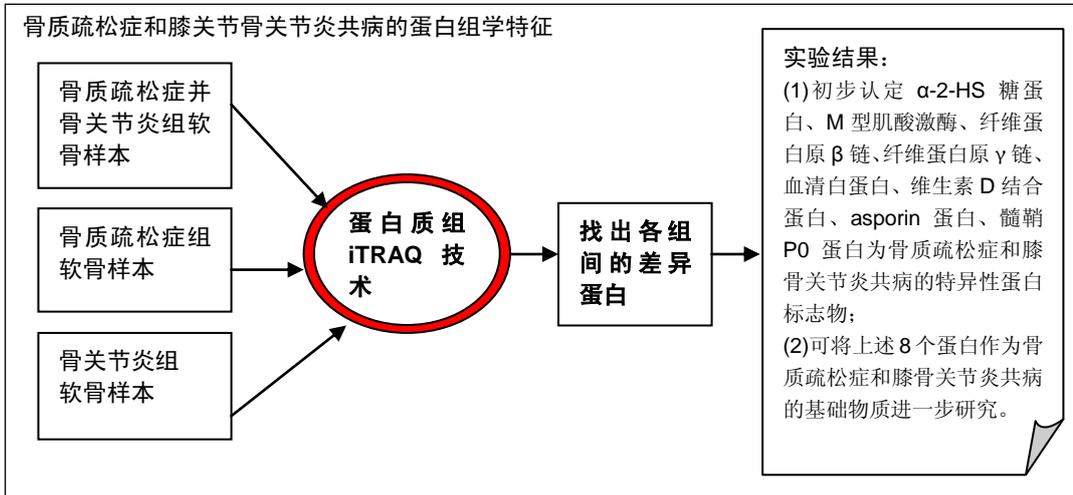


# 骨质疏松症和膝关节骨关节炎共病的蛋白组学分析

时刚<sup>1</sup>, 张开伟<sup>2</sup>(<sup>1</sup>解放军成都军区八一骨科医院, 四川省成都市 610031; <sup>2</sup>贵州中医学院第一附属医院, 贵州省贵阳市 550002)  
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0376 ORCID: 0000-0002-1545-2304(时刚)

文章快速阅读:



时刚, 男, 1989 年生, 四川省武胜县人, 汉族, 2016 年贵阳中医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨与关节方面的研究。

通讯作者: 张开伟, 博士, 主任医师, 贵州中医学院第一附属医院, 贵州省贵阳市 550002

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-27



## 文题释义:

**蛋白组学研究:** 是在蛋白质组学水平上, 对生命活动的功能执行体——蛋白质进行深入系统的研究, 不仅能全景式地揭示生命活动的本质, 而且对研究疾病病因、病理、诊断以及治疗方法等均具有重大意义。

**蛋白组学 iTRAQ 技术:** 是由 AB SCIEX 公司研发的一种基于体外等重同位素标记的相对与绝对定量技术。该技术利用 4 种或 8 种同位素试剂标记多肽末端氨基或赖氨酸侧链氨基基团, 经高精度质谱仪串联分析, 可同时比较多达 8 种样品之间的蛋白质表达量, 是近年来定量蛋白质组学常用的高通量筛选技术。

## 摘要

**背景:** 鉴于骨质疏松症和骨关节炎以及两者共病的发病率较高, 且两者之间的关系目前尚无统一性定论, 在综合分析国内外相关研究者对两者的相关性的研究方案后, 趋利去弊, 课题采取运用蛋白组学技术对骨质疏松症与骨关节炎两者共病的软骨组织进行研究, 希望从中找出两者共病的蛋白标志物。为两者共病的相关性研究提供客观的物质基础, 为防治骨质疏松症和骨关节炎提供理论依据。

**目的:** 利用蛋白组学 iTRAQ 技术, 对骨质疏松症、膝关节骨关节炎和骨质疏松症并膝关节骨关节炎模型的新西兰大白兔膝关节软骨组织进行差异蛋白定量分析, 从中筛选并鉴定出骨质疏松症和骨关节炎共病的蛋白标志物。

**方法:** 制备骨质疏松症、膝关节骨关节炎和骨质疏松症并膝关节骨关节炎动物模型, 待造模成功后, 提取各组动物膝关节软骨样本, 运用蛋白组 iTRAQ 技术对各组样本进行蛋白组定量定性分析, 对比各组样本中蛋白质组的差异性, 筛选出共病组样本中与各自单病组样本中的蛋白表达量存在明显差异(差异倍数 $>1.2$ ,  $P < 0.01$ )的特异性蛋白。再查阅 uniprot 数据库及相关文献, 分析特异性蛋白的特性以及与骨质疏松症和膝关节骨关节炎的相关性, 以初步鉴定出骨质疏松症和膝关节骨关节炎共病的蛋白标志物。

**结果与结论:** ①共筛选出 12 个骨质疏松症和骨关节炎共病的特异性蛋白:  $\alpha$ -2-HS 糖蛋白、M 型肌酸激酶、纤维蛋白原  $\beta$  链、纤维蛋白原  $\gamma$  链、血清白蛋白、维生素 D 结合蛋白、N-acylethanolamine 酰胺酶、促微管聚合蛋白 2、Asporin 蛋白、髓鞘 P0 蛋白、Uncharacterized protein (G1TQR3)、Uncharacterized protein(U3KLT3); ②上述 12 个特异性蛋白在骨质疏松症和骨关节炎共病模型组的蛋白表达量均呈显著性升高; ③根据 12 个特异性蛋白各自的生物特性与骨质疏松症和膝关节骨关节炎的病因病理机制的相互联系, 从中初步鉴定出 8 个特异性蛋白, 其生物特性与骨质疏松症和膝关节骨关节炎的病因病理密切相关, 初步认定为骨质疏松症和膝关节骨关节炎共病的蛋白标志物, 可将其作为两者共病的物质基础进行进一步相关机制研究。

## 关键词:

骨质疏松症; 骨关节炎; iTRAQ 技术; 蛋白组学; 蛋白标志物

## 主题词:

骨质疏松; 骨关节炎; 组织工程

## 基金资助:

贵州省 2012 年省长基金(071303)

Shi Gang, Master, Physician, Bayi Orthopedics Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

## Corresponding author:

Zhang Kaiwei, MD, Chief physician, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

## Proteomics analysis of osteoporosis with knee osteoarthritis

Shi Gang<sup>1</sup>, Zhang Kaiwei<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Bayi Orthopedics Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610031, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Incidence of osteoporosis, osteoarthritis and osteoporotic osteoarthritis is high, and the relationship between osteoporosis and osteoarthritis remains controversial. Therefore, our group designed the study on the cartilages of osteoporotic osteoarthritis by proteomics based on the previous researches, so as to search for the related protein markers. It provides an objective basis for the study on osteoporotic osteoarthritis and provides theoretical basis for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis.

**OBJECTIVE:** To quantitatively analyze the proteins in the knee articular cartilage tissue of New Zealand rabbit models of osteoporosis, knee osteoarthritis and osteoporotic knee osteoarthritis by proteomics iTRAQ technique, and to screen the related protein makers.

**METHODS:** Animal models of osteoporosis, knee osteoarthritis and osteoporotic knee osteoarthritis were established. The knee articular cartilage samples were then collected. Quantitative and qualitative analysis of proteome was conducted on these samples using proteomics iTRAQ technique. The differences of proteome among samples were compared. Specific proteins were selected which had significant differences (difference multiples > 1.2,  $P < 0.01$ ) in protein expression level between comorbidity and mono-morbidity groups. In addition, characteristics of proteins as well as their relation with osteoporosis and knee osteoarthritis were analyzed by referring to uniprot database and relevant literature in order to preliminarily determine the protein marker of the osteoporosis with knee osteoarthritis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A total of 12 specific proteins were screened: alpha 2-HS glycoprotein, creatine kinase M-type, fibrinogen beta chain, fibrin-ogen gamma chain, serum albumin, vitamin D binding protein, N-acyl ethanol-amine acid amidase, tubulin polymerization-promoting protein family member 2, asporin protein, myelin protein zero, uncharacterized protein (G1TQR3) and uncharacterized protein (U3KLT3). The above 12 proteins were significantly increased in the osteoporotic knee osteoarthritis group. These results indicate that eight specific proteins were identified, and their biological features are closely related to the pathogenesis of osteoporosis and knee osteoarthritis. The protein markers of osteoporosis with knee osteoarthritis were identified preliminarily, which can be used for the material basis for further study.

**Subject headings:** Osteoporosis; Osteoarthritis; Tissue Engineering

**Funding:** the Guizhou Provincial Governor Foundation in 2012, No. 071303

## 0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种以单位体积内骨量减少、骨强度降低、骨的微结构破坏为特点的退行性骨骼疾病。骨关节炎是一种以关节软骨的退变和继发性骨质增生为特点的退行性关节疾病。两者均为老年人的常见病、高发病,且在临床上往往伴随出现,故在临床上对骨质疏松症或骨关节炎的治疗过程中,往往也需两者兼顾。不过从两者病理特点分析:骨质疏松症病理过程主要是以单位体积内骨量减少、骨强度降低、骨的微结构破坏为特点,其病理过程主要呈现出一种骨丢失的状态;而骨关节炎的病理过程主要是以膝关节软骨退变,软骨下骨应力改变而局部出现骨硬化以及韧带附着处出现增生形成骨赘为特点,其病理过程主要呈现出一种骨增生的状态,可见两者病理过程中在骨组织结构形态方面呈现出一种相互矛盾的态势。因此,在临床治疗过程中,也只有解决好了它们之间的看似矛盾的相互关系的问题,才有可能取得更为有效、更为满意的疗效。而要解决上述的问题,首要任务的就是进行两者的相关性研究以及两者的基础研究。

至于两者的相关性,已然成为国内外研究的一大热点。然而却未形成统一的认识,目前主要有3种结论:骨质疏松症和骨关节炎存在负相关、骨质疏松症和骨关节炎存在正相关和骨质疏松症和骨关节炎不相关<sup>[1]</sup>。在综合分析各家观点后发现,各个观点的提出依据主要是基于两者病理改变过程中在骨组织形态学上的相互影响机制的分析,并呈现出各家据理力争、相持不下的态势。而从中医角度出发,骨质疏松症主要属于“骨痿”范畴,认为该病的发生主要与五脏虚损和气血功能紊乱密切相关,其中以肾虚、血瘀为主要病机<sup>[2]</sup>。骨关节炎主要属于“骨痹”范畴,认为其病机早期以气滞、

血瘀、痰湿等实邪入侵、邪气互结为主,中后期则以肝肾亏虚、经络瘀阻、筋骨失养为主<sup>[3]</sup>。由此可见,骨质疏松症和骨关节炎具有极为类似的中医辨证和病机认识,而且“肾虚血瘀”极可能为两者共同的中医证候病机。而根据现代研究,中医“证”的实质是一个系统性的、复杂的、动态的功能体系,涉及的化学物质主要有激素、酶类、神经递质等,而各种物质最根本的功能执行载体则是蛋白质的组合<sup>[4]</sup>。故对中医“证”的研究,终究会落实到蛋白分子层面。

因此,鉴于两者之间的关系目前尚无统一性定论,在综合分析国内外学者对两者的研究方案后,趋利去弊,此次课题则以骨质疏松症和骨关节炎具有“肾虚血瘀”的共证中医病机认识和中医“证”的实质为“蛋白质组”的现代认识为立题依据,以骨质疏松症和膝关节骨关节炎共病模型的新西兰大白兔的膝关节软骨为研究对象,以蛋白组学 iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)技术为研究手段,进行两者共病的物质基础的研究。希望从中找出骨质疏松症和骨关节炎共病的物质基础,确定其蛋白标志物,为两者的相关性研究以及临床防治研究提供客观的物质基础,以及佐证“肾虚血瘀”为两者共证的中医辨证认识,为下阶段以“补肾活血法”进行两者的防治提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 蛋白组学水平,随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2013年6月至2016年3月在贵阳中医医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 纳入雌性成年新西兰大白兔40只,由贵

阳医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK 黔 2015-001。

**1.3.2 蛋白组学研究主要试剂、仪器、分析软件** 水合氯醛(上海化学试剂采购供应五联化工厂), 硫酸庆大霉素(上海申广动物保健品有限公司阜阳分公司), 甲泼尼松龙琥珀酸钠(天津药业焦作有限公司), PBS(hyclone), BSA(A0332-25G生工), BCA定量试剂盒(P0012 碧云天), iTRAQ 试剂盒(AB SCIEX), SCX 色谱柱(PolyLCInc, Maryland, U.S.A.), Easy nLC 色谱系统(Thermo Scientific), Q Exactive质谱仪(Thermo Scientific), 电泳仪(GE Healthcare EPS601), ProteomeDiscoverer 1.4(Thermo Scientific), Perseus 1.3(Max Planck Institute of Biochemistry in Martinsried, Germany)。

#### 1.4 方法

**1.4.1 动物造模** 雌性成年新西兰大白兔40只, 按随机数字表法分为4组( $n=10$ ), 即骨质疏松症并膝关节炎组、骨质疏松症组、膝关节炎组及正常组, 在适应性喂养7 d后, 分别对骨质疏松症并膝关节炎组、骨质疏松症组、膝关节炎组进行造模手术。正常组不予处理, 正常喂养。

骨质疏松症组在全麻下, 切除双侧卵巢, 术后每兔1笼分笼饲养, 并连续3-5 d, 每天1次肌内注射硫酸庆大霉素 $8 \times 10^4$  U以预防感染。于术后第2周开始连续肌注甲泼尼松龙琥珀酸钠1 mg/(kg · d) 4周<sup>[5]</sup>。

膝关节炎组在全麻下, 予以右膝关节前交叉韧带和内侧副韧带全切断, 术后伤肢包扎但不固定<sup>[6]</sup>, 术后每兔1笼分笼饲养, 并连续3-5 d, 每天1次肌内注射硫酸庆大霉素 $8 \times 10^4$  U以预防感染。

骨质疏松症并膝关节炎组在全麻下, 予以骨质疏松症造模和膝关节炎造模, 其方法分别与骨质疏松症组及膝关节炎组造模方式相同。

**1.4.2 动物模型验证** 在各组造模2个月后, 测骨质疏松症造模组(骨质疏松症并膝关节炎组、骨质疏松症组)、正常组的骨密度, 对骨质疏松症造模组骨质疏松表现进行评价; 测膝关节炎造模组(骨质疏松症并膝关节炎组、膝关节炎组)的右膝MRI对膝关节炎造模组进行骨关节炎表现评价。

**1.4.3 样本提取** 待各组造模成功后, 分别提取骨质疏松症并膝关节炎组、骨质疏松症组、膝关节炎组兔右膝关节软骨, 用PBS充分冲洗后放入EP管中, 立即放入-80 °C冰箱保存。

#### 1.4.4 蛋白组学研究主要方法及步骤

**蛋白质提取与定量:** 将上述3组样品分别逐步进行液氮研磨+TCA/丙酮沉淀+SDT裂解液+超声+沸水浴+离心, 收集滤液。然后采用BCA法进行各组蛋白质定量, 各样品取20  $\mu$ g进行SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 判断样品裂解情况。并进行蛋白质分装, 保存于-80 °C。

**iTRAQ标记与质谱分析:** 采用Filter aided proteome

preparation (FASP)方法对各样品进行酶解, 得到肽段。用iTRAQ试剂盒按照ABI公司说明书对每个肽段进行iTRAQ标记, 每个标签标记100  $\mu$ g。标记后的肽段样品混合, 经过强阳离子交换色谱柱(SCX)分级成10份, 然后分别脱盐冻干。分级后的肽段样品分别进行1 h梯度Q-exactive分析, 共计8次LCMS/MS分析。

**数据库检索:** 使用Proteome Discoverer 1.4(Thermo Scientific)软件将Q-exactive产生的原始图谱文件(.raw文件)转化为.mgf文件, 通过软件内置的工具提交到MASCOT 2.2服务器进行数据库检索。然后再通过Proteome Discoverer 1.4将MASCOT服务器上形成的查库文件(.dat文件)传回软件, 根据FDR < 0.01的标准对数据进行筛选, 获得高度可信的定性结果。此项目使用数据库为: Uniprot\_Oryctolagusuniculus\_23004\_20160307.fasta (序列总数: 23004, 下载时间: 2016-03-07, 下载链接: <http://www.uniprot.org>)。

MASCOT是蛋白质组学定性分析中的金标准, 采用Mascot 2.2进行数据库搜索, 详细参数见表1。

表1 Mascot 鉴定参数

Table 1 Parameters of Mascot identification

项目	参数
Type of search	MS/MS Ion search
Enzyme	Trypsin
Mass Values	Monoisotopic
Max Missed Cleavages	2
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C), iTRAQ8plex (N-term), iTRAQ8plex (K)
Variable modifications	Oxidation (M), iTRAQ8plex (Y)
Peptide Mass Tolerance	$\pm 20$ ppm
Fragment Mass Tolerance	0.1 Da
Protein Mass	Unrestricted
Database	Uniprot_Oryctolagusuniculus_23004_20160307.fasta
Database pattern	Target-Decoy
Peptide FDR	$\leq 0.01$

在定量分析过程中, 此项目采用Proteome Discoverer 1.4软件对肽段报告离子峰强度值进行抽提, 并对定量值进行归一化处理, 详细参数见表2。

表2 Proteome Discoverer 1.4 定量分析参数

Table 2 Parameters of Proteome Discoverer 1.4 quantitative analysis

项目	参数
Peak integration	Integration Window Tolerance: 20 ppm Integration Method: Most Confident Centroid
Scan Event Filters	Mass Analyzer: FTMS MS Order: MS2 Activation Type: HCD
Protein Quantification	The protein ratios are calculated as the median of only unique peptides of the protein
Experimental Bias	Normalizes all peptide ratios by the median protein ratio. The median protein ratio should be 1 after the normalization

1.4.5 筛选骨质疏松症和膝骨关节炎共病的特异性蛋白在“骨质疏松症并膝骨关节炎组/骨质疏松症组”、“骨质疏松症并膝骨关节炎组/膝骨关节炎组”和“骨质疏松症组/膝骨关节炎组”的差异蛋白中按以下2个条件进行骨质疏松症和膝骨关节炎共病的特异性蛋白筛选。

条件①: 差异性蛋白在“骨质疏松症并膝骨关节炎组/骨质疏松症组”和在“骨质疏松症并膝骨关节炎组/膝骨关节炎组”中的表达量同时表现为显著性升高或者同时表现为显著性降低(差异倍数 $>1.5$ ,  $P < 0.01$ ); 条件②: 上述差异蛋白在“骨质疏松症组/膝骨关节炎组”中的表现为无显著性差异(差异倍数 $<1.5$ 或 $P > 0.05$ )。

1.5 主要观察指标 在各组造模术后2个月分别进行椎骨骨密度、股骨骨密度检测和膝关节MRI检查以用于模型评价。待造模成功后, 提取各组的右膝关节关节面软骨, 运用蛋白组iTRAQ技术筛选出各组间的差异性蛋白。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计学软件, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入雌性成年新西兰大白兔40只, 按随机数字表法分为4组, 即骨质疏松症并膝骨关节炎组、骨质疏松症组、膝骨关节炎组及正常组, 每组10只。全部进入结果分析, 无脱落。

2.2 模型评价结果 骨质疏松症造模组(骨质疏松症并膝骨关节炎组、骨质疏松症组)椎骨骨密度和股骨骨密度均较正常组显著降低, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表3。

表3 骨质疏松症造模组与正常组的骨密度比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{g}/\text{cm}^2$ )  
Table 3 Comparison of bone mineral density between osteoporosis and normal groups

组别	椎骨骨密度	股骨骨密度
正常组( $n=10$ )	0.288 $\pm$ 0.008	0.282 $\pm$ 0.052
骨质疏松症造模组( $n=20$ )	0.215 $\pm$ 0.034 <sup>a</sup>	0.203 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>
下降率	25%	28%

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

骨关节炎造模组右膝MRI显示, 关节软骨表面毛糙征、软骨线中断, 软骨信号不均匀, 部分出现高信号影。

经上述两方面的评价结果显示, 骨质疏松症组、骨质疏松症并膝骨关节炎组有典型的骨质疏松症表现; 骨关节炎组、骨质疏松症并膝骨关节炎组有典型的骨关节炎表现。故可充分认为此实验中各模型组的造模均取得成功。

### 2.3 差异蛋白鉴定和定量结果评估

#### 2.3.1 肽段离子得分分布 见图1。

实验中质谱数据采集自Q Exactive高分辨率质谱仪, 能够获得高质量的MS1和MS2图谱。然后使用MASCOT这种严格的分析工具对MS图谱数据进行分析, 最终获得每张

MS2图谱的得分。从图1中可以看出, MS2的MASCOT得分较为理想, 约70%以上的肽段得分在20分以上, 肽段得分中位数为20。每一套iTRAQ数据在定性分析工作中均使用 $FDR < 0.01$ 作为筛选标准, 结合所得的优秀肽段得分分布情况, 进一步说明MS实验数据质量较高。

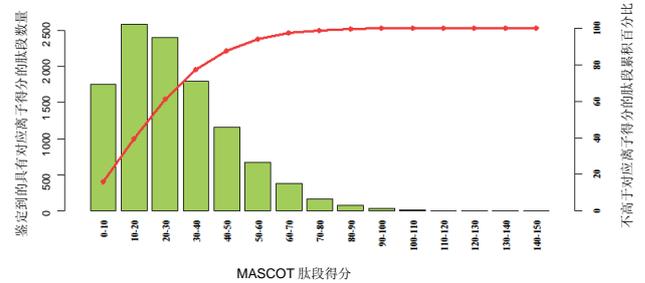


图1 肽段离子得分分布图

Figure 1 Distribution of the peptide ion score

图注: 横坐标为 MASCOT 肽段得分; 主纵坐标 Number of peptides 对应图中的柱状图, 表示鉴定到的具有对应离子得分的肽段数量; 次纵坐标对应图中的累积曲线, 表示不高于对应离子得分的肽段累积百分比。

#### 2.3.2 蛋白质相对分子质量分布 见图2。

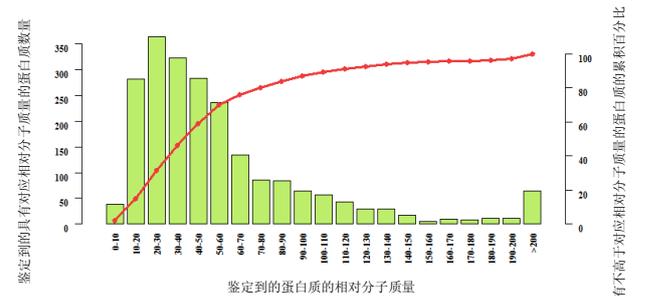


图2 鉴定蛋白质相对分子质量分布图

Figure 2 Distribution of the protein molecular mass

图注: 横坐标为鉴定到的蛋白质的相对分子质量; 主纵坐标 Number of proteins 对应图中的柱状图, 表示鉴定到的具有对应相对分子质量的蛋白质数量; 次纵坐标对应图中的累积曲线, 表示具有不高于对应相对分子质量的蛋白质的累积百分比。

#### 2.3.3 蛋白质等电点分布 见图3。

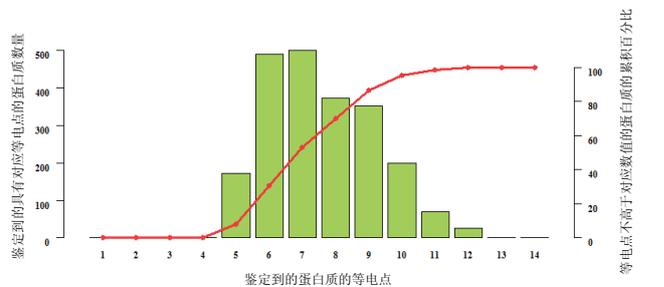


图3 鉴定蛋白质等电点分布图

Figure 3 Distribution of the protein isoelectric point

图注: 横坐标为鉴定到的蛋白质的等电点; 主纵坐标 Number of proteins 对应图中的柱状图, 表示鉴定到的具有对应等电点的蛋白质数量; 次纵坐标对应图中的累积曲线, 表示等电点不高于对应数值的蛋白质的累积百分比。

### 2.3.4 肽段序列长度分布 见图4。

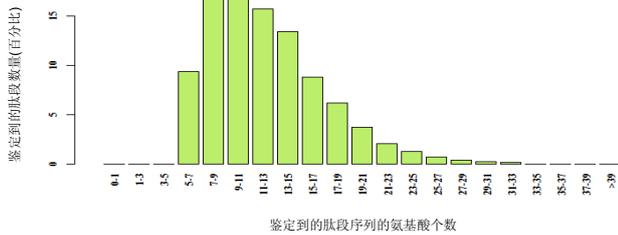


图4 肽段序列长度分布图

Figure 4 Distribution of the peptide sequence length

图注：横坐标为鉴定到的肽段序列的氨基酸个数；纵坐标为鉴定到的肽段数量(百分比)。

### 2.3.5 肽段序列覆盖度 见图5。

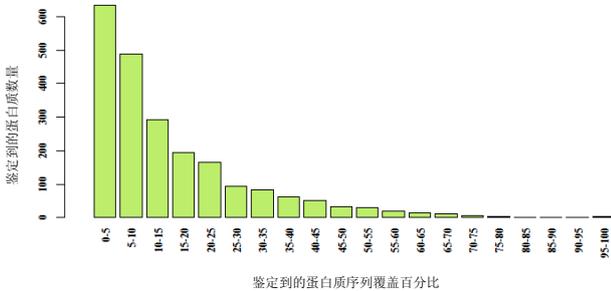


图5 蛋白质序列覆盖度分布图

Figure 5 Distribution of the protein sequence coverage

图注：该图显示鉴定到的不同覆盖度的蛋白质比例分布情况。横坐标为鉴定到的蛋白质序列覆盖百分比；纵坐标为鉴定到的蛋白质数量。

### 2.3.6 鉴定肽段数量分布 见图6。

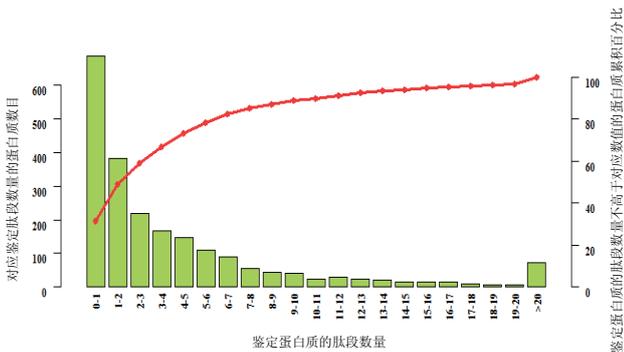


图6 鉴定肽段数量分布图

Figure 6 Distribution of the number of peptides

图注：该图显示鉴定蛋白质所对应的鉴定肽段数量分布情况。横坐标为鉴定蛋白质的肽段数量；主纵坐标 Number of proteins 对应图中的柱状图，表示对应鉴定肽段数量的蛋白质数目；次纵坐标对应图中的累积曲线，表示鉴定蛋白质的肽段数量不高于对应数值的蛋白质累积百分比。

**2.4 差异蛋白定量结果** 在骨质疏松症并膝骨关节炎组与骨质疏松症组中分析共筛出123个差异蛋白，其中65个差异蛋白的表达量呈显著升高，其余58个差异蛋白的表达量则显著降低。在骨质疏松症并膝骨关节炎组与膝骨关节炎组中分析共筛出103个差异蛋白，其中62个差异蛋白的表达量显著升高，其余41个差异蛋白的表达量则显著降低。

在骨质疏松症组与膝骨关节炎组中分析共筛出：89个差异蛋白，其中45个差异蛋白的表达量呈显著升高，其余44个差异蛋白的表达量则显著降低，详见表4。

表4 差异蛋白定量结果统计

Table 4 Statistical results of the differential proteins analysis

组别	表达量升高	表达量降低	总计
骨质疏松症并膝骨关节炎组/骨质疏松症组	65	58	123
骨质疏松症并膝骨关节炎组/膝骨关节炎组	62	41	103
骨质疏松症组/膝骨关节炎组	45	44	89

**2.5 骨质疏松症和膝骨关节炎共病特异性蛋白筛选结果** 在上述差异性蛋白中总共筛选出12个骨质疏松症和膝骨关节炎共病的特异性蛋白。且此12个特异性蛋白在骨质疏松症和膝骨关节炎共病模型组样本中的蛋白表达量均呈显著性升高(差异倍数>1.5,  $P < 0.01$ )，详见表5。

## 3 讨论 Discussion

iTRAQ技术是由AB SCIEX公司研发的一种基于体外等重同位素标记的相对与绝对定量技术。该技术利用4种或8种同位素试剂标记多肽末端氨基或赖氨酸侧链氨基基团，经高精度质谱仪串联分析，可同时比较多达8种样品之间的蛋白质表达量，是近年来定量蛋白质组学常用的高通量筛选技术<sup>[7]</sup>。然而，该技术在骨质疏松症和骨关节炎各自的领域中的应用还处于初级阶段，却已在发现各自的生物标志物方面取得了一定的研究成果。比如，Fan等<sup>[8]</sup>在运用蛋白质组学技术对骨质疏松症中雌激素的缺失对其蛋白表达的影响的研究中，发现了硫氧还蛋白过氧化酶1、阻凝蛋白轻链肽2、泛素化酶E2-M<sub>1</sub> 17 000三种骨质疏松症的相关蛋白。此外，Fernández-Puentes等<sup>[9]</sup>运用iTRAQ技术对骨关节炎进行研究，通过与正常组的血清标本比较后，发现了349种特异性和重复性较高的差异蛋白，对其中262种差异性蛋白进行了量化并计算出它们各自的iTRAQ比，并指出脂蛋白、软骨寡聚基质蛋白、四连接素和血管性血友病因子等为骨关节炎潜在生物标志物。然而，将两病合并，以蛋白质组学技术为手段，对两者共病物质基础的研究，国内外尚无相关报道。此课题则以iTRAQ技术，对骨质疏松症和膝骨关节炎共病模型兔进行蛋白质组学研究，并从中找出骨质疏松症和膝骨关节炎共病的12个特异性蛋白。通过检索Uni Prot knowledgebase数据库 (Swiss-Prot/Tr EMBL, www.expasy.org)以及查阅国内外文献后，总结归纳所有特异性蛋白的生物特性，并从其中提炼出可能与骨质疏松症和膝骨关节炎的病理机制有一定的相关性的蛋白并作出以下论述与分析：

$\alpha 2$ -HS-糖蛋白，又称胎球蛋白A，是一种主要由肝脏合成的血浆蛋白，是一种主要抗炎症因子<sup>[3]</sup>，在巨噬细胞的灭活过程中起着重要作用，参与各种炎症过程。而在近期的研究中，发现炎症是引起骨质疏松症的重要因素之一<sup>[4]</sup>，且几乎伴随着整个骨质疏松病理过程。此外，软骨退变也与炎症

表5 骨质疏松症+骨关节炎共病特异蛋白筛选结果

Table 5 Screening results of specific proteins of the osteoporosis with knee osteoarthritis

特异蛋白 序号	类型	(膝骨关节炎+骨质 疏松症)/膝骨关节炎蛋白 表达差异倍数	Significance A	(膝骨关节炎+骨质 疏松症)/骨质疏松症蛋 白表达差异倍数	Significance A	膝骨关节炎/骨 质疏松症蛋白 表达差异倍数	Significance A
U3KMR2	Alpha-2-HS- Glycoprotein	1.953	0.005	2.008	0.000	1.028	0.914
P00563	Creatine kinase M-type	2.218	0.001	1.957	0.000	0.883	0.658
G1T0W8	Fibrinogen beta chain	2.143	0.002	1.949	0.000	0.910	0.736
G1U9S2	Serum albumin	2.412	0.000	2.171	0.000	0.900	0.708
G1T7U7	Uncharacterized protein (Fragment)	3.646	0.000	3.144	0.000	0.862	0.601
G1SSD3	Uncharacterized protein(Fragment)	1.922	0.007	1.727	0.001	0.898	0.703
G1U4P8	Uncharacterized protein	2.039	0.003	2.253	0.000	1.105	0.677
G1TKX3	Uncharacterized protein	1.939	0.006	1.731	0.001	0.893	0.687
G1TQR3	Uncharacterized protein	2.005	0.004	2.379	0.000	1.187	0.471
G1T7D3	Uncharacterized protein	2.604	0.000	2.915	0.000	1.120	0.637
U3KLT3	Uncharacterized protein	1.950	0.006	1.685	0.001	0.864	0.606
G1SU82	Vitamin D-binding protein	2.040	0.003	2.050	0.000	1.005	0.991

关系密切, 软骨退变刺激着炎症的发展, 而炎症又促进着软骨的退变<sup>[5]</sup>。纤维蛋白原 $\beta$ 、 $\gamma$ 链为构成纤维蛋白原重要的2条多肽链, 在一般情况下,  $\beta$ 和 $\gamma$ 链可单独存在。其作为血浆中最为丰富的凝血因子的主要成分, 主要参与凝血、止血过程<sup>[6]</sup>。而在骨质疏松症的病理过程中, 随着骨量的减少, 微骨折的发生, 必然会破坏骨内毛细血管, 出现凝血反应。同样在膝骨关节炎的病理过程中, 随着软骨的破坏, 关节面的应力改变将直接刺激软骨下骨, 必然出现创伤反应, 以致在关节中产生凝血表现。血清白蛋白是一种由肝脏合成的相对分子量较小的极易纯化蛋白质, 是反应体内营养状况尤其是蛋白质含量水平的重要指标。此外, 有研究显示血清白蛋白含量与骨骼质量有一定的相关性<sup>[7]</sup>。而骨质疏松症和膝骨关节炎均为骨骼系统的退行性病变。维生素D结合蛋白是一种由肝脏合成的 $\alpha$ -球蛋白。其生理功能主要体现为结合和转运维生素D各种同质异型体。具体表现为通过提供高容量、高亲和力和高效的载体与维生素D的同质异型体相结合, 以延长循环中维生素D及其代谢产物的半衰期, 使维生素D充分发挥促骨形成、维持钙平衡等功能。此外, 维生素D结合蛋白还是一种趋化因子, 与免疫调节密切相关<sup>[8]</sup>。有研究显示, 免疫系统和免疫因素在骨质疏松症的病理过程起着重要的调节作用<sup>[9]</sup>。比如, 活化的T细胞可以直接作用于骨髓间质细胞和成骨细胞, 非活化T细胞则能延缓骨吸收以调节骨的动态平衡<sup>[10]</sup>。而在骨关节炎中, 自体免疫同样起着重要的作用。比如, 早期骨关节炎的滑膜中就有T细胞浸润<sup>[11]</sup>, 出现

免疫反应。血清白蛋白是体内营养状况尤其是蛋白质含量水平的重要指标, 而良好的蛋白营养是预防与控制骨质疏松的重要因素。髓鞘P0蛋白是一种相对分子质量为30 000的糖蛋白, 是免疫球蛋白基因超家族中的一员。髓鞘P0蛋白主要分布于神经胶质细胞的细胞膜上, 与周围神经损伤与修复密切相关<sup>[12]</sup>。而在骨质疏松症的病理过程中, 均存在着不同程度的周围神经病变, 且以下肢更甚<sup>[13]</sup>。而从膝关节的解剖角度分析, 关节囊、韧带、滑膜以及近关节缘的骨膜和软骨下骨的血管, 均有丰富的神经支配。这些神经的感受器正常时无活性, 而在骨关节炎出现后, 出现关节张力高度增强或化学物质刺激时被激活<sup>[12]</sup>, 从而在膝骨关节炎的病理过程中, 均伴随着周围神经损伤与修复。Asporin蛋白是一种细胞外基质蛋白, 是富含亮氨酸重复序列的小分子蛋白多糖家族的新成员。于2001年在关节软骨和半月板中发现, 其生物学特性还在进一步研究当中, 但根据现有的研究表明显示它对关节软骨的形成和修复过程有一定的抑制作用<sup>[14]</sup>。此外, 有研究已经证实, 它在膝骨关节炎的关节软骨中大量表达<sup>[15]</sup>。肌酸激酶又称肌酸磷酸激酶, 主要分布于骨骼肌、心肌和脑组织的细胞浆和线粒体中。肌酸激酶是一个与细胞内能量转运、ATP的再生以及肌肉收缩有直接关系的重要激酶, 常被作为判断肌肉疲劳的重要指标。而骨质疏松症和膝骨关节炎均属中老年退行性疾病, 在其病理过程中容易产生骨骼肌疲劳现象。而由于目前对于N-乙酰基乙醇胺水解酸性酰胺酶和促微管聚合蛋白TPP2两者的研究与认识还处于初级阶段, 对其蛋

白以及相关功能了解较少。并从两者已知的蛋白质和功能信息中,还不足以显示其与骨质疏松症和骨关节炎病因病理的相关性<sup>[16-22]</sup>。至于在此次实验中,它们为何在骨质疏松症并膝骨关节炎模型组样本中出现特异性的蛋白表达量的升高,有待进一步的研究。

综上所述,此次实验所筛选出的骨质疏松症和膝骨关节炎的特异性蛋白的生物特性,主要涉及到炎症、凝血、免疫等功能系统和骨骼、肌肉、周围神经等组织系统,与骨质疏松症和骨关节炎两者的病因病机紧密相扣。并根据12个特异性蛋白各自的生物特性与骨质疏松症和膝骨关节炎的病因病机的相互联系,可从中初步认定 $\alpha$ -2-HS糖蛋白、M型肌酸激酶、纤维蛋白原( $\beta$ 、 $\gamma$ 链)、血清白蛋白、维生素D结合蛋白、asporin蛋白、髓鞘P0蛋白为骨质疏松症和膝骨关节炎共病的特异性蛋白标志物。可将上述8个蛋白作为骨质疏松症和膝骨关节炎共病的基础物质进一步研究,探明它们各自的生物特性和它们之间的相互联系,以及它们在两者病理过程中具体参与的生物过程和变化规律等,为骨质疏松症和膝骨关节炎的防治提供新的思路 and 理论依据。

**致谢:** 感谢贵阳中医学院及其附院各位老师的支持;感谢上海中科新生命生物科技有限公司的技术援助。

**作者贡献:** 时刚参与动物造模、取材、数据统计、撰写文章等;张开伟全程指导。该研究采用盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“贵州省2012年省长基金(071303)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经贵州中医学院第一附属医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经贵州中医学院第一附属医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 王子江,向川. 骨质疏松症与骨关节炎的相关性研究新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014,20(3):310-314.  
[2] 李沛,潘富伟. 骨质疏松症中医证候分布规律及相关性研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014,20(1):110-114.  
[3] 王国栋. 中医辨证治疗膝关节骨性关节炎[J]. 中医研究, 2014, 27(1):10-11.

[4] 余宗阳,杜建. 蛋白质组学与中医证实质研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(9):844-846.  
[5] Long J, Zhou Q, Li D, et al. Phytoestrogenic molecule icaritin prevents OVX-induced osteoporosis in mice. *J Orthop Trans*. 2014;2(4):224-225.  
[6] 肖春苟,邹锦慧,李力强,等. 以改良Hulth法建立兔膝骨性关节炎关节软骨的病理变化[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014,22(12): 1-3.  
[7] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2005;3(12):1154-1169.  
[8] Fan Y,Liu J,Wang S,et al. Functional proteome of bones in rat with osteoporosis following ovariectomy. *Life Sci*. 2005; 76(25): 2893-2901.  
[9] Fernández-Puentes C, Carrasco L. Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell*. 1980;20(3):769-775.  
[10] Qiu C, Liu X, Wang J, et al. Estrogen increases the transcription of human  $\alpha$  2 - Heremans - Schmid - glycoprotein, by an interplay of estrogen receptor  $\alpha$  and activator protein-1. *Osteoporos Int*. 2014; 25(4):1357-1367.  
[11] 夏婷,李双庆. 炎症相关骨质疏松症的发病机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015,21(1):117-120.  
[12] 马玉环,郑文伟,林平冬等. 骨关节炎软骨退变与炎症的关系[J]. 风湿病与关节炎, 2015,4(8):50-53.  
[13] Marion B, McMaster MT, Black MA, et al. A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease. *Proteomics*. 2009;9(11): 2929-2945.  
[14] Baxter VK, Shaw GC, Sotuyo NP, et al. Serum albumin and body weight as biomarkers for the antemortem identification of bone and gastrointestinal disease in the common marmoset. *Plos One*. 2013; 8(12):e82747.  
[15] Hwang JH, Wang T, Lee KS, et al. Vitamin D binding protein plays an important role in the progression of endometriosis. *Int J Mol Med*. 2013; 32(6):1394-1400.  
[16] 常志芳,冯成龙,史晓霞,等. 免疫与骨质疏松的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015,21(4): 508-513.  
[17] Fumoto T, Takeshita S, Ito M, et al. Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2014;29(4):830-842.  
[18] Moradi B, Rosshirt N, Hagmann S, et al. Osteoarthritis progression is accompanied by inflammatory CD4+ T-cell polarisation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):S232-S233.  
[19] da Silva JT, Santos FM, Giardini AC, et al. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. *Growth Factors*. 2015; 33(1):8-13.  
[20] Bauman WA, Cardozo CP. Chapter 47-Immobilization Osteoporosis. *Osteoporosis*. 2013:1139-1171.  
[21] 王丽丽,汪莉,吴焕文,等. 细胞外基质蛋白Asporin的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2016,36(2):195-198.  
[22] Song GG, Kim JH, Lee YH. A meta-analysis of the relationship between aspartic acid (D)-repeat polymorphisms in asporin and osteoarthritis susceptibility. *Rheumatol Int*. 2014;34(6): 785-792.