

# 蛋白质组学在自身免疫性疾病中的应用研究进展

林晨红 管剑龙

**摘 要** 自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AIDs)是一类以免疫应答或自身免疫耐受异常为特征,累及多器官、组织的系统性疾病,发病机制尚不清楚,诊断主要依靠临床表现结合自身抗体的检测。蛋白质组学是分析蛋白质表达、功能及其在细胞、组织或生物体中相互作用的全面高通量技术,常用的方法包括二维凝胶电泳法、质谱法及蛋白质微阵列等。蛋白质组学主要在蛋白质水平上研究临床疾病的发生和发展,在 AIDs 中可用于鉴定新的自身抗原/抗体、筛选诊断相关候选蛋白、寻找疾病活动性相关蛋白、发现有效治疗靶点及评估临床疗效。

**关键词** 自身免疫性疾病 蛋白质组学 蛋白质微阵列

**中图分类号** R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.005

自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AIDs)是指累及多种器官、组织或系统的以免疫应答异常或自身免疫受损为特征的一类疾病,全球约 3% 人口罹患 AIDs<sup>[1]</sup>。目前,许多 AIDs 的发病机制仍不清楚,其诊断主要依靠临床表现结合实验室检测到一种或几种高效价的自身抗体来确定;自身抗体不仅是 AIDs 的生物标志,还参与了 AIDs 的发病机制<sup>[2]</sup>。蛋白质组学从整体上分析动态变化的蛋白质的组成、表达、修饰、调控以及蛋白质之间相互作用,是后基因组学的重要内容之一,可为疾病在蛋白质水平上发生的变化提供更全面完整的认识。近年来,越来越多的研究显示,蛋白质组学和微阵列技术可有效用于探索新的抗原、抗体以及 AIDs 疾病中的生物标志物,为 AIDs 的病因研究及诊治提供了新的思路<sup>[3, 4]</sup>。

## 一、蛋白质组学的研究内容及蛋白质微阵列

蛋白质组(proteome)的概念最先由 Marc Wilkins 提出,是指由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白。然而,不同于基因组,蛋白质组是可以在不同条件下改变的实体,并且在单个生物体的不同组织中可以是不同的<sup>[5]</sup>。蛋白质组就像每一个生理情景的快照,将这些快照连接起来便能描述细胞在分子水平的动态活动,而生命就是从静态基因组到高度动态的蛋白质组的翻译。分析蛋白质表达、功能及其在细胞、组织或生物体中相互作用的全面高通量技术即为蛋白质组学,在同一系统不同水平上蛋白质组学与基

因组学提供互补的信息;因此,蛋白质组学又称为后基因组学<sup>[6]</sup>。目前,蛋白质组学的研究主要分为 3 个领域:①用于大规模鉴定蛋白质及其翻译后修饰的蛋白质微特征;②“差异显示”蛋白质组学在广泛的疾病中有潜在应用价值;③研究蛋白质与蛋白质之间的相互作用<sup>[7]</sup>。

常用的蛋白质分离和鉴定以及描述蛋白质结构和功能的蛋白质组学方法包括二维凝胶电泳法、色谱分析法、毛细管电泳法和质谱分析法等<sup>[3]</sup>。由于可变的 mRNA 和大量的翻译后修饰,细胞蛋白质种类的数量远远超过基因的数量;此外,当细胞暴露于不同环境时,单个蛋白质的表达水平可高达 6 个数量级。因此,大规模分析蛋白质组的研究需要灵敏的高通量工具,且可检测较宽的动态范围,近 10 余年来被广泛运用的蛋白质芯片/蛋白质微阵列便是这样一种工具<sup>[7, 8]</sup>。微阵列技术允许在单个试验中同时分析数千个参数,其原理是将捕获分子的微点以行和列的形式固定在固体支持物上并暴露于含有相应结合分子的样品中,然后由基于荧光、化学发光、质谱、放射学或电化学的读出系统检测每个微点内形成的复合物;蛋白质微阵列可用于酶-底物、DNA-蛋白质和不同蛋白质-蛋白质相互作用的研究<sup>[9]</sup>。目前蛋白质微阵列分为功能性蛋白质微阵列、分析或捕获蛋白质微阵列和反相蛋白质微阵列 3 种<sup>[10]</sup>。

## 二、蛋白质组学为 AIDs 研究带来新的思路

目前,与 AIDs 相关的潜在免疫失调机制大部分仍不清楚,而自身抗原及相应抗体的多样性使得这一问题更加复杂,分析自身抗体谱是了解 AIDs 发生、发展机制的有效途径。然而,经过大量的试验探索,许

基金项目:上海卫生系统第二批重要疾病联合攻关重点项目 (2014ZYJB0010)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华东医院免疫风湿科

通讯作者:管剑龙,电子信箱:guanjianlong@medmail.com.cn

多 AIDs 的自身靶抗原仍是未知的,比如类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、银屑病等<sup>[4]</sup>。早期可用于多重分析的免疫测定方法包括酶联免疫吸附试验(ELISAs)、荧光免疫分析、免疫印迹分析(Western blot)、在微量滴定板中进行的放射免疫测定、在塑料针上合成的肽阵列以及基于噬菌斑和基于集落的分析;然而,这些技术在大量试剂和临床样品的需求上受到限制<sup>[11]</sup>。新兴的蛋白质组学技术可对个体的抗体谱进行全局变化分析,鉴定自身抗原及定位特异性自身抗体/自身抗原复合物,已逐渐成为 AIDs 研究中的重要工具<sup>[12]</sup>。蛋白质是生命活动的执行者,其多样性对应了生命现象的多样性,抗体的多样性则对应机体免疫系统的多样性,某些抗体可特异性识别蛋白质翻译后修饰的糖基化或磷酸化位点、降解产物、功能状态和构象变化。蛋白质组学从整体水平研究蛋白质的表达与调控规律,其中,蛋白质微阵列是比基因微阵列更大规模的组学研究工具,是连结蛋白质组学和基因组学的技术手段,为 AIDs 的研究带来了新的思路。

### 三、蛋白质组学在 AIDs 中的应用进展

蛋白质组学的敏感度、准确性及可重复性使其在基础研究、疾病诊断和药物研发中显示出巨大潜力,它已被应用于分析抗原与抗体、蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与脂质、蛋白质与小分子以及酶与底物之间的相互作用<sup>[3, 13]</sup>。作为研究自身免疫应答的特异性及病理生理学的强大工具,蛋白质微阵列可用于鉴定每一个患者的抗原指纹,这可能是靶向主要致病抗原的关键步骤,有望阐明在个体遗传背景下经内在因素或环境因素修饰的多种蛋白质或肽诱导某些 AIDs 的机制<sup>[4]</sup>。

首先,蛋白质组学可用于发现和鉴定新的抗原、抗体。Okunuki 等<sup>[14]</sup>用蛋白质组学技术全面比较了白塞病(Behcet's disease, BD)葡萄膜炎患者与健康对照者血清识别的视网膜自身抗原,经二维电泳法、Western blot 法及质谱法新鉴定出硒结合蛋白(SBP)为候选视网膜自身抗原,经 ELISA 及 Western blot 法检测发现抗 SBP 抗体阳性患者较抗体阴性患者更频繁发生眼炎,从而也提示对视网膜 SBP 的自身免疫可能参与 BD 葡萄膜炎发病。Hu 等<sup>[15]</sup>使用蛋白质微阵列方法识别原发性干燥综合征(primary Sjogren's syndrome, pSS)的唾液自身抗体,该手段可避免侵入性唾液腺组织活检且可能有助于 pSS 的早期诊断。骨关节炎(osteoarthritis, OA)是常见风湿性疾病之一,其诊断方法非常有限且无有效的药物可阻止其特征

性软骨退化;Henjes 等<sup>[16]</sup>使用蛋白质微阵列表征 OA、RA 及健康对照的差异自身抗体谱,确定目标候选的相关自身抗体,以期对 OA 的早期诊断、治疗监测及预后评估提供帮助。

其次,蛋白质组学可用于筛选诊断相关候选蛋白。BD 作为一种自身免疫性系统性血管炎,由于缺乏特异性诊断相关抗体诊断主要依赖于临床症状,为了探索更准确的临床诊断线索,Hu 等<sup>[17]</sup>先使用 Hu-Prot 阵列对 40 例 BD 患者、15 例 AIDs 患者[5 例大动脉炎(takayasu arteritis, TA)、5 例 ANCA 相关性血管炎(ANCA associated vasculitis, AAV)和 5 例干燥综合征(Sjogren's syndrome, SS)]以及 20 例健康受试者的血清进行分析筛选出 20 个 BD 相关候选抗原,随后用 20 个候选抗原组建成聚焦阵列,对 130 例 BD 患者、103 例 AIDs 患者(40 例大血管炎、40 例 ANCA 相关性血管炎和 23 例干燥综合征)以及 110 例健康受试者进行分析,发现 CTDPI(RNA 聚合酶 II 亚基 A C 端域磷酸酶)为 BD 特异性自身抗原,并经传统的 Western blot 法分析验证了抗 CTDPI 与 BD 的关联。Metz 等<sup>[18]</sup>使用毛细管液相色谱结合质谱分析方法鉴定出 5 种与 1 型糖尿病相关的差异表达蛋白质,为预测及诊断 1 型糖尿病的进一步研究提供新的方向。Long 等<sup>[19]</sup>曾用基于磁珠分离的血清蛋白质分析探索可区分 RA 患者与健康对照的早期生物标志物及疾病活动标志物的蛋白质组学模式,以帮助识别早期 RA 及评估疾病活动情况。李玉慧等<sup>[20]</sup>用蛋白质微阵列绘制蛋白质指纹图谱比较 pSS 患者及正常对照血清中的蛋白质差异,经分析检出血清特异性抗体阴性 pSS 的特异性蛋白标志物,并建立敏感度和特异性均较好的血清特异性抗体阴性 pSS 诊断模型。Lizuka 等<sup>[21]</sup>应用蛋白质组学分析,对比有中枢神经系统(CNS)受累的系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者和没有 CNS 受累 SLE 患者的蛋白质差异表达,鉴定出 4 种候选自身抗原的蛋白质,这 4 种抗神经元细胞抗体的候选自身抗原可能是对 SLE 累及 CNS 的重要标记。此外,人类蛋白质微阵列还为脑脊液中新型自身抗体的发现提供了一个强大的平台,神经精神系统性红斑狼疮(neuropsychiatric SLE, NPSLE)患者脑脊液中的自身抗体是 NPSLE 预测、诊断或预后的潜在生物标志, Hu 等<sup>[22]</sup>将 12 例 NPSLE、7 例非 NPSLE 和 10 例对照(非 SLE)的脑脊液样品用蛋白质微阵列进行筛选,确定了 137 个与 NPSLE 相关的自身抗原,经统计分析发现其中抗

SS-A 阳性率在 NPSLE 组显著高于非 NPSLE 组,从而推断抗 SS-A 自身抗体可能是 NPSLE 的潜在脑脊液标志物。

同时,蛋白质组学还可用于寻找疾病活动相关蛋白质。Price 等<sup>[23]</sup>构建了用于检测血清因子结合抗体的多重蛋白质微阵列,并使用微阵列检测自身抗体靶标,其中,来自 SLE 个体的血清图谱显示,与对照组对比升高的 IgG 自身抗体对 B 细胞活化因子(BAFF)的反应性与疾病相关特征的严重性相关,包括 IFN- $\alpha$  驱动的 SLE 病理。SLE 幼年患者倾向于比成年患者更具侵袭性的疾病过程,其自身抗体的检测与监测极为重要,为了寻找比血液采样侵入性更小更新颖的技术,基于血清和尿中检测到的 SLE 相关潜在抗体,Abrão 等<sup>[24]</sup>使用唾液蛋白质组学评估了 SLE 患者唾液中相关生物标志,预期可以帮助母亲患有 SLE 的儿童早期识别和监测疾病状态。罗小云等使用蛋白质组学技术鉴定 TA 急、慢性期患者及健康者差异表达蛋白,经分析发现,TA 患者血浆表达多种免疫相关蛋白和急性时相蛋白,可能用于判定疾病分期;此外,还发现补体激活、补体调节蛋白和自身抗体的产生均与 TA 的免疫病理机制相关。

此外,蛋白质组学还是寻找治疗靶点及评估疗效的新手段。AIDs 的治疗一般采用非特异性地抑制免疫系统,而蛋白质组学的发展为 AIDs 的特异性靶向治疗带来了新的机遇。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 拮抗剂可显著改善 RA 患者的临床结果,但有 20%~40% 的 RA 患者对抗 TNF- $\alpha$  的治疗没有反应,为了鉴定 RA 中 TNF- $\alpha$  拮抗剂反应的有效预测因子,Blaschke 等<sup>[25]</sup>使用二维差凝胶电泳分离和质谱法对使用依那西普治疗的 50 例 RA 患者在开始治疗前和治疗 6 个月之后的血清样品进行分析,首次鉴定和验证了 Hp- $\alpha$ 1, Hp- $\alpha$ 2, VDBP 和 ApoC-III 作为预测 RA 中依那西普药物反应的潜在生物标志物。Ho 等使用蛋白质微阵列来指导抗原特异性耐受 DNA 疫苗的开发、设计以及对这些疫苗的治疗反应,为 AIDs 提供了有希望的新治疗手段。

#### 四、展 望

目前,AIDs 的确切发病机制尚不明确,缺乏特异有效的诊断及治疗措施。蛋白质组学从组织、细胞的整体蛋白质水平出发,更全面直接地研究生命现象的发生、发展及变化,为 AIDs 的研究带来新思路。无论是二维凝胶电泳法、质谱法等早期的蛋白质组学技术,还是新兴被广泛应用的蛋白质微阵列均在 AIDs

研究中有着广阔的前景。相信随着蛋白质组学理论及技术的发展完善,蛋白质组学在 AIDs 发病机制、自身抗原抗体、疾病相关标志物、治疗靶点及疗效评估的研究等方面有望取得更多重要突破。

#### 参考文献

- Chatzantoni K, Mouzaki A. Anti-TNF- $\alpha$  antibody therapies in autoimmune diseases [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(16): 1707-1714
- Lyons R, Narain S, Nichols C, *et al.* Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1050:217-228
- Conrotto P, Souchelnyskyi S. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications [J]. *Exp Oncol*, 2008, 30(3):171-180
- Krenn V, Petersen I, Haupl T, *et al.* Array technology and proteomics in autoimmune diseases [J]. *Pathol Res Pract*, 2004, 200(2):95-103
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13:19-50
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, *et al.* Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(4):323-333
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J]. *Nature*, 2000, 405(6788):837-846
- Gordus A, MacBeath G. Circumventing the problems caused by protein diversity in microarrays: implications for protein interaction networks [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(42):13668-13669
- Templin MF, Stoll D, Schrenk M, *et al.* Protein microarray technology [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(15):815-822
- Stoevesandt O, Taussig MJ, He M. Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(2):145-157
- Hueber W, Utz PJ, Steinman L, *et al.* Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(5):290-295
- Machour N, Gilbert D, Vittecoq O, *et al.* Proteomics and autoantibody [J]. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21(8-9):759-764
- Zhu H, Snyder M. Protein chip technology [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(1):55-63
- Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, *et al.* Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(5):823-831
- Hu S, Vissink A, Arellano M, *et al.* Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjogren's syndrome using protein microarrays [J]. *Proteomics*, 2011, 11(8):1499-1507
- Henjes F, Lourido L, Ruiz-Romero C, *et al.* Analysis of autoantibody profiles in osteoarthritis using comprehensive protein array concepts [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(11):5218-5229

(下转第 75 页)

入, 这样一方面可以减低患者的饥饿感, 提高患者的耐受性; 另一方面复合型膳食的升糖指数相对较低, 有利于维持餐后血糖的平稳。同时个体化的饮食治疗可以更好地改善超重及肥胖的 T2DM 患者的血脂水平, 这一结论在毕鑫等<sup>[12]</sup>的研究中也得到了证实, 适量膳食纤维食物的增加可以促进 TG 及 TC 的排泄来降低血脂水平, 而血脂水平的改善也能改善糖尿病患者的胰岛素抵抗, 从而降低患者的血糖水平。

另外在本研究中, 与对照组比较, 碳水化合物膳食干预组显著降低了超重及肥胖的 T2DM 患者的住院费用及空腹血糖的达标率, 更好地节约了医疗资源, 减轻了患者的医疗负担, 具有较好的社会意义。标准化膳食干预后, 患者的超重、肥胖程度以及胰岛抵抗较未干预组有了较好的改善; 另外, 饮食中精确地限制碳水化合物的摄入量也可以减少糖尿病及其他疾病药物的用量, 可以较为快捷地调整血糖、加速住院期间血糖的达标<sup>[13]</sup>。但与已有的某些研究相比, 笔者并不能得出干预组缩短了住院时间。这一结论可能受样本量、本次干预人群特殊性(干预人群平均年龄偏大)以及样本的代表性等因素的影响。本研究的目标人群为全住院患者, 并不能代表全人群, 需在后期补充大样本全人群的社区干预再行验证, 从而为研究结论更合理地推广应用提供有力支持。

综上所述, 本研究通过精确的碳水化合物交换法饮食干预可以很好地改善超重及肥胖的 T2DM 患者的血糖、血脂及体重指数, 并能降低住院医疗费用, 对糖尿病患者的院内治疗, 出院的自我管理及血糖监测具有很重要的现实意义, 同时还能减轻患者的经济负担, 具有远期的社会意义。

(上接第 15 页)

- 17 Hu C, Pan J, Song G, *et al.* Identification of novel biomarkers for bhect disease diagnosis using human proteome microarray approach [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(2):147-156
- 18 Metz TO, Qian WJ, Jacobs JM, *et al.* Application of proteomics in the discovery of candidate protein biomarkers in a diabetes autoantibody standardization program sample subset [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(2):698-707
- 19 Long L, Li R, Li Y, *et al.* Pattern-based diagnosis and screening of differentially expressed serum proteins for rheumatoid arthritis by proteomic fingerprinting [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(8):1069-1074
- 20 李玉慧, 孙晓麟, 朱雷, 等. 利用蛋白质组学技术筛选干燥综合征血清特异性标志物[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2014, (3):220-223
- 21 Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, *et al.* Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nervous

## 参考文献

- 1 司宝立. 饮食干预对肥胖糖尿病患者的影响[J]. *河南预防医学杂志*, 2011, 22(2): 125-126
- 2 郭炬旋, 朱凯星, 庄晓霞, 等. 2010 年广州市海珠区 15 岁及以上居民糖尿病流行特征及危险因素分析[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2014, 22(6): 697-670
- 3 刘锐, 徐保锋, 周灵利, 等. 2 型糖尿病患者应用磺脲类药物与脑中风风险性的 meta 分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2015, 31(9): 758-764
- 4 孙学丽, 齐玉梅, 韩明明等. 2 型糖尿病患者的营养治疗[J]. *中国热带医学*, 2010, 10:1424-1425
- 5 罗曦娟, 王正珍, 朱玲, 等. 糖尿病前期人群的运动处方: 设计与实施[J]. *北京体育大学学报*, 2014, 37(11): 62-64
- 6 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(7): 447-498
- 7 中国超重/肥胖医学营养治疗专家共识编写委员会. 中国超重/肥胖医学营养治疗专家共识(2016 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2016, 8(9): 525-540
- 8 Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity [J]. *Obesity Rev*, 2011, 12(2): 131-141
- 9 Lindstorm J, Louheranta A, Mannelin M, *et al.* The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year Results on diet and physical activity [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(12): 3230-3236
- 10 Bao W, Li S, Chavarro JE, *et al.* Low carbohydrate-diet scores and long-term risk of type 2 diabetes among women with a history of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(1): 43-49
- 11 Bazzano LA, Hu T, Reynolds K, *et al.* Effects of low-carbohydrate and low-fat diets: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2014, 161(5): 309-318
- 12 毕鑫, 洪忠新. 两种处方饮食对 2 型糖尿病患者的血脂及胰岛抵抗的影响[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(1B): 133-135
- 13 梁琳琅. 餐后高血糖病理机制及管理策略[J]. *中华糖尿病杂志*, 2016, 8(3): 190-192

(收稿日期: 2017-01-16)

(修回日期: 2017-03-07)

system involvement [J]. *Lupus*, 2010, 19(6):717-726

- 22 Hu C, Huang W, Chen H, *et al.* Autoantibody profiling on human proteome microarray for biomarker discovery in cerebrospinal fluid and sera of neuropsychiatric lupus [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126643
- 23 Price JV, Haddon DJ, Kemmer D, *et al.* Protein microarray analysis reveals BAFF-binding autoantibodies in systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12):5135-5145
- 24 Abrão AL, Falcão DP, de Amorim RF, *et al.* Salivary proteomics: A new adjuvant approach to the early diagnosis of familial juvenile systemic lupus erythematosus [J]. *Med Hypotheses*, 2016, 89:97-100
- 25 Blaschke S, Rinke K, Maring M, *et al.* Haptoglobin-alpha1, -alpha2, vitamin D-binding protein and apolipoprotein C-III as predictors of etanercept drug response in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17:45

(收稿日期: 2017-02-24)

(修回日期: 2017-03-14)