

· 论著 ·

基于同位素标记的相对和绝对定量的糖尿病 并发肺结核患者血浆蛋白质组学研究

吴明歧¹ 闫世春² 刘玉琴³ 郭鑫³ 王美杰¹ 田晶¹ 侯绍英¹

【摘要】 目的: 比较糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者与糖尿病并发肺结核(diabetes mellitus complicated with pulmonary tuberculosis, DM-PTB)患者的血浆蛋白质谱差异, 筛选 DM-PTB 潜在蛋白质生物标志物, 为进一步探索 DM-PTB 的发病机制提供思路。方法: 采用回顾性研究的方法, 选取于 2017 年 1 月至 2018 年 1 月在黑龙江省传染病防治院确诊的 DM 患者和 DM-PTB 患者各 16 例, 采用基于同位素标记的相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)蛋白质组学技术分析两组间血浆蛋白质谱, 以 DM-PTB 组对 DM 组蛋白表达量变化倍数 >1.2 或 <0.83 且 $P<0.05$ 为标准筛选差异蛋白, 并对差异蛋白进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析等生物信息学分析。结果: 共筛选出 275 个差异表达蛋白, 其中有 111 个在 DM-PTB 组上调, 有 164 个在 DM-PTB 组下调。GO 分析显示, 差异表达蛋白富集数目最多的生物学过程为细胞过程(92.00%, 253/275), 定位于细胞器(87.27%, 240/275), 分子功能为结合(90.55%, 249/275)。KEGG 代谢通路分析显示, 差异表达蛋白共富集到 26 条代谢通路(错误发现率 <0.05), 富集数目最多的通路为黏着斑通路(22 个蛋白), 此外 PI3K-Akt 信号通路、胆固醇代谢通路、血小板激活通路、吞噬体通路和补体及凝血通路等与糖脂代谢和免疫相关的通路也发生了变化。结论: 本研究通过 iTRAQ 蛋白质组学方法筛选出了 DM-PTB 患者的差异表达蛋白, 发现这些差异表达蛋白参与了与细胞活动、糖脂代谢和免疫调节相关的信号通路, 提示上述通路的变化可能与 DM-PTB 的发病密切相关。

【关键词】 糖尿病; 结核, 肺; 同位素标记; 蛋白质组学; 血浆

【中图分类号】 R587.1; R521; Q493.2

Plasma proteomics analysis of diabetic patients complicated with pulmonary tuberculosis by iTRAQ technology WU Ming-qi¹, YAN Shi-chun², LIU Yu-qin³, GUO Xin³, WANG Mei-jie¹, TIAN Jing¹, HOU Shao-ying¹. ¹Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; ²Division of Chronic Disease Control and Community Health, Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China; ³Infectious Disease Hospital of Heilongjiang Province, Harbin 150500, China Corresponding author: HOU Shao-ying, Email: hsy3982@163.com

【Abstract】 **Objective:** To analyze the difference in plasma protein mass spectrum between diabetic (DM) patients and diabetic patients complicated with pulmonary tuberculosis (DM-PTB), screen potential protein biomarkers of DM-PTB, and to provide basis for further pathogenesis exploration. **Methods:** A retrospective study was conducted in 16 DM and 16 DM-PTB patients from Infectious Disease Hospital of Heilongjiang Province between January 1, 2017 and January 1, 2018. The plasma protein mass spectra between the two groups were analyzed by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) proteomics technology. The differential proteins were screened according to the following criteria: fold of protein expression change in DM-PTB compared to DM >1.2 or <0.83 , and $P<0.05$. The differential proteins were analyzed by bioinformatics, such as Gene Ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, and so on.



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口, 提供丰富的线上扩展功能, 包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.19982/j.issn.1000-6621.20210659

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81872615); 黑龙江省

自然科学基金青年项目(QC2018092)

作者单位: ¹ 哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 哈尔滨 150081; ² 黑龙江省疾病预防控制中心慢性非传染性疾病预防与控制所, 哈尔滨 150030; ³ 黑龙江省传染病防治院, 哈尔滨 150500

通信作者: 侯绍英, Email: hsy3982@163.com

Results: A total of 275 differentially expressed proteins were selected out, among which 111 were up-regulated and 164 were down-regulated in DM-PTB. GO analysis showed that the biological process with the largest number of differentially expressed proteins was cellular process (92.00%, 253/275), located in organelle (87.27%, 240/275) and the molecular function was binding (90.55%, 249/275). KEGG pathway analysis showed that the differentially expressed proteins were enriched into 26 pathways (false discovery rate < 0.05) and focal adhesion was the pathway with the largest number of enrichment (22 proteins). Moreover, changes were also found in PI3K-Akt signaling pathway, cholesterol metabolism, platelet activation, phagosome, complement and coagulation pathways, et al., which related to glucose and lipid metabolism and immunity. **Conclusion:** In this study, differentially expressed proteins of DM-PTB patients were screened by iTRAQ quantitative proteomics, and they were involved in signaling pathways related to cellular activity, glucose and lipid metabolism, and immune regulation, suggesting that the changes of pathways mentioned above may be closely related to the pathogenesis of DM-PTB.

【Key words】 Diabetes mellitus; Tuberculosis, pulmonary; Isotope labeling; Proteomics; Plasma

【Fund program】 National Natural Science Foundation of China (81872615); Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation of China (QC2018092)

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 患病的重要危险因素^[1]。DM 可使 PTB 的患病风险增加 1.5~7.8 倍^[2-3], 与此同时, 糖尿病并发肺结核 (DM-PTB) 会增加 PTB 的治疗难度, 更易出现不良治疗结局^[4]。因此, 在 DM 患者中早期诊断 PTB, 对于结核病的防控及后续的治疗具有重要意义。然而, PTB 的诊断方法仍有一定局限性, 不利于疾病的早期诊断^[5-6]。为此, 深入探索 DM-PTB 的发病机制, 识别特异性的生物分子用于 PTB 诊断尤为关键。蛋白质组学在筛选生物标志物, 探寻疾病的发病机制方面得到了广泛应用^[7]。与传统的双向凝胶电泳结合质谱的方法相比, 基于同位素标记的相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 蛋白质组学技术具有一致率高, 标记过程简单、反应迅速等特点, 并且在检测前排除血浆中大量高丰度蛋白的遮蔽作用, 具有较好的检测效能^[8-9]。因此, 笔者采用 iTRAQ 蛋白质组学技术, 比较 DM 和 DM-PTB 患者的血浆蛋白质表达差异, 筛选潜在蛋白生物标志物, 为在 DM 患者中早期诊断 PTB 提供思路。

资料和方法

一、研究对象

采用回顾性研究的方法, 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月于黑龙江省传染病防治院确诊的 DM 患者 (DM 组) 和具有 DM 病史且新诊断 PTB 的患者 (DM-PTB 组) 作为研究对象。其中, DM 组 16 例, DM-PTB 组 16 例; 所有研究对象均为汉族。DM 诊断参照美国糖尿病协会制定的标准^[10], PTB 诊断参照《WS 288—2008 肺结核诊断标准》^[11]。排除肿瘤、肝硬化等重病患者; 乙型肝炎病毒和 HIV 感染

者; 妊娠和哺乳期女性; 服用过抗结核药物者。采用加入乙二胺四乙酸的抗凝采血管收集研究对象的清晨空腹静脉血 10 ml, 4 °C 3000×g 离心 10 min, 收集上清液于 -80 °C 保存, 以备后续分析。所有研究对象均经知情同意。

二、仪器与主要试剂

1. 仪器: UltiMate3000 型高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Easy1200 超高压纳升级液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 高 pH 值反相色谱柱 C₁₈ 1.7 μm, 100 mm×4.6 mm (美国 Phenomenex 公司), 纳升级分析柱 Acclaim PepMap C₁₈ 1.9 μm, 75 μm×250 mm (美国 Dionex 公司)。

2. 主要试剂: 尿素 (美国 Gibco BRL 公司), 二硫素糖醇 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 碘乙酰胺 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 甲酸 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 乙腈 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 三乙基碳酸氢铵 (美国 Santa Cruz 公司), 测序级胰蛋白酶 (美国 Promega 公司), 三氟乙酸 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 碳酸氢铵 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 8 标 iTRAQ 试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司), Top12 高丰度蛋白去除试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

三、样品处理

采用 8 标 iTRAQ 试剂对患者血浆样品进行标记, 将每组的样品分别按随机数字表排列, 依次每 4 例血浆样品混为 1 个样品进行检测, 最终每组各得到 4 个混合样品。使用 Top12 高丰度蛋白去除试剂盒对血浆样品中的高丰度蛋白进行去除后, 加入 1.5 μg 胰蛋白酶于 37 °C 酶切 12 h, 对酶切后的样品真空冷冻干燥以备后续使用。

用 100 μ l 超纯水溶解干燥的样品。采用 8 标 iTRAQ 试剂在室温条件下与样品反应 2 h, 对肽段进行标记。待反应终止, 将标记后的肽段样品加入除盐柱内除盐, 收集洗脱溶液并冷冻干燥备用。

四、液相色谱串联质谱检测

使用 100 μ l 10 mmol/L 的碳酸氢铵水溶液溶解标记肽段, 采用 UltiMate3000 型高效液相色谱仪和 Easy1200 超高压纳升级液相色谱仪进行分离。经液相色谱分离后的标记肽段采用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行检测, 在正离子模式下采集信号, 一级扫描范围为 350~1600 m/z。

五、统计学处理

将质谱数据导入到 Proteome Discoverer 1.4 软件中进行数据处理, 采用 Mascot 2.3 软件进行搜库, 数据库为 Swiss-Prot 数据库。以 DM-PTB 组对 DM 组蛋白表达量变化倍数 (fold change, FC) > 1.2 或 < 0.83 且 $P < 0.05$ 为标准, 筛选差异表达蛋白。采用 RStudio 1.2 软件对差异表达蛋白进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 采用火山图和层次聚类热图对差异蛋白表达情况进行可视化, 以错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 为差异有统计学意义。

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析, 正态分布的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”描述, 组间差异的比较采用两独立样本 t 检验; 偏态分布的计量资料以

“ $M(Q_1, Q_3)$ ”描述, 组间差异的比较采用两独立样本 Mann-Whitney U 检验; 计数资料以“构成比 (%)”描述, 组间差异的比较采用 Fisher 精确概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、基本信息

DM-PTB 组和 DM 组的年龄、性别分布、糖尿病病程、空腹血糖及胰岛素使用情况差异均无统计学意义。DM-PTB 组体质量指数明显低于 DM 组, 口服降糖药者的比例明显低于 DM 组, 差异有统计学意义 (表 1)。

二、DM-PTB 患者血浆差异表达蛋白鉴定

在两组研究对象中共检测到 902 个蛋白, 筛选出 DM-PTB 组对 DM 组的差异表达蛋白有 275 个, 其中在 DM-PTB 组中表达上调的蛋白有 111 个, 在 DM-PTB 组中表达下调的蛋白有 164 个。采用火山图对差异蛋白的筛选结果进行可视化, 见图 1; 采用层次聚类热图对差异蛋白的表达量及样品的聚类情况进行可视化 (图 2), 可见差异蛋白呈明显聚类趋势, DM-PTB 组和 DM 组的样品具有明显的分组现象, 说明各组内样品一致性较好。

在筛选出的 275 个差异表达蛋白中, 进一步列出变化最为显著的前 20 个蛋白, 如表 2 所示, 其中, 在 DM-PTB 组患者血浆中表达上调和下调最明显的蛋白分别是 C 反应蛋白和胸腺素 β_4 。

表 1 不同特征在 DM-PTB 组和 DM 组研究对象中的分布情况

特征	DM-PTB 组 (16 例)	DM 组 (16 例)	统计检验值	P 值
年龄 [岁, $M(Q_1, Q_3)$]	52.50 (43.25, 65.50)	56.50 (46.00, 63.50)	$U=142.500$	0.584
性别 [例 (构成比, %)]			—	1.000
男性	9 (56.3)	8 (50.0)		
女性	7 (43.7)	8 (50.0)		
体质量指数	22.36 \pm 3.03	27.54 \pm 3.78	$t=-4.274$	< 0.001
糖尿病病程 (年, $\bar{x} \pm s$)	5.35 \pm 2.94	7.36 \pm 3.07	$t=-1.888$	0.069
空腹血糖 [mmol/L, $M(Q_1, Q_3)$]	7.92 (7.12, 11.27)	7.24 (6.54, 10.32)	$U=104.000$	0.366
使用胰岛素 [例 (构成比, %)]			—	0.458
是	9 (56.3)	12 (75.0)		
否	7 (43.7)	4 (25.0)		
口服降糖药 [例 (构成比, %)]			—	0.002
是	1 (6.3)	10 (62.5)		
否	15 (93.7)	6 (37.5)		

注 DM-PTB: 糖尿病并发肺结核; DM: 糖尿病; “—”表示采用 Fisher 精确概率法检验

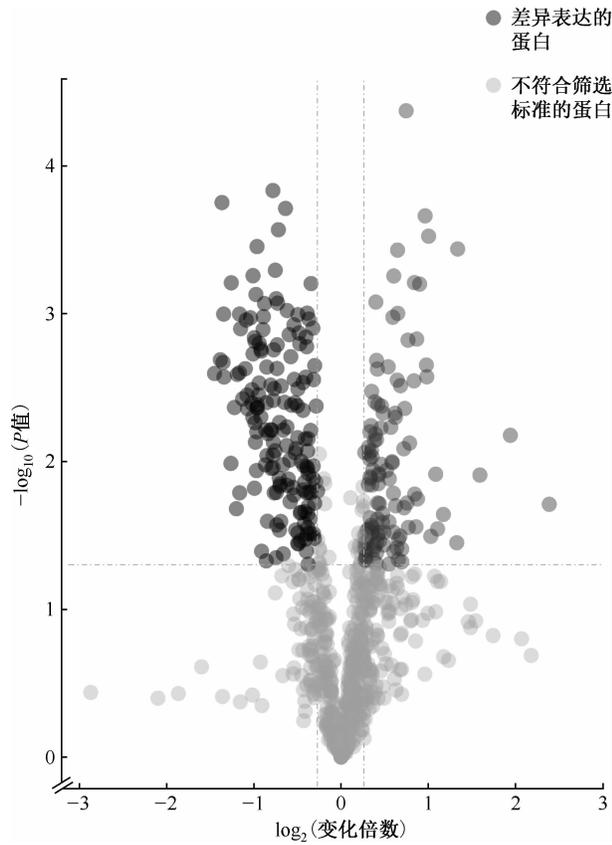
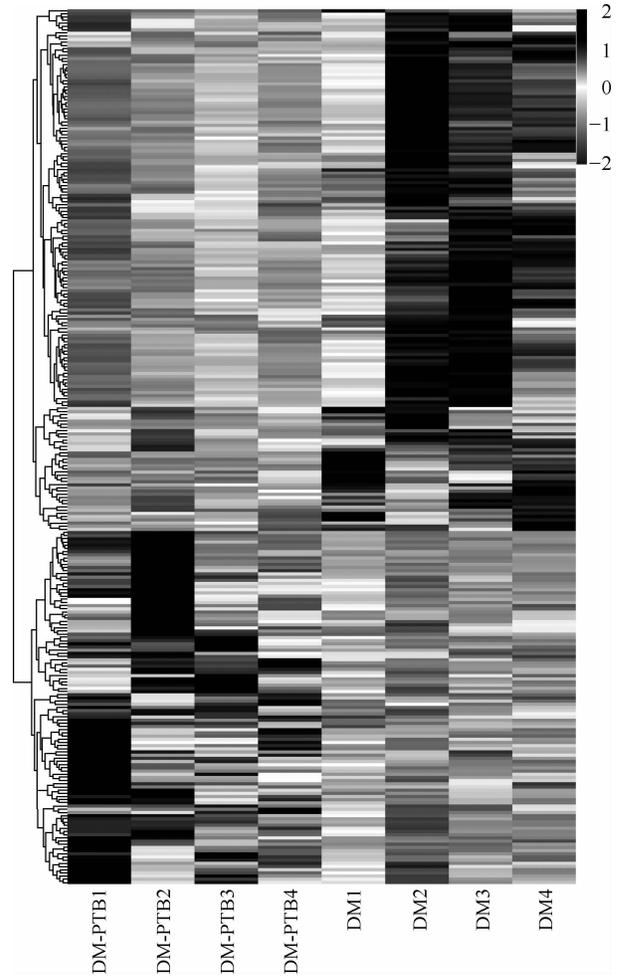


图 1 糖尿病并发肺结核患者与糖尿病患者差异表达蛋白筛选结果火山图



注 DM-PTB:糖尿病并发肺结核;DM:糖尿病
图 2 糖尿病并发肺结核患者与糖尿病患者差异表达蛋白层次聚类热图

表 2 20 个糖尿病并发肺结核患者与糖尿病患者显著差异表达蛋白

序号	基因	蛋白名称	FC 值	P 值	表达趋势
P02741	<i>CRP</i>	C 反应蛋白	5.22	0.019	↑
P0DJI9	<i>SAA2</i>	血清淀粉样蛋白 A2	3.84	0.007	↑
P02763	<i>ORM1</i>	α1 酸性糖蛋白 1	3.01	0.012	↑
Q96IU4	<i>ABHD14B</i>	α/β 水解酶结构域蛋白 14B	2.53	<0.001	↑
Q9NP78	<i>ABCB9</i>	ATP 结合盒式亚族 B 成员 9	2.51	0.035	↑
Q13126	<i>MTAP</i>	S-甲基化-5'-腺苷磷酸化酶	2.25	0.023	↑
P02679	<i>FGG</i>	纤维蛋白原 γ 链	2.15	0.029	↑
P11226	<i>MBL2</i>	甘露糖结合凝集素	2.12	0.012	↑
P02675	<i>FGB</i>	纤维蛋白原 β 链	2.04	0.032	↑
P02750	<i>LRG1</i>	富亮氨酸 α-2 糖蛋白 1	2.00	<0.001	↑
Q9P1F3	<i>ABRACL</i>	Costars 家族蛋白 ABRACL	0.44	0.021	↓
Q9HBI1	<i>PARVB</i>	β-parvin	0.43	0.004	↓
P12814	<i>ACTN1</i>	α-辅肌动蛋白 1	0.42	<0.001	↓
P23284	<i>PPIB</i>	肽基-脯氨酰顺-反异构酶 B	0.42	0.010	↓

续表 2

序号	基因	蛋白名称	FC 值	P 值	表达趋势
P09104	ENO2	烯醇化酶 γ	0.39	0.003	↓
Q92686	NRGN	神经颗粒素	0.39	0.001	↓
P62158	CALMI	钙调蛋白	0.39	0.002	↓
Q5VZ66	JAKMIP3	Janus 激酶与微管相互作用蛋白 3	0.39	<0.001	↓
P37802	TAGLN2	转凝蛋白 2	0.38	0.002	↓
P62328	TMSB4X	胸腺肽 $\beta 4$	0.37	0.003	↓

注 FC:糖尿病并发肺结核组对糖尿病组蛋白表达量变化倍数;↑表示在糖尿病并发肺结核组上调,↓表示在糖尿病并发肺结核组下调

三、差异表达蛋白的功能注释

GO 分析从细胞组成、分子功能和生物过程等 3 个方面对蛋白质进行注释,进一步解释差异蛋白的生物学功能。GO 分析表明,275 个差异表达蛋白分别富集了 178 条细胞组成术语、76 条分子功能术语和 865 条生物过程术语(FDR<0.05),其中,富集蛋白数目最多的前 10 条术语如表 3 所示。细胞组成中富集差异蛋白数目最多的是细胞器(87.27%,240/275),此外差异蛋白还定位于细胞内(83.27%,229/275)、膜结合细胞器(83.27%,229/275)、细胞内组分(82.91%,228/275)和细胞质(81.45%,224/275)等部位。分子功能中富集差异蛋白数目最多的是结合(90.55%,249/275),此外差异蛋白还具有蛋白结合(90.36%,225/249)、负离子结合(27.31%,68/249)、蛋白复合体结合(25.70%,64/249)和同一蛋白结合(25.30%,63/249)等功能。生物过程中富集差异蛋白数目最多的是细胞过程(92.00%,253/275),此外差异表达蛋白还参与生物调节(80.73%,222/275)、生物过程调节(78.55%,216/275)、刺激反应(77.09%,212/275)和细胞过程调节(75.64%,208/275)等生物过程。

四、差异蛋白的代谢通路分析

为了深入探索差异蛋白参与的代谢通路,利用 KEGG 数据库对上述差异蛋白进行富集分析,结果表明,275 个差异表达蛋白共富集到 46 条代谢通路,其中有统计学意义的通路有 26 条(FDR<0.05),如表 4 所示。差异表达蛋白富集数目最多的通路为黏着斑通路(22 个蛋白)。此外,差异蛋白还参与 PI3K-Akt 信号通路(17 个蛋白)、血小板激活通路(14 个蛋白)、吞噬体通路(11 个蛋白)、胆固醇代谢通路(9 个蛋白)和补体及凝血通路(8 个蛋白)等与糖脂代谢和免疫相关的通路。

表 3 差异表达蛋白的 GO 分析

序号	功能名称	富集差异蛋白数量
细胞组成		
GO:0043226	细胞器	240
GO:0005622	细胞内	229
GO:0043227	膜结合细胞器	229
GO:0044424	细胞内组分	228
GO:0005737	细胞质	224
GO:0005576	细胞外区	218
GO:0044444	细胞质组分	213
GO:0044421	胞外区组分	205
GO:0043229	胞内细胞器	202
GO:0005615	细胞外间隙	198
分子功能		
GO:0005488	结合	249
GO:0005515	蛋白结合	225
GO:0043168	负离子结合	68
GO:0044877	蛋白复合体结合	64
GO:0042802	同一蛋白结合	63
GO:0036094	小分子结合	62
GO:0005102	信号受体结合	61
GO:0019899	酶结合	61
GO:0098772	分子功能调节器	59
GO:0097367	碳水化合物衍生物结合	57
生物过程		
GO:0009987	细胞过程	253
GO:0065007	生物调节	222
GO:0050789	生物过程调节	216
GO:0050896	刺激反应	212
GO:0050794	细胞过程调节	208
GO:0051179	定位	182
GO:0051716	细胞刺激反应	167
GO:0032501	多细胞生物过程	160
GO:0051234	建立定位	154
GO:0006810	转运	153

表 4 差异表达蛋白的 KEGG 通路分析

序号	通路名称	富集差异蛋白数量
hsa04510	黏着斑通路	22
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	17
hsa04810	肌动蛋白细胞骨架调节通路	15
hsa04611	血小板激活通路	14
hsa04015	Rap1 信号通路	12
hsa04512	ECM 受体交互作用	11
hsa01200	碳代谢通路	11
hsa04514	细胞黏着分子通路	11
hsa04145	吞噬体通路	11
hsa00010	糖酵解/糖异生通路	10
hsa05146	阿米巴通路	10
hsa04530	紧密连接通路	10
hsa04979	胆固醇代谢通路	9
hsa05100	上皮细胞细菌侵入通路	9
hsa05132	沙门菌感染通路	9
hsa04670	白细胞跨内皮迁移通路	9
hsa05130	致病性大肠杆菌感染通路	8
hsa05412	右心室心率失常心肌病通路	8
hsa04610	补体及凝血通路	8
hsa05410	肥厚性心肌病通路	8
hsa05414	扩张性心肌病通路	8
hsa05131	志贺菌通路	7
hsa04520	黏着连接通路	7
hsa01230	氨基酸生物合成通路	7
hsa05020	朊病毒通路	6
hsa05144	疟疾通路	6

讨 论

DM-PTB 的发病机制较为复杂,除感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 外,还与免疫、遗传和代谢等多种因素有关^[12-14],因此,有必要采用系统生物学方法进行研究。Zhang 等^[15]比较了 DM-PTB 和 PTB 患者的血浆蛋白质表达差异,证实蛋白质组学在探索 DM-PTB 机制方面具有广泛的应用潜力;然而,该研究的设计与本研究正好相反,且选用方法的检测能力较低。为此,笔者采用 iTRAQ 蛋白质组学方法,对 DM-PTB 和 DM 患者的血浆进行研究,共筛选出 275 个差异表达的蛋白,为后续探讨 DM-PTB 发病机制及早期诊断 PTB 提

供依据。

年龄、性别及糖尿病病程与 DM-PTB 的发病密切相关^[16],因此,在人群招募时笔者对上述因素进行匹配,排除了混杂因素对结果的影响。两组患者在降糖药使用方面存在差异,可能是由于单纯使用胰岛素的 DM 患者血糖控制较差,易成为 DM-PTB 患者^[17],但两组患者的空腹血糖水平相似,说明两组患者是具有可比性的。此外,笔者还发现 DM-PTB 组患者的体质量指数低于 DM 组,推测原因是 PTB 作为一种消耗性疾病,易造成患者营养不良,从而引起能量的明显缺乏^[18]。

在笔者筛选出的显著差异表达蛋白中,急性期蛋白如 C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A2、 α_1 酸性糖蛋白 1、纤维蛋白原和甘露糖结合凝集素等在 DM-PTB 组表达明显上调,该类蛋白通常无明显的组织特异性,在机体发生感染和炎症时呈上升趋势。富亮氨酸 α_2 糖蛋白 1 可通过调节体内转化生长因子 β 通路参与炎症过程, Garay-Baquero 等^[19]发现 PTB 患者血浆中富亮氨酸 α_2 糖蛋白 1 表达水平明显高于健康对照组,提示该蛋白可能在 PTB 发生发展中起重要作用。本研究发现,DM-PTB 患者血浆内上述参与炎症过程的蛋白均明显增高,说明与 DM 患者相比,DM-PTB 患者体内的炎症状态明显加重。胸腺肽 β_4 是由胸腺组织分泌的具有生理活性的多肽, Kang 等^[20]发现 PTB 患者肺部肉芽肿组织内胸腺肽 β_4 高表达,且该蛋白与低氧诱导因子 1α 和血管内皮生长因子介导的炎症和血管再生有关。笔者研究发现,DM-PTB 患者血浆中胸腺肽 β_4 下调,可能与其被募集到肺部组织内有关。此外,笔者还发现钙调蛋白、 α -辅肌动蛋白 1 和 β -parvin 等与细胞自噬和结构变化有关的蛋白发生改变,这与 MTB 感染机体后引起细胞介导的免疫反应过程相适应。除上述蛋白外,笔者还发现了 α/β 水解酶结构域蛋白 14B、ATP 结合盒式亚族 B 成员 9、神经颗粒素和转凝蛋白 2 等差异蛋白。既往研究表明,这些蛋白与神经系统疾病和多种癌症相关^[21-24],但对于其与 DM-PTB 的关系仍需进一步研究。

本研究通过 GO 分析对差异蛋白进行功能注释,发现细胞器的差异蛋白富集度最高。细胞器可合成并分泌多种蛋白质,参与多项细胞功能。在细胞内的众多细胞器中,溶酶体与细胞自噬、机体免疫防御和病原体清除密切相关,可通过与吞噬小体结合形成吞噬溶酶体,进一步杀死和降解病原体。MTB 在侵袭巨噬细胞后,可抑制细胞内吞噬小体

成熟或干扰吞噬溶酶体的形成,进而达到抑制细胞自噬,促进 MTB 在胞内存活的作用^[25]。此外,笔者发现差异蛋白的分子功能与其参与的生物学过程相适应,主要通过结合的方式,参与包括细胞过程、生物调节、生物过程调节和刺激反应在内的多种生物学过程,提示上述生物学过程可能在 DM-PTB 发展过程中起着重要作用。

本研究对差异蛋白进行 KEGG 代谢通路分析后发现,黏着斑信号通路富集到的蛋白数目最多,提示该通路可能与 DM-PTB 发病密切相关。MTB 感染机体后主要引起细胞免疫,黏着斑作为细胞与细胞外基质连接的主要方式,在维持细胞运动张力、促进细胞增殖和细胞生存信号传递方面发挥重要作用^[26]。既往研究表明,DM 和 PTB 患者体内差异表达分子均富集到了黏着斑通路,提示该通路可能与 DM 和 PTB 的发病相关^[27-28]。与此同时,笔者发现差异表达蛋白还参与了 PI3K-Akt 信号通路、血小板激活通路、胆固醇代谢通路、吞噬体通路、补体及凝血通路等与糖脂代谢和免疫调节相关的信号通路。PI3K-Akt 信号通路是黏着斑通路的下游通路之一,在葡萄糖转运、调节蛋白质和脂肪代谢等方面发挥重要作用^[29]。彭文光等^[30]发现,活动性结核病患者外周血 T 淋巴细胞和 Treg 细胞的 PI3K-Akt-mTOR 通路各分子表达下调,提示该通路处于相对抑制状态。由此可见,加强对 PI3K-Akt 信号通路内相关蛋白的研究可能有助于进一步揭示 DM-PTB 的发病机制。众所周知,血小板在炎症及免疫功能调节过程中发挥重要作用。Xu 等^[31]发现,DM-PTB 患者的平均血小板体积高于 PTB 患者,但低于 DM 患者,提示血小板的形态变化可能与 DM-PTB 的发生有关。此外,DM 患者免疫抑制和血脂代谢异常等状态,增强了机体对 MTB 的易感性,进一步促进 DM-PTB 的发生发展^[32]。

综上所述,本研究从蛋白质组学的角度初步比较了 DM 和 DM-PTB 患者血浆蛋白质表达的差异,筛选出了可能与 DM-PTB 发病密切相关的蛋白,进一步发现 DM-PTB 患者体内与细胞活动、糖脂代谢和免疫调节相关的信号通路发生了显著变化。下一步,作者将结合本研究鉴定到的蛋白和代谢通路继续研究,深入发掘 DM-PTB 的发病机制,以期寻找特异性的蛋白标志物,实现对 DM-PTB 的早期识别和诊断。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.
- [2] Lönnroth K, Roglic G, Harries AD. Improving tuberculosis prevention and care through addressing the global diabetes epidemic: from evidence to policy and practice. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(9): 730-739. doi:10.1016/s2213-8587(14)70109-3.
- [3] Stevenson CR, Critchley JA, Forouhi NG, et al. Diabetes and the risk of tuberculosis: a neglected threat to public health? *Chronic Illn*, 2007, 3(3): 228-245. doi:10.1177/1742395307081502.
- [4] Baker MA, Harries AD, Jeon CY, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review. *BMC Med*, 2011, 9: 81. doi:10.1186/1741-7015-9-81.
- [5] Sotgiu G, Saderi L, Petruccioli E, et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*, 2019, 79(5): 444-453. doi:10.1016/j.jinf.2019.08.018.
- [6] Trébuq A, Enarson DA, Chiang CY, et al. Xpert® MTB/RIF for national tuberculosis programmes in low-income countries; when, where and how? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(12): 1567-1572. doi:10.5588/ijtld.11.0392.
- [7] 王玉. 蛋白质组学在人类疾病研究中的应用. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2013, 22(1): 48-52. doi:10.3969/j.issn.1006-298X.2013.01.012.
- [8] 高玉洁, 李俊明. 蛋白质组学技术在结核病诊断标志物筛选中的应用及进展. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43(8): 688-691. doi:10.3760/cma.j.cn112147-20190926-00649.
- [9] 张雪群, 姜颖, 厉有名, 等. 人血浆低丰度蛋白富集方法的研究进展. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(10): 947-950. doi:10.3760/j.issn:1009-9158.2006.10.030.
- [10] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care*, 2010, 33 Suppl 1 (Suppl 1): S11-61. doi:10.2337/dc10-S011.
- [11] 中华人民共和国卫生部. WS 288—2008 肺结核诊断标准. 2008-08-01.
- [12] Kumar NP, George PJ, Kumaran P, et al. Diminished systemic and antigen-specific type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines in diabetic and prediabetic individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis*, 2014, 210(10): 1670-1678. doi:10.1093/infdis/jiu329.
- [13] 张金凤, 吴坤, 李雨泽, 等. CC 趋化因子配体 1 基因多态性与 2 型糖尿病并发肺结核发病风险的关系. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(5): 398-401. doi:10.3969/j.issn.1006-6187.2016.05.003.
- [14] Bailey SL, Ayles H, Beyers N, et al. The association of hyperglycaemia with prevalent tuberculosis: a population-based cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1): 733. doi:10.1186/s12879-016-2066-1.
- [15] Zhang X, Ma A, Sun S, et al. Proteomic Analysis of Plasma in Adult Active Pulmonary Tuberculosis Patients with Diabetes Mellitus. *Clin Lab*, 2015, 61(10): 1481-1490. doi:10.7754/clin.lab.2015.150210.
- [16] Workneh MH, Bjune GA, Yimer SA. Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: A systematic review. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175925. doi:10.1371/journal.pone.0175925.
- [17] Chen Z, Liu Q, Song R, et al. The association of glycemic level and prevalence of tuberculosis: a meta-analysis. *BMC Endocr Disord*, 2021, 21(1): 123. doi:10.1186/s12902-021-00779-6.
- [18] Lu P, Zhang Y, Liu Q, et al. Association of BMI, diabetes,

- and risk of tuberculosis; a population-based prospective cohort. *Int J Infect Dis*, 2021, 109: 168-173. doi:10.1016/j.ijid.2021.06.053.
- [19] Garay-Baquero DJ, White CH, Walker NF, et al. Comprehensive plasma proteomic profiling reveals biomarkers for active tuberculosis. *JCI Insight*, 2020, 5(18): e137427. doi:10.1172/jci.insight.137427.
- [20] Kang YJ, Jo JO, Ock MS, et al. Over-expression of thymosin β_4 in granulomatous lung tissue with active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2014, 94(3): 323-331. doi:10.1016/j.tube.2014.01.003.
- [21] 张嘉泳, 柳维林, 陈立典, 等. 神经颗粒素对中枢神经系统疾病认知功能障碍作用的研究进展. *中国康复理论与实践*, 2020, 26(3): 325-329. doi:10.3969/j.issn.1006-9771.2020.03.012.
- [22] Aushev VN, Gopalakrishnan K, Teitelbaum SL, et al. Tumor expression of environmental chemical-responsive genes and breast cancer mortality. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(12): 843-851. doi:10.1530/erc-19-0357.
- [23] Kang YY, Li JJ, Sun JX, et al. Genome-wide scanning for CHD1L gene in papillary thyroid carcinoma complicated with type 2 diabetes mellitus. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(12): 2536-2547. doi:10.1007/s12094-021-02656-z.
- [24] Zhao Z, Lu L, Li W. TAGLN2 promotes the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by activating STAT3 signaling through ANXA2. *Oncol Lett*, 2021, 22(4): 737. doi:10.3892/ol.2021.12998.
- [25] 宁唤唤, 徐志凯, 柏银兰. 结核分枝杆菌调控宿主细胞自噬的分子机制研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(6): 849-853. doi:10.13423/j.cnki.cjmi.008178.
- [26] 吴艺舟, 严雨欣, 孙杰. 黏着斑信号通路调控肿瘤上皮间质转化的研究进展. *医学理论与实践*, 2015, 28(19): 2601-2604.
- [27] Xu MD, Wu XZ, Zhou Y, et al. Proteomic characteristics of circulating microparticles in patients with newly-diagnosed type 2 diabetes. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1): 209-220.
- [28] Fu Y, Yi Z, Li J, et al. Deregulated microRNAs in CD4⁺ T cells from individuals with latent tuberculosis versus active tuberculosis. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(3): 503-513. doi:10.1111/jcmm.12205.
- [29] 宋紫临, 吴丽丽, 秦灵灵, 等. PI3K/AKT 信号通路与糖尿病的研究进展. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(6): 1264-1269. doi:10.11842/wst.2019.06.032.
- [30] 彭文光, 张学璇, 谢汉彬, 等. 活动性结核病患者 T 淋巴细胞 PI3K-Akt-mTOR 信号通路活化状态研究. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(15): 2220-2226. doi:10.3760/cma.j.issn.1007-1245.2018.15.001.
- [31] Xu F, Qu S, Wang L, et al. Mean platelet volume (MPV): new diagnostic indices for co-morbidity of tuberculosis and diabetes mellitus. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 461. doi:10.1186/s12879-021-06152-1.
- [32] Segura-Cerda CA, López-Romero W, Flores-Valdez MA. Changes in Host Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection Associated With Type 2 Diabetes: Beyond Hyperglycemia. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 342. doi:10.3389/fcimb.2019.00342.

(收稿日期:2021-11-18)

(本文编辑:李敬文)