

蛋白质组学在股骨头坏死中的研究进展

胡淼锋¹, 周晓成¹, 单乐天¹, 肖鲁伟¹, 童培建²

(1.浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2.浙江省中医院骨科, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 蛋白质组学技术的兴起能快速筛选并鉴定疾病的特异性生物标记物, 有助于揭示股骨头坏死的发生机制, 早期诊断, 从而寻找更有效的治疗方法和治疗靶点。目前以找出其发生机制、早期诊断和早期治疗的相关蛋白及其功能鉴定, 建立相关数据库及蛋白提取方法的优化为研究热点和焦点。本文综述近年来股骨头坏死相关的蛋白质研究技术及其在股骨头坏死患者骨组织、血清及相关动物模型中运用, 为进一步研究提供思路。

【关键词】 股骨头坏死; 蛋白质组学; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.03.024

Research progress on proteomics in femur head necrosis HU Miao-feng, ZHOU Xiao-cheng, SHAN Le-tian, XIAO Lu-wei, and TONG Pei-jian*. *Department of Orthopaedics, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou, 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Appearance of proteomics technology can fleetly filter and reveal specificity biomarkers of disease, this will help to reveal the pathogenesis of femur head necrosis and help early diagnosis, find more effective methods and therapeutic targets. At present, they are hot spots that find out the occurred mechanism, related proteins of early diagnosis and early treatment and its functional identification; set up the early related database; optimize the protein extraction methods for research of femur head necrosis. This article reviews the application of study technology of related proteins of femur head necrosis on bone tissue, serum, related animal model, and in order to provide further research ideas.

KEYWORDS Femur head necrosis; Proteomics; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(3):264-266 www.zggszz.com

人体内真正发挥作用的是蛋白质, 基因的重要作用最终通过蛋白质体现, 因此, 随着人类基因组序列草图的完成, 生命科学进入了一个崭新的后基因组学时代, 即蛋白质组学时代。与基因组学研究不同, 其可获得蛋白质的亚型、转录后蛋白调节的信息, 弥补基因组学缺陷, 直接揭示基因的功能^[1]。利用蛋白质组学技术可以从蛋白质分子水平深刻认识疾病的病理机制, 筛选鉴定出疾病特异性生物标记物, 明确疾病的发病机制, 并探索新的治疗方法^[2]。股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head, ONFH), 又称缺血性股骨头坏死, 是由于不同原因破坏了股骨头血液供应所造成的最终结果, 是骨科领域常见的难治性疾病。目前国内外对 ONFH 的发病机制的研究仍处于探索阶段, 早期诊断和治疗也有待于进一步探究^[3-4], 以往细胞学、基因组学平台上的研究已不能满足探索 ONFH 未知领域的要求, 需要新兴的分子生物学技术来开拓一个崭新的科技研究平台, 蛋白质组学技术的发展为股骨头坏死等发病机制尚不明确的疾病的诊断和治疗研究提供了新的途径。因此蛋白质组学技术在股骨头坏死研究中越来越受到重视^[5]。本文就目前研究股骨头坏死常用的蛋白质组学研究技术及近年来有关股骨头坏死蛋白质组学的研究成果展开

综述。

1 蛋白质组学相关研究技术

蛋白质组学(proteomics)是以细胞、组织、生物体内蛋白质组成及其活动方式(表达、翻译及修饰、功能等)为研究对象, 研究其结构、功能、相互作用和修饰的一门新兴且迅速发展的学科^[6-7]。目前在骨科中以双向电泳、质谱分析及液质联用等蛋白质组学技术最为常用, 主要用于蛋白分离和鉴定。

1.1 双向电泳(2-DE) 蛋白质双向电泳技术是各种蛋白质分离分析方法中惟一能同时分辨上千个蛋白质点的技术^[8]。尤其适用于不同状态下细胞蛋白质表达差异的研究。其原理是蛋白质等电点不同, 在 PH 梯度胶内进行一维等电聚焦分离蛋白, 然后经聚丙烯酰胺电泳法, 按分子质量进行二维电泳分离, 分离后进行染色和蛋白点分析。通过软件定量分析实验组和对照组中蛋白点的不同密度。利用蛋白酶将感兴趣的蛋白点从凝胶上切下, 以质谱和序列数据搜寻鉴定蛋白。双向电泳的高分辨率, 重复性好和兼具微量制备的性能是其他蛋白质分离方法所不能匹敌的, 但仍存在一些缺点, 如低丰度蛋白质, 疏水蛋白的分离检测, 且有限的运动范围和不能对超过一定分子量范围的蛋白质进行分析。

1.2 生物质谱技术(MS) MS 技术的发展能进一步对 2-DE 所分离的成千上百种蛋白质进行分析^[9]。MS 是通过离子化装置将分子转化为气态离子, 根据不同离子间质荷比的差异来分离并确定相对分子量, 进行网上数据对比。从而鉴定蛋白质, 氨基酸序列及翻译后修饰情况等。其方法主要有两种, 即

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81072820)

Fund program: Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81072820)

通讯作者: 童培建 E-mail: tongpeijian@163.com

肽指纹图谱技术和串联质谱技术。肽指纹谱技术是将特定序列的蛋白酶水解成多肽斑点后得到的几个肽段的质量,然后用这些肽段质量查询数据库如 Genbank、PIR 蛋白数据库、EMBL^[10],得到研究蛋白质的结构和功能。对于不能单独依靠肽指纹图谱鉴定的蛋白质可用肽序列标签串联质谱鉴定技术测定蛋白质的氨基酸序列。利用这些技术再进行蛋白质数据库检索,可实现对蛋白质快速鉴定和高通量筛选^[11]。

1.3 液质联用(HLPC-MS) 液质联用(HLPC-MS)又叫液相色谱-质谱联用技术,体现了色谱和质谱优势的互补,它以液相色谱作为分离系统,质谱为检测系统。将色谱对复杂样品的高分离能力,与 MS 具有高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来,这些高通量技术在骨组织蛋白中的应用为疾病诊断,生物标记物的发现等跨出了重要一步^[12]。

2 蛋白质组学在股骨头坏死中的应用

目前对 ONFH 的蛋白质组学尚处于初级阶段,国内外其研究对象主要包括:股骨头坏死患者的股骨头骨组织、血清及相关动物模型的股骨头。

2.1 ONFH 患者的坏死股骨头与正常股骨头间的差异蛋白 应用蛋白质组学技术分析 ONFH 患者坏死股骨头和正常股骨头之间的差异蛋白质,寻求可以用于股骨头坏死早期诊断及防治的蛋白质标记物。Tan 等^[13]应用蛋白质组学技术分析坏死股骨头与正常股骨头之间蛋白质的变化,共发现 7 个相关蛋白质,且其中 4 个相关蛋白在股骨头坏死患者中的表达明显高于类风湿性关节炎,骨关节炎和骨折患者。这些特征性指标的发现有利于 ONFH 早期诊断鉴别和发病机制的研究。Zhang 等^[14]通过蛋白质组学技术发现股骨头坏死患者中有 141 个蛋白表现上调,56 个表现下调,且表明硫酸软骨素蛋白多糖,阳离子运输和动员合成可能是股骨头坏死发病过程中的一个关键环。张雷等^[12]寻找与成人非创伤性股骨头坏死缺血性相关的蛋白质。鉴定出差异表达蛋白 189 个,其中坏死组表达量上调 3 倍以上的蛋白点 104 个,下调 3 倍以上的 50 个。通过基因本体论蛋白功能分析发现,其中 34 种蛋白质与股骨头缺血性坏死密切相关。GPCR26 和 CHST2 表达下调,且蛋白印迹实验验证了质谱鉴定结果。这些蛋白质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,随着对这两个蛋白的作用机制研究深入,可为阐明股骨头缺血性坏死的发病机制提供了一条新途径。骨组织是一种比较特殊的生物标本,又是研究股骨头坏死必不可少的实验材料。其样本质地坚硬、矿物质含量高,细胞含量较少,如何将其有效破碎、及促使骨组织细胞成分中蛋白充分溶解,并把复杂的蛋白质成分有效分离,对于后续进行差异蛋白质分析和鉴定至关重要。崔永锋等^[15]通过 2 种不同提取液提取蛋白,发现三氯乙酸丙酮沉淀法能有效提高了骨组织蛋白的提取率。Vincourt 等^[16]利用基质的生物学特征改进传统的软骨组织蛋白提取等。由此可见通过改进可以获得快速、有效的骨组织蛋白提取方法,这将有利于骨组织蛋白质组学研究。

2.2 ONFH 患者与正常人血清之间的差异蛋白 分析股骨头坏死患者和正常人血清蛋白质的差异,寻求可能获得与疾病相关的蛋白质,这些血清蛋白质学标志物可以用于诊断和发病机制的研究。血清标本易于采集,信息含量丰富,是蛋白质组学主要的研究对象。Wu 等^[17]比较了成人股骨

头坏死和健康志愿者之间血清中的蛋白质差异,发现股骨头坏死患者中的变异激肽原-1、补体因子 C3 的前体以及补体因子 H 均有明显的升高,而抗凝血酶Ⅲ链乙、载脂蛋白 A-IV 前体和凝胶溶素 a 异构体水平出现明显的降低,表明股骨头坏死的发生与以上各种血清蛋白的表达有关。Jiang 等^[18]采用 2-DE 和 MALDI-TOF MS 技术比较正常健康女性人员(A),SARS 康复无并发症女性人员(B),SARS 康复伴发股骨头坏死女性人员(C)3 组血清中的蛋白质差异,初步鉴定了 18 个差异蛋白,与 A 组和 B 组比较,C 组 4 种蛋白降低,3 种蛋白高表达。其中 C 组血清淀粉样 P 物质与 A 组和 B 组比较,其高表达($P < 0.05$),因此认为血清淀粉样 P 物质可能是 SARS 患者股骨头坏死的一个生物标记物,可作为 ONFH 的诊断和治疗。血清淀粉样 P 物质功能及具体的作用机制有待于进一步研究。血清标本易于获取,但血液蛋白质组成成分复杂,高低丰度蛋白质含量的动态范围非常宽。如何有效地尽量去除高丰度蛋白质,实现富集低丰度蛋白质,发现其在低丰度蛋白质中的候选标志物。已有学者对此进行了优化^[19]。

2.3 相关动物模型建立的蛋白质组学实验研究 建立动物模型,提取骨组织蛋白样品分析,鉴定出差异蛋白,且可通过药物早期干预治疗对照。寻求股骨头坏死的发病及药物治疗可能发挥的作用。动物模型是研究股骨头坏死重要的工具。股骨头坏死的发生机制极其复杂,所以研究者们根据研究目的建立了许多动物模型模拟人类的股骨头坏死。刘建仁等^[20]用激素制造大鼠骨坏死模型并设中药治疗组和空白对照组,运用蛋白质组学技术,提取骨组织蛋白质样品进行分析,初步鉴定了 3 个差异蛋白,阻凝蛋白重连 II B,磷脂酰甘油过氧分酶,泛素化酶 E2(Mw: 17kd),并分析 3 种蛋白在激素性股骨头坏死中发病及中药治疗激素性股骨头坏死过程中可能发挥的作用,为股骨头坏死的发病和药物治疗分子水平上做了进一步的研究。Li 等^[21]采用 2-DE 和 MALDI-TOF MS 技术,验证了甲强龙诱导的鸡股骨头坏死中骨髓脂肪细胞的变化。共发现 9 种蛋白表达下调,因此认为蛋白质组学能很好的探测骨髓脂肪细胞在激素性鸡股骨头坏死的变化。胡峰等^[22]用激素建立新西兰大白兔股骨头坏死模型,采用 2-DE 技术创建早期 ONFH 不同时间与正常股骨头的蛋白表达图谱,运用基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对差异点进行鉴定。通过比较后发现 24 个差异蛋白点(差异大于 2 倍),经质谱成功鉴定出 20 个,其中 7 种蛋白质在早期 ONFH 中呈现表达上升,另外 13 种蛋白呈现表达下降。Western blot 显示早期 ONFH 中 AnnexinA1 的表达水平低于对照组,其表达趋势与 2-DE 结果相一致。AnnexinA1 是钙离子依赖结构相关磷脂结合蛋白,众多研究表明,它与细胞信号传导、炎症介导、细胞凋亡、细胞修复、肿瘤进程等密切相关^[23]。此外还发现其在成骨细胞分化^[24],软骨矿化过程及骨细胞扩增的调节发挥这重要的调控作用^[25],AnnexinA1 很可能通过上述或其他途径参与了早期 ONFH 的发病过程,是潜在的重要蛋白标志物,值得进一步深入研究。

3 展望

综上所述,蛋白质组学研究平台的建立为股骨头坏死的研究提供了一个新的契机,随着研究技术不断进步也取得一些研究成果。但目前对股骨头坏死的蛋白质组学研究还处于起始阶段,蛋白质组学技术还需进一步发展,骨组织及血清样

本中蛋白提取方法也需优化和统一,目前发现的差异蛋白质也较少,其具体的功能及与疾病的发病机制,治疗等都还需要进一步探索,且现有相关的蛋白组数据库也仍然比较有限。目前股骨头坏死仍以寻找其发病机制、早期诊断和早期治疗的相关蛋白及其功能鉴定,建立早期的相关数据库为研究热点和焦点。但随着蛋白质组学的迅速发展,运用蛋白质组学技术深入研究 ONFH 的分子发生发展机制,寻找差异表达蛋白,有望在 ONFH 的早期诊断和治疗中带来重大突破。

参考文献

- [1] Yeatman TJ. The future of cancer management; translating the genome, transcriptome and proteome[J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(1): 7-14.
- [2] Chen EL, Yates JR 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics[J]. *Mol Oncol*, 2007, 1(2): 144-159.
- [3] Mont MA, Jone LC, Hungerford DS. Current concepts review non-traumatic osteonecrosis of the femoral head; ten years later[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88: 1117.
- [4] Drescher W, Pufe T, Smeets R, et al. Avascular necrosis of the hip: diagnosis and treatment[J]. *Z Orthop Unfall*, 2011, 149(2): 231-40.
- [5] Wilson R, Whitelock JM, Bateman JF. Proteomics makes progress in cartilage and arthritis research[J]. *Matrix Boil*, 2009, 28(3): 121-128.
- [6] Mallick P, Schirle M, Chen SS, et al. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 125-131.
- [7] Bhavsar AP, Auweter SD, Finlay BB. Proteomics as a probe of microbial pathogenesis and its molecular boundaries[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(2): 253-265.
- [8] 童明霞, 缪应雷. 蛋白质组学在炎症性肠病研究中的应用[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(22): 2333-2338.
Tong MX, Miao YL. Application of proteomics to the study of inflammatory bowel disease[J]. *Shi Jie Hua Ren Xiao Hua Za Zhi*, 2010, 18(22): 2333-2338. Chinese.
- [9] Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects[J]. *Clin Biochem Rev*, 2006, 27: 99-116.
- [10] Elek G, Lapis K. A path or a new road in laboratory diagnostics biological mass spectrometry: facts and perspectives[J]. *Pathol Oncol Res*, 2006, 12(3): 178-183.
- [11] Larbi NB, Jefferies C. 2D-DIGE; comparative proteomics of cellular signaling pathways[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 517: 105-132.
- [12] 张雷, 杨国敬, 王珺, 等. 基于 MDLC-MS/MS 技术的股骨头缺血性坏死的组织蛋白质组分析[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(3): 213-217.
Zhang L, Yang GJ, Wang J, et al. High throughout proteomic analysis of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2011, 24(3): 213-217. Chinese with abstract in English.
- [13] Tan XY, Cai DZ, Wu YL, et al. Comparative analysis of serum proteomes; discovery of proteins associated with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Transl Res*, 2006, 148(3): 114-119.
- [14] Zhang H, Zhang L, Wang J, et al. Proteomic analysis of bone tissues of patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *OMICS*, 2009, 13(6): 453-466.
- [15] 崔永锋, 杨贞, 朱宝华, 等. 三氯醋酸-丙酮沉淀法用于骨组织蛋白的提取[J]. *中国医学科学院学报*, 2011, 33(2): 210-213.
Cui YF, Yang Z, Zhu BH, et al. Application of trichloroacetic Acid-acetone precipitation method for protein extraction in bone tissue[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2011, 33(2): 210-213. Chinese.
- [16] Vincourt JB, Lionneton F, Kratassiouk G, et al. Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(10): 1984-1995.
- [17] Wu RW, Wang FS, Ko JY, et al. Comparative serum proteome expression of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. *Bone*, 2008, 43(3): 561-566.
- [18] Jiang HY, Wang SX, Li XH, et al. The proteomics research on relational expressed serum proteins among the recovered SARS patients complicating avascular necrosis of femoral head[J]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue*, 2008, 42(7): 522-526.
- [19] Chen YY, Lin SY. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(11): 2117-2127.
- [20] 刘建仁, 樊粤光, 王海彬, 等. 中药治疗激素性股骨头坏死的蛋白质组学分析[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2005, 13(5): 4-10.
Liu JR, Fan YG, Wang HB, et al. Bone proteomic analysis about chinese medicine action on rat glucocorticoid-induced model of osteonecrosis[J]. *Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2005, 13(5): 4-10. Chinese.
- [21] Li SC, Lin CY, Kuo TF, et al. Chicken model of steroid-induced bone marrow adipogenesis using proteome analysis; a preliminary study[J]. *Proteome Sci*, 2010, 8: 47.
- [22] 胡蜂. 早期激素性股骨头坏死差异蛋白质组学分析及相关蛋白表达验证[D]. 广西医科大学, 2010.
Hu F. Differential proteomics analysis of steroid-induced avascular necrosis of femoral head and verification of related protein[D]. *Guang Xi Yi Ke Da Xue*, 2010. Chinese.
- [23] Tabe Y, Jin L, Contractor R, et al. Novel role of HDAC inhibitors in AML1/ETO AML cells; activation of apoptosis and phagocytosis through induction of annexin A1[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(8): 1443-1456.
- [24] Zhang AX, Yu WH, Ma BF, et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 304(1-2): 167-179.
- [25] Haut Donahue TL, Genetos DC, Jacobs CR, et al. Annexin V disruption impairs mechanically induced calcium signaling in osteoblastic cells[J]. *Bone*, 2004, 35(3): 656-663.

(收稿日期: 2012-05-15 本文编辑: 李宜)