DOI:10.16016/j.1000-5404.202009170

基于 TMT 和 PRM 技术的湿性年龄相关性黄斑变性泪液蛋白质组学研究

覃 珂,刘丹宁,周希瑗 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院眼科

[摘要] **目的** 研究未经诊治湿性年龄相关性黄斑变性(age related macular degeneration, AMD)患者的泪液蛋白质组学,绘制蛋白质图谱,筛选差异表达蛋白以鉴定潜在的生物标志物。**方法** 以2017年7月至2018年3月于重庆医科大学附属第二医院眼科门诊就诊的33例未经诊治湿性AMD(nAMD)患者和同时期及地点的30例排除眼底疾病的正常老年人泪液为对象,采用串联质谱标签法(tandem mass tag,TMT)对鉴定两组样本的差异表达蛋白进行定量,对所鉴定的差异表达蛋白进行生物信息学分析,并筛选出有潜在研究前景的候选蛋白,并使用平行反应监测(parallel reaction monitoring,PRM)技术靶向验证候选蛋白在人群泪液nAMD中的表达情况。**结果** 通过TMT相对定量蛋白质组学从未经诊治的湿性AMD患者和正常老年人的泪液中共定量到3 473个蛋白质,其中包含差异表达蛋白382个(122种蛋白上调,260种蛋白下调,$P<0.05$),通过GO功能富集分析和KEGG通路富集分析发现这些差异表达蛋白主要参与免疫反应和氧化应激的调节。选择MAOA、Transaldolase和LAMP-2作为潜在的生物标记物,并通过PRM成功验证到这3个候选蛋白的表达情况与TMT定量蛋白质组结果一致。**结论** 采用TMT相对定量结合PRM靶向验证技术能有效地筛选出湿性AMD与正常人泪液中的382个差异蛋白,并验证提供3种潜在的生物标记物。

[关键词] 湿性年龄相关性黄斑变性;泪液蛋白质组学;串联质谱标签;平行反应监测
[中图法分类号] R770.4;R774.5 [文献标志码] A

Tear proteomics in neovascular age-related macular degeneration based on TMT and PRM techniques

QIN Ke, LIU Danning, ZHOU Xiyuan Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the tear proteomics of treatment-naïve eyes with naïve neovascular age-related macular degeneration (nAMD) and screen differentially expressed proteins (DEPs) so as to identify potential biomarkers. **Methods** The tear samples of 33 untreated nAMD patients (16 females and 17 males, 70.53±10.56 years old) and another 30 healthy volunteers (16 females and 14 males, 66.64±8.46 years old, with no ocular fundus diseases) were harvested in our hospital from July 2017 to March 2018. Tandem mass tag (TMT) was performed to identify the DEPs, and the obtained proteins were further analyzed using bioinformatics to screen the candidate proteins with potential prospects. In addition, parallel reaction monitoring (PRM) was used to verify the expression of selected biomarkers in the tear samples of nAMD patients. **Results** A total of 3 473 proteins were identified and quantified from the tear samples of the two groups, including 382 DEPs, with 122 of them up-regulated and 260 down-regulated ($P<0.05$). Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis showed that these DEPs were mainly involved in the regulation of immune

[基金项目] 重庆市科学技术委员会(cstc2016jcyjA0122)
[通信作者] 周希瑗,E-mail:zhouxiyuan2002@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

response and oxidative stress. Among these proteins, monoamine oxidase A (MAOA), transaldolase (TAL) and lysosome associated membrane protein (LAMP-2) were selected as potential biomarkers, whose expressions were then successfully verified by PRM, indicating consistency with the quantitative proteomic results of TMT. **Conclusion** TMT relative quantification and PRM targeting verification effectively screen out 382 differential proteins from tear samples between nAMD patients and healthy population, and provide 3 potential biomarkers for nAMD diagnosis.

[**Key words**] age-related macular degeneration; tear proteomics; tandem mass tag; parallel reaction monitoring

Supported by the Project of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2016jcyjA0122). Corresponding author: ZHOU Xiyuan, E-mail: zhouxiyuan2002@aliyun.com

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是50岁以上人群失明的主要原因[1],且尚无治愈的方法。根据其眼底形态学诊断可分为干性和湿性两类,其中湿性AMD又称为新生血管性年龄相关性黄斑变性(neovascular age-related macular degeneration,nAMD),是造成AMD不可逆盲的最主要类型。从湿性AMD的病理机制推论,有效的早期筛查、早期预防将阻止患者视力不可逆下降,提高治疗效果,改善AMD致盲率高的现状。但目前湿性AMD患者常出现临床症状后才就诊,其缺乏有效的早期筛查及预防方法,因此临床上迫切需要寻找一种能够早期发现、早期预防湿性AMD新的筛选方法。

近年来,蛋白质组学的发展为许多疾病研究带来了新的思路,并为寻找疾病特异性蛋白标志物提供了可行的手段。串联质谱标签(tandem mass tag,TMT)技术是Thermo Scientific公司研发的一种基于体外等重同位素标记的相对与绝对定量技术,近年来在蛋白质组学研究中已广泛应用。而平行反应监测(parallel reaction monitoring,PRM)作为靶向蛋白质组学技术,其分辨率高、灵敏度高、兼具定性定量、可同时检测多个目的蛋白且不需要抗体,是一种理想的验证手段。

目前国内外对湿性AMD蛋白质组学研究主要集中在玻璃体液、玻璃膜疣、血浆及房水等,在泪液方面比较缺乏。泪液作为眼表循环的液体,容易采集且具有无创性,已有文献表明泪液蛋白质组学研究能够很好地反映眼部及系统性疾病的发展状况[2-3]。因此在湿性AMD患者的泪液中可能也存在可以反映机体分子调控水平改变的特异性蛋白标志物。本研究使用TMT技术对湿性AMD和正常人泪液进行蛋白质组学定量分析,筛选出差异表达蛋白,结合生物信息学分析筛选出潜在的生物标记物并使用PRM技术进行验证,进而为湿性AMD的早期诊断和治疗提供新的线索和思考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年7月至2018年3月于重庆医科大学附属第二医院眼科门诊就诊的湿性AMD患者33例66眼(16名女性,17名男性)作为试验组,年龄(70.53±10.56)岁。同时期及地点,选择排除眼底疾病的正常老年人30例60眼(16名女性,14名男性)作为对照组,年龄(66.64±8.46)岁。两组患者在性别构成以及年龄方面分布无明显差异。此项研究通过重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准(2018年科伦审第81号),所有纳入研究人员均被告知参加本研究,且签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 泪液样本收集 采用标准的Schirmer's试纸法[5](无表面麻醉)采集湿性AMD及正常对照人群泪液样本:准备1条5 mm×35 mm的消毒滤纸条,一端于5 mm处折成直角。将滤纸条折叠端放置于内侧1/3下穹隆处,长端悬挂于睑外,嘱受试者闭眼5 min。所有样本均由同一研究人员完成,并在收集过程中佩戴手套,滤纸条全程未与受试者皮肤接触。然后将滤纸条取下置于1.5 mL的无菌EP管中,并在-80 ℃冰箱中保存,统一测定。

1.2.2 蛋白提取、定量和肽段酶解 每组内样品随机按10~11个Schirmer strip试纸混合成一个生物学重复,装入15 mL离心管中。对照组和试验组各3个混样,依次标记为A1、A2、A3和B1、B2、B3。取混样后的样品加入没过试纸的SDT裂解液,常温放置30 min,每10 min涡旋混匀。吸出SDT裂解液后转移至1.5 mL离心管中,100 ℃加热15 min,超声100 W,10 s,10次,14 000 r/min 4 ℃离心30 min,取上清液为蛋白溶液。使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。每个样品取蛋白质20 μg,加入5×上样缓冲液,沸水浴5 min,12% SDS-PAGE电泳(恒压250 V,40 min),考马斯亮蓝染色。

https://doi.org/10.16781/j.cnki.1000-4718/cplt2021040

各样品取 30 μg 蛋白采用 FASP(filter aided proteome preparation)方法进行胰蛋白酶酶解,肽段定量[采用 nanodrop 测量仪器测定光密度 $D(280)$]。

1.2.3　TMT 标记和 High pH Reversed-Phase 肽段分级　　各样品分别取 100 μg 肽段,按照 Thermo 公司 TMT 标记试剂盒说明书进行标记。将每组标记后的肽段等量混合,采用 High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit 进行分级。

1.2.4　LC-MS/MS 数据采集　　使用纳升流速的 HPLC 液相系统 Easy nLC 对每份样品进行分离。用 Q-Exactive 质谱仪对色谱分离后的样品进行质谱分析。

1.2.5　蛋白质鉴定和定量分析　　用软件 Mascot2.2 和 Proteome Discoverer1.4 对原始数据进行查库鉴定及定量分析。

1.2.6　PRM 靶向蛋白验证　　每例样品取蛋白加 DTT 至终浓度 100 mmol/L,沸水浴 15 min 后冷却至室温,加入 200 μL UA buffer 混匀,转至 10 kD 超滤管中,离心 14 000×g 30 min。加入 200 μL UA buffer 离心 14 000×g 30 min,弃上清液。加入 100 μL IAA(50 mmol/L IAA in UA),600 r/min 振荡 1 min,避光室温 30 min,离心 14 000×g 20 min。加入 100 μL UA buffer,离心 14 000×g 20 min,重复 3 次。加入 100 μL NH_4HCO_3 buffer(50 mmol/L),离心 14 000×g 20 min,重复 2 次。加入 40 μL NH_4HCO_3 buffer(含 Trypsin),600 r/min 振荡 1 min,37 ℃下保存 16 h。更换新的收集管,离心 14 000×g 15 min。加入 40 μL NH_4HCO_3 buffer(50 mmol/L)离心 14 000×g 30 min,收集滤液。酶解后的肽段脱盐冻干,然后用 0.1%FA 复溶,$D(280)$测定肽段浓度。使用软件 Xcalibur 对适合 PRM 分析的肽段信息进行 PRM 方法设置。用 Q-Exactive HF 质谱仪(Thermo Scientific)对高效液相色谱分离后的样品进行 PRM 质谱分析。采用软件 Skyline 3.5.0 对 PRM 原始文件进行数据分析。

1.3　统计学分析

两组受试者年龄、性别差异比较采用 t 检验,数据采用 SPSS 21.0 系统软件处理。检验水准 $\alpha=0.05$。

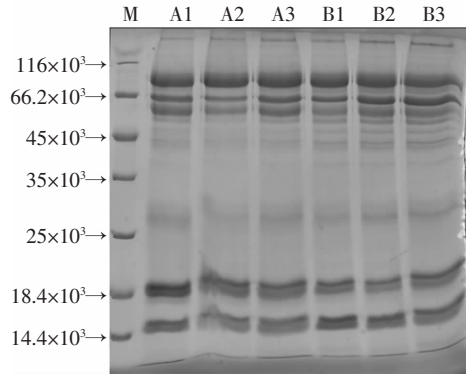
2　结果

2.1　蛋白质定量和 SDS-PAGE 电泳结果

样本混样后蛋白质定量以及 SDS-PAGE 电泳结果显示各组样品平行性较好,符合质谱上机标准(图 1)。

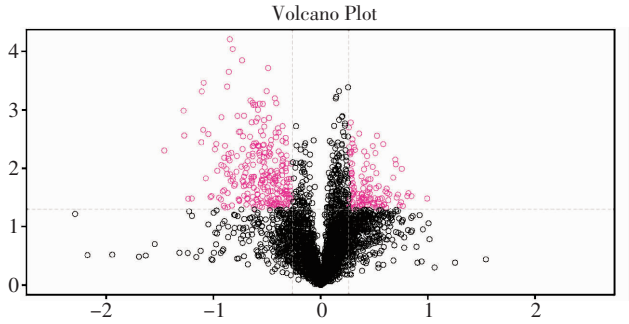
2.2　湿性 AMD 和正常人泪液蛋白差异情况

本研究在两组样本的泪液中共定量到蛋白质 3473 个。其中,以倍数变化大于 1.2 倍(上调大于 1.2 倍或者下调小于 0.83)且 $P<0.05$ 的标准筛选差异表达蛋白质,与正常组对比,湿性 AMD 患者泪液中表达上调的蛋白质数量为 122 个,表达下调的蛋白质数量为 260 个,表 1 中列出了所有的差异表达蛋白,红色为上调蛋白,绿色为下调蛋白。蛋白质定量结果统计以火山图形式进行展示(图 2),红色点表示显著性差异表达的蛋白质,黑色点表示无差异变化的蛋白。



M 为标准;A1 为对照组 1;A2 为对照组 2;A3 为对照组 3;B1 为试验组 1;B2 为试验组 2;B3 为试验组 3

图 1　SDS-PAGE 电泳结果



横坐标为差异倍数(以 2 为底数的对数变换),纵坐标为差异的显著性 P 值(以 10 为底的对数变换),图中红色点为显著性差异表达的蛋白,黑色点为无差异变化的蛋白

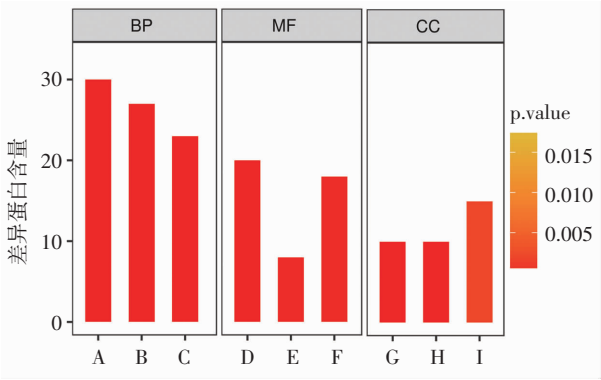
图 2　实验组/对照组火山图

2.3　生物信息学分析结果

利用 Blast2GO 软件对所有差异表达蛋白质进行 GO 分析,包括生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC),图 3 分别展示了三方面分析中排名前 3 的结果。结果表明 BP 分析中适应性免疫应答、补体激活;MF 分析中抗原结合,免疫球蛋白受体结合和丝氨酸水解酶活性;CC 分析中免疫球蛋白复合物和血液微粒,均发生了显著性变化。利用 KAAS(KEGG Automatic Annotation Server)软件对目标蛋白质集合进行 KEGG 通路注释,发现 Amphetamine addiction 通路发生了显著变化。在该通路详细示意图(图 1)中可发现,在本研究鉴定到的差异蛋白中,单胺氧化酶 A

http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

(MAOA)是参与该通路的重要蛋白。基于 STRING(http://string-db.org)数据库,使用 CytoScape(3.2.1)软件生成蛋白质互相作用网络图(protein-protein interaction network, PPI),发现乙醛脱氢酶 3A1(Aldehyde dehydrogenase family 3 member A1, ALDH3A1)连接程度最高(图 4)。



BP 为生物过程,MF 为分子功能,sCC 为细胞组分;BP 中变化最为显著的 A 为适应性免疫应答,B 为补体激活,C 为补体激活的经典途径;MF 中变化最为显著的 D 为抗原结合,E 为免疫球蛋白受体结合,F 为丝氨酸水解酶活性;CC 中变化最为显著 G 为循环的免疫球蛋白复合物,H 为免疫球蛋白复合物,I 为血液微粒

图 3 差异表达蛋白的 GO 分析

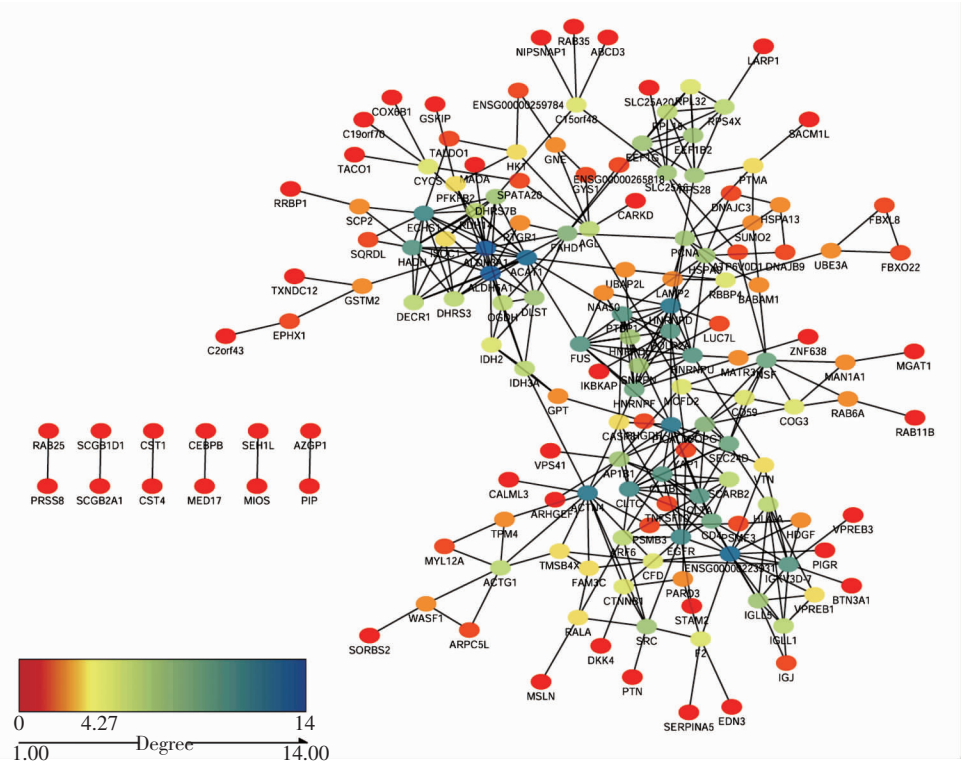
2.4 PRM 验证结果

根据生物信息学分析结果,我们选择参与了最显著变化的 Amphetamine addiction 通路的蛋白质 MAOA 进行验证。此外,根据文献以及蛋白质数据库(UniProtKB),按照表达变化倍数由高到低依次查找差异表达蛋白具有的潜在生物学功能和意义,选择转醛醇酶(transaldolase)、溶酶体膜蛋白 2(LAMP-2)作为潜在生物标记物进行验证。用 Skyline 软件对 3 种目标蛋白的 6 条目标肽段进行分析,目标肽段的定量结果见表 1。根据每个目标蛋白的对应肽段在不同样品组间的相对表达量,进一步计算得到目标蛋白在不同样品组中的相对表达量差异,并与 TMT 结果相比较,表 2 中可见 PRM 验证结果与 TMT 相对定量结果趋势一致。3 个目标蛋白的 PRM 相对定量结果分别见图 5。

表 1 目标肽段 PRM 验证分析结果

肽段序列	蛋白编号	蛋白名称	B/A
DVPAVEITHTFWER	P21397	MAOA	5.611
SYEPLEDPGVK	P37837	Transaldolase	2.627
ILDWHVANTDK	P37837	Transaldolase	1.501
LLGELLQDNAK	P37837	Transaldolase	2.432
LSSTWEGIQAGK	P37837	Transaldolase	2.308
VEEVGPYTYR	A0A1W2PPU6	LAMP-2	3.905

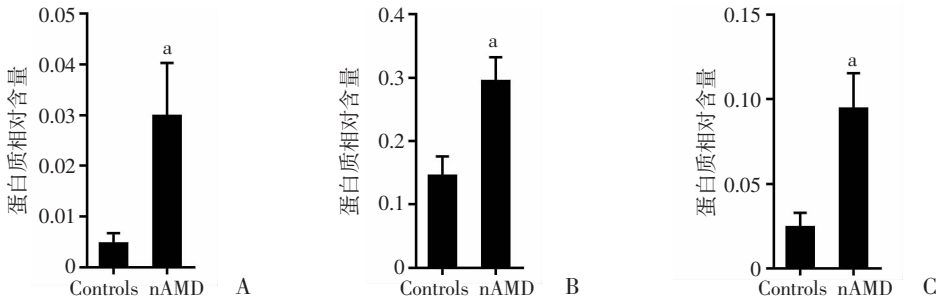
B:实验组;A:对照组



图中颜色愈接近蓝色提示该蛋白连接程度愈高,其中乙醛脱氢酶 3A1 连接程度最高

图 4 差异表达蛋白的蛋白质互相作用网络图

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



a: $P<0.05$,与 Controls 比较

图 5 MAOA(A)、Transaldolase(B)和 LAMP-2(C)的 PRM 验证结果

表 2 TMT 定量和 PRM 验证结果比较

蛋白名称	PRM 每组样品蛋白含量均值		PRM B 组/A 组[a]	TMT B 组/A 组
	A 组平均值	B 组平均值		
MAOA	0.004 7	0.026 5	5.610 8	1.418
Transaldolase	0.145 5	0.294 6	2.025 0	1.235
LAMP-2	0.024 2	0.094 5	3.904 9	1.485

B:实验组;A:对照组;a: $P<0.05$

3 讨论

湿性 AMD 作为目前主要致盲性眼病之一,仍无早期确诊及治愈方法。因此,寻找新的早期诊断及无创筛查手段迫在眉睫。目前,国内外对 AMD 蛋白质组学研究主要集中在血浆、房水、玻璃体和视网膜上[6-12],对泪液的蛋白质组学研究较为缺乏。泪液作为体表循环液体,易于获得且收集具有无创性,在一些眼部疾病的蛋白质组学中有所应用,是生物标志物研究的良好候选者。

本研究是对未经治疗的湿性 AMD 患者的泪液蛋白质组进行全面的分析,并探索该疾病潜在的泪液生物标志物。我们利用 TMT 蛋白相对定量技术,对湿性 AMD 患者和正常人群的泪液进行了蛋白质组学分析,共定量 3473 个蛋白质。其中,以倍数变化大于 1.2 倍(上调大于 1.2 倍或者下调小于 0.83)且 $P<0.05$ 的标准筛选差异表达蛋白质,与正常组对比,湿性 AMD 患者泪液中表达上调的蛋白质数量为 122 个,表达下调的蛋白质数量为 260 个。GO 功能分析提示差异表达蛋白主要在适应性免疫应答、补体激活等生物学过程,抗原结合等分子功能,免疫球蛋白复合物等细胞组分发生了显著性变化。其中,本研究鉴定的补体调节蛋白 CD59 表达显著下调,它的不足可引起补体系统过度激活,最终形成膜攻击复合体(membrane attack complex,MAC)。MAC 可以诱导 VEGF 等细胞因子释放,从而参与湿性 AMD 的发生发展[13]。已有研究表明,补体激活、炎症介质的合成与分泌和免疫复合物的堆积等与 AMD 的发生发展密切相关。但是本研究的 GO 分析提示补体激活和免疫应答等生物过程在湿性 AMD 患者泪液中富集程度低于正常人,与目前研究不一致,这很可能是由于眼球的免疫豁免。免疫豁免是眼内免疫的门槛,眼内血-视网膜屏障(blood-retinal barrier,BRB)可以将眼内与眼外的免疫系统隔绝,眼内微环境可以一定程度地限制免疫的异常反应,尽可能地保障眼内免疫稳定状态,从而导致泪液中免疫系统与目前研究趋势不一致的情况。因此,泪液中的免疫反应与湿性 AMD 的关系还需进一步研究。

PPI 分析结果提示在差异表达蛋白的互相作用网络图中,ALDH3A1 连接程度最高,其可能是影响整个系统代谢及信号转导的关键点。但是,已有研究表明[14],ALDH3A1 是一种主要在角膜中发挥作用的蛋白,它在维持角膜的正常结构和透明性方面起重要作用。在人类的角膜中,ALDH3A1 主要分布在角膜上皮和基质细胞,因此不选择其作为潜在生物标记物进行验证。KEGG 通路分析发现 Amphetamine addiction 通路发生了最显著变化。在本研究鉴定到的差异蛋白中,单胺氧化酶 A(MAOA)是参与该通路的重要蛋白。此外,根据文献以及蛋白质数据库(UniProtKB),按照表达变化倍数由高到低依次查找差异表达蛋白具有的潜在生物学功能和意义,筛选出 Transaldolase 和 LAMP-2 作为潜在生物标记物进行 PRM 靶向蛋白验证,发现其与 TMT 结果一致,提示结果可靠。

单胺氧化酶 A(MAOA)是几乎所有哺乳动物组织中线粒体外膜上的含黄素酶,其在生物体内主要参与生物活性单胺类物质如 5-HT、多巴胺等的代谢灭活。MAOA 的过度活跃可导致生物胺的减少,并导致氧自由基的过量产生,从而导致氧化应激和神经毒性。ZUO 等[15]鉴定了大鼠眼中 MAOA 的活性,发现其在

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

视网膜中活性比在巩膜中低。CAO 等[16]分析了幼龄和老年大鼠的 MAOA 活性,发现大鼠眼中胺代谢酶活性的变化可能对它们衰老引起的功能变化产生影响。NEBBIOSO 等[17]研究了视神经中 MAOA 随年龄相关的变化,发现随着年龄增加 MAOA 的表达和活性均呈上升趋势。正如研究[18]所证明的,单胺氧化酶显示出显著的年龄依赖性增加,并在神经退行性疾病中起着重要作用。目前尚未有 MAOA 在湿性 AMD 的文献研究,通过本实验发现,MAOA 在湿性 AMD 患者的眼泪中表达显著上调,其可能通过调控 Amphetamine addiction 通路,引起氧化应激增加,从而参与湿性 AMD 的发生发展,可作为潜在的生物标记物进一步研究。

转醛醇酶(TAL)是戊糖-磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)中非氧化阶段重要的关键酶,主要通过调控 PPP 途径氧化和非氧化阶段之间的平衡,从而调控 PPP 途径的两大产物:5-磷酸核糖和 NADPH。其中,NADPH 广泛参与生物体内多种代谢反应,充当共氢体和还原当量的角色,可维持谷胱甘肽(GSH)保持还原状态。因此,TAL 是生物新陈代谢所必需的。已有研究表明[19-22],TAL 对 HIV 引起的氧化应激、白血病、神经多发性硬化、恶性肿瘤和细胞凋亡等疾病和病理过程中有着重要作用。BANKI 等[23]发现 TAL 的过表达降低了 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)的活性,从而减少了 NADPH 和谷胱甘肽(GSH)的产生,并增强了人 Jurkat 白血病 T 细胞系的氧化应激。其中,还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞质中一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸残基组成的三肽,是细胞内抗氧化系统的重要组成部分。已有研究表明[24],GSH 在视网膜光损伤中起着重要的保护作用,它可以保护细胞免受过量脂质过氧化损伤。因此 TAL 可能通过减少 NADPH 的产生使氧化型 GSH 还原障碍,从而使视网膜失去保护层。此外,AMD 的组织病理学研究表明,患病早期黄斑病变区的光感受器就受到不同程度的损害。视锥细胞生长因子(RdCVF)是一种硫氧还蛋白样蛋白,CRONIN 等[25]发现 RdCVFL 的氧化会导致光感受器功能障碍和对氧化应激的易感性增加。而 NADPH 是硫氧还蛋白还原酶的辅助因子,对于还原 RdCVFL 是必需的,RdCVFL 一旦被氧化,就只能被硫氧还蛋白还原酶还原[26]。因此,我们推测 TAL 可能通过调节 PPP 途径影响 NADPH 的产生,引起下游细胞因子表达变化并导致氧化应激从而参与湿性 AMD 的发生发展。本研究发现 TAL 在湿性 AMD 患者的眼泪中表达显著上调,这与先前研究的结论一致,具有深入研究的价值。

溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP-2)是溶酶体膜蛋白的一种固有成分,由 3 个结构域构成:溶酶体腔内结构域、跨膜区和细胞质结构域,在人体中分为 3 中亚型:LAMP-2A、LAMP-2B 和 LAMP-2C。已有研究发现,LAMP-2 不仅是溶酶体的结构蛋白,其在肿瘤侵袭和转移、自噬体形成、吞噬体成熟和抗原提呈等[27-29]生物过程中起着重要作用,是生物体内不可或缺的蛋白。但是,目前 LAMP-2 在湿性 AMD 中的研究尚为缺乏。华夏等[30]研究了 LAMP-2 在年龄相关性白内障中表达情况,发现 LAMP-2 很有可能在年龄相关性疾病中可能发挥作用。PRIORE 等[31]发现随着年龄的增长,黄斑区视网膜色素上皮层(RPE)细胞的凋亡也增加。研究提示 RPE 细胞中溶酶体系统与年龄呈正相关,年龄的增加激活了溶酶体系统,导致 RPE 细胞受损。因此,LAMP-2 作为溶酶体的标志物,其表达升高可能与年龄相关性疾病以及 RPE 细胞受损密切相关。此外,自噬在 AMD 的发病机制中占有重要的位置[32]。研究表明[33],自噬的异常可降低 RPE 细胞吞噬光感受器外节(photoreceptor outer segment,POS)的能力以及降解大分子物质及代谢产物的能力,最终对 RPE 组织造成年龄相关的退行性病变,促进 AMD 的发生发展。而根据物质进入溶酶体的方式,自噬可分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA)。其中,LAMP-2A 作为溶酶体膜受体结合分子伴侣识别的蛋白质复合物参与 CMA 过程,是目前监测 CMA 的重要蛋白。本研究发现 LAMP-2 在湿性 AMD 患者的泪液中表达显著上调,推测其反映了溶酶体的变化,并可能通过影响自噬从而参与湿性 AMD 的发生发展,其为湿性 AMD 的机制研究提供一个重要的研究方向。

综上所述,本研究使用 TMT 相对定量结合 PRM 靶向验证技术,对未经诊治的湿性 AMD 患者的泪液进行蛋白质组学研究,绘制出湿性 AMD 患者完整泪液蛋白质图谱,弥补了目前湿性 AMD 蛋白质组学在泪液方面探究的空白,并选择 MAOA、Transaldolase 和 LAMP-2 作为潜在的生物标记物进行验证,从而为探索湿性 AMD 的发生机制提供新方向,为寻找其潜在生物标记物和早期诊断提供新线索。

参考文献:

[1] BRANDL C, BREINLICH V, STARK K J, *et al*. Features of age-related macular degeneration in the general adults and their dependency on age, sex, and smoking: results from the German KORA study[J]. PLoS ONE, 2016, 11(11): e0167181. DOI: 10.1371/journal.pone.0167181.

[2] VON THUN UND HOHENSTEIN-BLAUL N, FUNKE S,
http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20210414.0...

GRUS F H. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases[J]. Exp Eye Res, 2013, 117: 126-137. DOI: 10.1016/j.exer.2013.07.015.

[3] KIM H J, KIM P K, YOO H S, *et al*. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients[J]. Clin Biochem, 2012, 45(1/2): 60-67. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006.

[4] REMINGTON S G, CROW J M, NELSON J D. Antibodies to endogenous tear protein in normal human tears[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(10): 819-823. DOI: 10.3109/02713680903108531.

[5] NORDGAARD C L, BERG K M, KAPPHAHN R J, *et al*. Proteomics of the retinal pigment epithelium reveals altered protein expression at progressive stages of age-related macular degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(3): 815-822. DOI: 10.1167/iovs.05-0976.

[6] ETHEN C M, REILLY C, FENG X, *et al*. The proteome of central and peripheral Retina with progression of age-related macular degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(6): 2280-2290. DOI: 10.1167/iovs.05-1395.

[7] CRABB J W, MIYAGI M, GU X, *et al*. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 14682-14687. DOI: 10.1073/pnas.222551899.

[8] SAKAMOTO S, TAKAHASHI H, TAN X, *et al*. Changes in multiple cytokine concentrations in the aqueous humour of neovascular age-related macular degeneration after 2 months of ranibizumab therapy[J]. Br J Ophthalmol, 2018, 102(4): 448-454. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-310284.

[9] KANG G Y, BANG J Y, CHOI A J, *et al*. Exosomal proteins in the aqueous humor as novel biomarkers in patients with neovascular age-related macular degeneration[J]. J Proteome Res, 2014, 13(2): 581-595. DOI: 10.1021/pr400751k.

[10] CABRAL T, LIMA L H, MELLO L G M, *et al*. Bevacizumab injection in patients with neovascular age-related macular degeneration increases angiogenic biomarkers[J]. Ophthalmol Retin, 2018, 2(1): 31-37. DOI: 10.1016/j.oret.2017.04.004.

[11] IANNACCONE A, GIORGIANNI F, NEW D D, *et al*. Circulating autoantibodies in age-related macular degeneration recognize human macular tissue antigens implicated in autophagy, immunomodulation, and protection from oxidative stress and apoptosis[J]. PLoS ONE, 2015, 10(12): e0145323. DOI: 10.1371/journal.pone.0145323.

[12] XU X R, ZHONG L, HUANG B L, *et al*. Comparative proteomic analysis of plasma proteins in patients with age-related macular degeneration.[J]. Int J Ophthalmol, 2014, 7: 256-263. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.02.12.

[13] RAMO K, CASHMAN S M, KUMAR-SINGH R. Evaluation of adenovirus-delivered human CD59 as a potential therapy for AMD in a model of human membrane attack complex formation on murine RPE[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(9): 4126. DOI: 10.1167/iovs.08-2025.

[14] ESTEY T, CANTORE M, WESTON P A, *et al*. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(7): 4382-4392. DOI: 10.1074/jbc.m607546200.

[15] ZUO D M, YU P H. Semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase in rat brain microvessels, meninges, Retina and eye sciera[J]. Brain Res Bull, 1994, 33(3): 307-311. DOI: 10.1016/0361-9230(94)90198-8.

[16] CAO DANH H, STROLIN BENEDETTI M, DOSTERT P, *et al*. Age-related changes in monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase activities of rat aorta[J]. J Pharm Pharmacol, 1985, 37(5): 354-357. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1985.tb05083.x.

[17] NEBBIOSO M, PASCARELLA A, CAVALLOTTI C, *et al*. Monoamine oxidase enzymes and oxidative stress in the rat optic nerve: age-related changes[J]. Int J Exp Path, 2012: 93(6): 401-405. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2012.00832.x.

[18] THOMAS T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimers disease[J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(2): 343-348. DOI: 10.1016/s0197-4580(00)00100-7.

[19] BANKI K, HUTTER E, GONCHOROFF N J, *et al*. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling[J]. J Immunol, 1999, 162: 1466-1479.

[20] ESPOSITO M, VENKATESH V, OTVOS L, *et al*. Human transaldolase and cross-reactive viral epitopes identified by autoantibodies of multiple sclerosis patients[J]. J Immunol, 1999, 163(7): 4027-4032.

[21] COLOMBO E, BANKI K, TATUM A H, *et al*. Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis[J]. J Clin Invest, 1997, 99(6): 1238-1250. DOI: 10.1172/jci119281.

[22] LACHAISE F, MARTIN G, DROUGARD C, *et al*. Relationship between posttranslational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV-sensitive repair-deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(12): 1365-1373. DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00532-9.

[23] BANKI K, HUTTER E, GONCHOROFF N J, *et al*. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

transaldolase[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 11944-11953. DOI: 10.1074/jbc.273.19.11944.

[24] CAI J Y, NELSON K C, WU M, *et al*. Oxidative damage and protection of the RPE[J]. Prog Retin Eye Res, 2000, 19(2): 205-221. DOI: 10.1016/s1350-9462(99)00009-9.

[25] CRONIN T, RAFFELSBERGER W, LEE-RIVERA I, *et al*. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(7): 1199-1210. DOI: 10.1038/cdd.2010.2.

[26] HOLMGREN A. Thioredoxin and glutaredoxin: general aspects and involvement in redox regulation[M]//Regulation of Photosynthesis. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001: 321-330. DOI: 10.1007/0-306-48148-0_19.

[27] SASAKI M, MIYAKOSHI M, SATO Y, *et al*. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis[J]. Lab Invest, 2010, 90(6): 835-843. DOI: 10.1038/labinvest.2010.56.

[28] ESKELINEN E L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(5/6): 495-502. DOI: 10.1016/j.mam.2006.08.005.

[29] SCHNEEDE A, SCHMIDT C K, HÖLTTÄ-VUORI M, *et al*. Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(2): 280-295. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00973.x.

[30] 华夏, 孙慧敏, 苑晓勇, 等. IGFBP-5 和 Lamp-2 在年龄相关性白内障和透明晶状体上皮细胞的蛋白表达[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(6): 1287-1290.
HUA X, SUN H M, YUAN X Y, *et al*. Protein expression of IGFBP-5 and Lamp-2 in lens epithelia of age-related cataracts and transparent lenses[J]. Int J Ophthalmol, 2006, 6(6): 1287-1290.

[31] PRIORE L V D, KUO Y H, TEZEL T H. Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 3312-3318. DOI: 10.1007/s00417-002-0538-z.

[32] MITTER S K, SONG C J, QI X P, *et al*. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD[J]. Autophagy, 2014, 10(11): 1989-2005. DOI: 10.4161/auto.36184.

[33] KEVANY B M, PALCZEWSKI K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors[J]. Physiology, 2010, 25(1): 8-15. DOI: 10.1152/physiol.00038.2009.

(收稿:2020-09-20;修回:2020-12-08)

(编辑 张 维)

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/