

肝移植并免疫抑制剂联合用药后 人血清差异蛋白质的鉴定

李彦¹, 刘锋², 王鸿丽², 梁艳¹, 刘煜³, 杨松成², 何昆²

(1. 武警总医院药剂科, 北京 100039; 2. 国家生物医学分析中心, 北京 100850; 3. 武警总医院肝脏移植研究所, 北京 100039)

摘要:建立了基于质谱技术的应用免疫抑制剂肝移植后人血清中差异表达蛋白质的分析方法。肝移植前后的人血清用双向凝胶电泳分离, 硝酸银染色, 选取的差异蛋白质斑点用表面活性剂 Rapigest SF 变性和胰蛋白酶进行胶内酶解后, 采用纳升超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(nanoUPLC-ESI-MS/MS)进行鉴定。本实验明确鉴定了9个显著差异表达的蛋白质斑点, 对应8个不同的蛋白质, 所发现的差异蛋白质多与免疫调节和肝病有关, 可为深入研究肝移植术后免疫抑制剂抗排斥作用的分子机理提供线索。

关键词:肝移植; 血清; 免疫抑制剂; 纳升超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(nanoUPLC-ESI-MS/MS)

中图分类号: O 657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2015)01-0029-04

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2014.0056

Identification of the Differentially Expressed Proteins in Human Serum after Liver Transplantation and Immunosuppressant Combination Therapy

LI Yan¹, LIU Feng², WANG Hong-li², LIANG Yan¹, LIU Yu³,
YANG Song-cheng², HE Kun²

(1. Department of Pharmacy, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China; 3. Institute of Liver Transplantation, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: The mass spectrometry method was established for analysis of differentially expressed protein in human serum after liver transplantation with immunosuppressive agent. The proteins in serum before and after liver transplantation were separated by two-dimensional gel electrophoresis with silver staining, the differentially expressed proteins on the gel were digested with surfactant Rapigest SF and trypsin and then identified by nanoUPLC-ESI-MS/MS. In the experiment, 9 differentially expressed protein spots were identified clearly, corresponding to 8 different proteins. It was found that differentially expressed proteins are mostly related to immune regulation and liver dis-

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-06-23

基金项目: 武警总医院二类课题(wz2011019)资助

作者简介: 李彦(1965—), 女, 副主任药师, 从事药剂和临床药学研究。E-mail: liyanbjing@126.com

通信作者: 何昆(1973—), 男, 副研究员, 从事蛋白质组学与细胞生物学研究。E-mail: hk@proteomics.cn

网络出版时间: 2014-12-02; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7538/zpxb.youxian.2014.0056.html>

ease, and it may provide clues for the in-depth study the anti-rejection effect of immunosuppressive agent after liver transplantation.

Key words: liver transplantation; serum; immunosuppressive agent; nanoUPLC-ESI-MS/MS

肝脏移植术(liver transplantation)后如何减少免疫排斥反应等并发症,如何选择有效的治疗方法是目前肝移植领域中的重点问题^[1-2]。免疫抑制剂 FK506 可用于治疗器官移植术后,其他免疫抑制药物无法控制的移植排斥反应,已成为临床抗排斥反应的首选药物,常与骁悉和激素联合治疗术后的抗排斥反应,但其体内作用机制还在研究中。近几年,蛋白质组学技术在发现药物靶点、阐明药物作用机理等方面发挥了极大的优势^[3-4],但还未见免疫抑制剂在肝移植后抗排斥作用的蛋白质组学方面的报道。本研究利用纳升超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(NanoUPLC-ESI-MS/MS)技术对二维凝胶电泳分离的肝移植前和移植后,服用免疫抑制剂治疗表达显著的差异蛋白质斑点硝酸银染色后进行鉴定,以期从蛋白质组学角度探索 FK506 联合用药抗排斥反应的作用机制提供线索。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Synapt G2 质谱仪(nanoUPLC-ESI-MS/MS), Rapigest SF;美国 Waters 公司产品;经修饰的测序级胰蛋白酶(Trypsin);德国 Roche 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)等;美国 Sigma 公司产品。

1.2 样品

5 例移植前和移植后 24 h、10 d、30 d、90 d、180 d 的血清样品:来自武警总医院肝移植研究所的乙肝肝硬化肝癌移植病人,年龄 27~65 岁。移植后采用三联用药,即 FK506+骁悉+激素,3 个月时停用激素,FK506 在 3 个月内浓度为 8~10 $\mu\text{g/L}$,3~6 个月为 6~8 $\mu\text{g/L}$ 。

1.3 实验方法

1.3.1 传统胶内酶解方法^[5] 从双向电泳分离的银染色凝胶中切取差异蛋白质斑点,利用 30 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -100 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 脱色液(1:1,V/V)完全脱色,再用 10 mmol/L DTT 和 55 mmol/L IAA 进行还原和烷基化,然后加入 0.01 g/L 胰蛋白酶液进行酶解,

37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,分别用 5%TFA、2.5%TFA 与 ACN 溶液(1:1,V/V)和 ACN,于 37 $^\circ\text{C}$ 孵温 1 h 后,提取肽段,真空离心干燥。

1.3.2 加入表面活性剂的酶解方法^[6] 脱色后,用 10 mmol/L DTT 和 55 mmol/L IAA 进行还原和烷基化,加入 0.01 g/L 胰蛋白酶液和 0.03% Rapigest SF 进行酶解,于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,肽段提取方法同传统方法。

1.3.3 质谱分析和数据库检索 用 1%甲酸溶解样品,进样 5 μL 。富集柱:Symmetry C18(180 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$);分析柱:nano Acquity UPLC 超高效液相色谱键合乙烷杂颗粒柱 BEH C18(75 $\mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 1.7 \mu\text{m}$);柱温度 35 $^\circ\text{C}$;流速 200 nL/min;流动相:含 0.1%甲酸的水溶液(A)和含 0.1%甲酸的乙腈(B)。

纳升电喷雾正离子数据采集模式:DDA 方式,每次扫描 2 个强度最高的离子进行串联质谱分析;毛细管电压 2 500 V;锥孔电压 35 V;离子源温度 90 $^\circ\text{C}$;采集范围: m/z 350~1 600(一级质谱), m/z 50~2 000(二级质谱)。通过数据库 Mascot 检索。

2 实验结果

2.1 传统酶解方法和加入表面活性剂变性酶解效率的比较

从凝胶上取同等量标准蛋白 BSA 条带,分成 2 组,分别用传统酶解方法和加入表面活性剂 Rapigest SF 酶解方法胶内酶解后进行 nano UPLC-ESI-MS/MS 分析,利用部分肽段测序进行 Mascot 数据库检索,结果列于表 1。结果显示,加入 Rapigest SF 酶解方法的匹配肽段数、氨基酸覆盖率和检索分值比传统方法分别提高了约 40%、30%、65%。因此,本研究的后续实验均采用加入表面活性剂的酶解方法。

2.2 差异蛋白质点的 LC-ESI-MS/MS 鉴定及数据库检索

凝胶上的表达差异蛋白质斑点,经 nano UPLC-ESI-MS/MS 分析和数据库检索,获得

差异蛋白质信息,结果列于表2。从9个差异蛋白质点鉴定出8个有意义的蛋白质,质谱的质量偏差均小于 1×10^{-6} 。其中,蛋白质点487

为表达下调蛋白,其余均为表达上调蛋白,点576和578鉴定为同一蛋白质 haptoglobin Hp2,详细信息示于图1。

表1 两种酶解方法的LC-ESI-MS/MS分析结果比较

Table 1 The comparison of two kinds of digestion methods

方法	匹配肽段数	氨基酸覆盖率/%	检索分值/%
传统酶解方法	14.66±2.88	41±7.81	621.33±152.07
表面活性剂变性酶解方法	20.56±4.04	54±9.84	1 015.66±251.88

表2 nanoUPLC-ESI-MS/MS鉴定差异表达蛋白质

Table 2 Identification of differentially expressed protein spots by nanoUPLC-ESI-MS/MS

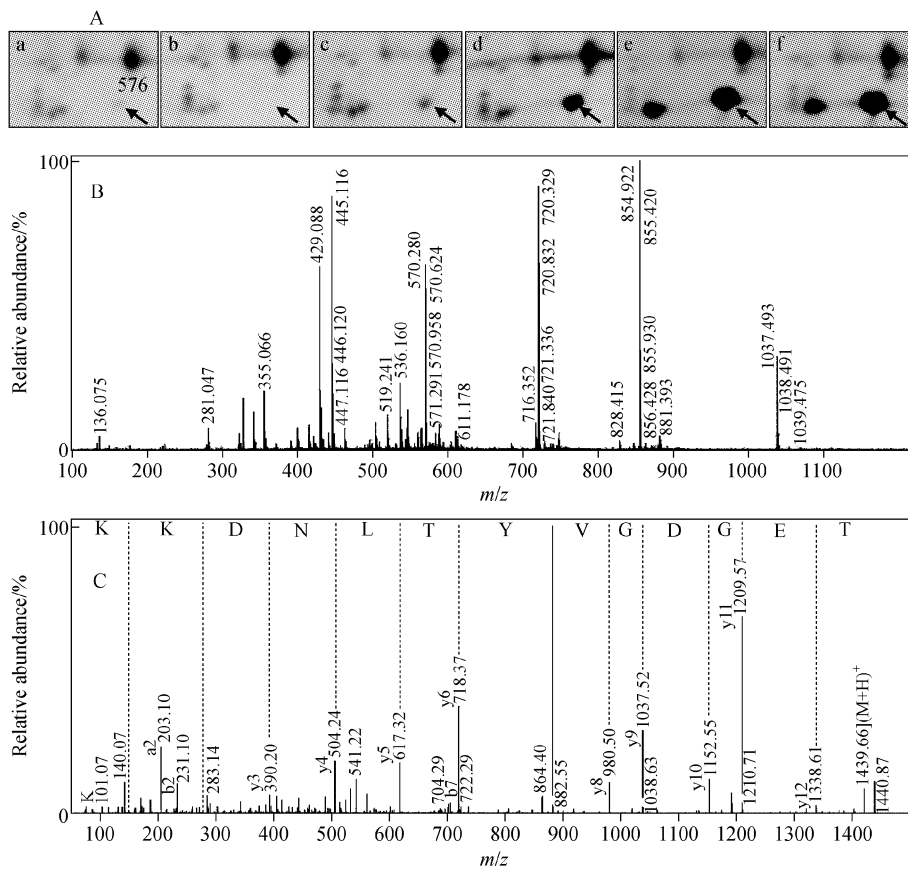
点编号	序列登录号	蛋白质名称	相对分子质量	等电点	匹配分值*	匹配肽段覆盖率/%
576	gi 223976	haptoglobin Hp2 结合珠蛋白 Hp2 型	42 344	6.23	781	12
578	gi 223976	haptoglobin Hp2 结合珠蛋白 Hp2 型	42 344	6.23	385	18
599	gi 223373	α -1-microglobulin α 1 微球蛋白	20 421	5.84	146	14
624	gi 259352	serum amyloid A 血清淀粉样蛋白	14 854	9.27	232	39
946	gi 229188	fibrinopeptide B 纤维蛋白肽 B	12 891	6.17	1 570	21
415	gi 32189392	peroxiredoxin-2 过氧化物还原酶 2	22 049	5.66	301	42
487	gi 78101271	complement component C3 补体成分 C3	40 204	4.79	424	37
397	gi 55743122	retinol-binding protein4 视黄醇结合蛋白 4	23 371	5.76	218	27
236	gi 38026	Zn- α 2-glycoprotein 锌 α 2 糖蛋白	34 714	5.71	305	30

注: * 蛋白质匹配分值>38分有意义($P<0.05$)

2.3 讨论

本实验利用 LC-MS/MS 技术建立了免疫抑制剂 FK506 联合用药在肝移植后人血清差异表达蛋白质的鉴定方法。血清中高丰度蛋白质的浓度与低丰度蛋白质的浓度比值可达 109 倍,这使得许多低丰度蛋白在电泳中被掩盖。为获得更多蛋白质点信息,采用灵敏度低于 1 ng 的硝酸银染色。而相对低的蛋白质浓度则直接影响蛋白质鉴定的灵敏度和可靠性。为提高银染凝胶中低丰度蛋白质的鉴定率,本研究使用酸性不稳定表面活性剂 Rapigest SF 来提高蛋白溶解率,浓度小于 0.1% 的 Rapigest SF 完全不影响胰蛋白酶的活性,且与质谱兼容。结果表明,加入表面活性剂能够明显提高银染色后蛋白质斑点的肽段提取率和氨基酸序列覆盖率,同时酶解时间可由原来的过夜缩短至

2 h。此方法与 MALDI-TOF MS 兼容性较差,不建议使用。鉴定的 8 个蛋白质多与免疫反应或肝病有关,如: Haptoglobin (Hp, 结合珠蛋白) 具有结合血红蛋白、促进血管生成和参与免疫反应等功能,体内结合珠蛋白数量明显的变化,有助于对肝脏疾病的诊断,判断疾病的预后^[7-8]。有研究报道, Hp 通过激活天然免疫能增强小鼠急性移植排斥反应^[9]。Retinol-binding protein4 (RBP4, 视黄醇结合蛋白) 是体内视黄醇从肝脏转运到靶组织的特异转载蛋白,肝功能受损, RBP 表达会明显下调,血清中 RBP 的表达水平可以帮助评价肝脏功能的损害程度^[10]。鉴定的这些差异点将为从蛋白质组学角度深入研究移植后,免疫抑制剂 FK506 联合用药抗排斥反应的作用机制、临床合理选择和使用免疫抑制剂等提供线索。



注:A. 差异蛋白质斑点 576 的局部放大图(a. 肝移植前; b. 肝移植后 24 h; c. 肝移植后 10 d; d. 肝移植后 30 d; e. 肝移植后 90 d; f. 肝移植后 180 d); B. 点 576 的一级质谱图; C. 肽段 m/z 1 438.657 0 的串联质谱测序图

图 1 nanoUPLC-ESI-MS/MS 分析蛋白质斑点 576

Fig. 1 The analysis of No. 576 protein spot by nanoUPLC-ESI-MS/MS

参考文献:

- [1] CZAJA A J. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(9): 2 248-2 266.
- [2] CHINEN J, BUCKLEY R H. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2): S324-S335.
- [3] SAVINO R, PADUANO S, PREIANÒ M, et al. The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 13 926-13 948.
- [4] MIAO Q, ZHANG C C, KAST J. Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2012, 9(3): 281-291.
- [5] SHEVC HENKO A, TOMAS H, HAVLIS J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2 856-2 860.
- [6] MBEUNKUI F, GOSHE M B. Investigation of so-lubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MS^E [J]. *Proteomics*, 2011, 11(5): 898-911.
- [7] SARVARI J, MOJTAHEDI Z, KURAMITSU Y, et al. Differential expression of haptoglobin isoforms in chronic active hepatitis, cirrhosis and HCC related to HBV infection[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(5): 871-877.
- [8] WILLIAMS R, SPEYER B E, BILLING B H. Serum haptoglobin in liver disease [J]. *Gut*, 1961, 2(4): 297-303.
- [9] SHEN H, SONG Y, COLANGELO C M, et al. Haptoglobin activates innate immunity to enhance acute transplant rejection in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 383-387.
- [10] NOBILI V, ALKHOURI N, ALISI A, et al. Retinol-binding protein 4: A promising circulating marker of liver damage in pediatric nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7(5): 575-579.