

蛋白质组学在系统性血管炎中的研究进展

蔡昕添 吴 婷 李南方

摘 要 系统性血管炎是一组以血管炎性反应和破坏为主要病理变化的自身免疫性疾病。由于血管炎受累部位和类型的不同,其临床表现相当广泛,且缺少特异性生物学标志物,这都给临床诊断及治疗带来了巨大的困难。因此,寻找新型诊断及评估病情变化的特异性生物学标志物,以期及早制定出更好的治疗方案,是临床急需解决的问题。近年来,随着蛋白质组学研究的深入,为探讨系统性血管炎的发病机制及筛选特异性生物学标志物提供良好的技术支持,从而为系统性血管炎的早期诊断、病情评估及治疗提供更好的帮助。本文就蛋白质组学在系统性血管炎中的研究进展做一综述。

关键词 蛋白质组学 系统性血管炎 生物学标志物

中图分类号 R593

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.040

系统性血管炎是一组原因不明的、以血管壁和(或)管壁周围组织炎症和坏死为基本病理改变的结缔组织疾病,根据受累血管类型、位置、病理特征等情况的不同,可导致相应的组织和器官出现缺血的表现,临床上常表现为皮肤破坏、多部位关节炎甚至多脏器衰竭。目前,系统性血管炎的诊断主要依靠患者的临床表现、影像学检查、病理活检、动脉造影以及结合实验室检查检测到的一种或多种自身抗体来确定^[1]。然而,目前临床常用的诊断方法其效率与准确率均不高且存在一定的局限性。生物学标志物虽早已应用于临床之中,且为非侵入性检查,对患者伤害小,可反复进行。但目前仅少数生物学标志物可用于系统性血管炎的诊断,如抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)对于ANCA相关性血管炎(ANCA-associated vasculitis, AAV)的诊断具有重要临床价值,但对于病情评估尚存争议;如红细胞沉降率和C反应蛋白等炎性生物学标志物,但其特异性较差,无法区分血管炎与感染^[2]。这些标志物或许有助于系统性血管炎的诊断,但对疾病活动与复发的评估价值并不大。因此,寻找新型诊断及评估病情变化的特异性生物学标志物,以期更早制定出新型的治疗方案,提高系统性血

管炎患者生存率和生活质量,是临床亟待解决的重大问题。

蛋白质组学作为一门新兴的科学技术,已受到众多学科的广泛关注,成为当下的研究热点。目前,蛋白质组学技术广泛应用于肿瘤、心血管疾病及自身免疫性疾病的研究之中,对深入探究疾病发生、发展机制、早期筛查与诊断、个性化治疗、预后评估都有着极其重大的意义^[3]。它的发展完善为系统性血管炎的研究带来了全新的思维模式,开拓出全新的研究领域,对探讨系统性血管炎发病机制、早期诊断和治疗及改善预后具有重大意义^[4]。本文通过查阅国内外相关文献对蛋白质组学及其在系统性血管炎,尤其是在巨细胞动脉炎、川崎病、ANCA相关性血管炎、白塞病、过敏性紫癜中的研究进展做一综述。

一、蛋白质组学

蛋白质组学是应用多技术对特定生物液体、细胞或组织内所表达的全部蛋白质进行鉴定,并分析其表达水平及修饰状态,研究其结构、功能以及相互作用。通过蛋白质组学技术的研究,不仅能了解疾病发展的物质基础,还能为疾病机制的阐述及疾病的攻克提供可靠的理论依据和有效的解决途径。

二、蛋白质组学技术在系统性血管炎中的应用

1. 巨细胞动脉炎:巨细胞动脉炎(giant cell arteritis, GCA)是一种肉芽肿性大血管炎,常影响主动脉及其主要分支,尤其是颞动脉。其临床表现可因受累部位不同而表现复杂,甚至出现失明等严重并发症。因此,早诊和早治是预防这种疾病发生不可逆损害的关键^[5]。Alexis等^[6]采用2-DE联合MS技术将GCA患者颞动脉活检分离得到的血管平滑肌细胞(vessel

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金青年科学基金资助项目(2018D01C117)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院高血压诊疗研究中心、新疆高血压研究所、国家卫生健康委员会高血压诊疗研究重点实验室

通讯作者:李南方,教授,博士生导师,电子信箱:lnanfang2016@sina.com

smooth muscle cells, VSMCs) 与来自健康对照组的 VSMCs 进行差异蛋白质分析, 结果发现 26 种差异蛋白, 其中内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 被认为是 GCA 中 VSMCs 增殖的关键激活物, 这也再次证实此前 Planas-Rigol 等^[7] 所得出的结论: ET-1 在 GCA 血管病变中显著上调, 并通过促进 VSMCs 向内膜层迁移, 进一步加重 GCA 中血管内膜增生和血管闭塞情况。以上研究表明 ET-1 等蛋白质对于 GCA 的诊断及病情预后判断可能具有较大的提示价值。ET-1 是内皮素家族的成员之一, 内皮素家族成员 (主要包括 ET-1、ET-2 和 ET-3) 都是由 21 个氨基酸组成的活性多肽, 是目前已知最强的缩血管物质之一, 参与多种疾病的病理生理过程。而 ET-1 是唯一存在于内皮细胞的内皮素, 除有收缩血管作用外, 还可介导血管内皮损伤及刺激血管平滑肌细胞增殖。近年来多项研究表明其参与了多种系统性血管炎发病机制^[8]。然而, 其特异性与敏感度仍有待于进一步开展大样本队列研究予以证实。

2. 川崎病: 川崎病 (kawasaki disease, KD) 是一种婴幼儿时期常见的急性系统性血管炎。它主要累及中、小血管, 并可导致一系列心血管系统的严重并发症^[9]。为寻找诊断 KD 的新型生物学标志物, Alex 等^[10] 运用蛋白质组学技术分析了 KD 患者与高度怀疑 KD 但最终证实为其他发热性疾病患者的血清和尿液, 发现两种免疫调节相关分子仅在 KD 患者尿液中高表达, 包括金属蛋白酶 Meprin A 和细丝蛋白 C。更有意义的是, 研究者利用前瞻性盲法研究验证了这两个指标, 最终在不同队列中再次证实 KD 患者血清与尿液中 Meprin A 和细丝蛋白 C 水平显著高于对照组。并且与目前常用的实验室检查比较, 这两种标志物对于症状不典型 KD 均表现出更为优异的诊断效能。此外, Yayoi 等^[11] 采用 LC-MS/MS 技术比较了急性期与恢复期 KD 患者的血清蛋白质, 结果显示急性期患者血清中 LBP、LRG1 和 AGT 的表达水平显著高于恢复期患者, 而急性期患者血清中 RBP4 的表达水平则明显低于恢复期患者。这提示以上蛋白可作为预测 KD 活动性的潜在生物学标志物。目前, 临床上 KD 治疗最常用、最有效的方案仍为口服阿司匹林和大剂量静脉注射丙种球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 联合^[12]。然而 IVIG 存在众多不良反应, 甚至是致命性的不良反应, 如急性肾衰竭和血栓栓塞, 所以评估该方案是否利大于弊是极为必要的^[13]。Zhang 等^[14] 采用 2-DE 和 MALDI-TOF/

TOF-MS 对 IVIG 治疗前后的患者血清进行蛋白质差异表达分析, 共鉴定出 29 种差异表达的蛋白质, 其中最有价值的蛋白质是转甲状腺素蛋白 (transthyretin, TTR)。KD 患者的 TTR 水平显著高于健康对照组, 且 IVIG 治疗起效后, TTR 可恢复到正常水平, 但在 IVIG 治疗无效的患者中 TTR 并没有这种变化, 这或许可作为评估 KD 患者 IVIG 疗效有无的潜在指标。

3. ANCA 相关性血管炎: AAV 是一系列以坏死性炎性反应为特征的小血管炎。ANCA 是目前诊断 AAV 最常检测的血清标志物, 但并非所有 AAV 患者都能检测到 ANCA, 且 ANCA 的血清水平并不总能准确反映 AAV 的活动度^[15]。因此, 需要寻找更多的生物学标志物用于 AAV 的诊断及其活动度的评估。此外, 因 AAV 常同时累及多脏器, 所以发掘能反映特异性器官损伤的生物学标志物也尤为重要。Régent 等^[16] 采用 ¹³C/¹⁵N 标记结合 LC-MS/MS 的方法对健康者和 AAV 患者治疗前 (活动期) 与治疗 (缓解期) 的血清进行蛋白质差异表达分析, 共鉴定出多种差异有统计学意义的表达蛋白质。并在另一更大样本量的 AAV 患者队列中对以上蛋白质进行了敏感度与特异性的分析鉴定, 最终选定组织金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 为监测 AAV 活动的最佳生物学标志物, 这一结论也证实了 Bjerkeli 等^[17] 的研究结果, 活动期 GPA 的 TIMP-1 水平显著高于非活动期与健康对照组。

Rani 等^[18] 采用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 分析了 GPA 活动期患者、缓解期患者以及健康对照 3 组间血清中的差异表达蛋白质。研究结果显示与缓解期及健康对照组比较, 活动期患者血清中发现了多种差异表达蛋白质。其中触珠蛋白可能是反映 GPA 疾病活动最重要的标志物。维生素 D 结合蛋白、CD91 和 IL-17 可用于活动期与肾损伤的监测。以上几种蛋白质均可用于诊断和预后判断, 但其实际的临床价值仍有待于进一步评估。

4. 白塞病: 白塞病 (Behcet's disease, BD) 是一种变异性血管炎, 可累及全身各处血管, 当累及中枢系统、泌尿系统等重要脏器时常致死致残。为应对这一挑战, Hu 等^[19] 利用血清标本, 采用了 Hu-Prot 技术分别分析了 BD、大动脉炎、ANCA 相关性血管炎、干燥综合征和健康受试者中差异表达的蛋白质, 并通过更大样本量的队列进行了验证, 发现抗-CTDP1 抗体在 BD 患者中的表达明显高于疾病对照组和健康对照组。此外, Cheng 等^[20] 通过 LC-MS/MS 分析了

BD 患者血清同其他风湿免疫性疾病、健康对照之间差异表达的蛋白质,从 BD 外周血循环免疫复合物中鉴定出多种自身抗原。并针对自身抗原微管蛋白 - α - 1c 的自身抗体进行了进一步的研究,发现它在 BD 中表达显著增高,这或许是一种全新的 BD 诊断标志物。研究者还发现抗微管蛋白 - α - 1c 自身抗体与深静脉血栓形成等并发症密切相关,而且其血清水平与 BD 活动度呈正相关。但研究者尚不清楚是抗微管蛋白 - α - 1c 抗体导致了内皮细胞损伤及局部血管炎性反应,还是血管炎性反应诱导产生了抗微管蛋白 - α - 1c 抗体。所以有必要进一步研究微管蛋白 - α - 1c 及其自身抗体在 BD 中的发病机制。

5. 过敏性紫癜:过敏性紫癜(henoch - schonlein purpura, HSP)是一种由 IgA 介导的小血管炎,又名 IgA 血管炎(IgA - vasculitis, IgAV),通常涉及皮肤、关节、胃肠道以及肾脏,其中肾脏受累者(IgA vasculitis with nephritis, IgAVN)预后往往极差。目前为止,尚无明确的实验室检查能用于确诊 HSP^[21-23]。孙秀坤等^[21]通过 CM10 芯片结合 SELDI - TOF - MS 技术,分析了 HSP 伴发肾炎患者与 HSP 不伴肾炎患者尿液中的差异表达蛋白质谱,并利用 SVM 算法建立由多个标记蛋白构成的 IgAVN 的早期诊断模型,这些标记蛋白能在尿检发现隐血、尿蛋白之前即可测得,这为 IgAVN 的早期诊断提供了可能。当然该模型的稳定性与可重复性仍有待于不同队列的进一步验证。

He 等^[22]纳米级超高效液相色谱 - 质谱(nano LC - MS/MS)研究了 IgAV、IgAVN 和健康受试者之间在血清中差异表达的蛋白质,并通过 ELISA 进一步验证了其中丰度差异较大的蛋白质,如血管紧张素原和激肽原 - 1 等。最终,研究者发现血清中血管紧张素原浓度与 IgAVN 发病密切相关,且其可作为判断 IgAV 预后的潜在标志物。Mao 等^[23]研究也发现尿血管紧张素原浓度可用作判断 IgAV 肾脏受累严重程度的潜在生物学标志物,并认为尿血管紧张素原水平的升高很可能直接参与了 IgAV 急性期肾损害的疾病进展。研究者还推测阻断尿血管紧张素原的生成可能是治疗重症 IgAV 肾脏受累的一种有效方法。

三、展 望

由于系统性血管炎治疗难度大且预后较差,因此尽早诊断是改善系统性血管炎患者预后的关键。鉴于目前系统性血管炎早期检测手段的局限性,研究者一直在找寻其敏感度及特异性更高的早期诊断标志物。近年来,蛋白质组学的飞速发展对系统性血管炎

的研究提供了全新思路。为揭示系统性血管炎发病机制及寻找早期诊断、疗效评价和预后评估的可靠生物学标志物提供了极大的便利。但蛋白质组学技术在系统性血管炎的研究中仍存在无法回避的缺陷,如目前已发现的生物学标志物仍面临难以大规模应用于临床实践、检验检测流程仍未制定出标准化的规范和后期质控标准存在较大差异等困境。即便如此,随着蛋白质组学理论研究的持续深入、系统性血管炎中蛋白质组学数据不断积累以及实际实验操作流程的逐步改进,这必将带动系统性血管炎相关研究更进一步地发展。

参考文献

- Crnogorac M, Horvatic I, Kacinari P, *et al.* Serum C3 complement levels in ANCA associated vasculitis at diagnosis is a predictor of patient and renal outcome[J]. J Nephrol, 2018, 31(2): 257 - 262
- Hatemi G, Esatoglu SN, Yazici Y. Biomarkers in vasculitis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2018, 30(1): 30 - 35
- Elefante E, Bond M, Monti S, *et al.* One year in review 2018: systemic vasculitis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2018, 36:13 - 27
- Ebhardt HA, Root A, Sander C, *et al.* Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine[J]. Proteomics, 2015, 15(18): 3193 - 3208
- Prior JA, Ranjbar H, Belcher J, *et al.* Diagnostic delay for giant cell arteritis - a systematic review and meta - analysis[J]. BMC Med, 2017, 15(1): 120
- Régent A, Ly KH, Groh M, *et al.* Molecular analysis of vascular smooth muscle cells from patients with giant cell arteritis: targeting endothelin - 1 receptor to control proliferation[J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(4): 398 - 406
- Planas - Rigol E, Terrades - Garcia N, Corbera - Bellalta M, *et al.* Endothelin - 1 promotes vascular smooth muscle cell migration across the artery wall: a mechanism contributing to vascular remodelling and intimal hyperplasia in giant - cell arteritis[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(9): 1624 - 1634
- Wang C, Chang DY, Chen M, *et al.* HMGB1 contributes to glomerular endothelial cell injury in ANCA - associated vasculitis through enhancing endothelium - neutrophil interactions[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(7): 1351 - 1360
- Kumar PR, Dharmagat B, Surjit S. Controversies in diagnosis and management of Kawasaki disease[J]. World J Clin Pediatr, 2018, 7(1): 27 - 35
- Kentsis A, Shulman A, Ahmed S, *et al.* Urine proteomics for discovery of improved diagnostic markers of Kawasaki disease[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(2): 210 - 220
- Kimura Y, Yanagimachi M, Ino Y, *et al.* Identification of candidate diagnostic serum biomarkers for Kawasaki disease using proteomic analysis[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43732
- Qiu H, He Y, Rong X, *et al.* Delayed intravenous immunoglobulin treatment increased the risk of coronary artery lesions in children with Kawasaki disease at different status[J]. Postgraduate Med, 2018, 130(4): 442

(转第 176 页)

报告基因实验 Western blot 法检测证实 miR - 214 - 5p 靶向负调控 MFGE8 表达,过表达 MFGE8 则反转 IFN - α 对血管外膜成纤维细胞的增殖抑制和凋亡促进作用。进一步研究显示,干扰 MFGE8 表达反转抑制 miR - 214 - 5p 表达对 IFN - α 诱导的人脑血管外膜成纤维细胞增殖和凋亡的作用。以上研究说明 IFN - α 对人脑血管外膜成纤维细胞增殖抑制和凋亡促进作用与调控 miR - 214 - 5p/MFGE8 通路有关。

综上所述,IFN - α 通过调控 miR - 214 - 5p/MFGE8 通路抑制人脑血管外膜成纤维细胞增殖,促进细胞凋亡。本研究为 IFN - α 在血管增生性疾病治疗中的应用奠定理论基础,miR - 214 - 5p/MFGE8 有望成为血管增生性疾病的潜在治疗靶点。

参考文献

- 1 王敏,曹秉振. 血管外膜成纤维细胞与血管病变的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13(12): 1288 - 1291
- 2 黄晶,宋方,龙向淑,等. IFN - α 通过 IFI16 抑制人脑血管外膜成纤维细胞增殖并促进细胞凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 494 - 497
- 3 赵宁,杨磊磊,彭夫松,等. 冠心病患者血浆中 miR - 210 和 miR - 214 及基质细胞衍生因子 - 1 α 变化与冠状动脉侧支循环形成的相关性研究[J]. 中国心血管病研究, 2019, 17(5): 426 - 430
- 4 吴德琳,刘宇娜,郑思道. 心血管疾病运动康复新机制: microRNA 的调控[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(21): 2786 - 2789
- 5 张莉,刘晟,黄毅,等. 脂肪球表皮生长因子 VIII 在血管衰老和血管疾病重塑中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(3): 261 - 264
- 6 George PM, Badiger R, Alazawi W, *et al.* Pharmacology and therapeutic potential of interferons[J]. Pharmacol Ther, 2012, 135(1): 44 - 53
- 7 龙向淑,吴强,宋方,等. 干扰素 α 通过 IFI16 和 P21 影响人血管内皮细胞凋亡[J]. 重庆医学, 2015, 44(34): 4759 - 4761

- 8 龙向淑,吴强,宋方. 干扰素诱导蛋白 16 对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 中华高血压杂志, 2013, 21(1): 29 - 33
- 9 龙向淑,宋方,黄晶,等. 干扰素 - α 抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(8): 1106 - 1107
- 10 龙向淑,吴强,宋方,等. 干扰素诱导蛋白 p204 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(6): 1018 - 1022
- 11 黄晶,宋方,龙向淑,等. α 干扰素对人脑血管成纤维细胞增殖、凋亡与迁移的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2013, 29(12): 952 - 955
- 12 Zhang M, Wang D, Zhu T, *et al.* miR - 214 - 5p targets ROCK1 and suppresses proliferation and invasion of human osteosarcoma cells[J]. Oncol Res, 2017, 25(1): 75 - 81
- 13 Li H, Wang H, Ren Z. MicroRNA - 214 - 5p inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by targeting wiskott - Aldrich syndrome like[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 757 - 764
- 14 Cao TH, Ling X, Chen C, *et al.* Role of miR - 214 - 5p in the migration and invasion of pancreatic cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7214 - 7221
- 15 Lu HQ, Liang C, He ZQ, *et al.* Circulating miR - 214 is associated with the severity of coronary artery disease[J]. J Geriatr Cardiol, 2013, 10(1): 34 - 38
- 16 Afzal TA, Luong LA, Chen D, *et al.* NCK associated protein 1 modulated by miRNA - 214 determines vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and neointima hyperplasia[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(12): e004629
- 17 Yang T, Zhang GF, Chen XF, *et al.* MicroRNA - 214 provokes cardiac hypertrophy via repression of EZH2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(4): 578 - 584
- 18 Soubeyrand S, Nikpay M, Turner A, *et al.* Regulation of MFGE8 by the intergenic coronary artery disease locus on 15q26.1[J]. Atherosclerosis, 2019, 284: 11 - 17
- 19 张世阳,徐修才,焦莉莉,等. 根皮苷对糖基化低密度脂蛋白诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞表达脂肪球表皮生长因子 8 的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2017, 20(4): 430 - 434

(收稿日期:2019 - 10 - 16)

(修回日期:2019 - 10 - 29)

(接第 184 页)

- 13 Mccrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, *et al.* Diagnosis, treatment, and long - term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American heart association[J]. Circulation, 2017, 135(17): e927 - e999
- 14 Zhang L, Jia HL, Huang WM, *et al.* Monitoring of the serum proteome in Kawasaki disease patients before and after immunoglobulin therapy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 447(1): 19 - 25
- 15 Gapud EJ, Seo P, Antiochos B. ANCA - associated vasculitis pathogenesis: a commentary[J]. Curr Rheumatol Rep, 2017, 19(4): 15
- 16 Régent A, Lofek S, Dib H, *et al.* Identification of target antigens of anti - endothelial cell antibodies in patients with anti - neutrophil cytoplasmic antibody - associated vasculitides: a proteomic approach[J]. Clin Immunol, 2014, 153(1): 123 - 135
- 17 Bjerkeli V, Halvorsen B, Damås JK, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in patients with Wegener's granulomatosis[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(12): 1659 - 1663
- 18 Rani L, Minz RW, Arora A, *et al.* Serum proteomic profiling in granulomatosis with polyangiitis using two - dimensional gel electro-

phoresis along with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(8): 910 - 919

- 19 Hu CJ, Pan JB, Song G, *et al.* Identification of novel biomarkers for Behcet disease diagnosis using human proteome microarray approach[J]. Mol Cell Proteomics: MCP, 2017, 16(2): 147 - 156
- 20 Cheng Y, Zhao X, Chen Y, *et al.* Circulating immune complexome analysis identified anti - tubulin - α - 1c as an inflammation associated autoantibody with promising diagnostic value for Behcet's disease[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0199047
- 21 孙秀坤,唐旭,沈宏,等. 尿蛋白组学筛选检测过敏性紫癜患者的肾损害[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 1: 52 - 53
- 22 He X, Yin W, Ding Y, *et al.* Higher serum angiotensinogen is an indicator of IgA vasculitis with nephritis revealed by comparative proteomes analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130536
- 23 Mao YN, Liu W, Li YG, *et al.* Urinary angiotensinogen levels in relation to renal involvement of Henoch - Schonlein purpura in children[J]. Nephrology, 2012, 17(1): 53 - 57

(收稿日期:2019 - 08 - 12)

(修回日期:2019 - 09 - 24)