

应用 iTRAQ-HPLC-MS 技术筛选奶牛脂肪肝病尿液蛋白标志物

孙雨航, 夏成*, 舒适, 孙玲伟, 徐闯

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要: 应用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术筛选并鉴定脂肪肝病奶牛尿液中的差异表达蛋白, 为诊断奶牛脂肪肝病提供新的生物标志物。收集 40 头奶牛的尿液, 分为脂肪肝病组 A1、A2 和健康对照组 B1、B2, 每组各 10 头奶牛。组内每 10 个样品等量混合后进行试验, 将符合要求的样品进行 iTRAQ 标记后利用高效液相色谱法层析, 经串联质谱鉴定。共筛选出 110 个差异表达蛋白, 其中 50 个表达下调, 60 个表达上调; 通过生物信息学分析得到了 4 个关键性蛋白: 玻连蛋白 (Vitronectin, VTN)、脂质运载蛋白 (Lipocalin, LCN2)、凝血酶原 (Prothrombin, F2) 和丛集素 (Clusterin, CLU)。本试验成功筛选出脂肪肝病奶牛尿液中的差异表达蛋白, 并鉴定出其中 4 种与奶牛脂肪肝病存在密切关系的关键性调节因子, 如能进一步证实为奶牛脂肪肝病的重要生物标志物, 将会为奶牛脂肪肝病的早期检测和诊断提供新的方法。

关键词: 同位素标记相对和绝对定量技术; 差异表达蛋白; 奶牛脂肪肝病; 蛋白标志物

中图分类号: S823.91; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)05-0844-09

Screening Protein Markers in Urine of Dairy Cows with Fatty Liver Disease Based on ITRAQ-HPLC-MS Technology

SUN Yu-hang, XIA Cheng*, SHU Shi, SUN Ling-wei, XU Chuang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: To obtain new protein markers of fatty liver disease in dairy cows, the relative and absolute quantification isotope labeling (iTRAQ) technology was used to screen and identify differentially expressed proteins in urine of dairy cows with fatty liver disease. 40 cows urines were collected and divided into diseased groups A1, A2 and healthy groups B1, B2, respectively including 10 cows in each group. Every 10 urine samples in the same group was equally mixed into 1 sample for the experiment. Subsequently, the samples which the requirements were marked by an iTRAQ kit. Finally, the high-performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometry were used. In this way, we got a series of data as a result, then the results were conducted by a series of bioinformatics analysis. Totally, 110 differentially expressed proteins were screened, in which 50 were upregulated and 60 were downregulated. 4 key proteins were acquired by bioinformatic analysis: Vitronectin (VTN), Lipocalin (LCN2), Prothrombin (F2) and Clusterin (CLU). Differentially expressed proteins in the urine of dairy cows with fatty liver disease were screened

收稿日期: 2013-10-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31001094); “十二五”农村领域国家科技课题 (2012BAD12B05-2; 2012BAD12B03-2); 科技支撑计划 (2013BAD21B01); 国家自然科学基金面上项目 (31672625); 科技部星火计划 (2012GA670001); 黑龙江省新世纪优秀人才项目 (1252-NCET-003)

作者简介: 孙雨航 (1989-), 女, 满族, 辽宁锦州人, 硕士生, 主要从事临床兽医学专业, 动物营养代谢病研究, E-mail: 758375006@qq.com

* 通信作者: 夏成, 教授, 博士生导师, 主要从事动物营养代谢病研究, Tel: 0459-6819207, E-mail: xcwlxyf@sohu.com

in this experiment, 4 key regulatory factors were closely related to fatty liver disease, and should be further confirmed as important biological markers of fatty liver disease in dairy cows, which will provide a new method in early detection and diagnosis of fatty liver disease of dairy cows.

Key words: the relative and absolute quantification isotope labeling technology; differentially expressed proteins; dairy cow with fatty liver disease; protein markers

奶牛脂肪肝病又称母牛肥胖综合症,是指干乳期过于肥胖母牛产后发生能量负平衡,导致体脂动员所引起的一种以肝脏脂肪蓄积和脂肪变性为病理特征的围产期能量代谢障碍性疾病^[1]。目前,奶牛脂肪肝病面临的最主要问题是早期诊断困难,缺乏特异性的诊断手段和方法。活体穿刺测定肝脂含量是临床上诊断奶牛脂肪肝的“金标准”,但需要肝脂含量超过 $50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,患病牛才能表现明显的临床症状^[2],同时由于该检测方法存在易损伤、感染,检测复杂,费用高等弊端,故不适用于兽医临床^[1,3]。另外,血液生化指标测定和肝功能检测是辅助诊断奶牛脂肪肝病的重要方法,可通过检测病牛血液葡萄糖 (Glucose, Glc) 和 β -羟丁酸 (β -hydroxybutyric acid, BHBA) 等浓度指标以及肝损伤特异性酶活性等指标的变化来预测脂肪肝病的发生。但是,这 2 种方法都需要巨大的工作量且肝酶升高以及肝损伤的程度与肝脂沉积程度并非一致^[4],这就使其在诊断奶牛脂肪肝病方面缺乏一定的特异性和准确度。尽管重度脂肪肝病奶牛的血浆丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 等酶活性升高显著,但是病牛常因失去治疗价值而被淘汰^[5-6]。因此,寻求一种能够满足兽医临床和养牛生产实践需要的非损伤、特异性高、灵敏度和准确度好的诊断方法,已成为防治奶牛脂肪肝病急需突破的瓶颈。

相对和绝对定量同位素标记 (Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术是美国应用生物系统公司在 2004 年推出的一项新的体外同位素标记技术^[7],主要用于蛋白质的鉴定^[4]、蛋白变化监测^[8]和筛选疾病生物标志物^[9]等。目前,可用于该技术的检测样本来源几乎涵盖了所有的机体代谢物,包括血清^[10]、血浆^[11]、泪液^[12]和组织^[13]等,而本试验中所使用的尿液样本因其具备良好的样品试验条件早已被广泛地应用到临床研究中^[14]。因此,本研究旨在应用 iTRAQ 技术筛选和鉴定奶牛脂肪肝病的生物标记物,为奶牛脂肪肝病

的早期诊断奠定理论依据和方法学基础。

1 试验材料与方法

1.1 试验动物和分组

在黑龙江某一集约化奶牛场选取产后 7~28 d, 年龄在 2~5 岁之间,胎次为 1~3 胎,体况及泌乳量相近的荷斯坦奶牛进行肝脂检测。首先,用 C. Xu 等所描述的方法开始采集肝组织样本^[15],然后根据 T. H. Herdt 等所描述的方法计算肝脂含量并分组^[16],选择其中肝脂含量超过 34% 且无其他疾病的 20 头奶牛作为脂肪肝病组 A,肝脂含量低于 13% 且无任何疾病的 20 头健康奶牛作为对照组 B。为了减少试验误差、增加技术重复,随后将 A、B 2 组分别随机分成 2 组,即 A1 和 A2, B1 和 B2 组各 10 头奶牛,用于后续的试验。所选试验奶牛均按中国奶牛饲养标准饲喂,且日粮组成和营养水平一致,具体比例见表 1。

1.2 样品的采集和处理

清晨用导尿管分别采集空腹健康组和患病组奶牛尿液各 20 mL,在 4 °C 下 $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,密封,置于一 80 °C 冰箱冷冻保存。

1.3 SDS-PAGE 电泳检测

A1、A2 和 B1、B2 各组组内每 10 个样品等量混合成为 1 个混合样本,每组样本中各取 1.6 mL,然后按照 TCA-丙酮沉淀法进行沉淀。预冷后加入 8 mL 样品混匀,置于一 20 °C 下抽提过夜,然后于 $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min 后弃去上清液。进行沉淀时共用丙酮洗 4 次,以去除 TCA,每次 $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。洗完后放于通风橱风干,干燥后加入缓冲液 (SDT buffer 4% SDS, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TrisHCl pH 8.0),加入比例为 1:10,溶解后沸水煮 5 min,取 2 μL SDS-PAGE 进行电泳检测。

1.4 FASP 酶解和肽段定量

从 4 个样本中各取出约 20 μL 样品,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 2 μL ,经沸水浴后冷却至室温。然后加入 200 μL UA buffer ($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Urea, 150

表 1 试验奶牛日粮组成及营养水平

Table 1 Diet composition and the nutrient levels of experimental cows %

项目 Item	含量 Content
原料 Ingredient	—
干草 Hay	3.2
进口苜蓿 Imported alfalfa	14.0
秸秆 Straw	9.4
全株玉米青贮 Whole corn silage	24.0
玉米 Corn	26.0
豆粕 Soybean meal	21.0
磷酸氢钙 $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	0.4
食盐 NaCl	0.5
碳酸钙 CaCO_3	0.5
预混料 Premix	1.0
合计 Total	100
营养水平 Nutrient	—
粗蛋白 CP	16.0
粗脂肪 EE	5.6
中型洗涤纤维 NDF	39.1
酸性洗涤纤维 ADF	20.3

每千克预混料向日粮提供:维生素 A $\geq$ 160 kIU;维生素D₃ $\geq$ 40 kIU;维生素 E $\geq$ 1 000 IU;维生素 B₁₂ $\geq$ 1 000 mg;硫酸镁 $\geq$ 1 200 mg;碘化钾 $\geq$ 20 mg;硫酸亚铁 $\geq$ 1 200 mg;硫酸铜 $\geq$ 300 mg;硫酸锰 $\geq$ 1 000 mg;亚硒酸钠 $\geq$ 10 mg;石粉 850~895 g

Per kg premix provide: Vitamin A $\geq$ 160 kIU; Vitamin D₃ $\geq$ 40 kIU; Vitamin E $\geq$ 1 000 IU; Vitamin B₁₂ $\geq$ 1 000 mg; MgSO₄ $\geq$ 1 200 mg; KI $\geq$ 20 mg; FeSO₄ $\geq$ 1 200 mg; CuSO₄ $\geq$ 300 mg; MnSO₄ $\geq$ 1 000 mg; Na₂SeO₃ $\geq$ 10 mg; Mountain flour 850-895 g

mmol·L⁻¹ TrisHCl pH8.0)混匀,转入 30 kd 超滤离心管后 14 000 r·min⁻¹离心 15 min。再加入 200 μL UA buffer 14 000 r·min⁻¹离心 15 min,然后弃去滤液。再加入 100 μL IAA(50 mmol·L⁻¹ IAA in UA)600 r·min⁻¹下震荡 1 min,避光放在室温下 30 min,然后 14 000 r·min⁻¹离心 10 min。然后加入 100 μL UA buffer 14 000 r·min⁻¹离心 10 min,此过程重复 2 次。再加入 100 μL Dissolution buffer,14 000 r·min⁻¹离心 10 min,重复 2 次。最后加入 40 μL Trypsin buffer(2 μg Trypsin in 40 μL Dissolution buffer),6 000 r·min⁻¹振荡 1 min,置于 37 ℃ 下 16~18 h。换新收集管,14 000 r·min⁻¹离心 10 min 后收集滤液。

1.5 肽段 i-TRAQ 标记

应用 i-TRAQ 试剂盒对 4 组样品进行标记,分别记为 B1—114、A1—115、A2—116 和 B2—117。

1.6 质谱分析

1.6.1 毛细管高效液相色谱 样品由自动进样器上样到 1 个肽段夹中,再经色谱柱分离。然后对肽段进行洗脱,洗脱的相关液相梯度为 0~50 min, A 液线性梯度 4%~50%;50~54 min, B 液线性梯度 50%~100%;54~60 min, B 液维持在 100%。

1.6.2 ESI 质谱鉴定 酶解产物经毛细管高效液相色谱脱盐及分离后用 LTQ VELOS 质谱仪进行质谱分析。以 Microspray 方式进样,以正离子为检测方式,其中毛细管温度为 200 ℃。多肽和多肽碎片的质量电荷比的采集:每次全扫描后采集 40 个碎片图谱。

1.7 数据分析

1.7.1 原始质谱数据分析 原始文件用 BIO-WORKS 软件搜索相应的数据库,最后得到鉴定的蛋白质结果。然后将蛋白数据进行整理,规定以 2 为阈值,筛选出患病组与健康组奶牛差异表达比值在 2 倍以上的蛋白。

1.7.2 基因网络分析 分析蛋白与蛋白之间的相互作用,最后通过综合考虑数据结果,将其整合为基因间的相互关系网络,然后将相关性较大的基因进行生物学统计,得到计数和富集度列表,从而更加直观地显示网络调控的核心基因。

1.7.3 信号通路富集度分析 将基因使用 Gen MAPP v2.1 向 KEGG pathway 数据库映射,并统计基因在每个信号通路中出现的次数。

2 结 果

2.1 差异表达蛋白

在以 2 为阈值筛选出的差异表达蛋白中,比值小于 2 者为表达下调的蛋白,大于 2 者为表达上调的蛋白。经鉴定 110 种差异表达的蛋白中有 50 种表达下调蛋白(表 2),包括 34 种牛源性蛋白和 13 种人源性蛋白,还有 3 种其他动物蛋白。另外,鉴定的 110 种蛋白中有 60 种表达上调蛋白(表 3),其中 34 种、20 种和 6 种分别被收录在牛、人以及猪数据库中。许多蛋白是同一类蛋白,具有相同的功能,且比值相近,具有一定的重复性,说明筛选蛋白结果很理想。

2.2 基因网络分析结果

为了更加直观地显示网络调控的核心基因,随后我们将相关性较大的基因进行生物学统计,得到计数和富集度列表,如表 4 所示。

表 2 脂肪肝病牛尿液中 50 个表达下调的蛋白
Table 2 Fifty down-regulated proteins in urine from dairy cows with fatty liver disease

地址 ID	基因缩写 Gene abbreviation	英文名称 English name	中文名称 Chinese name	比值 Ratio
119914036	SPA31-BOVIN	Serpin A3-1	丝氨酸 A3-1	0.497 263
119923092	SPB3_HUMAN	Squamous cell carcinoma antigen	鳞状细胞癌抗原	0.235 833
151557009	SPB3_HUMAN	SERPINB4 protein	丝氨酸蛋白酶抑制剂 B4 抗体	0.262 367
111307504	SDHL-BOVIN	L-serine dehydratase/ L-threonine deaminase	L-丝氨酸(苏氨酸)脱水酶	0.188 473
74354820	ANT3-BOVIN	Antithrombin-III	抗凝血酶-3	0.322 589
50844503	TKT-BOVIN	Transketolase	转酮醇酶	0.428 571
42	A1AT-BOVIN	Alpha-1-antiproteinase	α -1-抗蛋白酶	0.466 064
110288008	UK114-BOVIN	Ribonuclease UK114	核糖核酸酶 UK114	0.409 350
498822	A2AP-BOVIN	Alpha-2-antiplasmin	α -2-抗纤维蛋白溶酶	0.348 631
111120280	CO2-BOVIN	Complement C2	补体 C2	0.374 747
124056491	CO3-BOVIN	Complement C3	补体 C3	0.210 428
1229	CO4-BOVIN	Complement C4	补体 C4	0.475 220
27806637	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	补体 C4-A	0.4348 49
75947612	CO9-BOVIN	Complement component C9	补体成分 C9	0.177 336
27807343	CTHL2-BOVIN	Cathelicidin-2	抗菌肽 2	0.371 240
53854908	CTHL3-BOVIN	Cathelicidin-3	局部抗菌肽-3	0.364 650
1707408	CTHL3-BOVIN	Cathelicidin-3	抗菌肽-3	0.309 435
111399424	CTHL4-BOVIN	Cathelicidin-4	抗菌肽 4	0.398 337
116119217	CTHL4-BOVIN	Cathelicidin-4	抗菌肽 4	0.476 725
27806237	CTHL5-BOVIN	Cathelicidin-5	抗菌肽 5	0.338 15
27807329	CTHL6-BOVIN	Cathelicidin-6	抗菌肽 6	0.260 591
151556224	CTHL7-BOVIN	Cathelicidin-7	抗菌肽 7	0.415 498
86438524	PEDF-BOVIN	Pigment epithelium-derived factor	色素上皮衍生因子	0.454 450
151556981	HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	肝素辅因子 2	0.223 329
74354056	ENOA-BOVIN	Alpha-enolase	α -烯醇	0.450 000
27808640	PGRP1-BOVIN	Peptidoglycan recognition protein 1	肽聚糖识别蛋白 1	0.450 399
95769010	ILEU-BOVIN	Leukocyte elastase inhibitor	白血球弹性蛋白酶抑制剂	0.316 913
151555910	CLU-BOVIN	Clusterin	丛生蛋白	0.322 037
148744060	CD177_MOUSE	CD177 antigen	CD177 抗原	0.414 048
151555647	CD14-BOVIN	Monocyte differentiation antigen CD14	单核细胞变异抗原 CD14	0.343 547
60650302	PGS1-BOVIN	Biglycan	双糖链蛋白多糖	0.349 621
109825284	COTL1-BOVIN	Coactosin-like protein	毛状蛋白类似蛋白	0.365 375
545920	CALR-BOVIN	Calreticulin	钙网蛋白	0.264 297
89474609	OSTP-BOVIN	Osteopontin	骨桥蛋白	0.297 518
157830374	TRFL-BOVIN	Lactotransferrin	乳运铁蛋白	0.305 812
135806	THRB-BOVIN	Prothrombin	凝血素	0.226 266
71480635	RETN_BOVIN	Resistin	抵抗素	0.337 536
162797	CASB-BOVIN	Beta-casein	β 酪蛋白	0.117 155
163190	IBP3-BOVIN	Insulin-like growth factor-binding protein 3	胰岛素样生长因子结合蛋白 3	0.043 478
151554669	HS12B_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 12B	热休克 70 蛋白 12B	0.110 429
151555899	TGON2_HUMAN	Trans-Golgi network integral membrane protein 2	反面高尔基网膜内在蛋白 2	0.168 047
109030	LAC_HUMAN	Ig lambda-1 chain C regions	Ig λ 1 链 C 区域	0.190 086
12084215	HB-BOVINB	Hemoglobin subunit beta	血红蛋白 β 亚基	0.162 563
31615475	RET4-BOVIN	Retinol-binding protein 4	视黄醇结合蛋白 4	0.067 157
114051758	TIMD1_HUMAN	Hepatitis A virus cellular receptor 1	甲肝病毒细胞受体 1	0.198 379
119904118	NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	中性粒细胞明胶酶 相关脂质运载蛋白	0.312 148
146186805	PCD GK_PANTR	Protocadherin gamma-C3	原钙粘蛋白 γ c3	0.461 612
54036676	ACTG_XENLA	Actin,cytoplasmic 2	激动蛋白细胞质 2	0.466 693
114051379	A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	富含亮氨酸 α 2-糖蛋白	0.484 743
27806235	ADAP1_HUMAN	Arf-GAP with dual PH domain-containing protein 1	域包含蛋白质	0.493 450

ID 为蛋白在 NCBI 数据库中的 gi 号,gi 不同代表不同种蛋白。表 3 同
ID is the “ gi ” of a protein in NCBI,and various numbers represent different proteins. The same as Table 3

表 3 脂肪肝病牛尿液中 60 个表达上调的蛋白
Table 3 Sixty up-regulated proteins in urine from dairy cows with fatty liver disease

地址 ID	基因缩写 Gene abbreviation	英文名称 English name	中文名称 Chinese name	比值 Ratio
77404252	CO1A1_BOVIN	Collagen alpha-1(I) chain	a-1 胶原蛋白 I 链	5.773 975
27806257	CO1A2_BOVIN	Collagen alpha-2(I) chain	a-2 胶原蛋白 I 链	6.765 625
116003881	CO3A1_HUMAN	Collagen alpha-1(III) chain	a-1 胶原蛋白 III 链	14.437 500
53854288	K2C5_BOVIN	Keratin,type II cytoskeletal 5	角蛋白,II 型细胞骨架 5	2.367 114
119892108	K22E_HUMAN	Keratin,type II cytoskeletal 2 epidermal	角蛋白,II 型上皮细胞骨架 2	2.884 924
151553925	K1C10_BOVIN	Keratin,type I cytoskeletal 10	角蛋白,I 型细胞骨架 10	3.574 866
134085706	K2C6A_HUMAN	Keratin,type II cytoskeletal 6A	角蛋白,II 型细胞骨架 6A	9.520 833
61820389	SAL_PIG	Salivary lipocalin	唾液脂质运载蛋白	10.106 840
74268269	APOA1_BOVIN	Apolipoprotein A-I	载脂蛋白 A-1	3.317 308
85701291	VTDB_BOVIN	Vitamin D-binding protein	维生素 D 结合蛋白	5.416 902
1169594	FABPL_BOVIN	Fatty acid-binding protein,liver	肝脏脂肪酸结合蛋白	3.224 537
895754	FABP4_BOVIN	Fatty acid-binding protein,adipocyte	脂肪细胞中脂肪酸结合蛋白	3.998 741
13637914	CATD_BOVIN	Cathepsin D	组织蛋白酶 D	5.092 593
115305256	SDC1_BOVIN	Syndecan-1	共结合蛋白聚糖-1	2.362 567
111304516	TWSG1_HUMAN	Twisted gastrulation protein homolog 1	扭曲的原肠胚形成蛋白同系物 1	2.000 365
76615983	PIP1_BOVIN	Prolactin-inducible protein homolog1	催乳激素诱导蛋白同系物 1	3.265 934
39725470	PIP2_BOVIN	Prolactin-inducible protein homolog2	催乳激素诱导蛋白同系物 2	7.364 035
119911835	VMO1_HUMAN	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	卵黄膜外层蛋白 1 同系物	4.016 085
109659361	SFRP4_HUMAN	Secreted frizzled-related protein 4	卷曲相关分泌蛋白 4	18
151556882	SG2A2_HUMAN	Secretoglobin family 2A member 2	分泌球蛋白 2A 家族成员 2	3.184 380
94534741	GNS_BOVIN	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶	2.013 536
151554376	BTD_BOVIN	Biotinidase	生物素酰胺酶	2.235 501
113912173	RNT2_HUMAN	Ribonuclease T2	核糖核酸酶 T2	2.571 567
19068135	DPP4_BOVIN	Dipeptidyl peptidase 4	二肽基肽酶 4	3.063 643
86826319	CBPB2_BOVIN	Carboxypeptidase B2	羧肽酶 B2	2.125 708
78042496	AMY2B_HUMAN	Alpha-amylase 2B	a-淀粉酶 2B	3.100 000
86826779	SIAE_HUMAN	Sialate O-acetylesterase	唾液酸-O-乙酰酯酶	3.190 360
240684	DNAS1_BOVIN	Deoxyribonuclease-1	脱氧核糖核酸酶-1	3.480 413
61555615	VNN1_BOVIN	Pantetheinase	泛酰巯基乙胺酶	4.093 642
59857939	TIMD4_HUMAN	T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4	T 细胞免疫球蛋白和粘蛋白域包含蛋白质 4	2.117 998
114051886	VSIG4_HUMAN	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4	v 组和免疫球蛋白域包含蛋白质 4	2.563 149
74268005	WFDC2_PIG	WAP four-disulfide core domain protein 2	WAP 四二硫核心域蛋白 2	11.252 980
108914	SAP1_BOVIN	Proactivator polypeptide1	激活剂前体多肽 1	68.992 830
120419464	SAP2_BOVIN	Proactivator polypeptide2	激活剂前体多肽 2	2.161 349
84000107	GPNMB_HUMAN	Transmembrane glycoprotein HGFIN	跨膜糖蛋白造血干细胞生长因子诱导神经肽	7.096 638
76620378	CYTL1_HUMAN	Cytokine-like protein 1	细胞因子如蛋白 1	8.642 857
119933204	FA10_BOVIN	Coagulation factor X	凝固因子 X	3.364 423
75775527	TNR1B_HUMAN	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	肿瘤坏死因子受体超家族成员 1B	3.881 095
76624918	CNTFR_HUMAN	Ciliary neurotrophic factor receptor subunit alpha	睫状神经营养因子受体亚单位 α	2.473 499
154425674	LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	潜在的转化生长因子 β 绑定蛋白 1	2.556 932
122140148	CR3L3_BOVIN	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3	循环 AMP 反应元素绑定存在蛋白质 3	2.020 039
74356495	THY1_MACMU	Thy-1 membrane glycoprotein	胸腺抗原膜糖蛋白	2.094 555
82697317	CD59_PIG	CD59 glycoprotein	糖蛋白 CD59	2.285 119
1770087	FCGR3_BOVIN	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III	低亲和力受体免疫球蛋白伽马 Fc 地区 III	7.892 857
156713141	BASI_CRIGR	Basigin	基础免疫球蛋白	2.106 635
148232148	KLK1_HUMAN	Kallikrein-1	血管舒缓素-1	3.712 180
56606017	KLK1_HUMAN	Kallikrein-1	血管舒缓素-1	2.747 925
151555746	COL12_BOVIN	Collectin-12	胶原凝集素-12	8.310 807
75775171	LEG9_BOVIN	Galectin-9	半乳凝素-9	3.510 359

续表

地址 ID	基因缩写 Gene abbreviation	英文名称 English name	中文名称 Chinese name	比值 Ratio
27807439	BCAM_BOVIN	Basal cell adhesion molecule	基底细胞粘附分子	5.072 710
125991938	CAD11_HUMAN	Cadherin-11	钙黏着蛋白-11	2.065 727
151553637	MCP_BOVIN	Membrane cofactor protein	膜辅蛋白	2.026 084
115305366	PRSS8_RAT	Prostasin	前列腺蛋白	2.149 317
27806093	EPCR_BOVIN	Endothelial protein C receptor	内皮细胞蛋白 C 受体	2.036 640
28603766	IPSP_BOVIN	Plasma serine protease inhibitor	血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂	2.385 533
157954420	ANGL2_HUMAN	Angiopietin-related protein 2	血管生成素相关蛋白 2	2.450 842
119917197	PVRIG_HUMAN	Transmembrane protein PVRIG	跨膜蛋白 PVRIG	2.550 930
78045497	VTNC_HUMAN	Vitronectin	玻连蛋白	3.668 680
27806637	FBN1_BOVIN	Fibrillin-1	原纤蛋白-1	3.735 508
82697387	OTOR_HUMAN	Otoraplin	靶标	6.282 517

经过统计发现,LCN2、F2、VTN 和 CLU 在基因网络分析中计数最大,是出现次数最多的蛋白;这 4 种蛋白的富集程度也是其中最小的,即每个生物

过程富集到每一个蛋白上的数值最小(表 4),表明这些蛋白在生物过程中出现的最多,相应也发挥最重要的作用。

表 4 基因计数及富集程度

Table 4 Gene count and enrichment *P*-value

基因简称	英文名称	中文名称	计数	富集程度
Gene abbreviation	English name	Chinese name	Count	Enrichment <i>P</i> -value
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	单核细胞变异抗原 CD14	8	0.129 117 822
CD59	CD59 glycoprotein	糖蛋白 CD59	8	0.129 117 822
SDC1	Syndecan-1	共结合蛋白聚糖-1	9	0.074 983 488
C3	Complement C3	补体 C3	10	0.040 169 272
LCN2	Neutrophilgelatinase-associated lipocalin	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白	12	0.008 969 395
F2	Prothrombin	凝血酶原	13	0.003 725 820
VTN	Vitronectin	玻连蛋白	13	0.003 725 820
CLU	Clusterin	丛集素	17	0.000 045 717

共得到 76 条基因计数和富集程度列表,此图为其中计数较大(大于 6)的蛋白;LCN2、F2、VTN、CLU 这 4 种蛋白的计数分别为 12、13、13、17,富集程度 *P* 值分别为 0.008 969 395、0.003 725 82、0.003 725 82、0.000 045 717

A total of 76 lists of genes count and enrichment degree,seen here in which the count large (greater than 6) protein;LCN2,F2,VTN,CLU these four protein count 12,13,13,17, respectively,and the degree of enrichment of *P* values were 0.008 969 395,0.003 725 82,0.003 725 82,0.000 045 717

2.3 信号通路分析结果

经过统计分析发现,粘着斑通路、代谢通路和 ECM(受体相互作用)通路计数最大,均为 6(表 5),说明这 3 个通路是调控奶牛脂肪肝病的重要通路。具体通路调控作用分析详见讨论部分。

3 讨 论

本研究运用 iTRAQ 技术分析脂肪肝病奶牛体内差异表达蛋白,成功获得了 4 种关键性调节因子:F2、VTN、LCN2 和 CLU。

3.1 凝血酶原(Prothrombin,F2)调控途径

F2 也称凝血因子 II (Coagulation factor II (F2)),是一种由 622 个氨基酸组成的蛋白质。它能够控制凝血酶原凝血酶前体的合成,使可溶性纤维蛋白原转变成不溶性的纤维蛋白链并催化许多其他凝血反应^[17];它还可以通过介导磷酸化过程,促进肌动蛋白应力纤维的形成,从而促进 Actin 的形成。根据 KEGG pathway 数据库搜库结果可知 F2 主要存在于肌动蛋白细胞骨架的调节通路中,F2 下调可导致 F-Actin(纤维状肌动蛋白)下调。这说明

表 5 信号通路计数
Table 5 Signaling pathway count

信号通路名称 Signaling pathway name	计数 Count	信号通路名称 Signaling pathway name	计数 Count
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine,serine and threonine metabolism	1	粘着斑通路 Focal adhesion	6
磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	1	过氧化物酶体增殖物活化受体信号通路 PPAR signaling pathway	3
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	1	细胞黏附分子 Cell adhesion molecules	1
粘多糖降解 Glycosaminoglycan degradation	1	黏着连接 Adherens junction	1
泛酸盐和辅酶 A 生物合成 Pantothenate and CoA biosynthesis	1	紧密连接 Tight junction	1
生物素代谢 Biotin metabolism	1	代谢途径 Metabolic pathways	6
刺激神经组织的配体受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	1	细胞外基质-受体反应相互作用 ECM-receptor interaction	6
溶酶体 Lysosome	3		

F2 不仅参与凝血的调控,也参与了肌肉收缩调节。同时,F2 还是一种强效的草酸钙晶体生成抑制剂,存在于未稀释的人尿液中和无机条件下^[18]。在构建人类凝血酶原片段时,研究人员选用序列同源性的 80.9%的牛凝血酶原片段,结果显示,没有任何差异^[19]。这为能够在奶牛尿液中找到脂肪肝病的生物标志物提供了理论依据。

3.2 玻连蛋白 (Vitronectin,VTN)调控途径

VTN 是一种存在于血浆的丰富的黏连糖蛋白,被发现于不同的细胞外基质位点、血管壁、肿瘤细胞等,尤其是与损伤/修复或疾病状态下的重塑组织密切相关^[20]。VTN 参与凝血、纤溶系统、补体活化的调节^[20-21]。在急性炎症期(如发生严重脓毒病时)显著增加,并出现在脏器损伤条件下^[22-23],同时能够促进嗜中性粒细胞的粘附和迁移^[24]。通过信号通路富集程度分析发现,VTN 主要存在于粘着斑通路和细胞外基质-受体反应 (ECM) 通路中,富集程度高达 6。而在 KEGG pathway 数据库图释粘着通路中,ECM 下调直接导致 Actin(肌动蛋白)下调。也就是说 VTN 蛋白表达上调通过作用于 ECM 过程能够对 Actin 的下调进行调节,但具体 VTN 上调导致 ECM 过程是上调还是下调需要进一步验证。

上面提到的 Actin 是微丝的结构蛋白,在细胞

内以 2 种形式存在:即游离状态的单体(G-Actin)和微丝中的纤维状肌动蛋白多聚体(F-Actin)。非稳态动力学模型被用于说明微丝组装的动态调节机制,它认为 ATP 是调节微丝组装的动力学不稳定性行为的主要因素^[25]。微丝组装的延长期通过 ATP 来调节,1 个球状肌动蛋白分子可结合 1 分子 ATP,结合 ATP 的肌动蛋白(即 ATP-肌动蛋白)对纤维状肌动蛋白末端的亲和性高。而水解的 ADP-肌动蛋白对纤维末端的亲和性低,容易从末端脱落,使纤维缩短^[26]。ATP-肌动蛋白浓度与其聚合速度呈正比,当 ATP-肌动蛋白浓度下降时期聚合速度下降,而 ATP 水解为 ADP+Pi 的速度不变,ADP-肌动蛋白不断从纤维末端解聚脱落^[27],从而使 F-Actin 缩短。当奶牛发生脂肪肝时,脂肪酸的 β -氧化发生障碍,没有足够乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环生成足够的 ATP^[28],从而使 ATP-肌动蛋白浓度降低,最终导致 F-Actin 的缩短。

上述讨论与本试验中 VTN 和 F2 调节的 F-Actin 下调一致。也就是说,当发生脂肪肝时,F-Actin 下调。则 VTN 表现上调,F2 表现下调。因此 VTN 和 F2 与奶牛脂肪肝病密切相关,影响着此病的发生和发展,至于它们能否作为早期诊断奶牛脂肪肝病特异且灵敏的生物标志物仍需要后续的试验

进行验证。

3.3 脂质运载蛋白 (Lipocalin, LCN2) 调控途径

LCN2 是中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白。它已经被定性为由肝脏产生的急性反应物,且多由冷应激产生,可潜在地提高细胞增殖和保护能力,并与肝脏再生相关,可作为探索肝脏功能的敏感生物标记物。在氧化应激和 X 射线下也可诱导肝脏产生 LCN2。同时脂肪肝病会影响蛋白质的生物学功能,尤其是高密度脂蛋白 (High density lipoprotein, HDL) 的生物学功能。当奶牛患脂肪肝病时,其体内的 HDL 颗粒结合了大量珠蛋白和血浆淀粉状蛋白 A,使 HDL 的载脂蛋白 A-I 和载脂蛋白 C-III 浓度减少。载脂蛋白 A-I 的作用是激活卵磷脂-胆固醇酰基转移酶,使来自胆甾醇基和溶血磷脂胆碱的磷酸卵磷脂酯化为游离胆固醇。胆固醇酯^[29]、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白和肉碱棕榈酰转移酶等在患脂肪肝奶牛都有所减少^[30],从而使甘油三酯的运输减少,最终导致脂肪肝,形成恶性循环。总之,肝脏受损产生 LCN2,且影响蛋白质的功能,并导致载脂蛋白的减少,载脂蛋白减少反过来加剧脂肪肝的形成。

3.4 丛集素 (Clusterin, CLU) 调控途径

CLU 也称丛生蛋白,是 1 个 449-氨基酸,异二聚体糖蛋白^[31]。Clusterin 与许多病理过程相关,如老化,神经退行性疾病,尤其在癌的进展中发挥核心作用;同时它也与不同的生理过程相关,如脂质转运^[32]。丛生蛋白与低密度脂蛋白、高密度脂蛋白和胆固醇呈正相关^[33],而与甘油三酯负相关,这是代谢性综合征的关键^[34]。也就是说,当丛生蛋白表达下调时,甘油三酯升高,极低密度脂蛋白降低。极低密度脂蛋白降低会造成甘油三酯在肝脏内蓄积,加上与丛生蛋白负相关的甘油三酯升高,共同加剧了脂肪肝的发生。因此,丛生蛋白表达下调和脂肪肝病表现一致,可认为是脂肪肝病的生物标志物之一。

4 结 论

综上所述,F2 和 VTN 通过信号通路调节能量代谢,LCN2 和 CLU 通过调节运载甘油三酯的极低密度脂蛋白来调控肝脏内的脂肪沉积量,它们在奶牛脂肪肝病的形成和发展中共同发挥作用。

参考文献:

[1] JORRITSMA R, JORRITSMA H, SCHUKKEN Y

- H, et al. Prevalence and indicators of postpartum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands[J]. *Livest Prod Sci*, 2001, 68(1): 53-60.
- [2] GERLOFF B J, HERDT T H, EMERY R S. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, 188(8): 845-850.
- [3] LEBLANC S. Metabolic health of dairy cattle in the transition period[J]. *J Reprod Dev*, 2010, (Suppl): S29-35.
- [4] WOLFF S, OTTO A, ALBRECHT D, et al. Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: A comparative study[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(7): 1183-1192.
- [5] XU C, WANG Z, LIU G W, et al. Metabolic characteristic of the liver of dairy cows during ketosis based on comparative proteomics[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2008, 21(7): 1003-1010.
- [6] XU C, WANG Z. Comparative proteomics analyze of ketotic cows liver[J]. *Vet Res Commun*, 2008, 32(3): 263-273.
- [7] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [8] HARDT M, WITKOWSKA H E, WEBB S, et al. Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva-quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents[J]. *J Anal Methods Chem*, 2005, 77(15): 4947-4954.
- [9] HAURA E B, MÜLLER A, BREITWIESER F P, et al. Using iTRAQ combined with tandem affinity purification to enhance low-abundance proteins associated with somatically-mutated EGFR core complexes in lung cancer[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(1): 182-190.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] SRINIVASAN S, THANGAVELU M, ZHANG L, et al. iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients[J]. *Invest Ophthalmol Vis*

- Sci, 2012, 53(8):5052-5059.
- [13] DESOUZA L, DIEHL G, RODRIGUES M J, et al. Search for cancer markers from endometrial ts using differentially labeled tags i-TRAQ and c-ICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(2): 377-386.
 - [14] MA D, LI L. Searching for reliable premortem protein biomarkers for prion diseases [J]. *Exp Rev Proteomics*, 2012, 9(3):267-280.
 - [15] XU C, LIU G W, LI X B, et al. Decreased complete oxidation capacity of fatty acid in the liver of ketotic cows[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2010, 3:312-317.
 - [16] HERDT T H, GOEDERS L, LIESMAN J S, et al. Test for estimation of bovine hepatic lipid content[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1983, 182(9):953-955.
 - [17] RUNGROJ N, SUDTACHAT N, NETTUWAKUL C, et al. Association between human prothrombin variant (T165M) and kidney stone disease[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9):e45533.
 - [18] RYALL R L, GROVER P K, STAPLETON A M, et al. The urinary F1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine *in vitro* [J]. *Clin Sci*, 1995, 89:533-541.
 - [19] DESOUZAL V, TAYLOR A M, LI W, et al. Multiple reaction monitoring of iTRAQ labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial ts [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(8):3525-3534.
 - [20] PREISSNER K T, REUNING U. Vitronectin in Vascular Context: Facets of a multitasking matricellular protein [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2011, 37(4):408-424.
 - [21] PATE G E, WALINSKI H P, BOHUNEK L, et al. Validation of the vitronectin knockout mouse as a model for studying myocardial infarction: Vitronectin appears to influence left ventricular remodeling following myocardial infarction[J]. *Exp Clin Cardiol*, 2013, 18(1):43-47.
 - [22] SINGH B, JANARDHAN K S, KANTHAN R. Expression of angiostatin, integrin α v β 3, and vitronectin in human lungs in sepsis[J]. *Exp Lung Res*, 2005, 31:771-782.
 - [23] TSURUTA Y, PARK Y J, SIEGAL G P, et al. Involvement of vitronectin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2007, 179(10): 7079-7086.
 - [24] BAE H B, ZMIJEWSKI J W, DESHANE J S, et al. Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(6):790-796.
 - [25] ATKINSON S J, HOSFORD M A, MOLITORIS B A. Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(7):5194-5199.
 - [26] KORN E D, CARLIER M F, PANTLON D. Actin polymerization and ATP hydrolysis [J]. *Science*, 1987, 238:638-644.
 - [27] NEUHAUS J M, WANGER M, KEISER T, et al. Treadmilling of actin [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1983, 4:507-527.
 - [28] RUKKWAMSUK T, RUNGRUANG S, CHOOTHE-SA A, et al. Effect of propylene glycol on fatty liver development and hepatic fructose 1,6 biphosphatase activity in periparturient dairy cows[J]. *Livest Prod Sci*, 2005, 95(1):95-102.
 - [29] KATOH N. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows[J]. *Vet Med Sci*, 2002, 64:293-307.
 - [30] DANN H M, DRACKLEY J K. Camitine palmitoyl transferase I in liver of periparturient dairy cows effects of periparturient disorders [J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88:3851-3859.
 - [31] MATERIA S, CATER M A, KLOMP L W, et al. Clusterin (Apolipoprotein J), a molecular chaperone that facilitates degradation of the copper-ATPases ATP7A and ATP7B * [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 10073-10083.
 - [32] TROUGAKOS I P, GONOS E S. Regulation of clusterin (apolipoprotein J), a functional homologue to the small heat shock proteins by oxidative stress in ageing and age-related diseases [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(12):1324-1334.
 - [33] ARONIS K N, VAMVINI M T, CHAMBERLAND J P, et al. Circulating clusterin (Apolipoprotein J) levels do not have any day/night variability and are positively associated with total and LDL cholesterol levels in young healthy individuals [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(11):E1871-E1875.
 - [34] HOOFNAGLE A N, WU M, GOSMANOVA A K, et al. Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, Obesity, and dyslipoproteinemia. [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30:2528-2534.