

• 诊治分析 •

基于TMT定量蛋白质组学技术筛选贝赫切特病血清差异蛋白

朱梦雅, 陈勇, 黄娴倩, 干敏芝, 张可悦

【关键词】 贝赫切特病; 串联质谱标签; 差异蛋白; C3; FGB

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.019

【中图分类号】 R593.2 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)08-1053-04

贝赫切特病 (Behcet's disease, BD) 又称白塞病, 是一种自身免疫性疾病, 地中海、东亚等地区高发^[1]。复发性口腔溃疡、生殖器溃疡和眼部病变, 是BD经典的“三联征”, 除此以外, 还可累及多个系统, 如消化道、心血管系统等^[2]。BD的基本病理改变是血管炎, 表现为血管内皮细胞损伤, 血栓形成, 血管壁和周围组织炎症细胞浸润等^[3], 动静脉均可受累, 预后差, 致死率高^[4]。由于缺乏特异性血清标志物, BD的诊断主要依靠其临床表现, 当患者症状不典型时, 极易漏诊、误诊; 因此, 筛选和鉴定BD特异的血清分子标志物是BD研究的热点。本研究通过串联质谱标签(TMT)定量蛋白质组学分析筛选BD患者与健康人群外周血清中高度特异性的蛋白质, 通过分析相关基因参与的生物学过程、信号通路等进一步探索发病机制, 为鉴别诊断、早期诊断、优化治疗方案提供理论依据, 现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2020年1—8月宁波市第二人民医院门诊和住院BD患者12例, 纳入BD组。均符合国际BD诊断标准^[5], 排除其他风湿性疾病、癌症、急慢性感染等疾病, 且均无血缘关系。另选同期在本院体检中心健康体检者12例, 纳入健康对照组。本研究获得中国科学院大学宁波华美医院人体研究伦理委员会批准, 所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

作者单位: 315010 宁波, 宁波市第二人民医院

通信作者: 陈勇, Email: nbdeyycy@163.com

1.2 主要试剂和仪器 Orbitrap Fusion 质谱仪 (Thermo Fisher), Easy-NLC1200 液相色谱仪 (Thermo Fisher), 台式冷冻离心机 (湖南湘仪动力测试仪器有限公司), SDS-PAGE 凝胶电泳仪 (北京六一仪器厂), 酶标仪 (上海科华试验系统股份有限公司), Image Scanner 扫描仪 (GE Healthcare), 冻干机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); TMT 标记试剂盒 (Thermo Fisher), 羟胺 (Sigma), SDS 裂解液 (碧云天生物技术有限公司), BCA 试剂盒、质谱级乙腈、水 (Thermo Scientific), PMSF (Amresco), 甘氨酸、SDS、磷酸 (中国医药集团有限公司), G-250、TEAB (Sigma), 胰酶 (北京华利世科技有限公司), 甲酸 (CNW), 去除高丰度蛋白试剂盒 (Thermo Fisher)。

1.3 方法

1.3.1 蛋白提取及浓度测定 抽取研究对象空腹外周静脉血 2 ml, 置于 EDTA 抗凝管中, 取血清, 用缓冲液 (试剂盒: Binding Buffer) 将血清稀释 10 倍, 制成样品后, 经真空冷冻、干燥后备用。将冻干的样品裂解、复溶、离心取上清, 即为样品的总蛋白溶液, 经 BCA 蛋白浓度测定, 分装后贮存于 -80 °C, 备用。

1.3.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 使用 12% SDS-PAGE 分离。每样取蛋白 10 μg, 加入上样缓冲液, 用微量加样枪向加样孔加入 20 μl 处理好的样本, 同时加入蛋白质分子量标准品作对照。电泳开始时电压设为 80 V, 约 40 min, 待溴酚蓝染料从积层胶进入分离胶时, 电压调至 120 V, 约 1.5 h 电泳至溴酚蓝到达凝胶底部, 关闭电源, 取下凝胶。将凝胶放入培养皿后, 加入考马斯亮兰染色, 染色后的凝胶使用 Image Scanner 扫描仪全彩模式扫描, 光密度值 300 dpi。

1.3.3 胰蛋白酶的酶解及标记 每个样品蛋白定量后,在10K超滤管中加入120 μ l还原缓冲液,在60 $^{\circ}$ C下反应1 h;加入50 mmol/L IAA,室温下避光40 min;4 $^{\circ}$ C,离心,收集管底液弃用;加入100 μ l 300 mmol/L TEAB 缓冲液,离心后分2份备用。使用新的收集管,加入100 μ l 300 mmol/L TEAB 缓冲液,加入胰蛋白酶溶液3 μ l;离心后收集酶解后的肽段,再加入50 μ l 200 mmol/L TEAB 缓冲液,离心后将溶液收集、冷冻干燥。将100 μ l 缓冲液加入样品,涡流混合,取40 μ l 样品在EP管中反应;在室温下的TMT试剂中加入88 μ l 无水乙腈,涡流5 min后离心;再取41 μ l TMT试剂加入样本中,涡流混合均匀,室温下静置1 h;再加入8 μ l 5%羟胺终止反应,置于-80 $^{\circ}$ C保存。

1.3.4 反相色谱分离 液相色谱:色谱柱(Agilent Zorbax Extended-C18 窄径色谱柱,2.1 mm \times 150 mm,5 μ m);检测波长:UV 210 nm 和 280 nm;流相A相:ACN-H₂O(2 : 98, v/v);流相B相:ACN-H₂O(90 : 10, v/v);流速:300 μ l/min;经梯度洗脱,依次采集8~60 min的样品,每隔1 min采集洗脱液,放置1~15号离心管内,按照这样的顺序循环采样,直到梯度结束。收集样品后冷冻保存,待上质谱。

1.3.5 色谱条件与质谱条件 色谱条件:样品以300 nl/min的流速进样,色谱柱为Pep Map 100 μ m \times 2 cm柱(RP-C18, Thermo Fisher),然后用分析柱Pep Map RSLC和75 μ m \times 15 cm(RP-C18, Thermo Fisher)分离。流相A相:H₂O-FA(99.9 : 0.1, v/v);流动相B:ACN-H₂O-FA(80RU 19.9RU 0.1M VPT vpw);质谱条件:一级MS质量分辨率是12万,自动增益控制值4E5;将质谱扫描的荷质比范围设定为350~1500,对10个最高峰扫描;动态排除时间设为45 s。MS/MS图谱采集采用正离子模式高能碰撞,碰撞能量设置为38;MS/MS分辨率为50 000,自动增益设为5E4,最大注射时间86 ms。

1.4 数据处理 实验数据利用Proteome Discoverer TM2.2(美国Thermo公司)软件进行分析,Uniprot的人数据库检索筛选出的不同蛋白质,Omics Bean组学数据分析云平台整合数据,对所有差异蛋白进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释、KEGG Pathway分析及蛋白互作分析。

2 结果

2.1 可信蛋白及差异蛋白筛选结果 共筛选出748个可信蛋白。以倍数变化(FC) > 1.2或FC < 5/6和P < 0.05为标准筛选出291个差异显著蛋白,其中较对照组上调蛋白221种,下调蛋白70种,见图1。

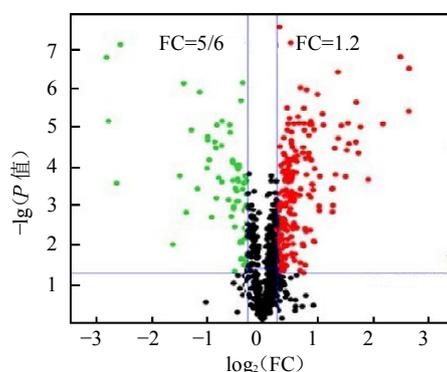
2.2 GO功能分析及富集结果 BD组与健康对照组的差异蛋白参与的生物过程富集于蛋白激活级联、白细胞介导免疫、免疫效应过程等;从细胞成分上看,这些蛋白主要分布在胞膜外区、胞外区部分、胞外细胞器等部位;分子功能富集于抗原结合、蛋白结合、免疫球蛋白结合等方面,见图2。

2.3 KEGG Pathway分析及富集结果 BD组与健康对照组差异蛋白显著富集的前10条通路,依次为:补体系统、金黄色葡萄球菌感染、吞噬体、血小板活化、细胞外基质受体作用、系统性红斑狼疮、百日咳、致病性大肠杆菌感染、病灶黏附作用、致心律失常性右室心肌病,见图3。

2.4 蛋白相互作用分析 在补体系统、吞噬体、血小板活化、细胞外基质受体作用、系统性红斑狼疮等通路中起主要作用的互作蛋白有C3、FGB、FGA及VWF等。

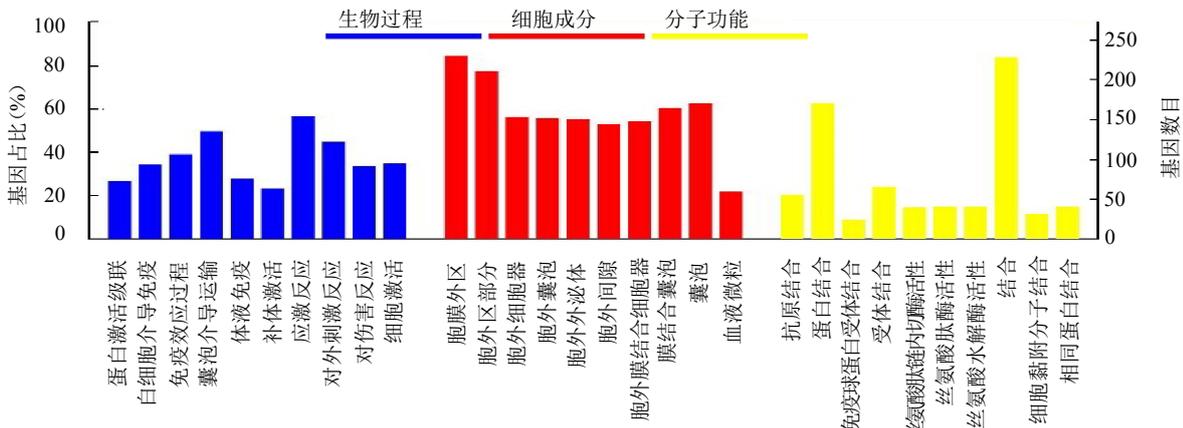
3 讨论

研究显示,内皮系统损伤、凝血功能紊乱等在BD发病中起重要作用。血小板、内皮细胞在炎症诱导下活化,促炎因子上升,进而导致血管内皮损伤及功能障碍,造成BD血管壁坏死、血栓形成等病变^[6]。



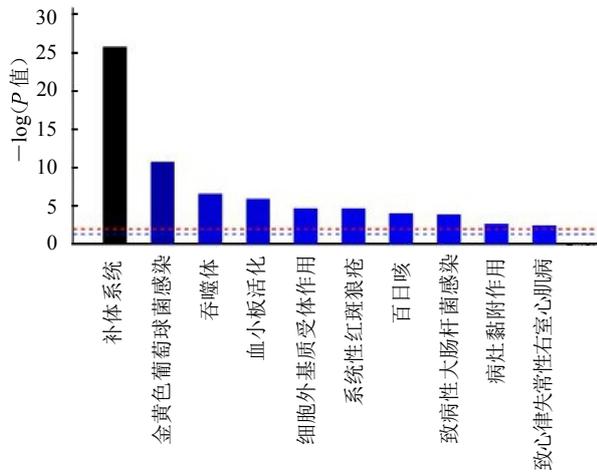
注:火山图横标为log₂(FC),图上距离0点越远的则代表差异越大,右侧指上调,左侧指下调。纵坐标为-lg(P值),图上距离0点的纵坐标值越远的代表差异越大。图中的绿点为差异蛋白下调,红点为差异蛋白上调,黑点表示非显著差别蛋白

图1 BD组与健康对照组差异蛋白火山图



注: 各类别的条目横坐标按 P 值排序, 越靠左越显著; 纵坐标表示各条目所含差异蛋白的数量和占总的差异蛋白的比率

图2 BD组与健康对照组的差异蛋白GO富集分析概况



注: 红线表示 P 值为 0.01, 蓝线表示 P 值为 0.05。当柱子的顶端高于蓝线时, 其所代表的生物过程具有显著性, 高于红线时非常显著

图3 BD组与健康对照组的差异蛋白KEGG通路富集分析
有研究提示血管型BD患者血浆中NO显著降低, 表明血管内皮抗氧化能力下降, 内皮损伤是BD血管炎症发生的基础^[7]。血管内皮生长因子在BD血浆中升高也是血管内皮损伤的标志^[8-9]。

同样凝血功能紊乱也是BD血管炎发病的基础, 有研究表明BD患者容易形成血栓与体内凝血机制的改变相关^[6]。BD组凝血酶-抗凝血酶III复合物(TAT)、凝血酶原片段1+2(F1+2)、von Wille-Brand因子等表达水平较健康人群升高, 同样提示BD患者凝血机制激活, 血栓形成风险增高^[10]。

本研究GO功能分析发现差异蛋白参与的生物过程富集于激活蛋白级联反应、白细胞介导免疫等, 符合BD慢性炎症性疾病特征。而KEGG Pathway分析显示补体及凝血系统为最主要的通路, 并在蛋白相互作用中得到验证。作为蛋白互作网中起中心连接的互作蛋白有C3、FGB、FGA及VWF等, 它们都与血管

炎症、动脉粥样硬化、血栓形成有着密不可分的关系。

有研究显示高血压性脑出血患者出现补体C3、C4的过度激活, 补体过度激活会导致血管壁受损而增加血管通透性, 提示其可成为评估脑出血患者预后不良的预测指标^[11]。更多研究提示C3参与过敏性紫癜介导的免疫损伤, 与细胞炎症反应、内皮细胞损伤等密切相关^[12-13]。本研究发现, BD组C3明显下调, 可能与患者补体过度激活、补体消耗有关, 并通过C3通路引起内皮细胞损伤, 血管炎症发生, 可作为BD血管受累的预测因子和治疗靶点, 值得进一步探究。

纤维蛋白原(FGB)参与凝血过程, 与心脑血管疾病的发生和发展密切相关^[14]。其可与介导血小板聚集的血小板膜受体糖蛋白IIb-IIIa复合物结合, 促进血栓形成, 而发展动脉粥样斑块^[15]。由此不难推测FGB同样为血管炎发病的危险因素。FGBβ基因中存在20多个多态位点, 本研究BD组FGB较对照组人群表达明显下调, 一方面可能是BD患者纤溶亢进导致FGB的下降, 另一方面可能与FGB基因多态相关。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] DAVATCHI F, CHAMS-DAVATCHI C, SHAMS H, et al. Behcet's disease: epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2017, 13(1): 57-65.
- [2] MENDES D, CORREIA M, BARBEDO M, et al. Behçet's disease: a contemporary review[J]. J Autoimmun, 2009, 32(3/4): 178-188.
- [3] GUL A. Pathogenesis of Behcet's disease: autoinflammatory features and beyond[J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(4): 413-418.
- [4] YAZICI H, SEYAHI E, HATEMI G, et al. Behcet syndrome: a contemporary view[J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(2): 107-119.

- [5] International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's disease (ITR-ICBD). The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(3): 338-347.
- [6] BUTTA N V, FERNÁNDEZ-BELLO I, LÓPEZ-LONGO F J, et al. Endothelial dysfunction and altered coagulation As mediators of thromboembolism in behcet disease[J]. Semin Thromb Hemost, 2015, 41(6): 621-628.
- [7] SAHIN M, ARSLAN C, NAZIROGLU M, et al. Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels as signs of endothelial dysfunction in Behçet's disease[J]. Ann Clin Lab Sci, 2006, 36(4): 449-454.
- [8] BALTA S, BALTA I, DEMIRKOL S, et al. Endothelial function and Behçet disease[J]. Angiology, 2014, 65(8): 657-659.
- [9] BASSYOUNI I H, SHARAF M, WALI I E, et al. Clinical significance of Angiopoietin-1 in Behçet's disease patients with vascular involvement[J]. Heart Vessels, 2016, 31(6): 918-924.
- [10] KIRAZ S, ERTENLI İ, ÖZTÜRK M A, et al. Pathological haemostasis and 'prothrombotic state' in Behçet's disease[J]. Thromb Res, 2002, 105(2): 125-133.
- [11] 吴亮,刘明.血清免疫球蛋白及补体 C3、C4 水平与高血压性脑出血患者预后的关系[J].临床荟萃,2021,36(2):107-111.
- [12] HEINEKE M H, BALLERING A V, JAMIN A, et al. New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura)[J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(12): 1246-1253.
- [13] ONI L, SAMPATH S. Childhood IgA vasculitis (henoch schonlein Purpura)-advances and knowledge gaps[J]. Front Pediatr, 2019, 7: 257.
- [14] WILHELMSEN L, SVÄRDSUDD K, KORSAN-BENGTSEN K, et al. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 1984, 311(8): 501-505.
- [15] LOWE G D. Fibrinogen and cardiovascular disease: Historical introduction[J]. Eur Heart J, 1995, 16(Suppl A): 2-5.

收稿日期:2024-03-01

(本文编辑:孙海儿)

甲状腺髓样癌侧颈淋巴结转移的危险因素分析

张斌,吴贤江

【关键词】 甲状腺髓样癌;N1b 淋巴结转移;影响因素

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.020

【中图分类号】 R736.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)08-1056-04

甲状腺髓样癌(MTC)是一种起源于甲状腺滤泡旁细胞(C细胞)的恶性肿瘤,发病率约占所有甲状腺癌的2%^[1]。MTC恶性程度较高,较分化型甲状腺癌更易发生淋巴结转移和远处转移^[2]。MTC预后较差,部分原因是未能在早期对淋巴转移风险做出评估干预^[3];此外,由于内分泌抑制治疗和碘-131放射治疗等辅助疗法对MTC无效,目前仅可通过手术治愈MTC。因此,手术规范和彻底的淋巴结清扫对降低术后复发、改善预后具有积极的作用。然而,目前国际上尚无统一的手术方案,尤其是针对是否需要预防性清扫侧颈区淋巴结仍未达成共识。本研究对2016年11月至2022年3月宁波市第二医院收治的56例经术后病理确诊为MTC的患者的临床资料进

行回顾性研究,分析影响侧颈淋巴结(N1b)淋巴结转移的危险因素,并探讨血清降钙素和癌胚抗原水平预测N1b淋巴结转移的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年11月至2022年3月宁波市第二医院收治的术后病理诊断为MTC的56例患者的临床病历资料。其中男18例,女38例;年龄18~73岁,中位年龄55岁。中央区淋巴结转移26例。纳入标准:(1)年龄≥18岁,经术后病理明确诊断为MTC;(2)首次行甲状腺切除手术;(3)临床病历资料完整。排除标准:(1)临床病历资料不完整;(2)术前经放射性碘治疗;(3)合并其他恶性肿瘤;(4)既往有甲状腺手术史;(5)患有免疫性疾病、全身感染等。本研究获得宁波市第二医院人体研究伦理委员会批准,豁免签署知情同意书。

1.2 方法 根据N1b淋巴结有无转移分为两组。收集两组年龄、性别、美国癌症联合委员会(AJCC)T分

基金项目:宁波市医学重点学科(2022-F18)

作者单位:315211 宁波,宁波大学医学部(张斌);宁波市第二医院(吴贤江)

通信作者:吴贤江,Email:nbejyx@126.com