

- Fibre Toxicol, 2013, 10 (1): 3.
- [11] Rabolli V, Badissi A A, Devosse R, *et al.* The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles [J]. Part Fibre Toxicol, 2014, 11 (1): 69.
- [12] Song L, Weng D, Liu F, *et al.* Tregs promote the differentiation of Th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice [J]. PLoS One, 2012, 7 (5): e37286.
- [13] Lo Re S, Dumoutier L, Couillin I, *et al.* IL-17A-producing gammadelta T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis [J]. J Immunol, 2010, 184 (11): 6367-6377.
- [14] Huh JR, Littman DR. Small molecule inhibitors of ROR γ 1: targeting Th17 cells and other applications [J]. Eur J Immunol, 2012, 42 (9): 2232-2237.
- [15] Allison SJ. Fibrosis: Regulation of fibrotic signalling by TGF- β receptor tyrosine phosphorylation [J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10 (9): 484.
- [16] Scabilloni JF, Wang L, Antonini JM, *et al.* Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288 (4): L709-717.
- [17] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease [J]. Nat Med, 2012, 18 (7): 1028-1040.
- [18] Barbarin V, Xing Z, Delos M, *et al.* Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288 (5): L841-848.
- [19] Yao SQ, Rojanasakul LW, Chen ZY, *et al.* Fas/FasL pathway-mediated alveolar macrophage apoptosis involved in human silicosis [J]. Apoptosis, 2011, 16 (12): 1195-1204.
- [20] Joshi GN, Knecht DA. Silica phagocytosis causes apoptosis and necrosis by different temporal and molecular pathways in alveolar macrophages [J]. Apoptosis, 2013, 18 (3): 271-285.
- [21] He J, Wang Y, Xu LH, *et al.* Cucurbitacin IIa induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances autophagy in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16 (1): 27-34.
- [22] Chen S, Yuan J, Yao S, *et al.* Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis [J]. Autophagy, 2015, 11 (12): 2346-2357.
- [23] Stegmann KA, De Souza JB, Riley EM. IL-18-induced expression of high-affinity IL-2R on murine NK cells is essential for NK-cell IFN- γ production during murine Plasmodium yoelii infection [J]. Eur J Immunol, 2015, 45 (12): 3431-3440.
- [24] Schell U, Simon S, Hilbi H. Inflammasome recognition and regulation of the legionella flagellum [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2016, 397 (6): 161-181.
- [25] He X, Qian Y, Li Z, *et al.* TLR4-Upregulated IL-1 β and IL-1RI promote alveolar macrophage pyroptosis and lung inflammation through an autocrine mechanism [J]. Sci Rep, 2016, 6 (8): 31663.

尘肺生物样本库蛋白组学的应用展望

贺今, 刘光峰, 崔萍

(山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062)

摘要: 职业性尘肺病是我国发病率和死亡率最高的职业病, 尘肺病是以进行性肺间质纤维化为特征的肺部疾病, 但临床缺乏特效药物及早期筛选的分子标志物, 利用生物样本库及蛋白组学技术, 筛选和研究尘肺病患者血液、支气管肺泡灌洗液等特异性蛋白的差异表达, 将有利于特效药物的研发及早期分子标志物的建立。

关键词: 生物样本库; 尘肺; 蛋白组学

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2017)06-0434-03 DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2017.06.010

Prospects on application of pneumoconiosis proteomics biobank

He Jin, Liu Guangfeng, Cui Ping

(Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Ji'nan 250062, China)

Abstract: The pneumoconiosis had the highest morbidity and mortality among occupational diseases in China. Pneumoconiosis was occupational lung disease characterized by progressive pulmonary fibrosis, but clinical treatments lacked of efficacious drug and molecular marker in early diagnosis. Differential protein expression of blood samples and bronchoalveolar lavage fluid were analyzed by tissue of biobanks and proteomics technology. This would made for development of efficacious drug and establishment of molecular marker in early diagnosis.

Key words: biobank; pneumoconiosis; proteomics

目前尘肺病仍是我国发病率最高的职业病, 由于易合并

肺癌、慢阻肺、肺结核等疾病, 致死率和致残率都很高。尘肺生物样本库是一种收集、处理、存储和应用各种尘肺生物标本及患者相关信息用于临床诊疗和分子靶向学研究的生物系统。患者血液、组织等生物样本的采集和保存将为进行的

收稿日期: 2017-09-18; 修回日期: 2017-11-10

作者简介: 贺今 (1975—), 女, 副主任医师, 博士研究生, 从事职业病临床治疗工作。

基因组学及蛋白质组学研究提供保证。生物样本库是临床进行差异化研究的主要依据,尤其基于生物样本库的蛋白质组学研究是目前的热点问题^[1],全面公开的数据库将提供极好的药物靶标和疾病的生物标志物^[2]。蛋白质组 (proteome) 是指特定时期内一个细胞、组织或器官乃至一种生物的遗传信息所翻译转录的全部蛋白质,既包括一个基因组直接翻译和转录后的蛋白,也包括转录和翻译后的修饰蛋白。蛋白质组学 (proteomics) 是从宏观上对蛋白质的转录水平、翻译后的修饰以及蛋白质之间相互作用的研究,因此蛋白质组学不仅是对蛋白质的定性和定量研究,也是从整体角度分析细胞内蛋白定位、修饰、蛋白-蛋白相互作用、联系,从而揭示蛋白质功能的研究^[3]。目前对尘肺治疗仍然无特效药物,病理生理的蛋白质组学 (biology/disease-driven human proteome project, B/DHPP) 研究将有助于疾病的诊断、分期及治疗^[4],因此开展蛋白质组学研究已经被很多学者用于筛选尘肺的分子生物学标志物,具有较高的应用价值,尤其是有关肺巨噬细胞在尘肺发生发展中所起重要作用的研究。蛋白质组学是了解尘肺发病机制的重要手段,对尘肺早期诊断和筛选药物的治疗靶点以及为不同期别尘肺及不同合并症 (如结核、肺癌、COPD 等) 患者制定个体化治疗具有重要意义。

1 尘肺患者肺组织、细胞生物标本库蛋白质组学的应用

1.1 支气管肺泡灌洗液巨噬细胞蛋白质组学研究

以往将支气管肺泡灌洗液 (BALF) 作为各种职业性间质性肺病 (包括石棉肺、煤工尘肺、矽肺、硬金属肺病等) 的诊断生物标本^[5]。现在已经进一步证明肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AM) 是粉尘作用的主要靶细胞,在尘肺进行性肺纤维化发展中起着重要作用^[6,7],是患者脱离粉尘作业仍进行性发展的主要原因。尽管高千伏 X 线片、胸部 DR 及高分辨 CT 诊断技术水平不断提高,但对于尘肺与特发性肺纤维化、肺结核等鉴别诊断仍然是临床挑战。BALF 可以为尘肺临床诊断提供依据,尤其对于叁期尘肺大阴影与肺癌的鉴别诊断,可以提高确诊率及减少经皮穿刺活检等创伤性操作对患者的肺部损害。BALF 中 AM 蛋白测定可以对不同期别尘肺纤维化的具体作用机制进行研究,如韩亚凤等^[8]对矽肺患者 BALF 中的 AM 与内质网应激和自噬相关蛋白表达进行了研究,发现矽肺患者 AM 的葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78)、Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 蛋白相对表达水平增高,并与矽肺纤维化进展呈正相关。孙海霞等^[9]也对矽肺患者 BALF 中 AM 的 GRP78、Beclin1、LC3 蛋白表达及 CAAT 区/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP) 进行了检测,表明促凋亡的 CHOP 蛋白在尘肺患者中增高且与其纤维化程度呈正相关,但 GRP78 在纤维化程度较轻时为上调,而进展到叁期尘肺时表现为下调。袁腾^[10]等研究表明,AM 线粒体凋亡相关蛋白天氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 Caspase-9、Caspase-3 和细胞色素 C (CytC) 的蛋白相对表达水平随矽肺期别增高而升高,且与不同粉尘的致纤维化刺激程度相关。以上研究有望进一步明确与尘肺纤维化程度相对应的蛋白生

物标志物。采用 HOPE (hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect, 羟乙基哌嗪乙磺酸-谷氨酸介导的具有保护作用的有机溶剂) 新的无福尔马林固定技术对 BALF 灌洗细胞进行储存固定^[11]后能使 RNA、DNA 及蛋白高质量保存,HOPE-BAL 技术由于对核酸 (RNA、DNA) 蛋白质保存完好,可对尘肺等职业性肺病患者 BALF 的 AM 细胞进行免疫组织化学、原位杂交、荧光定量聚合酶链反应、基因芯片分析及蛋白质免疫印迹等检测,因此 HOPE-BAL 是筛选不同期别尘肺生物标志物和分析差异蛋白的较好工具。对于叁期尘肺、尘肺结核患者,由于在病变基础上易于进展为疤痕癌而不利于影像学的早期鉴别诊断,在获得 BALF 的同时可以采用活检术获得新鲜冰冻组织^[12],对新鲜冰冻肺组织病理切片检查结合新一代基因测序 (next-generation DNA/RNA sequencing, NGS) 技术能筛选致病性突变和甲基化位点,为尘肺临床鉴别诊断提供服务。

1.2 肺组织蛋白质组学研究

王晓飞等^[13]在特发性肺纤维化患者活检肺组织中发现正常肺组织高表达的窑蛋白-1 明显降低,窑蛋白-1 的降低与肺纤维化的形成与发展密切相关,而 p-Smad 2 和 p-Smad 3 蛋白则与纤维化程度呈正相关,从而推测窑蛋白-1 可能是干预肺纤维化潜在分子靶点,恢复窑蛋白-1 功能的药物研究有望成为抗肺纤维化治疗的研究方向。范晶晶等^[14]应用蛋白质组学技术发现微小 RNA (miRNA)-149 在矽肺肺纤维化小鼠肺组织中表达降低,表明 miRNA-149 通过负调控 IL-6 在抗肺纤维化过程中发挥重要作用。miR-486-5p 在矽肺和特发性肺纤维化患者和小鼠肺组织中均表达降低,表明 miR-486-5p 具有很强的抗肺纤维化活性作用^[15]。这也预示对以进行性肺组织弥漫性纤维化为特征的尘肺病,生物样本库蛋白质组学的研究有助于进一步验证及发现可靠的分子标志物及治疗靶点。

1.3 利用差异蛋白质组学进行抗尘肺纤维化机制的研究

比较蛋白质组学能够较为全面地对生理和病理过程中的蛋白质在表达数量、表达水平和修饰状态上的差异进行比较,可以发现与病变相关的特异蛋白质。因此通过比较蛋白质组学技术,分析、寻找与矽肺发病学相关的特异性蛋白质,同时针对筛选的差异性蛋白选择靶向治疗的抗尘肺纤维化药物。徐洪等^[16]对 *N*-乙酰-丝氨酸-天门冬氨酸-赖氨酸-脯氨酸 (*N*-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline, Ac-SDKP) 在防治矽肺纤维化作用方面进行了研究,通过比较蛋白质组学技术手段,筛选到与矽肺发生、发展和 Ac-SDKP 抗矽肺纤维化作用密切相关的差异蛋白,如热休克蛋白 60 (heat shock protein, Hsp60)、氯离子通道蛋白 5 (chloride intracellular channel 5, CLIC5),随矽肺纤维化程度的加重表现为进行性降低,而采用药物保护和干预治疗后可恢复正常。

2 尘肺血清、痰液、尿液生物样本的蛋白质组学应用

缪荣明等^[17]采用双向凝胶电泳技术结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 的蛋白质组学技术分析了矽肺患者血清蛋白表达变化,发现白细胞介素-6、角蛋白 K6、C-fos、MEdullasin 等蛋白在矽肺组中高表达,提示上述差异表

达的蛋白参与矽肺纤维化形成,可作为矽肺诊断与鉴别诊断的蛋白标志物。肺表面活性蛋白 D (surfactant protein D, SP-D) 为肺高度特异性蛋白。吴友茹等^[18]检测了特发性肺纤维化患者外周血血清上清液、诱导痰上清液源自肺泡上皮蛋白 SP-D 水平,发现 SP-D 是预测特发性肺纤维化急性加重期和缓解期的有价值的生物标志物,能反映肺纤维化的进展。Bonella F 等^[19]研究认为,在 BALF 及血清中肺上皮细胞衍生蛋白如 (Krebs von den lungen-6, KL-6) 以及肺表面活性蛋白 SP-D、SP-A 是预测肺纤维化进展程度及肺功能损伤的重要指标,能较好地反映尘肺等肺纤维化疾病严重程度,为未来仅采用血清或痰液标本预测尘肺药物疗效提供了可能。Liou^[20]检测暴露于 SiO₂ 粉尘的工人血清、尿液标本中 8-氧鸟嘌呤 (8-oxodG) 明显高于不接触粉尘的工人,建议将尿液样本 8-oxodG 作为生物标志物。Huang^[21]应用液相色谱-串联质谱法蛋白质组学技术测定 COPD 患者血、尿锁链素较正常健康者明显增高,表明血、尿液锁链素是弥散功能受损的 COPD 等肺部疾病患者靶向治疗的分子标志物,为尘肺合并 COPD 或者严重纤维化致肺弥散功能损伤的患者提供了可能的分子标志物及治疗靶点。

3 问题和展望

尘肺病是长期吸入二氧化硅等矿物性粉尘引起的以肺组织纤维化为主的疾病,表现为进行性间质纤维化,最终导致呼吸衰竭和死亡,容易合并 COPD、气胸、肺感染、肺结核等并发症。其发病机制主要包括:(1)吸入的 SiO₂ 等粉尘颗粒引起肺部炎症和致纤维化作用^[22];(2)宿主因素包括基因易感性^[23]、氧化应激与细胞因子的失衡^[24]、细胞凋亡异常^[25]。最近在 BALF、血清等尘肺样本中差异蛋白质组学的研究结果已经表明尘肺发病机制与蛋白表达异常密切相关,由于进行性纤维化很难用单一的生物标志物来说明,适宜的生物学标志物对于尘肺早期诊断和治疗效果监测具有重要价值,高质量的生物样本对于应用蛋白质组学技术开展尘肺个体化治疗是非常必要的。BALF、血液样本、尿液样本是尘肺生物样本库的基础,持续改善样本库的质量控制和标准化建设是开发靶向药物的关键,也为尘肺的诊断、分期及药物疗效预测提供帮助。

参考文献:

[1] Merali S, Barrero CA, Bowler RP, *et al.* Analysis of the plasma proteome in COPD: Novel low abundance proteins reflect the severity of lung remodeling [J]. COPD, 2014, 11 (2): 177-189.

[2] Lindskog C. The potential clinical impact of the tissue-based map of the human proteome [J]. Expert Review of Proteomics, 2015, 12 (3): 1-3.

[3] Mahiya S. Proteomics [J]. Lap Lambert Academic Publishing, 2012, 108 (4): 499-511.

[4] Markovarga G, Omenn GS, Paik YK, *et al.* A first step toward completion of a genome-wide characterization of the human proteome [J]. Journal of Proteome Research, 2016, 12 (1): 1-5.

[5] Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? [J]. European Respiratory Journal, 2011, 38 (4): 761-769.

[6] 姚三巧, 陈志远, 卢遥, 等. 矽肺病患者肺泡巨噬细胞死亡受体表达及意义 [J]. 中国职业医学, 2013, 40 (2): 91-94.

[7] Costantini LM, Gilberti RM, Knecht DA. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica [J]. PLoS One, 2011, 6 (2): e14647.

[8] 韩亚凤, 孙海霞, 王忠艳, 等. 内质网应激及自噬相关蛋白在矽肺患者肺泡巨噬细胞中表达研究 [J]. 中国职业医学, 2015, 42 (1): 23-28.

[9] 孙海霞, 姚三巧, 韩亚凤, 等. 内质网应激凋亡相关基因 mRNA 在矽肺患者肺泡巨噬细胞表达研究 [J]. 中国职业医学, 2015, 42 (3): 274-279.

[10] 袁腾, 黄娜, 陈刚, 等. 矽肺患者肺泡巨噬细胞线粒体凋亡相关蛋白表达及其意义 [J]. 中国职业医学, 2013, 40 (5): 394-397.

[11] Marwitz S, Abdullah M, Vock C, *et al.* HOPE-BAL: improved molecular diagnostics by application of a novel technique for fixation and paraffin embedding [J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59 (6): 601-614.

[12] Bins S, Cirkel GA, Gadellaa-Van Hooijdonk CG, *et al.* Implementation of a multicenter biobanking collaboration for next-generation sequencing-based biomarker discovery based on fresh frozen pretreatment tumor tissue biopsies [J]. Oncologist, 2016, 22 (1): 33-40.

[13] 王晓飞, 丁辉, 周凤秋, 等. 特发性肺纤维化患者肺组织中窖蛋白-1 和细胞外基质的表达 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35 (5): 336-339.

[14] 范晶晶, 吉晓明, 王莎莎, 等. 二氧化硅诱导的肺纤维化中 miR-149 对白细胞介素-6 的调节 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 2014, 32 (3): 161-167.

[15] Ji XM, Wu BQ, Fan JJ, *et al.* The anti-fibrotic effects and mechanisms of microrna-486-5p in pulmonary fibrosis [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14131.

[16] 徐洪, 薛新新, 杜世璞, 等. Ac-SDKP 抗矽肺纤维化作用的比较蛋白质组学研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32 (8): 561-567.

[17] 缪荣明, 丁帮梅, 张颖轶, 等. 矽肺与慢性支气管炎患者蛋白质谱变化的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33 (8): 589-591.

[18] 吴友茹, 陈明勇, 朱静. 肺纤维化患者血清及诱导痰肺表面活性蛋白水平测定及意义 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12 (3): 350-351.

[19] Bonella F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease-associated interstitial lung disease [J]. Seminars in Respiratory & Critical Care Medicine, 2014, 35 (2): 181.

[20] Liou SH, Chen YC, Liao HY, *et al.* Increased levels of oxidative stress biomarkers in metal oxides nanomaterial-handling workers [J]. Biomarkers, 2016, 21 (7): 600-606.

[21] Huang JT, Chaudhuri R, Albarbarawi O, *et al.* Clinical validity of plasma and urinary desmosine as biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease [J]. Thorax, 2012, 67 (6): 502-508.

[22] Li C, Du S, Lu Y, *et al.* Blocking the 4-1BB pathway ameliorates crystalline silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice [J]. Theranostics, 2016, 6 (12): 2052-2067.

[23] 蒲新明, 刘培成. 尘肺肺纤维化易感性基因的研究现状 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008, 26 (11): 696-698.

[24] 顾春晖, 刘移民. 粉尘致肺纤维化机制研究现状 [J]. 热带医学杂志, 2009, 9 (5): 582-584.

[25] 姚三巧. 死亡受体调控的尘肺发病新机制 [J]. 新乡医学院学报, 2016, 33 (2): 81-86.