技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)07-1043-05

增殖性糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿玻璃体蛋白质组学初步研究

李 琦,张 雯,张学东
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:对增殖性糖尿病视网膜病变(Proliferative diabetic retinopathy,PDR)伴重度黄斑水肿的玻璃体蛋白质组学变化进行初步研究。方法:收集 27 例 PDR 伴重度黄斑水肿及 9 例健康人的玻璃体液,用双向凝胶电泳(2-DE)的方法得到 2-DE 图谱,PDQuest7.3.1 软件对比图谱,获得差异蛋白点。将差异蛋白点取出、酶解后,用表面增强激光解吸离子化 - 飞行时间质谱的方法对玻璃体差异蛋白质进行初步鉴定,得到肽质量指纹图,采用 Mascot 和 MS-Fit 软件进行数据检索,找到差异蛋白。结果:PDR 伴重度黄斑水肿的玻璃体和正常人玻璃体的蛋白质图谱 PDQuest 软件比较,蛋白点强度相差 2 倍以上且有统计学意义($P<0.01$)的共有 30 个,其中 20 个蛋白点上调,10 个蛋白点下调。选取上调最明显的 10 个蛋白点进行质谱分析和数据库的检索及鉴定,其中 4 个明显差异的蛋白质即 11- 视黄醇结合蛋白、18- 载脂蛋白 D、20- 载脂蛋白 AIV、28- 甲状腺激素结合蛋白。结论:初步建立 PDR 伴重度黄斑水肿的玻璃体的蛋白质 2-DE 图谱。其蛋白质组发生了改变,本研究发现有四种蛋白质明显增加。

【关键词】增殖性糖尿病视网膜病变;重度黄斑水肿;载脂蛋白
【中国图书分类法分类号】R774 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-04

Proteomic analysis of vitreous from Proliferative diabetic retinopathy with heavy macular edema

LI Qi, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify and analyze proliferative diabetic retinopathy with heavy macular edema-related proteins in the vitreous. *Mehtods*: The vitreous samples of 27 eyes active proliferative diabetic retinopathy with heavy macular edema patients with 9 normal eyes vitreous samples were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis then compared the 2-DE map with PDquest to find the disparation proteins spots. The spots were extracted and been enzymolysis and progressing mass spectrogram identification. Then according the results of Peptide Mass Finger printing (PMF) to find the disparation proteins by searching internet using Mascot and Ms-Fit. One sample of the each group was enrolled to identify disparation proteins by Western blot. *Results*: At least 30 proteins were up regulated or down-regulated by over two folds between two groups. 20 protein spots up regulated and 10 down- regulated .Four proteins (apolipoprotein A-IV precursor, Transthyretin precursor, apolipoprotein D, Retinol-binding protein I, cellular) in the 20 spots were expressed significantly differently between the normal and PDR with heavy macular edema patients. The four proteins were up regulated in the diabetic retinopathy with macular edema patients. *Conclusions*: We constructed vitreous protein profiles for proliferative diabetic retinopathy with heavy macular edema patients and identified four candidate proteins believed to be involved in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy with heavy macular edema.

【Key words】Proliferative diabetic retinopathy; Heavy macular edema; Apolipoprotein

蛋白质组指"一种基因组所表达的全套蛋白质",即包括一种细胞乃至一种生物所表达的全部蛋白质。蛋白质组的研究不仅能为理解生命活动规律提供物质基础,也能为众多疾病机理的阐明及攻克提供理论根据和解决途径。通过对正常个体及病理个体间的蛋白质组比较分析,可以找到某些"疾病相关特异性的蛋白质分子",它们可成为新药物设计的分子靶点,或者为疾病的早期诊断提供分子标志[1]。

糖尿病视网膜微血管病变是糖尿病人失明的首要原因,其发病人数随糖尿病发病人数的增加而逐年上升。患病

作者介绍:李 琦(1972-),女,硕士,
研究方向:眼底病、青光眼。
通讯作者:张学东,女,教授,E-mail:172349521@qq.com。
基金项目:重庆市卫生局科研基金(编号:2008-2-36)。

五年后,25%的患者会发生糖尿病视网膜病变,15 年后,高达75%~80%的患者有视网膜的病变。黄斑水肿更加重了视力损害,但其发病机理尚未阐明。本研究应用蛋白质组学方法观察增殖性糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿的玻璃体蛋白质表达变化,寻找特异性的靶蛋白,为研究糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿的发生、发展及药物干预提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组:所有病人均选自我院需行玻璃体腔注射曲安耐德的患者,经眼底检查、眼底荧光血管造影,相关光断层成像等检查确诊为增殖期糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿(按照 2002 年糖尿病视网膜病变国际临床分型和黄斑水肿的分期标准分型)。共 15 人,27 眼。男性 7 人,女性 8 人。病人年龄 30~66 岁,糖尿病病程长于 5 年。排除其他眼病如葡萄膜炎、青光眼等。

对照组:健康的捐献者共 9 眼。男性 7 人,女性 2 人。病人年龄 33~48 岁,没有肝功和肾功异常,无糖尿病史。

样本收集:实验组:眼部表面麻醉后,用 1 ml 空针号针头,在角膜缘后 4 mm,睫状体平坦部抽出约 0.2 ml 的玻璃体液;对照组:眼在捐献者死后 24 h 内抽取玻璃体液。

1.2 样品处理

由于玻璃体内的蛋白含量低,我们将收集的实验组 27 管 0.2 ml 的玻璃体液,随机将 3 管混合成 1 个 0.6 ml 的玻璃体液样品,将收集的对照组 9 管 0.2 ml 的玻璃体液,随机将 3 管混合成 1 个 0.6 ml 的玻璃体液样品。抽出的玻璃体液均保存在 -80℃的冰箱中。每次从冰箱取出研究对象的玻璃体液,冰浴 10 min,带玻璃体完全变为液体后,低温离心 5 min(参数:4 摄氏度,1 500 r/min),取上清液,向上清液中加入 4 倍体积的样品裂解液,4℃静置 2 h,4℃离心 14 000 g/min,30 min,小心吸取上清液,弃沉淀,得到的上清液即为最初的人玻璃体液总蛋白质溶液。

1.3 蛋白质浓度检测(Bradford 法)

制作标准曲线:严格按蛋白质测定试剂盒说明书操作,2 标准蛋白浓度测定:取适量的待测蛋白溶液,稀释 5 倍使其浓度位于标准曲线范围内。为消除与标准曲线之间的影响因素,也加入 PBS (Phosphate buffered saline)缓冲液也进行稀释,充分漩涡混匀,加入 96 孔板,并做复孔,静置 5 min 使其充分反应,测定 A_{595} 值,重复 3 次取平均值。根据标准曲线计算蛋白样品的浓度。

1.4 双向凝胶电泳

采用 Bio-Rad 公司商品化的 IPG 干胶条(pH 4~7,17 cm)进行 1 向 IPG-IEF。先行 IPG 胶条再水化(rehydration),在Bio-Rad 公司的 PROTEAN IEFCELL 等电聚焦系统中进行,采用胶内水化的方式。进行平衡后,行垂直平板十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。

双向电泳凝胶用图像扫描仪透射扫描,光学分辨率为 600 dpi,灰度设置 input level 为(0、0.9、255),output level 为(0,255),存储为 TIF 格式。利用 Bio-Rad 公司的 PDQUEST8.0 软件对凝胶进行分析,分析过程包括:①通过蛋白质点自动检测和手工标记取点获得蛋白质点检测图;②利用背景扣除削减部分背景条纹;③进行第一向等电点校正和第二向分子量校正;④选取一张凝胶图作为参考凝胶,其余图谱与之比较,生成凝胶分析报告,并进行手工修正,从凝胶分析报告可以获得蛋白点的等电点和分子量,蛋白质的表达量及凝胶之间点的匹配率最终检测出差异表达的蛋白点。蛋白质量的比较以每个蛋白点在整个胶图中所占体积百分数来衡量,可以消除蛋白量不同造成的误差。

1.5 质谱分析

选择切取有差异的蛋白质点,行脱色、酶解、萃取样品、上质谱等处理后,将得出的数据行数据库检索:使用国际互联网上的蛋白质数据库经表面增强激光解吸离子化 - 飞行时间质谱分析后得到的肽质量指纹谱(Peptide mass fingerprinting,PMF)数据,使用互联网上的蛋白质数据库 SWISS-PORT (http://www.matrixscience.com)提供的 MASCOT 软件和 http://prospector.ucsf.edu 提供的 MS-fit 软件查询。根据样品及质谱仪器种类等实际情况,设定检索参数及检索范围,等电点和分子量范围一般不设定,必要时在 MS-fit 软件中限定。按照 Christopher Gerner 的观点[2],PMF 查询后,以下条件可作为鉴定蛋白质的标准:(1)至少 8 个肽段匹配;(2)序列覆盖率 20%以上;(3)检索分子量 / 等电点与实验数据基本吻合;(4)鉴定蛋白质分数与其他蛋白质差异显著。

2 结 果

2.1 Bradford 法的蛋白浓度测定

根据标准曲线和所的标本 A_{595} 值,计算蛋白量,再按稀释倍数计算标本的浓度。糖尿病视网膜病变的玻璃体蛋白的浓度范围 0.2~0.5 mg/ml、正常人玻璃体蛋白的浓度范围 0.05~0.2 mg/ml。

2.2 2-DE 的结果

在多次重复的操作后,得到了分辨率较高、重复性较好的增殖性糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿(图 1)和正常人的玻璃体蛋白质(图 2)的双向电泳图。利用 Bio-Rad 公司的 PDQUEST8.0 软件对凝胶进行分析,从凝胶分析报告可以获得蛋白点的等电点 pI 值为 4~7 和相对分子质量为 17~200 kD 之间均有分布。其中高丰度蛋白点主要分布于分子量 19~50 kD、PI 5~7 范围内。蛋白质的表达量大,约有 461 点。实验组的凝胶之间点的匹配率 75%。最终检测出差异表达 30 个蛋白点强度相差 2 倍以上且有统计学意义($P<0.01$)。有 20 个蛋白点上调,10 个蛋白点下调。

2.3 差异蛋白的质谱鉴定及生物信息学分析

我们选取上调的 10 个点做质谱分析，按照 Christopher Gerner 的标准鉴定蛋白质，目前有 4 个蛋白点得到了初步的鉴定：11- 视黄醇结合蛋白（图 2~4）、18- 载脂蛋白 D（图 5、6）、20- 载脂蛋白 AIV（图 7、8）、28- 甲状腺激素结合蛋白（图 9、10）。

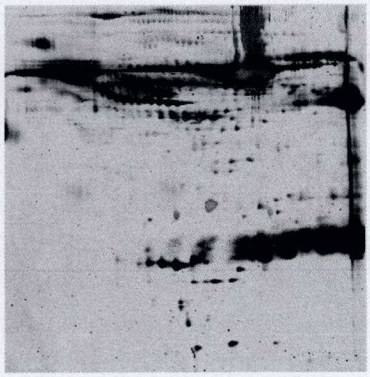


图 1 正常人玻璃体蛋白质 2-DE

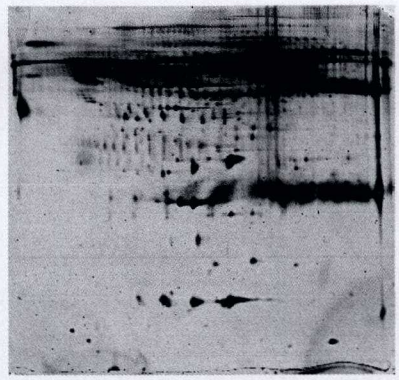


图 2 增殖糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿玻璃体蛋白质组 2-DE

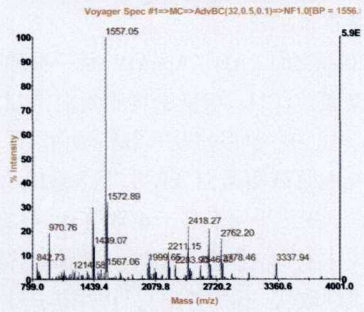


图 3 11- 视黄醇结合蛋白 PMF 图谱

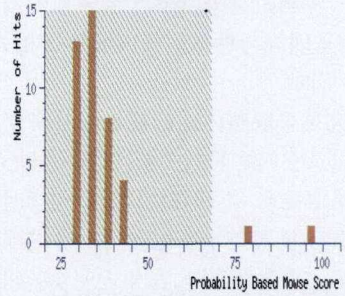


图 4 11- 视黄醇结合蛋白 Mascot 检索鉴定结果

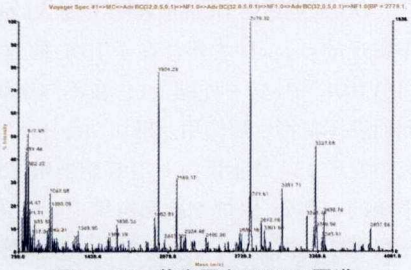


图 5 18- 载脂蛋白 DPMF 图谱

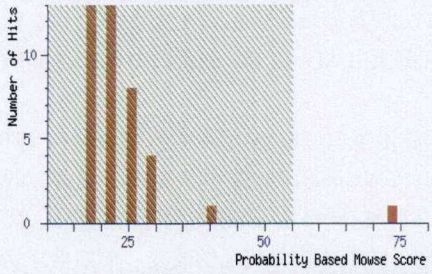


图 6 18- 载脂蛋白 DMascot 检索鉴定结果

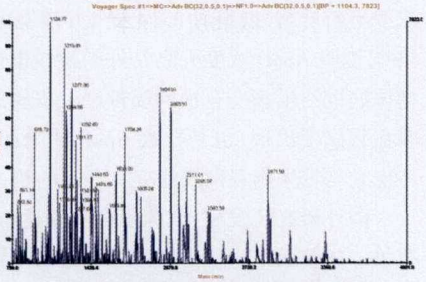


图 7 20- 载脂蛋白 AIVPMF 图谱

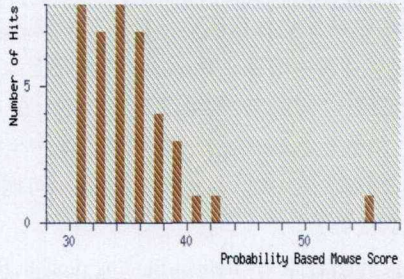


图 8 20- 载脂蛋白 AIVMascot 检索鉴定结果

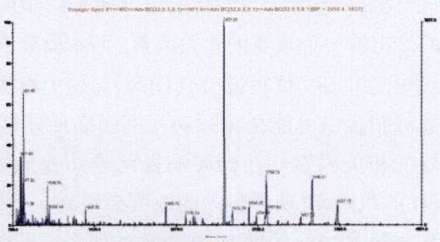


图 9 28- 甲状腺激素结合蛋白 PMF 图谱

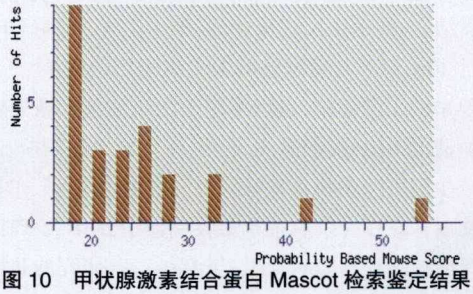


图 10 甲状腺激素结合蛋白 Mascot 检索鉴定结果

表 1 差异蛋白的鉴定结果

点的位置	蛋白质	匹配率	蛋白库位置	查阅线路	分子量和等电点
1	RBPI	45%~72%	P09455	Mascot/MS-fit	15850/5.0
4	TTR	30%~48%	P02766	Mascot/MS-fit	15887/5.0
8	ApoD	34%~56%	P05090	Mascot/MS-fit	21276/5.5
10	ApoIV	61%	P06727	Mascot/MS-fit	45399/5.3

3 讨 论

糖尿病视网膜病变（Diabetic retinopathy，DR）是糖尿病严重的并发症，是一种复杂的多基因病，目前已成为致盲的首要原因[3]。经典理论认为，视网膜微血管的改变是 DR 的最基本的病理变化。部分国外学者从基因组学研究，认为醛糖还原酶基因和脂蛋白 A 基因、TNF 基因、肾素血管紧张素系统基因、对氧磷脂酶基因等与糖尿病视网膜病变相关，但在不同的人群，相关性不同[4-6]。

蛋白质组学研究是采取整体论的观点同时研究成千上万个基因或蛋白质以及它们之间的关系，其技术核心是双向凝胶电泳和蛋白质鉴定技术。本研究应用蛋白组学对增殖性糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿患者与正常捐献眼玻璃体的蛋白质组进行了初步差异分析。结果表明实验组有 4 个差异蛋白与糖尿病视网膜病变有关：28- 甲状腺激素结合蛋白 TTR 和 11- 视黄醇结合蛋白属于炎性因子和急性反应时相蛋白，20- 载蛋白 AIV 和 18- 载蛋白 D 属于与脂肪代谢相关蛋白。

转甲状腺素蛋白（28- 甲状腺激素结合蛋白 TTR）又称为前白蛋白（Prealbumin，PA）是甲状腺素与视黄醇的转运蛋白，其主要在肝脏、脉络丛、胰腺的内分泌腺合成，代谢周期短，可敏感地反映机体营养状况的改变。前期糖尿病病人的血清蛋白质组研究发现其 TTR 较正常人有增高[7]。我们在研究中也发现增殖糖尿病视网膜病变伴重度黄斑水肿的玻璃体中存在 TTR，且表达增强。Toyofumi 的研究提示糖尿病视网膜病变的玻璃体均有 TTR 的浓度差异存在[8]。在 PDR 病人的视网膜上，有新生血管的出现，视网膜可能产生局部的营养状况变化，局部代谢加强。TTR 的增高，提示可能与新生血管和增殖性病变有关。

11- 视黄醇结合蛋白（Retinol binding protein，RBP）是一种低分子量的亲脂载体蛋白，属 Lipocalin 蛋白超家族成员。主要负责结合、转运全反式视黄醇（维生素 A）。编码 RBP 的基因位于 10q，该区与糖尿病的发生有密切的联系[9,10]。血清 RBP 主要来源于肝细胞，也可来源于脂肪细胞。糖尿病和肥胖患者血清的 RBP 水平升高，但生理功能未阐明[7,11]。血清 RBP 的减少则可改善胰岛素敏感性和血糖稳定[12]。在我们的实验中发现，在相应位点正常组玻璃体中 RBP 与 TTR 的浓度均低于糖尿病视网膜病变组，与 Masayuki 研究的非增殖性糖尿病视网膜病伴黄斑水肿的结果相同。在他们的研究中发现，非增殖性糖尿病视网膜病变如不伴有黄斑水肿，则在玻璃体中没有 RBP 与 TTR 的表达增加。在原发性黄斑裂孔的病人的玻璃体蛋白表达中也存在 RBP 与 TTR 的表达[13]。在 Ken 的研究中发现在糖尿病不伴有视网膜病变的患者的 IRBP 量要高于伴有者；但未发现 RBP 与 TTR 的明显差异改变[14]。我们推测 RBP 与 TTR 可能和黄斑部的代谢异常有关，特别是黄斑水肿。

20- 载蛋白 AIV（ApoAIV）是一种酸性糖蛋白，主要存在于乳糜微粒（CM）、极低密度脂蛋白（VLDL）和高密度脂蛋白（HDL）中。在炎症过程中，载脂蛋白 AⅣ明显增加[15]。Sun 等的研究血浆载脂蛋白 AⅣ水平结果提示糖尿病患者血浆载脂蛋白 AⅣ水平明显高于正常组[16]。在糖尿病视网膜病变的玻璃体中发现 AⅣ水平增加，可能提示糖尿病视网膜病变是一种炎性改变。我们考虑它与糖尿病视网膜病变有一定的相关性。

18- 载脂蛋白 D（apoD）是在正常人的高密度脂蛋白（HDL）中发现的。apoD 主要存在于 HDL 的亚型和极高密度脂蛋白（VHDL）中，是一种糖蛋白，在不同组织中，可能因配基不同而发挥独特生理作用。确切功能还不很清楚[17]。在新的研究中发现 18- 载脂蛋白 D 有抑制增殖的作用，是抗氧化防御系统的一部分，保护细胞和组织免受氧化损害[18]。在缺血的脑组织恢复供血中，可以发现 18- 载脂蛋白 D 的梗塞区边缘有大量的积聚，促进组织的修复。当外周神经受损时，ApoD 浓度不断升高，损伤后 3～4 周，其浓度可比正常人高出 500 倍[19]，说明 ApoD 浓度升高是外周神经损伤的一个重要特点。糖尿病视网膜病变有视网膜神经上皮层的损伤，且先于视网膜血管病变出现，也是导致 ApoD 的增加的一个因素。我们考虑它与糖尿病视网膜病变有一定的相关性。

国外研究还发现，载脂蛋白的表达与视网膜硬性的渗出有关。1996 年 Chew 研究糖尿病脂代谢异常，会增加糖尿病病人视网膜上的硬性的渗出，而硬性的渗出的成分是脂蛋白[20]。故推测，增高的载脂蛋白可能是糖尿病视网膜病变硬性的渗出的一个重要的相关因素。而本研究发现的糖尿病视网膜病变组 18- 载脂蛋白 D 增高，与这个推测结论相符。增高的载脂蛋白可能是糖尿病视网膜病变硬性的渗出的一个重要的相关因素。在糖尿病视网膜病变的缺血区，也应有 ApoD 的积聚，玻璃体腔内的浓度会增高。我们推测 apoD 的增高会促进 LDL 的增加。在以往的研究中发现 DM 患者常伴

有高血脂等代谢异常。血脂升高,将促进 DR 的发生发展,尤其与 DR 的硬性渗出有直接关系,DM 时 LDL 的氧化及糖基化均明显增加,有较高的细胞毒性,破坏微血管内皮细胞保护屏障,内皮功能受损,促进局部微血管病变,是并发 DR 的一个重要因素[21]。

目前国际上对糖尿病视网膜病变的玻璃体蛋白质组学研究仍然在初步阶段,然而经过双相电泳、质谱分析、Western blot 鉴定或免疫组化染色确认蛋白后,得出不同的差异蛋白[22,23],说明糖尿病视网膜病变是多因素引起,不能明确何种蛋白起决定性的作用。但在不同的 PDR 阶段的黄斑水肿和单纯的黄斑水肿,都发现炎性因子、急性反应时相蛋白 TTR 和 RBP 明显增高,推测其可能是黄斑水肿的标志蛋白。下一步将在玻璃体中降低 TTR、RBP 的含量,观察黄斑水肿的改变情况,明确其对 PDR 发展的影响。载脂蛋白与脂肪代谢的异常有明显的相关性,而 ApoE、ApoAIV、ApoAVI 等的异常增加都有报道,但都无患者血脂情况的对应报道。我们将对照研究玻璃体、血清的载脂蛋白与 PDR 的关系。

参 考 文 献

[1] Liu S Q. Expressional differents in retinal protein between normal rats[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(14): 2118-2124.

[2] Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, et al. The Fas induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39018-39026.

[3] Blom M L, Green W R, Schachat A P, et al. Diabetic retinopathy: a review [J]. Del Med J, 1994, 66(7): 379-388.

[4] Patel A, Hibberd M L, Millward B A, et al. Chromosome Tq35 and diabetic microvascular complication[J]. J Diabetes Complications, 1996, 10(2): 61.

[5] Kraft H G, Sandholzer C, Menzel H J, et al. Apolipoprotein(a) particle density and correntration in plasma[J]. Arterioscler Thromb, Vasc Biol, 1992, 12(3): 302-306.

[6] Arcaro G, Zenere B M, Saggiani F, et al. ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria [J]. Diabetes Care, 1999, 22(9): 1536-1542.

[7] Yang Q, Graham T E, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and tye 2 diabetes [J]. Nature, 2005, 436(7049): 356-362.

[8] Toyofumi N, Reiko K, Tsunchiko I, et al. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole[J]. Chromatography B, 2002, 776: 89-100.

[9] Meigs J B, Panhuysen C I, Myers R H, et al. A genome-wide scan for loci linked to plasma levels of glucose and HbAlc in a community-based sample of Caucasian pedigrees: The framitgsham off spring study[J]. Diabetes, 2002, 51(3): 833-840.

[10] Duggirals R, Blangero J, Almasy L, et al. Linkage of type 2 diabetes mellitus and age at onset to a genetic location on chromosome Ioq in Mexican Americans[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(4): 1127-1140.

[11] Biesalski H K, Nohr D. Importance of vitamin A for lung function and development[J]. Mol Aspects Med, 2003, 24(6): 431-440.

[12] Timothy E, Graham, Qin Y, et al. Retinol-binding Protein 4 and insulin Resistance in Lean. Obese and diabetic Subjects [J]. N Engl J Med, 2006, 354(24): 2552-2563.

[13] Masayuki O, Karen W, John W C, et al. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema [J]. Experimental Eye Research, 2005, 81: 176-182.

[14] Ken Y, Atsushi M, Hidetoshi Y, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2003, 2: 1177-1187.

[15] Black D D, Wang H, Hunter F, et al. Intestinal expression of apolipoprotein AIV and CIII is coordinately regulated by dietary lipid in newborn swine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(3): 619-624.

[16] Khovidhunkit W, Duchateau P N, Medzihradszky K F, et al. Apolipoproteins AIV and AV are acute-phase proteins in mouse HDL[J]. Atherosclerosis, 2004, 176(1): 37-44.

[17] Blanco-Vaca F, Pownall H J. Disulfide linked dimers of apolipoprotein D in urine [J]. Electrophoresis, 1993, 14: 1086.

[18] Martin L, Keller G A, Liggitt D, et al. Male-specific beta-cell dysfunction and diabetes resulting from increased expression of a syngeneic MHC class I protein in the pancreata of transgenic mice[J]. New Biol, 1990, 2(12): 1101-1110.

[19] Smith K M, Lawn R M, Wilcox J N. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin: cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization [J]. J Lipid Res, 1990, 31: 995.

[20] Chew E Y, Klein M L, Ferris F L. Association of elevated serum levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy[J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114: 1079-1084.

[21] Chew E Y, Klein M L. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exodate in diabetic retinopathy[J]. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study(ETDRS) report 22 Arch Ophthalmol, 1996, 114: 1079-1084.

[22] Merchant M L, Klein J B. Proteomics and diabetic retinopathy[J]. Clin Lab Med, 2009, 29(1): 139-149.

[23] Mukai N, Nakanishi T, Shimizu A, et al. Identification of phosphotyrosyl proteins in vitreous humours of patients with vitreoretinal diseases by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting/matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry [J]. Ann Clin Biochem, 2008, 45(Pt 3): 307-312.

(责任编辑:张学颖)