

· 临床研究 ·

非标记定量蛋白质组学技术探讨不同透析龄患者腹膜透析流出液外泌体差异蛋白的研究

武云慧¹, 黄抱娣¹, 茅春霞¹, 李归雁², 邢昌赢¹, 张莉^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院肾内科, ²营养科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**研究不同透析龄患者腹膜透析流出液(peritoneal dialysis effluent, PDE)外泌体中差异蛋白质组。**方法:**选取10例稳定腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)患者,根据透析龄分为初始腹透组($n=5$)和维持腹透组($n=5$)。收集患者留腹过夜的外泌体,通过透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)、纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)、免疫印迹法鉴定经超速离心提取的外泌体,并用非标记定量蛋白质组学技术鉴定和筛选,对具有显著差异的蛋白开展功能富集和信号通路生物信息学分析。**结果:**PDE中提取到的外泌体TEM下呈茶托状,直径分布在30~150 nm,表达外泌体标志蛋白CD63和TSG101。通过数据库比对两组共筛选出499种差异蛋白,与初始腹透组相比,维持腹透组经差异显著性筛选上调蛋白17种,下调蛋白15种。基因本体论(gene ontology, GO)分析显示,差异表达蛋白主要分布在氯离子通道复合物、细胞表面以及核基质,以结合与催化活性为主,参与结合的正向调控、氧化应激反应及过氧化物酶反应等生物过程。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路主要富集在免疫相关的信号通路,包括IL-17和Th17细胞分化信号通路,在腹膜损伤中起着关键作用。**结论:**采用非标记定量蛋白质组学技术筛选的差异蛋白可能作为PD患者腹膜损伤的候选标志物,也为揭示腹膜纤维化分子生物学机制提供线索。

[关键词] 腹膜透析;流出液;外泌体;蛋白质组学;非标记技术

[中图分类号] R586

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)08-1133-09

doi:10.7655/NYDXBNS20220813

The study of label-free quantitative proteomics technology on the differential proteins of exosomes in peritoneal dialysis effluent from patients with different dialysis ages

WU Yunhui¹, HUANG Baodi¹, MAO Chunxia¹, LI Guiyan², XING Changying¹, ZHANG Li^{1*}

¹Department of Nephrology, ²Department of Nutrition, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To study the differential proteomics in exosomes of peritoneal dialysis effluent (PDE) from patients with different dialysis ages. **Methods:** Ten stable peritoneal dialysis (PD) patients were selected and divided into newly enrolled patients group (NEPs group, $n=5$) and maintenance peritoneal dialysis patients group (MPDs group, $n=5$) according to the dialysis age. PDE was collected from patients left overnight. Exosomes were extracted by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blotting. Label-free quantitative proteomics technology was used to identify and screen the exosomes. Functional enrichment and signal pathway bioinformatics analysis were performed for significantly differential proteins in the exosomes. **Results:** The exosomes in PDE showed saucer-like vesicles under TEM, and the diameters were between 30 and 150 nm measured by NTA. The specific markers of exosomes, CD63 and TSG101 were detected by Western blotting. A total of 499 proteins were detected by proteomics analysis. After significant difference screening, 17 were up-regulated and 15 were down-regulated. Gene ontology (GO) analysis showed that these differentially expressed proteins were mainly distributed in chloride channel complexes, cell surface and nuclear matrix, playing a role mainly in binding and catalytic activities, and were involved in biological processes such as positive regulation of binding, oxidative stress response and peroxidase response. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were mainly enriched in immune-related signaling pathways, including IL-17

[基金项目] 江苏省医学创新团队(CXTDA2017011)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lizhang6@126.com

signaling pathway and Th17 cell differentiation signaling pathway, which play a key role in peritoneal injury. **Conclusion:** The differentially expressed proteins screened by label-free quantitative proteomics technology could be used as candidate markers of peritoneal injury in PD patients and provides molecular clues for revealing the peritoneal fibrosis mechanism of pathogenesis.

[**Key words**] peritoneal dialysis; effluent; exosomes; proteomics; label-free technology

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(08): 1133-1141]

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)是终末期肾脏病患者广泛使用的肾脏替代治疗方式之一, PD的全球年增长率约为8%, 已高于血液透析的增长率(约6%~7%)^[1]。随着透析时间的延长, 腹膜结构和功能受损, 限制了治疗并导致患者的不良结局。相关机制尚不明确, 其中人腹膜间皮细胞的上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是核心环节, EMT是上皮特征的逐步丢失和肌成纤维细胞样表型的获得^[2]。腹膜活检仍然是识别腹膜病理改变的金标准, 由于不易重复检查, 并且存在创伤风险, 在临床上难以推广。因此, 寻找早期识别腹膜损伤的无创性生物标志物, 指导个性化干预, 能够延长患者的PD时间。

外泌体是一类直径为30~150 nm的细胞外囊泡, 可由多种细胞分泌, 包裹着蛋白质、脂质、DNA和RNA等物质, 介导细胞间的信号转导, 这些物质几乎参与了所有的生理和病理过程, 可作为液体活检的重要标志物进行疾病诊断与治疗^[3-4]。虽然研究证明腹膜透析流出液(peritoneal dialysis effluent, PDE)中存在外泌体^[5], 但对PDE来源外泌体所携带的蛋白质研究却少有报道。最新研究表明, PDE中通过外泌体释放的水通道蛋白1与腹膜超滤效率相关, 可能是评估腹膜完整性的一种潜在生物标志物^[6]。本研究通过非标记定量蛋白质组学技术对不同透析龄患者PDE外泌体蛋白进行鉴定和定量分析, 筛选差异蛋白, 通过生物信息学分析差异蛋白功能及生物学过程, 寻找腹膜损伤的生物标志物及探讨发病机制提供了参考依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2020年5—7月于南京医科大学第一附属医院腹膜透析中心行稳定PD治疗并规律随访的患者。透析方案为持续性非卧床腹膜透析(continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD)或日间非卧床腹膜透析(daytime ambulatory peritoneal dialysis, DAPD)。排除标准: ①年龄<18岁或>80岁; ②

PD<1个月; ③恶性肿瘤或严重创伤患者; ④自身免疫性疾病患者; ⑤有肝炎、肝纤维化或结核病史患者; ⑥1个月内发生过腹膜炎或其他严重感染患者。根据透析龄分为两组: 初始腹透组(newly enrolled patients group, NEP组)(1个月≤透析龄≤2个月); 维持腹透组(maintenance peritoneal dialysis patients group, MPD组)(24个月≤透析龄≤28个月)。最后, 纳入NEP组和MPD组各5例患者, 收集这些患者的一般临床资料。本研究经医院伦理委员会批准(审批文号: 2020-SR-294), 并获得患者的知情同意。

SDS(上海生工), 尿素(Bio-Rad公司, 美国), Tris(上海生工), HCl(北京国药), BCA定量试剂盒(上海碧云天), 30 kDa超滤离心管(Sartorius公司, 德国), IAA(Sigma公司, 美国), 胰蛋白酶(Promega公司, 美国), Anti-CD63抗体(Ab216130)、Anti-TSG101抗体(Ab125011)(Abcam公司, 美国), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(A0208, 上海碧云天), C₁₈ Cartridge(Waters公司, 美国), 低速离心机(湖南Cence TDZ5-WS), 超速离心机(Himac CP80WX, 德国), 透射电子显微镜(FEI, Tecnai G2 Spirit, 美国), 纳米颗粒跟踪分析仪(Particle Metrix, ZetaView PMX 110, 德国), 电泳系统(Bio-Rad公司, 美国), Multiskan FC酶标仪、高效液相色谱仪(EASY-nLC System, 美国)、质谱系统(Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 外泌体的分离

收集每例患者行腹膜平衡试验前1 d 100 mL留腹过夜的PDE, 放入4℃预冷离心机, 于300 g离心10 min、2 000 g离心10 min去除死细胞后, 取上清液转移至超速离心机配套的离心管中, 在4℃下10 000 g离心30 min去除细胞碎片, 100 000 g离心70 min, 取透明沉淀, 并分别用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)1 055、1 015、1 015 μL重悬, -80℃保存以备下一步检测。

1.2.2 外泌体的鉴定

取15 μL样品在电镜测试的铜网上室温下静置

1 min,滤纸吸去浮液,加入 15 μL 2%醋酸双氧铀染色 1 min,沉淀后吸去残液,白炽灯下烤 10 min,TEM 观察样本中有形物体的形态和大小;取 2 μL 样品置于新的离心管中,用 PBS 稀释至 1 mL,混匀后缓慢注入纳米颗粒跟踪分析仪中,进行粒径和浓度分析;免疫印迹法检测外泌体标志蛋白 CD63 和 TSG101,根据检测出的蛋白浓度,将样品原液稀释至所需的上样量,SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,分别加入单克隆抗体 CD63、TSG101(均按照 1:1 500 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 1 h,TBST 清洗,再分别加入山羊抗兔 IgG 二抗(均按照 1:5 000 稀释),室温下摇床孵育 1 h,TBST 清洗,加入 ECL 发光液显影后采集图像。

1.2.3 蛋白的提取和酶解

取样品加入适量 SDT 裂解液(4% SDS,100 mmol/L Tris-HCl),沸水浴 15 min 后,14 000 g 离心 15 min,提取上清液中的蛋白。BCA 法测定蛋白质浓度。各样品取 20 μg ,行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色。蛋白样品取 80 μg ,分别加入 50 mmol/L DTT 还原,沸水浴 5 min,用 200 μL UA(8 mmol/L 尿素,150 mmol/L Tris-HCl)混匀,通过重复超滤除去洗涤剂、DTT 和其他低分子量组分。再加入 100 μL IAA 避光反应 30 min,依次用 100 μL UA、25 mmol/L NH_4HCO_3 清洗过滤器。加入 40 μL 胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 16 h,离心收集酶解上清液。采用 C_{18} Cartridge 对肽段进行脱盐,真空冻干,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 质谱数据采集

在与 Easy-nLC 系统偶联的 Q-Exactive 质谱仪上,采集液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)数据。配制流动相 A 液(100%水、0.1%甲酸)和 B 液(80%乙腈、0.1%甲酸)。色谱柱以 100%的 A 液平衡,取 2 μg 样品进样,液质检测,液相色谱洗脱条件(表 1)。使用 Q-Exactive 质谱仪,检测方式为正离子,质谱采用数据依赖型采集模式,全扫描范围为 350~1 800 m/z,一级质谱分辨率设为 70 000,C-trap 最大容量为 3×10^6 ,最大注入时间为 50 ms,每次全扫描后采集 10 个碎片图谱;二级质谱检测中,分辨率设为 17 500,AGC target 为 2×10^5 ,最大注入时间为 45 ms,碎裂碰撞能量设为 27%,生成质谱检测原始数据。

1.2.5 蛋白的鉴定和定量分析

MaxQuant 是基于质谱的蛋白质组学数据分析最常用的平台之一,集成了多种算法用于高分辨率的定量质谱数据集^[7]。Uniprot 是目前国际上有关蛋白质信息最全面的非冗余数据库,具有丰富蛋白质序

表 1 液相色谱洗脱条件

Table 1 Liquid chromatography elution conditions

时间(min)	流动相 B 比例(%)
5	5
95	28
110	38
115	100
120	100

列和注释数据资源^[8]。本研究产生的质谱原始文件导入 MaxQuant 软件(版本号 1.6.14.0)进行处理,并通过数据库 Uniprot_HomoSapiens_20367_20200226 检索鉴定,所得文件采用 Perseus 1.3 软件以差异倍数 > 2 或 < 0.5 且 $P < 0.05$ 为标准筛选差异蛋白。

1.2.6 生物信息学分析

Blast2GO 数据库对筛选出的差异表达蛋白进行基因本体论(gene ontology,GO)功能富集;京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库软件进行通路分析。STRING 和 Cytoscape 工具分析蛋白互作网络。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26 软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较用 t 检验;非正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,两组间比较用 Mann-Whitney U 检验;计数资料组间比较采用 Fisher 精确概率检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

本研究共纳入 10 例 PD 患者,NEP 组和 MPD 组男女比均为 3/2,两组患者在透析龄方面差异有统计学意义($P < 0.05$),在年龄、高血压、糖尿病、透析方案、腹膜平衡试验(peritoneal equilibration test,PET)值、估计肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate,eGFR)、尿素清除指数(urea clearance index,Kt/V)方面差异无统计学意义(P 均 > 0.05 ,表 2)。

2.2 PDE 外泌体的鉴定

电镜下观察到茶托状的双层膜包裹的圆形囊泡,NTA 对囊泡的粒径分析结果显示,大多数囊泡直径分布在 30~150 nm,免疫印迹结果显示利用超速离心得到的细胞外囊泡存在外泌体的标志蛋白 CD63 和 TSG101。证明从 PDE 中提取到外泌体(图 1)。

2.3 蛋白鉴定和定量分析结果

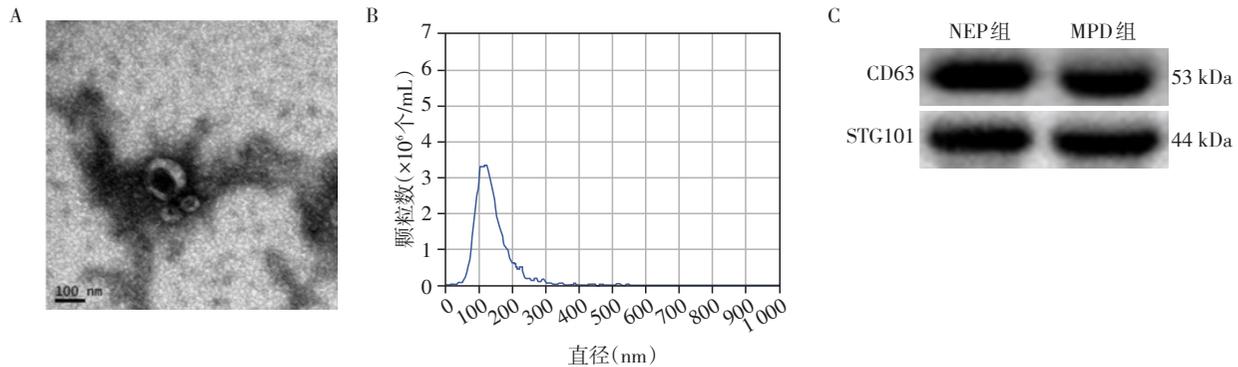
根据色谱分析及数据库比对,共鉴定出 499 种

表2 不同透析龄患者一般临床资料比较

Table 2 Comparison of general clinical data of patients with different dialysis ages

项目	NEP组(n=5)	MPD组(n=5)	P值
性别(男/女,例)	3/2	3/2	1.000 ^a
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	36.6 ± 13.3	52.2 ± 8.3	0.243 ^b
透析龄[月, $M(P_{25}, P_{75})$]	1.0(1.0, 1.0)	24.0(24.0, 26.0)	0.008 ^c
高血压(例)	4	5	1.000 ^a
糖尿病(例)	0	1	1.000 ^a
CAPD/DAPD(例)	3/2	2/3	1.000 ^a
PET值($\bar{x} \pm s$)	0.52 ± 0.44	0.60 ± 0.43	0.686 ^b
eGFR[mL·min ⁻¹ ·(1.73m ²) ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$]	3.45 ± 1.93	1.90 ± 1.94	0.836 ^b
Kt/V[mL/min, $M(P_{25}, P_{75})$]	1.69(1.34, 2.71)	1.95(1.56, 2.29)	1.000 ^c

NEP组:初始腹透组(1月≤透析龄≤2月);MPD组:维持腹透组(24月≤透析龄≤28月);CAPD:持续性非卧床腹膜透析;DAPD:日间非卧床腹膜透析;PET值:4 h D/PCr,即4 h腹透流出液/血浆肌酐浓度比值;eGFR:估算肾小球滤过率;Kt/V:尿素清除指数;采用($\bar{x} \pm s$)表示;非正态分布资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示;a:组间比较采用Fisher精确概率检验;b:组间比较采用t检验;c:组间比较采用Mann-Whitney U检验。



A:透射电镜下外泌体形态;B:纳米颗粒跟踪分析检测外泌体粒径大小;C:免疫印迹检测外泌体特异性标志物。

图1 腹透流出液中外泌体鉴定

Figure 1 Identification of exosomes in peritoneal dialysis effluent

蛋白。通过定量分析,共筛选出32种差异表达蛋白,较NEP组相比,17种蛋白在MPD组表达上调(表3),15种蛋白在MPD组表达下调(表4)。

2.4 生物信息学分析结果

2.4.1 差异蛋白GO功能的富集分析

对差异蛋白进行GO功能分析,结果显示主要参与对结合的正向调控、氧化应激反应、过氧化物酶反应、离子转运、胱甘肽结合反应等重要的生物学过程,分子功能则以结合与催化活性为主,如双链RNA结合、谷胱甘肽转移酶活性、电压门控离子通道活性、氯离子通道活性等,同时还与氯离子通道复合物、细胞膜、细胞核基质区域、肌浆网、肌球蛋白复合物等细胞组分密切相关(图2)。

2.4.2 KEGG通路富集及差异蛋白互作分析

将组间PDE外泌体差异蛋白进行互作网络分析(图3)。结果表明,鉴定到的PDE外泌体中有23个差异蛋白参与复杂调控网络,提示具有较好的生物

学关联。KEGG通路分析表明,共发现8个有统计学意义的代谢通路,分别是IL-17信号通路、Th17细胞分化通路、吞噬体通路、植物-病原体相互作用、孕激素介导的卵母细胞成熟、前列腺癌、沙门氏菌感染、抗原处理和递呈相关通路,差异蛋白在吞噬体通路富集的蛋白数目最多(图4)。

3 讨论

PDE代表了一种特别有吸引力的非侵入性临床样本,在透析液中浸泡的腹膜组织能够分泌或脱落一些物质,这些流出物有助于监测腹膜状态,更好地了解腹膜环境信息^[5]。蛋白质是细胞和生物体功能的直接执行者,蛋白质组学近年来得到了飞跃发展,对生命科学领域方面的探索具有重要意义。本研究所使用的非标记技术优势在于不需核素标记,方法简便,可对多个临床样本分析,并提供了大量蛋白丰度的差别信息,已逐渐成为重要的蛋白质

表3 MPD组/NEP组上调差异蛋白

Table 3 MPD group/NEP group up-regulated differential protein

基因	蛋白编号	差异蛋白	差异倍数	P值
APOF	Q13790	载脂蛋白F	2.312	0.035
AZGP1	P25311	锌结合 α 2-糖蛋白	2.324	0.034
S100A6	P06703	S100钙结合蛋白A6	2.335	0.033
CLIC4	Q9Y696	细胞内氯离子通道蛋白4	2.362	0.031
MBL2	P11226	甘露糖结合凝集素2	2.417	0.026
SERPING1	P05155	血浆蛋白酶C1抑制剂	2.544	0.018
S100A10	P60903	S100钙结合蛋白A10	2.550	0.018
LCN2	P80188	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白	2.581	0.016
COMP	P49747	软骨寡聚基质蛋白	2.638	0.014
CLIC1	O00299	细胞内氯离子通道蛋白1	2.650	0.013
IGHV4-4	A0A075B6R2	免疫球蛋白重链可变区4-4	2.732	0.011
CTSG	P08311	组织蛋白酶G	2.739	0.010
ITLN2	Q8WWU7	内凝集素2	2.918	<0.010
TGM1	P22735	转谷氨酰胺酶1	3.327	<0.010
CLIC3	O95833	细胞内氯离子通道蛋白3	3.457	<0.010
MPO	P05164	髓过氧化物酶	4.576	<0.010
S100A9	P06702	S100钙结合蛋白A9	11.654	<0.010

表4 MPD组/NEP组下调差异蛋白

Table 4 MPD group/NEP group down-regulated differential protein

基因	蛋白编号	差异蛋白	差异倍数	P值
EPX	P11678	嗜酸性粒细胞过氧化物酶	0.010	<0.010
MYH9	P35579	非肌肉肌球蛋白重链IIA	0.142	<0.010
MYL12A	P19105	肌球蛋白轻链12A	0.216	<0.010
TUBA1B	P68363	微管蛋白 α -1B链	0.240	0.014
CAP1	Q01518	腺苷酸环化酶相关蛋白1	0.246	0.016
VIM	P08670	波形蛋白	0.255	0.019
HSP90AB1	P08238	热休克蛋白90 β	0.258	0.020
FCRL3	Q96P31	Fc受体样蛋白3	0.276	0.026
HLA-DRB1	P01911	HLA II类主要组织相容性复合体-DRB1	0.279	0.028
IGKV2D-28	P01615	免疫球蛋白轻链kappa可变区2D-28	0.283	0.029
H2BC14	Q99879	组蛋白H2B 1-M型	0.285	0.030
NPM1	P06748	核仁磷酸蛋白1	0.295	0.035
VWF	P04275	血管性血友病因子	0.305	0.040
IGHV2-5	P01817	免疫球蛋白重链可变区2-5	0.315	0.045
HSP90AA1	P07900	热休克蛋白90 α	0.318	0.047

组学定量分析方法^[9]。

PDE中含有大量血浆蛋白,如白蛋白和免疫球蛋白,这可能掩盖了其他丰度较低但相关性较高的蛋白,如细胞因子和趋化因子,干扰了质谱鉴定^[10]。外泌体是细胞间信息交流、物质传递的载体,既携带起源细胞内成分,又排除了高丰度杂质蛋白的干扰,为寻找特异性标志物提供了新思路。本研究通过对初始腹透组与维持腹透组的PDE外泌体进行

蛋白质组学比较,共筛选出17种上调蛋白和15种下调蛋白。通过查阅文献发现,若能及早监测到PDE外泌体携带蛋白质的改变,这些信息将有可能帮助监测腹膜损伤,维持腹膜的最佳功能。

细胞内氯离子通道(chloride intracellular channel, CLIC)蛋白家族是由6个进化保守的蛋白组成:CLIC1~6,以可溶性和膜结合性两种状态存在,并已被证明在细胞运动调节^[11]、细胞凋亡^[12]及小管

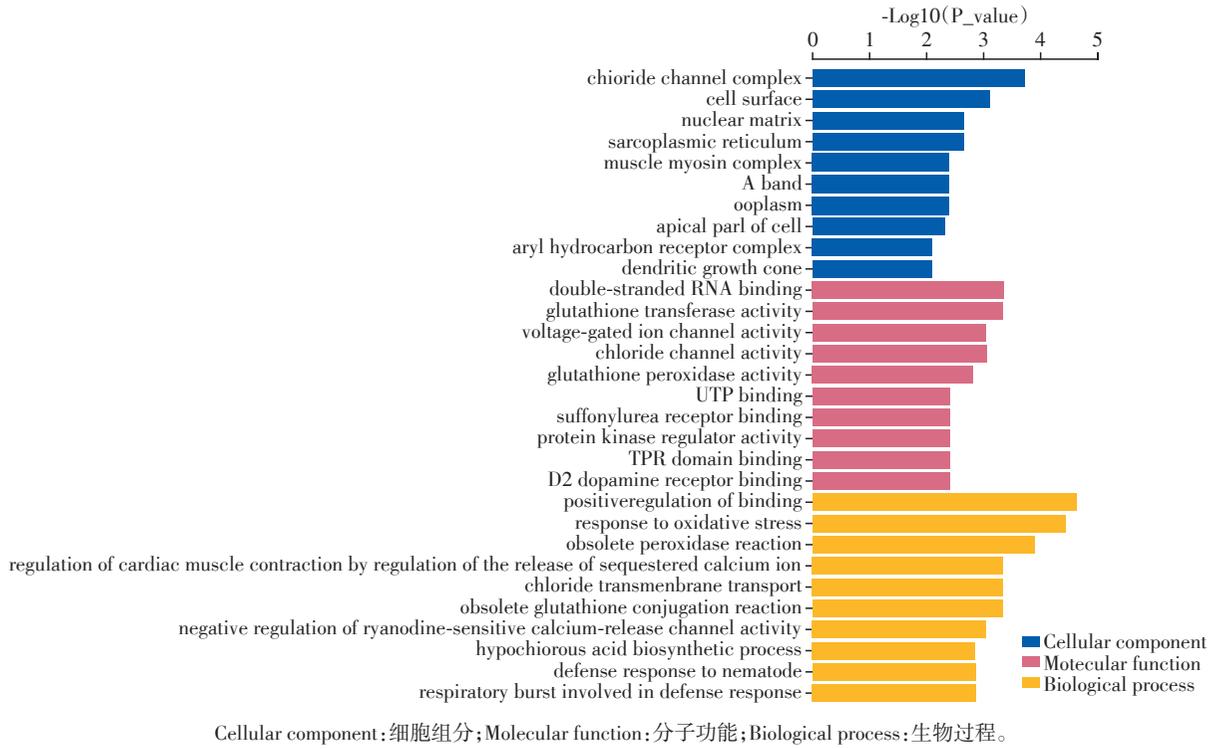
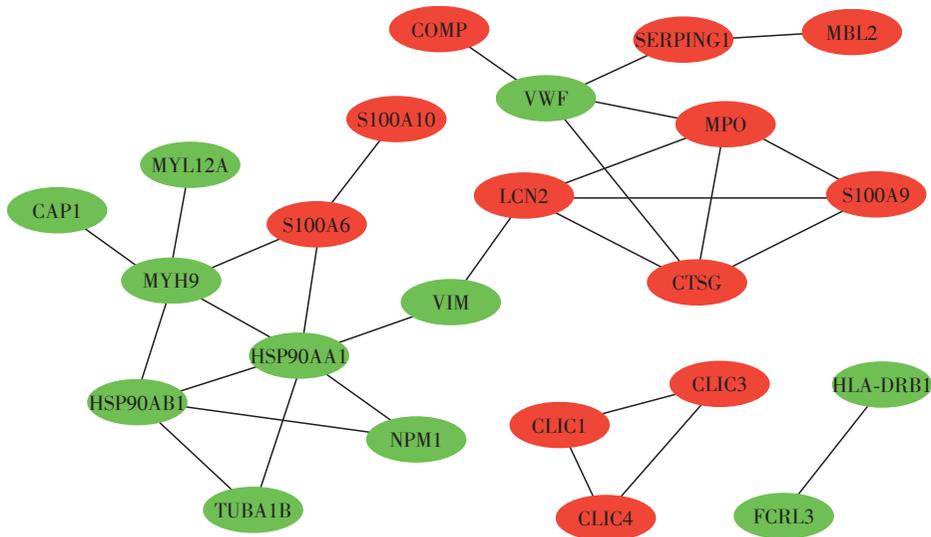


图2 GO功能富集分析

Figure 2 GO function enrichment analysis



红色圈内表示上调表达蛋白,绿色圈内表示下调表达蛋白。

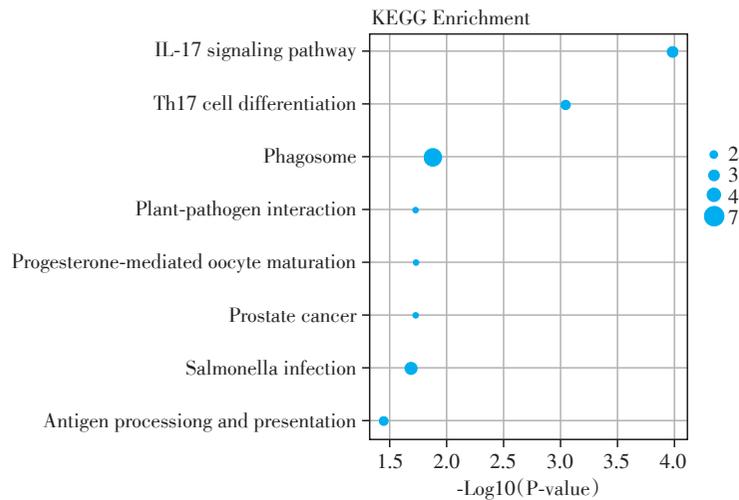
图3 蛋白互作网络分析

Figure 3 Protein interaction network analysis

生成^[13]等多种过程中发挥重要作用。研究表明, CLIC在线粒体损伤产生的活性氧诱导下能够迁移到细胞膜上,介导胞内氯离子外流,促进NLRP3炎症小体组装、Caspase-1激活和IL-1 β 分泌^[14]。此外,还有研究发现CLIC1^{-/-}小鼠的腹腔巨噬细胞表现出吞噬体酸化缺陷、蛋白水解能力受损和活性氧产生减少^[15]。本研究外泌体中携带的CLIC蛋白可能

参与了腹膜改变中的慢性炎症反应,并且因PD时间延长而表现为上调,通过调节CLIC活性可考虑作为开发抗炎药物的合适靶点。

嗜酸性粒细胞过氧化物酶(eosinophil peroxidase, EPX)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)是由炎症部位活化的免疫细胞所释放的含血红素的酶,除参与对病原微生物的氧化防御机制外,在



圆圈大小表示基因数目。

图4 KEGG 信号通路富集分析

Figure 4 KEGG pathway enrichment analysis

刺激成纤维细胞迁移、血管生成和促进细胞外基质合成中也发挥着重要作用^[16-17]。研究发现,由烟曲霉菌引起的肺曲霉病中,除中性粒细胞外,嗜酸性粒细胞缺乏会影响肺部对烟曲霉菌的防御。正常小鼠烟曲霉菌暴露后激发诱导CD11b⁺SinglecF⁺Ly-6G^{lo}Ly-6C^{neg}CCR3⁺嗜酸性粒细胞募集在肺部,伴随EPX mRNA水平的升高。转录因子dblGATA1缺乏的小鼠则显示嗜酸性粒细胞的选择性缺乏,表现烟曲霉菌清除受损和肺内病变^[18]。随着透析时间的延长,PD导管及透析液的长期刺激,机体免疫状态发生改变,本研究EPX在PDE外泌体中表达明显下降,可能与腹膜损伤加重有关。另有研究报道,结直肠癌干细胞信号活跃(Snail⁺IL8⁺)的大肠癌患者肿瘤中MPO⁺中性粒细胞浸润增加,提示中性粒细胞参与介导EMT和结直肠癌干细胞小生境,预示着患者生存不良^[19]。在PD患者PDE外泌体中MPO的升高可能与上皮-间质稳态失衡相关。针对异常早期嗜酸性粒细胞和中性粒细胞激活策略可能被开发用于对抗腹膜损伤。

非肌肉肌球蛋白重链II A(myosin-9, MYH9)属于肌球蛋白超家族,参与肌动蛋白纤维运动、骨架重组、细胞-细胞间黏附和蛋白转运等过程^[20]。研究发现,干扰MYH9可影响脂多糖刺激小胶质细胞释放外泌体。脂多糖可通过增加外泌体浓度,提高CD9和CD81蛋白阳性标记率和表达率,从而增强小胶质细胞的外泌体释放,将MYH9 siRNA转染后会降低释放的外泌体浓度和粒径^[21]。MYH9在长期PD患者PDE外泌体中表达异常,可能是介导外泌体

释放所需的潜在靶点。

热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)是一类三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)依赖的分子伴侣,促进蛋白质折叠,参与蛋白质稳态和肿瘤发展等过程^[22]。研究表明,转移性口腔癌来源的细胞外囊泡富集HSP90 α 、HSP90 β 和癌症起始细胞标志物CD326/EpCAM,显著促进了口腔癌细胞的迁移、侵袭和体外肿瘤起始,靶向这些分子的三重siRNA显著降低了分子伴侣的水平并减弱了EMT,逆转了细胞外囊泡驱动的恶性肿瘤事件^[23]。本研究发现,HSP90 α 、HSP90 β 在PD患者PDE外泌体中出现的差异性表达,可能与机体参与应激反应相关,是否能对腹膜改变进行判断和评估尚需要做进一步研究。

锌结合 α 2-糖蛋白(zinc-alpha-2-glycoprotein, AZGP1)是由脂肪细胞和上皮细胞合成的一种糖蛋白,在参与脂肪分解和能量消耗中有重要影响^[24]。研究发现,AZGP1在非结核分枝杆菌肺病的乳腺癌患者的血清外泌体中明显表达,可能通过调节免疫功能和触发脂解增强易感性,有利于对疾病的风险评估和监测^[25]。这一发现与本研究PDE外泌体中AZGP1表达上调趋势一致,其水平可能与脂质代谢相关,需进一步验证。

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, LCN2)是一种急性时相反应蛋白,属于lipocalin超家族,在急性肾损伤中可能提供了对感染的必要保护^[26]。既往研究报道,LCN2在炎症状态和肾小管上皮细胞损伤时

表达增加,被认为是预测肾小管损伤的新型生物标志物,与急性肾损伤、糖尿病肾病等多种肾脏疾病密切相关^[27-28]。本研究结果发现,LCN2蛋白在PD患者PDE外泌体中表达升高,长期PD引起过多炎症介质释放,造成腹膜间皮细胞损伤,进而影响腹膜功能,LCN2的升高可能与机体保护作用有关。

本研究在吞噬体通路富集的蛋白数目最多,吞噬过程作为重要的天然免疫防护机制,对维持机体稳态至关重要。从吞噬体产生,经过与溶酶体融合、酸化等一系列变化,最终降解抗原或杀死病原微生物的过程称为吞噬体成熟^[29]。该成熟过程涉及蛋白质组成的变化,蛋白质组学已经成为吞噬体成熟研究的重要工具^[30]。已有研究发现,在强直性脊柱炎病变髋关节的蛋白质组中,MPO被认为是参与吞噬体通路的关键蛋白,体外实验也进一步证实了上调的MPO可能通过吞噬体通路促进成纤维细胞的炎症反应^[31]。

通过比较不同透析龄患者PDE外泌体差异蛋白,发现与IL-17信号通路、Th17细胞分化通路、吞噬体通路等密切相关,Th17细胞介导的炎症反应,特别是细胞因子IL-17,已经被证明在腹膜损伤中起着关键作用^[32]。PDE外泌体中两个阶段差异蛋白的观察可能为PD相关腹膜损伤提供新的数据。PD是将腹膜透析液导入到患者腹腔中进行物质交换的人为操作技术,考虑其高渗、高糖和低pH等外源性因素刺激腹膜组织占主导作用,本研究共收集单中心一段时间内就诊的10例PD患者,年龄不匹配所出现的差异可能与初始腹透组患者整体年龄偏低,维持腹透组因腹透时间长而出现整体年龄偏高相关。本研究存在不足之处,包括样本量小,及其观察性和横断面性质,后续可通过扩大样本量来改进,使得年龄差异更小,并进一步探讨不同年龄段PDE中外泌体蛋白的差异和评估其用于临床监测的实用性。综上所述,本研究发现的差异蛋白可能作为PD患者腹膜损伤的候选标志物,也为揭示腹膜纤维化分子生物学机制提供线索。

[参考文献]

- [1] LI P K, CHOW K M, VANDE LUIJTGAARDEN M W, et al. Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(2): 90-103
- [2] YANG X, BAO M, FANG Y, et al. STAT3/HIF-1 α signaling activation mediates peritoneal fibrosis induced by high glucose[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 283
- [3] BORIACHEK K, ISLAM M N, MÖLLER A, et al. Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles[J]. *Small*, 2018, 14(6): 1702153
- [4] 孙振杰, 黄正千, 吴茂东, 等. 外泌体在中枢神经细胞间的信息交流作用及在神经退行性疾病中的功能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 293-297
- [5] PEARSON L J, KLAHARN I Y, THONGSAWANG B, et al. Multiple extracellular vesicle types in peritoneal dialysis effluent are prominent and contain known biomarkers[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e178601
- [6] CORCIULO S, NICOLETTI M C, MASTROFRANCESCO L, et al. AQP1-containing exosomes in peritoneal dialysis effluent as biomarker of dialysis efficiency [J]. *Cells*, 2019, 8(4): 330
- [7] TYANOVA S, TEMU T, COX J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(12): 2301-2319
- [8] 罗静初. UniProt 蛋白质数据库简介[J]. *生物信息学*, 2019, 17(3): 131-144
- [9] YANG Y, ZHENG N, ZHAO X, et al. Changes in whey proteome with lactation stage and parity in dairy cows using a label-free proteomics approach [J]. *Food Res Int*, 2020, 128: 108760
- [10] ZAVVOS V, BUXTON A T, EVANS C, et al. A prospective, proteomics study identified potential biomarkers of encapsulating peritoneal sclerosis in peritoneal effluent [J]. *Kidney Int*, 2017, 92(4): 988-1002
- [11] CIANCI F, VERDUCI I. Transmembrane chloride intracellular channel 1 (tmCLIC1) as a potential biomarker for personalized medicine[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(7): 635
- [12] WANG H, AN J, HE S, et al. Chloride intracellular channels as novel biomarkers for digestive system tumors [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 630
- [13] ARGENZIO E, MOOLENAAR W H. Emerging biological roles of Cl⁻ intracellular channel proteins [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(22): 4165-4174
- [14] TANG T, LANG X, XU C, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 202
- [15] JIANG L, SALAO K, LI H, et al. Intracellular chloride channel protein CLIC1 regulates macrophage function through modulation of phagosomal acidification [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 22): 5479-5488
- [16] DENICHILO M O, PANAGOPOULOS V, RAYNER T E, et al. Peroxidase enzymes regulate collagen extracellular matrix biosynthesis [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(5): 1372-1384
- [17] PANAGOPOULOS V, ZINONOS I, LEACH D A, et al. Uncovering a new role for peroxidase enzymes as drivers of

- angiogenesis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 68: 128-138
- [18] LILLY L M, SCOPEL M, NELSON M P, et al. Eosinophil deficiency compromises lung defense against aspergillus fumigatus[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(3): 1315-1325
- [19] HWANG W L, LAN H Y, CHENG W C, et al. Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 10
- [20] PECCI A, MA X, SAVOIA A, et al. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease[J]. *Gene*, 2018, 664: 152-167
- [21] LV Y, CHEN J, HU J, et al. Nonmuscle myosin heavy chain II A-mediated exosome release via regulation of the rho-associated kinase 1/myosin light chains/actin pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 598592
- [22] CHONG K Y, KANG M, GAROFALO F, et al. Inhibition of heat shock protein 90 suppresses TWIST1 transcription[J]. *Mol Pharmacol*, 2019, 96(2): 168-179
- [23] ONO K, SOGAWA C, KAWAI H, et al. Triple knockdown of CDC37, HSP90-alpha and HSP90-beta diminishes extracellular vesicles-driven malignancy events and macrophage M2 polarization in oral cancer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1769373
- [24] FAN G, LI Y, MA F, et al. Zinc- α 2-glycoprotein promotes skeletal muscle lipid metabolism in cold-stressed mice[J]. *Endocr J*, 2021, 68(1): 53-62
- [25] PHILLEY J V, KANNAN A, GRIFFITH D E, et al. Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 18070-18081
- [26] PARAGAS N, KULKARNI R, WERTH M, et al. α -intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2963-2976
- [27] XU K, SHANG N, LEVITMAN A, et al. Elevated neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with the severity of kidney injury and poor prognosis of patients with COVID-19[J]. *Kidney Int Rep*, 2021, 6(12): 2979-2992
- [28] NAJAFI L, KESHTKAR R S, PIRSAHEB S, et al. Assessment of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin(s-NGAL and u-NGAL) level as a predictive factor of disease progression in diabetic nephropathy in type 2 DM[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2021, 15(4): 270-278
- [29] PAUWELS A M, TROST M, BEYAERT R, et al. Patterns, receptors, and signals: regulation of phagosome maturation[J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(6): 407-422
- [30] 张称宗, 宗浩, 于仁涛, 等. 免疫细胞吞噬体成熟的蛋白质组学研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(8): 833-835
- [31] YU C, ZHAN X, LIANG T, et al. Mechanism of hip arthropathy in ankylosing spondylitis: abnormal myeloperoxidase and phagosome[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 572592
- [32] MARCHANT V, TEJERA-MUNOZ A, MARQUEZ-EXPOSITO L, et al. IL-17A as a potential therapeutic target for patients on peritoneal dialysis[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1361
- [收稿日期] 2022-02-27
(本文编辑:唐震)

(上接第 1132 页)

- gout[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 268
- [16] XING S C, MENG D M, CHEN Y, et al. Study on the diversity of bacteroides and clostridium in patients with primary gout[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 707-715
- [17] ZHOU X, JOHNSON J S, SPAKOWICZ D, et al. Longitudinal analysis of serum cytokine levels and gut microbial abundance links IL-17/IL-22 with clostridia and insulin sensitivity in humans[J]. *Diabetes*, 2020, 69(8): db190592
- [18] CANI P D, JORDAN B F. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(11): 671-682
- [19] VIEIRA A T, MACIA L, GALVAO I, et al. A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(6): 1646-1656
- [20] VIEIRA A T, GALVO I, MACIA L M, et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(1): 275-284
- [21] CLEOPHAS M, CRIŞAN T O, LEMMERS H, et al. Suppression of monosodium urate crystal-induced cytokine production by butyrate is mediated by the inhibition of class I histone deacetylases[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(3): 593-600
- [22] SHENG Y, ZHENG S, MA T, et al. Mulberry leaf alleviates streptozotocin-induced diabetic rats by attenuating NEFA signaling and modulating intestinal microflora[J]. *Rep*, 2017, 7(1): 12041
- [收稿日期] 2021-11-29
(本文编辑:唐震)