

文章编号: 1000-8020(2016)01-0008-06

·论著·

2型糖尿病人群血浆中 FCN3 水平的 蛋白质组学研究

尚庆刚 冯里茹 于微 徐健 刘小立¹ 王俊¹
深圳市慢性病防治中心 深圳 518020



摘要:目的 研究2型糖尿病患者血浆中纤维胶凝蛋白3(FCN3)表达趋势。方法 利用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳分离2型糖尿病和健康对照人群血浆中的蛋白质,并利用MALDI-TOF-TOF鉴定差异蛋白。使用Western Blot和酶联免疫反应对二维聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果进行验证。结果 补体C1s亚成分、补体C3、C9以及FCN3在糖尿病患者血浆中浓度升高。Western Blot结果表明,糖尿病患者血浆中补体C9和FCN3浓度普遍高于正常对照人群。ELISA数据显示糖尿病患者血浆FCN3浓度为 $(50.88 \pm 3.85) \mu\text{g/mL}$,健康对照人群为 $(36.20 \pm 2.75) \mu\text{g/mL}$,差异有统计学意义($P=0.0062$);糖尿病患者血浆中C9浓度为 $(26.22 \pm 1.43) \mu\text{g/mL}$,健康对照人群为 $(19.23 \pm 1.55) \mu\text{g/mL}$,差异有统计学意义($P=0.0022$)。结论 2型糖尿病患者血浆FCN3浓度升高,更大程度地激活了补体系统。

关键词: 纤维胶凝蛋白3 2型糖尿病 蛋白质组学
中图分类号: R587.2 文献标志码: A

Proteomics study on ficolin 3 in the human plasma of type 2 diabetics

SHANG Qinggang, FENG Liru, YU Wei, XU Jian, LIU Xiaoli, WANG Jun
Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China

Abstract: Objective To explore the expression trend of ficolin 3(FCN3) in type 2 diabetes (T2DM) plasma. **Methods** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE) was used to separate the plasma proteins from T2DM patients and healthy control subjects. MALDI-TOF-TOF was used to identify the differential proteins. Western Blot and enzyme-linked immune response (ELISA) were used to verify the results from 2DE. **Results** The experiment on 2DE showed complement C1s subcomponent, complement C3, C9 and FCN3 were up-regulated in the plasma of T2DM patients. The Western Blot results showed that C9 and FCN3 increased in the plasma of T2DM patients with respect to T2DM-free subjects. The experiment results on ELISA showed that the plasma concentration of FCN3 were (50.88 ± 3.85) and $(36.20 \pm 2.75) \mu\text{g/mL}$ ($P=0.0062$) in T2DM and T2DM-free, respectively. The plasma concentration of C9 were (26.22 ± 1.43) and $(19.23 \pm 1.55) \mu\text{g/mL}$ ($P=0.0022$) in T2DM and T2DM-free. FCN3 and C9 were up-regulated in T2DM plasma. **Conclusion** FCN3 over-expressed in the plasma of T2DM patients, which activated the complement system in greater degree.

Key words: ficolin 3, type 2 diabetes, proteomics

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81202207 81172668); 广东省医学科研基金(No. A2014649)

作者简介: 尚庆刚,男,硕士,主管医师,研究方向: 慢性病预防与控制, E-mail: mbzxshang@163.com

¹ 通信作者: 刘小立,主任医师,研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: liuxl36@126.com;

王俊,副主任技师,研究方向: 生物化学、分子营养学, E-mail: junwangwh@hotmail.com

糖尿病是一种常见的慢性代谢紊乱综合征,90%以上糖尿病属于2型糖尿病。2型糖尿病与生活习惯息息相关,糖尿病及其慢性并发症均可防可治。寻找糖尿病标志物,利用标志物尽早发现和诊断糖尿病,监测高危人群的发病趋势具有不容忽视的作用。

最近研究表明补体系统蛋白在糖尿病患者与健康人群中存在明显差异。补体系统是体内重要的效应系统和效应放大系统。补体激活存在3条途径:经典激活途径、旁路激活途径和甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin, MBL)激活途径。凝集素途径作为机体第一线天然免疫防御系统,具有极其重要的生物学意义。

纤维胶凝蛋白(ficolin, FCN)可以直接识别N-乙酰葡糖胺,继而激活甘露糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶,启动凝集素途径。目前在人体中已经发现3种纤维胶凝蛋白,FCN1、FCN2和FCN3。FCN3启动凝集素途径的能力比FCN1、FCN2和MBL更强^[1]。FCN3不仅可以激活补体凝集素途径,而且还参与调理吞噬,介导细胞凋亡。

研究表明血浆FCN3含量与胰岛素抵抗相关,但其机制目前尚不明确。本文基于蛋白质组学策略,研究糖尿病患者血浆中FCN3表达趋势,为进一步研究其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高速冷冻离心机(Centrifuge 5415R, Eppendorf, 德国),超纯水系统(Milli-Q Element A10, Millipore, 美国),等电聚焦仪(PROTEAN@i12TM IEF cell, Bio-rad, 美国),垂直电泳系统(PROTEAN@II cell, Bio-rad, 美国),光密度扫描仪(GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-rad, 美国)。MALDI-TOF-TOF(Bruker Daltonics, 德国),ChemiDoc™MP System(Bio-Rad, 美国)。

Tris、SDS、30%丙烯酰胺、尿素、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(Chaps)、二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAA)、矿物油、pH4~7线性IPG胶条、pH4~6两性电解质、pH5~7两性电解质、甘氨酸、考马斯亮蓝G250均购自Bio-Rad公司;三氯乙酸(TCA)、甘油、低熔点琼脂糖购自Sigma公司;丙酮、乙醇、甲醇、乙酸购自Merk公司。质谱级胰蛋白酶购自progeMa。Anti-FCN3 antibody购自R&D, anti-C9 antibody(多克隆抗体)购自ABCam;二抗(GOAT X MOUSE-

HRP和GOAT X Rabbit-HRP)购自Bio-Rad; FCN3、C9的ELISA试剂盒购自USCN Life Science & Technology Company(中国武汉)。

1.2 双向电泳和MALDI-TOF-TOF质谱鉴定

1.2.1 样本 来源于2009—2011年中国居民营养与健康状况监测项目(深圳地区)样本库,根据调查问卷、体检及生化指标,抽取糖尿病样本2例,健康对照样本2例,实验前向受试者介绍实验目的,并与其签署知情同意书。

1.2.2 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳 混合血浆经改良后的三氯乙酸/丙酮法^[2]去除高丰度蛋白,然后经17 cm IPG胶条分离,IPG胶条经平衡后转移至17 cm垂直凝胶进行第二维分离,凝胶经考马斯亮蓝胶体染色后,光密度扫描仪扫描凝胶,利用PD Quest 8.0软件进行分析。

1.2.3 胶内酶切 超纯水清洗电泳胶粒3次;25 mmol/L NH₄HCO₃乙腈溶液脱色胶粒,纯乙腈干燥胶粒,加入20 μg/mL胰蛋白酶5 μL,4℃放置30 min,再加入5 μL的40 mmol/L NH₄HCO₃,37℃水浴10 h;离心后取上清的酶解母液至PCR管待测。

1.2.4 MALDI-TOF-TOF鉴定差异蛋白 采用MALDI-TOF-TOF系统对电泳分离后的胶内酶切产物进行质谱检测,蛋白酶解液与基质(0.4 mg/mL CHCA溶于30%乙腈/0.06%三氟乙酸)混合后点板,内标按照说明的量点板,待内标与多肽/基质混合液体结晶后,将靶板安装入MALDI-TOF-TOF系统进行检测。利用355 nm氮分子激光器的20%~50%功率采集MS数据,根据S/N(设置为15)采集MS/MS数据,Peak lists在FlexAnalysisv3.5中产生,传至Bio Tools进行数据检索。

1.2.5 数据检索 利用Mascot进行数据检索,参数设置:物种Homo sapiens;消化酶Trypsin;漏切位点1;固定修饰Carbamidomethyl(C);可变修饰Oxidation(M);母离子质量精确度±100 ppm;子离子质量精度±0.3 Da;离子类型[M+H]⁺。蛋白得分>35被认为差异具有统计学意义(P<0.05)。

1.3 Western Blot验证

1.3.1 样本 来源于2009—2011年中国居民营养与健康状况监测项目(深圳地区)样本库,根据调查问卷、体检及生化指标,抽取糖尿病样本9例,健康对照样本9例(包括双向电泳的健康对照和糖尿病血浆样品),实验前向受试者介绍实验目的,并与其签署知情同意书。

1.3.2 Western Blot 未经去除高丰度蛋白混合血浆进行 SDS-PAGE 分离,然后被转膜至 0.22 μm PVDF 膜,anti-C9 antibody, anti-FCN3 antibody 和二抗分别按照 1:500, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1:3000 使用。ChemiDoc™ MP System 拍下条带的光密度,利用 Image Lab 4.1 估算条带强度。

1.4 酶联免疫反应验证测定血浆中 C9 和 FCN3 浓度

1.4.1 样本 来源于 2009—2011 年中国居民营养与健康状况监测项目(深圳地区)样本库,按照对照与病例比例介于 1:1 和 1:4 之间的要求,根据调查问卷、体检及生化指标,选择年龄 45~60 岁样本。

糖尿病组病例符合以下两个条件之一:(1)已经确诊糖尿病;(2)空腹血糖 $> 11.1 \text{ mmol}/\text{L}$ 。根据以上条件分别选取 50 例 T2DM 和 30 例健康对照测定其血浆中 C9 浓度;97 例 2 型糖尿病和 62 例健康对照测定其血浆 FCN3 浓度。最终在 97 例 2 型糖尿病患者和 62 例健康对照血浆样本

中测得 FCN3 的浓度有效数据,在 49 例 T2DM 和 29 例对照血浆样品中测得 C9 浓度有效数据(包括双向电泳的健康对照和糖尿病血浆样品)。实验前向受试者介绍实验目的,并与其签署知情同意书。

1.4.2 ELISA 测定血浆中 FCN3 和 C9 浓度 根据制造商说明书进行操作测定血浆中 FCN3 和 C9 浓度,FCN3 和 C9 的 ELISA 试剂盒检测限分别为 0.133 和 0.22 ng/mL 。

2 结果

2.1 2DE 及差异点 MALDI-TOF-TOF 鉴定

由图 1 可见,所圈区域蛋白在糖尿病血浆样本中强度均为健康对照样本 4 倍以上,挖取这些差异蛋白点,经胰蛋白酶酶切处理,所得肽段经 MALDI-TOF-TOF 鉴定分析,这些蛋白分别是 FCN3,补体 C1s 亚成分,补体 C3 和补体 C9。差异蛋白详细鉴定信息见表 1。

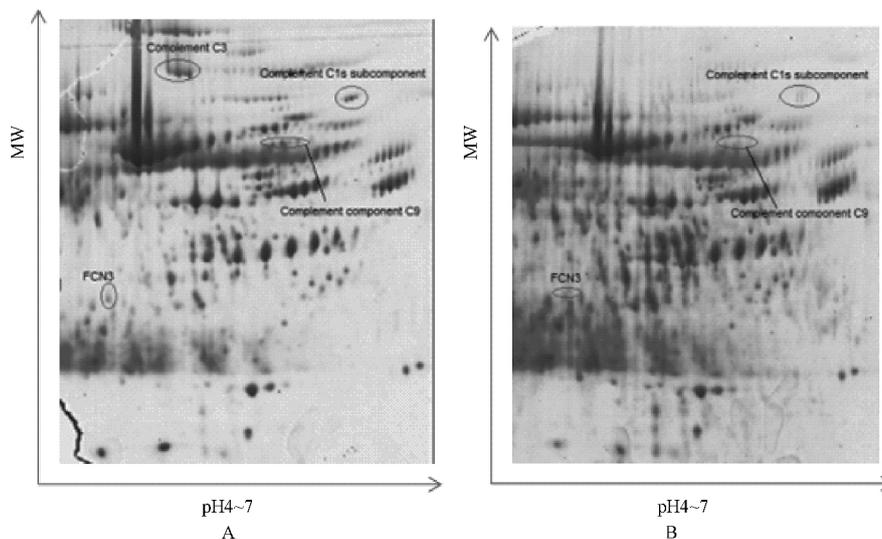


图 1 糖尿病患者(A)及健康对照(B)血浆 2DE 以及差异蛋白点

Figure 1 2DE of plasma from T2DM(A) and T2DM-free subjects(B) and the different proteins

图 2~图 5 为差异蛋白 FCN3 的 4 个被成功鉴定出肽段的 MS/MS 图。质谱图中对应 b、y 等离子的数据分析表明从质谱图到肽段数据分析的可靠。将检索所得肽段进行 NCBI Blast,综合 4 个肽段检索结果, Mascot 检索结果的可靠性被进一步验证。

2.2 Western Blot 验证差异蛋白血浆中含量趋势

由图 6 可见,以 α -tubulin 为内参,相对于正常对照,糖尿病患者血浆中 C9 和 FCN3 浓度普遍偏高。

2.3 ELISA 进一步验证 2DE 数据的可靠性

由表 2 可见,糖尿病患者血浆中 C9 和 FCN3

浓度差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究中双向电泳实验数据表明,相对于健康对照,糖尿病患者血浆中 FCN3 浓度上调,该数据通过 Western Blot 和 ELISA 数据进一步被验证。本研究数据与 LI 等^[3]的研究结果一致。LI 等^[3]用经一维 SDS-PAGE 及 shot-gun 方法比较 2 型糖尿病患者混合血清和糖耐量正常人的混合血清,结果显示糖尿病患者血清中 FCN3 浓度较健康对照更高。ZHENG 等^[4]研究显示在糖尿病视网膜病变的玻璃体液体和血清中 FCN3 浓度上

表 1 被成功鉴定差异蛋白信息
Table 1 The information of differential proteins identified successfully

蛋白	分子量 /Da	等电点	匹配肽段数目	蛋白得分	匹配肽段氨基酸	
					序列	起止位置
FCN3	33395	6. 20	4	98	RQDGSVDFFR	136 ~ 145
					TFAHYATFR	191 ~ 199
					FSEGTAGDSLHLHSGR	214 ~ 229
					YGIDWASGR	277 ~ 285
C9	64615	5. 43	2	154	TEHYEEQIEAFK	214 ~ 225
					AIEDYINEFSVR	497 ~ 508
C3	188569	6. 02	7	410	VFLDCCNYITELR	723 ~ 735
					SNLDEDIAEENIVSR	749 ~ 764
					AAVYHHFISDGVR	914 ~ 926
					GYTQQLAFR	1052 ~ 1060
					DFDFVPPVVR	1245 ~ 1254
					IHWESASLLR	1311 ~ 1320
					VYAYYNLEESCTR	1479 ~ 1491
C1s	78174	4. 86	5	405	SSNNPHSPIVEEFQVPYNK	87 ~ 105
					GFQVVVTLR	211 ~ 219
					SNALDIIFQDTLTGQK	265 ~ 280
					DVVQITCLDGFVEVVEGR	315 ~ 331
					TNFDNDIALVR	524 ~ 534

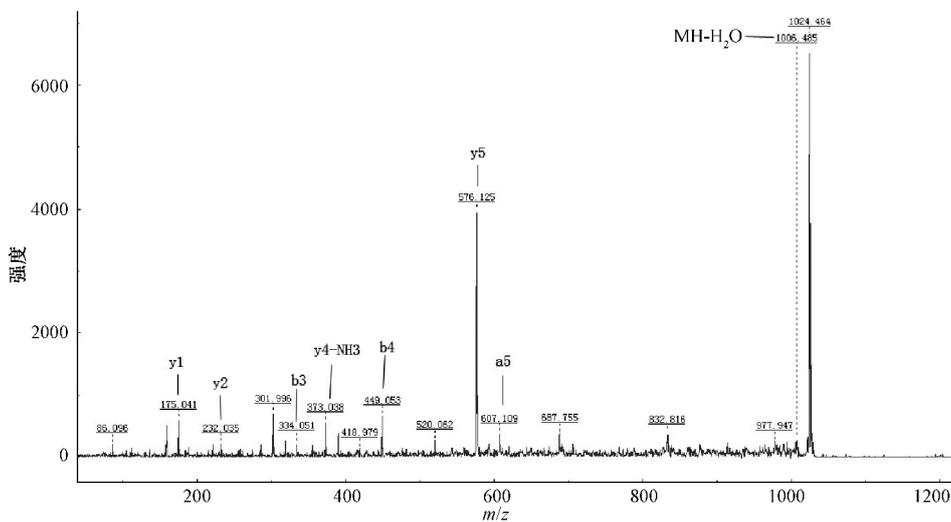


图 2 FCN3 m/z 1024. 4606 多肽(肽段 YGIDWASGR) 串联质谱图

Figure 2 The MS/MS spectrum for peptides of FCN3 m/z 1024. 4606(YGIDWASGR)

表 2 ELISA 验证 T2DM 患者血浆中 FCN3 和 C9 浓度变化

Table 2 Altered level of T2DM plasma FCN3 and C9 by ELISA validation(n =9 $\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g/mL}$

组别	C9	FCN3
对照组	19. 23 \pm 1. 55	36. 20 \pm 2. 75
T2DM 组	26. 22 \pm 1. 43	50. 88 \pm 3. 85
t	3. 164	2. 773
P	0. 0022	0. 0062

调。而 CHEN 等^[5]的最新研究却与这些结果相冲突,与糖耐量正常人群比较,葡萄糖调节受损人群血清 FCN3 浓度明显下调,经过 3 年后跟踪调

查,发现发展为 2 型糖尿病的人群的血清 FCN3 基本水平明显低于没有发展为糖尿病人群。文献中出现 FCN3 在糖尿病患者血清/血浆变化趋势中不一致的情况,有可能是糖尿病的各种并发症,如视网膜病变、肾病、糖尿病血管病变等,对血浆 FCN3 的浓度产生重要影响所致。

研究表明 FCN3 和胰岛素抵抗之间存在联系^[5]。FCN3 与胰岛素抵抗之间的作用机制目前有几种不同的可能性,一种是根据 FCN3 与 MBL 结构和功能的相似性猜测,FCN3 是通过与 MBL 一样的途径与胰岛素抵抗相关。另一种猜测是基

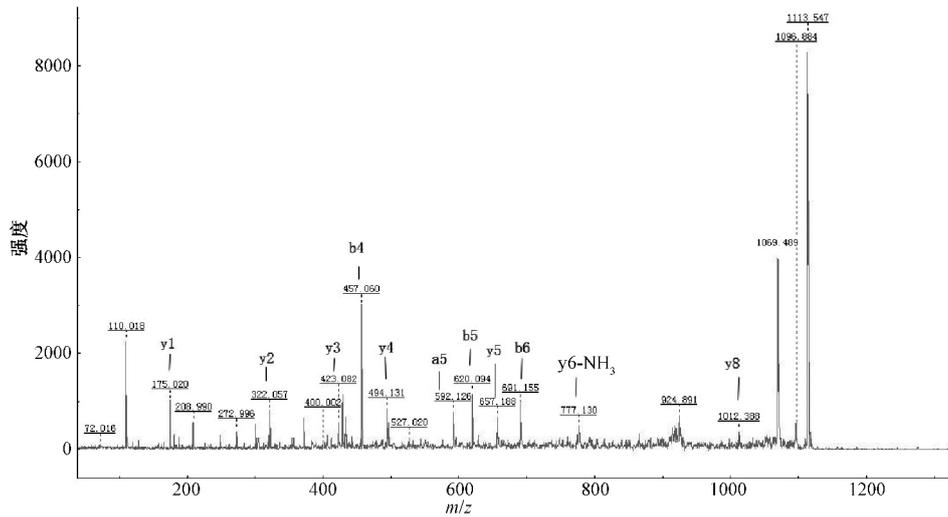


图3 FCN3 m/z 1113.5444 多肽(肽段 TFAHYATFR) 串联质谱图

Figure 3 The MS/MS spectrum for peptides of FCN3 m/z 1113.5444(TFAHYATFR)

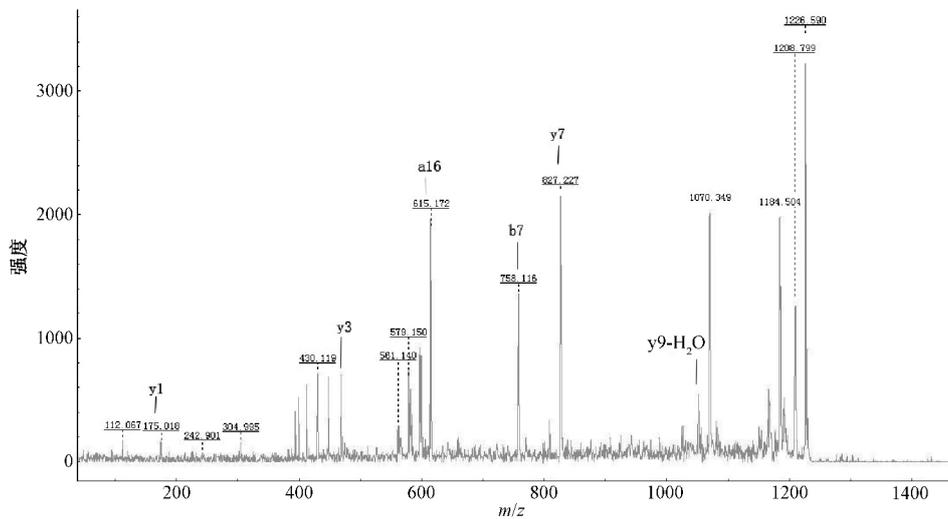


图4 FCN3 m/z 1226.5886 多肽(肽段 RQDGSVDFFR) 串联质谱图

Figure 4 The MS/MS spectrum for peptides of FCN3 m/z 1226.5886(RQDGSVDFFR)

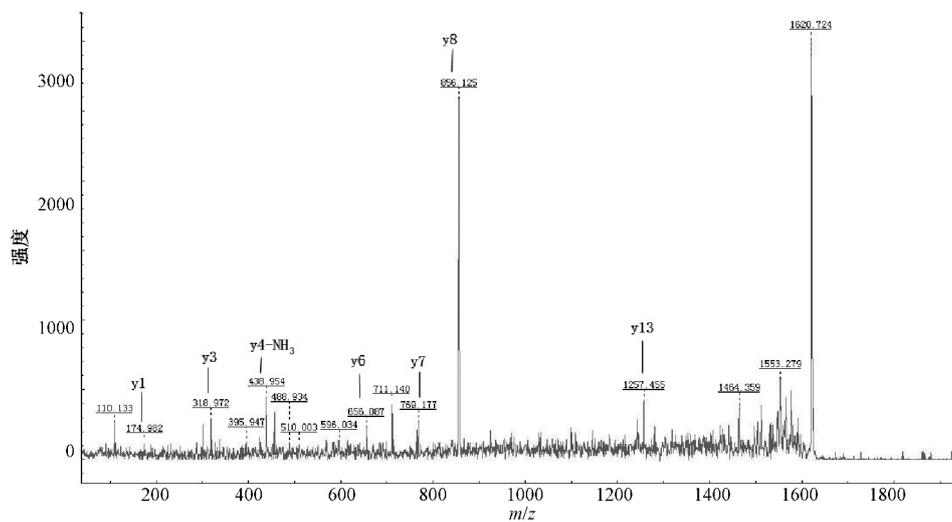


图5 FCN3 m/z 1620.7264 多肽(肽段 FSEGTAGDSLHSGR) 串联质谱图

Figure 5 The MS/MS spectrum for peptides of FCN3 m/z 1620.7264(FSEGTAGDSLHSGR)

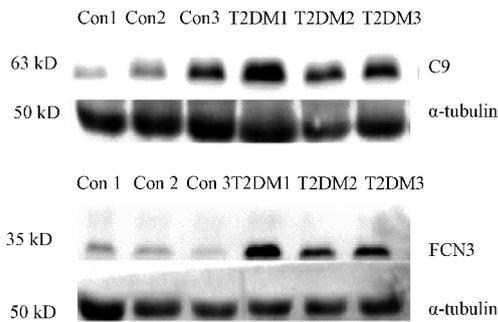


图 6 Western Blot 验证

Figure 6 Western Blot validation

于 FCN3 与膜结合的模型识别受体 Toll 样受体都可结合细胞表面糖分子, Toll 样受体通过激活先天免疫反应和后来的炎症途径, 结合自由脂肪酸与胰岛素抵抗相关^[6-7] 猜测 FCN3 是通过这一途径与胰岛素关联起来。

本研究 2DE 结果显示补体系统蛋白补体 C1s 亚成分、补体成分 C3 以及补体成分 C9 在糖尿病患者中均呈上调状态。经进一步的扩大样本 Western Blot 与 ELISA 验证表明, 糖尿病患者血浆中 C9 浓度较正常人群更高。补体的经典激活途径中, 一旦补体 C1s 形成, 即完成识别阶段进入活化阶段。研究表明补体 C3 和胰岛素抵抗之间存在较强的相关性^[8]。补体 C9 参与形成最终膜攻击复合物。这表明相较于健康对照, 在糖尿病患者体内, 补体系统被更大程度激活。糖尿病患者血浆中 C9 含量升高表明补体系统被更大程度的激活。

血浆 C9 含量上调, 补体系统被更大程度激活, 而 FCN3 可通过凝集素途径激活补体系统, 补体系统更大程度地被激活可能由于糖尿病患者血浆中 FCN3 含量上调所致。

本文研究表明, 血浆中 FCN3 的水平在糖尿病患者明显高于健康对照, 糖尿病患者的补体系统被更大程度的激活, 其相关机制有待进一步研

究。不足之处在于研究群体样本有限, 未对研究群体进行进一步详细的分类。

参考文献

- [1] 陈颢, 陈海冰. 纤维蛋白胶凝素-3 研究进展 [J]. 中国临床保健杂志, 2011, 14(2): 213-216.
- [2] 王俊, 冯里茹, 于微, 等. 改良 TCA/丙酮沉淀法去除肥胖人群血浆中的高丰度蛋白质 [J]. 卫生研究, 2013, 43(5): 741-747.
- [3] LI Rongxia, CHEN Haibing, TU Kang, et al. Localized-statistical quantification of human serum proteome associated with type 2 diabetes [J]. Plos One, 2008, 3(9): e3224. doi: 10.1371.
- [4] ZHENG Bingqing, LI Tao, CHEN Haibing, et al. Correlation between ficolin-3 and vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. Am J Ophthalmol, 2011, 152(6): 1039-1043.
- [5] CHEN Haibing, LU Junxi, CHEN Xie, et al. Low serum levels of the innate immune component ficolin-3 is associated with insulin resistance and predicts the development of type 2 diabetes [J]. J Mol Cell Biol, 2012, 4: 256-257.
- [6] RAETZSCH C F, BROOKS N L, ALDERMAN J M, et al. Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway [J]. Hepatology, 2009, 50: 592-600.
- [7] SMITH N J, VARLEY C L, EARDLEY I, et al. Toll-like receptor responses of normal human urothelial cells to bacterial flagellin and lipopolysaccharide. [J]. Urol, 2011, 186: 1084-1092.
- [8] MUSCARI A, MASSARELLI G, BASTAGLI L, et al. Relationship of C3 to fasting insulin, risk factor, and previous ischaemic events in middle-aged men [J]. Eur Heart J, 2000, 21: 1081-1090.

收稿日期: 2015-03-18

参考文献撰写要求

参考文献中, 只列作者亲自阅读的公开发表的文献, 未公开发表的(如内部资料、待发表等)不得列入, 应尽量精选。按 GB/T7714—2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码方法, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出。著录项目包括: 主要责任者(专著作者, 论文集主编, 学位申报人, 专利申请人, 报告撰写人, 期刊文章作者, 析出文章作者), 文献题名, 文献载体类型标识, 版本(初版省略), 出版地, 出版者, 出版年, 文献起止页码。文中引用文献若写原著者, 序号置于方括号中放在著者姓名的右上角; 如未写出著者姓名, 序号放在引文之后。文献著者等于或少于 3 位者全部列出, 多于 3 位者只标注前 3 位作者, 后加“等。”或者其他与之相应的字(西文加“et al.”, 日文加“他.”)。外文期刊名称用缩写, 以《Index Medicus》中的格式为准。中文期刊用全称。标引格式及标点符号如下: 期刊: 序号 作者姓名. 文题名 [文献类型标识]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页。书籍: 序号 作者姓名. 书名 [文献类型标识]. 其他责任者(译者). 版次. 出版地: 出版社, 出版年: 起页-止页。

《卫生研究》编辑部