

圣科健骨胶囊对大鼠血清差异蛋白的影响

么宝金¹, 果淑凤², 袁劲松², 刘佳³, 赵大庆^{1*}

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 2. 北京世纪圣科科技发展有限公司, 北京 100010; 3. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: **目的** 探讨圣科健骨胶囊对大鼠血清差异蛋白的影响。**方法** 采用 iTRAQ 技术结合生物信息学分析, 比较空白组和圣科健骨胶囊组大鼠血清中的差异蛋白, 筛选与圣科健骨胶囊健骨功效相关的功能蛋白。**结果** 与空白组比较, 圣科健骨胶囊组大鼠血清中的差异蛋白主要为参与蛋白水解调节、外源刺激反应调节、压力反应调节、大分子复合物亚基组织和肽酶活性调节等生物进程的功能蛋白, 其中显著上调者主要包括 Greb1、Prkd3、Tns4、Serpina3m 等调控骨形成及骨质密度的功能蛋白, 显著下调者主要包括 Zfhx2、Nfkbiz、Kng1、Hpn、Prkesh 等参与骨关节炎和风湿性关节炎炎性反应的相关因子。**结论** 圣科健骨胶囊的健骨功效主要是通过上调参与调控骨密度和骨形成过程的功能蛋白表达来实现的, 同时可通过抑制相关炎症因子表达来防治骨关节炎和风湿性关节炎。

关键词: 圣科健骨胶囊; 血清; 差异蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0789-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.015

Effects of Shengke Jiangu Capsules on serum differential proteins in rats

YAO Bao-jin¹, GUO Shu-feng², YUAN Jin-song², LIU Jia³, ZHAO Da-qing^{1*}

(1. Jilin Provincial Academy of Ginseng, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Beijing Shijishengke Technological Development Co., Ltd., Beijing 100010, China; 3. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

KEY WORDS: Shengke Jiangu Capsules; serum; differential proteins

圣科健骨胶囊是由中国预防医学科学院和中国疾病预防控制中心专家结合国际上防治骨质疏松症的最新科研成果研制而成的保健产品, 作为健骨类产品在市场上销售多年, 取得了良好疗效, 该制剂从骨代谢本质入手, 遵循“补骨、修骨和养骨”三位一体理论, 将国际公认的高效健骨因子与纳米钙、活化维生素 D₃、微量元素等多种骨营养素按照一定比例复合而成, 通过调节内分泌可有效促进骨基质生成, 达到补充骨量、修复损伤骨组织、养护骨骼的功效。本实验采用同位素标记蛋白质定性定量 (iTRAQ) 分析技术结合生物信息学分析方法, 对圣科健骨胶囊给药后大鼠血清蛋白组进行差异表达分析, 以期揭示其健骨功效的内在分子机制。

1 材料

清洁级雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量(220±20) g, 购于长春市亿斯实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (吉)-2016-0003。圣科健骨胶囊由北京世纪圣科科技发展有限公司提供, 主要由高效健骨因子与纳米钙、活化维生素 D₃、微量元素等多种骨营养素按照一定比例复合而成。ProteoMiner 低丰度蛋白富集试剂盒购于美国 Bio-Rad 公司; iTRAQ 蛋白标记试剂盒购于美国 AB Sciex 公司。二硫苏糖醇、碘乙酰胺、三乙基碳酸氢铵、胰蛋白酶等为分析纯, 购于美国 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱纯, 购于美国 Thermo 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2018-07-02

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目 (JJKH20170721KJ); 吉林省科技厅优秀青年人才基金项目 (20170520044JH); 吉林省中医骨病临床医学研究中心项目 (20180623048TC)

作者简介: 么宝金 (1983—), 男, 博士, 研究员, 从事中药物质基础及作用机制研究。E-mail: ybj19830928@sina.com

* 通信作者: 赵大庆 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事中药有效成分及应用开发研究。

2 方法

2.1 蛋白提取制备

2.1.1 给药及血清采集 将大鼠随机分为空白组和给药组，每组 20 只，给药组给予 1 g/kg 圣科健骨胶囊生理盐水混悬液，空白组给予等体积生理盐水，每天灌胃给药 1 次，连续 3 周。末次灌胃给药次日，大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉，颈总动脉收集血液，4 ℃ 静置 2 h，2 000×g 离心 5 min，收集上清液，10 000×g 离心 10 min，收集血清，血清组分保存于-80 ℃下。

2.1.2 蛋白富集及酶解 将空白组、给药组血清分别合并，经 ProteoMiner 低丰度蛋白富集试剂盒去除免疫球蛋白和白蛋白等高丰度蛋白，采用 Bradford 法测定蛋白浓度。取 2 组血清蛋白各 100 μg，加入 10 mmol/L 二硫苏糖醇，37 ℃ 下还原处理 1 h 后加入 20 mmol/L 碘乙酰胺烷化处理 45 min，再加入 5 μg 胰蛋白酶，37 ℃ 下酶解 4 h 后再补加 5 μg 继续酶解 8 h，冻干。

2.1.3 蛋白酶解、标记和纯化 将酶解蛋白冻干粉溶于 0.5 mol/L 三乙基碳酸氢铵中，iTRAQ 蛋白标记试剂盒进行酶解蛋白标记，岛津 LC-20AB 液相系统进行肽段分离。分析采用 Ultremex SCX 层析柱（美国 Phenomenex 公司）；洗脱液 Buffer A，pH 2.7，含 25 mmol/L 磷酸二氢钾和 25% 乙腈；Buffer B，pH 2.7，含 25 mmol/L 磷酸二氢钾、1 mol/L 氯化钾和 25% 乙腈，洗脱条件为 Buffer A 10 min，5% ~ 35% Buffer B 11 min，35% ~ 80% Buffer B 1 min；吸收波长 214 nm。收集不同组分，经 Strata X 层析柱除盐后冻干。

2.1.4 液质鉴定及生物信息学分析 通过超高压液相色谱 nanoACQUITY 联合质谱 TripleTOF 5600 技术进行肽段鉴定，采用 Symmetry C₁₈、BEH130 C₁₈ 色谱柱（美国 Waters 公司）；流动相 A 液为水-乙腈-甲酸（98 : 2 : 0.1），B 液为水-乙腈-甲酸（2 : 98 : 0.1）；洗脱条件为 A 液 15 min，5% B 液 1 min，5% ~ 35% B 液 40 min，35% ~ 80% B 液 5 min，80% B 液 5 min；质谱参数反射扫描，分辨率 3.0×10⁴ 以上；脉冲频率 11 kHz；碰撞能量（35±5 eV）。然后，通过 ProteinPilot 5.0 软件（美国 AB Sciex 公司）进行数据分析，蛋白鉴定错误率 FDR ≤ 1%，当 2 组样品蛋白质丰度差异倍数 ≥ 1.5 倍或 ≤ 0.67 倍，且 P < 0.05 时可认定为差异蛋白，其功能富集采用 AmiGO 进行分析。

3 结果

3.1 血清差异蛋白功能富集分析 共鉴定出 237 种表达蛋白，与空白组比较，给药组显著上调的差异蛋白（差异倍数 ≥ 1.5 倍，P < 0.05）有 130 种，显著下调的（差异倍数 ≤ 0.67 倍，P < 0.05）有 107 种。针对这些差异蛋白，首先进行功能富集分析，包括细胞组分、分子功能、生物进程 3 种功能分类。

在细胞组分功能分类中，差异蛋白主要归类为细胞外区域、皮质肌动蛋白细胞骨架、蛋白酶体核心复合物、肌动蛋白丝、肌动球蛋白等，具体见表 1。

表 1 血清差异蛋白细胞组分富集分析 (P < 0.05)

Tab. 1 Cellular component enrichment analysis of serum differential proteins (P < 0.05)

GO 编号	GO 条目	差异表达蛋白数/个	P 值
0005576	细胞外区域	94	6.18×10 ⁻⁵
0030864	皮质肌动蛋白细胞骨架	7	4.61×10 ⁻³
0005839	蛋白酶体复合物	8	6.97×10 ⁻³
0005884	肌动蛋白丝	6	8.18×10 ⁻³
0042641	肌动球蛋白	9	8.90×10 ⁻³
0001725	应力纤维	8	1.53×10 ⁻²
0005924	细胞-底物黏合连接	8	1.53×10 ⁻²
0005925	黏着斑	8	1.53×10 ⁻²
0032432	肌动蛋白丝束	8	1.53×10 ⁻²
0030055	细胞-底物连接	8	2.15×10 ⁻²
0014731	血影蛋白相关细胞骨架	3	2.26×10 ⁻²
0030863	皮层细胞骨架	9	2.35×10 ⁻²
0005635	核被膜	7	2.64×10 ⁻²
0044448	细胞皮层部分	9	3.09×10 ⁻²
0044445	胞质部分	10	3.16×10 ⁻²
0017177	葡糖苷酶 II 复合物	2	3.52×10 ⁻²
0034359	成熟乳糜微粒	2	3.52×10 ⁻²
0015629	肌动蛋白细胞骨架	20	4.61×10 ⁻²

在分子功能分类中，差异蛋白主要归类为肽酶调节剂活性、抗原结合、肽酶抑制剂活性、酶抑制剂活性、过氧化物酶活性、丝氨酸型肽链内切酶抑制剂活性等，具体见表 2。

在生物进程分类中，差异蛋白主要归类为蛋白水解调节、外源刺激反应调节、压力反应调节、大分子复合物亚基组织、肽链内切酶活性调节、肽酶活性调节等，具体见表 3。

3.2 含药血清健骨功效分子机制研究 基于“3.1”项下结果，对给药后大鼠血清中显著上调（差异倍数 ≥ 1.5 倍，P < 0.05）的差异蛋白作进一步分析，结果共筛选出 14 种调控骨形成及骨质密度的功能蛋白，具体见表 4，主要包括 Greb1 蛋白（Greb1）、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 D3（Prkd3）、张力蛋白（Tns4）、丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3M（Serpina3m）、微管相关蛋白 1 A（Map1a）等。

表2 血清差异蛋白分子功能富集分析 ($P < 0.05$)

Tab. 2 Molecular function enrichment analysis of serum differential proteins ($P < 0.05$)

GO 编号	GO 条目	差异表达蛋白数/个	P 值
0061134	肽酶调节活性	24	1.06×10^{-4}
0003823	抗原结合	15	2.43×10^{-4}
0030414	肽酶抑制剂活性	21	4.90×10^{-4}
0004857	酶抑制剂活性	24	1.53×10^{-3}
0004601	过氧化物酶活性	9	1.60×10^{-3}
0004867	丝氨酸型肽链内切酶抑制剂活性	14	2.71×10^{-3}
0004175	肽链内切酶活性	23	3.65×10^{-3}
0016209	抗氧化活性	10	3.77×10^{-3}
0004298	苏氨酸型肽链内切酶活性	8	7.44×10^{-3}
0005506	铁离子结合	7	8.24×10^{-3}
0070011	肽酶活性, 作用于 L-氨基酸肽	27	1.07×10^{-2}
1901681	硫化物结合	14	1.10×10^{-2}
0005200	细胞骨架结构组成	9	1.35×10^{-2}
0005198	结构分子活性	19	1.57×10^{-2}
0008026	ATP 依赖性解旋酶活性	3	2.32×10^{-2}
0043274	磷脂酶结合	3	2.32×10^{-2}
0070008	丝氨酸型外肽酶活性	3	2.32×10^{-2}
0070035	嘌呤 NTP 依赖性解旋酶活性	3	2.32×10^{-2}
0005102	受体结合	38	2.33×10^{-2}
0008233	肽酶活性	28	2.65×10^{-2}
0050750	低密度脂蛋白颗粒受体结合	4	2.74×10^{-2}
0030234	酶调节活性	30	3.31×10^{-2}
0043499	真核细胞表面结合	6	3.38×10^{-2}
0001884	嘧啶核苷结合	2	3.59×10^{-2}
0015091	三价铁跨膜转运活性	2	3.59×10^{-2}
0017098	磷酸受体结合	2	3.59×10^{-2}
0017166	黏着斑蛋白结合	2	3.59×10^{-2}
0070001	天冬氨酸型肽酶活性	2	3.59×10^{-2}
0043498	细胞表面结合	8	4.11×10^{-2}
0008236	丝氨酸型肽酶活性	13	4.79×10^{-2}

表3 血清差异蛋白生物进程富集分析 ($P < 0.05$)

Tab. 3 Biological process enrichment analysis of serum differential proteins ($P < 0.05$)

GO 编号	GO 条目	差异表达蛋白数/个	P 值
0030162	蛋白水解调节	21	9.43×10^{-7}
0032101	外部刺激反应调节	31	5.51×10^{-5}
0080134	压力反应调节	35	1.15×10^{-4}
0043933	大分子复合物亚基组织	40	1.21×10^{-4}
0052548	肽链内切酶活性调节	20	1.95×10^{-4}
0052547	肽酶活性调节	24	2.11×10^{-4}
0071822	蛋白质复合物亚基组织	34	2.83×10^{-4}
0006950	应力反应	84	3.11×10^{-4}
0009611	损伤反应	48	5.93×10^{-4}
0044092	分子功能负调控	35	6.07×10^{-4}
1900046	止血调节	13	6.43×10^{-4}
0061041	伤口愈合调节	13	9.75×10^{-4}
0043086	催化活性负调节	32	1.02×10^{-3}
0043243	蛋白复合物分解正调控	4	1.21×10^{-3}
0070293	肾吸收	4	1.21×10^{-3}
0010951	肽链内切酶活性负调节	14	1.21×10^{-3}
1900048	止血正调节	7	1.23×10^{-3}
0051246	蛋白质代谢进程调节	51	1.28×10^{-3}
0051291	蛋白质异寡聚化	8	1.43×10^{-3}
0042744	过氧化氢分解代谢过程	9	1.46×10^{-3}
0070271	蛋白质复合体生物起源	26	1.54×10^{-3}
0050727	炎症反应调节	17	1.74×10^{-3}
0042542	过氧化氢反应	10	2.23×10^{-3}
0070301	细胞过氧化氢反应	9	2.45×10^{-3}
0000302	活性氧反应	12	2.48×10^{-3}
0032501	多细胞生物进程	101	2.61×10^{-3}
0042060	伤口愈合	31	2.66×10^{-3}
0050896	应激反应	122	3.21×10^{-3}
0006917	细胞凋亡诱导	9	3.91×10^{-3}
0006954	炎症反应	20	3.99×10^{-3}
0008361	细胞大小调节	6	4.36×10^{-3}
0044699	单一生物体进程	157	4.65×10^{-3}

表4 含药血清健骨功效差异蛋白分析

Tab. 4 Differential protein analysis of medicated serum for bone-invigorating effect

蛋白名称	差异倍数/倍	P 值
Greb1 蛋白 (Greb1)	5.923	0.024
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 D3 (Prkd3)	5.872	0.001
张力蛋白 (Tns4)	4.801	0.037
丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpina3m)	2.648	0.001
微管相关蛋白 1 A (Map1a)	2.617	0.045
过氧化物还原酶-2 (Prdx2)	2.304	0.001
丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3L (Serpina3l)	2.234	0.001
催乳素 (Prl)	1.999	0.035
谷胱甘肽过氧化物酶 1 (Gpx1)	1.889	0.001
蛋白 4.1 (Epb41)	1.814	0.001
丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3K (Serpina3k)	1.762	0.001
嗜中性粒细胞颗粒蛋白 (Ngp)	1.687	0.020
备解素 (Cfp)	1.515	0.001
羧酸酯酶 1C (Ces1c)	1.507	0.001

3.3 含药血清抗炎功效分子机制研究 基于“3.1”项下结果,对给药后大鼠血清中显著下调(差异倍数 ≤ 0.67 倍, $P < 0.05$)的差异蛋白作进一步分析,结果共筛选出12种参与炎症反应的功能蛋白,具体见表5,主要包括锌指同源蛋白2 (Zfhx2)、NF-kappa-B 抑制剂 zeta (Nfkbiz)、激肽原-1 (Kng1)、丝氨酸蛋白酶 hepsin (Hpn) 等。

4 讨论

本实验采用 iTRAQ 分析技术结合生物信息学分析方法,对圣科健骨胶囊给药后大鼠血清蛋白组进行系统分析,共鉴定出237种差异蛋白。功能富集分析结果表明,这些差异蛋白主要为细胞外基质、细胞骨架蛋白、蛋白酶体复合物等,主要参与酶调节、抗原结合、蛋白水解调节、外源刺激反应调节、压力反应调节、大分子复合物亚基组织、肽酶活性调节等生物进程。

表 5 含药血清抗炎功效差异蛋白分析

Tab. 5 Differential protein analysis of medicated serum for anti-inflammatory effect

蛋白名称	差异倍数/倍	P 值
锌指同源蛋白 2(Zfhx2)	0.119	0.001
NF-kappa-B 抑制剂 zeta (Nfkbiz)	0.338	0.001
激肽原-1(Kng1)	0.369	0.001
丝氨酸蛋白酶 hepsin(Hpn)	0.420	0.002
葡萄糖苷酶 2 亚基 beta(Prkcsh)	0.469	0.001
前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 9 型(Pcsk9)	0.505	0.001
CD5 抗原样(Cd5l)	0.578	0.001
Ficolin-2 蛋白(Fen2)	0.581	0.014
Xaa-Pro 氨肽酶 2(Xpnpep2)	0.604	0.001
中性 α-葡萄糖苷酶 AB(Ganab)	0.642	0.001
天冬氨酸胺酶 A(Napsa)	0.649	0.006
Dickkopf 相关蛋白 3(DKK3)	0.670	0.036

与空白组比较, 圣科健骨胶囊组显著上调的差异蛋白主要包括 Greb1、Prkd3、Tns4、Serpina3m 等调控骨形成及骨质密度的功能蛋白。其中, Greb1 作为雌激素调节通路的重要分子, 在成骨细胞和成软骨细胞中表达量显著上调, 其遗传变异与骨密度变化导致的骨质疏松密切相关^[1-2]; Prkd3 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 是成骨细胞分化和矿化结节形成的重要调控因子^[3]; Tns4 属于支架蛋白家族成员, 是细胞生长和迁移的重要调控因子, 主要通过触发整联蛋白与肌动蛋白细胞骨架的解偶联来实现^[4]; Serpina3m、Serpina3l、Serpina3k 同属于丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpina3 亚型, 可通过抑制局部丝氨酸蛋白酶浓度进而调控骨髓造血微环境的动态平衡^[5]; Map1a 属于微管相关蛋白家族成员, 可通过调节微管组装、微管结构及功能促进成骨细胞增殖和分化^[6]; Prdx2 主要在骨髓基质细胞中表达, 可有效阻止骨髓老化^[7]; Prl 是一种蛋白质激素, 可减少破骨细胞形成和骨质流失, 促进骨形成^[8]; Gpx1 是一种抗氧化酶, 主要调控细胞防御氧化损伤, 从而防止骨质疏松症等与年龄相关疾病的发生^[9]; Epb41 最初被认为是红细胞膜分子, 主要负责维护细胞的完整性及膜骨架和跨膜蛋白之间的相互作用, 最近研究表明, 该基因缺失小鼠肠钙吸收功能受损, 进而导致继发性甲状旁腺功能亢进所致的骨钙缺失^[10]; 另外, 显著上调的差异表达蛋白还包括具有抗炎、抗感染、排毒功效的功能蛋白, 如 Ngp、Cfp、Ces1c 等^[11-13]。由此表明, 圣科健骨胶囊的健骨功效主要是通过上调以上参与调控骨密度和骨形成过程的功能蛋白来实现的。

与空白组比较, 圣科健骨胶囊组显著下调的差

异蛋白主要包括 Zfhx2、Nfkbiz、Kng1、Hpn、Prkcsh 等参与骨关节炎和风湿性关节炎炎性反应的相关因子。其中, Kng1 是一种高分子量激肽原, 该基因缺失小鼠可有效拮抗 PG-PS 所致骨关节炎炎性反应及软骨损伤^[14]; Hpn 是一种丝氨酸蛋白酶, 大量研究表明蛋白水解级联中的丝氨酸蛋白酶导致细胞外基质如骨关节炎软骨组织的病理性损伤^[15]; Pcsk9 是一种促炎因子, 其基因缺失小鼠可有效降低炎性反应相关因子表达^[16]; Cd5l、Fen2、Xpnpep2、Ganab 等在骨关节炎和风湿性关节炎患者关节液或关节软骨中表达量显著上调^[17-20]; DKK3 缺失可抑制 NF-κB 信号通路, 进而降低炎性反应症状^[21]; Nfkbiz 为非典型 IκB 蛋白家族成员, 也为各种炎症刺激诱导下 NF-κB 的主要反应因子, 既是促炎因子, 又是抗炎基因产物活性的调控因子^[22]; Zfhx2、Prkcsh、Napsa 等在炎性反应调控中发挥重要作用^[23]。由此表明, 圣科健骨胶囊可通过抑制相关炎性因子表达来对骨关节炎和风湿性关节炎实现防治作用。

参考文献:

[1] Mohammed H, D'Santos C, Serandour A A, et al. Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 342-349.

[2] Hegarty K G, Drummond F J, Daly M, et al. GREB1 genetic variants are associated with bone mineral density in Caucasians [J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(2): 189-199.

[3] Ford J J, Yeh L C, Schmidgal E C, et al. Protein kinase D1 is essential for bone acquisition during pubertal growth[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(11): 4182-4191.

[4] Muharram G, Sahgal P, Korpela T, et al. Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells[J]. *Dev Cell*, 2014, 29(5): 629-630.

[5] Winkler I G, Hendy J, Coughlin P, et al. Serine protease inhibitors serpin1 and serpin3 are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(7): 1077-1088.

[6] Kanenari M, Zhao J, Abiko Y. Enhancement of microtubule-associated protein-1 Alpha gene expression in osteoblasts by low level laser irradiation[J]. *Laser Ther*, 2011, 20(1): 47-51.

[7] Wang W, Gou L T, Xie G, et al. Proteomic analysis of interstitial fluid in bone marrow identified that peroxiredoxin 2 regulates H₂O₂ level of bone marrow during aging[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(8): 3812-3819.

[8] Ledesma-Colunga M G, Adán N, Ortiz G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19: 93.

- [9] Mlakar S J, Osredkar J, Prezelj J, *et al.* The antioxidant enzyme GPX1 gene polymorphisms are associated with low BMD and increased bone turnover markers [J]. *Dis Markers*, 2010, 29(2): 71-80.
- [10] Liu C, Weng H, Chen L, *et al.* Impaired intestinal calcium absorption in protein 4.1R-deficient mice due to altered expression of plasma membrane calcium ATPase 1b (PMCA1b) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(16): 11407-11415.
- [11] Druhan L J, Lance A, Li S, *et al.* Leucine rich α -2 glycoprotein; a novel neutrophil granule protein and modulator of myelopoiesis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170261.
- [12] Ali Y M, Hayat A, Saeed B M, *et al.* Low-dose recombinant properdin provides substantial protection against *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(14): 5301-5306.
- [13] Jones R D, Taylor A M, Tong E Y, *et al.* Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(1): 40-49.
- [14] Sainz I M, Isordia-Salas I, Castaneda J L, *et al.* Modulation of inflammation by kininogen deficiency in a rat model of inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(8): 2549-2552.
- [15] Wilkinson D J, Desilets A, Lin H, *et al.* The serine proteinase hepsin is an activator of pro-matrix metalloproteinases; molecular mechanisms and implications for extracellular matrix turnover [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 16693.
- [16] Walley K R, Thain K R, Russell J A, *et al.* PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(258): 258ra143.
- [17] Balakrishnan L, Bhattacharjee M, Ahmad S, *et al.* Differential proteomic analysis of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients [J]. *Clin Proteomics*, 2014, 11(1): 1.
- [18] Ammitzboll C G, Thiel S, Ellingsen T, *et al.* Levels of lectin pathway proteins in plasma and synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(5): 1457-1463.
- [19] Haas C S, Creighton C J, Pi X J, *et al.* Identification of genes modulated in rheumatoid arthritis using complementary DNA microarray analysis of lymphoblastoid B cell lines from disease-discordant monozygotic twins [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(7): 2047-2060.
- [20] Calamia V, Fernández-Puente P, Mateos J, *et al.* Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(6): M111.013417.
- [21] Cheng W L, Yang Y, Zhang X J, *et al.* Dickkopf-3 ablation attenuates the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(2): e004690.
- [22] Hörber S, Hildebrand D G, Lieb W S, *et al.* The atypical inhibitor of NF- κ B, I κ B ζ , controls macrophage interleukin-10 expression [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12851-12861.
- [23] Gautier E L, Chow A, Spanbroek R, *et al.* Systemic analysis of PPAR γ in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity [J]. *J Immunol*, 2012, 189(5): 2614-2624.