

蛋白质组学方法在玻璃体研究中的应用

林铁柱,褚光辉,王建伟,李世洋

作者单位:(471031)中国河南省洛阳市,解放军第150中心医院眼科

作者简介:林铁柱,毕业于第四军医大学,眼科学硕士,主治医师,研究方向:玻璃体及视网膜疾病。

通讯作者:林铁柱. 360970814@qq.com

收稿日期:2013-10-23 修回日期:2014-01-29

Proteomic analyses in the study of vitreous humour

Tie-Zhu Lin, Guang-Hui Chu, Jian-Wei Wang, Shi-Yang Li

Department of Ophthalmology, the 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China

Correspondence to: Tie-Zhu Lin. Department of Ophthalmology, the 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China. 360970814@qq.com

Received: 2013-10-23 Accepted: 2014-01-29

Abstract

• Vitreous humour (VH) is a transparent, highly hydrated gel, which occupies the vitreous cavity. The protein composition of the VH would change in pathological conditions of the retina, which has been testified in many studies. In the last decade, proteomics analyses have been performed to study the proteome of the human VH and hope to find some specific proteins in the aetiology of diabetic retinopathy (DR). Recent proteomic studies on the VH from animal models of autoimmune uveitis have identified some specific proteins in related entophthalmia.

• KEYWORDS: vitreous humour; proteome; diabetic retinopathy; entophthalmia; uveitis

Citation: Lin TZ, Chu GH, Wang JW, et al. Proteomic analyses in the study of vitreous humour. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):474-476

摘要

玻璃体以透明的凝胶状态充填于玻璃体腔内,当视网膜发生病变时,相邻的玻璃体的蛋白质构成会发生一些变化,这在很多研究中得到证实。最近10a,蛋白质组学技术被用来研究玻璃体的蛋白质组,希望发现与糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)病因相关的特异蛋白质。最近对动物自身免疫性葡萄膜炎的玻璃体样本进行蛋白质组学研究,发现了与眼内炎症相关的特异蛋白质。

关键词:玻璃体;蛋白质组学;糖尿病性视网膜病变;眼内炎症;葡萄膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.25

引用:林铁柱,褚光辉,王建伟,等.蛋白质组学方法在玻璃体研究中的应用.国际眼科杂志2014;14(3):474-476

0 引言

玻璃体是透明富含水的凝胶,包含99%的水及其他的胶原纤维、透明质酸、玻璃体细胞、无机盐和脂质混合物。正常玻璃体的平均蛋白浓度约0.5mg/mL,主要成分是白蛋白(60%~70%)、球蛋白、凝固蛋白、补充因子和低分子蛋白^[1]。睫状体通过房水扩散、超滤过和主动转运与玻璃体进行稳定的液体交换^[2],蛋白质则通过局部分泌(糖蛋白)、血液滤过(白蛋白)和周围组织扩散进行积聚^[3]。因为玻璃体和视网膜相邻,视网膜的功能状态会影响玻璃体的蛋白质组和生化指标,玻璃体视网膜疾病会引起玻璃体特异蛋白质水平的改变,特别是在血-视网膜屏障破坏时^[4]。通过蛋白质组学技术可以对细胞、组织、生物流体和任何状态下的有机体蛋白质组的特异性变化进行研究^[5]。研究人员一直希望通过蛋白质组学技术研究病变状态下玻璃体的蛋白质组表达情况,与健康对照组对比找出疾病特异性蛋白质用于诊断和/或药物作用靶点^[3,4,6-12]。虽然目前并未取得令人满意的结果和进展,但是随着蛋白质组学的进一步发展和更先进技术的应用,以及我们对于玻璃体的了解更加深入,我们期待在不远的将来实现这一目标。

1 蛋白质组学工作流程

蛋白质组学的两个目的:定量分析蛋白质或者发现特异蛋白质。流程包括:收集样本、蛋白质消化为多肽、多肽混合物分离、质谱鉴定蛋白质和数据分析。

1.1 收集样本 玻璃体可以分为三个区域:中轴部、基底部和皮质。中轴部玻璃体细胞外基质高度水合化,基底部和皮质玻璃体都含有低浓度的玻璃体细胞和致密的胶原纤维束。因此,样本获取位置的不同可能影响蛋白质组的构成。

基于伦理学的原因,在正常人眼中无法收集玻璃体样本,而凡需行玻璃体手术干预的眼都处于病变状态,因此,一些研究人员建议从生物数据库中筛选尸眼作为“正常”玻璃体蛋白质组来源^[3]。当然这个观点是有争议的,因为尸眼的组织改变是客观存在的,但与活体玻璃体所获取的小样本相比,它可获取完整的玻璃体样本。玻璃体也可以从活体摘除的眼球中获得,但这些眼通常患有外伤或者恶性肿瘤。从尸眼或者活体摘除的眼球中获取玻璃体样本,常用的方法是将连有10mL注射器的23G针头经巩膜刺入眼后段,抽取至少3mL的玻璃体样本,通常不提倡解剖切开尸眼获取玻璃体样本,因为眼球开放会导致玻璃体液的流失。

很多研究都是在玻璃体切割手术时切取中轴部玻璃体作为样本。在手术开始时,关闭灌注通道,玻璃体切割头负压吸引切割,负压吸气管道的另一端接有2.5mL注

射器收集,一般可获取约 1mL 未稀释玻璃体样本。考虑黄斑裂孔是由于玻璃体黄斑牵拉的自发条件引起,可能对玻璃体的蛋白构成没有影响,很多研究人员将从黄斑裂孔眼获取的玻璃体样本作为正常对照^[13]。

在 PDR 的玻璃体研究中,玻璃体体积血是干扰蛋白质组学研究结果的一个重要原因,因为出血可以使血清蛋白混入玻璃体中。Simó 等在研究时使用分光光度计测量玻璃体的出血水平,排除了出血水平>5mg/mL 的所有样本^[6,10]。

在应用蛋白质组学技术鉴定分析之前,样本的保存是至关重要的。保存时需要防止蛋白质降解,常用的方法包括液氮快速冷冻后置于-80℃ 环境中保存^[14]和添加蛋白酶抑制剂保存^[9]两种。

蛋白质提取方法与蛋白质组学技术的鉴定能力关系紧密,对于玻璃体样本最主要的问题就是它的黏性特征,它可以阻止玻璃体液的分离,而这种特征又与样本获取的部位、供者的年龄、晶状体的状态和玻璃体的病变状态相关。随着年龄的增长,玻璃体逐渐液化,一般从中轴部开始然后逐渐融合。Neal 等^[8]测量了人不同部位玻璃体的黏度系数,发现在天然晶状体眼中,晶状体周围玻璃体的黏度高于视网膜周围玻璃体的黏度,而在人工晶状体眼中这种趋势却相反。

降低玻璃体黏度的方法有很多种,包括蒸馏法、高速离心法、微细过滤法、稀释法和透明质酸酶处理,其中高速离心法(12 000rpm,15min)是最常用的方法^[12],但这些方法均无法避免对玻璃体蛋白质组分的干扰。

1.2 蛋白质分离 任何机体或组织、细胞的蛋白质组都是非常复杂的复合成分,在对它进行分析之前,需要先进行组分分离,常用的方法包括亲和色谱法和凝胶电泳法。

在玻璃体总蛋白质中,白蛋白和免疫球蛋白的含量超 80%,会影响低丰度蛋白的检测。亲和色谱法的作用原理是通过特异性去除高丰度蛋白来提高低丰度蛋白检测的准确性。在玻璃体实验中,可以使用蛋白 A 琼脂糖 4 快速流动^[11]或白蛋白/IgG 提取设备^[7]在电泳之前移除 IgG。

免疫亲和分离(Immunoaffinity subtraction, IS)是通过 IgY-12 阵列去除生物体液中含量最丰富的 12 种血浆蛋白。Kim 等^[7]使用 IgY-12 阵列处理 PDR 眼中的玻璃体样本,随后比较低丰度和高丰度蛋白片段,发现低丰度蛋白分辨率低,原因可能是部分低丰度蛋白在 IS 过程被移除。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)通过电泳迁移分离蛋白质。在样本中加入阴离子去污剂和强还原剂后,破坏分子内和分子间的氢键和二硫键,蛋白质分子解聚成多肽链,消除不同分子间的电荷差异和立体结构差异,这样蛋白质电泳迁移率主要取决于分子量的大小。SDS-PAGE 与等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)结合根据等电点分离蛋白质,可以提高分辨率,称作二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)。IEF 联合固相 pH 梯度可以分辨数以千计的蛋白质^[15]。蛋白质在电泳分离之后可被染色从而实现可视化、定量化和对照比较。蛋白质表达水平定量可以根据点光学密度(OD%)估计,光学密度与蛋白质聚集程度成正比,匹配点平均 OD% 两倍以上差异在玻璃体样本间蛋白质比较有一定的意义。Ouchi 等^[9]首次使用这种方法比较分析了患有和未患有糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)患者眼玻璃体的蛋白质表达,在 DME 玻璃体中检测到 72 个蛋白

点,而在对照组检测到 64 个蛋白点,有 8 个蛋白点信号强度有明显差别,在高表达的 DME 组鉴定出 6 种蛋白质。

2D 荧光差异凝胶电泳(2D fluorescence difference gel electrophoresis, DIGE)是 2D-PAGE 方法中的一种,可以定量分析两个以上样本的相关蛋白质,具有可靠性高和重复性好的优点。电泳前荧光标记相关蛋白质^[16],使用特定波长扫描,然后使用蛋白质成像技术分析。Hernández 等^[17]应用 DIGE 比较分析了 8 例未患糖尿病和 8 例 DME 患者的玻璃体,检测了 1300 个蛋白点,鉴定了 25 种蛋白质,发现其中 4 种与 DME 显著相关。

1.3 蛋白质鉴定 质谱分析技术(mass spectrometry, MS)是鉴定和定量分析蛋白质的关键技术。MS 的原理是测量离子的质量电荷比(mass/charge ratios, m/z),测量前需要将多肽片段离子化。目前应用最广泛的是基质辅助激光解吸/离子化(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷射离子化(electrospray ionization, ESI)。与 ESI 相比, MALDI 对标本中的金属盐类、磷酸、尿素及一些清洁剂具有较高耐受性。将测量所得到的质谱图与已知蛋白质谱数据库进行比对,通过匹配分子质量得知待研究化合物为何种物质。这项技术受数据库和蛋白质混合物的复杂性所局限^[18]。串联 MS(Tandem MS, 或 MS/MS)提高了 MS 的精确度,与单次 MS 相比, MS/MS 能够获得多肽序列数据,同时还能选择性分析多肽片段。LC-MS/MS 仪可大大提高复杂蛋白质混合物分析的动态性和灵敏度^[19]。Yu 等^[12]应用这种技术测量了 24 只增生性玻璃体视网膜病变眼和 8 只生物数据库眼玻璃体的蛋白质谱,鉴定出 363 种蛋白质。

1.4 数据分析 随着氨基酸序列计算方法和蛋白质鉴定方法的发展,匹配信息可包含在质谱光谱中。目前最常与 2-DE 和 MS 联合应用的蛋白质谱数据库有 MOWSE, JIPID, PIR, NRL-3D, SEQUEST, SCOPE 及 Mascot 等,这些数据库已逐渐完善并广泛应用于测定蛋白质分子量,预测蛋白质分子的结构组成、排列顺序以及蛋白质功能的研究。

2 玻璃体蛋白质组学与 DR

在最近 10a,有很多研究通过蛋白质组学方法(2DE, DIGE, ESI-MS, MALDI-MS 和 LC-MS/MS)研究 DR 玻璃体的蛋白质组^[3,4,6,7,9-12,17]。大多数的研究表明 DR 玻璃体的蛋白质总量高于正常对照组,这可能因为玻璃体积血和/或血-视网膜屏障破坏导致的血清积聚升高了总蛋白质水平。Simó 等^[10]的研究发现, PDR 玻璃体内的脂蛋白上调。总的来说, DR 玻璃体蛋白质组的分析结果是多样化的,包括总蛋白质和各种不同蛋白质的表达,随着蛋白质鉴定数量的增多,我们未来能发现一些与 DR 发病机制相关的特异蛋白质。

3 蛋白质组学与眼内炎症

在美国, 10% ~ 15% 双眼盲和 22% 的单眼盲是由眼内炎症引起的;在英国,眼内炎症导致了 10% 的视力损伤^[20]。我们希望应用蛋白质组学方法加深眼内炎症的研究,评估治疗方案,从而最终实现眼内炎症的个体化治疗,但目前眼内炎症的蛋白质组学研究还局限在动物模型^[21]。

内毒素介导的葡萄膜炎(endotoxin-induced uveitis, EIU)是一种急性眼内炎症的动物模型。为了研究 EIU 的机制, Bahk 等^[22]应用蛋白质组学方法分析了 EIU 小鼠玻

璃体的蛋白渗透,发现了晶状体家族蛋白的特异改变。

马复发性葡萄膜炎(equine recurrent uveitis, ERU)是一种发生在马身上的复发性葡萄膜炎^[23],是人类自身免疫性葡萄膜炎的唯一动物模型,切除玻璃体可以明显减少其复发次数并降低其严重程度,因此推测玻璃体可能参与了该疾病的发展。Deeg等^[24]应用MS系统的研究了此类模型的玻璃体,在一项早期研究中,他们采用2-DE-MALDI-TOF/MS方法鉴定了42种蛋白质,其中9种在ERU中有特异表达,它们在功能上与免疫应答、炎症和血-视网膜屏障的维护相关。最近,他们还发现了与ERU相关的功能蛋白质网络和分子信号联系途径,使用的方法是以LC-MS/MS为基础的非标记定量,鉴定了119种蛋白质,其中26种上调,44种下调^[25]。

4 结论

目前玻璃体蛋白质组学研究仍处在起步阶段。尽管蛋白质组学技术上的发展取得了显著的进步,但仍存在许多不足之处,如没有能避免对玻璃体组织干扰的降低玻璃体黏度的方法,低丰度蛋白质的分辨能力还需要进一步提高。基于伦理学的原因,人玻璃体样本的收集也有很大的局限性,将筛选尸眼或黄斑裂孔眼的玻璃体作为正常对照仍有争议。在DR研究中,无法完全避免血清蛋白的干扰,眼内炎症的蛋白质组学研究仍局限在动物模型。

我们相信玻璃体蛋白质组学研究有广阔的应用前景,随着技术的逐渐完善,必将能深化相关疾病的发生发展机制和疾病相关特异分子作用机制的研究,高通量的蛋白筛选鉴定技术使得发现和鉴定与某一疾病相关的特异性蛋白质成为可能,借以阐明疾病发生发展的分子机制以及发现新的疾病治疗相关靶点,发展更加特异的诊断标志物和治疗药物与途径,有利于疾病的早期诊断、鉴别诊断、个体化治疗、治疗反应监测和预后分析。

参考文献

- Ulrich JN, Spannagl M, Kampik A, et al. Components of the fibrinolytic system in the vitreous body in patients with vitreoretinal disorders. *Clin Exp Ophthalmol* 2008;36(5):431-436
- Bishop PN, Takanosu M, Le Goff M, et al. The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye* 2002;16(4):454-460
- Wu CW, Sauter JL, Johnson PK, et al. Identification and localization of major soluble vitreous proteins in human ocular tissue. *Am J Ophthalmol* 2004;137(4):655-661
- Shitama T, Hayashi H, Noge S, et al. Proteome profiling of vitreoretinal diseases by cluster analysis. *Proteomics-Clinical Applications* 2008;9(2):1265-1280
- Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature Biotechnol* 2010;28(7):695-709
- García-Ramírez M, Canals F, Hernández C, et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2007;50(6):1294-1303
- Kim T, Kim SJ, Kim K, et al. Profiling of vitreous proteomes from

- proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics* 2007;7(22):4203-4215
- Neal RE, Bettelheim FA, Lin C, et al. Alterations in human vitreous humour following cataract extraction. *Exp Eye Res* 2005;80(3):337-347
- Ouchi M, West K, Crabb JW, et al. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res* 2005;81(2):176-182
- Simó R, Higuera M, García-Ramírez M, et al. Elevation of apolipoprotein AI and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients. *Arch Ophthalmol* 2008;126(8):1076-1081
- Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* 2003;2(11):1177-1187
- Yu J, Liu F, Cui SJ, et al. Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy. *Proteomics* 2008;8(17):3667-3678
- Johnson MW. Improvements in the understanding and treatment of macular hole. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13(3):152-160
- Mandal N, Heegaard S, Prause JU, et al. Ocular proteomics with emphasis on two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Biological Procedures Online* 2010;12(1):56-88
- Gorg A, Obermaier C, Bogut h G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(6):1037-1053
- Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nature Protocols* 2006;1(4):1732-1742
- Hernández C, García-Ramírez M, Colomé N, et al. New pathogenic candidates for diabetic macular edema detected by proteomic analysis. *Diabetes Care* 2010;33(7):92
- Lam TC, Chun RK, Li KK, et al. Application of proteomic technology in eye research: a mini review. *Clin Exp Optometry* 2008;91(1):23-33
- Peng J, Elias JE, Thoreen CC, et al. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res* 2003;2(1):43-50
- Lee RW, Dick AD. Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation. *Eye* 2012;26(1):17-28
- de Smet MD, Chan CC. Regulation of ocular inflammation - what experimental and human studies have taught us. *Progress Retinal Eye Res* 2001;20(6):761-797
- Bahk SC, Lee SH, Jang JU, et al. Identification of crystallin family proteins in vitreous body in rat endotoxin-induced uveitis: involvement of crystallin truncation in uveitis pathogenesis. *Proteomics* 2006;6(11):3436-3444
- Deeg CA, Amann B, Raith AJ, et al. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):652-656
- Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, et al. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 2007;7(9):1540-1548
- Hauck SM, Hofmaier F, Dietter J, et al. Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signaling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics* 2012;75(14):4545-4554