

## · 基础研究 ·

## 急性脊髓损伤患者血清蛋白质组学研究

高 瑞, 杨成伟, 王伟恒, 周许辉\*

海军军医大学附属长征医院骨科, 上海 200003

【摘要】目的 观察急性脊髓损伤(SCI)患者和健康人群血清差异表达蛋白, 寻找急性SCI相关特异性代谢通路或蛋白标志物。方法 2013年7月—2014年12月, 采集9例急性颈部SCI患者(病例组)和9例年龄、性别与病例组相匹配的健康受试者(对照组)的血液样本。记录病例组损伤时间、颈椎日本骨科学会(JOA)评分等基本信息。应用非标记相对定量蛋白质组学技术比较病例组与对照组血清蛋白质谱, 采用Spearman相关分析寻找差异表达蛋白与患者年龄、损伤时间以及JOA评分的相关性。应用基因本体论(GO)分析、BiNGO富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)对差异表达蛋白进行生物信息学分析。结果 共发现22个差异表达蛋白。与对照组相比, 病例组11个蛋白表达上调(包括果糖-二磷酸醛缩酶、碳酸酐酶等), 且与损伤时间和颈椎JOA评分呈正相关; 11个蛋白表达下调(包括免疫球蛋白等), 且与损伤时间和颈椎JOA评分呈负相关。生物信息学分析发现这些差异表达蛋白主要富集在果糖和甘露糖代谢通路、血小板激活代谢通路、黏附连接代谢通路和氮代谢通路。结论 急性SCI患者和健康人群血清蛋白质谱存在差异, 果糖-二磷酸醛缩酶、碳酸酐酶等有望成为急性SCI潜在的分子标志物。

【关键词】脊髓损伤; 血清; 蛋白质组学

【中图分类号】R 651.21 【文献标志码】A 【文章编号】1672-2957(2019)02-0116-05

【DOI】10.3969/j.issn.1672-2957.2019.02.009

## Serum proteomic analysis in patients with acute spinal cord injury

GAO Rui, YANG Cheng-wei, WANG Wei-heng, ZHOU Xu-hui\*

Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Navy Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】Objective To investigate the specific metabolic pathway or different biomarkers for acute spinal cord injury (SCI) by comparing the protein expression between acute SCI patients and healthy controls. Methods From July 2013 to December 2014, the blood samples were collected from 9 acute cervical SCI patients and 9 healthy controls. The demographic characteristics of age, time of injury, and cervical Japanese Orthopedic Association (JOA) score of the 9 SCI patients were recorded. The serum protein mass spectra were compared between SCI patients and healthy controls by label-free relatively quantitative proteomic technology. The correlation between differential protein expression and demographic characteristics was studied in the patients by using Spearman correlation analysis. The bioinformatic analyses of differential expression proteins were performed by using gene ontology (GO), BiNGO, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analyses. Results Twenty-two candidate proteins were identified in the acute SCI group, among which 11 proteins were up-regulated (such as fructose-bisphosphate aldolase, carbonic anhydrase) and positively correlated with the time of injury and JOA score; and 11 proteins (such as immunoglobulins) were down-regulated and negatively correlated with the time of injury and JOA score. Bioinformatic analysis showed the 22 proteins were mainly in fructose and mannose metabolism pathway, platelet activated metabolic pathway, adhesion and connection metabolism pathway, and nitrogen metabolism pathway. Conclusion There are different serum protein profiles between acute SCI patients and healthy controls. Candidate proteins fructose-bisphosphate aldolase and carbonic anhydrase are promising biomarkers.

【Key Words】Spinal cord injuries; Serum; Proteomics

J Spinal Surg, 2019, 17(2): 116-120

基金项目: 上海市卫生局青年科研项目(2012Y146)

作者简介: 高 瑞(1984—), 博士, 主治医师; gaoruidr@hotmail.com

\*通信作者: 周许辉 xuhuizhou66@163.com

急性脊髓损伤(SCI)是脊柱外科的常见疾病之一<sup>[1]</sup>。目前尚缺乏有效、特异性的实验室检查手段或评估指标。SCI后的病理过程可分为原发性损伤和继发性损伤,原发性损伤是指椎体或椎间盘等对脊髓造成的直接压迫,继发性损伤是指在原发性损伤后脊髓出现出血和炎性反应<sup>[2]</sup>。目前脊髓继发性损伤的病理生理机制和生物化学通路尚未完全明确<sup>[3]</sup>。近年来,蛋白质组学技术已经广泛应用于各种疾病的标志物检测研究,本研究采用非标记相对定量蛋白质组学(labelfree)技术比较急性颈部SCI患者和健康人群血清蛋白质谱,对差异表达的蛋白进行生物信息学分析,以期发现急性SCI后的重要差异表达蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

2013年7月—2014年12月,收集9例急性颈部SCI患者(伤后24 h内)作为病例组,收集9例性别、年龄与病例组相匹配的健康体检者作为对照组。病例组均为男性,年龄32~55岁,平均47岁,记录患者损伤时间,并进行颈椎日本骨科学会(JOA)评分<sup>[4]</sup>。对照组也均为男性,年龄31~54岁,平均44岁。2组患者均无恶性肿瘤、自身免疫病及慢性传染病等疾病。

### 1.2 仪器及主要试剂

酶联斑点分析仪(CTL公司,美国);Q-Exactive液相色谱-质谱联用系统(Thermo公司,美国);EASY-nLC1000纳升级流速高效液相色谱系统(Thermo公司,美国);去除人14种高丰度蛋白的多重亲和排除系统(Aligent公司,美国);胰蛋白酶(Promega公司,美国)。

### 1.3 血液样本收集和血清蛋白处理

患者伤后送入急诊时即用肝素抗凝采血管收集其空腹静脉血液,4℃离心(1 500 r/min,离心半径19.5 cm,10 min)。每3份血清样本随机合并,作为一个生物学重复,每组3个重复。取血清样品,去除血清中高丰度蛋白,将低丰度蛋白超滤浓缩。浓缩后加入适量裂解液,沸水浴15 min,定量后,-80℃保存。每份样品取200 μg,加入二硫苏糖醇(DTT)至浓度为100 mmol/L,4℃离心(8 000 r/min,离心半径19.5 cm,10 min),离心2次后加入0.5%胰蛋白酶40 μL,37℃孵育18 h。

### 1.4 液相色谱-串联质谱分析

按定量结果取3 μg酶解产物进行液相色谱-

串联质谱分析,采用EASY-nLC1000纳升级流速高效液相色谱系统进行分离。经液相分离后用Q-Exactive液相色谱-质谱联用系统进行质谱分析。分析时长为120 min,检测方式为正离子,母离子( $m/z$ )扫描范围为300~1 800。

### 1.5 非标记分析和生物信息学分析

将液相色谱-串联质谱原始文件导入Maxquant 1.3.0.5软件进行非标记定量分析,数据库为ipi.human.3.68.fasta。所得的查库文件使用Perseus 1.3.0.4软件进行分析。获得的差异表达蛋白在基因本体论(GO)数据库进行注释分析,包括细胞组分、分子功能和生物学过程分析。在京都基因与基因组百科全书(KEGG)软件进行通路分析。采用Cytoscape 3.2.1软件的BiNGO 3.0.3插件进行富集分析。

### 1.6 统计学处理

使用SPSS 16.0软件对数据进行统计学分析。组间各血清蛋白质平均丰度的差异比较采用独立样本 $t$ 检验,以检验结果 $P<0.05$ 或差异倍数 $>2$ 的蛋白被认为是差异表达蛋白。采用Spearman相关分析探讨差异表达蛋白与年龄、损伤时间以及JOA评分的相关性。

## 2 结果

### 2.1 基本信息

病例组9例患者损伤时间为3~24( $16.4 \pm 3.1$ )h,颈椎JOA评分为6~13( $9.2 \pm 1.7$ )分。

### 2.2 差异表达蛋白

共发现483个蛋白,其中22个蛋白呈现差异表达。与对照组相比,病例组中有11个蛋白表达上调,包括果糖-二磷酸醛缩酶、碳酸酐酶等;11个蛋白表达下调,包括免疫球蛋白等(表1)。

### 2.3 差异表达蛋白与损伤时间及JOA评分的关系

Spearman相关分析结果显示,11个表达上调蛋白与损伤时间和颈椎JOA评分呈正相关;11个表达下调蛋白与损伤时间和颈椎JOA评分呈负相关(表1);22个差异表达蛋白均与损伤时年龄无关。

### 2.4 生物信息学分析

GO和BiNGO分析结果显示,22种差异表达蛋白主要参与碳酸盐转运、碳酸酐酶活性、B细胞受体信号通路及细胞活化过程(表2),主要富集于大分子复合物、细胞外区、细胞膜、细胞器及膜封闭腔(表3)。将所有的差异表达蛋白进行KEGG通路分析,共发现了4个有统计学意义的代谢通路:果糖和甘露糖代谢通路、血小板激活代谢通路、黏附连接代谢通路和氮代谢通路。

表 1 差异表达蛋白与损伤时间、JOA 评分的相关性

Tab. 1 Correlation analysis between differentially proteins and time of injury , JOA score

| 基因<br>Gene       | 蛋白<br>Protein | 蛋白描述<br>Protein description                                      | 表达<br>Expression      | 比值<br>Ratio | JOA 评分<br>JOA score |          | 损伤时间<br>Time of injury |          |
|------------------|---------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|---------------------|----------|------------------------|----------|
|                  |               |                                                                  |                       |             | <i>r</i>            | <i>P</i> | <i>r</i>               | <i>P</i> |
| <i>Aldoa</i>     | ALDOA         | 果糖-二磷酸醛缩酶 A<br>Fructose-bisphosphate aldolase A                  | 上调<br>Up-regulation   | 12.892      | 0.66                | 0.007    | 0.57                   | 0.002    |
| <i>Fga</i>       | FIBA          | 纤维蛋白原 α 链<br>Fibrinogen alpha chain                              | 上调<br>Up-regulation   | 8.681       | 0.65                | 0.003    | 0.78                   | 0.001    |
| <i>Ca3x</i>      | CAH3          | 碳酸酐酶 3<br>Carbonic anhydrase 3                                   | 上调<br>Up-regulation   | 8.156       | 0.74                | 0.009    | 0.71                   | 0.002    |
| <i>Aldob</i>     | ALDOB         | 果糖-二磷酸醛缩酶 B<br>Fructose-bisphosphate aldolase B                  | 上调<br>Up-regulation   | 7.568       | 0.71                | 0.002    | 0.74                   | 0.002    |
| <i>Ywhae</i>     | 1433E         | 14-3-3 蛋白 ε<br>14-3-3 epsilon                                    | 上调<br>Up-regulation   | 6.321       | 0.69                | 0.007    | 0.83                   | <0.000 1 |
| <i>Ca2</i>       | CAH2          | 碳酸酐酶 2<br>Carbonic anhydrase 2                                   | 上调<br>Up-regulation   | 4.764       | 0.81                | 0.007    | 0.55                   | 0.001    |
| <i>Ces1c</i>     | EST1C         | 羧酸酯酶<br>Carboxylesterase 1C                                      | 上调<br>Up-regulation   | 4.218       | 0.79                | 0.005    | 0.61                   | 0.001    |
| <i>Serpina3n</i> | SPA3N         | 丝氨酸蛋白酶抑制因子 A3N<br>Serine protease inhibitor A3N                  | 上调<br>Up-regulation   | 3.845       | 0.63                | 0.008    | 0.68                   | 0.002    |
| <i>Ugp2</i>      | UGPA          | UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶<br>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase | 上调<br>Up-regulation   | 3.518       | 0.64                | 0.003    | 0.71                   | 0.005    |
| <i>Prg4</i>      | PRG4          | 蛋白聚糖 4<br>Proteoglycan 4                                         | 上调<br>Up-regulation   | 3.206       | 0.73                | 0.000    | 0.82                   | 0.003    |
| <i>Ca1</i>       | CAH1          | 碳酸酐酶 1<br>Carbonic anhydrase 1                                   | 上调<br>Up-regulation   | 3.103       | 0.72                | 0.003    | 0.83                   | <0.000 1 |
| <i>Dnah2</i>     | DYH2          | 轴丝动力蛋白重链<br>Axonemal dynein heavy chain                          | 下调<br>Down-regulation | 0.211       | -0.79               | 0.007    | -0.77                  | 0.002    |
| <i>Igh-1a</i>    | IGG2B         | 免疫球蛋白 γ-2B 链 C 区<br>Ig gamma-2B chain C region                   | 下调<br>Down-regulation | 0.228       | -0.59               | 0.003    | -0.68                  | 0.001    |
| <i>LOC367586</i> | IGG2A         | 免疫球蛋白 γ-2A 链 C 区<br>Ig gamma-2A chain C region                   | 下调<br>Down-regulation | 0.302       | -0.66               | 0.009    | -0.81                  | 0.002    |
| <i>Apoa2</i>     | APOA2         | 载脂蛋白 A- II<br>Apolipoprotein A- II                               | 下调<br>Down-regulation | 0.325       | -0.54               | 0.002    | -0.59                  | 0.007    |
| <i>Lac2</i>      | LAC2          | 免疫球蛋白 λ-2 链 C 区<br>Ig lambda-2 chain C region                    | 下调<br>Down-regulation | 0.333       | -0.71               | 0.007    | -0.72                  | <0.000 1 |
| <i>C4a</i>       | C4a           | 补体 C4a<br>Complement C4a                                         | 下调<br>Down-regulation | 0.391       | -0.72               | 0.007    | -0.71                  | 0.001    |
| <i>HVM36</i>     | HVM36         | 免疫球蛋白重链 V 区 441<br>Ig heavy chain V region 441                   | 下调<br>Down-regulation | 0.393       | -0.58               | 0.005    | -0.61                  | 0.003    |
| <i>F13a1</i>     | F13A          | 凝血因子 X III A 链<br>Coagulation factor X III A chain               | 下调<br>Down-regulation | 0.401       | -0.69               | 0.008    | -0.66                  | 0.002    |
| <i>C4b</i>       | C4b           | 补体 C4b<br>Complement C4b                                         | 下调<br>Down-regulation | 0.412       | -0.59               | 0.003    | -0.52                  | 0.003    |
| <i>Ppbp</i>      | Cxcl1         | CXC 趋化因子<br>CXC chemokine                                        | 下调<br>Down-regulation | 0.487       | -0.62               | 0.000    | -0.58                  | 0.004    |
| <i>Cd5l</i>      | CD5L          | 抗原样 CD5<br>CD5 antigen-like                                      | 下调<br>Down-regulation | 0.535       | -0.75               | 0.003    | -0.83                  | 0.002    |

表2 GO分子功能分类

Tab. 2 GO molecular functional classification

| GO分子功能注释<br>GO molecular function annotation   | 蛋白<br>Protein                                | P值<br>P value |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|
| 碳酸盐转运<br>Carbonate transport                   | CAH1, CAH2, CAH3                             | 0.000 43      |
| 碳酸酐酶活性<br>Carbonic anhydrase activity          | CAH1, CAH2, CAH3                             | 0.000 43      |
| B细胞受体信号通路<br>B cell receptor signaling pathway | LAC2, HVM36, IGG2A, IGG2B                    | 0.000 81      |
| 细胞活化<br>Cell activation                        | LAC2, HVM36, IGG2A, IGG2B, 1433E, GROA, FIBA | 0.000 98      |

表3 GO细胞成分分类(2级)

Tab. 3 GO cellular component classification( Level 2 )

| GO细胞成分分类<br>GO cellular component classification | 蛋白<br>Protein                         |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 大分子复合物<br>Macromolecular complex                 | LAC2, HVM36, IGG2A, IGG2B, CAH1, CAH3 |
| 细胞膜<br>Membrane                                  | LAC2, HVM36, IGG2A, IGG2B, 1433E      |
| 细胞外区<br>Extracellular region                     | CAH1, HVM36, GROA, FIBA               |
| 膜封闭腔<br>Membrane-enclosed lumen                  | ALDOA, 1433E, F13A, EST1C, FIBA       |
| 细胞连接<br>Cell junction                            | 1433E                                 |
| 细胞器<br>Organelle                                 | CAH1, CAH2, CAH3, LAC2, HVM36, IGG2A  |

3 讨 论

本研究通过研究颈部急性SCI(24 h内)患者与健康人群血液中蛋白质组的差异,筛选出22个表达差异的蛋白质,其中11个蛋白表达上调,且与损伤程度(JOA评分)及损伤时间呈正相关;11个蛋白表达下调,且与损伤程度(JOA评分)及损伤时间呈负相关。并且这些差异表达蛋白主要富集在果糖和甘露糖代谢通路、血小板激活代谢通路、黏附连接代谢通路及氮代谢通路。

关于SCI后继发性损伤的机制目前有几种假说:脊髓微循环障碍机制、免疫炎症反应机制、兴奋性氨基酸毒性机制、氧自由基过氧化反应损伤机制、钙离子内流机制等。有多种细胞因子参与上述机制过程,SCI可改变相关蛋白的表达,并将这些蛋白释放到血液中<sup>[5]</sup>。

研究发现,SCI会刺激机体发生自身免疫反应,

参与反应的细胞有淋巴细胞、中性粒细胞、抗原提呈细胞及吞噬细胞等。这些细胞在SCI后被激活,释放炎症介质和细胞因子来攻击靶细胞。SCI后的脱髓鞘反应能激活T细胞,使T细胞表面产生大量的细胞黏附分子,从而易于进入血脑屏障来抑制轴突坏死<sup>[6]</sup>。而B细胞在SCI后的增殖和活化受到抑制,具体表现为外周血B细胞数量减少,非胸腺依赖性B细胞活化受到抑制<sup>[7]</sup>。本研究也发现黏附连接代谢通路激活,而B细胞受体信号通路受到抑制,与上述研究结果一致。

本研究发现果糖和甘露糖代谢相关蛋白表达上调,果糖和甘露糖代谢途径异常激活,说明SCI时中心代谢明显增强,这与既往报道一致<sup>[8-10]</sup>。SCI可以引起严重的病理生理反应,包括炎症反应、代谢失调和线粒体损伤,而能量损失与神经损伤相关。推测该代谢通路的激活可以归结于SCI后细胞缺乏能量所致。Carpenter等<sup>[11]</sup>发现,在果糖和甘露糖代谢通路中,神经元可以利用乳酸作为底物产能。Yan等<sup>[12]</sup>根据GO分析的结果发现SCI后大部分差异表达蛋白为能量代谢酶。Chen等<sup>[13]</sup>进一步发现急性SCI后糖酵解途径中的果糖-二磷酸醛缩酶会明显升高,且这种酶对神经元有保护作用。此外,碳酸酐酶家族在急性SCI后表达异常升高,考虑和脉管系统的破坏密切相关<sup>[3]</sup>。

SCI早期会出现脊髓灰质周围的出血、低灌注、微血栓形成,白质部位髓鞘肿胀。损伤刺激会导致血小板活化因子释放增多,在SCI的炎症反应和继发性损伤中发挥毒性作用<sup>[14]</sup>。肖建如等<sup>[15]</sup>按损伤程度对SCI患者进行分组及动态观察,发现各组患者的全血血小板活化因子均有不同程度升高,持续至伤后7 d,全血血小板活化因子含量增高和损伤程度呈正相关。本研究同样发现,和对照组相比,SCI患者的血小板激活代谢通路表达活跃。

急性SCI还会诱导机体的免疫细胞产生大量一氧化氮合酶,而一氧化氮被认为在继发性SCI发生机制中起着重要作用。SCI发生后一氧化氮的合成逐渐增加,至伤后12 h达到高峰<sup>[16]</sup>。本研究亦发现急性SCI后氮代谢通路异常活跃,侧面印证了上述报道。

本研究并没有发现氧化应激蛋白或轴突生长相关蛋白的表达异常,这可能和本研究选取的时间点较早(损伤后24 h之内)有关。据报道,急性SCI中重要的氧化应激蛋白之一谷胱甘肽S转移酶一般在伤后24 h出现,而与轴突生长相关的蛋白出现得更

晚一些<sup>[3, 17]</sup>。

综上,本研究通过对急性SCI患者及健康人群的血清蛋白质组学进行分析,发现急性SCI后果糖和甘露糖代谢通路、血小板激活代谢通路、黏附连接代谢通路及氮代谢通路活跃,B细胞受体信号代谢通路则受到抑制。果糖-二磷酸醛缩酶、碳酸酐酶等有望成为急性SCI潜在的分子标志物,为后续评估急性SCI病情进展及病理机制提供了一定依据。

### 参考文献

- [1] 杨泉雄,于前进,秦江,等.脊髓损伤住院患者1 027例流行病学分析[J].脊柱外科杂志,2016,14(5): 301-305.
- [2] Bollaerts I, Van Houcke J, Andries L, et al. Neuroinflammation as fuel for axonal regeneration in the injured vertebrate central nervous system[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 9478542.
- [3] 姚立炜,张超,冯世庆,等.脊髓损伤的蛋白质组学研究进展[J].中华实验外科杂志,2015,32(4): 943-944.
- [4] Yonenobu K, Abumi K, Nagata K, et al. Interobserver and intraobserver reliability of the Japanese Orthopaedic Association scoring system for evaluation of cervical compression myelopathy[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(17): 1890-1895.
- [5] 王建民,唐开.免疫炎症反应在继发性脊髓损伤中作用的研究进展[J].医学综述,2012,18(3): 350-353.
- [6] 王涛丽,顾兵,李华南,等.急性脊髓损伤后的炎症反应及其抗炎治疗[J].中国药理学通报,2015,31(4): 452-457.
- [7] Oropallo MA, Goenka R, Cancro MP. Spinal cord injury impacts B cell production, homeostasis, and activation [J]. Semin Immunol, 2014, 26(5): 421-427.
- [8] Lou D, Du Y, Huang D, et al. Traumatic brain injury alters the metabolism and facilitates Alzheimer's disease in a murine model[J]. Mol Neurobiol, 2017, 55(6): 4928-4939.
- [9] Bartnik BL, Hovda DA, Lee PW. Glucose metabolism after traumatic brain injury: estimation of pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase flux by mass isotopomer analysis[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(1): 181-194.
- [10] Brekke EM, Walls AB, Schousboe A, et al. Quantitative importance of the pentose phosphate pathway determined by incorporation of <sup>13</sup>C from [2-<sup>13</sup>C]- and [3-<sup>13</sup>C] glucose into TCA cycle intermediates and neurotransmitter amino acids in functionally intact neurons[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(9): 1788-1799.
- [11] Carpenter KL, Jalloh I, Hutchinson PJ. Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury[J]. Front Neurosci, 2015, 9: 112.
- [12] Yan X, Liu T, Yang S, et al. Proteomic profiling of the insoluble pellets of the transected rat spinal cord[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(2): 179-193.
- [13] Chen A, Sun S, Ravikumar R, et al. Differential proteomic analysis of acute contusive spinal cord injury in rats using iTRAQ reagent labeling and LC-MS/MS[J]. Neurochem Res, 2013, 38(11): 2247-2255.
- [14] 林爱华,张继平.脊髓损伤后血小板活化因子的变化及作用[J].中国脊柱脊髓杂志,2007,17(9): 719-720.
- [15] 肖建如,陆永坚,胡业丰.急性颈髓损伤患者血液三种缩血管活性介质的动态变化及其临床意义[J].中国急救医学,1998,8(1): 10-12.
- [16] Maggio DM, Singh A, Iorgulescu JB, et al. Identifying the long-term role of inducible nitric oxide synthase after contusive spinal cord injury using a transgenic mouse model[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2). pii: E245.
- [17] 高瑞,袁文,王新伟,等.绿色荧光蛋白转基因大鼠骨髓间充质干细胞在急性脊髓损伤大鼠中的迁移和分化[J].脊柱外科杂志,2015,13(5): 299-302.

(收稿日期: 2017-03-28)

(本文编辑: 于 倩)