

定量蛋白质组学及其在颅内动脉瘤中的研究进展

王佳¹, 赵继宗^{1,2}

1. 首都医科大学附属北京天坛医院国家神经系统疾病临床医学研究中心, 北京 100050
2. 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100050

摘要 颅内动脉瘤(IA)是颅内动脉壁的某一部分因病变而向外突出所形成的永久性扩张,是造成蛛网膜下腔出血的首位病因。定量蛋白质组学,作为新近出现的一种崭新的研究手段,为治疗颅内动脉瘤提供了新的研究思路。通过同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术及二维液相色谱-串联质谱(2D-LC-MS/MS)法筛选动脉瘤壁差异表达蛋白质,为动脉瘤形成和破裂的分子机制研究提供了帮助。本文综述了颅内动脉瘤的研究进展以及定量蛋白质组学技术在颅内动脉瘤研究中的应用。

关键词 脑血管疾病; 颅内动脉瘤; 定量蛋白质组学; 同位素标记相对和绝对定量技术

颅内动脉瘤(intracranial aneurysm, IA)是一种常见的脑血管病,主要由于脑血管内膜和内部弹性板病变,引起血管壁局部扩张或膨出而形成。颅内动脉瘤人群的发病率为3.6%~6%^[1-2]。在蛛网膜下腔出血的患者中,约有68%为动脉瘤破裂所致,其破裂的发生率(占动脉瘤人群)为1%~2%^[2],破裂后致残、致死率很高。大约有10%的颅内囊状动脉瘤(sIAs)患者有家族史^[1],与之相关的基因位点有2q、8q11、9p21、10q24、13q13、18q11.2^[2]。动脉瘤的分类可以按大小和形状区分,小动脉瘤的直径小于15 mm,大动脉瘤的直径为15~25 mm,巨大动脉瘤的直径为25~50 mm,直径超过50 mm的动脉瘤被分类为超级巨大动脉瘤。颅内囊状动脉瘤(体积较小的也称为浆果状动脉瘤)是最常见的脑动脉瘤。近年来,随着神经影像学技术的发展和诊断水平的提高^[3],颅内动脉瘤的检出率不断提高。但是,对颅内动脉瘤的治疗,是选择保守观察、开颅夹闭术还是介入栓塞术,尤其是对未破裂动脉瘤的治疗方案如何选择仍存在争议,加之开颅夹闭术及介入栓塞术的手术风险大,因此,对颅内动脉瘤破裂风险评估研究显得尤为重要。本文综述了颅内动脉瘤的研究进展及定量蛋白质组学技术在颅内动脉瘤研究中的应用。

1 颅内动脉瘤的研究进展

对颅内动脉瘤基因组及转录组的诸多研究表明,颅内动

脉瘤的形成和破裂与受损的动脉壁的免疫炎性反应和物理切应力作用有关^[3-4]。颅内动脉瘤壁组织与匹配颞浅动脉壁的基因表达谱研究中表明^[5],基因增殖、迁移、血管肌肉细胞的凋亡、动脉粥样硬化、细胞外基质干扰和炎症反应与颅内动脉瘤的形成有关。目前,功能基因组中所采用的策略,如基因芯片、基因表达序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)等,都是从细胞中mRNA角度出发,通过研究细胞中mRNA的水平反映蛋白质的表达水平,但事实并不完全如此。从DNA、mRNA到蛋白质,存在3个层次的调控,即转录水平调控、翻译水平调控、翻译后水平调控。从mRNA角度考虑,实际上仅包括了转录水平调控,并不能全面代表蛋白质表达水平。研究表明,组织中mRNA和蛋白质相对丰度之间的二元相关性很弱,而且蛋白质复杂的翻译后修饰、蛋白质的亚细胞定位或迁移、蛋白质-蛋白质相互作用等则几乎无法从mRNA水平判断。此外,有一些因素也可能导致颅内动脉瘤形成,如绒毛膜癌脑转移形成动脉瘤^[6]。这些结果表明,有多种不同的分子机制参与颅内动脉瘤的形成。蛋白质是生命状态的直接体现,指导蛋白质合成的编码区只占人类基因序列的5%;其余95%以上的序列是基因调控序列。编码区和非编码区各个基因及其产物之间相互关联,是蛋白质随发育阶段、特定组织甚至所处环境的变迁而变化。蛋白质是生命功能的执行者,其含量的变化在生物体的

收稿日期:2016-12-02;修回日期:2017-01-20

基金项目:国家科技支撑计划项目(2015BA112B04);北京市医院管理局“使命”计划项目(SML20150501)

作者简介:王佳,博士研究生,研究方向为脑血管疾病,电子信箱:wangjia1118@hotmail.com;赵继宗(通信作者),中国科学院院士,研究方向为脑血管疾病,电子信箱:zhaojz205@163.com

引用格式:王佳,赵继宗. 定量蛋白质组学及其在颅内动脉瘤中的研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(4): 60-63; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.04.010

生长、环境应激、疾病发生发展等过程中发挥着重要的作用。且从DNA、mRNA到蛋白质的过程涉及一整套精细的表达调控机制,如转录调控、转录后调控、翻译调控、翻译后调控等。因此,全面探究生物体疾病机理、环境应激、生长发育机制等,精细描绘关键基因的表达模式,进一步在蛋白质水平分析验证表达谱结果已成为当前研究的必然趋势^[6-7]。

2 蛋白质组学概述

2.1 蛋白质组学与定量蛋白质组学的概念

蛋白质组学(proteome)的概念在1994年首次被提出,源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的杂合,意指“一种基因组、细胞或组织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^[8]。蛋白质组学包括蛋白表达蛋白质组学、功能蛋白质组学、转录后加工蛋白质组学、结构蛋白质组学等。毋庸置疑,蛋白质本身的存在形式和活动规律,如翻译后修饰、蛋白质间相互作用及蛋白质构象等问题,仍依赖于直接对蛋白质的研究解决。定量蛋白质组是指对特定已知蛋白质进行质谱检测,而不需要像发现蛋白质组那样对所有未知蛋白质进行全检测。定量蛋白质组的核心是利用串联四级杆质谱特有的多反应检测扫描(multi reaction monitoring, MRM)方式定向检测蛋白质,通过软件计算要检测蛋白质的肽对应的母子离子对,用串联四级杆质谱进行MRM扫描,得到MRM色谱峰,一般还会进行二级质谱(MS/MS)扫描,以对这些肽的MRM进行序列确认,或利用MS/MS进行定性和翻译后修饰位点检测等。

2.2 蛋白质定量技术

质谱技术^[9-11]通过测定蛋白质的质量来判别蛋白质的种类。当前蛋白质组研究的核心技术就是双向凝胶电泳-质谱技术,即通过双向凝胶电泳将蛋白质分离,然后利用质谱对蛋白质进行逐一鉴定。蛋白质的鉴定还与蛋白质浓度相关,特别是浓度的变化对其在细胞中的功能极其重要。因此,测量蛋白质的相对和绝对浓度可以更好地反映生物代谢过程。

iTRAQ差异蛋白质组学质谱定量技术-iTRAQTM(isobaric tagging for relative and absolute quantitation)是美国应用生物系统公司(Applied Biosystems Inc, ABI)推出的一种多肽体外标记试剂,采用4种或8种同位素标签,通过特异性标记多肽的氨基基团,然后进行串联质谱分析,可同时比较4种或8种不同样品中蛋白质的相对含量或绝对含量。在质谱中,任何一种iTRAQ试剂标记的不同样本中的同一蛋白质表现为相同的质荷比^[12-13]。应用iTRAQ差异蛋白质组学质谱定量技术-iTRAQTM可以分析颅内囊状动脉瘤组织与匹配的颞浅动脉组织,鉴定和定量蛋白质。iTRAQ试剂,是一种在同位素编码的亲亲和标签(isotope-coded affinity tags, ICAT)基础上发展起来的可进行四重样品标记,以使用串联质谱进行丰度比较分析的氨基反应试剂。联合反向高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析,可同时比较两个样品中带有不同标记的

同种多肽的相对丰度。此外,iTRAQ可同时标记复杂样品中的每个组别,在复杂样品识别不同蛋白质。迄今为止,尚缺乏动脉瘤壁蛋白质组学研究的资料,而应用iTRAQ技术比较同一患者的颅内动脉瘤与颞浅动脉蛋白质水平差异,可以为动脉瘤形成和破裂分子机制的全面阐释提供实验依据。

3 定量蛋白质组学技术在颅内动脉瘤研究的应用

颅内动脉瘤常位于Willis环壁动脉分叉处,由于颅内动脉壁先天性平滑肌层缺乏,结合动脉粥样硬化、高血压等后天因素,破坏动脉内弹力板,血流长期冲击,血管壁逐渐膨出形成囊性动脉瘤。某些炎症、外伤也可导致动脉瘤形成。近年来,颅内动脉瘤基因组学、表达谱方面的研究为动脉瘤致病机制的阐明提供了启示和帮助^[14]。在基因组和转录组中,遗传信息相对稳定的,将翻译成不同的蛋白质,完成多种生物学功能。蛋白质组学的研究将为颅内动脉瘤致病机制提供一个更可靠的思路。

细胞骨架(cytoskeleton)是细胞中的蛋白纤维网络结构。不仅在维持细胞形态,承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用,而且还参与许多重要的生命活动,如细胞迁移和物质运输等。细胞在病理情况下常常会出现细胞骨架系统异常。细胞骨架蛋白异常表达可能与动脉瘤有关,细胞骨架蛋白表达减少,使血管壁发生细胞重塑,导致腹主动脉瘤(AAA)的形成^[15]。采用iTRAQ同位素试剂标记法分析颅内囊状动脉瘤的优势在于,所需样本量小(适合于动脉瘤血管壁组织),能发现普通凝胶技术不能发现的低丰度蛋白、碱性蛋白及一些膜蛋白,是目前最新的定量蛋白质组学方法^[16]。以往研究发现,采用iTRAQ技术筛选动脉瘤壁与配对颞浅动脉差异表达的蛋白质显示,动脉瘤形成与细胞骨架和细胞外基质的变化有关^[17]。

王道奎等^[18]收集破裂的14例动脉瘤壁标本与匹配的14例颅脑外伤手术患者颞浅动脉,采用iTRAQ技术进行差异蛋白质分析,显示破裂动脉瘤壁有多种蛋白质表达异常,细胞自噬诱导分子(transmembrane 9 superfamily protein 1, TM9SF1)、杀青素1(azurocidin 1, AZU1)、血管张力纤维形成相关蛋白(sorbin and SH3 domain containing 2, SORBS2)产生了变化,这些变化可能与动脉瘤破裂的分子机制相关。筛选动脉瘤壁差异表达蛋白质,为动脉瘤形成和破裂的分子机制研究提供思路。

定量蛋白质组学技术同样可以应用于颅内动脉瘤的血清检测中。周杰等^[19]利用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术对颅内动脉瘤患者和外伤性蛛网膜下腔出血(tramatic subarachnoid hemorrhage, tSAH)患者的血清蛋白质进行检测,共检测出410个蛋白质峰,其中371个差异蛋白具有统计学意义($P < 0.05$),利用筛选的5个显著性差异蛋白($P < 0.0001$)建立并训练人工神经

网络模型, m/z 为 2980、3973、5917、6431、9232 的蛋白质可能是筛选颅内动脉瘤患者的差异蛋白, 筛选其作为颅内动脉瘤血清标志物建立预测模型, 为颅内动脉瘤的早期筛选开创了一种新的模式, 具有潜在意义。Martin 等^[20]应用双向电泳及质谱分析等方法通过对蛛网膜下腔出血后致痉挛的基底动脉同未痉挛的基底动脉比较蛋白质谱的变化, 从而探讨脑血管痉挛的蛋白质质控因子进而寻求脑血管痉挛的治疗靶点。颅内动脉瘤血清蛋白质谱研究对于进一步解释颅内动脉瘤病因学、病理生理学的分子机制以及基因治疗可能具有重要作用。

4 结论

颅内动脉瘤是导致蛛网膜下腔出血的一种常见的脑血管疾病。目前其致病机制、影响发生发展因素和导致破裂的因素尚不清楚。本文就定量蛋白质组学技术在颅内动脉瘤中的研究进展做一综述, 旨在为进一步研究颅内动脉瘤的致病机制提供技术支持。但目前蛋白质组学技术对颅内动脉瘤的发病机制和诊断的研究还处于初级阶段。颅内动脉瘤本身蛋白组学的复杂性, 如各种信号传导通路, 蛋白质转录后修饰的多样性等, 限制了人们寻找致病的功能蛋白质和特异性蛋白质。应用 iTRAQ 技术研究颅内动脉瘤差异蛋白表达和蛋白-蛋白间相互作用机制, 可以综合分析颅内动脉瘤密切相关的翻译后修饰和信号转导通路, 从而描绘出复杂的蛋白质组图谱, 阐明动脉瘤发生的网络机制。将来在对发病机制阐明的基础上, 通过蛋白质组学技术进展及与基因组学及其他技术的结合, 可以进一步加深对整个疾病的理解并探寻疾病的蛋白质分子治疗靶点。

参考文献 (References)

- [1] Arimura H, Li Q, Korogi Y, et al. Computerized detection of intracranial aneurysms for three-dimensional MR angiography: Feature extraction of small protrusions based on a shape-based difference image technique[J]. *Medical Physics*, 2006, 33(2): 394-401.
- [2] Gasparotti R, Liserre R. Intracranial aneurysms[J]. *European Radiology*, 2005, 15(3): 441-447.
- [3] 陈轶, 孙清荣, 廖翠薇, 等. CTA 减影法在颅内动脉瘤检查中的应用价值[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(22): 2197-2198.
Chen Yi, Sun Qingrong, Liao Cuiwei, et al. The value of CTA subtraction in the examination of intracranial aneurysms[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007, 29(22): 2197-2198.
- [4] Yu U S, Lee S H, Kim Y J, et al. Bioinformatics in the post-genome era [J]. *BMB Reports*, 2004, 37(1): 75-82.
- [5] Wang T, Cui Y, Jin J, et al. Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(9): 4743-54.
- [6] Wang J, Mei H, Zheng C, et al. The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(5): 1363-1376.
- [7] Zeng J, Liu Y, Liu W, et al. Integration of transcriptome, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53409.
- [8] Stelzl U, Worm U, Lalowski M, et al. A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 957-968.
- [9] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198-207.
- [10] Cravatt B F, Simon G M, Yate J R. The biological impact of mass-spectrometry based proteomics[J]. *Nature*, 2007, 450(7172): 991-1000.
- [11] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 212-217.
- [12] Sun C Y, Xia G W, Xu K, et al. Application of iTRAQ in proteomic study of prostate cancer[J]. *National Journal of Andrology*, 2010, 16(8): 741.
- [13] 李伟. iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术在比较蛋白质组学中的应用[J]. *生命的化学*, 2006, 26(5): 453-456.
Li Wei. Application of iTRAQ-MS/MS in comparative proteomics[J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(5): 452-456.
- [14] Kurki M I, Häkkinen S K, Frösen J, et al. Upregulated signaling pathways in ruptured human saccular intracranial aneurysm wall: an emerging regulative role of Toll-like receptor signaling and nuclear factor- κ B, hypoxia-inducible factor-1A, and ETS transcription factors. [J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(6): 1675-1676.
- [15] Modrego J, López-Farré A J, Martínez-López I, et al. Expression of cytoskeleton and energetic metabolism-related proteins at human abdominal aortic aneurysm sites[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2012, 55(4): 1124-1133.
- [16] 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(7): 616-621.
Xie Xiuzhi, Wang Xin, Liu Lihua, et al. iTRAQ technology and its application in proteomics[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 27(7): 616-621.
- [17] Wang J, Yu L, Huang X, et al. Comparative proteome analysis of saccular intracranial aneurysms with iTRAQ quantitative proteomics[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 130: 120-128.
- [18] 王道奎, 王成东, 曲秉坤, 等. 颅内动脉瘤壁的定量蛋白质组学研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2013, 29(12): 1281-1285.
Wang Daokui, Wang Chengdong, Qu Bingkun, et al. Quantitative proteomic analysis of the intracranial aneurysm wall using iTRAQ labeling coupled with 2D LC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Neurosurgery*, 2013, 29(12): 1281-1285.
- [19] 周杰. 颅内动脉瘤患者血清差异蛋白质谱表达模型研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2009.
Zhou Jie. A study of serum differential protein mass spectra expression model of patients with intracranial aneurysms[D]. Luzhou: Luzhou Medical College, 2009.
- [20] Maurer M H, Haux D, Sakowitz O W, et al. Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage: Preliminary results of a proteome-wide screening[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2007, 27(10): 1675-1683.

Comparative proteome analysis of intracranial aneurysms

WANG Jia¹, ZHAO Jizong^{1,2}

1. China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

2. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract The intracranial aneurysm (IA) is a cerebrovascular disorder in which the weakness in the wall of a cerebral artery or vein causes a localized dilation or ballooning of the blood vessel. The quantitative proteomics is to obtain quantitative information about all proteins in a sample. The quantitative proteomics is mainly performed by isobaric tagging for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and 2-DE or mass spectrometry (MS). The identification of the proteins related to the intracranial aneurysm (IA) wall biological activities could help to find novel pathological mechanisms and therapeutic targets for the human intracranial aneurysm. This paper reviews the applications of quantitative proteomics technology in the study of intracranial aneurysm.

Keywords cerebrovascular disease; intracranial aneurysms; quantitative proteomics technology; isobaric tagging for relative and absolute quantitation

(责任编辑 田恬)