

• 临床检验研究论著 •

过敏性鼻炎的鼻液蛋白质组学分析

谢服役¹, 张孝认², 孙琦²

(宁波市医疗中心李惠利医院检验科, 浙江宁波 315041)

摘要:目的 应用蛋白质组学技术筛选过敏性鼻炎(AR)患者鼻腔灌洗液中的蛋白标记物。方法 采集 10 例 AR 患者及 20 例健康对照者过敏原刺激前后的鼻腔灌洗液,用双向电泳检测其中的蛋白组成,筛选差异表达的蛋白进行质谱分析鉴定。结果 共筛选出 6 种差异表达的蛋白,在过敏原刺激后,乳铁蛋白、载脂蛋白 A1(APOA1)及 α 1-抗胰蛋白酶表达上调,PLUNC 蛋白、结合珠蛋白、IgJ 表达下调。结论 筛选出的 6 种蛋白可能成为 AR 的生物标记物。

关键词:过敏性鼻炎; 生物标记物; 蛋白质组学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)22-3027-03

Proteomic analysis of nasal lavage fluid in patients with allergic rhinitis

Xie Fuyi¹, Zhang Xiaoren², Sun Qi²

(Department of Clinical Laboratory, Ningbo Medical Center Lihuli Hospital, Ningbo, Zhejiang 315041, China)

Abstract: Objective To screen the biomarkers in nasal lavage fluid of patients with allergic rhinitis (AR) by proteomics technology. **Methods** The nasal lavage fluid samples of 10 cases of AR patients and 20 cases of normal controls were collected both before and after allergen stimulation tests. Two-dimensional gel electrophoresis was used to detect the proteins in nasal lavage fluid samples. The proteins that showed different expression levels were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Results** Six kinds of proteins differentially expressed were screened out. The expressions of lactoferrin, α 1-antitrypsin, and APOA1 increased in the AR patients after being stimulated by allergens. On the contrary, the expressions of PLUNC protein, haptoglobin and IgJ decreased. **Conclusion** The six kinds of proteins might be the biomarkers of AR.

Key words: allergic rhinitis; biomarkers; proteomic

过敏性鼻炎(AR)又称变应性鼻炎,属鼻腔黏膜的变应性疾病,是特应性个体鼻腔黏膜对吸入空气中的某些成分如花粉、灰尘等高度敏感所致。AR 在过敏性疾病中发病率最高,经流行病学资料证实,保守估计全球有 5 亿人患有 AR,且近十年来其发病率有明显增加趋势^[1]。AR 病因复杂,临床症状多样,现有诊断方法缺乏特异性且具有创性,症状不典型或疾病早期的患者往往被漏诊。而当诊断不明时,不能及时给予干预及治疗使得鼻炎反复发作、甚至出现过敏性哮喘。因此探索和完善 AR 实验室检测方法至关重要^[2]。本研究采用蛋白质组学技术,通过对比分析 10 例 AR 患者与 20 例健康对照者受过敏原刺激前后鼻液的蛋白构成,筛选与 AR 相关的蛋白靶,以期发现可用于 AR 早期诊断的生物标记蛋白。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象及纳入标准 AR 组:2012 年 1 月至 2013 年 12 月在宁波市医疗中心李惠利医院耳鼻喉科门诊就诊的 AR 患者 10 例,年龄 18~42 岁。诊断标准:(1)出现喷嚏、清水样涕、鼻塞、鼻痒等 2 项以上(含 2 项)临床症状,且每天症状持续或累计在 1 h 以上;(2)鼻黏膜苍白、水肿,鼻腔水样分泌物;(3)皮肤点刺试验呈阳性;(4)血清特异性 IgE(sIgE)抗体阳性^[3]。10 例患者均经病史、皮肤点刺试验或血清 sIgE 检测确认对户尘螨过敏。10 例患者受试前均于鼻部症状缓解期,近 3 周内无呼吸道感染疾病及服用相关抗过敏性药物史。对照组:来自于同期在宁波市医疗中心李惠利医院体检的 20 例健康者,年龄 20~37 岁。符合以下条件:(1)参与本研究测试前 3

周无上呼吸道感染史及服用相关抗过敏性药物史。(2)无吸烟史及职业性刺激性化学物暴露史。(3)无鼻部疾病和其他过敏性疾病既往史、家族史。(4)经血清 sIgE 检测户尘螨特异性抗体阴性。所有对象均在知情同意下,自愿参与本次研究。

1.1.2 样本采集 参考文献[4]的方法,将 AR 组与对照组分别使用户尘螨进行鼻黏膜激发试验,即将吸有 16 μ L 户尘螨抗原提取液(含 0.375% 碳酸氢钠、0.5% 氯化钠、0.4% 酚)的滤纸紧贴于双侧下鼻甲前端黏膜处持续 10 min 或症状出现时。分别在刺激前、刺激后用 15 mL 生理盐水对鼻腔进行缓慢灌洗,收集灌洗液,离心后取其上清,于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 IPGhor 等电聚焦仪、DALI-SIX SDS-PAGE 电泳仪及 ImageScanner 扫描仪由 GE Healthcare 公司提供;PDquest8.0 分析软件由 Bio-Rad 公司提供;ABI 5800 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪。蛋白定量试剂盒(2-D Quant kit),尿素、二硫苏糖醇(DTT)、IPG 干胶条(24 cm, pH 3~10)购自 GE 公司,三氯乙酸(TCA)、十二烷基磺酸钠(SDS)、硝酸银均购自 Amresco 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 样本的制备 取待测鼻腔灌洗液 10 mL,加入 1 mL TCA(终浓度 10%),振荡混匀后于 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min 后离心(12 000 r/min, 10 min),去除上清液,向沉淀中加入 1 mL 丙酮(-20 $^{\circ}$ C 预冷),剧烈振荡混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,此步重复 1 次以保证 TCA 完全除去,最后将离心管在室温放置 60 min,沉淀干燥后溶解于 UK 溶液[9.5 mol/L 尿素,5 mmol/L 碳酸钾,1.25% SDS,0.5% DTT,2% 两性载体电解

质(pH3~10),6% Triton X-100]中,利用蛋白定量试剂盒(2-D Quant kit)调整蛋白浓度为 10 μg/μL。

1.3.2 向凝胶电泳 取 200 μg 蛋白样品,与一定量的样品水化液充分混合,使得总体积为 450 μL。在聚焦槽中缓慢加入蛋白样品,将 IPG 胶条置在聚焦槽中,在每根胶条的支持膜面缓慢加上 2 mL 覆盖油,准备完毕后开始按如下参数设置等电聚焦程序。等电聚焦参数:温度 20 ℃、最大电流为每片胶条 50 μA。等电聚焦程序:50 V×12 h(step)、500 V×1 h(step)、1 000 V×1 h(step)、1 000~10 000 V(gradient)×1 h、10 000 V×10 h(step)。胶条平衡及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳:等电聚焦结束后,将胶条放入含 10 mL 平衡缓冲液的平衡管中,室温缓慢水平摇晃平衡 15 min,将胶条放到第二向 SDS-PAGE 胶上表面,并充分接触。待琼脂糖完全凝固后,将凝胶转移至电泳槽中按如下参数进行电泳。电泳设置为 100 V,45 min;200 V 电泳至溴酚蓝指示剂到凝胶底部。

1.3.3 图像采集与分析 将凝胶采用银染进行染色,染色后的凝胶应用 ImageScanner 扫描仪进行扫描,扫描模式为灰度模式,光密度值为 300 dpi。使用 PDquest8.0 分析软件对图像进行分析,主要操作包括凝胶蛋白点检测、图像背景扣除、蛋白点灰度值标准化、不同凝胶间蛋白点匹配。选取蛋白斑点表达差异大于 1.5 倍且 2 组间蛋白差异表达率经 χ^2 检验 $P<0.05$ 的斑点作为差异表达蛋白。

1.3.4 质谱鉴定 将选取的差异蛋白点的凝胶送往上海博苑生命科技有限公司使用 ABI 5800 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪进行质谱鉴定。质谱结果进入 UniProt 或 SwissProt 数据库进行检索。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,对分类变量进行 χ^2 检验,对连续性变量进行 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料比较 AR 组与对照组一般情况比较(见表 1),AR 组血清总 sIgE 率高于对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 AR 组及对照组一般资料比较

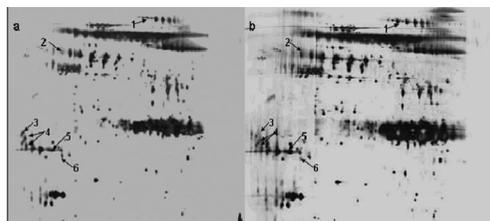
项目	对照组	AR 组	P
n	20	10	—
性别比(男/女,n)	8/12	4/6	>0.05
年龄(岁)	30.50±7.68	29.85±5.18	>0.05
体质量指数(kg/m ²)	22.50±2.80	22.80±3.04	>0.05
户尘螨皮肤点刺试验阳性例数(n)	0	10	—
基础鼻症状总评分*	0.68±1.03	0	—
血清总 sIgE 率[n(%)]	6(30)	10(100)	<0.05

*:基础鼻症状总评分:流涕、喷嚏、鼻塞、鼻痒,分别按 0(无症状)、1、2、3(严重)分进行评分后计算总得分。—:无数据。

2.2 双向凝胶电泳图像分析结果 经双向凝胶电泳分析,AR 组与对照组均可得到较为理想的蛋白质表达谱。用 PDquest8.0 分析软件筛选出 8 个差异蛋白点。因部分蛋白点丰度值较低,或不易于分离,最终选取 6 个蛋白质进行质谱分析(见图 1)。

2.3 质谱分析结果 经 ABI 5800 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪成功鉴定 6 个差异蛋白,AR 组患者经户尘螨抗原刺激发

生 AR 后,乳铁蛋白、APOA1、 α 1-抗胰蛋白酶等 3 种蛋白表达上调[上调率分别为 90% (9/10)、100% (10/10)、80% (8/10)],PLUNC 蛋白、结合珠蛋白、IgJ 等 3 种蛋白表达下调[下调率分别为 80% (8/10)、90% (9/10)、80% (8/10)],而在对照组中表达无明显改变。



a:鼻黏膜激发试验前;b:鼻黏膜激发试验后;1:乳铁蛋白;2: α 1-抗胰蛋白酶;3:IgJ;4:胰、肺及鼻咽上皮克隆(PLUNC)蛋白;5:载脂蛋白 A1(APOA1);6:结合珠蛋白。

图 1 AR 患者鼻黏膜激发试验前后鼻腔灌洗液双向凝胶电泳图

3 讨 论

AR 的典型临床表现为喷嚏、鼻塞、鼻痒、流清水样涕,可伴有眼部发痒、结膜充血等症状,其病因复杂,诊断和治疗均比较困难,并且是过敏性哮喘的高危因素,常发生在过敏性哮喘发病前期或发病初期^[1]。当诊断不明时,往往治疗不及时且反复发作、甚至发生过敏性哮喘。临床上采用病史结合诊断性试验(包括皮肤过敏原点刺试验及放射性过敏原吸附试验检测血清 sIgE 抗体)来诊断 AR^[3]。但临床上出现喷嚏、流涕等症状常不能与病毒感染很好地区分,且上述 2 种实验方法均存在一定的局限性,如皮肤反应试验有潜在风险,并且测试结果的解释较复杂,需要受过训练的专职人员进行。血清 sIgE 抗体检测相对灵敏度低,检测费用高,难于大范围推广。因此,寻找一种方便、快速、经济、特异度高的 AR 早期诊断方法显得尤为重要。

蛋白质组学技术是继基因组后的一种高通量的研究方法,近年来广泛应用于人类疾病研究,运用蛋白质组学技术研究 AR 患者鼻液中分泌蛋白组成,不仅能找出鼻液中蛋白质的差异表达并能将其分离鉴定,本研究应用蛋白质组学技术分析 10 例 AR 患者发病前后鼻腔灌洗液蛋白质成分的变化,筛选出 6 种差异蛋白,通过与对照组的比较,初步确认为 AR 的相关蛋白。

AR 是患者接触变应原后主要由 IgE 介导的,并有多免疫活性细胞如肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和细胞因子参与的鼻黏膜非感染性炎症性疾病,常有黏膜上皮细胞变性、杯状细胞增多、炎性细胞浸润、血管通透性增加、分泌亢进等改变。AR 患者鼻液中的细胞因子、免疫因子其种类和数量在发病前后会有明显改变^[5]。乳铁蛋白在人类呼吸道黏膜下腺体及其分泌物中广泛存在,同时也存在于中性粒细胞颗粒中^[6],具有参与铁的转运、促进细胞生长、广谱抗菌、抗氧化、抗炎、调节免疫系统等多种生物学功能^[7-8]。本研究发现,AR 患者在接受过敏原刺激后在其鼻腔液中乳铁蛋白表达明显上调,而另有文献报道在 AR 患者血液中乳铁蛋白水平却较健康人低^[4]。这一发现说明乳铁蛋白参与鼻黏膜的过敏性炎症反应,起到防御作用,可考虑将其列为 AR 的新型生物标志物。

PLUNC 家族蛋白是另一类呼吸道特殊的分泌蛋白,是一种新型的呼吸道防御分子,已有研究发现其具有抵抗细菌、类

原体、病毒作用^[9-10]。Ghafari 等^[6]发现吸烟患者鼻腔灌洗液中 PLUNC 蛋白水平较非吸烟者低。Lindahl 等^[11]发现在职业性刺激性化学物接触者,鼻分泌物中 PLUNC 水平较健康人低。本研究中,有 8 例 AR 患者在过敏原刺激后 PLUNC 蛋白表达下调(下调率 80%),这与 Ghafari 等^[12]的研究结果较一致,具体机制有待进一步研究。APOA1 主要存在于血浆及乳糜微粒中,参与脂代谢及信号传导作用,有研究发现 APOA1 具有抑制 IL-1、IL-8 等因子抑制中性粒细胞功能的作用^[13],亦有研究显示在学龄儿童体内 APOA1 水平升高与过敏性哮喘关系密切^[14]。本研究发现在接受变应原刺激后,AR 患者鼻液中 APOA1 表达升高,说明 AR 患者发病时血管通透性升高,但 APOA1 在 AR 中的作用尚不明确。

α -抗胰蛋白酶是具有蛋白酶抑制作用的一种急性时相反应蛋白,它不仅作用于胰蛋白酶,同时也作用于糜蛋白酶、尿激酶、胶原酶、弹性蛋白酶、纤溶酶和凝血酶等,与这些酶结合,抑制其活性,从而增加细胞生物膜稳定性,起到抗炎、防御作用。本研究发现在 AR 患者接受过敏原刺激后,其鼻腔灌洗液中 α -抗胰蛋白酶表达上调,说明 α -抗胰蛋白酶在 AR 患者鼻黏膜中具有保护上皮细胞、减少黏膜损伤作用,是 AR 急性发病的一种自我防御、修复作用。

结合珠蛋白是肝脏合成的一种糖蛋白,分布在血清中,与游离血红蛋白结合成稳定的复合物,被单核-巨噬细胞系统吞噬、降解,从而减少游离血红蛋白。结合珠蛋白同时又是一种急性期时相反应蛋白。当机体处于应激状态时,血液中的结合珠蛋白明显增多。本研究中,在受过敏原刺激后的 AR 患者鼻液中,结合珠蛋白表达明显上调,但其具体机制及生物学功能尚不明确,推测可能与急性反应及血管通透性增加有关。

本研究采用蛋白质组学技术方法筛选出 AR 患者在受过敏原刺激后鼻腔灌洗液的差异表达蛋白,初步探索了 AR 的生物标记物,以期能为开发特异度高、快捷、经济的 AR 早期诊断方法提供依据。

参考文献

[1] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008[J]. *Allergy*, 2008, 63(86): 8-160.

[2] 许以平. 过敏性疾病实验室检测方法的完善刻不容缓[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(8): 673-675.

[3] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2009 年,

武夷山)[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(12): 977-978.

[4] Choi GS, Shin SY, Kim JH, et al. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(3): 403-410.

[5] Jun SW, Kim TH, Lee HM, et al. Overexpression of the anaphylatoxin receptors, complement anaphylatoxin 3a receptor and complement anaphylatoxin 5a receptor, in the nasal mucosa of patients with mild and severe persistent allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(1): 119-125.

[6] Ghafari B, Ståhlbom B, Tagesson C, et al. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting[J]. *Proteomics*, 2002, 2(1): 112-120.

[7] Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, et al. Lactoferrin in health and disease[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007, 61: 261-267.

[8] Niehaus MD, Gwaltney JM, Hendley JO, et al. Lactoferrin and eosinophilic cationic protein in nasal secretions of patients with experimental rhinovirus colds, natural colds, and presumed acute community-acquired bacterial sinusitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(8): 3100-3102.

[9] Zhou HD, Li XL, Li GY, et al. Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 309(1/2): 191-197.

[10] Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, et al. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(5): 1201-1206.

[11] Lindahl M, Ståhlbom B, Tagesson C. Identification of a new potential airway irritation marker, palate lung nasal epithelial clone protein, in human nasal lavage fluid with two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(9): 1795-1800.

[12] Ghafari B, Irander K, Lindbom J, et al. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(2): 330-338.

[13] Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Hatanaka E, et al. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions[J]. *Lipids*, 2002, 37(9): 925-928.

[14] Nagel G, Koenig W, Rapp K, et al. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009, 20(1): 81-88.

(收稿日期: 2014-03-18)

(上接第 3026 页)

分布特点及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(5): 575-578.

[8] 谭文婷, 邓国宏, 王宇明, 等. 重庆地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(24): 2321-2323.

[9] 蒋音, 蔡枫. 乙型肝炎病毒基因分型与临床意义[J]. *中华传染病杂志*, 2007, 24(6): 417-419.

[10] 闵志军, 徐培君, 张力超, 等. 常州地区乙型肝炎病毒基因分型及 HBV DNA 定量的临床研究[J]. *现代实用医学*, 2009, 21(2): 99-100.

[11] 于欣, 葛宪民, 李丹亚, 等. 广西乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(2): 174-

179.

[12] 黄海燕, 孟祥伟, 张玲玲. 长春地区乙型肝炎病毒基因分型与肝病发病关系的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12): 1057-1060.

[13] 雷建华, 梁骏, 杨旭, 等. 各种临床类型乙型肝炎病例血清 HBeAg/HBeAb 和 HBV DNA 定量分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(17): 2493-2496.

[14] 董榕峰, 丁艾昆, 孙玉秋, 等. 乙型肝炎病毒基因分型与 YMDD 变异的关系及其临床意义研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(6): 1458-1459.

(收稿日期: 2014-01-08)