

· 论 著 ·

LC-MS 法筛选强骨饮对绝经后骨质疏松症患者全血差异蛋白的研究

杨依然¹ 史晓林^{2*} 刘钟¹ 李春雯³ 梁博程² 刘康² 何伟涛⁴ 胡炯²

1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005

3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

4. 海盐县中医院骨伤科, 浙江 嘉兴 314300

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1676-04

摘要: **目的** 应用 LC-MS 法筛选分析经强骨饮治疗的绝经后骨质疏松症患者 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 和未经治疗的绝经后骨质疏松症患者全血差异蛋白, 探索强骨饮治疗绝经后骨质疏松症的作用机制。 **方法** 采用液相色谱-串联质谱联用测定法分别对 7 例经强骨饮治疗后的绝经后骨质疏松症患者 (治疗组) 及 8 例未经治疗的绝经后骨质疏松症患者 (对照组) 全血蛋白进行检测, 并对差异蛋白质进行定量分析, 筛选出差异蛋白, 进行生物信息学分析。 **结果** 分析治疗组与对照组患者全血筛选出的 91 个差异蛋白, 以差异倍数大于 1.2 倍作为显著上调、小于 0.83 作为显著下调, 确认有 31 个蛋白表达显著上调, 60 个蛋白表达显著下调。对所有差异蛋白进行 GO 功能注释分析, 发现上调的差异蛋白主要位于细胞质内, 而有 22% 的下调蛋白在细胞外, 有 1 个细胞骨架蛋白。差异蛋白参与的主要细胞活动为单一生物过程、细胞代谢过程等, 分子功能主要为催化活性、分子功能调节剂和结构分子活动等。 **结论** LC-MS 法能有效筛选出强骨饮治疗的 PMOP 患者和未经治疗的 PMOP 患者全血中的差异蛋白, 强骨饮治疗 PMOP 的作用机制是一个由多种蛋白质分子参与的结果, 其关键的靶标和具体的调控机制尚需进一步的研究探讨。

关键词: 液相色谱中串联质谱; 蛋白质组学; 绝经后骨质疏松症; 强骨饮

Analysis of differentially expressed proteins in whole blood in the treatment of postmenopausal osteoporosis with Qianggu decoction by LC-MS

YANG Yiran¹, SHI Xiaolin^{2*}, LIU Zhong³, LI Chunwen⁴, LIANG Bochong², LIU Kang², HE Weitao⁵, HU Jiong²

1. The Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053

2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005

3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053

4. Department of Orthopaedics, Haiyan County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiaxing 314300, China

* Corresponding author: SHI Xiaolin, Email: xlshi-2002@ 163.com

Abstract: **Objective** To screen and analysis of whole blood differential proteins in postmenopausal osteoporosis patients treated with Qiangguyin and untreated postmenopausal osteoporosis patients by LC-MS, and to explore the mechanism of Qiangguyin in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Methods** In this study, the whole blood protein was detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the treatment group ($n = 7$) and the control group ($n = 8$), and the differential proteins were quantitatively analyzed. **Results** A total of 91 differential proteins were screened from the whole blood of Qiangguyin treatment group and control group. Among them, 31 proteins were significantly up-regulated and 60 proteins were significantly down-regulated. GO function annotation and functional analysis were performed on all identified proteins, and it was found that the up-regulated differential proteins were mainly located in the cytoplasm, almost all in the cells, while 22% of the down-regulated proteins were outside the cell, 36% were in the cytoplasm, and 1 was cytoskeletal protein. The main activities involved in

基金项目: 国家自然科学基金(81573754, 81873129); “十三五”浙江省中医药(中西医结合)重点学科建设计划(2017-XK-A16)

* 通信作者: 史晓林, Email: xlshi-2002@ 163.com

differential proteins are single biological processes, metabolic processes, biological regulation, and responses to stimuli. The molecular functions are mainly catalytic activity, molecular function regulators and structural molecular activities. **Conclusion** LC-MS can effectively screen out the differential proteins of Qianggu Decoction in the treatment of PMOP. The mechanism of Qiangguyin in the treatment of postmenopausal osteoporosis is the result of a variety of protein molecules involved, its key targets and specific regulation. The mechanism needs to be further explored and verified.

Key words: liquid chromatography tandem mass spectrometry; proteomics; postmenopausal osteoporosis; Qiangguyin

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身骨代谢性疾病^[1], 绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是由于绝经后雌激素水平降低导致的骨质疏松。强骨饮是益气温经法治疗 OP 的代表方, 已经过十几年的临床应用, 大量临床研究^[2-5]已证明强骨饮治疗 OP 安全有效, 关于其作用机制的动物实验也很丰富, 但是目前强骨饮的治疗机制仍不明确。本研究应用液相色谱串联质谱 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) 法筛选分析强骨饮治疗后的 PMOP 患者和未经治疗的 PMOP 患者全血中的差异蛋白, 以探索强骨饮治疗 PMOP 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

在 2013 年 6 月至 2016 年 8 月于浙江中医药大学附属第二医院骨科就诊的 PMOP 患者中, 随机选择自愿参与本临床研究者 16 例, 其中 8 例行强骨饮治疗 (治疗组), 8 例未经任何骨质疏松相关治疗 (对照组), 所有患者均签署知情同意书。

1.1.1 诊断标准: 西医诊断标准参照本团队的前期研究^[4]。中医证候诊断参照文献^[6]中气滞血瘀型标准。纳入标准, 参照前期研究^[4]。排除标准: ①不符合上述 OP 诊断标准或中医辨证标准; ②患有其他干扰骨代谢疾病者; ③卵巢摘除者; ④近 2 年内曾使用过激素、降钙素或其他影响骨代谢药物者; ⑤患有严重其他疾病可能影响临床研究者; ⑥能引起继发性骨质疏松的疾病和因素。

1.1.2 治疗方法及疗效判定: 治疗组入选患者给予强骨饮颗粒剂 (杭州市养生实业有限公司, 药物组成参照前期研究^[4]。颗粒剂, 规格: 4 g/袋, 14 袋/包), 每次服用 4 g, 每日 3 次, 连服 12 个月。对照组在本研究期内不进行任何骨质疏松症治疗。对所有受试者每月进行电话随访及现场指导, 疗效判定参考前期研究^[3]。

1.2 采集样本

治疗组脱落 1 例, 其余受试者均按计划完成全

部对应治疗, 统一于清晨空腹抽取静脉血 15 mL。

1.3 液相色谱-质谱联用分析

将样本进行预处理, 经胰酶酶解, 高性能液体色谱分级, 真空冷冻干燥, 亲和富集, 除盐, 再次真空冷冻干燥, 溶解, 使用 EASY-nLC 1000 超高效液相进行分离^[8]。

1.4 生物信息学分析

使用 Maxquant (v1.5.2.8) 进行二次数据检索, 检索 Gene Ontology 和 COG 数据库, 对鉴定出的所有蛋白进行 GO 功能注释、分析。利用 STRING 数据库构建差异蛋白间相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 根据中心度定位关键网络节点。

2 结果

2.1 差异性蛋白鉴定与筛选

通过 LC-MS 法分析强骨饮治疗组与对照组的全血, 共筛选出差异蛋白 91 个, 以差异倍数大于 1.2 倍为显著上调、小于 0.83 为显著下调, 其中 31 个蛋白表达显著上调, 60 个蛋白表达显著下调。

2.2 差异基因 GO 分析结果

GO 功能注释和功能分析发现, 上调的差异蛋白有 55% 位于细胞质内, 几乎都在细胞内 (表 1); 下调蛋白有 22% 在细胞外, 仅有 36% 在细胞质内, 有一个细胞骨架蛋白, 见表 2。差异蛋白主要参与的细胞活动为单一生物过程、细胞代谢过程、细胞生物调节、对刺激的反应、信号传导等, 主要的分子功能为催化活性、分子功能调节剂和结构分子活动。

表 1 上调的差异蛋白的亚细胞定位分布情况

Table 1 The subcellular localization of up-regulated differential proteins

亚细胞定位	数量
细胞质	17
细胞核	8
细胞质和细胞核	3
细胞质膜	2
细胞外	1

表 2 下调的差异蛋白的亚细胞定位分布情况

Table 2 The subcellular localization of down-regulated differential proteins

亚细胞定位	数量
细胞质	22
细胞核	8
细胞质和细胞核	4
细胞质膜	6
线粒体	6
细胞骨架	1
细胞外	13

2.3 差异蛋白间的相互作用结果分析

通过 STRING 数据库分析表明,各差异蛋白之间在基因融合、共同表达、文本注释等方面均相互联系和作用,其中 PSMA7、PSMA3、UBA52、PSMC6、ATXN3、NEDD8、DDB1、PSMB6、RAD23 A 等蛋白位于相互作用节点的中心,见图 1。

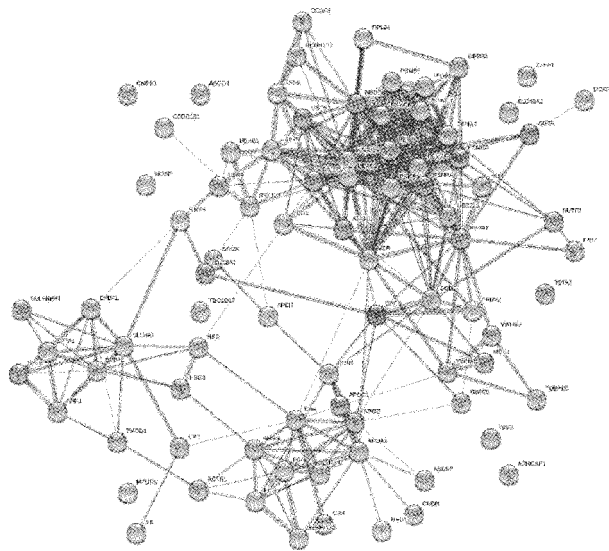


图 1 差异蛋白质基因交互作用网络图
Fig.1 PPI network diagram of differential proteins

3 讨论

原发性骨质疏松症本身具有起病隐匿、早期临床症状少的特点,相对于双能 X 线骨密度测定等检测手段,血液标志物检测具有副作用小、灵感度高的优点。PMOP 在 OP 发病率中占有很大比重,并且 PMOP 发生于女性绝经后这个特定时期,具有自身的病理基础,但是目前仍缺乏针对 PMOP 的特异性血液检测标志物^[9]。如果能够找到合适的血液检测标志物,无疑将在 PMOP 的诊断及治疗效果评估中起到重要作用。蛋白组学技术是阐明蛋白相关信

号通路靶点及机制的有效手段,蛋白组学技术的应用不仅可以为疾病的诊疗提供潜在的血液检测靶点,也可以帮助探索其发病机制及药物治疗机制。日前,以肿瘤组织为样本来源应用蛋白组学技术已经成功在肿瘤的良好、恶性鉴别等方面取得一定成果,发现一些具有特异性的蛋白质靶点^[10]。蛋白组学研究材料来源非常丰富,几乎所有稳定的蛋白质来源都可以作为实验材料,除血液及血液成分外,还有以动物尿液中蛋白^[11]、体外破骨细胞^[12]、腰椎后路椎间融合术中搜集的患者椎体源性骨髓上清液^[13]等作为样本来源进行骨质疏松症相关的蛋白组学研究的报道。有针对白种绝经后骨质疏松症患者外周血单核细胞的蛋白组学研究,发现四种蛋白质(LOC654188, PPIA, TAGLN2, YWHAB)下调和三种蛋白质(LMNBI, ANXA2P2, ANXA2)上调^[14]。出于骨质疏松临床研究的可重复性考虑,外周血作为样本来源具有取材简便、可重复性强的优点,无疑是具有优势的蛋白组学实验材料。而在血液及血液成分的蛋白组学研究中,相对于血清、血浆、外周血单核细胞的蛋白组学研究,全血的蛋白组学研究能够得到最多的差异蛋白。为了能够获得比较全面的研究成果,初步探索强骨饮干预 PMOP 的有效血液蛋白靶点,此次研究选择了用全血作为研究材料,按照预期获得了数量丰富的差异蛋白,这些差异蛋白都是下一步研究强骨饮治疗 PMOP 机制的潜在靶点。

强骨饮的前期研究已经证明其可以有效改善 PMOP 患者的骨转化率和骨密度值,并且观察到在用 9 个月后建立新的骨平衡^[15],因此本研究严格控制治疗组患者的用药时间,在用药满一年后进行采血,以求得到预期研究结果。

本研究通过蛋白组学方法分析发现,在 STRING 数据库生成的 PPI 网络处于作用节点中心的蛋白质中, PSMA7、PSMA3、PSMC6、PSMB6、ATXN3、NEDD8 在亚细胞分析定位都位于细胞质中,并且都参与了细胞的单一生物过程、细胞生物调节、对刺激的反应、信号传导等细胞活动,而 UBA52 位于细胞外, DDB1 位于细胞核内, RAD23 A 位于线粒体中。根据差异基因 GO 分析结果显示上调蛋白仅有一个在细胞外,绝大多数在细胞内,而下调蛋白有 22% 在细胞外,这提示了上调和下调的差异蛋白参与的细胞活动具有一定的差异性。

日前,本研究发现的差异蛋白中有少部分已经被发现与骨代谢有直接或者间接的关联,例如 ATXN3 在一项尼日利亚人帕金森病研究^[17]中被发

现与帕金森病的发病有关^[16],而帕金森病又与骨质疏松症具有相关性。PSMC6 和 PSMA3 被发现与特发性关节炎具有相关性^[18],PSMA3 还被发现与甲状腺发育疾病的发病有直接关系^[19],在 2019 年的一项针对中国老年 2 型糖尿病患者甲状腺功能紊乱的多中心临床研究中直接说明了甲状腺疾病与 OP 发病率具有直接关系^[20]。PSMA7 在一项针对牙周炎及牙槽骨吸收治疗的蛋白组学研究^[21]中被发现是治疗靶向蛋白。

综上所述,相对于血清、血浆、外周血单核细胞的蛋白组学研究,全血的蛋白组学研究能够筛选出相对数量更丰富的差异蛋白,这些差异蛋白都是下一步研究的潜在靶点,其中位于细胞质中的 PSMA7、PSMA3、PSMC6、PSMB6、ATXN3、NEDD8,位于细胞外的 UBA52、细胞核内的 DDB1、线粒体中的 RAD23 A 可以作为下一步研究的靶点。

4 结论

LC-MS 法能有效筛选出经强骨饮治疗的 PMOP 患者和未进行任何治疗的 PMOP 患者全血中的差异蛋白,强骨饮治疗绝经后骨质疏松症的作用机制是一个由多种蛋白质分子参与的结果,其关键的靶标和具体的调控机制尚需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国全科医学,2017,32:3963-3982.
- [2] 史晓林.自拟强骨饮治疗骨质疏松症的 32 例临床报告[J].中国中医骨伤科杂志,2006,2:57-58.
- [3] 吴连国,王定,朱彦昭,等.强骨饮治疗原发性骨质疏松症的临床研究[J].中国中医药科技,2009,3:159-160,167-168.
- [4] 李春雯,史晓林.益气温经方防治绝经后骨质疏松性髋部骨折的骨密度及 SF-36 疗效评价[J].中国现代应用药学,2015,32(5):592-595.
- [5] 孔令成,施振宇,姚建亮,等.强骨饮治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折的临床研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(9):1159-1163.
- [6] 黄宏兴,蔡桦,梁建祖,等.骨质疏松症(骨痿)的中医临床路径研究[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(1):12-18.
- [7] 刘忠厚,杨定焯,朱汉民,等.中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿)[J].中国骨质疏松杂志,2000,6(1):1-3.
- [8] 慕丹丹.硅对铜胁迫欧美杨无性系 1-214 酶活性及蛋白质组的影响[D].沈阳农业大学,2017.
- [9] Cano A, Miguel Ángel García-Pérez. Postmenopausal Osteoporosis [M]. Menopause, Springer; 2017.
- [10] Alaiya AA, Bo Franzén, Auer G, et al. Cancer proteomics: From identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6):1210-1217.
- [11] Jinkyu L, Sunil H. Identification of osteoporosis-associated protein biomarkers from ovariectomized rat urine[J]. Current Proteomics, 2017, 14(2):130-137.
- [12] Qi X, Peifu T, Yanpan G, et al. Proteomic analysis of estrogen-mediated signal transduction in osteoclasts formation[J]. BioMed Research International, 2015, 2015:1-10.
- [13] Zhou Q, Xie F, Zhou B, et al. Differentially expressed proteins identified by TMT proteomics analysis in bone marrow microenvironment of osteoporotic patients[J]. Osteoporosis International, 2019,30(5):1089-1098.
- [14] Zhang L, Liu Y, Zeng Y, et al. Network-based proteomic analysis for postmenopausal osteoporosis in Caucasian females[J]. Proteomics, 2016, 16(1):12-28.
- [15] Shi ZY, Zhang XG, Li CW, et al. Effect of traditional chinese medicine product, qiangguyin, on bone mineral density and bone turnover in chinese postmenopausal osteoporosis[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017:1-8.
- [16] Okubadejo N, Britton A, Crews C, et al. Analysis of nigerians with apparently sporadic parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3[J]. PLoS One, 2008, 3(10):e3421.
- [17] Raglione LM, Sorbi S, Naemias B. Parkinson's disease and osteoporosis[J]. Clinical Cases in Mineral & Bone Metabolism, 2010, 7(3):afs161.
- [18] Sjakste T, Paramonova N, Rumba-Rozenfelde I, et al. Juvenile idiopathic arthritis subtype and sex specific associations with genetic variants in the PSMA6/PSMC6/PSMA3 gene cluster[J]. Pediatrics & Neonatology, 2014, 55(5):393-403.
- [19] Budny B, Szczepanek-Parulska E, Zemojtel T, et al. Mutations in proteasome related genes are associated with thyroid hemiagenesis[J]. Endocrine, 2017, 56(2):279-285.
- [20] Zhu Y, Xu F, Shen J, et al. Prevalence of thyroid dysfunction in older Chinese patients with type 2 diabetes-A multicenter cross-sectional observational study across China[J]. PLoS One, 2019, 14(5):e0216151.
- [21] Abbaszadeh HA, Peyvandi AA, Sadeghi Y, et al. Er:yag laser and cyclosporin a effect on cell cycle regulation of human gingival fibroblast cells[J]. J Lasers Med Sci, 2017, 8(3):143-149.

(收稿日期:2019-02-21;修回日期:2019-06-17)