

· 论 著 ·

早期糖尿病肾病的血浆蛋白质组学分析

卢洪梅, 汤水福[△], 胡坤华

(广州中医药大学第一附属医院肾内科, 广州 510405)

摘要:目的 寻找糖尿病肾病敏感的血浆分子标志物。方法 对 8 例早期糖尿病肾病患者的血浆和正常血浆进行蛋白质组学荧光差异双向电泳(2-D DIGE)分析,选择表达差异大于 1.5 倍的蛋白斑点进行质谱分析。结果 成功建立糖尿病肾病和正常血浆的胶内差异双向凝胶电泳图谱,通过分析共鉴定出 13 种差异蛋白质,包括 C3 补体、C4 补体、载脂蛋白 E 等。结论 2-D DIGE 能够客观地显示糖尿病肾病与正常血浆之间的蛋白质表达差异,本研究鉴定的 13 种蛋白有可能为糖尿病肾病的早期诊断提供潜在的血浆分子标志物。

关键词:糖尿病肾病;蛋白质组学;荧光差异双向电泳

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)32-3867-03

Early diabetic nephropathy plasma proteomic analysis

Lu Hongmei, Tang Shuifu[△], Hu Kunhua

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine University of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: Objective To explore the sensitive blood plasma molecular markers in diabetic nephropathy(DN). Methods Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) was used to analyze early DN patients plasma(n=8) and normal plasma, proteins that showed differential expression of a 1.5 fold change were analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Results 2D-DIGE maps of plasma proteins in patients with DN and normal plasma were established successfully. We validated 13 differentially expressed proteins detected by 2D-DIGE, including complement component C3, complement component C4, apolipoprotein E, etc. Conclusion Proteomic analysis can objectively revealed the differences of protein expression between the two kinds of blood plasma. The 13 proteins might be the potential plasma molecular markers for the clinical diagnosis of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy; proteomics; 2-D DIGE

糖尿病肾病是临床常见的继发性肾脏病,是糖尿病致死致残的主要原因。据统计糖尿病肾病占糖尿病患者死亡的 60%,糖尿病患者死于糖尿病肾病肾衰竭者为非糖尿病患者的 17 倍,可见其是影响糖尿病患者生存质量和死亡率的重要因素^[1],治不得法,常导致肾衰竭致死^[2],故早期发现、早期治疗是影响糖尿病肾病预后的关键^[3]。目前对本病的病因和发病机制尚未阐明,为此,急需寻找一些更灵敏、特异度更高的分子标志物,达到早期诊断糖尿病肾病。蛋白质组学技术已被广泛用于寻找疾病的分子标记物研究,例如前列腺癌、手口足病、骨肉瘤、胆管上皮癌、胃癌等^[4-8],旨在从蛋白整体水平出发,从源头寻找高效灵敏的分子标记物。本研究以糖尿病肾病和正常血浆为研究对象,进行双向电泳和质谱分析,初步筛选糖尿病肾病表达的差异蛋白质。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验中用于蛋白质组学研究的组织标本全部来自广州中医药大学第一附属医院。取自 8 个病例,所有病例严格按照早期糖尿病肾病诊断标准(Mogensen 分期标准 III 期),并选择年龄 18~45 岁男性患者,血浆样本收集后予 -80℃ 保存。

1.2 仪器 DU730 型核酸/蛋白分析仪(美国 Beckman); IPGphor III 等电聚焦仪, Ettan DALT six 大型垂直电泳系统、扫描仪 Typhoon9400 和 DeCyder V6.0 分析软件(Amersham Biosciences);质谱仪 Ultraflex III(美国布鲁克)。除高峰期蛋白试剂盒(Proteoprep blue albumin IgG Depletion Kit)购自美国 Sigma 公司,蛋白质纯化试剂盒(Clean-up Kit)、定量试剂盒(2-D Quant Kit)、固相 pH 值干胶条(IPG strip4-7, 24 cm)、

IPG buffer4-7、CyDye DIGE Flour minimal Dye Labelling Kit 试剂盒均购自美国 GE healthcare 公司。

1.3 方法

1.3.1 血浆样本的制备 分别取 80 μL 血浆标本,经过试剂盒 Proteoprep blue albumin IgG Depletion Kit 处理,去除大部分高丰度清蛋白和 IgG;过柱后血浆按蛋白质纯化试剂盒(Clean-up Kit)说明书纯化蛋白,然后利用定量试剂盒(2-D Quant Kit)对蛋白样本进行定量。

1.3.2 荧光双向电泳 荧光试剂盒(CyDye DIGE Flour minimal Dye Labelling Kit)包含 3 种荧光 Cy2、Cy3、Cy5,每 400 pmol 的 Dye 染料标记 50 μg 的蛋白,其中 Cy2 标记内参(内参由所有实验样本等量混合,再均分至各张胶),标记完后加赖氨酸终止反应,按照实验设计把对应的 Cy2、Cy3 和 Cy5 标记样本混成一管。标记好的蛋白样品均匀加入等点聚焦(IEF)专用的胶条槽,放入 IPG 干胶条(IPG strip4-7, 24 cm)进行第一向电泳。IEF 参数设置为:30 V、6 h、step;60 V、6 h、Gradient;200 V、1 h、Gradient;500 V、2 h、Gradient;1 000 V、2 h、Gradient;3 500 V、2.5 h、Gradient;10 000 V、2.5 h、Gradient;10 000 V、8 h、step 至总电压伏小时数达 80 000 Vhr。IEF 结束后,IPG 胶条分别在含 10 mg/mL 二硫苏糖醇和 25 mg/mL 碘乙酰胺平衡缓冲液中平衡 15 min。第二向电泳在 12.5% 的 SDS-PAGE 胶上进行,首先电泳参数 2 W/胶,50 min 把蛋白从胶条转移出来,接着用恒功率 17 W/胶,直至溴酚蓝指示剂到达凝胶底部边缘。

1.3.3 图像采集与分析 使用 Typhoon 9400 扫描仪采集胶内差异图像,使用的激光波长为 Cy2 488 nm、Cy3 532 nm、Cy5

633 nm。图像用 DeCyder V6.0 软件进行图谱分析,选取蛋白斑点表达差异大于 1.5 倍且 t -test $P < 0.05$ 的斑点作为差异表达蛋白。

1.3.4 差异蛋白的质谱鉴定 将染色的凝胶放入 Spot handling workstation,进行自动化蛋白质斑点切取,用 12.5 mg/mL 胰酶把蛋白酶解成肽段,利用 UltraflexIII 质谱仪获得肽质量指纹图谱(PMF)和 4 个肽段 MS/MS 图谱。所获得图谱使用 Biotoools 软件检索,以 MASCOT(Matrix Science)为搜索引擎,搜索参数设置:数据库为 NCBIInr、检索种属为 human 数据检索的方式为 combined、最大允许漏切位点为 1、酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置:PMF 为 75 ppm,MS/MS 为 0.5×10^3 ,得分大于 66 分认为是成功鉴定的蛋白质。

2 结 果

2.1 分析胶成像 经过荧光差异双向电泳(2-D DIGE),糖尿病肾病和正常血浆均得到了清晰的蛋白质表达谱。两组蛋白样本均重复 4 次,如图 1 为其中一张胶内差异双向电泳图谱,它由 3 张不同颜色的图谱融合而成。其中蓝色图谱代表内标,由 Cy2 标记;绿色图谱代表糖尿病肾病的血浆蛋白,由 Cy3 标

记;红色图谱代表正常血浆蛋白,由 Cy5 标记。

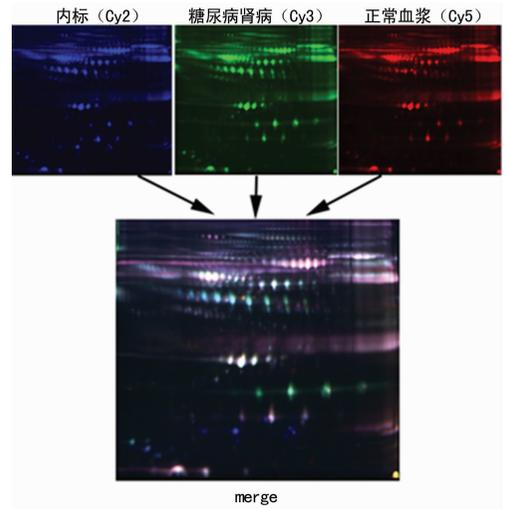


图 1 2-D DIGE 图像

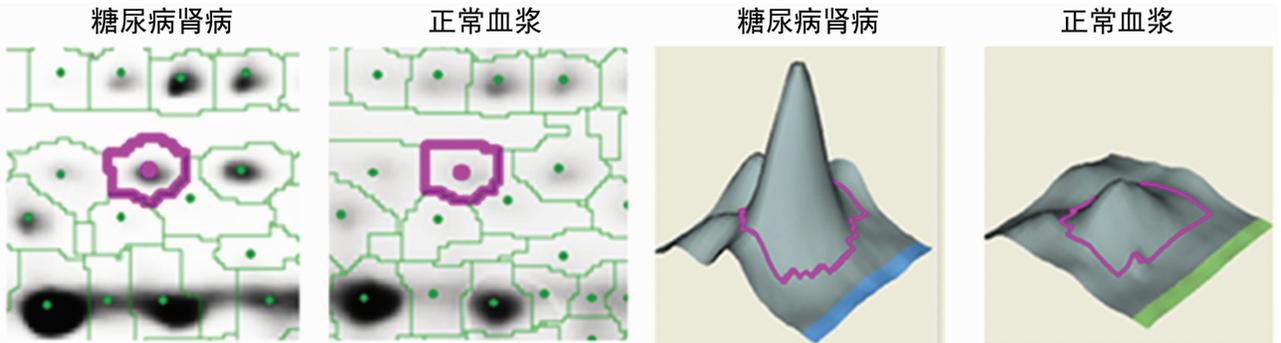


图 2 斑点 491 在糖尿病肾病和正常血浆中的表达情况

2.2 图像分析 使 DeCyder 6.0 软件分析,在每块胶图上检测到蛋白斑点约 1 600 个。糖尿病肾病血浆与正常血浆比较,大于 1.5 倍同时满足 $P < 0.05$ 的差异斑点有 13 个,其中 7 个斑点糖尿病肾病表达下调,6 个表达上升。结合胶图斑点位置和 3-D 图可以清楚看出该点的表达差异情况,如斑点 491。见图 2。

2.3 质谱结果 对 13 个差异蛋白斑点进行 MALDI-TOF/TOF-MS 分析,得到肽质量指纹图(图 3),横坐标表示肽段的质荷比,纵坐标表示肽段强度。经数据库检索,斑点 491 鉴定为 C4 补体蛋白。在数据库 NCBIInr(human)检索,得到各差异斑点的蛋白名称,见表 1。

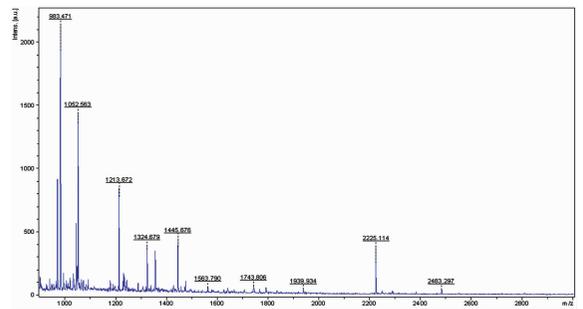


图 3 斑点 491 的肽指纹图谱

表 1 差异斑点质谱鉴定结果

斑点编号	丰度值	t -检验	蛋白质名称	NCBIInr 登录号码	Mascot 得分值	等电点	分子量	覆盖率(%)
354	-1.77	0.006	补体成分 C3	gi 78101268	199	5.55	114 238	18
427	-1.68	0.003	重组人纤维蛋白原片段 D 晶状体结构,C 链,	gi 24987625	124	5.86	35 497	22
432	1.56	0.029	角蛋白, I 型细胞骨架蛋白 16	gi 24430192	177	4.99	51 578	45
434	1.83	0.033	凝溶胶蛋白同源异构体前体	gi 4504165	101	5.90	86 043	10
436	1.69	0.019	人血清清蛋白、肉豆蔻酸酯及阿司匹林复合物,A 链	gi 122920512	178	5.62	68 408	20
442	-1.89	0.016	纤维蛋白原 γ	gi 223170	78	5.54	46 823	13
491	-1.71	0.041	补体成分 C4	gi 443671	167	6.79	195 195	7
498	1.57	0.013	人血清清蛋白、肉豆蔻酸及三碘苯甲酸复合物,A 链	gi 157830361	90	5.69	67 988	20
556	1.87	0.001	免疫球蛋白重链恒定区 μ	gi 12054080	98	6.40	50 117	18
672	2.27	0.013	Ga 元件与人血清清蛋白复合物晶状体结构,A 链	gi 55669910	578	5.57	67 174	44
1255	-1.78	0.038	载脂蛋白 E	gi 4557325	466	5.65	36 246	62

续表 1 差异斑点质谱鉴定结果

斑点编号	丰度值	t-检验	蛋白质名称	NCBIInr 登录号码	Mascot 得分值	等电点	分子量	覆盖率(%)
1477	1.52	0.013	无脂成分人载脂蛋白 A~I 晶状体结构, A 链	gi 90108664	202	5.27	2 861	37
1636	-4.00	0.014	十二烷基磺酸钠条件下人载脂蛋白 C-II 核磁共振结构, A 链	gi 14277770	92	4.66	809	34

Mascot: 蛋白质质谱检索软件; NCBIInr: NCBI 蛋白质数据库。

3 讨 论

糖尿病肾病发生是多因素、多步骤共同作用的结果^[9]。涉及与肾内血流动力学异常、葡萄糖毒性效应、一些生长因子及细胞因子的作用以及种族、遗传和不良生活习惯有关^[10], 但其发病机制知之甚少^[11]。蛋白质作为发挥基因功能的载体, 在疾病的发生、发展中有更直接的意义, 故蛋白质组学技术被广泛用作寻找疾病的生物学标记物。本研究共对 8 例早期糖尿病肾病、正常血浆进行蛋白质组学技术研究, 共发现差异表达蛋白 13 个, 这些差异的蛋白是从早期糖尿病肾病、正常血浆比较分析而来, 故可认为是糖尿病肾病相关蛋白。

传统的双向电泳技术考染灵敏度较差, 难以检测低丰度蛋白质, 银染灵敏度高, 但无法与后续的质谱兼容, 而且, 传统方法每块胶只能上 1 个样本, 同时受人为操作等因素影响, 误差较大, 重复性也不好。2-D DIGE 技术可以较好地解决这个问题。该技术使用了一组特殊的 CyDye DIGE 荧光染料 (Cy2、Cy3、Cy5), 对低丰度蛋白的探测灵敏度大幅度提高, 并且可以在 1 块胶上同时分离 3 种不同染料标记的蛋白, 最为可贵的是, DIGE 胶的 Cy2 标记物 (标记样本从所有实验样本中取等量混合标记, 再均分各胶) 为各胶建立一个共同的内部参照, 使之可以去除胶间人为造成差异, 大幅减少了假阴性及假阳性^[11]。C3 补体由人的 19 号染色体编码, 是一种重要的免疫系统蛋白, 对于补体系统的激活和先天性免疫起着极其核心的作用。C3 补体是一把双刃剑: 一方面促进吞噬作用, 指导免疫系统选择适当抗原进行体液反应; 另一方面 C3 补体上调会破坏自身细胞, 同时 C3 补体与外源蛋白之间的相互作用会导致外源微生物产生免疫逃避^[12]。糖尿病肾病 C3 补体表达升高, 有可能导致肾组织自身破坏, 同时外源微生物的自身免疫逃避也可能加剧了肾脏的损害。

C4 补体也是补体系统重要组成之一, 是检测体液排斥最重要的临床检测指标。C4 补体被激活后降解为 C4a 和 C4b, 激活的 C4b 经蛋白水解形成 C4d, C4d 分布于内皮细胞表面和胞质内、血管基质的外基质等, 性质稳定, 能够很好地被免疫组织化学方法检测。目前 C4d 已经被用作系统性红斑狼疮的生物标记物^[13]。糖尿病肾病 C4 补体表达升高, 激活了免疫系统, 加上 C4d 性质稳定, 能够很好被检测, 故 C4 也很有可能作为糖尿病肾病早期诊断的生物标记物。

载脂蛋白 E 是一类在乳糜微粒和中密度脂蛋白中发现的脂蛋白, 由肝和巨噬细胞所产生, 为脂蛋白正常分解代谢所必需。转运脂蛋白、脂溶性维生素、胆固醇进入淋巴液系统, 最后进入血液。其最早被认为在脂蛋白代谢和心脏血管疾病中起作用。近来发现, 载脂蛋白 E 与免疫调节相关, 包括抑制 T 细胞增殖、巨噬细胞功能调节, 脂类抗原递呈给天然杀伤 T 细胞, 以达到炎症和氧化调节^[14-15]。因此, 载脂蛋白 E 可能与糖尿病肾病形成密切相关。

本实验运用 2-D DIGE 和质谱技术, 鉴定出糖尿病肾病相关差异蛋白 13 个, 对这些差异蛋白的功能继续深入研究, 有可能成为糖尿病肾病诊断的靶向性生物标记物, 以期达到早期发现、早期治疗, 改善总体预后的目的。而相关蛋白的验证及功能, 尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李小会, 董正华. 糖尿病肾病病因病机的探讨[J]. 陕西中医, 2005, 26(6): 552-553.
- [2] 吕仁和, 赵进喜, 王越. 糖尿病肾病临床研究述评[J]. 北京中医药大学学报, 1994, 179(2): 74-78.
- [3] 吕仁和. 糖尿病及其并发症中西医诊治学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 528.
- [4] Pang J, Liu WP, Liu XP, et al. Profiling protein markers associated with Lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis[J]. J Proteome Res, 2010, 9(1): 216-226.
- [5] Deng L, Jia HL, Liu CW, et al. Analysis of differentially expressed proteins involved in hand, foot and mouth disease and normal sera[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(6): E188-196.
- [6] Song J, Jing NS, Qian CG, et al. 2-D DIGE and MALDI-TOF-MS analysis of the serum proteome in human osteosarcoma[J]. Proteomics Clin Appl, 2007, 1(3): 272-285.
- [7] Penno MA, Klingler-Hoffmann M, Brazzatti JA, et al. 2D-DIGE analysis of sera from transgenic mouse models reveals novel candidate protein biomarkers for human gastric cancer[J]. J Proteomics, 2012, 77(1): 40-58.
- [8] Shi Y, Deng X, Zhan Q, et al. A prospective proteomic-based study for identifying potential biomarkers for the diagnosis of cholangio carcinoma[J]. J Gastrointest Surg, 2013, 20(6): 678-680.
- [9] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 414-421.
- [10] 汪年松, 王锋. 糖尿病肾病的炎症机制和防治[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(2): 98-101.
- [11] 朱永华, 刘炜, 石忠松, 等. 颅内动脉瘤患者血清蛋白组变化的研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(6): 652-656.
- [12] Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity[J]. Immunol Rev, 2001, 180(1): 35-48.
- [13] Liu CC, Manzi S, Kao AH, et al. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(10): 3087-3099.
- [14] van den Elzen P, Garg S, León L, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation[J]. Nature, 2005, 437(7060): 906-910.
- [15] Zhang HL, Wu J, Zhu J. The role of apolipoprotein E in guillain-barré syndrome and experimental autoimmune neuritis[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 10(3): 357-412.