

- [12] Benemei S, De CF, Fusi C, et al. TRPA1 and other TRP channels in migraine [J]. J Headache Pain, 2013, 14 (1): 71.
- [13] Boyer N, Dallel R, Artola A, et al. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression [J]. Pain, 2014, 155 (7): 1196.
- [14] Nosedà R, Burstein R. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain [J]. Pain, 2013, 154 (6): S44-S53.
- [15] Silberstein SD, Edvinsson L. Is CGRP a marker for chronic migraine? [J]. Neurology, 2013, 81 (14): 1184-1185.
- [16] Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Alvarez R, et al. Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine [J]. Cephalalgia, 2015, 35 (4): 310-316.
- [17] Boyer N, Dallel R, Artola A, et al. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression [J]. Pain, 2014, 155 (7): 1196.
- [18] Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Cardena E, et al. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia [J]. Ann Neurol, 2010, 68 (1): 81-91.
- [19] Lai KL, Niddam DM, Fuh JL, et al. Flunarizine versus topiramate for chronic migraine prophylaxis: a randomized trial [J]. Acta Neurol Scand, 2017, 135 (4): 476-483.
- [20] Becerra L, Bishop J, Barnett G, et al. Triptans Disrupt Brain Networks and Promote Stress-induced CSD-like Responses in Cortical and Subcortical Areas [J]. J Neurophysiol, 2016, 115 (1): 208-217.
- [21] Johnson JL, Hutchinson MR, Williams DB, et al. Medication-overuse headache and opioid-induced hyperalgesia: A review of mechanisms, a neuroimmune hypothesis and a novel approach to treatment [J]. 2012, 33 (1): 52-64.
- [22] Munksgaard SB, Bendtsen L, Jensen RH. Modulation of central sensitisation by detoxification in MOH: results of a 12-month detoxification study [J]. Cephalalgia, 2013, 33 (7): 444.

## 特发性炎性肌病的蛋白组学研究进展

王慧芳<sup>1,2</sup> 综述 蒲传强<sup>1</sup> 审校

1. 解放军总医院神经内科,北京市 100853

2. 山西医科大学第一医院神经内科,山西省太原市 030001

**摘要:**特发性炎性肌病主要包括皮肤炎、多发性肌炎和散发性包涵体肌炎,该类肌病发病机制未明确,用于临床诊断的特异性抗体缺乏。使用蛋白组学研究数据虽然较少,但有所发现。皮肤炎主要与氧化应激相关蛋白有关,多发性肌炎多与炎症、线粒体功能障碍和氧化磷酸化通路异常相关,而散发性包涵体肌炎不仅与氧化应激、线粒体功能障碍、炎症相关,还与变性相关。本文就蛋白质组学在特发性炎性肌病目前的研究做一综述。

**关键词:**蛋白组学;特发性炎性肌病;皮肤炎;多发性肌炎

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.02.022

特发性炎性肌病是一组免疫介导的非化脓性炎性骨骼肌肉疾病,其发病机制主要与免疫因子相关。长期以来人们在研究其发病机制中发现,参与

特发性炎性肌病的免疫物质多为蛋白质样物质,而对这些免疫性相关的蛋白样物质的深入研究极少。近年来,蛋白组学的研究及其技术的广泛应用在蓬

收稿日期:2017-02-08;修回日期:2017-04-19

作者简介:王慧芳(1980-),女,主治医师,在读博士研究生,主要从事神经肌肉病方面的研究。

通讯作者:蒲传强(1958-),男,主任医师,医学博士,博士研究生导师,主要从事神经肌肉病方面的研究。

勃发展,尤其是采用蛋白组学技术应用于特发性炎症性肌病的研究,以寻找可能的重要相关蛋白质,而且有了可喜的进展。

## 1 蛋白组学技术

蛋白组学方法分两大类,即凝胶蛋白组学技术和无凝胶蛋白组学技术。

### 1.1 凝胶蛋白组学技术

凝胶蛋白组学技术主要为二维凝胶电泳分离后质谱分析技术<sup>[1,2]</sup>。二维凝胶电泳分离后质谱分析技术主要用于分析非疏水性蛋白质及含有中等分子量的蛋白质。但是,由于检测蛋白的数量较为局限,二维凝胶电泳分离后质谱分析技术的使用越来越少。

### 1.2 无凝胶蛋白组学技术

无凝胶蛋白组学技术包括同位素标记及无同位素标记的定量蛋白组学技术。

同位素标记的定量蛋白质组学技术包括:氨基酸稳定同位素标记物技术、同位素编码的亲标记物技术以及相对和绝对定量等压标记物技术等。氨基酸稳定同位素标记物技术<sup>[3]</sup>主要用于细胞培养物中蛋白质的分析。同位素编码的亲标记物技术<sup>[4]</sup>主要用于分析难以处理的特殊蛋白质如:膜蛋白,高度酸性或碱性蛋白,低丰度蛋白,高分子量蛋白鉴定和定量半胱氨酸硫醇的氧化性蛋白质<sup>[5]</sup>。相对和绝对定量等压标记物技术的创建是同位素标记定量蛋白质组学的一个重大突破<sup>[6]</sup>,其用于检测翻译后修饰蛋白质<sup>[2]</sup>,但同样也有其局限性,即容易受到标记过程的影响。

无同位素标记的定量蛋白组学技术是目前最新的一门技术,其中 SWATH-质谱技术<sup>[7]</sup>已作为无标记的定量蛋白组学技术的代表性技术被推广开来,具有高通量、高灵敏度、高重复性等特点,主要用于分析复杂蛋白质的生物样品,已被用于许多大规模生物标志物的开发和研究<sup>[8]</sup>。

## 2 皮肤炎的蛋白组学研究

Passadore 等<sup>[9]</sup>采用二维电泳质谱分析方法,对多肌炎 (polymyositis, PM)/皮肤炎 (dermatomyositis, DM) 患者肺泡灌洗液中的差异蛋白进行分析,发现细胞骨架和组织结构蛋白共 12 个 (过氧化氢酶 I、烯醇酶 I、波形蛋白、KIAA1538 蛋白和肌强直性肌营养不良激酶等),这些蛋白参与肌动蛋白细胞骨架的重建、肌肉组织的退行性变及再生。在特发性炎症性肌病的病理机制中,目前的观点认为,组织结

构蛋白是骨骼肌炎症病理损害过程中最主要的候选参与者,而在此研究中有 7 个蛋白与细胞骨架的形成密切相关,然而进一步的研究缺乏。研究还发现与氧化应激相关的特异性蛋白有 4 种 (过氧化物酶 I、辅酶 Q10、D3 羟基丁酸脱氢酶和  $\beta$  球蛋白),可能通过促使蛋白质功能的丧失、干扰细胞周期及细胞氧化还原电位不平衡来发挥作用。

Salajegheh 等<sup>[10]</sup>选取 4 例 DM 患者,采用液相色谱串联质谱分析方法同时结合基因芯片技术,分析 DM 患者肌肉组织束周萎缩中相关的表达蛋白,发现干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15)、黏病毒抗性蛋白 1 (myxovirus resistance A, MxA)、干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, IFIT1) 及干扰素诱导蛋白 3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3, IFIT3) 在束周萎缩的患者中表达升高。ISG15 是泛素化修饰中较为重要的表达蛋白,由 I 型干扰素诱导刺激产生,可以修饰结合其他蛋白,推测 DM 肌细胞的成熟需要 ISG15 与其他蛋白协同完成,其损伤可能与细胞内 ISG15 产物不平衡有关。束周萎缩是 DM 肌肉病理的特征性表现,以往研究认为束周萎缩病理机制可能与局灶缺血有关。已有报道,ISG15 在系统性红斑狼疮肾脏及皮肤的缺血组织中均有表达升高,本次研究在束周萎缩的肌细胞中发现并通过免疫组织化学染色证实 ISG15 在 DM 束周萎缩缺血细胞中表达升高,其余 3 种蛋白也有不同程度的升高,推测 ISG15 及其相关的结合蛋白可能在 DM 束周萎缩的形成过程中发挥着重要的作用。

O' Hanlon 等<sup>[11]</sup>选取 10 例系统性自身免疫性疾病双胞胎患者 (4 例为系统性红斑狼疮、4 例幼年特发性关节炎患者及 2 例青少年 DM),10 例非双胞胎患者和 10 例正常对照,采用一维反向液相色谱质谱分析方法对血浆标本进行蛋白组学分析,发现:① $\alpha$ 1 微球蛋白、纤维蛋白原、载脂蛋白 A 和载脂蛋白 E、补体 C3 和补体 C8、视黄醇结合蛋白在慢性炎症病变中升高;②载脂蛋白 A 在系统性红斑狼疮患者外周血和 IBM 患者肌肉组织中升高;③氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1) 表达减少,多为青少年 DM 患者,推测 PON1 可能参与青少年 DM 的发病。已有研究证实 PON1 在类风湿性关节炎中表达降低,病理机制为异生物质的解毒功能减低,与高密度和低密度脂蛋白缔合时减少氧化损伤

的功能降低。

### 3 多发性肌炎的蛋白组学研究

李秋兰等<sup>[12]</sup>进行PM并肺间质病变血清蛋白质组学研究,收集PM、PM并肺间质病变患者及正常人各3例,采用双向电泳分离基质辅助激光解析电离飞行时间质谱进行分析,结果显示PM组血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A protein, SAA)、载脂蛋白A1、凝集素和血清白蛋白表达上调,转铁蛋白(TRF)表达下调;PM并肺间质病变组锌- $\alpha$ 2-糖蛋白、 $\alpha$ 2-H2-糖蛋白、 $\alpha$ 1- $\beta$ -糖蛋白表达下调。SAA的前体对PM患者血管基底膜和细胞等有细胞毒性作用,可导致内皮增厚、基底膜变化和血管增生<sup>[13]</sup>。载脂蛋白A1起负性调节作用,有抑制炎症作用。 $\beta$ 2-糖蛋白在NF- $\kappa$ B信号通路中依赖Toll样蛋白起作用,可能在PM患者肌细胞的炎症反应和损伤机制中起一定作用。综合以上,PM的发病主要与炎症反应关系密切。

Munters等<sup>[14]</sup>选取7例PM/DM患者进行为期12 d的训练,入选条件,病程大于6个月,未进行锻炼或者锻炼未超过1周1次,对3例PM/DM患者的肌肉组织,通过二维电泳质谱方法进行蛋白组学研究。运动后的肌肉组织中发现31个蛋白与毛细血管、细胞骨架重建,蛋白质合成,蛋白酶降解有关。同时发现一些负性调节蛋白在糖酵解过程中发挥作用,提示糖酵解减少能量的产生。还发现57个蛋白与线粒体代谢有关,以往的研究亦发现运动后线粒体激酶活性增高,运动后与线粒体再生相关的基因表达上调,而该研究发现PM/DM患者运动后,与线粒体再生相关的基因表达下调,这一发现提示,肌炎患者避免运动会减少肌肉炎症的恶化,线粒体功能障碍和氧化磷酸化通路异常相关。57个蛋白参与氧化磷酸化过程,20个在训练后上调,其中NADH脱氢酶复合物I、琥珀酸脱氢酶复合物II以及泛素细胞色素还原酶c核心蛋白III和Rieske铁硫多肽1的表达明显增加。综合以上,PM可能与炎症反应及线粒体功能障碍和氧化磷酸化通路异常相关。

### 4 散在性包涵体肌炎的蛋白组学研究

Li等<sup>[15]</sup>选散发性包涵体肌炎(sporadic inclusion body myositis, sIBM)患者4例,采用二维电泳质谱分析方法进行肌肉组织蛋白质组学研究。发现16个上调蛋白,其中载脂蛋白A-I表达升高,升高的原因可能为氧化应激与炎症相结合导致sIBM患者

的淀粉样病变。3个分子伴侣热休克蛋白27(HSP27)、热休克蛋白20(HSP20)及DJ-1蛋白表达升高,HSP27可能与A $\beta$ 及P-tau样蛋白的代谢有关,HSP20可能与肌动蛋白有关,DJ-1可能通过氧化应激影响热休克蛋白70(HSP70)及线粒体的功能致病,HSP70与HSP27作用导致淀粉样血管病变致病。综合以上,该研究提示sIBM的发病主要与氧化应激关系密切。

Parker等<sup>[16]</sup>选取sIBM 8例、PM5例、DM4例,正常对照3例,采用液相色谱-质谱分析方法,进行肌肉蛋白组学的比较分析,发现:①三种炎性肌病位于慢肌纤维的差异表达蛋白多于快肌纤维;②sIBM中抗快肌纤维抗体(快肌纤维肌动蛋白重链1和2抗体)表达增高,5例sIBM患者 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3肌细胞表达均减少,sIBM患者肌动蛋白重链3和8表达增高提示再生存在;③sIBM患者核纤层蛋白A/C表达增高,此蛋白位于镶边空泡的边缘,影响肌核变性;④糖原脱支酶淀粉-1,6-葡萄糖苷酶和4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶在sIBM患者中明显降低尤其4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶的表达,提示糖酵解途径参与sIBM的发病。以往的观点认为糖酵解主要位于快肌纤维,然而该研究发现在DM/PM患者中4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶主要表达于慢肌纤维中,推测4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶在sIBM中糖酵解作用主要位于慢肌纤维。综合以上推测,sIBM中快肌纤维可能与再生相关,而慢肌纤维可能与糖酵解关系密切。

Doppler等<sup>[17]</sup>选择4例sIBM肌肉标本,运用液相色谱质谱方法,发现:①337个蛋白质仅表达在sIBM中,与细胞外基质相关的蛋白质26个;②双糖链蛋白聚糖和细胞外基质分子脯氨酸精氨酸末端富含亮氨酸的重复蛋白(proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein, PRELP)仅表达在肌肉组织中炎性细胞的周边,炎性细胞浸润的肌纤维周边缺乏P物质沉积,正常情况下PRELP在肌细胞中不表达,双糖链蛋白聚糖在血管和基底膜周围表达,正常肌肉组织可见P物质的沉积。以上结果提示P物质、双糖链蛋白聚糖和PRELP在sIBM基底膜病变的过程中参与固有免疫及炎性病变的形成过程。

Li等<sup>[18]</sup>选取sIBM患者和神经源性肌萎缩的患者各3例,取肌肉组织,采用二维电泳质谱分析方法,发现29个差异蛋白(醛脱氢酶1 $\alpha$ 1、烯醇化酶1、淀粉样蛋白前体蛋白、 $\alpha$ B晶蛋白和脂肪酸结合

蛋白等),参与氧化应激反应,细胞凋亡的调节、信号转导及细胞骨架的形成。20个蛋白位于细胞内,其中脂质蛋白、细胞骨架蛋白、核蛋白和胞内细胞器蛋白分别占31.8%、31.8%、13.6%和22.7%;6个细胞外蛋白和1个膜蛋白。最终证实淀粉样前蛋白(amyloid precursor protein, APP)和 $\alpha$ B-晶蛋白基因表达水平显著升高。APP诱导内质网应激,与蛋白质的异常聚集和蛋白质错误折叠密切相关; $\alpha$ B-晶体蛋白主要与未折叠的蛋白质相互作用,抑制聚结,从而防止缺陷蛋白质的积累。此外,在sIBM肌肉中,APP由免疫细胞分泌的促炎因子刺激肌纤维产生,并且最终导致免疫细胞的炎症细胞因子的分泌,在这个过程中细胞的应激反应,炎症和变性都参与sIBM的发病。综合以上提示两个蛋白质在sIBM的发病机理起直接致病作用

## 5 小结

目前,特发性炎性肌病的发病机制并不清楚。目前蛋白组学的研究结果提示,皮肤炎的发病倾向于氧化物酶I、辅酶Q10和ISG15等介导的氧化应激反应;多发性肌炎多见于炎症,线粒体功能障碍和氧化磷酸化通路异常;而散发性包涵体肌炎涉及的范围广,不仅与氧化应激、线粒体功能障碍、炎症和变性相关,更在快慢肌纤维的分型机制中做了研究。目前IIM的相关蛋白数学数据较少,现有的结果并未能在机制中给予更多疾病的解释,但从上述的结果可以给我们一些新的提示,因此我们有理由相信,蛋白组学在炎性肌病中的作用将会随着相关蛋白组学研究的深入呈现出光明的前景。

## 参 考 文 献

- [1] Wang P, Giese RW. Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2017, 1486: 35-41.
- [2] Chait BT, Cadene M, Olinares PD, et al. Revealing Higher Order Protein Structure Using Mass Spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrometr, 2016, 27(6): 952-965.
- [3] Kani K. Quantitative Proteomics Using SILAC [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1550: 171-184.
- [4] Wang J, Gao L, Lee YM, et al. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches [J]. Pharmacol Therapeut, 2016, 162: 10-22.
- [5] Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics [J]. J Pharm Biomed Analysis, 2015, 113: 2-20.
- [6] Chen J, Ge L, Liu A, et al. Identification of pathways related to FAF1/H. pylori-associated gastric carcinogenesis through an integrated approach based on iTRAQ quantification and literature review [J]. J Proteom, 2016, 131: 163-176.
- [7] Selevsek N, Chang CY, Gillet LC, et al. Reproducible and consistent quantification of the Saccharomyces cerevisiae proteome by SWATH-mass spectrometry [J]. Mol Cell Proteom, 2015, 14(3): 739-749.
- [8] Lam MP, Ping P, Murphy E. Proteomics Research in Cardiovascular Medicine and Biomarker Discovery [J]. J Am College Cardiol, 2016, 68(25): 2819-2830.
- [9] Passadore I, Iadarola P, Di Poto C, et al. 2-DE and LC-MS/MS for a comparative proteomic analysis of BALF from subjects with different subsets of inflammatory myopathies [J]. J Proteome Res, 2009, 8(5): 2331-2340.
- [10] Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy [J]. Ann Neurol, 2010, 67(1): 53-63.
- [11] O'Hanlon TP, Li Z, Gan L, et al. Plasma proteomic profiles from disease-discordant monozygotic twins suggest that molecular pathways are shared in multiple systemic autoimmune diseases [J]. Arthritis Res Therapy, 2011, 13(6): R181.
- [12] 李秋兰,章涛,洪文婷,等.多发性肌炎并肺间质病变血清蛋白质组学研究[J].福建医科大学学报,2015,49(2): 105-110.
- [13] Garcia-Garcia M, Mourad G, Durfort M, et al. Vascular involvement and cell damage in experimental AA and clinical beta(2)-microglobulin amyloidosis [J]. Nephrol Dialysis Transplant, 2002, 17(8): 1450-1456.
- [14] Munters LA, Loell I, Ossipova E, et al. Endurance Exercise Improves Molecular Pathways of Aerobic Metabolism in Patients With Myositis [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(7): 1738-1750.
- [15] Li J, Yin C, Okamoto H, et al. Proteomic analysis of inclusion body myositis [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(8): 826-833.
- [16] Parker KC, Kong SW, Walsh RJ, et al. Fast-twitch sarcomeric and glycolytic enzyme protein loss in inclusion body myositis [J]. Muscle Nerve, 2009, 39(6): 739-753.
- [17] Doppler K, Lindner A, Schutz W, et al. Gain and loss of extracellular molecules in sporadic inclusion body myositis and polymyositis--a proteomics-based study [J]. Brain Pathol, 2012, 22(1): 32-40.
- [18] Li K, Pu C, Huang X, et al. Proteomic study of sporadic inclusion body myositis [J]. Proteome Sci, 2014, 12(1): 45.