

血清差异蛋白补体 C3f 和脱精氨酸-C3f 的研究现状*

刘 伟¹综述,王世鑫^{2△}审校

(1. 天津市第二人民医院检验科/天津市肝病研究所 300192; 2. 天津市西青区西青医院 300380)

关键词:补体系统; C3f; 脱精氨酸-C3f**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.028**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2016)13-1820-03

补体系统是广泛存在于血清、组织液和细膜表面的一组精密调控蛋白,是一个复杂的先天免疫监视系统,是人体免疫防御的第一道防线,在抵御病原体和保持宿主体内平衡中发挥关键作用。补体系统主要由 30 多种可溶性蛋白和膜结合蛋白组成,这些蛋白目前被分为三类,包括补体固有成分、多种调节因子和补体受体。在这些成分中,补体固有成分的第三组分(C3)是机体补体系统浓度最高的成分,主要由 α 和 β 两条肽链经二硫键连接而成。在补体激活过程中,3 条补体激活途径(包括经典途径、旁路途径和凝集素途径)都需要通过活化的 C3 形成 C5 活化酶而进一步发挥级联放大作用^[1-3]。C3f 是在 C3b 失活过程中,从 C3b 片段上剪切下来的一个 17 肽^[4]。脱精氨酸-C3f(DRC3f)是 C3f 在羧基肽酶-N 作用下脱精氨酸形成的一个 16 肽。随着蛋白质组学技术的发展,特别是液体芯片飞行时间质谱技术的出现,发现 C3f 和 DRC3f 在多种疾病的发病机制、发现疾病早期诊断标志物和药物作用靶点等领域具有一定的研究价值^[5-7]。因此,本文就补体 C3f 和 DRC3f 的结构和功能研究现状综述如下,以期对进一步研究提供参考。

1 研究背景

蛋白质组学是以研究细胞、组织甚至有机体所表达的全部蛋白质的结构与功能为目的的学科,它是继基因组学发展后的一个新兴的研究领域。蛋白质组学技术随着蛋白质组学的发展应运而生,它主要包括蛋白质分离技术和蛋白质鉴定技术。

蛋白分离技术就是将目的蛋白从实验标本的大量蛋白中分离出来的技术,主要分为基于凝胶分离技术和非凝胶分离技术。双向凝胶电泳分离技术(2-DE)是基于凝胶分离技术的经典方法,被广泛应用;而非凝胶分离技术的代表技术就是液相色谱技术。质谱技术是蛋白质鉴定的核心技术,它可以分为一级质谱技术和二级质谱技术。一级质谱技术的基本原理是样品经不同方式的离子源离子化后,根据不同离子间质荷比的差别来确定分子质量以待进一步鉴定,其代表技术为基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)。在此技术中,目的蛋白的鉴定结果是蛋白质荷比,并不能确定其身份,但可用于建立诊断决策树和神经网络模型等数模方式。二级质谱技术是对一级质谱技术鉴定出的目的蛋白进行再次离子化的技术,它可以鉴定出蛋白的氨基酸序列,以便后续功能研究^[8]。

液体芯片飞行时间质谱技术是一种将蛋白质分离技术和鉴定技术结合起来的新兴技术,它主要基于磁珠分选与 MAL-

DI-TOF-MS 联合应用,然后通过二级质谱鉴定出蛋白的氨基酸序列而确定蛋白身份。由表面经化学或生物处理的磁珠、磁珠分选仪器及质谱检测系统三部分构成。血清、尿液、细胞抽提物等标本无需特殊处理,可直接与磁珠结合进行分选,保存了较好的蛋白完整性。由于此技术对小分子蛋白检出率高,是一种上样量小、高通量、低耗材的自动化技术,而且重复性好、具有较高的灵敏度和特异性^[9-10],目前已经成为蛋白质组学研究的核心技术。许多不同研究方向的科研工作者,应用液体芯片飞行时间质谱技术对多种疾病进行蛋白质组学研究,均发现差异蛋白 C3f 或 DRC3f,说明它们在疾病的发生发展中普遍参与,因此,具有相当的研究价值。

2 C3f 和 DRC3f 的结构和质谱特性

C3f 是 C3b 在失活过程中,从 C3b 片段上剪切下来的一个 17 肽,其相对分子质量约为 2 021,经二级质谱鉴定其氨基酸序列为 NH₂-Ser-Ser-Lys-Ile-Thr-His-Arg-Ile-His-Trp-Glu-Ser-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-COOH。

DRC3f 是 C3f 在羧基肽酶-N 作用下脱去精氨酸,迅速生成的 16 肽,其相对分子质量约为 1 866,经二级质谱鉴定其氨基酸序列为 NH₂-Ser-Ser-Lys-Ile-Thr-His-Arg-Ile-His-Trp-Glu-Ser-Ala-Ser-Leu-Leu-COOH。

3 C3f 功能的研究现状

3.1 矽肺 本课题组应用 Dynabeads RPC18 磁珠与 MALDI-TOF-MS 联合检测技术,对 30 例非矽尘暴露健康体检者、30 例矽尘暴露患者(0 期)、30 例可疑矽肺患者(0+期)及 25 例 I 期矽肺患者的血清进行检测,共得到 5 个差异峰,其中相对分子质量 5 081 和 5 066 处为表达上调的肽段,2 021、3 954、1 777 处为表达下调的峰。选取比较有意义的 2 021 和 1 777 的肽段进行二级质谱鉴定其氨基酸序列,结果两个肽段身份同为补体 C3 的一个片段-C3f。后续用人工合成的 C3f 体外培养人胚肺成纤维细胞(MRC-5),发现 C3f 均可以抑制 MRC-5 细胞内及细胞外 TGF- β 1 和 I、III 型胶原的表达,从而推断在矽肺中 C3f 是通过抑制 TGF- β 1 这一途径来抑制 I、III 型胶原的表达的^[11-13]。

3.2 系统性硬化症 Xiang 等^[7]应用疏水相互作用层析 18 磁珠与 MALDI-TOF-MS 联合检测,对 40 例硬皮病患者、30 例系统性红斑狼疮患者、21 例类风湿性关节炎患者、30 例骨关节炎患者和 26 名健康献血者血清标本进行了检测。研究发现,有一组相对分子质量为 1 865、1 778、1 691、1 563、1 450 的

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30771788);天津市卫生局科技基金项目(06KG10);天津市应用基础研究计划面上项目(06YFJMJC09900)。

△ 通讯作者, E-mail: wshx-001@163.com。

短肽在硬皮病中显著表达。经二级质谱鉴定其氨基酸序列,发现这组蛋白是从补体 C3b 衍生出来的,属于 DRC3f 家族。其中 DRC3f(相对分子质量 1 865)与硬皮病中血管受累程度及疾病的活动度皆有关联。然后,他们用人工合成的 DRC3f 和 C3f,以及含 DRC3f 的滤过血清分别刺激微血管内皮细胞和皮肤成纤维细胞,发现 DRC3f 和 C3f 可以刺激微血管内皮细胞的增殖而对成纤维细胞的增殖没有刺激作用。同时,他们还检测出 DRC3f 和 C3f 的刺激均能使血管内皮细胞表达 TGF- β 1 的量增加。之后,他们又证实 DRC3f 和 C3f 能够提高皮肤成纤维细胞 TGF- β 1 生成量,且呈剂量依赖性^[14]。由此推断,在硬皮病发病过程中,DRC3f 和 C3f 可能对皮肤胶原纤维过度沉积起着促进作用。

3.3 肝病 王剑^[15]应用 WCX 磁珠与 MALDI-TOF-MS 联合技术,检测 14 例急性乙肝(AHB)、76 例慢性乙肝(CHB)、41 例肝硬化(LC)和 14 例原发性肝细胞癌(HCC)患者血清标本,发现相对分子质量为 1 866 的肽段在轻、中度 CHB 患者血清中浓度较高,而在重度 CHB 患者血清中浓度较低,表达差异显著,然后对其进行二级质谱鉴定身份为 DRC3f。之后,他们用新鲜和超滤过的含有 DRC3f 的轻、中度 CHB 患者血清以及人工合成的 DRC3f 和 C3f 刺激正常人肝细胞(QSG-7701),发现它们都对肝细胞的增殖有促进作用,同时还发现 DRC3f 可以降低肝细胞中 TGF- β 1 及 I 型胶原的表达。因此,他们推断 DRC3f 可能是重度肝炎的生物标志物,并且可能参与了 CHB 感染及其病情进展的某种机制^[16]。他们还以小鼠为研究对象,发现 500 μ g/kg 地塞米松和 800 μ g/kg DRC3f 在预防刀豆 A 引起的急性肝损伤中起到的作用是相当的,由此推断 DRC3f 对急性肝损伤有保护作用^[17]。此外,他们还证实,外源性 DRC3f 可通过 TGF- β 1 通路抑制肝星状细胞中 I、III 型胶原、 α -SMA 等蛋白的表达^[18]。

Xin 等^[19]应用 C18 反相色谱柱与 MALDI-TOF-MS 联合技术,对青岛 63 例诊断为非酒精性脂肪肝(NAFLD)的患者及其正常的双胞胎同胞的血清进行检测,发现差异蛋白 C3f 和纤维蛋白肽 A。然后他们用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测 NAFLD 患者血清和健康人血清各 50 例,发现 C3f 和纤维蛋白肽 A 在两组间存在显著差异,并得出结论 C3f 和纤维蛋白肽 A 可能是 NAFLD 的潜在诊断标志物。

3.4 其他疾病 沈芳芳等^[20]利用 WCX 磁珠的液体芯片飞行时间质谱,在糖尿病肾病维持性透析患者透析前、后的血清中也发现差异蛋白 C3f,其在透析前血清中显著高于透析后血清及透析废液。

朱德祥等^[21]应用免疫金属亲和和铜离子磁珠的液体芯片飞行时间质谱,在结肠直肠癌患者血清中也找到了差异蛋白 C3f,其在肠癌患者血清中较正常对照组表达是下调的。

Wang 等^[6]利用 2-DE 的液体芯片飞行时间质谱,检测强肌健力方(QJF)治疗前后的重症肌无力(MG)患者血清,发现差异蛋白补体 C3f 在治疗后表达上调。

4 结束语

补体 C3 是人体内补体系统中浓度最高的分子,也是补体系统的关键分子,3 条补体激活途径都需要通过活化的 C3 形成 C5 活化酶而进一步发挥级联放大作用。C3 活化后形成的 C3b 即为 C5 活化酶的组成部分,其可在 CR1 或 H 因子的帮助下,由 H 因子分解为 iC3b 和 17 肽 C3f^[4]。有研究表明在

C3b 失活过程中,前两步的剪切(也就是 C3f 和 C3dg 被剪切出来的过程)可能对 C3b 的失活具有重要意义^[22],但具体机制尚不清楚。目前,C3f 或 DRC3f 参与补体激活的具体过程和免疫机制也有待发现。因此,期待相关科研工作者给予进一步研究和成果汇报。

参考文献

- [1] Nicolas SM, Sarah EC, Veronique F, et al. Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation[J]. Front Immunol, 2015, 6(262): 1-30.
- [2] Nicolas SM, Remi N, Lise H, et al. Complement system part II: role in immunity[J]. Front Immunol, 2015, 6(257): 1-26.
- [3] 咎琦,刘欣,逢越,等. 补体 C3 结构与功能研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(4): 549-553.
- [4] Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity[J]. Immunol Rev, 2001, 180(23): 35-48.
- [5] An Y, Bekesova S, Edwards N, et al. Peptides in low molecular weight fraction of serum associated with hepatocellular carcinoma[J]. Dis Markers, 2010, 29(12): 11-20.
- [6] Wang C, Lu Y, Chen Z, et al. Serum proteomic, peptidomic and metabolomic profiles in myasthenia gravis patients during treatment with Qiangji Jianli Fang[J]. Chin Med, 2012, 16(7): 1-8.
- [7] Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, et al. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis (SSc): complement C3f-des-arginine (DRC3f), detected dominantly in SSc, enhances proliferation of vascular endothelial cells[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(6): 2018-2030.
- [8] 刘伟,魏茂提,王世鑫,等. 蛋白质组学技术在寻找矽肺早期血清标志物中的应用[J]. 中国职业医学, 2009, 36(4): 1-3.
- [9] Zhang X, Leung SM, Morris CR, et al. Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma[J]. J Biomol Tech, 2004, 15(3): 167-175.
- [10] Baumann S, Ceglarek U, Fiedler GM, et al. Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2005, 51(6): 973-980.
- [11] 刘伟,马庆波,李哲,等. 液体芯片飞行质谱技术与人工神经网络模型在矽尘接触人群诊断中的应用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28(4): 291-293.
- [12] 刘伟. 矽尘暴露人群血清生物标志物的筛选及其相关功能的初步研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2010.
- [13] 刘伟,马庆波,陈娟娟,等. 补体片段 C3f 对人胚肺成纤维细胞合成 I、III 型胶原及转化生长因子- β 1 的影响[J]. 中