DNA或RNA改变的不对应性,进而能够在细胞和生命有机体的整体水平阐明生命的本质和疾病形成的机制。在本研究应用蛋白质组技术寻找椎间盘突出患者和正常人的血清差异蛋白,并应用酶联免疫吸附试验对差异表达进行进一步验证。笔者希望所证实的差异蛋白能作为腰椎间盘突出症的生物标志物以及成为该疾病靶向治疗的位点。

1 材料与方法

1.1 腰椎间盘突出症的诊断标准

包括所有具有坐骨神经痛的症状和体征的患者都纳入该诊断标准。所有患者均有下腰痛并严重的下肢疼痛,直腿抬高试验阳性。另外,核磁共振显示相应节段腰椎间盘突出。分别由两名骨科医生根据影像学 and 体格检查做出临床诊断,并用术中加以证实。所有患者已排除肝肾疾病。

1.2 研究对象

总共10例腰椎间盘突出症患者(5例男性和5例女性),平均年龄28($S=2$)岁,均未行任何外科治疗及无疾病相关危险因素,10例正常志愿者(5例男性和5例女性),平均年龄25($S=3$)岁。另外10例腰椎间盘突出症患者(5例男性和5例女性),平均年龄26($S=2$)岁和10例正常志愿者(5例男性和5例女性),平均年龄30($S=3$)岁,被用于酶联免疫吸附试验。

1.3 血清样本

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。为了尽量减少个体差异,病例组与对照组的年龄、性别在蛋白质组研究中相互匹配。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,并且已征得所

有人组人员的同意。

30 μL 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,下一步进行双向电泳。

1.4 双向电泳

主要按照Görg等^[3]方法和Bio-Rad仪器操作手册进行。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 V 1 h、500 V 3 h、1 000 V 1 h、5 000 V 1 h、7 000 V 2 h、10 000 V至总电压积为50 000 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, 20 g/L SDS, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 体积百分数为30%甘油,20 g/L DTT)、平衡液B(6 mmol/L Urea, 20 g/L SDS, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 30%甘油, 25 g/L 碘乙酰胺)中各平衡15 min。将平衡好的胶条转入protean II 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120 g/L,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。随后对凝胶进行银染。

1.5 凝胶图像分析

凝胶通过Image Scanner II透射扫描仪及Labsan扫描软件进行扫描获取图像,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SPSS15.0软件上进行。

1.6 MALDI-TOF-TOF-MS质谱分析

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%乙腈和50 mmol/L碳酸氢铵脱色20 min,乙腈脱水,冷冻抽干。加入5~10 μL TPCK处理的胰蛋白酶(12.5 ng/ μL),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中约30 min,取出后在37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中酶解过夜。加入体积百分数为50%乙腈和1 g/L TFA混合液60 μL ,轻微振荡萃取30~40 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 μL CHCA溶液(0.5 g/L,由1 g/L TFA和体积百分数为50% 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 ~ 3 500 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。

1.7 数据库检索

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。查询条件:物种来源选择 human,肽质量控制在 800 ~ 4 000 u;PI 值范围:4 ~ 7;肽片段分子量最大容许误差控制在 ± 0.5 u;离子选择 MH⁺和 monoisotopic;最小匹配肽片段数规定为 4;固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化 (Carbamidomethyl), 可变修饰为蛋氨酸氧化 (Oxidation)。

1.8 酶联免疫吸附试验

另外 10 例腰椎间盘突出患者和 10 例正常人利用酶联免疫吸附试验测定所得出蛋白的血清学水平,实验方法依照试剂说明使用。

2 结果

10 名患者和 10 名正常对照的血清样本经过双向电泳分析及银染后得到蛋白电泳图谱。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 10 到 120 ku 及 PI 4 ~ 7。各双向电泳图蛋白分布样式相似,匹配性好。在所用的腰椎间盘突出病例组出线的上调或下调大于 3 倍的蛋白点均予以苯甲基磺酰氟化物处理,通过质谱分析及蛋白数据库检索确认蛋白。若蛋白点具有较高的分数及较高次序的覆盖,那结果的可靠性就更高。最后,我们鉴定出 6 个蛋白,所有 6 个蛋白在患者与正常组双向电泳凝胶上均为显著地连贯地表达 (图 1)。这些点经过消化及分析,结果如表 1 所示。

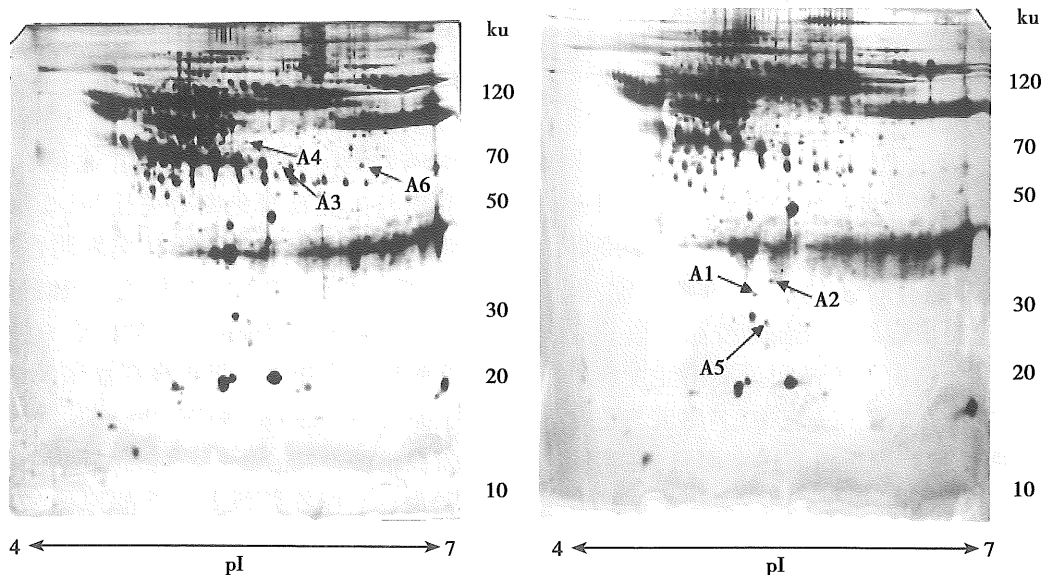


图 1 腰椎间盘突出患者与正常对照血清蛋白电泳图

Fig.1 Human serum proteins separated on 2-DE gels

A: LDH patient; B: normal control. Total protein (300 μ g) was loaded on the IPG strip (pH 4-7, non-linear) for IEF and separated in the second dimension. The spots were silver-stained. Arrow showed 6 distinctly expressed protein spots.

载脂蛋白 L1 在椎间盘患者血清表达而正常组不表达,载脂蛋白 M、四连接素及免疫球蛋白轻链在腰椎间盘突出患者血清比正常人血清分别降低 $(22 \pm 3)\%$ ($P < 0.01$), $(37 \pm 5)\%$ ($P < 0.01$),

$(27 \pm 3)\%$ ($P < 0.01$)。

在另外一组患者与正常人中前面所说的 4 种蛋白的平均浓度通过酶联免疫吸附试验得到确认,载脂蛋白 M、四连接素及免疫球蛋白轻链在腰

表 1 腰椎间盘突出症患者差异表达蛋白质质谱鉴定及检索结果

Table 1 MALDI-TOF-MS analysis of differentially expressed proteins in LDH and normal controls

Spot No.	Accession NO.	Protein name	<i>m/u</i>	PI	Protein Score	OD intensity in LDH
A1	645213	Apolipoprotein M	13 042.4	7.66	210	Decreased
A2	796167	IGL	14 669.1	6.27	207	Decreased
A3	384697	Serum albumin precursor	47 329.7	5.97	371	Increased
A4	745872	Serum albumin precursor	69 321.5	5.92	107	Increased
A5	9028	Tetranectin	22 552.3	5.52	307	Decreased
A6	514475	Apolipoprotein L1	43 900	5.84	234	Increased

PI: equipotential point; *m*: molecular mass

椎间盘突出症患者血清浓度比正常人均降低($P < 0.05$),相反,载脂蛋白 L1 在腰椎间盘突出症患者血清浓度比正常人显著升高($P < 0.01$,表 2)。

表 2 腰椎间盘突出症患者与正常对照组的四种蛋白酶联免疫吸附试验结果

Table 2 ELISA result of the four proteins in LDH and normal control ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

Group	Apol-1	TN	APOM	IGL
Patient	$3.47 \pm 0.11^{1)}$	$5.69 \pm 0.08^{2)}$	$0.25 \pm 0.04^{2)}$	$1.82 \pm 0.03^{2)}$
Control	None	10.25 ± 0.07	0.92 ± 0.05	6.59 ± 0.07

1) compared with control group, $P < 0.01$; 2) compared with control group, $P < 0.05$

3 讨论

因为蛋白质组的可重复性、准确性及高通量等特点,被广泛应用于对于肿瘤^[4]、炎症、免疫等领域。尽管蛋白质组有效应用于各种实验研究,但是用于腰椎间盘突出症的研究只是开始阶段。应用蛋白质组技术分离出与腰椎间盘突出症发病机制可能相关的生物标志蛋白。在 10 名患者与正常人血清中,发现 6 种差异蛋白表达。而且,在实验中与对照组中 6 种蛋白中的 4 种在血清学水平有差异且有统计学意义。

载脂蛋白 L (apolipoprotein-L, ApoL) 是一种 383 位氨基酸残基蛋白,与目前已知的其他结构无明显的同源性,只有在胰腺发现该蛋白。在血浆中没有检测出有游离的 ApoL,而主要与载脂蛋白 A1 复合体脂蛋白结合。1999 年 CG12_1 的克隆揭示了 ApoL 蛋白可能存在,它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- α , TNF- α) 水平变化敏感^[5]。一些学者对 ApoL 特异家

族成员进行进一步鉴定以及分类,结果发现他们的相似性提示该家族的出现可能因为通过局部基因多重化而引起的。尽管该蛋白不具有经典信号肽片断,证据表明 APOL-1 最少已分泌于血浆之中。已知, TNF- α 在腰椎间盘突出引起的炎症反应起重要作用^[6]。尽管如此, Brisby 等^[7]研究发现 LDH 患者与正常人血清 TNF- α 浓度无明显差异。因此,载脂蛋白 L1 水平可反映血清 TNF- α 水平从而可间接地反映腰椎间盘突出严重程度。此外,载脂蛋白 L1 与溶酶体的溶解有关,且 ApoL 翻译信号肽段的出现代表一种新的自然免疫复合物的出现^[8]。而最近研究表明, ApoL1 是唯一一种与 bcl-2 (B-cell leukemia-lymphoma, B 细胞淋巴瘤/白血病-2,一种原癌基因)同源域 3 结合的脂质类蛋白且能诱导自体吞噬的细胞凋亡途径^[9],而腰椎间盘突出与人类自身免疫有关且 bcl-2 家族调控的细胞自体凋亡途径参与髓核细胞凋亡过程^[10],因此,有理由相信 APO-L1 可能为 LDH 的信号肽段。

四连接素 (Tetranectin, TN) 是一种血纤维蛋白溶酶原结合蛋白,可出现在血浆及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)^[11]。TN 除了它的血纤维蛋白溶酶原结合蛋白特性外,还能与肝磷脂、载脂蛋白(a),组织纤维蛋白溶酶原激活剂,肝细胞生长因子及血管他丁^[12]。TN 的表达可在各种内分泌组织、内皮细胞、及间质细胞检测到,其中间质细胞包括成纤维细胞、单核细胞和中性粒细胞。TN 也是 ECM 成骨作用、肌肉发育及再生的决定性组成部分,这些均提示其在修复重建的生理学作用。血清 TN 水平的下降可见于创伤后或急性心肌梗塞后,类风湿性关节炎及恶性肿瘤等^[13]。虽然 TN 的确切生物学功能未被证实,一些实验证据表明 TN 在组织的修复重建中起重要的作用。TN 可以增加组织型纤维蛋白溶酶原激活剂催化激

活纤维蛋白溶酶原以多聚赖氨酸的催化激活作用^[12]。因为活化的纤维蛋白溶酶原被公认在细胞外基质的退变中起重要作用。在本研究中,血清TN水平是降低的,因为绝大部分腰椎间盘突出症患者是由于椎间盘退变引起的,而且是以髓核细胞凋亡首先凋亡的一个过程,然后紧随着椎间盘重建修复的失平衡状态。这样,LDH患者血清TN水平的降低有理由相信可能与椎间盘的修复重建有关,而引起TN的分泌降低。

人类载脂蛋白M(apolipoprotein M, apoM)最初在1999年由Xu和Dahlbäck在乳糜颗粒中分离出来^[14]。Xu等^[15]报道TGF- β 可下调apoM在HepG2的表达和分泌。这提示apoM可能与宿主的防御反应有关,因为apoM基因位于6号染色体组织相容性复合体Ⅲ区域^[14],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^[14]。因此apoM可能跟免疫系统相关,或者被一些细胞因子和炎症因子调控。而apoM与LDH的具体关系仍然不明确,需进一步研究证实。免疫球蛋白轻链在LDH中的作用不清楚,是否能作为LDH临床标志有待进一步研究。

在过去,没有证据直接表明LDH组表达的4种差异蛋白与LDH的发病机制有关。本文首次提出这四种蛋白与LDH的关系,而且是利用蛋白质组学对LDH在分子水平进行分析,初步说明这4种蛋白可能与LDH发生的免疫机制以及炎症过程相关,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] Igarashi T, Kikuchi S, Shubayev V, et al. Volvo award winner in basic science studies: exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats [J]. *Spine*, 2000,25(23):2975-2980.
- [2] Battlé MC, Videmam T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006,88 Suppl 2:3-9.
- [3] 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.
- [4] 崔冀,汪建平,蔡世荣,等. 运用蛋白质组学技术研究结肠黏膜、腺瘤及腺癌组织蛋白的差异表达 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008,29(6):744-748.
- [5] 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.
- [6] Murata Y, Nannmark U, Rydevik B, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in apoptosis of dorsal root ganglion cells induced by herniated nucleus pulposus in rats [J]. *Spine*, 2008,33(2):155-162.
- [7] Brisby H, Olmarker K, Larsson K, et al. Proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid and serum in patients with disc herniation and sciatica [J]. *Eur Spine J*, 2002,11(1):62-66.
- [8] Pérez-Morga D, Vanhollebeke B, Paturiaux-Hanocq F, et al. Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes [J]. *Science*, 2005,309(5733):469-472.
- [9] Wan G, Zhaoriquetu S, Liu Z, et al. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death [J]. *J Biol Chem*, 2008,283(31):21540-21549.
- [10] 胡明,马远征,张传森,等. 人退变椎间盘组织细胞凋亡相关基因表达的初步研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2006,12(6):484-486.
- [11] Caterer NR, Graverson JH, Jacobsen C, et al. Specificity determinants in the interaction of apolipoprotein (a) kringles with tetranectin and LDL [J]. *Biol Chem*, 2002,383(11):1743-1750.
- [12] Westergaard UB, Andersen MH, Heegaard CW, et al. Tetranectin binds hepatocyte growth factor and tissue-type plasminogen activator [J]. *Eur J Biochem*, 2003,270(8):1850-1854.
- [13] Kamper E F, Kopeikina L T, Trontzas P, et al. Comparative study of tetranectin levels in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, seronegative spondylarthritis and osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 1998,17(4):318-324.
- [14] Luo G, Zhang X, Nilsson-Ehle P, et al. Apolipoprotein M [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2004,3(21):1-5.
- [15] Xu N, Hurtig M, Zhang XY, et al. Transforming growth factor-beta down-regulates apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004,1683(1-3):33-37.