·临床流行病学·

利用蛋白质组学技术筛选特发性肺间质纤维化患者血清生物标志物

张颖 王超超 牛瑞
250000 济南，山东大学第二医院呼吸内科
通信作者：牛瑞，Email：yjxs1127@163.com
DOI：10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.08.020

【摘要】 目的 利用蛋白质组学技术筛选并鉴定特发性肺间质纤维化患者和健康人血清差异表达蛋白。**方法** 收集山东大学第二医院于2014年10月至2015年10月收治的30例特发性肺间质纤维化患者及健康人血清各30份，组内等量混合后，去除高丰度蛋白，经同位素标记相对和绝对定量试剂标记后采用二维液相色谱-串联质谱鉴定并进行相对定量。对鉴定出的差异蛋白进行基因功能聚类（GO）分析和通路富集分析，筛选出与特发性肺间质纤维化发生相关的蛋白质。**结果** 质谱鉴定出置信度＞95%的蛋白质共490个，其中差异表达蛋白25个。与对照组相比，25个差异蛋白中有4个表达上调，21个表达下调。GO分析显示，大多数差异蛋白处于细胞外区域（92%）；通路富集分析显示，含差异蛋白数量最多的通路为补体和凝血级联通路。**结论** 特发性肺间质纤维化患者血清中鉴定出了与补体及凝血相关的差异蛋白，其具体功能有待进一步研究。

【关键词】 特发性肺间质纤维化；蛋白质组学；血清生物标志物

Screening on serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis patients by proteomics technology *Zhang Ying, Wang Chaochao, Niu Rui*

Department of Respiration, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250000, China
Corresponding author: Niu Rui, Email: yjxs1127@163.com

【Abstract】 Objective Applying the proteomics technology to identify proteins differentially in serums of idiopathic pulmonary fibrosis patients and normal population. **Methods** The study included serum samples from idiopathic pulmonary fibrosis group and normal controlled group with 30 cases of each, from the Second Hospital of Shandong University, between October 2014 and October 2015. Proteins differentially expressed in serums were quantified by the isobaric tags for relative and absolute quantization coupled with two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry technology. The proteins were analyzed in terms of molecular function, cell location and biological processes for showing the key protein molecules which were related to the development of idiopathic pulmonary fibrosis. **Results** A total of 490 kinds of proteins (with confidence coefficient above 95%) were identified by mass spectrometry and 25 kinds of differentially expressed proteins were found. Compared with the control group, we found 4 types of up-regulated proteins and 21 down-regulated ones in the serum of idiopathic pulmonary fibrosis patients. Data from the Gene ontology analysis showed that most differentially expressed proteins were in the extracellular region (92%) while pathway enrichment analysis showed that most proteins were involved in the complement and coagulation cascade pathway. **Conclusion** Proteins related to the complement system coagulation cascade pathway, and the proteins function need to be further studied.

【Key words】 Idiopathic pulmonary fibrosis; Proteomics; Serum biomarkers

特发性肺间质纤维化是一种特殊类型、不明原因的慢性、进行性、纤维化性间质性肺炎，患者主要表现为进行性呼吸困难，伴刺激性干咳，进而发展为低氧血症和呼吸衰竭，最终导致死亡[1]。特发性肺间质纤维化的早期诊断较难，诊断主要依赖胸部高分辨电子计算机断层扫描（CT）和（或）肺活检组织病理学[1]，这些方法存在敏感度低、创伤性大的缺点。而生物标志物作为一类反映机体健康或疾病状态的特殊物质，测定方便。因此，寻找新的特发性肺间质纤维化相关的分子标记物对开展早期诊断十分必要[2]。蛋白质组学是通过大规模的蛋白分离，从整体的角度来分析生物过程中全部蛋白质的组成、

表达、功能改变和相互作用的学科，在蛋白质水平上揭示蛋白功能与细胞生命活动的规律[3]，从而作为诊断疾病或者判别预后的依据[4]。同位素相对标记与绝对定量（isobaric tags for relative and absolute quantitation，iTRAQ）联合二维液相色谱-串联质谱（two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry，2D-LC-MS/MS）技术是近年来应用最广泛的蛋白质组学定量技术[5]，为解决低丰度蛋白的定性、定量研究问题提供了有效途径，已被应用于肿瘤、颅脑损伤、苯中毒等多种疾病的标志物的研究[6]。本研究应用iTRAQ技术结合2D-LC-MS/MS技术对特发性肺间质纤维化患者血清蛋白质进行识别，对差异蛋白进行基因功能（GO）分析、KEGG通路富集分析，以初步探讨差异蛋白的功能。

对象与方法

1. 研究对象：山东大学第二医院呼吸内科2014年10月至2015年10月收治的30例特发性肺间质纤维化患者，男性25例，女性5例，年龄为（63.15±9.8）岁，其中病情轻度9例、中度18例、重度3例。参照2011年特发性肺间质纤维化诊疗指南[1]进行诊断，临床表现为以劳力性呼吸困难并进行性加重，伴咳嗽、气喘或黏液脓性痰或脓痰等；胸部高分辨CT显示肺部出现弥漫性网状、结节状或毛玻璃样影等；肺功能显示限制性通气功能障碍和（或）弥散性功能障碍；病情程度根据肺功能肺总量及一氧化碳弥散量进行划分：轻（肺总量或一氧化碳弥散量＞60%）、中（肺总量或一氧化碳弥散量40%～60%）、重（肺总量或一氧化碳弥散量＜40%或无法完成肺功能检测）。排除已知原因的弥漫性间质性肺疾病等。对照组：30名健康体检者，男性25名，女性5名，年龄为（64.15±9.35）岁。病例组与对照组均无严重心肺功能不全，肝肾功能正常，无活动性疾病或影响血清蛋白质含量的其他相关疾病，无肿瘤病史。病例组与对照组性别、年龄等一般资料组间比较差异无统计学意义。所有研究对象均签署知情同意书，实验经过获得山东大学第二医院伦理委员会审批（KYLL-2013-025）。

2. 研究方法：

（1）血清蛋白提取及定量：将采集的抗凝血在4 ℃条件下离心10 min，收集上清，分装后置-80 ℃冰箱保存。将30例特发性肺间质纤维化患者血清随机10份等量混合为1组，共3组；健康人血清也按同样方法混合为3组，每组血清标本各取400 μl，按照去血清高丰度蛋白提取试剂盒（美国Sigma公司）说明书进行操作，提取血清蛋白，-80 ℃保存备用。按照BCA定量试剂盒（美国Sigma公司）说明书进行蛋白定量。

（2）蛋白酶解、iTRAQ标记及肽段分离检测：每组样品各取200 μg蛋白，加入还原剂，37 ℃酶解过夜。根据iTRAQ试剂（美国Applied Biosystems公司）说明书对样品进行标记。将标记后的样品加入强阳离子交换柱进行肽段分离，之后用二维液相色谱-串联质谱法对肽段进行鉴定。

（3）质谱分析、差异蛋白筛选：分离后的肽段直接进入质谱仪Thermo Scientific Q Exactive进行在线检测。采用ProteinPilot™5.0软件（美国Applied Biosystems公司），下载UniProt_HUMAN蛋白质数据库，对质谱的原始数据进行比对分析，设置假阳性率＜5%，同时进行蛋白反库搜索，设置蛋白鉴定置信度＞95%，即unused score＞1.3的结果为可信蛋白。

3. 生物信息学分析：利用GO数据库（http://www.geneontology.org）对筛选到的差异蛋白按照生物学过程、细胞组成和分子功能3个方面进行注释和分类；利用KEGG pathway数据库，对差异蛋白参与的KEGG代谢通路进行注释和分类分析。

结　果

1. 血清蛋白质的鉴定：iTRAQ共鉴定出490个可信蛋白。按照变异系数（CV）≤0.5且$\bar{x}$≥1.5筛选后，得到重复性较好的上调蛋白共32个，按照CV≤0.5且$\bar{x}$≤0.67筛选后，得到重复性较好的下调蛋白共58个，按照每组比值≥1.5或≤0.67的蛋白，筛选得到上调蛋白10个，下调蛋白22个，其中2种方法筛选到的共有上调蛋白4个，下调蛋白21个（表1）。

2. 生物信息学分析：GO分析显示，25个差异蛋白多数位于细胞外区域（92%）。对25个差异蛋白进行KEGG分类结果显示，9个差异蛋白参与了补体和凝血级联通路、血小板激活、ECM-受体相互作用等19条信号通路。补体和凝血级联通路包含FGA（sp|P02671|FIBA_HUMAN）、KLKB1（sp|P03952|KLKB1_HUMAN）、KNG1（sp|P01042|KNG1_ HUMAN）及PLG（sp|P00747|PLMN_HUMAN）4个差异蛋白。

讨　论

特发性肺间质纤维化的发病率逐年升高，且致残率、病死率高，极具侵袭性[1]。目前特发性肺间质纤维化缺乏有效的治疗措施，主要治疗方法为糖皮

表1 特发性肺间质纤维化患者血清相关差异表达蛋白

蛋白登录号	蛋白名称	变异系数	平均数
sp|P02741|CRP_HUMAN[a]	C-reactive protein OS=Homo sapiens GN=CRP PE=1 SV=1	0.428 227	15.991 630
sp|P0DJI9|SAA2_HUMAN[a]	Serum amyloid A-2 protein OS=Homo sapiens GN=SAA2 PE=1 SV=1	0.482 296	6.897 656
sp|P02671|FIBA_HUMAN[a]	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	0.367 555	6.386 091
sp|P02750|A2GL_HUMAN[a]	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	0.268 261	2.667 538
sp|Q9UGM5|FETUB_HUMAN	Fetuin-B OS=Homo sapiens GN=FETUB PE=1 SV=2	0.177 014	0.505 001
sp|Q6UXB8|PI16_HUMAN	Peptidase inhibitor 16 OS=Homo sapiens GN=PI16 PE=1 SV=1	0.263 589	0.497 978
sp|Q8TD30|ALAT2_HUMAN	Alanine aminotransferase 2 OS=Homo sapiens GN=GPT2 PE=1 SV=1	0.185 369	0.494 008
sp|P04004|VTNC_HUMAN	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	0.305 866	0.492 436
sp|Q96PD5|PGRP2_HUMAN	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1	0.126 417	0.483 297
sp|P06396|GELS_HUMAN	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0.132 265	0.479 367
sp|P05452|TETN_HUMAN	Tetranectin OS=Homo sapiens GN=CLEC3B PE=1 SV=3	0.083 588	0.468 172
sp|P11597|CETP_HUMAN	Cholesteryl ester transfer protein OS=Homo sapiens GN=CETP PE=1 SV=2	0.211 424	0.447 584
sp|P27169|PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3	0.100 676	0.429 006
sp|P02749|APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3	0.281 506	0.424 417
sp|P03952|KLKB1_HUMAN	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	0.136 552	0.396 430
sp|P00747|PLMN_HUMAN	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2	0.453 395	0.391 498
sp|P29622|KAIN_HUMAN	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3	0.202 106	0.384 712
sp|P06276|CHLE_HUMAN	Cholinesterase OS=Homo sapiens GN=BCHE PE=1 SV=1	0.207 718	0.381 729
sp|P22891|PROZ_HUMAN	Vitamin K-dependent protein Z OS=Homo sapiens GN=PROZ PE=1 SV=2	0.378 681	0.377 571
sp|P19827|ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3	0.353 235	0.325 527
sp|P00739|HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=2 SV=2	0.325 946	0.323 948
sp|P02760|AMBP_HUMAN	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	0.317 541	0.303 938
sp|P01042|KNG1_HUMAN	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0.347 829	0.299 932
sp|P02765|FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	0.258 359	0.131 207
tr|V9GYM3|V9GYM3_HUMAN	Apolipoprotein A-Ⅱ OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	0.394 861	0.094 239

注：[a]蛋白表达上调，其余为蛋白表达下调

质激素和细胞毒类药物，但其效果欠佳[7]，且毒副作用较大，患者耐受性较差。特发性肺间质纤维化患者预后差，一般生存期为确诊后的2～3年[1]。

因此，进一步了解特发性肺间质纤维化的分子机制及寻找新的早期诊断标志物成为目前研究的热点。近年来，关于蛋白质组学的研究已在多个领域发挥着重要作用，是分析蛋白表达谱有力的工具[8]。iTRAQ是美国应用生物系统公司在2004年推出的一项功能强大的多肽体外同位素标记技术，该技术采用4种或8种同位素编码的标签，通过特异性标记多肽的氨基基团和串联质谱分析，可同时比较4种或8种样品中蛋白质的相对水平[5]。

补体是免疫系统的重要组成部分，在机体天然防御、免疫调控中发挥重要作用[9]。古兴宇等[10]研究认为，特发性肺间质纤维化的病理发展可能与机体凝血级联反应产物有关。现就几个典型差异表达的炎症因子作相关描述。

C-反应蛋白是由肝脏合成的急性蛋白，正常人的血清C-反应蛋白水平较低，而在组织损伤和炎症时机体会大量分泌C-反应蛋白[11]，研究表明C-反应蛋白与多种疾病相关，如慢性阻塞性肺病、肺癌、闭塞性细支气管炎和系统性红斑狼疮。本实验中结果显示C-反应蛋白在特发性肺间质纤维化患者的血清中升高最多（约16倍），暗示其可能作为生物标记物用于疾病诊断。

激肽原是一种多功能的单链糖蛋白，由激肽原基因编码，属于激肽释放酶激肽系统，分为低分子量激肽原和高分子量激肽原，主要由肝脏合成，它们分别行使不同的生物功能。激肽原有诱导炎症反应、参加生长因子、激素等的激活释放功能，在增生性肉芽肿[12]、类风湿性关节炎[13]等慢性炎症疾病中也有重要的作用。本研究提示，激肽原蛋白主要与补体和凝血级联途径有关，可以成为潜在特发性肺间质纤维化早期诊断标志物。

纤维蛋白原是一种主要由肝细胞合成分泌的糖蛋白，分别由3个独立的基因FGA、FGB、FGG编码[14]。纤维蛋白原是急性时相蛋白，在感染或炎症等情况下分泌增加[15]。本研究中质谱鉴定结果显示特发性肺间质纤维化组血清C-反应蛋白和FGA蛋白表达上调，激肽原表达下调，提示C-反应蛋白、FGA和

激肽原可能与特发性肺间质纤维化的发生发展有关。

总之，本研究基于iTRAQ技术的蛋白质组学筛选血清特异性生物标志物，为特发性肺间质纤维化提供了广泛而实用的分子生物学信息。但这些蛋白在特发性肺间质纤维化发生发展中的作用尚未完全清楚，需要进一步评价这些血清差异蛋白作为早期诊断特发性肺间质纤维化的候选标志物的可靠性。

利益冲突　无

参 考 文 献

［1］Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management［J］. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824. DOI: 10.1164/rccm.2009-040GL.

［2］Gotway MB, Freemer MM, King TE Jr. Challenges in pulmonary fibrosis. 1: Use of high resolution CT scanning of the lung for the evaluation of patients with idiopathic interstitial pneumonias［J］. Thorax, 2007, 62(6): 546-553. DOI: 10.1136/thx.2004.040022.

［3］Abdul-Salam VB, Wharton J, Wilkins MR, et al. Application of proteomics to explore the pathobiology of pulmonary arterial hypertension［J］. Thorax, 2010, 65 Suppl 4: A44-45. DOI: 10.1136/thx.2010.150938.46.

［4］Mackintosh C, Madoz-Gúrpide J. Mining sarcomas by proteomics approaches: ewing sarcoma on the spotlight［J］. Recent Pat Biotechnol, 2013, 7(2): 98-111. DOI: 10.2174/187220831130 79990004.

［5］Chen Z, Wang QH, Lin L, et al. Comparative evaluation of two isobaric labeling tags, DiART and iTRAQ［J］. Anal Chem, 2012, 84(6): 2908-2915. DOI: 10.1021/ac203467q.

［6］谢秀枝，王欣，刘丽华，等. iTRAQ技术及其在蛋白质组学中的应用［J］. 中国生物化学与分子生物学报，2011，27(7)：616-621. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2011.07.013.
Xie XZ, Wang X, Liu LH, et al. iTRAQ technology and its application in proteomics［J］. Chin J Biochem Mol Biol, 2011, 27(7): 616-621. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2011.07.013.

［7］王西勇，王西华，吴国球. 特发性肺纤维化药物治疗进展［J］. 东南大学学报：医学版，2010，29(6)：695-698.
Wang XY, Wang XH, Wu GQ. Advances in drug therapy for idiopathic pulmonary fibrosis［J］. J Southeast Univ: Med Sci Ed, 2010, 29(6): 695-698.

［8］Latterich M, Abramovitz M, Leyland-Jones B. Proteomics: new technologies and clinical applications［J］. Eur J Cancer, 2008, 44(18): 2737-2741. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.09.007.

［9］Sarma JV, Ward PA. The complement system［J］. Cell Tissue Res, 2011, 343(1): 227-235. DOI: 10.1007/s00441-010-1034-0.

［10］古兴宇，田林娟，吴允萍，等. 丹参多酚酸盐治疗特发性肺纤维化的疗效［J］. 中国老年学杂志，2012，32(23)：5276-5277.
Gu XY, Tian LJ, Wu YP, et al. Effect of salvia miltiorrhiza polyphenol on idiopathic pulmonary fibrosis［J］. Chin J Gerontol, 2012, 32(23): 5276-5277.

［11］Frangogiannis NG. Monomeric C-reactive protein and inflammatory injury in myocardial infarction［J］. Cardiovascul Res, 2012, 96(1): 4-6. DOI: 10.1093/cvr/cvs265.

［12］Hayashi I, Amano H, Yoshida S, et al. Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies［J］. Lab Invest, 2002, 82(7): 871-880. DOI: 10.1097/01.LAB.0000018885.36823.D6.

［13］Espinola RG, Uknis A, Sainz IM, et al. A monoclonal antibody to high-molecular weight kininogen is therapeutic in a rodentmodel of reactive arthritis［J］. Am J Pathol, 2004, 165(3): 969-976. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63358-5.

［14］Manco-Johnson MJ, DiMichele D, Castaman G, et al. Pharmacokinetics and safety of fibrinogen concentrate［J］. J Thromb Haemost, 2009, 7(12): 2064-2069. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03633.x.

［15］Jensen T, Kierulf P, Sandset PM, et al. Fibrinogen and fibrin induce synthesis of proinflammatory cytokines from isolated peripheral blood mononuclear cells［J］. Thromb Haemost, 2007, 97(5): 822-829. DOI: 10.1160/TH07-01-0039.

（收稿日期：2018-01-15）

（本文编辑：万玉立）