

基于蛋白质组学筛选关节炎相关生物标志物的研究进展

郑梓桐¹, 王美娟¹, 冯育林^{1,2*}, 吕 尚^{1,2*}

1. 江西中医药大学 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 江西 南昌 330006

摘 要: 在人体中, 对蛋白质组进行系统性研究是充分了解生物过程的必要条件。关节炎是目前最常见的全身性炎症之一, 其主要诊断依据为临床症状、影像学或一些常规的检验及检查结果。这些方法对于诊断急性发作期及慢性期的关节炎较为有效, 但在评估和监测关节炎病程发展的方面具有一定局限性。因此, 寻找可用于关节炎早期诊断与全程监测的生物标志物成为当前临床研究领域中亟待解决的问题。而蛋白质组学能够从整体上分析蛋白质的组成、结构及其功能, 从而发现具有较高特异性及灵敏度的生物标记物, 加深对关节炎发病机制和病程进展的认识。通过对近年来国内外基于蛋白质组学在关节炎领域筛选生物标志物的研究进行综述, 并就其在关节炎诊疗中的功能及意义进行概述, 为关节炎的临床诊疗研究提供参考。

关键词: 蛋白质组学; 生物标志物; 分析技术; 类风湿关节炎; 骨关节炎; 痛风性关节炎

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)18-6383-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.028

Research progress on screening arthritis-related biomarkers based on proteomics

ZHENG Zitong¹, WANG Meijuan¹, FENG Yulin^{1,2}, LYU Shang^{1,2}

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: In the human body, a systematic study of proteomes is a necessary condition for a full understanding of biological processes. Arthritis is one of the most common systemic inflammation at present. Its primary diagnosis is based on clinical symptoms, imaging or some routine tests and examination results. These methods are effective in the diagnosis of acute and chronic arthritis, but have certain limitations in evaluating and monitoring the development of arthritis. Therefore, finding biomarkers that can be used for early diagnosis and whole-course monitoring of arthritis has become an urgent problem to be solved in the current clinical research field. Proteomics can analyze the composition, structure and function of proteins as a whole, so as to find biomarkers with high specificity and sensitivity, and to deepen understanding of the pathogenesis and progression of arthritis. This paper reviews the research on the screening of biomarkers in the field of arthritis based on proteomics in recent years, and summarizes its function and significance in the diagnosis and treatment of arthritis, so as to provide reference for the clinical diagnosis and treatment of arthritis.

Key words: proteomics; biomarkers; analysis technics; rheumatoid arthritis; osteoarthritis; gouty arthritis

关节炎是对各类关节炎性疾病的总称, 主要由炎症、感染、退化、外伤等炎症性损伤所导致, 通常发生在人体关节及其周围组织。临床上以关节疼痛、肿胀、晨僵、活动受限等为主要表现, 严重者可导致永久性残疾^[1-2]。目前, 临床发病率较高的关节炎类型包括类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、骨

关节炎 (osteoarthritis, OA)、痛风性关节炎 (gouty arthritis, GA) 等^[3]。关节炎患者在日常生活和工作中常受到诸多限制^[4], 心脏病和糖尿病等并发症的发展进一步危害患者身体健康, 甚至带来死亡风险^[5-6]。在临床实践中主要通过患者关节局部症状、X 线检查和血清学检测对关节炎的诊断、监测及治疗效果

收稿日期: 2024-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204590); 江西省自然科学基金资助项目 (20224BAB216099); 中国博士后科学基金第七十三批面上资助 (2023M731439); 江西省研究生创新专项资金项目 (YC2023-S789)

作者简介: 郑梓桐, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: 1425230193@qq.com

***通信作者:** 冯育林, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: fengyulin2003@126.com

吕 尚, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: lupbao@163.com

进行评估。此类诊断方法对关节炎的评估确实具有一定的可行性与有效性,但也存在着一定的局限性,主要表现为难以实现早期关节炎的诊断,如早期的关节退行性病变常被 X 线影像遗漏^[7],因此用于评估关节炎诊疗的方法尚存在较大的发展空间。目前评价关节炎发生发展的方法正朝着分子层面发展,故代谢组学、蛋白质组学、转录组学等系统生物学方法在此方面有着特有的优势。其中蛋白质组学能够大规模研究蛋白质在不同环境和条件下的变化,可在关节炎病程的早期阶段筛选特异性靶蛋白,尤其适合关节炎相关生物标志物的发现。

1994 年,澳大利亚学者 Wasinger 等^[8]首次提出了蛋白质组学的概念,随后蛋白质组学得到了快速发展,成为鉴定蛋白质、获得生物标志物至关重要的技术。作为生命科学的一个研究领域,蛋白质组学能够在蛋白质水平进行定性、定量分析,监测蛋白质在疾病影响下的一系列变化,研究药物的治疗靶点与一系列蛋白质相关的问题。在不同条件下对蛋白质组产生的差异进行研究,可以识别出参与疾病或影响治疗效果的蛋白质作为其生物标志物^[9-10]。不同组织间的蛋白质有所不同,选择不同的底物进行分析,通过蛋白质组学技术将得到的不同结果进行高通量研究,能够获得有关蛋白变化的信息,了解用其他方法难以或不可能获得的蛋白质表达、定位、相互作用或蛋白质翻译后修饰的变化。在生理或病理条件下,这些变化可能导致疾病的发生或发展;同时,也是评估药物疗效的重要指标。因此,对不同类型的关节炎样本进行大量的蛋白质组学研究,寻找有意义的生物标志物,可以深入了解各类关节炎的发生发展情况。本文总结了近年来蛋白质组学在关节炎中的应用,为关节炎的临床诊疗研究提供参考。

1 关节炎相关特异性生物标志物的需求

根据调查显示^[11-12],我国 60 岁及以上老年人关节炎的患病率为 38.5%,在老年人慢性疾病中位居首位。随着我国人口老龄化不断加剧,关节炎作为发病率逐年上升的常见疾病,严重威胁着我国中老年人的生命健康。同时,据 2017 年发表的一项有关常见膝关节骨性关节炎的相关研究显示^[13],关节炎患者逐渐趋向于年轻化。因此,识别关节炎患病相关因素、对患者进行诊断、实施系统的预防措施已成为亟待解决的问题^[14]。

目前,对于关节炎的诊断主要是基于患者的临

床表现,临床上尚无简单实用的检测方法能够准确评估关节炎的疾病活动性和严重程度。已知类风湿因子(rheumatoid factor, RF)是 RA 诊断标准中的血清学指标,抗环瓜氨酸肽(anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP)抗体可作为 RA 准确诊断和预后评估指标^[15],但是有研究表明 RF 定量的生化测试灵敏度为 63%, anti-CCP 抗体检测的灵敏度为 61%^[16-17],提示 RA 的早期诊断较为困难,RA 患者无法得到高效的治疗,进一步解释了 RA 预后差的原因。通过蛋白质组学技术得到的生物标志物可以帮助患者尽早做出诊断,同时实现疾病活动性、严重程度和治疗效果的评估^[18]。根据研究的推进,大量证据表明在关节炎早期给予积极的治疗能够帮助减少由关节炎引起的放射损伤和残疾^[19]。

2 蛋白质组学在筛选疾病生物标志物方面的常用技术与方法

2.1 传统蛋白质组学方法

传统的蛋白质组学方法侧重于分析策略^[20],试图破译任何给定疾病状况或药物治疗后差异表达的蛋白质。其分析方法倾向于提供关于蛋白质的信息,或提供在某些情况下相关蛋白质的丰度,这是识别和验证靶蛋白的主要方法之一。早期的蛋白质组学分析主要依赖于二维凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE),其通过等电聚焦技术与标准的聚丙烯酰胺十二烷基硫酸钠凝胶电泳分离技术分离肽和蛋白质的复杂混合物^[21-22]。由于其高分辨率和大样品负载能力,2-DE 允许在单个凝胶上同时显示数百种蛋白质,从而在给定的时间点生成样品蛋白质组的直接全局视图^[23-24]。遗憾的是,该技术并未用于检测具有极端 pH 值和相对分子质量范围的蛋白质,且不适合分析膜蛋白或低丰度的蛋白质。

2.2 新兴蛋白质组学方法

在过去的 10 年中,蛋白质组学技术取得了重大进展,在灵敏度、选择性、可重复性、蛋白质覆盖范围和成本效益方面具有显著优势。目前,质谱是蛋白质组学研究的核心,液相色谱-串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[25]将色谱法与 1 台或 2 台质谱分析仪耦合,可以更快速、更灵敏地生成蛋白质列表^[26],与 Western blotting 和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)相比,其定量的蛋白质数量增加了若干数量级。因此,LC-MS/MS 广泛用于识别各种数据库中未知的特定蛋白质,已成为

鉴定血清或血浆蛋白翻译后修饰的有力工具,如磷酸化、糖基化或风湿瓜氨酸化等^[27]。

此外,基于 LC-MS/MS 的新兴蛋白质组学技术,如多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术^[28]、同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[29]、数据依赖采集(data dependent acquisition, DDA)技术^[30]等已广泛用于揭示疾病的特异性蛋白。MRM 作为靶向蛋白质组学的原型方法,在三重四极杆质谱仪(triple quadrupole mass spectrometer, QqQ-MS)上对预先定义的一系列跃迁(前体/产物离子对)随着时间的推移进行监测以进行精确的量化;而近期发展起来的一种有望加快检测发展的靶向蛋白质组学技术——平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM),其使用靶向串联质谱同时监测目标肽的产物离子,具有高分辨率和质量精度,能够以更高的灵敏度和特异性量化多肽^[31-32]。与靶向蛋白质组学相比,非靶向蛋白质组学技术能够根据蛋白质或多肽是否被标记,对样品中所有蛋白质进行无分化分析,在识别新的生物标志物方面提供了巨大的潜力。iTRAQ 技术是近年来被广泛使用的非靶向蛋白质组学技术,其利用 4 种或 8 种同位素标记蛋白质肽段的氨基末端或赖氨酸侧链,高效鉴定并筛选样品中的蛋白质,该技术分析结果可靠且精确度高,同时展现出高效性和良好的重复性^[34];串联质量标签(tandem mass tags, TMT)技术作为另一种非靶向蛋白质组学技术,与 iTRAQ 技术的原理相似,运用 TMT 试剂进行标记,能够同时比较并准确测定多个样品中肽的相对丰度^[35],大大减少了整体的定量时间和成本。与靶向蛋白质组学方法不同,DDA 具有更广泛的覆盖范围,然而 DDA 选择前体离子的随机性导致其重现性欠佳^[30]。而数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)技术^[36]将前体离子隔离到预先定义的隔离窗口中并破碎;用高分辨率质谱仪分析每个窗口中的所有碎片离子^[37],具有蛋白质覆盖范围广、重现性高、准确性高的优势,与样品制备和计算数据分析的相结合,实现分析性能的进一步提高,被认为具有 PRM(高灵敏度和可重复性)和 DDA(宽蛋白覆盖)的双重优势^[38]。

3 蛋白质组学在筛选关节炎相关生物标志物中的应用

一个细胞或有机体会产生一整套蛋白质组^[39],

但随着时间的推移,蛋白质组将经历一个持续且复杂的动态调整过程。这些蛋白质可直接参与疾病相关的生化过程,通过直接观察患病细胞或组织内的蛋白质,能够更全面地了解疾病的发生发展情况。因此,通过蛋白质组学技术对疾病或生物样本的整个蛋白质材料进行研究分析,跟踪蛋白质组在不同条件下的差异表达,可为探索疾病相关生物标志物提供依据^[40]。

随着仪器与分析技术的不断发展,蛋白质组的获取已更为容易,且对蛋白质成分鉴定、亚细胞定位及翻译后修饰的分析能力显著提升。最新的蛋白质组学技术、软件平台和在线存储库数据库的进步使评估蛋白质组的复杂变化成为可能,实现了对细胞内蛋白质组成、结构及活性的系统性研究。蛋白质组学技术的运用,能够深入发掘多种与关节炎紧密相关且极具潜力的生物标志物,这些标志物不仅为监测关节炎的治疗效果提供了可能,并且显著增强了对关节炎发病机制的理解。因此,生物标志物在病理过程中是具有诊断、预后评估或预测效用的客观分子指标。近年来,研究者利用蛋白质组学技术分析从临床样本或实验动物模型中收集的不同生物样本^[41-43],在关节炎的不同临床阶段研究中取得了诸多进展。为此,笔者针对近年来与关节炎相关的研究报道,总结并归纳了各类关节炎用于诊断、治疗评估和预后评估生物标志物。

3.1 在 OA 相关生物标志物筛选中的应用

OA 是最常见的关节炎形式,其特征是关节结构的改变,包括进行性软骨破坏、滑膜炎症和软骨的改变,被国际骨关节炎研究协会定义为“一种涉及活动关节的疾病”,在全球范围内影响广泛,主要受影响群体为 65 岁以上的老年人^[44]。为了改进预防或延缓 OA 疾病进展的治疗方法,需要得到能够早期确定 OA 的生物标志物。

最近的研究表明,OA 患者血浆和滑液中的聚集素蛋白水平显著高于对照样本,与早期 OA 患者相比,晚期 OA 患者滑液和血浆中的聚集素水平显著升高。聚集素在血浆和滑液水平与膝关节 OA 的放射学严重程度也有显著的相关性。因此,聚集素是诊断和评估 OA 严重程度的一种新的生物标志物,其灵敏度为 71.4%,特异性为 73.3%^[45-46]。此外,Tardif 等^[47]利用 LC-MS/MS 技术对 OA 患者血清蛋白进行鉴定与定量,并使用来自纽芬兰 OA 患者的血浆进行蛋白质特异性测定,研究发现软骨酸

性蛋白 1 (cartilage acidic protein 1, CRTAC1)、原纤维蛋白 1 和维生素 D 结合蛋白 (vitamin D-binding protein, VDBP) 可作为整个 OA 患者潜在的新候选生物标志物进一步研究。塞来昔布是一种非甾体抗炎药和选择性环氧合酶-2 抑制剂, 被广泛用于缓解 OA 患者的疼痛与炎症反应, Haartmans 等^[48]通过非靶向 LC-MS/MS 技术深入探究了塞来昔布在体内 OA 模型中对软骨的抗炎作用与保护作用。结果显示, 塞来昔布治疗后, 人软骨外植体中含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 4/5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4/5, ADAMTS4/5) 和基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13) 的基因表达显著降低, 说明塞来昔布通过调节 ADAMTS4/5、MMP13 水平, 从而保护 OA 患者关节软骨。Szilagyi 等^[49]通过对血浆蛋白的研究发现共有 5 种蛋白 [CRTAC1、血清软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP)、血小板反应蛋白 4、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 受体 1 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 超家族成员 14] 与 OA 疾病的严重程度相关。其中 CRTAC1 反映了疾病的严重程度并可预测 OA 的进展。因此, CRTAC1 可能是诊断与监测 OA 疾病活动最密切相关的主要生物标志物之一。Timur 等^[50]强调补体系统在膝关节 OA 发病机制中起关键作用, 同时对比了 4 种不同来源的 OA 膝关节组织, 其中, OA 半

月板组织分泌物中补体 C8 (complement C8, C8) 的含量显著高于其他来源。这一发现提示了 C8 可作为半月板病变所引发膝关节 OA 的潜在生物标志物。Ali 等^[51]研究发现, 与对照组相比, 在 OA 的早期阶段, 患者体内 III 型胶原 α -1 链的表达量显著上调; 然而, 随着 OA 进展至晚期, 其表达量却呈下调趋势。鉴于 III 型胶原在组织再生过程中通常会显著上调, 因此, 这一发现提示在 OA 的早期阶段, 患者体内可能存在大量关节组织再生的情况。

综上, CRTAC1 在诊断、监测 OA 疾病活动方面展现出高度的相关性, 因此, CRTAC1 可作为 OA 诊断、治疗及预后评估的潜在生物标志物。此外, 研究明确了某些蛋白质在 OA 的不同阶段下的变化, 如 III 型胶原 α -1 链在 OA 早期增加, 而在 OA 晚期减少, 而 CRTAC1 和 MMPs 仅在骨性关节炎晚期增加。同时, 有研究表明过去常被视为 OA 重要靶点的分子 (如 IL-1 等), 现被发现其特异性较低^[52], 因此研究者转而将目光投向更多具有潜力的候选生物标志物 (图 1)。由此可见, 蛋白质组学对评估 OA 严重程度的诊断、监测和治疗评估具有重要潜力。

3.2 在 RA 相关生物标志物筛选中的应用

RA 是一种多因素自身免疫性疾病, 若不进行适当的疾病治疗与管理, 可导致不可逆的变形关节损伤和进行性骨侵蚀。因此, RA 患者的高致残率相对较高^[53]。为了降低 RA 的致残率, 寻找合适的生

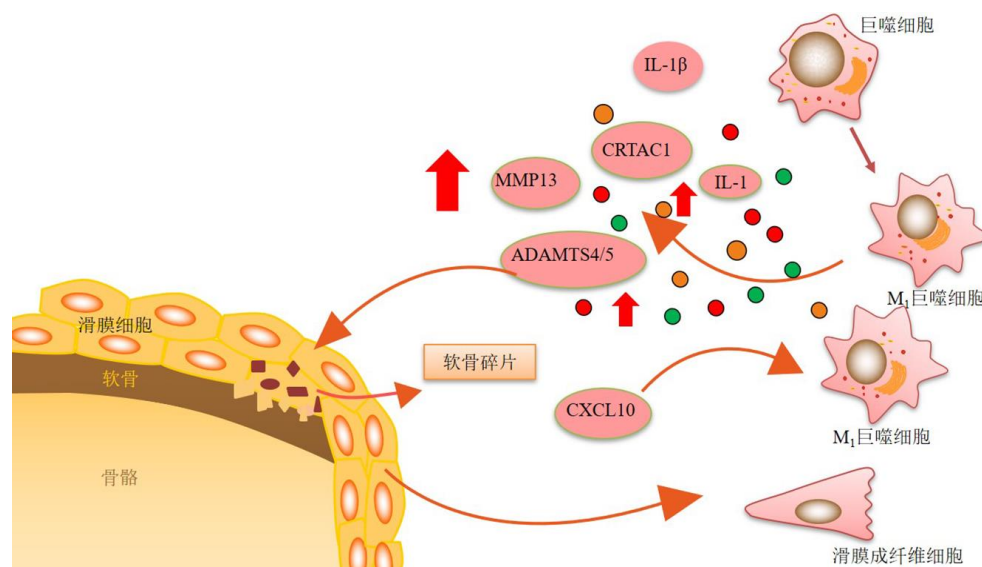


图 1 OA 的发病机制与关键生物标志物

Fig. 1 Pathogenesis and key biomarkers of OA

物标志物用于 RA 早期诊断、治疗评估和预后评估至关重要。

Hu 等^[54]为了鉴定 RA 的血清标志物,通过基于质谱的蛋白质组学并使用蛋白质-蛋白质相互作用网络分析方法,利用蛋白质组学数据集、免疫浸润状态、组织特异性、亚细胞定位、基于疾病活动性诊断指征的相关性分析和诊断受体操作特征分析对 RA 相关特异性蛋白进行重新分析。结果表明触珠蛋白和血清类黏蛋白 1 (orosomucoid 1, ORM1) 在正常和 RA 患者血清样本中存在显著差异,且在疾病活跃期和非活跃期均有差异表达,与疾病活动性呈正相关。因此,触珠蛋白和 ORM1 有望成为 RA 治疗和诊断的生物标志物。Mun 等^[55]采用质谱法进行血清蛋白谱分析,从中鉴定出 5 种潜在生物标志物,并用 MRM 对 5 种生物标志物进行定量验证,发现血清淀粉样蛋白 A4 (serum amyloid A4, SAA4) 和 VDBP 在区分 RA 患者和健康对照中表现出很高的性能。因此, VDBP 和 SAA4 蛋白可作为 RA 炎症反应引起的炎症和关节破坏的潜在诊断标志物。这一发现可为 RA 的诊断提供新的潜在生物标志物。生物标志物对关节炎类疾病的监测具有重要意义, Qin 等^[56]通过纳米 LC-MS/MS 技术检测 RA 患者与正常对照组血浆外泌体蛋白的差异表达,结果显示 RA 患者血清中的 COMP 水平显著高于对照组,在 RA 的发病机制中发挥重要作用。有望成为 RA 的诊断和预后评估中的潜在生物标志物。Kang 等^[57]使用非靶向 LC-MS/MS 对 RA 患者的尿液样本进行定量尿蛋白质组分析,鉴定出 134 个差异蛋白。通过对差异蛋白的整合转录组学和蛋白质组学的分析,在 RA 患者的尿液中识别出了与 RA 相关的生物标志物 (凝溶胶蛋白、ORM1、ORM2 和可溶性白细胞分化抗原 14),有效提高了对 RA 疾病活动性的评估能力。

在 RA 的治疗中, Yu 等^[58]采用 LC-MS/MS 技术对治疗前后 RA 患者血清中鉴定出的 77 个差异蛋白,采用 ELISA 和受试者工作特征曲线对关键蛋白进行分析与验证。研究发现二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 是与 RA 临床指标及免疫细胞浸润相关性最强的蛋白,同时,研究结果表明治疗后血清中 DPP-4 水平显著升高,与 C 反应蛋白及血沉呈负相关。因此, DPP-4 可能是 RA 疾病活动性评估与疗效评估的潜在生物标志物。目前,甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是用于 RA 临床缓

解的一线治疗药,然而, 30%~40% 的 RA 患者对该药的临床反应不足,这种现象被称为 MTX 耐药性。因此, Escal 等^[59]对活动性 RA 患者和 MTX 治疗后患者的血浆样本进行非靶向蛋白质组学分析。与临床缓解期 RA 患者相比,活动期 RA 患者中参与糖酵解的磷酸丙糖异构酶-1 (triosephosphate isomerase-1, TPI-1) 和葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase, GPI) 显著下调,表明 MTX 可能影响 RA 患者滑膜组织中 GPI 和 TPI-1 的表达并促进疾病的进展。Yang 等^[60]通过 iTRAQ 技术分析芍药苷在实验性 RA 模型中的潜在药物作用靶点,在芍药苷治疗后 RA 大鼠滑膜组织中的白血病抑制因子受体 (leukemia inhibitory factor receptor, LIFR) 和无孢蛋白 (asporin, ASPN) 蛋白显著下调,提示芍药苷可通过降低 ASPN 和 LIFR 表达实现对 RA 的治疗,有助于确定治疗 RA 的潜在药物。

迄今为止,蛋白质组学已被认为是识别 RA 潜在生物标志物和确定治疗反应预测因子的有效工具^[61-62]。基于对 RA 患者相关特异性蛋白的研究,发现 ORM1 在不同研究中均具有显著差异,同时被认为是可用于动态评估 RA 疾病活动性的生物标志物。由此可见, ORM1 与 RA 的发生发展密不可分,有望成为 RA 诊断、监测与治疗评估的生物标志物。同时, COMP 作为关节软骨破裂的标志物,被认为是影响早期 RA 的重要预后因素。此外, GPI、TPI-1、ASPN 和 LIFR 的研究进一步揭示了药物治疗 RA 的作用机制,为药物优化和联合用药提供科学依据,促进新药研发进程 (图 2)。

3.3 在 GA 相关生物标志物筛选中的应用

GA 由尿酸钠晶体在关节和周围组织沉积引起,是一种剧烈的、极度疼痛的炎症性关节炎^[63]。据统计研究^[64-65]及国家风湿病数据中心数据显示, GA 患病率逐年升高,平均患病率约为 1.58%, GA 已经成为我国乃至全球范围内发病率高、危害级别高、治疗难度大的代谢性风湿疾病。而蛋白质表达的变化可能有助于理解痛风易感性及其在 GA 抗炎疼痛缓解中的重要性。因此,了解 GA 的相关功能的蛋白表达情况至关重要。

Yao 等^[66]在急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 大鼠滑膜中发现了 14 种不同表达的蛋白,其中 9 种是首次在该模型中发现,有 7 个上调和 7 个下调的蛋白,其中 TNF 相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)

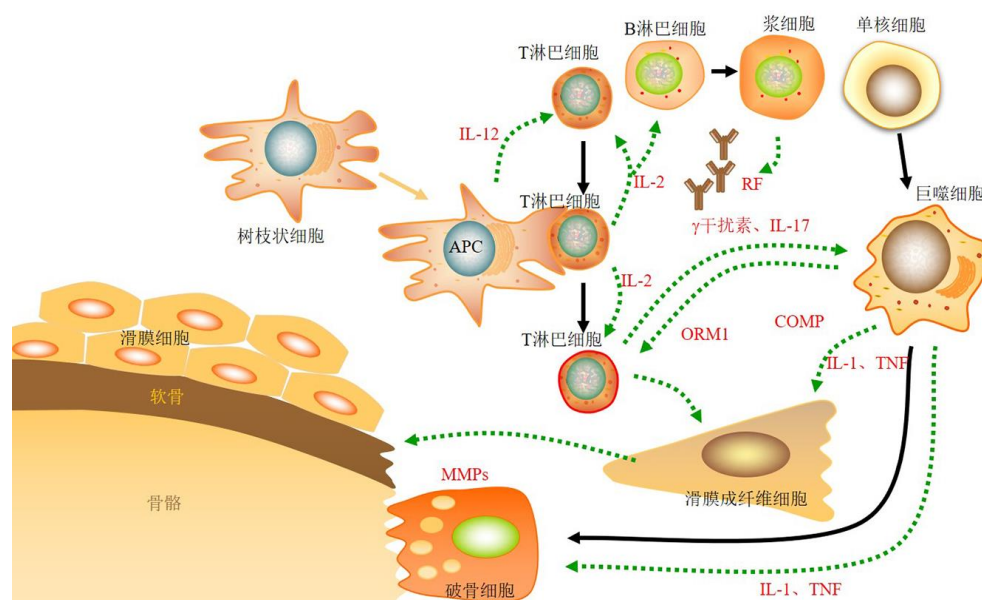


图 2 RA 的发病机制与关键生物标志物

Fig. 2 Pathogenesis and key biomarkers of RA

和神经纤毛蛋白 2 (neuropilin 2, NRP2) 差异极为显著, 分别增加 210、110 倍, 同时在穿山龙总皂苷治疗的大鼠滑膜中发现 TRAIL 和 NRP2 显著下调。由此得知, TRAIL 和 NRP2 的高表达可能是 AGA 的标志。孙广瀚等^[67]基于血清的蛋白质组学识别有炎症功能的蛋白质信号, 通过分析 AGA 患者与健康志愿者的差异表达蛋白质, 确定了 AGA 患者 4 种 [TNF 受体 2 (TNF receptor 2, TNFR2)、巨噬细胞炎症蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β)、IL-8、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)] 表达差异最显著的蛋白质。研究表明, 在尿酸单钠的存在下, GM-CSF 可诱导 IL-8 产生, 从而加剧炎症的反应。因此, TNFR2、MIP-1 β 、IL-8、GM-CSF 可能是用于 AGA 患者风险预测和诊断的生物标志物。此外, Tian 等^[68]根据 Western blotting 与 ELISA 研究发现微小 RNA-223-3p (micro RNA-223-3p, miR-223-3p) 可通过靶向 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 抑制单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体诱导的大鼠模型和成纤维细胞样滑膜细胞中的炎症和焦亡, 可以作为治疗 GA 的生物标志物。为了明确防己治疗 GA 的作用机制, 张帅男等^[69]通过 LC-MS/MS 对防己治疗前后的大鼠滑膜组织进行鉴定与分析, 发现防己显著逆转了非受体酪氨酸

蛋白磷酸酶 11 和钙黏蛋白 5 的异常表达, 为评估防己对 GA 的治疗提供了科学依据。Fu 等^[70]利用 LC-MS/MS 与 DIA 对正常滑膜液与 GA 患者的滑膜液进行蛋白质组学分析, 对相关蛋白表达的影响通过对差异蛋白聚类分析, 得出相关差异蛋白组织蛋白酶 B、D、G、S 存在显著差异, 描述了 GA 的病理特征、途径、潜在的预测因素和治疗目标, 为今后临床疾病提供针对性的治疗思路。

目前, 通过蛋白质组学技术研究 GA 相关生物标志物的文献较少, 但是 GA 生物标志物的研究也取得了重要进展, TNFR2、TRAIL 和 NLRP3 等的发现为 GA 的临床诊断、治疗检测和预后评估提供了新的工具与思路 (图 3)。未来, 随着蛋白质组学技术的持续进步与日益完善, 相信将有更多具有潜在价值的生物标志物被发现, 并用于 GA 临床诊疗中。

4 结语与展望

在过去的 10 余年间, 蛋白质组学技术日益成为探索关节炎病理机制及其治疗策略的关键工具。随着蛋白质组学对关节炎领域研究的不断发展, 海量的关节炎相关生物标志物被发现。生物标志物在一定程度上有助于更好地理解关节炎的病理生物学, 一些研究确定的生物标志物对识别新靶点、监测关节炎动态和开发新的治疗方法至关重要, 为关节炎的诊疗提供了新的可能。因此, 深入探索关节炎相关生物标志物对关节炎的诊疗具有重大意义。

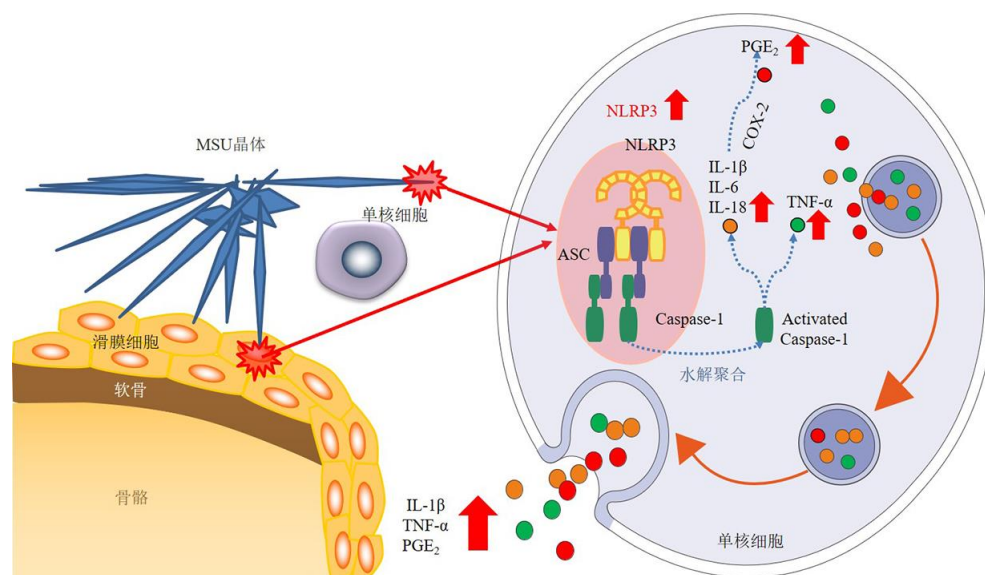


图 3 GA 发病机制与关键生物标志物

Fig. 3 Pathogenesis and key biomarkers of GA

笔者认为虽然蛋白质组学技术的进步已经在一定程度上改变了关节炎相关生物标志物的发现发展,但生物标志物的开发、验证和临床应用仍然存在一些挑战。主要体现在以下 3 个方面。

(1) 研究存在偏差或假阳性情况:在关节炎相关生物标志物的研究过程中,不同关节炎样品间的差异和取样时间点的差异对实验结果有着不可忽视的影响。在这种情况下往往导致候选生物标志物无法通过验证,因此,关节炎相关生物标志物的发现与临床应用之间仍存在一定差距。针对现存的问题进行优化,笔者认为应该严格执行样品收集和储存的标准化过程,减少样品间差异和时间点差异,选择适宜的技术方法开展研究;同时有必要通过详细分类对混杂的因素进行分析与评估,注重多组学联合研究,全面分析数据以减少错误识别的生物标志物。

(2) 生物标志物缺乏临床验证:尽管蛋白质组学的研究作为发现关节炎疾病中的特异性生物标志物提供依据,但大部分研究结果尚缺少广泛的临床验证。正是由于缺乏对已知生物标志物的临床验证,阻碍了相关疾病的药物研发进展,使生物标志物无法进一步在临床上作为常规使用手段。因此,在未来的研究中,需要积极验证各个研究中提出的生物标志物的有效性,推动基于生物标志物的药物研发,将生物标志物从发现阶段转移到临床使用阶段,从而实现对各类关节炎的精准医疗。

(3) 真正进入临床应用的生物标志物较少:关

节炎的主要临床挑战之一是开发强大的生物标志物来预测疾病及其进展。然而,在临床应用中,真正具有较高价值、可广泛采用的生物标志物却寥寥无几,除少数几个成功案例外,如 RF,其他大多数仍停留在研究阶段。由此可见,未来的相关生物标志物研究应加强与临床应用的衔接,从而推动生物标志物研究向更实用的方向发展。

迄今为止,蛋白质组学技术已展现出在生物标志物发现领域的巨大潜力,并提高了对关节炎的认知与理解。虽然蛋白质组学在生物体水平上仍然面临着概念和技术的挑战,但是随着研究体系的完善,相信通过将蛋白质组学得到的生物标志物纳入关节炎患者的日常诊断、预后及疗效监测将成为现实,为个性化分子医学打开大门,实现早期诊断和基于患者蛋白质谱的定制治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] van Nies J A, Krabben A, Schoones J W, *et al.* What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(5): 861-870.
- [2] Scherer H U, Häupl T, Burmester G R. The etiology of rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400.
- [3] 张永怡, 孙志岭, 彭琳秀, 等. 代谢组学在关节炎领域的研究现状及文献计量学分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(4): 612-618.
- [4] O'Donnell S, Lagacé C, McRae L, *et al.* Life with arthritis in Canada: A personal and public health challenge [J].

- Chronic Dis Inj Can*, 2011, 31(3): 135-136.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Arthritis as a potential barrier to physical activity among adults with heart disease—United States, 2005 and 2007 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, 58(7): 165-169.
 - [6] Sophia Fox A J, Bedi A, Rodeo S A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function [J]. *Sports Health*, 2009, 1(6): 461-468.
 - [7] Cush J J. Rheumatoid arthritis: Early diagnosis and treatment [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2022, 48(2): 537-547.
 - [8] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1090-1094.
 - [9] Tilleman K, Deforce D, Elewaut D. Rheumatology: A close encounter with proteomics [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(10): 1217-1226.
 - [10] Mallick P, Kuster B. Proteomics: A pragmatic perspective [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(7): 695-709.
 - [11] Almutairi K B, Nossent J C, Preen D B, *et al.* The prevalence of rheumatoid arthritis: A systematic review of population-based studies [J]. *J Rheumatol*, 2021, 48(5): 669-676.
 - [12] 闫伟, 路云, 张冉, 等. 基于 CHARLS 数据分析的我国老年人共病现状研究 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2019, 23(4): 426-430.
 - [13] Luca N J, Stinson J N, Feldman B M, *et al.* Validation of the standardized universal pain evaluations for rheumatology providers for children and youth (SUPER-KIDZ) [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2017, 47(10): 731-740.
 - [14] 徐小兵, 李迪, 孙杨, 等. 基于关联规则的中国老年人慢性病共病分析 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2021, 29(11): 808-812.
 - [15] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1580-1588.
 - [16] Wu C Y, Yang H Y, Luo S F, *et al.* From rheumatoid factor to anti-citrullinated protein antibodies and anti-carbamylated protein antibodies for diagnosis and prognosis prediction in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 686.
 - [17] Kroot E J, de Jong B A, van Leeuwen M A, *et al.* The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(8): 1831-1835.
 - [18] Balakrishnan L, Bhattacharjee M, Ahmad S, *et al.* Differential proteomic analysis of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients [J]. *Clin Proteomics*, 2014, 11(1): 1.
 - [19] Goekoop-Ruiterman Y P, de Vries-Bouwstra J K, Allaart C F, *et al.* Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2 Suppl): S126-S135.
 - [20] Soares H D, Williams S A, Snyder P J, *et al.* Proteomic approaches in drug discovery and development [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2004, 61: 97-126.
 - [21] Weiland F, Zammit C M, Reith F, *et al.* High resolution two-dimensional electrophoresis of native proteins [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(12/13): 1893-1902.
 - [22] Carrette O, Burkhard P R, Sanchez J C, *et al.* State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: A key tool of proteomics research [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 812-823.
 - [23] López J L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 849(1/2): 190-202.
 - [24] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198-207.
 - [25] Gregorich Z R, Ge Y. Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities [J]. *Proteomics*, 2014, 14(10): 1195-1210.
 - [26] Yates J R, Ruse C I, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009, 11: 49-79.
 - [27] Silva A M N, Vitorino R, *et al.* Post-translational modifications and mass spectrometry detection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 925-941.
 - [28] Shi T J, Su D, Liu T, *et al.* Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics [J]. *Proteomics*, 2012, 12(8): 1074-1092.
 - [29] Wiese S, Reidegeld K A, Meyer H E, *et al.* Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research [J]. *Proteomics*, 2007, 7(3): 340-350.
 - [30] Gillet L C, Leitner A, Aebersold R. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: Entering the high-throughput era for hypothesis testing [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2016, 9(1): 449-472.
 - [31] Vidova V, Spacil Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent

- acquisition [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 964: 7-23.
- [32] Rauniyar N. Parallel reaction monitoring: A targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28566-28581.
- [33] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [34] Choe L, D'Ascenzo M, Relkin N R, *et al.* 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease [J]. *Proteomics*, 2007, 7(20): 3651-3660.
- [35] Myers S A, Kjaeger S, Satpathy S, *et al.* Evaluation of advanced precursor determination for tandem mass tag (TMT)-based quantitative proteomics across instrument platforms [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(1): 542-547.
- [36] Li J P, Zhu H J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based proteomics of drug-metabolizing enzymes and transporters [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2718.
- [37] Huang Q, Yang L, Luo J, *et al.* SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale [J]. *Proteomics*, 2015, 15(7): 1215-1223.
- [38] Meier F, Brunner A D, Frank M, *et al.* diaPASEF: Parallel accumulation-serial fragmentation combined with data-independent acquisition [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(12): 1229-1236.
- [39] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 582-587.
- [40] Chandramouli K, Qian P Y. Proteomics: Challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity [J]. *Hum Genomics Proteomics*, 2009, 2009: 239204.
- [41] Jin E H, Shim S C, Kim H G, *et al.* Polymorphisms of *COTL1* gene identified by proteomic approach and their association with autoimmune disorders [J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41(5): 354-361.
- [42] Katano M, Okamoto K, Arito M, *et al.* Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(1): R3.
- [43] Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y N, *et al.* Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: Association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1828-1837.
- [44] Hodgkinson T, Kelly D C, Curtin C M, *et al.* Mechanosignalling in cartilage: An emerging target for the treatment of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(2): 67-84.
- [45] Kalvaityte U, Matta C, Bernotiene E, *et al.* Exploring the translational potential of clusterin as a biomarker of early osteoarthritis [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 32: 77-84.
- [46] Ungsudechachai T, Honsawek S, Jittikoon J, *et al.* Clusterin is associated with systemic and synovial inflammation in knee osteoarthritis [J]. *Cartilage*, 2021, 13(1_suppl): 1557S-1565S.
- [47] Tardif G, Paré F, Gotti C, *et al.* Mass spectrometry-based proteomics identify novel serum osteoarthritis biomarkers [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 120.
- [48] Haartmans M J J, Timur U T, Emanuel K S, *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory and chondroprotective effect of celecoxib on cartilage *ex vivo* and in a rat osteoarthritis model [J]. *Cartilage*, 2022, 13(3): 19476035221115541.
- [49] Szilagyi I A, Vallerger C L, Boer C G, *et al.* Plasma proteomics identifies CRTAC1 as a biomarker for osteoarthritis severity and progression [J]. *Rheumatology*, 2023, 62(3): 1286-1295.
- [50] Timur U T, Jahr H, Anderson J, *et al.* Identification of tissue-dependent proteins in knee OA synovial fluid [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(1): 124-133.
- [51] Ali N, Turkiewicz A, Hughes V, *et al.* Proteomics profiling of human synovial fluid suggests increased protein interplay in early-osteoarthritis (OA) that is lost in late-stage OA [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(3): 100200.
- [52] Cheng C, Tian J, Zhang F J. Can IL-1 be used as a target for osteoarthritis? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(7): e88.
- [53] Radu A F, Bungau S G. Management of rheumatoid arthritis: An overview [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2857.
- [54] Hu C Q, Dai Z, Xu J, *et al.* Proteome profiling identifies serum biomarkers in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 865425.
- [55] Mun S, Lee J, Park A, *et al.* Proteomics approach for the discovery of rheumatoid arthritis biomarkers using mass spectrometry [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4368.
- [56] Qin Q, Song R H, Du P, *et al.* Systemic proteomic analysis reveals distinct exosomal protein profiles in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 9421720.
- [57] Kang M J, Park Y J, You S, *et al.* Urinary proteome profile predictive of disease activity in rheumatoid arthritis [J]. *J*

- Proteome Res*, 2014, 13(11): 5206-5217.
- [58] Yu J H, Hu C Q, Dai Z, *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 as a potential serum biomarker for disease activity and treatment response in rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110203.
- [59] Escal J, Neel T, Hodin S, *et al.* Proteomics analyses of human plasma reveal triosephosphate isomerase as a potential blood marker of methotrexate resistance in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2024, 63(5): 1368-1376.
- [60] Yang S, Xing Z H, Liu T, *et al.* Synovial tissue quantitative proteomics analysis reveals paeoniflorin decreases LIFR and ASPN proteins in experimental rheumatoid arthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 463-473.
- [61] Ling S F, Nair N, Verstappen S M M, *et al.* Proteomic analysis to define predictors of treatment response to adalimumab or methotrexate in rheumatoid arthritis patients [J]. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20(3): 516-523.
- [62] Park Y J, Yoo S A, Hwang D, *et al.* Identification of novel urinary biomarkers for assessing disease activity and prognosis of rheumatoid arthritis [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(2): e211.
- [63] Richette P, Bardin T. Gout [J]. *Lancet*, 2010, 375(9711): 318-328.
- [64] Ragab G, Elshahaly M, Bardin T. Gout: An old disease in new perspective—A review [J]. *J Adv Res*, 2017, 8(5): 495-511.
- [65] Kuo C F, Grainge M J, Zhang W Y, *et al.* Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(11): 649-662.
- [66] Yao L, Dong W R, Lu F, *et al.* An improved acute gouty arthritis rat model and therapeutic effect of *Rhizoma Dioscoreae nipponicae* on acute gouty arthritis based on the protein-chip methods [J]. *Am J Chin Med*, 2012, 40(1): 121-134.
- [67] 孙广瀚, 刘健, 万磊, 等. 基于血清蛋白组学探讨黄芩清热除痹胶囊改善急性痛风性关节炎急性炎症的作用研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3061-3067.
- [68] Tian J, Zhou D, Xiang L, *et al.* MiR-223-3p inhibits inflammation and pyroptosis in monosodium urate-induced rats and fibroblast-like synoviocytes by targeting NLRP3 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 204(3): 396-410.
- [69] 张帅男, 李红美, 李煦照. 代谢组学联合蛋白质组学分析防己治疗痛风性关节炎的作用机制 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40 (7): 941-947.
- [70] Fu W L, Ge M H, Li J. Phospholipase A2 regulates autophagy in gouty arthritis: Proteomic and metabolomic studies [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 261.

[责任编辑 赵慧亮]