

继发性萎缩性鼻炎的鼻黏膜蛋白质组学分析

闵艺洋,陈斌,阎小军,江晨艳,石润杰

(上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科,上海 200011)

摘要: **目的** 筛选继发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜组织的特异性差异表达蛋白(DEPs),探讨继发性萎缩性鼻炎发生、发展的蛋白质水平分子机制。**方法** 定量分析继发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜组织与上颌窦囊肿患者正常鼻黏膜组织的蛋白质表达谱,以差异蛋白表达倍数(FC) >1.2 或 <0.83 且 $P < 0.05$ 筛选 DEPs,并对 DEPs 进一步进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** 共筛选出 291 个 DEPs,其中 53 个上调,238 个下调;GO 富集分析显示 DEPs 主要参与内质网-高尔基体囊泡运输、核糖体的结构组成部分以及细胞质核糖体大亚基;KEGG 富集分析显示 DEPs 主要参与鞘糖脂生物合成以及蛋白质的运输、加工等通路。**结论** 通过 4D-Label-free 技术筛选出了继发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜组织的特异性 DEPs,其中差异表达明显的蛋白质 COL6A6、MPP1、GOLGA4 以及 SLC38A10 可能在继发性萎缩性鼻炎的发生和发展中起重要作用。

关键词:继发性萎缩性鼻炎;蛋白质组学;4D-Label-free 技术;生物信息学分析
中图分类号:R765.21

Proteomic analysis of nasal mucosa in secondary atrophic rhinitis

MIN Yiyang, CHEN Bin, YAN Xiaojun, JIANG Chenyan, SHI Runjie

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: **Objective** To identify specific differentially expressed proteins (DEPs) in the nasal mucosa of patients with secondary atrophic rhinitis and explore the protein-level molecular mechanism of the occurrence and progression of this disease. **Methods** The protein expression profiles of nasal mucosa tissues from patients with secondary atrophic rhinitis and normal nasal mucosa tissues from patients with maxillary sinus cysts were quantitatively analyzed. DEPs were identified based on fold change (FC) >1.2 or <0.83 and $P < 0.05$, followed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses. **Results** A total of 291 DEPs were identified, including 53 upregulated proteins and 238 downregulated ones. GO enrichment analysis revealed that DEPs were mainly involved in processes such as endoplasmic reticulum-Golgi vesicle transport, structural components of ribosomes, and cytoplasmic large ribosomal subunits. KEGG enrichment analysis showed that DEPs were primarily involved in pathways related to sphingolipid biosynthesis, protein transport and processing. **Conclusions** Using 4D-label-free technology, specific DEPs are identified in the nasal mucosa of patients with secondary atrophic rhinitis. Proteins with significant differential expression, such as COL6A6, MPP1, GOLGA4, and SLC38A10, may play critical roles in the pathogenesis and progression of secondary atrophic rhinitis.

Keywords:Secondary atrophic rhinitis; Proteomics; 4D-label-free technology; Bioinformatics analysis

继发性萎缩性鼻炎是发生在鼻甲术后或外伤、反复感染或放射性损伤后鼻甲黏膜萎缩或缺失而导致的一种鼻腔功能性疾病^[1],其中高达 10% 的鼻甲手术患者在术后可能由于下鼻甲的过度切除而发展成为萎缩性鼻炎^[2]。患者的临床表现异质性较大,通常包括鼻腔解剖通畅但却有堵塞感的矛盾症状、鼻腔过度通气感、鼻腔干燥甚至窒息感等^[3-4],严重影响了患者的生活质量。由于发病的具体分子生物学机制不明,当前其外科治疗方法多通过缩小鼻腔容积以改善形态学为主要目的,如鼻中隔黏骨膜瓣鼻孔缩小术、

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(YG2021ZD16)。
第一作者简介:闵艺洋,女,在读硕士研究生。
通信作者简介:江晨艳,女,博士,副主任医师;石润杰,男,博士,主任医师。

带蒂颊肌瓣鼻腔黏骨膜下植入术以及下鼻道填充术等^[5-8],但这些手术方法会因为皮瓣或黏骨膜瓣不够而达不到治疗效果,或因为瘢痕问题而产生其他并发症,且无法恢复黏膜功能。为具体了解继发性萎缩性鼻炎患者发病的分子生物学机制,本研究采用蛋白质组学技术,对比分析3例继发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜组织与3例上颌窦囊肿患者正常鼻黏膜组织的特异性差异表达蛋白(differentially expressed proteins,DEPs),并通过基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)进行通路富集分析,以确定这些差异表达蛋白质参与的生物学过程及功能。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2020年1—9月在上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科住院的患者6例,继发性萎缩性鼻炎和上颌窦囊肿患者各3例。3例继发性萎缩性鼻炎患者,男2例,女1例;年龄27~45岁,平均年龄 (35.7 ± 7.4) 岁。3例上颌窦囊肿患者,男2例,女1例;年龄18~34岁,平均年龄 (25.7 ± 6.5) 岁。继发性萎缩性鼻炎患者的鼻黏膜取自钩突处,上颌窦囊肿患者的鼻黏膜组织取自上颌窦开放术中必经通路处的钩突正常鼻黏膜组织。本研究已通过医院伦理委员会的审批,所有参与者均签署了知情同意书。手术中获取的鼻黏膜组织标本立即用0.9%的生理盐水冲洗,以清除血液和骨碎片等杂质,随后使用PBS缓冲液进一步清洗。处理完成后,标本用锡箔纸紧密包裹,装入塑料冻存管,并迅速转移至-80℃超低温冰箱中保存,以确保样本的稳定性和后续实验的可靠性。

1.2 方法

1.2.1 鼻黏膜组织的蛋白质抽提 将鼻黏膜组织与适量SDT裂解液混合后,使用匀浆仪进行组织破碎处理。破碎处理结束之后进行超声处理,并在沸水浴中加热。以14 000 g的离心力离心15 min,取上清液采用BCA法测定蛋白质含量。

1.2.2 蛋白质样品的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE) 将20 μg蛋白质样品与6X上样缓冲液混合后,置于沸水浴中加热5 min。加热后采用12% SDS-PAGE凝胶电泳系统进行蛋白质分离,结束后使用考马斯亮蓝染色液对凝胶中的蛋白质条带进行染色处理。

1.2.3 蛋白质样品的超滤管内酶解(filter-aided sample preparation,FASP) 采用过滤辅助样品制备技术FASP进行蛋白质酶解处理,并利用C18柱对肽段进行脱盐纯化,冻干后将样品溶解于40 μL含0.1%甲酸的溶液中,以备后续分析,并通过OD280法进行肽段定量分析。

1.2.4 样品的质谱分析 实验采用纳升级液相色谱-质谱联用系统进行分析,其中液相分离部分使用NanoElute系统,质谱分析使用tims TOF Pro质谱仪。流动相包括由0.1%甲酸水溶液组成的A相以及由0.1%甲酸乙腈溶液构成的B相。液相梯度洗脱程序设置为:在0~75 min时,B相比比例由2%线性升至22%;在76~80 min时,B相比比例从22%升至37%;在81~85 min时,B相比比例快速提升至80%;在最后的86~90 min时,维持80% B相进行柱清洗。

质谱分析采用PASEF技术平台完成,整体检测周期设定为90 min,检测模式为正离子极性,母离子覆盖100~1 700 m/z扫描区间,离子迁移率设定为0.75~1.4 V·s/cm²,离子采集时长与利用率分别保持100 ms和100%;在离子源条件方面,设定毛细管电压1 500 V,干燥气体流量3 L/min,气态环境温度维持180℃。此外在PASEF专项配置方面,每个分析周期(1.16 s)完成10次MS/MS二级扫描,设置电荷状态0~5的筛选范围,动态排除周期30 s,碰撞能量梯度20~59 eV,并基于2 500触发阈值控制10⁴目标离子强度。

1.2.5 蛋白质的鉴定和定量 使用MaxQuant分析平台对所有样本的质谱原始数据进行整合处理,执行数据库检索,同时完成蛋白质的定性与定量分析。

1.2.6 鼻黏膜组织DEPs的筛选及其生物信息学分析 本研究采用差异表达蛋白质筛选标准为:表达倍数变化(fold change,FC)>1.2或<0.83,同时满足显著性水平 $P<0.05$ 。通过该标准对比分析继发性萎缩性鼻炎患者与健康对照组鼻黏膜组织的蛋白质表达谱,对获得的DEPs进行功能注释分析;利用DAVID在线分析平台(<https://david.nci.crf.gov/>)进行GO功能富集,从生物学过程(biological process,BP)、分子功能(molecular function,MF)和细胞组分(cellular component,CC)3个层次进行功能分类;同时,基于KEGG数据库开展DEPs的通路富集分析。

1.3 统计学方法

本研究使用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。对于继发性萎缩性鼻炎患者与健康对照组鼻黏膜组织的比较,采用独立样本 t 检验评估组间差异。质谱

数据分析中,将 $FC > 1.2$ 或 < 0.83 且显著性水平 $P < 0.05$ 作为 DEPs 的筛选阈值。在功能富集分析中,采用 Fisher 精确概率法对 GO 功能注释和 KEGG 通路分析结果进行统计学评估,显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 继发性萎缩性鼻炎特异性 DEPs

两组样本的主成分分析(principal component analysis, PCA)如图 1 所示。根据上述筛选标准,继

发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜组织与上颌窦囊肿患者的正常鼻黏膜组织比较共筛选出 DEPs 291 个;上调的 DEPs 有 53 个,其中上调明显的 DEPs 有 2 个,分别是 VI 型胶原蛋白 alpha 6 链(COL6A6,上调倍数为 8.69 倍)、膜相关鸟苷酸激酶 p55 支架蛋白 1(MPP1,上调倍数为 5.58 倍);下调的 DEPs 有 238 个,其中下调明显的 DEPs 有 2 个,分别是高尔基体蛋白 A4(GOLGA4,下调幅度为 87.7%)、溶质载体家族蛋白 38 成员 A10(SLC38A10,下调幅度为 86.6%)。详见表 1,图 2。

表 1 两组样本的鼻黏膜相比差异变化前 10 位的上调或下调的蛋白质

变化趋势	蛋白名称	蛋白注释	差异表达倍数	<i>t</i>	<i>P</i>
上调	COL6A6	collagen type VI alpha 6 chain	8.698	3.290	0.030
	MPP1	MAGUK p55 scaffold protein 1	5.583	5.153	0.006
	DDX58	DEAD box proteins	4.533	3.322	0.029
	LSAMP	limbic system associated membrane protein	4.403	2.801	0.048
	MELTF	melanotransferrin	4.373	3.035	0.038
	CYP2S1	cytochrome P450 family 2 subfamily S member	3.540	3.786	0.019
	FMO1	flavin containing dimethylaniline monooxygenase 1	3.495	2.783	0.049
	SEPTIN4	septin 4	3.360	6.679	0.002
	DCLK1	doublecortin like kinase 1	3.085	3.971	0.016
	JAM2	junctional adhesion molecule 2	2.849	3.413	0.026
下调	GOLGA4	golgin A4	0.123	-3.443	0.026
	SLC38A10	solute carrier family 38 member 10	0.134	-3.371	0.028
	TSPAN6	tetraspanin 6	0.171	-4.091	0.014
	COG1	component of oligomeric golgi complex 1	0.187	-3.171	0.033
	DPP7	dipeptidyl peptidase 7	0.196	-2.964	0.041
	TRIP11	thyroid hormone receptor interactor 11	0.207	-3.344	0.028
	HSD17B2	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 2	0.207	-4.367	0.011
	RAB3GAP1	RAB3 GTPase activating protein catalytic subunit 1	0.220	-4.128	0.014
	COG3	component of oligomeric golgi complex 3	0.229	-6.675	0.002
	RPL32	ribosomal protein L32	0.232	-5.520	0.005

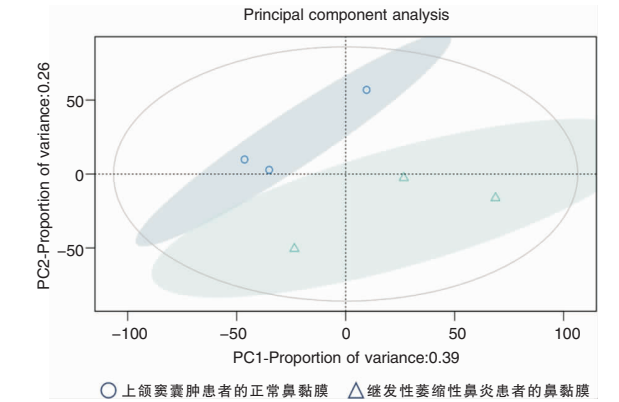


图 1 两组样本的 PCA 结果 注:PCA(主成分分析)。

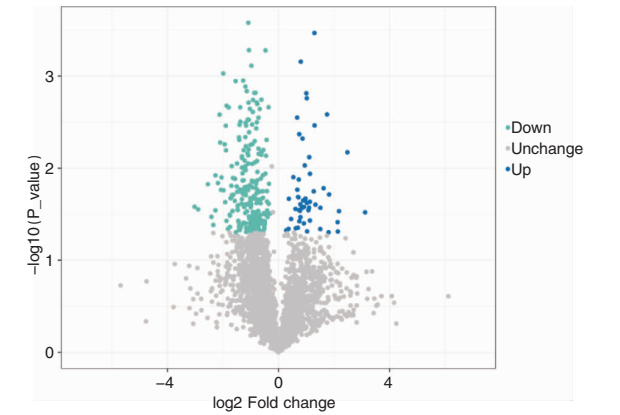


图 2 两组样本的 DEPs 火山图 注:DEPs(差异表达蛋白)。

2.2 DEPs 的 GO 富集分析

GO 富集分析结果(图 3)显示:继发性萎缩性鼻炎特异性的 DEPs 在 BP 层面主要涉及内质网 - 高尔基体囊泡运输、病毒转录以及外源性肽类抗原通过 MHC II 类途径的呈递和加工;在 MF 层面主要涉及核糖体的结构组成部分、肽的二硫键氧化还原酶活性以及蛋白质二硫键异构酶活性;在 CC 层面主要涉及细胞质核糖体大亚基以及 COP I/II 囊泡外衣。

2.3 DEPs 的 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果(图 4)显示:继发性萎缩性鼻炎特异性 DEPs 主要参与鞘脂生物合成、蛋白质运输以及内质网中蛋白质加工等通路。

3 讨论

继发性萎缩性鼻炎的发病率近年来随着鼻甲切除术的流行而越来越高,虽然该病症在病理学层面未达到致死性标准,但其顽固的临床症状与治疗应答率低下,导致患者长期处于躯体功能受损与心理健康受损的共病状态,这种多维度的健康损耗显著削弱了个体的职业功能表现及社会活动参与度^[9-10]。本研究通过蛋白质组学测序技术发现了

291 个与继发性萎缩性鼻炎密切相关的特异性差异蛋白,并对其进行了 GO 及 KEGG 富集分析。其中差异表达明显的蛋白质可能在继发性萎缩性鼻炎的发生及发展中起到重要作用。

COL6A6 基因位于人类 3 号染色体长臂的 q22.1 位点,编码 VI 型胶原蛋白家族的重要成员。该蛋白主要表达于上皮细胞的基底膜中,是细胞外基质的关键组成部分,不仅为组织提供结构支持,还通过介导细胞与纤连蛋白的相互作用参与细胞信号传导和微环境调控^[11]。研究表明,COL6A6 在多种生物学过程中发挥重要作用,包括抑制细胞凋亡、缓解氧化应激以及促进炎症细胞的浸润等^[12]。Ma 等^[13]的研究发现肺腺癌组织中,COL6A6 的表达与多种免疫细胞(如 B 细胞、T 细胞、中性粒细胞及树突状细胞)的浸润呈正相关,提示其在肿瘤微环境中的免疫调节作用。这一发现与本研究观察到的继发性萎缩性鼻炎患者鼻黏膜中 COL6A6 蛋白表达显著上调的现象相吻合,进一步支持了 COL6A6 在炎症相关疾病中的潜在作用。基于这些证据,推测 COL6A6 可能是通过调控局部免疫细胞浸润和炎症反应,成为导致患者鼻黏膜炎症的重要分子机制之一,未来研究可进一步探讨 COL6A6 在继发性萎缩性鼻炎中的具体作用机制及其作为潜在治疗靶点的可能性。

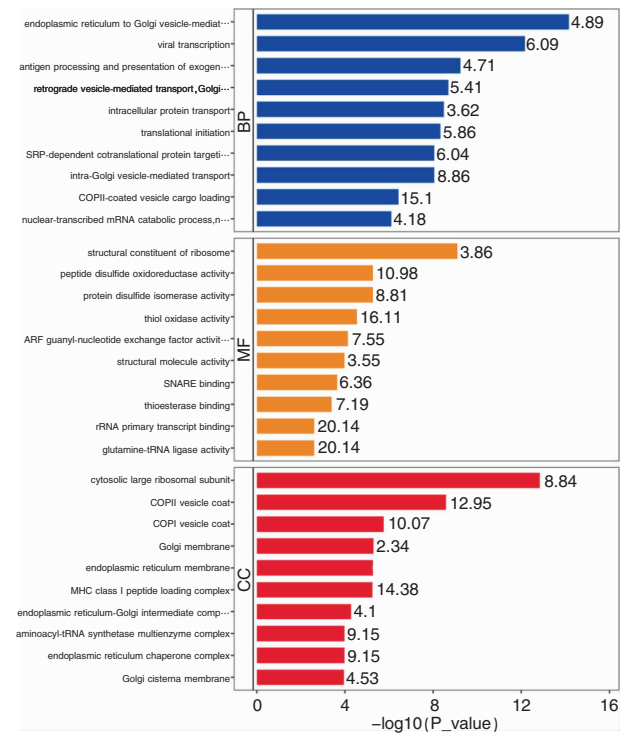


图 3 两组样本的 GO 富集分析 注:GO(基因本体)。

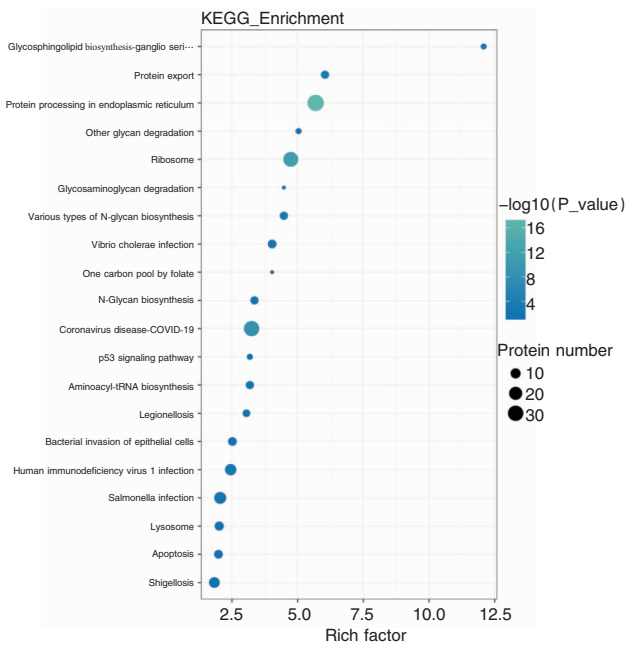


图 4 两组样本的 KEGG 富集分析 注:KEGG(京都基因与基因组百科全书)。

MPP1 蛋白作为膜相关鸟苷酸激酶家族的核心成员,其结构特征包含 PDZ 结构域、SH3 基序和鸟苷酸激酶结构域,这些结构域共同参与细胞内的信号传导网络和蛋白质相互作用网络^[14]。该蛋白通过与细胞膜上的筏蛋白特异性结合,在维持细胞膜稳定性和调控细胞极性方面发挥关键作用^[15]。具体而言,MPP1 蛋白通过调控中性粒细胞的极化过程,直接影响其趋化移动能力和炎症反应强度^[16]。在继发性萎缩性鼻炎患者的鼻黏膜组织中,MPP1 蛋白的表达水平显著上调,这一现象可能与中性粒细胞的异常活化以及上皮细胞连接蛋白的表达改变密切相关。这种表达改变可能导致炎症反应的持续存在和黏膜屏障功能的损伤。从分子机制来看,MPP1 蛋白可能通过调节细胞间连接复合物的稳定性,影响上皮细胞的紧密连接和粘附连接,从而改变黏膜屏障的通透性。同时,MPP1 蛋白与中性粒细胞表面受体的相互作用可能调控其活化状态,影响炎症因子的释放和免疫细胞的浸润。这些发现不仅为深入理解继发性萎缩性鼻炎的发病机制提供了新的分子视角,而且为开发基于 MPP1 蛋白调控的靶向治疗策略奠定了理论基础,具有潜在的临床应用价值。

GOLGA4 作为高尔基体中的一种 golgin 蛋白,其核心功能在于维持高尔基体的结构和功能完整性,通过促进囊泡运输,直接参与蛋白质的生产、加工和运输过程^[17-18]。尤其在黏膜上皮细胞等分泌性细胞中,GOLGA4 的正常表达对于确保蛋白质分泌的顺利进行具有不可替代的作用,一旦其表达异常,将导致细胞蛋白质分泌受到抑制,进而影响组织的正常功能;而 SLC38A10 作为溶质载体蛋白家族的一员^[19],主要分布在内质网和高尔基体中,其功能集中在将氨基酸运输到细胞内,为细胞提供必要的营养支持,帮助维持氨基酸代谢的平衡,确保细胞的正常生理活动^[20]。因为氨基酸运输关系到蛋白质生产和细胞信号传递,如果 SLC38A10 出现异常,会直接影响细胞的代谢能力和蛋白质合成。本研究发现,继发性萎缩性鼻炎患者的鼻黏膜组织中 GOLGA4 和 SLC38A10 蛋白含量明显减少,说明这两种蛋白可能参与疾病发展。具体来看 GOLGA4 减少会导致高尔基体结构异常,影响黏膜细胞的蛋白质生产和分泌功能,最终破坏黏膜屏障的修复能力;SLC38A10 减少会阻碍氨基酸运输,导致蛋白质合成不足,使黏膜细胞无法正常工作。这些变化共同造成鼻腔黏膜防御能力下降、炎症加重,加快疾病恶

化。接下来需要研究这两个蛋白在疾病中的具体作用,探索它们能否作为治疗靶点,为诊断和治疗该疾病提供新方法。

综上所述,本文利用蛋白质组学测序技术筛选出了继发性萎缩性鼻炎特异性的 DEPs,并采用 GO 及 KEGG 富集分析的方法进一步分析其富集的 BP、MF、CC 以及相关通路。结果表明 COL6A6、MPP1、GOLGA4 以及 SLC38A10 可能在继发性萎缩性鼻炎的发生、发展中起到重要作用,这有助于揭示继发性萎缩性鼻炎发病的分子生物学机制,为进一步研究提供参考。

参考文献:

- [1] Mishra A, Kawatra R, Gola M. Interventions for atrophic rhinitis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*,2012, 2012(2): Cd008280.
- [2] Passali D, Lauriello M, Anselmi M, et al. Treatment of hypertrophy of the inferior turbinate: long-term results in 382 patients randomly assigned to therapy [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*,1999, 108(6): 569-575.
- [3] Sumaily IA, Hakami NA, Almutairi AD, et al. An updated review on atrophic rhinitis and empty nose syndrome [J]. *Ear Nose Throat J*,2023;1455613231185022.
- [4] Kuan EC, Suh JD, Wang MB. Empty nose syndrome [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*,2015,15(1): 493.
- [5] Park MJ, Jang YJ. Successful management of primary atrophic rhinitis by turbinate reconstruction using autologous costal cartilage [J]. *Auris Nasus Larynx*,2018,45(3): 613-616.
- [6] Hassan CH, Malheiro E, Béquignon E, et al. Sublabial bioactive glass implantation for the management of primary atrophic rhinitis and empty nose syndrome: Operative technique [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*,2022,7(1): 6-11.
- [7] Talmadge J, Nayak JV, Yao W, et al. Management of postsurgical empty nose syndrome [J]. *Facial Plast Surg Clin North Am*,2019, 27(4): 465-475.
- [8] 罗元博,江晨艳,史方泽,等.下鼻道填充术对下鼻甲继发性缺失患者鼻腔容积影响的对照研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2024,30(2):32-39.
- [9] Manji J, Nayak JV, Thamboo A. The functional and psychological burden of empty nose syndrome [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2018, 8(6): 707-712.
- [10] Gill AS, Said M, Tollefson TT, et al. Update on empty nose syndrome: disease mechanisms, diagnostic tools, and treatment strategies [J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*,2019, 27(4): 237-242.
- [11] Hesse H, Engvall E. Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies [J]. *J Biol Chem*,1984, 259(6): 3955-3961.
- [12] Di Martino A, Cescon M, D'Agostino C, et al. Collagen VI in the musculoskeletal system [J]. *Int J Mol Sci*,2023, 24(6): 5095.

[13] Ma Y, Qiu M, Guo H, et al. Comprehensive analysis of the immune and prognostic implication of COL6A6 in lung adenocarcinoma[J]. Front Oncol,2021,11: 633420.

[14] Stöhr H, Weber BH. Cloning and characterization of the human retina-specific gene MPP4, a novel member of the p55 subfamily of MAGUK proteins[J]. Genomics,2001,74(3): 377 – 384.

[15] Trybus M, Niemiec L, Biernatowska A, et al. MPPI-based mechanism of resting state raft organization in the plasma membrane. Is it a general or specialized mechanism in erythroid cells? [J]. Folia Histochem Cytobiol,2019, 57(2): 43 – 55.

[16] Quinn BJ, Welch EJ, Kim AC, et al. Erythrocyte scaffolding protein p55/MPPI functions as an essential regulator of neutrophil polarity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009, 106(47): 19842 – 19847.

[17] Muschalik N, Munro S. Golgins[J]. Curr Biol,2018, 28(8): R374 – R376.

[18] Lowe M. The physiological functions of the golgin vesicle tethering proteins[J]. Front Cell Dev Biol,2019, 7: 94.

[19] Pizzagalli MD, Bensimon A, Superti-Furga G. A guide to plasma membrane solute carrier proteins[J]. FEBS J,2021, 288(9): 2784 – 2835.

[20] Tripathi R, Hosseini K, Arapi V, et al. SLC38A10 (SNAT10) is located in ER and Golgi compartments and has a role in regulating nascent protein synthesis [J]. Int J Mol Sci,2019, 20(24): 6265.

(收稿日期:2025 – 02 – 27)

本文引用格式: 闵艺洋,陈斌,阎小军,等. 继发性萎缩性鼻炎的鼻黏膜蛋白质组学分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2025,31(3):28 – 33. DOI:10.11798/j.issn.1007 – 1520.202525087

Cite this article as; MIN Yiyang, CHEN Bin, YAN Xiaojun, et al. Proteomic analysis of nasal mucosa in secondary atrophic rhinitis[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2025,31(3):28 – 33. DOI: 10.11798/j.issn.1007 – 1520.202525087