

系统性红斑狼疮外周血单个核细胞磷酸化蛋白质组学研究

程娟¹, 马华林², 戴勇³

摘要 目的 通过系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMCs)的磷酸化蛋白质组学分析,为SLE的进一步机制研究及治疗奠定基础。方法 收集15例SLE患者和15例健康受试者的外周血,使用TiO₂富集PBMCs的磷酸化肽段,进行质谱分析,然后进行磷酸化肽段和磷酸化位点鉴定,并进行生物信息学分析。结果 SLE患者与正常人存在有差异的1 035个磷酸化位点,与标注蛋白对应的基因有618个。共筛选出12条代谢通路,其中丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)通路含差异的磷酸化位点最多。结论 SLE患者PBMCs具有差异的磷酸化蛋白质及肽段,与代谢通路一起可作为SLE发病机制研究参考和补充,并可作为治疗靶点研究。

关键词 系统性红斑狼疮; 磷酸化蛋白质组学; 外周血单个核细胞; MAPK

中图分类号 R 5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0962-04

蛋白质磷酸化是生物界最重要也是最常见的一种蛋白质翻译后修饰(posttranslational modifications, PTMs)和调控修饰形式^[1-2]。磷酸化介导的细胞信号异常与许多疾病的发生有关^[3-4]。此外,蛋白激酶的异常表达是许多疾病发生的重要原因或组成部分。因此,各种信号通路中蛋白质磷酸化位点的特征可以提高对特定疾病的病因学理解^[5]。系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种经典自身免疫性疾病,特点是血清中出现了以抗核

抗体为代表的多种自身抗体^[6]。其发病率女性是男性的9倍^[7],在我国其发病率37.7/10万^[8]。该研究通过比较SLE患者和正常人群中外周血单个核细胞(PBMCs)的磷酸化蛋白质组学表达分析,旨在为SLE的发病机制提供蛋白质组学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集深圳市人民医院风湿科SLE患者15例,其中男2例,女13例,年龄18~51(31.36±9.82)岁,均符合SLE诊断标准。标本采集时间选在糖皮质激素和免疫抑制剂使用之前。正常对照15例均来自健康志愿者,其中男3例,女12例,年龄20~54(32.13±10.47)岁。两组间性别及年龄差异无统计学意义。本研究经深圳市人民医院伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 标本采集与处理 收集正常对照组及SLE组患者空腹静脉血4 ml,EDTA抗凝。淋巴细胞分离液分离PBMCs,乳白色PBMCs层用PBS洗涤2次。然后用PBS定容至1 ml;用细胞计数板计数。混合同一实验组内不同个体细胞样本,然后按以下步骤进行:裂解液裂解细胞、蛋白定量、FASP酶解(Trypsin,18 h)、酶解肽段、磷酸化肽段富集(方法见1.3)、ESI质谱、软件分析数据、蛋白质鉴定、磷酸化位点鉴定。

1.3 磷酸化肽段富集方法 酶解样品(3 mg)加入TiO₂及上样缓冲液(200 μl),混合40 min,10 000 r/min离心3 min,留取上清液(重复富集4次),加入洗涤液(800 μl),混合40 min,10 000 r/min离心3 min,弃去上清液,重复洗涤一次,弃去上清液,加入洗脱液(800 μl),混合40 min,10 000 r/min离心3 min,收集上清液,再次加入洗脱液(800 μl)混合

2014-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:30972741)

作者单位: 深圳市人民医院¹ 检验科、² 肾内科、³ 临床医学研究中心,深圳 518020

作者简介: 程娟,女,副主任技师;

戴勇,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: daiyong22@aliyun.com

CyclinD1 showed heterogeneity of expression in some patients' carcinoma. ③ There were no relationships between expression of HER-2 and CyclinD1 in PTC. **Conclusion** ① HER-2 plays an important role in the carcinogenesis of PTC. HER-2 could be a potential target for targeted therapy in PTC. ② CyclinD1 could be as molecular markers of early diagnosis in PTC. There could be positive correlation between CyclinD1's heterogeneity of expression of PTC and the lymph node metastases.

Key words papillary thyroid carcinoma; HER-2; C-erbB-2; CyclinD1

40 min, 离心后收集上清液, 合并上述 2 次上清液, 冻干。

1.4 毛细管高效液相色谱法 A 液: 0.1% 甲酸的乙腈水溶液(乙腈为 90%) B 液: 0.1% 甲酸的水溶液。色谱柱以 95% 的 B 液平衡 10 min 后, 启动进样器将样品进样到 Trap 柱。

1.5 质谱数据采集 多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描(MS1 扫描) 后采集 10 个碎片图谱(MS2 扫描) ^[9]。

1.6 数据分析

1.6.1 原始数据预处理 对原始数据使用 R 软件进行均一化处理和预处理。① 分析可信度高的磷酸化位点; ② 磷酸化位点信号值为零值的改为一个较小的值, 方便后续的归一化处理; ③ 磷酸化信号对数化(log2); ④ 平均值法均一化信号。

1.6.2 差异基因筛选 对于以上的均一化结果, 筛选在组间存在差异的磷酸化位点, 具体方法: ① 计算两组间的倍数变化; ② 设置阈值为 1, 即 2 倍变化; ③ 根据 NCBI 的注释信息, 标注蛋白对应的基因名称。

1.7 差异磷酸化位点对应基因的功能分析

1.7.1 Gene ontology 分析 GO 包括三大独立的本体(Ontology): 细胞组分、生物进程和分子生物学功能。通过 GO 分析, 可知差异磷酸化位点所对应基因涉及的生物学功能。

1.7.2 Pathway 分析 与 GO 分析类似, 同样将差异基因使用 GenMAPP v2.1 向 KEGG Pathway 数据库映射, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 SLE 患者 PBMCs 差异磷酸化位点和对应基因 对原始数据进行预处理和均一化处理, 以可信度高的磷酸化位点为分析对象, SLE 患者 PBMCs 共发现与正常人存在有差异的磷酸化位点 1 035 个。根据 NCBI 的注释信息, 与标注蛋白对应的基因有 618 个。

2.2 SLE 患者血液中单个核细胞磷酸化蛋白的功能分析 筛选包含差异基因的所有 GO 分类项, 对已鉴定的磷酸化蛋白进行功能分析。其特征从细胞组成、生物进程及分子功能三方面进行评价, 见表 1~3。

2.3 SLE 磷酸化蛋白的通路分析 将差异基因使用 GenMAPP v2.1 向 KEGG Pathway 数据库映射, 并对代谢通路做统计检验, 共筛选到 12 条代谢通路, 其中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 信号通路含差异的磷酸化位点最多, 红色标注的是含差异磷酸化位点的基因, 见表 4、图 1。

3 讨论

蛋白质的磷酸化与去磷酸化过程调节着细胞信号转导、生长和分化等所有的生命活动过程。环境的改变可导致蛋白质磷酸化现象的发生, 从而引起细胞内蛋白质的数量和组成发生改变, 最终引起生理状态的改变^[10]。随着不断发展的蛋白质组学技术, 磷酸化已经成为蛋白质组学研究的热点。在复杂的细胞蛋白质组中, 与疾病或者信号相关的蛋白质由于存在量极少而难以得到鉴定^[11]。尽管蛋白质组技术的发展异常迅猛, 但是对磷酸化蛋白质进行全面详尽地分析仍很困难。其原因主要是: ① 蛋白质磷酸化在体内是一种不稳定的动态过程。② 磷酸化蛋白质在细胞内丰度较低。这些特点给磷酸

表 1 生物进程分布

项目	碱基、核苷、核苷酸 和核酸的代谢过程	细胞成分 的组织	细胞 周期	运输	蛋白质 修饰过程	细胞间 通讯	多细胞有 机体的发展	其他
生物进程(%)	21.2	20.8	6.3	14.5	9.9	7.4	12.6	7.3

表 2 细胞组成分布

项目	细胞核	细胞质	细胞骨架	质膜	高尔基体	线粒体	内质网	其他
细胞组成(%)	29.0	15.8	12.7	18.1	5.8	3.4	4.2	10.3

表 3 分子功能分布

项目	蛋白结合	酶调节 活性	核苷酸 结合	核酸 结合	催化 活性	信号转导 激活	结构分子 活性	其他
分子功能(%)	36.0	6.9	12.5	12.8	17.0	5.5	3.0	6.3

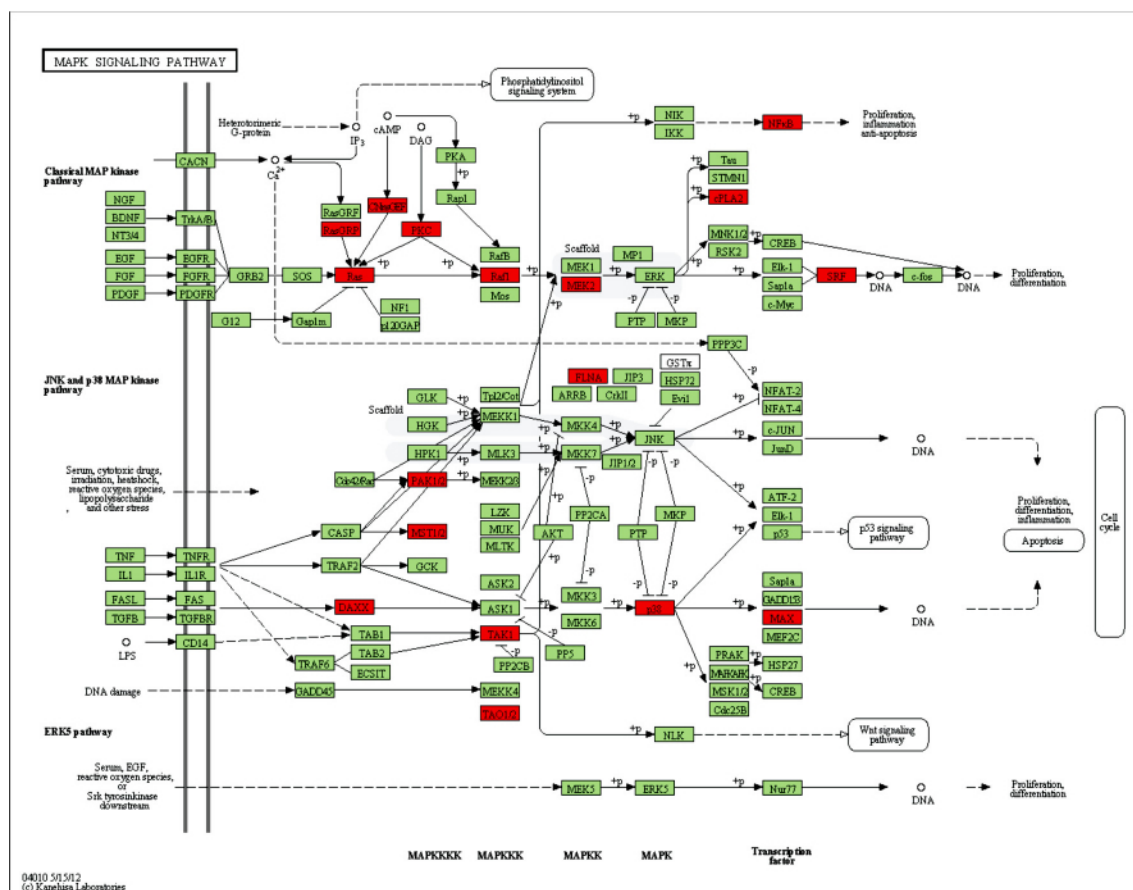


图1 SLE 外周血 PBMCs 的 MAPK 信号通路
红色标注: 含差异磷酸化位点的基因

表4 差异基因通路分析定位到的代谢通路

通路	基因数	P 值
胰岛素信号转导通路	10	0.016 194
FC 小量 RI 信号通路	12	0.000 009
B 细胞受体信号通路	7	0.008 772
ErbB 信号通路	8	0.005 723
磷脂酰肌醇信号系统	9	0.000 864
戊糖磷酸途径	3	0.020 733
T 细胞受体信号通路	12	0.000 218
MAPK 信号通路	19	0.003 020
趋化因子信号通路	17	0.000 297
血管内皮生长因子信号通路	7	0.008 121
GnRH 信号通路	12	0.000 110
NOD 样受体信号通路	6	0.006 232

化蛋白质的标记与分离富集造成很大困难。③ 磷酸化蛋白质的磷酸基团很容易在分离过程中丢失, 且因其负电性而难于质子化, 这些均给质谱分析鉴定磷酸化蛋白质造成困难。本研究采用磷酸化肽段富集试剂盒捕获的磷酸化蛋白丰度较低, 并结合质谱与蛋白质分离富集技术, 并用 Mascot 算法鉴定多肽及磷酸化位点, 共鉴定出有差异的磷酸化位点

1 035 个, 与标注蛋白对应的基因有 618 个。

蛋白质组学方法在信号转导等方面的研究, 目前主要针对检测和定量蛋白表达谱、识别翻译后修饰和绘制蛋白质相互作用网络等。在蛋白水平上蛋白质组学分析明确疾病的蛋白质变化、确定以供诊断的分子标记及了解疾病的发生过程^[12]。MAPKs 是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 信号途径是目前细胞信号传递途径研究的热点, 其中 MAPK 信号途径活化与细胞增殖、分化、细胞因子合成、细胞周期调控及细胞凋亡等密切相关, 有研究^[13]指出针对该信号途径进行的干预和调控治疗, 在 SLE 以及相关疾病的治疗中具有良好应用前景。研究^[14]表明 SLE 患者外周血 T 淋巴细胞免疫耐受缺陷与 MAPK 信号途径调控异常有关, 此调控异常直接导致 SLE 患者 TCR 介导的细胞内信号传递机制异常和 T 淋巴细胞功能异常。本研究显示 SLE 患者 PBMCs 中的 MAPK 信号途径高度活化, 提示 SLE 患者 PBMCs 中 MAPK 信号途径的异常活化, 对狼疮发病机制研究、探讨新的治疗手

段及观察疗效提供了实验依据。

尽管该研究对 SLE 患者外周血单个核细胞的磷酸化蛋白质谱表达进行鉴定以及生物信息学分析,所获取数据还远远不足,但该项研究结果对了解该病的发生机制提供部分参考和补充,从蛋白质组学磷酸化深入研究其发病机制提供理论基础。

参考文献

- [1] Melo-Braga M N, Verano-Braga T, León I R, et al. Modulation of protein phosphorylation, glycosylation and acetylation in grape (*Vitis vinifera*) mesocarp and exocarp due to *Lobesia botrana* infection [J]. *Mol Cell Proteomics* 2012, 11(10): 945–56.
- [2] Lin S Y, Li T Y, Liu Q, et al. Protein phosphorylation-acetylation cascade connects growth factor deprivation to autophagy [J]. *Autophagy* 2012, 8(9): 1385–6.
- [3] Zahid S, Oellerich M, Asif A R, et al. Phosphoproteome profiling of substantia nigra and cortex regions of Alzheimer's disease patients [J]. *J Neurochem* 2012, 121(6): 954–63.
- [4] Chien K Y, Liu H C, Goshe M B. Development and application of a phosphoproteomic method using electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC), IMAC, and LC-MS/MS analysis to study Marek's disease virus infection [J]. *J Proteome Res* 2011, 10(9): 4041–53.
- [5] Giorgianni F, Zhao Y, Desiderio D M, et al. Toward a global characterization of the phosphoproteome in prostate cancer cells: identification of phosphoproteins in the LNCaP cell line [J]. *Electrophoresis* 2007, 28(12): 2027–34.
- [6] Zhang L, Dai Y, Peng W, et al. Genome-wide analysis of histone H3 lysine 4 trimethylation in peripheral blood mononuclear cells of minimal change nephrotic syndrome patients [J]. *Am J Nephrol* 2009, 30(6): 505–13.
- [7] Rahman A, Isenberg D A. Systemic lupus erythematosus [J]. *N Engl J Med* 2008, 358(9): 929–39.
- [8] Xiang Y J, Dai S M. Prevalence of rheumatic diseases and disability in China [J]. *Rheumatol Int* 2009, 29(5): 481–90.
- [9] Li X, Zhang Y, Zeng X, et al. Chemical profiling of bioactive constituents in *Sarcandra glabra* and its preparations using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011, 25(17): 2439–47.
- [10] Popova T G, Turell M J, Espina V, et al. Reverse-phase phosphoproteome analysis of signaling pathways induced by Rift valley fever virus in human small airway epithelial cells [J]. *PLoS One* 2010, 5(11): e13805.
- [11] Kovarova H, Hajdich M, Livingstone M, et al. Analysis of state-specific phosphorylation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis approach [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 787(1): 53–61.
- [12] Jungblut P R, Zimny-Armdt U, Zeindl-Eberhart E, et al. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases [J]. *Electrophoresis* 1999, 20(10): 2100–10.
- [13] De Luca A, Maiello M R, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2012, 2: S17–27.
- [14] Hoffman R W. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol* 2004, 113(1): 4–13.

The phosphoproteome analysis in PBMCs of SLE patients

Cheng Juan¹, Ma Hualin², Dai Yong³

(¹Dept of Clinical Laboratory, ²Dept of Nephrology, ³Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020)

Abstract Objective To investigate the aberrant expression of phosphoproteome analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Lay the foundation for further research of mechanism and treatment in patients with SLE. **Methods** Phosphopeptides were enriched using TiO₂ from PBMCs of patients and healthy subjects, then analyzed by automated LC-MS/MS analysis. Phosphorylation sites were identified and quantitated by MASCOT and MaxQuant. Differential expressed proteins and peptides were screened based on the bioinformatics analysis. **Results** 1 035 phosphorylation sites were identified from SLE compared with normal subjects, 618 corresponding genes were screened out in annotation proteins. Pathway analyses showed 12 signaling pathways were identified. There were the most difference phosphorylation sites in mitogen activated protein kinases (MAPK) signaling pathway. **Conclusion** Differently phosphorylated proteins and peptides can be detected in patients with SLE, which can be used as a mechanism of reference and supplement combined with metabolic pathway, and might be used as a potential target for treatment and research of SLE.

Key words systemic lupus erythematosus; phosphoproteome; signaling pathway; mitogen activated protein kinases