

# 基于 iTRAQ 技术探讨水蛭干预 IgA 肾病大鼠模型蛋白质组学研究

谢永祥 史伟 龙春莉 蓝芳 谢丽萍

530023 南宁,广西中医药大学第一附属医院肾病科

**【摘要】 目的** 运用 iTRAQ 结合质谱技术检测 IgA 肾病(IgAN)大鼠模型尿液蛋白指纹图谱,筛选差异表达蛋白,研究水蛭治疗血瘀证 IgAN 的作用机制。**方法** 选用 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠 140 只,运用脂多糖牛血清白蛋白+脂多糖+四氯化碳方法建立实验性 IgAN 模型,造模成功后,随机分为模型对照组(不予干预)、生理盐水对照组(给予生理盐水 2 mL/100 g 灌胃)、水蛭高剂量治疗组(给予泼尼松 5.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>+水蛭 1.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃。每日一次)、水蛭中剂量治疗组(给予泼尼松 5.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>+水蛭 0.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃。每日一次)、水蛭低剂量治疗组(给予泼尼松 5.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>+水蛭 0.3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃。每日一次)、泼尼松治疗对照组(给予泼尼松 5.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),另设立空白对照组,每组 20 只。收集各组大鼠尿液样本,经过 SDS-PAGE 电泳后,进行 iTRAQ 标记,采用离线二维液相色谱分离与点靶以及质谱分析,运用数据库检索对各组样本进行相对定量分析,并利用生物信息学软件进行信息学分析。**结果** 以 P 值<0.05 且蛋白丰度差异<0.83 或蛋白丰度差异>1.2 为差异蛋白筛选标准,共筛选出的 16 个差异蛋白,其中模型对照组和空白对照组相比上调、水蛭治疗后下调的蛋白有 6 个,模型对照组和空白对照组相比下调、水蛭治疗后上调的蛋白有 10 个。采用 KEGG 富集分析筛选出和 IgAN 发生、发展密切相关的有 10 条分子信号通路,主要通路为补体和凝血级联途径。**结论** 应用 iTRAQ 技术筛选出水蛭治疗后 IgAN 大鼠模型尿液标本中差异表达蛋白及与 IgAN 发生、发展密切相关的信号通路,为深入研究 IgAN 血瘀证的发生机制及水蛭治疗 IgAN 的作用机制奠定了基础。

**【关键词】** IgA 肾病;水蛭;血瘀证;蛋白质组学;iTRAQ

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.03.010

**Proteomic study of the rat model on intervention of leeches against IgA nephropathy based on iTRAQ technology** XIE Yong-xiang, SHI Wei, LONG Chun-li, LAN Fang, XIE Li-ping. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of traditional Chinese medicine, Nanning, 530023, China

Corresponding author: SHI Wei, E-mail: shiw1960@163.com

**【Abstract】 Objective** To detect the fingering map of urinary proteins from the rat model of IgA nephropathy (IgAN) with iTRAQ technology combined with mass spectrometry, to screen those proteins with differential expression, and to investigate the mechanism of treatment of IgAN of blood stasis syndrome. **Methods** A total of 140 Wistar male rats aged 6 weeks were used to establish the experimental IgAN model with the method of lipopolysaccharide-bovine serum albumin + lipopolysaccharide + carbon tetrachloride. After the model was successfully established, the

**【基金项目】** 国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:81460719);广西自然科学基金项目(编号:2014GXNSFAA118247);广西名中医史伟传承工作室 **【作者简介】** 谢永祥,男,硕士,副主任医师,研究方向:肾小球疾病、肾纤维化的中西医结合防治研究,电话:0771-5848760, E-mail:xyx2218@163.com **【通信作者】** 史伟,女,学士,主任医师,研究方向:肾小球疾病、肾纤维化的中西医结合防治研究,电话:0771-5848760, E-mail:shiw1960@163.com

rats were randomly divided into six groups, including the model-controlled group, saline-controlled group, high-dose leech-treated group, middle-dose leech-treated group, low-dose leech-treated group and prednisone-controlled group. Another blank control group was set and 20 animals were assigned to each of these seven groups. Urine samples were collected from rats of each group, and was labeled with iTRAQ technology after SDS-PAGE electrophoresis. The labeled urine samples were then separated and dot-targeted by off-line two-dimensional liquid chromatography, and analyzed by mass spectrometry. With database retrieval relative quantitative analysis was done for samples in each group. Informatic analysis was performed with bioinformatics software.

**Results** Using  $p$ -value  $< 0.05$  and fold change  $< 0.83$  or fold change  $> 1.2$  as the screening criteria for differential proteins, sixteen differential proteins in total were screened out from urine samples. There were six proteins, which were upregulated in the model-controlled and the blank control group, and downregulated in the leech-treated groups; and, ten proteins, which were downregulated in the model-controlled and the blank control group and upregulated in the leech-treated groups. By adopting KEGG accumulation analysis ten molecular signaling pathways were screened out to have close association with development and progression of IgAN, and the major pathways were complement and coagulation cascade reactions. **Conclusions** The differentially expressed proteins and the molecular signaling pathways closely associated with development and progression of IgAN have been screened out from the urine samples from the IgAN rat model after leech treatment, which lays basis for study pathogenesis of IgAN of blood stasis syndrome and therapeutic mechanism of leech treatment of IgAN.

**【Key words】** IgA nephropathy; Leech; Blood stasis syndrome; Proteomics; iTRAQ

IgA 肾病(IgAN)是中国最常见的肾小球疾病,是导致终末期肾衰竭的常见原因,刘志红等<sup>[1]</sup>开展的一项肾脏病理资料全面调查显示 IgAN 约占原发性肾小球疾病发病率的 45%。中医学认为,瘀血既是 IgAN 的病理产物,又是新的致病因素,络络瘀阻是 IgAN 病机中的重要方面。叶天士提出了“久病人络”的络病理论,为后世医家活血化瘀通络法的研究提供了重要的理论依据,同时也为从瘀论治 IgAN,奠定了理论基础。中药水蛭具有破血逐瘀、通经活络等功效,越来越广泛应用在 IgAN 的治疗中,且能提高常规治疗的疗效。

同位素相对标记与绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术是一种新型蛋白质分离技术,具有高通量、高精度等特点,为低丰度蛋白的定性、定量研究提供了有效的方法<sup>[2]</sup>。为了系统揭示 IgAN 血瘀证的发生机制及水蛭干预 IgAN 进程的作用机制,本研究采用 iTRAQ 结合质谱技术检测 IgAN 大鼠模型的尿液蛋白指纹图谱,筛选差异表达蛋白,阐述水蛭对血瘀证 IgAN 的作用机制。

## 材料与amp;方法

### 一、实验材料

1. 实验动物 选用 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠

140 只,体质量 180~200 g,由广西食品药品监督管理局提供,许可证号:SCXK 桂 2014-0002,购进大鼠后均在广西中医药大学清洁级实验室进行适应性喂养。

2. 实验药物 水蛭免煎颗粒,由江阴天江药业有限公司生产的中药配方颗粒,每 10 g 相当于生药 10 g。醋酸泼尼松片,由浙江仙琚制药股份有限公司提供,5 mg/片。

3. 试剂 硫素糖醇(Promega 公司);碘乙酰胺(Promega 公司);测序级胰蛋白酶(Trypsin)(Promega 公司);甲酸铵(Sigma 公司);25%氨水(圣克鲁斯公司);iTRAQ 8 标试剂盒(AB Sciex 公司);异丙醇(AB Sciex 公司),sep-Pak C18 除盐柱 1cc (100 mg)(Waters 公司);10 KDa 超滤管(Amicon ultra, Centrigrugal Filter, Millipore 公司);高 pH 反相色谱柱(Waters 公司);纳升级肽段捕集柱,纳升级肽段分析柱(Thermo Scientific 公司)。

4. 仪器 H-Class 超高压液相色谱(Waters 公司);EASY-nLC 1000 超高压纳升级液相色谱(Thermo Scientific 公司);Orbitrap Fusion 质谱仪(Thermo Scientific 公司);IKA 振荡器,恒温加热块(鼎国昌盛生物技术有限公司);LX-100 手掌式离心机(其林贝尔仪器公司);电热恒温水浴锅(长安科学仪器公司);分析天平(Sartorius BT25S 梅特勒公司);制冰机(Panasonic 日本松下公司);冷冻干燥机

(alpha1-2LD, 德国 Christ 公司); 酶解仪 (Thermo-mixer Comfort, 美国 Eppendorf 公司)。

## 二、实验方法

1. 动物分组与模型建立 运用脂多糖牛血清白蛋白 + 脂多糖 + 四氯化碳方法建立实验性 IgAN 模型, 如果免疫荧光显示肾组织有较强的 IgA 沉积, 检测指标显示有大量蛋白尿及血尿, 大鼠血液流变学提示低、中、高切变率与血浆黏度都出现了明显的升高, 则提示造模成功<sup>[3-4]</sup>。造模成功后随机分为: 模型对照组、生理盐水对照组、水蛭高剂量治疗组、水蛭中剂量治疗组、水蛭低剂量治疗组、泼尼松治疗对照组, 另外设立空白对照组, 共 7 组, 每组 20 只。

2. 给药方法 各组 14 周内进食进水不限, 给予的处理为: (1) 空白对照组: 正常饮食和生活, 不予干预, 直至第 14 周末; (2) 模型对照组: 造模成功后不给予任何干预; (3) 生理盐水对照组: 造模成功后予生理盐水 2 mL/100 g, 灌胃给药至 14 周末; (4) 水蛭高、中、低剂量治疗组: 造模成功后每日早上予泼尼松悬液 2 mL, 下午予水蛭悬液 2 mL, 灌胃给药至 14 周末, 水蛭用量为高剂量组  $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 中剂量组  $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 低剂量组  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 泼尼松用量为  $5.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; (5) 泼尼松治疗对照组: 造模成功后每日早上予泼尼松悬液 2 mL, 灌胃给药至 14 周末, 泼尼松用量为  $5.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

3. 尿液蛋白质组学验证 实验终点 14 周末, 收集所有大鼠实验结束前 24 h 尿液, 尿液收集后立即冷却至  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。离心  $5\ 000 \text{ r} \times 30 \text{ min}$  去除细胞和碎屑等残渣, 随后  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存。尿蛋白的富集。应用 Bradford 法测定蛋白浓度<sup>[5]</sup>。SDS-PAGE 电泳结束后, 取出凝胶, 去离子水反复冲洗去除胶表面的电泳缓冲液; SDS-PAGE 凝胶蛋白考马斯亮蓝染色; 在去离子水中漂洗数次后, 浸入去离子水中, 至凝胶成像仪中成像。蛋白还原烷基化酶切: 采用优化的 Wisniewski 的方法<sup>[6]</sup>; 肽段脱盐后, 真空离心浓缩抽干收集管中液体,  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存待用。冻干样品胰蛋白酶酶解, 每组样品用 ZipTip-C18 取  $1 \mu\text{l}$  脱盐后点靶, 经质谱验证 iTRAQ 试剂标记成功后, 将样品等量混合、冻干。标记样品采用离线二维液相色谱分离, 收集到的各组分样品稀释后进行反相 C18 柱梯度淋洗和点靶。标记肽段的串联质谱鉴定和相对定量分析采用 AB sciex 公司生产的 5800 型 MALDI-TOF/TOF 蛋白质分析仪。质谱分析数据用 Protein Pilot 2.0 对 SWISSPROT 数据库进行检索鉴定蛋白, 报告置信度在 95% 以上的蛋白质。运用富集分析算法对初步鉴定的蛋白数据进行分组, 鉴

定的蛋白与数据库进行比对, 选择基因本体(GO)的生物过程、细胞成分和分子功能注释对蛋白质进行分类, 选择 KEGG 的通路数据库对蛋白所涉及的通路进行分类和富集分析。以上实验进行 3 次。最后采用 Western Blot 对 IgAN 血瘀证尿液标本的差异蛋白质表达的验证。

## 三、统计学处理

本结果使用 Swiss-prot 数据库, iTRAQ 的质谱分析由 Thermo Scientific 公司 Orbitrap Fusion 质谱仪完成。根据原始的 *P* 值, 选取 *P* 值  $< 0.05$  进行过滤后, 几组对比实验以蛋白丰度差异  $\leq 0.83$  或蛋白丰度差异  $\geq 1.2$  为差异蛋白筛选标准, 所得出的结果进入分析。

通过生物信息学分析工具 DAVID 对鉴定的差异蛋白进行 GO(Gene Ontology)功能注释, 主要包括生物进程、分子功能和细胞成分的 GO 分析, 同时应用 string 网络分析进行蛋白功能网络的相互作用分析, 并使用 KEGG 进行富集分析。

## 结 果

一、大鼠尿液标本中差异表达蛋白的 iTRAQ 分析 设定蛋白丰度差异  $\geq 1.2$  为上调, 蛋白丰度差异  $\leq 0.83$  为下调, 结果显示, 模型对照组和空白对照组相比上调、水蛭治疗后下调的蛋白有 6 个(表 1), 模型对照组和空白对照组相比下调、水蛭治疗后上调的蛋白有 10 个(表 2)。

## 二、蛋白之间的相互作用分析

上述筛选出的 16 个差异蛋白, 采用 string 软件绘制差异蛋白功能网络说明这些蛋白之间的相互作用, 在这些网络中发现一些比较重要的与 IgAN 血瘀证发生发展密切相关的蛋白, 主要集中在血清白蛋白、补体 C4、凝血因子和谷氨酰胺氨肽酶等, 结果见图 1。

## 三、KEGG 通路的富集度分析

采用 KEGG 进行富集分析, 结果显示, 筛选出和 IgAN 发生发展密切相关的有 10 条分子信号通路, 主要集中在补体和凝血级联途径(图 2)、FcγR 介导的吞噬作用信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节途径、细胞粘附分子通路途径、抗原递呈信号途径、肾素-血管紧张素系统、蛋白质的消化和吸收途径等, 差异蛋白主要包括凝血因子 X(F10)、凝结蛋白(Gsn)、泛素羧基末端水解酶同工酶 1(Uchl1)、 $\beta_2$  微球蛋白(B2m)等, 这些蛋白可能与 IgAN 的发生和发展密切相关。

表 1 造模后上调且水蛭治疗后下调的差异蛋白

Accession	蛋白名称	模型对照组/空白对照组	生理盐水对照组/模型对照组	水蛭高剂量治疗组/模型对照组	水蛭中剂量治疗组/模型对照组	水蛭低剂量治疗组/模型对照组	泼尼松治疗对照组/模型对照组
P02651	Apolipoprotein A-IV(载脂蛋白 A-IV)	1.291	1.109	1.136	0.695	0.954	0.963
P08649	Complement C4(补体 C4)	2.351	0.978	0.964	0.314	0.364	0.452
P14841	Cystatin-C(胱抑素 C)	2.302	0.845	0.269	0.427	0.305	0.205
P01039	Cystatin-A(胱抑素 A)	1.338	1.023	0.620	0.614	0.724	1.196
Q63207	Coagulation factor X(凝血因子 X)	2.006	0.832	1.054	0.254	0.361	0.333
P32038	Complement factor D(补体因子 D)	1.282	1.023	0.287	0.976	0.788	0.508

表 2 造模后下调且水蛭治疗后上调的差异蛋白

Accession	蛋白名称	模型对照组/空白对照组	生理盐水对照组/模型对照组	水蛭高剂量治疗组/模型对照组	水蛭中剂量治疗组/模型对照组	水蛭低剂量治疗组/模型对照组	泼尼松治疗对照组/模型对照组
P00758	Kallikrein-1(血管舒缓素-1)	0.653	0.897	1.332	1.335	1.049	1.141
O35112	CD166 antigen(CD166 抗原)	0.740	1.012	1.123	1.072	1.259	1.707
P02770	Serum albumin(血清白蛋白)	0.653	1.009	1.122	2.279	1.375	0.697
P07151	Beta-2-microglobulin( $\beta_2$ -微球蛋白)	0.636	0.983	0.735	1.919	1.374	0.616
P27590	Uromodulin OS(糖蛋白 OS)	0.693	0.897	1.756	1.360	0.776	0.793
P28826	Meprin A subunit beta(内肽酶 Meprin 亚基 $\beta$ )	0.652	1.002	1.455	1.447	1.046	1.104
Q68FP1	Gelsolin(凝结蛋白)	0.789	0.768	0.966	1.526	1.018	0.824
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1(泛素羧基末端水解酶同工酶 1)	0.648	1.021	1.557	1.046	1.322	1.376
P50123	Glutamyl aminopeptidase(谷氨酰氨基肽酶)	0.767	0.956	1.299	1.255	1.130	1.087
Q03626	Murinoglobulin-1(小鼠球蛋白-1)	0.558	0.845	1.151	1.995	1.111	0.947



中药水蛭始载于《神农本草经》，作为活血化瘀类动物药材的代表药，具有破血、逐瘀、通经的功效，大量临床研究证明，水蛭及其提取物在慢性肾脏病治疗方面疗效明显。其作用机制主要体现在：改善血液流变学，抗凝血、活化纤溶系统、抑制血小板聚集、溶解血栓，抑制内、外源性凝血系统活性，调整血脂水平，拮抗肾间质纤维化，缓解炎症反应对肾组织的损伤，抗肾小球系膜细胞增殖和炎性细胞浸润<sup>[11]</sup>。基于已有的 RCTs 研究表明糖皮质激素治疗 IgAN 具有降低蛋白尿、保护肾功能、减轻或延缓肾组织损害的作用<sup>[12]</sup>，因此，对照组选择了泼尼松。

本研究中我们首先比较了模型对照组和水蛭治疗组的蛋白表达模式。根据 GO 注释和 KEGG pathway 分析，提示补体凝血通路和血小板激活通路可能参与 IgAN。补体系统可被经典途径、旁路途径和甘露糖结合凝集素 3 条途径激活，进而产生清除免疫复合物、介导炎症、促进纤维化等效应。血小板活化过程的紊乱可能导致血栓形成，而炎症和缓慢的血流则提示 IgAN 发生发展。越来越多的证据表明，补体系统可通过参与机体的防御反应对肾脏起保护作用；同时，由于其为固有免疫系统和适应性免疫系统的交叉系统从而使得在某些情况下肾脏成为宿主免疫应答的“受害者”<sup>[13-14]</sup>。IgA 分子糖基化异常，与抗聚糖抗体结合为免疫复合物，沉积于肾小球系膜区，进而激活补体系统，导致免疫炎症反应<sup>[15]</sup>。近年来关于补体系统与 IgAN 之间关系的研究逐渐增多，成为研究的热点问题，并可望成为未来干预治疗的重要靶点。吴艺等<sup>[16]</sup>认为血液流变学异常是血瘀 IgAN 肾功能恶化的主要致病因素。IgAN 患者肾脏局部存在纤溶异常、凝血，血液处于高凝状态<sup>[17]</sup>。在本研究中，我们发现中药水蛭在治疗 IgAN 有很多优势，其可以改善补体通路和血小板激活通路，导致一系列蛋白表达量发生变化，从而在分子水平上改善血瘀证 IgAN。但是，本研究尚存在一定的局限性，对于筛选出的差异蛋白还有待于进一步验证，通过延长药物治疗的时间或增加用药量，能否使差异蛋白表达恢复到正常水平，也值得进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Li LS, Liu ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13,519 renal biopsies [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 920-923.
- [2] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [3] 汤颖, 姜探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. *中山大学学报*, 2006, 27(2): 184-187.
- [4] 任建勋, 林成仁, 王敏. 多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 23(5): 210-211.
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248-254.
- [6] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [7] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南. 西医疾病部分 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008. 176-178.
- [8] 郑智勇, 刘秉翰, 余英豪, 等. IgA 肾病肾微循环病变的图像分析研究[J]. *中国体视学与图像分析*, 1998, 3(2): 78-80.
- [9] 沈庆法. 中医临床肾脏病学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1997. 52.
- [10] 钟云良, 谢桂权. 蛋白质组学与中医肾病证候研究[J]. *中医药通报*, 2008, 7(1): 64-66.
- [11] 任现纸, 汪受传, 瞿文生. 水蛭治疗系膜增生性肾小球肾炎的探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 32(3): 244.
- [12] 列才华, 谢院生, 陈香美. 糖皮质激素治疗 IgA 肾病的循证研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(3): 273-275.
- [13] Koscielska-Kasprzak K, Bartoszek D, Myszkla M, et al. The complement cascade and renal disease [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2014, 62(1): 47-57.
- [14] Khan MA, Hsu JL, Assiri AM, et al. Targeted complement inhibition and microvasculature in transplants: a therapeutic perspective [J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183(2): 175-186.
- [15] 朱林波, 郑建楠, 刘林林. 补体系统与 IgA 肾病 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(12): 1133-1137.
- [16] 吴艺, 王智, 黄植楦, 等. IgA 肾病患者血液流变学与血瘀证关系的探讨 [J]. *广西中医学院学报*, 2007, 10(4): 20-23.
- [17] 危成筠, 陈香美, 赵丹阳, 等. IgA 肾病血瘀证与临床病理的相关性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(8): 687-690.

(收稿日期: 2018-09-25)