

# 利用 LC-MS 深入分析大鼠肾小球蛋白质组学表达谱

洪权<sup>①\*</sup>, 薛鹏<sup>②\*</sup>, 吕杨<sup>①</sup>, 陈香美<sup>①</sup>, 齐卡<sup>①</sup>, 吴镛<sup>①†</sup>

① 解放军总医院内科临床部肾病科暨全军肾脏病研究所, 北京 100853;

② 中国科学院生物物理研究所蛋白质组学技术实验室, 北京 100101

\* 同等贡献

† 联系人, E-mail: wudi@301hospital.com.cn

2009-12-23 收稿, 2010-04-08 接受

国家自然科学基金(30670983)和国家自然科学基金重点项目(30630033)资助

**摘要** 肾小球是肾脏器官滤过的基本功能单位, 大多数肾脏疾病都是由于肾小球的硬化或纤维化而最终导致肾功能不全. 分析肾小球的病理生理过程, 必须对其生理功能有明确的认识, 但由于研究手段有限, 目前仍缺乏对正常肾小球的蛋白质成分全景式的分析. 因此, 本研究用蛋白质组学的方法, 对正常大鼠的肾小球进行了全面的分析. 在本研究中, 取成年 SD 大鼠的肾脏组织, 并分离出高纯度的肾小球. 利用多维蛋白鉴定技术对大鼠肾小球进行全面系统的蛋白质组学分析. 当假阳性率低于 0.1% 时, 共鉴定出肽段 19062 个, 其中非重复肽段 11249 个, 归属于 3796 个蛋白, 其中含有 2 个以上肽段 2741 个蛋白. 我们对这些蛋白进行了功能注释和分类, 发现了 26 个与已报道的肾小球(内皮细胞、足细胞和系膜细胞)Marker 蛋白一致; 利用 HomoloGene 将我们得到的大鼠肾小球蛋白质组学数据与其他文献报道的人和小鼠肾蛋白质组学数据进行了比较, 为深入了解肾小球正常结构和功能提供重要的分子依据, 为进行肾小球疾病的诊断和致病机制的研究奠定基础.

## 关键词

肾小球  
蛋白质组  
多维蛋白鉴定技术  
肾小球标志物  
同源基因

肾脏组织主要由肾小球、肾小管及间质等组成. 肾小球是其中的重要滤过功能单位. 肾小球的硬化或纤维化是大部分肾脏疾病共同的终末期表现. 尽管国内外进行了大量的临床和实验研究试图解析其病理生理过程, 但对这部分疾病的分子机制仍不明确, 缺乏正常肾小球的蛋白质成分数据是其中重要原因之一, 因此探索肾小球的蛋白质组情况具有重要的意义. 目前, 蛋白质组技术越来越多地被用来研究整个肾脏蛋白表达或比较肾组织不同区域的蛋白表达差异. 为在蛋白质水平了解肾功能以及慢性肾脏病(Chronic Kidney Disease, CKD)的病因和进展机制, 2005 年 10 月全球通过收集 30 多个研究调查, 开展人类肾脏和尿液蛋白质组计划(Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP). 尽管这一计划促进了蛋白质组在肾脏病研究领域的开展, 为 CKD 的生

物标记物研究及肾脏疾病药物靶标的发现建立了比较完整的肾脏蛋白质组数据库, 但目前在肾脏病领域的蛋白质组学研究, 主要集中于尿液蛋白质组学研究上, 用于寻找肾脏病相关的标记物. 然而从尿液分析中得到的结果, 很难判断蛋白来源于血清还是肾脏, 对阐明疾病的机理还有很大困难. 对于肾脏结构本身的蛋白质组学研究还比较少. Zhao 等人<sup>[1]</sup>报道了小鼠肾脏皮质的蛋白质组, 共鉴定到 1967 种蛋白, 很多蛋白与尿液蛋白质组学得到的数据相一致. Miyamoto 等人<sup>[2]</sup>对来源于一位 68 岁输尿管癌患者的正常肾脏组织的肾小球进行了蛋白质组学研究, 通过一维分离(SDS-PAGE)和二维分离(IEF-SDS)与液质联用的方法共鉴定到 6686 个蛋白. 然而, 大鼠作为研究肾脏疾病的主要模型, 在肾脏蛋白质组学的研究还鲜有报道.

自从美国 Yates 等人<sup>[3]</sup>提出多维蛋白质鉴定技术

**英文版见:** Hong Q, Xue P, Lü Y, et al. An in-depth analysis of proteomics expression profiling in rat glomeruli utilizing LC-MS. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-3291-4

(Multidimensional Protein Identification Technology, MudPIT)以来,已成为蛋白质组学研究的主要技术手段.多维的基本原理是首先将复杂的蛋白质混合物酶解成多肽片段,然后用阳离子交换和反向二维液相色谱与质谱联用技术对多肽进行分析鉴定.与现在主要应用于肾脏蛋白质组学研究的一维电泳和二维电泳先分蛋白、再分离肽段的策略相比,更有利于低丰度蛋白、疏水性膜蛋白的鉴定,适于更宽的等电点和小分子量蛋白的鉴定.

本研究分离提取正常大鼠肾小球蛋白质,利用多维蛋白质鉴定技术,以最大限度地探测和识别低丰度的蛋白质,明确肾小球中蛋白质表达谱,为进行生理和病理生理过程中蛋白质表达、功能及相互作用特点的研究奠定基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验对象

实验用大鼠购自北京维通利华公司,品系为近交系雄性SD(Sprague Dawley)大鼠,8~10周龄,体重180~200 g,实验动物清洁饲养,自由饮食、饮水.连续3 d记录24 h尿量并留取2 mL尿样用于尿蛋白定量检测,检测收缩压,2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血备测肾功能,留取肾组织备用.

### 1.2 主要试剂

BCA蛋白浓度检测试剂盒(美国Bio-Rad公司);碘乙酰胺、DTT、碳酸氢氨、尿素、蛋白酶抑制剂(美国Sigma公司);测序级的胰蛋白酶(美国Promega公司);超纯水由Milli-Q系统产生(美国Millipore公司);乙腈和甲酸(J. T. Baker Phillipsburg, NJ, USA). C18填料(粒径3.5  $\mu\text{m}$ ,孔径120  $\text{\AA}$ ,SunChrom北京金欧亚科技发展有限公司);SCX填料(粒径5  $\mu\text{m}$ ,孔径300  $\text{\AA}$ ,美国Phenomenex公司).

### 1.3 大鼠基本情况监测

(i) 肾功能检测. 考马斯亮蓝法检测尿蛋白浓度,乘以24 h尿量计算出24 h尿蛋白定量.

(ii) 收缩压检测. 使用MRB2 III A电脑大鼠血压心率测量仪(上海市高血压研究所)测量大鼠尾动脉收缩压.

(iii) 大鼠肾组织PAS染色. 肾组织标本用10%

福尔马林固定过夜,常规脱水、透明、石蜡包埋;常规脱蜡;过碘酸-希夫氏(periodic acid-Schiff, PAS)染色观察肾脏组织病理改变.光镜下观察肾脏病理改变,摄片.

### 1.4 肾小球的纯化分离

参照Krakower等人<sup>[4]</sup>方法分离正常大鼠肾小球.在无菌条件下取肾皮质剪成细条,放在80目钢丝筛网上研磨收集网下肾小球及破碎细胞,置150目筛网上用PBS反复冲洗,收集肾小球.

### 1.5 肾小球的纯度鉴定

将收集的肾小球重悬于PBS,滴加在载玻片上,200 $\times$ 光镜下观察其纯度并摄像.取适量肾小球,加入RIPA裂解液(含50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5%脱氧胆酸, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF和各种蛋白酶抑制剂: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),室温裂解15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下12000 r/min离心20 min,取上清,进行BCA法测定浓度. SDS变性后,80  $\mu\text{g}$ 蛋白上样行SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜上,丽春红S染色后5%脱脂奶粉4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,加1:100稀释的羊抗大鼠E-cadherin多抗(美国SantaCruz公司)孵育4 h, 1 $\times$ TBST洗膜3次,加1:1000稀释的HRP标记的抗羊二抗孵育1 h, 1 $\times$ TBST洗膜3次, ECL显色系统发色, Alpharmimage2002系统扫描并进行灰度分析.

### 1.6 质谱蛋白样品准备

将分离纯化的肾小球重悬于MilliQ超纯水中,清洗3次,彻底去除原有的PBS溶液. 800 $\times g$ 离心5 min吸除多余的水分后称重.取10 mg的干净的肾小球溶于1 mL含7 mol/L尿素和2 mol/L硫脲中,超声破碎,离心后取上清.用BCA法测定蛋白的浓度.取100  $\mu\text{g}$ 的肾小球蛋白溶液,加入终浓度为10 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)打开蛋白质的二硫键,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h;冷却到室温后,快速加终浓度为50 mmol/L碘代乙酰胺(IAM)封闭自由的巯基,置于暗室,室温45 min;加入40 mmol/L DTT,室温放置15 min淬灭过量的IAM;加入25 mmol/L碳酸氢铵稀释5 $\times$ 体积,然后按照酶和底物质量比为1:100加入胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解12 h后,再加入相同量的胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$  6 h,加入终浓度为0.1% FA终止反应,然后13000 $\times g$ 离心10 min除去不溶物,收集上清保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ ,用于质谱测试.

## 1.7 纳升级二维液相色谱质谱联用分析

多维蛋白质鉴定系统采用电喷雾(nano-ESI)源的 LTQ-ion trap(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 质谱仪, 修改自 Yates 等人的方法<sup>[5-7]</sup>.

包含分流装置、双相分离毛细管色谱柱、带 tip 头的分析型反相 C18 毛细管色谱柱 3 部分. 分流装置实现整个体系的流速为 400~800 nL. 双相分离毛细管色谱柱由 3 cm C18 填料(5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , SunChrom, Deutsche)和 3 cm 离子交换填料(5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Phenomenex, USA)构成. 反相 C18 毛细管色谱柱是由毛细管拉制机将内径为 100  $\mu\text{m}$  石英毛细管拉制出 tip 头, 然后由高压氮气将 C18 填料填充至毛细管柱中, 有效柱长约 10 cm. 多肽样品分析过程为: 取 100  $\mu\text{g}$  蛋白酶解后多肽混合物应用高压氮气装填至自制的双相石英毛细管柱内. 二维色谱分离的流动相: 流动相 A 为 5% ACN/0.1% FA; 流动相 B 为 80% ACN/0.1% FA; 流动相 C 为 800 mmol/L 醋酸铵/5% ACN/0.1% FA. 双相毛细管柱先用流动相 A 脱盐 45 min, 然后按照流动相 C 中醋酸铵浓度(0~800 mmol/L) 采用步长式梯度分 6 步洗脱双相柱. 具体如下: 第 1 步, 时长 100 min, 流动相 B 从 0~100%. 第 2~6 步, 3 min 100%流动相 A, 紧接着 5 min X% 流动相 C, 5 min 0~10%的流动相 B 梯度, 77 min 10%~45%流动相 B 梯度, 10 min 45%~100%流动相 B, 10 min 100%流动相 B, 最后 10 min 100%流动相 B 平衡柱体. X%流动相 C 分别代表浓度为 10%, 25%, 40%, 70%和 100%的醋酸铵. 所有双相柱洗脱液直接进入分析型 C18 毛细管色谱柱, 流出液经电喷雾离子化后直接进入质谱进行分析. 电喷雾电压为 2.0 kV, 离子传输管温度为 200  $^{\circ}\text{C}$ . 质谱数据采集采用数据依赖式采集(Data Dependent Acquisition, DDA) 模式, 即一个全离子一级质谱扫描(400~2000  $m/z$ )之后, 选取一级质谱中信号最强的 5 个母离子进行 MS/MS 质谱. MS/MS 质谱数据采集的参数如下: 离子碎裂碰撞能量(collision energy), 35%; 离子强度阈值(ion selection shreshold), 2000 counts; 激活  $Q$  值, 0.25; 激活时间, 30 ms; 动态排除时间, 30 s. HPLC 溶液梯度及质谱扫描功能由 XCalibur 软件系统控制(Thermo Fisher).

## 1.8 数据分析

质谱采集的数据, 采用 Bioworks3.31 的 SEQUESTv.28 进行数据检索, 检索数据库为 NCBI Rat

Refseq Database, Version 2009.10.05. 利用反转数据库来计算数据的假阳性率<sup>[8]</sup>, 检索参数为胰蛋白酶, 酶的漏切位点数设为 2; 母离子质量容忍度为 $\pm 2$  Da (monoisotopic), 碎片离子质量容忍度为 $\pm 1$  Da (monoisotopic); 氨基酸残基修饰设置: 可变修饰为半胱氨酸的碘代乙酰化(57.02 Da), 甲硫氨酸的氧化(15.99 Da). 检索后的数据用 bioworks 计算 Peptide possibility, 最后通过 XCorr, sp, Rsp, DeltaCn 和 Peptide possibility 过滤, 使鉴定肽段的假阳性率 FDR=1%. 将所鉴定到的多肽利用 protein Coverage-Summarizer 合并蛋白计算蛋白覆盖率.

## 1.9 肾小球蛋白功能分类

肾小球蛋白进行功能分类是利用在线工具 PANTHER (Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships)<sup>[9]</sup>和 <http://www.uniprot.org> 在线工具综合获得. 基因 ID 和基因 Name 通过 RGD(Rat Genome Database)数据库获得.

## 2 结果和讨论

### 2.1 大鼠基本情况

24 h 尿蛋白定量:  $(9.12 \pm 0.32)$  g/24 h, 正常; 尾动脉收缩压:  $(14.2576 \pm 0.3857)$  kPa(正常范围: 10.906~15.96 kPa)<sup>[10]</sup>.

### 2.2 大鼠肾脏组织 PAS 染色

肾小球系膜(系膜细胞、系膜基质)未见增殖, 毛细血管祥开放良好, 间质未见炎细胞浸润, 肾小管内无管型, 基地侧无断裂现象(图 1).

### 2.3 肾小球纯度检测

肾小球的纯度直接影响到肾小球蛋白质鉴定的结果, 减少肾小管和肾间质组织对肾小球的污染, 有利于鉴定到特异性的肾小球蛋白. 我们利用 Krakower 等人<sup>[4]</sup>方法分离肾小球, 得到了很好的纯度. 在光镜下观察分离的肾小球纯度达 98%以上, 形态正常, 如图 2.

Western blotting 检测所分离的 E-钙黏蛋白(肾小管上皮细胞的标记物), 以肾小管上皮细胞为对照, 以 $\beta$ -actin 为参照校正上样量, 结果显示分离所得肾小球中 E-钙黏蛋白表达丰度很低, 表明所得小球的纯度较高, 如图 3 所示.



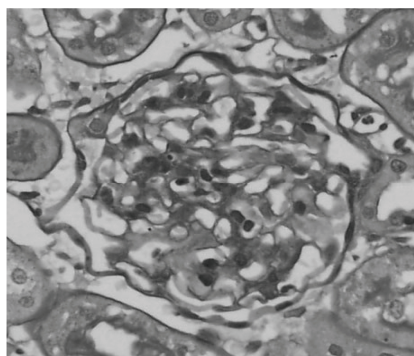


图1 大鼠肾脏 PAS 染色(400×)

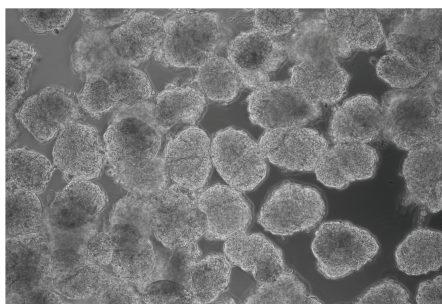


图2 光镜下检测分离的肾小球的纯度(200×)

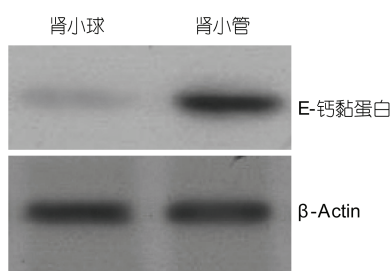


图3 Western blotting 检测 E-钙黏蛋白的表达

## 2.4 2D-LC-MS/MS 鉴定肾小球蛋白结果

大约 20 μg 的纯化肾小球蛋白进行了 6 步的 2D-LC-MS/MS 检测, 总离子流如图 4 所示. 可以看出 6 步分离比较均匀. 我们通过检索反转库将 6 步质谱结果合并过滤, 过滤参数为 Peptide possibility < 0.5, sp > 500, Rsp ≤ 5, DeltaCN = 0 或 > 0.08. 共获得 19160 个鉴定, 其中属于反转库的为 99 个, 真实库结果 19062 个. 根据假阳性率为反转库检索结果与真实库检索结果之比, 获得假阳性率为 0.517%. 19062 张有效图谱鉴定出非重复肽段 11249 个, 补充材料 1(Peptide.xls)列出了所有肽段及各项参数. 我们利用

protein coverage summarizer 软件将 19062 个肽段归并成蛋白, 并计算出蛋白覆盖率, 共鉴定到 3795 个蛋白, 其中 2 个及 2 个以上肽段的蛋白 2740 个. 这些蛋白代表了 3109 个非重复的基因. 有关蛋白的基本信息和分类的结果, 见补充材料 2(Protein annotation.xls). 研究获得蛋白信息量大于以往的文献报道, 早在 1997 年, Magni 等人<sup>[11]</sup>对人肾皮质蛋白进行 2DE 分离, 随后通过肽指纹图谱鉴定了 89 个蛋白质和 74 个多肽亚型. 随后有报道利用 2DE 分离牛肾脏组织蛋白, 170 点的胶块上鉴定出了 85 个蛋白<sup>[12]</sup>.

肾小球的细胞分为系膜细胞、足细胞、内皮细胞 3 种细胞类型, 它们各自都有独特的标记物, 对这些标记物的研究对于深入理解肾脏细胞的分子功能以及肾脏病的发病机理有着重要的理论和现实意义. 我们采用多维蛋白质鉴定技术, 利用少量的样品就可以同时鉴定多种肾小球标志性蛋白, 表 1 列出了我们实验中鉴定到的主要小球细胞标记物, 其中获得的内皮细胞标志物最多, 共 13 个, 包括 nucleolin, thrombomodulin, von Willebrand 因子, ICAM-1 等; 足细胞的标记物 11 个蛋白, 包括 podocin, ezrin, synaptopodin 等; 因系膜细胞属于肌成纤维细胞, 不具典型的标志物蛋白, 但我们检测到了 Desmin, alpha-actin, Thy1 等相对典型的标志性蛋白. 慢性肾脏病透析患者经常出现血管内皮细胞功能紊乱, 是促使动脉粥样硬化性心血管疾病发生的重要因素, 肾小球局部的 von Willebrand 因子(vWF)是血管内皮细胞受损的重要标志物, vW 因子的检测对心血管及慢性肾脏病患者的预防具有重要的临床意义<sup>[13-15]</sup>.

## 2.5 蛋白的 GO 分类

将获得的蛋白提交至 Uniprot 工作站进行 GO 分类, Uniprot 识别出 3086 个蛋白的 GI number, Gene Ontology(GO)分类: (1) 分子功能(molecular function)分类; (2) 细胞组分(cellular component)分类; (3) 生物过程(biological process)分类. 如图 5.

图 6 显示出 GO 分子功能的分类图. 结果表明大部分蛋白具有多重功能: 结合活性、催化、转运等活性. 结合功能即为某个蛋白选择性地与另一个蛋白分子的单个或多个特定区域相结合的能力, 约 50% 的蛋白都具备这一功能, 可与蛋白, 金属离子, 核苷酸, ATP, RNA, 肌动蛋白和脂质等结合. 其次为具催化活性的蛋白, 约占 32%. 对特异性底物或相关的

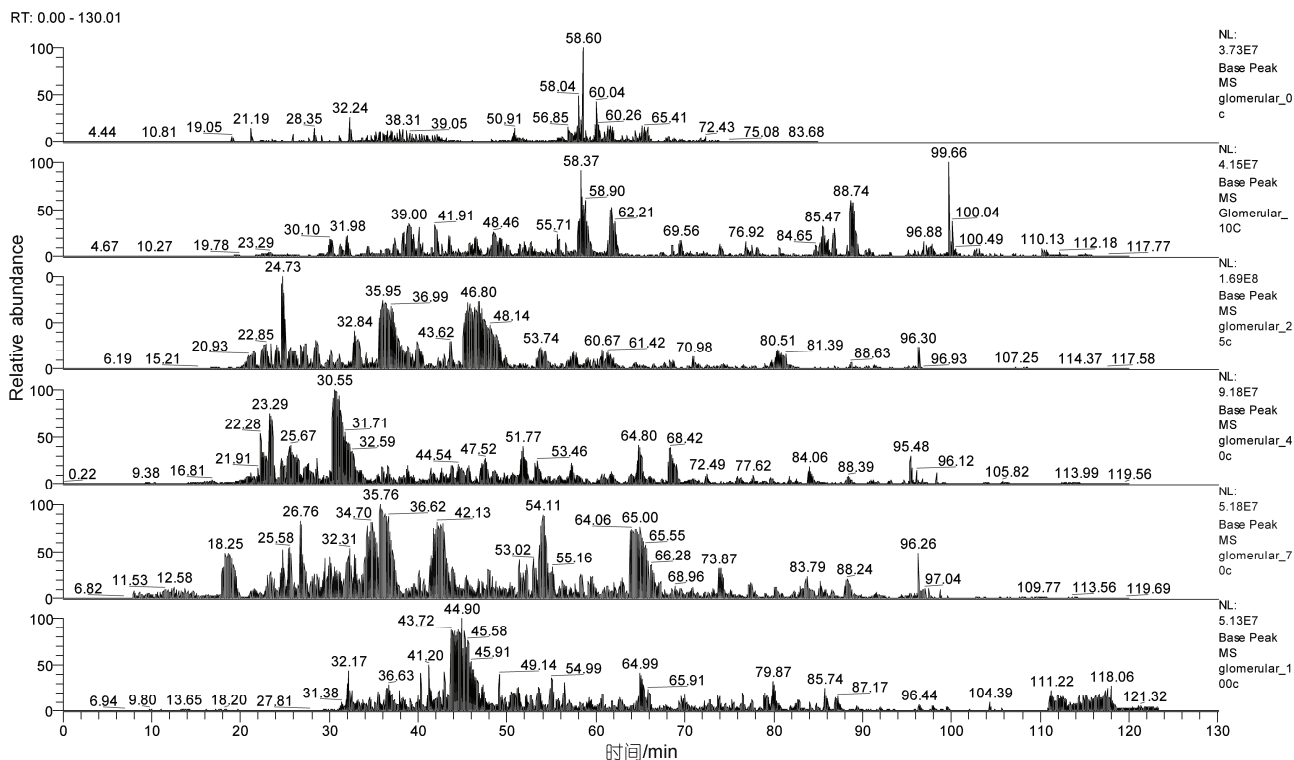


图4 6步SCX-RP的总离子流图

底物群从膜的一侧转运至另一侧的转运蛋白约占该分类中所有蛋白的5%。如图6所示,100个蛋白(3.7%)经分析具有结构分子活性。酶调节蛋白和信号转导活性蛋白分别占3%左右,二者对细胞增殖、分化甚至凋亡起着重要作用;另外还包括离子载体活性蛋白、转录调节活性蛋白、抗氧化、通道调节及翻译调节等功能蛋白。分子功能的多样性表明LC-MS方法可广泛、多维、无偏差地检测组织中的蛋白表达情况。

图7为GO分类中的Cellular Component分析,大部分蛋白以组成细胞成分、细胞器及膜成分为主,三者分别占37%,25%和13%。同样也可见胞外区蛋白及突触样蛋白的发现。这一结果表明LC-MS不仅可以检测到占主要成分的细胞器及细胞膜等结构蛋白,也可检测到细胞膜外或膜内等功能蛋白。

图8为GO分类的Cell Process分析结果。肾小球中的系膜细胞、内皮细胞及足细胞在不同程度调节肾小球的滤过功能,这一过程涉及到能量代谢、细胞间通讯、离子转运等复杂的生物学过程,因此在本研究中,大量参与生物学进程的蛋白都集中在细胞进程与代谢及生物学调节方面,分别占24%,19%和10%左右。

## 2.6 酶学分类

2009个蛋白参与的6大类生物酶体系,以水解酶类和氧化还原酶类最多,水解酶类(182个)、氧化还原酶类(142个)共占59%左右,肾小球是肾脏发挥滤过功能的重要功能单位,维持这一过程必须消耗大量能量,而能量的代谢与蛋白的水解或氧化还原密不可分,因此,与肾小管等相比,肾小球必然需要更多的水解酶和氧化还原酶参与其中<sup>[43]</sup>,如图9。

## 2.7 通路分析

共参与32条代谢通路,其中参与Lipid metabolism(24个)和Carbohydrate degradation(20个)2条通路的蛋白数量最多,如表2所列。这2个通路主要负责糖酵解和脂肪酸代谢为细胞提供能量。肾小球承受血液流变的压力<sup>[44]</sup>、对多种物质的滤过和代谢,并且有内分泌功能<sup>[45]</sup>,因此多条代谢通路非常活跃,数据表中可检索到许多代谢相关基因如糖酵解途径中烯醇酶(Enolase)和果糖磷酸激酶(PFKI)等,高糖环境中的系膜细胞能量代谢水平比较高,同样可检测到Enolase的上调<sup>[46]</sup>。活跃的代谢通路为细胞提供了

表 1 肾小球 3 种细胞(系膜细胞、足细胞、内皮细胞)标志物

登录号	基因符号	蛋白描述	覆盖率(%)	功能	定位
NP_113863.2	<i>Actn4</i>	$\alpha$ 肌动蛋白 4	73.765	与结合素相互作用, 并加强足细胞与基底膜的交联作用, 从而稳定肾小球结构, 预防疾病的发生	足细胞 <sup>[16]</sup>
NP_602308.1	<i>Agt</i>	血管紧张素原	3.983	RAS 系统的主要成分, 是血压、体液和电解质的潜在调节因子之一	系膜细胞 <sup>[17]</sup>
NP_001012055.1	<i>Cdh16</i>	钙黏蛋白 16	10.241	在内皮细胞横向连接时发挥作用, 可调控血管内皮的通透性	内皮细胞 <sup>[18]</sup>
XP_343484.1	<i>Dag1</i>	预测: 营养不良聚糖前体类似物 (肌营养不良蛋白缔合性糖蛋白 1)	9.854	在维持足细胞独特结构过程中发挥双重作用: 可与肾小球基底膜连接, 可维持滤过膜的完整性	足细胞 <sup>[19]</sup>
NP_071976.1	<i>Des</i>	结蛋白	31.13	足细胞损伤标志物	足细胞/系膜细胞 <sup>[20,21]</sup>
NP_598308.1	<i>Gbp2</i>	G 蛋白 2	2.876	新的细胞活化标志物, 表现为免疫复合物激活的内皮细胞的特征	内皮细胞 <sup>[22]</sup>
NP_037099.1	<i>Icam1</i>	细胞黏附分子 1 前体	2.385	促进细胞极性的形成, 调节内皮细胞的运动	内皮细胞 <sup>[23]</sup>
NP_001007726.1	<i>Icam2</i>	细胞黏附分子 2	6.498	表达于内皮连接处, 也可调节血管的生成	内皮细胞 <sup>[24]</sup>
NP_997489.1	<i>Kirrell</i>	去氧肾上腺素 1 前体	13.308	足细胞膜蛋白中 Ig 超家族	足细胞 <sup>[25]</sup>
NP_001029181.1	<i>Mcam</i>	黑色素瘤细胞黏附分子亚型 2	8.746	比可溶性 CD31 能更好地反映内皮细胞的重塑	内皮细胞 <sup>[26]</sup>
NP_076473.2	<i>Mcam</i>	黑色素瘤细胞黏附分子亚型 1	8.179		内皮细胞 <sup>[26]</sup>
NP_036881.2	<i>Ncl</i>	核仁蛋白	8.403	血管系统中内皮细胞血管生成的特异性标志物	内皮细胞 <sup>[27]</sup>
NP_072150.1	<i>Nphs1</i>	肾病同系物 1, 去氧肾上腺素	18.61	重要的足细胞蛋白, 足细胞特异性标志蛋白, 在肾小球-足细胞的滤过屏障中具有重要的作用	足细胞 <sup>[28,29]</sup>
NP_570841.2	<i>Nphs2</i>	足细胞裂隙膜蛋白	20.888	足细胞特异性标志蛋白	足细胞 <sup>[31]</sup>
NP_620203.1	<i>Podxl</i>	足糖萼样蛋白前体	24.33	足细胞分化的特异性标志物	足细胞 <sup>[31-33]</sup>
NP_067727.2	<i>Synpo</i>	突触极蛋白	33.382	足细胞特异性标志蛋白	足细胞 <sup>[31]</sup>
NP_113959.1	<i>Thbd</i>	血栓调节蛋白	7.106	内皮细胞损伤的特异性标志物, 是一种具有抗凝作用的跨膜糖蛋白	内皮细胞 <sup>[34]</sup>
NP_036805.1	<i>Thy1</i>	Thy-1 细胞表面抗原前体	9.938	T 淋巴细胞和感染和 B 淋巴细胞的信号转导分子	系膜细胞 <sup>[35]</sup>
NP_062230.1	<i>Vil2</i>	埃兹蛋白	40.273	激素抵抗和蛋白尿的肾小球滤过屏障的通透性增加可能与足细胞相关蛋白埃兹蛋白表达下降有关.	足细胞 <sup>[31]</sup>
NP_112402.1	<i>Vim</i>	波形蛋白	52.361	足细胞细胞骨架蛋白	足细胞 <sup>[36]</sup>
XP_001066203.1	<i>Vwf</i>	预测: vW 因子类似物	1.387	内皮细胞和巨噬细胞特殊的糖化蛋白产物, 常用于组织切片中鉴别血管系统	内皮细胞 <sup>[37-39]</sup>
XP_342760.3	<i>Vwf</i>	预测: vW 因子类似物	1.387		
NP_001099736.1	<i>ZO-1</i>	紧密连接蛋白 1	15.176	连接蛋白组分, 在多数紧密连接中发挥作用, 同时也表达于足细胞的裂孔隔膜的连接处	足细胞 <sup>[40]</sup>
NP_001100180.1	<i>EMILIN1</i>	弹性蛋白微丝 1	3.111	目前鉴定为内皮系统的特异性细胞表面糖化蛋白	内皮细胞 <sup>[41]</sup>
NP_001100877.1	<i>CDH5</i>	钙黏蛋白 5	1.289	内皮特异的钙黏蛋白, 是内皮侧膜连接的重要组成部分, 可调控血管内皮的通透性	内皮细胞 <sup>[18]</sup>
NP_001101892.1	<i>PLXDC2</i>	plexin 结构域 2	1.887	表达于内皮细胞形成毛细血管过程中细胞表面的蛋白	内皮细胞 <sup>[42]</sup>

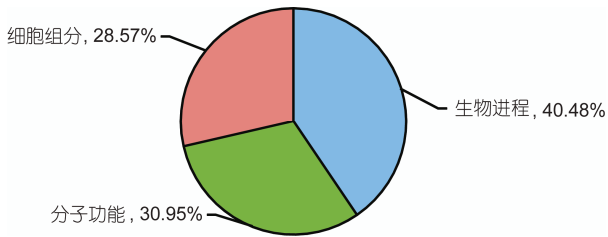


图5 GO分类总图

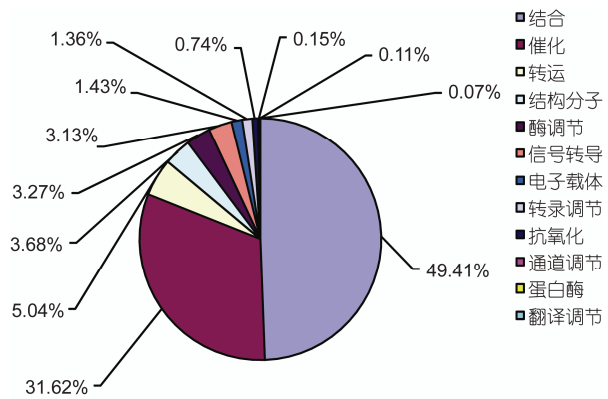


图6 GO分类的分子功能分析结果

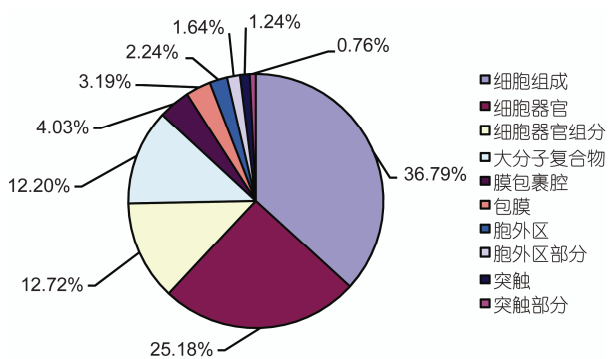


图7 GO分类后细胞组分分析结果

能量的同时也产生了大量的自由基。文献报道抗Thy1肾炎大鼠模型中, 肾小球内产生的大量 ROS 起到了重要的致病作用<sup>[47,48]</sup>。

### 2.8 大鼠、人、小鼠 3 种不同物种的肾脏蛋白质组的比较

由于不同物种间的蛋白无法直接比较, 同源基因 (HomoloGene) 可以方便地将不同物种的基因统一成唯一 ID 方便比较。我们采用 NCBI HomoloGene release 64 数据库, 将大鼠肾小球蛋白质组的大鼠 3796 个

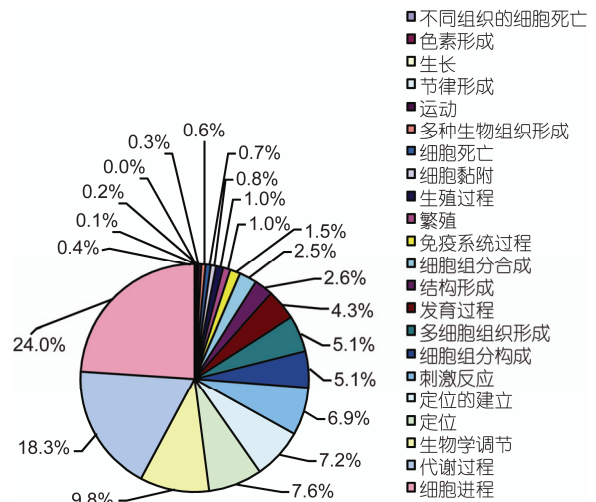


图8 GO分类的生物进程分析结果

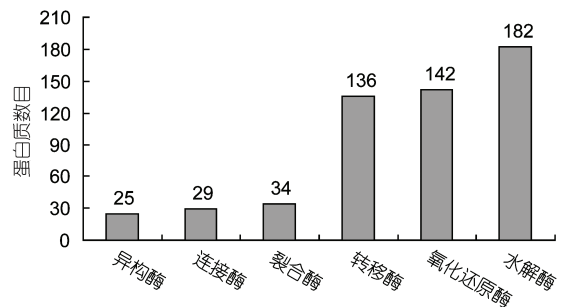


图9 3086个蛋白的酶学分类分析

蛋白的 Entrez Gene ID 获得了 2521 个唯一的 homologue ID。小鼠肾脏皮质的蛋白质组来源于 Zhao 等人<sup>[1]</sup>的报道, 1966 个蛋白共获得 1888 个 homologue ID, 人的肾小球蛋白质组的数据来源于 Miyamoto 等人<sup>[2]</sup>的文章, 6686 个蛋白共获得 2518 个 homologue ID。蛋白转化成 homologue ID 数目不一致, 除了少数蛋白或基因没有相对应的 homologue ID 外, 主要是检索蛋白数据库有一定的冗余性, 存在多种蛋白对应一种 homologue ID 的情况。人肾小球蛋白质组采用的是 IPI 数据库检索, 数据库有较大的冗余, 所以只获得的 homologue ID 远远少于蛋白数目。图 10 给出了 3 种物种肾脏蛋白质组的基因差别。我们的实验和人类肾小球蛋白质组获得的基因数目基本相同, 小鼠的基因略微少些。三种物种相互比较, 共有的基因数为 639 种, 其中大鼠和人的共有基因要多于大鼠与小鼠或人与小鼠。这可能是 3 个种属来源的蛋白数据



表 2 通路分析列表

序号	通路名称	参与基因数目
1	脂代谢	24
2	碳水化合物水解	20
3	氨基酸生物合成	9
4	氨基酸降解	9
5	嘌呤代谢	8
6	碳水化合物代谢	7
7	碳水化合物合成; 糖异生	6
8	辅因子生物合成	6
9	蛋白修饰	5
10	聚胺合成	4
11	能量代谢	4
12	醇解; 丙酮酸盐酵解成乳酸盐; 丙酮酸盐生成(S) 乳酸盐	4
13	卟啉代谢	3
14	代谢中间产物合成; 5-磷酸- $\alpha$ -D-核糖 1-二磷酸生物合成; D-核糖 5 磷酸合成 5-磷酸- $\alpha$ -D-核糖 1-二磷酸(路径 I): step 1/1	2
15	中间产物代谢	2
16	氮代谢; 尿素循环	2
17	多元醇合成	2
18	次级代谢产物代谢	2
19	硫代谢	2
20	乙醇代谢; 乙醇降解; 乙醇生成乙酸	1
21	聚胺降解; 肌氨酸代谢成甲醛和甘氨酸	1
22	氨基糖代谢; N-乙酰神经氨酸降解; N-乙酰神经氨酸生成 D-果糖 6 磷酸	1
23	辅因子代谢; 维生素代谢	1
24	甘油脂类代谢; 甘油三酯降解	1
25	糖酯生物合成; 糖基锚合成	1
26	酮类代谢; 琥珀酰-CoA 降解; 琥珀酰-CoA 生成乙酰乙酰-CoA	1
27	膜脂代谢; 甘油磷脂代谢	1
28	一碳代谢; 四氢叶酸脂转换	1
29	磷脂代谢; 二磷酸基甘油合成; sn-甘油三磷酸生成二磷酸基甘油	1
30	嘧啶代谢; 从头合成途径合成 CTP; UDP 生成 CTP: 2/2 步	1
31	类固醇生物合成; 雌激素生物合成	1

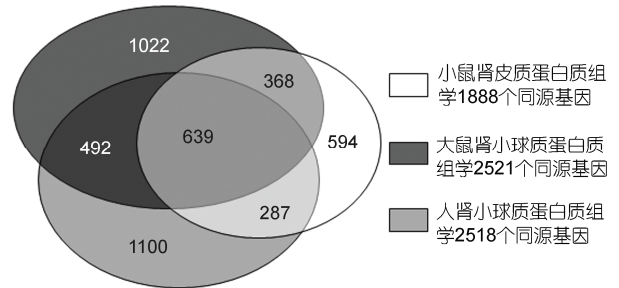


图 10 3 个物种(人、大鼠、小鼠)肾脏蛋白质组比较

在 GenBank 数据库中并非都能检索到相应的 Unigene ID, 因此存在少量数据的缺失. 此外, 由于大鼠和人都是采用的是肾小球的蛋白质样品, 而小鼠的数据采用肾脏皮质的蛋白样品, 肾脏皮质不仅包括了肾小球, 还有一部分是肾小管及间质成分, 因此小鼠的蛋白质组学数据中所含的 homologene 成分更加复杂, 肾小管及间质成分中表达丰度相对较高的蛋白可能会掩盖去肾小球的部分蛋白数据. 因此, 利用分离的肾小球制备蛋白样品进行研究, 更能精确地体现肾小球的蛋白质组谱情况. 这一结果同样提示, 我们今后可以分离肾小管或肾间质进行蛋白质组的研究, 提高检测分析的精准度, 可为肾小管或间质损害的标志物研究提供研究平台.

### 3 结论

本文以方便取材的大鼠作为研究对象, 利用高效液相及质谱系统检测到来自健康 SD 大鼠的肾小球蛋白质样品的 3796 个蛋白, 并结合生物信息学软件进行系统的分析、归类, 与既往研究报道所获得数据进行对比, 结果表明本研究所获得的蛋白信息更加全面, 并且可方便地获得几种细胞的标志物蛋白, 为深入认识肾小球的结构和功能奠定了基础, 为开展 CKD 的发病机制研究提供了稳定而全面的蛋白质分析平台.

### 参考文献

- 1 Zhao Y, Denner L, Haidacher S J, et al. Comprehensive analysis of the mouse renal cortex using two-dimensional HPLC-tandem mass spectrometry. *Proteome Sci*, 2008, 6: 15
- 2 Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, et al. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3680—3690
- 3 Delahunty C M, Yates J R 3rd. MudPIT: Multidimensional protein identification technology. *BioTechniques*, 2007, 43: 563, 565, 567
- 4 Krakower C A, Greenspon S A. Localization of nephrotoxic antigen within isolated renal glomerulus. *Azche Pathol*, 1951, 51: 629—639



- 5 Washburn M P, Wolters D, Yates J R 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 242—247
- 6 Romijn E P, Yates J R 3rd. Analysis of organelles by on-line two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2008, 432: 1—16
- 7 Delahunty C, Yates J R 3rd. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, 2005, 35: 248—255
- 8 Elias J E, Gygi S P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods*, 2007, 4: 207—214
- 9 Thomas P D, Campbell M J, Kejariwal A, et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*, 2003, 13: 2129—2141
- 10 陈主初, 吴端生. 实验动物学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001. 265
- 11 Magni G, Hijazi Z M, Pandian N G, et al. Two- and three-dimensional transesophageal echocardiography in patient selection and assessment of atrial septal defect closure by the new DAS-Angel Wings device: Initial clinical experience. *Circulation*, 1997, 96: 1722—1728
- 12 D'Ambrosio C, Arena S, Talamo F, et al. Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids: Bovine proteome database. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815: 157—168
- 13 Foley R N, Parfrey P S, Samak M J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, 1998, 32 (Suppl 3): 112—119
- 14 Malyszko J, Malyszko J S, Kozminski P, et al. Elevated resistin is related to inflammation and residual renal function in haemodialysed patients. *Nephrology*, 2007, 12: 246—253
- 15 Stam F, van Guldener C, Becker A, et al. Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: The Hoorn study. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 537—545
- 16 Dandapani S V, Sugimoto H, Matthews B D, et al. Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem*, 2007, 282: 467—477
- 17 Tanaka T, Ohkubo H, Nakanishi S. Common structural organization of the angiotensinogen and the alpha 1-antitrypsin genes. *J Biol Chem*, 1984, 259: 8063—8065
- 18 Lampugnani M G, Resnati M, Raiteri M, et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 1992, 118: 1511—1522
- 19 Vogtlander N P, Tamboer W P, Bakker M A, et al. Reactive oxygen species deglycosilate glomerular alpha-dystroglycan. *Kidney Int*, 2006, 69: 1526—1534
- 20 Nagase M, Shibata S, Yoshida S, et al. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension*, 2006, 47: 1084—1093
- 21 Smeets B, Te Loeke N A, Dijkman H B, et al. The parietal epithelial cell: A key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 928—939
- 22 Lubeseder-Martellato C, Guenzi E, Jörg A, et al. Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1749—1759
- 23 Finzel A H, Reiningger A J, Bode P A, et al. ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21: 185—189
- 24 Huang M T, Mason J C, Birdsey G M. Endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 regulates angiogenesis. *Blood*, 2005, 106: 1636—1643
- 25 Gerke P, Huber T B, Sellin L, et al. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 918—926
- 26 Bardin N, Reumaux D, Geboes K, et al. Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12: 16—21
- 27 Christian S, Pilch J, Akerman M E, et al. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol*, 2003, 163: 871—878
- 28 Wagner N, Wagner K D, Xing Y, et al. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 3044—3051
- 29 Szeto C C, Lai K B, Chow K M, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta*, 2005, 361: 182—190
- 30 Vaughan M R, Pippin J W, Griffin S V, et al. ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int*, 2005, 68: 133—144
- 31 Saleem M A, O'Hare M J, Reiser J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin ex-

- pression. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 630—638
- 32 Nagata M, Horita S, Shu Y, et al. Phenotypic characteristics and cyclin-dependent kinase inhibitors repression in hyperplastic epithelial pathology in idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Lab Invest*, 2000, 80: 869—880
- 33 Nagata M, Nakayama K, Terada Y, et al. Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am J Pathol*, 1998, 153: 1511—1520
- 34 Urban M, Wojtkielewicz K, Głowińska B, et al. Soluble thrombomodulin-a molecular marker of endothelial cell injury in children and adolescents with obesity (in Polish). *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw*, 2005, 11: 73—77
- 35 Richard A, Kroczek, Kurt C, et al. Thy-1 functions as a signal transduction molecule in T lymphocytes and transfected B lymphocytes. *Nature*, 1986, 322: 181—184
- 36 Nagata M, Watanabe T. Podocytes in metanephric organ culture express characteristic in vivo phenotypes. *Histochem Cell Biol*, 1997, 108: 17—25
- 37 Zanetta L, Marcus S G, Vasile J, et al. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 2000, 85: 281—288
- 38 Blann A D. Is raised von Willebrand factor a marker of endothelial cell damage? *Med Hypotheses*, 1993, 41: 419—424
- 39 Blann A D. Von Willebrand factor antigen as an acute phase reactant and marker of endothelial cell injury in connective tissue diseases: A comparison with CRP, rheumatoid factor, and erythrocyte sedimentation rate. *Z Rheumatol*, 1991, 50: 320—322
- 40 Macconi D, Abbate M, Morigi M, et al. Permelective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol*, 2006, 168: 1073—1085
- 41 Sanz-Moncasi M P, Garin-Chesa P, Stockert E, et al. Identification of a high molecular weight endothelial cell surface glycoprotein, endoGlyx-1, in normal and tumor blood vessels. *Lab Invest*, 1994, 71: 366—373
- 42 Wang X Q, Sheibani N, Watson J C. Modulation of tumor endothelial cell marker 7 expression during endothelial cell capillary morphogenesis. *Microvasc Res*, 2005, 70: 189—197
- 43 Burch H B, Bross T E, Brooks C A, et al. The distribution of six enzymes of oxidative metabolism along the rat nephron. *J Histochem Cytochem*, 1984, 32: 731—736
- 44 Malyszko J, Pawlak K, Borawski J, et al. Effect of ketanserin on platelet function and bleeding time in uremic patients treated with erythropoietin. *Thromb Res*, 1995, 78: 541—546
- 45 Rastaldi M P, Armelloni S, Berra S, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J*, 2006, 20: 976—978
- 46 Ramachandra Rao S P, Wassell R, Shaw M A, et al. Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292: 1182—1189
- 47 Nakamura K, Oka M, Shirai M, et al. Source of reactive oxygen species in anti-Thy1 nephritis. *Ren Fail*, 1998, 20: 399—405
- 48 Zent R, Ailenberg M, Downey G P, et al. ROS stimulate reorganization of mesangial cell-collagen gels by tyrosine kinase signaling. *Am J Physiol*, 1999, 276: 278—287

## 补充材料

### ① Peptide.xls

### ② Protein annotation.xls

本文的以上补充材料见网络版 [csb.scichina.com](http://csb.scichina.com)。补充材料为作者提供的原始数据，未经本刊排版和编辑加工，作者对其学术质量和内容负责。