

# Differential proteomic analysis of nonunion and normal bone tissue

Haihui Qin Hang Wu Hongmei Tu Qihe Song Xiaozhou Zhang

Department of Orthopedics Xiaogan Central Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan, Hubei, 432000, China

## Abstract

**Objective:** Through differential proteomic analysis between nonunion bone tissue and normal bone tissue, we aim to identify significant differential proteins and provide a basis for the occurrence, development, and treatment of nonunion. **Methods:** Total protein was extracted from 3 cases of nonunion tissue and 3 cases of normal bone tissue. After quantification, an equal amount of protein was taken and subjected to reduction, alkylation, and enzymatic hydrolysis steps to become a peptide mixture. After peptide fragment mass spectrometry detection, mass spectrometry spectra are obtained. Finally, the qualitative or quantitative information of protein in the sample can be obtained by analyzing these mass spectra using relevant software. **Results:** A total of 6 samples were tested and quantitatively analyzed in this project, and 24182 peptide segments were identified, belonging to 4510 different proteins. A total of 515 significantly different proteins were screened out. **Conclusion:** There are significant differences in proteomics between nonunion bone tissue and normal bone tissue, and these differentially expressed proteins play an important role in nonunion.

## Keywords

Nonunion; Bone; Proteomics; OSFT; Lipocalin

## 骨不连组织与正常骨组织差异蛋白质组学分析

卿海辉 吴航 涂红梅 宋其合 张小舟

武汉科技大学附属孝感市中心医院骨科, 中国·湖北·孝感 432000

## 摘要

**目的:** 通过骨不连组织与正常骨组织差异蛋白质组学分析, 寻找明显差异蛋白, 为骨不连的发生、发展及治疗等提供依据。**方法:** 分别对3例骨不连骨组织及3例正常骨组织提取总蛋白, 定量后取等量蛋白经还原、烷基化、酶解的步骤变为肽段混合物, 肽段样品的质谱检测得到质谱图, 最后通过相关的软件解析这些质谱图就可以得到样品中蛋白质的定性或定量信息。**结果:** 本项目共对6个样品进行了检测和定量分析, 共鉴定到24182条肽段, 属于4510个不同的蛋白, 共筛选出515个显著差异蛋白。**结论:** 在蛋白质组学方面骨不连组织与正常骨组织差异十分明显, 这些差异蛋白质在骨不连中发挥重要作用。

## 关键词

骨不连; 骨组织; 蛋白质组学; 破骨细胞刺激因子; 脂质运载蛋白

## 1 引言

骨不连又称为骨折不愈合 (Nonunion), 是指骨折经过治疗后, 骨折愈合时间超过正常范围, 且延长治疗后仍未能实现骨性愈合。是骨折术后常见并发症之一, 发生率约为4.93%<sup>[1]</sup>。骨不连可造成肢体功能障碍, 外观畸形等, 目前骨不连主要为手术治疗, 但存在一些严重的并发症, 如感染、持续伤口渗液、皮肤感觉异常、持续疼痛和再次骨不连等,

导致其病残风险上升、生存质量下降, 无论从身体、心里及经济等方面给患者带来巨大影响。因此, 对骨不连研究具有重大意义, 本研究首次从蛋白质组学方面对骨不连进行了分析, 并取得了较好的结果。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验标本、主要试剂、仪器

标本自2022年1月至2024年12月收集于武汉科技大学附属孝感市中心医院骨科, 标

本获得后保存-80度冰箱保存。十二烷基硫酸钠、三氟乙酸、三(2-羧乙基)膦酸盐、氯乙酰胺2、胰蛋白酶、丙酮均购自Sigma-Aldrich, 干式恒温器、掌上离心机、恒温混匀仪、手持匀浆仪购自杭州米欧, BCA蛋白质定量检测试剂盒购自生工生物, 非接触式超声波细胞粉碎机, 酶联

**【基金项目】** 孝感市科技计划项目 (项目编号: XGKJ2022010018)。

**【作者简介】** 卿海辉 (1983-), 男, 中国湖南娄底人, 硕士, 从事骨科研究。

免疫分析仪购自杭州奥盛，高效液相色谱仪购自 Agilent，UltiMate 3000 纳升高效液相色谱购自 Thermo Scientific，timsTOF Pro 质谱仪购自 Bruker Daltonics，纳升 C18 捕集柱、纳升 C18 分析柱购自 AUROR。

## 2.2 蛋白提取

实验时取出样品后加入裂解液，使用组织破碎仪来进行组织破碎后孵育，蛋白变性后进行超声处理，离心样品后取上清，采用丙酮沉淀法对上清液中的蛋白进行沉淀。蛋白沉淀后复溶，采用 BCA 法测定蛋白浓度。完成还原和烷基化加入胰蛋白酶，孵育振荡过夜进行酶切。第二天加入终止酶切反应，离心样品取上清行脱盐，真空抽干后 -20℃ 冻存。

## 2.3 质谱检测

样品的质谱检测使用 UltiMate 3000 RS LCnano 纳升液相 (Thermo) 串联 timsTOF Pro 质谱仪 (Bruker)，质谱以 dia PASEF 模式进行数据采集，利用 timsControl 软件进行 dia PASEF 采集窗口的设置。

## 2.4 数据库检索

原始数据使用 DIA-NN (DIA-NN-v1.8.1) 软件的 library-free mode 进行分析。检索使用的数据库是从 Uniprot 下载的 Human 蛋白序列数据库检索参数主要采用默认设置，蛋白质定量信息使用 MaxLFQ 算法进行归一化处理。

## 2.5 数据分析

使用 DIA-NN 检索结果中 “pg\_matrix.tsv” 中的信息用于蛋白质水平的定量分析。取至少在一个组中出现 50% 有效定量值的蛋白进行定量比较，通过 t-检验的 P 值和变化倍数确定显著变化的蛋白，蛋白的功能注释从 GO、KEGG、EggNOG、Pfam、UniProt 中亚细胞定位等数据库中提取，经费舍尔精确检验来判断是否在调控中被富集，使用 STRING 数据库进行蛋白互作网络的分析。

# 3 结果

## 3.1 定量结果总览

本项目共对 6 个样品进行了检测和定量分析，共鉴定到 24182 条肽段，属于 4510 个不同的蛋白。

## 3.2 差异表达分析

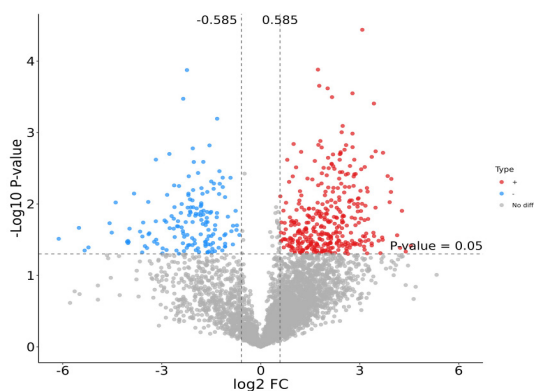


图 1 差异蛋白火山图

差异蛋白火山图通过对质谱原始数据进行数据库检索，获得肽段的检测信号强度，进而计算相应蛋白的定量信息。

图中每个点表示一个定量到的蛋白质，横坐标表示不同组间差异倍数 (log<sub>2</sub> FC)，纵坐标表示该蛋白的差异显著性，本项目共筛选出 515 个显著差异蛋白。

## 3.3 注释与富集分析

GO (Gene Ontology, 基因本体论) 注释与富集分析, GO 可分为 3 类, 分别描述基因分子功能 (MF)、所处细胞位置 (CC)、参与生物过程 (BP)。注释与富集分析是将筛选出的差异蛋白加入进行注释后, 将其注释到的条类型与背景蛋白的注释结果输入进行分析。

## 3.4 互作网络分析

STRING 数据库中含有来源广泛的蛋白互作信息, 是目前使用最广泛、信息最全面的蛋白互作网络分析工具。本项目基于 STRING 数据库分析差异蛋白的蛋白互作网络, 如图 2 所示:

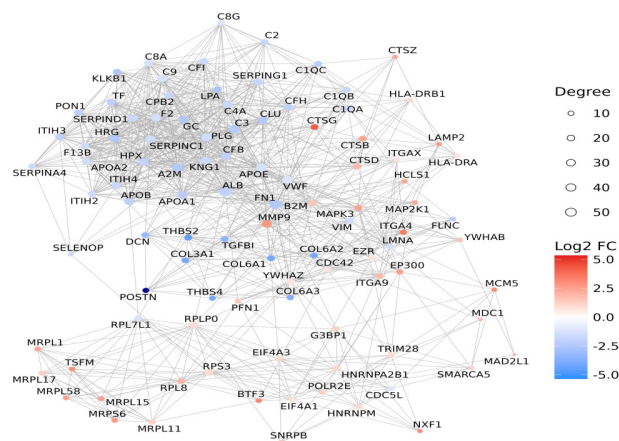


图 2 ZCGG/GBL Degree

ZCGG/GBL 每个节点为一个差异蛋白 (GBL 表示骨不连组织, ZCGG 表示正常骨组织), 节点之间的连线表示两个蛋白之间存在已知的或预测可能存在的蛋白相互作用, 节点颜色表示该蛋白的差异倍数, 节点大小可以表示互作网络中蛋白的连接度。本实验结果显示差异蛋白质之间绝大多数存在密切关系及重要作用。

# 4 讨论

对骨不连已存在大量研究, 在蛋白方面也存在不少, 但目前还没有从蛋白质组学方面进行过研究。蛋白质组 (proteome) 是在一定条件下由一个特定细胞或生物产生的所有蛋白质<sup>[2]</sup>, 蛋白质组学从整体研究, 因此更为全面, 本研究首次从差异蛋白质组学方面对骨不连研究, 发现骨不连与正常骨组织存在明显异常, 共筛选出 515 个显著差异蛋白, 相比正常骨组织, 其中破骨细胞刺激因子 1、脂质运载蛋白

2、胸腺素 04 在骨不连组织中的含量明显下降，而 RETN、分泌型卷曲相关蛋白 4、透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白 1 含量明显增多。

破骨细胞刺激因子 1 (OSTF1) 具有促破骨活性。骨折修复后期，破骨细胞在成骨细胞协同下，清除过度骨痂、重塑骨骼以适应力学需求<sup>[5]</sup>；早期炎症中，破骨细胞可能释放生长因子促血管生成，还能吸收坏死骨为新生骨腾空间。病理状态下，破骨细胞活性失衡（如过度激活）会导致骨吸收过度，延缓愈合<sup>[4]</sup>。OSTF1 可调控破骨细胞分化与激活，促进其前体分化成熟以增强骨吸收能力，参与破骨细胞融合并影响效率，还通过与成骨细胞、免疫细胞等相互作用，间接影响骨修复微环境<sup>[5]</sup>。

脂质运载蛋白 2 (LCN2) 通过结合巨藻蛋白和 24p3R 受体，调控炎症反应与免疫细胞活性。骨折早期，它调节炎症因子释放、清除坏死组织，平衡中性粒细胞和巨噬细胞活性，控制炎症强度与时长，为骨痂形成创造适宜环境<sup>[6]</sup>。LCN2 作为运铁蛋白，介导铁离子转运，影响细胞代谢，调节成骨细胞能量代谢和活性，还与骨形态发生蛋白协同加速骨基质矿化和新骨形成<sup>[7]</sup>。其水平升高可降低破骨细胞活性，减少骨吸收，维持骨重建平衡。此外，老年 2 型糖尿病患者中 LCN2 水平降低与骨质疏松相关，高血糖可能通过抑制其表达影响成骨细胞功能，延缓骨折愈合，故 LCN2 可能是糖尿病相关骨折的潜在治疗靶标<sup>[8]</sup>。

胸腺素 β4 (TMSB4X，即胸腺素 04) 可加速成骨细胞迁移至骨折部位，促进骨痂形成。它可能通过调节细胞骨架增强骨形态发生蛋白 (BMP) 信号通路效应，助力骨折愈合<sup>[9]</sup>。其能为骨再生提供营养支持，满足骨折愈合对血供的需求。且具抗炎特性，可减少局部炎症，抑制纤维化过度，避免瘢痕干扰骨再生<sup>[10]</sup>。同时可能与活性维生素 D3、白蛋白协同，优化骨代谢环境<sup>[11]</sup>。作为多功能蛋白，TMSB4X 在细胞迁移、抗炎和组织修复中起核心作用，骨折愈合机制涉成骨调控、抗炎及血管生成。本研究显示其在骨不连组织中含量明显下降，印证其对骨折愈合的重要性。

抵抗素 (RETN) 由脂肪细胞和免疫细胞产生，属分泌型多肽激素蛋白，参与脂质代谢调节等，对骨折愈合等有多重影响。其水平上升会促进巨噬细胞浸润加剧关节损害，激活 NF-κB 等炎症通路，影响骨折早期炎症微环境，加速关节炎进展与关节骨质破坏。同时，RETN 可能与糖尿病等相关，间接干扰胰岛素信号途径，影响骨重建及成骨、破骨细胞功能。SFRP4 是 Wnt 信号通路拮抗剂，而该通路对骨骼系统发育至关重要。SFRP4 会抑制内膜吸收，干扰软骨内骨化，减少骨形成，引发骨质疏松等，使皮质骨变薄、脆性骨折增多，还可能影响成骨细胞分化和结痂形成，导致骨折愈合推迟，其表达或功能异常还会影响局部血供及骨重塑，造成骨不愈合。HAPLN1 在骨折修复中作用关键，能促进

骨再生，早期通过稳定 HA-蛋白聚糖复合物助力软骨基质形成，其表达不足会影响骨痂形成和矿化。它还能改善骨修复微环境，调节 ECM 稳定性以影响淋巴管功能，且可能通过调控细胞外基质影响炎症反应和血管生成，外源性补充或加速复杂骨折愈合。

## 5 总结

综合以上，骨不连组织与正常骨组织在蛋白质组学上有明显差异，其中破骨细胞刺激因子 1、脂质运载蛋白 2、胸腺素 04 在骨不连组织中的含量明显下降，以及 RETN、分泌型卷曲相关蛋白 4、透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白 1 含量明显增多，与骨不连发生存在密切关系，本研究结果对骨不连的诊断和治疗有一定的促进作用。

## 参考文献

- [1] Zura R, Watson JT, Einhorn T, et al. An inception cohort analysis to predict nonunion in tibia and 17 other fracture locations[J]. *Injury*. 2017 Jun;48(6):1194-1203.
- [2] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*[J]. *Electrophoresis*. 1995 Jul;16(7):1090-4.
- [3] Hu B, Du G. OSTF1 knockdown mitigates IL-1β-induced chondrocyte injury via inhibiting the NF-κB signaling pathway[J]. *Heliyon*. 2024 Apr 20;10(9):30110-30125.
- [4] Vermeren M, Lyraki R, Wani S, et al. Osteoclast stimulation factor 1 (Ostf1) KNOCKOUT increases trabecular bone mass in mice[J]. *Mamm Genome*. 2017 Dec;28(11-12):498-514.
- [5] 杨虎,郑宇,王通,等.低氧诱导因子-1α 促进骨折早期愈合的机制[J].*中医正骨*, 2024, 36(6):52-57.
- [6] 张新月,查才军,刘彦虹.脂质运载蛋白2及其相关疾病的研究进展[J].*国际免疫学杂志*, 2023(2):211-215.
- [7] 王炜,周婉,叶山东,等.脂质运载蛋白2和老年2型糖尿病患者骨密度和骨转换标志物的相关性研究[J].*中国骨质疏松杂志*, 2018,24(6):718-722.
- [8] 李冬萍,包小燕,山永仪,等.老年2型糖尿病患者脂质运载蛋白2水平与骨代谢及骨质疏松的相关性研究[J].*中国医刊*, 2021,56(4):391-395.
- [9] 王云,赵秉浩,张民.骨形态发生蛋白-2对骨质疏松性骨折愈合的影响[J].*中华临床医师杂志:电子版*, 2013,7(4):161-162.
- [10] 陆敏安.骨折愈合因素分子水平的研究进展[J].*右江民族医学院学报*, 2004, 26(3):418-420.
- [11] 黄健芳,石钰,彭红梅,等.终末期肾病患者骨折影响因素的Meta分析[J].*临床肾脏病杂志*,2023,23(6): 480-486.
- [12] 郑戈,毕兵,朱晶,等.血清缺氧诱导因子-1α、Dickkopf-1,抵抗素与痛风性关节炎疼痛,骨破坏的相关性及临床意义[J].*安徽医药*, 2022,26(11):2280-2284.