

通过基于iTRAQ的蛋白组学方法筛选与TGF- β 1 调控瓣膜间质细胞活化相关的关键蛋白

由万宁¹ 金炼驰¹ 赖永洁^{2*}

(¹遵义医科大学珠海校区/贵州省免疫学研究生创新研究基地, 珠海 519041;

²遵义医科大学珠海校区免疫学与病原生物学教研室, 珠海 519041)

摘要 瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)由成纤维细胞表型分化为肌成纤维细胞表型, 即VICs活化是驱动瓣膜纤维化病变的早期关键环节, 而转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是诱导VICs活化的经典细胞因子, 该文利用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术对TGF- β 1处理前后的VICs进行了差异蛋白质组学分析, 以期发现与VICs活化相关的关键蛋白。该研究以原代培养的大鼠VICs为对象, 利用蛋白组学方法分析TGF- β 1处理VICs前后蛋白质表达谱的变化, 通过多种生物学信息分析方法对重点差异蛋白进行筛选, 并利用qRT-PCR与Western blot法验证候选蛋白的表达差异。结果显示, 共鉴定出可定量差异蛋白7 104个, 其中包括具有显著差异($P < 0.05$)的上调蛋白404个、下调蛋白494个。GO分析显示差异蛋白主要富集到多细胞生物学过程、DNA结合功能以及细胞外基质区域组分等功能条目中, KEGG分析显示差异蛋白主要参与DNA复制、错配修复及黏着斑等信号通路。此外, 进一步发掘出了AKAP12、FBLN2、NCAM1、MFAP4以及CADM4等5种与VICs活化相关的新型候选蛋白。该研究全面解析了TGF- β 1处理前后的VICs差异蛋白表达谱, 为进一步阐明VICs活化与瓣膜性心脏病的发生机制提供了新的线索。

关键词 蛋白质组学; iTRAQ; 瓣膜间质细胞; 活化; 瓣膜纤维化

Screening of Key Proteins Related to TGF- β 1 Regulating Valve Interstitial Cell Activation via iTRAQ-Based Proteomics

YOU Wanning¹, JIN Lianchi¹, LAI Yongjie^{2*}

(¹Zhuhai Campus of Zunyi Medical University/Innovative Base for Immunology Post-Graduate Students in Guizhou Province, Zhuhai 519041, China; ²Department of Immunology and Pathogenic Biology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China)

Abstract The differentiation of VICs (valve interstitial cells) from fibroblast like phenotype to myofibroblast phenotype, which can be termed “activation” of VICs, is an early hallmark of the onset of valvular fibrosis, and TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) is a putative cytokine that induces the activation of VICs. In this paper, differential proteomic analysis of primary VICs pre and post TGF- β 1 treatment was carried out by iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) technology to discover the novel proteins related to the activation of VICs. In this study, primary rat VICs culture system was established, and bioinformatics method was used to analyze the changes of protein expression profiles of VICs treated with TGF- β 1. The differential expression of

收稿日期: 2022-03-29 接受日期: 2022-07-05

国家自然科学基金(批准号: 81700341)和贵州省自然科学基金(批准号: (2020) 1Y297)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0756-7623304, E-mail: laiyongjie121@163.com

Received: March 29, 2022 Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81700341) and the Guizhou Provincial Natural Science Foundation (Grant No. (2020) 1Y297)

*Corresponding author. Tel: +86-756-7623304, E-mail: laiyongjie121@163.com

candidate proteins were validated by qRT-PCR and Western blot assay. The results showed that a total of 7 104 quantifiable proteins were identified, including 404 up-regulated proteins and 494 down-regulated proteins with significant differences ($P < 0.05$). GO enrichment analysis revealed that multicellular biological process, DNA binding functions and extracellular matrix region components were the mainly enriched GO terms. KEGG analysis showed that the differential proteins were mainly involved in DNA replication, mismatch repair and focal adhesion and other signaling pathways. This study comprehensively analyzed the differential protein expression profiles of VICs pre and post TGF- β 1 treatment, and identified five candidate proteins (including AKAP12, FBLN2, NCAM1, MFAP4 and CADM4) related to the activation of VICs, providing new insights into the mechanisms of VICs activation and valvular heart disease.

Keywords proteomics; iTRAQ; valve interstitial cells; activation; valvular fibrosis

随着生产生活方式的改变以及人口老龄化趋势的不断加深,心血管疾病已成为导致人类死亡的首要病因^[1],其中瓣膜性心脏病(valvular heart disease, VHD)引发的心功能不全严重危害人类生命健康,VHD的病理改变主要涉及瓣膜的纤维化以及钙化过程,阐明瓣膜病变的分子机制对VHD的防治具有积极意义^[2]。

正常瓣膜由瓣膜内皮细胞(valve endothelial cells, VECs)、瓣膜间质细胞(valve interstitial cells, VICs)和VICs分泌产生的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成^[3]。瓣膜细胞组分中85%为VICs,它们在正常状态下表现出静态表型即成纤维细胞样表型,但是在损伤或促纤维细胞因子等因素的刺激下会转化为活化表型即肌成纤维细胞样表型,VICs持续活化并出现调节失控是引发瓣膜纤维化的关键环节,同时该环节与VICs向成骨细胞表型分化过程之间的相互调控在瓣膜钙化进程中也发挥了重要作用^[4-5]。因此,全面解析并发掘与VICs活化相关的关键蛋白将有助于进一步阐明VHD的发生机制。

VHD患者的瓣膜标本不易获得,且临床术后所获瓣膜标本往往处于病变终末期,不利于研究病变早期的VICs活化机制,而动物瓣膜来源的原代VICs培养体系则为VHD的研究提供了替代方案^[6]。同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术具有通量高、稳定性佳且不受样品本身特性限制的优点,是筛选差异蛋白的理想工具^[7-8]。瓣膜ECM中含有高丰度的蛋白质,因此,本研究以原代培养的大鼠VICs为对象,通过蛋白组学的方法分析TGF- β 1处理VICs前后蛋白质表达谱的差异,并进一步对可能参与VICs活化的候选蛋白进行筛选,为VHD的防治提供新的理论依据与药物靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择SPF级健康雄性Sprague Dawley大鼠6只,80~90日龄,体质量(200 $\pm$ 20) g。实验动物购自广东百世通生物科技有限公司,本研究经遵义医科大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号:ZMU21-2203-143)。

1.1.2 主要试剂 高糖培养基、II型胶原酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;兔抗 α -SMA(α -smooth muscle actin)多克隆抗体购自北京义翘神州科技股份有限公司;鼠抗Vimentin单克隆抗体、鼠抗MFAP4单克隆抗体、鼠抗FBLN2单克隆抗体、鼠抗AKAP12单克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司;兔抗NCAM1多克隆抗体、兔抗CD31单克隆抗体、兔抗GAPDH单克隆抗体、山羊血清、0.25% Triton X-100、细胞裂解液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG均购自上海碧云天生物科技有限公司;兔抗CADM4多克隆抗体购自美国GeneTex公司;Alexa Fluor488TM标记的山羊抗兔IgG、Alexa Fluor594TM标记的山羊抗小鼠IgG、ECL化学发光试剂盒、抗体剥离液和TMT试剂均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;iTRAQ试剂购自美国AB SCIEX公司;水合氯醛购自天津大茂化学试剂厂;TGF- β 1购自美国PeproTech公司;RNA提取试剂盒、cDNA反转录试剂盒以及荧光染料试剂均购自大连宝生物工程有限公司;所用引物均由广州艾基生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 瓣膜间质细胞的分离与培养 大鼠腹腔注入2%戊巴比妥钠(100 mg/kg),麻醉后用颈椎脱臼法

处死, 在无菌条件下取出心脏。用手术器械剪下心脏瓣膜, 浸在预冷的Hanks液中, 100 $\times$ g离心5 min, 弃上清。加入425 U/mL的胶原酶II消化2 h, 期间每15 min吹打混匀1次, 670 $\times$ g离心8 min, 弃上清。将细胞混悬液与完全培养基(DMEM+2% FBS+1%青霉素-链霉素双抗)混匀后转移至细胞培养瓶中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下进行培养。

1.2.2 免疫荧光 VICs消化后按 5×10^5 个/孔的密度接种于已放玻璃爬片的24孔板内, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下贴壁培养。次日弃培养液, PBS清洗3次, 以4%多聚甲醛固定20 min。PBS清洗3次后以10%羊血清室温封闭30 min。一抗(均按1:200比例稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 次日弃一抗, PBS清洗3次, 加入对应荧光标记的二抗(按1:2 000比例稀释), 常温避光孵育2 h。弃二抗, PBS清洗3次后封片, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 蛋白肽段酶解、iTRAQ标记与肽段分级 将VICs接种至直径为100 mm的培养皿中生长, 同时加入5 ng/mL TGF- β 1处理48 h后, 用SDT(sodium dodecyl sulfate and dithiothreitol)裂解细胞, 然后采用BCA法进行蛋白质定量。每组取20 μ g蛋白质分别加入1 $\times$ 上样缓冲液, 沸水浴5 min, 进行12.5% SDS-PAGE电泳(恒流14 mA、90 min), 考马斯亮蓝染色。每个样品取适量蛋白质采用FASP(filter aided proteome preparation)方法进行胰蛋白酶酶解^[9], 采用C18 Cartridge对肽段进行脱盐, 肽段冻干后加入40 μ L 0.1%的甲酸溶液复溶, 以紫外光吸收法进行肽段定量。各样品分别取100 μ g肽段, 按照AB SCIEX公司的iTRAQ标记试剂盒说明书进行标记。样品分为处理组与未处理组, 每个组别含有3个生物学重复样本, 共计6个样本。强阳离子交换(strong cation exchange, SCX)分级: 将每组标记后的肽段混合, 采用AKTA Purifier 100进行分级。缓冲液A液含10 mmol/L KH₂PO₄、25%乙腈, pH3.0; B液含10 mmol/L KH₂PO₄、500 mmol/L KCl、25%乙腈, pH3.0。色谱柱以A液平衡, 样品由进样器上样到色谱柱进行分离, 流速为1 mL/min。液相梯度如下: 0 min~22 min, B液线性梯度为0%~8%; 22 min~47 min, B液线性梯度为8%~52%; 47 min~50 min, B液线性梯度为52%~100%; 50 min~58 min, B液线性梯度维持在100%; 58 min以后, B液线性梯度重置为0%。洗脱过程中检测波长为214 nm处的吸光度(D)值, 每隔1 min收集洗脱组分, 分别冻干后采用C18 Cartridge脱盐。

1.2.4 LC-MS/MS数据采集与分析 高效液相色谱: 每份样品采用纳升流速的HPLC液相系统Easy nLC进行分离。缓冲液A液为0.1%甲酸水溶液, B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈浓度为84%)。色谱柱以95%的A液平衡。样品由自动进样器上样到Thermo Scientific™ Acclaim™ PepMap™100 C₁₈反相分析柱(100 μ m $\times$ 2 cm, 3 μ m)中, 然后再经C₁₈分析柱(75 μ m $\times$ 10 cm, 3 μ m)分离。液相梯度: 0 min~50 min, B液线性梯度为0%~35%; 50 min~55 min, B液线性梯度为35%~100%; 55 min~60 min, B液线性梯度维持在100%。质谱鉴定方法: 样品经色谱分离后用Q-Exactive质谱仪进行质谱分析。分析时长为60 min, 检测方式为正离子, 母离子扫描范围为质量电荷比(m/z) 300~1 800, 一级质谱分辨率为70 000 at 200 m/z, 自动增益控制目标(AGC target)为3e6, 一级质谱Maximum IT为10 ms, number of scan ranges为1, dynamic exclusion为40 s。多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描后采集20个碎片图谱, MS2 activation type设置为HCD, isolation window设为2 m/z, 二级质谱分辨率为17 500 at 200 m/z, microscans为1, 二级maximum IT为60 ms, normalized collision energy为30 eV, underfill为0.1%。质谱分析原始数据采用软件Mascot2.2和Proteome Discoverer1.4进行查库鉴定及定量分析。

1.2.5 生物信息学分析 利用CELLO(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)进行亚细胞定位预测, Pfam数据库进行蛋白结构域预测, Blast2GO进行目标蛋白的基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析, KAAS(KEGG automatic annotation server)对目标蛋白集合进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路注释分析, STRING(<http://string-db.org/>)及CytoScape软件进行蛋白质相互作用网络分析。最后采用Fisher精确检验, 比较各个GO分类在目标蛋白质集合和总体蛋白质集合中的分布情况。

1.2.6 qRT-PCR 将细胞随机分为未处理组和处理组, 按 1×10^5 个/孔的密度接种细胞至6孔板, 处理组使用2% FBS培养基并加入5 ng/mL的TGF- β 1培养, 未处理组只加入2% FBS培养基, 培养48 h后, 各组取10 ng的总RNA, 反转录成cDNA备用。通过美国国立生物技术信息中心检索相应基因的mRNA序列, 利用Primer-BLAST程序进行引物设计和特异性

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primers list for quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Gapdh</i>	F: AGT GCC AGC CTC GTC TCA TA R: ATG AAG GGG TCG TTG ATG GC
<i>Akap12</i>	F: GCG GGA GTA GAA GAG CCA C R: AAG TCC ACG CGC AAC TCA TA
<i>Ncam1</i>	F: TGG CCA TTC TTC TGT GGG AG R: TCT ACA GGA CCC TTC TCG GG
<i>Fbln2</i>	F: GGC TCT GAA TGC GTG GAT GT R: AAC ACA ATT GGC CCT CAC CA
<i>Mfap4</i>	F: GAG TAC TGG CTG GGG CTG R: AAG TCC ACG CGC AAC TCA TA
<i>Cadm4</i>	F: ACG CTC ACT GTC TTA GTG GC R: CTC CTT TCA GCT CCT TGC GA
<i>Acta2</i>	F: TAA GGC CAA CCG GGA GAA AA R: CAG AGT CCA GCA CAA TAC CAG TTG

比对, 退火温度设为60 °C, 跨越至少1个内含子, 引物序列如表1所示。

1.2.7 Western blot实验 当VICs汇合度达80%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化后接种至6孔板中, 贴壁过夜, 次日将培养基分别更换为含有0.5、1、5、10 ng/mL TGF- β 1的新培养基, 并同时设置未处理组, 继续培养细胞48 h。弃培养基, 用PBS洗3次, 每孔加入80 μ L RIPA, 冰上裂解30 min。采用BCA法进行蛋白质定量。每组取蛋白质20 μ g并将其分别加入1 $\times$ 上样缓冲液中, 沸水浴10 min。预制胶放入电泳槽, 加入电泳液, 将变性蛋白样品混匀后上样, 每孔蛋白上样量为20 μ g, 加入预染蛋白Marker作为分子量标志。蛋白电泳参数设置为恒压170 V、1 h。转膜参数为4 °C下湿转、恒流240 mA、4 h。5% BSA封闭, 取出PVDF膜用TBST洗5 min, 放置摇床上常温封闭1 h。一抗(均以1:500稀释)4 °C孵育过夜, 次日以TBST洗膜, 5 min/次, 共3次。加入HRP标记的二抗(以1:2 000稀释), 常温避光慢摇1 h。二抗结合后, TBST洗膜, 5 min/次, 共3次。膜晾干后加入ECL发光液, 进行曝光, 并用ImageJ 1.8.0软件分析条带灰度值。

1.2.8 统计学分析 蛋白质组学分析采用NCBI BLAST、Blast2GO Command Line、KAAS、Cluster3.0、Java Trewview、Gene Symbol软件进行。各项实验至少重复3次, 采用Prism 8.1软件分析结果。结果数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两两比对

用 t 检验, 组间比较利用单因素方差分析, 当 $P<0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠原代VICs细胞的培养及表型鉴定

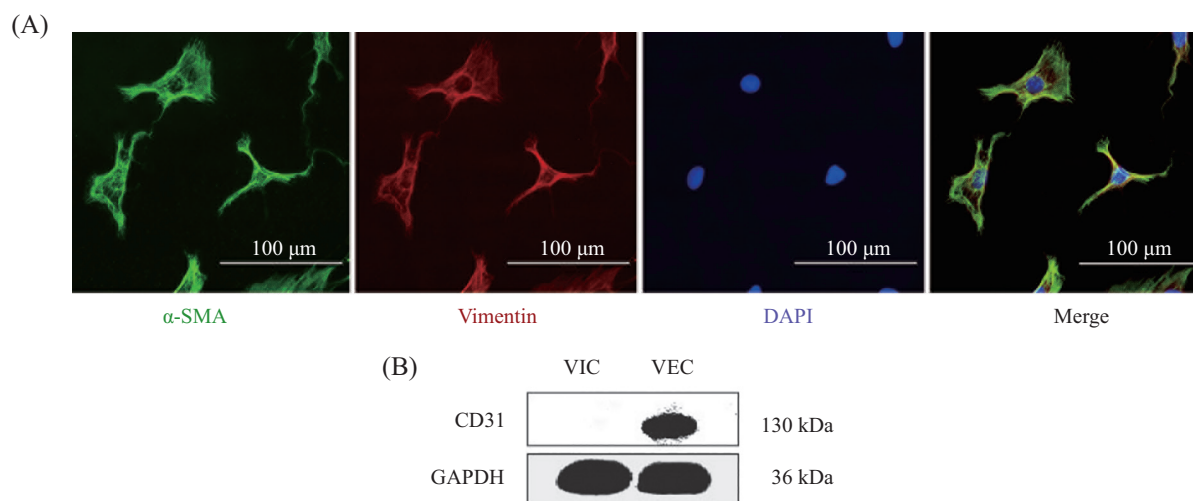
大鼠瓣膜组织经II型胶原酶消化贴壁培养1天后可见散在细胞, 用 α -SMA和波形蛋白Vimentin抗体对分离的细胞进行免疫荧光检测, 由图1A可见, 细胞中VICs标志分子 α -SMA(绿色)和Vimentin(红色)表达均为阳性。为验证分离到的VICs中无瓣膜内皮细胞干扰, 通过Western blot法检测分离到的VICs中内皮细胞标志物CD31的表达, 由图1B可知, 获得的原代VICs无明显内皮细胞污染, 可用于后续研究。

2.2 TGF- β 1作用浓度的确定

如图2所示, 与未处理组对比, VICs活化标志蛋白 α -SMA表达水平与TGF- β 1作用浓度之间呈现显著的剂量依赖关系, 当作用浓度达到5 ng/mL时, α -SMA表达水平升高趋势趋于平缓, 浓度升至10 ng/mL时, α -SMA的表达量未见显著增加。基于此, 本研究后续采用5 ng/mL作为TGF- β 1处理VICs的作用浓度。

2.3 蛋白质组学鉴定结果

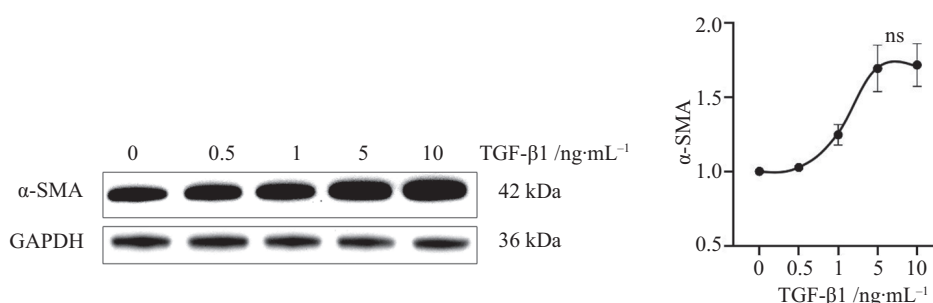
如图3所示, 标记后的蛋白样品经肽段分析共得到可定量蛋白7 104个。与未处理组相比, 以差异倍数(fold change, FC) ≥ 1.20 或FC ≤ 0.83 , 且 $P<0.05$ 的标准进行表达显著性差异蛋白的筛选, 最终获得处



A: 免疫荧光法检测 α -SMA、Vimentin在VICs中的表达; B: Western blot检测分离的VICs中VECs标志物CD31的表达, VECs细胞裂解物为阳性对照。
A: α -SMA and Vimentin expression in VICs were detected by immunofluorescence; B: VECs marker CD31 in isolated VICs was detected by Western blot, and VECs cell lysate was used as a positive control.

图1 大鼠瓣膜原代VICs的培养及表型鉴定

Fig.1 Morphological and phenotypic identification of primary rat VICs



浓度为0.5、1、5、10 ng/mL的TGF- β 1处理VICs 48 h后, Western blot 法检测VICs活化标志蛋白的水平变化。ns: 没有显著性差异。

VICs were treated with indicated dosage of TGF- β 1 for 48 h, and Western blot was used to check the level of VICs activation marker α -SMA. ns: no significant difference.

图2 不同浓度TGF- β 1处理VICs后活化标志 α -SMA表达的变化

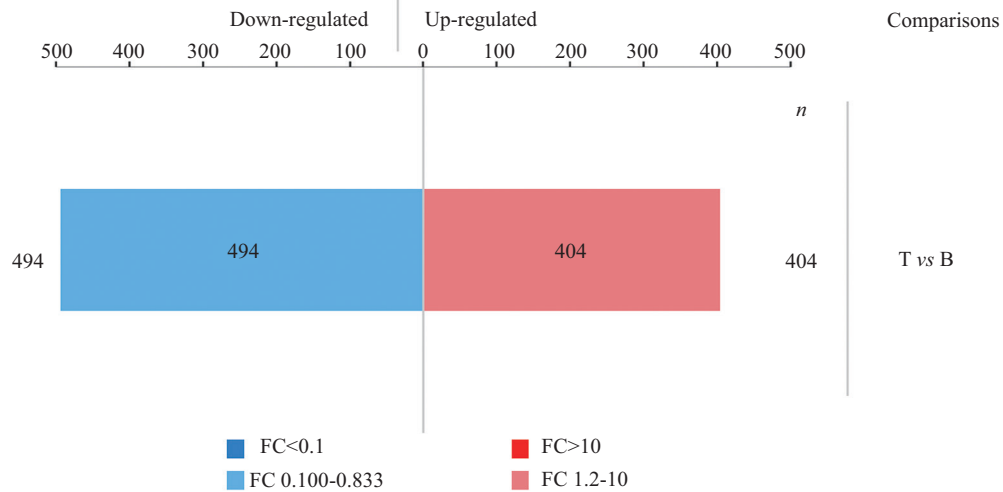
Fig.2 The expression change of VICs activation marker α -SMA post treatment with different concentrations of TGF- β 1

理组上调蛋白404个和下调蛋白494个, 共898个差异蛋白。

2.3.1 差异蛋白GO功能富集分析 本研究针对鉴定出的差异蛋白进行了GO功能富集分析, 以比较VICs活化前后蛋白质在功能方面的变化。注释到蛋白数量最多的前20个GO条目如图4所示, 生物过程(biological process, BP)分类中, 差异蛋白主要富集在多细胞生物过程(multicellular organismal process)、发育过程(developmental process)、解剖结构发育(anatomical structure development)等条目中; 功能归类(molecular function, MF)分类中, 差异蛋白主要富集在DNA结合(DNA binding)、染色质结合(chromatin binding)等条目中; 细胞组分(cellular component, CC)

分类中, 差异蛋白主要富集于细胞外区域(extracellular region)、细胞外空间(extracellular region part)中。
2.3.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析 对差异显著的上调和下调蛋白进行蛋白质相互作用分析, 由图5和图6可见, 上调蛋白中连接度较高的蛋白主要为ECM蛋白、细胞骨架蛋白以及细胞表面受体等, 而下调蛋白中联系密切的蛋白质多与DNA复制相关。

2.3.3 KEGG通路注释分析 根据比较组之间差异蛋白在KEGG数据库中的注释结果, 如图7所示, 归类到DNA复制(DNA replication)、错配修复(mismatch repair)、黏着斑通路(focal adhesion pathway)、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶通路(PI3K/Akt signaling path-

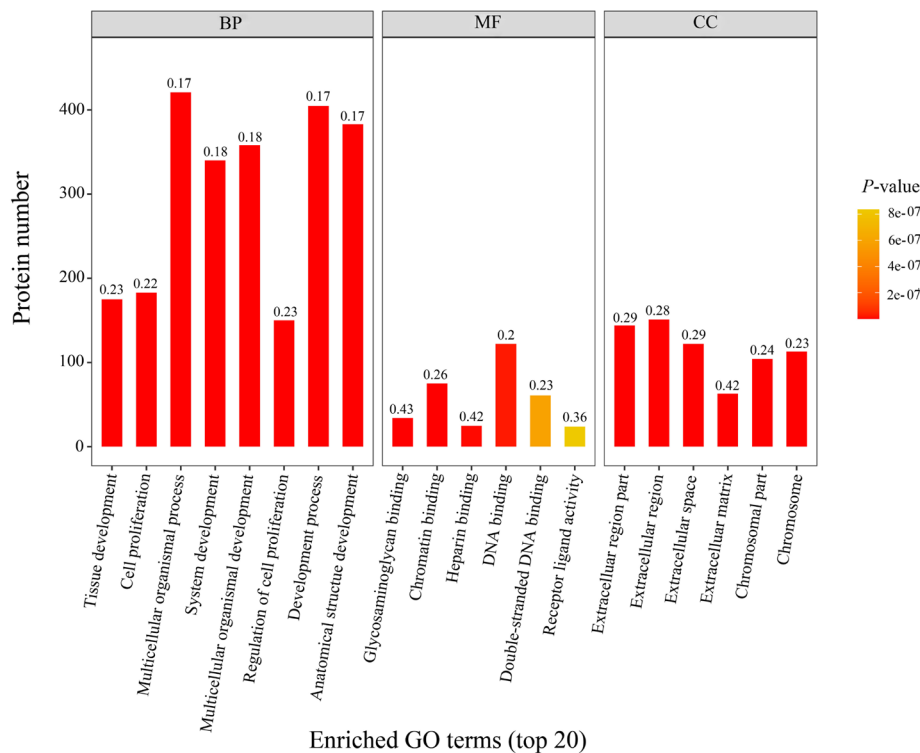


T: 处理组; B: 空白组(未处理组)。

T: treated group; B: blank group (untreated group).

图3 差异蛋白数量统计图

Fig.3 Diagram of numbers of differentially expressed proteins



Enriched GO terms (top 20)

柱状图上方数字为富集因子, 表示该GO条目下注释到的差异蛋白数目与该条目下总可定量蛋白数目之间的比值。

The number on the top of the column represents rich factor, which is the ratio of the number of related differential protein sets to all quantifiable protein sets for this GO term.

图4 差异蛋白GO功能富集分类统计图

Fig.4 GO function enrichment analysis of differentially expressed proteins

way)、细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、ECM-受体相互作用(ECM-receptor interaction)等通路中的差异蛋白数目最多。

2.3.4 重点差异蛋白的筛选 表2、表3所示为筛选整理出的重点差异蛋白, 经相关研究文献检索, 并结合GO功能、KEGG通路以及蛋白相互作用网络预测的结果, 我们对获得的差异蛋白进行进一步



Fig.5 PPI (protein-protein interaction network) analysis of up-regulated proteins



Fig.6 PPI (protein-protein interaction network) analysis of down-regulated proteins

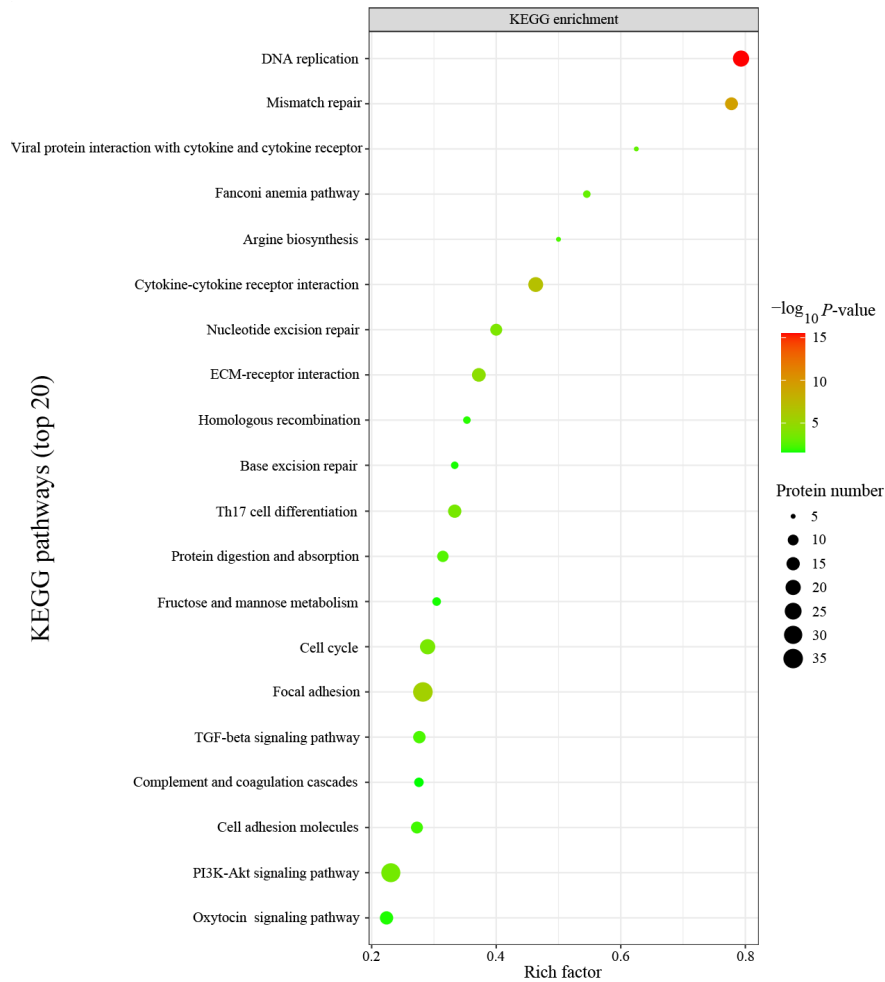


图7 KEGG通路富集气泡图

Fig.7 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

分析,筛选出AKAP12、MFAP4、FBLN2、NCAM1和CADM4等5种可能与VICs活化有关的新型候选蛋白。

2.4 qRT-PCR和 Western blot法验证差异蛋白AKAP12、FBLN2、NCAM1、MFAP4、CADM4的表达变化

为验证上述候选差异蛋白的表达变化,本研究通过qRT-PCR和 Western blot方法检测了TGF- β 1处理后它们在转录以及蛋白水平的变化。表4所示为VICs经TGF- β 1处理48 h后的转录水平变化,与未处理组对比,处理组的*Fbln2*、*Ncam1*、*Cadm4*基因转录水平显著升高($P < 0.01$),*Akap12*、*Mfap4*水平也有明显升高($P < 0.05$)。图8A与图8B分别为各差异蛋白的Western blot结果与相对定量统计分析结果,相比于未处理组,处理组各蛋白表达水平均显著升高。以上证实在TGF- β 1的作用下,上述候选蛋白的表达

上调趋势与蛋白组学结果一致,表明本研究中蛋白组学分析获得的数据是可靠的。

3 讨论

基于iTRAQ的蛋白组学是时下新兴的一门检测蛋白质变化的高通量技术,能够灵敏地捕捉细胞或组织中蛋白质的表达变化,从而发掘出可能影响病理进程的关键蛋白分子^[10]。已有学者利用人主动脉瓣膜狭窄组织进行蛋白组学研究,但其组织内部严重钙化^[11],这对于初期瓣膜病变的研究价值较为有限,而以原代VICs为研究对象进行的活化相关蛋白筛选,可为早期瓣膜病变的发生机制提供理论支持。研究表明,TGF- β 1是调控VICs活化的强大诱导因子,并可在此基础上发挥其促进瓣膜纤维化的作用^[12-13]。TGF- β 1通过与潜伏相关肽(latency-associated peptide, LAP)及潜在TGF- β 结

表2 部分上调蛋白列表
Table 2 Partial list of up-regulated proteins

蛋白编号 Ensembl ID	蛋白全称 Protein description	基因名称 Gene name	差异倍数 Fold change	P值 P-value
ENSRNOP00000040819	Stratifin	<i>Sfn</i>	3.16	<0.01
ENSRNOP00000025314	Nestin	<i>Nes</i>	2.65	<0.01
ENSRNOP00000009448	C-C motif chemokine ligand 2	<i>Ccl2</i>	2.02	<0.01
ENSRNOP00000026793	Cell adhesion molecule 4	<i>Cadm4</i>	1.97	<0.01
ENSRNOP00000063496	Annexin A3	<i>Anxa3</i>	1.95	<0.01
ENSRNOP00000009696	Fibulin 2	<i>Fbln2</i>	1.91	<0.01
ENSRNOP00000061595	Collagen type XI alpha 1 chain	<i>Col11a1</i>	1.90	<0.01
ENSRNOP00000074059	Transforming growth factor, beta 2	<i>Tgfb2</i>	1.79	<0.01
ENSRNOP00000010620	Semaphorin7A	<i>Sema7a</i>	1.74	<0.01
ENSRNOP00000056846	Cytokine receptor-like factor 1	<i>Crlf1</i>	1.70	<0.01
ENSRNOP00000019272	Inhibin subunit beta A	<i>Inhba</i>	1.65	<0.05
ENSRNOP00000019772	Fibronectin 1	<i>Fn1</i>	1.63	<0.01
ENSRNOP00000071884	Tenascin C	<i>Tnc</i>	1.62	<0.01
ENSRNOP00000075422	Collagen type XII alpha 1 chain	<i>Col12a1</i>	1.60	<0.01
ENSRNOP00000026483	A-kinase anchoring protein 12	<i>Akap12</i>	1.53	<0.01
ENSRNOP00000003268	Microfibril associated protein 4	<i>Mfap4</i>	1.50	<0.01
ENSRNOP00000048442	Neural cell adhesion molecule 1	<i>Ncam1</i>	1.46	<0.01
ENSRNOP00000024084	Actin, alpha 1, skeletal muscle	<i>Acta1</i>	1.39	<0.05

表3 部分下调蛋白列表
Table 3 Partial list of down-regulated proteins

蛋白编号 Ensembl ID	蛋白全称 Protein description	基因名称 Gene name	差异倍数 Fold change	P值 P-value
ENSRNOP00000022585	Angiopoietin-like 2	<i>Angptl2</i>	0.42	<0.01
NSRNOP00000068781	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5	<i>Adamts5</i>	0.49	<0.01
ENSRNOP00000008361	Matrilin 2	<i>Matn2</i>	0.52	<0.01
ENSRNOP00000059574	C-X-C motif chemokine ligand 12	<i>Cxcl12</i>	0.58	<0.05
ENSRNOP00000006070	Decorin	<i>Dcn</i>	0.63	<0.01
ENSRNOP00000016389	Transforming growth factor, beta induced	<i>Tgfb1</i>	0.64	<0.01
ENSRNOP00000071970	Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	<i>Tinagl1</i>	0.67	<0.05
ENSRNOP00000020919	Serpin family E member 2	<i>Serpine2</i>	0.68	<0.01
ENSRNOP00000063778	Collagen type XIV alpha 1 chain	<i>Col14a1</i>	0.70	<0.01
ENSRNOP00000000211	von Willebrand factor A domain containing 5A	<i>Vwa5a</i>	0.72	<0.01
ENSRNOP00000006055	C-type lectin domain family 3, member B	<i>Clec3b</i>	0.73	<0.05
ENSRNOP00000022128	C-X3-C motif chemokine ligand 1	<i>Cx3cl1</i>	0.73	<0.01
ENSRNOP00000037441	Kinesin family member 20A	<i>Kif20a</i>	0.74	<0.01
ENSRNOP00000027860	HtrA serine peptidase 1	<i>Htra1</i>	0.75	<0.01

合蛋白(latent TGF-β binding protein, LTBP)结合以无活性的复合物形式存在于组织中,而胞外的多种ECM、蛋白酶或细胞表面黏附分子等与该复合物的相互作用则可介导TGF-β1的释放,从而帮助有活性的TGF-β1发挥作用^[14]。VICs的活化进程中本研究利用蛋白组学的方法检测了TGF-β1处理前后

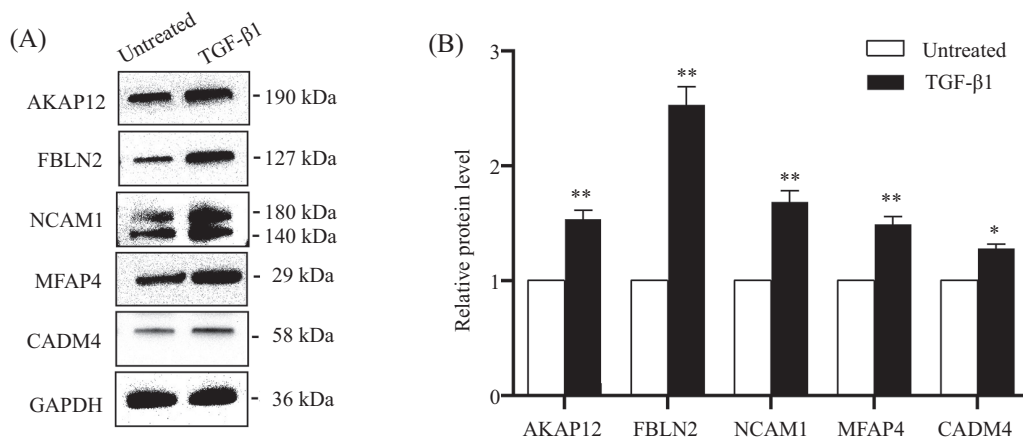
VICs蛋白表达的差异,通过多种生物信息学分析,发现差异蛋白主要定位在胞外区域,对差异蛋白进行蛋白质相互作用分析显示上调蛋白中大多数为ECM相关蛋白、细胞骨架蛋白及细胞表面受体相关蛋白等,它们所构成的网络对胞外的机械应力信号的转导以及VICs的进一步活化至关重要,而它

表4 TGF- β 1对差异蛋白转录水平的影响Table 4 The transcriptional changes of differentially expressed proteins after TGF- β 1 treatment

基因名 Gene	差异倍数 Fold change
<i>Akap12</i>	1.59 $\pm$ 0.12*
<i>Fbln2</i>	4.26 $\pm$ 0.35**
<i>Ncam1</i>	6.47 $\pm$ 0.37**
<i>Mfap4</i>	1.57 $\pm$ 0.13*
<i>Cadm4</i>	8.37 $\pm$ 0.72**

TGF- β 1(5 ng/mL)处理VICs 48 h后,通过qRT-PCR法检测各基因转录水平。以*Gapdh*为内参基因, * P <0.05, ** P <0.01, 与未处理组相比。

VICs were treated with TGF- β 1 (5 ng/mL) for 48 h, and then the transcription level of indicated genes were detected by qRT-PCR. *Gapdh* was used as the internal reference gene. * P <0.05, ** P <0.01 compared with untreated group.



A: Western blot法验证 TGF- β 1(5 ng/mL)处理 VICs 48 h后各蛋白表达水平的变化; B: Western blot相对定量结果分析, 以 GAPDH 为内参。 * P <0.05, ** P <0.01, 与未处理组相比。

A: VICs were treated with TGF- β 1 (5 ng/mL) for 48 h and protein levels were validated by Western blot; B: quantitative analysis of Western blot results. GAPDH was used as the internal reference. * P <0.05, ** P <0.01 compared with untreated group.

图8 Western blot法验证TGF- β 1对差异蛋白表达水平的影响Fig.8 Validation of changes in protein levels of differentially expressed proteins after TGF- β 1 treatment by Western blot

们与TGF- β 1之间存在的正反馈调控则可能在VICs活化进程中发挥重要作用。综合差异表达蛋白的生物学信息分析结果以及研究的新颖性,我们对上调蛋白进行了进一步筛选,重点关注了AKAP12、FBLN2、NCAM1、MFAP4、CADM4等5种蛋白。

激酶锚定蛋白12(A-kinase anchor protein 12, AKAP12)属于支架蛋白家族成员,具有结合锚定蛋白激酶A、C以及磷酸酶的能力,从而协调磷酸化与去磷酸化等信号转导过程^[14-15]。氧化应激是促使纤维化发生的重要因素,过表达人心肌成纤维细胞中的AKAP12可以显著降低氧化应激水平,提示AKAP12可能在心肌纤维化进程中具有保护作用,而本研究发现TGF- β 1可显著上调AKAP12的表达,其是否参与VICs活化值得探讨。

腓骨蛋白(fibulin 2, FBLN2)为一种ECM糖蛋白,

隶属于纤维蛋白家族,广泛存在于纤维结缔组织中,可通过桥接弹力素与原纤维蛋白构成微丝纤维结构,进而促进弹力纤维的正确组装与成熟^[16]。FBLN2可通过与其他ECM成分如蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖等结合,为细胞分化及迁移提供可靠的微环境,促进心脏瓣膜、心肌及血管等组织的形成^[17]。IBRAHIM等^[18]有关肥厚型心肌病的研究结果显示,与正常心肌相比,病变心肌内的心肌间质成纤维细胞FBLN2与TGF- β 1的水平均有显著升高,二者在心肌组织中的分布高度重合,而敲低FBLN2水平则可有效减轻血管紧张素II介导的心肌肥大,并通过影响TGF- β 1的分泌和下游信号通路的激活延缓心肌纤维化的进展^[19]。以上研究提示,FBLN2作为ECM蛋白,可通过多种机制影响细胞分化、迁移等生物学过程。

神经细胞黏附分子1(neural cell adhesion mol-

ecule 1, NCAM1)是免疫球蛋白分子超家族成员, 主要调控神经组织和骨骼肌内的细胞黏附^[20-21]。心血管系统发育初期, NCAM1可促进心房壁和心室壁的分化、房间隔与心内膜垫的融合以及心室小梁的形成和重塑^[22]。在扩张性心肌病、心肌梗死和高血压诱发的心力衰竭中, 纤维化或梗死区域的心肌中NCAM1呈强表达, 且在心肌重塑过程中NCAM1表达显著上调^[23-24]。此外, 已有研究表明在小鼠胚胎成纤维细胞内, TGF- β 1可促进NCAM1的表达进而调控细胞间黏附和胚胎发育^[25], 以上研究也提示NCAM1可能与VICs活化密切相关。

微纤维相关糖蛋白4(microfiber-associated protein 4, MFAP4)是一种ECM蛋白, 为纤维蛋白原相关蛋白超家族成员。MFAP4主要由血管平滑肌细胞产生, 并在心肺血管中高度富集^[26]。MFAP4被认为是心血管疾病关联的生物标志物之一, 敲除MFAP4可减轻心脏纤维化和心室重塑^[27-28]。MFAP4主要通过钙依赖的方式与弹力素特异性结合, 并可作为弹力素与原纤维蛋白的桥接分子, 引导弹力素沉积到微纤维上, 促进胶原纤维的沉积和ECM重塑^[29]。MFAP4上调可促进纤维化进程, 提示其在纤维化初期VICs活化进程中可能发挥重要作用。

细胞黏附分子4(cell adhesion molecule 4, CADM4)作为免疫球蛋白超家族成员, 在细胞表面充当黏附分子^[30]。在斑马鱼的发育模型中, CADM4的表达决定心脏流出道(outflow tract, OFT)的形成, CADM4上调OFT则增大延长, CADM4下降OFT则缩小变短, 且CadM4已被作为先天性心脏病的易感基因, 表明其对于心脏的形成和病变有重要作用, 但并未见其与心脏瓣膜或TGF- β 1的相关报道^[31-32], 而我们的结果显示TGF- β 1处理的VICs中CADM4的表达水平约是未处理细胞的2倍, 表明其是TGF- β 1的下游蛋白, 但对于CADM4是否参与VICs活化还有待进一步探究。

综上所述, 本研究基于iTRAQ蛋白组学较为全面地分析了TGF- β 1诱导VICs活化前后蛋白表达差异, 挖掘出AKAP12、FBLN2、NCAM1、MFAP4以及CADM4等可能参与VICs活化调控的潜在蛋白分子, 下一步将采用过表达或敲低目的基因的方法研究上述蛋白对VICs活化的影响以及它们调控VICs活化的具体分子机制。本研究为阐明VICs活化的分子机制提供了新的候选蛋白, 并为VHD的防治提供了潜在靶点和研究方向。

参考文献 (References)

- [1] FLORA G D, NAYAK M K. A brief review of cardiovascular diseases, associated risk factors and current treatment regimens [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(38): 4063-84.
- [2] SAAD A M, KASSIS N, ISOGAI T, et al. Trends in outcomes of transcatheter and surgical aortic valve replacement in the United States (2012-2017) [J]. *Am J Cardiol*, 2021, 141: 79-85.
- [3] THEOCHARIS A D, SKANDALIS S S, GIALELI C, et al. Extracellular matrix structure [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4-27.
- [4] JENKE A, KISTNER J, SARADAR S, et al. Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(5): H1123-41.
- [5] PERRUCCI G L, ZANOBINI M, GRIPARI P, et al. Pathophysiology of aortic stenosis and mitral regurgitation [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(3): 799-818.
- [6] BRIOSCHI M, BAETTA R, GHILARDI S, et al. Normal human mitral valve proteome: a preliminary investigation by gel-based and gel-free proteomic approaches [J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(20): 2633-43.
- [7] DOAN N D, DICHIARA A S, DEL ROSARIO A M, et al. Mass spectrometry-based proteomics to define intracellular collagen interactomes [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1944: 95-114.
- [8] LI W, ZENG Z, GUI C, et al. Proteomic analysis of mitral valve in Lewis rat with acute rheumatic heart disease [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14151-60.
- [9] WIŚNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-62.
- [10] CHEN X L, SUN Y P, ZHANG T T, et al. Quantitative proteomics using isobaric labeling: a practical guide [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19(5): 689-706.
- [11] SCHLOTTER F, HALU A, GOTO S, et al. Spatiotemporal multi-omics mapping generates a molecular atlas of the aortic valve and reveals networks driving disease [J]. *Circulation*, 2018, 138(4): 377-93.
- [12] LODYGA M, HINZ B. TGF- β 1: a truly transforming growth factor in fibrosis and immunity [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 101: 123-39.
- [13] LIU Y, YIN Z, XU X, et al. Crosstalk between the activated Slit2-Robo1 pathway and TGF- β 1 signalling promotes cardiac fibrosis [J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(1): 447-60.
- [14] ROBERTSON I B, HORIGUCHI M, ZILBERBERG L, et al. Latent TGF- β -binding proteins [J]. *Matrix Biol*, 2015, 47: 44-53.
- [15] NEWLON M G, ROY M, MORIKIS D, et al. The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(3): 222-7.
- [16] DIVIANI D, REGGI E, ARAMBASIC M, et al. Emerging roles of A-kinase anchoring proteins in cardiovascular pathophysiology [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(7 Pt B): 1926-36.
- [17] KOBAYASHI N, KOSTKA G, GARBE J H O, et al. A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(16): 11805-16.
- [18] ZHANG H Y, TIMPL R, SASAKI T, et al. Fibulin-1 and fibu-

- lin-2 expression during organogenesis in the developing mouse embryo [J]. *Dev Dyn*, 1996, 205(3): 348-64.
- [19] IBRAHIM A M, ROSHDY M, ELSHORBAGY S, et al. An investigation of Fibulin-2 in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): E7176.
- [20] ZHANG H, WU J, DONG H, et al. Fibulin-2 deficiency attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by reducing transforming growth factor- β signaling [J]. *Clin Sci*, 2014, 126(4): 275-88.
- [21] GRUMET M, RUTISHAUSER U, EDELMAN G M. Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells *in vitro* [J]. *Nature*, 1982, 295(5851): 693-5.
- [22] EDELMAN G M. Cell adhesion molecules in neural histogenesis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1986, 48: 417-30.
- [23] BURROUGHS C L, WATANABE M, MORSE D E. Distribution of the neural cell adhesion molecule (NCAM) during heart development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1991, 23(12): 1411-22.
- [24] NAGAO K, SOWA N, INOUE K, et al. Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy [J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(2): 351-8.
- [25] ARNETT D K, MEYERS K J, DEVEREUX R B, et al. Genetic variation in NCAM1 contributes to left ventricular wall thickness in hypertensive families [J]. *Circ Res*, 2011, 108(3): 279-83.
- [26] ROUBIN R, DEAGOSTINI-BAZIN H, HIRSCH M R, et al. Modulation of NCAM expression by transforming growth factor-beta, serum, and autocrine factors [J]. *J Cell Biol*, 1990, 111(2): 673-84.
- [27] ONG S L M, DE VOS I J H M, MEROSHINI M, et al. Microfibril-associated glycoprotein 4 (Mfap4) regulates haematopoiesis in zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11801.
- [28] WULF-JOHANSSON H, LOCK JOHANSSON S, SCHLOSSER A, et al. Localization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) in human tissues: clinical evaluation of serum MFAP4 and its association with various cardiovascular conditions [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82243.
- [29] WANG H B, YANG J, SHUAI W, et al. Deletion of microfibrillar-associated protein 4 attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in heart failure [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(17): e015307.
- [30] PILECKI B, HOLM A T, SCHLOSSER A, et al. Characterization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) as a tropoelastin- and fibrillin-binding protein involved in elastic fiber formation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(3): 1103-14.
- [31] MAUREL P, EINHEBER S, GALINSKA J, et al. Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(5): 861-74.
- [32] ZENG X X, YELON D. Cadm4 restricts the production of cardiac outflow tract progenitor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 951-60.