

• 短篇论著 •

基于 iTRAQ-LC-MS/MS 技术的高脂血症性急性胰腺炎患者治疗前后血清蛋白质差异性分析*

邱嘉华, 陈少奎, 黄锦文, 胡先福, 刘付俊业, 冯彩华

深圳市龙华区人民医院消化内科, 广东深圳 518109

摘要:目的 比较高脂血症性急性胰腺炎(HLAP)患者治疗前后血清蛋白谱的差异, 筛选并分析差异表达的蛋白质。方法 采用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术结合液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)检测 20 例 HLAP 患者治疗前后血清差异表达的蛋白质, 对筛选的差异蛋白质进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 利用 String 数据库构建差异蛋白间的相互作用网络, 从中筛选出关系密切的蛋白质。结果 通过试验共鉴定出蛋白质 367 种, 与 HLAP 治疗前组比较, HLAP 治疗后组共获得显著差异蛋白 37 个, 其中上调 34 个, 下调 3 个。GO 功能富集分析结果显示, 差异表达蛋白具有 9 种分子功能, 14 种细胞成分, 主要参与 24 种生物过程, 包括刺激应答、免疫反应、细胞过程、生物调节过程等。KEGG 通路富集分析结果显示, 共富集到 26 条通路, 参与的差异蛋白数量最多的通路为补体和凝血级联通路。差异蛋白质-蛋白质相互作用网络分析发现, MASP1、MASP2、C8G、CLU、SPARC 关系最为密切, 并且主要富集于补体和凝血级联通路。结论 血清中差异表达的蛋白质 MASP1、MASP2、C8G、CLU、SPARC 可能是影响 HLAP 治疗效果的关键靶向蛋白, HLAP 的治疗效果可能与补体和凝血级联通路相关。

关键词: 胰腺炎; 高脂血症; 质谱分析; 差异蛋白; 同位素标记

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.02.016

中图法分类号: R576; R446.1

文章编号: 1673-4130(2025)02-0210-05

文献标志码: A

高脂血症性急性胰腺炎(HLAP)是急性胰腺炎的第三大病因, 仅次于胆石症和乙醇摄入。相关研究显示, 在急性胰腺炎中 HLAP 发病率约占 10%, 随着近年来人们生活习惯和饮食结构的改变, HLAP 的发病率呈增高的趋势, 且趋于年轻化^[1-2]。HLAP 临床表现不典型, 易出现并发症, 多有重症倾向, 且容易复发。HLAP 发病机制复杂, 可能与胰腺微循环障碍、基因多态性、游离脂肪酸的细胞毒性作用、氧化应激、钙超载、炎性介质-细胞因子损伤、细胞信号转导通路等有关^[3-4], 但确切发病机制仍待进一步研究。

蛋白质组学技术在从蛋白质表达模式验证和推测疾病机制方面发挥着重大作用, 而定量蛋白质组学就是把一个基因组表达的全部蛋白质或一个复杂的混合体系中所有的蛋白质进行精确的定量和鉴定, 找到与疾病密切相关的差异蛋白, 进而确定靶分子, 为临床诊断、发病机制、病理研究、药物筛选、新陈代谢研究等提供理论依据^[4-5]。同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)与液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)技术联用, 可对复杂组分的蛋白样本进行分析研究。与其他蛋白组学技术相比, iTRAQ-LC-MS/MS 技术蛋白定量检测具有灵敏度高、分析范围广、高通量检测

等优点, 其准确性及应用价值已被多个研究证实, 在生命科学的各个领域已得到广泛应用^[6-7]。

本研究采用 iTRAQ-LC-MS/MS 检测 HLAP 患者治疗前后血清蛋白质的差异表达情况, 并利用生物信息学方法进一步探索潜在的靶蛋白和病理生理机制, 以期 HLAP 的临床治疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2019 年 5 月本院收治的 20 例 HLAP 患者作为研究对象。入选标准: (1)符合中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组修订的《中国急性胰腺炎诊治指南(2019 年, 沈阳)》^[5]; (2)血清甘油三酯(TG) ≥ 11.30 mmol/L 或 TG 5.65~11.30 mmol/L; (3)血清呈乳糜状。排除标准: (1)伴有心血管疾病、机械性肠梗阻、消化性溃疡并穿孔、胆管梗阻患者; (2)长期饮酒者; (3)其他原因引起的急性胰腺炎等患者。本研究方案通过医院伦理委员会的审批, 所以有参与者在受试前均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、离心机(珠海黑马医学仪器有限公司)、恒温箱(上海一恒科学仪器有限公司)、液相色谱 LC-20AD

* 基金项目: 深圳市龙华区医疗卫生机构区级科研项目(2021120)。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20241231.1523.002.html\(2025-01-04\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20241231.1523.002.html(2025-01-04))

(一维, Shimadzu)、液相色谱 Dionex Ultimate 3000 RSLCnano(二维, Thermo Scientific)、质谱仪 Q Exactive(Thermo Scientific)、iTRAQ 试剂盒(iTRAQ Reagent 8 plex Buffer Kit 及 iTRAQ Reagent Multiplex Kit, AB SCIEX 公司生产)、胰酶(Promega)、三乙基碳酸氢铵缓冲液 TEAB(Sigma)、TCEP(Sigma)、MMTS(Sigma)、蛋白浓度检测试剂盒(Bradford 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 于治疗前(入院时)、治疗后 7 d 分别抽取患者空腹静脉血 5 mL, 静置 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 每份样品不少于 1 mL, 分装后贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱待检。

1.3.2 蛋白质提取、定量 首先, 使用去高丰度蛋白试剂盒去除血清标本中的高丰度蛋白, 然后进行蛋白质提取, 并用 Bradford 法测定蛋白质水平, 根据试剂盒说明书进行操作。根据吸光度(A)值获得蛋白质的质量浓度。

1.3.3 蛋白酶解、iTRAQ 试剂标记 取 200 μg 蛋白用胰酶消化至肽段水平, 收集管底部共得到 100 μL 酶解后的样品。从冰箱中取出 8 标的 iTRAQ 试剂盒, 平衡到室温, 将 iTRAQ 试剂离心至管底; 向每管 iTRAQ 试剂中加入 150 μL 异丙醇, 涡旋振荡, 离心至管底; 取 50 μL 样品(100 μg 酶解产物)转移到新的离心管中。添加 iTRAQ 试剂到样品中, 将治疗前和治疗后 HLAP 患者均分为: HLAP 治疗前 1 组(iTRAQ 113)、HLAP 治疗前 2 组(iTRAQ 115)、HLAP 治疗前 3 组(iTRAQ 117)、HLAP 治疗后 1 组(iTRAQ 114)、HLAP 治疗后 2 组(iTRAQ 116)、HLAP 治疗后 3 组(iTRAQ 118)。因此, HLAP 治疗前组和 HLAP 治疗后组均有 3 组重复试验, 以减少实验误差。涡旋振荡, 离心至管底, 室温反应 2 h; 加入 100 μL 水终止反应。混合标记后的样品, 涡旋振荡, 离心至管底; 真空冷冻离心干燥, 抽干后的样品冷冻保存待用。

1.3.4 高 pH 液相分级 流动相 A: H_2O (NH_3 in H_2O , pH=10); 流动相 B: 80% 乙腈(ACN) (NH_3 in H_2O , pH=10)。梯度洗脱条件: 0~5 min, 5% 流动相 B; 5~10 min, 5%~10% 流动相 B; 10~60 min, 10%~40% 流动相 B; 60~65 min, 40%~95% 流动相 B; 65~75 min, 保持 95% 流动相 B; 75~85 min, 由 95%~5% 流动相 B。真空冷冻离心干燥, 抽干后的样品冷冻保存待用。

1.3.5 纳升级反相色谱-质谱分析(nano-RPLC) 根据紫外监测情况, 将高 pH 反相分离得到组分后, 每管样本用流动相 A(2% ACN+0.1% FA)复溶。涡旋

振荡, 12 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 吸取上清, 采用夹心上样, Loading Pump 流速 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, 上样 10 min, 分离流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, 分离时间为 60 min。样本经 nano 高效液相色谱分离后进行质谱分析, 正离子扫描模式。一级质谱分辨率 70 000, 扫描范围 350~1 800 质荷比(m/z); 二级质谱分辨率 17 500。

1.4 数据分析及生物信息学分析 质谱仪获取 RAW 格式的原始质谱数据, 利用 Proteome Discoverer 1.4 处理, 将 RAW 文件转换成 MGF 格式的质谱文件, 将 MGF 格式的质谱文件和蛋白检索库输入 ProteinPilot™ Software 4.5 进行质谱检索。设置蛋白鉴定置信度为 95%, 即 $\text{unused} > 1.3$, 且至少有一个肽段和库中的肽段 95% 以上相匹配, 同时进行蛋白检索, 设置假阳性率(FDR) < 1%。差异表达蛋白质筛选参数: (1) 肽段数 ≥ 2 ; (2) 选择重复性好的蛋白, 即变异系数(CV) < 0.5; (3) $P < 0.05$; (4) 计算各组数据比值的均值, 选取差异倍数 ≥ 1.5 为上调蛋白, 差异倍数 ≤ 0.67 为下调蛋白。通过 Uniprot 数据库筛选相关蛋白质, 检索京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库, 对鉴定到的蛋白质所涉及的生物通路进行分类和富集分析。利用 String 数据库对差异表达显著的蛋白质在线绘制蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 分析蛋白质之间的相互作用。

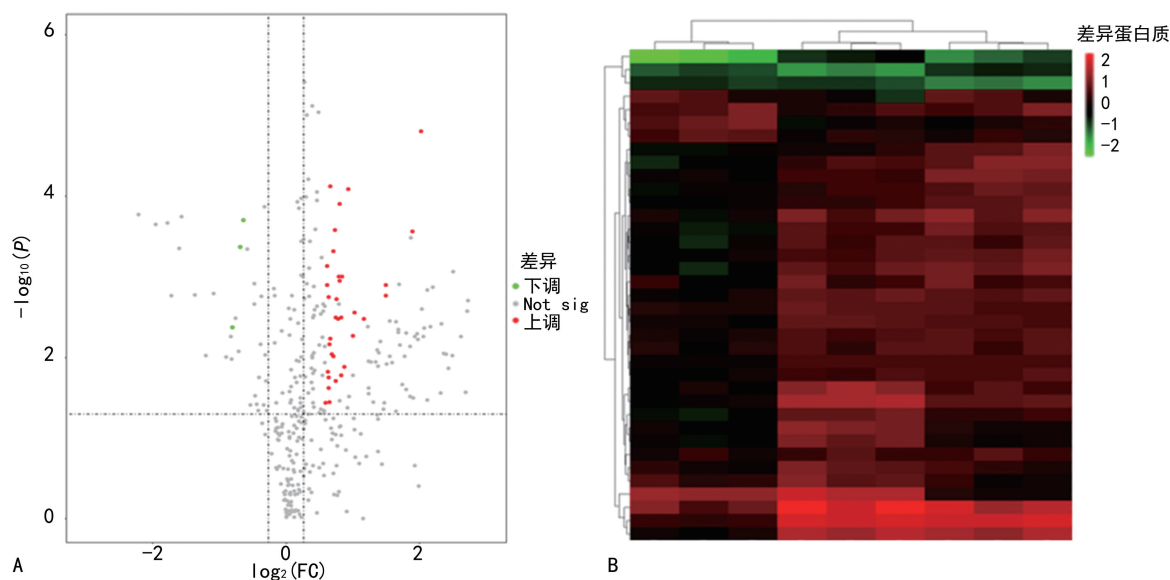
1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱鉴定结果 在 UniProt 蛋白质数据库中搜索, 共鉴定出蛋白质 367 种。以差异倍数大于 1.50 或小于 0.67 且经统计检验 $P < 0.05$ 为蛋白质差异表达上调或下调的标准。HLAP 治疗后组与治疗前组比较共获得差异蛋白质 37 个, 其中上调 34 个(MASP2、CLU、SPP2、RBP4、C1QC、SERPINA4、CPN2、ALDOB、HGFAC、IGKV1-6、C8G、IGHV3-9、APMAP、IGKV6D-21、SPARC、IGKLC、IGLV1-47、IGHV1-2、MST1、IGKV3-20、GPX3、IGHV1-18、SELENOP、GP1BA、HSPA5、IGLV2-18、SELL、IGLV8-61、SHBG、IGHV3-72、KRT10、MASP1、ANPEP、IGKV3-15), 下调 3 个(SSC5D、IGLV4-69、SAA1)。见图 1。

2.2 生物信息学分析结果 对差异表达蛋白进行基因本体(GO)分析, 显著差异蛋白质参与 24 个生物过程, 主要涉及刺激应答、生物调节、免疫系统过程、细胞过程、定位、代谢过程等。根据分子功能注释, 差异蛋白涉及 9 种分子功能, 主要包括结合活性、催化活性、分子功能调节、分子转导活性等。根据细胞成分

分析,差异蛋白涉及 14 种细胞组分,主要有胞外区、细胞成分、细胞器、细胞膜等。见图 2。



注:A 为 367 个蛋白质的火山图谱,绿点代表显著下调的蛋白质,红点代表显著上调的蛋白质,黑点代表表达水平差异无统计学意义(Not sig)的蛋白质;B 为 37 个差异蛋白质的热图,绿框表示显著下调的蛋白质,红框表示显著上调的蛋白质。

图 1 差异表达蛋白质鉴定

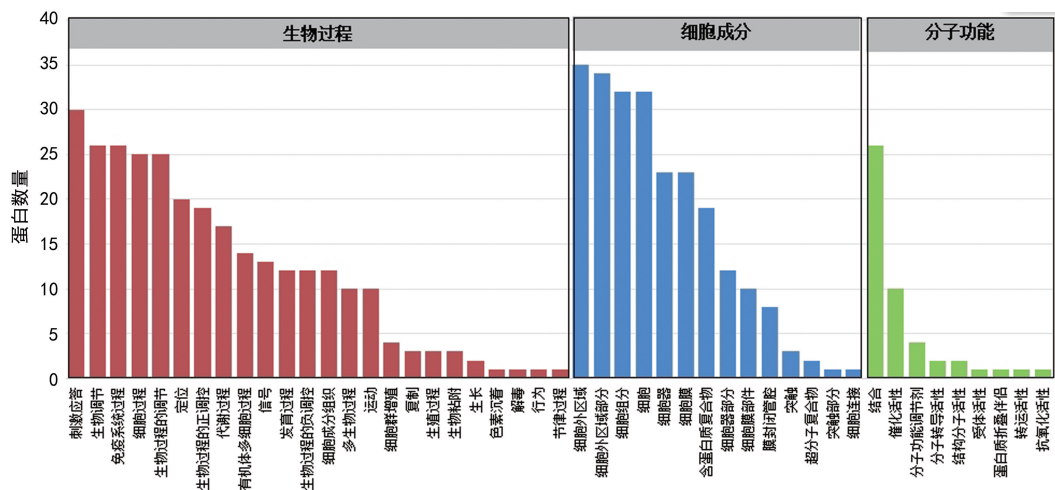


图 2 差异蛋白 GO 功能分类图

2.3 KEGG 通路富集分析 将所有的差异蛋白进行 KEGG 分析,结果显示共有 26 条通路被富集,富集程度由高到低依次为补体与凝血级联反应通路、金黄色

葡萄球菌感染通路、肌蛋白病、代谢途径通路。见表 1、图 3。

表 1 差异蛋白参与的信号通路(富集蛋白数,前 4 位)

通路名称	通路编号	蛋白数	差异蛋白
补体和凝血级联通路	hsa04610	5	MASP2、CLU、C1qC、MASP1、C8G
金黄色葡萄球菌感染	hsa05150	4	MASP2、KRT10、C1qC、MASP1
肌病毒病	hsa05020	3	C1qC、C8G、HSPA5
代谢途径	hsa01100	3	ANPEP、ALDOB、GPX3

2.4 PPI 分析结果 将 37 个显著差异蛋白质新建蛋白集,利用 String 数据库绘制差异蛋白质 PPI 网络

图。其中 String 可识别的差异蛋白为 13 个,筛选出相互作用程度最高的前 5 个蛋白质,分别为 MASP1、

MASP2、C8G、CLU、SPARC。见图 4。

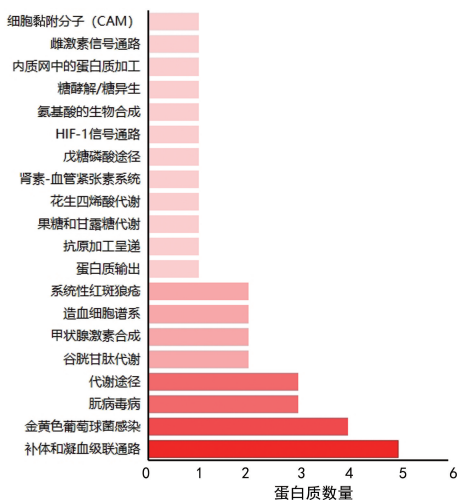


图 3 差异蛋白质通路富集分析

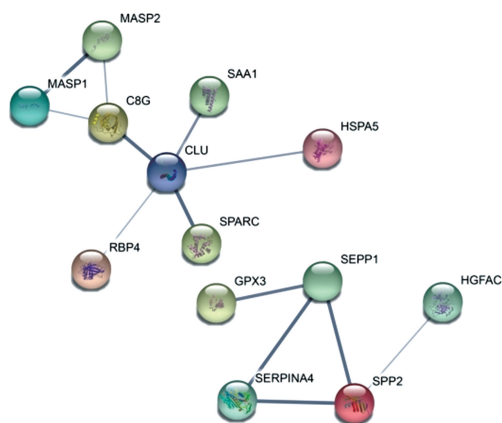


图 4 差异蛋白质 PPI 网络图

3 讨论

近年来 HLAP 的发病率不断增加,发病年龄较小,多有重症倾向,且容易复发。许多研究都集中在预防和有效阻断 HLAP 及其诊断和治疗上,但其发病机制仍未明确。研究 HLAP 发生发展的确切信号转导通路,开发合适且经济有效的治疗方法,有望提高其临床治疗效果。本研究采用 iTRAQ 技术结合 LC-MS/MS 定量检测 HLAP 患者治疗前后血清蛋白质的差异表达情况,共筛选出显著性差异的蛋白质 37 个,其中显著上调 34 个,显著下调 3 个。这些差异表达的蛋白质主要涉及 24 种生物过程,9 种分子功能,14 种细胞成分。生物过程涉及刺激应答、生物调节、系统免疫程序等。分子功能主要有结合、催化活性、分子功能调节剂等。细胞成分涉及细胞外区、细胞外部分、细胞部分等。

显著差异蛋白 KEGG 通路富集分析结果显示:共富集到 26 条通路,参与的差异蛋白数量最多的通路为补体和凝血级联通路。通过 String 数据库构建 PPI 网络图,笔者发现这些差异蛋白位于多条信号通路的节点上,这些节点上的差异蛋白与所鉴定到的信

号通路基本一致。筛选出来相互作用程度最高的前 5 个蛋白质,分别为 C8G、MASP1、MASP2、CLU、SPARC,其中 C8G、MASP1、MASP2、CLU 富集在补体和凝血级联信号通路上。

一直以来,补体系统被认为是 AP 的发病机制和疾病进展中的局部和全身炎症的效应者。胰腺蛋白酶可以激活补体的关键效应因子,进而驱动局部和全身炎症反应。异常激活补体和凝血级联通路可能导致 HLAP 患者出现危及生命的全身炎症反应^[8-9]。补体 C8 γ (C8G)是 5 种补体成分(C5b、C6、C7、C8、C9)之一 C8 的一个亚基,它们聚集在病原生物表面形成具有溶细胞活性的大分子复合物,称为膜攻击复合物^[10]。C8G 的独特之处在于,它属于小的分泌蛋白家族的脂钙蛋白家族,具有与小的疏水性配体结合的能力^[11]。C8G 是补体系统中唯一的脂质运输蛋白类物质,是形成膜攻击复合物的重要物质,可增加膜攻击复合物溶解细胞的能力,在免疫防御反应中起着重要的作用。C8G 的上调可能有助于 HLAP 患者血脂的代谢,调动机体的免疫防御机制,改善病情进展。

随着急性胰腺炎病程的进展,机体可出现凝血功能的变化,以及一系列补体的激活和变化,其转归与机体的免疫状态密切相关^[12]。补体系统是固有免疫的重要组成部分,是机体免疫防御的第一道防线。MASP1、MASP2 属于 MASP 家族,与补体 C1s 具有共同的结构域,同属丝氨酸蛋白酶亚家族,在血清中以酶原存在。MASP1、MASP2 是参与激活补体的凝集素途径的关键因子,该蛋白酶激活后可裂解 C4 和 C2 生成 C3 转化酶 C4b2b,活化的 MASP1 还直接裂解 C3,从而激活补体第三途径即凝集素途径来清除病原体,抵御机体感染^[13]。故推测 MASP1 和 MASP2 可能通过凝集素途径参与 HLAP 的发生发展过程,清除 HLAP 发病后经胆道、肠道等多种途径进入血液的细菌,发挥抗感染、免疫调节等生理功能。

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)也被称为骨连接素和基底膜蛋白 40,是一种具有多种功能的细胞外基质糖蛋白,在脂肪、肝脏、肌肉和胰腺组织中表达。SPARC 由内皮细胞、成纤维细胞、周细胞、星形胶质细胞和巨噬细胞分泌,可介导细胞-基质之间的相互作用,产生多种生物学效应,如影响细胞黏附和迁移力,改变细胞形态和通透性,调节细胞周期和细胞增殖等。对 SPARC 敲除小鼠模型的研究表明,SPARC 可减轻 AP 的严重程度,显著降低胰腺坏死、凋亡、免疫细胞浸润水平,慢性刺激后纤维化减少^[14]。此外,有研究表明,TG 是血清 SPARC 的独立影响因素,2 型糖尿病合并血脂异常患者 SPARC 水平升高,SPARC 可能参与了胰岛素信号通路的调节,能促进

胰岛素的分泌,说明血清 SPARC 水平的改变与胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱有关^[15-16]。本研究结果发现,HLAP 治疗后血清 SPARC 显著上调,且与 CLU 有显著相关,提示 SPARC-CLU 相关信号通路可能参与了 HLAP 患者血脂的代谢。因此,SPARC 可能成为未来治疗干预 HLAP 疾病进展新的靶蛋白。

CLU 即簇集蛋白,是一种多功能糖蛋白复合体,主要参与生殖、补体调节、脂质运输、组织修复及细胞凋亡等。XIE 等^[17]研究显示,AP 大鼠模型随病情的发展,CLU 在胰腺炎症区域的腺泡细胞胞质内表达明显升高。SAVKOVIC 等^[18]报道,CLU 基因缺失的大鼠较容易出现急性坏死性胰腺炎,细胞凋亡率显著增加,炎症细胞渗出明显增多。由此推测,上调 CLU 表达水平有利于调节 HLAP 患者胰腺细胞的凋亡,减少炎症介质的产生,有助于胰腺细胞的修复和再生,起到阻止病情进展的作用。这将为提高 HLAP 的治疗效果提供一条新的治疗途径。

本研究使用 GO 和 KEGG 数据库来分析预测差异表达的蛋白质,结果发现差异表达蛋白主要参与刺激应答、免疫反应、细胞过程、生物调节过程等生物过程,另外,通过 String 数据库筛选了 C8G、MASP1、MASP2、CLU、SPARC 等 5 个关系最密切的蛋白质。这些差异蛋白质可能为 HLAP 寻找新的治疗途径提供线索,未来还需要在体内和体外进行进一步的研究来验证其靶点和富集的信号通路。

参考文献

- [1] CARR R A, REJOWSKI B J, COTE G A, et al. Systematic review of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: a more virulent etiology[J]. *Pancreatology*, 2016, 16(4): 469-476.
- [2] ZHENG Y, ZHOU Z, LI H, et al. A multicenter study on etiology of acute pancreatitis in Beijing during 5 years[J]. *Pancreas*, 2015, 44(3): 409-414.
- [3] WANG Y, STEMFELD L, YANG F, et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells[J]. *Gut*, 2009, 58(3): 422-430.
- [4] GERASIMENKO J V, GERASIMENKO O V, PETERSEN O H, et al. The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis[J]. *J Physiol*, 2014, 592(pt2): 269-280.
- [5] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(2019 年, 沈阳)[J]. *中华胰腺病杂志*, 2019, 39(11): 721-730.
- [6] WU B U, JOHANNES R S, SUN X, et al. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study[J]. *Gut*, 2008, 57(12): 1698-1703.
- [7] VIDOVA V, SPACIL Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 964: 7-23.
- [8] EHRNTHALLER C, IGNATIUS A, GEBHARD F, et al. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system[J]. *Mol Med*, 2011, 17(3/4): 317-329.
- [9] BETTAC L, DENK S, SEUFFERLEIN T, et al. Complement in pancreatic disease-perpetrator or savior[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 15.
- [10] CHISWELL B, LOVELACE L L, BRANNEN C, et al. Structural features of the ligand binding site on human complement protein C8gamma: a member of the lipocalin family[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(5): 637-644.
- [11] LOVELACE L L, CHISWELL B, SLADE D J, et al. Crystal structure of complement protein C8gamma in complex with a peptide containing the C8gamma binding site on C8alpha: implications for C8gamma ligand binding[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 750-756.
- [12] NOVOVIC S, ANDERSEN A M, ERSBOLL A K, et al. Mannan-binding lectin and mannan-binding lectin-associated serine protease 2 in acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2011, 40(7): 1097-1102.
- [13] DOBÓ J, PÁL G, CERVENAK L, et al. The emerging roles of mannan-binding lectin-associated serine proteases(MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond[J]. *Immunol Rev*, 2016, 274(1): 98-111.
- [14] HERRMENA C A, WOLF L, NASRIN S S, et al. Activity of acute pancreatitis is modified by secreted protein acidic and rich in cysteine ablation[J]. *United European Gastroenterol J*, 2022, 10(6): 544-555.
- [15] HARRIES L W, MCCULLOCH L J, HOLLEY J E, et al. A role for SPARC in the moderation of human insulin secretion[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e68253.
- [16] KOS K, WONG S, TAN B, et al. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose[J]. *Diabetes*, 2009, 58(8): 1780-1788.
- [17] XIE M J, MOTOO Y, SU S B, et al. Expression of clusterin in pancreatic acinar cell injuries in vivo and in vitro[J]. *Pancreas*, 2001, 22(2): 126-134.
- [18] SAVKOVIC V, GANTZER H, REISER U, et al. Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(2): 431-437.