

• 论 著 •

应用定量蛋白质组学技术对 IgA 肾病肾组织蛋白的鉴定和定量分析^{*}

崔甄甄

(广西师范大学生命科学学院,广西桂林 541006)

摘要:目的 应用相对和绝对定量的同位素标记(iTRAQ)结合液相色谱和质谱技术,对 IgA 肾病肾组织蛋白质进行鉴定和定量分析。**方法** 利用 iTRAQ 技术分析 IgA 肾病肾组织及正常对照肾组织中的蛋白质组信息,寻找显著差异表达蛋白质。**结果** 共鉴定 1860 个蛋白,其中 287 个蛋白在 IgA 肾病肾组织中显著上调表达,287 个蛋白显著下调表达,最终筛选出 9 个明显上调蛋白和 8 个明显下调蛋白。**结论** 定量蛋白质组学技术可有效地用于组织蛋白鉴定和相对定量,利于更好地了解蛋白质与 IgA 肾病发病机制的关系。

关键词:IgA 肾病; 同位素标记; 肾脏组织; GO 分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)20-2804-04

Differential proteomic analysis of renal tissues in patients with IgA nephropathy using quantitative proteomics technique^{*}

CUI Zhenzhen

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541006, China)

Abstract: Objective To analyze and identify the protein of patients with IgA nephropathy for identification and quantitative analysis using the combination of liquid chromatography and mass spectrometry which combined isobaric tags for relative and absolute quantification. **Methods** Proteomic analysis of renal tissue in patients with IgA nephropathy and normal controls was performed to identify different expressed proteins. **Results** A total of 1 860 proteins were identified, 287 proteins were upregulated in renal tissue of IgA nephropathy patients, 287 proteins were downregulated significantly, finally 9 upregulated proteins and 8 down regulated proteins were identified (protein fold difference greater than 1.5). **Conclusion** Quantitative proteomic technology is efficiently applicable for identification and relative quantitation of proteome in renal tissue, which could get all the information of different protein. This is useful for us to better understand the relationship of protein and the pathogenesis of IGA nephropathy.

Key words:IgA nephropathy; isotope labeling; renal tissue; GO analysis

IgA 肾病(IgAN)是一种免疫复合物引起的肾炎,常见的临床症状包括发作性肉眼血尿、无症状性血尿、急性肾衰竭等。目前发病机制尚未完全阐明,主要认为与遗传、免疫、细胞因子及炎症等因素相关^[1-2]。目前临床诊断可根据临床表现、实验室检查及肾组织病理检查 4 个方面来判断,最可靠的诊断手段仍是肾组织病理检查,但是穿刺部位并不一定具备病理代表性,且疾病的发生往往在表象变化前就早已开始了分子变化,其次,病理检查具有出血和并发症风险,因而不能在同一患者身上进行反复的侵入性检查。因此,有必要运用创新性手段寻找非侵入性的诊断工具,在患者肾功能出现异常前通过检测分子标志物,从而发现潜在的 IgA 肾病患者,及时为其作出诊断与有效治疗^[3-4]。本研究利用相对和绝对定量的同位素标记(iTRAQ)结合液相色谱和质谱技术,在掌握全组蛋白信息后,将 IgA 肾病组织与正常对照肾组织的总蛋白质进行定量分析和鉴定,从获得的表达差异蛋白中筛选潜在的生物标记物并对其进行功能分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有标本均来源于中国人民解放军第一八一医院,患者知情同意参加本项研究,并经医院伦理委员会通过。试验组标本均取自肾穿刺活检组织标本,并通过病理检查确诊

为 IgA 肾病后进行分组试验。本试验共纳入了 6 例 IgA 肾病患者肾组织标本(试验组)及 3 例肾肿瘤手术取下的远离病灶部位并经临床证实的正常肾组织标本(正常对照组),试验组与正常对照组相互匹配。

1.2 主要仪器与试剂 液相色谱仪购自 Dionex(美国);Opti-TOF LC/MALDI 和 MALDI TOF/TOF 购自 Applied Biosystems(美国)。高丰度蛋白去除试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒购自 Bio-Rad Laboratories(美国);三乙基碳酸氢铵(TEAB)、三-(2-羧乙基)膦(TCEP)购自 Sigma-Aldrich(美国);胰蛋白酶、iTRAQ 8-plex 标记试剂盒及缓冲液购自 Applied Biosystems(美国)。

1.3 方法

1.3.1 肾组织标本的采集 标本来自于肾穿刺活检,在临床医生的帮助下进行无菌操作,在取得肾活检组织后立刻用 0.9% NaCl 冲洗,而后移入冻存管并放入 -20 ℃ 冰箱冷冻,冷冻完毕后移入 -80 ℃ 冰柜保存备用。

1.3.2 组织蛋白的提取 将事先配制好的丙酮溶液 A(10% 的 TCA-丙酮溶液)、B(丙酮)和清洁干净的研钵置于 -20 ℃ 冷却;将一定量的肾组织(一般为 250 mg)至于液氮中冷却;在预冷完毕后的研钵中放入标本,并加液氮研磨至粉末状;取出磨

* 基金项目:广西师范大学校级项目青年基金(17A)。

作者简介:崔甄甄,女,实验员,主要从事生物化学与分子生物学及重大疾病分子机理等相关研究。

好的标本,用 A 液加至 10 倍体积使其悬浮,加入 1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT,−20 ℃ 环境下静置 2 h,而后将其取出并移入 4 ℃ 恒温,35 000 r/min 离心 15 min,弃上清;用 B 液加至 10 倍体积使其再次悬浮,加入 1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT,−20 ℃ 环境下静置 2 h,而后将其取出并移入 4 ℃ 恒温,35 000 r/min 离心 15 min,弃上清;沉淀标本再次用 10 倍体积的 B 液悬浮,将前一步骤重复 2 次;取出去上清后的沉淀,将其置于真空环境中干燥 5 min,使有机溶剂去除干净;按 10 mg:200 μL=干粉末:蛋白抽提液的比例分别加入 1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT 并使其充分溶解,随后将其移入 10 ℃ 恒温,40 000 r/min 离心 15 min,上清液为所需要的蛋白质溶液;采用蛋白浓度测定试剂盒(Bio-Rad Laboratories, 美国),根据试剂盒制造商的说明书测定上清液中蛋白质浓度。

1.3.3 消化及 iTRAQ 标记 试验组和正常对照组各取 100 μg 蛋白质,加入 DTT 至终浓度 10 mmol/L,56 ℃ 环境下恒温孵育 1 h;加入 IAM 至终浓度 55 mmol/L,放置暗处室温静置 45 min;加入蛋白质溶液 4 倍体积的丙酮(已做过预冷处理),静置于−20 ℃ 环境 2 h;离心 25 min,弃上清,加入 20 μL TE-AB 溶液,使沉淀溶解,之后再加入 2% SDS 的溶液 1 μL,超声处理后静置至蛋白质完全溶解;按 1:30=胰蛋白酶:蛋白质的比例加入 1 μg/μL 的胰蛋白酶,置于 37 ℃ 恒温环境下消化 24 h;再次加入 1 μL 胰蛋白酶,同等环境下消化 12 h。打开 iTRAQ 试剂盒后将试剂置于室温环境下,每只试剂加入 70 μL 乙醇,并将消化后的样品溶解其中,混匀、标记。iTRAQ 标记如下:正常对照组加入 iTRAQ 试剂 113,试验组加入 iTRAQ 试剂 121,混匀,室温静置 1 h。

1.3.4 强阳离子交换色谱分离 强阳离子交换的目的在于去除过量的 iTRAQ 试剂和干扰物,从而得到更准确的质谱结果。将标本悬浮在 200 μL 缓冲液 A 中,60 min 内进行以下梯度测试:5 min 100% 缓冲液 A,40 min 5%~30% 缓冲液 B,5 min 30%~100% 缓冲液 B,5 min 100% 缓冲液 B 和 5 min 100% 缓冲液 A。收集 10 个组分,之后根据色谱图的峰值强度进而合并相关组分,所得产物真空干燥后备用(保存于−20 ℃ 环境下)。缓冲液 A 的配制:10 mmol/L 磷酸氢钾,25% 乙腈+500 mmol/L 氯化钾,pH 调至 3.0。缓冲液 B 的配制:10 mmol/L 磷酸二氢钾,25% 乙腈+500 mmol/L 氯化钾,pH 调

至 3.0。

1.3.5 液相色谱和质谱分析 将干燥好的样品溶解于缓冲液 C,装入 C18 trap 柱并同时用分离柱分离,设定速度为 500 nL/min,缓冲液 C(95% 纯水,5% 乙腈+0.1% TFA)。分离时,设置时间进入 120 min 后将缓冲液 B 的乙腈的线性浓度从 5% 增加至 30%,当设置时间进入 40 min 后将 30% 增至 60%。最后用洗脱剂在 800 nL/min 的流速下洗脱,在 Opti-TOF LC/MALDI 仪中沉积为 10S 组分。质谱仪设置为正离子数据采集模式,一级质谱每个谱 1 000 次激光射击,二级质谱每个谱 4 000 次激光射击,质量公差为 80 ppm,加合物公差(m/z)±0.003,气压为 2×10^2 bar^[5]。

1.3.6 蛋白质鉴定、数据库搜索与 GO 分析 将质谱分析所得到的数据结合 ImageMaster 2D 5.0 软件对蛋白质进行定量分析与鉴定。通过 UniProtKB(<http://www.uniprot.org/uniprot/>)数据库查找相关蛋白质。其中,试验组比正常对照组数据值 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 的蛋白,认为是差异表达蛋白,当相对比值 ≥ 1.5 时称其为上调蛋白,比值 ≤ 0.67 时称其为下调蛋白,且满足 $P < 0.05$ 。GO 分析由分子功能(MF)、细胞组成(CC)及生物过程(BP)三部分组成,在 WEGO 数据库完成(<http://wego.genomics.org.cn/>),通过该分析,可找到在统计上显著富集的 GO Term,从而进一步研究蛋白质各功能在疾病中发挥的作用。

2 结 果

2.1 蛋白质鉴定结果 差异蛋白选取时应满足所选择肽链 > 1 、置信区间 $> 95\%$ ($P < 0.05$) 的相关条件,本试验通过采用 iTRAQ 技术与质谱分析相结合,对 IgA 肾病和正常肾组织内的差异蛋白质组进行分析鉴定,共获得 1 860 种蛋白质并成功定量、定性,其中差异倍数大于 1.5 的蛋白个数共计 287 个,为明显表达差异的上调蛋白,差异倍数小于 0.67 的蛋白共计 287 个,为明显表达差异的下调蛋白。

2.2 差异表达蛋白筛选结果 在正常对照组中加入 iTRAQ 试剂 113,IgA 肾病试验组中加入 iTRAQ 试剂 121 进行标记,通过比较某一蛋白质不同组间的差异表达并计算试验组与正常对照组蛋白含量的比值,结合本次试验结果及以往的相关研究报道,最终共筛选出 9 个明显上调蛋白和 8 个明显下调蛋白,见表 1~2。

表 1 IgA 肾病患者肾组织的上调蛋白

编号	ID	蛋白名称	分子功能	生物过程	最大差异倍数
1	sp P09493	原肌球蛋白 $\alpha 1$ 链	细胞骨架的结构组成	建立定位、运输	3.35
2	sp P61769	$\beta 2$ -微球蛋白	蛋白结合	免疫反应	2.99
3	sp P68133	肌动蛋白, α 骨骼肌	核苷结合	生物质量调控	2.76
4	sp Q9NZP8	补体 C1r 子蛋白	水解酶活性	免疫反应	2.58
5	sp P04083	膜联蛋白 A1	钙离子结合	运输	2.56
6	sp P04075	果糖二磷酸醛缩酶 A	裂解酶活性	生物质量调控	2.38
7	sp P62328	胸腺素 $\beta 4$	蛋白结合	细胞组分的调节	1.91
8	sp P01011	$\alpha 1$ -抗糜蛋白酶	蛋白结合	生物质量调控	1.58
9	sp P05156	补体因子 I	水解酶活性	对外部刺激的反应	1.56

表2 IgA肾病患者肾组织的下调蛋白

编号	ID	蛋白名称	分子功能	生物过程	最大差异倍数
1	sp P09669	细胞色素c氧化酶亚基6c	氧化还原酶活性	细胞代谢过程	0.62
2	sp P51649	琥珀酸半醛脱氢酶,线粒体	氧化还原酶活性	氧化还原	0.55
3	sp P10809	60 kDa热休克蛋白,线粒体	核苷酸结合	免疫系统过程的正调节	0.53
4	sp P62195	26S蛋白酶体调节亚基8	核苷结合	分解代谢过程	0.50
5	sp P05091	醛脱氢酶,线粒体	氧化还原酶活性	氧化还原	0.47
6	sp P01031	补体C5	蛋白结合	细胞代谢过程	0.45
7	sp P02753	视黄醇结合蛋白4	脂质结合	应对外部刺激	0.36
8	sp P00966	精胺琥珀酸合成酶	核苷结合	细胞代谢过程	0.36

表3 富集量最大的5种分子功能、细胞组成、生物过程

分子功能	蛋白数(n)	比例(%)	细胞组成	蛋白数(n)	比例(%)	生物过程	蛋白数(n)	比例(%)
蛋白结合	321	57.12	细胞内	464	82.56	细胞代谢过程	264	46.98
核苷结合	114	20.28	细胞内的部分	462	82.21	建立定位	131	23.31
水解酶活性	103	18.33	细胞内的细胞器	374	66.55	运输	129	22.95
氧化还原酶活性	91	16.19	界膜的细胞器	310	55.16	生物质量监管	88	15.66
核苷酸结合	72	12.81	胞器部分	230	40.93	氧化还原	82	14.59

2.3 差异蛋白GO分析 本试验对差异蛋白进行了GO富集分析,通过该分析,对差异表达的蛋白质生物过程及分子功能有了进一步认识,见表3。

3 讨 论

本次蛋白质组学分析研究发现了多个在IgA肾病患者肾组织中差异表达的蛋白,其中有些蛋白在过去的相关研究报道中被指出一定程度上与肾脏的损伤有关,或在免疫性疾病发生过程中起着重要作用^[6-7],如上调蛋白中的胸腺素β4(thymosin beta-4)、膜联蛋白A1(annexin A1)和下调蛋白中的补体C5(complement C5)、视黄醇结合蛋白4(retinol-binding protein 4)等。

视黄醇结合蛋白4是一种转运蛋白,主要由肝细胞合成,广泛分布于血清、尿液及人体其他体液中。Frey等^[8]研究发现,若视黄醇结合蛋白4在肾脏的分解代谢中受损,会直接导致该物质在人体血清内累积,且该现象并非肝脏疾病所致,因而肾功能与视黄醇结合蛋白4含量息息相关,它在一定程度上与肾脏的损伤具有联系,表明本次研究鉴定出差异表达显著的视黄醇结合蛋白4有望作为IgA肾病的潜在诊断标志物。

β2-微球蛋白的结构与免疫球蛋白结构极为相似^[9],属于小分子蛋白,由于这一特性,其合成速率极高且非常稳定,通常以游离形式存在于血液、尿液、脑脊液等体液中^[10],其主要生理作用是对HLA-I类抗原的表达起稳定作用。人体血液循环系统中的β2-微球蛋白含量极少,在经过肾小球自由过滤后会自动滤除,99.9%的β2-微球蛋白均被近曲小管上皮细胞以胞饮的方式摄取,并被降解成氨基酸供有机体再次使用^[11]。因而,近年研究表明β2-微球蛋白可作为一种反映肾损伤的标记物^[12]。相关研究报道指出,当尿液与血液中的β2-微球蛋白出现升高或下降时,将反映出肾小球、肾小管等部位的受损情况,通过对β2-微球蛋白的测定便可较为敏感地判断肾功能^[7]。

本次研究发现在IgA肾病组织中β2-微球蛋白表达差异显著,这与以往的研究结果一致。

膜联蛋白A1是一种钙离子结合蛋白,广泛存在于人类组织器官的细胞中,并占据整个细胞蛋白质含量的0.5%~2%^[13],该蛋白参与多种重要的细胞生理过程,在中性粒细胞中表达较高。研究表明,该蛋白参与调控炎症的相关过程并在其中扮演了重要角色^[14]。在炎性反应中,膜联蛋白A1对中性粒细胞与单核细胞的迁移具有较大的抑制作用^[15],当中性粒细胞黏附于血管内皮细胞上时,膜联蛋白A1会立刻移动,同时与白细胞因子及细胞毒性相互作用^[16],从而起到调控炎性反应的作用。膜联蛋白A1还参与了生物体内的多种生物学功能,除炎性反应外,还包括信号转导、细胞增殖与凋亡等,详细的作用机制有待进一步研究。同时,本次研究中还发现一些差异显著的蛋白,如精胺琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase)、补体C5(complement C5)等,相关报道已证实它们与组织内相关物质的合成、免疫调节作用相关^[17],但它们在IgA肾病发展中的具体作用尚不清楚。

本次研究着重于IgA肾病肾组织和正常对照肾组织中差异蛋白质的比较,从而筛选出潜在的生物标志物,这些标志物将有可能成为今后IgA肾病的早期诊断、治疗的新依据。iTRAQ技术结合液相色谱和质谱技术已成为定量蛋白质组学研究领域的一项高效工具,为寻找、筛查疾病的潜在生物标志物提供了有效途径,为临床诊断、治疗及新型药物的开发与研究提供了新方向。

参考文献

- [1] 张小攀. IgA肾病发病机制的研究新进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2016, 36(1): 157-160.
- [2] 孙立明. 现代医学对IgA肾病的病因发病机制的研究进

- 展[J]. 中华全科医学, 2011, 9(1): 112-113.
- [3] Yu HH, Chiang BL. Diagnosis and classification of IgA nephropathy[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4/5): 556-559.
- [4] 贺理宇, 刘虹, 彭佑铭. IgA 肾病免疫机制与治疗靶点研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(1): 96-101.
- [5] Wang LQ, Dai Y, Qi SW, et al. Comparative proteome analysis of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus with iTRAQ quantitative proteomics [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(3): 585-593.
- [6] Monteiro MB, Thieme K, Santos-Bezerra DP, et al. Beta-2-microglobulin(B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes[J]. Metabolism, 2016, 65(6): 816-824.
- [7] Jovanovic D, Krstivojevic P, Obradovic I, et al. Serum Cystatin C and β -Microglobulin as Markers of Glomerular Filtration Rate, Renal Failure, Informa Healthcare[J]. Renal Failure, 2003, 25(1): 123-133.
- [8] Frey SK, Nagl B, Henze A, et al. Isoforms of Retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver[J]. Lipids Health Dis, 2008, 7(1): 1-9.
- [9] Tin A, Astor BC, Boerwinkle E, et al. Genome-wide association study identified the human leukocyte antigen region as a novel locus for plasma beta-2 microglobulin[J]. Hum Genet, 2013, 132(6): 619-627.
- [10] Cheung CL, Lam KS, Cheung BM. Serum beta-2 microglobulin predicts mortality in People with diabetes[J].
- [11] Spaggiari E, Dreux S, Czerniewicz I, et al. Fetal obstructive uropathy complicated by urinary ascites: outcome and prognostic value of fetal serum β -2-microglobulin[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 41(2): 185-189.
- [12] Foster MC, Coresh J, Hsu CY, et al. Serum β -Trace protein and β -2-Microglobulin as predictors of ESRD, mortality, and cardiovascular disease in adults with CKD in the chronic renal insufficiency cohort(CRIC) study[J]. Am J Kidney Dis, 2016, 68(1): 68-76.
- [13] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function [J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 331-371.
- [14] Pan B, Kong JE, Jin JR, et al. A novel anti-inflammatory mechanism of high density lipoprotein through up-regulating annexin A1 in vascular endothelial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(6): 501-512.
- [15] Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir[J]. Lancet, 2002, 359(9312): 1121-1122.
- [16] Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines[J]. Toxicology, 2005, 209(2): 217-220.
- [17] Schejbel L, Fadnes D, Permin H, et al. Primary complement C5 deficiencies-molecular characterization and clinical review of two families[J]. Immunobiology, 2013, 218(10): 1304-1310.

(收稿日期: 2017-04-17 修回日期: 2017-06-21)

(上接第 2803 页)

综上所述, 小分子标志物 let-7b 被证实参与众多的病理生理过程, 特别是在肿瘤研究领域, 本研究证实血液循环系统来源的 let-7b 可以作为早期食道癌的诊断生物标志物。

参考文献

- [1] Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma[J]. Blood, 2009, 114(25): e20-e26.
- [2] Wang Y, Li L, Qu Z, et al. The expression of miR-30a* and miR-30e* is associated with a dualistic model for grading ovarian papillary serous carcinoma[J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1904-1914.
- [3] Perez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, et al. A microRNA Signature Associated with Early Recurrence in Breast Cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91884.
- [4] Liu Z, Chen L, Zhang X, et al. RUNX3 regulates vimentin

Eur J Endocrinol, 2013, 169(1): 1-7.

- [5] expression via miR-30a during epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(4): 610-623.
- [6] Fu J, Xu X, Kang L, et al. miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445(2): 314-319.
- [7] Lodes MJ, Caraballo M, Suciu D, et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray [J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6229.
- [8] Pantaleo MA, Ravagnini G, Astolfi A, et al. Integrating miRNA and gene expression profiling analysis revealed regulatory networks in gastrointestinal stromal tumors [J]. Epigenomics, 2016, 8(10): 1347-1366.
- [9] van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function [J]. J Biochem, 2006, 140(1): 13-21.

(收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-06-22)