

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.007
文章编号: 1005-8982 (2019) 06-0031-04

综述

蛋白质组学的研究现状及其在2型糖尿病中的应用*

张智慧, 闫朝丽

(内蒙古医科大学附属医院 内分泌科, 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要: 蛋白质组学是对基因编码蛋白质进行大规模分析的一门新兴学科。本文概述蛋白质组学的基本技术: 双相凝胶电泳、多维液相色谱、生物质谱技术及蛋白质芯片在2型糖尿病(T2DM)中的应用, 从而探讨T2DM中与炎症及脂代谢紊乱相关的生物蛋白: C反应蛋白、 α 2-巨球蛋白、载脂蛋白A1、Clusterin及锌- α -2糖蛋白的研究进展, 发现早期诊断T2DM新的特异性标志物及药物作用靶点。

关键词: 蛋白质组学; 糖尿病, 2型; 电泳, 凝胶, 双向; 蛋白质阵列分析

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Application and progress of proteomics in type 2 diabetes*

Zhi-hui Zhang, Zhao-li Yan

(Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Neimenggu 010059, China)

Abstract: Proteomics is a new subject for large-scale analysis of gene coding protein. This paper describes the basic technology of proteomics: application two-dimensional gel electrophoresis, multidimensional liquid chromatography, mass spectrometry, protein chip and their application in type 2 diabetes, to explore the biological protein related to inflammation and dyslipidemia in type 2 diabetes, such as C reaction protein, alpha macroglobulin, apolipoprotein 2-A1, Clusterin protein and zinc alpha-2 glycoprotein, and to find some new mellitus specific markers and drug targets for early diagnosis of type 2 diabetes.

Keywords: proteomics; diabetes mellitus, type 2; electrophoresis, gel, two-dimensional; protein array analysis

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种慢性全身性代谢性疾病, 由环境因素和遗传因素共同引起。其主要病因是胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。2013年全国调查中T2DM患病率为10.4%, 男性(11.1%)多于女性(9.6%)^[1]。然而, 随着血清蛋白组学研究的深入, 使得一些与疾病特定状态相关的生物标志分子被发现, 这为解释疾病发生、发展机制, 预防和诊断T2DM及糖尿病相关药物的开发提供了思路。本文就蛋白质组学方法学、T2DM与炎症因子及脂代谢相关因子机制与关系作一综述。

1 蛋白质组学概述

生命的各项活动都离不开蛋白质, 蛋白质是机体各项功能的执行者。蛋白质组学是从1个细胞或组织的蛋白质整体活动角度来研究生命现象。通过比较分析病理及正常个体间的蛋白质组, 找到一些与疾病相关的特异性蛋白和标志蛋白。其不仅可作为疾病诊断的血清学依据, 而且为新药的设计提供参考分子靶点^[2]。

1.1 血清蛋白质组学的技术方法

蛋白质组研究主要分为两步, 首先从样品中分离出蛋白质, 然后鉴定被分离的蛋白质。其两大关键

收稿日期: 2018-09-11

* 基金项目: 中华医学会基金(No: 13040710456); 内蒙古自治区自然科学基金(No: 2015MS08105); 内蒙古医科大学附属医院重大科研项目(No: NYFY ZD 001)

[通信作者] 闫朝丽, E-mail: aliceyzl@126.com; Tel: 13848177245

核心技术是：双向凝胶电泳技术和质谱鉴定技术^[3-5]。同时由于技术的局限性，近年来也出现多维液相色谱和蛋白质芯片等，以下就相关技术作一阐述。

1.1.1 双相凝胶电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 2-DE 被认为是目前蛋白质组学中不可替代的核心技术。首先分辨率很高，可分离 1 000 多种蛋白质；其次敏感性高，可检测到纳克级水平蛋白质；再次通量高，在同一条件同一细胞组织中同时分析多种蛋白。2-DE 的第一向进行等电聚焦，蛋白质沿 pH 梯度分离至各自的等电点；第二向沿垂直的方向进行分子量的分离，从而直观地分析细胞内蛋白质组分的等电点、相对分子量和表达丰度的相对量等信息。

1.1.2 多维液相色谱 (multidimensional liquid chromatography tandem, MDLC) MDLC 能够检测出在 2-DE 前处理中丢失的蛋白，使其获得的蛋白质更完整，但分离能力还不是很高。其中高效液相色谱和毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 作为 2-DE 互补的血清蛋白质和多肽的分离分析新手段得到迅速发展，成为生物大分子快速分离鉴定的有力工具。反相液相色谱作为多维色谱分离中最后一维的分离模式，这是由于其分离效率高、分析速度快、流动相组分及质谱匹配等优点。而离子交换色谱、亲和色谱等与 CE 模式可作为各种复杂样品的预分离模式。在蛋白组学的研究中，多维液相分离系统将会是 2-DE 的有益补充。

1.1.3 生物质谱 蛋白质组学中最为重要的鉴定技术即生物质谱。其基本原理是将样品分子离子化，通过离子键质荷比记录，从而将得到的质谱图与已知质谱数据库比样对照，确定待测化合物的属性。尽管质谱技术分离分析能力强大，但却难以区分 2 种同源性极高的蛋白，只能分离气体状态的带电分子。其中电子喷雾电离质谱测量法和基质辅助激光解吸电离 / 飞行时间质谱测量法最为常用。

1.1.4 蛋白质芯片 蛋白质芯片是一种蛋白质分析技术，是基因芯片的补充。其在同一时间向以蛋白质或多肽为材料分析整个蛋白质组。蛋白质芯片和质谱分析技术目前被联合用来研究差异表达的蛋白质，即通过不同的蛋白样品和同一蛋白质芯片相互作用，洗掉未结合的蛋白质，再利用质谱技术分析鉴定。对于低分子量、低丰度，以及疏水的蛋白质血清及组织粗样品的直接检测最为适用。

2 蛋白质组学在 T2DM 中的应用

2.1 T2DM 急性时相期蛋白

近年来，部分学者认为 T2DM 可能与炎症相关，认为 T2DM 是一种低度炎症及自然免疫性的慢性疾病^[6]。C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、 $\alpha 2$ -巨球蛋白 ($\alpha 2$ -macroglobulin, $\alpha 2$ -M) 是 T2DM 临床上较为敏感的标志物。

2.1.1 CRP CRP 是一种急性期蛋白，由于组织损伤或刺激后在肝脏产生。其以非共价键形式结合，形成环状五球体。CRP 不仅可以与多种自身配体或外来配体结合，被 C1q 识别，进而激活补体活化的经典途径，成为机体的防御功能的重要组分，而且可以限制由于补体激活后的炎症反应所带来的潜在破坏性^[7]。LI 等^[8]研究认为 T2DM 是易感个体，因各种因素作用致先天性免疫系统被激活，产生多种炎症反应因子，从而参与 IR 和代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的发生、发展。

谭英^[9]通过观察不同体重指数 (body mass index, BMI) 糖尿病患者血清中 CRP 含量，发现 CRP 与 BMI、胰岛素抵抗指数 (the insulin resistance index, HOMR-IR) 呈正相关，与胰岛素敏感指数呈负相关。这表明炎症反应与肥胖关系密切，同时也说明炎症反应激活可能参与 IR，因为 CRP 是临床最有效的炎症反应标志物。陈春莲等^[10]研究发现，T2DM 患者血清 CRP 水平高于健康者，进一步证明炎症参与 T2DM 的发生、发展。

RIAZ 等^[11]比较糖尿病患者和健康人群血清中差异蛋白质水平的变化，为增加准确性，实验利用单向电泳和 2-DE 找到差异蛋白，平行进行质谱分析发现，与正常人相比，CRP 增加 872%，因此，RIAZ 等^[11]认为糖尿病人群中 CRP 的增加支持糖尿病的发生与炎症和肥胖有关这一观点。

2.1.2 $\alpha 2$ -M $\alpha 2$ -M 作为一种蛋白质在血浆中分子量最大，主要由肝细胞和单核吞噬细胞系统合成。是一种内源性蛋白酶抑制剂，同时也充当细胞因子 / 生长因子的转运蛋白与多功能结合蛋白。该蛋白质的分子量为 180 kD，但约 720 kD 分子量的四聚体形式也存在于血清中^[12]。

$\alpha 2$ -M 血浆水平升高代表着生命的生长、发育及分化，在胚胎发育、妊娠和儿童期有着重要的意义。大多数疾病情况下 $\alpha 2$ -M 浓度不发生变化，成人每天大约可以代谢分解掉 10% $\alpha 2$ -M。 $\alpha 2$ -M 与蛋白酶结

合形成的复合物,由于发生构象改变被有关细胞受体识别,快速从血循环中被清除。生理状态下,与多种分子或离子结合是 $\alpha 2$ -M最突出的功能,特别是与多种蛋白水解酶结合从而影响这些酶的活性^[13]。而在炎症和感染等病理情况下, $\alpha 2$ -M在机体合成大量增加,同时与过量产生的蛋白水解酶结合并加速其清除,以起到保护组织免于炎症或免疫损伤的作用。因而, $\alpha 2$ -M的作用主要表现为消除组织中内源性和外源性的蛋白酶,与某些蛋白酶抑制因子共同调节控制蛋白水解活性^[14]。

TAKADA等^[15]通过质谱分析发现,糖尿病患者中的单体 $\alpha 2$ -M增加,然而其四聚体形式只是略微增加。 $\alpha 2$ -M不仅是心脏肥大和糖尿病性心肌梗死的早期分子标志,同时也是参与心脏及动脉粥样硬化的急性期血清生物标志物的蛋白质,而在糖尿病初期就表现为上调。因此,TAKADA等^[15]认为在人类血浆中 $\alpha 2$ -M解离的单体形式可能会成为诊断T2DM的重要生物标志物。

2.2 T2DM的脂代谢紊乱

T2DM与IR关系密切,脂肪组织不仅可贮存能量,而且可分泌某些生理活性物质来影响胰岛素的敏感性,影响人体内血糖的调节,因此脂代谢可能也参与T2DM的发生、发展。而载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, Apo A1)、丛生蛋白(Clusterin, CLU)和锌- $\alpha 2$ 糖蛋白(Zinc- $\alpha 2$ -glycoprotein, ZAG)的研究较为广泛。

2.2.1 载脂蛋白A1 载脂蛋白作为血浆脂蛋白的组成部分,其不但可转运脂类物质并稳定脂蛋白的结构,甚至可激活脂蛋白代谢酶、促进脂类运输、调节酶活性和引导血浆脂蛋白同细胞表面受体结合。Apo A1是高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中的主要载脂蛋白^[16]。

RIAZ等^[11]通过单向电泳和2-DE 2种方法寻找糖尿病患者和健康人群血清中蛋白质的差异,并通过质谱分析比较相关差异蛋白的变化。与健康人群相比糖尿病患者Apo A1下调,同时其认为Apo A1与肥胖相关,因此可作为参与T2DM发生、发展的生物标志物^[11]。

JIANG等^[17]认为,在肥胖、IR及T2DM中,Apo A1降低常伴随着Apo B升高,Apo B/Apo A1是高血压、MS和糖尿病的危险因子,Apo B/Apo A1比值适用于糖尿病、肥胖人群的风险评估,具有临床意义。

2.2.2 CLU CLU别名载脂蛋白J和分泌蛋白40-40。生理状态下,主要参与组织修复、脂质转运、补体抑制及细胞凋亡等生物学过程。病理条件下,CLU被认为是癌症、神经退行性疾病、肾小球肾炎及心肌梗死等多种疾病发生、发展过程中的有效因素。

CLU通常被认为主要与HDL相关,尤其富含于HDL 3小分支。HOOFNAGLE等^[18]通过同位素稀释质谱法对HDL、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、总胆固醇、甘油三酯(Triglyceride, TG)等蛋白质进行研究表明,在HDL较低与TG较高的人群中,CLU水平均较低,这成为发展为代谢综合征的主要组成部分。HOOFNAGLE等^[18]发现HDL中的CLU水平与胰岛素敏感性呈正相关;与肥胖及脂代谢紊乱呈负相关,相比之下,其他类型的蛋白质与代谢综合征的这些特征并无相关。因此CLU的损耗表明存在着功能失调的HDL。这一发现,结合Apo B相关脂蛋白和IR中CLU水平的直接联系,增加IR可能将蛋白质从HDL转变为VLDL和LDL的可能性,而脂类代谢的改变继发于IR与代谢综合征HDL中CLU的减低。

2.2.3 ZAG ZAG是新近发现的一种细胞因子,其促进脂类降解的同时还可以调节脂类代谢,促进脂肪酸氧化,活化解偶联蛋白增加产热。ZAG还可通过自分泌或旁分泌的方式影响其他脂肪因子的表达,如促进脂联素、抑制瘦素在脂肪组织中的表达^[19]。故认为与肥胖、IR密切相关。

刘瑞等^[20]研究发现,空腹血清ZAG水平在肥胖、糖耐量受损、T2DM组中较正常对照组减低,提示ZAG可能与糖脂代谢紊乱和肥胖有重要的关系。

RUSSELL等^[21]将从人血浆中纯化的ZAG,按94种不同剂量腹腔注射雄性NMRI小鼠。结果发现,ZAG对降低小鼠BMI具有时间和剂量依赖性。体脂分析表明,小鼠BMI减少的主要原因是脂肪含量减少。证实了人体内ZAG与BMI有关。YANG等^[22]研究发现,血浆中HDL、脂联素与ZAG呈正相关。BMI、腰臀围、体脂比、TG、空腹胰岛素和HOMR-IR等与ZAG呈负相关。ZAG水平在糖尿病患者中低于糖尿病前期患者,多囊卵巢综合征女性与健康女性相比ZAG水平减低。

因此,ZAG可能作为一个与肥胖及肥胖相关的IR的生物标志物。SELVA等^[23]研究发现,脂肪组织中ZAG水平与ZAG mRNA水平呈正相关,因此,其认为脂肪组织对ZAG影响重大。

3 现状与展望

近年来, 蛋白组学在肿瘤、心血管等重大疾病血清的研究中被广泛应用。然而其研究才刚刚起步, 因此重复性不理想, 一些低丰度蛋白难以鉴定, 研究耗时且费用昂贵, 研究依旧集中在比较 T2DM 个体与健康个体的组织和血清等样品, 仍处于对疾病研究初期的摸索阶段。随着蛋白质组学技术的不断完善, 有望获得在病理状态下异常表达的蛋白质标志物。最终可用于全面了解生理和病理状态下 T2DM 蛋白质的质谱变化, 筛选出重要诊断依据。这不仅对更好地理解 T2DM 的病理、生理有益, 同时也有助于发现疾病的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 1(10): 4-66.
- [2] 陈骊珠, 张墨, 马巍, 等. 蛋白质组学技术在产前诊断生物标志物筛查中的研究进展 [J]. 中国全科医学, 2018, 16(3): 461-463.
- [3] 张海洋, 牛春雨, 赵自刚. 血清蛋白组学技术及其应用进展 [J]. 中国微循环, 2009, 13(3): 207-209.
- [4] ONAT A, CAN G, ÖRNEK E, et al. Abdominal obesity with hypertriglyceridaemia, lipoprotein(a) and apolipoprotein A-I determine marked cardiometabolic risk[J]. Eur J Clin Invest, 2013, 43(11): 1129-1139.
- [5] MURRI M, INSENER M, LUQUE M, et al. Proteomic analysis of adipose tissue: informing diabetes research[J]. Expert Rev Proteomics, 2014, 11(4): 491-502.
- [6] BHATTARAI M D. Three patterns of rising type 2 diabetes prevalence in the world: need to widen the concept of prevention in individuals into control in the community[J]. JNMA J Nepal Med Assoc, 2009, 48(174): 173-179.
- [7] de CARVALHO J F, HANAOKA B, SZYPER-KRAVITZ M, et al. C-Reactive protein and its implications in systemic lupus erythematosus[J]. Acta Reumatol Port, 2007, 32(4): 317-322.
- [8] LI J, WANG L, WANG Q, et al. Diagnostic value of carotid artery ultrasound and hypersensitive C-reactive protein in Type 2 diabetes mellitus patients with acute myocardial infarction in Chinese population[J]. Medicine, 2018, 97(41): DOI: 10.1097/MD.00000000000012334.
- [9] 谭英. 初发 2 型糖尿病患者体重指数, C-反应蛋白, 胰岛素抵抗的相关研究 [J]. 吉林医学, 2012, 33(10): 2077-2078.
- [10] 陈春莲, 易玉芳, 王志成, 等. 2 型糖尿病患者血清 chemerin 和 C 反应蛋白水平及胰岛素抵抗与大血管病变的相关性研究 [J]. 中国全科医学, 2013, 16(21): 2438-2440.
- [11] RIAZ S, ALAM S S, AKHTAR M W. Proteomic identification of human serum biomarkers in diabetes mellitus type 2[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(5): 1103-1107.
- [12] WANG H Y, TIAN Y F, CHIEN C C, et al. Differential proteomic characterization between normal peritoneal fluid and diabetic peritoneal dialysate[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(6): 1955-1963.
- [13] WYATT A R, ZAMMIT N W, WILSON M R. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action of alpha (2) -macroglobulin in human plasma[J]. Cell Stress Chaperones, 2013, 18(2): 161-170.
- [14] PE'ER J, FOLBERG R, ITIN A, et al. Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy[J]. Br J Ophthalmol, 1996, 80(3): 241-245.
- [15] TAKADA T, KODERA Y, MATSUBARA M, et al. Serum monomeric α 2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes[J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1): 270-276.
- [16] KIM S J, CHAE S, KIM H, et al. A protein profile of visceral adipose tissues linked to early pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(3): 811-822.
- [17] JIANG X B, HE D S, MAO Z G, et al. BMI, apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio, and insulin resistance in patients with prolactinomas: a pilot study in a Chinese cohort[J]. Tumour Biol, 2013, 34(2): 1171-1176.
- [18] HOOFNAGLE A N, WU M, GOSMANOVA A K, et al. Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(12): 2528-2534.
- [19] XU L L, YU W H, NIU M, et al. Serum ZAG levels were associated with eGFR mild decrease in T2DM patients with diabetic nephropathy[J]. Int J Endocrinol, 2017, 2(3): DOI:10.1155/2017/5372625.
- [20] 刘瑞, 杨刚毅, 李伶. 锌- α 2-糖蛋白与脂联素在不同糖耐量人群中的关联性研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(4): 278-281.
- [21] RUSSELL S T, ZIMMERMAN T P, DOMIN B A, et al. Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 27, 1636(1): 59-68.
- [22] YANG M, LIU R, LI S, et al. Zinc- α 2-glycoprotein is associated with insulin resistance in humans and is regulated by hyperglycemia, hyperinsulinemia, or liraglutide administration: cross-sectional and interventional studies in normal subjects, insulin-resistant subjects, and subjects with newly diagnosed diabetes[J]. Diabetes Care, 2013, 36(5): 1074-1082.
- [23] SELVA D M, LECUBE A, HERNÁNDEZ C, et al. Lower zinc-alpha2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11): 4499-4507.

(李科 编辑)