文章编号:1000-5404(2006)11-1221-03

论著

人骨关节炎滑膜成纤维细胞差异蛋白质谱初步分析

柏干苹[1,2,4],周丽娜*[1,2],贺伟峰[1,2],罗高兴[1,2],陈烯伟[1,2],易绍萱[1,2],胡晓红[1,2],石东文[1,2],陈光兴[3],方勇飞[4],吴 军[1,2]
(第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,[2]疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,[3]关节外科中心,[4]风湿科,重庆 400038)

提 要:目的 应用双向凝胶电泳-质谱法分析正常人及骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者滑膜成纤维细胞蛋白质组表达差异,探讨差异蛋白在骨关节炎发病中的作用。**方法** 采用固相pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分离正常人及骨关节炎患者滑膜成纤维细胞总蛋白质,银染显色,PDQuest2-DE软件分析图像,比较2种细胞蛋白质组表达差异,对差异蛋白质点用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱进行鉴定。**结果** 胶图差异分析显示36个表达水平存在明显差异的蛋白质,选取15个点进行质谱鉴定,鉴定出6个表达上调蛋白质。**结论** 正常人及骨关节炎患者滑膜成纤维细胞表达蛋白质组存在差异。这些差异蛋白可能参与骨关节炎的发病。

关键词: 骨关节炎;滑膜成纤维细胞;蛋白质组;双向电泳
中图法分类号: R329.24; R341; R684.3 **文献标识码:** A

Analyses of differentially expressed proteins of human synovial fibroblasts obtained from osteoarthritis

BAI Gan-ping[1,2,4], ZHOU Li-na[1,2], HE Wei-feng[1,2], LUO Gao-xing[1,2], CHEN Xi-wei[1,2], YI Shao-xuan[1,2], HU Xiao-hong[1,2], SHI Dong-wen[1,2], CHEN Guang-xing[3], FANG Yong-fei[4], WU Jun[1,2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, [3]Department of Orthopaedics, [4]Department of Rheumatism, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To understand the possible roles of some proteins expressed by human synovial fibroblasts in the pathogenesis of osteoarthritis by means of 2-DE and bioinformatics. **Methods** The difference of synovial fibroblasts protein expression between osteoarthritis patients and healthy controls was analyzed by 2-DE. The differential expression spots were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), followed by bioinformatics analysis. **Results** Gel-image analysis revealed that there were 36 differential protein spots. A total of 15 differential protein spots were identified by MALDI-TOF-MS, of which 6 spots were much more intensive in osteoarthritis patients than normal ones. **Conclusion** These differential proteins based on bioinformatics analysis might be involved in synovitis in osteoarthritis patients.

Key words: osteoarthritis; synovioblast; proteome; two-dimensional electrophoresis

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种严重危害人类健康的慢性进行性骨关节疾病,该病是以关节软骨退变为核心,累及骨质,并包括滑膜、关节囊及关节囊外其他结构的不同程度的炎性病变。对其发病机制的研究涉及软骨细胞的较多,近几年来随着对OA的深入认识,开始注意到滑膜在OA中的重要地位,滑膜细胞功能异常与参与OA发病进程的重要介质(如细胞因子IL-1、TNF-α和IL-6)有密切的关系。本研究利用高分辨双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)对正常人及骨关节炎患者滑膜成纤维细胞(synovial fibroblast)进行蛋白质分离,并对差异蛋白质进行鉴定及功能分析,以便更好地了解骨关节炎的发病机制。

基金项目: 疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室专项基金资助项目(2004)
Supported by the Funds for Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases (2004)
*:为同等贡献者
作者简介: 柏干苹(1969-),女,四川省广元市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事风湿病基础与临床方面的研究。电话:(023)60685643
通讯作者: 吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@126.com
方勇飞,电话:(023)68754135
收稿日期: 2006-01-16;**修回日期:** 2006-04-17

1 材料与方法

1.1 滑膜细胞的培养

滑膜组织均取材于第三军医大学西南医院关节外科中心行膝关节置换术的骨关节炎患者，所有患者均符合1995年美国风湿病学会的骨关节炎诊断标准[1]。参照文献[2]进行滑膜细胞的原代培养：术中取出滑膜组织，立即于无菌条件下剪碎，0.5%胰蛋白酶37 ℃消化2 h后，离心收集细胞，加入含有20%胎牛血清(Gibco公司)DMEM培养液，置于37 ℃、5% CO_2孵箱中令其贴壁生长，细胞生长至85%时，用胰蛋白酶消化进行1∶2传代。本实验中采用3～5代滑膜成纤维细胞。

1.2 方法

1.2.1 细胞总蛋白质的制备[3] 取3～5代培养滑膜细胞，待细胞生长至融合期时，吸出培养液，用胰酶消化，PBS液洗涤细胞3次后，加入细胞裂解液(尿素7 mol/L，硫脲2 mol/L，CHAPS 4%，DTT 65 mmol/L，Bio-Lyte 0.2%，均为Bio-Rad公司产品)充分混匀，20 000 r/min，4 ℃离心1 h，取上清，用Bradford方法测定蛋白含量，并分装于-80 ℃冻存备用。

1.2.2 双向电泳 操作及所用试剂均同文献[4]，蛋白样品400 μg，采用pH 4～7、17 cm预制IPG胶条，第1向等电聚焦程序设置如下：250 V、线性、30 min，1 000 V、快速、1 h，10 000 V、线性、5 h，10 000 V、快速、60 000 Vh，500 V、快速、任意时间保持。等电聚焦电泳后IPG胶条在平衡液中进行平衡，随后被转移至1 mm厚的12% SDS聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Rad公司)上端进行第2向SDS-PAGE电泳。

1.2.3 银染 按文献[4]进行。

1.2.4 凝胶图像采集分析与质谱鉴定 凝胶通过GS800 Calibrated Densitometer扫描仪(Bio-Rad公司)以及Quantity One 4.5.0扫描软件(Bio-Rad公司)进行扫描获取图像，数字化图像文件运用PDQuest 7.3分析软件(Bio-Rad公司)对图像进行分析，筛选蛋白质差异点，随后将从蛋白质差异点抽提所得的肽段通过Autoflex质谱仪进行分析，获取蛋白样品的肽质量指纹图(由北京华大蛋白质组研发中心完成)，最后应用Mascot软件在人类蛋白质公共数据库(NCBI、SWISS-PROT)中搜寻，获得蛋白质的相关信息。

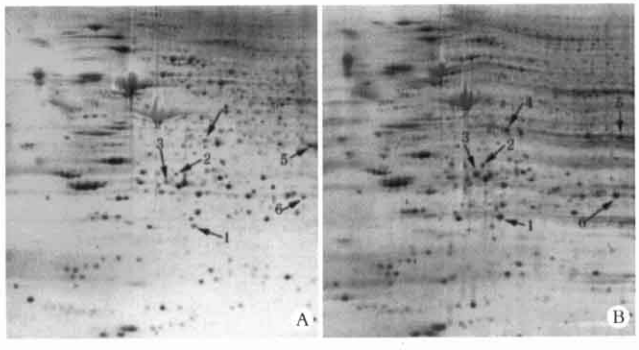
2 结果

2.1 正常人及OA患者滑膜细胞双向凝胶电泳图谱分析

正常人及OA患者滑膜成纤维细胞蛋白质双向电泳银染图谱见图1AB。2种细胞裂解总蛋白质均在相同条件下制备了3张2-DE胶，采用PDQuest 7.3软件比较2组电泳图谱，2组双向电泳图谱非常相似，经过背景消减后，将其中的1块胶定为参考胶，进行3块凝胶间的蛋白质点的匹配，正常人及OA患者滑膜细胞平均蛋白质点数分别为852和837，匹配率达92%和90%。同时为了考察2种细胞蛋白质图谱中相互匹配的点是否为同一种蛋白质，选择图1中相匹配的2点分别进行质谱鉴定，结果均为半乳糖凝集素Galectin-1，证明胶图具有良好的稳定性，可进行进一步的蛋白质差异表达分析。

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

差异表达蛋白质点筛选的标准：凝胶电泳图进行扫描后，通过PDQuest 7.3软件筛选出两者间表达量相差3倍以上的差异表达蛋白质点，获得正常人及骨关节炎滑膜成纤维细胞差异表达蛋白质点数为36个。选取其中最明显的15个差异蛋白质点用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOF-MS)，成功鉴定6个表达上调蛋白，结果见表1。



A：正常人；B：OA患者；1-6：成功鉴定蛋白

图1 滑膜细胞蛋白质双向电泳图谱

表1 正常人及OA患者滑膜细胞差异蛋白质谱鉴定结果

编号	NCBI检索ID	蛋白名称	分值	序列符合率(%)	等电点	分子量
1	gi|33188452	peroxiredoxin 2 isoform b [Homo sapiens]	150	46%	6.12	16 036
2	gi|2136005	proteasome activator PA28 beta chain [Homo sapiens]	103	40	5.44	27 502
3	gi|5822091	Chain H, Cathepsin D [Homo sapiens]	107	53	5.31	26 457
4	gi|12654583	Ribosomal protein P0 [Homo sapiens]	126	47	5.42	34 424
5	gi|30841309	manganese-containing superoxide dismutase [Homo sapiens]	88	35	6.87	23 772
6	gi|4502101	annexin I [Homo sapiens]	198	45	6.57	38 918

3 讨论

骨关节炎通常被认为是一种因生物力学改变和衰老而引起的退行性关节疾病，然而最近的研究表明其发病机制中有炎症反应的参与。临床症状和体征中反映炎症的根据包括受累关节肿胀、滑膜渗出及关节僵直等。患者滑液中有单核细胞增加和免疫球蛋白及补体水平增高，滑膜也有炎症性关节炎的一个最明显特征，即滑膜衬里层成纤维细胞增生[5]。本研究通过对滑膜成纤维细胞进行蛋白质组差异分析，成功鉴定6个表达上调的蛋白，经过复习文献对获得的6个在结构及功能上较明确的蛋白质在滑膜炎中的作用进行了分析。

本研究显示，蛋白酶体激活因子PA28β亚单位、

核糖体 PO 蛋白表达明显上调。蛋白酶体（proteosome）是存在于细胞中的一种大分子蛋白质水解酶复合体，具有广泛的蛋白水解活性，在 MHC-Ⅰ类抗原的加工及递呈中起着重要的作用，PA28 是蛋白酶体重要的活化调节因子。研究表明[6]，PA28 具有增强 20S 蛋白酶体核心肽酶活性的作用，参与 MHC-Ⅰ类抗原的加工及递呈，PA28 表达上调时，蛋白酶体活性明显增强，MHC-Ⅰ类抗原递呈能力亦随之明显增高，并可促进淋巴细胞增殖活化。而核糖体 PO 蛋白为自身抗原之一，抗核糖体 P 蛋白抗体为系统性红斑狼疮（SLE）特异性诊断标志之一。因此，本研究提示，PA28 表达增强可能是诱导局部细胞性免疫应答的重要因素，而核糖体 PO 蛋白的表达增强可能是细胞内的蛋白酶体活性增强的结果。PO 蛋白在 OA 病理过程中的作用有待于进一步的研究。

急慢性炎症过程可引起机体发生氧化应激状态，氧化应激产生的活性氧（reactive oxygen species，ROS），参与一系列炎症、变性类疾病的形成过程。滑膜成纤维细胞和单核细胞的硫氧还原蛋白的免疫定位揭示了氧化应激诱导的促炎症途径的存在[7]。本研究表明，2 种抗氧化酶锰超氧化物歧化酶（SOD_2）和硫氧还原蛋白过氧化物酶（peroxiredoxinⅡ）在 OA 滑膜成纤维细胞中表达增加，提示二者的表达上调可能是机体对 OA 滑膜炎症的一种保护反应，旨在清除细胞内多余的活性氧分子，增强细胞抗氧化能力而调控炎症程度。研究显示，OA 滑膜成纤维细胞、软骨细胞均高表达 SOD_2，在促炎症因子 TNF、IL-1 刺激后表达上调更明显[8]。另外与 Prx 同家族成员之一的 Prx 5 在软骨细胞中亦高表达，且与 TNF、IL-1 上调有关，本研究与文献[8]结果一致，进一步证实了这 2 种蛋白可能在氧化应激中起保护作用。

另一种可能调控炎症程度、具保护作用的蛋白为表达上调的膜联蛋白 1（annexinⅠ），膜联蛋白Ⅰ属钙磷脂结合蛋白（Annexins）家族，为磷酯酶 A_2（phospholipaseA_2，PLA_2）的抑制剂，可通过抑制炎症介质的释放、中性粒细胞的游出以及激素的分泌而具有抗炎特性。最近的研究表明[9]，IL-1、IL-6、TNF 可诱导滑膜成纤维细胞膜联蛋白Ⅰ表达增强，在抗原诱导的关节炎中，亦可通过调节细胞因子的表达而具有抗炎活性。

金属蛋白酶及组织蛋白酶导致细胞外基质的降解在骨与软骨破坏中起着重要的作用。研究表明，滑膜成纤维细胞可释放组织蛋白酶 B、K、L，参与细胞外基质的降解，并且这些酶的产生在其与 T 细胞直接接触或促炎症细胞因子存在的条件下可以明显地增加[10]。本研究表明组织蛋白酶 D 在 OA 滑膜成纤维细胞表达上调，虽该蛋白与 OA 骨侵蚀的相关性报道较少，但该酶在炎症过程中可通过细胞分泌水解组织蛋白，组织中的乳酸及二氧化碳降低细胞外 pH 而被激活，亦提示该蛋白可能与骨侵蚀有关，其具体的作用机制有待进一步的研究。

综上，OA 患者滑膜成纤维细胞中表达上调的蛋白并不是孤立存在的，而是互相关联，互相作用，参与 OA 滑膜炎症的各个环节。我们的研究提示核糖体 PO 蛋白和 PA28 表达的上调可能是 OA 免疫病理发生发展的重要机制，组织蛋白酶 D 及 SOD_2、硫氧还原蛋白过氧化物酶Ⅱ、膜联蛋白Ⅰ可能是参与 OA 骨和软骨侵蚀这一病理过程的重要因素，疾病的缓解或进展可能是炎症反应与抗炎反应动态平衡的维持或破坏的结果。进一步阐明这些蛋白在骨关节炎发病中的作用无疑对指导治疗具有重要的意义。

参考文献：

[1] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊治指南（草案）[J]. 中华风湿病学杂志，2003，7(11)：702－704.

[2] 孙铁铮，吕厚山，药立波，等. 染料木黄酮对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞生长的影响[J]. 中华风湿病学杂志，2000，4(5)：266－269.

[3] 彭双发，吴　军，殷剑宁，等. 人 $CD4^+CD25^+$ T 细胞和 $CD4^+CD25^-$ T 细胞蛋白质组的双向电泳分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(6)：492－494.

[4] 柏干苹，周丽娜，贺伟峰，等. 双向电泳-质谱法寻找类风湿关节炎疾病相关蛋白[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：726－728.

[5] HARAOUI B，PELLETIER J P，CLOUTIER J M，*et al*. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *In vivo* effects of antirheumatic drugs[J]. Arthritis Rheum，1991，34(2)：153－163.

[6] KLOETZEL P M. The proteasome and MHC class I antigen processing[J]. Biochim Biophys Acta，2004，1695(1－3)：225－233.

[7] MAURICE M M，NAKAMURA H，GRINGHUIS S，*et al*. Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum，1999，42(11)：2430－2439.

[8] WANG M X，WEI A，YUAN J，*et al*. Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis[J]. FEBS Lett，2002，531(2)：359－362.

[9] PERRETTI M，GAVINS F N. Annexin 1：an endogenous anti-inflammatory protein[J]. News Physiol Sci，2003，18：60－64.

[10] BURGER D，REZZONICO R，LI J M，*et al*. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes：involvement of membrane-associated cytokines[J]. Arthritis Rheum，1998，41(10)：1748－1759.

（编辑　王　红）