

基础研究

基于蛋白质组学对脊柱结核患者外周血浆
差异蛋白筛选及功能分析娄才立¹, 马宏宝¹, 任智博¹, 王立楠¹, 张旭², 董辉², 俞梦楚², 牛宁奎³

(1 宁夏医科大学临床学院 750004 银川市; 2 宁夏医科大学总医院科研设备管理中心 750004 银川市;

3 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市)

【摘要】目的:利用蛋白质组学技术筛选脊柱结核(spinal tuberculosis, STB)患者外周血浆中表达差异的蛋白质,探讨 STB 致病机制及代谢途径。**方法:**收集 30 例 STB 患者和 30 例健康志愿者的外周血,取其中 3 例 STB 患者(观察组)和 3 例健康志愿者(对照组)的外周血浆通过蛋白质组学同位素标记相对及绝对定量技术和液相色谱-质谱分析技术鉴定差异蛋白,筛选出表达差异显著(差异倍数 >1.2 , $P<0.05$)的蛋白质,并进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析;然后将 30 例 STB 患者和 30 例健康志愿者的血浆进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)和酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证其差异基因及蛋白。**结果:**STB 患者外周血浆中共筛选出 16 个与对照组存在显著性差异的蛋白;其中 11 个蛋白[脂多糖蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)、S100-A8 蛋白(protein S100-A8)、S100-A9 蛋白(protein S100-A9)、淀粉样蛋白 A-2 (serum amyloid A-2 protein, SAA2)、富含亮氨酸 α -2 糖蛋白(leucine-rich α -2-glycoprotein, LRG2)、蛋白聚糖 4(proteoglycan 4, PRG4)、补体因子 I (complement factor I, CFI)、 α -1-抗胰蛋白酶(α -1-antitrypsin, SERPINA1)、组织蛋白酶 D(cathepsin D, CTSD)、血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)和 λ 免疫球蛋白 4-60, IGLV4-60)]表达上调,5 个蛋白[黏着斑蛋白(vinculin, VCL)、3-64D 免疫球蛋白 3-64D, IGHV3-64D)、2D-29 免疫球蛋白 2D-29, IGKV2D-29)、非功能性免疫球蛋白(non-functional immunoglobulin 6D-41, IGKV6D-41)和 1-45 免疫球蛋白 1-45, IGHV1-45)]表达下调。LBP、S100-A8 蛋白和 S100-A9 蛋白在 STB 患者外周血浆的基因和蛋白表达与对照组比较均显著性升高($P<0.05$),主要参与白介素-17 信号通路和自噬信号通路,且在以上信号通路中与炎症、自噬、趋化因子等生物学功能相关。SAA2、LRG2、PRG4、CFI、SERPINA1、CTSD、CP 和 VCL 的基因和蛋白表达与对照组无统计学差异; IGLV4-60、IGHV3-64D、IGKV2D-29、IGKV6D-41 和 IGHV1-45 的基因表达与对照无显著性差异($P>0.05$),蛋白表达未验证。**结论:**蛋白质组学可用于 STB 患者外周血差异蛋白的筛选及 STB 发病机制的研究, LBP、S100-A8 和 S100-A9 蛋白可能是 STB 发病相关的重要表达蛋白,主要参与 IL-17 信号通路和自噬相关信号通路且集中于炎症、自噬、趋化因子等生物学功能。

【关键词】脊柱结核;蛋白质组学;差异蛋白;信号通路

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2022.09.06

中图分类号: R529.2, R446.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2022)-09-0814-09

Screening and functional analysis of differential proteins in peripheral plasma of spinal tuberculosis patients based on proteomics/LOU Caili, MA Hongbao, REN Zhibo, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2022, 32(9): 814-822

【Abstract】 Objectives: To screen the differentially expressed proteins in peripheral plasma of patients with spinal tuberculosis with proteomics technology to provide reference for the study of the pathogenic mechanism

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81860395);宁夏科学自然基金项目(编号:2020AAC03391);2022 年自治区重点研发计划项目(2022BEG03099)

第一作者简介:男(1992-),医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0951)6743242 E-mail:loucaili123@163.com

通讯作者:牛宁奎 E-mail:niuningkui163.com

and metabolic pathway of spinal tuberculosis. **Methods:** Peripheral blood was collected from 30 patients with spinal tuberculosis and 30 healthy volunteers, and the peripheral plasma from three patients with spinal tuberculosis (observation group) and three healthy volunteers (control group) was identified by isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) based proteomics technique and liquid chromatography-mass spectrometry analysis for differential proteins to screen the proteins with significant expression differences ($FC > 1.2$, $P < 0.05$), and enrichment analysis was performed through Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Then, plasma from spinal tuberculosis patients and healthy volunteers was tested by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to verify the differential genes and proteins. **Results:** A total of 16 proteins were screened in the peripheral plasma of patients with spinal tuberculosis that were significantly different from those of the control group. Among them, 11 were up-regulated [lipopolysaccharide-binding protein (LBP), S100-A8, S100-A9, serum amyloid A-2 protein (SAA2), leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG2), proteoglycan 4 (PRG4), complement factor I (CFI), alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), cathepsin D (CTSD), ceruloplasmin (CP), and lambda-immunoglobulin variable 4-60 (IGLV4-60)] and 5 proteins were down-regulated [vinculin (VCL), immunoglobulin heavy variable 3-64D (IGHV3-64D), immunoglobulin kappa variable 2D-29 (IGKV2D-29), non-functional immunoglobulin kappa variable 6D-41 (IGKV6D-41), and immunoglobulin heavy variable 1-45 (IGHV1-45)]. The gene and protein expressions of LBP, S100-A8, and S100-A9 proteins were significantly elevated in the peripheral plasma of patients with spinal tuberculosis compared with those of control group ($P < 0.05$). They mainly involved in the interleukin-17 signaling pathway and autophagy signaling pathway, where they were associated with inflammation, autophagy, chemokines and other biological functions. The gene and protein expressions of SAA2, LRG2, PRG4, CFI, SERPINA1, CTSD, CP, and VCL were not statistically different from those of the control group; the gene expression of IGLV4-60, IGHV3-64D, IGKV2D-29, IGKV6D-41, and IGHV1-45 were not significantly different from those of the control group ($P > 0.05$), and the protein expression was not validated. **Conclusions:** Proteomics can be used to screen differential proteins in peripheral blood of patients with spinal tuberculosis and study the pathogenesis of spinal tuberculosis. LBP, S100-A8 and S100-A9 proteins may be important expression proteins related to the pathogenesis of spinal tuberculosis, which proteins mainly participate in IL-17 signaling pathway and autophagy-related signal pathway, and focus on biological functions such as inflammation, autophagy and chemokines.

[Key words] Spinal tuberculosis; Proteomics; Differential protein; Signaling pathway

[Author's address] 1. Clinical Medical School, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China; 2. Institute of Medical Sciences, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China; 3. Department of Spinal Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

脊柱结核 (spinal tuberculosis, STB) 是一种慢性传染疾病, 常继发于肺结核, 占骨与关节结核的 50%, 主要通过血液循环到达椎体, 但具体发病机制目前仍不明确^[1-3]。STB 早期患者临床症状不明显, 病情严重程度取决于发病时间及并发症等因素, 若治疗不及时, 将导致严重并发症, 如脊柱后凸畸形和神经损伤性瘫痪, 严重影响患者的生存和疾病的预后^[4,5]。近年来蛋白质组学技术不断发展和完善, 为从蛋白质分子角度研究疾病的发病机制、诊断性标志物及药物疗效评价等提供了新的思路和方法^[6]。蛋白质组学技术主要运用蛋白质组学中同位素标记相对和绝对定量技术以及液

相色谱-质谱分析技术鉴定出差异性蛋白对其进行诊断性潜在标志物与发病机制研究; 蛋白质组学在结核病中对差异蛋白的信号通路、潜在分子靶点及药物治疗等取得较大进展。王秀军等^[7]运用非标记定量蛋白质组学技术对继发性肺结核中差异蛋白和信号通路进行了相关研究。Xu 等^[8]通过蛋白质组学对巨噬细胞在抗 STB 治疗过程中涉及的关键分子机制研究进行研究, 发现细胞色素 B-245- β 链 (cytochrome B-245 beta chain, CYB β)、基质金属肽酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 和 C-X-C 基序趋化因子配体 10 (C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL10) 具有作为

治疗 STB 分子靶点的潜能。Niu 等^[9]运用定量蛋白质组学对人巨噬细胞感染结核分枝杆菌进行抗结核药治疗的作用研究。本研究通过蛋白质组学对 STB 患者外周血浆中差异蛋白进行筛选研究,旨在为该疾病在诊断潜在生物性标志物、发病机制、代谢途径及治疗评价等方面提供帮助。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2019 年 10 月~2021 年 6 月在宁夏医科大学总医院确诊为 STB 的 30 例患者作为观察组,男性 13 例,女性 17 例,年龄 37~37 岁(53.5 ± 4.6 岁);同时招募 30 例健康志愿者作为正常组,男性 15 例,女性 15 例,年龄 40~72 岁(51.3 ± 5.5 岁)岁。两组性别及年龄均无统计学差异 ($P > 0.05$)。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会审查通过。

STB 患者纳入标准:(1)临床上通过实验室及影像学等检查确诊为 STB;(2)近期末服用激素或药物治疗。排除标准:(1)伴有活动性肺结核、糖尿病、恶性肿瘤及其他传染性疾病;(2)近期服药可能导致血常规数值变化的患者;(3)女性处于月经周期者;(4)化脓性脊柱炎、布氏杆菌性脊柱炎等其他病原菌感染引起的脊柱病变者;(5)资料不全或拒绝参与调查研究。

健康志愿者纳入标准:(1)身体健康,无高血压、糖尿病、恶性肿瘤、结核病等慢性疾病,近 1 个月内未服用免疫激活或抑制类药物;(2)近 2 周内无病毒、细菌感染病史;(3)体检无异常表现,血液常规检查红细胞、单核细胞、粒细胞等指标在正常范围内。排除标准为:(1)近期服药可能导致血常规数值变化者;(2)女性处于月经周期者;(3)有免疫缺陷类疾病或其他免疫系统性疾病;(4)资料不全或拒绝参与调查研究。

两组所用血常规检查的试剂和方法一致。

1.2 主要试剂和仪器

Easy nLC 色谱系统(Thermo Fisher Scientific);Q Exactive plus 质谱仪(Thermo Fisher Scientific);Multiskan Sky 酶标仪(Thermo Fisher Scientific);Agilent 1260 infinity II HPLC 系统;电泳仪(BIO-RAD);MP Fastprep-24 匀浆仪(MP Fastprep-24 5G);超声破碎仪(宁波新芝 JY96-I-IN);Nano Drop(Thermo Fisher scientific);聚丙

烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(碧云天,P0015F);脂多糖蛋白(LBP)抗体试剂盒、S100A8/A9 抗体试剂盒(北京欣博盛科技生物有限公司);RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen, 美国);TB Green premix Ex TaqTM II (TAKARA, 日本);Light Cycler 480 II 定量平台(Roche, 美国);PrimeScript RT reagent Kit(Thermo, 美国);乙腈(Merck, 1000304008);Lysing Matrix A(MP, 6910-100-99219);C18 反向分析柱(Waters, WAT023590);二硫苏糖醇(Sigma, 43819-5G);甲酸铵(Sigma, 17843);三氟乙酸(Sigma, T6508);裂解液(4%SDS, 100mM Tris-HCl);加速缓冲液(8M Urea, 150mM Tris-HCl);高 pH 值反向缓冲液 A (10mM HCOONH₄, 5%丙烯腈);高 pH 值反向缓冲液 B(10mM HCOONH₄, 85%丙烯腈)。

1.3 蛋白质组学差异蛋白的筛选

取结核患者和健康志愿者外周血浆各 3 例,按照 Agilent 对应 protocol 中操作方法,去除高丰度蛋白质后获得低丰度蛋白,加入胰蛋白酶裂解成肽段;加入乙腈等标记加入肽段溶液,然后加入同位素进行标记;将样品加载到 C18 反相分析柱进行分离,获取差异蛋白肽段,使用高分辨质谱仪 Q-Exactive plus 进行同位素标记相对和绝对定量技术检测,质谱扫描后使用质谱分析软件 Mascot 2.6 和 Proteome Discoverer 2.2 对数据进行分析,找出表达差异显著(差异倍数 >1.2 , $P < 0.05$)的蛋白质。

1.4 生物信息学分析

利用 Blast2GO 软件对目标蛋白质集合进行基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。

1.5 外周血中差异基因表达的验证

使用 Trizol 试剂盒提取两组所有人血液中的总 RNA,将 RNA 反转录获得 cDNA。取 cDNA 使用 TB Green premix Ex TaqTM II 在定量平台[以 β -actin 为内参进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)]验证实验。反应体系为:1 μ l 模板 cDNA, 0.4 μ l + 0.4 μ l 上下游引物, 8.2 μ l ddH₂O, 10 μ l SYBR MIX, 总体积 20 μ l;PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环。检测得到的数据通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析计算基因的相

对表达量。

1.6 外周血中差异蛋白表达的验证

收集两组所有人的全血 3~5ml 在 1h 内进行 3000rpm/min 离心 10min, 取上层血浆放 -80℃ 保存, 待样本收集完整后进行酶联免疫检测 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱中蛋白定性结果

STB 患者外周血浆通过质谱和数据分析, 共获得肽段 3382 个, 其中独特肽段 3024 个, 独特肽段拼接共获得蛋白质 352 个。

2.2 外周血浆中差异蛋白的检测结果

蛋白质组学对 STB 患者与正常组外周血浆检测, 以表达差异倍数大于 1.2 倍 (上调或下调) 且 $P < 0.05$ 作为显著差异蛋白的筛选条件, 结果显示 16 个差异蛋白中 11 个蛋白表达上调, 5 个蛋白表达下调 (表 1)。

2.3 差异蛋白的 GO 富集分析

GO 富集分析结果显示, 差异蛋白富集主要存在细胞外、细胞质、线粒体、内质网等; 相关部位在物质代谢过程中的作用体现在生物免疫调节、细胞分化调节、抗氧化调节、转运调节及吞噬作用等 (图 1)。

2.4 差异蛋白的 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析差异性蛋白的相关信号通路结果见 (表 1), 其中 STB 外周血浆中差异蛋白的相关性较大的 LBP、Protein S100-A8/A9 蛋白主要富集在 IL-17 信号通路、自噬信号通路 (图 2)。说明 IL-17 信号通路和自噬信号通路可能在 STB 患者的致病机制或炎症反应中发挥重要作用。

2.5 外周血差异蛋白基因表达水平

RT-PCR 引物见表 2。STB 患者外周血中 LBP、S100-A8/9 反转录基因表达与对照组比较显著性升高 ($P < 0.05$), SAA2、LRG2、PRG4、CF1、SERPINA1、CTSD、CP、VCL、IGHV3-64D、IGKV6D-29、IGKV6D-41 和 IGH-45 基因表达与对照组比较无统计学差异 (表 3, $P > 0.05$)。

2.6 外周血浆中差异蛋白表达水平

使用 ELISA 抗体试剂盒检测了 STB 患者中的 LBP、S100-A8/A9 (同型二聚体)、SAA2 等蛋白, 结果显示, LBP、S100-A8/S100-A9 蛋白 (同型二聚体) 在 STB 患者外周血浆表达水平存在显著性升高, 且 LBP、S100-A8/S100-A9 蛋白的表达与该基因在转录水平表达一致; SAA2、LRG2、PRG4、CF1、SERPINA1、CTSD、CP 和 VCL 蛋白的表达在 STB 患者与对照组人群无明显差异, 且与对应基因表达不一致 (表 4)。

3 讨论

蛋白质组学技术是研究及实现对复杂样品中全部蛋白质进行大规模修饰定性和定量分析的技术, 具有特异性强、敏感度高、高通量等特点^[10-12]。使用软件和质谱技术对同位素标记相对和绝对定量技术来研究 STB 外周血浆中蛋白表达的差异性, 对比差异蛋白不同肽段信号进行定量分析; 应用 Proteome Discoverer 2.2 软件对所有肽段的进行数据查库鉴定、定性、定量和生物信息学分析, 筛选其可能信号通路, 为 STB 的致病机制的研究提供参考依据。

本研究使用蛋白质组学技术研究 STB 患者与健康志愿者外周血浆来寻找表达差异的蛋白并对其进行进一步筛选验证, 结果显示 LBP 和 S100-A8/A9 蛋白及基因在 STB 患者外周血浆的基因转录和蛋白水平表达一致且均存在显著差异性, 可用于 STB 疾病的相关性研究。SAA2、LRG2、PRG4 等在健康志愿者与 STB 患者外周血中的基因和蛋白在转录和蛋白表达水平不一致且差异性不显著。但有研究表明基因转录水平与蛋白水平的表达并不完全相同且存在差异^[13], 而 SAA2、LRG2、PRG4 等基因在血液中表达不显著, 可能与其蛋白在血液循环系统中存在位置可能不同。GO 和 KEGG 富集分析表明 STB 中主要的 LBP、S100-A8/A9 蛋白在炎症反应中与 IL-17 信号通路、自噬信号通路等密切相关。LBP 与 C 反应蛋白、炎症性标志物等显著相关^[13]。IL-17 信号通路是炎性相关的一种信号通路, 其核心因子为 IL-17。有研究表明, IL-17 是一种高度通用的促炎细胞因子, 对多种生理过程至关重要, 包括宿主防御、组织修复、炎症疾病发生机制和癌症进展^[14]。Amatya 等^[15]发现在 IL-17 信号通路中 IL-17 因子

不仅在炎症反应中发挥重要作用,而且能够诱导起始基因转录或通过稳定目的基因产物上调炎症基因的表达,释放趋化因子、抗菌肽等炎症物质,进而产生炎症作用。炎症反应中 IL-17 因子在其信号通路中能够抑制核转录因子- κ B (nuclear transcription Kappa B, NF- κ B)的激活^[14,16]。LBP 为细胞膜表面受体蛋白,在结核分枝杆菌感染的炎性反应 NF- κ B 信号通路中起到激活和传递信

号的作用^[17]。NF- κ B 因子在结核分枝杆菌引起炎症反应中常诱导大量炎症介质表达,进而引起炎症的不可控性^[18]。当 NF- κ B 因子激活过程被抑制后,则在结核中起到抗炎症作用^[14-16,18]。因此,推测在结核分枝杆菌侵袭细胞时可能激活 LBP,进而引起 IL-17 信号通路的反应,对其炎症反应产生抑制,且 IL-17 能够抑制 NF- κ B 信号通路的激活。本研究结果显示,STB 患者外周血中 LBP 与

表 1 脊柱结核患者外周血中表达差异显著的蛋白

蛋白名称 Protein hydrolysates	差异倍数 Fold change	显著性 Significance	亲本基因 Parental gene	基因本体 Gene ontology	信号通路 Signaling pathway
λ 免疫球蛋白 lambda-immunoglobulin variable 4-60(LGLV 4-60)	2.130	0.010	IGLV4-60	炎症、免疫反应 Inflammation and immunoreaction	无 None
脂多糖蛋白 Lipopolysaccharide-binding protein(LBP)	1.825	0.029	LBP	炎症、趋化作用、吞噬作用 Inflammation, chemotaxis, and phagocytosis	NF- κ B 和 IL-17 信号通路 NF-kappa B signaling pathway and IL-17 signaling pathway
血清淀粉样蛋白 A-2 Serum amyloid A-2 protein (SAA2)	1.758	0.028	SAA2	趋化作用 Chemotaxis	无 None
富含亮氨酸 α -2 糖蛋白 Leucine-rich alpha-2- glycoprotein(LRG2)	1.714	0.022	LRG1	转化 Transformation	无 None
S100-A8 蛋白 Protein S100-A8(S100-A8)	1.644	0.042	S100-A8	炎症、趋化作用、吞噬作用、凋亡 Inflammation, chemotaxis, phagocytosis, and apoptosis	IL-17 信号通路 IL-17 signaling pathway
100-A9 蛋白 Protein S100-A9(S100-A9)	1.568	0.031	S100-A9	炎症、趋化作用、吞噬作用、凋亡 Inflammation, chemotaxis, phagocytosis, and apoptosis、	IL-17 信号通路 IL-17 signaling pathway
蛋白聚糖 4 Proteoglycan 4(PRG4)	1.438	0.003	PRG4	粘附、抑制作用 Conglutination and inhibition	无 None
补体因子 I Complement factor I(CF I)	1.376	0.030	CFI	趋化作用、迁移作用、吞噬作用 Chemotaxis, migration, and phagocytosis	金黄色葡萄球菌感染 Staphylococcus aureus infection
α -1-抗胰蛋白酶 Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1)	1.345	0.022	SERPINA1	趋化作用、吞噬作用 Chemotaxis and phagocytosis	补体系统 Complement and coagulation cascades
组织蛋白酶 D Cathepsin D(CTSD)	1.326	0.049	CTSD	凋亡、转运、炎症 Apoptosis, translocation, and inflammation	鞘脂类信号通路 Sphingolipid signaling pathway
血浆铜蓝蛋白 Ceruloplasmin(CP)	1.231	0.000	CP	转运、抗氧化 Translocation and antioxidant	卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism
黏着斑蛋白 Vinculin(VCL)	0.821	0.032	VCL	粘附 Conglutination	粘附 Focal adhesion
3-64D 免疫球蛋白 Immunoglobulin heavy variable 3-64D(IGHV3-64D)	0.730	0.019	IGHV3- 64D	趋化作用、免疫反应 Chemotaxis and immunoreaction	钙信号通路 Calcium signaling pathway
2D-29 免疫球蛋白 Immunoglobulin kappa variable 2D-29(IGKV2D-29)	0.694	0.034	IGKV2D- 29	趋化作用、免疫反应 Chemotaxis and immunoreaction	NF- κ B 信号通路 NF-kappa B signaling pathway
非功能性免疫球蛋白 Non-functional immunoglob- ulin 6D-41(IGKV6D-41)	0.669	0.003	IGKV6D- 41	趋化作用 Chemotaxis	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway
1-45 免疫球蛋白 Immunoglobulin heavy variable 1-45(IGHV1-45)	0.637	0.048	IGHV1-45	增殖、分化、免疫反应 Multiplication, differentiation, and immunoreaction	B细胞受体信号通路 B cell receptor signaling pathway

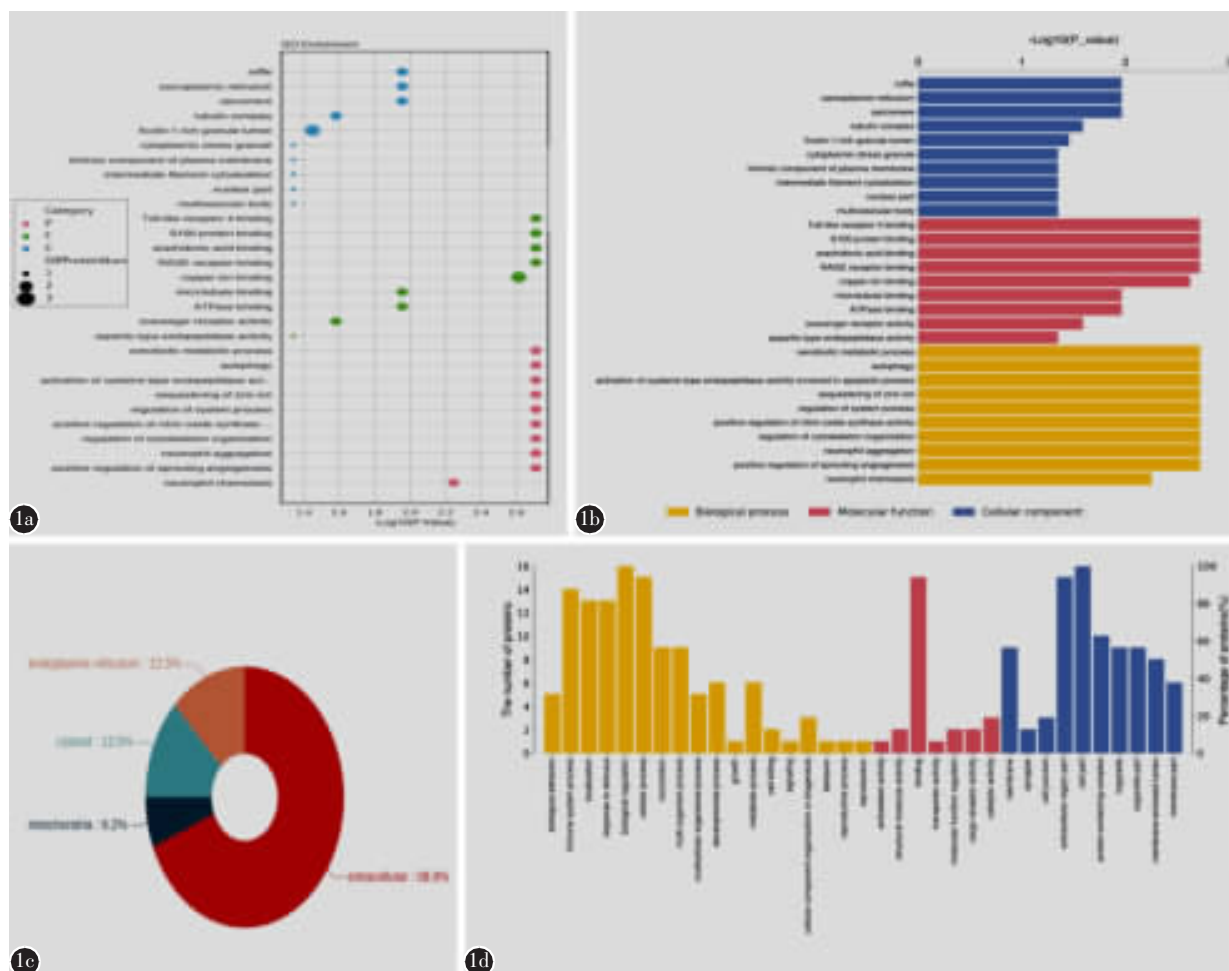


图 1 差异蛋白相关的 GO 富集分析 a 筛选出的差异蛋白质组成、参与的活动和发挥作用 b 筛选的差异蛋白在不同的生物学功能中的差异倍数 c 筛选出的差异蛋白存在的位置 d 在不同功能下筛选出的差异蛋白质的数量

Figure 1 GO enrichment analysis associated with differential proteins a The composition, activity and function of the screened proteins b The fold change of the screened differential proteins in different biological functions c The locations of the screened differential proteins d The number of differential proteins screened under different functions

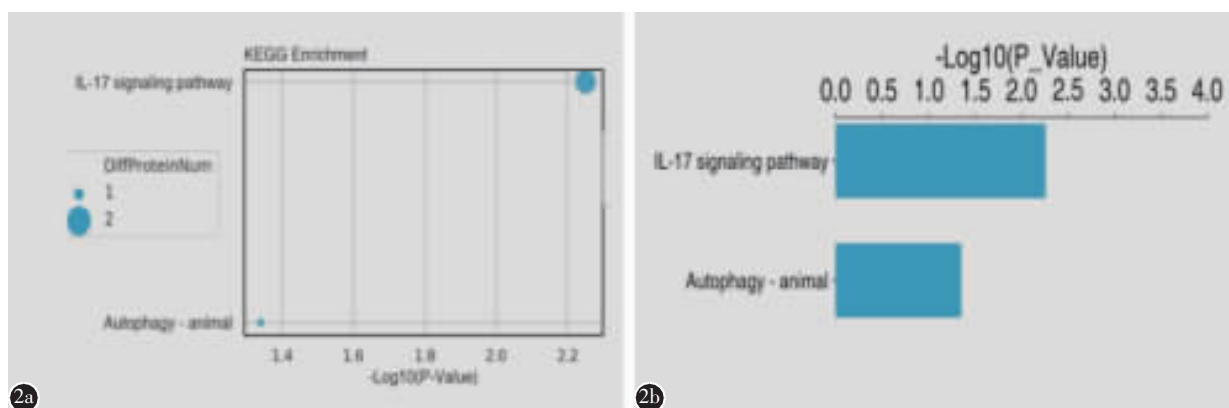


图 2 差异蛋白的 KEGG 富集分析结果 a KEGG 富集分析气泡图 b KEGG 富集分析柱状图

Figure 2 KEGG enrichment analysis results of differential proteins a Bubble diagram of KEGG enrichment analysis b Histogram of KEGG enrichment analysis

IL-17 信号通路关系密切,但在 STB 炎症中如何发挥作用以及参与的途径及机制目前仍不清楚。LBP 是最早被发现,在革兰氏阴性菌中能 与脂多糖结合形成的一种急性反应蛋白。Chen 等^[19]发现 LBP 在脓毒血症期间表达显著升高,在鉴别非脓毒血症和脓毒血症时具有显著的特异性,具有成为诊断或鉴别脓毒血症生物标志物的潜能。Chalubinska-Fendler 等^[20]测量乳腺癌患者放疗后 LBP 的表达对疗效评估具有较高的准确性,有望成为乳腺癌放疗疗效评估的生物标志物。LBP 在类风湿性关节炎活动期的敏感性高于红细胞沉降率或 C-反应蛋白,也有可能成为诊断类风湿性关节炎的实验性标志物^[21]。Pillay 等^[22]测量活动性肺结核及治愈结核患者体内 LBP 表达显著升高,而结核的治疗期间 LBP 表达反而下降,LBP 在结核的发病中发挥了重要作用。De Groot 等^[23]在活动性肺结核患者血清中对 LBP 进行了验证,其具有成为诊断肺结核生物标志物的潜力。本研究发

现 LBP 在 STB 患者的外周血浆中稳定差异表达的特异性,LBP 有望成为诊断 STB 潜在的标志物。

另外,Wang 等^[24]发现 S100-A8 蛋白和 S100-A9 蛋白为同型二聚体,通过刺激细胞招募和诱导细胞因子分泌来调节炎症反应,可作为诊断和随访的候选生物标志物以及炎症相关疾病治疗反应的预测指标。本研究结果表明,S100-A8/A9 蛋白与自噬和 IL-17 信号通路密切相关。而自噬在细

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Table 2 RT-PCR primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物 Products
LBP	上游 Forward CTGGCATTGCTGCTTACGTC	164
	下游 Reverse CTCAAGTCCCCGGTGAAGTC	
S100-A8/A9	上游 Forward TGTCTTTTCAGAAGACCTGGTTTC	140
	下游 Reverse ACGGCATGGAAATTCCTTTT	
IGLV4-60	上游 Forward GCTGACTCAATCATCCTCTGC	171
	下游 Reverse CTCCCCTGTGTGTAGCTTCCA	
SAA2	上游 Forward TGGTGGAAAGATGGAGACAA	115
	下游 Reverse AAAGCTCTCTCTGTCATCACTG	
LRG1	上游 Forward TTGGCAGCATCAAGGAAGC	226
	下游 Reverse CAGATGGACAGTGTCCGCA	
PRG4	上游 Forward CAGAGGTCTCTACTCCAACCTACC	199
	下游 Reverse AGTCATTTCAAGTTAGTCGCTG	
CFI	上游 Forward GGTGAGGTGGACTGCATTACA	191
	下游 Reverse CCTCCCACAATTCGTTTCCTTC	
SERPINA1	上游 Forward GGAGGCTCAGATCCATGAAGG	187
	下游 Reverse GGTGTCCCCGAAGTTGACAG	
CTSD	上游 Forward TGCTCAAGAACTACATGGACGC	117
	下游 Reverse CGAAGACGACTGTGAAGCACT	
CP	上游 Forward GGGCCATCTACCCTGATAACA	88
	下游 Reverse TTAAAGGTCCGATGAGTCTGTA	
VCL	上游 Forward CTCGTCCGGGTTGGAAAAGAG	142
	下游 Reverse CTCGTCCGGGTTGGAAAAGAG	
IGHV3-64D	上游 Forward GGACGACGTCTGTAGCACT	83
	下游 Reverse GGGCTATCTTCCGTATCACA	
IGKV2D-29	上游 Forward CCGAGGTCTCATCTCGATCTTCC	129
	下游 Reverse AGTCATATCAGGGTTAGTCACTG	
IGKV6D-41	上游 Forward GCAGGACCAGATTCATCATGG	214
	下游 Reverse GGTCTCGTCGATGTAGACAG	
IGHV1-45	上游 Reverse GCGGAATCGATCATCTGTGCC	96
	下游 Forward TCCTCTTGTGCTAGCATCCA	
β-actin	上游 Forward GAAAATCTGGCACCACAAAT	43
	下游 Reverse GATAGCACAGCTGGATAGCAA	

表 3 正常人和脊柱结核患者外周血中差异基因的表达情况 (n=30)

Table 3 Expressions of differential genes in peripheral blood of normal people and patients with spinal tuberculosis

	正常人 Normal people	脊柱结核患者 STB patients	P值 P value
LBP	0.97±0.36	1.63±0.31	0.01
S100-A8/9	0.87±0.35	1.46±0.26	0.03
IGLV4-60	0.79±0.26	0.86±0.38	0.23
SAA2	1.35±0.25	1.25±0.82	1.06
LRG1	0.76±0.31	0.86±0.23	0.06
PRG4	0.81±0.31	0.89±0.27	0.93
CFI	0.83±0.52	0.77±0.46	0.09
SERPINA1	0.75±0.31	0.89±0.62	0.06
CTSD	0.76±0.46	0.67±0.54	0.16
CP	0.84±0.57	0.74±0.51	0.07
VCL	0.76±0.31	0.58±0.39	0.06
IGHV3-64D	0.89±0.43	0.75±0.47	0.25
IGKV2D-29	0.85±0.39	0.76±0.48	0.29
IGKV6D-41	0.76±0.43	0.89±0.53	0.08
IGHV1-45	0.67±0.37	0.85±0.23	0.26

表 4 正常人和脊柱结核患者外周血中差异蛋白的表达情况 (n=30,pg/ml)

Table 4 Expressions of differential proteins in peripheral blood of normal people and patients with spinal tuberculosis

	正常人 Normal people	脊柱结核患者 STB patients	P值 P value
LBP	4.97±1.23	7.57±2.52	0.02
S100-A8/9	4.26±1.49	5.98±1.64	0.03
SAA2	5.56±3.25	5.98±4.23	0.67
LRG1	23.26±12.32	28.36±29.36	1.36
PRG4	323.56±159.64	415.38±257.68	0.09
CFI	46.57±23.49	43.26±24.17	0.83
SERPINA1	384.34±87.36	387.92±106.85	1.96
CTSD	589.48±126.47	658.76±175.65	0.08
CP	92.36±23.18	85.76±26.34	0.67
VCL	1652.48±849.54	1584.25±867.59	0.82

胞保持生长、分化、凋亡的过程和维持细胞内环境稳态中起重要作用^[25]。自噬在许多疾病如癌症、阿尔兹海默症和微生物感染性疾病等的发生发展中发挥重要作用^[26-28]。自噬在其信号通路中是由巨噬细胞介导的一种免疫性保护机制,在人体中参与体液免疫反应、细菌感染防御反应、炎症反应调节、炎症因子产生及吞噬调节作用^[29]。有相关研究报道 S100-A8/A9 蛋白在炎症因子中大量产生以及在肿瘤的发生和转移中发挥重要作用^[30]。Mierrez 等^[31]的研究发现结核分枝杆菌与自噬之间存在相互抑制状态,即结核分枝杆菌能够抑制自噬,进而自我增殖;当自噬被激活时则可能抑制结核杆菌,对机体起到保护作用。自噬是结核分枝杆菌侵袭人体巨噬细胞防御时的过程,且在防御过程中发挥着重要作用^[25]。S100A8/A9 蛋白又称“警报性蛋白”,虽然在疾病中作用机制尚不清楚,但研究发现 S100A8/A9 蛋白在类风湿性关节炎、关节损伤及心肌梗死等疾病中表达显著,对疾病复发风险的预测及治疗具有显著的意义, S100A8/A9 蛋白具有作生物标志物的潜能^[32,33]。Gopal 等^[34]在肺结核患者中发现 S100A8/A9 蛋白可作为潜在生物标志物来评估肺结核疾病严重程度。本研究结果显示 S100A8/A9 蛋白在 STB 患者外周血浆表达中也存在稳定性差异。因此,我们推测其在 STB 诊断和随访中具有生物标志物的潜能,但其发挥的生物学功能仍需要进一步研究和分析。

本研究利用蛋白质组学技术筛选出 STB 患者外周血浆中表达差异的蛋白质,并对其进行了生物信息学分析研究,结果显示, LBP、S100-A8/A9 蛋白在 STB 的炎症机制的 IL-17 信号通路、自噬信号通路中可能发挥着重要的调控作用, LBP、S100-A8/A9 具有作为诊断 STB 标志物的潜能。但由于其具体功能和机制在 STB 研究中鲜有报道,对 LBP、S100-A8/A9 蛋白筛选及相关信号通路进一步研究,期待为 STB 的发病机制及潜在性诊断标志物的研究提供线索。但本研究样本数量相对较少,仍需进一步扩大样本进行验证研究。

4 参考文献

- 吕贵何, 宗治贤, 陈祝明, 等. 脊柱结核的发病机制、诊断及治疗相关进展[J]. 系统医学, 2019, 4(2): 174-177.
- 顾明浩, 周昌伟, 刘庆鹏. 脊柱结核的手术治疗研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2020, 18(3): 208-212.
- 杨璐, 段浩, 李云轩, 等. 脊柱结核术后手术部位感染的相关危险因素分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2020, 30(11): 964-969.
- Wang B, Shang R, Yang T, et al. Evaluation of clinical outcomes of one-stage anterior and posterior surgical treatment for atlantoaxial tuberculosis complicated with neurological damage[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1): 148.
- The epidemiology of spinal tuberculosis in the United States: an analysis of 2002-2011 data[J]. J Neurosurg Spine, 2017, 26(4): 507-512.
- 宿进江, 陈晓杭, 陈红燕, 等. 国内蛋白质组学研究现状及前沿热点可视化分析[J]. 生物技术, 2020, 30(6): 561-568.
- 王秀军, 刘秋月, 陈晓凤, 等. 基于非标记定量技术的继发性肺结核患者血浆蛋白质组学研究[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(2): 159-165.
- Xu G, Xue J, Jiang J, et al. Proteomic analysis reveals critical molecular mechanisms involved in the macrophage anti-spinal tuberculosis process[J]. Tuberculosis(Edinb), 2021, 126: 102039.
- Niu N, Yin J, Yang Y, et al. Novel targeting of PEGylated liposomes for codelivery of TGF-beta1 siRNA and four anti-tubercular drugs to human macrophages for the treatment of mycobacterial infection: a quantitative proteomic study[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 4441-4470.
- Vyse S, Desmond H, Huang PH. Advances in mass spectrometry-based strategies to study receptor tyrosine kinases [J]. IUCr J, 2017, 4(Pt 2): 119-130.
- 吴琼, 隋欣桐, 田瑞军. 高通量蛋白质组学分析研究进展[J]. 色谱, 2021, 39(2): 112-117.
- Gengenbacher M, Mouritsen J, Schubert OT, et al. Mycobacterium tuberculosis in the Proteomics Era[J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(2): Free article.
- Kudoh K, Mizukami H, Itabashi C, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is a distinctive biomarker of abnormal pain threshold in the general Japanese population [J]. BMJ Open Diabetes Res Care, 2020, 8(1): e001739.
- Li X, Bechara R, Zhao J, et al. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease[J]. Nat Immunol, 2019, 20(12): 1594-1602.
- Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 signaling: the yin and the yang[J]. Trends Immunol, 2017, 38(5): 310-322.
- Zhu S, Pan W, Song X, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha[J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1077-1086.
- Huang X, Zeng Y, Jiang Y, et al. Lipopolysaccharide-binding protein downregulates fractalkine through activation of p38 MAPK and NF-kappaB [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 9734837.
- Zhang Q, Sun J, Fu Y, et al. Guttiferone K exerts the anti-inflammatory effect on mycobacterium tuberculosis-(H37Ra-) infected macrophages by targeting the TLR/IRAK-1 mediated

- Akt and NF- κ B pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 8528901.
19. Chen K, Chao C, Jiang J, et al. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein as biomarker for sepsis in adult patients: a systematic review and Meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e153188.
20. Chalubinska-Fendler J, Graczyk L, Piotrowski G, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is an early biomarker of cardiac function after radiation therapy for breast cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019, 104(5): 1074–1083.
21. Wen W, Li Y, Cheng Y, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is a sensitive disease activity biomarker for rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(2): 233–240.
22. Pillay K, Lewis L, Rambaran S, et al. Plasma biomarkers of risk of tuberculosis recurrence in HIV co-infected patients from South Africa[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631094.
23. De Groote MA, Sterling DG, Hraha T, et al. Discovery and validation of a six-marker serum protein signature for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(10): 3057–3071.
24. Wang S, Song R, Wang Z, et al. S100A8/A9 in Inflammation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1298.
25. Li Y, Lei Y, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 43–52.
26. Pitt A, Buchanan S. A biochemical and structural understanding of TOM complex interactions and implications for human health and disease[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1164.
27. Russo M, Russo G. Autophagy inducers in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 153: 51–61.
28. Giampieri F, Afrin S, Forbes-Hernandez T, et al. Autophagy in human health and disease: novel therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(4): 577–634.
29. Fang F, Ge Q, Li R, et al. LPS restores protective immunity in macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* via autophagy[J]. *Mol Immunol*, 2020, 124(1): 18–24.
30. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, et al. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(10): 801–812.
31. Mierrez M, Master S, Singh S, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 753–766.
32. Kang K, Woo J, Park S. S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Korean J Intern Med*, 2014, 29(1): 12–19.
33. Cai Z, Xie Q, Hu T, et al. S100A8/A9 in myocardial infarction: a promising biomarker and therapeutic target [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 603902.
34. Gopal R, Monin L, Torres D, et al. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(9): 1137–1146.

(收稿日期:2022-01-10 末次修回日期:2022-08-30)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 卢庆霞)