

# 蛋白质组学在骨质疏松症中的应用

张世阳 高海青

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)03-0291-04

**摘要:** 蛋白质组学是继基因组学后提出的新兴学科。它以组织或细胞的全部蛋白质结构与功能为研究对象。近年来蛋白质组学技术飞速发展并已得到广泛应用。蛋白质组学在成骨细胞代谢、破骨细胞代谢以及骨质疏松症动物模型的研究中取得较大进展,从而在探讨骨质疏松症的发生机制,提供其早期诊断标志物的筛选以及寻找其治疗药物靶标等方面发挥了重要作用。

**关键词:** 蛋白质组学; 质谱; 骨质疏松症; 成骨细胞; 破骨细胞

**The application of proteomics in osteoporosis** ZHANG Shiyang, GAO Haiqing. Anhui Medical University, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China

Corresponding author: GAO Haiqing, Email: gaohaiqing52@yahoo.com.cn

**Abstract:** Proteomics is a new emerging science after genomics. The research subjects of proteomics include the structure and function of entire proteins in tissues or cells. Currently the proteomic technology has been developed and used widely. The applications of proteomics in osteoblasts metabolism, osteoclasts metabolism, and animal models of osteoporosis have also been developed significantly. So the proteomics has played a crucial role in exploring the mechanism of osteoporosis, in selecting new biomarkers for early diagnosis, and in identifying the pharmaceutical targets.

**Key words:** Proteomics; Mass spectrometry; Osteoporosis; Osteoblasts; Osteoclasts

人类基因组工作框架图的完成,标志着生命科学的研究开始进入后基因组时代。研究的重心从作为遗传信息的载体—基因,逐渐转向生理活动的执行者—蛋白质。人们认识到,只有对蛋白质的数量、结构、性质、相互关系以及其生物功能的全面了解,才能阐明生命活动的规律,揭示生命现象的本质。蛋白质组学这一新兴学科应运而生<sup>[1]</sup>。骨质疏松症(osteoporosis, OP)是在世界范围内日益增长的重大卫生健康问题,传统的研究方法难于在分子水平探讨OP的发生与发展的机制。蛋白质组学的兴起为OP的诊治研究提供了崭新的途径,可以帮助阐明OP的发病机制、筛选特异性生物标志物、寻找药物靶标以及进行治疗效果与预后的评价。因此,蛋白质组学在OP的研究中越来越受到重视。

## 1 蛋白质组与蛋白质组学的概念

1994年澳大利亚学者Wilkins与Williams<sup>[2]</sup>首次提出了蛋白质组(proteome)的概念。这是由英文蛋白质(protein)与基因组(genome)组合而成的新的英文名词。自此之后,蛋白质组成为生命科学研究的新领域。

蛋白质组是指一个细胞或组织基因组所表达的全部蛋白质。蛋白质组学则为一衍生概念,是从整体的角度分析细胞或组织的动态变化的蛋白质组成成分、表达水平、翻译后修饰状态以及蛋白质之间相互作用,揭示蛋白质功能与细胞生命活动的规律进而了解疾病的发生与发展、细胞内信息加工和网络整体的综合情况。

## 2 蛋白质组学的研究内容

目前蛋白质组学的研究内容主要分为两部分,一是表达蛋白质学,为“竭泽法”,即采用高通量的蛋白质组研究技术分析生物体内尽可能多乃至接近所有的蛋白质。如我国科学家团队于2002年率先

作者单位: 230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院,安徽省立医院老年病科

通讯作者: 高海青,250012 济南,山东大学齐鲁医院老年病科,山东省心血管病蛋白质组学重点实验室,Email: gaohaiqing52@yahoo.com.cn

组织实施的“人类肝脏蛋白质组计划”。这种蛋白质表达法研究规模化、系统化,理论上符合蛋白质组学研究的本质,实际操作中由于蛋白质的动态变化,实现目标往往困难。二是差异蛋白质学,为“功能法”,即研究不同时间与空间下细胞蛋白质组成的变化,以发现有差异的蛋白质组学种类为主要目标,其特点在于有更高的可行性,并且反映了蛋白质的动态本质,因此具有广泛和明确的应用前景。另外,近年来蛋白质组学的研究范围也在不断的完整与补充,如修饰蛋白质学,定量蛋白质学等。

### 3 蛋白质组学研究技术

蛋白质组学的研究技术主要包括蛋白质样品制备、蛋白质分离技术、蛋白质鉴定技术以及生物信息学。

#### 3.1 蛋白质样品制备技术

蛋白质样品制备时蛋白质组学研究中最为关键的一步,其直接影响到蛋白的产率、生物活性以及特定目的蛋白质的结构的完整性。样品制备必须注意简化样品的处理过程、防止蛋白的聚集与沉淀、保证样品中核酸与干扰蛋白的清除等。目前尚无通用的样品制备方法。新近出现的激光捕捉显微解剖法(LCM)等新方法的应用为样品更精确,完备的制备提供了条件。

#### 3.2 蛋白质分离技术

双向二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)是目前最常用的蛋白质分离技术,也是目前对蛋白质组分辨率最高、重复性最好的分离技术。2-DE由O'Farrell在1975年首先建立,其基本原理是:第一相根据不同蛋白质带电荷量的特性,进行等电聚焦,蛋白质按水平梯度迁移,停留在各自的等电点。第二相根据不同蛋白质分子质量大小的特性,沿垂直方向分离。分离的蛋白质经不同的染色方法加以鉴定,形成双向电泳图谱。2-DE具有的优势但仍然存在诸多缺点,例如其重复性差,自动化程度低,对于分子量过大、过小的以及低丰度的蛋白质与极酸极碱和难溶的膜蛋白质等分离困难等。目前已发展出现的差异凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)与高效液相色谱技术(HPLC)进一步完善了2-DE的不足,使蛋白质的分辨谱更广。

#### 3.3 蛋白质鉴定技术

随着蛋白质组学的蓬勃发展,生物质谱技术(mass spectrometry, MS)与之共同进步,其具有高灵敏度

与高通量的特点,已经成为蛋白质鉴定的主流技术。MS鉴定蛋白质的基本原理是首先将样品分子离子化,然后根据不同离子间的质荷比( $m/z$ )来分离蛋白质,并确定其相对分子质量。目前用于鉴定蛋白质的主要MS有基质辅助激光解析飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/MS)与电喷雾电离质谱(electron spray ionization mass spectrometry, ESI/MS)<sup>[3]</sup>。

#### 3.4 生物信息学

生物信息学(bioinformatics)是通过对生物学实验数据的获取、加工、存储、检索以及分析进而获取数据的生物学意义。生物信息学在蛋白质组学中的应用,具体内容包括有2-DE胶图的图像分析、质谱数据的处理与检索、蛋白质数据库的建立与目标蛋白质的结构分析等<sup>[4]</sup>。

## 4 蛋白质组学在骨质疏松症中的应用

骨质疏松症(OP)是以骨量减少、骨微结构破坏、骨强度下降、骨骼脆性增加而容易导致骨折为特征的全身性骨骼疾病。据国际骨质疏松基金会(IOF)2008年统计,全球约有2亿OP患者,美国与欧洲绝经后妇女30%患病<sup>[5]</sup>。OP对于个人健康、家庭负担以及社会资源造成巨大的负担与损失,因此研究OP的发病机制与治疗手段无疑具有重大的实际意义。

OP的发生可源于成骨细胞数量和(或)活性的降低,或者破骨细胞数量和(或)活性的升高。当出现成骨细胞/破骨细胞功能失衡时,会发生骨量减少,骨强度下降,结果造成OP的发生。蛋白质组学的发展为研究OP以及成骨细胞破骨细胞等分子机制提供了全新的思路。

#### 4.1 蛋白质组学与成骨细胞

骨髓间充质干细胞((bone marrow stromal cells, BMSC))是分化发育为成骨细胞的主要来源<sup>[6]</sup>。BMSC具有多分化潜能并有自我更新的能力,而控制BMSC定向诱导成骨细胞分化的分子机制尚未完全明确。研究人员应用蛋白质组学技术在此方面作了有益的尝试。

Salasznyk等<sup>[7]</sup>运用二维液相色谱串联质谱法(2D-LC-MS)进行人BMSC及其分化诱导成骨细胞的蛋白质组学研究。结果发现,755种差异表达的蛋白质中有247种与158种分别为BMSC与成骨细胞所特有,而且这些蛋白验证后证实与钙调节的

信号转导以及细胞黏附等功能有关。Foster等<sup>[8]</sup>应用MS方法鉴定比较发现人BMSC<sub>0</sub>定向成骨细胞分化前后的463个差异蛋白,其中包括已知的人BMSC<sub>0</sub>细胞表面抗原、膜蛋白以及细胞黏附分子等。在成骨细胞分化过程中,21种蛋白表达下降2倍,83种蛋白表达增高3倍,其中碱性磷酸酶与蛋白多糖核心蛋白的表达增加得到进一步验证。刘元林等<sup>[9]</sup>从人骨髓细胞分离BMSC<sub>0</sub>,采用定向成骨细胞分化诱导培养体系诱导BMSC<sub>0</sub>定向成骨细胞分化,利用2-DE找到38个差异蛋白点,运用MALDI-TOF/MS并结合肽质量指纹谱(PMF)成功鉴定出23个差异蛋白,发现其中主要是微管蛋白和骨架蛋白。作者还围绕其中的热休克蛋白27以及KIAA0120作了深入的探讨。Zhang等<sup>[10]</sup>利用2-DE电泳与MALDI-TOF/MS质谱技术鉴定出人MSC定向分化为成骨细胞后的差异蛋白52个,其功能涉及代谢、信号转导、核酸复制、蛋白降解以及蛋白折叠等。周颖等<sup>[11]</sup>运用2D-DIGE与MALDI-TOF/MS技术分析BMSC<sub>0</sub>定向成骨分化过程中的蛋白质变化,结果鉴定到23个差异蛋白质点,其功能涉及到细胞骨架形成、细胞能量代谢与氧化应激等。这些应用蛋白质组学新兴的实验技术探索BMSC<sub>0</sub>C定向诱导成骨分化蛋白表达的差异,阐述BMSC<sub>0</sub>分化与更新过程中相关蛋白质的数量与修饰的变化,期望发现BMSC<sub>0</sub>C诱导成骨分化过程的关键调控蛋白。这些关键因子与信息有可能成为骨分化研究中的特异标志物,可以帮助更深入地了解BMSC<sub>0</sub>定向分化的分子机制,为OP的诊治提供更多的思路与途径。

研究人员还发现一些细胞因子能够调节成骨细胞的生成、成熟和活性。Kratchmarova等<sup>[12]</sup>在含有精氨酸的介质中用表皮生长因子(EGF)和血小板源性生长因子(PDGF)培养人MSC,运用同位素标记的定量质谱分析,直接比较了由EGF与PDGF调节的整个成骨细胞的信号网络,并证实两种细胞因子分别作用于磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)途径中的不同位点实现其调控功能的。这一研究为成骨细胞在OP的发病机制上以及提供OP治疗靶点上提供了有益的实验基础。

#### 4.2 蛋白质组学与破骨细胞

破骨细胞是人单核细胞/巨噬细胞家族的成员之一,它直接参与骨吸收,目前被认为是能够吸收骨组织的唯一细胞,直接参与骨吸收。研究破骨细胞蛋白质组以及分泌蛋白质组可以为理解破骨细胞增殖与分化的分子机制提供额外信息。Czupalla等<sup>[13]</sup>

利用2-DE结合MS方法,并在mRNA水平上比较表达的特定基因谱以及差异表达的蛋白质谱,发现两大类蛋白质,第一类蛋白质差异表达可以由微阵列的结果证实,第二类蛋白质的表达可用蛋白质组学方法分析,却不能在mRNA水平上证实,作者认为这类破骨细胞中被基因编码的差异蛋白是经历了翻译后修饰的缘故,该修饰的变化可直接决定蛋白质的结构,进而改变其活性与功能。Kubota等<sup>[14]</sup>通过2-DE联合MALDI/MS方法分析了破骨细胞的分泌蛋白质组,同时采用同位素编码的亲亲和标签结合液相色谱-质谱定量分析(LC-MS/MS),发现破骨细胞差异表达的蛋白质,涉及到组织蛋白酶、骨桥蛋白、豆蔻蛋白以及炎症蛋白等。作者还认为两种蛋白质组学分析方法各有优势,可以互补,共同有助于阐明骨吸收与骨形成的分子机制,可能为OP的治疗提供潜在的治疗靶标。

#### 4.3 蛋白质组学在骨质疏松症动物模型中的应用

##### 4.3.1 在绝经后骨质疏松症动物模型中的应用

绝经后骨质疏松症的动物模型于1969年首先由Saville运用大鼠建立,后经反复证实。目前双侧卵巢切除的雌鼠骨质疏松模型已经成为标准化的公认的绝经后骨质疏松经典的病理模型<sup>[15]</sup>。Fan等<sup>[16]</sup>建造去卵巢大鼠雌激素缺乏导致原发性OP模型,并应用中药(生脉成骨胶囊,主要成分为木豆叶)干预,运用2-DE、MALDI/MS以及大鼠蛋白质数据库成功鉴定出3个差异蛋白质,分别为硫氧还蛋白过氧化酶1、阻凝蛋白轻链肽2与泛素化酶E2-17KD,初步认为此三个蛋白在绝经后骨质疏松的发病以及中药治疗过程中发挥着重要调控作用。苏友新等<sup>[17]</sup>从股骨皮质骨蛋白质差异表达角度探讨去卵巢大鼠骨质疏松症发生机制以及中药强骨宝1号方干预的内在机制。作者应用蛋白质组学方法,发现去卵巢骨质疏松症造模可使股骨皮质骨烯醇化酶、ATP合成酶、乙酰辅酶A还原酶与肌钙蛋白表达上调,乳铁蛋白轻链、膜联蛋白表达下调。同时发现,强骨宝1号干预可使乳铁蛋白轻链、丙酮酸激酶同工酶、冠蛋白表达上调,烯醇化酶、ATP合成酶、肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶、肌球蛋白、磷酸甘油酸变味酶表达下调。作者认为上述差异蛋白的改变与去卵巢大鼠骨质疏松症发病以及强骨宝干预可能有关。

##### 4.3.2 继发性骨质疏松症动物模型中的应用

糖皮质激素诱发的骨质疏松是最为常见的继发性骨质疏松症的其中之一。糖皮质激素可通过多种

机制导致 OP 的发生与发展。超生理剂量的糖皮质激素可直接抑制成骨细胞的增殖与分化,还影响成骨细胞的功能,使得骨形成减少。同时糖皮质激素可直接刺激破骨细胞,可引起机体的钙磷代谢和甲状旁腺素代谢的变化,促进骨吸收。最终导致骨代谢处于骨吸收大于骨形成的负平衡状态,诱发 OP 的发生<sup>[18]</sup>。糖皮质激素诱导骨质疏松模型的建立对于临床防治长期大量应用糖皮质激素诱发的骨质疏松具有重要的实际意义。刘建仁等<sup>[19]</sup>建立大鼠的激素性骨坏死模型,分别制备激素性骨坏死组、中药(生脉成骨胶囊)治疗组与空白对照组大鼠股骨与肱骨组织的总蛋白,进行 2-DE 与 MALDI-TOF/MS 分析,鉴定出 3 个差异蛋白,分别为阻凝蛋白重链 II B、磷脂谷胱甘肽过氧化酶与泛素化酶 E2-17KD。结果初步认为这三种蛋白在激素性骨坏死的发病以及中药(生脉成骨胶囊)的治疗过程中发挥着重要作用。该研究为揭示激素性骨坏死的发病机理与中药的干预机制提供了全新的实验证据。

综上所述,随着蛋白质组学技术以及蛋白质相互作用网络通路<sup>[20]</sup>的发展与成熟,以及在 OP 研究中的广泛应用,将有利于更深入、全面了解 OP 的发生与发展机制,有助于发现 OP 的生物标志物与提供更有效的药物靶点,势必开创 OP 诊治的新时代。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Fields S. Proteomics; Proteomics in genomeland. *Science*, 2001, 291(5507): 1221-1224.
- [ 2 ] Wilkins MR, Sanchez JC, Cooley AA. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 19-50.
- [ 3 ] Zhou M, Veenstra T. Mass spectrometry: m/z 1983-2008. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 667-668.
- [ 4 ] Wang X, Liotta L. Clinical bioinformatics: a new emerging science. *J Clin Bioinforma*, 2011, 20(1): 1.
- [ 5 ] Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10(2): 92-96.
- [ 6 ] Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(1): 204.
- [ 7 ] Salasnyk RM, Westcott AM, Klees RF, et al. Comparing the protein expression profiles of human mesenchymal stem cells and human osteoblasts using gene ontologies. *Stem Cells Dev*, 2005, 14(4): 354-366.
- [ 8 ] Foster LJ, Zeemann PA, Li C, et al. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. 2005, 23(9): 1367-1377.
- [ 9 ] Liu YL, Yu XD, Liu XD, et al. Proteomic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced to differentiate into osteoblasts. *J Fourth Mil Med Univ*, 2006, 27(17): 1551-1554.
- [ 10 ] Zhang AX, Yu WH, Ma BF, et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem*, 2007, 304(1-2): 167-179.
- [ 11 ] Zhou Y, Hou SX, Chen BY, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stem cells undergoing osteoblast differentiation. *Chin J Bone Tumor Bone Disease*, 2009, 8(5): 296-299.
- [ 12 ] Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 2005, 308(5727): 1472-1477.
- [ 13 ] Czupalla C, Mansukoski H, Pursche T, et al. Comparative study of protein and mRNA expression during osteoclastogenesis. *Proteomics*, 2005, 5(15): 3868-3875.
- [ 14 ] Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics*, 2003, 3(5): 616-626.
- [ 15 ] Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol*, 2007, 26(3): 380-384.
- [ 16 ] Fan Y, Liu J, Wang S, et al. Functional proteome of bones in rats with osteoporosis following ovariectomy. *Life Sci*, 2005, 76(25): 2893-2901.
- [ 17 ] Su XX, Li YZ, Zheng LP. Proteomic analysis of femurs in ovariectomized rats following QIANGGUBAO I. *Fujian J TCM*, 2011, 42(1): 1-3.
- [ 18 ] den Uyl D, Bultink IE, Lems W F. Advances in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*, 2011, 13(3): 233-40.
- [ 19 ] Liu JY, Fan YG, Wang HB, et al. Bone proteomic analysis about Chinese medicine action on rat glucocorticoid-induced models of osteonecrosis. *Chinese Trad Med Traum Orthop*, 2005, 13(5): 4-9.
- [ 20 ] Wang J, Liu B, Li M, et al. Identifying protein complexes from interaction networks based on clique percolation and distance restriction. *BMC Genomics*, 2010, 11 Suppl2: S10.

(收稿日期: 2011-11-15)

# 蛋白质组学在骨质疏松症中的应用

作者: 张世阳, 高海青, ZHANG Shiyang, GAO Haiqing  
作者单位: 张世阳, ZHANG Shiyang(230001 合肥, 安徽医科大学附属省立医院, 安徽省立医院老年病科), 高海青, GAO Haiqing(250012 济南, 山东大学齐鲁医院老年病科, 山东省心血管病蛋白质组学重点实验室)  
刊名: 中国骨质疏松杂志   
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis  
年, 卷(期): 2012, 18(3)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201203024.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201203024.aspx)