

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000006

大鼠同种异体肾移植急性排斥反应蛋白质组学研究

陈 刚, 吴小候

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨大鼠肾移植术后移植肾急性排斥反应蛋白质组学变化,以期寻找新的生物学标志物。**方法:**实验组以近交系雄性 F344 和 Lewis 大鼠分别作为供体和受体,共 8 对。对照组以近交系雄性 F344 大鼠作为供体和受体,共 8 对。分别建立大鼠肾移植模型,术后 7 d 获取移植肾组织,行双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)分析,筛选并鉴定差异表达蛋白。**结果:**实验组和对照组蛋白斑点数量分别为 (554.0 ± 34.0) 和 (542.0 ± 21.0) 个。实验组与对照组比较,37 个蛋白点的表达水平发生显著变化,其中 29 个点得到较满意的肽质量指纹图,在 SwissProt 数据库中进行搜索、鉴定出 6 个差异的蛋白。**结论:**本实验通过比较蛋白质组学方法成功筛选并鉴定出 6 个可能与大鼠移植肾急性排斥反应有关的差异表达蛋白,并可能成为移植肾急性排斥新的生物学标志物。

【关键词】大鼠;肾移植;急性排斥反应;蛋白质组学

【中图分类号】R669.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-06-30

Proteome analysis of renal allograft acute rejection in rats

Chen Gang, Wu Xiaohou

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To analyze changes of protein expression in rat transplant kidney by proteomics technique and to search and identify differential expression proteins which are related with acute rejection. **Methods:** All transplant rats were divided into two groups: experimental group(F344→Lewis) and control group(F344→F344). Rat models of allogene renal transplantation were established respectively and allograft specimens were obtained on 7 d post the transplantation. Total proteins of rat transplant renal tissues were separated by two-dimensional gel electrophoresis(2-DE). Differential expression proteins were analyzed and then identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS). **Results:** Averages protein spots in experimental group and control group were 554.0 ± 34.0 and 542.0 ± 21.0 respectively. Compared with those in control group, 37 differentially expressed proteins were screened in experimental group, of which 29 were identified by peptide mass fingerprint and 6 were founded by bioinformatics in SwissProt data base. **Conclusion:** Six differential expression proteins which may correlate with acute rejection of renal allograft are identified by comparative proteomics and might become possible biological marker of acute rejection of renal allograft.

【Key words】 rats; renal transplantation; acute rejection; proteomics

肾移植是目前治疗终末期肾脏疾病最有效的方法。然而,移植肾排斥反应仍然是移植专业医生所面临的主要临床问题,是影响移植肾长期存活的关键,但其确切的发生机制尚不完全清楚。肾移植术后急性排斥反应是肾移植的主要并发症,是影响

移植肾功能的主要因素,也是导致慢性排斥反应的重要危险因素^[1]。穿刺活检是目前移植肾急性排斥反应的标准诊断操作,但由于其有创性和并发症风险,将穿刺活检作为常规监控是不切实际的。因此临床需要寻求新的检测方法和新的生物学标志物。

目前蛋白质组学技术已被应用于各种疾病病因的研究。生物标志物的发现和验证是目前蛋白质组学研究的主要应用,其目的是为了提高疾病的诊断、治疗监测和判断预后^[2]。通过前期实验,已经成功建立了相对简单且稳定的大鼠肾移植急性排斥

作者介绍:陈 刚, Email: chengang127@163.com,

研究方向:肾移植临床与基础。

基金项目:重庆市卫生局基金资助项目(编号:2010-2-042);重庆医科大学校级课题基金资助项目(编号:XBYB2008001)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000006.html>

反应模型。在此基础之上,本实验利用双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术分析了大鼠同基因移植组和同种异基因移植组肾移植术后蛋白质差异表达情况,并对差异蛋白质与急性排斥反应关系进行了探讨,以期寻找移植肾急性排斥反应的相关生物学标记物。

1 材料与方法

1.1 建立大鼠肾移植急性排斥反应模型

本实验所用大鼠为 8~10 周龄近交系雄性 Lewis 和 F344 大鼠,体质量 180~200 g,在重庆医科大学实验中心清洁饲养。术前禁食 12 h,但自由饮水。分 2 组:对照组(同基因移植组, $n=8$,供、受体均为近交系雄性 F344 大鼠);实验组(异基因移植组, $n=8$,供体为近交系雄性 F344 大鼠,受体为近交系雄性 Lewis 大鼠)。采用氯胺酮腹腔麻醉,供体下腔静脉与受体肾静脉端端吻合,供体腹主动脉与受体腹主动脉侧侧吻合,进行左肾原位肾移植^[9]。从手术当天开始,受体腹腔注射青霉素 20 万 U,连续 3 d。分组喂养,观察肾移植大鼠的食欲、活动、毛发光洁度及不良反应等情况。

1.2 样本获取及组织学分析

术后 7 d 获取移植肾标本。部分标本常规处理,HE 染色,行形态学观察,病理诊断标准采用 Banff97 分级诊断标准。部分标本-80℃保存备用。

1.3 蛋白样本含量测定和双向凝胶电泳

从对照组和实验组中分别选取 5 份重量相等的受体标本各自混合。加入 1 ml 裂解液(8 mol/L 尿素, Urea; 4% 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸, CHAPS; 30 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, Tris base), 碾磨 5 min, 离心 20 min, 收集上清液分装每管 200 μ l, 部分冷存备用。用 Bradford 法进行样品蛋白定量。2-DE 采用 17 cm 胶条(pH 3~10), 第一向为固相 pH 梯度等电聚焦。上样量为 300 μ g 总蛋白, 总聚焦时间电压为 60 000 Vh。等电聚焦结束后依次加入平衡缓冲液 I 和 II, 分别缓慢平衡 15 min。平衡结束后进行第二向垂直平板十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。凝胶染色用酸性硝酸银法。用专用图像扫描仪进行对凝胶透射扫描。用 PDQuest 8.1.0 软件分析电泳图, 蛋白点的 Mr 和 pI 通过 Bio-Rad 的 2-DE 内参和外标 Marker 蛋白校正后计算得到。这一过程包括:背景条纹部分消减;归一化处理;手工和自动取点相结合;配比凝胶图谱。每个样品进行 3 次电泳以保证重复性。光密度总值相差 3 倍及 3 倍以上判定为有明显差异表达。

1.4 胶内酶解

①定位:根据双向电泳图谱分析确定明显差异表达蛋白点。②切点:微量加液器枪头(消毒)头端减去 0.5 cm, 直径与蛋白质点大小相应, 切胶、涡旋洗涤 1 min $\times$ 3 次。③脱色:加现配脱色液($K_3Fe(CN)_6$ 、 $Na_2S_2O_3$ 、MilliQ 水) 50 μ l, 震荡, 直至蛋白质点无色透明。加 MilliQ 水洗 3 遍至透明。④脱水:加干燥脱水液(1 ml 100% ACN+0.25 ml 200 mmol/L NH_4HCO_3 +0.75 ml MilliQ 水) 50 μ l, 静置 20 min, 去上清, 冷冻干燥 1 h。⑤酶解:加 10 ng/ μ l 胰酶溶液 20 μ l, 4℃冰箱吸胀 1 h。弃多余胰酶液, 加入 10% CAN/40 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 30 μ l, 在 37℃水浴中酶解 24 h。⑥萃取肽段:加入 30 μ l 萃取液覆盖胶粒, 37℃水浴酶解 1 h $\times$ 2。吸去萃取液, 按编号合并到新的 EP 管中, 冷冻干燥 2 h。

1.5 质谱分析

每管加 0.1% TFA 基质饱和溶液 30 μ l, 涡旋震荡, 离心 3 min, 加入 2 μ l 基质液 II, 涡旋震荡, 快速点样, 室温自然干燥 8 h。质谱分析(ABI 公司 voyagerDE-PRO MALDI-TOF 质谱分析仪), 参数设置:线形模式, 正离子谱测定, 激光波长 337 nm, 离子源加速电压 20 KV, 脉冲宽度 3 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 离子延迟时间 100 ns, 激光强度为 850~1200 内部单位, 质谱信号单次扫描累加 400 次, 外标采用 Mixture 2 标准液校正。

1.6 数据库搜索

采用 Mascot 软件在 Swissprot 数据库进行搜索。参数设置:肽质指纹图中的肽片段质量控制在 800~4000 Da 范围, pI 的误差为 ± 0.15 pH, 表观分子量的误差为 $\pm 20\%$, 漏切位点数为 1 个, 物种选择 Rattus, 同时肽质量类型根据校正方式选择平均分子质量或者单同位素质量, 最少匹配肽段数为 5, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸化。查询结果蛋白质得分 > 51, 予以确认。

2 结果

2.1 组织学检查

实验组在术后 7 d 有比较明显急排表现。光镜:在血管周围比较明显的弥漫性炎症细胞浸润, 以淋巴细胞多见;同时可见肾小管上皮细胞变性、坏死、脱落;伴出血或血栓形成, 可见动脉壁纤维素变性、坏死。对照组可见肾间质轻度水肿, 炎性细胞浸润少见, 肾小管上皮细胞无明显变性、坏死、脱落, 不伴出血或血栓。

2.2 双向电泳分析

用 PDQuest 8.1.0 软件分析双向凝胶电泳图谱。双向电泳图谱重复性高, 符合比较差异蛋白的要求。结果提示蛋白质斑点分子质量在 10~100 kD、分布在 pH3~10 范围内, 实验组和对照组蛋白点分别为 (554.0 ± 34.0) 和 (542.0 ± 21.0) 个(图 1、图 2)。光密度总值分析:与对照组比较, 实验组有 37 个蛋白点的表达水平发生显著变化, 其中 24 个蛋白斑点表达水平明显上调, 而 13 个蛋白点表达水平是明显下调的。

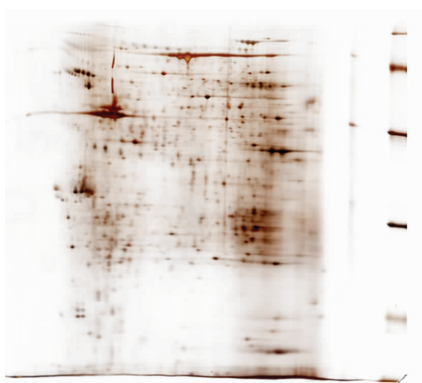


图 1 实验组术后 7 d 蛋白双向电泳图谱

Fig.1 2-DE image of experimental group on 7 d post the operation

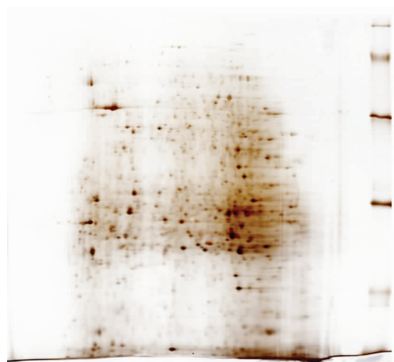


图 2 对照组术后 7 d 蛋白双向电泳图谱

Fig.2 2-DE image of control group on 7 d post the operation

2.3 肽指纹图谱分析

对 37 个差异蛋白点进行原位酶解和 MALDI-TOF-MS 肽指纹图分析,其中 29 个点获得较满意的肽质量指纹图(图 3 为点 18 的肽指纹图)。对所获得较满意肽质量指纹图采用 Mascot 软件在 SwissProt 数据库中进行搜索,同时结合相应各蛋白质点的等电点、分子量、差异表达水平、肽段匹配率和序列覆盖率等相关参数进行综合分析,以蛋白得分大于 51 分为有明显差异。结果成功搜索并鉴定出 Tropomyosin beta chain, Protein disulfide-isomerase A3, ADP-ribosylation factor 5, Alpha-1-antiproteinase, cyclin-dependent kinase 6 和 NIMA-related kinase2 共 6 个可能与大鼠移植肾急排相关的差异表达蛋白(表 1)。

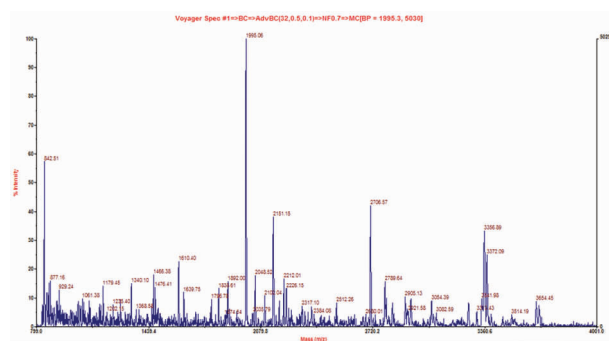


图 3 蛋白点 18 的肽指纹图谱

Fig.3 MALDI-TOF mass spectrum of 18 spot

3 讨论

免疫损伤仍然是影响移植肾长期存活的关键^[4]。急排仍然是肾移植一个重要并发症,同时也是慢性移植肾肾病的主要免疫危险因素^[1]。受体通过直接或间接的途径对移植物组织相容性抗原进行快速识别,活化 T 细胞和 B 细胞及由此产生的细胞和抗体介导免疫反应,导致移植物众多结构组成部分的免疫损伤^[5]。受体基因差异表达的生物学功能包括免疫信号转导、细胞骨架重组、细胞凋亡、细胞因子激活^[6]。然而基因的表达变化只能对由移植引发的生物学事件提供部分解释,因为其所介导的蛋白质不一定发生平行性变化。因此需要详细了解移植肾组织蛋白质可能的表达和功能的变化^[7]。近年蛋白质组学开始被应用到器官移植的排斥反应机制及相关生物标记物的研究等领域。尿蛋白质组学技术已应用于肾移植排斥反应基础研究领域^[8]。然而,尿液是复杂的混合物,是血液免疫反应发生后的结果,且尿液 pH 值可能导致蛋白质降解。有报道使用蛋白质组学技术检测肾移植急排的血清生物标志物。然而在血清蛋白的水平可以准确找到一些具体的蛋白表达变化之前可能肾功能已严重受损。虽然移植肾穿刺活检是当前检测和确诊急性排斥反应

表 1 实验组移植肾组织中差异表达的蛋白

Tab.1 Different protein expression of experimental group post the transplantation

序号	蛋白质名称	NCBI登录号	分子量(D)	等电点	序列覆盖率(%)	差异表达水平	蛋白质得分
1	Tropomyosin beta chain	500450	32 931	4.66	23	5.09	63
2	Protein disulfide-isomerase A3	29468	57 044	5.88	36	3.53	120
3	ADP-ribosylation factor 5	79117	20 631	6.30	48	4.54	62
4	Alpha-1-antiproteinase	24648	46 278	5.70	25	3.41	77
5	cyclin-dependent kinase 6	114483	36 939	6.00	29	-4.74	53
6	NIMA-related kinase2	819641	35 094	6.30	31	-5.29	70

标准方法,但由于其有创性、并发症风险和成本等问题将移植肾穿刺活检作为日常监控是不切实际的^[9]。因此临床需要寻求无创、快速的诊断方法和新的生物学标志物。大鼠的基因组与人类高度相似,且利用大鼠模型可以克服人肾穿刺活检组织的数量和可获得性方面的局限性。本研究利用蛋白质组学技术分析了大鼠同基因移植组和异基因移植组肾移植术后蛋白质差异表达情况,探讨差异蛋白与急性排斥反应的关系,发现了一些可能与大鼠移植肾急排相关的生物标记物。

在本实验研究中,恰当上样量是 2-DE 成功的关键之一。本研究分别以上样量 300 μg 和 500 μg 进行双向电泳。结果:上样量为 500 μg 效果不太理想,部分蛋白质点过于集中,出现较明显的干扰条纹;而上样量 300 μg 图谱整体布局较好,蛋白质点大多比较清晰,未出现较明显的横向和纵向条纹干扰。因此,最终选择上样量为 300 μg 。2-DE 结果实验组(急性排斥反应组)24 个蛋白点表达水平明显上调,而 13 个蛋白点表达水平明显下调。经质谱分析,其中 29 个蛋白斑点获得较满意的肽指纹图谱,在 SwissProt 数据库中进行搜索,成功搜索并鉴定出 Tropomyosin beta chain,Protein disulfide isomerase A3,ADP-ribosylation factor 5,Alpha-1-antitrypsin, cyclin-dependent kinase 6 和 NIMA-related kinase 2 等 6 个可能与大鼠移植肾急排相关的差异表达蛋白。由于 2-DE 或质谱分析的技术敏感性限制,部分蛋白质没有被分离和鉴定,也可能存在没有被分离和鉴定的新蛋白^[10]。

Tropomyosin beta chain(TM β)属于 TM 家族。本实验发现大鼠肾移植术后急排发生时 TM β 蛋白表达上调,这可能与调节细胞能动性、阻止细胞恶性变化、锚定细胞骨架结构等生物学活性有关^[11-12]。有研究证实 TM β 显示出锚定细胞骨架、促进肿瘤细胞凋亡生物学活性。

Protein disulfide isomerase A3(PDIA3)属于蛋白质二硫键异构酶家族。本实验 2-DE 显示 PDIA3 的表达水平在急排组明显上调。结合已知的 PDIA3 生物学功能,可能的机理是:(1)PDIA3 本身具有免疫原性,是一种通过调控肌钙网蛋白表达来调控肿瘤细胞死亡免疫原性的关键蛋白^[13],并直接参与了 MHC-I 分子形成^[14]。(3)急排发生时,以淋巴细胞为主的各种炎性细胞的浸润,并释放多种炎症因子,

加之缺血缺氧等多种损害因素的联合作用导致热休克反应的发生,合成包括 PDIA3 在内的多种热休克蛋白^[15-16]。

ADP-ribosylation factor 5(ARF5)是 ADP-核糖基化因子(ADP-ribosylation factor,ARF)家族的一员。本研究发现实验组 ARF5 表达明显上调。这可能与发生急排时免疫损伤状态下,ARF5 作为小 G 蛋白之一,在细胞凋亡与坏死的细胞骨架重组中可能执行重要功能^[17],可能在急排发生时的细胞骨架重建中发挥重要作用。在急排发生时,细胞处于免疫应激状态,高尔基体功能增强,囊泡转运发生变化。ARF5 可能参与从高尔基体到内质网的逆转运^[18]。

α 1-抗胰蛋白酶(Alpha-1-antitrypsin,A1AT)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。本实验经比较蛋白质组学发现:实验组 A1AT 表达明显上调。结合已知的 A1AT 生物学功能,急排时细胞处于免疫损伤状态,作为急性时相蛋白,A1AT 表达可能上调^[19],引起肾小球滤过率下降,从而导致移植肾损伤^[20]。加之肾移植不可避免存在缺血再灌注损伤,缺血再灌注损伤是移植肾排斥反应主要的非免疫因素^[21-22],这一急性病变也可能导致 A1AT 表达上调。

cyclin-dependent kinase 6 是细胞周期蛋白依赖性激酶的一种。本实验发现实验组 CDK6 表达明显下调,这可能与发生急排时细胞凋亡增加有关。CDK6 的下调或缺失使得细胞周期内源性调控受阻,延迟有丝分裂早期反应^[23-24],使细胞停滞在 G1 期,起到抑制细胞分裂的作用,从而诱导细胞凋亡。

Nek2 蛋白(NIMA-related kinase2)是细胞循环调节激酶。本实验发现 Nek2 在实验组表达明显下调。结合已知的 Nek2 生物学功能,这可能与发生急排时免疫损伤导致细胞凋亡与坏死增加有关。Nek2 蛋白主要在细胞减数分裂阶段表达,与减数分裂的同源染色体分离有关^[25-26]。Nek2 的下调或缺失使得细胞周期调节受影响,有丝分裂调节受阻,抑制细胞分裂,进而诱导细胞凋亡。

综上,本实验结果可能有助于发现一些新的与肾移植急性排斥反应相关的生物标记物。

参 考 文 献

- [1] Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, et al. New mechanisms and recent insights in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI)[J]. G I-

tal Nefrol, 2012, 29(5): 535-547.

[2] Bai S, Liu S, Guo X, et al. Proteome analysis of haptoglobin in cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(3): 1619-1625.

[3] 陈刚, 唐伟, 唐亚雄, 等. PDIA3 在大鼠同种异体移植肾组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 365-367.

[4] Liu Z, Yang X, Fu Y, et al. Proteomic analysis of early germs with high-oil and normal inbred lines in maize[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(4): 813-821.

[5] Sacks S, Lee Q, Wong W, et al. The role of complement in regulating the alloresponse[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2009, 14(1): 10-15.

[6] Gunther OP, Balshaw RF, Scherer A, et al. Functional genomic analysis of peripheral blood during early acute renal allograft rejection[J]. Transplantation, 2009, 88(7): 942-951.

[7] Bermudez-Crespo J, López JL. A better understanding of molecular mechanisms underlying human disease[J]. Proteomics Clin Appl, 2007, 1(9): 983-1003.

[8] Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns[J]. Transplantation, 2008, 86(2): 192-199.

[9] Chen G, Huang JB, Mi J, et al. Characterization of acute renal allograft rejection by proteomic analysis of renal tissue in rat[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 1315-1322.

[10] Azarpira N, Aghdai MH, Raisjalali GA, et al. Influence of recipient and donor IL-10, TNFA and INFG genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(6): 1621-1626.

[11] Zhao L, Liu L, Wang S, et al. Differential proteomic analysis of human colorectal carcinoma cell lines metastasis associated proteins[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(10): 771-782.

[12] Obeid M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin[J]. Immunology, 2008, 181(4): 2533-2543.

[13] Vigneron N, Peaper DR, Leonhardt RM, et al. Functional significance of tapasin membrane association and disulfide linkage to ERp57 in MHC class I presentation[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(9): 2371-2376.

[14] McNulty S, Colaco CA, Blandford LE, et al. Heat-shock proteins as

dendritic cell-targeting vaccines-getting warmer[J]. Immunology, 2013, 139(4): 407-415.

[15] Chen G, Mi J, Xiao MZ, et al. PDIA3 mRNA expression and IL-2, IL-4, IL-6, and CRP levels of acute kidney allograft rejection in rat[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(5): 5233-5238.

[16] Anders N, Jurgens G. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(21): 3433-3445.

[17] Shiyuan H, Anette B, Michel S, et al. Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid[J]. Purinergic Signal, 2009, 5(3): 369-383.

[18] Ye GJ, Oshins RA, Rouhani FN, et al. Development, validation and use of ELISA for antibodies to human alpha-1 antitrypsin[J]. J Immunol Methods, 2013, 388(1-2): 18-24.

[19] Malard V, Gaillard JC, Bérenguer F, et al. Urine proteomics profiling of uranium nephrotoxicity[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794(6): 882-891.

[20] Chen G, Fu YR, Wu XH. Protective Effect of salvia miltiorrhiza extract against renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats[J]. Molecules, 2012, 17(2): 1191-1202.

[21] Chen G, Mi J, Wu X, et al. Structural features and bioactivities of the chitosan[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(4): 543-547.

[22] Whiteway SL, Harris PS, Venkataraman S, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 6 suppresses cell proliferation and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells[J]. J Neurooncol, 2013, 111(2): 113-121.

[23] Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, et al. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(6): 476-487.

[24] Park J, Rhee K. NEK2 phosphorylation antagonizes the microtubule stabilizing activity of centrobin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 431(2): 302-308.

[25] Isaac W, Donna-Marie C, Joanne EB, et al. Insights into the conformational variability and regulation of human Nek2 kinase[J]. Mol Biol, 2009, 386(2): 476-485.

(责任编辑:唐宗顺)

欢迎订阅:敬请赐稿!