

· 临床论著 ·

早泄肾阳虚证血清蛋白质组学分析及
蛋白质相互作用网络构建谭从娥¹ 黄祥云¹ 王米渠²

摘要 目的 鉴定早泄肾阳虚证血清蛋白质组,从蛋白质相互作用角度探索肾阳虚证发病机制。**方法** 分别取 4 例早泄肾阳虚证患者及 4 名健康人外周血,提取血清蛋白,获取肾阳虚证相关蛋白质组,采用同位素标记相对和绝对定量技术鉴定肾阳虚证血清蛋白质组,采用 STRING 数据库构建肾阳虚证蛋白质相互作用网络,对各网络中蛋白质功能进行生物信息学分析。**结果** 共鉴定血清蛋白质总数 238 个,其中有定量信息的 162 个。筛选差异表达蛋白质 9 个,其中 1 个上调,8 个下调。肾阳虚证蛋白质相互作用网络由 72 个蛋白质节点和 283 对蛋白质相互作用构成,并可以聚为 16 个模块,其中蛋白质节点 ≥ 3 的模块有 10 个。每个模块都有一个核心蛋白,其中 C3、C5、C1S 和 MASP2 为补体系统的组分蛋白,主要参与补体激活生物学过程。**结论** 早泄肾阳虚证差异蛋白质相互作用网络中蛋白模块的功能主要富集于补体激活生物学过程,提示以补体激活途径异常为主导的免疫功能紊乱可能是肾阳虚证的主要病理机制之一。

关键词 早泄;肾阳虚证;蛋白质组;同位素标记相对和绝对定量;补体系统

Serum Proteomic Analysis and Construction of Protein-protein Interaction Networks about Ejaculation Praecox with Shen-yang Deficiency TAN Cong-e¹, HUANG Xiang-yun¹, and WANG Mi-qu²
Basic Medical College, Shaanxi University of TCM, Xi'an (712046); 2 Basic Medical College, Chengdu University of TCM, Chengdu (610075)

ABSTRACT Objective To identify serum proteome of ejaculation praecox (EP) with Shen-yang deficiency, and to explore its pathogenesis of EP in the protein-protein interaction (PPI) network. **Methods** The serum samples were respectively collected from 4 EP with Shen-yang deficiency patients and 4 healthy controls. After the serum proteome of EP with Shen-yang deficiency was obtained, the technology of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) was adopted for identification. The STRING database was applied to construct the PPI network whose function was analyzed through bioinformatics methods. **Results** A group of 238 serum proteins were identified in total, of which, 162 proteins reached the strict quantitative standard. Nine proteins were differently expressed, including 1 up-regulated and 8 down-regulated. The constructed PPI network was constituted by 72 protein nodes and 283 protein couples, and could be clustered to 16 clusters, in which 10 clusters were composed of 3 or more proteins. Each cluster could be found with a core protein correspondingly. The core protein of C3, C5, C1S and MASP2 were all main constituents of complement system, whose function involves in biological process of complement activation. **Conclusions** The protein models in PPI network of differently expressed serum proteome about EP with Shen-yang deficiency were functional enriched in the biological process of complement activation; which indicate that a immune dysfunction dominated by abnormal process of complement activation may be one of the main mechanisms of EP with Shen-yang deficiency.

KEYWORDS ejaculation praecox; Shen-yang deficiency; proteome; isobaric tags for relative and absolute quantization; complement system

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473559, No.81072731);陕西省教育厅自然科学专项(No.2013JK0821)

作者单位:1. 陕西中医药大学基础医学院(西安 712046); 2. 成都中医药大学基础医学院(成都 610075)

通讯作者:谭从娥, Tel: 029-33327022, E-mail: tanzime@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170203. 010

作为脏腑辨证的一个重要证型,肾阳虚证一直是中医界研究的热点。其现代分子机制研究经历了从单个基因到“组学”整体的研究历程^[1]。尽管大规模、高通量的蛋白质组学实验技术使得我们对肾阳虚证的认识不断增加^[2],但对特定蛋白质的全局作用关系的理解仍不完整。因此,研究肾阳虚证相关蛋白质组及其功能,并进一步分析蛋白质组中各蛋白质之间的作用关系,对研究肾阳虚证的发病机制具有重要意义。同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术作为蛋白质定量研究的先进手段^[3],可同时 8 个样品进行定量研究,具有良好的精确性和重复性,能够满足蛋白质组学研究的提高通量和缩小批间误差要求^[4]。本研究利用 iTRAQ 技术筛选早泄肾阳虚证相关蛋白质,构建蛋白质相互作用网络,定位网络中关键蛋白质,从蛋白质组学及其网络关系角度探索肾阳虚证发病机制。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 早泄诊断标准参考国际性医学会 2014 年早泄诊治指南^[5]。肾阳虚证辨证标准参照参考文献^[6]。中医临床表现以早泄、腰膝酸痛、畏寒肢冷、尺脉不足为主症,兼症有精神不振、性欲减退、腰背发冷、夜尿频多等。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合早泄诊断标准及中医辨证分型标准;受试者签署知情同意书。排除标准:严重心血管疾病;严重精神疾病。

3 一般资料 选择 2014 年 10—12 月于陕西中医药大学附属医院男科门诊就诊的 4 例早泄肾阳虚证患者,年龄 38~45 岁,平均(41±3)岁,4 例患者均具备主症 4 项。另选择来自本医院体检健康男性志愿者 4 名作为对照组,年龄 39~45 岁,平均(42±4)岁。两组年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。试验过程获得陕西中医药大学附属医院伦理委员会审批(批号:SZFYIEC-PJ-2014 年第[06]号)。

4 观察指标及方法 参照参考文献^[3]。所有受试者均于清晨 7:00—8:00 时,空腹时采肘正中静脉血 5 mL,室温静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,于 -80℃ 冰箱保存。使用安捷伦公司多重亲和去除液相色谱柱(Agilent Human 14)去除每个血清样品中的高丰度蛋白质后,加入由 4% 十二烷基硫酸钠(SDS)、150 mmol/L TrisHCl (pH8.0)和 1 mmol/L 二巯素糖醇(DTT)组成的 STD 缓冲液,沸水浴 5 min,离心取上清,蛋白质定量。取约 20 μg 以备 SDS PAGE 电泳检测。

4.1 血清蛋白质组鉴定 采用 SDS-PAGE 电泳。各取 20 μg 蛋白质样品 5:1(v/v)加入 5× 上样缓冲液,沸水浴 5 min,14 000 ×g 离心 10 min 取上清,采用通用电气公司 600V 电泳仪进行 12.5% SDS-PAGE 电泳。电泳条件:恒流 14 mA,电泳时间 90 min。考马斯亮蓝染色。

4.2 iTRAQ 标记及强阳离子交换色谱分级 各取 250 μg 样品,加入 200 μL UA buffer(8 mol/L 尿素,150 mmol/L TrisHCl, pH8.0)混匀,用艾本德公司低温高速离心机 14 000 ×g 离心 10 min,重复 2 次。加入 40 μL 胰蛋白酶缓冲液(40 μL 溶解液中加 2 μg 胰蛋白酶),600 r/min 振荡 1 min,37℃ 16~18 h。换新收集管,14 000 ×g 离心 10 min,取滤液,用艾本德公司紫外分光光度计进行 OD280 肽段定量。各组样品分别取约 35 μg,采用美国应用生物系统公司 iTRAQ8 标试剂盒进行标记,每个样品对应一个分子量,病例组 4 个样品分别标记为 113、115、117、119,对照组 4 个样品分别标记为 114、116、118、121。将标记后的所有肽段混合,用通用电气公司的蛋白纯化仪(AKTA Purifier 100)进行强阳离子交换色谱(SCX)预分级。收集穿流及洗脱部分约 30 份,根据 SCX 色谱图合并成 10 份,冻干后采用安捷伦公司 C₁₈ 色谱柱脱盐。

4.3 质谱分析及数据处理 每份样品采用纳升流速 HPLC 液相系统 EASY-nLC 进行分离后用美国菲尼根质谱公司 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。质谱分析原始数据用软件 Mascot 2.2 和 Proteome Discoverer 1.4 进行查库鉴定及定量分析。选择置信度 >95%,即 Prot Score >1.3,且至少有 1 个肽段和库中肽段 95% 以上相匹配^[7]的蛋白质进行报告。分别计算两组中各鉴定蛋白表达值的平均值,差异倍数(Ratio)取病例组/对照组,Ratio ≥1.2 或 Ratio ≤0.8 即认为该蛋白存在表达差异。

5 生物信息学分析方法 采用 STRING 9.1 (<http://www.string-db.org/>)数据库^[8]对实验鉴定到的所有蛋白质的相互作用进行预测,并绘制蛋白质相互作用网络图。选择综合置信值 ≥0.7 (STRING 数据库默认的高置信值)时 STRING 数据库的数据分析模式构建蛋白质相互作用网络图。借助 STRING 的 Markov Clustering (MCL)方法^[9],分析蛋白质相互作用网络的拓扑结构,得到蛋白质网络模块,并采用 AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/rte>)对每个蛋白质模块进行 Gene Ontology (GO)生物学过程的显著性分析。

蛋白质可在数据库中检索。当综合置信值 ≥ 0.7 (STRING 数据库默认的最高置信值)时,有 59 个蛋

2 两组血清差异表达蛋白(表1) 两组差异表达蛋白9个,上调蛋白1个,下调蛋白8个。

图1 两组蛋白质质谱鉴定结果

3 肾阳虚证蛋白质相互作用网络(图3) 将鉴定到的238个蛋白质输入 STRING 9.1 数据库,有147个

图2 两组 SDS-PAGE 电泳结果

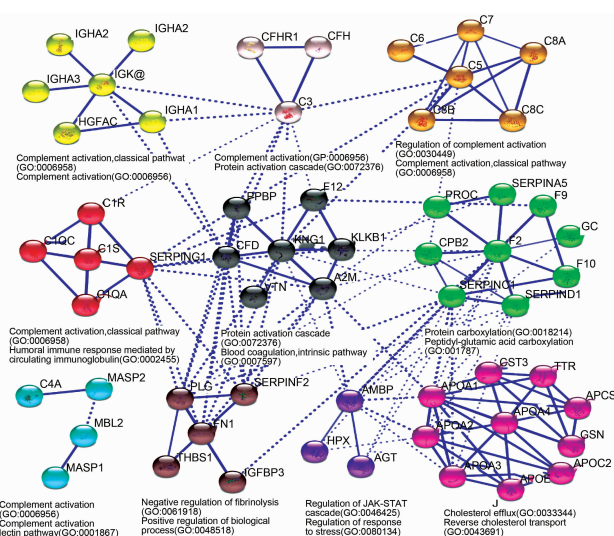
图3 鉴定蛋白质相互作用网络图

表 1 两组血清差异表达蛋白

登录号	名称	分子量	覆盖率 (%)	唯一肽 段数	蛋白表达平均值		比值(病例组 /对照组)
					病例组	对照组	
B3KW05	G-protein coupled receptor associated sorting protein 2(GPRSP2)	93.74	1.55	1	1.142	0.837	1.365
H0YL80	Tropomyosin alpha-1 chain(TPM1)	8.01	14.71	1	0.755	1.096	0.689
H3BS21	Haptoglobin (HP)	24.78	6.31	1	0.742	1.066	0.696
A9NIU4	Obscurin (OBSCN)	212.26	1.53	1	0.790	1.098	0.719
B4DUU3	Smad nuclear-interacting protein 1 (SNIP1)	14.48	12.9	1	0.794	1.087	0.731
P01031	Complement C5(C5)	188.19	30.91	47	0.857	1.143	0.749
B0V2C8	Complement C4 beta chain(C4B)	192.72	57.51	1	1.025	1.366	0.751
P01024	Complement C3(C3)	187.03	8.78	11	0.847	1.072	0.791
E7EQB2	Lactoferrin(LTF)	76.58	4.6	3	0.871	1.102	0.790

白质游离,另外 83 个蛋白质之间发生了 283 对相互作用,其中有 72 个蛋白质彼此之间至少发生了 2 对以上的相互作用,它们彼此相互关联,构成了蛋白质相互作用网络。

4 肾阳虚证蛋白质相互作用网络中存在的功能模块(图 4) 借助 STRING 数据库的 MCL 聚类运算功能,发现肾阳虚证蛋白质相互作用网络中可能存在的一些重要的功能模块。当 MCL 聚类参数值取 3 时,有相互作用的 83 个蛋白质可以聚为 16 类,其中蛋白质节点 ≥ 3 的模块有 10 个。每个模块都有一个核心蛋白,它们分别为:免疫球蛋白 k (IGK)、补体成分 3 (C3)、补体成分 5 (C5)、补体成分 1S 亚成分 (C1S)、激肽原 1 (KNG1)、凝血因子 2 (F2)、甘露聚糖结合凝集素丝氨酸蛋白酶 2 (MASP2)、纤维连接蛋白 1 (FN1)、 $\alpha 1$ 微球蛋白/bikunin 前体 (AMBP) 和载脂蛋白 A4 (APOA4)。5 个模块 (A、B、C、D、G) 的 GO 功能富集于“补体激活”(complement activation)生物学过程,另外 5 个模块 (E、F、H、I、J) 涉及到蛋白质激活作用级联 (protein activation cascade)、蛋白质羧化作用 (protein carboxylation)。



注:图中 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 J 标识的 10 个模块用不同的颜色来区分;实线表示模块内蛋白质间的功能联系;虚线表示模块间蛋白质间的功能联系

图 4 肾阳虚证蛋白质网络中存在的功能模块

讨 论

肾阳虚证的发病机制是因肾脏阳气不足,温煦功能减弱所引起的,其现代机制研究涉及神经、免疫、内分泌等多系统功能的紊乱,表现为一个复杂的、多维的分子网络失衡状态^[1]。目前,在系统生物学研究的背景下,

肾阳虚证的蛋白质组学研究取得了一定的研究成果,如刘希成等^[2]采用血清比较蛋白质组学技术筛选出老年肾阳虚证相关 33 种差异表达蛋白,卢德赵等^[10]研究了肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组,发现肾阳虚动物能量代谢相关酶的变化与肾阳虚证的临床虚寒症状有关等。这些研究获得了一批肾阳虚证相关蛋白。然而,证是以众多的分子网络变化为基础的^[1],所以这些蛋白质在肾阳虚证中的调控作用并不是单一的、线式的,而是彼此联系的、立体层面上的网络式调控。因此,本研究在生物分子网络的大背景下,运用 iTRAQ 技术鉴定肾阳虚证差异表达蛋白质,构建蛋白-蛋白相互作用网络,通过对网络中的特征蛋白质调控关系的挖掘,从分子功能整体及相互联系层次研究肾阳虚证的科学内涵。

借助 iTRAQ 技术,本实验鉴定肾阳虚证相关蛋白质 238 个,和对照组比较有 9 个蛋白有表达差异,其生物学过程涉及到防御反应、补体激活、代谢过程等多个方面。9 个差异蛋白中有 8 个蛋白表达下调,其中 3 个蛋白质 (C3、C5、C4A) 均参与补体激活生物学途径。C3 是血清中含量最高的补体成分,在补体系统的激活中起着核心的作用。在 C3 转化酶的作用下,裂解成 C3a 和 C3b 两个片段,在补体经典激活途径和旁路激活途径中均发挥重要作用^[11]。C5 是形成膜攻击复合体 (MAC) 的第 1 个补体分子,对免疫反应有调节作用,其活化产物 C5a 诱导单核细胞分泌 IL-1、IL-6、IL-8 及肿瘤细胞因子等,可促进抗原及同种异体抗原诱导的 T 细胞增殖和 B 细胞产生抗体,有利于增强机体的防御机能^[12]。补体 C4A 是补体 C4 的活化产物之一,参与补体经典激活途径,在补体活化、促进吞噬、防止免疫复合物沉着等方面发挥作用^[13]。这三个蛋白质的生理作用皆与维护机体的正常免疫功能相关,在本实验中又发现其在肾阳虚证患者中的表达显著降低,说明其可能在肾阳虚证免疫功能低下中扮演了重要角色,值得进一步深入研究。

肾阳虚证相关差异蛋白质的作用不是孤立的,而是相互联系的。借助 STRING 数据库,分析鉴定蛋白质间的相互作用,发现 238 个蛋白质中有 83 个蛋白质发生交互作用,并且功能相似的蛋白质可聚在一起,形成了 10 个重要的蛋白功能模块,相应的也定位出了 10 个模块的核心蛋白质,其中包括 2 个差异表达蛋白 (C3、C5)。值得注意的是,在 10 个核心蛋白中,有 4 个蛋白 (C3、C5、C1S 及 MASP2) 为补体系统的重要组成成分。C1S 为 C1 的亚单位之一,是启动补体活化经典途径的重要识别分子^[14];MASP 具有与活化 C1q 同样的生物学活性,可水解 C4、C2,继而形成 C3

转化酶,激活补体级联酶促反应的凝集素激活途径^[15]。补体系统是构成机体免疫系统的重要组成部分,参与机体的自身防御功能,在维持细胞完整和调控适应性免疫应答中起着重要作用。肾阳虚证补体成分蛋白的批量涌现提示该证存在着免疫稳态的失衡,这与前期的研究结论^[16]是一致的。

《伤寒溯源集》^[17]言:“命门之真阳,为卫气之根本。皮毛之卫气,乃真阳之外发。”说明卫气根于肾阳而发挥御邪防病的功能,肾阳足则人体抵御外邪能力强,肾阳虚则卫外功能低下,故中医肾阳虚证病机和西医免疫稳态理论在机体抵抗外邪能力低下方面具有交叉点,而补体系统的异常可能在肾阳虚证免疫功能紊乱中发挥着重要作用。本研究样本量虽然较小,只有 4 例患者,但是研究方法采用的 iTRAQ 定量蛋白质组学技术,具有较好的定量效果和较高的重复性。而且本研究是以蛋白质功能相互作用关系为基础,构建的蛋白质相互作用网络图,将复杂的实验数据可视化,有利于凸显肾阳虚证的整体特征。因此从方法学角度上来说,是肾阳虚证研究的一次有益探索,下一步需扩大样本量进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 沈自尹. 中西医结合肾本质研究回顾[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 304-306.
- [2] 刘希成, 梁恒, 田真, 等. 肾阳虚证候的人血清比较蛋白质组学分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(7): 592-599.
- [3] 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.
- [4] Wu WW, Wang G, Baek SJ, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(3): 651-658.
- [5] Althof SE, McMahon CG, Waldinger MD, et al. An update of the International Society of Sexual Medicine's guidelines for the diagnosis and treatment of Premature Ejaculation (PE) [J]. *Sex Med*, 2014, 2(2): 60-90.
- [6] 严石林, 高峰, 吴斌, 等. 肾阳虚证半定量操作标准的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(6): 701-702.
- [7] Unwin RD, Griffiths JR, Whetton AD. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(9): 1574-1582.
- [8] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D808-D815.
- [9] Brohée S, van Helden J. Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks [J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(1): 1-19.
- [10] 卢德赵, 沃兴德, 沃立科, 等. 甲状腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究[J]. 中医药学报, 2008, 36(4): 11-15.
- [11] Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity [J]. *Immunol Rev*, 2001, 180(1): 35-48.
- [12] Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 821-852.
- [13] Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation [J]. *Semin Nephrol*, 2013, 33(6): 479-492.
- [14] Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component [J]. *Adv Immunol*, 1985, 37: 151-216.
- [15] Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, et al. The role of MASP-1/3 in complement activation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 735: 41-53.
- [16] 谭从娥, 李炜弘, 汤朝晖, 等. 应用基因表达谱芯片技术筛选老龄肾阳虚证特征功能类基因[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(10): 1441-1444.
- [17] 清·钱潢. 伤寒溯源集[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1957: 63.

(收稿: 2016-05-03 修回: 2016-12-31)

责任编辑: 赵芳芳