

糖尿病肾病差异蛋白质组分析

洪侃^{1,2}, 郝志明³, 石维², 刘志华¹, 许宇静², 卞坤娟², 黄玉政⁴, 徐明⁴

(¹苏州大学附属第一医院心内科, 江苏 苏州 215006; ²南京医科大学附属无锡人民医院内分泌科, ³心内科, 江苏 无锡 214023; ⁴江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏 无锡 214064)

[摘要] 目的:利用弱阳离子磁珠纯化(magnetic beads based weak cation exchange chromatography, MB-WCX)系统结合基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)的方法获取糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的尿小分子差异多肽谱。方法:按 Mogensen 标准,根据 3 d 平均微量白蛋白尿排泄率,将 68 例 2 型糖尿病患者分组,其中正常蛋白尿(DM1)组 24 例,微量白蛋白(DM2)组 22 例,大量蛋白(DM3)组 22 例;健康对照(C)组 20 例。DM1 及 DM2 组肾小球率过滤(glomerular filtration rate, GFR)均 $> 90 \text{ ml}/(\text{min}\cdot 1.73 \text{ m}^2)$, DM3 组 GFR 为 $60\sim 89 \text{ ml}/(\text{min}\cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 。采用 MB-WCX 试剂盒富集尿多肽,再经 MALDI-TOF-MS 技术,采集尿液多肽谱,应用 ClinProt™ 软件进行生物学比较分析。结果:质荷比 $< 12\ 000$ 时,DM1 组与 C 组相比,有 15 个蛋白质峰差异有统计学意义($P < 0.01$)。DM2 组与 C 组相比,有 1 个蛋白质峰差异有统计学意义($P = 0.029\ 8$)。DM3 组与 C 组相比,有 10 个蛋白质峰差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:MB-WCX 系统联合 MALDI-TOF-MS 蛋白质检测技术,能够获得健康人及 DN 患者尿液小分子多肽谱,为进一步从中寻找早期筛查的标志物提供基础。

[关键词] 磁珠分离; 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 糖尿病肾病; 尿液; 多肽

[中图分类号] R587.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-1033-05

Proteome analysis of diabetic nephropathy urinary

HONG Kan^{1,2}, YU Zhi-ming³, SHI Wei², LIU Zhi-hua¹, XU Yu-jing², BIAN Kun-juang², HUANG Yu-zheng⁴, XU Ming⁴

(¹Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Suzhou Medical University, Suzhou 215006; ²Department of Endocrinology, ³Department of Cardiology, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023; ⁴Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

[Abstract] **Objective:** To detect urinary polypeptide patterns in stages of the type 2 diabetic nephropathy (DN) in order to screen and find out the potential biomarkers. **Methods:** A total of 68 urine samples from type 2 diabetic patients with normoalbuminuria (DM1, $n = 24$), microalbuminuria (DM2, $n = 22$) and macroalbuminuria (DM3, $n = 22$), and healthy controls (C, $n = 20$) were condensed by magnetic beads based weak cation exchange chromatography (MB-WCX), and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). ClinProt™ software was used to profile and screen the polypeptide patterns in urine of the patients. **Results:** When the relative molecular mass $< 12\ 000$, there were significant differences in 15 protein peaks between group DM1 and group C ($P < 0.01$). There was one protein peak of significantly low expression in the group DM2, when compared to group C ($P = 0.029\ 8$). And there were significant differences in 10 protein peaks between group DM3 and group C ($P < 0.01$). **Conclusion:** MB-WCX coupled to MALDI-TOF-MS is a fast, convenient and high throughput analyzing method capable of screening some relatively specific and potential biomarkers from the urine of DN with different stages.

[Key words] magnetic beads separation; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; diabetic nephropathy; urine; polypeptide

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 1033-1037]

迄今为止,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的临床诊断与病情进展判断主要依赖于尿蛋白、血液生化等指标^[1-2]。遗憾的是部分患者在发现有微量白蛋白尿(microalbuminuria, MALB)或尚未出现蛋白尿时,肾功能已有不同程度的损害^[3-4];肾穿刺活检术创伤大,有一定风险,而且费用较高,难以随时施行,不能作为患者的常规检查项目,所以探索新的反映DN早期损伤的标志物,是非常必要的^[5-6]。本研究旨在利用弱阳离子磁珠纯化(magnetic beads based weak cation exchange chromatography, MB-WCX)试剂和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS),对糖尿病尿小分子多肽谱作一初步研究,为诊断DN寻找新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象

选择2010年2月~2010年11月在南京医科大学附属无锡市人民医院内分泌科住院的符合1999年WHO关于糖尿病诊断标准、确诊的2型糖尿病患者68例,按3d平均微量白蛋白尿排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)分为3组。DM1组为正常尿蛋白组24例,男13例、女11例,平均年龄(55.2 ± 9.3)岁,3d平均UAER < 30 mg/24 h,肾小球率过滤(glomerular filtration rate, GFR) > 90 ml/(min·1.73 m²),按Mogensen标准分期为I~II期。DM2组为微量白蛋白组,22例,男12例、女10例,平均年龄(62.4 ± 11.2)岁,3d平均UAER 30~300 mg/24 h, GFR在90~120 ml/(min·1.73 m²),按Mogensen标准分期为III期。DM3组为大量蛋白组,22例,男11例、女11例,平均年龄(62.5 ± 10.6)岁,3d平均UAER > 300 mg/24 h, GFR为60~89 ml/(min·1.73 m²),按Mogensen标准分期为IV期。以上各组患者均无其他合并症及近期使用肾毒性药物病史。同时设C组为健康对照组,来源于同期健康体检者20例,男9例、女11例,平均年龄(53.4 ± 6.8)岁。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者及健康对照人员均签署知情同意书。

1.1.2 仪器和试剂

MB-WCX试剂盒(NO.223983)、MTP-Anchorchip 800/384点样靶均为德国Bruker Daltonics公司产品。丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为

进口HPLC级(购自美国TEDIA、西班牙Scharlau公司)。基质:HCCA(德国Bruker Daltonics公司),0.3 mg/ml,溶于乙醇:丙酮=2:1,新鲜配置;其他材料来自德国Eppendorf公司。PDQuest 8.0图像分析软件为美国Bio-Rad公司产品。Milli-Q超纯水系统为美国Millipore公司产品。X-22Ri台式高速离心机均为美国Beckman Coulter公司产品。MALDI-TOF-MS仪为德国Bruker Daltonics公司产品。

1.2 方法

1.2.1 一般临床资料收集

包括患者体质指数、血压、空腹血糖、血胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯、血肌酐等。

1.2.2 尿液收集和处理

收集受试者清晨中段尿50 ml,30 min内置入4℃冰箱,然后分别吸取1 ml于离心管中以4℃ 3 000 r/min离心5 min,将分离的上清尿标本分装于离心管中,0.5 ml/管,置-80℃冰箱保存待用。

1.2.3 尿液多肽的纯化及提取

-80℃冰箱中取出尿标本,4℃ 10 000 r/min再次离心3 min,取上清液用MB-WCX磁珠处理,步骤如下:①从4℃冰箱取出磁珠悬浮液1管,手动上下摇动1 min,使磁珠悬浮液完全混匀。取60 μl磁珠结合缓冲液加入200 μl编号的样品管中,再加入5 μl磁珠至样品管,用加样枪吹打混匀,再向样品管中加入80 μl已离心的尿标本上清液,用加样枪吹打混匀至少5次,室温静置5 min。②将样品管放入磁珠分离器,使磁珠贴壁1 min,磁珠与悬浮的液体分离,弃悬浮液体。向样品管中加入100 μl磁珠清洗缓冲液,使磁珠与标本中相应蛋白充分结合。③从磁珠分离器上取下样品管,向样品管中加入5 μl磁珠洗脱缓冲液,混匀贴壁的磁珠,室温静置5 min。将样品管放入磁珠分离器,静置2 min。④准备0.5 ml 8联管,编号标记,并在各管中加入5 μl稳定缓冲液。⑤待磁珠与悬浮液体充分分离后,将上清液移入已编号的相应8联管中,用加样枪小心吸打混匀。⑥磁珠洗脱液1 μl与基质10 μl完全混合,取0.5~1.0 μl磁珠处理好的混悬液点靶,室温干燥,进靶。

1.2.4 尿液多肽谱数据的采集和生物信息学软件处理

利用MALDI-TOF-MS仪进行分析,具体参数设置如下:选择方法LP-Clinprot.par,靶MTP-Anchorchip800/384, N₂激光源,激光能量在60%左右,正离子线性模式和自动采集数据的模式,检测质荷

比(mass-to-charge ratio, m/z)范围为 900~12 000;质谱数据采集后,应用 Autoflex analysis 对图谱进行基线的平滑、衰减、标峰及用 Excel 表格进行数据输出。

1.3 统计学方法

采用 ClinPro Tools 软件进行处理,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组间的一般临床资料比较

各组间的一般临床资料比较见表 1。各组空腹血糖比较差异有统计学意义($P < 0.05$),DM1、DM2 和 DM3 组与 C 组相比,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

2.2 各组尿液多肽谱分析

m/z $< 12\ 000$ 范围内,C 组尿液多肽谱平均出峰 33 个。DM1 组平均出峰 60 个。DM2 组尿液多肽

谱平均出峰 14 个,相对分子量已逐渐向大分子量过渡,但仍以 m/z 1 000~3 500 为主。而 DM3 组尿液多肽谱平均峰 122 个,多肽峰无明显集中,见图 1。

DM1 组与 C 组间多肽谱比较:统计分析后显示 15 个多肽峰差异($P < 0.05$)具有统计学意义。其中高表达 13 个,m/z 分别为:1 015.18、1 030.98、1 037.05、1 046.65、1 050.65、1 060.98、1 067.09、1 072.22、1 226.44、1 256.16、1 272.35、1 278.19、1 294.08;低表达 2 个,m/z 为 3 831.76、4 876.51。

DM2 组与 C 组间尿多肽表达差异:统计分析后显示 1 个多肽峰差异具有统计学意义($P < 0.05$),为低表达,m/z 为 3 830.91,余均无统计学意义。

DM3 组与 C 组间尿多肽表达差异:统计分析后显示 10 个差异表达明显的多肽峰差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中低表达 8 个,m/z 分别为:6 194.97、6 338.11、3 088.64、6 267.86、6 435.33、7 989.78、2 790.54 及 3 911.11;高表达的 2 个,m/z 分别为 1 278.16、1 066.78。

表 1 各组临床一般资料

Table 1 Clinical information of different groups

($\bar{x} \pm s$)

指 标	C 组	DM1 组	DM2 组	DM3 组	<i>P</i> 值
体质指数	24.43 ± 2.52	23.61 ± 3.33	23.54 ± 3.61	24.14 ± 4.14	0.31
收缩压(mmHg)	122.22 ± 14.11	126.32 ± 10.20	129.51 ± 12.32	133.25 ± 15.22	0.26
舒张压(mmHg)	80.41 ± 11.10	81.34 ± 10.51	79.42 ± 10.52	80.34 ± 11.50	0.24
空腹血糖 (mmol/L)	4.19 ± 2.05	6.38 ± 2.88*	7.19 ± 3.05*	8.18 ± 2.69*	0.04
胆固醇 (mmol/L)	3.28 ± 0.85	3.89 ± 0.94	4.18 ± 0.92	4.39 ± 1.25	0.17
甘油三酯 (mmol/L)	1.46 ± 0.87	2.03 ± 1.23	2.11 ± 1.07	2.23 ± 1.15	0.14
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	2.21 ± 0.91	2.45 ± 0.64	2.02 ± 0.71	3.05 ± 0.84	0.17
肌酐 (μmol/L)	60.14 ± 20.31	61.92 ± 22.53	63.62 ± 26.51	67.33 ± 37.14	0.15

与 C 组比较,* $P < 0.05$ 。

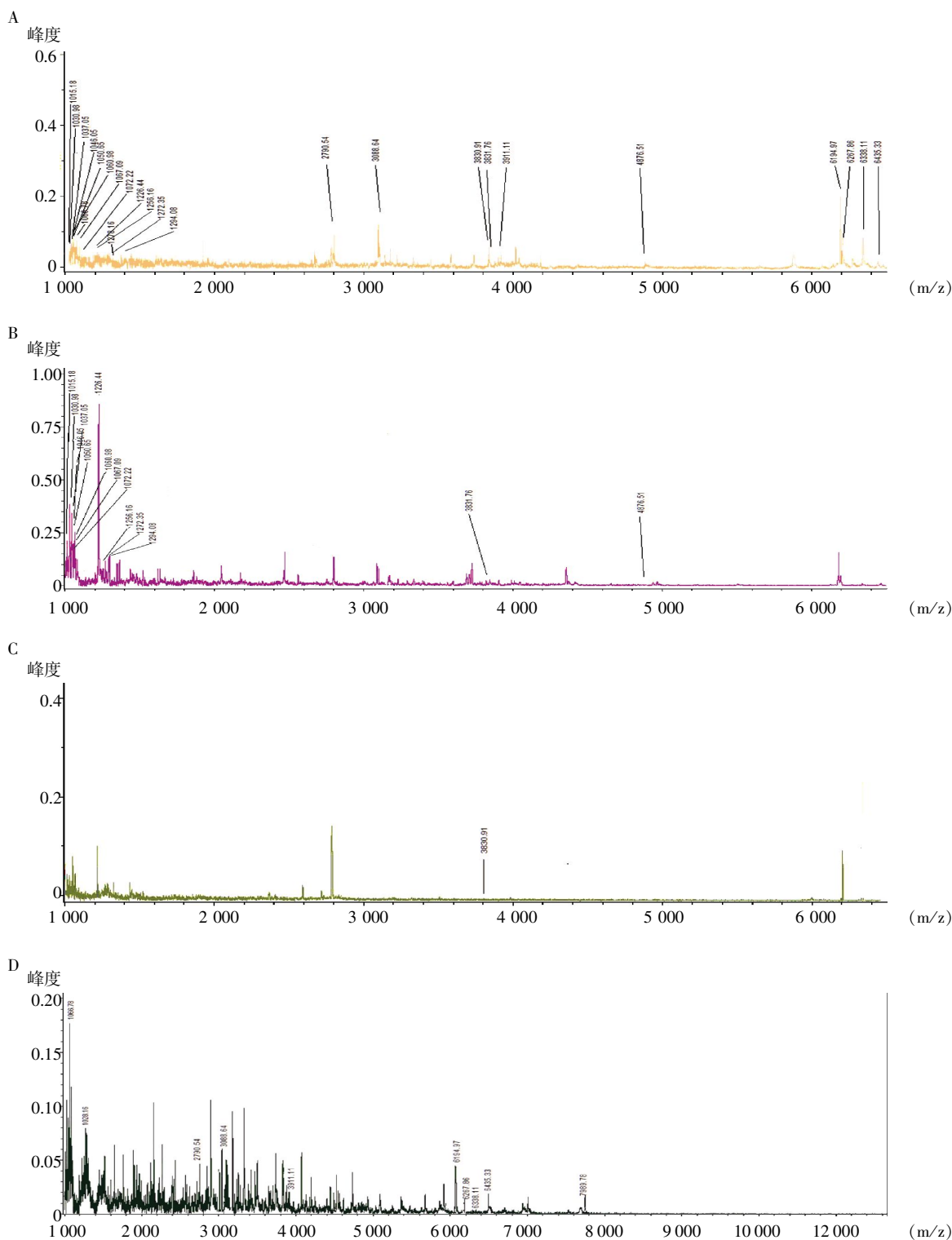
3 讨 论

DN 是 2 型糖尿病最常见的慢性微血管并发症,发病率逐年升高,严重影响患者的生存质量^[7]。虽然 DN 的治疗水平已较以往有很大提高,但仍然是终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)最主要的原因,约占全部 ESRD 病例的 44%。这种现象主要由以下两种原因导致。首先是 DN 发病机制复杂,虽然 DN 发病相关的一些途径已被报道,但确切的机制仍不清楚。因此,预防 DN 并不太成功;其次, DN 的早期诊断仍存在问题^[1-2]。

随着基因组计划的实施,人们开始认识到蛋白质作为生命活动执行体的重要性,对蛋白质组的直接研究能更准确地了解和解释各种生命现象及生

命活动规律。差异蛋白组学,主要是通过比较分析不同状态下蛋白质表达图谱,从而实现对体系内代谢调控的动态监测,从而更易于提示机体对内、外界环境变化产生反应的本质规律。

尿液蛋白是血浆蛋白和肾脏蛋白的混合物,其中约 30%来源于血浆蛋白,另外 70%由肾脏产生,包含多种生物标志,尿液蛋白质和量的变化可以间接反映肾脏病变的性质和程度^[8-9]。人类肾脏与尿蛋白组学计划(Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP)正着力建立尿液蛋白组学的标准化指导方案。因此,利用蛋白质组学技术及差异蛋白组学方法来检测并发现患者尿液中的各种特异性生物学指标具有较强的可行性与可操作性,且由于其非创伤性,在肾脏疾病的研究中具有越来越重要



A;C 组尿液多肽谱;B;DM1 组尿液多肽谱;C;DM2 组尿液多肽谱;D;DM3 组尿液多肽谱。

图 1 各组尿液多肽谱图

Figure 1 Urine polypeptide spectrum of each group

的地位。

Rossing 等^[3]发现与正常蛋白尿的糖尿病患者相比,在 DN 尿液中,存在另一些不太常见的胶原片段(如 II 型胶原片段 α-1),而 I 型胶原片段和

uromodulin 尿调蛋白片段则有所减少。Wu 等^[4]通过蛋白芯片联合质谱分析发现了分子量分别为 2 797.03、4 545.77、4 984.03 和 9 083.71 的蛋白可作为 DN 的潜在标志物。从近几年的研究发现,分子

量在 1 000~40 000 的尿蛋白峰值比较有意义,越来越多的研究更趋向于强调小分子多肽组具早期诊断价值^[10-15]。

本研究在 $m/z < 12\ 000$ 范围内,利用 MB-WCX 和 MALDI-TOF-MS 技术测定健康对照人群与糖尿病患者尿液,结果初步显示,在 C 组和 DM1 组,多肽谱的出峰多集中在 $m/z < 7\ 000$ 的较小区域,且以 $m/z\ 1\ 000$ 左右的多肽谱为主,且峰度较 $m/z\ 4\ 000$ 的多肽峰明显增高,而从 DM2 组至 DM3 组,多肽谱的出峰已明显增多,且分布也从小分子过渡到大小分子散在分布,符合糖尿病肾病的损害过程。同样,在 C 组与 DM1 组、DM1 与 DM2 组进行两两比较时,共同多肽峰值变化多在 $m/z\ 1\ 000\sim 1\ 300$ 和 $m/z\ 6\ 100\sim 6\ 400$,而当与 DM3 组进行两两比较时,共同多肽峰值变化分散在 $m/z\ 3\ 000\sim 12\ 000$ 。在我们观察的范围内,DM2 组与 C 组比较只发现 1 个有统计学差异的多肽峰值。在 DM3 组与 C 组比较发现,低表达的 2 个有统计学差异的多肽峰值都在 $m/z\ 1\ 000\sim 1\ 300$,而高表达的有统计学差异的峰值有 8 个,除了 $m/z\ 3\ 911.11$ 多肽峰外,主要集中在 $m/z\ 6\ 000\sim 7\ 000$ 。表明在早期 DN 患者, $m/z\ 1\ 000\sim 1\ 300$ 的差异多肽峰表达增高。 m/z 为 3 831.76、3 830.91、3 911.11 的多肽峰,其相对分子量接近,考虑为同一类多肽,在 C 组中表达最高,而在 DM 的各组中均表达下降,虽在各组中无明显统计学差异,仍考虑上述差异峰可能对早期 DN 的预警及早期诊断具有重要价值。

本研究表明,运用 MB-WCX 联合 MALDI-TOF MS 技术可以较灵敏、简便地获得健康人及 DN 患者的尿液多肽谱,可以较容易地发现某一图谱与其他图谱的差异,并能了解某一差异峰在各组间的峰度变化情况,并可以进一步通过对差异多肽峰的鉴定获得相对特异的潜在标志物,对于早期 DN 的临床诊断及研究提供便捷、无创的途径。

[参考文献]

- [1] Dihazi H, Müller GA, Lindner S, et al. Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients[J]. Clin Chem, 2007, 53(9): 1636-1645
- [2] Yang YH, Zhang S, Cui JF, et al. Diagnostic potential of serum protein pattern in type 2 diabetic nephropathy[J]. Diabet Med, 2007, 24(12): 1386-1392
- [3] Rossing K, Mischak H, Dakna M, et al. Urinary proteomics in diabetes and CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(7): 1283-1290
- [4] Wu J, Chen YD, Yu JK, et al. Analysis of urinary proteomic patterns for type 2 diabetic nephropathy by protein chip [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 91(2): 213-219
- [5] Otu HH, Can H, Spentzos D, et al. Prediction of diabetic nephropathy using urine proteomic profiling 10 years prior to development of nephropathy [J]. Diabetes Care, 2007, 30(3): 638-643
- [6] Rao PV, Lu X, Standley M, et al. Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy [J]. Diabetes Care, 2007, 30(3): 629-637
- [7] Wu J, Chen YD, Shi XL, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV): a novel emerging target for the treatment of type 2 diabetes[J]. JNMU, 2009, 23(4): 6-13
- [8] Thongboonkerd V, Songtawe N, Sritippayawan S. Urinary proteome profiling using microfluidic technology on a chip [J]. J Proteome Res, 2007, 6(5): 2011-2018
- [9] Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots[J]. Proteomics, 2004, 4(4): 1159-1174
- [10] Jiang H, Guan G, Zhang R, et al. Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2009, 25(3): 232-241
- [11] Jiang H, Guan G, Zhang R, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy[J]. Nephrology (Carlton), 2009, 14(3): 332-337
- [12] Riaz S, Alam SS, Srai SK, et al. Proteomic identification of human urinary biomarkers in diabetes mellitus type 2 Diabetes[J]. Technol Ther, 2010, 12(12): 979-988
- [13] Georg M, Sven B, Alexander L, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2007, 53(3): 421-428
- [14] Bellei E, Rossi E, Lucchi L, et al. Proteomic analysis of early urinary biomarkers of renal changes in type 2 diabetic patients [J]. Proteomics Clin Appl, 2008, 2(4): 478-491
- [15] Lapolla A, Seraglia R, Molin L, et al. Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study[J]. J Mass Spectrom, 2009, 44(3): 419-425

[收稿日期] 2012-01-09