

· 基础研究 ·

基于蛋白组学探讨糖皮质激素性骨质疏松发病机制

张方晴^{1,2}, 李秋月², 石钺¹, 王镜勋¹, 吴嘉朔¹, 阮豪南¹, 薛昊天^{1,3}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 3. 河北大学公共卫生学院, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的：基于 Label-free 非标全蛋白组学方法探讨糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 的发病机制。方法：将 12 只 SPF 级 SD 雌性大鼠随机分为空白对照组和 GIOP 组。适应性饲养 1 周后，GIOP 组按 2.5 mg/kg 体重于左右大腿内侧交替注射地塞米松，空白对照组注射等量的生理盐水，每周 2 次。造模 8 周末，取各组大鼠的胫骨进行病理切片，以确定造模成功。每组选取 3 个样本进行蛋白质组学检测，在质控后通过蛋白质的定性定量分析筛选差异蛋白，并通过生物信息学手段针对差异蛋白进行聚类分析，利用基因本体论 (gene ontology, GO)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等功能富集分析手段，以阐明糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 诱发的 GIOP 的潜在病理机制。结果：与空白对照组比较，GIOP 组大鼠骨小梁排列紊乱，分布不均且伴有断裂现象，骨空腔隙增加，具有显著差异，证明造模成功。蛋白组学检测共鉴定 47 个差异表达蛋白，其中 20 个蛋白上调，27 个蛋白下调。蛋白核磷蛋白 1 (nucleophosmin 1, NPM1)、脂肪细胞膜关联蛋白 (adipocyte plasma membrane associated protein, APMAP)、抗酒石酸性磷酸酶 5 (tartrate-resistant acid phosphatase, ACP5)、细胞色素 c 氧化酶 6A (cytochrome c oxidase subunit 6A1, COX6A1) 等蛋白表达具有显著差异。KEGG 结果显示，差异表达蛋白富集在代谢相关通路、免疫炎症相关通路及腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated kinase, AMPK) 信号通路上。结论：NPM1、APMAP、COX6A1、ACP5 等蛋白与 GIOP 的发病机制密切相关，可作为 GIOP 的潜在生物标志物。AMPK 信号通路在 GIOP 的发生发展中起重要作用，为治疗 GIOP 的潜在信号通路。

【关键词】 糖皮质激素性骨质疏松； 发病机制； 全蛋白质组学

中图分类号：R681

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2023.04.008

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis based on label-free mass proteomics

ZHANG Fang-qing^{1,2}, LI Qiu-yue², SHI Yue¹, WANG Jing-xun¹, WU Jia-shuo¹, RUAN Hao-nan¹, XUE Hao-tian^{1,3} (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 3. College of Public Health, Hebei University, Baoding 071000, Hebei, China)

ABSTRACT Objective To explore pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) based on label-free mass proteomics. **Methods** Twelve female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups, named as sham group and GIOP group. After one-week adaptive feeding, the rats of GIOP group were administered with dexamethasone via intramuscular injection according to 2.5 mg/kg weighting, while the rats of sham group were administered with the same amount of saline, twice a week. The tibias of each group were collected after 8-week modeling and made pathological sections to confirm the success of modeling. Three samples of each group were picked up to perform label-free mass proteomics. After quality control, differentially expressed proteins were identified according to qualitative and quantitative analyses. Then gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis, cluster analysis as well as protein-protein interaction analysis were performed using bioinformatics analysis. **Results** Compared with sham group, the structure of bone trabecular in GIOP group showed abnormal arrangement, uneven distribution and obvious fragmentation, which could demon-

基金项目：中国中医科学院科技创新工程课题 (编号：CI2021A04901)；中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (编号：2016-12M-1-102)；中国中医科学院优秀青年科技人才 (创新类) 培养专项 (编号：ZZ13-YQ-036)；中国中医科学院望京医院苗圃培育项目 (编号：WJYY-YJKT-2022-04)

Fund program: Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (No. CI2021A04901)

通讯作者：石钺 E-mail: shiyue1029@126.com

Corresponding author: SHI Yue E-mail: shiyue1029@126.com

strate successful modeling. A total of 47 differentially expressed proteins (DEPs) were identified including 20 up-regulated and 27 down-regulated proteins. The expression of protein nucleophosmin 1 (NPM1), adipocyte plasma membrane associated protein (APMAP), cytochrome c oxidase subunit 6A1 (COX6A1) and tartrate-resistant acid phosphatase (ACP5) showed a significant difference between two groups. KEGG results showed DEPs were enriched on metabolism-related pathways, immune-related pathways and AMP-activated kinase (AMPK) signaling pathway. **Conclusion** Protein NPM1, APMAP, COX6A1 and ACP5 showed a close relationship with pathogenesis of GIOP, which could serve as potential biomarkers of GIOP. AMPK signaling pathway played an important role in the occurrence and development of GIOP, which could be regarded as potential signaling pathway to treatment GIOP.

KEYWORDS Glucocorticoid-induced osteoporosis; Pathogenesis; Proteomics

糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是一种由长期或者大量使用糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 所导致的, 以骨量减少和骨微观结构退化为特征的一类继发性骨质疏松症^[1-2]。流行病学研究表明, 在使用 GCs 治疗风湿病患者时, 发生骨量减少、骨折及骨质疏松的概率在 90% 及以上, 即使将 GCs 的每日临床使用剂量控制在 2.5 mg 以下, 仍有 58.5% 的患者表现出骨量降低和骨质疏松^[3-4]。根据骨质疏松诊疗指南, 专家建议患者应该在接受糖皮质激素治疗的同时, 服用药物来预防骨质疏松的发生^[5]。目前美国 FDA 批准用于治疗 GIOP 的药物仅有 4 种^[2] (唑来膦酸、阿仑膦酸钠、特立帕肽和利塞膦酸钠)。GCs 具有良好的抗炎作用, 在临床治疗中应用广泛^[6]。如何有效预防和治疗 GCs 的应用所引起的 GIOP, 研制出疗效好、不良反应低且价格低廉的治疗 GIOP 的药物, 成为了骨质疏松研究的热点和难点问题。

药物的开发离不开对疾病发病机制的了解, 研究表明^[7-9], GCs 可直接或间接影响骨重塑过程, 引起骨形成和骨吸收失衡。一方面, GCs 可直接引起核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 表达增多, 使破骨细胞数量增加, 骨吸收加快。另一方面, GCs 可直接加速细胞凋亡, 导致成骨细胞数量降低, 骨形成减慢。GCs 还可诱发肌肉萎缩, 影响钙的重吸收及降低激素 (如甲状旁腺激素) 水平, 使患者骨量减少, 从而引起骨折或骨质疏松。本研究应用 Label-free 非标全蛋白质组学对 GCs 所诱导的 GIOP 大鼠模型进行蛋白定性鉴别和定量检测, 筛选造模前后具有表达差异的蛋白, 并利用基因本体论 (gene ontology, GO), KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 等功能富集分析手段, 以阐明 GCs 诱发的 GIOP 的潜在病理机制, 为临床有效治疗 GIOP 药物的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

Easy-nLC 1200 高效液相色谱仪 (美国 Thermo

Fisher Scientific 公司), Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 涡旋混合仪 (美国 Scilogex 公司), 干式金属浴 (美国 Scilogex 公司), H1650R 离心机 (湖南湘仪仪器公司), 水浴箱 (北京光合科技有限公司), 分析天平 (上海越平科学仪器有限公司), 多样品组织研磨仪 (上海测博生物科技有限公司), SCIENTZ08-II 超声破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司), 离心浓缩仪 (北京吉艾姆科技有限公司), VE586 转移电泳槽 (上海天能科技有限公司)。

1.2 实验试剂

多聚甲醛 (上海麦克林试剂公司), 质谱级水 (美国 Fisher Scientific 公司), 质谱级乙腈 (美国 Fisher Scientific 公司), 质谱级甲酸 (美国 Fisher Scientific 公司), 分析级无水乙醇 (北京化工有限公司), 分析级冰乙酸 (天津大茂化学试剂有限公司), 考马斯亮蓝 (北京 Solarbio 科技有限公司), NuPAGE Gel (美国 Invitrogen 公司), 分子生物学级碳酸氢铵 (北京 Sigma 公司), 分子生物学级氯化钠 (上海生工生物工程股份有限公司), 分子生物学级脱氧胆酸钠 (北京 Sigma 公司), 尿素 (北京 Solarbio 科技有限公司), 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) (上海 Promega 公司), 质谱级胰蛋白酶 (北京华利科技有限公司), 10 kDa filter 柱 (美国 Pall Corporation 公司), C18 脱盐柱 (自制, 填料粒径 3 μ m, 孔径 150 $\text{\AA}$)。C18 反相色谱柱: 预柱为 2 cm $\times$ 100 μ m ID, 填料粒径 3 μ m, 孔径 120 $\text{\AA}$ (自制); 分析柱为 15 cm $\times$ 150 μ m ID, 填料粒径 1.9 μ m, 孔径 120 $\text{\AA}$ (自制)。

1.3 动物饲养

SPF 级 SD 雌性大鼠 12 只, 体质量 220~240 g, 购于北京大学医学部 (实验动物科学部) [SYXK (京) 2017-0020]。于 SPF 级环境适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组和 GIOP 组, 每组 6 只。两组大鼠均以普通维持饲料喂养, 自由饮水, 每周称重。控制环境温度 18~29 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%。动物实验的开展均经过中国医学科学院药用植物研究所实验动物中心的批准 (编号: SLXD 20211029231), 实验程序

严格按照中国有关实验动物使用和护理的法规进行。

1.4 造模方法

两组大鼠适应性饲养 1 周后,GIOP 组大鼠于左右大腿内侧交替注射地塞米松注射液(2.5 mg/kg),每周注射 2 次,每次注射前称重,按照每 100 g 注射 0.1 ml 的 2.5 mg/ml 地塞米松注射液剂量进行肌肉注射。空白对照组大鼠按相同体积注射生理盐水。对所有动物进行肌肉注射 8 周后,用 20%氨基甲酸乙酯溶液麻醉,进行取材、处死等操作。经过本课题组前期验证^[10-11],该造模方法可以建立均一、稳定的糖皮质激素性骨质疏松模型,且具有良好的重复性。

1.5 股骨与胫骨的取材

造模第 8 周结束后,禁食 24 h,以 1 g/kg 剂量腹腔注射 20%氨基甲酸乙酯溶液进行麻醉。麻醉后沿大鼠的腹白线剪开,暴露脏器,将大鼠的左侧、右侧后肢完整分离,完全剥离肌肉组织后,得到的股骨、胫骨均以 0.9%无菌生理盐水冲洗,右侧股骨以锡纸包裹,经液氮速冻后,保存于-80℃冰箱,用于蛋白组学检测;右侧胫骨置于 4%多聚甲醛溶液中,用于 HE 染色。

1.6 检测项目与方法

1.6.1 HE 染色 采用苏木精-伊红染色法取胫骨干骺端制作切片。取右侧胫骨,以 4%多聚甲醛固定 24 h 后,以梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明后,石蜡包埋,制作 5 μm 厚的石蜡切片,以苏木精-伊红溶液进行常规 HE 染色。

1.6.2 总蛋白的提取 从-80℃冰箱取出右侧股骨样本,剪碎后放置于研磨机液氮研磨至粉末状态。取 50 mg 样品分别加入 500 μl 2×裂解液(含 0.5%脱氧胆酸钠)和 500 μl 含 8 M 尿素的裂解缓冲液。冰上超声裂解 15 min 后,4℃,12 000×g 离心 10 min。取 30 μl 上清液,用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)法对蛋白进行定量。

1.6.3 蛋白的酶解和肽段的脱盐 质量控制合格后,经 10 mM 的二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)还原二硫键,碳酸氢铵体系烷基化后,按 1:100 的比例加入胰蛋白酶,37℃进行酶解过夜。14 000×g 离心 10 min 收集酶切后的肽段,经清洗置换后,取上清液进行脱盐。酶解得到的肽段采用 C18 柱脱盐,上样后经 50%乙腈洗脱,洗脱液于 550×g,45℃,1 h 进行抽干,于-80℃冰箱保存待用。

1.6.4 液相色谱-质谱分析 液相色谱系统为 Easy-nLC 1200,流动相 A 为含有 0.1%甲酸的水溶液,流动相 B 为含有 0.1%甲酸的 80%乙腈溶液,进

样量为 5 μl,流速为 600 nl/min,梯度洗脱程序为 0~90 min 11%~29% B;90~115 min 29%~44% B;115~116 min 44%~100% B;116~120 min 100% B。采用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行数据采集,离子源为纳流电喷雾离子源,喷雾电压 2 200 V,离子传输毛细管温度为 320℃;质谱数据在正离子模式下采用数据相关采集模式(data-dependent acquisition mode,DDA)方法进行采集,一级质谱使用 Orbitrap 进行全扫描,扫描范围为 m/z:350~1 550,扫描分辨率为 120 000;二级质谱采集通过 32%的高能碰撞解离(high-energy collision dissociation,HCD)对母离子进行碎裂,碎片离子在离子阱中进行检测,分辨率为 15 000。

1.6.5 蛋白质的定性定量分析 将质谱数据输入到 Proteome Discoverer 软件(Version 2.4,Thermo Fisher Scientific,USA)进行质谱谱图的筛选。筛选条件为母离子质量范围为 350~10 000 Da,二级质谱图中的最小峰数为 1,信噪比 S/N 阈值为 1。采用 PD 内嵌的 Sequest 软件进行搜索,并与第 1 步筛选后的谱图对比进行定性分析。蛋白定量值通过提取 TMT 报告离子的信号值进行重新计算,其中肽段定量值使用中位数值表示,蛋白定量值为肽段定量值的累加和。差异蛋白的筛选条件为差异倍数(fold change,FC)>1.5,P<0.05,所得到的差异蛋白均经 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[12]进行归一化处理。

1.6.6 生物信息学分析 基于质谱检测得到的 raw 文件,通过 Proteome Discoverer 2.4 软件与 Uniprot 数据库比对分析,基于搜库结果进行蛋白质的鉴定与定量,同时进行肽段、蛋白和母离子质量容差分布分析来评定质谱检测数据的质量,并对鉴定蛋白进行基本特征分析,对鉴定蛋白进行功能数据库注释,包括 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。进行蛋白质的定量分析,包括鉴定蛋白质总体差异的主成分分析(principal component analysis,PCA),差异蛋白的筛选及表达模式聚类分析。最后针对筛选出来的差异蛋白进行 GO、KEGG 富集分析和蛋白互作(protein-protein interaction,PPI)网络构建等。

1.7 统计学处理

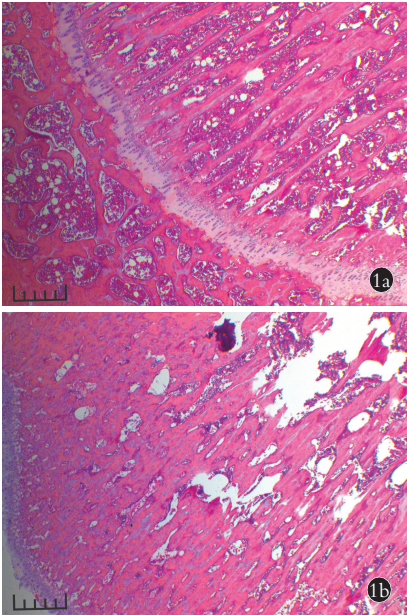
采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。采用 GraphPad Prism 8.0 进行数据结果可视化。符合正态分布的定量资料数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。HE 定量结果和单个蛋白定量表达组间比较采用单因素方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

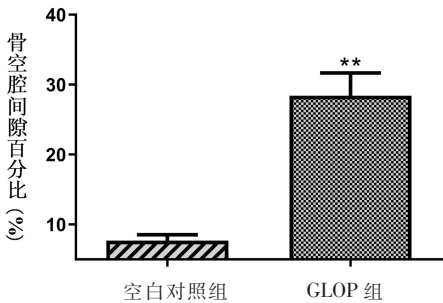
2.1 病理组织学检测

病理组织学结果显示,与空白对照组比较,GIOP

组大鼠的骨小梁排列紊乱，分布不均且伴有断裂现象。同时,GIOP 组大鼠的骨空腔间隙数量增加,定量分析结果显示,GIOP 组与空白对照组之间的骨空腔存在着显著差异($P<0.01$),表明该方法造模成功。见图 1、图 2。



注:采用苏木精-伊红溶液染色,放大倍数为 5 倍(标尺=2 mm)
图 1 大鼠右侧胫骨病理组织学检测 1a. 空白对照组 1b. GIOP 组
Fig.1 Histopathological detection of the right tibia of rats 1a. Sham group 1b. GIOP group

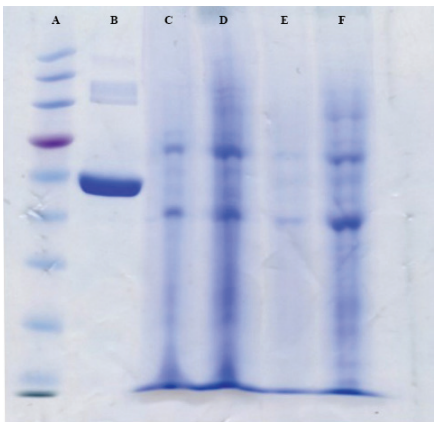


注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$
图 2 病理组织学检测中骨空腔间隙百分比柱状图(每组样本数=6)
Fig.2 Bar graph of percentage of bone cavity volume in histopathological detection($n=6$)

2.2 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 电泳结果证实制备的各组股骨总蛋白样品的平行性好,蛋白条带清晰,且未见蛋白降解。符合后续蛋白定量检测要求。见图 3。

2.3 糖皮质激素性骨质疏松大鼠的生物信息学分析
2.3.1 PLS-DA 分析 偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 是一种用于判别分析的多变量统计方法。在蛋白组



注:A 为 marker,B 为 BSA,C 为 GIOP 组 2×DOC,D 为空白对照组 2×DOC,E 为 GIOP 组 8 mM Urea,F 为空白对照组 8 mM Urea
图 3 空白对照组与 GIOP 组大鼠股骨总蛋白 SDS-PAGE 图
Fig.3 SDS-PAGE electropherogram of total protein from femurs of rats between sham group and GIOP group

分析中,PLS-DA 分析可以进行样本间的比较,以找出离群样品并判别相似性高的样品簇。针对本次蛋白组检测结果进行 PLS-DA 分析,结果显示,组内样本相互聚集,组间样本相互分离,不同组间的蛋白表达具有差异,后续分析可信。见图 4。

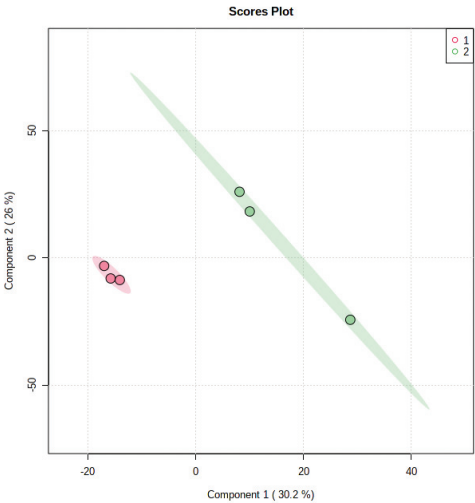


图 4 空白对照组与 GIOP 组组间差异的 PLS-DA 分析
Fig.4 PLS-DA analysis between sham group and GIOP group

2.3.2 GIOP 大鼠和正常大鼠的差异表达蛋白 以 $FC>1.5, P<0.5$ 为条件筛选差异表达蛋白。与空白对照组大鼠相比,GIOP 模型组共筛选得到差异表达蛋白 47 个,其中上调表达蛋白 20 个,下调表达蛋白 27 个。见表 1。

对筛选出的差异表达蛋白进行聚类分析,从热图中可看出,组内样本表达模式相似,组间样本表达模式差异大,说明分组处理对结果有明显的影响,组内样本重复好,得到的结果可信度高。火山图能够更

表 1 GIOP 组大鼠与空白对照组大鼠的差异表达蛋白
Tab.1 DEPs of rats between GIOP group and sham group

序号	蛋白登记号	蛋白名称	GIOP	空白对照	GIOP	调控类型	序号	蛋白登记号	蛋白名称	GIOP	空白对照	GIOP	调控类型
			相对表达量	组相对表达量	组/空白对照组					相对表达量	组相对表达量	组/空白对照组	
1	A0A0G2K6G2	APMAP	0.576	0.062	9.227	Up	25	Q4KM66	CMPK1	7.016	12.644	0.555	Down
2	P12785	NPM1	2.695	0.594	4.539	Up	26	Q920L2	ADA	2.231	4.221	0.529	Down
3	Q5VLR6	RNASE2	1.390	0.450	3.088	Up	27	D3ZZR3	CTSS	3.393	6.431	0.528	Down
4	A0A0G2K6Z6	ACP5	7.806	2.537	3.077	Up	28	F1LQ48	HMNPI	1.645	3.177	0.518	Down
5	B2RZ77	DPT	2.156	0.744	2.896	Up	29	A1A5L2	PGM1	14.801	28.701	0.516	Down
6	P35280	PPAT	0.532	0.185	2.876	Up	30	Q6WN19	DSTYK	0.297	0.633	0.470	Down
7	D3ZZC1	TXNDC5	1.527	0.624	2.448	Up	31	P19804	RPLP1	1.771	3.957	0.448	Down
8	Q4QQV0	LSP1	0.309	0.126	2.443	Up	32	D4A4J0	SUPT16H	0.154	0.359	0.431	Down
9	F7FNG0	PRTN3	0.374	0.155	2.413	Up	33	G3V699	SERPINB10	0.219	0.509	0.430	Down
10	P29975	LTA4H	2.338	0.979	2.390	Up	34	Q9JHL4	DBNI	0.168	0.402	0.419	Down
11	Q641Y8	EHD1	0.179	0.079	2.258	Up	35	A0A0G2JZ52	HNRNPU	1.198	2.929	0.409	Down
12	P05545	RAB2A	5.938	2.661	2.231	Up	36	D3ZZT9	COL14A1	2.261	5.773	0.392	Down
13	G3V8L1	ITGAM	0.646	0.309	2.089	Up	37	Q9EPH1	A1BG	1.402	3.940	0.356	Down
14	G3V647	PDXK	0.105	0.054	1.969	Up	38	P16290	CES1D	7.223	22.147	0.326	Down
15	P49088	ITGB1	0.473	0.255	1.853	Up	39	Q5M7V3	THRAP3	1.871	6.329	0.296	Down
16	D4A7Y1	ACAN	16.802	9.160	1.834	Up	40	D4A9P9	HHATL	0.134	0.473	0.283	Down
17	A0A0G2JZ12	EPRS	1.425	0.798	1.786	Up	41	D4A3D2	SMYD1	0.157	0.621	0.253	Down
18	Q1PBJ1	MCM7	26.248	15.611	1.681	Up	42	A0A0G2K9Z1	MYBPH	0.362	1.551	0.233	Down
19	P02680	ALB	11.793	7.416	1.590	Up	43	B5DEX4	VASP	0.190	0.862	0.221	Down
20	P50475	ST13	0.192	0.128	1.506	Up	44	Q62636	RHEB	0.721	3.305	0.218	Down
21	P43138	H1-0	0.180	0.270	0.666	Down	45	A0A0G2K8K3	SERPIND1	0.087	0.444	0.197	Down
22	P21818	CPA3	0.727	1.196	0.608	Down	46	F1LQN3	RTN4	0.241	1.815	0.133	Down
23	Q5U2S7	FKBP5	0.244	0.415	0.589	Down	47	P10759	COX6A1	0.290	2.263	0.128	Down
24	A0A0G2K8Q1	APOC3	0.798	1.399	0.571	Down							

加直观地展示蛋白的上调和下调，横坐标绝对值越大,说明该蛋白在两组之间的差异越大;纵坐标值越大,说明该蛋白在两组间的表达差异越显著,结果越可靠。结果显示，蛋白核磷蛋白 1(nucleophosmin, NPM1)、脂肪细胞膜关联蛋白 (adipocyte plasma membrane associated protein, APMAP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5(tartrate-resistant acid phosphatase, ACP5)、细胞色素 c 氧化酶 6A1(cytochrome c oxidase subunit

6A1, COX6A1)等蛋白在两组之间差异表达显著,其在 GIOP 发病机制中的作用值得深入探讨。见图 5、图 6。

2.3.3 差异表达蛋白的 GO 分析 GO 功能富集分析可以对差异蛋白的生物学功能进行富集，从而了解差异蛋白与哪些生物学功能显著相关。GO 分析包括分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)和生物过程(biological process,

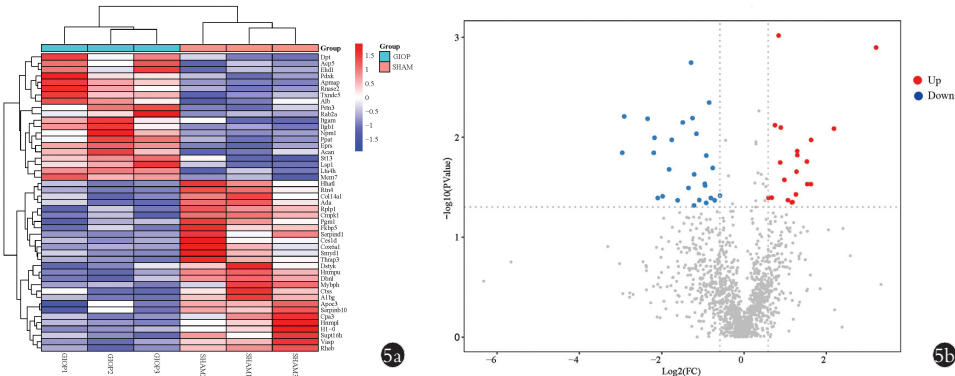
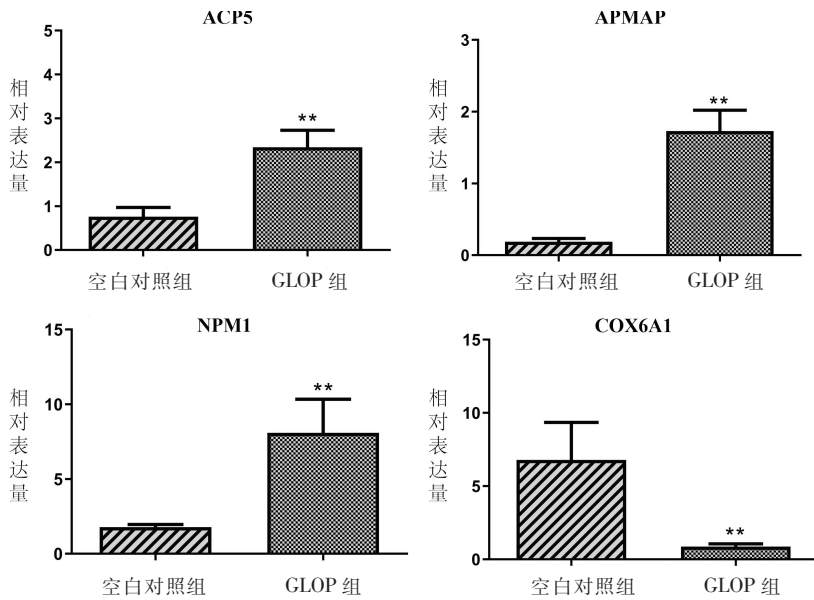


图 5 空白对照组与 GIOP 组大鼠差异表达蛋白图 5a. 聚类分析热图 5b. 火山图
Fig.5 Differentially expressed protein between sham group and GIOP group 5a. Cluster analysis heat map 5b. Volcano plot



注:与空白对照组相比,** $P<0.01$

图6 空白对照组与GIOP组大鼠单个差异表达蛋白定量图(每组样本数=3)

Fig.6 Digram of single quantitative differentially expressed protein between sham group and G1OP group ($n=3$)

BP)。结果显示,差异表达蛋白与核酸的代谢过程密切相关,包括核糖核苷酸、嘌呤核苷酸和磷酸核糖等。此外还与能量代谢有关。见图7。

2.3.4 差异表达蛋白的 KEGG 分析 KEGG 数据库可以对差异蛋白富集的通路进行分析。结果显示, 差异表达蛋白更多地富集在代谢相关的通路上, 包括氨基酸合成、嘌呤代谢及其他代谢等。同时, 差异表达蛋白也富集在免疫相关的通路上, 如血小板激活、白细胞迁移途径等, 证明 GIOP 的发生也与免疫炎症有关。此外, 有少部分差异表达蛋白富集在神经相关的通路上, 如帕金森病、神经退行性疾病等, 为骨质疏松与神经性疾病的共病的治疗提供了一定的参考。值得注意的是, GIOP 组中显著上调的 NPM1、磷酸核糖焦磷酸酶(phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase, PPAT) 等蛋白富集在 AMPK 信号通路上。见图 8。

2.3.5 差异表达蛋白的互作分析 PPI 的构建能够更加清晰地了解蛋白之间的相互作用方式,以揭示 GIOP 潜在的发病机制。通过 String 数据库分析及

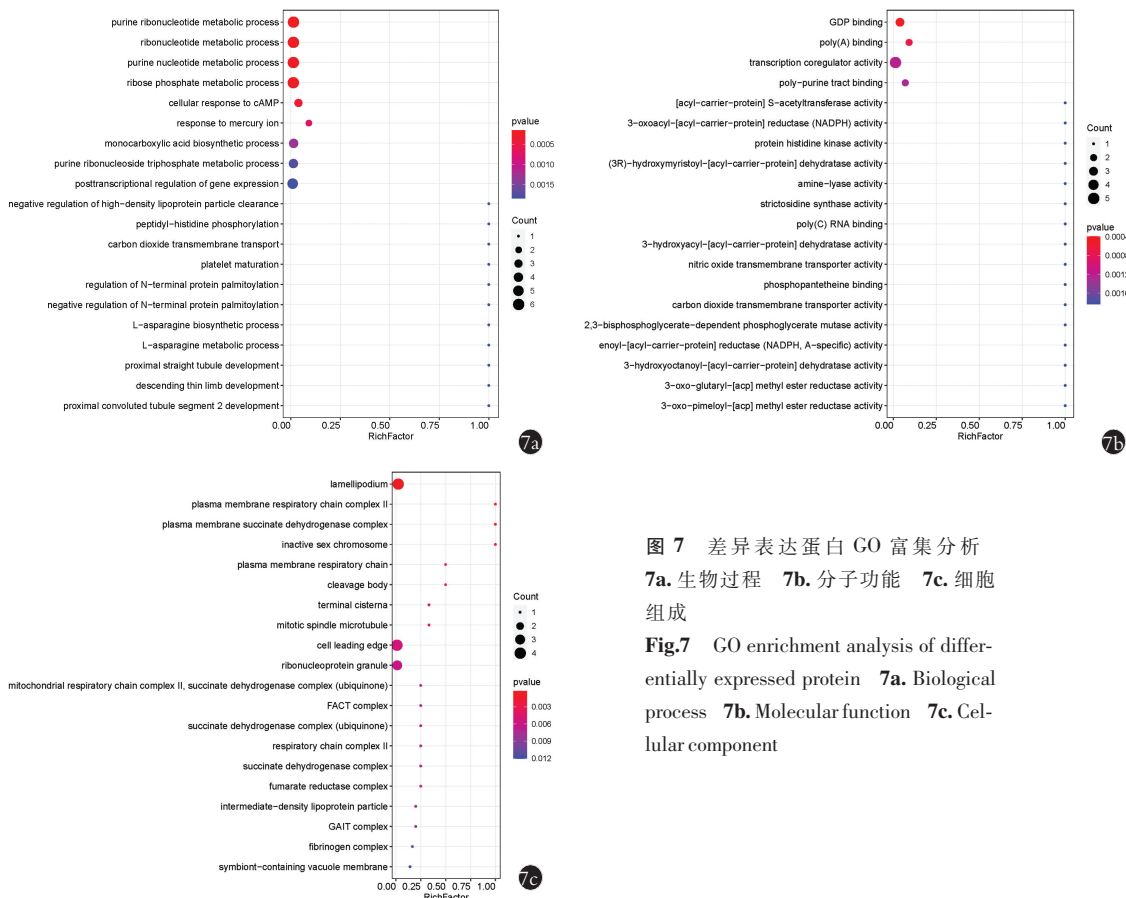


图 7 差异表达蛋白 GO 富集分析
7a. 生物过程 7b. 分子功能 7c. 细胞组成

Fig.7 GO enrichment analysis of differentially expressed protein **7a.** Biological process **7b.** Molecular function **7c.** Cellular component

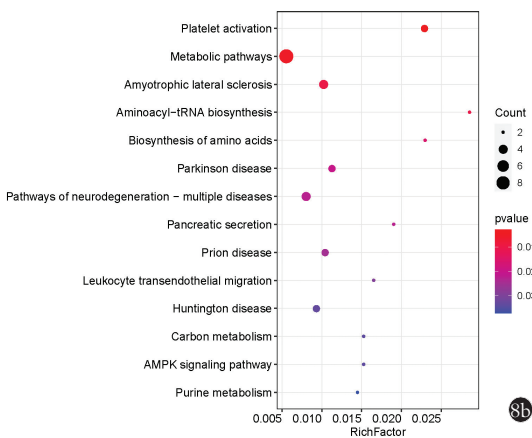
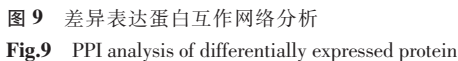


Fig.8 KEGG enrichment analysis of DEPs **8a.** Bar graph of TOP15 DEPs **8b.** Bubble Plot of TOP15 DEPs **8c.** Number of up-regulated and down-regulated DEPs

骨细胞形成因子,其过表达容易造成骨吸收加剧,破骨细胞活性增强,使得骨形成和骨吸收失衡,从而造成骨质疏松^[13]。本研究 ACP5 的 log₂FC 值在 1.5 以上,证明破骨细胞标志物 ACP5 在 GIOP 组和空白对照组间的表达差异显著。以上结果皆表明,GIOP 模

本研究旨在通过 Label-free 非标全蛋白组学手段探讨糖皮质激素性骨质疏松的发病机制, 并发现了一些在 GIOP 发病过程中起调控作用的关键蛋白。

HE 染色结果显示,GIOP 组大鼠骨小梁排列紊乱,分布不均且伴有断裂现象,且两组之间的骨空腔存在显著的定量差异,直接印证了 GIOP 模型的可信度。而与之相应的,在蛋白定量结果中,破骨细胞标志性因子 ACP5 的显著上调,侧面印证了骨质疏松模型的可信度。ACP5,又名 TRACP,是一种标志性的破



型建立成功,该蛋白定量结果准确、可信。

3.2 显著上调与下调的蛋白表达

3.2.1 APMAP 蛋白 相较于正常大鼠,GIOP 组大鼠 APMAP 蛋白表达上调最为显著 ($\log_2FC>3$)。APMAP 是一种糖基 II 型跨膜蛋白,主要分布在脂肪细胞的质膜和内质网中,与脂肪细胞生成和分化密切相关^[14-15]。目前,针对 APMAP 的研究主要集中于其在各种癌症发生和发展过程中的作用,包括宫颈癌、前列腺癌、结肠癌等。研究表明,APMAP 可通过参与脂质转运过程,提高癌细胞的迁移能力^[15-16]。APMAP 与脂质的形成关系密切,研究表明,采用基因敲除手段敲除 APMAP 基因后,小鼠的肥胖表型明显改善,具体体现为其对胰岛素敏感性增强、呼吸交换频率增加、炎症相关基因表达下降及脂肪细胞减少^[17]。此外,APMAP 在人类及肥胖大鼠模型中的表达显著上升,抑制 APMAP 在 3T3-L1 细胞中的表达会抑制细胞分化成脂肪细胞,APMAP 的表达受过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 调控^[18]。值得注意的是,在笔者此前的研究中,PPAR γ 在 GIOP 大鼠模型中的表达显著升高^[10],提示糖皮质激素可能是通过提高 PPAR γ 的表达,诱导 APMAP 过表达,造成体内的骨脂代谢紊乱,从而引发 GIOP。

3.2.2 COX6A1 蛋白 在所有定量蛋白中,COX6A1 蛋白下调最为显著。COX6A1 蛋白是线粒体电子传输中的末端氧化酶细胞色素 c 氧化酶的核编码多肽链之一,与线粒体功能和氧化应激密切相关^[19]。COX6A1 对活性氧损伤具有保护作用^[20],编码该蛋白的突变会导致腓骨肌萎缩^[21]。此外,COX6A1 是一种重要的抗凋亡因子,在溶酶体介导的细胞自噬途径中发挥关键作用。研究表明,药物吉非替尼的肝毒性机制是通过诱导 COX6A1 降解,从而破坏线粒体呼吸链复合物的功能,激活细胞凋亡,进而导致肝损伤^[22]。本实验中,GIOP 组大鼠中 COX6A1 蛋白表达的显著下调。据此,笔者推测 GCs 可能是经由自噬途径诱导 COX6A1 降解,从而引发骨细胞凋亡。笔者之前的实验中采用网络药理学结合实时荧光定量技术对大鼠骨中的靶基因进行了检测,值得注意的是,一些与自噬和细胞凋亡相关靶基因如细胞周期素 D1 (cyclin D1, CCND1) 和 SRC 等的表达在 GIOP 组和空白对照组大鼠间具有显著差异^[10]。故而推断,GCs 会引发细胞自噬,激活细胞凋亡,从而导致骨质疏松的发生。

3.3 生物信息学分析

KEGG 富集分析显示,差异表达蛋白多集中于代谢相关通路上,包括 EPRS、ACP5、COX6A1、IT-

GB1 等,侧面说明了 GCs 可以通过引发机体代谢紊乱从而诱发 GIOP。另外,AMPK 信号通路值得关注。AMPK 信号通路可调节细胞内 ATP 供应,通过影响细胞对葡萄糖的摄取和脂肪酸的氧化来调控糖脂代谢,是目前研发新型抗 II 型糖尿病药物的有效药理学靶点^[23]。而在本实验结果中,共 2 个差异表达蛋白富集于 AMPK 信号通路上。其中 NPM1 的差异表达倍数高,且在后续的 PPI 分析中 Degree 值也较高,提示其关键作用。NPM1 是一种丰富的核仁蛋白,与细胞内核糖体的成熟与转运、中间体的合成密切相关。NPM1 基因突变是急性髓细胞性白血病中一种重要的基因突变,临床上可作为诊断急性髓细胞性白血病的重要指标之一,也是治疗其他血液疾病中的重要靶点^[24-25]。目前,NPM1 蛋白在骨代谢过程中的研究较少,但有文献报导称,NPM1 基因的敲除会引起核转录因子 (nuclear factor κ B, NF- κ B) 转录的水平降低,且 NPM1 能够参与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等炎症因子的表达过程^[26]。由于 NF- κ B 与 TNF- α 炎症的发生发展密切相关,且能够参与破骨细胞的增殖分化过程,从而引起骨吸收加速,所以,AMPK 信号通路中 NPM1 蛋白表达的上调可增加 NF- κ B 与 TNF- α 的表达,从而加速骨吸收,引发骨代谢失衡。

PPI 结果显示 ALB、NPM1 和 ITGB1 等靶蛋白 Degree 值较高,提起其关键作用。其中 ALB 的 Degree 值最高。ALB 是人体血浆中含量最丰富的白蛋白,其可以作为运输载体直接与脂肪酸、金属离子等化合物结合,发挥抗炎、抗血栓等作用^[27]。ALB 可促进成骨细胞增殖分化。研究表明,当骨外损伤时,伤口处 ALB 的局部浓度显著增加,骨骼愈合速率与 ALB 的局部浓度成正比^[28]。临床研究发现,低 ALB 可增加患者骨折的风险及增加骨质疏松性椎体骨折的术后死亡率^[29-30]。

3.4 总结

为了探讨糖皮质激素性骨质疏松的发病机制,本研究通过 Label-free 非标全蛋白组学的研究手段,对地塞米松造模前后 SD 大鼠的骨蛋白表达进行了定量比较,在 47 个具有差异表达的靶蛋白中,造模后 APMAP 蛋白上调最为显著,COX6A1 蛋白下调最为显著。AMPK 信号通路有望作为潜在的信号通路揭示 GIOP 的发病机制,该信号通路上的 NPM1 在 GIOP 大鼠中表达显著升高,提示其可能为 AMPK 信号通路中介导 GIOP 发生的关键靶蛋白。PPI 分析中,靶蛋白 ALB 的 Degree 值最高,提示其与其他差异表达蛋白关系密切,且有望作为潜在的 GIOP 治疗靶点。

参考文献

[1] ZHANG S, LI D, YANG J Y, et al. Plumbagin protects against glucocorticoid-induced osteoporosis through Nrf-2 pathway [J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(4): 621-629.

[2] CHOTIYARNWONG P, MCCLOSKEY E V. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment [J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16(8): 437-447.

[3] 张学武, 姚海红, 梅轶芳, 等. 全国多中心使用糖皮质激素风湿病患者骨质疏松调查 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2017, 11(3): 277-284.

ZHANG X W, YAO H H, MEI Y F. Survey on glucocorticosteroid associated osteoporosis in patients with rheumatic diseases in China 2013 [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2017, 11(3): 277-284. Chinese.

[4] SEIBEL M J, COOPER M S, ZHOU H. Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013, 1(1): 59-70.

[5] CHEN Z G, XUE J Q, SHEN T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 329-338.

[6] KIM D, NGUYEN Q T, LEE J, et al. Anti-inflammatory roles of glucocorticoids are mediated by Foxp3+ regulatory T cells via a miR-342-dependent mechanism [J]. Immunity, 2020, 53(3): 581-596.

[7] BUCKLEY L, HUMPHREY M B. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2018, 379(26): 2547-2556.

[8] TSOURDI E, HOFBAUER L C. Denosumab: a new treatment option for glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018, 6(6): 428-429.

[9] TETTELBAUM S L. The conundrum of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8(8): 451-452.

[10] ZHANG F Q, LI Q Y, WU J S, et al. Total flavonoids of drynariae rhizoma improve glucocorticoid-induced osteoporosis of rats; UH-PLC-MS-based qualitative analysis, network pharmacology strategy and pharmacodynamic validation [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 920931.

[11] 方圣杰, 章轶立, 朱嘉, 等. 糖皮质激素抑制 Leptin, VEGF 蛋白表达诱导骨质疏松作用机制研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(3): 320-324.

FANG S J, ZHANG Y L, ZHU J, et al. Study on the mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis by inhibition of leptin and VEGF in rats [J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(3): 320-324. Chinese.

[12] CONSORTIUM U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D506-D515.

[13] BRIGGS T A, RICE G I, DALY S, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature [J]. Nat Genet, 2011, 43(2): 127-131.

[14] LUO G, MU J Z, WANG S H, et al. Association of blood APMAP content and meat quality trait in Rex rabbits [J]. Anim Biotechnol, 2022: 1-6. online ahead of print.

[15] ZHU X T, XIANG Z J, ZOU L X, et al. APMAP promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer cells by activating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. J Cancer, 2021, 12(20): 6265-6273.

[16] JIANG S Y, WANG X T, SONG D L, et al. Cholesterol induces epithelial-to-mesenchymal transition of prostate cancer cells by suppressing degradation of EGFR through APMAP [J]. Cancer Res, 2019, 79(12): 3063-3075.

[17] PESSENTHEINER A R, HUBER K, PELZMANN H J, et al. APMAP interacts with lysyl oxidase-like proteins, and disruption of Apmmap leads to beneficial visceral adipose tissue expansion [J]. FASEB J, 2017, 31(9): 4088-4103.

[18] BOGNER-STRAUSS J G, PROKESCH A, SANCHEZ-CABO F, et al. Reconstruction of gene association network reveals a transmembrane protein required for adipogenesis and targeted by PPAR γ [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(23): 4049-4064.

[19] XU J, LI D, LU Y, et al. A β monomers protect lens epithelial cells against oxidative stress by upregulating CDC25B [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 175: 161-170.

[20] EUN S Y, WOO I S, JANG H S, et al. Identification of cytochrome c oxidase subunit 6A1 as a suppressor of Bax-induced cell death by yeast-based functional screening [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(1): 58-63.

[21] TAMIYA G, MAKINO S, HAYASHI M, et al. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease [J]. Am J Hum Genet, 2014, 95(3): 294-300.

[22] LUO P H, YAN H, DU J X, et al. PLK1 (polo like kinase 1)-dependent autophagy facilitates gefitinib-induced hepatotoxicity by degrading COX6A1 (cytochrome c oxidase subunit 6A1) [J]. Autophagy, 2021, 17(10): 3221-3237.

[23] GARCIA D, SHAW R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. Mol Cell, 2017, 66(6): 789-800.

[24] CHIARELLA S, DE COLA A, SCAGLIONE G L, et al. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(5): 3228-3239.

[25] GRISENDI S, BERNARDI R, ROSSI M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis [J]. Nature, 2005, 437(7055): 147-153.

[26] LIN J H, KATO M, NAGATA K, et al. Efficient DNA binding of NF- κ B requires the chaperone-like function of NPM1 [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(7): 3707-3723.

[27] DE SIMONE G, DI MASI A, ASCENZI P. Serum albumin: a multifaceted enzyme [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10086.

[28] HORVÁTHY D B, SIMON M, SCHWARZ C M, et al. Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering [J]. Biofactors, 2017, 43(3): 315-330.

[29] KUNUTSOR S K, VOUTILAINEN A, WHITEHOUSE M R, et al. Serum albumin and future risk of hip, humeral, and wrist fractures in Caucasian men: new findings from a prospective cohort study [J]. Med Princ Pract, 2019, 28(5): 401-409.

[30] OHBA T, YOKOMICHI H, KOYAMA K, et al. Factors affecting postoperative mortality of patients with insufficient union following osteoporotic vertebral fractures and impact of preoperative serum albumin on mortality [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2020, 21(1): 528.

(收稿日期: 2022-12-26 本文编辑: 连智华)