

非酒精性脂肪性肝病蛋白质组学研究进展*

叶桦^{1, 2)} 刘伟²⁾ 虞朝辉¹⁾ 厉有名^{1)**} 姜颖^{2)**}

(¹⁾ 浙江大学医学院附属第一医院消化内科, 杭州 310003;

(²⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206)

摘要 非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种常见慢性肝脏疾病, 其发病率呈逐年上升趋势, 但发病机制尚未明确, 诊疗手段仍不完善. 蛋白质组学(proteomics)的出现使 NAFLD 研究有了进一步的发展, 相关研究已达 21 个. 目前, 蛋白质组学技术可以研究疾病相关的分子改变, 从而寻找新的生物标志物和治疗靶标. 在此, 对蛋白质组学在 NAFLD 诊断及分期、发病机制和其他相关领域研究进展作一个较为全面的综述. 首先, 对研究中遇到的研究对象、样本种类、实验方法和标志物特征选择进行经验性总结. 其次, 除了介绍如何运用蛋白质组学研究病因、危险因素和重要分子在 NAFLD 发病机制中的作用, 还介绍 NAFLD 发病机制的亚细胞蛋白质组学、修饰蛋白质组学以及蛋白质组学与转录组学相结合的研究实例. 此外, 对差异蛋白质的分析策略和价值作了重点阐述, 收集到一些有望成为 NAFLD 治疗靶标的候选分子. 最后, 结合新技术展望研究新空间, 以期能够有助于推动蛋白质组学在寻找新的疾病标志物、探索疾病分子机制和治疗靶标中开辟新的途径.

关键词 蛋白质组学, 非酒精性脂肪性肝病, 生物标志物, 发病机制

学科分类号 Q5, R575.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00566

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变、或不伴有肝细胞气球样变、小叶内炎症细胞浸润以及窦周纤维化为主要特征的临床病理综合征, 其疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌. 广义的概念不排除营养、药物、代谢、遗传或病毒感染等继发因素^[1-2]. 随着人群中肥胖及其相关代谢紊乱的增多, 当前 NAFLD 发病率不断增高且渐趋低龄化, 已成为发达国家慢性肝病的首要病因^[3], 在我国亦可能成为仅次于慢性病毒性肝炎的第二大肝病^[4]. NAFLD 将降低患者生活质量, 加重合并症, 增加心血管疾病、糖尿病等疾病风险, 甚至有一部分患者发展为终末期肝病. 但是, 目前其精确的发病机制尚未明了, 诊疗方法尚不完善, 因此对该病的研究迫在眉睫.

近年来, 系统生物学的发展, 使得从整体水平

上研究生命现象成为可能. NAFLD 是由遗传和环境等多种因素共同作用的疾病, 它的发生发展很可能是多条信号转导通路和多种蛋白质分子共同作用的结果. 对于这样一种复杂疾病来说, 基于蛋白质整体水平的研究手段是非常必要的. 运用蛋白质组学(proteomics)系统地分析 NAFLD 病程发展过程中肝脏蛋白质表达的变化, 将有助于我们提高对 NAFLD 发生发展分子机制的认识, 发现潜在的诊断标志物或药物靶点, 为提高 NAFLD 的诊断和治疗提供基础. 从 2003 年第一篇 NAFLD 蛋白质组学研究报道问世以来, 科学家们对 NAFLD 的蛋白

* 国家自然科学基金资助项目(30700356, 30871154, 30900677), 国际科技合作资助项目(2009DFB33070, 2010DFA31260)和浙江省自然科学基金资助项目(Y2090463).

** 通讯联系人.

厉有名. Tel: 0571-87236603, E-mail: zlym@zju.edu.cn

姜颖. Tel: 010-80727777, E-mail: jiangying304@hotmail.com

收稿日期: 2010-11-03, 接受日期: 2011-02-24

质组学研究越来越广泛. 因此, 本文就现有的蛋白质组学在 NAFLD 应用的研究进行简要综述, 展望蛋白质组学在 NAFLD 研究领域的新空间.

1 NAFLD 诊断和分期标志物研究

NAFLD 的诊断和分期不仅能指导治疗, 而且提示预后. 至今, 仍然以肝脏组织的病理变化作为诊断和分期金标准, 但是这种侵入性的检查方式有

许多弊端, 非侵入性诊断方法亟待突破性地发展. 进行 NAFLD 的蛋白质组学研究尤其是血清蛋白质组学研究有助于发现新的候选潜在诊断和分期标志物. 目前此类研究报道较多(表 1), 虽然仍然没有将研究成果转换成临床应用, 但是启示我们, 在疾病诊断和分期标志物的研究中需要注意以下几点: 研究对象、样本种类、实验方法和标志物特征.

Table 1 Proteomics approaches for biomarkers discovery in NAFLD

表 1 蛋白质组学在 NAFLD 诊断和分期标志物研究中的应用

研究目的	实验样本	研究方法	研究结果	参考文献
NAFLD 分期标志物研究	硬化前 NAFLD、NAFLD 伴肝硬化、NAFLD 伴肝硬化和 HCC 患者的血清蛋白质	2-DE 结合 MALDI-TOF-MS 技术	4 个差异表达蛋白质, 其中 CD5L 可以作为 NAFLD 发展为肝硬化的候选标志物, 结合其他差异蛋白质(载脂蛋白异构体)可以区分各病程.	[5]
NAFLD 诊断和分期标志物研究	80 例病理确诊的无肝损伤、非酒精性单纯性脂肪肝、NASH 阶段的肥胖患者和 24 例正常人的血清蛋白质	SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术	有 3 个特征峰随着肥胖患者肝脏从正常向单纯性脂肪肝、NASH 发展而增强, 而减肥手术以后回落到正常. 这些峰所代表的蛋白质即血红蛋白 α 、 β 两种亚基, 可能可以成为肥胖患者肝脏损伤程度的血清标志物.	[6]
NAFLD 诊断和分期标志物研究	80 例病理确诊的非酒精性单纯性脂肪肝、NASH 阶段患者和 19 例正常人的血清蛋白质	MALDI-TOF-MS 技术	MALDI-TOF-MS 在诊断 NASH 或区分非酒精性单纯性脂肪肝和 NASH 中没有临床应用价值, 但是发现的 15 个峰可能可以提示 NASH 的发病机制.	[7]
NAFLD 诊断和分期标志物研究	病理确诊的 16 例无肝损伤肥胖和 69 例非酒精性单纯性脂肪肝、NASH、NASH F3/F4 各阶段患者的血清蛋白质	基于 HPLC-LTQ-MS 的非标定量技术	任意两组血清样本间共有 605 个差异表达蛋白质(FDR < 0.05), 其中 6 个蛋白质组合可以区分正常和 NAFLD 三阶段病程, 成功率 76%, 3 个蛋白质组合可以区分 NASH F3/F4 与其他阶段 NAFLD, 成功率为 90%, 2 个蛋白质组合能完全区分 NAFLD 与肥胖对照.	[8]
NAFLD 诊断和分期标志物研究	病理确诊的非酒精性单纯性脂肪肝、早期 NASH 阶段的肥胖患者各 6 例和 6 例具有正常肝脏的胆囊疾病患者的肝脏蛋白质	2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术	非酒精性单纯性脂肪肝、早期 NASH 阶段差异表达蛋白质各 22、21 个, 其中 CPS1 和 GRP78 的表达下调, 在早期 NASH 阶段肝脏组织中验证成功, 并且在患者血清中也随着 NAFLD 病程递进而下调, 有望成为新的血清标志物.	[9]
NAFLD 诊断和分期标志物研究	167 例病理确诊的不同自然病程 NAFLD 患者的内脏脂肪组织蛋白质	反相蛋白质芯片技术 (27 个磷酸化蛋白)	基于胰岛素通路中 PKB 和 IRS1 水平的模型可以预测 NASH, 基于 PKA 两个亚基和 GSK3 的磷酸化水平的模型可以预测 NASH 相关的纤维化.	[10]

CD5L: CD5 抗原类似物(CD5 antigen like); FDR: 假发现率(false discovery rate); PKB: 蛋白激酶 B(protein kinase B); IRS1: 胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate 1); PKA: 蛋白激酶 A(protein kinase A); GSK-3: 肝糖原合成激酶 3(glycogen synthase kinase 3); CPS1: 氨基甲酰磷酸合成酶 1(carbamoyl-phosphate synthase 1); GRP78: 葡萄糖调节蛋白 78(78 kDa glucose regulated protein); 2-DE: 双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis); MALDI: 基质辅助激光解析电离(matrix assisted laser desorption/ionization); TOF: 飞行时间(time of flight); MS: 质谱(mass spectrometry); SELDI: 表面增强激光解析电离(surface enhanced laser desorption/ionization); HPLC: 高效液相色谱(high performance liquid chromatography); LTQ: 线性离子阱四级杆(linear trap quadrupole).

1.1 研究对象

疾病标志物研究对象以患者及对照人群为宜, 其次是动物模型、细胞模型. 通过模型找到的标志物还需要在人群中验证才有意义. 因此, 除非样本难以获得, 一般直接以人群为研究对象. 事实上, 尚未见用动物模型或细胞模型研究 NAFLD 诊断和分期标志物的报道.

1.2 样本种类

疾病诊断常用的样本包括组织和体液. 前者取样过程中对机体有一定损伤和风险, 后者较为患者和医生所接受, 包括血清、尿液等. 实际操作中, NAFLD 患者血清样本较组织样本容易获得, 在疾病诊断、发展和转归的监控中血清标志物更有实用价值, 因此绝大多数研究^[5-8]为血清蛋白质组学研究. 然而, 血清蛋白质丰度动态范围非常广, 目前蛋白质组学的各种方法仍然很难避免血清中高丰度蛋白质对低丰度特异性标志物检出的干扰, 而且血清样本处理过程中凝血时间、保存时间和温度的变化都会造成血清蛋白质成分的改变, 因此 Rodríguez-Suárez 等^[9]首先筛选各阶段 NAFLD 患者肝脏的差异表达蛋白质, 对验证成功的蛋白质再回归到血清中进一步验证, 结果发现两个随 NAFLD 病程进展而下调的蛋白质有望将来开发成新的血清标志物. 虽然血清学检测是最常用的疾病检测手段, 但是一些血清蛋白质在个体的不同阶段丰度有所波动, 而且如果存在合并症, 其他疾病也会影响血清蛋白质的组成变化^[11]. 鉴于此, 科学家探索相对损伤较小的特异性较高的诊断方法, Younossi 等^[10]进行脂肪组织磷酸化蛋白质表达特点在 NAFLD 分期中应用的研究, 采用反相蛋白质芯片分析 27 个磷酸化蛋白质的差异表达, 通过训练集的建模和测试集的验证, 结果表明运用包含 PKB 和 IRS1 的模型可以预测 NASH, 基于 PKA 两个亚基和 GSK-3 的模型可以预测 NASH 相关的纤维化. NAFLD 尿液蛋白质组学的研究尚未见报道, 虽然尿液成分易受肾脏功能变化的影响, 但是随着尿液蛋白质组学研究的进展, 现已有肾脏疾病以外其他脏器疾病的尿液标志物分子研究, 如冠状动脉疾病^[12]、骨关节炎^[13]、睡眠呼吸暂停综合征^[14]、肺癌^[15]和药物诱导性肝损伤^[16]等.

1.3 实验方法

科学家已经尝试各种蛋白质组学定性和定量技术. 从 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术^[6], MALDI-TOF-MS 技术^[7], 2-DE 结合 MALDI-TOF-MS 技术^[3], 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术^[9], 基于 HPLC-LTQ-MS 的非标定量技术^[8], 到反相蛋白质芯片技术^[11]. 实验技术的革新正不断推动标志物研究的进程.

1.4 标志物特征

标志物特征与实验方法密切相关, 不同的实验技术得到的结果不同, 为特征峰或特征蛋白质. 单一生物标志物在诊断和分期中的特异性和敏感性都不理想, 多分子标志物(multi-marker)可以改善特异性和敏感性. Bell 等^[8]采用基于 HPLC-LTQ-MS 的非标定量的方法分析各组间血清蛋白质水平的变化, 发现 6 个蛋白质组合(纤维 β 链、视黄酸结合蛋白 4、血清淀粉样 P 成分、Lumican、transgelin 2 和 CD5L)可以区分正常和 NAFLD 三阶段病程, 成功率 76%, 3 个蛋白质组合(补体复合物 C7、胰岛素样生长因子对酸敏感亚基和 transgelin 2)可以区分 NASH F3/F4 与其他阶段的 NAFLD, 成功率 90%, 2 个蛋白质组合(凝血素片段和对氧磷酶 1)能完全区分 NAFLD 与肥胖对照, 而单一蛋白质无法做到. 每一种检测试剂的灵敏性和特异性都有一定限度, 而且在其他慢性肝病或肝硬化时会出现较大重叠. 因此仅以这些血清标志物为基础对一个患者做出 NAFLD 的准确诊断并不可靠, 还需结合其他检查如影像学、肝酶谱等综合判断, 以提高疾病诊断的准确性. Younossi 等^[10]运用生物信息学, 结合其他检测指标创建预测模型.

2 NAFLD 发生发展机制研究

目前 NAFLD 的发生发展机制尚不清楚, 认为与脂肪酸代谢和运输障碍、胰岛素耐受、氧化应激增加、炎症、固有免疫紊乱相关^[3]. 传统单一分子的研究无法做到对 NAFLD 发病机制全面和具体的认识. 为了寻找新的分子机制以及药物治疗靶点, 运用差异蛋白质组学方法大规模分析基因对应产物的表达变化是切实可行的(表 2).

Table 2 Proteomics approaches for pathogenesis study in NAFLD

表 2 蛋白质组学在 NAFLD 发生发展机制研究中的应用

研究目的	实验样本	研究方法	研究结果	经过验证的分子	参考文献
NAFLD 发病机制研究	病理确诊的无肝损伤、非酒精性单纯性脂肪肝、轻度 NASH 和重度 NASH 阶段各 10 例的肥胖患者的肝脏蛋白质	iTRAQ 结合毛细管液相色谱和 ESI-Q-TOF 技术	各阶段持续差异表达蛋白质 9 个($P \leq 0.05$), 其中 7 个与肝脏脂质的堆积和肝脏炎症相关, Lumican 和 FABP1 可能促进 NAFLD.	RT-PCR 和 IHC: Lumican 和 FABP1	[17]
高脂饮食在 NAFLD 发病机制中的研究	高脂饮食诱导的非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性单纯性脂肪肝伴非特异性炎症、NASH 各阶段模型大鼠的肝脏蛋白质	2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术	各阶段差异表达蛋白质各 53、42、49 个(改变 1.5 倍以上, $P < 0.05$). 成功验证 ESH1 的下调促进肝脏脂肪变.	Western blot: FABP1、ECSEH1、PDI、PDIA3/ERp57、ASS、CPS1、14-3-3 ϵ 、CFL1 和 MIF	[18]
高脂血症在脂肪肝发病机制中的研究	天然缺乏 TXNIP 的高甘油三酯血症伴脂肪肝模型 HcB19 小鼠的肝脏蛋白质	2-DE 结合 MALDI-TOF-MS 技术	11 个差异表达蛋白质($P < 0.05$), 其中新发现 2 个差异表达蛋白质(PCCA 和 3-HAAO)可能参与高脂血症中脂肪肝发生发展.	Western blot: CAT 和 SDHA RT-PCR: peroxiredoxin 1	[19]
游离脂肪酸在 NAFLD 发病机制中的研究	游离脂肪酸诱导的脂肪变 L-02 细胞蛋白质	2-DE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术	14 个差异表达蛋白质(改变 2 倍以上, $P < 0.05$). 成功验证 ERp57/ PDIA3 的下调减轻肝脏脂肪变.	RT-PCR: ERp57/ PDIA3、HSP90 和 FAS	[20]
高同型半胱氨酸血症在肝脏脂肪变发病机制中的研究	饮食和基因诱导的高同型半胱氨酸血症模型小鼠的肝脏蛋白质	2D-DIGE 结合 HPLC-LTQ-MS 技术	饮食、基因及两者共同诱导的差异表达蛋白质分别有 27、9、14 个(改变 2 倍以上, $P \leq 0.05$). 差异表达蛋白质参与同型半胱氨酸/甲硫氨酸代谢、尿素循环和抗氧化防御.	Western blot: BHMT 和 ARG 1 ELISA: GNMT 和 SAHH	[21]
AdoMet 在 NASH 发病机制中的研究	MAT1A ^{-/-} 小鼠的肝脏蛋白质	2-DE 结合 MALDI-TOF-MS	117 个差异表达蛋白质, 其中 4 个蛋白质与线粒体功能相关. AdoMet 缺陷的 NASH 模型肝脏线粒体功能受损、发生氧化应激, 新发现 PHB1、COX 表达的下调与 NASH 的发病机制密切相关.	Western blot: prohibitin (PHB)、ATP5B、COX-1 和 COX-2 Northern blot: PHB、ATP5B、COX-2	[22]
瘦素在肝脏脂肪变逆转机制中的研究	瘦素处理的 ob/ob 实验小鼠和 ob/ob 对照小鼠的肝脏线粒体蛋白质	iTRAQ 结合 RP-HPLC 和 MALDI-TOF/TOF 技术	相对于 ob/ob 小鼠, 瘦素处理的 ob/ob 小鼠有 3 个线粒体电子转运酶下调($P < 0.05$), 2 个脂肪酸代谢酶下调($P < 0.05$). 这与线粒体代谢, 结构的改变相一致.	无	[23]
TACE 在 NAFLD 发病机制中的研究	具有脂肪性肝炎表型的高脂饮食 Timp3 ^{-/-} 小鼠的肝脏蛋白质	UPLC-Q-TOF 液质联用技术	38 个差异表达蛋白质, 包括脂肪酸摄入、甘油三酯合成和甲硫氨酸代谢相关蛋白质. 初步解释 TACE 如何在高脂饮食诱导下调肝脏代谢, 促进肝脏脂肪变.	Western blot 和 RT-PCR: ADK、GNMT、MAT I / III 和 FABP1	[24]

Continued

研究目的	实验样本	研究方法	研究结果	经过验证的分子	参考文献
脂肪肝线粒体功能研究	饲养 12 周的单纯性脂肪肝模型 ob/ob 小鼠的肝脏线粒体蛋白质	2D-DIGE 结合 RPLC、ESI-Ion Trap 液质联用技术	40 个差异表达蛋白质($P < 0.01$), 其中 32 个定位于线粒体。肝脏线粒体发生了适应性的改变, 调节乙酰辅酶 A 池 (acetyl-CoA pool) 和保护脂肪肝氧化应激的相关线粒体蛋白质表达发生了相应变化。	无	[25]
NAFLD 内脏脂肪组织细胞信号通路研究	99 例病理确诊的无肝损伤、非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪肝伴非特异性炎症和 NASH 的肥胖患者的内脏脂肪组织蛋白质	反相蛋白质芯片技术(54 个多条信号通路的不同激酶底物和末端点蛋白质)	NAFLD 患者脂肪组织胰岛素通路紊乱, 非酒精性单纯性脂肪肝患者脂肪组织胰岛素通路中蛋白质磷酸化程度比 NASH 显著。	无	[26]
转录组与蛋白质组结合对 NAFLD 发病机制和标志物研究	98 例病理确诊的无肝损伤、非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性单纯性脂肪肝伴非特异性炎症、NASH 各阶段的肥胖患者肝脏总 mRNA 和血清蛋白质	cDNA 芯片 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术	相对于无肝损伤肥胖对照, cDNA 芯片结果显示非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性单纯性脂肪肝伴非特异性炎症、NASH 各阶段的肥胖患者肝脏各有 7、3、14 个表达差异基因(改变 2 倍以上), 下调基因与肝脏解毒相关, 而上调基因多与星状细胞活化和纤维化有关; 蛋白质芯片结果显示各疾病组各有 4 个差异表达蛋白质峰。	无	[27]
转录组与蛋白质组结合对高脂饮食在 NAFLD 发病机制中的研究	高脂喂养 C57BL/6 小鼠 8 周诱导单纯性脂肪肝模型的肝脏蛋白质	cDNA 芯片 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术	309 个差异表达基因(改变 2 倍以上, $P < 0.05$), 12 个差异表达蛋白质(改变 1.5 倍以上, $P < 0.05$)。SBP2、GSTM1 和 GSTP1 在转录水平和蛋白质水平均下调。外来物代谢、脂质代谢、炎症反应和细胞周期控制这几个关键通路参与 NAFLD 肝脏脂肪变。	RT-PCR: SBP2、GSTM1 和 GSTP1 Western blot: ApoE、GSTM1 和 GSTP1	[28]

FABP1: 脂肪酸结合蛋白 1(fatty acid-binding protein 1); ECHS1: 烯酰辅酶 A 水合酶(enoyl - coenzyme A hydratase); PDI: 蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase); ERp57/ PDIA3: 蛋白二硫键异构酶 A3(protein disulfide-isomerase A3); ASS: 精氨酰琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthetase); CFL1: 丝切蛋白 1(cofilin 1); MIF: 巨噬细胞转移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor); PCCA: 丙酰辅酶 A 羧化酶 α 链(propionyl CoA carboxylase α chain); 3-HAAO: 3-羟化邻氨基苯甲酸 3, 4 双加氧酶(3-hydroxyanthranilate 3,4 dioxxygenase); CAT: 过氧化物酶(catalase); SDHA: 琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase subunit A); HSP90: 热休克蛋白 90(heat shock protein 90); FAS: 脂肪酸合酶(fatty acid synthase); GNMT: 甘氨酸 N-甲基转移酶(glycine N-methyltransferase); SAHH: S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase); BHMT: 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶(betaine-homocysteine methyltransferase); ARG 1: 精氨酸酶 1(arginase 1); ATP5B: ATP 合酶 β 亚基(ATP synthase beta chain); COX-1: 细胞色素 c 氧化酶 I (cytochrome c oxidase I); COX-2: 细胞色素 c 氧化酶 II (cytochrome c oxidase II); ADK: 腺苷激酶(adenosine kinase); MAT I / III: 甲硫氨酸腺苷基转移酶 1 (methionine adenosyltransferase 1); SBP2: 硒结合蛋白 2(selenium-binding protein 2); GSTM1: 谷胱甘肽 S 转移酶 μ 1 (glutathione S-transferase, μ 1); GSTP1: 谷胱甘肽 S 转移酶 π 1 (glutathione S-transferase π 1); ApoE: 载脂蛋白 E(apolipoprotein E); iTRAQ: 用于相对和绝对定量的等量异位标签(isobaric tag for relative and absolute quantitation); ESI: 电喷雾离子源(electrospray ionization); Q: 四极杆(quadrupole); 2D-DIGE: 双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis); RP-HPLC: 反相高效液相色谱(reverse phase high performance liquid chromatography); UPLC: 超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography); RPLC: 反相液相色谱(reverse phase liquid chromatography); Ion Trap: 离子阱。

人体肝脏组织和细胞样本为研究 NAFLD 发病机制最理想的研究对象, 能较真实地反映疾病状态. 但由于人体取材困难而蛋白质组学研究样本需求量较多, 目前只报道一例基于人体肝脏组织的 NAFLD 蛋白质组学研究^[7]. 该研究运用灵敏度较高的 iTRAQ 标记, 样本用量相对较少. 动物和细胞模型虽然无法完全模拟疾病状态, 但其性状的均一性和可控性使得我们能够对疾病机制的研究更加深入.

2.1 病因、危险因素和重要分子在 NAFLD 发病机制中作用的研究

借助动物和细胞, 控制 NAFLD 病因、危险因素或一些重要分子的表达来诱导 NAFLD 模型, 运用蛋白质组学技术, 研究这些病因、危险因素和重要分子如何通过改变蛋白质表达参与 NAFLD 发病, 从差异表达蛋白质中拓展新的 NAFLD 相关分子及分子治疗靶点.

NAFLD 病因和危险因素包括年龄、性别、饮食、运动、肥胖、2 型糖尿病、高血脂、高血压、胆石症、体重快速增减和嗜肝病毒感染等. 本实验室 Zhang 等^[8]采用蛋白质组学方法对高脂饮食在 NAFLD 发病机制中的作用进行研究. 作者发现, 高脂饮食诱导的大鼠非酒精性单纯性脂肪肝差异表达蛋白质近一半是脂质、氨基酸、碳水化合物等代谢酶和转运体, 非酒精性单纯性脂肪肝伴非特异性炎症阶段约 25% 是线粒体蛋白质, 包括 4 个参与线粒体电子转运和氧化磷酸化的蛋白质, NASH 阶段有近 20% 的细胞骨架蛋白. 结合 RNA 干扰技术, 从差异蛋白质中新发现一个在肝脏脂肪变发生中有重要地位的蛋白质 ECSH1. 另外, 已有两个报道, 采用蛋白质组学方法对高血脂在 NAFLD 发病机制中的作用进行研究. Van Greevenbroek 等^[9]在动物水平新发现 2 个脂肪肝发生发展相关蛋白质 (参与生酮作用的 PCCA 和参与尼克酸代谢的 3-HAAO); Wang 等^[20]在细胞水平寻找到 14 个表达差异 2 倍以上的蛋白质, 干扰差异蛋白质 ERp57 表达后脂肪变细胞脂肪含量减少, 预示 ERp57 可能在 NAFLD 患者肝脏脂肪变的发生中有一定作用. 这些新发现的 NAFLD 发病相关分子将来可能作为新的治疗靶点.

参与 NAFLD 发病机制的分子比较多, 但是通过蛋白质组学深入研究的只有少数几个. DiBello 等^[21]发现, 同型半胱氨酸血症小鼠肝脏差异表达蛋白质主要参与同型半胱氨酸 / 甲硫氨酸代谢、尿素

循环和抗氧化防御, 由此, 初步了解过量的同型半胱氨酸导致肝脏脂肪变的分子机制. Santamaria 等^[22]发现, S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)缺陷小鼠即 MAT1A^{-/-}小鼠(甲硫氨酸腺苷转移酶 1A 基因敲除小鼠)差异表达蛋白质主要为代谢酶或抗氧化酶, 其中 4 个与线粒体功能相关, 推测 AdoMet 缺陷引起肝脏线粒体功能损伤, 从而使细胞发生氧化应激. 同时, 新发现 PHB、COX 表达的下调与 NASH 密切相关. Singh 等^[23]发现瘦素处理的 ob/ob 小鼠肝脏线粒体电子转运酶、硬脂酰 CoA 去饱和酶 1 和长链脂肪酸延长酶表达下调, 从蛋白质水平证实了瘦素影响肝脏线粒体功能, 对瘦素介导的体重下降和肝脏脂肪变逆转的分子机制进行了初步探索. Fiorentino 等^[24]初步解释肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TACE) 在高脂饮食诱导下通过调节参与肝脏代谢的蛋白质表达促进肝脏脂肪变. 对这些重要分子的蛋白质组学研究一方面从整体上阐明这些分子在 NAFLD 发病中的可能机制, 更重要的是为 NAFLD 发病分子机制研究提供了新线索.

2.2 亚细胞蛋白质组学研究 NAFLD 发病机制

通过分离纯化细胞器富集细胞器特异蛋白质, 有利于发现低丰度有意义的蛋白质, 同时帮助我们了解特定细胞器功能. Douette 等^[25]采用 2D-DIGE 结合 RPLC、ESI-Ion Trap 液质联用技术研究 ob/ob 小鼠脂肪变肝脏线粒体蛋白质组成变化, 结果显示线粒体中参与调节乙酰辅酶 A 池和保护脂肪肝氧化应激的相关蛋白质表达发生了适应性改变. 这使得我们对线粒体在 NAFLD 发生发展中的重要性获得更全面的了解.

2.3 修饰蛋白质组学研究 NAFLD 发病机制相关信号通路

细胞应答外界刺激的信号传导通路中, 蛋白质磷酸化是目前所知的最主要方式. 磷酸化蛋白质组学有助于我们从整体上观察 NAFLD 发生发展中信号通路的状态及其改变. Calvert 等^[26]首次进行 NAFLD 磷酸化蛋白质组学研究, 发现 NAFLD 患者脂肪组织胰岛素通路紊乱, 表现为非酒精性单纯性脂肪肝患者脂肪组织胰岛素通路中蛋白质磷酸化程度比 NASH 显著, 从而为脂肪组织参与 NAFLD 病理过程的假说提供部分依据. 研究还发现脂肪组织胰岛素信号通路中一些蛋白质磷酸化的改变可能区分 NASH 和非酒精性单纯性脂肪肝. 此研究展现出磷酸化组学在 NAFLD 研究中良好的应用前景.

2.4 蛋白质组学与转录组学结合研究 NAFLD 发病机制

蛋白质组学与转录组学在不同层面上从整体角度研究机体特定条件下功能状态, 人成神经管细胞瘤细胞系中蛋白质组与转录组数据相关性较低($r^2=0.22$), 大肠杆菌($r^2=0.47$)和酵母($r^2=0.58$)相对较高^[29]. Younossi 等^[27]对 NAFLD 同时在转录与蛋白质水平研究进行首次尝试, 但没有很好地将转录与蛋白质水平数据有效结合. Kirpich 等^[28]采用 cDNA 芯片和 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术, 分析 NAFLD 模型小鼠肝脏中差异表达的基因和蛋白质. 实验只发现 SBP2、GSTM1 和 GSTP1 在转录水平和蛋白质水平变化一致, mRNA 与蛋白质水平之间无直接相关性. 主要原因是蛋白质存在翻译后修饰, 蛋白质表达受翻译速率的调节, mRNA 和蛋白质稳定性不一, 蛋白质胞内定位影响, 以及芯片技术较 2D-DIGE 更成熟、更敏感等. 两个组学数据综合分析结果显示外来物代谢、脂质代谢、炎症反应和细胞周期调控这几个关键通路参与 NAFLD 肝脏脂肪变.

2.5 蛋白质组学产出数据的分析

如何把一个包括差异蛋白质名称和差异倍数的差异蛋白质列表转换成更有价值的信息, 即如何利用产出的差异蛋白质来探索 NAFLD 的发生发展机制, 从而挖掘新治疗靶点, 这是一个非常关键的环节. 现有 NAFLD 发病机制蛋白质组学研究基本上是对数据进行两个步骤的分析(图 1).

2.5.1 对差异蛋白质进行整体分析. 生物信息学是蛋白质组学研究必不可少的支撑学科, 在差异蛋白质整体分析中运用广泛. 目前, NAFLD 发病机制蛋白质组学研究所采用的生物信息学方法比较基础, 但是足以解决基本问题. 参考 Gene ontology^[22,25] (<http://www.geneontology.org/>)、Swiss Prot^[20,22] (<http://www.uniprot.org/>) 和 Panther^[17-18] (<http://www.pantherdb.org/>) 数据库等注释信息进行差异蛋白质细胞器定位和功能分析等, 再结合聚类分析^[18,20]等找到与 NAFLD 密切相关的生物学过程, 如脂质代谢、尿素代谢、线粒体电子转运、氧化磷酸化和炎症反应等, 这样能更全面地了解 NAFLD 发生发展中所涉及的病理生理过程.

目前 NAFLD 发病机制蛋白质组学研究多数使用肝脏组织样本, 而肝实质细胞占肝脏总体积约

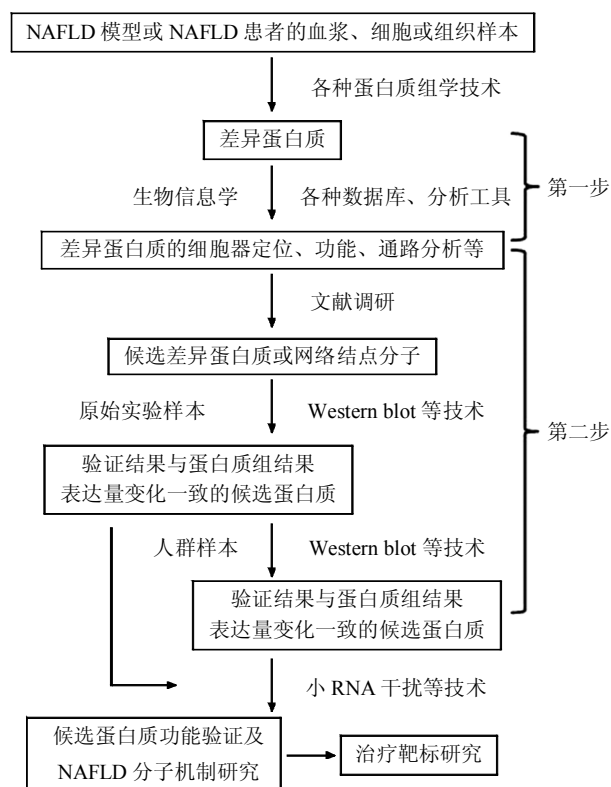


Fig. 1 The workflow for comparative proteomic studies on the pathogenesis of NAFLD

图 1 运用蛋白质组学研究 NAFLD 发病机制的流程图

80%^[30], 因此现有数据中绝大多数差异蛋白质在肝实质细胞中有表达, 肝非实质细胞特异表达蛋白质极少. 肝实质细胞是肝脏执行功能的主要细胞, 与肝脏多种疾病的发生密切相关. 图 2 显示 NAFLD 发病机制蛋白质组学研究结果在肝实质细胞中所覆盖的主要生物学过程, 这些生物学过程与 NAFLD 的关系都被以往的机制研究所证实. 这一方面体现运用蛋白质组学筛查疾病发病机制的可行性和可信性, 另一方面提醒我们 NAFLD 发病机制蛋白质组学研究仍然存在拓展其他相关生物学过程的空间, 产出数据中那些非主要生物学过程可以作为将来研究的候选对象. 肝非实质细胞虽然数量较少, 但与肝实质细胞存在紧密的交互作用(cross-talk), 共同参与 NAFLD 病理生理过程, 有待今后通过分离富集后运用蛋白质组学方法从整体上揭示各种肝非实质细胞蛋白质在 NAFLD 发病机制中的作用.

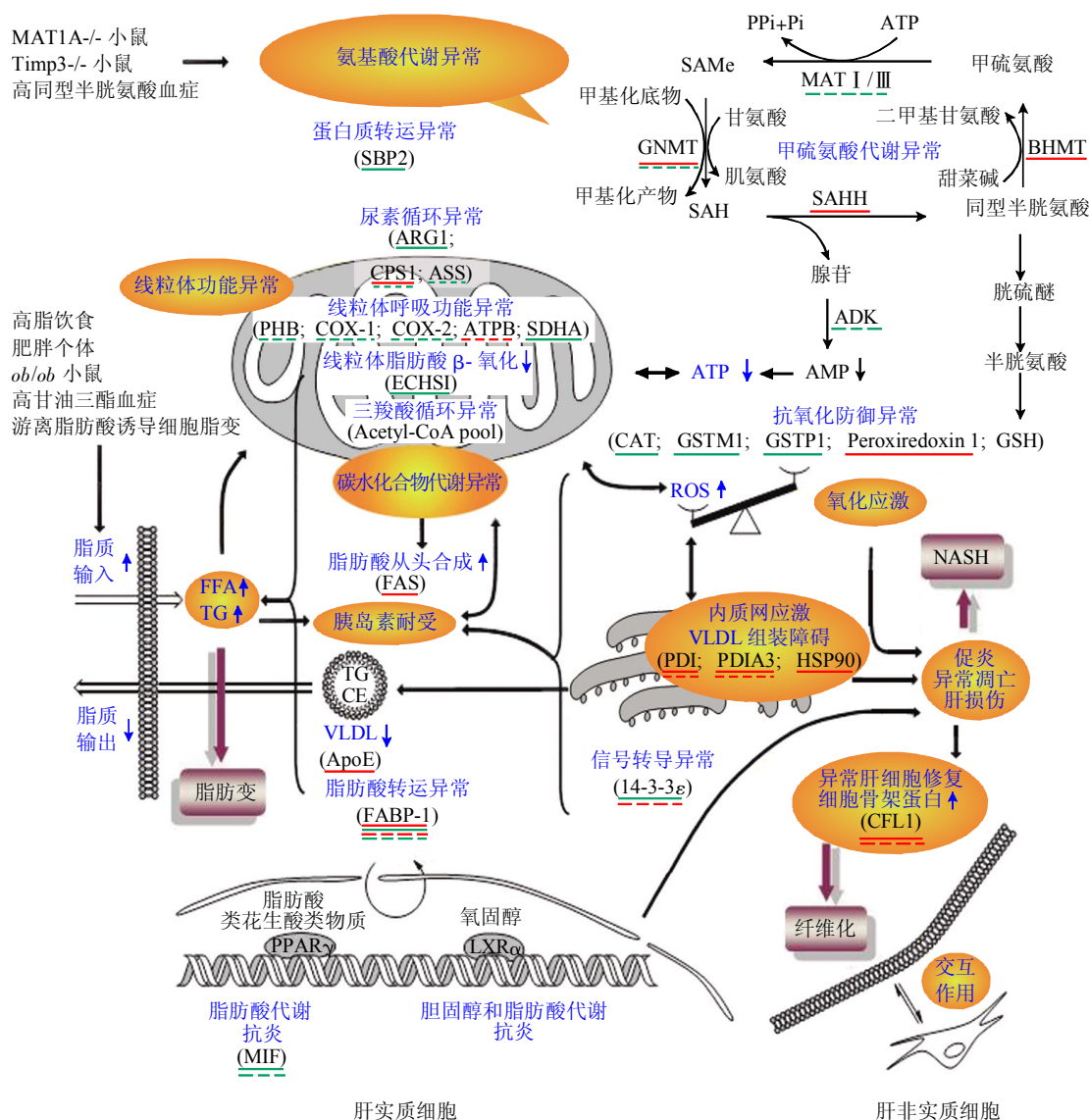


Fig. 2 Possible mechanisms of pathogenesis of NAFLD

图 2 NAFLD 可能的发病机制

在运用蛋白质组学进行 NAFLD 发病机制研究中, 经过 Western blot、Northern blot、RT-PCR 或(和)IHC 验证表达变化的蛋白质用不同的下划线标明: 红色实线(非酒精性单纯性脂肪肝阶段上调表达蛋白质)、绿色实线(非酒精性单纯性脂肪肝阶段下调表达蛋白质)、红色虚线(NASH 阶段上调表达蛋白质)和绿色虚线(NASH 阶段下调表达蛋白质)。FFA: 游离脂肪酸(free fatty acids); TG: 甘油三酯(triglyceride); VLDL: 极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein); GSH: 还原型谷胱甘肽(reduced glutathione)。

此外, 用 IPA(Ingeniuty Pathways Analysis, http://www.ingeniuty.com/products/pathways_analysis.html)等工具能够提供可靠的蛋白质调控网络, 挖掘一些差异蛋白质共同的上游调控分子, 以发现表达量低以致无法鉴定到但对 NAFLD 发病产生重要作用的蛋白质。例如, Zhang 等^[18]通过 IPA 分析获得并成功验证转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 α 和 CCAAT/ 增强子结合蛋白 α 的表达改变。

关注疾病涉及的信号通路或代谢通路, 可以参考 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 和 GeneGo (<http://www.genego.com/>)等, Calvert 等^[20]则运用聚类 and 主成分分析发现 NAFLD 发展中脂肪组织胰岛素信号通路的重要性。更强大的生物信息分析预测软件的开发及应用将推进 NAFLD 蛋白质组学研究。

综合现有差异蛋白质数据整体分析的结果, 从

图 2 中我们发现不同特点的模型通过不同途径最终都发展成为 NAFLD: 肥胖、高血脂症、糖尿病或胰岛素耐受相关的 NAFLD 较符合“二次打击”假说^[31], 而由氨基酸代谢异常起因的 NAFLD 可能是通过氨基酸代谢直接影响脂肪酸代谢, 或其他诸如线粒体功能异常等途径间接影响脂肪酸代谢. 这更全面和充分地表明 NAFLD 是一个多因素多基因相关疾病, NAFLD 患者必须接受个体化综合治疗.

2.5.2 对差异蛋白质进行文献调研及验证. 经过对差异蛋白质进行整体分析, 可以初步将某些分子与 NAFLD 发病机制相关生物学过程或通路联系起来, 结合文献调研及筛选原则, 从中确定值得深入研究的候选蛋白质, 然后运用 Western blot、Northern blot、PT-PCR 或(和)IHC 等技术在样本中验证候选蛋白质表达量的变化. 如果样本来源于 NAFLD 模型, 那么需要在人群样本中再次加以验证, 避免种属间差异导致的假阳性, 如 FABP1^[17-18,24] 在不同种属 NAFLD 模型与人群样本之间结果不一致. 图 2 中已标出 12 个 NAFLD 发病机制蛋白质组学研究中经过第一轮验证的所有分子. 根据小鼠

肝实质细胞蛋白质表达谱数据(来自本实验室未发表的数据), 这些分子均在肝实质细胞中有表达. 经过验证的这些分子有望通过人群验证和进一步的功能验证成为新的治疗靶点.

3 其 他

蛋白质组学在 NAFLD 的研究应用越来越广泛(表 3). Meneses-Lorente 等将其应用于药物促肝脏脂肪变副作用预警分子研究^[32-33], 采用 2D-DIGE 联合 MALDI-TOF MS 和 Q-TOF/TOF 技术发现, 部分蛋白质的改变发生在肝脏临床指标变化之前, 这些蛋白质可以作为预测药物潜在诱导肝脏脂肪变的指标, 增加药物使用的安全性. Bell 等^[34]运用蛋白质组学评价 NAFLD 动物模型. 作者采用基于 HPLC-LTQ-MS 液质联用的非标定量方法, 找出的差异蛋白质与 NAFLD 尤其是 NASH 患者的血清差异表达蛋白质^[8]的功能类似, 在蛋白质水平验证了第一例饮食诱导的 NASH 和代谢综合症大动物模型^[35].

Table 3 Proteomics approaches for other NAFLD related researches
表 3 蛋白质组学在 NAFLD 相关研究中的其他应用

研究目的	实验样本	研究方法	研究结果	分子验证	参考文献
药物促肝脏脂肪变副作用预警分子研究	DCA 药物处理 6 h、2 天、5 天大鼠的肝脏蛋白质	2D-DIGE 结合 MALDI-TOF-MS 和 ESI-Q-TOF 技术	各阶段脂肪变肝脏差异表达蛋白质分别有 16、35、41 个(改变 1.1 倍以上, $P < 0.05$), 包括分泌蛋白质、内质网和线粒体分子伴侣、抗氧化蛋白质和脂肪酸合成相关酶, 其中一些蛋白质可以作为标志物来预测药物诱导肝脏脂肪变潜能.	无	[32-33]
致动脉粥样硬化饮食及改良的致动脉粥样硬化饮食在 NAFLD 发病机制中的研究和 NAFLD 新模型验证	分别用致动脉粥样硬化饮食、改良的致动脉粥样硬化饮食喂养 Ossabaw 猪模拟代谢综合症伴轻度肝损伤、重度代谢综合症伴 NASH 模型的血清蛋白质	基于 HPLC-LTQ-MS 液质联用的非标定量技术	任意两组血清间共有 162 个差异表达蛋白质($FDR < 0.05$), 其中可信度最高的组间差异表达蛋白质各有 4、16、7 个, 包括免疫调节和炎症相关蛋白质、脂质代谢相关蛋白质、结构和细胞外基质和凝血因子等, 与 NASH 患者的血清差异表达蛋白质图谱类似. 在蛋白质水平验证第一例饮食诱导的 NASH 和代谢综合症大动物模型.	无	[34]

4 展 望

蛋白质组学作为一个新的学科领域, 还处于起步阶段. 蛋白质组学在 NAFLD 领域中的应用已具

雏形. 现有报道运用多种蛋白质组分离和鉴定技术, 包括二维聚丙烯酰胺凝胶电泳-质谱、液相色谱-质谱、毛细管电泳-质谱和蛋白质芯片-质谱方法, 对 NAFLD 诊断和分期、疾病发生发展机制

等从多角度、多层面加以蛋白质整体水平动态研究,对NAFLD发病机制进行了完善和补充,挖掘了一批候选标志物和治疗靶标分子,而且NAFLD蛋白质组学近10年的研究逐渐从停留在对已知病理生理机制的描述深入到对候选分子表达量变化以及功能验证^[18,20]。同时,经验证的NAFLD相关差异蛋白质(表2,图2)为NAFLD研究提供新的研究候选分子。随着技术的发展,阻碍NAFLD蛋白质组学研究的瓶颈有望被突破。例如,质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)可以高通量验证蛋白质水平变化,最新标记方法 Super-SILAC^[36]以SILAC标记的人细胞系为桥梁比较疾病与正常肝脏微量组织中蛋白质的变化,解决人体肝脏样本量少的问题,借助肝脏细胞分离技术^[37]或激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)能够进行肝脏单一细胞差异蛋白质组学研究,以便更深入了解肝脏各种细胞在NAFLD发病中所发挥的作用,将修饰蛋白质组学技术及蛋白质相互作用方法学应用于NAFLD研究将拓展新蛋白质修饰、相互作用和通路的发现。

参 考 文 献

- [1] Chitturi S, Farrell G C, Hashimoto E, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: definitions and overview of proposed guidelines. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22**(6): 778–787
- [2] Loria P, Adinolfi L E, Bellentani S, *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis*, 2010, **42**(4): 272–282
- [3] Tiniakos D G, Vos M B, Brunt E M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2010, **5**: 145–171
- [4] Fan J G, Farrell G C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol*, 2009, **50**(1): 204–210
- [5] Gray J, Chattopadhyay D, Beale G S, *et al.* A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease. *BMC Cancer*, 2009, **9**: 271
- [6] Trak-Smayra V, Dargere D, Noun R, *et al.* Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut*, 2009, **58**(6): 825–832
- [7] Ulukaya E, Yilmaz Y, Moshkovskii S, *et al.* Proteomic analysis of serum in patients with non-alcoholic steatohepatitis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol*, 2009, **44**(12): 1471–1476
- [8] Bell L N, Theodorakis J L, Vuppalanchi R, *et al.* Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2010, **51**(1): 111–120
- [9] Rodríguez-Suárez E, Duce A M, Caballería J, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. *Proteomics Clin Appl*, 2010, **4**(4): 362–371
- [10] Younossi Z M, Baranova A, Stepanova M, *et al.* Phosphoproteomic biomarkers predicting histologic nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *J Proteome Res*, 2010, **9**(6): 3218–3224
- [11] Estep J M, Bireddine A, Younossi Z. Non-invasive diagnostic tests for non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med*, 2010, **10**(2): 166–172
- [12] Delles C, Schiffer E, von Zur Muhlen C, *et al.* Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals. *J Hypertens*, 2010, **28**(11): 2316–2322
- [13] Nemirovskiy O, Li W W, Szekely-Klepser G. Design and validation of an immunoaffinity LC-MS/MS assay for the quantification of a collagen type II neoepitope peptide in human urine: application as a biomarker of osteoarthritis. *Methods Mol Biol*, 2010, **641**: 253–270
- [14] Snow A, Gozal D, Valdes R Jr, *et al.* Urinary proteins for the diagnosis of obstructive sleep apnea syndrome. *Methods Mol Biol*, 2010, **641**: 223–241
- [15] Sinchaikul S, Tantipaiboonwong P, Sriyam S, *et al.* Different sample preparation and detection methods for normal and lung cancer urinary proteome analysis. *Methods Mol Biol*, 2010, **641**: 65–88
- [16] Shi Q, Hong H, Senior J, *et al.* Biomarkers for drug-induced liver injury. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, **4**(2): 225–234
- [17] Charlton M, Viker K, Krishnan A, *et al.* Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009, **49**(4): 1375–1384
- [18] Zhang X, Yang J, Guo Y, *et al.* Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: enoyl-coenzyme A hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. *Hepatology*, 2010, **51**(4): 1190–1199
- [19] Van Greevenbroek M M, Vermeulen V M, De Bruin T W. Identification of novel molecular candidates for fatty liver in the hyperlipidemic mouse model, HcB19. *J Lipid Res*, 2004, **45**(6): 1148–1154
- [20] Wang H, Chan P K, Pan S Y, *et al.* ERp57 is up-regulated in free fatty acids-induced steatotic L-02 cells and human nonalcoholic fatty livers. *J Cell Biochem*, 2010, **110**(6): 1447–1456
- [21] DiBello P M, Dayal S, Kaveti S, *et al.* The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Proteomics*, 2010, **9**(3): 471–485
- [22] Santamaria E, Avila M A, Latasa M U, *et al.* Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(6): 3065–3070
- [23] Singh A, Wirtz M, Parker N, *et al.* Leptin-mediated changes in

- hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(31): 13100–13105
- [24] Fiorentino L, Vivanti A, Cavalera M, *et al.* Increased tumor necrosis factor alpha-converting enzyme activity induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Hepatology*, 2010, **51**(1): 103–110
- [25] Douette P, Navet R, Gerkens P, *et al.* Steatosis-induced proteomic changes in liver mitochondria evidenced by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *J Proteome Res*, 2005, **4**(6): 2024–2031
- [26] Calvert V S, Collantes R, Elariny H, *et al.* A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology*, 2007, **46**(1): 166–172
- [27] Younossi Z M, Baranova A, Ziegler K, *et al.* A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005, **42**(3): 665–674
- [28] Kirpich I A, Gobejishvili L N, Homme M B, *et al.* Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*, 2011, **22**(1): 38–45
- [29] de Sousa Abreu R, Penalva L O, Marcotte E M, *et al.* Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 2009, **5**(12): 1512–1526
- [30] Gao B, Jeong W I, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, 2008, **47**(2): 729–736
- [31] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology*, 1998, **114**(4): 842–845
- [32] Meneses-Lorente G, Guest P C, Lawrence J, *et al.* A proteomic investigation of drug-induced steatosis in rat liver. *Chem Res Toxicol*, 2004, **17**(5): 605–612
- [33] Meneses-Lorente G, Watt A, Salim K, *et al.* Identification of early proteomic markers for hepatic steatosis. *Chem Res Toxicol*, 2006, **19**(8): 986–998
- [34] Bell L N, Lee L, Saxena R, *et al.* Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, **298**(5): G746–754
- [35] Lee L, Alloosh M, Saxena R, *et al.* Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology*, 2009, **50**(1): 56–67
- [36] Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, *et al.* Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods*, 2010, **7**(5): 383–385
- [37] Song Y, Hao Y, Sun A, *et al.* Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, 2006, **6**(19): 5269–5277

Recent Progress of Proteomics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

YE Hua^{1,2)}, LIU Wei²⁾, YU Chao-Hui¹⁾, LI You-Ming^{1)**}, JIANG Ying^{2)**}

¹⁾ Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China;

²⁾ State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common chronic liver disease with an increasing morbidity. However, its pathogenesis is still elusive and its diagnosis and treatment need to be improved. The emergence of proteomics has pushed NAFLD research forward and twenty-one associated studies have been reported by now. Recent progress in proteomic techniques allows evaluation of molecular changes associated with disease, thereby permitting to identify novel biomarkers and therapeutic targets. Herein, the application of proteomics in the study of the diagnosis, pathogenesis and other related fields of NAFLD were comprehensively reviewed. Firstly, empirical knowledge about categories of subjects and samples, experimental methods and biomarker selection was summarized. Secondly, in addition to studies utilizing proteomics to explore roles of etiological factors, risk factors and important molecules in the pathogenesis of NAFLD, studies of NAFLD pathogenesis by the means of subcellular proteomics, modification-specific proteomics, and the integration of proteomics and transcriptomics were also shown. Thirdly, methods for analyzing differentially expressed proteins and implications of these results were highlighted. It's hoped that this review can help to promote the application of proteomics in exploring disease pathogenesis and discovering novel biomarkers and treatment targets.

Key words proteomics, nonalcoholic fatty liver disease, biomarkers, pathogenesis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00566

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30871154, 30700356, 30900677), The International Scientific Collaboration Program (2009DFB33070, 2010DFA31260) and The Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y2090463).

**Corresponding author.

LI You-Ming. Tel: 86-571-87236603, E-mail: zlym@zju.edu.cn

JIANG Ying. Tel: 86-10-80727777, E-mail: jiangying304@hotmail.com

Received: November 3, 2010 Accepted: February 24, 2011