



基于两种蛋白质组学技术筛选不同分期白癜风的差异表达蛋白

李一雷, 高兴华, 杨莽榕, 徐欣植, 杨骥, 李明

引用本文:

李一雷, 高兴华, 杨莽榕, 等. 基于两种蛋白质组学技术筛选不同分期白癜风的差异表达蛋白[J]. 中国临床医学, 2021, 28(6): 925-933.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210563>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

焦虑、抑郁评分对白癜风治疗效果影响的前瞻性临床研究

A prospective clinical study on the effect of anxiety and depression scores on the treatment effect of vitiligo
中国临床医学. 2021, 28(6): 934-938 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210970>

基于祛风理气活血基础方的中西医结合治疗白癜风的临床疗效分析

Efficacy of integrated Chinese and Western medicine in the treatment of vitiligo based on the basic formula of *Qufeng Liqi Huoxue*
中国临床医学. 2021, 28(6): 939-942 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210910>

慢性自发性荨麻疹患者血清差异表达蛋白的筛选及C反应蛋白的测定

Screening of differential expression proteins in serum and detection of C-reactive protein in patients with chronic spontaneous urticaria
中国临床医学. 2018, 25(2): 275-277 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180140>

肿瘤-睾丸抗原联蛋白 $\alpha 2$ 在肝细胞癌中的表达及临床意义的多组学研究

Multi-omics study on the expression of cancer-testis antigen catenin alpha 2 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance
中国临床医学. 2021, 28(1): 27-35 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20202336>

早期胃癌淋巴结转移差异表达基因分析

Analysis of differentially expressed genes in lymph node metastasis of early gastric cancer
中国临床医学. 2019, 26(4): 555-560 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190912>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210563

基于两种蛋白质组学技术筛选不同分期白癜风的差异表达蛋白

李一雷¹, 高兴华², 杨养榕¹, 徐欣植¹, 杨 骥¹, 李 明^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院皮肤科, 上海 200032

2. 中国医科大学附属第一医院皮肤科, 沈阳 110001

引用本文 李一雷, 高兴华, 杨养榕, 等. 基于两种蛋白质组学技术筛选不同分期白癜风的差异表达蛋白[J]. 中国临床医学, 2021, 28(6): 925-933. LI Y L, GAO X H, YANG Q R, et al. Proteomics study of differentially expressed proteins in patients with different stages of vitiligo[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(6): 925-933.

[摘要] **目的:** 采用两种蛋白质组学技术鉴定和筛选不同分期白癜风的血清标志物, 并研究其网络关系。 **方法:** 收集白癜风稳定期和进展期以及健康人各 15 例的血清样本, 采用双向凝胶电泳技术(2-DE)和核素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)对所有样本进行检测, 筛选出差异常表达蛋白, 并用软件分析其可能作用的主要通路。 **结果:** 通过 2-DE 鉴定出稳定期白癜风患者 10 个差异蛋白(6 个上调, 4 个下调), 进展期白癜风患者 25 个差异蛋白(11 个上调, 14 个下调); iTRAQ 鉴定出稳定期患者 62 个差异蛋白(29 个上调, 33 个下调), 进展期患者 50 个差异蛋白(30 个上调, 20 个下调)。两种蛋白质组学鉴定出的相同差异蛋白包括稳定期间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4、补体 C4-A(上调); 进展期补体 C4-B、载脂蛋白 A(下调)和间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4(上调)。基因本体(Gene ontology, GO)注释分析示共同的差异蛋白主要参与 CCKR 通路、纤溶酶原激活级联通路、p53 通路、趋化炎症因子调控通路等。 **结论:** 基于 2-DE 与 iTRAQ 两种不同的蛋白质组学方法筛选出不同分期白癜风的共同差异表达蛋白, 为进一步研究白癜风的发生机制奠定了基础。

[关键词] 双向凝胶电泳技术; 核素标记相对和绝对定量技术; 白癜风; 分期; 差异蛋白

[中图分类号] R 758.4⁺1 **[文献标志码]** A

Proteomics study of differentially expressed proteins in patients with different stages of vitiligo

LI Yi-lei¹, GAO Xing-hua², YANG Qiao-rong¹, XU Xin-zhi¹, YANG Ji¹, LI Ming^{1*}

1. Department of Dermatology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Dermatology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

[Abstract] **Objective:** To identify and screen serum markers in different stages of vitiligo by 2 proteomic techniques, and to explore their relationship network. **Methods:** Serum samples were collected from 15 patients with vitiligo in stable stage, 15 patients with vitiligo in progressive stage, and 15 healthy individuals. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) were used to detect and label all samples. Differential proteins were screened, and the relationship of pathways was analyzed by software. **Results:** A total of 10 differential proteins were identified by 2-DE in patients with stable vitiligo, including 6 up-regulated and 4 down-regulated proteins; 25 differential proteins were identified in patients with progressive vitiligo, including 11 up-regulated and 14 down-regulated proteins. Sixty-two differential proteins (29 up-regulated and 33 down-regulated) in stable patients, and 50 differential proteins (30 up-regulated and 20 down-regulated) in advanced patients were identified by iTRAQ. The same differential proteins identified by the two proteomics include α -trypsin inhibitor heavy chain H4, complement C4-A (up-regulated) at the stable stage of vitiligo, and complement C4-B, apolipoprotein A (down-regulated) and α -trypsin inhibitor heavy chain H4 (up-regulated) at the advanced stage of vitiligo. According to GO annotation, the main pathways involved in the differential proteins were CCKR, plasminogen activator, p53, chemokine regulatory pathways, etc. **Conclusions:** The differentially expressed proteins in different stages of vitiligo could be screened by proteomic methods of both 2-DE and iTRAQ technology, which provided a foundation for further study of the pathogenesis of vitiligo.

[收稿日期] 2021-03-16

[接受日期] 2021-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(82003345)。Supported by Youth Program of National Natural Science Foundation of China (82003345).

[作者简介] 李一雷, 博士, 住院医师。E-mail: 271678818@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: li.ming@zs-hospital.sh.cn

[Key Words] two-dimensional gel electrophoresis (2-DE); isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ); vitiligo; stage; differential proteins

白癜风是一种获得性自身免疫系统疾病,其特征是真皮、表皮黑素细胞进行性破坏导致的原发性、局限性或泛发性累及皮肤及黏膜部位白斑。白癜风每年全球平均发病率为0.4%~2%^[1],多在儿童和青少年时期发病,性别倾向相同^[2]。白癜风虽然一般不危及生命,但会对患者的身心健康、学习、工作及生活等多方面产生严重的影响。白癜风的病因目前尚不清楚,但多认为是多因素导致,遗传和环境因素都参与发病。在目前已知因素中,自身免疫在白癜风的发生和发展中起关键作用,但蛋白质组学特别是小分子和血清蛋白在白癜风发病中的作用尚不清楚。白癜风因发病机制复杂、治疗困难、病情反复,至今缺乏高效、特异的靶向治疗手段,已经成为皮肤病学亟待解决的一个重要课题。

虽然功能基因组学和蛋白质组学技术在肿瘤生物学标志物筛选的应用增加,但是研究人员对参与免疫性皮肤病发生发展的基因和蛋白质模式却知之甚少。近年来,自身免疫性皮肤病(包括红斑狼疮、系统性硬化症等)中的蛋白质组学应用逐渐增多。这些研究提示,细胞因子、趋化因子和凋亡相关分子在自身免疫性疾病发病中发挥重要作用。这些研究不仅为疾病的发病机制提出了更深入的见解,而且发现了自身免疫性疾病具体的致病机制的特定基因模式^[3]。

本研究采用双向凝胶电泳(2-DE)与核素标记相对和绝对定量(iTRAQ)两种质谱技术筛选不同分期白癜风的差异表达蛋白,筛选出与白癜风发生、发展相关的血清蛋白标志物,进而为研究疾病复发及预后,揭示疾病进展机制提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年1月至2018年6月在中国医科大学附属第一医院与2020年12月至2021年2月在复旦大学附属中山医院皮肤科诊治的30例白癜风患者为研究对象。所有患者的临床诊断和分期符合中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组制定并更新的《白癜风诊疗共识(2018版)》^[4]中的标准,根据其白癜风疾病活动度评分(VIDA)、临床特征、同形反应(KP)、Woods

灯检查结果诊断。进展期判定参考VIDA评分:最近6周内出现新皮损或原皮损扩大加4分;最近3个月内出现新皮损或原皮损扩大加3分;最近6个月内出现新皮损或原皮损扩大加2分;最近1年内出现新皮损或原皮损扩大加1分;至少1年内稳定为0分;至少1年内稳定且有自发光色素再生减1分。总分>1分即为进展期,共15例;稳定期15例。

进展期男性7例、女性8例,年龄17~41岁,平均(31.20±8.47)岁;稳定期男性8例、女7例,年龄17~48岁,平均(38.93±14.00)岁;对照组为同期健康志愿者,男性6例、女性9例,年龄17~50岁,平均年龄(41.67±9.86)岁。所有患者无其他自身免疫系统疾病和肿瘤,均在取样前未接受药物治疗1个月以上。所有参与研究的患者和健康志愿者签署知情同意书。本研究经医院伦理委员会审核批准(B2021-151R2)。

1.2 去高丰度蛋白制备 清晨空腹取肘静脉血5 mL,4℃静置2 h,待自凝后,4℃、3 000 r/min离心10 min,分离血清后-80℃保存备用。吸取400 μL树脂匀浆于2.0 mL带滤柱离心管中,12 000×g离心10 min,去保存液。加入400 μL平衡液,12 000×g离心10 min以洗涤树脂,重复操作1次。缓慢滴加80 μL血清样本于树脂上,吸附10 min,12 000×g离心10 min;将收集到的样本再次滴加至树脂,吸附10 min,12 000×g离心10 min,加入100 μL平衡液洗涤树脂,1 200×g离心10 min;合并滤液后加入4倍体积丙酮,-20℃静置过夜。将得到沉淀于4℃、1 200×g离心20 min,去上清,晾干,-80℃保存备用。

1.3 2-DE

1.3.1 聚焦过程及凝胶图像分析 第1向等电聚焦:上样总蛋白120 μg;IPG预制胶条(24 cm,pH 4~7;Bio-Rad公司);等电聚焦仪(GE Ettan IPGphor3),程序为300 V 30 min、700 V 30 min、1 500 V 90 min、9 000 V 3 h、9 000 V 4 h,聚焦过程总电压为52 kV/h。同一样本重复聚焦3次。第2向十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:将胶条依次放入胶条平衡缓冲液I、II中,于低速摇床摇15 min,再转至30% SDS-PAGE上;电

泳程序为 S1 2 W/胶 45 min、S2 17 W/胶至溴酚蓝到胶底,约 4.5 h,溴酚蓝指示剂到达底部时停止电泳并银染。

凝胶经扫描仪(UMAX Powerlook 1100)扫描后,用 ImageMaster 2D platinum 5.0 转件(GE)分析。组内同一样本 3 张胶图,对其进行背景消减、均一化和匹配等分析。蛋白表达量的组间比较采用 t 检验,检验水准(α)为 0.05;两组间蛋白质表达量相差 2 倍以上点为差异蛋白点。

1.3.2 质谱鉴定 切下目的差异蛋白点进行胶内蛋白质酶解,将抽提所得的肽段用 ultrafleX III TOF/TOF 型质谱仪进行分析(Bruker 公司)。紫外线波长为 355 nm,重复频率为 200 Hz,加速电压为 20 000 V,最优相对分子质量分辨率为 1 500。收集相对分子质量 700~3 200 处信号。胰酶自切峰为内标校正质谱仪。所有实验样品的质谱图均以默认模式获得。利用软件 flexAnalysis(Bruker Dalton)过滤基线峰、识别信号峰;利用 BioTools(Bruker Dalton)软件搜索 NCBI human 数据库进行匹配,获取差异表达蛋白信息,并在 Gene Ontology (GO)数据库查询其分子功能。

1.4 iTRAQ

1.4.1 蛋白标记及质谱分析 使用 ProteoPrep 白蛋白和 IgG 去除试剂盒(Sigma-Aldrich 公司)去除白蛋白,并使用 BCA 蛋白质分析试剂盒(Thermo Fisher 公司)估计 IgG 蛋白浓度。通过 iTRAQ(AB Sciex 公司)LC-MS/MS 分析各组的总蛋白质。蛋白质样品(100 μ g)经还原、烷基化和胰蛋白酶水解,进行 iTRAQ 标记。所有标记的肽合并,并在真空离心机中蒸干。用 Gemini NX 3u C18 110A, 150 mm \times 2.00 mm Phenomenex 柱和 Gemini 3u C6 Phenyl 110A, 100 mm \times 2.0 mm 柱进行高效液相色谱法(HPLC)分析前,首先用缓冲液($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 10)将 iTRAQ 标记的样品稀释至 100 μ L,然后用 H_2O (流动相 A)和 80%乙腈(流动相 B)进行反相柱分离,流速为 0.2 mL/min。使用溶剂梯度系统:0~15 min, 5%~10% B; 15~48 min, 15%~25% B; 48~60 min, 25%~37% B; 60~65 min, 37%~95% B; 65~70 min, 95% B。在

214 nm/280 nm 处光密度监测下洗脱,每 50 s 收集 1 次组分;总共 10 个组分,合并后干燥。采用线性梯度法分离多肽,用质谱分析仪(Thermo Fisher 公司)在 350~1 800 m/z 高分辨率模式下($>35\ 000$)获得质谱,每个循环从每个质谱中选择最多 20 个前体进行破碎,每个前体破碎的最短累计时间为 120 ms、动态排除时间为 10 s。串联质谱以高灵敏度模式(分辨率 $>175\ 000$)记录,并调整滚动碰撞能和 iTRAQ 试剂碰撞能。

1.4.2 功能注释分析 差异表达蛋白质的相互作用网络由 ReactomeFIViz(一种细胞景观应用程序,用于协助生物学家进行路径丰富和基于网络的数据分析)自动构建。肽数据用 ProteinPilot 软件 5.0 及 Paragon 蛋白质数据库搜索算法(AB Sciex 公司)进行分析。根据国际蛋白质指数人类序列数据库 3.83 版检索得到的 LC-MS/MS。分析半胱氨酸与甲基硫代磺酸甲酯(MMTS)烷基化情况,胰蛋白酶消化最多允许 1 次胰蛋白酶断裂,同时用集成工具进行错误发现率(FDR)分析。基于 GO,应用 PANTHER 软件对涉及生物过程、分子功能、细胞成分和途径富集的差异表达蛋白质进行评价,并获得相应的 P 值。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,蛋白表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,差异倍数大于 1.5 倍(上调、下调)且 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,视为差异表达蛋白。

2 结果

2.1 2-DE

2.1.1 电泳图像结果 取 120 μ g 蛋白上样,在 pH 4~7 的预制干胶条进行 2-DE,获得电泳图,ImageMaster 2D platinum 5.0 软件分析显示有 31 个蛋白点的表达丰度变化明显($P < 0.05$)。

2.1.2 电泳质谱分析结果 结果(表 1~表 2)显示:通过与对照组比较,在白癜风稳定期患者中得出 10 个差异蛋白,其中 6 个上调、4 个下调;在白癜风进展期患者中得出 25 个差异蛋白,其中 11 个上调、14 个下调。

表1 采用2-DE筛选的白癜风稳定期的差异蛋白

蛋白名称	蛋白序列	分值	等电点	相对分子质量	差异倍数比率
激肽原-1	P01042	191	6.34	72 996	-1 000 000
补体 C1q	P02746	92	6.12	26 933	-1000 000
载脂蛋白 E	P02649	317	5.65	36 246	-2.11 918
结合珠蛋白	P00738	97	6.13	45 861	-1.51 291
转铁蛋白	P02787	113	6.81	79 280	1 000 000
抗凝血酶Ⅲ	P01008	99	5.98	53 025	1 000 000
间α胰蛋白酶抑制剂重链 H4	Q14624	306	6.51	103 521	2.86 546
补体 C4A	P0C0L4	221	6.65	194 247	2.26 642
补体 C3	P01024	179	6.02	188 569	4.58 277
血清白蛋白	P02768	136	5.92	71 317	3.20 345

表2 采用2-DE筛选的白癜风进展期的差异蛋白

蛋白名称	蛋白序列	分值	等电点	相对分子质量	差异倍数比率
铜蓝蛋白	P00450	231	5.44	122 983	-1 000 000
玻连蛋白	P04004	201	5.55	55 069	-1 000 000
激肽原-1	P01042	360	6.34	72 996	-1 000 000
补体 C3	P01024	134	6.02	188 569	-1 000 000
补体 C4B	P0C0L5	142	6.73	194 212	-1 000 000
载脂蛋白 L1	O14791	148	5.6	44 004	-1 000 000
载脂蛋白 A-IV	P06727	110	5.28	45 371	-1 000 000
载脂蛋白 A-I	P02647	361	5.56	30 759	-1 000 000
补体 C4A	P0C0L4	125	6.65	194 247	-1 000 000
过氧化还原酶-6	P30041	55	6.54	25 133	-1 000 000
间α胰蛋白酶抑制剂重链 H4	Q14624	199	6.51	103 521	-11.9 416
抗凝血酶Ⅲ	P01008	307	6.32	53 025	-3.30 293
间α胰蛋白酶抑制剂重链	Q14624	233	6.51	103 521	-2.33 923
免疫球蛋白链 C区	P01871	193	6.35	49 960	-2.0 355
激肽原-1	P01042	300	6.34	72 996	1 000 000
补体 C3	P01024	290	6.02	188 569	3.31 003
间α胰蛋白酶抑制剂重链 H4	Q14624	278	6.51	103 521	2.24 357
转铁蛋白	P02787	164	6.81	79 280	2.02 112
补体因子 I	P05156	187	7.72	68 071	2.2 044
载脂蛋白 L1	O14791	149	5.60	44 004	2.01 092
抗凝血酶Ⅲ	P01008	266	6.32	53 025	1.64 382
免疫球蛋白γ4链 C区	P01861	75	7.18	36 431	1.62 011
补体 C4A	P0C0L4	185	6.65	194 247	1.57 939
α-1B糖蛋白	P04217	256	5.58	54 809	1.59 039
铜蓝蛋白	P00450	413	5.44	122 983	1.59 452

2.2 iTRAQ 质谱分析结果 结果(表3~表4)显示:通过与对照组比较,在稳定期患者中得出 62 个差

异蛋白,其中 29 个上调、33 个下调;在进展期患者中得出 50 个差异蛋白,其中 30 个上调、20 个下调。

表3 采用 iTRAQ 筛选的稳定期白癜风的差异蛋白

蛋白序列	蛋白名称	基因名称	相对分子质量	等电点	覆盖率	差异倍数
P05154	丝氨酸蛋白酶抑制因子	SERPINA5	45 674.14	9.30	7	10.07
B9DI82	磷脂酰磷脂酶 C 片段	PLCH2	134 778.10	7.64	1	5.60
A0A0B4J2B7	免疫球蛋白重链 3~30 片段	IGHV3-30	12 946.63	9.10	39	5.29
P01876	免疫球蛋白 α 1 链 C 区	IGHA1	37 654.23	6.08	191	4.20
A0A075B6K9	免疫球蛋白 λ 2 链 C 区片段	IGLC2	11 236.38	6.91	84	3.40
A0A0C4DH31	免疫球蛋白重链 1~18 片段	IGHV1-18	12 820.29	8.98	20	2.86
A0A075B6K4	绒毛膜促性腺激素片段	IGLV3-10	12 628.89	4.72	17	2.37
Q15485	纤维蛋白胶凝素-2	FCN2	34 000.76	6.31	9	2.59
A0A0B4J1V0	免疫球蛋白重链 3~15 片段	IGHV3-15	12 925.64	8.84	20	1.98
A0A0C4DH67	免疫球蛋白轻链 1~8 片段	IGKV1-8	12 537.18	9.21	18	1.83
A0A075B6N7	免疫球蛋白 α 2 链 C 区	IGHA2	36 590.95	5.86	72	1.81
D6RF35	维生素 D 结合蛋白	GC	53 020.02	5.38	81	1.81
Q08380	半乳糖凝集素 3 结合蛋白	LGALS3BP	65 330.25	5.13	10	1.90
Q04756	肝细胞生长因子激活因子	HGFAC	70 681.11	6.99	14	1.82
P03951	凝血因子 XI	F11	70 108.40	8.47	8	1.75
P81605	皮离蛋白	DCD	11 283.74	6.09	1	1.51
A0A0B4J231	免疫球蛋白 λ 样多肽 5	IGLL5	23 150.06	9.08	63	1.59
P00734	凝血酶原	F2	70 036.12	5.64	69	1.55
Q71DI3	组蛋白	HIST2H3A	15 387.84	11.27	3	1.54
A0A0G2JN06	免疫球蛋白 γ 2 链 C 区片段	IGHG2	35 900.23	7.66	142	1.51
A0A0C4DH38	免疫球蛋白重链 5~51 片段	IGHV5-51	12 674.41	8.45	25	1.57
A0A0B4J1U2	免疫球蛋白轻链 λ 7~43 片段	IGLV7-43	12 450.88	6.52	5	1.57
P00747	纤溶酶原	PLG	90 568.09	7.04	94	1.51
P02766	转甲状腺素	TTR	15 886.83	5.52	23	1.58
P04196	富含组氨酸糖蛋白	HRG	59 577.63	7.09	24	1.58
A0A0C4DH68	免疫球蛋白 κ 链 2~24 片段	IGKV2-24	13 078.87	8.74	20	1.63
P01031	补体 C5	C5	188 303.00	6.11	66	1.57
P14780	基质金属蛋白酶 9	MMP9	78 457.32	5.69	6	1.58
P69905	血红蛋白 α 亚单位	HBA1	15 257.36	8.72	24	1.54
Q9P127	亮氨酸拉链蛋白 4	LUZP4	35 936.42	9.47	2	-4.09
O75636	纤维蛋白胶凝素 3	FCN3	32 902.61	6.20	15	-3.34
P69891	血红蛋白亚单位 γ 1	HBG1	16 140.27	6.64	14	-3.10
P02763	α 1 酸性糖蛋白 1	ORM1	23 511.27	4.93	57	-2.98
P02748	补体 C9	C9	63 172.73	5.43	32	-2.70
P07996	血小板反应素-1	THBS1	129 381.40	4.71	37	-2.50
P19652	α -1 酸性糖蛋白 2	ORM2	23 602.35	5.03	33	-2.34
P20742	PZP 结构域	PZP	163 861.00	5.97	119	-2.34
P18428	脂多糖结合蛋白	LBP	53 382.97	6.23	9	-2.20
P0DJI8	血清淀粉样蛋白 A1	SAA1	13 531.86	6.28	6	-2.19
Q13201	多聚蛋白 1	MMRN1	138 108.60	8.15	5	-1.93
P27169	对氧磷脂酶 1	PON1	39 730.81	5.08	40	-1.82
P02750	富含亮氨酸的 α 2 糖蛋白	LRG1	38 177.44	6.45	15	-1.80
P02741	C 反应蛋白	CRP	25 038.26	5.45	3	-1.72
P0C0L4	补体 C4A	C4A	192 783.20	6.66	219	-1.66
A0A075B6K3	免疫球蛋白 λ 链 2~11 区	IGLV2-11	12 643.88	6.69	5	-1.64
P23142	纤维蛋白-1	FBLN1	77 213.47	5.07	16	-1.58
A0A0A6YYG9	肌动蛋白相关蛋白	ARPC4-TTLL3	71 718.39	5.59	2	-1.57
Q14624	α -胰蛋白酶抑制剂重链 4	ITIH4	103 356.20	6.51	110	-1.57
P01011	α 1 抗糜蛋白酶	SERPINA3	47 650.31	5.33	86	-1.53
Q16610	细胞外基质蛋白 1	ECM1	60 673.46	6.25	12	-1.53
P04275	血管性血友病因子	VWF	309 262.00	5.29	27	-1.53

续表

蛋白序列	蛋白名称	基因名称	相对分子质量	等电点	覆盖率	差异倍数
P06681	补体 C2	C2	83 266.95	7.23	30	-1.52
P25311	锌 α 2 糖蛋白	AZGP1	34 258.30	5.71	35	-1.52
E7ES19	凝血酶敏感蛋白 4	THBS4	96 004.91	4.39	4	-1.50
V9GYM3	载脂蛋白 A2	APOA2	14 914.10	8.43	52	-1.50
P02647	载脂蛋白 A1	APOA1	30 777.44	5.56	228	-1.50
P55058	磷脂转移	PLTP	54 738.80	6.53	10	-1.50
P01009	α 1 抗胰蛋白酶	SERPINA1	46 735.98	5.37	240	-1.50
A0A087WXI2	免疫球蛋白 Fc 结合蛋白	FCGBP	445 207.00	5.16	10	-1.50
P07339	组织蛋白酶 D	CTSD	44 551.72	6.10	2	-1.50
Q06033	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H3	ITIH3	99 848.02	5.49	24	-1.50
P19823	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H2	ITIH2	106 462.20	6.40	90	-1.50

表 4 采用 iTRAQ 筛选的白癜风进展期的差异蛋白

蛋白序列	蛋白类型	基因名称	相对分子质量	等电点	覆盖率	差异倍数
A0A024R6I7	α 1 抗胰蛋白酶	SERPINA1	46 707.93	5.37	230	36.80
P05154	血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂	SERPINA5	45 674.14	9.30	7	18.98
P01876	免疫球蛋白 α 1 链 C 区	IGHA1	37 654.23	6.08	191	6.94
Q15485	纤维蛋白胶凝素 2	FCN2	34 000.76	6.31	9	3.92
P08779	角蛋白 16	KRT16	51 267.25	4.98	9	3.91
P00739	结合珠蛋白	HPR	39 029.11	6.63	100	2.96
P0C0L5	补体 C4B	C4B	192 749.20	6.89	220	2.96
Q04756	肝细胞生长因子激活剂	HGFAC	70 681.11	6.99	14	2.85
A0A0B4J231	免疫球蛋白 λ 样多肽 5	IGLL5	23 150.06	9.08	63	2.85
K7ER74	载脂蛋白 C4-C2	APOC4-APOC2	20 049.07	6.36	21	2.80
F5H7G1	补体 C8 β 链	C8B	61 230.52	7.86	9	2.78
B0YIW2	载脂蛋白 C3	APOC3	12 815.43	7.90	36	2.73
P01031	补体 C5	C5	188 303.00	6.11	66	2.68
P43652	糖蛋白 AFM	AFM	69 068.41	5.64	46	2.66
P06396	凝溶胶蛋白	GSN	85 696.47	5.90	53	2.66
P80108	磷脂酰肌醇聚糖特异性磷脂酶 D	GPLD1	92 335.35	5.91	17	2.62
P04114	载脂蛋白 B	APOB	515 598.30	6.58	550	2.46
P08697	α 2 抗血浆蛋白	SERPINF2	54 565.11	5.87	29	2.44
P10909	簇蛋白	CLU	52 494.01	5.89	63	2.43
P00742	凝血因子 X	F10	54 731.14	5.68	13	2.40
A0A0C4DH41	免疫球蛋白重链 4~61 片段	IGHV4-61	13 065.75	9.36	35	2.36
P04259	角蛋白 6B	KRT6B	60 066.25	8.09	10	1.98
Q12805	包含表皮生长因子的 fibulin 类细胞外基质蛋白 1	EFEMP1	54 640.10	4.95	5	1.96
P02765	α 2-HS 糖蛋白	AHSG	39 324.24	5.43	72	1.73
P01011	α 1 抗胰凝乳蛋白酶	SERPINA3	47 650.31	5.33	86	1.72
A0A075B6K4	免疫球蛋白 λ 链 3~10 片段区	IGLV3-10	12 628.89	4.72	17	1.68
P14780	基质金属蛋白酶 9	MMP9	78 457.32	5.69	6	1.66
P01019	血管收缩素	AGT	53 153.57	5.87	32	1.62
P19827	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H1	ITIH1	101 387.90	6.31	87	1.62
A0A0C4DH68	免疫球蛋白 κ 链 2~24 区	IGKV2-24	13 078.87	8.74	20	1.59
P02647	载脂蛋白 A1	APOA1	30 777.44	5.56	228	1.56
P05160	凝血因子 XIII B 链	F13B	75 509.92	6.01	31	1.53
Q14019	毛状样蛋白 1	COTL1	15 944.79	5.54	1	-12.63
P01591	免疫球蛋白 J 链	JCHAIN	18 098.40	5.12	15	-5.02
A0A0B4J1X5	免疫球蛋白重链 3~74 区	IGHV3-74	12 839.47	8.91	104	-4.07
Q9P127	亮氨酸拉链蛋白 4	LUZP4	35 936.42	9.47	2	-3.96
O43866	CD5 抗原样蛋白	CD5L	38 087.45	5.28	18	-2.96

续表

蛋白序列	蛋白类型	基因名称	相对分子量	等电点	覆盖率	差异倍数
Q92820	γ 谷氨酰水解酶	GGH	35 963.95	6.66	4	-2.55
A0A087WUS7	免疫球蛋白 δ 链 C 区	IGHD	42 352.35	8.38	16	-2.55
P05109	钙结合蛋白 S100A8	S100A8	10 834.38	6.51	6	-2.39
P02750	富含亮氨酸的 $\alpha 2$ 糖蛋白	LRG1	38 177.44	6.45	15	-2.36
Q8IVF4	动力蛋白重链 10	DNAH10	514 834.70	5.64	3	-2.03
P07339	组织蛋白酶 D	CTSD	44 551.72	6.10	2	-2.02
P06702	钙结合蛋白 S100A9	S100A9	13 241.85	5.71	4	-2.00
A0A0G2JPD4	免疫球蛋白 $\gamma 4$ 链 C 区	IGHG4	35 940.14	7.18	175	-2.00
Q06033	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H3	ITIH3	99 848.02	5.49	24	-1.95
P07996	凝血酶敏感蛋白 1	THBS1	129 381.40	4.71	37	-1.95
P00738	结合珠蛋白	HP	45 204.78	6.13	235	-1.84
P02776	血小板因子 4	PF4	10 844.83	8.93	2	-1.80
P0DJ18	血清淀粉样蛋白 A1	SAA1	13 531.86	6.28	6	-1.70
P35527	角蛋白 9	KRT9	62 063.62	5.14	13	-1.61
P20742	PZP 结构域	PZP	163 861.00	5.97	119	-1.53
P02748	C9 补体 C9	C9	63 172.73	5.43	32	-1.52

2.3 2-DE 和 iTRAQ 蛋白组学差异蛋白对比 两种方法鉴定出稳定期患者 2 个重合的差异蛋白,分别为间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4、补体 C4-A,表达均上调,其中间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4 差异倍数比率上调为主。鉴定出进展期患者 3 个重合的差异蛋白,分别为补体 C4-B、载脂蛋白 A-I (下调),间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H4 的差异倍数比率下调为主(下调)。

2.4 生物信息学分析 利用 GO 注释富集分析两种蛋白组学技术筛选的白癜风不同分期差异蛋白,

显示进展期和稳定期差异蛋白存在于各种生物过程,如生物代谢、细胞凋亡、免疫共刺激、生物黏附、生物调控等。进一步用 PANTHER 软件分析这些蛋白在白癜风不同分期中的富集通路,结果(图 1)显示:进展期差异蛋白主要富集于 CCKR 通路、纤溶酶原激活级联通路、p53 通路、趋化炎症因子调控通路及 DNA 复制;稳定期差异蛋白参与促性腺激素释放激素受体调节通路、FAS 信号通路、血管紧张素 II 刺激信号通路等。



图 1 白癜风稳定期(A)与进展期(B)差异蛋白富集通路

3 讨论

白癜风是一种黑素细胞被破坏所致色素脱失性免疫功能失衡性皮肤病,其发病机制尚不明确,多种致病学说共存,主要涉及遗传、自身免疫、氧化应激、细胞毒作用、黑素细胞结构及功能缺陷、神经介质、微环境紊乱等。因此,寻找新的血清蛋白质标志物有利于白癜风不同分期的病理机制研究。

本研究采用两种蛋白质组学技术对白癜风不

同分期患者的血清进行差异蛋白筛选,发现与正常对照组相比,稳定期患者血清中丝氨酸蛋白酶抑制因子(SERPINA5)表达明显上调,而亮氨酸拉链蛋白 4(LUZP4)、补体 C9 表达明显下调。其中, SERPINA5 是活化蛋白 C 的抑制因子,其可以独立作为纤溶酶原激活剂尿激酶的抑制剂参与宿主防御及肿瘤抑制、细胞凋亡等过程^[5]。通过 PANTHER 软件分析得出纤溶酶原激活级联通路参与白癜风稳定期发生,而激活的通路中可能有筛

选出的差异表达蛋白共同参与。另外,角蛋白骨架蛋白通常在鳞状上皮组织中表达增多,本研究筛选出较多差异表达的不同序列号角蛋白,比如 KRT6、KRT9,特别是进展期白癜风角蛋白 I 型骨架蛋白 16(KRT16)明显上调。而 KRT16 在银屑病、先天性厚甲中被依次报道,主要参与维持皮肤屏障功能和先天免疫相关基因表达,特别是表皮损伤相关的分子模式^[6]。但认为角蛋白可能是实验过程中的混杂蛋白,暂排除不予考虑其为差异蛋白,而角蛋白是否为白癜风角质形成细胞受损导致输注黑色素细胞障碍,仍需进一步验证。

与白癜风稳定期差异蛋白不同,进展期白癜风差异蛋白除了 SERPINA5、LUZP4 外,丝氨酸蛋白酶家族中 SERPINA1(即 α 1-抗胰蛋白酶)表达亦上调。SERPINA1 是血液循环系统中最丰富的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其主要作用为监测肝脏或肺脏组织中蛋白酶的平衡,但在不同疾病中发挥的抗炎和免疫调节作用不同。成人慢性阻塞性肺病患者血液中 SERPINA1 降低^[7],而本研究显示其在白癜风进展期患者中表达明显上调,说明该蛋白在白癜风患者血清中表达上调可能通过触发急性期反应,并改变血液循环中的急性期蛋白质的合成和糖基化,发挥抗淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞的抗炎活性。

对差异蛋白通过 GO 富集软件进行白癜风相关通路排序,其中 CCKR 信号通路被首次发现参与白癜风进程。CCKR 通路主要为 APO 脂代谢通路,为脂肪代谢时分泌因子通过脑迷走神经传递信号的热门研究机制^[8]。不同分期白癜风患者血清中筛选出的差异载脂蛋白不同,在稳定期主要为载脂蛋白 E(APOE),在进展期主要为载脂蛋白 L1(APOL1)、载脂蛋白 A(APOA),而 APOA 和 APOE 分别为高密度脂蛋白(HDL)的主要和次要成分。脂代谢异常可诱导循环中及系统性炎症反应。近年研究^[9]发现,血管紧张素 II(Ang II)和氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)可诱导树突细胞(DCs)免疫成熟和炎症反应。最新研究^[10]发现,在白癜风病变皮肤中,DCs 及其相关促炎细胞因子增加。本研究通路富集分析发现,稳定期患者中与脂质代谢相关的差异蛋白参与 Ang II 通路,但 Ang II 是否诱导白癜风患者病变皮肤中 DCs 及促炎因子发生聚集,从而发生免疫炎症反应,有待进一步验证。另外,本研究发现,基质金属蛋白酶 9(MMP9)亦发生

明显变化。最新研究^[11]发现,对白癜风患者进行紫外线光疗后,p53-TRPM1/miR-211-MMP9 轴激活。而 p53 通路参与细胞凋亡、细胞迁移及黏附。本研究发现白癜风不同分期中 MMP9 表达上调,且参与 p53 通路,进一步说明 MMP9 可能通过 p53 通路介导的黑素细胞迁移。稳定期白癜风差异蛋白富集通路还包括 FAS 信号通路。而最新研究^[12]同样发现,FAS 介导的途径参与小鼠白癜风模型中细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)依赖和诱导的人黑素细胞凋亡;有研究表明在白癜风患者病变皮肤中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和干扰素 γ (IFN- γ)表达水平升高,可以协同抑制 FAS 介导的凋亡。本研究筛选出的白癜风稳定期差异蛋白可能参与诱导黑色素细胞凋亡,与该作用机制相关的血清标志物有望成为白癜风早期诊断和预后的有效指标。

本研究借助 2-DE 与 iTRAQ 两种蛋白质组学技术筛选白癜风不同分期的差异蛋白,发现 SERPINA5 等可能作为白癜风的潜在生物学标志物。富集通路分析发现,除了经典 p53 通路外,差异蛋白还富集于诱导细胞凋亡的 Fas 通路及参与脂质代谢的 CCKR 信号通路。本研究说明,应用蛋白质组学能筛选出新的血清标志物及作用通路,对不同分期白癜风的病理机制研究提供新的敏感指标,然而筛选出的部分差异蛋白的差异率不一致,需要进一步深入研究,以便为白癜风患者提供有效的评估指标及预后预测指标。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] KRÜGER C, SCHALLREUTER K U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults[J]. *Int J Dermatol*, 2012, 51(10): 1206-1212.
- [2] HABIB A, RAZA N. Clinical pattern of vitiligo[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2012, 22(1): 61-62.
- [3] TRCKA J, KUNZ M. Functional genome and proteome analyses of cutaneous autoimmune diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(29): 3787-3798.
- [4] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 白癜风诊疗共识(2018版)[J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 51(4): 247-250. Pigmentary Disorder Group, Committee on Dermatology and Venereology, China Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Diagnosis and treatment of vitiligo: an expert consensus statement(2018)[J]. *Chinese Journal of Dermatology*, 2018, 51(4): 247-250.
- [5] VILANDER L M, KAUNISTO M A, VAARA S T, et al. Genetic variants in SERPINA4 and SERPINA5, but not

- BCL2 and SIK3 are associated with acute kidney injury in critically ill patients with septic shock[J]. *Crit Care*, 2017, 21(1):47.
- [6] LESSARD J C, PINA-PAZ S, ROTTY J D, et al. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(48): 19537-19542.
- [7] 陈少莲,张 涛,马晓桂,等. 血清 α -1 抗胰蛋白酶测定的临床意义[J]. *吉林医学*, 2020, 41(12):3004-3008. CHEN S L, ZHANG T, MA X G, et al. The clinical significance of alpha-1 antitrypsin[J]. *Jilin Medical Journal*, 2020, 41(12): 3004-3008.
- [8] LO C C, DAVIDSON W S, HIBBARD S K, et al. Intraperitoneal CCK and fourth-intraventricular Apo AIV require both peripheral and NTS CCK1R to reduce food intake in male rats [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1700-1707.
- [9] 马云吉,邹云增,葛均波. 心肌梗死微环境中氧化低密度脂蛋白对树突状细胞诱导炎症反应的影响[J]. *中国临床医学*, 2018, 25(3):383-386. MA Y J, ZOU Y Z, GE J B. Effect of oxidized low-density lipoprotein on dendritic cells-induced inflammation in microenvironment of myocardial infarction [J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2018, 25(3): 383-386.
- [10] SINGH A, DAS D, KURRA S, et al. Dendritic cells and their associated pro-inflammatory cytokines augment to the inflammatory milieu in vitiligo skin [J]. *Cytokine*, 2021, [Online ahead of print].
- [11] SU MY, MIAO F, JIANG S, et al. Role of the p53-TRPM1/miR-211-MMP9 axis in UVB-induced human melanocyte migration and its potential in repigmentation[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(4):1017-1026.
- [12] HARUKI J, HIROSHI N, SUSUMU F, et al. Fas-FasL interaction in cytotoxic T cell-mediated vitiligo: the role of lesional expression of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in Fas-mediated melanocyte apoptosis [J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(1):61-70.

[本文编辑] 姬静芳