

角膜移植免疫排斥反应相关泪液低分子量蛋白质分析

周瑾¹, 陆晓和², 项道满¹

作者单位:¹(510120)中国广东省广州市妇女儿童医疗中心眼科;²(510282)中国广东省广州市,南方医科大学附属珠江医院眼科

作者简介:周瑾,女,博士后,研究方向:角膜及眼表疾病。

通讯作者:陆晓和,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜及眼表疾病. jane5188@163.com;项道满,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:小儿眼病. xiangdm35@126.com

收稿日期:2012-05-14 修回日期:2012-07-02

Analysis of low molecular weight protein of corneal allograft rejection in tear

Jin Zhou¹, Xiao-He Lu², Dao-Man Xiang¹

¹Department of Ophthalmology, Guangzhou Woman and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China;

²Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xiao-He Lu. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. jane5188@163.com; Dao-Man Xiang. Department of Ophthalmology, Guangzhou Woman and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. xiangdm35@126.com

Received:2012-05-14 Accepted:2012-07-02

Abstract

• **AIM:** To test the difference of protein composition in tear between cornea transplantation immunological rejection rats and rats with no rejection by SELDI protein chip technology, and to find cornea transplantation immunological rejection associated protein and deduce the possible mechanisms of cornea transplantation immunological rejection.

• **METHODS:** To build homogeneity penetrability corneal transplantation rat model: The grafts of group I came from side-center and the suture tail remained about 1mm while grafts of group II came from center cornea and the suture remained as short as possible. Slit-lamp microscopy was used to observe the three indexes of cornea score in opacity, edema and new vessels from the 1st day after operation. The result data were as mean±SD and tested by independent-sample *t* test in SPSS 13.0 software. The difference was set at $P < 0.05$. The tears were collected at the 7th. Capture marker with WCX2 protein chip. Then find out the protein combination that can best distinguish the two group samples. Preliminary screening the marked proteins in Swiss-Prot and TrEMBL protein library.

• **RESULTS:** The 7th day post-operation was sample collection time. It is the time to distinguish the graft rejection group from non-rejection group. 108 proteins were marked in total in two groups, there are 11 kinds of proteins with classified value, among these 6 kinds got high classify value. The result of albumin search library result suggested that the related albumin maybe Neuropeptide Y, β -defensin 1, Glucagon, and Cortistatin-14.

• **CONCLUSION:** It is reliable to obtain proteomic profiles in tear for rat marker of cornea graft rejection using SELDI-TOF-MS with well reproducibility. The results suggest that neuropeptide and energy maybe play an important role in graft rejection.

• **KEYWORDS:** penetrating keratoplasty; corneal allograft rejection; proteome

Citation: Zhou J, Lu XH, Xiang DM. Analysis of low molecular weight protein of corneal allograft rejection in tear. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1447-1451

摘要

目的:利用蛋白芯片技术检测发生与未发生角膜移植排斥反应的大鼠泪液标志蛋白表达,筛选角膜移植排斥反应相关蛋白并分析其与角膜免疫排斥反应相关的可能机制。

方法:行大鼠右眼同种异体穿透性角膜移植, I组从角膜旁中心取植片,缝线保留长度约1mm,术后给予抗生素滴眼液; II组取角膜中心植片,缝线尽量剪短,术后给予环孢霉素A滴眼液;术后计算排斥反应系数。术后第7d采集泪液。弱阳离子交换芯片结合表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术筛选穿透性角膜移植大鼠血清中表达的免疫排斥反应相关的低相对分子质量差异蛋白,结合生物信息学方法初步分析可能的标志蛋白。

结果:术后第7d时 I组发生角膜移植排斥反应, II组没有发生;两组中共有108个蛋白质被标记,其中有分类价值的标志蛋白质有11种,相对分类价值较高的有6种,蛋白质搜库结果提示相关蛋白可能是下调蛋白: Pro-histogranin、胰高血糖素样肽1;上调蛋白: β -防御素2、细胞凋亡蛋白酶-3亚基、神经激肽A。

结论:应用 SELDI-TOF-MS 技术获得大鼠角膜移植后泪液标志蛋白表达图谱的实验方法稳定可行,提示我们在角膜的免疫排斥反应的后续研究中考考虑能量代谢、神经递质在角膜移植免疫排斥反应中的地位和作用。

关键词:穿透性角膜移植;角膜移植排斥;蛋白质组

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.06

引用:周瑾,陆晓和,项道满.角膜移植免疫排斥反应相关泪液低分子量蛋白质分析.国际眼科杂志 2012;12(8):1447-1451

0 引言

移植排斥是一多因素参与的复杂过程,是角膜移植术失败的主要原因,其影响因素具有广泛性和交叉性^[1]。泪液为角膜(主要是角膜上皮细胞)供氧,其中很多蛋白质成分为外分泌蛋白,受眼局部因素及全身状态的双重影响。在一些眼病或者全身疾病的研究中,已发现泪液有特征性的蛋白质成分变化。有研究表明:角膜移植术后,泪液中的IgG, sIgA 和乳铁蛋白(LF)规律变化曲线:当排斥反应发生时,IgG水平异常升高,LF水平呈下降趋势^[2]。目前对泪液的研究多采用常规的生化分析和ELISA等传统方法进行分析。对泪液中的低丰度蛋白的研究则由于样本量采集的受限鲜见报导。本实验采用蛋白质组学研究方法对穿透性角膜移植术后发生移植排斥反应的大鼠泪液中低分子量低丰度蛋白进行检测,分析差异表达谱,筛选角膜移植排斥反应相关蛋白并分析其与角膜免疫排斥反应相关的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠20只(供体),SD大鼠40只(受体),均为健康清洁级,雌雄兼用,体质量200~250g,2~3月龄,南方医科大学实验动物中心提供;眼科手术显微镜(美国Leica-M841型);裂隙灯显微镜(德国ZEISS);Axiotron研究型显微镜及显微摄影装置(德国ZEISS);激光解析离子化飞行时间质谱仪(美国Ciphergen公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与处理 SD大鼠随机平均分为对照组(I组)和CsA组(II组),每组20只,参照Williams等^[3]方法进行同种异体穿透性角膜移植手术;其中I组从角膜旁中心取植片,缝线保留长度约1mm;II组取角膜中心植片,缝线尽量剪短。术后所有受鼠术眼结膜下注射庆大霉素,隔日1次,每次2000U,共3次;2.5g/L氯霉素眼药水点眼,每日2次;5g/L托品酰胺滴眼液,每日1次,连用1wk。II组大鼠:术眼点10g/L CsA滴眼液,典必殊滴眼液每日2次,每次1滴。

1.2.2 临床观察 参照改良Holland等^[4]评分标准,以角膜混浊、水肿和新生血管3项评分之和为当日排斥反应指数(rejection value, RV),当RV≥6或者单项评分达到4时,即认定植片已经排斥。排除标准:手术因素造成感染、前房出血、前房消失或术后3d内发生严重角膜移植术物水肿、混浊及破坏,不归于角膜移植术后免疫排斥反应。

1.2.3 标本采集 术后第7d采集大鼠泪液:腹腔注射100mL/L水合氯醛溶液2mL/kg,牵拉待取眼下睑,特制聚乙烯塑料毛细管置于下穹隆部结膜囊内近小泪点处,利用其虹吸作用采泪25min,可得泪液标本约12~14μL。冻存于-80℃冰箱以备后用。

1.2.4 蛋白芯片检测及分析 将每组18例泪液(每组有2例泪液标本发生冻融,放弃)随机平均分为2组。取其中一组用于蛋白质决策树模型的建立:应用WCX2蛋白芯片捕获蛋白,蛋白质离子化后,用PBS IIC型蛋白质芯片阅读机对不同组泪液进行检测,获得各样本的蛋白指纹图谱。采用Ciphergen Biosystems公司的Ciphergen ProteinChip 3.0版本机带分析软件自动采集数据,采用Biomarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白质以基于最小Gini指标方法建立决策树模型,然后以10折交叉验证法(10-fold Cross-validation Estimates)进行决策树评估,找出区分两组样本能力最强的蛋白质组合;另外一组

标本盲法检测该模型的敏感性及其特异性;在Swiss-Prot和TrEMBL蛋白质库中对标志蛋白进行初步筛选。

统计学分析:动物模型部分所得观测数据以均数±标准差表示,利用SPSS 13.0软件包进行成组设计资料的t检验分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后第7d两组植片情况 术后第7d两组植片情况(图1):术后第7d各组角膜基质层均见植床有新生血管,可见虹膜水肿。I组对照组新生血管已经布满植片,角膜移植术物水肿、混浊;II组CsA治疗组前房反应较对照组轻,新生血管超过植片约1mm。

2.2 术后第7d角膜植片RV值 两组角膜移植术物在移植术后7d混浊、水肿、新生血管化及RV值临床评分比较差异有显著性(P=0.000,表1)。

2.3 蛋白芯片重复性分析 随机选一个泪液样本分析芯片重复性。处理样本后。点到同一芯片的8个点上,质谱测定,检测芯片阅读机及芯片内部重复性。结果显示,蛋白质荷比(M/Z)值3000~10000选取的5个蛋白质峰计算出的变异系数均小于20%,表明同一芯片内部各点具较好重复性。

2.4 差异蛋白分析 原始数据用ProteinChip软件校正,设定排斥与非排斥组泪液样品检测的蛋白质分子量区间在1000~20000Da(为避免0~1000Da这一区间范围内存在的试剂成分、SPA以及其它化学成分对后续数据分析产生影响,低于1000Da的蛋白质或肽段自动从波谱中被清除)。共有108个M/Z在M1053.15~M19552.6之间的蛋白质被标记,其中有分类价值的标志性蛋白质有11种(图2),相对分类价值较高的有6种,其中M2162.66, M3356.53在排斥反应组中表达下调, M1169.86, M1183.69, M9238.59, M11882.2在排斥反应组中表达上调(图3)。

2.5 诊断模型盲法验证结果 用该模型盲法分析18例未知样本的SELDI泪液蛋白质图谱,结果显示,9例排斥反应泪液标本中7例被准确预测出,2例错误,9例未排斥反应组标本中8例被准确预测出,1例错误。敏感性为78%,特异性为89%。

2.6 蛋白质库查询结果 将有分类价值的6个标志蛋白质通过ExPASy tool分别在Swiss-Prot和TrEMBL蛋白质库中查询,考虑仪器误差(0.1%~3%),得到如下候选蛋白(表2)。

3 讨论

角膜移植已成为治疗终末期角膜疾病的有效方法,尽管成功率很高,移植排斥反应仍是难以克服的问题之一,其发生机制尚未完全清楚。研究表明,该过程与机体免疫、内分泌网络功能改变相关^[5]。因此,个别生物标志变化难以从宏观角度分析该过程中复杂的病理生理活动。在整体水平对蛋白质进行研究将有助于全面深入认识角膜移植排斥反应。目前,尚缺乏诊断或监测角膜移植排斥反应的特异性生物学标志。蛋白质组学研究的出现为我们提供了新的思路。蛋白质组是从动态、整体的角度在分子水平上研究个体细胞、组织或体液中所有蛋白质的功能,提供一组蛋白质的模式及功能信息,能同时反映外界因素影响和细胞内部遗传特性的结果^[6]。直接从蛋白质组入手研究角膜移植将更全面、真实地揭示角膜移植术后免疫排斥反应的发病机制,为角膜移植术后免疫排斥反应的诊断和防治研究提供新线索。

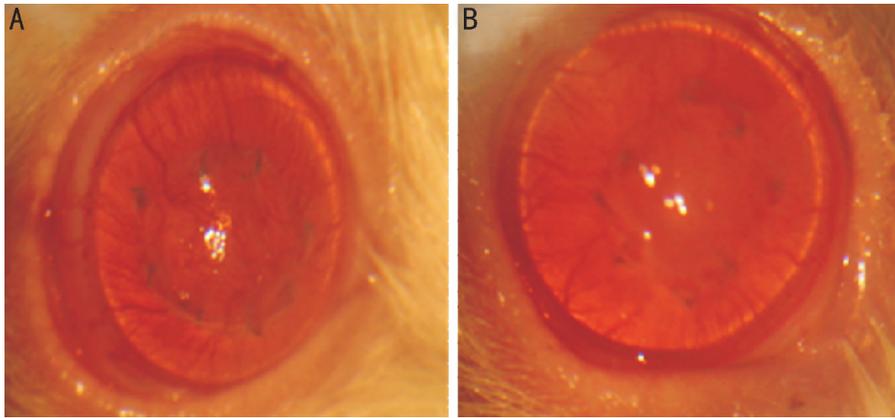


图1 术后第7d植片情况 A:对照组;B:CsA组。

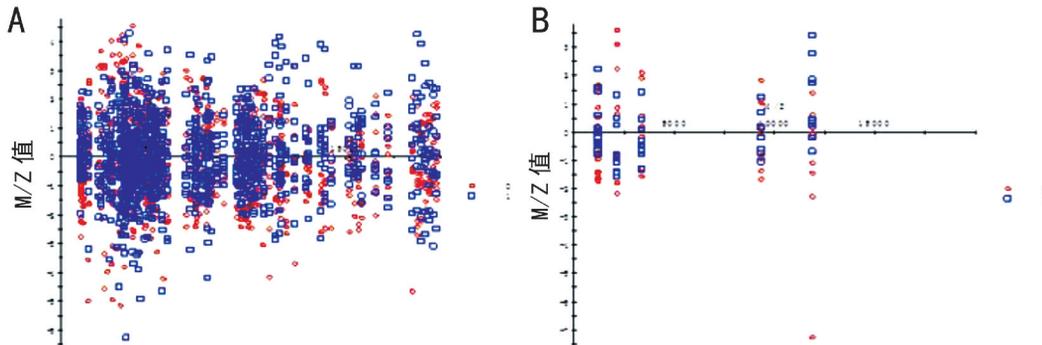


图2 泪液蛋白聚类示意图 A:所有蛋白聚类;B:差异蛋白聚类。

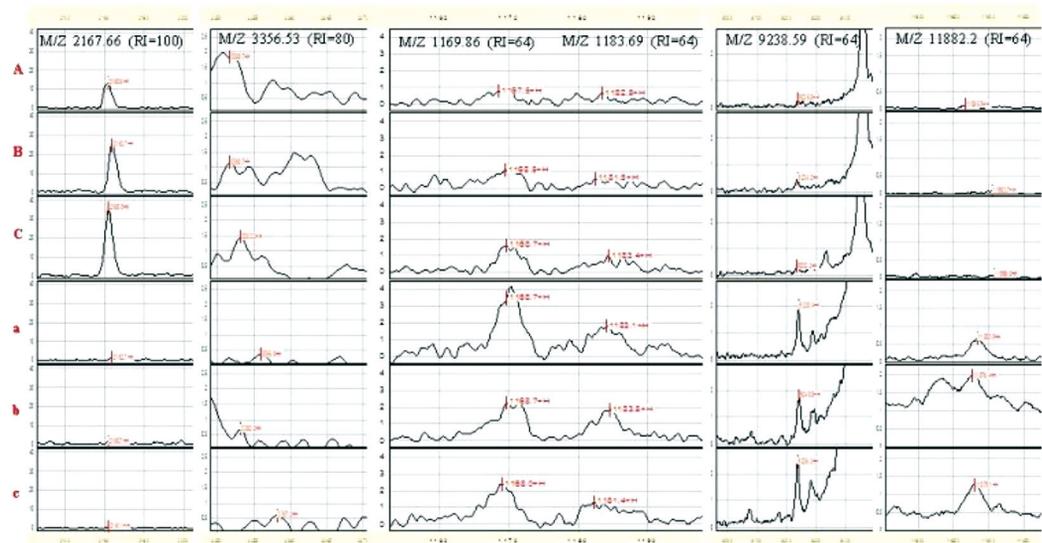


图3 标志蛋白示意图 A,B,C:未排斥组;a,b,c:排斥组。

分组	n(只)	排斥指数	混浊	水肿	新生血管化
对照组	18	8.272±0.145	3.003±0.102	1.742±0.879	3.528±0.161
CsA组	18	5.500±0.985	1.606±0.662	1.089±0.932	2.806±0.900
t		67.177	48.707	21.617	15.910
P		0.000	0.000	0.000	0.000

角膜本身无血管,其营养代谢主要来自于泪膜、房水和角膜缘血管网。上皮细胞的氧供来自泪膜,内皮细胞的氧供来自房水。能量物质主要是葡萄糖,大部分通过内皮细胞从房水中获取,约10%由泪膜和角膜缘血管供给。因此,我们可以得出结论:角膜自身状况的改变缘自于泪液、房水及血液成分的改变。结合临床实际,对于角膜移

植免疫排斥反应患者来说,对于泪液的采集及干预治疗较房水更加安全可行。泪液属于体液的一种,即受眼局部因素也受全身状态的影响。Crus等^[7]利用 SELDI 蛋白质芯片技术对泪液进行分析,发现主要的蛋白质峰(如溶菌酶、脂蛋白等)可被鉴别出来。平均每种芯片可探测到超过60种的蛋白质。经判别分析后发现干眼症组与对照组

表2 蛋白质数据库检索结果

M/Z (Mr)	蛋白质号	蛋白质库名称	蛋白质名称及特性
1183.69Da (1171 ~ 1192)	SMS_RAT (P60042)	Swiss-Prot database	Antrin. Chain: 25-34, pI: 9.64, Mw: 1186
1169.86Da (1140 ~ 1180)	MORN_RAT (P69209)	Swiss-Prot database	Morphogenetic neuropeptide Chain 1-11, pI: 8.76, Mw: 1142
	TKN1_RAT (P06767)	Swiss-Prot database	Neurokinin A Chain: 98-107, pI: 6.74, Mw: 1134
2162.66Da (2160 ~ 2165)	DFTS_RAT (P07448)	Swiss-Prot databas	Dentinal fluid transport-stimulating peptide Chain: 1-20, pI: 5.45, Mw: 2165
	Q5BM22_RAT (Q5BM22)	TrEMBL database	Pro-histogranin Chain: 1-19, pI: 9.68, Mw: 2162
3356.53Da (3353 ~ 3359)	GLUC_RAT (P06883)	Swiss-Prot database	Glucagon-like peptide 1(7-37) (By similarity) Chain: 98-128, pI: 5.53, Mw: 3356
	DEF4_RAT (Q62714)	Swiss-Prot database	Neutrophil antibiotic peptide NP-4 Chain:69-93, pI :8.97, Mw :3339
9838.59Da (9828.7 ~ 9848.4)	Q30KJ1_RAT (30KJ1)	TrEMBL database	Beta-defensin 2 Chain: 1-86, pI: 8.97, Mw: 9848
11882.3Da (11870.4 ~ 11894.2)	CASP3_RAT (P55213)	Swiss-Prot database	Caspase-3 subunit p12 Chain: 176-277, pI: 6.87, Mw: 1890
	GP2A2_RAT (Q925Q4)	Swiss-Prot database	Glycoprotein hormone alpha-2 Chain: 23-130, pI: 8.79, Mw: 11892
	Q6TXI9_RAT (Q6TXI9)	TrEMBL database	LRRGT00010 Chain: 1-103, pI: 9.85, Mw: 11874

的泪液蛋白质图谱有着显著差别。而且能检测到小达2kDa的蛋白质,并且可重复性很高;Tomosugi等^[8]发现 Sjögren 综合征患者的泪液蛋白质与对照组相比有显著的改变,其中包括两组潜在的新的生物标记物;糖尿病的泪液也有其特殊的改变^[9]。在多发硬化患者的泪液和脑脊液中的等电聚焦图谱很相似^[10],因而对泪液的分析有可能代替其他样本来帮助诊断。

我们通过 SELDI-TOF-MS 技术检测两组泪液,发现6种标志蛋白可能与角膜移植免疫排斥反应相关,从免疫排斥反应相关角度进一步分析6个蛋白搜库结果,我们得出以下结论。

下调蛋白可能为 Pro-histogranin 和胰高血糖素样肽1 (GLP-1);Histogranin 是与 H4 组蛋白片段(86 ~ 100)同源的天然的15肽氨基酸,有研究表明作为参加免疫反应的蛋白质的一员,Histogranin 可以刺激游离巨噬细胞,通过级联放大效应刺激 TNF,IL-1 和 IL-6 分泌^[11]。这些关键细胞因子的增量调节机制可能在免疫调节的生理机制中意义重大。Pro-histogranin 在排斥组泪液中的下调表达是否意味着 Histogranin 的增多以及 Histogranin 接下来的转归有待于进一步研究;GLP-1 是体内重要的肠肽激素,在调节体内葡萄糖稳态中起重要作用。在胰腺外组织它也可调节葡萄糖的代谢,促进糖原合成和糖利用。角膜组织损伤修复需要大量能量,GLP-1 的下调是否可以导致糖代谢异常,进而促进了角膜移植免疫排斥反应的发生?这为我们研究移植免疫排斥反应提供了新思路。

上调蛋白可能为 β-防御素2、细胞凋亡蛋白酶-3 (Caspase-3, CPP3) 亚基、神经激肽 A (NKA): 防御素

(defensin) 是一组耐受蛋白酶的富含精氨酸的小分子多肽,对细菌、真菌和某些有包膜病毒具有直接杀伤作用。β-防御素最初是在血液滤液中发现的,随后发现在肾小管、胰腺、肺、乳腺、腮腺、眼前房、鼻黏膜以及其他一些组织的上皮细胞中 β-防御素连续性表达。β-防御素2 主要在感染刺激后的皮肤和黏膜组织中表达。作为机体上皮组织抵御环境中微生物侵袭的第一道化学屏障,β-防御素的动员比特异性抗体或细胞介导的免疫反应更加简单而快速,几小时内就能起作用,可在感染后短期内阻遏、延缓微生物的生长,或完全消除其感染,因此在机体的固有免疫防御中发挥着重要作用。β-防御素还具有间接的免疫激活作用。研究表明,在较低的分子浓度下,β-防御素能够与这些细胞表面特异性的趋化因子受体相结合,趋化这些细胞朝着受致病微生物侵袭的或黏膜病灶部位迁移。我们的研究表明:β-防御素2 在发生角膜移植排斥组泪液中超常量表达,显著高于未排斥组。提示在 β-防御素2 可能通过直接或者间接的免疫激活作用参与到角膜移植术后免疫排斥反应中;CPP3 是细胞凋亡蛋白酶,已经有大量研究表明细胞凋亡参与了角膜移植免疫排斥反应^[12]。泪液中 CPP3 亚基的上调表达从另外一个方面证实了细胞凋亡与角膜移植排斥反应密切相关;近年来,越来越多的证据证明,神经肽在神经、内分泌及免疫系统的调节机制中起着重要的作用。排斥反应组泪液中 NKA 上调表达提示我们在角膜的免疫排斥反应中是否要考虑到神经递质对免疫排斥反应的影响。机体内环境稳定是由三个体系的相互调节实现的:内分泌系统、神经系统及免疫系统。它们之间的信息传递是由内分泌或者旁分泌

的激素、神经递质和细胞因子来实现的。考虑神经系统与角膜移植免疫排斥反应的相关性将为临床治疗提供新路径。

利用蛋白质组学技术研究角膜移植术后免疫排斥反应可以了解、分析角膜移植后机体表达的全部蛋白质信息,为阐明疾病的发生、发展提供蛋白质方面的证据,并对此进行深入的研究。可为角膜移植后相关疾病,尤其是移植免疫排斥的预防和治疗带来新的曙光。我们利用蛋白质组学技术和方法试图从蛋白质或因子水平探讨角膜移植后与免疫排斥相关病变的可能机制,寻找反映疾病发生、发展的目标蛋白质。目前我们的研究获得了较大的收获,但仍需要验证相关的蛋白质,筛选出有意义的目标蛋白质,了解目标蛋白质在疾病过程中的修饰情况。结合我国角膜病研究特色,积极开展角膜蛋白质组学方面的研究,尤其在疾病研究方面,可以将筛选到的疾病标志物作为治疗靶标,设计和开发出相关的治疗药物,其应用前景非常广阔。

参考文献

- 1 Beauregard C, Huq SO, Barabino S, *et al.* Keratocyte apoptosis and failure of corneal allografts. *Transplantation* 2006;81(11):1577-1582
- 2 Mohan M, Sachdev MS, Jaffery NF. Tear and serum immunoglobulins during corneal graft rejection. *Cornea* 1987;6(4):273-280
- 3 Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26(1):23-30
- 4 Holland EJ, Chan CC, Wetzig RP, *et al.* Clinical and

immunohistologic studies of corneal rejection in rat penetrating keratoplasty model. *Cornea* 1991;10(5):374-380

5 Katami M. Corneal transplantation--immunologically privileged status. *Eye* 1991;5(Pt 5):528-548

6 Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004;37(11):943-952

7 Grus FH, Podust VN, Bruns K, *et al.* SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(3):863-876

8 Tomosugi N, Kitagawa K, Takahashi N, *et al.* Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4(3):820-825

9 Herber S, Grus FH, Sabuncuo P, *et al.* Two-dimensional analysis of tear protein patterns of diabetic patients. *Electrophoresis* 2001;22(9):1838-1844

10 Kubota R, Noda S, Wang Y, *et al.* A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 1997;41(3):360-369

11 Hentall ID, Hargraves WA, Sagen J. Inhibition by the chromaffin cell-derived peptide serine-histogranin in the rat's dorsal horn. *Neurosci Lett* 2007;419(1):88-92

12 Ferguson TA, Griffith TS. The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:140-154