

iTRAQ 法分析原发性慢性闭角型青光眼患者 血浆中蛋白组学变化

李倩¹, 张立宇¹, 蒋正轩¹, 沈兵², 许育新¹

摘要 通过分析原发性慢性闭角型青光眼(CPACG)患者血浆中蛋白组学的变化,找出血浆差异蛋白(DEPs),发现该病可能存在的血浆蛋白标志物。采集实验对象血浆,通过同位素标记相对与绝对定量技术(iTRAQ)标记蛋白,液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)检测后对DEPs进行基因本体论分析(GO分析)和基于京都基因与基因组百科全书分析(KEGG分析)根据DEPs的主要作用途径找出关键蛋白。质谱分析共筛选出143个有统计学意义的DEPs($P < 0.05$),其中49个上调,94个下调。GO分析明确DEPs分子功能、生物过程和细胞组成3个部分的分布情况。KEGG分析显示DEPs主要与代谢通路和补体凝集级联反应有关,根据作用机制不同分为以下3类:①调节青光眼视神经节细胞相关蛋白:肝细胞生长因子激动剂(HGFA);②氧化应激相关蛋白:超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx-3)、过氧化物酶(Peroxiredoxin-2);③免疫反应相关蛋白:补体4(C4)、补体4结合蛋白(C4BP)。这些DEPs可能为临床诊断提供了新的血浆标志物,为明确CPACG的病理机制和临床诊断提供了新思路。

关键词 CPACG; iTRAQ法; LC-MS/MS; 蛋白组学

中图分类号 R 320.37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0640-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.030

青光眼是一类以高眼压为危险因素并具有特征性、不可逆性视野缺损的进展性视神经病变,是全球第二位致盲性疾病。原发性慢性闭角型青光眼(chronic primary angle-closure glaucoma, CPACG)是我国最常见的类型,在我国40岁以上自然人群中致盲率达38.3%^[1]。迄今为止,CPACG的发病机制并未完全阐明。现利用液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/

MS)分析联合同位素标记相对与绝对定量技术(isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ)鉴定CPACG患者血浆中的差异蛋白(different proteins, DEPs),通过生物信息学分析,试图发现该病血浆中存在的蛋白标志物和参与疾病发生的主要信号通路,找出疾病可能存在的血浆标志物,明确发病机制,对临床的诊断和治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2019年2~9月安徽医科大学第二附属医院眼科收治的CPACG患者10例,其中男女各5例,年龄64~72(67.8±3.64)岁。同时收集年龄、性别无统计学差异的白内障患者10例作为对照组,其中男女各5例,年龄61~70(65.8±3.82)岁。本研究获安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准,患者或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准 CPACG患者纳入标准:①符合慢性青光眼诊断标准的患者;②眼底视神经损害和特征性视野缺损;③房角镜及OCT显示前房角关闭的患者;④患者眼压高于2.79 kPa且没有药物干预。

CPACG患者排除标准:①继发于其他疾病的闭角型青光眼患者;②以前做过青光眼手术或药物干预的患者;③患有影响血液中相关蛋白变化的疾病,例如自身免疫性疾病、感染性疾病的患者;④有高血压、糖尿病、高度近视、脑血管疾病等青光眼高危因素的患者。

对照组的纳入标准:年龄、性别、民族、居住地区无统计学差异的白内障患者。

对照组的排除标准:有青光眼高危因素和家族聚集性青光眼疾病的患者,排除程度严重的,可导致继发性青光眼的白内障患者。

1.3 血浆样品的采集与保存 清晨采集患者空腹血液2 ml于抗凝管中,1 h内前往实验室进行离心,4℃、3 000 r/min离心15 min,取上清液以200 μl/管分装至离心管中,-80℃保存,避免反复冻融。

2019-11-14 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2018A0664)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

² 安徽医科大学基础教研室,合肥 230032

作者简介:李倩,女,硕士研究生;

许育新,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xuyuxin1168@sina.com

1.4 标记前样本准备 去除高丰度蛋白,按照 BCA 法进行蛋白定量和 SDS-PAGE 电泳,然后样品蛋白还原烷基化及酶解,参考 FASP 法酶解蛋白。

1.5 iTRAQ 蛋白标记 取出 iTRAQ 试剂,室温下离心至管底,异丙醇溶解;取 50 μ l 样品(100 μ g 酶解产物)转移到新的离心管中,加入 iTRAQ 试剂后室温反应 2 h;加水终止反应;混合样品振荡,离心至管底;真空冷冻干燥样品,留作 iTRAQ 分离鉴定。具体操作按照 iTRAQ 试剂盒说明书进行。

1.6 2D-LC-MS/MS 分析 质谱采用 Triple TOF 5600 系统(AB SCIEX,美国)结合纳升喷雾离子源(AB SCIEX,美国)喷雾电压为 2.5 kV,气帘气压和雾化气压分别设为 206.84 kPa 和 34.47 kPa,加热器温度为 150 $^{\circ}$ C,质谱扫描方式为信息依赖的采集工作模式下(information dependent analysis,IDA),一级 TOF-MS 单张图谱扫描时间为 250 ms,每次 IDA 循环下最多可采集 35 个电荷为 2+ 到 5+ 且单秒计数大于 150 的二级图谱,每次循环时间皆为 2.5 s,碰撞室能量设定适用于所有前体离子碰撞诱导解离,动态排除设置为 18 s,约等于色谱半峰宽。

1.7 序列数据库检索与数据分析 收集到的数据用 Protein Pilot Software v. 5.0(AB SCIEX,美国)软件进行分析,选用 uniprot 数据库来鉴定肽段。根据信号强度值得到蛋白质量,设定在 2 个重复样品中上调或下调,且 $\log_{10}$ 差异倍数(fold change,FC) > 1.2, $P < 0.05$ 的蛋白为 DEPs。

1.8 GO 分析与 KEGG 分析 基因本体论(gene ontology,GO)分析总共有 3 个部分:分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组成(cellular component, CC)。通过(<http://metascape.org>)网站进行 GO 分析,了解 DEPs 相关注

释及其主要功能。基于京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)分析是利用 KOBAS 联机分析数据库(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)对 DEPs 进行了路径分析。通过对 GO 分析和 KEGG 分析结果的整理,根据文献阅读进行比对筛选,发现可能的重要蛋白。

2 结果

2.1 DEPs 的筛选 定量分析显示 CPACG 组与对照组比较有 143 个有统计学意义的 DEPs,其中上调蛋白 49 个,下调蛋白 94 个(图 1)。

2.2 GO 功能及富集分析结果 通过对 DEPs 进行 GO 功能注释(图 2),根据 GO 分析发现 DEPs 主要涉及免疫应答、对刺激的应答、细胞形态调节、蛋白激活传递、细胞基质黏附等生物过程、蛋白结合,接

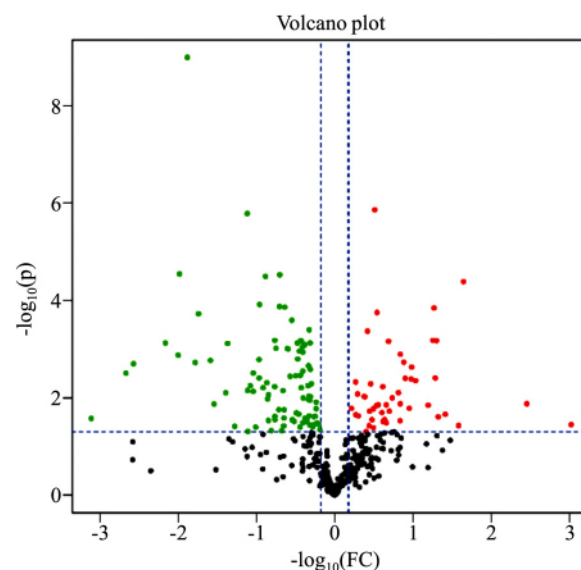


图 1 DEPs 表达火山图

红点:上调 绿点:下调 黑点:无统计学意义的变化

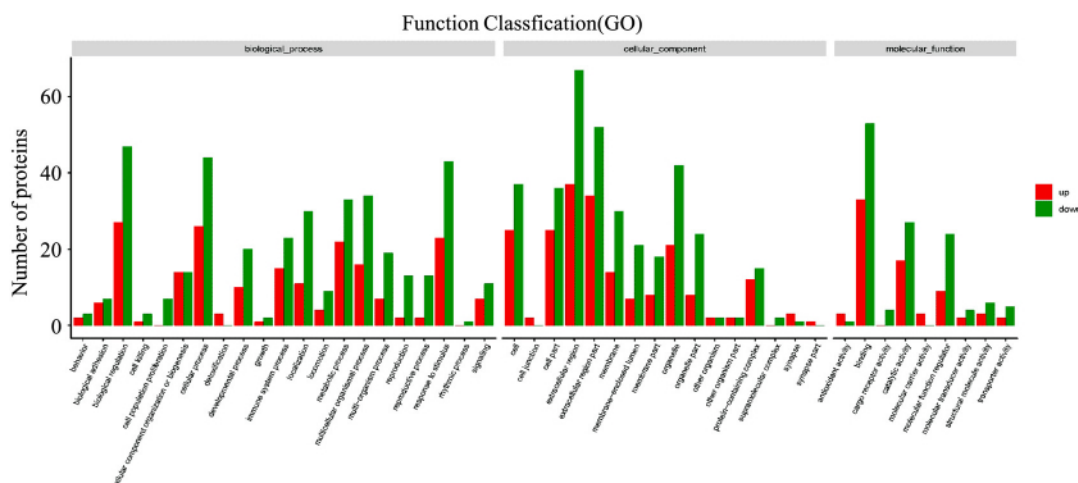


图 2 GO 分析 DEPs 在 BP、CC、MF 3 个方面的分布

触反应、分子功能调节等分子功能,细胞定位主要在细胞外区域。

2.3 KEGG 信号通路分析 为了分析这些 DEPs 的相关功能,使用 KOBAS 在线分析工具来搜索 KEGG 信号通路。发现主要富集在补体凝集级联反应和代谢途径(图3),图4显示 DEPs 富集的不同途径。

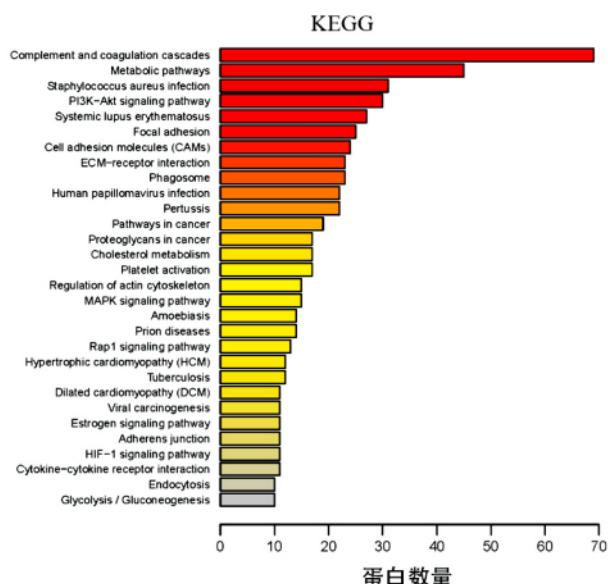


图3 DEPs KEGG 富集信号通路图

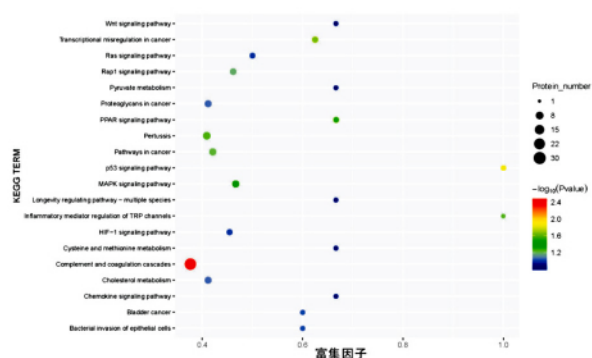


图4 DEPs KEGG 信号通路气泡图

2.4 重要 DEPs 通过 DEPs KEGG 分析,在表达上调的 DEPs 中发现以下重要蛋白(表1):对 CPACG 视神经节细胞和 GO 分起保护作用的肝细胞生长因子激动剂(hepatocyte growth factor activator, HGFA)通过抗氧化应激作用影响原发性闭角型青光眼进展的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 3, GPx-3)、过氧化物酶(Peroxiredoxin-2);以及在致病机制中参与免疫反应的补体 4(complement

4, C4)、补体 4 结合蛋白(complement 4 binding protein, C4BP)。

表1 重要 DEPs 分析表

蛋白编号	蛋白名称	FC	P 值
Q04756	HGFA	3.01	0.028
B2R9V7	SOD	4.03	0.020
P22352	GPx-3	3.14	0.041
P32119	Peroxiredoxin-2	10.85	0.004
A0A140TA29	C4B	44.40	0.017
P20851	C4BP	1.86	0.005

3 讨论

本研究通过 iTRAQ 法对 CPACG 的血浆进行检测分析,显示在 CPACG 发展中的关键蛋白和主要信号通路。其主要结果如下:①鉴定出 143 种有统计学意义的 DEPs,其中 49 种蛋白上调,94 种蛋白表达下调;②GO 分析 DEPs 在 BP、CC、MF 3 个方面的表达,结果显示 DEPs 主要与免疫应答、抗氧化应激有关,与青光眼的发病机制相一致;③KEGG 分析发现 DEPs 的主要作用通路,其中补体凝集级联反应是最主要的通路,很可能在青光眼疾病发展过程中起到重要作用,而补体系统作为免疫系统的重要部分,可能是 CPACG 发病的关键因素;④通过对质谱结果的 GO 分析和 KEGG 分析并结合文献,推测表 1 中的蛋白可能与青光眼存在重要联系,阐述如下:

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)具有组织损伤再修复作用,在眼部组织中也有着丰富的表达,参与多种眼科疾病。HGF 的基因多态性与闭角型青光眼的易感性存在密切关系,具有 CGC 单体型的患者患闭角型青光眼的可能性更低^[2]。Nie et al^[3]发现 HGF 基因表达在青光眼中呈下降趋势,治疗后 HGF 基因表达增高但仍低于正常,并且通过生物信息学分析,认为 HGF 可作为青光眼治疗预后的生物标志物之一。本研究检测到青光眼患者血浆中 HGFA 显著升高,但 HGF 浓度未见增多,认为 HGFA 的增高可能是由于青光眼患者 HGF 的表达低于正常人,发病时机体产生自我调节,使 HGFA 代偿性增高。

氧化应激是青光眼视神经损伤机制之一,在青光眼中,细胞线粒体功能发生缺陷, Ca^{2+} 超载和活性氧水平升高,小梁网(trabecular meshwork, TM)和视网膜缺乏有效的抗氧化剂,最终导致 DNA、蛋白质

和脂质破坏、细胞衰变,从而引起组织的形态和功能损伤^[4-6]。SOD、GPx-3、Peroxiredoxin 能通过对抗氧自由基减少缺血和氧化应激对细胞和组织的损害^[7]。实验结果中 SOD、GPx-3、Peroxiredoxin-2 在青光眼患者血浆中上调,可见氧化应激在青光眼发病中发挥着重要作用。然而 Tang et al^[5]通过 Meta 分析发现不同亚型的青光眼患者外周血和房水中抗氧化物总量和单独某种抗氧化物含量变化不同,开角型青光眼房水或外周血中总抗氧化物水平(total antioxidant status, TAS)降低但房水 SOD 和 GPx 表达水平增高,剥脱性青光眼 TAS 与对照组比较却没有统计学意义。本研究中,CPACG 患者血浆 SOD 和 GPx3 的表达增多,与 Goyal et al^[8]实验中房水 SOD 和 GPx 水平增高一致。因此,平衡氧化物和抗氧化物是青光眼治疗的新思路。

补体系统是天然免疫系统的重要组成部分,在青光眼疾病中,补体系统通过免疫应答对视神经产生作用是近些年研究热点。C4 和 C4BP 是补体系统的一部分, Mohlin et al^[9]通过猪视网膜和人视网膜色素上皮细胞共同培养模仿视神经退行性疾病,发现视网膜色素上皮细胞可以使补体系统发挥作用,减少视神经节细胞的死亡。补体紊乱常常是青光眼疾病发展的原因之一,青光眼的视神经和视网膜在损伤前有局部补体上调和激活, C3 抑制剂可起到一定的治疗作用^[10]。C3 是补体系统的重要成分, C1Q 是补体系统的激活成分,然而,本研究中仅检测到 C4 和 C4BP 增多而 C3 和 C1Q 并未增多,认为与补体系统的改变一般早于青光眼视神经损伤有关, CPACG 多无明显的发作症状,前来就医时大都已有严重视神经损伤,此时机体已产生自我保护反应,对紊乱的补体进行调整和清除,因此可能检测不

到 C3 和 C1Q。实验中 C4 显著增多,具体功能和机制还需要将来进一步的研究验证。

参考文献

- [1] 刘美玲,王友信. 我国 40 岁以上自然人群闭角型青光眼致盲率研究系统评价和 Meta 分析[J]. 中华眼科杂志, 2017, 53(5): 373-7.
- [2] Jiang Z, Liang K, Ding B, et al. Hepatocyte growth factor genetic variations and primary angle-closure glaucoma in the Han Chinese population[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60950.
- [3] Nie Q, Zhang X. Transcriptional profiling analysis predicts potential biomarkers for glaucoma: HGF, AKR1B10 and AKR1C3[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 5103-11.
- [4] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Curr Biol, 2014, 24(10): R453-62.
- [5] Tang B, Li S, Cao W, et al. The association of oxidative stress status with open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma: a systematic review and meta-analysis[J]. J Ophthalmol, 2019, 2019: 1803619.
- [6] He Y, Ge J, Tombran-Tink J. Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(11): 4912-22.
- [7] Yuan H, Li H, Yu P, et al. Involvement of HDAC6 in ischaemia and reperfusion-induced rat retinal injury[J]. BMC Ophthalmol, 2018, 18(1): 300.
- [8] Goyal A, Srivastava A, Sihota R, et al. Evaluation of oxidative stress markers in aqueous humor of primary open angle glaucoma and primary angle closure glaucoma patients[J]. Curr Eye Res, 2014, 39(8): 823-9.
- [9] Mohlin C, Sandholm K, Kvanta A, et al. A model to study complement involvement in experimental retinal degeneration[J]. Ups J Med Sci, 2018, 123(1): 28-42.
- [10] Bosco A, Anderson S R, Breen K T, et al. Complement C3-targeted gene therapy restricts onset and progression of neurodegeneration in chronic mouse glaucoma[J]. Mol Ther, 2018, 26(10): 2379-96.

Analysis of proteome in plasma of patients with primary chronic angle-closure glaucoma by iTRAQ

Li Qian, Zhang Liyu, Jiang Zhengxuan, et al

(Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract In order to look for the plasma differential proteins (DEPs) and the possible plasma protein markers, we analyzed the proteomics in plasma of patients with primary chronic angle closure glaucoma. The plasma was collected, and iTRAQ and LC-MS/MS were performed to find the different proteins (DEPs). The DEPs were analyzed by GO and KEGG to find out the main pathways and key proteins. 143 statistically significant proteins were screened by mass spectrometry ($P < 0.05$), of which 49 were up-regulated and 94 were down-regulated. The DEPs were analyzed from three parts such as the molecular function, biological process and cellular component by GO

血清 25-(OH) D₃ 水平对卵巢反应性及冻融胚胎移植临床结局的影响

尹佳倩^{1,2,3}, 许孝凤^{1,2,3}, 张雅梦^{1,2,3}, 邹慧娟^{1,2,3}, 曹云霞^{1,2,3}

摘要 探讨血清 25 羟维生素 D [25-(OH) D₃] 水平对卵巢反应性及冻融周期胚胎移植 (FET) 妊娠结局的影响。选取行 FET 共 157 例患者作为研究对象, 根据患者行体外受精-胚胎移植治疗前血清 25-(OH) D₃ 水平, 分为 <20 μg/L 组和 ≥20 μg/L 组; 比较 2 组的促排卵过程中卵巢反应性及妊娠结局。25-(OH) D₃ ≥20 μg/L 组的临床妊娠率显著高于 <20 μg/L 组 (64.3% vs 45.5% $P < 0.05$); 2 组患者获卵数、M II 数、受精率、促性腺激素 (Gn) 总量、Gn 总天数、优质胚胎率、绒毛膜促性腺激素 (HCG) 日 E₂ 值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。血清低水平 25-(OH) D₃ 与卵巢反应性无相关性, 但与妊娠率的下降有一定相关性。

关键词 体外受精-胚胎移植技术; 血清 25-(OH) D₃

中图分类号 R 714.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0644-03

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.031

维生素 D (vitamin D, VitD) 在人体内可促进钙磷吸收和骨盐代谢, 调节细胞增殖分化, 改善胰岛素抵抗, 调节细胞免疫, 并可通过影响卵巢功能和增强子宫内膜容受性影响女性的内分泌功能以及生殖过

程^[1]。人体内的 VitD 主要来源于皮肤光照, 少部分来源于胃肠道吸收。VitD 吸收入血后, 与 VitD 结合蛋白结合转运至肝脏, 在肝脏内经 25 羟化酶转化成 25 羟维生素 D₃ [25-(OH) D₃] 是血液循环中 VitD 的主要存在形式^[2], 也是诊断体内 VitD 是否不足的可靠指标。有研究^[3-6]显示, 由于女性户外活动的减少, 缺少光照, 部分女性 VitD 缺乏, 并且低水平的 VitD 对卵泡发育、子宫内膜容受性均有负面影响。但 VitD 水平与体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization and embryos transfer, IVF) 结局相关性的报道尚少, 该研究旨在探讨血清 25-(OH) D₃ 水平对不孕患者卵子质量及冻融胚胎移植 (frozen-thawed embryo transfer, FET) 临床结局的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2017 年 6~12 月在安徽医科大学第一附属医院生殖中心因单纯输卵管因素行 IVF 治疗并在复苏周期移植优质囊胚的 157 例患者临床资料。患者年龄 26~34 (29.9 ± 3.97) 岁, 均签署知情同意书, 并于 IVF 治疗前 1 个月经周期检测血清 25-(OH) D₃ 水平, 根据最新 WHO 标准^[7], 分为 VitD 不足组 (<20 μg/L), 共 101 例; VitD 充足组 (≥20 μg/L), 共 56 例。排除标准: ① 男方因素就诊; ② 女方多囊卵巢综合征、糖尿病、甲状腺功能异常等内分泌疾病; ③ 子宫内膜异位症; ④ 生殖道畸形及宫颈异常。

1.2 研究方法

1.2.1 VitD 测定 IVF 治疗前 1 个月经周期留取患者静脉血 5 ml, 采用化学发光法测定血清 25-

2019-11-14 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目 (编号: 2016YFC1000204)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

² 安徽医科大学生殖健康与遗传安徽省重点实验室, 合肥 230022

³ 安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 尹佳倩, 女, 硕士研究生;

曹云霞, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

analysis. The main pathways are metabolic pathway and complement coagulation cascades, the key proteins are divided into the following three kinds according to their different functions: ① regulating the glaucoma optic ganglion cells: HGFA; ② oxidative stress related: glutathione peroxidase 3, SOD, Peroxiredoxin-2; ③ immune response related: C4, C4BP. These differential proteins provide new plasma markers for clinical diagnosis. It helps us to understand the pathological mechanism of primary angle closure glaucoma and provides a new idea for clinical diagnosis.

Key words CPACG; iTRAQ; LC-MS/MS; proteomics