

DOI:10.13350/j.cjpb.230311

• 论著 •

基于数据非依赖采集技术的肝多房棘球蚴病患者血清差异蛋白质组学研究^{*}

汪伟¹, 刘光辉², 朱文君², 蔡其刚³, 王向前², 赵慧众², 韩秀敏^{2**}

(1. 国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室, 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏无锡 214064; 2. 青海省人民医院; 3. 青海省畜牧兽医科学院)

【摘要】 目的 基于数据非依赖采集(data-independent acquisition, DIA)的蛋白质组学技术筛选肝多房棘球蚴病血清差异表达蛋白, 为肝多房棘球蚴病早期诊断提供参考依据。 **方法** 收集经病理确诊的 10 例肝多房棘球蚴病患者及 10 例健康体检者血清, 提取总蛋白后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。对蛋白样品进行液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)鉴定, 对差异表达蛋白进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。 **结果** 在肝多房棘球蚴病患者和健康体检者间共鉴定出血清差异表达蛋白 99 种, 包括 41 种上调蛋白、58 种下调蛋白。韦恩分析发现, 肝多房棘球蚴病患者和健康体检者间存在 38 种特有血清差异表达蛋白, 其中上调蛋白有 8 种、下调蛋白 30 种。GO 富集分析显示, 肝多房棘球蚴病患者和健康体检者间差异表达蛋白注释到 23 个生物过程、20 个细胞组成、21 种分子功能; KEGG 通路分析发现, 肝多房棘球蚴病与健康体检者间血清差异表达蛋白均参与了补体和凝血级联反应路径。 **结论** 基于 DIA 技术初步建立了肝多房棘球蚴病患者及健康体检者的血清差异蛋白质图谱, 这些血清差异表达蛋白均参与了补体和凝血级联反应路径。

【关键词】 肝棘球蚴病; 多房棘球蚴病; 数据非依赖采集; 差异蛋白质组学

【中图分类号】 R532.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0303-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Mar;18(3):303-309.]

Serum differential proteomics analysis of hepatic echinococcosis patients based on data-independent acquisition

WANG Wei¹, LIU Guang-hui², ZHU Wen-jun², CAI Qi-gang³, WANG Xang-qian², ZHAO Hui-zhong², HAN Xiu-min² (1. National Health Commission Key Laboratory on Parasitic Disease Prevention and Control, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasites and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, Jiangsu, China; 2. Qinghai Provincial People's Hospital; 3. Qinghai Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, China) ^{***}

【Abstract】 Objective To screen serum differentially expressed proteins (DEPs) of hepatic alveolar echinococcosis (AE) patients based on data-independent acquisition (DIA) proteomics analysis, so as to provide insights into early diagnosis of hepatic AE. **Methods** Ten serum samples from patients with definitive diagnosis of hepatic AE and 10 serum samples from healthy volunteers were collected. Total proteins were extracted and subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein samples were characterized by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and the DEPs were subjected to GO term and KEGG pathway analyses. **Results** There were 99 serum DEPs between the hepatic AE patients and healthy volunteers, including 41 up-regulated proteins and 58 down-regulated proteins. Venn analysis revealed 38 serum DEPs between hepatic AE patients and healthy volunteers, including 8 up-regulated proteins and 30 down-regulated proteins. In addition, GO term analysis of the serum DEPs between hepatic AE patients and healthy volunteers were enriched in 23 biological processes, 20 cellular components and 21 molecular functions, and KEGG pathway analysis revealed that the serum DEPs between hepatic AE patients and healthy volunteers were all enriched in complement and coagulation cascades. **Conclusions** The serum DEPs profiles of hepatic AE patients and healthy volunteers have been preliminarily established

* **【基金项目】** 青海省重点研发与转化计划项目(No. 2019-HZ-803); 无锡市卫生健康委重大科研项目(No. Z202116); 江苏省无锡市“太湖之光”科技攻关项目(No. Y20212012)。

** **【通讯作者】** 韩秀敏, E-mail: qhxn_66@163.com

【作者简介】 汪伟(1982-), 男, 安徽无为, 副研究员, 主要从事寄生虫病学研究。E-mail: wangwei@jipd.com
汪伟和刘光辉为共同第一作者

based on DIA, and these DEPs are all involved in complement and coagulation cascades.

【Key words】 hepatic echinococcosis; alveolar echinococcosis; data-independent acquisition; differential proteomics

棘球蚴病是由棘球属绦虫幼虫感染引起的一种人兽共患寄生虫病,是严重危害人畜健康、影响社会经济和畜牧业发展的全球重要公共卫生问题之一^[1]。迄今已鉴定出至少8种棘球绦虫^[2],其中以细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫流行范围最广、引起的危害最大^[3]。目前,由细粒棘球绦虫幼虫感染引起的细粒棘球蚴病广泛分布于除南极洲外的其他六大洲,而由多房棘球绦虫幼虫感染引起的多房棘球蚴病则仅见于北半球^[4]。全球棘球蚴感染患者超过200万例,每年新发感染病例超过20万例,因棘球蚴病治疗及造成的畜牧业损失每年超过40亿美元^[5]。在流行区,细粒棘球蚴病年发病率为1/10万~200/10万,造成的疾病负担高达100万伤残调整生命年(DALYs);多房棘球蚴病年发病率为0.03/10万~1.2/10万,其造成的疾病负担亦高达67万DALYs^[6-7]。我国是全球棘球蚴病流行最严重的国家之一^[1]。2012-2016年全国棘球蚴病抽样调查结果显示,内蒙古自治区、四川省、西藏自治区、甘肃省、青海省、宁夏回族自治区、云南省、陕西省和新疆维吾尔自治区的368个县(市、区)存在棘球蚴病流行,其中115个县(市、区)存在细粒棘球蚴病和多房棘球蚴病混合流行;推算棘球蚴病患者166098例,人群棘球蚴病患率为0.28%,超过5000万人面临棘球蚴病威胁^[8]。我国细粒棘球蚴病疾病负担占全球总数的40%,因人体患病造成的经济损失占全球总数的30%;我国每年报道的多房棘球蚴病新发病例数占全球总数的91%,多房棘球蚴病疾病负担占全球总数的95%^[9-10]。

棘球蚴病患者在疾病早期一般无明显症状,多数患者在棘球蚴感染5~10年后才出现临床症状,且出现明显症状时往往已处于疾病晚期阶段,导致了患者预后不佳^[11]。目前,人体棘球蚴病诊断主要通过临床表现、影像学检测和血清免疫学检测,但超声、CT等影像学工具在感染早期难以准确检测和鉴别病灶性质,而血清学检测假阳性率较高^[12]。因此,筛选敏感性和特异性较高的免疫诊断标志物对于棘球蚴病早期诊断、患者预后改善具有重要意义。

数据非依赖采集技术(data-independent acquisition, DIA)是目前主流的一种蛋白质质谱定量技术,其采用二级质谱定量分析样品的差异表达蛋白,具有数据质量高、定量准确性高的优点^[13]。既往曾有学者采用DIA技术探索细粒棘球蚴和多房棘球蚴病小鼠模型中的差异表达蛋白^[14-15],但基于DIA技术分析人体肝多房棘球蚴病患者差异表达蛋白尚少见报

道。本研究采用DIA蛋白质组学技术对多房棘球蚴病患者血清样本进行分析,为筛选肝多房棘球蚴病患者血清诊断标志物提供参考依据。

对象与方法

1 研究对象

选择在青海省人民医院住院治疗的10例多房棘球蚴病患者为研究对象,选择同期健康体检者10例作为对照。多房棘球蚴病患者诊断均经血清学和病理学检测证实,且符合《包虫病诊断标准》(WS257-2006)^[16]。清晨采集患者空腹肘静脉血10 mL,4℃、1000 g离心10 min,收集血清至1.5 mL EP管中,-80℃保存备用。本研究与全部研究对象均签署知情同意书、经医院伦理委员会审核备案,并获得中华人民共和国科学技术部“中国人类遗传资源采集审批资格许可证”(编号:2021SQCJ0659)。

2 试剂和仪器

2.1 主要试剂 iRT标准肽段为瑞士Biognosys生物公司产品,BCA试剂盒、质谱级水、乙腈化学试剂购自美国ThermoScientific公司,蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)购自美国Amresco公司,预制胶购自美国Rosetta-Stone公司,考马斯亮蓝G-250购自美国Sigma公司,无水乙醇、异丙醇购自美国GENERAL-REAGENT公司,十二水合磷酸氢二钠、一水合磷酸二氢钠、氯化钠、40%丙烯酰胺/亚甲基双丙烯酰胺溶液(Acr-Bis)、pH值6.8和8.8的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、过硫酸铵、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、甘油、溴酚蓝、三氟乙酸(TFA)、碘乙酰胺、四乙基溴化铵(TEAB)购自中国生工生物工程(上海)股份有限公司。甘氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸均购自中国国药集团化学试剂有限公司,去高丰度蛋白试剂盒购自中国天津品心诺生物科技有限公司。

2.2 仪器设备 Q Exactive HF质谱仪、EASY-nLC 1200液相仪为美国ThermoFisher公司产品,ImageScanner扫描仪为美国GE Healthcare公司产品,Agilent 1100高分离度高效液相色谱仪(HPLC)为美国Agilent科技有限公司产品,台式冷冻离心机为上海卢湘仪离心机仪器有限公司产品,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)仪为北京市六一仪器厂产品。

3 方法

3.1 主要溶液配制 根据实验要求,按照说明书配制pH 7.2磷酸盐缓冲液(PBS)、2×Tris上样缓冲液、

Tris 电泳缓冲液、考马斯亮蓝 G-250 染色液和脱色液。

3.2 总蛋白提取 每个样品取 40 μL 血清,以结合缓冲液 10 倍稀释,加入到蛋白提取柱中,用收集管收集流出的样品。再次用 600 μL 结合缓冲液清洗柱体,收集洗脱组分,此为去除白蛋白/IgG 后的样本,真空冷冻干燥后备用。将冻干的样品加入 300 μL SDS 裂解液复溶,将溶液在室温下 12 000 g 离心 10 min。收集上清再次离心取上清,上清即为样品的总蛋白溶液,采用 BCA 法测定蛋白浓度后分装保存于 -80°C 备用。

3.3 总蛋白分离 每个样品取 10 μg 蛋白,采用 12% SDS-PAGE 进行总蛋白分离,分离后的凝胶采用考马斯亮蓝染色。染色后的凝胶应用 ImageScanner 扫描仪进行扫描,扫描模式为全彩模式。

3.4 胰蛋白酶酶解 根据测定的蛋白浓度,每个样品取 50 μg 蛋白,用裂解液将样品稀释调整到相同的浓度和体积。在蛋白溶液中加入 DTT 至终浓度为 4.5 mmol/L, 55°C 孵育 30 min。在冰上冷却直至室温后,加入相应体积的碘乙酰胺至终浓度为 9 mmol/L,充分混匀,室温避光放置 15 min。在上述溶液中加入 6 倍体积丙酮沉淀蛋白, -20°C 放置 4 h 或过夜。 4°C , 8 000 g 离心 10 min 后收集沉淀,挥发丙酮 2~3 min。加入 100 μL TEAB 复溶沉淀,加入 1/50 样品质量的 1 mg/mL 经 N-(对甲苯磺酰基)-L-苯丙氨酰甲基氯酮 (TPCK) 处理的胰蛋白酶, 37°C 消化过夜。加磷酸调 pH 值为 3,终止酶解反应。

3.5 肽段除盐 酶解后的肽段采用 C18 固相萃取柱脱盐。采用 1 mL 甲醇(含 0.1% TFA)冲洗酶解后的蛋白 1 次, 90% 乙腈-水 1 mL(含 0.1% TFA)冲洗 1 次,水(含 0.1% TFA)冲洗 1 次,样品加 1 mL 水(含 0.1% TFA)充分溶解,上样,靠重力自然吸附 3 次, 0.1% TFA-水冲洗 3 次用 90% 乙腈-水(含 0.1% TFA)靠重力自然洗脱 3 次,真空抽干, 60 μL 0.1% 甲酸-水复溶。

3.6 液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析 质谱进样前,每个样品按照体积比 iRT:待测样品 = 1:10 的体积比混合,作为内标。

3.6.1 高 pH 值液相分离 所有酶解后的样本取等量肽段混合,使用 Agilent 1100 HPLC 系统在 pH 值为 10 的流动相中分离组分。流动相 A:ACN- H_2O (2 : 98, v/v),流动相 B:ACN- H_2O (90 : 10, v/v),两个流动相均用氨水调节 pH 值至 10,流速:250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。梯度洗脱条件:0~10 min, 2% 流动相 B; 10~10.01 min, 2%~5% 流动相 B; 10.01~37 min, 5%~20% 流动相 B; 37~48 min, 20%~40% 流动相 B; 48~48.01 min, 40%~90% 流动相 B; 48.01~58 min, 90% 流动

相 B; 58~58.01 min, 90% 流动相 B; 58.01~63 min, 2% 流动相 B。从第 10 min 开始,依次每隔 1 min 收集洗脱液至 1~10 号离心管中,按顺序循环收取馏分,共收集 10 个组分。真空冷冻干燥抽干,样品冷冻保存,进行 LC-MS/MS 分析。

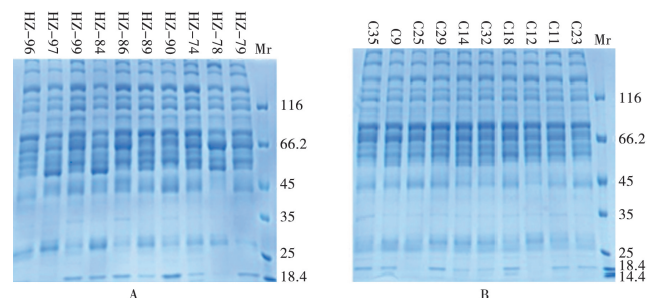
3.6.2 DIA 质谱扫描 液相洗脱流速 300 nL/min,缓冲液 A 为 0.1% 甲酸水溶液,缓冲液 B 为 0.1% 甲酸/80% 乙腈/20% 水溶液。每个样品酶解后的肽段单独上机采集,扫描范围设置为 350~1 250 m/z,隔离窗口 26 m/z。

3.6.3 数据解析和处理 将质谱输出的谱图与 FASTA 库产生的理论谱图进行匹配,将机器信号转变为肽段和蛋白序列信息,结合序列信息、肽段保留时间、碎片离子信息等进行谱图库建立和后续 DIA 分析。LC-MS/MS 原始文件导入 Spectronaut Pulsar 软件进行搜库建库。

结果

1 SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳结果显示,大部分蛋白条带清晰且重复性好,提示蛋白未降解,可用于进一步研究(图 1)。个别蛋白条带差异可能与个体差异有关,鉴定结果可能存在少许差异,但不影响整体分析。



注:A 多房棘球蚴病患者血清 SDS-PAGE 分析; B 健康体检者血清 SDS-PAGE 分析; Mr 蛋白分子标志物。HZ-96、HZ-97、HZ-99、HZ-84、HZ-86、HZ-89、HZ-90、HZ-74、HZ-78、HZ-79 多房棘球蚴病患者血清; C35、C9、C25、C29、C14、C32、C18、C12、C11、C23 健康体检者血清。

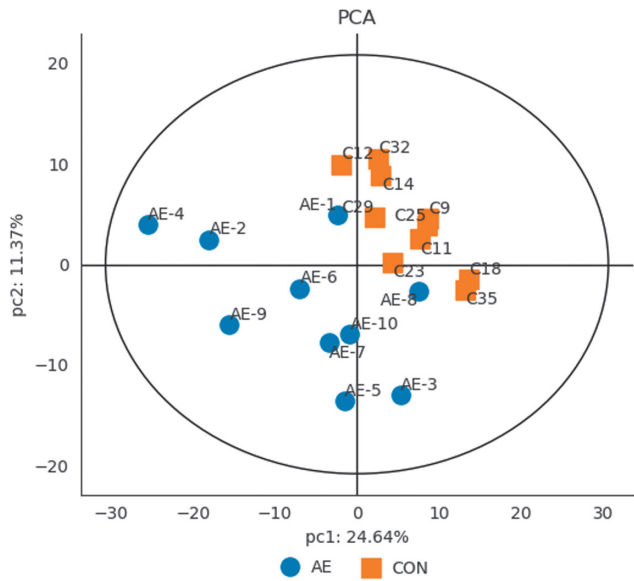
图 1 多房棘球蚴病患者和健康体检者血清 SDS-PAGE 鉴定

Note: A SDS-PAGE analysis of serum from patients with alveolarchinococcosis; B SDS-PAGE analysis of serum from healthy volunteers; Mr Protein marker; HZ-96, HZ-97, HZ-99, HZ-84, HZ-86, HZ-89, HZ-90, HZ-74, HZ-78 and HZ-79 Serum of patients with alveolarchinococcosis; C35, C9, C25, C29, C14, C32, C18, C12, C11 and C23 Serum of healthy volunteers.

Fig. 1 Identification of serum from alveolarchinococcosis patients and healthy volunteers by SDS-PAGE

2 DIA 定性分析和主成分分析

对 DIA 分析鉴定到的蛋白质和进行主成分分析发现,实验数据稳定可靠(图 2)。



注:图中每个点代表一个分组实验中的一次重复,不同颜色表示不同分组。 AE 多房棘球蚴病患者; CON 健康体检者。

图2 多房棘球蚴病患者和健康体检者血清蛋白主成分分析

Note: Each dot indicates a repeated assay, and the color indicates grouping. AE Alveolar echinococcosis patients; CON Healthy volunteers.

Fig. 2 Principal component analysis of serum proteins from alveolar echinococcosis patients and healthy volunteers

3 差异表达蛋白筛选与鉴定

共筛选出多房棘球蚴病患者和健康体检者血清差异表达蛋白 99 种,其中上调蛋白 41 种、下调蛋白 58 种。以差异倍数=1.5 和 P=0.05 绘制火山图见图 3。

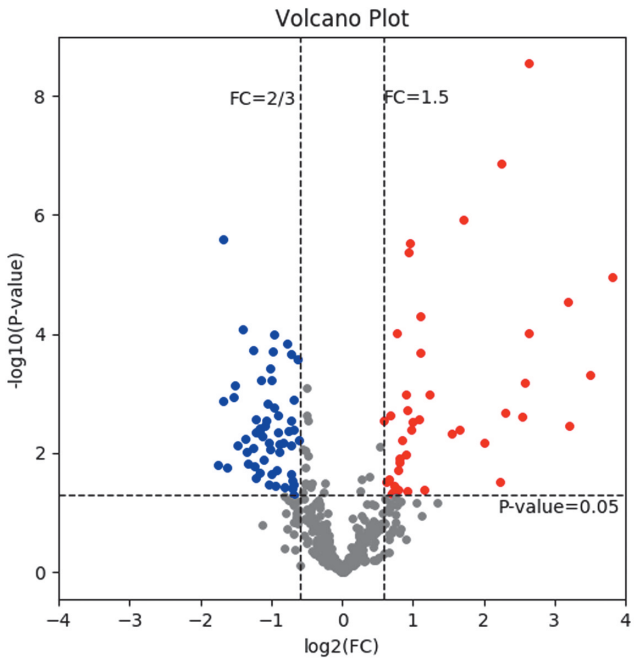


图3 多房棘球蚴病患者和健康体检者血清差异表达蛋白火山图
Fig. 3 Volcano plot representing the difference in serum proteins from alveolar echinococcosis patients and healthy volunteers

4 差异表达蛋白聚类分析

多房棘球蚴病患者和健康体检者间血清差异蛋白聚类分析结果见图 4。采用韦恩分析各组间差异蛋白特性和共性,其中多房棘球蚴病患者和健康体检者间存在 38 种特有差异表达蛋白,其中上调蛋白有 8 种、下调蛋白 30 种(表 1)。

表 1 多房棘球蚴病患者与健康体检者血清差异蛋白
Table 1 Serum differentially expressed proteins between alveolar echinococcosis patients and healthy volunteers

编号 No.	上调蛋白 Up-regulated protein	下调蛋白 Down-regulated protein
1	胰岛素样生长因子结合蛋白 2	谷胱甘肽过氧化物酶 3
2	甘露糖结合蛋白 C	α -胰蛋白酶抑制剂
3	富含亮氨酸的 α -2-糖蛋白	重链 H2
4	补体因子 B	α -2-HS-糖蛋白
5	角蛋白 I 型细胞骨架 10	免疫球蛋白重链 1-46
6	补体成分 C9	抑制酶 β C 链
7	氨基肽酶 N	白细胞介素 1 受体辅助蛋白
8	远上游元件结合蛋白 2	胰蛋白酶-1
9		纤维连接蛋白
10		组蛋白 H2A 型 1-B/E
11		酸性不稳定亚单位色素上皮源性因子
12		备解素
13		肽酶抑制剂 16
14		胆碱酯酶
15		载脂蛋白 M
16		维生素 K 依赖蛋白 Z
17		转铁蛋白
18		免疫球蛋白重链 2-5
19		富含半胱氨酸的分泌蛋白 3
20		N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶
21		血清对氧磷酶/内酰胺酶 3
22		磷脂酰肌醇-葡萄糖特异性磷脂酶 D
23		血小板碱性蛋白
24		载脂蛋白 L1
25		胰岛素样生长因子
26		血清对氧磷酶/芳香酯酶 1
27		胰岛素样生长因子结合蛋白 3
28		结合蛋白复合体
29		热休克蛋白 71
30		过氧化还蛋白-2

5 差异表达蛋白 GO 富集分析

多房棘球蚴病患者和健康体检者间血清差异表达蛋白主要富集于急性相反应、受体类聚、血小板脱颗粒、甘油三酯分解过程的负调节、高密度脂蛋白颗粒重塑、脂蛋白代谢等生物过程,胞外区、细胞外小体、血液微粒、极低密度脂蛋白颗粒等细胞成分,趋化活性、内肽酶抑制剂活性、脂质转运体活性、丝氨酸型内切酶抑制剂活性、胆固醇结合等分子功能(图 5、6)。进一步在 GO Level2 水平比较多房棘球蚴病患者和健康体检者间上调差异蛋白和下调蛋白分布,结果见图 7。

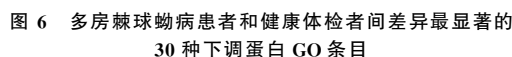
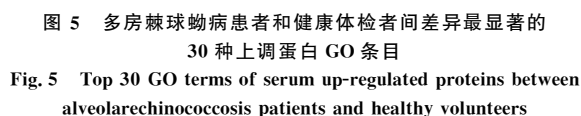
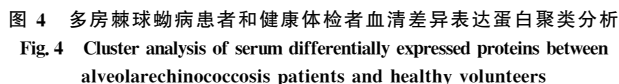


Fig. 6 Top 30 GO terms of serum down-regulated proteins between alveolarchinococcosis patients and healthy volunteers

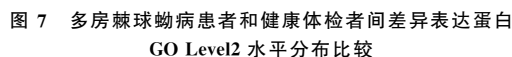


Fig. 7 Comparison of GO Level2 terms of serum differentially expressed proteins between alveolarchinococcosis patients and healthy volunteers

多房棘球蚴病与健康体检者间血清差异表达蛋白中,下调蛋白参与的代谢路径主要有胆固醇代谢、补体和凝血级联、PPAR 信号通路、维生素消化和吸收、非洲锥虫病、生物素代谢,上调蛋白参与的信号通路主要有金黄色葡萄球菌感染、雌激素信号通路、补体和凝血级联、沙门氏菌感染。多房棘球蚴病与健康体检者间血清差异蛋白中,上调蛋白参与的信号通路主要有胆固醇代谢、补体和凝血级联反应、血小板活化、nod-样受体信号通路、沙门氏菌感染、金黄色葡萄球菌感染,下调蛋白参与的路径主要有胆固醇代谢通路、PPAR 信号通路、补体和凝血级联信号通路、造血细胞谱系(图 8、9)。

讨 论

棘球蚴病由棘球绦虫幼虫感染引起的一种慢性人兽共患寄生性传染病^[1],人类是偶然中间宿主^[1]。棘球绦虫主要寄生于肝脏、肺、脾脏等器官,其中肝脏是受影响最严重的器官^[17]。棘球蚴可诱导宿主产生免疫应答,从而逃避人体免疫作用^[18]。不同发育阶段的棘球绦虫幼虫具有表达不同抗原的能力,在宿主产生

抗体前棘球蚴已经产生了新的抗原,由于产生时间不同,抗体不能发挥应有免疫应答效果^[18]。而每毫升囊液中含有数千个原头节,其可随囊液种植到其他部位,造成种植性转移^[19]。

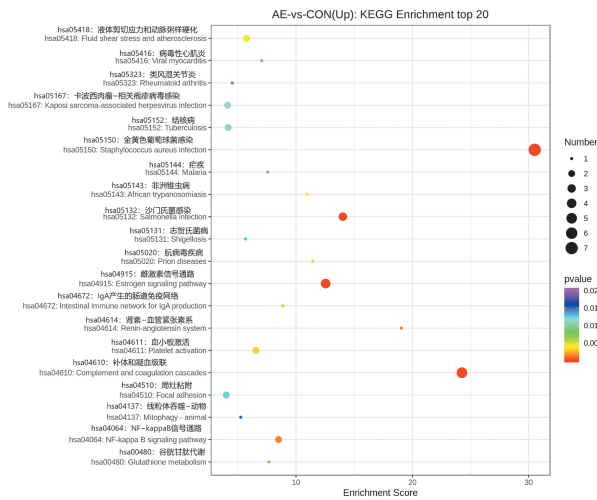


图 8 多房棘球蚴病患者和健康体检者间前 20 种上调表达蛋白气泡图
Fig. 8 Bubble plot of top 20 up-regulated proteins between alveolarechinococcosis patients and healthy volunteers

通路、胆固醇代谢通路、PPAR 信号通路、金葡菌感染信号通路、沙门菌感染信号通路是共同代谢通路。补体与凝血级联信号通路是人体免疫应答的重要的生物过程,当棘球蚴感染机体后可产生一系列免疫应答^[20]。凝血系统的激活限制病原体对机体的入侵过程,这一生物过程在生物体内普遍存在,以维持机体免疫状态^[21]。补体系统在机体免疫调节及防御过程中起至关重要的作用,棘球蚴感染人体后,人体会产生特异性和非特异性免疫应答^[19]。巨噬细胞是非特异性免疫应答的关键细胞,是抵抗外来物质的重要屏障,其可在不同内环境下发展为不同表型^[22]。抗炎因子在棘球蚴感染中主要的作用是修复组织和调控免疫^[23]。本次实验检测到白细胞介素 1 受体辅助蛋白、TGF-β 存在显著差异,但其表达为下调状态,这可能是由于寄生虫对宿主免疫功能的抑制造成,逃避宿主免疫以确保其能在宿主体内生存。

本研究发现,多房棘球蚴病患者血清中谷胱甘肽过氧化物酶呈高表达状态。寄生虫若想在宿主体内存活,其生理活动需要氧的参与,所以体内活性氧类物质需要及时清除^[24]。这也是多房棘球蚴能在宿主体内存生的必要条件。过氧化物氧还原蛋白是具有抗氧化作用的蛋白酶系,细粒棘球绦虫可通过自身合成过氧化物氧还原蛋白以抵抗氧化^[25,26]。脂类及多种消化棘球蚴病患者常合并胆囊结石,胆囊结石以胆固醇结石为主,这可能和棘球蚴病患者脂质代谢紊乱相关^[26]。

多房棘球蚴缺乏合成脂肪酸及胆固醇的能力。通过 KEGG 通路分析可见胆固醇代谢在宿主体内表达呈现下调状态,说明了棘球蚴主要是通过从宿主体内获取营养物质以维持自身生命活动^[27-28]。由于胆汁在宿主体内分布的差异,棘球蚴在宿主体内呈现类似分布^[29]。胆固醇代谢及维生素的消化和吸收呈现低表达状态。在棘球蚴病患者血清中,来自棘球蚴病外泌体可通过树突细胞将棘球蚴特异性抗原提呈给 T 细胞产生杀伤作用^[30]。我们检测到多种热休克蛋白家族外泌体蛋白基因 HSPA5、HSPA90B1 及代谢类酶 Dipeptidyl peptidase 4 及信号转导的 2 198 个蛋白基因,这些蛋白基因功能富集到免疫应答、凝血及炎症反应等。

我们采用韦恩分析发现多房棘球蚴病患者和健康体检者间存在 38 种特有差异表达蛋白,其中上调蛋白有 8 种、下调蛋白 30 种。以上分析出的蛋白根据通路富集情况通过进一步筛选出 8 种目标蛋白,包括过氧化物氧还蛋白、谷胱甘肽过氧化物酶、甘露糖结合蛋白、血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂、热休克蛋白 A5、热休克同源蛋白、Endoplasmic reticulum chaperone (HSPA90B1) 及代谢类酶 Dipeptidyl peptidase 4。这些特有差异蛋白可作为棘球蚴病早期诊断候选标志物。由于本研究样本量较

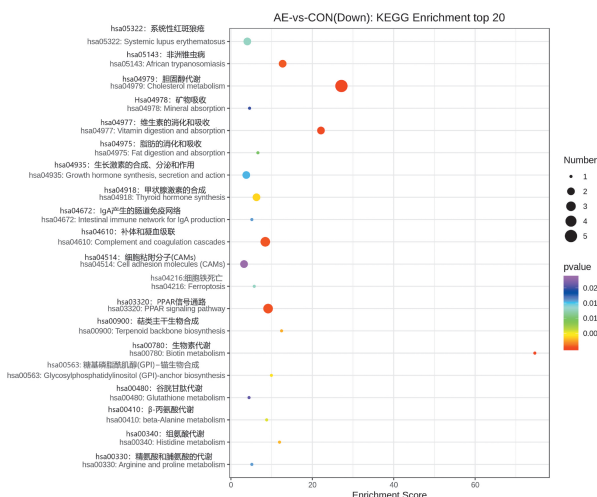


图 9 多房棘球蚴病患者和健康体检者间前 20 种下调表达蛋白气泡图
Fig. 9 Bubble plot of top 20 down-regulated proteins between alveolarchinococcosis patients and healthy volunteers

DIA 是近年来备受关注的质谱采集技术之一。其原理是在质谱数据采集时,高速、循环地将每个采集窗口内的所有母离子及其子离子碎裂后进行全扫描^[14-15]。本实验建立了多房棘球蚴病和健康体检者血清蛋白质谱,共在多房棘球蚴病患者与健康体检者间筛选出 99 种差异表达蛋白,其中 41 种上调蛋白、58 种下调蛋白。GO 功能分析发现,上调蛋白上调功能主要富集在炎症反应相关的信号通路,而下调蛋白功能主要富集在补体与凝血级联信号通路及胆固醇代谢通路。

KEGG 功能富集分析可见,补体和凝血级联反应

少,加之受多种因素影响,后续研究还有待进一步的改进与优化。

【参考文献】

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [2] Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al. Ecology and life cycle patterns of *Echinococcus* species[J]. Adv Parasitol, 2017(95): 213-314.
- [3] Woolsey ID, Miller AL. *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Echinococcus multilocularis*: A review[J]. Res Vet Sci, 2021(135): 517-522.
- [4] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017(95): 315-493.
- [5] Atkinson JA, Gray DJ, Clements AC, et al. Environmental changes impacting *Echinococcus* transmission: research to support predictive surveillance and control[J]. Glob Chang Biol, 2013, 19(3): 677-688.
- [6] Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2): 296-303.
- [7] Torgerson PR, Keller K, Magnotta M, et al. The global burden of alveolar echinococcosis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(6): e722.
- [8] 伍卫平, 王虎, 王谦, 等. 2012-2016年中国棘球蚴病抽样调查分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(1): 1-14.
- [9] Qian MB, Chen J, Bergquist R, et al. Neglected tropical diseases in the People's Republic of China: progress towards elimination[J]. Infect Dis Poverty, 2019, 8(1): 86.
- [10] Qian MB, Abela-Ridder B, Wu WP, et al. Combating echinococcosis in China: strengthening the research and development[J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1): 161.
- [11] McManus DP, Gray DJ, Zhang W, et al. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis[J]. BMJ, 2012, 344: e3866.
- [12] Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans[J]. Acta Trop, 2010, 114(1): 1-16.
- [13] Qin W, Qin X, Li L, et al. Proteome analysis of urinary biomarkers in a bovine IRBP-induced uveitis rat model via data-independent acquisition and parallel reaction monitoring proteomics[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 831632.
- [14] 韩爽, 马俊英, 张雪飞, 等. 基于非依赖性全扫描采集蛋白组学技术初步研究继发性细粒棘球蚴病小鼠肝脏差异表达蛋白[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2022, 34(1): 41-51.
- [15] 司晓妹, 马俊英, 张雪飞, 等. 基于非依赖性全扫描采集蛋白组学技术初步研究继发性多房棘球蚴病小鼠差异表达蛋白[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2022, 34(1): 52-58.
- [16] 中华人民共和国.《包虫病诊断标准》(WS257-2006)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-5.
- [17] McManus DP, Zhang W, Li J, et al. Echinococcosis[J]. Lancet, 2003, 362(9392): 1295-1304.
- [18] Gottstein B, Soboslay P, Ortona E, et al. Immunology of alveolar and cystic echinococcosis (AE and CE)[J]. Adv Parasitol, 2017(96): 1-54.
- [19] Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 47(1): 24-41.
- [20] Bakhtiar NM, Spotin A, Mahami-Oskoue M, et al. Recent advances on innate immune pathways related to host-parasite cross-talk in cystic and alveolar echinococcosis[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 232.
- [21] Grimm J, Nell J, Hillenbrand A, et al. Immunohistological detection of small particles of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* in lymph nodes is associated with enlarged lymph nodes in alveolar and cystic echinococcosis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(12): e0008921.
- [22] Rodriguez H, Prados-Rosales R, Lavin JL, et al. Editorial: Macrophage metabolism and immune responses[J]. Front Immunol, 2020(11): 1078.
- [23] Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? [J]. Acta Trop, 2003, 85(2): 119-132.
- [24] Fan J, Wu H, Li K, et al. Transcriptomic features of *Echinococcus granulosus* protoscoleces during the encystation process[J]. Korean J Parasitol, 2020, 58(3): 287-299.
- [25] Zeida A, Manta B, Trujillo M. *In vivo* observation of peroxiredoxins oligomerization dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(32): 18918-18920.
- [26] Abidova SS, Ovchinnikov IV, Shamirzaev BI, et al. The effect of alpha-tocopherol on blood lipid peroxidation in patients with hepatic echinococcosis[J]. Eksp Klin Farmakol, 1998, 61(3): 41-42.
- [27] Silva-Alvarez V, Franchini GR, Porfido JL, et al. Lipid-free antigen B subunits from *Echinococcus granulosus*: oligomerization, ligand binding, and membrane interaction properties[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(3): e0003552.
- [28] Silva-Alvarez V, Folle AM, Ramos AL, et al. *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation [J]. Parasit Vectors, 2016(9): 69.
- [29] Shi H, Lei Y, Wang B, et al. Protoscolicidal effects of chenodeoxycholic acid on protoscoleces of *Echinococcus granulosus*[J]. Exp Parasitol, 2016(167): 76-82.
- [30] Zhang X, Gong W, Cao S, et al. Comprehensive analysis of non-coding RNA profiles of exosome-like vesicles from the protoscoleces and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10): 316.

【收稿日期】 2022-12-05 【修回日期】 2023-02-25