

基于蛋白质组学方法研究水蛭干预 IgA 肾病大鼠的作用机制*

谢永祥^① 史伟^{①△} 龙春莉^① 蓝芳^① 孟立锋^① 谢丽萍^①

摘要 目的: 基于蛋白质组学方法检测水蛭对 IgA 肾病大鼠蛋白指纹图谱影响, 阐述水蛭对血瘀证 IgAN 的作用机理。方法: 选用 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠 140 只, 运用脂多糖牛血清白蛋白 + 脂多糖 + 四氯化碳方法建立实验性 IgAN 模型 (空白对照组除外), 造模成功后, 随机分为 (1) 空白对照组、(2) 模型组、(3) 生理盐水对照组、(4) 水蛭高剂量治疗组、(5) 水蛭中剂量治疗组、(6) 水蛭低剂量治疗组、(7) 强的松治疗对照组, 共 7 组, 每组 20 只; 血液样本经过 SDS - PAGE 电泳后, 进行 iTRAQ 标记, 离线二维液相色谱分离与点靶以及质谱分析及数据库检索对各组样本进行相对定量分析, 并利用生物信息学软件进行分析。结果: 以 p - value < 0.05 且 fold change < 0.83 或 fold change > 1.2 为差异蛋白筛选标准, 血液样本筛选出的 21 个差异蛋白, 血液标本 IgAN 血瘀证大鼠模型组和空白相比上调, 水蛭治疗后下调的蛋白 5 个, IgAN 血瘀证模型组和空白相比下调, 水蛭治疗后下调的蛋白 16 个。结论: 应用 iTRAQ 技术筛选出水蛭治疗后 IgAN 血瘀证大鼠血液标本中差异表达蛋白, 为深入研究 IgAN 血瘀证的病理机制及水蛭治疗 IgA 肾病的分子机制奠定了基础。

关键词 IgA 肾病 水蛭 蛋白质组学 iTRAQ

The Mechanism of Action of Leech in IgA Nephropathy Rats was Studied Based on Proteomics Methods

XIE Yongxiang , SHI Wei , LONG Chunli , et al

The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese medicine , Nanning(530023)

ABSTRACT Objective: The effect of leech on protein fingerprints of IgA nephropathy rats was detected by proteomics , and the mechanism of leech on IgAN of blood stasis syndrome was elaborated. **Methods:** 140 Wistar male rats aged 6 weeks were used to establish the experimental IgAN model (except blank control group) by the method of lipopolysaccharide bovine serum albumin + lipopolysaccharide + carbon tetrachloride. After the model was successfully established , the rats were randomly divided into six groups , including the model group , the prednisone - treated group , the saline control group , the high - dose leech - treated group , the middle - dose leech - treated group and the low - dose leech - treated group (n = 20 for each) . After SDS - PAGE electrophoresis , blood samples were labeled by iTRAQ , separated by off - line two - dimensional liquid chromatography and targeted , analyzed by mass spectrometry and database retrieval , and analyzed by bioinformatics software. **Results:** Using p - value < 0.05 and fold change < 0.83 or fold change > 1.2 as the screening standard for differential proteins , twenty - one differential proteins were screened out from blood samples. Compared with the blank in the blood specimen , the number of proteins in the model group was upregulated , 5 proteins were down - regulated after the treatment of leech , the number of proteins in the model group was down - regulated after the treatment of IgAN blood stasis , and 16 proteins were down - regulated after the treatment of leech. **Conclusion:** The application of iTRAQ technology to determine the difference expression protein in the blood specimen of the rat blood after the leech treatment , and the basis of the pathologic mechanism and the leeches to treat IgA nephropathy in the study of the molecular mechanisms of the blood stasis.

KEY WORDS IgA nephropathy Leech Proteomics analysis iTRAQ

IgA 肾病 (IgA nephropathy , IgAN) 是世界范围内高发病率的原发性肾小球疾病, 是导致终末期肾衰竭的常见原因, 约占原发性肾小球疾病的 20% ~ 47%^[1]。陈香美等^[2]对 IgA 肾病中医证候的多中心

流行病学调查发现, 标证中除湿热证外, 血瘀证是临床又一常见的证型, 当中更应该注重血瘀证的重要性。大量研究表明, 水蛭及其提取物治疗慢性肾脏病疗效明显, 为了进一步揭示 IgAN 血瘀证的发生机制

* 本课题为国家自然科学基金地区科学基金资助项目 (No. 81460719); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (No. 2014GXNSFAA118247); 广西壮族自治区名中医史伟传承工作室
① 广西中医药大学第一附属医院 (南宁 530023)
△ 通讯作者

及水蛭治疗 IgA 肾病的作用机制,本研究从蛋白质组学水平展开研究,复制 IgAN 血瘀证大鼠模型,利用比较蛋白质组学的技术和方法,分析治疗前后血液标本中蛋白表达的差异,寻找差异表达蛋白点。

材料与方 法

1 实验动物 选用 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠 140 只,体重 180~200 g,由广西食品药品监督管理局提供。许可证号:SCXK 桂 2014-0002,购进大鼠后均在广西中医药大学清洁级实验室进行适应性喂养。

2 实验药物 水蛭免煎颗粒,由江阴天江药业有限公司生产的中药配方颗粒,每 10 g 相当于生药 10 g。醋酸强的松片,由浙江仙琚制药股份有限公司提供,5 mg/片。

3 主要试剂及仪器

3.1 试剂 二硫苏糖醇,碘乙酰胺,测序级胰蛋白酶(Trypsin),Promega 公司;甲酸铵,Sigma 公司;25%氨水,圣克鲁斯公司;iTRAQ 8 标试剂盒,AB Sciex 公司;异丙醇,AB Sciex 公司;sep-Pak C18 除盐柱,1cc(100mg),Waters 公司;10 KDa 超滤管(Amicon ultra, Centrugal Filter),Millipore 公司;高 pH 反相色谱柱,Waters 公司;纳升级肽段捕集柱,及纳升级肽段分析柱,Thermo Scientific 公司。

3.2 仪器 H-Class 超高压液相色谱,Waters 公司;EASY-nLC 1000 超高压纳升级液相色谱,Orbitrap Fusion 质谱仪,Thermo Scientific 公司;IKA 振荡器;恒温加热块,鼎国昌盛生物技术有限公司;LX-100 手掌式离心机,其林贝尔仪器;电热恒温水浴锅,长安科学仪器;分析天平,Sartorius BT25S 梅特勒公司;制冰机,Panasonic 日本松下;冷冻干燥机(alpha-2LD),德国 Christ 公司;酶解仪(Thermomixer Com- fort),美国 Eppendorf 公司。

4 实验方法

4.1 动物分组与模型建立 运用脂多糖牛血清白蛋白+脂多糖+四氯化碳方法建立实验性 IgAN 模型(空白对照组除外)如果免疫荧光显示肾组织有较强的 IgA 沉积,检测指标显示有大量蛋白尿及血尿,大鼠血液流变学提示低、中、高切变率与血浆黏度都出现了明显的升高,则提示造模成功^[3,4]。造模成功后随机分为:(1)空白对照组、(2)模型对照组、(3)生理盐水对照组、(4)水蛭高剂量治疗组、(5)水蛭中剂量治疗组、(6)水蛭低剂量治疗组、(7)强的松治疗对照组,共 7 组,每组 20 只。

4.2 给药方法 所有各组 14 周内进食进水不限。空白对照组:正常饮食和生活,不予干预,直至第 14 周末。模型对照组:不给予任何干预。生理盐水对

照组:造模成功后予生理盐水 2 ml/100 g,灌胃给药至 14 周末。水蛭高、中、低剂量组:造模成功后每日早上予强的松悬液 2 ml,下午予水蛭悬液 2 ml,灌胃给药至 14 周末,水蛭用量为高剂量组 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,中剂量组 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,低剂量组 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹,强的松 5.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹。强的松治疗对照组:造模成功后每日早上予强的松悬液 2 ml,灌胃给药至 14 周末,强的松 5.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

4.3 血液蛋白质组学验证 实验终点 14 周末,采集每只大鼠腹主动脉血 3 ml 于非抗凝真空采血管中,离心,取上清分装,-80℃冰箱保存备用。检测时利用 SDS-PAGE 对各组血清样本去除高丰度蛋白效果进行验证。冻干样品胰蛋白酶酶解,每组样品用 ZipTip-C18 取 1 μl 脱盐后点靶,经质谱验证 iTRAQ 试剂标记成功后,将样品等量混合、冻干。标记样品离线二维液相色谱分离,收集到的各组分样品稀释后进行反相 C18 柱梯度淋洗和点靶。标记肽段的串联质谱鉴定和相对定量分析采用 AB Sciex 公司生产的 5800 型 MALDI-TOF/TOF 蛋白质分析仪。质谱分析数据用 Protein Pilot 2.0 对 SWISSPROT 数据库进行检索鉴定蛋白,报告置信度在 95% 以上的蛋白质。运用富集分析算法对初步鉴定的蛋白数据进行分组,鉴定的蛋白与数据库进行比对,选择基因本体(GO)的生物过程、细胞成分和分子功能注释对蛋白质进行分类,选择 KEGG 的通路数据库对蛋白所涉及的通路进行分类和富集分析。以上实验进行 3 次。最后予 Western Blot 对 IgAN 血瘀证血清标本的差异蛋白质表达的验证。

4.4 结果分析及信息学处理 本结果使用 Swiss-prot 数据库,iTRAQ 的质谱分析是由 Thermo Scientific 公司 Orbitrap Fusion 质谱仪完成。根据原始的 P-value,选取 p-value < 0.05 进行过滤后,几组对比实验以 fold change ≤ 0.83 或 fold change ≥ 1.2 为差异蛋白筛选标准,所得出的结果进入分析。

通过生物信息学分析工具 DAVID 对鉴定的差异蛋白进 GO(GeneOntology)功能注释;主要包括生物进程、分子功能和细胞成分的 GO 分析,同时应用 string 网络分析进行蛋白功能网络的相互作用分析,并使用 KEGG 进行富集分析。

结 果

1 大鼠血液标本中差异表达蛋白的 iTRAQ 分析 设定蛋白丰度差异达到 ≥ 1.2(上调),≤ 0.83(下调),血液标本 IgAN 模型组和空白相比上调,水蛭治疗后下调的蛋白 5 个(见表 1),IgAN 模型组和空白相比下调,水蛭治疗后下调的蛋白 16 个(见表 2)。

表 1 药物组下调血液样本模型组与对照组比较上调的差异蛋白

Accession	蛋白名称	114/113	115/114	116/114	117/114	118/114	119/114
Q63108	Carboxylesterase 1E	1.210	1.008	0.888	0.909	1.068	1.026
O54889	DNA – directed RNA polymerase I subunit RPA1	1.371	0.942	0.649	1.090	0.969	0.998
P02650	Apolipoprotein E	1.316	0.997	0.905	1.082	0.988	1.218
O55207	Synaptojanin – 2	1.842	1.013	2.208	1.103	1.026	1.053
Q63514	C4b – binding protein alpha chain	1.316	1.022	1.346	1.075	1.120	0.961

注: 113: 空白组; 114: 模型组; 115: 生理盐水对照组; 116: 中药高剂量组; 117: 中药中剂量组; 118: 中药低剂量组; 119: 强的松治疗

表 2 药物组下调血液样本模型组与对照组比较下调的差异蛋白

Accession	蛋白名称	114/113	115/114	116/114	117/114	118/114	119/114
Q5J2D6	Gametogenetin – binding protein 1	0.326	0.899	3.210	0.703	0.823	1.141
P20761	Ig gamma – 2B chain C region	0.497	0.832	0.919	1.143	1.037	1.061
Q6P734	Plasma protease C1 inhibitor	0.678	0.832	2.389	1.163	1.510	0.986
P02466	Collagen alpha – 2(I) chain	0.585	0.765	0.810	1.048	0.906	0.818
Q62638	Golgi apparatus protein 1	0.546	0.801	0.808	1.267	1.017	1.176
P81827	Urinary protein 1	0.757	0.812	0.748	1.073	1.076	0.890
Q5M8C6	Fibrinogen – like protein 1	0.779	0.897	2.618	0.974	0.988	0.894
Q8K4T4	Filamin – A – interacting protein 1	0.516	0.883	1.419	1.017	0.861	0.962
P51842	Retinal guanylyl cyclase 2	0.681	0.912	0.450	0.973	1.152	1.137
Q8CHN8	Mannan – binding lectin serine protease 1	0.779	0.985	1.283	1.107	1.126	0.940
P17475	Alpha – 1 – antiproteinase	0.807	1.002	1.561	1.125	1.141	1.033
Q63356	Unconventional myosin – 1e	0.451	0.945	0.734	1.144	1.098	1.244
P59996	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	0.818	0.993	2.446	0.955	1.082	1.100
O08619	Coagulation factor XIII A chain	0.569	1.008	0.846	0.964	0.984	1.031
P08661	Mannose – binding protein C	0.723	0.962	0.906	1.001	1.073	0.942
P80067	Dipeptidyl peptidase 1	0.580	1.014	1.115	1.292	1.025	1.394

注: 113: 空白组; 114: 模型组; 115: 生理盐水对照组; 116: 中药高剂量组; 117: 中药中剂量组; 118: 中药低剂量组; 119: 强的松治疗

2 蛋白之间的相互作用分析 血液样本筛选出的 21 个差异蛋白,采用 string 软件绘制差异蛋白功能网络说明这些蛋白之间的相互作用,在这些网络中发现一些比较重要的与 IgAN 血瘀证发生发展密切相关的蛋白,主要集中在载脂蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂和鸟苷酸环化酶等,结果见图 1。

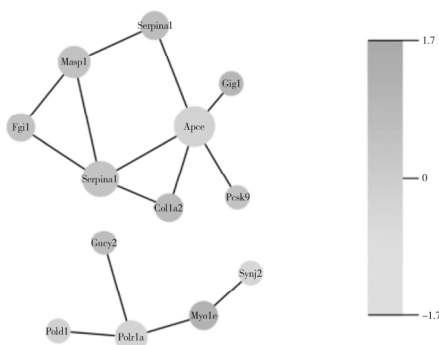


图 1 血液样本差异蛋白相互作用网络图

3 KEGG 通路的富集度分析结果 通过 KEGG 通路的富集度分析结果,血液样本筛选出和 IgA 肾病发生发展密切相关的主要有 4 条分子信号通路,主要集中在补体和凝血级联通路(complement and coagulation cascades),代谢信号通路(metabolic pathways),嘌呤代谢(purine metabolism) 和嘧啶代谢(pyrimidine

metabolism) 途径。这些差异蛋白主要包括 coagulation factor X III A1 (F13a1)、mannan – binding lectin serine peptidase 1(Masp1)、serpina1(serpin family A member 1)、serpin family G member 1(Serping1)、RNA polymerase I subunit A (Polr1a)、DNA polymerase delta 1 (Pold1) 等,这些蛋白可能与 IgA 肾病的发生和发展密切相关,需要进一步实验验证。

讨 论

IgA 肾病是一种免疫复合物沉积在肾小球系膜区或系膜及毛细血管壁上的疾病,同时伴有肾小球血流动力学异常,肾小动脉狭窄、闭塞及肾动脉硬化等变化。IgAN 整个病程中肾脏微循环内始终存在着较高浓度的血浆蛋白,造成血流缓慢,加速免疫复合物的沉积和微血栓的形成^[5]。肾小球硬化可破坏毛细血管床,使血浆蛋白进一步淤积,会造成恶性循环^[6]。这种病理变化与中医学的“瘀血”在本质上有内在的联系。吴艺等认为血液流变性异常是血瘀 IgAN 肾功能恶化的主要致病因素^[7-8]。周胜元等^[9]认为,不仅久病入络,新病也常入络成瘀,瘀血证几乎贯穿在肾小球疾病全过程中,只是程度不等而已。IgA 肾病西医多采用非免疫治疗及免疫治疗,疗效不稳定,不良反应及并发症较多。近年来中医药治疗 IgA 肾病的

疗效得到肯定,中医药及中西医结合治疗效果优于单纯西医治疗,国内外在治疗 IgA 肾病药物研制与开发方面越来越重视从传统中药中找寻。

对于中药作用机理的研究,传统方法研究具有很多局限,如只针对少数蛋白为研究对象等。目前,利用蛋白质组学技术针对 IgAN 的研究主要集中在发病机制和新型诊断生物标志的探索方面。iTRAQ 技术可以帮助寻找和确定中医证候的客观指标,具有能精确定性和定量的优势,且具有极高灵敏度,非常适合于高通量的筛选和鉴定组织中蛋白质表达水平的差异,从整体水平上研究蛋白的结构与功能,血液和尿液作为人体内最重要的体液,它的一些指标可直接反映人体的生理病理状态,我们采用 iTRAQ 技术分析 IgAN 血瘀证大鼠在经水蛭治疗前后,血清标本差异蛋白的表达情况。筛选出血清中有意义的差异蛋白为 21 个,主要涉及补体和凝血级联通路,代谢信号通路,肌动蛋白细胞骨架调节通路,以及肾素-血管紧张素系统信号通路等等。

中药水蛭作为有代表性的活血化瘀类药物,具有破血、散瘀和通经的功效,水蛭在 CKD 的治疗中应用越来越广泛,大量临床研究证明,水蛭及其提取物治疗慢性肾脏病疗效明显。其作用机制主要体现在:改善血液流变学,抗凝血、活化纤溶系统、抑制血小板聚集、溶解血栓,调整血脂水平,拮抗肾间质纤维化,缓解炎症反应对肾组织的损伤,抗肾小球系膜细胞增殖和炎性细胞浸润^[10]。我们筛选出血液中的差异蛋白相互间作用核心蛋白 ApoE 为载脂蛋白,主要在肝脏合成。它是一个多态性蛋白,有 3 个常见的异构体,即 ApoE2、ApoE3、ApoE4。ApoE 是血液中最重要载脂蛋白成分之一,对机体的脂类代谢影响极大。它主要存在于 CM、VLDL、IDL 和部分 HDL 中,是 HDL 的主要载脂蛋白,ApoE 的生理功能尚不清楚,除了作为 HDL 的结构成分外,可能还具有抑制卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)活性的作用。目前研究证明,肾小球的硬化与动脉粥样硬化具有相同的发病机制,

持续的高脂血症不仅可引起血管病变,也可导致肾小球系膜细胞增殖,系膜基质增加,最终加剧肾小球硬化^[11,12]。水蛭可能通过干预 ApoE 蛋白的表达,导致一系列蛋白表达的量发生变化,从而在分子水平上改善血瘀证。对于筛选的有意义差异蛋白还有待于进一步验证,通过延长药物治疗的时间或增加用量,能否使差异蛋白表达恢复到正常状态,也值得进一步研究。

参 考 文 献

- Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy. N Engl J Med 2013 368 (25): 2402 - 2414.
- 陈香美, 陈以平, 李平, 等. 1 016 例 IgA 肾病患者中医证候的多中心流行病学调查及相关因素分析. 中国中西医结合杂志 2006 26(3): 197 - 201.
- 汤颖, 姜探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进. 中山大学学报 2006 27(2): 184 - 187.
- 任建勋, 林成仁, 王敏. 多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究. 中药药理与临床 2017 23(5): 210 - 211.
- 郑智勇, 刘秉翰, 余英豪, 等. IgA 肾病肾微循环病变的图像分析研究. 中国体视学与图像分析 1998 3(2): 78 - 80.
- Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. Am J Kidney Dis 1997 29(6): 829 - 892.
- 王丽萍, 陈建, 庄永泽, 等. IgA 肾病血瘀证与肾脏病理损害的关系研究. 中国中医药信息杂志 2008 15(1): 21 - 23.
- 吴艺, 王智, 黄植楦, 等. IgA 肾病患者血液流变学与血瘀证关系的探讨. 广西中医学院学报 2007 10(4): 20 - 23.
- 周胜元, 杨洪涛. 杨洪涛治疗血尿的经验举要. 辽宁中医杂志 2008 35(1): 29 - 30.
- 任现纸, 汪受传, 瞿文生. 水蛭治疗系膜增生性肾小球肾炎的探讨. 辽宁中医杂志 2015 32(3): 244.
- 王海燕. 肾脏病学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 559.
- Saito T. Abnormal lipid metabolism and renal disorders. Tohoku J Exp Med 1997 181(3): 321.

(收稿: 2018 - 10 - 14 修回: 2018 - 11 - 17)



作者·编者·读者

电子邮件投稿注意事项

为了加快本刊时效性,欢迎广大读者通过电子邮件投稿。本刊邮箱地址: sx7965258@126.com。作者通过电子邮件投稿后请注意以下事项: ① 邮寄单位证明材料 1 份,注明有无一稿两投、有无署名争议、是否涉及保密等内容; ② 邮寄纸质稿件 1 份,以小 4 号字、1.5 倍行距, A4 纸打印; ③ 请邮寄审稿费人民币 50 元整; ④ 请留详细联系电话,以便有关稿件事宜及时与您联系。此外,请经常查收您的邮箱,以便第一时间获取稿件回执以及稿件处理等相关信息。

本刊编辑部