论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0148-04

丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白在健康人和系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中的差异表达

王林纤[1],戴 勇[2],彭武建[2],孙保东[2],齐素文[1],涂植光[1] (400016 重庆,重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室[1];518020 广东 深圳,广东省深圳市人民医院,暨南大学第二临床医学院临床医学研究中心[2])

【摘要】 **目的** 分析丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血单个核细胞中的表达水平,探讨该蛋白检测在系统性红斑狼疮病情判断中的可能应用。**方法** 实验分为3组:SLE稳定组、SLE活动组和健康对照组,每组6例,分别收集其外周血单个核细胞,用相对和绝对定量的等量异位标签串联质谱技术对丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白进行鉴定和相对定量分析,用Western blot技术对该蛋白的表达水平进行较大样本的独立验证。**结果** 基于质谱分析的蛋白组学结果表明,丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白在系统性红斑狼疮活动期患者外周血单个核细胞中表达显著下调(与正常人的相对比值为0.290 6),且该蛋白的低表达为Western blot实验进一步证实。临床资料分析表明,该蛋白的表达水平与系统性红斑狼疮疾病活动指数呈负相关($r=-0.607$, $P<0.05$)。**结论** 丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白可能参与SLE的发病,该蛋白有望作为系统性红斑狼疮的活动阶段特异性标志物。

【关键词】 丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白;系统性红斑狼疮;外周血单个核细胞;表达

【中图法分类号】 R341;R394.3;R593.241 【文献标志码】 A

Differential expression of serine-threonine kinase receptor-associated protein in healthy subjects and patients with systemic lupus erythematosus

Wang Linqian[1], Dai Yong[2], Peng Wujian[2], Sun Baodong[2], Qi Suwen[1], Tu Zhiguang[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Research Center of Clinical Medicine, Second Clinical Medical College, Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong Province, 518020, China)

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the expression level of serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP) in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and to investigate the possible application of STRAP test in evaluation of SLE. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were collected from 6 stable and 6 active SLE patients and 6 healthy controls, respectively. STRAP was first identified and quantified with isobaric tagging for relative and absolute protein quantification (iTRAQ) in combination with tandem mass spectrometry, and then confirmed by Western blotting in a larger independent sample size. **Results** Initial mass spectrometry-based proteomic analysis revealed that the STRAP level was significantly lower in active SLE patients than in healthy controls with a relative ratio of 0.290 6, which was further confirmed by Western blotting ($P<0.05$). Clinical data analysis disclosed that the expression level of STRAP in active SLE patients was negatively correlated with the SLE activity index ($r=-0.607$, $P<0.05$). **Conclusion** STRAP may be involved in the pathogenic process of SLE and can be used as a potential condition-specific indicator of active SLE.

【**Key words**】 serine-threonine kinase receptor-associated protein; systemic lupus erythematosus; peripheral blood mononuclear cells; expression

Supported by the Key Project for Science and Technology of Shenzhen City (201001001). Corresponding author: Tu Zhiguang, Tel: 86-23-68485759, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

【基金项目】 深圳市科技计划重点项目(201001001)

【通信作者】 涂植光,电话:(023)68485759,E-mail:tuzhiguang@yahoo.com.cn

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)是一种以多器官多系统损害为临床表现的自身免疫性疾病,其发病机制不明[1]。研究认为调节性 T 细胞(Treg)功能缺陷和淋巴细胞异常凋亡在 SLE 的发病中发挥了重要作用[2-3]。转化生长因子 β1(TGF-β1)可通过诱导 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞发挥免疫调节功能[4]。淋巴细胞中 TGF-β1 相关信号转导因子表达缺失与 SLE 的发病相关[5]。丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白(serine-threonine kinase receptor-associated protein,STRAP)相对分子质量约为 39×10^3,包含保守的色氨酸-天门冬氨酸 40(WD40)序列,主要存在于细胞质中,为重要的 TGF-β 信号抑制剂及细胞增生调节因子。STRAP 可与 TGF-β 受体Ⅰ和Ⅱ结合,逆向调节 TGF-β 的基因表达;STRAP 还可与 Smad7 结合,并与 TGF-β 受体形成稳定的异源复合体,从而阻止 Smad2 和 Smad3 的活化[6]。最新研究表明,STRAP 通过其 WD40 区域的第 4 和第 6 位氨基酸残基与凋亡信号调节激酶 1(apoptosis signal-regulating kinase 1,ASK1)的 C 末端结合,抑制 ASK1 调节的细胞凋亡[7]。STRAP 具有潜在的致癌作用,已经发现其在几种人体癌变组织中高表达[8-9]。但目前为止,尚少见 STRAP 与自身免疫性疾病关系的相关报道。本研究拟分析比较 SLE 患者外周血淋巴细胞中 STRAP 蛋白的表达水平,探讨该蛋白检测在 SLE 病情判断中的可能应用,并为探讨其在 SLE 发病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有病例来自深圳市人民医院风湿科 2009 年 3 月至 2010 年 4 月收治的 SLE 患者,健康对照者为医院正常体检的成年人。实验共分为 3 组,即 SLE 稳定组、SLE 活动组和健康对照组。SLE 的诊断依据 1982 美国 ACR(American College of Rheumatology)修订的诊断标准[10],包括初发病例和复发病例,其中初发病例均未使用激素或免疫抑制剂治疗,复发病例已停用激素或免疫抑制剂 3 个月以上。依照 SLE 疾病活动性指数(SLEDAI)[11] 积分,将积分≤8 的患者归为稳定组,积分 >8 的患者纳入活动组。用于 iTRAQ 标记定量蛋白质组学发现阶段(discovery stage)的研究对象包括 SLE 稳定组:女性 5 例,男性 1 例,年龄(33.67 ± 9.24)岁;SLE 活动组:女性 5 例,男性 1 例,年龄(31.83 ± 7.11)岁;健康对照组:女性 5 例,男性 1 例,年龄(34.17 ± 6.31)岁。用于 Western blot 验证阶段的研究对象包括 SLE 稳定组:女性 10 例,男性 1 例,年龄(34.18 ± 6.37)岁;SLE 活动组:女性 13 例,男性 1 例,年龄(31.79 ± 6.01)岁;健康对照组:女性 10 例,男性 1 例,年龄(33.18 ± 7.31)岁。经分析,各组资料除 SLE 相关指标外,其他指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 样本准备

静脉采集空腹 8 h 以上肝素锂抗凝全血约 10 ml,用 Lympholyte®-H 分离液(Cedarlane Laboratories,加拿大)分离外周血单个核细胞,用 M-PER® Mammalian 蛋白抽提试剂(Pierce,美国)抽提细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce,美国)测定蛋白浓度。所有步骤按厂家提供的操作说明书进行。

1.3 iTRAQ 标记

每组各取 100 μg 蛋白,加入 6 倍体积 -20 ℃预冷的丙酮沉淀过夜,蛋白样品经真空干燥后进行蛋白变性、还原、半胱氨酸封闭和胰酶消化,然后进行 iTRAQ 标记:iTRAQ114-健康对照组、iTRAQ115-SLE 稳定组、iTRAQ116-SLE 活动组。室温反应 1 h 后混合所有标记样品,真空干燥。除丙酮购自美国 Sigma 公司,胰酶购自美国 Promega 公司外,其他试剂均为 iTRAQ 标记试剂盒(Applied Biosystems,美国)组分,按厂家说明书操作。

1.4 iTRAQ 蛋白组学

①上述标记样品先进行强阳离子交换:用上样缓冲液(10 mmol/L KH_2PO_4,25% 乙腈,pH 3.0)将样品稀释 10 倍,上样至强阳性离子交换预装柱(35 mm × 0.3 mm,300 Å,3.5 μm,Zorbax Bio-SCX),用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪进行自动梯度洗脱,流速 20 μl/min。②进行反相液相色谱分离:洗脱各多肽组分经 Tempo™ LC MALDI 在线分离系统进行自动上样、反相洗脱和点靶。C18 反相柱规格(150 mm × 0.2 mm,200 Å,3 μm,Michrom Bioresources,美国)。流动相由 98% 乙腈和 0.1% TFA 组成,流速 2 μl/min,每块 MALDI 靶板可点样 380 个点左右。③进行质谱分析及数据库检索:用美国 AB 公司生产的 4800 Plus MALDI TOF/TOF 质谱仪进行多肽的串联质谱鉴定和相对定量分析。一级质谱激光激发 800 次,在阳离子模式下用反射模式进行检测,选择信噪比大于 40 的母离子做二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上最多选择 40 个母离子。二级 MS/MS 激光激发 1 600 次,碰撞能量 1 kV,碰撞诱导解离小室内的氮气压力维持在 2.0×10^{-4} Pa。用 AB 公司提供的 ProteinPilot™ 3.0 软件,对质荷比(m/z)为 114、115、116 的报告离子的峰面积积分进行相对定量分析。

1.5 Western blot 分析

Tris-HCl SDS/PAGE 胶浓度为 10.0%,外周血单个核细胞蛋白上样量为 100 μg,经电泳、转膜后,与鼠源 STRAP 单抗(Santa Cruz Biotechnology,美国)4 ℃孵育过夜,洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,ECL 化学发光试剂盒(Pierce,美国)检测,经 X 线片曝光显影,Gel Doc XR 凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)扫描条带灰度,并用仪器自带软件 Quantity One 分析处理,将图片上每个特异条带的灰度值数字化。同时以 GAPDH 为内参,用目的蛋白 STRAP 灰度值/内参 GAPDH 的灰度值校正误差,所得比值代表 STRAP 蛋白相对含量。

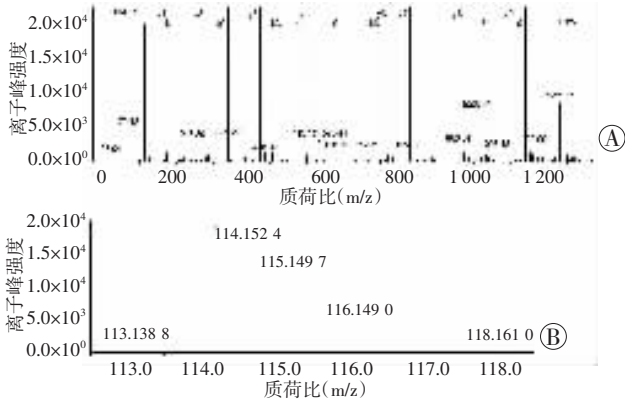
1.6 统计学分析

采用 IPI(International Protein Index,http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html) human V 3.62 蛋白数据库进行蛋白检索和鉴定[12],蛋白置信度设定为 >95% 或 ProtScore of >1.3,报告离子的相对比值≥2 为表达上调,≤0.5 为表达下调。采用 SPSS 13.0 统计软件,各组间 STRAP 表达水平差异及临床资料比较均采用单因素方差分析;STRAP 表达水平与 SLE 疾病活动指数相关性采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 STRAP 蛋白的鉴定及相对定量分析

用胰酶消化肽段二级质谱的 m/z 信号进行 IPI 数据库的检索和蛋白质鉴定，得到 STRAP 在 IPI 的标识号为 IPI00941907.1，蛋白置信度为99%（ProtScore 2.0）。STRAP 报告离子 115∶114、116∶114 和 116∶115 的相对比值分别为 0.708 9、0.290 6 和 0.409 6，表明与健康对照组（iTRAQ114）相比，STRAP 蛋白在 SLE 疾病活动组（iTRAQ116）中表达下调 3 倍多，与 SLE 稳定组（iTRAQ115）相比，其表达也下调 2 倍多。见图 1。

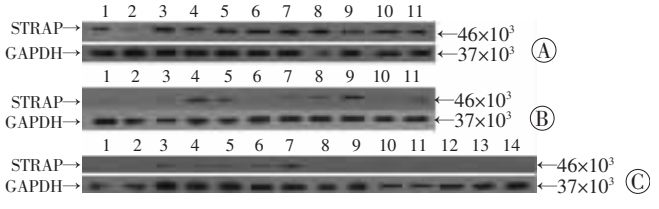


A：序列为 GHFGPIHCVR 的 STRAP 特异性多肽二级质谱产生的 b、y 碎片离子；B：iTRAQ 报告离子峰度（健康对照组-iTRAQ114，SLE 稳定组-iTRAQ115，SLE 活动组 iTRAQ116）

图 1 STRAP 酶解后的特异性多肽序列 GHFGPIHCVR 的二级质谱图及相应的报告离子相对峰度图

2.2 Western blot 检测

图 2 为来自 11 例 SLE 稳定期患者、14 例 SLE 活动期患者及 11 例健康对照者外周血单个核细胞中 STRAP 蛋白的 Western blot 条带灰度扫描照片。SLE 稳定组、SLE 活动组和健康对照组 STRAP 的相对含量 STRAP 灰度值/GAPDH 灰度值分别为（0.366 3 ± 0.174 5）、（0.207 7 ± 0.106 9）和（0.434 8 ± 0.142 9），SLE 活动组患者 STRAP 的表达水平均较 SLE 稳定组、健康对照组显著降低（$P<0.05$），而 SLE 稳定组与健康对照组相比无统计学差异（$P>0.05$）。



A：健康对照组 1～11；11 例健康对照者；B：SLE 稳定组 1～11：11 例SLE 稳定期患者；C：SLE 活动组 1～14：14 例 SLE 活动期患者

图 2 STRAP 蛋白的 Western blot 分析扫描灰度图

2.3 STRAP 表达水平与 SLEDAI 的相关性

STRAP 表达水平与 SLEDAI 呈负相关（$r = -0.607$，$P<0.05$）。

3 讨论

SLE 发病机制尚不明确，临床表现复杂，复发和缓解常交替出现。现有实验室诊断方法包括抗核抗体的检查等，无论是特异性还是敏感性都不能有效地满足临床需求，也没能较好地反应 SLE 活动情况的标志物来监测 SLE 的进程[13]。因此，寻找和发现新的能反应 SLE 进程的阶段特异性标志物，将有助于进一步阐明 SLE 的发病机制，为 SLE 的临床诊断、治疗和疗效监控提供新指标。

基于高度敏感性和精确性的串联质谱分析进行蛋白质定量的相关标记技术发展迅速，结合多维液相色谱，近几年，iTRAQ 技术已成为差异蛋白质组学定量研究主要工具之一，被用于多种疾病标志物的发现及疾病进程和预后分析[14-16]。鉴于淋巴细胞调节通路异常被认为广泛地参与 SLE 的病理过程[17-18]，我们用 iTRAQ 标记技术对 SLE 活动组和 SLE 稳定组外周血单个核细胞（主要成分为淋巴细胞）的蛋白质组学进行了分析比较，发现 STRAP 蛋白在 SLE 疾病活动组中表达下调 3 倍多；与 SLE 稳定组相比，其表达也下调 2 倍多。独立样本的 Western blot 实验进一步证实了该蛋白在 SLE 活动组中表达下调，且下调幅度与 iTRAQ 实验结果接近。

临床上，依据 SLE 疾病的严重程度而采取不同的治疗方案非常重要，但是目前还没有可靠的可用于 SLE 疾病活动性分析的生物标志物。本研究证明了 STRAP 在 SLE 活动期患者体内表达下调，且相关性分析结果显示，STRAP 在 SLE 患者中的表达水平与 SLE 疾病活动性指数呈负相关，相关系数为 -0.607，提示 STRAP 可能为 SLE 活动的负向调节因子，参与 SLE 疾病的缓解和复发过程，STRAP 有望作为临床上 SLE 疾病的活动性指标，评估 SLE 疾病的严重性。

STRAP 具有潜在的致癌作用，可促进癌细胞的增殖与分化，与 STRAP 蛋白在结肠癌、肺癌等多种癌变组织中高表达不同，我们检测出 STRAP 在 SLE 活动期表达下调，提示 STRAP 可能通过不同的途径或机制，参与自身免疫性疾病的发病。

STRAP 蛋白为 TGF-β 的负向调节因子。已有研究表明 TGF-β 与 SLE 密切相关。Zhang 等[19]报道自体造血干细胞移植治疗可诱导 SLE 患者体内生成新的 $CD8^+$ Treg 细胞，这类细胞具有自身抗原特异性和非特异性抑制活性，这种活性主要是 TGF-β 依赖。$CD8^+$ Treg 细胞可修复 SLE 患者调节性 T 细胞缺陷，保持患者真正的免疫缓解。TGF-β 亦可影响 Th17 细

胞的分化发育,导致自身抗体产物增多,加重 SLE 的炎症进程[20]。Lu 等[4]发现与正常对照组相比,SLE 患者外周血中 $CD4^+CD25^+$ Treg 数目及 $CD4^+CD25^+/CD4^+$ 值显著降低,细胞内 TGF-β1 水平显著增加。在本研究中,STRAP 在 SLE 疾病活动组出现低表达,这种低表达可能"削弱"其与 TGF-β 受体的结合,从而逆向调节 TGF-β 的活性,参与 SLE 的病理过程。

STRAP 还可与凋亡信号调节激酶 1 的羧基末端结合,抑制 ASK1 调节的细胞凋亡。ASK1 主要通过激活参与凋亡信号通路的 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)诱导细胞凋亡。Wong 等[21]近期报道,SLE 患者 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞中磷酸化 p38 MAPK 的基础表达水平,较正常人显著增高;在 IL-18 刺激的 $CD8^+$ T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞中磷酸化 JNK 表达水平亦显著升高,且增加的幅度与 SLE 疾病活动性指数呈显著正相关,表明炎性介质可激活 T、B 淋巴细胞内的 JNK 和 p38 MAPK 信号通路,导致淋巴细胞功能亢进,加重 SLE 过程中的病理损伤。本研究检测到 STRAP 在 SLE 活动期患者的淋巴细胞中出现低表达,提示可能存在这样一种发病机制:STRAP 为 ASK1 的抑制因子,淋巴细胞中 STRAP 表达降低,其抑制 ASK1 的能力减弱,ASK1 调节的凋亡活动加强,导致机体产生更多的自身抗原,自身反应性淋巴细胞被激活,自身免疫反应加强,最终导致 SLE 的发病与免疫病理损伤。

从 STRAP 相关途径入手,通过增加 STRAP 的表达水平,有可能缓解 SLE 病情,为 SLE 的治疗提供新途径。STRAP 有望作为 SLE 活动阶段的特异性标志物,为临床提供参考。

参考文献:

[1] Rahman A, Isenberg D A. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2008, 358(9): 929 - 939.

[2] La-Cava A. Lupus and T cells[J]. Lupus, 2009, 18(3): 196 - 201.

[3] Munoz L E, van-Bavel C, Franz S, *et al*. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2008, 17(5): 371 - 375.

[4] Lu L Y, Chu J J, Lu P J, *et al*. Expression of intracellular transforming growth factor-beta1 in $CD4^+CD25^+$ cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2008, 41(2): 165 - 173.

[5] Kohut E, Hajdu M, Gergely P, *et al*. Expression of TGF beta1 and its signaling components by peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus[J]. Pathol Oncol Res, 2009, 15(2): 251 - 256.

[6] Datta P K, Chytil A, Gorska A E, *et al*. Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor-beta signaling [J]. J Biol Chem, 1998, 273(52): 34671 - 34674.

[7] Jung H, Seong H A, Manoharan R, *et al*. Serine-threonine kinase receptor-associated protein inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 function through direct interaction[J]. J Biol Chem, 2010, 285(1): 54 - 70.

[8] Kim C J, Choi B J, Song J H, *et al*. Overexpression of serine-threonine receptor kinase-associated protein in colorectal cancers[J]. Pathol Int, 2007, 57(4): 178 - 182.

[9] Halder S K, Anumanthan G, Maddula R, *et al*. Oncogenic function of a novel WD-domain protein, STRAP, in human carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6156 - 6166.

[10] Tan E M, Cohen A S, Fries J F, *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11): 1271 - 1277.

[11] Gladman D D, Ibanez D, Urowitz M B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000[J]. J Rheumatol, 2002, 29(2): 288 - 291.

[12] Kersey P J, Duarte J, Williams A, *et al*. The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments[J]. Proteomics, 2004, 4(7): 1985 - 1988.

[13] Illei G G, Tackey E, Lapteva L, *et al*. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(6): 1709 - 1720.

[14] Matta A, DeSouza L V, Shukla N K, *et al*. Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2008, 7(5): 2078 - 2087.

[15] Hergenroeder G, Redell J B, Moore A N, *et al*. Identification of serum biomarkers in brain-injured adults: potential for predicting elevated intracranial pressure[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(2): 79 - 93.

[16] Culnan D M, Cooney R N, Stanley B, *et al*. Apolipoprotein A-Ⅳ: a putative satiety/antiatherogenic factor, rises after gastric bypass[J]. Obesity (Silver Spring), 2009, 17(1): 46 - 52.

[17] Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, *et al*. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2005, 38(5): 339 - 346.

[18] 游弋, 郝飞, 邓永健. 系统性红斑狼疮患者 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞 SLAM 基因的表达分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 207 - 209.

[19] Zhang L, Bertucci A M, Ramsey-Goldman R, *et al*. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing $CD8^+$ Treg cells are associated with immunological remission of lupus[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6346 - 6358.

[20] Nalbandian A, Crispin J C, Tsokos G C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(2): 209 - 215.

[21] Wong C K, Wong P T, Tam L S, *et al*. Activation profile of intracellular mitogen-activated protein kinases in peripheral lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Immunol, 2009, 29(6): 738 - 746.

(收稿:2010-07-09 修回:2010-08-30)
(编辑 王小宴)