

应用 iTRAQ 对唐氏综合征胎儿脐带血的蛋白质组学研究^{*}

文锦丽¹, 林秀华¹, 郭 辉¹, 李武县¹, 林琳华², 戴 勇^{1△} (暨南大学第二临床学院/深圳市人民医院:
1. 临床医学研究中心; 2. 产前诊断中心, 广东深圳 518020)

【摘要】 目的 筛选并鉴定唐氏综合征胎儿与健康对照者差异性表达蛋白质, 以寻找唐氏综合征胎儿的生物标记物。**方法** 应用同位素标记相对和绝对蛋白定量法和功能聚类分析法筛查和分析唐氏综合征胎儿脐带血和正常胎儿脐带血的差异表达蛋白。**结果** 共筛选鉴定到 506 种差异表达蛋白, 其中最显著的 3 种蛋白分别是基质蛋白-3、胸腺肽 β 10 和骨桥蛋白。**结论** 唐氏综合征胎儿和正常胎儿脐带血血清蛋白存在较多差异表达蛋白, 其中基质蛋白-3、胸腺肽 β 10 和骨桥蛋白等显著差异蛋白可能作为潜在的临床筛查生物标志物。

【关键词】 唐氏综合征; 蛋白质组学; 同位素标记相对和绝对蛋白定量法; 功能聚类分析法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 23. 005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)23-3461-02

Proteomics study of cord blood in Down's syndrome fetuses by iTRAQ^{*} WEN Jin-li¹, LIN Xiu-hua¹, GUO Hui¹, LI Wu-xian¹, LIN Lin-hua², DAI Yong^{1△} (1. Clinical Medicinal Research Center; 2. Department of Antenatal Diagnosis, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medicine College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

【Abstract】 Objective To identify the differentially expressed proteins between fetuses with Down's syndrome and healthy control, so as to screen the potential biomarkers of fetuses with Down's syndrome. **Methods** To investigate the differentially expressed proteins in cord blood of fetus with Down's syndrome and normal fetus using isobaric tagging for relative and absolute protein quantification and gene ontology analysis. **Results** A total of 506 differentiate proteins were identified, in which 3 proteins (Matrin-3, Thymosin beta 10 and Osteopontin) were significant. **Conclusion** The proteomics of the serum are significant different among normal fetus and fetus with Down's syndrome. Some of the protein, such as Matrin-3, Thymosin beta 10 and Osteopontin, may have potential applying value in clinic screening practice.

【Key words】 Down's syndrome; proteomics; iTRAQ; GO analysis

21-三体综合征又称唐氏综合征(DS), 是最常见的染色体病, 在 1/600~1/800 的活产儿, 或 1/150 次妊娠中有一次发生概率^[1]。DS 以智力障碍和多发畸形为主要特征, 迄今尚无有效的治疗方法, 因此对胎儿进行早期宫内诊断和有效干预对降低 DS 患儿出生率显得尤为重要。目前血液生化唐氏筛查检出率为 60%~75%, 并且假阳性率约 5%^[2]。迫切需要寻找一种更安全、有效的筛查方法, 同位素标记相对和绝对蛋白定量法(iTRAQ)是 Applied Biosystems 公司近年发展的蛋白质分析技术, 该技术的应用使快速筛选及鉴定潜在生物标记蛋白成为可能。本研究应用八通道的 iTRAQ 结合多维光谱和功能聚类(GO)分析法筛选和鉴定 DS 胎儿的差异蛋白质, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 DS 胎儿组和正常胎儿组各 10 例。所有受试者均知情同意并签署知情同意书, 实验符合人体试验伦理学标准, 并经过获得医院伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取和浓度测定 每组称取适量的样品, 加入适量蛋白裂解液溶解, 然后分别添加终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟(PMSF)和 2 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA), 5

min 后添加终浓度为 10 mmol/L 的二硫苏糖醇; 超声 15 min 后 25 000×g 离心 20 min, 取上清液。上清液加入 5 倍体积预冷丙酮, 在 -20 ℃ 沉淀 2 h, 然后 16 000×g 离心 20 min, 弃上清液。取适量沉淀, 加入适量蛋白裂解液溶解, 然后分别添加终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 和 2 mmol/L 的 EDTA, 5 min 后添加终浓度为 10 mmol/L 的 DTT, 超声 15 min 后 25 000×g 离心 20 min, 取上清液。上清液在 56 ℃ 条件下加入终浓度为 10 mmol/L 的 DTT 处理 1 h, 还原打开二硫键。再加入终浓度为 55 mmol/L 碘代乙酰胺暗室静置 45 min, 进行半胱氨酸的烷基化封闭。加入适量冷丙酮, 在 -20 ℃ 静置 2 h 后以 25 000×g 离心 20 min, 弃上清液; 沉淀在 200 μ L 0.5 mol/L TEAB 中超声溶解 15 min 并再次离心 20 min 后取上清液用于定量。按照 Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.2.2 SDS 电泳 配置 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 每组样品分别与 4×loading buffer 混合, 95 ℃ 加热 5 min。每组样品上样量为 30 μ g, 标记上样量 10 μ g。120 V 恒压电泳 2 h。电泳结束后, 用染液染色 2 h, 再用脱色液脱色 3~5 次, 每次 30 min。

1.2.3 蛋白质酶解和 iTRAQ 标记 每组样品精确取出 40 μ g 蛋白, 按照蛋白: 酶=20: 1 的比例加入胰蛋白酶, 37 ℃ 酶

^{*} 基金项目: 广东省深圳市科技计划资助项目(201202121); 广东省深圳市科创委重点资助项目(CXZZ20130321090846345)。

作者简介: 文锦丽, 女, 本科, 副主任技师, 主要从事临床医学免疫检验及科研工作。 Δ 通讯作者, E-mail: daiyong22@aliyun.com。

解 4 h,按上述比例再补加胰蛋白酶 1 次,37 ℃ 继续酶解 8 h。胰蛋白酶消化后,用真空离心泵抽干肽段,再用 0.5 mol/LTE-AB 复溶肽段,按照手册进行 iTRAQ 标记,两组肽段被不同的 iTRAQ 标签标记(健康对照组-iTRAQ114,DS 组-iTRAQ 116)后,在室温条件下静置 2 h。

1.2.4 SCX 分离和基于 QE 的液质联用分析 将标记后的两组肽段混合,采用岛津 LC-20AB 液相系统、分离柱为 4.6×250 mmol/L 型号的 Ultremex SCX 柱对样品进行液相分离。进入液相分离的肽段进入到串联 ESI 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)。一级质谱分辨率设置为 70 000,二级质谱分辨率为 17 500;扫描的质荷比范围为一级 350~2 000,二级 100~1 800。

1.2.5 Western-blot 验证差异蛋白 根据查阅文献本文选择较多的差异蛋白质和较少的差异蛋白质进行 Western-blot 验证。验证步骤分成 5 步,分别是提取蛋白质、二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白质转移、免疫印迹、数据收集。

1.3 统计学处理 平均报告离子比率大于 15 的蛋白多肽归类为上调,平均报告离子比率小于 0.07 归类为下调。然后利用在线 GO 工具在线鉴定蛋白的功能。

2 结 果

以多肽大于 1 和 95%可信区间作为阈值,有 506 种蛋白表达上调或者下调,其中显著差异的蛋白有 24 种。表 1 代表 DS 胎儿跟正常胎儿比较表达上调($n=16$)和下调($n=8$)的蛋白,其中 3 种蛋白(基质蛋白-3、胸腺肽 β 10、骨桥蛋白)在 DS 胎儿中显著高表达。

在鉴定分离出的蛋白中,对具有注释名的 1 375 种蛋白用 GO 进行分子功能、细胞组分和生物功能归类分析。532 种参与分子功能,其中 326 种参与蛋白结合,23 种参与辅助因子结合,32 种参与脂质结合,7 种参与氧结合,12 种参与模式结合,5 种参与细胞外基质结合,5 种参与细胞表面结合,20 种参与糖类结合,10 种参与核酸结合,9 种参与维生素结合,83 种参与核苷酸结合。从细胞组分归类中有 318 种膜蛋白定位于细胞内细胞器,278 种定位于膜绑定细胞器。在大分子复合物中,有 41 种核糖核蛋白复合体和 7 种蛋白-DNA 复合体。在生物过程归类中有 244 种蛋白参与主要代谢过程,230 种蛋白参与细胞代谢过程。有 123 种蛋白参与转运同时有 124 种蛋白参与建立细胞定位。

表 1 DS 胎儿跟正常胎儿脐带血清蛋白质组学比较			
接收编号	蛋白名称	多肽	比率
上调蛋白			
Q8NIG4	亮氨酸富集蛋白 47	3	60.266 2
Q9UNM6	26S 非腺三磷酸酶调节蛋白酶 13	1	60.266 2
P55209	核小体装配蛋白质	2	60.266 2
Q6PIM3	幼体大蛋白同族体 2	1	60.266 2
Q96HE7	ERO1-相似蛋白 α	2	60.266 2
Q9ULD0	酮戊二酸脱氢酶 2	10	60.266 2
P63313	胸腺素 β 10	4	60.266 2
O43681	ATP 酶 ASNA1	3	60.266 2
Q9UHI5	中性氨基酸转运蛋白	2	60.266 2
Q9Y6X5	骨桥蛋白	1	60.266 2
Q9PIF3	UPF0727 protein C6orf115	3	25.129 0
P62328	胸腺素 β 4	7	23.319 2
O95822	线粒体丙二酰-CoA 脱羧酶	2	22.506 7

续表 1 DS 胎儿跟正常胎儿脐带血清蛋白质组学比较			
接收编号	蛋白名称	多肽	比率
P07911	尿调节素	1	18.469 8
P34949	甘露糖-6-磷酸异构酶	2	18.165 2
Q6B0K9	血红蛋白亚基 μ	1	15.552 9
下调蛋白			
Q9HIE5	硫氧还原跨膜蛋白 4	1	0.010 0
Q9UHV9	Prefoldin 亚基 2	3	0.010 0
Q01433	腺苷酸脱氢酶 2	1	0.010 0
Q00765	Receptor expression-enhancing protein 5	4	0.010 0
P43243	基质蛋白-3	4	0.010 0
Q15651	高迁移率核小体结合结构域蛋白	2	0.031 0
O43760	Synaptogyrin-2	2	0.031 3
Q13885	微管蛋白 β 2 A 链	38	0.063 1

3 讨 论

iTRAQ 有利于筛选生物标志物,通过检测 iTRAQ 标记多肽释放的报告离子峰值强度并比较蛋白质丰度,筛选并鉴定有价值的 DS 胎儿生物标志蛋白,本研究应用 iTRAQ 和 GO 分析法寻找 DS 胎儿脐带血清蛋白质标志物。结果鉴定出 506 种蛋白,通过 GO 分析,鉴定到了几个可能有临床意义的差异蛋白。

表 1 列出了 DS 胎儿上调和下调的蛋白,其中对基质蛋白 3、胸腺肽 β 10 和骨桥蛋白的研究较多。基质蛋白-3 是相对分子质量为 125×10^3 的内核基质蛋白,在进化中高度保守。基质蛋白-3 包含一个双重核定位信号,2 个锌指结构域和 2 个标准的 RNA 识别模指^[3-4]。基质蛋白-3 由 MATR3 编码,在骨骼肌有表达,常染色体和有活性的 X 染色体区域均有 MATR3,基质蛋白-3 是一个新的人核心基质蛋白靶标,其降解能诱导细胞从凋亡向坏死转换^[5]。胸腺肽 β 10 由 43 种氨基酸组成,编码基因定位于 2 号染色体 p11.2。有研究显示胸腺肽 β 10 可通过干扰 Ras 功能而抑制血管生成^[6]。在许多肿瘤中,例如胰腺、结肠、乳腺、甲状腺和胃肿瘤中均发现有胸腺肽 β 10 升高^[7]。因而有学者认为,胸腺肽 β 10 也许可以作为一个肿瘤诊断和预后的有用生物标记物^[8]。Kim 等^[9]发现胸腺肽 β 10 通过干扰肌动蛋白和抑制 Ras 从而抑制肿瘤生长和血管生成。骨桥蛋白在 DS 胎儿肝细胞和巨噬细胞样细胞中表达,这些 DS 胎儿在围生期即可出现肝纤维化。有学者提出骨桥蛋白也许还与其他细胞因子,如 TGF- β 1、PDGF 等相关联,共同参与了 DS 新生儿常见的肝窦周围纤维化的发病机制^[10]。

本研究仅仅初步筛选出潜在的生物标志物,还必须进一步研究确认和检测其敏感性和特异性等深入研究。

参考文献

[1] Kwon JY, Park IY, Kwon S, et al. The quadruple test for Down syndrome screening in pregnant women of advanced maternal age[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 285(3): 629-633.

[2] Kolialexi A, Tsangaris GT, Papantoniou N, et al. Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(8): 691-698.

[3] Sui W, Tang D, Zou G, et al. Differential(下转第 3465 页)

尿病防控工作的开展提供科学依据。

在纳入本研究的样本中,男性 FPG 水平显著高于女性;FPG 受损率、糖尿病患病率男性显著高于女性,可能与男性生活习惯和工作压力较大有关。男性外出应酬的机会比女性多,生活没规律、吃油腻食物和肉食较多、烟酒无度。这种长期不健康的生活方式导致男性比女性更易患糖尿病。因此,在医务人员糖尿病的防控工作中,应多加关注男性医务人员的血糖水平,对其开展相应的健康教育和行为干预,降低糖尿病、脂质代谢异常等慢性病的发生率。

从本研究结果可以看出,年龄增长是糖尿病的重要因素,男性和女性医务人员的 FPG 水平均随着年龄增长而升高;男、女 FPG 受损率也随着年龄的增加而增加。男、女医务人员糖尿病患者 49 岁以上年龄段人数增长迅速,中老年是糖尿病的好发年龄,这可能是由于:(1)随着年龄增长,胰岛细胞功能逐渐降低导致胰岛素分泌绝对减少;(2)人民生活水平显著提高,体力活动和体育运动均减少,肥胖及机体代谢功能紊乱导致胰岛素抵抗,这些均是中老年人 2 型糖尿病高发的主要原因。有研究表明,中老年男性睾酮水平下降可导致胰岛素抵抗,其内源性睾酮水平与胰岛素抵抗存在负相关^[9-10];女性则由于绝经后体内雌激素水平明显下降,性激素结合球蛋白下降,而性激素结合球蛋白与胰岛素呈负相关,造成空腹胰岛素增高,使糖代谢发生异常。

在 4 种职业人群中,临床医生 FPG 水平最高,护理人员次之,医技人员列第 3,医疗行政人员 FPG 水平最低,这与职业性质有关。临床医生工作负荷大、无规律、突发事件多、精神压力大,而护理人员工作强度大、夜班频繁,作息不规律,因此临床医生和护理人员是医务人员糖尿病防控的重点人群。

本研究结果对医务人员开展糖尿病的防控具有重要的指导意义和实用价值,更加有效地对不同人群进行血糖水平监测,早发现早干预从而降低糖尿病的患病率及其并发症,进一步降低心脑血管疾病发生。

参考文献

[1] Raza S, Abbas S, Ahmad A, et al. Association of Glutathi-

(上接第 3462 页)

proteomic analysis of renal tissue in lupus nephritis using iTRAQ reagent technology[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(11):3537-3543.

[4] Hisada-Ishii S, Ebihara M, Kobayashi N, et al. Bipartite nuclear localization signal of matrin 3 is essential for vertebrate cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(1):72-76.

[5] Salton M, Lerenthal Y, Wang SY, et al. Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(8):1568-1576.

[6] Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, et al. Thymosin beta 10 expression in developing human salivary glands[J]. *Early Hum Dev*, 2011, 87(12):779-783.

[7] Lee SM, Na YK, Hong HS, et al. Hypomethylation of the thymosin β 10 gene is not associated with its overexpres-

one-S-Transferase (GSTM1 and GSTT1) and FTO Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus Cases in Northern India[J]. *Balkan J Med Genet*, 2014, 17(1):47-54.

[2] Wong IO, Cowling BJ, Schooling CM. Vulnerability to diabetes in Chinese: an age-period-cohort analysis[J]. *Ann Epidemiol*, 2015, 25(1):34-39.

[3] Jeon JY, Ha KH, Kim DJ. New risk factors for obesity and diabetes: Environmental chemicals[J]. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(2):109-111.

[4] Sherif S, Sumpio BE. Economic development and diabetes prevalence in MENA countries: Egypt and Saudi Arabia comparison[J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(2):304-311.

[5] 赵燕, 王海澜, 蓝宇萍. 2009 年深圳市龙岗区公职人员血糖水平分析[J]. *中国当代医药*, 2013, 20(4):165-168.

[6] 朱家瑞. 南平市 62 406 例健康成人空腹血糖水平分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(14):2973-2978.

[7] 王法弟, 付朝伟, 陈跃, 等. 农村社区成人糖尿病发病及空腹血糖水平异常情况研究[J]. *浙江预防医学*, 2011, 23(1):4-7.

[8] Ford ES, Zhao G, Li C. Pre-diabetes and the risk for Cardiovascular disease: a systematic review of the evidence[J]. *Am Coll Cardiol*, 2010, 55(13):1310-1317.

[9] 黄超, 王长江. 中国安庆农村人群中糖耐量和胰岛素抵抗情况的调查[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(4):515-518.

[10] 李江源, 李小鹰, 李明, 等. 年龄依赖性胰岛素抵抗与睾酮水平的相关性[J]. *中国老年医学杂志*, 2007, 26(2):104-106.

(收稿日期:2015-03-15 修回日期:2015-07-21)

sion in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cells*, 2011, 32(4):343-348.

[8] Fehér LZ, Pocsay G, Krenács L, et al. Amplification of Thymosin Beta 10 and AKAP13 Genes in Metastatic and Aggressive Papillary Thyroid Carcinomas[J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(2):449-458.

[9] Kim YC, Kim BG, Lee JH. Thymosin β 10 expression driven by the human TERT promoter induces ovarian cancer-specific apoptosis through ROS production [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e35399.

[10] Tokairin T, Nishikawa Y, Watanabe H, et al. Osteopontin expression in the liver with severe perisinusoidal fibrosis: Autopsy case of Down syndrome with transient myeloproliferative disorder[J]. *Pathol Int*, 2008, 58(1):64-68.

(收稿日期:2015-04-01 修回日期:2015-06-21)