

蛋白质磷酸化修饰组学在脓毒症研究中的应用前景

蒋毅 于洋 于泳浩

天津医科大学总医院麻醉科,天津市麻醉学研究所 300052

通信作者:于泳浩,Email: yuyonghao@126.com

【摘要】 脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,其发病机制复杂,预后差,是临床危重患者死亡的主要原因之一。磷酸化修饰是蛋白质翻译后修饰最主要的形式之一,磷酸化修饰组学从整体上观察细胞或组织中磷酸化修饰的状态及其变化,为脓毒症分子机制的研究提供新的视角。文章主要探讨蛋白质磷酸化修饰组学在脓毒症研究中的应用价值,综述磷酸化修饰组学技术的发展及其在脓毒症研究方面的应用前景。结合磷酸化修饰组学技术的特点,为脓毒症的深入研究提供新的研究途径,从而更全面了解脓毒症的发病机制。

【关键词】 脓毒症; 蛋白质组学; 磷酸化

基金项目: 国家自然科学基金(81671888)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.05.018

Application prospect of phosphoproteomics in research of sepsis

Jiang Yi, Yu Yang, Yu Yonghao

Department of Anesthesiology, the General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Anesthesiology, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Yu Yonghao, Email: yuyonghao@126.com

【Abstract】 Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome caused by infection. With complex pathogenesis and poor prognosis, it is one of the main causes of death in clinical critical patients. Phosphorylation is one of the main types of post-translational modifications. The states and changes of phosphorylation of cells or tissues can be observed through the phosphoproteomics, which can provide a new perspective for the study of the molecular mechanism of sepsis. This article mainly investigates the value of phosphoproteomics in the study of sepsis and reviews the development of phosphoproteomics and the prospect of its application in the research of sepsis. With the characteristics of phosphoproteomics, a new research approach is provided for the further study of sepsis. Its advantages are helpful to comprehensively understand the pathogenesis of sepsis.

【Key words】 Sepsis; Proteomics; Phosphorylation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81671888)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.05.018

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,是一种宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能衰竭^[1]。研究指出,全球每年约有 3 150 万人罹患脓毒症,而由其致死的人数高达 530 万,且其发生率仍在逐年增加,严重威胁人类健康^[2-3]。脓毒症的发病机制复杂,目前尚无有效的治疗方法,针对脓毒症多器官功能损伤的发病机制和防治策略是全球危重症医学学者们共同探究、亟待解决的问题。蛋白质翻译后修饰 (protein post-translational modifications, PTMs) 是生物体细胞对蛋

白质合成后进行的共价加工,与许多重要的生命进程控制相关,其不仅是表观遗传学的核心内容,还是蛋白质执行功能的最高形态。目前已知的 PTMs 种类超过 400 种,几乎所有的蛋白质均可发生 PTMs,并且同一个蛋白质还可同时具有多种 PTMs^[4]。磷酸化是 PTMs 最为重要的一种形式,也是目前研究最多、理解最为透彻的一种翻译后修饰,几乎参与所有生物过程^[5]。磷酸化修饰在人类多种疾病的发病过程中发挥着关键性的作用,利用磷酸化修饰组学进行全面而又深入的研究,可以揭示疾病发生、发展

的相关机制^[6-7]。在脓毒症相关通路中,磷酸化蛋白质参与并发挥着重要的功能。利用蛋白质组学的理念和分析方法,规模化地研究磷酸化蛋白质及其相互作用,可以从整体上观察细胞或组织中磷酸化修饰状态及其变化,为脓毒症相关分子机制的研究提供了一个全新的视角。

1 蛋白质磷酸化修饰组学技术

蛋白质磷酸化修饰是指在蛋白质激酶催化下,ATP 上的磷酸基团转移到蛋白质氨基酸残基上的过程,也是生物体内重要的共价修饰之一。在哺乳动物的细胞生命活动中,30%编码在基因组中的蛋白质可以发生磷酸化^[8]。且能够发生磷酸化修饰的最主要的 3 种蛋白质分别是丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸,三者比例为 1 800 : 200 : 1^[9-10]。蛋白质磷酸化不同程度地参与到了细胞调控的各种信号通路之中,为揭示人类疾病的具体研究机制提供了重要的靶点^[11]。蛋白质磷酸化修饰组学技术主要分为蛋白质/肽的富集技术、生物质谱技术和生物信息学分析。

1.1 蛋白质/肽的富集技术

由于磷酸化蛋白质/肽丰度低,故在与传统的蛋白质组学研究技术的比较中,蛋白质磷酸化修饰组学技术的特点在于其应用了富集技术。高效而简化的富集技术可以为后续磷酸化蛋白或肽段的鉴定提供纯净的样品,直接影响实验的准确性。目前根据蛋白质复合物的富集水平主要分为两种模式:基于蛋白质水平的富集和基于肽段水平的富集。

基于蛋白质水平最常用的富集方法是免疫富集法,即利用抗体与磷酸基团特异性识别并与之结合,从而得到磷酸化蛋白。但由于抗原抗体结合的特异性,此法对抗体的要求较高,而目前商品化的抗体中,仅抗磷酸酪氨酸抗体富集效果尚佳,丝氨酸、苏氨酸由于其抗原决定簇小、空间位阻大且特异性差而较少被应用^[12]。

目前研究中,应用较广且被认可的是基于肽段水平的磷酸化富集。这种富集方法多基于色谱分析法,常用的色谱方法有固定金属离子亲和色谱法和金属氧化物亲和色谱法。固定金属离子亲和色谱法因为其亲和力强、纯化率高、简单易行、价格低廉等优点,近些年已在磷酸化富集中得到广泛的应用,常用的金属离子有 Fe³⁺、Ti⁴⁺和 Zr⁴⁺等^[13]。金属氧化物

亲和色谱法的具体机制尚不明确,TiO₂ 是应用最多、最成熟的金属氧化物^[14]。Thingholm 等^[15]根据以上两种富集方法互补的特点,将两种富集方式创造性地结合起来,建立了连续洗脱固定金属离子亲和色谱富集策略:先用固定金属离子亲和色谱法对磷酸化肽段进行富集,再用 TiO₂ 进行二次富集,目的在于进一步提高富集效率,使结果中鉴定到的磷酸化肽段数量明显提高。

1.2 生物质谱技术

随着蛋白质组学的快速发展,生物质谱技术在蛋白质组学中的应用不断深入,从最初的蛋白质结构鉴定到功能层次的蛋白质翻译后修饰定性和定量研究,生物质谱技术不断发展进步,逐渐成为蛋白质组学研究中的核心技术^[16]。生物质谱技术是对磷酸化蛋白及磷酸化位点进行鉴定的重要手段。常用的方法有基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法与液相色谱串联质谱法。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法具有高灵敏度、高通量、样品靶点可多次应用测定的特点,经磷酸酯酶处理的肽段,质荷比会产生变化,通过检测这种变化即可确定磷酸化位点。由于液相色谱出色的分离效果,降低了离子抑制效应,所以应用液相色谱串联质谱法分析蛋白质磷酸化位点较为普遍^[17]。

应用定量标记技术(如稳定同位素氨基酸细胞培养技术、同位素标记相对和绝对定量技术、串联质谱标签技术)结合液相色谱-质谱联用是目前使用较普遍的蛋白质定量分析技术,这种联用技术可以实现更高通量的蛋白质定量分析^[18]。

1.3 生物信息学分析

近年来,随着磷酸化蛋白质研究的深入,磷酸化的相关数据也在不断积累,为了使数据更好地整合、储存和应用,一大批的磷酸化数据库涌现出来,如表 1。

表 1 磷酸化数据库

数据库名称	网址
Phospho.ELM	http://phospho.elm.eu.org/about.html
PhosphoSitePlus	http://www.phosphosite.org/homeAction.do
PHOSID	http://www.phosida.com/
PhosphoPep version2.0 Home	http://www.phosphopep.org/
PhosPhAt 4.0	http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/
NetworKIN 3.0	http://networkin.info/search.php
PhosphoPOINT	http://kinase.bioinformatics.tw/

目前,关于磷酸化蛋白质组学主流的生物信息

学分析项目包括: 聚类分析、GO 功能注释以及 KEGG 通路注释等。聚类分析是一种常用的探索性数据分析方法, 其目的是在相似性的基础上对数据进行分组、归类。聚类分组的结果中, 一般组内的数据模式相似性较高, 而组间的数据模式相似性较低, 因此可以有效区分组别^[19]。GO 功能注释是一个标准化的功能分类体系, 提供了一套动态更新的标准化词汇表, 并以生物过程、分子功能和细胞组分 3 个方面描述生物体中基因和基因产物的属性^[20]。KEGG 通路注释是常用于通路研究的数据库之一, 它是研究人员通过阅读海量文献以特定的图形语言描述众多的代谢途径以及各途径之间的相互关系^[21]。

2 蛋白质磷酸化修饰组学在脓毒症研究中的应用

蛋白质磷酸化修饰组学相关技术的飞速发展给各个领域的研究提供了新的思路和方法。蛋白质的磷酸化和去磷酸化调节着细胞信号转导、细胞分化、细胞生长和凋亡的整个生命活动过程, 蛋白质在蛋白激酶的作用下发生磷酸化, 在磷酸酶的作用下发生去磷酸化, 且不同酶可修饰不同蛋白质及其位点, 增加了研究的多样性^[22]。

2.1 磷酸化修饰组学在脓毒症诊断和治疗中的应用

磷酸化修饰组学的研究可以为脓毒症的研究提供新的生物标志物, 有利于对脓毒症严重程度及预后进行判断。Chiarla 等^[23]发现在脓毒症患者中, 血浆磷酸丝氨酸浓度与病情的严重程度具有相关性, 血浆中磷酸丝氨酸浓度越高, 疾病的严重程度和病死率越高, 对脓毒症患者血浆磷酸丝氨酸浓度的测定将为脓毒症的病情诊断提供帮助。

Wang 等^[24]利用 Ser-313 位点突变构建使之不能磷酸化的低磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 β (inhibitor of nuclear factor kappaB β , I κ B β) 转基因小鼠, 研究低磷酸化 I κ B β 对脓毒症小鼠的保护作用。研究发现, 盲肠结扎穿孔造模后, Ser-313 低磷酸化的 I κ B β 转基因小鼠血清中促炎细胞因子的表达明显低于野生型小鼠, 说明低磷酸化 Ser-313 的 I κ B β 能够调控免疫应答和炎症反应, 起到脓毒症小鼠心脏保护作用。Lee 等^[25]发现 α -查茄碱的抗炎作用与抑制活化剂蛋白-1 有关, 在 c-Jun 氨基末端激酶信号通路中 c-Jun 氨基末端激酶 N 端反应结构域中的 Ser63 和 Ser73 的磷酸化可增强其转录活性, α -

查茄碱则可通过减少 c-Jun 的磷酸化减低活化剂蛋白-1 的转录, 从而发挥抗炎作用。以上研究发现可为脓毒症相关治疗作用靶点提供新的参考。

2.2 磷酸化修饰组学在脓毒症发病机制研究中的应用

脓毒症的发病机制复杂, 涉及机体多种组织器官、多种系统的病理生理变化。目前, 利用磷酸化蛋白质组学技术探究脓毒症发病机制的相关研究已取得相应进展。彭娜等^[26]在研究乌司他丁对脓毒症大鼠心功能及 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mito-gen-activated protein kinase, MAPK) 影响中证实, 大剂量的多种蛋白酶抑制剂乌司他丁可以抑制大鼠心肌 p38MAPK 磷酸化, 推测乌司他丁对心功能的保护作用可能与 p38MAPK 通路磷酸化有关。许磊等^[27]通过免疫印迹技术对脓毒症患者及健康人体内血小板总造血系细胞特异性蛋白-1 (hematopoietic lineage cell specific protein-1, HS1) 和磷酸化 HS1 进行定量分析, 结果显示脓毒症患者磷酸化 HS1 含量远高于健康人, Syk, Src 激酶作用能够使 HS1 磷酸化, 继而使之信号转导, 此通路于脓毒症引起的血小板异常活化有关。因此, 将蛋白质磷酸化修饰组学技术应用到脓毒症研究中, 对于脓毒症研究的发展具有意义。

3 展 望

目前, 在脓毒症研究中蛋白质磷酸化修饰组学技术的应用还较为局限, 相关文献报道较少。蛋白质磷酸化修饰组学的发展依然存在很多限制, 包括磷酸化蛋白质/肽丰度低、富集损害及效率不佳、检测鉴定技术灵敏度低等问题。此外有研究表明, 发生磷酸化的位点中, 大约 65% 的磷酸化位点属于无功能位点^[28], 如何高效地筛选出功能性修饰位点, 也对生物信息学的发展提出较高的要求。因此, 完善和提高蛋白质磷酸化修饰组学相关研究技术, 也将会为脓毒症分子机制的研究提供技术保障, 应用前景值得期待。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810. DOI:10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of

- global incidence and mortality of hospital-treated sepsis-current estimates and limitations [J]. *Am. J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272. DOI:10.1164/rccm.201504-0781OC.
- [3] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (9): 840-851. DOI:10.1056/NEJMra1208623.
- [4] 陈霞, 罗良煌. 蛋白质翻译后修饰简介 [J]. *生物学教学*, 2017, 42(2): 70-72. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2017.02.040.
- [5] Ubersax JA, Ferrell JE Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 530-541. DOI:10.1038/nrm2203.
- [6] Liu JJ, Sharma K, Zangrandi L, et al. In vivo brain GPCR signaling elucidated by phosphoproteomics [J/OL]. *Science*, 2018, 360(6395): eaao4927. DOI:10.1126/science.aao4927.
- [7] Wang Z, Ma J, Miyoshi C, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need [J]. *Nature*, 2018, 558(7710): 435-439. DOI:10.1038/s41586-018-0218-8.
- [8] Frades I, Resjö S, Andreasson E. Comparison of phosphorylation patterns across eukaryotes by discriminative N-gram analysis[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16: 239. DOI:10.1186/s12859-015-0657-2.
- [9] Weigel NL, Moore NL. Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action [J/OL]. *Nucl Recept Signal*, 2017, 5: e005. DOI:10.1621/nrs.05005.
- [10] Mann M, Ong SE, Grønborg M, et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome[J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(6): 261-268. DOI:10.1016/S0167-7799(02)01944-3.
- [11] Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting [J]. *Trends Biochem.Sci*, 2005, 30 (6): 286-290. DOI:10.1016/j.tibs.2005.04.013.
- [12] Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 94-101. DOI:10.1038/nbt1046.
- [13] Thingholm TE, Larsen MR. Phosphopeptide enrichment by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1355(8): 123-133. DOI:10.1007/978-1-4939-3049-4_8.
- [14] Aryal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry [J]. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 2010, 24 (2): 219-231. DOI: 10.1002/rcm.4377.
- [15] Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, et al. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7 (4): 661-671. DOI:10.1074/mcp.M700362-MCP200.
- [16] Chen ZA, Rappsilber J. Protein dynamics in solution by quantitative crosslinking/mass spectrometry[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(11): 908-920. DOI:10.1016/j.tibs.2018.09.003.
- [17] Shen Y, Jacobs JM, Camp DG, et al. Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(4): 1134-1144. DOI:10.1021/ac034869m.
- [18] Nilsson CL. Advances in quantitative phosphoproteomics[J]. *Anal Chem*, 2011, 84(2): 735-746. DOI:10.1021/ac202877y.
- [19] Rodriguez MZ, Comin CH, Casanova D, et al. Clustering algorithms: a comparative approach [J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210236. DOI:10.1371/journal.pone.0210236.
- [20] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29. DOI:10.1038/75556.
- [21] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D109-D114. DOI:10.1093/nar/gkr988.
- [22] Hunter T. Signaling--2000 and beyond [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 113-127. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81688-8.
- [23] Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. High phosphoserine in sepsis: panel of clinical and plasma amino acid correlations [J/OL]. Springerplus, 2014, 3(1): 279. DOI:10.1186/2193-1801-3-279.
- [24] Wang GQ, Tang T, Wang ZS, et al. Overexpression of hypophosphorylated IκBβ at ser313 protects the heart against sepsis [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160860. DOI:10.1371/journal.pone.0160860.
- [25] Lee KG, Lee SG, Lee HH, et al. α-Chaconine isolated from a *Solanum tuberosum* L. cv Jayoung suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators via AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages and protects mice from endotoxin shock [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 235: 85-94. DOI:10.1016/j.cbi.2015.04.015.
- [26] 彭娜, 向定成, 罗国新, 等. 乌司他丁对脓毒症休克大鼠心功能及 p38MAPK 活化的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32 (11): 1620-1622. DOI:10.3969/j.issn.1673-4254.2012.11.021.
- [27] 许磊, 郭东风, 刘国荣, 等. 脓毒症中血小板活化及造血系细胞特异性蛋白-1 磷酸化的相关性研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24 (11): 1253-1256. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.11.016.
- [28] Landry CR, Levy ED, Michnick SW. Weak functional constraints on phosphoproteomes [J]. *Trends Genet*, 2009, 25 (5): 193-197. DOI:10.1016/j.tig.2009.03.003.

(本文编辑:张丽)