

# 蛋白质组学相关技术在骨关节炎研究中的应用与进展

潘 丁, 雷光华(中南大学湘雅医院骨科, 湖南省长沙市 410008)

## 文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 新兴的蛋白质组学相关技术已经成为研究包括骨关节炎的临床各类慢性疾病筛查和早期诊断蛋白质分子生物标记物的有效工具, 同时也为骨关节炎发生和发展的具体机制研究提供了可靠的技术平台。
- 2 文章增加的新信息: 骨关节炎关节软骨、滑膜和滑液组织与其同起源的正常组织的比较蛋白质组学研究为骨关节炎分子标志物的确定和靶向治疗药物的设计提供了最直接和最合理的研究途径。生物信息学的发展已给蛋白质组研究提供了更方便有效的计算机分析软件。
- 3 临床应用的意义: 人类基因组计划的完成, 科学家们开始着眼于下一步解释生物系统的正常和异常功能。因此, 在这些研究步骤中的一个焦点是关于蛋白质的功能。随着后基因组时代的进入, 已经发展出了新的工具来研究蛋白的表达、蛋白的相互作用以及确定骨关节炎病诊断和预后的新型生物标记物。

## 关键词:

组织构建; 组织工程; 综述; 骨关节炎; 蛋白质组; 分子标志物; 生物信息; 国家自然科学基金

## 主题词:

骨关节炎; 蛋白质组; 质谱法

## 基金资助:

国家自然科学基金项目(30300396)

## 摘要

**背景:** 蛋白质组学研究已经彻底改革了研究疾病的方式, 提供了解开骨关节炎病理生理机制的途径。

**目的:** 了解蛋白质组相关技术的研究成果及其在骨关节炎早期诊断、治疗效应和发病机制的分子标志物研究取得的进展。

**方法:** 通过中国期刊全文数据库、中国生物医学文献数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和万方数据知识服务平台, 手工和在线检索已发表的关于蛋白质组学技术和骨关节炎相关的研究。英文文献采用以下数据库检索: MEDLINE 数据库, Elsevier: ScienceDirect 数据库, BIOSIS Previews 数据库。纳入文献为采用严格相关和信息可靠的研究。

**结果与结论:** 蛋白质组学技术的成果为骨关节炎早期诊断、治疗效应和发病机制的分子标志物研究取得了一定的进展。研究证实了蛋白质组学在筛选骨关节炎分子标志物的研究中有较大的应用价值, 其相对于单一蛋白鉴定具有通量高、速度快的特点, 对骨关节炎的诊断和药物靶点鉴定发挥了重要作用。蛋白质组数据库是蛋白质组研究水平的标志和基础。生物信息学的发展已给蛋白质组研究提供了更方便有效的计算机分析软件。

潘丁, 雷光华. 蛋白质组学相关技术在骨关节炎研究中的应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(24): 3912-3918.

## Progress of proteomics technology and its application in osteoarthritis

Pan Ding, Lei Guang-hua (Department of Orthopedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Proteomics research has thoroughly reformed the way to study the diseases, and provides the understanding of the mechanism of osteoarthritis pathological physiology.

**OBJECTIVE:** To focus on the research progress of proteomics technology in osteoarthritis early diagnosis, therapeutic effect and pathogenesis molecular markers.

**METHODS:** Researches on proteomics technology and osteoarthritis published in journals were identified manually and on-line retrieved by using SinoMed, Chongqing VIP database, Wanfang Data and CNKI database. Those researches reported in English journals were identified using MEDLINE, Elsevier: ScienceDirect, and BIOSIS Previews database. Selected studies should describe a related and reliable study defined by strict screening and diagnostic criteria.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Proteomics technology for the osteoarthritis in early diagnosis, treatment effect and pathogenesis molecular markers has achieved a certain progress. Research showed that proteomics has great application value in screening osteoarthritis molecular markers, and has the characteristics of high flux and high speed compared with single protein identification, so it plays an important role in the diagnosis of osteoarthritis and drug target identification. Proteome database is a sign of proteome research level. The development of the bioinformatics has provided a more convenient and effective computer analysis software for proteomic study.

Pan Ding, M.D., Physician, Department of Orthopedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Corresponding author: Lei Guang-hua, M.D., Professor, Department of Orthopedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Accepted: 2014-05-23

**Subject headings:** osteoarthritis; proteomics; mass spectrometry  
**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 30300396

Pan D, Lei GH. Progress of proteomics technology and its application in osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(24):3912-3918.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是一种以反复发作的关节疼痛和逐渐出现的活动障碍为主要表现的慢性退行性关节疾病,是一种常见的衰老性疾病。随着社会老龄化人口的增加,骨关节炎的发病率也逐年上升,目前已跃居全球常见病和多发病第7位。最近一项由北京医院联合上海、广东、西安等地医疗机构研究人员完成的课题研究结果表明<sup>[1]</sup>: 全国6大地区40岁以上人群骨关节炎患病率为46.3%,其中男性为41.6%,女性为50.4%。约80%骨关节炎患者存在一定程度的运动受限,25%的骨关节炎患者日常生活受到明显影响,严重危害中老年人身心健康<sup>[2-3]</sup>。

由于目前尚缺乏有效的药物干预手段,骨关节炎的后期治疗往往需要进行人工关节置换,其医疗费用和相关并发症都给患者和社会带来巨大的压力和负担。因此,明确骨关节炎发病机制,寻找到有效的治疗靶点,在疾病早期进行干预治疗显得尤其重要。但到目前为止,骨关节炎的发病机制尚不十分清楚。一般认为,可能是全身和局部诸多综合因素,包括长期应力不平衡、炎症因子等刺激导致的软骨代谢异常所致<sup>[4-6]</sup>。

近年来,随着对骨关节炎发病机制研究的深入,学者们逐渐接受骨关节炎发生为关节腔早期微环境改变的结果,多种病理生理过程参与其中,包括关节腔内滑液氧化应激、炎症反应以及蛋白酶系统激活<sup>[7-9]</sup>。其中炎症反应最受学者关注, Pelletier等<sup>[10]</sup>认为骨关节炎为一种慢性炎症性疾病,进一步研究显示发生在滑膜组织的炎症是骨关节炎发生的触发事件,为最早期病理改变<sup>[11]</sup>。早期骨关节炎患者滑膜组织即有炎症递质过度表达,滑膜细胞与浸润的白细胞通过释放白细胞介素 $1\beta$ , 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与基质金属蛋白酶降解软骨蛋白聚糖、胶原纤维、软骨细胞外基质发挥软骨破坏作用<sup>[12]</sup>。同时这些促炎因子可激活下游活性分子,如前列腺素E<sub>2</sub>、一氧化氮,进一步促进骨关节炎发生<sup>[13-14]</sup>。

此外Koopman<sup>[15]</sup>研究发现骨关节炎患者中软骨基质代谢产物可释放入滑液,经滑膜衬里细胞吞噬处理后启动或加剧滑膜炎症反应,导致更剧烈的软骨破坏。既往研究显示,骨关节炎患者关节软骨和滑液中骨桥蛋白mRNA水平及蛋白表达较正常人均明显增高,骨桥蛋白的蛋白和mRNA水平增高与骨关节炎的病变严重程度呈正相关<sup>[16-17]</sup>。本课题组研究发现,与正常人比较,骨关节炎患者滑液中骨桥蛋白水平明显增高,并与关节软骨中骨桥蛋白水平呈正相关;骨关节炎患者关节滑液骨桥蛋白水平与骨关节炎K-L分级呈正相关,关节软骨骨桥蛋白表达与关

节软骨Mankin病理评分呈正相关<sup>[18]</sup>。

综上所述,骨关节炎患者关节中差异表达的蛋白与骨关节炎的发病和进展有关。但这些指标往往缺乏检测要求的敏感性与特异性,且易受治疗药物、样本处理、其他有关疾病、年龄和性别、创伤等的影响,难以进行临床应用。

随着人类基因组计划的逐步完成,又进一步提出了后基因组计划,蛋白质组研究是其中一个很重要的内容,目前已成为疾病研究的热点。蛋白质组的研究不仅能为生命活动规律提供物质基础,也能为众多疾病机制的阐明及攻克提供理论根据和解决途径。通过对正常个体及病理个体间的蛋白质组比较分析,可以找到某些具备疾病特异性的蛋白质分子,它们可成为新药物设计的分子靶点,或者也会为疾病的早期诊断提供分子标志。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 分别以“osteoarthritis”, “OA”, “degenerative arthritis”, “degenerative joint disease”, “proteomics”, “骨关节炎”, “骨性关节炎”, “退行性骨关节病”, “退行性关节炎”或“蛋白质组学”等为检索词,通过联机检索MEDLINE数据库、Elsevier: ScienceDirect数据库、BIOSIS Previews数据库、中国期刊全文数据库、中国生物医学文献数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和万方数据知识服务平台,文献追溯和手工检索等方法,收集截至2014年3月20日国内外公开发表的有关蛋白质组学技术在骨关节炎中的研究文献,然后用手工方法查找原文。

### 1.2 检索方法

**纳入标准:** 描述蛋白质组学相关技术的最新研究,以及采用蛋白质组学技术诊断和筛查骨关节炎分子标志物的最新研究。

**排除标准:** 不能从文献和作者处获取必需的足够信息。

**质量评估:** 每篇文献获取全文后由第一作者分析,确定纳入后,由第二作者根据文献信息完整度及发表期刊评估质量。根据纳入排除标准最终保留60篇文献进行分析。

## 2 结果 Results

**2.1 蛋白质组学概述** 蛋白质组是指由一个基因组,或一个细胞、组织表达的所有蛋白质<sup>[19]</sup>。蛋白质组的概念与基因组的概念有许多差别,它随着组织结构、甚至环境状态的不同而改变。一个基因在转录后可以多种mRNA形式进行剪接,并且同一个蛋白质也可能以许多形式进行翻译后

的修饰。因此一个蛋白质组并不是一个基因组的直接产物, 蛋白质组中蛋白质的数目可以超过基因组的数目<sup>[20]</sup>。蛋白质组学研究集中于动态地描述基因的各种调节, 对基因的表达在蛋白质水平上进行定量地测定, 鉴定药物和疾病对人体组织的影响, 以及尝试解释基因表达调控的机制<sup>[21-22]</sup>。蛋白质组学研究是基因产物图谱和蛋白质(多肽)图谱技术的一种延伸, 基因产物图谱依靠多种物理化学方式分离后的分析, 如质谱技术和氨基酸组分析等<sup>[23]</sup>; 而蛋白质(多肽)图谱则依靠双向凝胶电泳技术和进一步的图象分析。

国际上蛋白质组学研究已经取得了一定的进展, 不论是在基础理论方面还是技术方法上, 都在不断完善和进步。目前已经建立了多种蛋白质组学数据库。1996年, 澳大利亚建立了世界上第一个蛋白质组研究中心: Australia Proteome Analysis Facility (APAF)<sup>[24]</sup>。2001年4月, 在美国成立了国际人类蛋白质组研究组织(Human Proteome Organization, HUPO)<sup>[25]</sup>, 随后欧洲、亚太地区都相继成立了区域性蛋白质组研究组织, 尝试通过合作的方式, 融合各方面的力量, 完成人类蛋白质组计划(Human Proteome Project)<sup>[26]</sup>。

## 2.2 蛋白质组学研究内容

**2.2.1 蛋白质鉴定** 利用1D电泳和2D电泳并结合免疫组织化学和Western blot等技术, 或者利用免疫共沉淀、蛋白质芯片及抗体芯片等技术对组织中的蛋白质进行筛查和鉴定<sup>[27]</sup>。

**2.2.2 蛋白质翻译后修饰** 蛋白质在经过mRNA表达后, 还需经历复杂的翻译后修饰如糖基化, 磷酸化和酶原激活等。翻译后修饰是调节蛋白质功能的一种重要途径, 因此对蛋白质翻译后修饰的研究对阐明蛋白质的功能具有重要作用<sup>[28]</sup>。

**2.2.3 蛋白质功能分析** 主要包扩酶活性的分析和鉴定对应酶的底物, 以及细胞因子功能网络或信号转导通路分析。利用的技术主要包括基因敲除技术和反义表达技术。此外研究表达蛋白在细胞中的定位在一定程度上也有益于蛋白质的功能分析, 比如Clontech公司研发的荧光蛋白表达系统就是研究细胞内蛋白质定位的一种工具<sup>[29]</sup>。


**2.2.4 靶蛋白的寻找** 蛋白质是很多药物的单一或复合组分, 而很多药物的受体或靶分子也是蛋白质。除了直接作用于靶蛋白外, 也可以通过靶蛋白的研究来设计出干预蛋白质-蛋白质相互作用的药物分子<sup>[30]</sup>。

了解和探索人类不同生长、发育期和不同生理、病理条件下及不同细胞类型的基因表达特点, 对于基础和临床医学病理机制研究具有特别重要的意义。通过相关蛋白质组学研究可以找到直接与特定的与生理病理状态相关的蛋白质分子, 为进一步设计作用于靶蛋白的药物奠定基础<sup>[31]</sup>。

**2.3 蛋白质组学技术分类** 蛋白质组学技术的发展已经成为现代生物技术快速发展的重要支撑, 在近年来骨代谢和骨生物学研究方向取得了关键性的突破, 尤其是在骨组织相关细胞的胞内信号传导方面取得了一定的进展<sup>[32]</sup>。

**2.3.1 双向凝胶电泳** 双向凝胶电泳的原理是第一向基于蛋白质的不同等电点采用等电聚焦分离, 第二向则按不同的分子量采用SDS-PAGE分离, 把复杂蛋白混合物中的总蛋白在二维平面上分离。由于双向电泳技术在蛋白质组与医学研究中所处的重要位置, 它可用于蛋白质转录及转录后修饰研究、蛋白质组的比较和蛋白质间的相互作用、细胞分化凋亡研究、致病机制及耐药机制的研究、蛋白纯化等许多方面。近年来经过多方面改进已成为研究蛋白质组的最有使用价值的核心方法<sup>[33]</sup>。

**2.3.2 等电聚焦** 等电聚焦是一种利用有pH梯度的介质分离不同等电点蛋白质的电泳技术。等电聚焦凝胶电泳依据蛋白质分子的静电荷或等电点进行分离, 蛋白质分子在含有载体两性电解质形成的一个连续而稳定的线性pH梯度中电泳。蛋白质分子在偏离其等电点的pH条件下带有电荷, 因此可以在电场中移动; 当蛋白质迁移至其等电点位置时, 其静电荷数为零, 在电场中不再移动, 据此原理将蛋白质分离<sup>[34]</sup>。

**2.3.3 生物质谱** 生物质谱技术是蛋白质组学研究中最重要鉴定技术, 其基本原理是样品分子离子化后, 根据不同离子之间的荷质比(M/E)的差异来分离并确定分子量。对于经过双向电泳分离的目标蛋白质用胰蛋白酶酶解(水解Lys或Arg的-C端形成的肽键)成肽段, 对这些肽段用质谱进行鉴定与分析<sup>[35]</sup>。目前常用的质谱技术包括以下两种: 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾质谱(ESI-MS)(1)。

**2.3.4 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱** 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱的基本原理是将分析物分散在基质分子中并形成晶体, 用激光(337 nm的氮激光)照射晶体时, 基质分子吸收激光能量, 样品解吸附, 基质-样品之间发生电荷转移使样品分子电离。它从固相标本中产生离子, 并在飞行管中测定其分子量, 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱一般用于肽质量指纹图谱, 每次分析需3-5 min, 可以精确测量肽段质量<sup>[36]</sup>。

**2.3.5 电喷雾质谱** 电喷雾质谱是利用高电场使质谱进样端的毛细管柱流出的液滴带电, 在N<sub>2</sub>气流的作用下, 液滴溶剂蒸发, 表面积缩小, 表面电荷密度不断增加, 直至产生的库仑力与液滴表面张力达到雷利极限, 液滴爆裂为带电的子液滴, 这一过程不断重复使最终的液滴非常细小呈喷雾状, 这时液滴表面的电场非常强大, 使分析物离子化并以带单电荷或多电荷的离子形式进入质量分析器。电喷雾质谱从液相中产生离子, 肽段的混合物经过液相色谱分离后, 经过偶联的与在线连接的离子阱质谱分析, 给出肽片段的精确的氨基酸序列, 但是分析时间一般较长<sup>[37]</sup>。

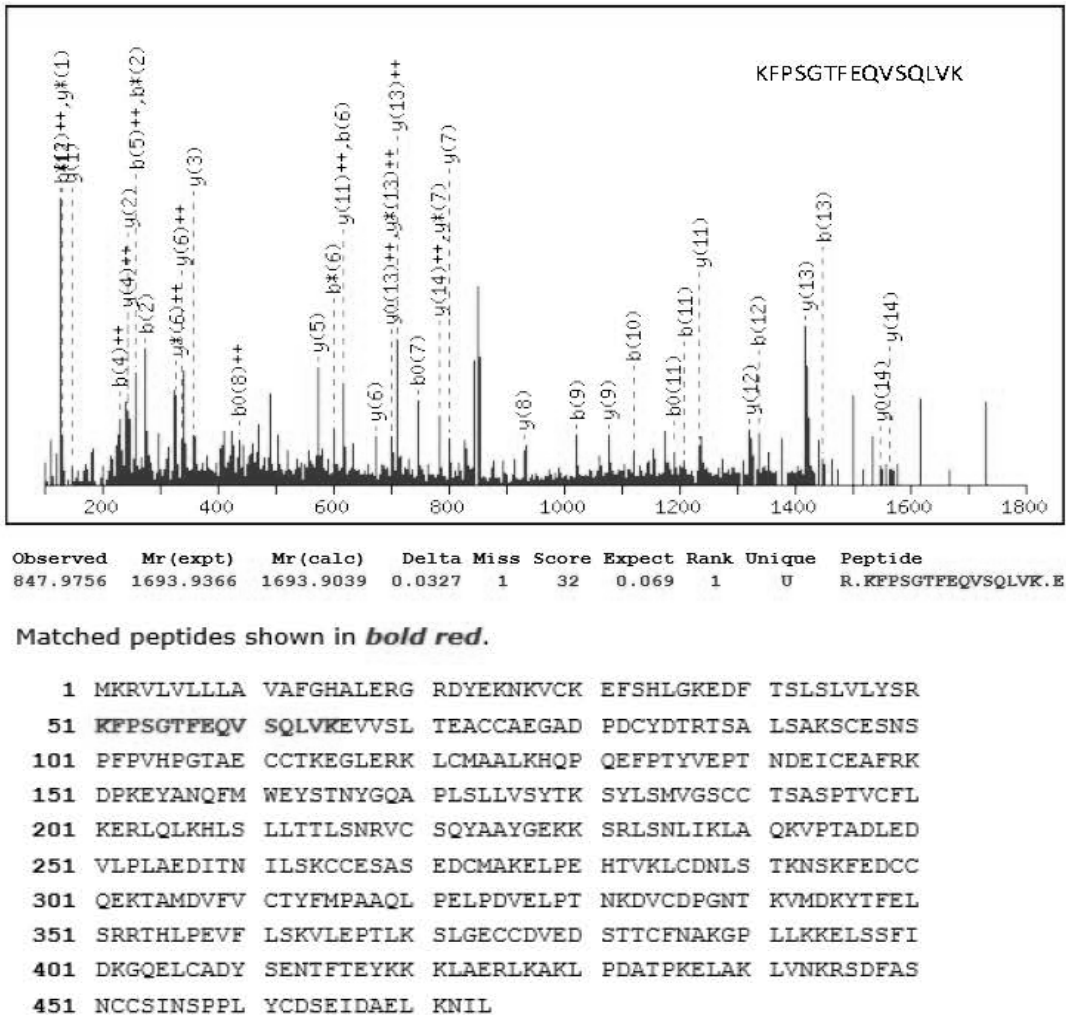


图1 本课题组前期采用质谱技术得到的骨关节炎滑液中VTDB\_HUMAN蛋白肽段(KFPSGTFEQVSQLVK)的二级质谱图和ESI-Q-TOF-MS鉴定结果

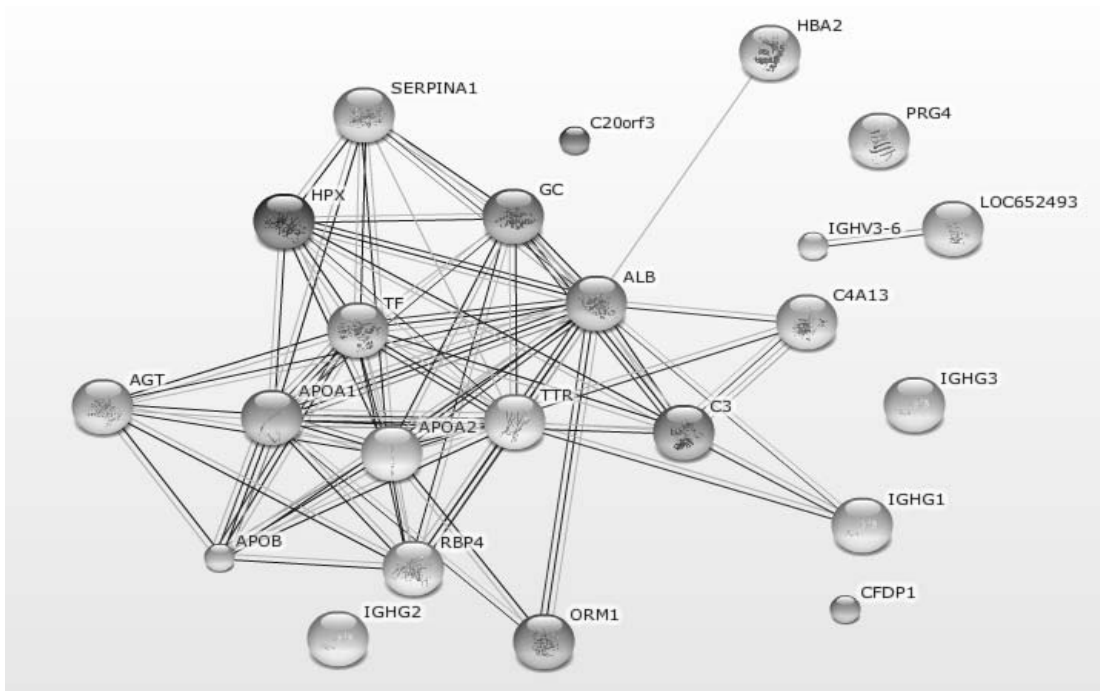


图2 本课题组前期通过生物信息学分析蛋白质组学技术鉴定的差异蛋白预测功能相关性网络图

目前,许多实验室两种质谱方法连用,获得有意义的蛋白质的肽段序列,设计探针或引物来获得有意义的基因。随着蛋白质组研究的深入,又有多种新型质谱技术出现,主要是在上述质谱技术的基础上进行改进与重新组合<sup>[38]</sup>。

**2.4 蛋白质组学技术在骨关节炎中的应用** 随着人类基因组计划在2003年完成,蛋白质组学研究正在开始改变研究疾病的方式,提供了解开骨关节炎病理生理机制的途径。这个新的领域拓宽了研究骨关节炎病因和预后的视野。蛋白质组学技术的成果为骨关节炎早期诊断、治疗效应和发病机制的分子标志物研究取得了一定的进展<sup>[39]</sup>。

有研究通过血清蛋白质组研究发现,糖蛋白 Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1)在血清中的水平与骨关节炎的严重程度相关<sup>[40]</sup>。另有研究通过差异蛋白质组分析,揭示了 matrilin-3 (MATN3)作为软骨表型的参与调节分子,在关节软骨中的表达上调可能是导致关节软骨退变的一种原因<sup>[41]</sup>。此外,有研究利用双向凝胶电泳和MALDI-TOF/TOF蛋白质组学技术分析骨关节炎软骨细胞的线粒体蛋白差异,确定了73种显著性差异表达的蛋白,其中23种已经被证实属于线粒体<sup>[42]</sup>。

Nemirovskiy等<sup>[43]</sup>通过免疫亲和液相色谱-质谱/质谱技术定量了人类尿液中的II型胶原,他们认为II型胶原的降解与骨关节炎的疾病状态有关,因此尿液中的II型胶原量可能作为骨关节炎的分子标志,而II型胶原可作为新的药物靶点;同时基质金属蛋白酶是催化胶原降解的酶,因此可作为治疗骨关节炎的药物。

最近,有研究通过双向凝胶电泳分析20例骨关节炎患者和20名健康对照者血清发现,8种蛋白在骨关节炎患者中上调,7种蛋白下调,其中作者报告称首次证实了触珠蛋白(haptoglobin)是一种骨关节炎依赖性上调的蛋白<sup>[44]</sup>。而另有研究者则采用同位素标记定量分析关节软骨,显示在骨关节炎软骨中55种蛋白表达上调,21种蛋白表达下调,该研究者选取了3种骨关节炎中未报道的蛋白通过Western Blot进一步获得了证实<sup>[45]</sup>。更进一步,有研究分析了类风湿性关节炎和骨关节炎患者的滑液,发现了575种蛋白,其中有135种蛋白差异表达 $\geq 3$ 倍,研究者发现了CD5分子样蛋白,可溶性清道夫受体富半胱氨酸包含域蛋白(soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein)和TTK蛋白激酶均在骨关节炎患者滑液中相对于类风湿性关节炎表达上调<sup>[46]</sup>。

综上所述,研究证实了蛋白质组学在筛选骨关节炎分子标志物的研究中有较大的应用价值,其相对于单一蛋白鉴定具有通量高、速度快的特点,对骨关节炎的诊断和药物靶点鉴定发挥了重要作用。

### 3 展望 Prospect

骨关节炎是一种常见的影响关节的肌肉骨骼疾病。

除了有高的患病率,骨关节炎的病因至今仍不明确。研究骨关节炎的分子机制将显著提高诊断和临床管理水平<sup>[47]</sup>。

蛋白质组学在应用到骨关节炎领域是一项新兴的技术。人类基因组计划的完成已经刺激科学家们开始着眼于下一步,即解释生物系统的正常和异常功能。因此,在这些步骤中的其中一个焦点是关于蛋白质的功能。随着后基因组时代的进入,已经发展出了新的令人兴奋的工具来研究蛋白的表达、蛋白的相互作用以及确定骨关节炎病诊断和预后的新型生物标志物<sup>[48]</sup>。

近两年来蛋白质组研究技术已被应用到各种生命科学领域,如细胞生物学、神经生物学等。在研究对象上,覆盖了原核生物、真核生物、植物和动物等范围,涉及到各种重要的生物学现象,如信号转导、细胞分化、蛋白质折叠等等。在未来的发展中,蛋白质组学的研究领域将更加广泛<sup>[49]</sup>。

蛋白质组学的研究方法存在多种技术并存,各有优势和局限的特点,而难以像基因组研究一样形成比较一致的方法。除了发展新方法外,更强调各种方法间的整合和互补,以适应不同蛋白质的不同特征。双向凝胶电泳存在繁琐、不稳定和低灵敏度等缺点。发展可替代或补充双向凝胶电泳的新方法已成为蛋白质组研究技术最主要的目标<sup>[50]</sup>。目前,二维色谱、二维毛细管电泳、液相色谱-毛细管电泳等新型分离技术都有补充和取代双向凝胶电泳之势<sup>[51-53]</sup>。另一种策略则是以质谱技术为核心,开发质谱鸟枪法、毛细管电泳-质谱联用等新策略直接鉴定混合全蛋白质酶解产物<sup>[54]</sup>。随着对大规模蛋白质相互作用研究的重视,发展高通量和高精度的蛋白质相互作用检测技术也被科学家所关注。此外,蛋白芯片的发展也十分迅速,并已经在临床诊断中得到应用<sup>[55]</sup>。

蛋白质组数据库是蛋白质组研究水平的标志和基础。生物信息学的发展已给蛋白质组研究提供了更方便有效的计算机分析软件;瑞士的SWISS-PROT拥有目前世界上最大、种类最多的蛋白质组数据库<sup>[56]</sup>。特别值得注意的是蛋白质质谱鉴定软件和算法发展迅速,如SWISS-PROT、Rockefeller大学、UCSF等都有自主的搜索软件和数据管理系统。最近发展的质谱数据直接搜寻基因组数据库使得质谱数据可直接进行基因注释、判断复杂的拼接方式<sup>[57-59]</sup>。随着基因组学的迅速推进,会给蛋白质组研究提供更多更全的数据库。另外,对肽序列标记的从头测序软件也十分引人注目<sup>[60]</sup>。通过生物信息学分析蛋白质组学技术鉴定的差异蛋白预测功能相关性网络图见**图2**。

综上,蛋白质组学技术将成为寻找骨关节炎分子标志和药物靶标最有效的方法之一。在对骨关节炎等人类重大慢性疾病的临床诊断和治疗方面蛋白质组技术也

有十分诱人的前景,目前正投入大量的人力和物力进行蛋白质组学方面的应用性研究。另外,蛋白质组学与其他学科的交叉也将日益显著和重要,这种交叉是新技术新方法的源泉,特别是蛋白质组学与其他大规模科学如基因组学、生物信息学等领域的交叉,构成组学生物技术研究体系,将成为未来骨关节炎研究中最令人激动的新前沿。

**作者贡献:** 设计、实施者为第一作者潘丁、评估者为通讯作者雷光华。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 等电聚焦凝胶电泳-依据蛋白质分子的静电荷或等电点进行分离,蛋白质分子在偏离其等电点的 pH 条件下带有电荷,因此可以将蛋白质进行分离。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 李宇华,张耀男,张毅,等.国内六大行政区域六城市中老年人膝关节炎骨性关节炎患病危险因素比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(39):7758-7760.
- [2] Muraki S, Oka H, Akune T, et al. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. *Osteoarthritis and cartilage*.2009;17(9):1137-1143.
- [3] 王伟,王坤正,党小谦,等.中老年人人群骨关节炎的流行病学研究[J]. 中国老年学杂志,2007,27(6):566-568.
- [4] Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*.2007;213(3):626-634.
- [5] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. 2011;7(1): 33-42.
- [6] Buckland J. Osteoarthritis: Complement-mediated inflammation in OA progression. *Nature reviews. Rheumatology*.2012;8(1):2.
- [7] Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*.2005;4(9):1263-1267.
- [8] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*.2007;74(4):324-329.
- [9] Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009;179(1):10-24.
- [10] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(6):1237-47.
- [11] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*.2006;8(6):R187
- [12] Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2011;23(5):471-478.
- [13] Fiorito S, Magrini L, Adrey J, et al. Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy. *Rheumatology (Oxford)*.2005;44(2):164-171.
- [14] Pearle AD, Scanzello CR, George S, et al. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(5):516-23.
- [15] Koopman W. *Arthritis and Allied Conditions, 14th ed. A Textbook of Rheumatology, vol.2*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.2001:2167-2209.
- [16] Hasegawa M, Segawa T, Maeda M, et al. Thrombin-cleaved osteopontin levels in synovial fluid correlate with disease severity of knee osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2011;38(1): 129-134.
- [17] Honsawek S, Tanavalee A, Sakdinakittakoon M, et al. Correlation of plasma and synovial fluid osteopontin with disease severity in knee osteoarthritis. *Clinical biochemistry*. 2009;42(9):808-812.
- [18] Gao SG, Li KH, Zeng KB, et al. Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):82-87.
- [19] Wilkins, M. Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6(6):599-603.
- [20] Osman KT, Edwards A. Structural genomics of human proteins. *Methods Mol Biol*. 2014;1140:27-34.
- [21] Benevento M, Di Palma S, Snijder J, et al. Adenovirus Composition, Proteolysis and Disassembly Studied by in-depth Qualitative and Quantitative Proteomics. *J Biol Chem*. 2014;289(16):11421-11430. .
- [22] Baker P R, Chalkley R J. MS-Viewer: A Web Based Spectral Viewer for Proteomics Results. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13(5):1392-1396.
- [23] Dunn MJ. PROTEOMICS Reviews 2014. *Proteomics*. 2014; 14(4-5):333-337.
- [24] Heazlewood JL, Millar AH. AMPDB: The Arabidopsis Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Res*.2005, 33(Database issue), D605-610.
- [25] Brower V. Proteomics: biology in the post-genomic era. Companies all over the world rush to lead the way in the new post-genomics race. *EMBO Rep*.2001;2(7):558-560.
- [26] Kelleher NL. A cell-based approach to the human proteome project. *J Am Soc Mass Spectrom*.2012;23(10):1617-1624.
- [27] Noordin R, Othman N. Proteomics technology - a powerful tool for the biomedical scientists. *Malays J Med Sci*. 2013; 20(2):1-2.
- [28] Haft DH, Payne SH, Selengut JD. Archaeosortases and exosortases are widely distributed systems linking membrane transit with posttranslational modification. *J Bacteriol*. 2012; 194(1):36-48.
- [29] Cao W, Epstein C, Liu H, et al. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics*. 2004;5(1):26.
- [30] Scott DE, Ehebauer MT, Pukala T, et al. Using a fragment-based approach to target protein-protein interactions. *Chembiochem*.2013;14(3):332-342.

- [31] Qing LS, Tang N, Xue Y, et al. Identification of Enzyme Inhibitors Using Therapeutic Target Protein - Magnetic Nanoparticle Conjugates. *Anal Methods*. 2012;4(6): 1612-1615.
- [32] Lee JH, Cho JY. Proteomics approaches for the studies of bone metabolism. *BMB Rep*. 2014;47(3):141-148.
- [33] Vensel WH, Tanaka CK, Altenbach SB. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteome Sci*.2014;12(1):8.
- [34] Zhu G, Sun L, Yang P.On-line amino acid-based capillary isoelectric focusing-ESI-MS/MS for protein digests analysis. *Anal Chim Acta*.2012;750:207-211.
- [35] Xu M, Yang L, Wang Q. Chemical interactions of mercury species and some transition and noble metals towards metallothionein (Zn7MT-2) evaluated using SEC/ICP-MS, RP-HPLC/ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Metallomics*. 2013;5(7):855-860.
- [36] Balazova T, Makovcova J, Sedo O, et al. The influence of culture conditions on the identification of Mycobacterium species by MALDI-TOF MS profiling. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;353(1):77-84.
- [37] Khemchyan LL, Khokhlova EA, Seitkalieva MM.Efficient Sustainable Tool for Monitoring Chemical Reactions and Structure Determination in Ionic Liquids by ESI-MS. *Chemistry Open*.2013;2(5-6):208-214.
- [38] Suzuki T, Maeda T, Grant S, et al. Confirmation of Fructans biosynthesized in vitro from [1-13C]glucose in asparagus tissues using MALDI-TOF MS and ESI-MS. *J Plant Physiol*. 2013;170(8):715-722.
- [39] Gobezie R, Millett PJ, Sarracino DS, et al. Proteomics: applications to the study of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Am Acad Orthop Surg*.2006;14(6):325-332.
- [40] Coffman FD. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): a putative disease marker at the interface of proteomics and glycomics. *Crit Rev Clin Lab Sci*.2008;45(6):531-562.
- [41] Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, et al. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheum*.2008;58(9): 2798-2808.
- [42] Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al.Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance.*Mol Cell Proteomics*.2009;8(1):172-189.
- [43] Nemirovskiy O, Li WW, Szekely-Klepser G.Design and validation of an immunoaffinity LC-MS/MS assay for the quantification of a collagen type II neopeptide peptide in human urine: application as a biomarker of osteoarthritis. *Methods Mol Biol*.2010;641:253-270.
- [44] Fernandez-Costa C, Calamia V, Fernandez-Puente P.Sequential depletion of human serum for the search of osteoarthritis biomarkers. *Proteome Sci*.2012;10(1):55.
- [45] Ikeda D, Ageta H, Tsuchida K, et al.iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis. *Biomarkers*. 2013; 18(7):565-572.
- [46] Balakrishnan L, Bhattacharjee M, Ahmad S, et al. Differential proteomic analysis of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clin Proteomics*.2014;11(1):1.
- [47] Mobasheri A. Applications of proteomics to osteoarthritis, a musculoskeletal disease characterized by aging. *Front Physiol*. 2011;2:108.
- [48] Ali M, Manolios N.Proteomics in rheumatology: a new direction for old diseases.*Semin Arthritis Rheum*.2005;35(2): 67-76.
- [49] Aviner R, Geiger T, Elroy-Stein O.Genome-wide identification and quantification of protein synthesis in cultured cells and whole tissues by puromycin-associated nascent chain proteomics (PUNCH-P). *Nat Protoc*.2014;9(4):751-760.
- [50] O'Farrell PH.Two-Dimensional Gel Electrophoresis and the Beginning of Proteomics. *Clin Chem*. 2014 Feb 25. [Epub ahead of print] No abstract available.
- [51] Ghareeb HO, Radke W. Characterization of cellulose acetates according to DS and molar mass using two-dimensional chromatography.*Carbohydr Polym*.2013; 98(2):1430-1437.
- [52] Flaherty RJ, Hugel BJ, Bruce SM, et al.Nicked-sleeve interface for two-dimensional capillary electrophoresis. *Analyst*. 2013;138(13):3621-3625.
- [53] Mellors JS, Black WA, Chambers AG, et al. Hybrid capillary/microfluidic system for comprehensive online liquid chromatography-capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry.*Anal Chem*.2013;85(8): 4100-4106.
- [54] Aerts JT, Louis KR, Crandall SR, et al.Patch Clamp Electrophysiology and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Metabolomics for Single Cell Characterization.*Anal Chem*. 86(6):3203-3208.
- [55] Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, et al. Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum Mol Genet*.2014;23(4): 1013-1024.
- [56] Jungo F, Bougueleret L, Xenarios I, et al. The UniProtKB/ Swiss-Prot Tox-Prot program: A central hub of integrated venom protein data. *Toxicon*.2012;60(4):551-557.
- [57] Kind T, Liu KH, Lee do Y, et al. LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat Methods*. 2013;10(8):755-758.
- [58] Sheynkman GM, Shortreed MR, Frey BL, et al. Large-scale mass spectrometric detection of variant peptides resulting from nonsynonymous nucleotide differences. *J Proteome Res*.2014;13(1):228-240.
- [59] Woo S, Cha S W, Merrihew G, et al. Proteogenomic database construction driven from large scale RNA-seq data.*J Proteome Res*.2014;13(1):21-28.
- [60] Llorens F, Hummel M, Pastor X, et al. Multiple platform assessment of the EGF dependent transcriptome by microarray and deep tag sequencing analysis.*BMC Genomics*. 2011;12:326.