

蛋白质组学及其在增生性玻璃体视网膜病变中的应用进展

王俊芳,梅立新

作者单位:(241001)中国安徽省芜湖市,皖南医学院弋矶山医院眼科

作者简介:王俊芳,女,在读硕士研究生,研究方向:眼底病学。

通讯作者:梅立新,男,主任医师,副主任,硕士研究生导师,研究方向:眼底病学. meilixin63@sina.com

收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-06-07

Current progress in proteomics and its application in proliferative vitreoretinopathy

Jun-Fang Wang, Li-Xin Mei

Department of Ophthalmology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Correspondence to: Li-Xin Mei. Department of Ophthalmology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. meilixin63@sina.com

Received:2010-05-10 Accepted:2010-06-07

Abstract

• Proteomics is the study of total expressed proteins and the dynamic change in certain cell, tissue or organ. It can study the organism dynamic and integrity at the protein level. Proteomics has been widely used in the current life sciences fields. However, its ophthalmic research is still initial, not fully developed. Now, the proteomics advancement in proliferative vitreoretinopathy is reviewed.

• **KEYWORDS:** proteomics; proliferative vitreoretinopathy; retinal pigment epithelium; extracellular matrix

Wang JF, Mei LX. Current progress in proteomics and its application in proliferative vitreoretinopathy. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1330-1332

摘要

蛋白质组学是研究特定时间或特定条件下一个细胞、组织或有机体所有蛋白质表达情况及其动态变化的科学,是在蛋白质水平上对生命体动态的、整体的研究。目前蛋白质组学已广泛应用于生命科学的各个领域。但在眼科的研究刚刚起步,发展尚不完全。现就蛋白质组学在增生性玻璃体视网膜病变中的应用进展做一综述。

关键词:蛋白质组学;增生性玻璃体视网膜病变;视网膜色素上皮细胞;细胞外基质

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.030

王俊芳,梅立新.蛋白质组学及其在增生性玻璃体视网膜病变中的应用进展.国际眼科杂志2010;10(7):1330-1332

0 引言

自从人类基因组计划(human genome project, HGP)完

成后,科学研究已转入了后基因组时代—蛋白质组学(proteomics)的研究^[1]。2001年的Science杂志更是把蛋白质组学列为2002年六大研究热点之一,其“热度”仅次于干细胞研究^[2]。蛋白质组(proteome)是由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白质。蛋白质组学即是从整体水平上研究特定时间或特定条件下这些蛋白质的表达及其活动规律,提供了关于蛋白质丰度、定位、化学修饰、蛋白质间相互作用等信息^[1]。与基因水平和生物小分子水平相比较,蛋白质生物大分子水平的研究更为复杂,也更为具体。作为生命活动的执行者,蛋白质在物质代谢、机体防御信号传导、个体生长发育、组织修复等方面发挥着不可替代的作用,作为生命活动存在的基础,蛋白质可以使人们更深入、更直观地了解生命活动、疾病的发生和发展过程。

1 蛋白质的研究技术

蛋白质同时具有氨基酸和生物大分子化合物的理化性质,因此要从体液和细胞中千百万的蛋白质中分析出某一单一蛋白质的结构和功能,就必须利用其理化性质进行分离和提纯,并对其进行鉴定。

1.1 蛋白质的分离技术

1.1.1 双向凝胶电泳 双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学研究的重要技术,也是目前用于分离蛋白质、进行比较蛋白质组学研究的主要方法,被广泛应用于微生物学^[3]、临床医学如肿瘤学^[4]等众多学科的研究。2-DE由Farrel等于1977年首次报道其原理为第一向的蛋白质等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF),加之第二向的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),通过被分离蛋白质等电点和分子量的差异,将蛋白质混合物在二维平面上分离,这就是现代DE的基础,即IEF-SDS PAGE。但它有着一定的局限性:如重复性差、自动化程度低、费时费力、对>100ku和<10ku的分子量的蛋白质、低丰度蛋白质(<1000copies)、极酸或极碱和难溶的蛋白质等分离困难等。随着技术的发展,包括1988年固相化pH梯度(immobilized PH gradients, IPEGs)技术的完善改善了传统DE的缺点,提高了其重复性和分辨率,从而奠定了2-DE在蛋白质分离技术上的重要地位。

1.1.2 色谱分离技术 色谱(chromatography separation, LC)分离技术常与与电离喷雾质谱(ESI-MS)或电离喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)连用^[5],成为蛋白质组学研究中另一种重要的方法,也是目前为止应用较为广泛的一种方法。它包括一维(one-dimensional, 1D)色谱、二维(two-dimensional, 2D)色谱、多维(multidimensional, MD)色谱等多种色谱分离技术。一维色谱-质谱技术和二维-质谱技术可以分析一些不太复杂的蛋白质体系,多维色谱-质谱(MD-LC-MS)技术则可以满足对复杂蛋白质混合分离鉴定的要求。LC与2-DE相比,具有操作简单、特异性更强等优点,特别在当其与质谱技术连用时,其对复杂体系的蛋白质的在线分离和鉴定达到前所未有的高灵敏度和分

析速度。Nielsen 等^[6]就应用 LC-MS-MS 技术成功分离和鉴定了小鼠脑海马组织中的 1 685 种蛋白质。与 LC 相比,MD-LC 的优势更为明显和突出。研究证实 MD-LC 与 MS/MS 联合的蛋白质组技术有很强大的功能,这种方法鉴定到的蓝藻蛋白质的数量是传统 2-DE 方法的 2 倍,而且可以明显提高碱性和疏水蛋白质的提纯^[7]。MD-LC-MS 技术正逐渐成为蛋白质组学研究的重要技术平台。

1.2 蛋白质的鉴定技术

1.2.1 质谱技术

蛋白质组鉴定的核心技术就是质谱技术(mass spectrometry, MS),其基本原理是使样品分子离子化后,根据不同离子间的质荷比(m/z)的差异来分离并确定蛋白质的相对分子量。自有机质谱仪诞生以来,一直是有机小分子结构分析的重要工具之一,但一直不能用来分析生物大分子。这是由于有机质谱有限的质量范围和电离技术部适合热不稳定、挥发性差的生物大分子。开始于 80 年代后期的电喷雾质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)和机制辅助的激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术具有灵敏度高、准确度高、易自动化的特点,启动了有机质谱在生物领域的应用,是蛋白质组学的一个重大突破。在对激素耐药型肾病综合征患儿尿液生物标志物筛选的实验中,88.89% 的灵敏度和 93.75% 特异度验证了 MALDI-TOF-MS 良好的临床应用价值^[8]。MALDI-TOF-MS 与四极/直角加速飞行时间(quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight, QqoTOF)质谱联合,具有更高的分辨率、准确度和敏感度,可用于鉴定蛋白质修饰来阐明蛋白质结构^[9]。近年来各种质谱分析软件不断出现,更是大大地加快了蛋白质组学的研究进程。

1.2.2 蛋白质芯片技术

生物体生理功能的调节归根结底是由蛋白质来完成的,而传统的蛋白质分析方法慢速、低效并不能适应当前的需要,基因芯片方法虽然可以对基因功能进行高效分析,但是因为 DNA 以及 mRNA 的表达水平和蛋白质的表达水平有很大差异,所以基因芯片并不能很好地体现蛋白质和机体生理功能之间的关系。蛋白质芯片技术的出现及发展,并以其微型化、高效、高通量和对蛋白质分析更加直接的特点,成为当今蛋白质研究的热门技术之一。蛋白质芯片技术的技术原理是利用化学或生物学的方法在载体表面制作成点状芯池,形成化学表面芯片探针或生物表面芯片探针。检测时将标本直接加入芯池,然后在每个芯池结合的特性,将样品中的特定蛋白质分离出来,然后对芯片上的蛋白质直接进行质谱检测,从中得到样品中各种蛋白质的相对分子量、含量等信息。其检测方法主要包括探针标记检测法、无探针标记的检测方法和动态的分析检测方法 3 种。Zhou 等^[10]就运用蛋白质芯片技术对在视网膜母细胞瘤患者和年龄匹配的正常小儿血清进行了蛋白质谱检测,其结果具有相当高的敏感性和特异性。

2 蛋白质组学在眼科学中的应用

作为一种系统、高效、直观的研究方法,目前蛋白质组学已经广泛应用于各个学科领域,但在眼科的应用范围也很局限,以晶状体^[11]、小梁网^[12]和视网膜相关疾病^[13]为主。虽然刚刚起步,且尚不能全面、系统地解释眼科疾病的病理过程,但与传统研究方法相比,蛋白质组学有助于更直观、更深刻地理解眼科相关疾病,通过比较差异性表

达的蛋白及鉴定蛋白质翻译后修饰,有助于寻找疾病的关键蛋白,进而为探寻新的诊断和治疗靶标提供依据。

3 蛋白质组学在 PVR 中的应用

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是以 RPE 细胞游离、移行、增生,并分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM),在玻璃体内和视网膜前、后表面形成增生性膜为特征的一种疾病,是增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、孔源性视网膜脱离(rhegmatogenous retinal detachment, RRD)及其复位术后常见的并发症,也是视网膜脱离手术失败的主要原因,约发生在 10% 左右的病例。

3.1 PVR 的研究现状

传统对 PVR 发病机制及相关影响因素的研究多属对单个蛋白质的研究,方法也局限于免疫组织化学等较为传统的研究方法^[14]。虽然在一定程度上可以揭示 PVR 的发病机制,为 PVR 的治疗提供一定的理论依据,但是单个蛋白质的研究已经不能满足后基因组时代的要求。这是因为:(1)生命现象的发生往往是多因素影响的,必然涉及到多个蛋白质;(2)多个蛋白质的参与是交织成网络的,或平行发生,或呈级联因果;(3)在执行生理功能时,蛋白质的表现的多种多样的、动态变化的,并不像基因组那样基本固定不变。因此,要对生命的复杂活动有全面和深入的认识,必然要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。洪玉等^[15]就曾经研究过 GM6001 和 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 等多种蛋白质在 PVR 疾病发展过程中的相互影响,为治疗外伤性 PVR 提供了理论依据。

3.2 PVR 中的蛋白质组学研究

3.2.1 玻璃体液和血清

PVR 患者的玻璃体液中含有大量的蛋白质,为明确这些蛋白质的组成及各自可能起到的作用,Yu 等^[16]运用 2D-LC-MS/MS 技术分别在正常患者、中度 PVR 患者和重度 PVR 患者的玻璃体液和血清中分离并鉴定出 129, 97 和 137 种蛋白质,其中,35 种为三者共有的蛋白质,24 种为 PVR 玻璃体特异蛋白质。在这些特有蛋白中,激肽原-1 和胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-6)明显高表达,而细胞骨架蛋白质微管蛋白以及参与糖酵解的酶表达下降。并且其通过进一步研究发现,玻璃体液中激肽原-1 的量明显低于血清中的量,推测玻璃体液中的激肽原-1 可能是由于血-视网膜屏障破坏后由血清中转运而来。而 IGFBP-6 玻璃体中的浓度明显高于血清,证实玻璃体中的 IGFBP-6 是以自分泌的方式通过血-视网膜屏障进入血液。ELISA 的研究方法也印证了这一观点^[17]。通过对这些标志性蛋白质的研究,可以对 PVR 的预防、术前术后严重度的评估及治疗提供帮助。

3.2.2 RPE 细胞

RPE 细胞(retinal pigment epithelium, RPE)在 PVR 的形成和发展中起重要作用,它不仅是增殖膜形成和收缩的主要细胞,而且还可以产生趋化因子,吸引纤维胶质细胞和成纤维细胞参与增殖膜的形成。RPE 细胞的间变(dedifferentiated)是 PVR 发病机制中的一个关键环节。Bonilha 等^[18]对健康小鼠 RPE 细胞顶部微绒毛进行分离,并通过 2-DE 和 LC-MS/MS 的方法对其中的蛋白质进行研究,从中分离出超过 200 种蛋白质,除了许多已经在其他上皮细胞中发现的功能蛋白质外,还发现了一些未曾被报道过的只存在于 RPE 细胞顶部并可能具有特殊功能的蛋白质。不同情况下的 RPE 细胞状态也是不同的,在运用 MALDI-TOF-MS 对体外培养的间变 RPE 细胞

研究发现,在这些细胞中,与细胞功能高度特异且与光感受器细胞相互作用的蛋白质是不存在的,但一些参与细胞吞吐作用相关的蛋白质依然存在,且与细胞形状、细胞黏附和细胞骨架形成相关蛋白和与翻译和肿瘤源信号转导有关的蛋白表达明显上调^[19]。这些体外的RPE细胞培养实验表明间变增生的RPE细胞可能本质上启动PVR,在此基础上对RPE细胞的进一步研究很有可能为预防和治疗PVR提供新的思路和方法。

3.2.3 细胞外基质 目前认为,PVR的基本病理过程是细胞的迁移、增生和收缩,而细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积是导致PVR增生膜形成的又一重要因素。有研究表明,ECM对细胞的迁移、增生、黏附、分化和基因表达有复杂的调控作用。它们可以改变视网膜色素上皮细胞的表型,细胞及非细胞成分的黏附,进而使细胞分裂增殖加快,促进增殖,与PVR的形成有着密切的关系^[20]。目前在眼科学领域有关ECM的蛋白质组学研究的报道较少,但在其它领域,如内科学^[21]、肿瘤学^[22]等领域的研究均证实了ECM对细胞的分裂和增生起到了重要的作用。眼科领域有关ECM的蛋白质组学研究仍有待进一步发展。

4 展望

增生性玻璃体视网膜病变(PVR)是一种复杂的、类似于损伤修复反应的病理过程,是一种组织的自我修复过度的结果,是一个复杂的、相互作用的级联反应过程^[23]。目前其具体发病机制尚不清楚,全面而深入的研究是寻找PVR发生机制并对其进行有效治疗的关键。蛋白质组学是在蛋白质水平上定量的、动态的、整体的研究生物体,并在更深层次上获得对细胞生理和生物化学过程、调控网络、以及疾病过程的广泛而完整的认识^[1]。现在,科学研究已经进入后基因组时代,蛋白质组学以其系统、高效的特点越来越受到重视,在对各种疾病的诊断和治疗方面也具有十分诱人的前景。虽然目前蛋白质组学在眼科领域的应用还受到一定的限制,但相信在不久的将来,蛋白质组学必将成为眼科各种疾病研究的主要方式,也必将为PVR的预防提供有力的依据,对PVR的靶向治疗具有重要的意义。

参考文献

- 1 Fields S. Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science* 2001;291(5507):1221-1224
- 2 Service RF. High-speed biologist search for gold in proteins. *Science* 2001;294:2074-2077
- 3 Tang J, Liu L, Huang X, et al. Proteomic analysis of Trichoderma atroviride mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Can J Microbiol* 2010;56(2):121-127
- 4 Tsunemi S, Nakanishi T, Fujita Y, et al. Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncol Rep* 2010;23(4):949-956

- 5 Preinerstorfer B, Schiesel S, Lämmerhofer M, et al. Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *J Chromatogr A* 2010;1217(3):312-328
- 6 Nielsen PA, Olsen JV, Podtelejnikov AV, et al. Proteomic mapping of brain plasma membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(4):402-408
- 7 Barrios-Llerena ME, Chong PK, Gan CS, et al. Shotgun proteomics of cyanobacteria-applications of experimental and data-mining techniques. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006;5(2):121-132
- 8 杨梅,刘文君,郭渠莲,等.应用SELDI-TOF-MS筛选激素耐药型肾病综合征患儿尿液生物标志物. *临床儿科杂志* 2010;28(2):183-186
- 9 Baldwin MA, Medzihradsky KF, Lock CM, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry for protein discovery, identification, and structural analysis. *Anal Chem* 2001;73(8):1707-1720
- 10 Zhou LJ, Xiao XY, Wu KL, et al. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of retinoblastoma. *Int J Ophthalmol* 2008;8(1):1-5
- 11 张春巍,刘平.年龄相关性白内障和正常晶状体蛋白质组的差异分析. *眼科新进展* 2007;27(4):254-257
- 12 Shinzato M, Yamashiro Y, Miyara N, et al. Proteomic analysis of the trabecular meshwork of rats in a steroid-induced ocular hypertension model: downregulation of type I collagen C-propeptides. *Ophthalmic Res* 2007;39(6):330-337
- 13 Finnegan S, Robson J, Hocking PM, et al. Proteomic profiling of the retinal dysplasia and degeneration chick retina. *Mol Vis* 2010;16:7-17
- 14 李雷,刘肖艺,刘庆淮.骨桥蛋白VEGF在增生性玻璃体视网膜病变前房液中的表达. *国际眼科杂志* 2009;9(5):859-860
- 15 洪玉,徐国兴. MMP-1、MMP-3、TIMP-1对外伤性PVR的影响研究. *国际眼科杂志* 2008;8(11):2195-2198
- 16 Yu J, Liu F, Cui SJ, et al. Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy. *Proteomics* 2008;8(17):3667-3678
- 17 于靖,王方.类胰岛素生长因子结合蛋白-6作为PVR血清分子标志物的验证. *眼科研究* 2009;27(8):641-644
- 18 Bonilha VL, Bhattacharya SK, West KA, et al. Proteomic characterization of isolated retinal pigment epithelium microvilli. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(11):1119-1127
- 19 Alge CS, Suppmann S, Priglinger SG, et al. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3629-3641
- 20 Hollborn M, Reichenbach A, Wiedemann P, et al. Contrary effects of cytokines on mRNAs of cell cycle- and ECM-related proteins in hRPE cells *in vitro*. *Curr Eye Res* 2004;28(3):215-223
- 21 Bosselut N, Housset C, Marcelo P, et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 2010;10(5):1017-1028
- 22 Cancemi P, Albanese NN, DiCara G, et al. Multiple changes induced by fibroblasts on breast cancer cells. *Connect Tissue Res* 2010;51(2):88-104
- 23 Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(1):127-144