

斑马鱼胚胎发育过程中内源性多肽的表达及与眼发育的相关研究

李楠^{1,2}, 张昕¹, 史春梅¹, 张青宇^{1,2}, 郭锡熔^{1,2}, 池霞^{1,2}, 童梅玲^{1*}

¹南京医科大学附属妇产医院儿童保健科, 江苏 南京 210004; ²南京医科大学儿科研究所, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究斑马鱼发育过程中内源性多肽的表达规律以及与眼发育的相关性。方法:分别收集0、48 h斑马鱼胚胎进行多肽质谱分析,筛选发育过程中的差异多肽,利用生物信息学方法分析差异多肽对应的前体蛋白及前体基因,从中筛选与眼发育相关的内源性多肽。结果:研究共筛选得到差异多肽232条。理化特性分析发现分子量均分布在2 000 Da以下,等电点主要以弱酸和弱碱性为主,中性极少。生物信息学发现 Vitellogenin (VTG)、Titin (TTN)基因编码的前体蛋白富集较多与胚胎发育和眼发育相关的差异多肽。信号通路分析(ingenuity pathway analysis, IPA)发现差异多肽的分子功能和生理系统功能与胚胎发育相关,差异多肽富集信号通路包括轴突介导的信号通路、FAK信号通路和MAPK信号通路,这些信号通路与眼发育密切相关。结论:斑马鱼胚胎期发育过程中内源性差异多肽理化特性稳定,与胚胎发育密切相关,并可能通过相关信号通路来影响眼发育,将为眼发育提供新的研究思路,为机制研究奠定基础。

[关键词] 内源性多肽;眼发育;斑马鱼;液相色谱-串联质谱分析;信号通路

[中图分类号] Q813.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)02-161-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180204

Expression of endogenous peptides during zebrafish embryonic development and its correlation with eye development

Li Nan^{1,2}, Zhang Xin¹, Shi Chunmei¹, Zhang Qingyu^{1,2}, Guo Xirong^{1,2}, Chi Xia^{1,2}, Tong Meiling^{1*}

¹Department of Child Health Care, the Affiliated Obstetrics and Gynaecology Hospital of NMU, Nanjing 210004;

²Institute of Pediatrics, NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To identify the expression of endogenous peptides during development of zebrafish and their relationship with eye development. **Methods:** The zebrafish embryos were collected for 0 hour and 48 hours respectively for peptide mass spectrometry analysis. The differential peptides in the development process were screened for bioinformatics analysis to detect the relationship with eye development. **Results:** A total of 232 bands of differential peptides were screened. Analysis of physical and chemical properties found that the molecular weight is distributed below 2 000 Da, isoelectric point of proteins mainly weak acid and weak alkaline, isoelectric point of little protein is neutral. Bioinformatics analysis found that Vitellogenin (VTG), Titin (TTN) encoded precursor protein have large numbers of peptides. The molecular function and physiological function of all differential peptides were analyzed by ingenuity pathway analysis (IPA), which found they are closely related embryonic development. The signal pathway analysis revealed that axonal-mediated signaling pathway, FAK signal pathway and MAPK signal pathway related to eye development. **Conclusion:** The differential endogenous peptides of zebrafish embryo development are stable, closely related to embryonic development, and may affect eye development through related signal pathway, which will provide new research ideas and mechanism for eye development.

[Key words] endogenous peptide; eye development; Zebrafish; LC-MS/MS

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(02): 161-165]

[基金项目] 国家自然科学基金(81670900, 81600779);江苏省“六大人才高峰”第七批高层次人才项目(2010001);南京市重点科学和科技发展计划(ZKX16061);南京医科大学科技发展项目(2015NJMU092)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: meilingtong111@126.com

近年来,随着分子生物学的发展,多肽组学在生理过程中的作用受到广泛关注。多肽是指10~100个氨基酸分子缩合而成的化合物,是蛋白质水解的中间产物,通过其对应的前体基因介导相关信号通路参与生理过程。研究证实多肽可以涉及人体的生殖、生长、神经发育等方面的生理活动^[1]。然而目前有关内源性多肽参与眼发育过程及其分子机制的相关研究较少。斑马鱼作为一种视觉高度发达的模式动物,其视网膜形态学结构与人类相似,基因相似度高达87%,是研究眼发育的理想动物模型^[2]。其眼发育具有时空特异性,在受精后24 h时循环系统、脑发育和眼发育形成,48 h时出卵膜,开始具有视功能,相当于人类新生儿时期^[3-4]。为此,本研究选用斑马鱼作为模式动物,研究发育过程中内源性多肽的表达差异,并进行生物信息学分析,筛选与眼发育密切相关的多肽及信号通路,旨在研究在胚胎发育尤其是眼发育中具有潜在重要作用的多肽,为眼发育的研究提供新方向和理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野生型斑马鱼品系购于南京大学模式动物研究所(Tübingen品系,德国);丰年虫(超鹰公司,中国);台式高速冷冻离心机(Beckman公司,美国);高速微量离心机(上海安亭科学仪器厂,中国);-80℃超低温冰箱、-20℃冰箱(SANY公司,日本);真空离心蒸发浓缩器(Eppendorf公司,德国);分光光度计NanoDrop@ND-1000(Nano Drop公司,美国);超滤离心管、LTQ-Orbitrap Velos质谱仪(赛默飞公司,美国);液相色谱系统(Dionex公司,美国);色谱柱(SCIEX公司,美国);高分辨率色谱级乙腈、甲酸、乙酸(Invitrogen公司,美国);串联质谱标签TMT 6-标签试剂(赛默飞公司,美国);二硫苏糖醇、碘乙酰胺(Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 样本收集

斑马鱼饲养于28.5℃恒温水中,日/夜周期为14 h/10 h,喂食丰年虫3次/d。于孵卵前1 d随机将雌雄斑马鱼1:1隔离放于专用交配缸中。次日光照抽离挡板雌雄鱼进行交配,30 min后收集胚胎,随机分成两组,一组直接移入-80℃冰箱冻存(0 h),另一组培养至48 h收集冻存。将0、48 h样本进行液相色谱-串联质谱分析(LC-MS/MS)。

1.2.2 超滤法分离多肽和串联质谱标记

样品在4℃条件下以12 000 g离心15 min,取上清液,加入20%体积的乙腈(ACN),涡旋震荡后室温孵育20 min,以使细胞破坏将多肽游离出来;用分子截留量为3 000 Da的超滤管,将上清在4℃条件下以5 000 g离心60 min,收集流出液。室温下对每个标记管加入无水乙腈41 μL,漩涡震荡5 min后,去上清液,100 μg的样本中加入41 μL TMT标签试剂,室温下孵育1 h后添加8 μL 5%羟胺,孵育15 min,转入-80℃存储,并作样本标记。

1.2.3 液相色谱-串联质谱分析

使用Ultimate 3000 nano-LC系统进行肽的分析,并通过LTQ-Orbitrap Velos质谱仪进行分析。采用RP分离方法进行样品处理,缓冲液A(2%乙腈、0.5%乙酸)和缓冲液B(98%乙腈、0.5%乙酸)。用以下梯度:初始加入5%缓冲液A维持10 min,再加入25%B维持100 min,加入40%B维持30 min,加入75%B维持10 min,在100%B中维持10 min,最后在95%A缓冲液下维持10 min。将洗脱的肽以1.8kV的电压喷射到质谱仪中,以质荷比400、分辨率>60 000为采集范围。使用MassLynx™软件分析质谱数据。

1.2.4 生物信息学分析

采用在线计算工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)分析多肽的等电点(pI)和分子质量(Mw)。采用IPA 7.1版本(Mountain View, CA)分析差异多肽富集相关信号通路、分子功能和生理功能。采用蛋白数据库(<http://www.uniprot.org/>)分析前体蛋白的详细功能和作用。采用(GO)分析(<http://geneontology.org>)进行差异多肽前体基因功能分析。

1.3 统计学方法

所有实验均重复3次。采用SPSS19.0软件进行统计学分析。通过*t*检验分析48 h组和0 h组的差异多肽, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 差异多肽的筛选

多肽质谱分析结果量化后,本研究共筛选得到232条差异表达的内源性多肽(倍数>2, $P < 0.01$)。其中21条具有显著性差异(倍数>3, $P < 0.001$,表1)。

2.2 差异多肽的理化特性分析

差异多肽(232条)的理化特性分析发现分子量多分布在2 000 Da以下,证实了用液相色谱-串联质

表1 斑马鱼胚胎发育过程中21条差异多肽

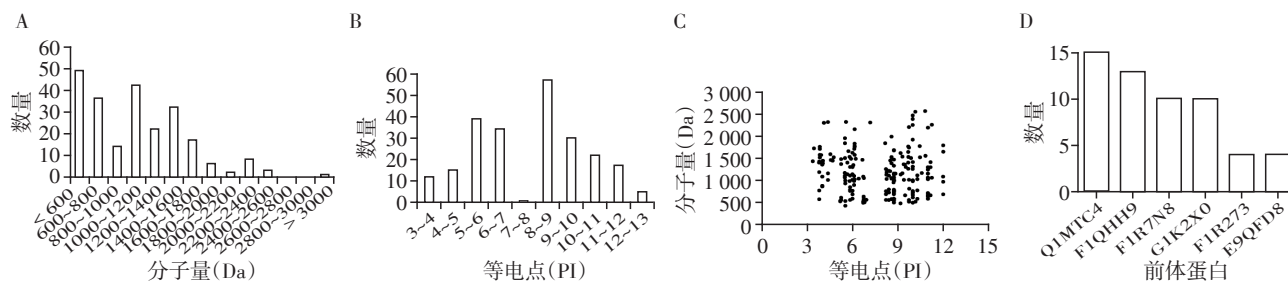
Table 1 Differential peptide in the development of zebrafish

前体蛋白	多肽	pH值	分子量(Da)	P值(<0.001)	倍数(>3倍)
F1QHH9	VKQINIHHDDTPEGQA	3.84	1 755.90	2.02E-05	113.490
F1RBA0	QAERLLKQINIHHDDTPEGQ	4.11	2 296.52	2.41E-04	40.144
F1R7N8	RVSIKI	11.00	714.91	7.43E-04	12.154
K7DYP6	RVSLKL	11.00	714.91	7.43E-04	12.154
F1QGL5	ANDSVSKLTPE	4.37	1 160.25	4.21E-04	4.740
F1QXS5	TQAPPPLQAKPRGGAGSSVGTIV	11.00	2 189.50	8.25E-04	-3.513
Q1LWN2	TKSPAADESADRIT	4.56	1 461.55	7.28E-04	-4.163
E9QGN2	KTLNCL	8.22	690.86	4.54E-04	-4.342
F1R7N8	SKTRAVQLQ	11.00	1 030.19	4.69E-04	-4.572
F1QHH9	IGAAGSAYMINDAAT	3.80	1 425.58	4.40E-04	-5.013
E7F251	NQAAVH	6.74	638.68	9.34E-04	-5.538
F1Q6K1	NLFLKVVLTAAQL	8.75	1 471.85	6.74E-04	-6.316
B8JHS8	KTIQVKIID	8.59	1 057.30	7.96E-04	-6.482
E7FA20	KTIPPQS	8.75	769.90	4.70E-04	-7.021
X1WDW5	KTLRKRKVKSVVVEKAKAKV	11.26	2 254.79	6.15E-04	-7.716
E7F719	KTANTLFLSLD	5.84	1 109.24	2.36E-04	-9.442
F1QHX4	KRYVM	9.99	695.88	3.84E-04	-10.266
G1K2X0	IKTLLSAGTKPAL	10.00	1 312.62	2.12E-04	-16.593
F1R9N4	SNRALKLASSKVKRS	12.02	1 644.94	3.02E-04	-17.105
G1K2X0	TKLLKGNEYIFRVLA	9.70	1 765.13	9.71E-04	-19.534
F1QA77	CALLLLLLGA	5.52	999.32	2.03E-04	-39.001

谱分离多肽的纯度。差异多肽的pH在5~6和8~9之间分布最多,呈弱酸和弱碱性,少有中性(图1A, B)。图1C提示差异多肽理化特性分布在一个有限的范围内,性质稳定。Q1MTC4、F1QHH9、F1R7N8、G1K2X0这4个前体蛋白拥有大量的差异多肽(图1D),提示这些前体蛋白在胚胎发育的过程中具有重要作用,前4个富集较多的前体蛋白对应的基因分别是Vitellogenin-2(VTG-2)、Vitellogenin-5(VTG-5)、titin-1(TTN-1)、titin-2(TTN-2)。

2.3 差异多肽(232条)的信号网络(ingenuity pathway analysis, IPA)分析

使用IPA软件分析差异多肽前体蛋白^[5]参与的信号通路,并对可能参与的细胞功能和生理功能做了相关性分析。结果发现:差异多肽富集信号通路主要集中于树突状细胞成熟通路、肝纤维化/肝星状细胞活化通路、内在凝血酶原激活途径、轴突介导的通路、FAK通路、MAPK信号通路和神经性疼痛通路(图2);差异多肽富集的分子和细胞功能主要与



A: 差异多肽的分子量分布; B: 差异多肽的等电点分布; C: 差异多肽的等电点及分子量分布; D: 差异多肽的前体蛋白对应多肽数量分布。

图1 差异多肽的分子量、等电点以及差异多肽对应的前体蛋白

Figure 1 The molecular weight, the isoelectric point and the corresponding precursor protein distribution of differential peptide

细胞发育、细胞间信号与相互作用、细胞组装与组织、细胞生长和增殖和细胞周期有关;差异多肽主要富集的生理系统功能为胚胎发育、生物体发育、神经系统的发育与功能、器官形态、生殖系统的发育与功能(图3)。结果表明差异多肽与发育密切相关,通过相关信号通路影响细胞功能参与生理过程。

2.4 眼发育相关多肽的筛选

通过IPA分析和GO分析并结合以上对差异多

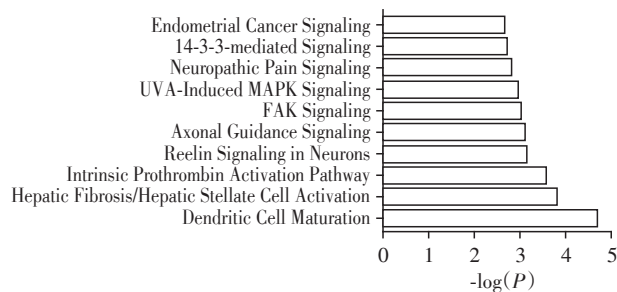
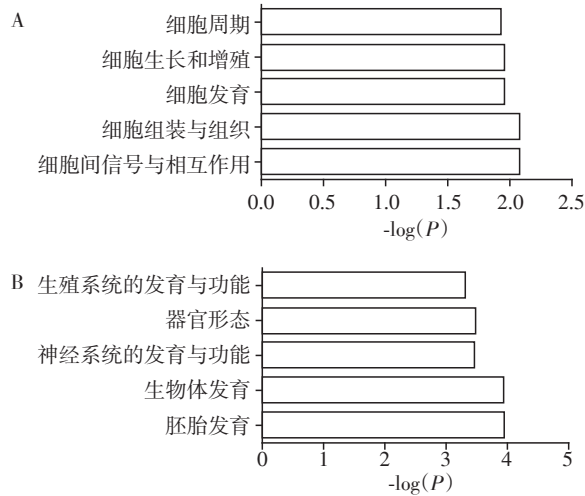


图2 差异多肽相关信号通路

Figure 2 The related signaling pathways of differential peptide



A:差异多肽的IPA分子和细胞功能分析相关性结果;B:差异多肽的IPA生理系统的发育和功能分析相关性结果。

图3 差异多肽分子与细胞功能(A)和生理系统发育与功能(B)的IPA相关性分析

Figure 3 The molecular and cell function (A) and physiological system development function (B) IPA correlation analysis results of differential peptide

肽生物信息学分析,本研究筛选出了与眼发育相关的差异表达内源性多肽,通过 uniprot 找出其前体蛋白以及前体蛋白的功能,并进行位置分析。结果发现4个与眼发育相关的多肽(表2),其中多肽“EPG-KQGAPGG”和“RAVLVDLEP”均在前体蛋白的功能域中,并且与眼发育有关,前者参与轴突介导,后者与微管蛋白形成有关,引起高度关注。

3 讨论

近年来,由于生物分子研究的深入,多肽组学成为科学研究的热门话题。内源性多肽指直接来源于机体内,具有生理功能的天然生物活性肽^[6]。科学研究表明人体内有上千种内源性肽,其分子量和结构差异大,理化特性不一,其中已有数条被证明参与眼发育的过程:如李金菊等^[7]在小鼠上证明钠尿酸及其受体参与调节眼发育的过程, Seltner 等^[8]在眼内视网膜内丛状层、脉络膜、睫状体和虹膜中检测到了血管活性肠肽的免疫活性, Popova 等^[9]发现不同类型的内源性多巴胺对视网膜电图有明显的开关作用。以上研究表明多肽与眼发育密切相关,与眼发育相关的内源性多肽的发掘和分子机制仍处于起始阶段,因此利用质谱分析筛选胚胎发育过程中与眼发育有关的未知内源性多肽并研究其可能的分子机制显得十分必要,有助于更深入了解内源性多肽与眼发育的关系,为眼发育的研究提供新视角。

斑马鱼是研究眼发育的一种模式动物,其成熟周期短并且与人基因相似性高,同源性好。发育过程中身体透明,眼球占头部比例较大,有利于形态学观察,因此本研究选用斑马鱼作为模式动物^[10]。

本研究发现筛选出的差异性多肽分子量大多在2 000 Da以下,证实了提取内源性多肽纯度高。等电点分析显示差异多肽大都呈弱酸及弱碱性,几乎没有中性,说明提取的内源性多肽稳定性好。两组差异多肽前体蛋白分析发现有4个前体蛋白降解的差异多肽在两组中占了较高比例,他们对应的基因分别是VTG-2、VTG-5、TTN-1和TTN-2。通过IPA

表2 眼发育相关多肽生物学信息

Table 2 Eye development related peptides information

多肽	前体蛋白	位置	功能域	生物学功能
VGGTKKNDSGKLLS	F1R8E2	332~345	-	视网膜发育
EPGKQGAPGG	A0A0R41MA3	937~946	不明确	轴突介导
RAVLVDLEP	Q6P5M9	62~70	微管蛋白	微管蛋白构成
KTSLH	A9C3V4	800~813	-	横跨膜

分析,本研究发现差异多肽参与多条信号通路,并在细胞间信号与相互作用中起着重要作用,表明差异多肽介导的信号通路在胚胎发育过程中参与调节细胞功能,这与VTG和TTN基因功能相关。其中VTG是雌激素污染的敏感标志物,与胚胎期各系统发育密切相关,有研究证明其在胚胎期斑马鱼眼和脑组织中均有表达^[11-12],而TTN基因与细胞组装有关,其参与构成结构拓扑蛋白,与脊椎动物眼晶状体 β 和 γ -晶状蛋白进化相关^[13]。TTN所表达的肌联蛋白被证实人在斜视患者肌肉中表达下调^[14]。

根据IPA和GO分析的结果,本研究共找到了4个与眼发育相关的多肽,其中“EPGKQGAPGG”和“RAVLVDLEP”位于其前体蛋白的功能域中,提示其具有潜在的生物学功能。“EPGKQGAPGG”的前体蛋白参与轴突介导,而轴突介导信号通路、FAK信号通路和MAPK信号通路与眼发育关系最密切^[15]。轴突介导信号通路能调节神经元迁移,其能影响视网膜神经节细胞的发展。FAK和MAPK信号通路的抑制会影响视网膜血管形成和神经轴突的生长,而神经轴突与视网膜神经节细胞形成密切相关^[16]。此外,MAPK信号通路在细胞受刺激后会激活并逐级磷酸化,能参与调节眼创伤的修复^[17]。“RAVLVDLEP”的前体蛋白参与微管形成,Eastlake等^[18]证实了微管蛋白的上升与视网膜的再生相关。

本研究结果发现斑马鱼胚胎发育过程中232条差异性生物内源性多肽,且这些差异性多肽参与胚胎发育密切相关的生理过程。同时,也筛选出与眼发育高度相关的内源性多肽。本研究为眼发育及相关眼病的研究提供了新的研究方向,并可为其机制研究提供新的理论基础。

[参考文献]

- [1] 李 运,王 菲,王 兴,等. 内源性多肽的潜在作用方式与功能预测[J]. 中国儿童保健杂志,2017,25(1):41-43
- [2] 方 薇,曾 静,王付利. 模式生物斑马鱼在人类疾病研究中的应用[J]. 医学信息旬刊,2010,5(2):337-338
- [3] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dynam*, 1995,203(3):253
- [4] Kimmel CB. Genetics and early development of zebrafish [J]. *Trends Genet*, 1989,5(8):283-288
- [5] Lin H, He L, Ma B. A combinatorial approach to the peptide feature matching problem for label-free quantification [J]. *Bioinformatics*, 2013,29(14):1768-1775
- [6] 郭锡熔. 肽学研究的新发现与研究进展[J]. 中国儿童保健杂志,2017,25(1):1-2
- [7] 李金菊,李瑞玲,李 雪,等. 钠尿肽受体A在小鼠视网膜发育过程中的表达[J]. 解剖学报,2014,591-598
- [8] Seltner RLP, Stell WK. The effect of vasoactive intestinal peptide on development of form deprivation myopia in the chick: a pharmacological and immunocytochemical study [J]. *Vision Res*, 1995,35(9):1265-1270
- [9] Popova E, Kuppenova P. Effects of dopamine receptor blockade on the intensity-response function of ERG b- and d-waves in dark adapted eyes [J]. *Vision Res*, 2014, 121(3):233-244
- [10] 全珊珊,吴新荣. 斑马鱼,人类疾病研究的理想模式动物[J]. 生命的化学,2008,28(3):260-263
- [11] Zhong L, Yuan L, Rao Y, et al. Distribution of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*) tissues for biomarker analysis [J]. *Aquat Toxicol*, 2014,149:1-7
- [12] Sire MF, Babin PJ, Vernier JM. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout [J]. *J Exp Zool*, 2010,269(1):69-83
- [13] Ramanujam V, Kotamarthi HC, Ainaravaru SRK. Ca^{2+} binding enhanced mechanical stability of an archaean crystallin [J]. *Plos One*, 2014,9(4):e94513
- [14] Agarwal AB, Feng CY, Altick AL, et al. Altered protein composition and gene expression in strabismic human extraocular muscles and tendons [J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2016,57(13):5576-5585
- [15] RiO JAD, Ureña JM, Jiménez EM, et al. MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(10):840-850
- [16] Toutounchian JJ, Pagadala J, Miller DD, et al. Novel small molecule JP-153 targets the Src-FAK-Paxillin signaling complex to inhibit VEGF-induced retinal angiogenesis [J]. *Mol Pharmacol*, 2017,91(1):1
- [17] Yao B, Wang S, Xiao P, et al. MAPK signaling pathways in eye wounds: Multifunction and cooperation [J]. *Exp Cell Res*, 2017,359(1):10-16
- [18] Eastlake K, Heywood WE, Traceywhite D, et al. Comparison of proteomic profiles in the zebrafish retina during experimental degeneration and regeneration [J]. *Sci Rep*, 2017,7:44601

[收稿日期] 2017-06-17