

硫酸羟氯喹治疗狼疮性肾炎过程中肾小球内蛋白质表达谱的变化

李艳秋,王海潮,郑晓杰,刘晓丹,刘雪,田淑艳,姚丽
(中国医科大学附属第一医院肾脏内科,沈阳 110001)

摘要 **目的** 筛选硫酸羟氯喹(HCQ)在治疗狼疮性肾炎(LN)过程中肾小球内差异表达的蛋白。**方法** 60只雌性NZB/WF1小鼠饲养至28周龄时,选择蛋白尿3+~4+的40只小鼠,将其分为HCQ组和对照组。饲养至36周时,经胸主动脉灌注磁珠分离肾小球蛋白,应用双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析和鉴定差异表达蛋白,应用免疫组织化学染色验证候选蛋白在2组小鼠肾小球中的表达。**结果** HCQ组和对照组相比共筛选出31个差异表达蛋白,包括24个上调蛋白和7个下调蛋白。**结论** HCQ治疗LN过程中RI和ENOA等蛋白在肾小球内表达差异明显,这些蛋白可能参与LN肾小球病变的发生和发展,是HCQ治疗LN的潜在靶点。

关键词 肾小球;狼疮性肾炎;蛋白质组学;双向电泳

中图分类号 R692.3 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)05-0401-04

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240511.1132.020>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.05.003

Changes in the protein expression profiles of glomeruli during the treatment of lupus nephritis with hydroxychloroquine sulfate

LI Yanqiu, WANG Haichao, ZHENG Xiaojie, LIU Xiaodan, LIU Xue, TIAN Shuyan, YAO Li
(Department of Nephrology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract **Objective** To screen the differentially expressed proteins in glomeruli during the treatment of lupus nephritis (LN) with hydroxychloroquine sulfate (HCQ). **Methods** Sixty female NZB/WF1 mice were used. At the age of 28 weeks, 40 mice with proteinuria of 3+ to 4+ were divided into HCQ and control groups. After feeding for 36 weeks, the glomerular proteins were extracted by magnetic beads and analyzed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The expression of the candidate proteins in the glomeruli of the LN mice was examined by immunohistochemistry. **Results** A total of 31 differentially expressed proteins were identified between the two groups, including 24 upregulated and seven downregulated proteins. **Conclusion** The expression of proteins like RI and ENOA in the glomeruli of LN mice was significantly different during HCQ treatment. These proteins may be involved in the pathogenesis of LN and are therefore potential targets of HCQ in the treatment of LN.

Keywords glomerulus; lupus nephritis; proteomics; two-dimensional electrophoresis

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种全身性自身免疫病,涉及多个器官和多种自身抗体,主要影响育龄妇女。SLE患者的死亡风险比普通人群增加2.6倍。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是SLE的主要并发症之一,是导致终末期肾病的一个重要原因,其发病率在SLE患者确诊5年

内高达50%~70%^[1]。随着蛋白质组学技术的迅速发展^[2],近年来许多学者再次将疾病的研究重点放在蛋白质上。本研究探讨了硫酸羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)治疗LN过程中肾小球内蛋白质组学的变化,为LN的早期治疗寻找生物标志物。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

HCQ,购自中国康乐制药有限公司;Aurum 血清蛋白小型试剂盒,购自美国Bio-Rad公司;Ettan IPGphor 3等电聚焦系统、Ettan DALTsix 垂直电泳仪、Ettan spot picker全自动斑点切取系统、Typhoon

基金项目:国家自然科学基金(81273107);沈阳市科技计划(211-173-9-67)

作者简介:李艳秋(1970-),女,教授,博士。

通信作者:李艳秋, E-mail: liyanqiu19700929@163.com

收稿日期:2023-10-02

网络出版时间:2024-05-14 14:53:45

Trio扫描仪、DeCyder差异分析软件购自美国GE Healthcare公司;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)仪,购自德国Bruker公司。

1.2 实验动物和分组

60只NZB/W F1小鼠,雌性,8周龄,SPF级,购自美国Jackson动物中心。小鼠饲养在中国医科大学动物部SPF级动物房,温度(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 20)%,予以12 h交替照明。根据国家标准GB14925-2010的规定,所有小鼠均可自由进食、饮水。动物实验通过中国医科大学动物保护与使用委员会批准(编号:2019101)。

每周使用蛋白试纸(桂林优利特公司)检测新鲜尿液标本,根据尿蛋白情况监测肾脏疾病。尿蛋白 $10 \sim <30$ mg/dL,为蛋白尿 \pm ;尿蛋白 $30 \sim <100$ mg/dL,为蛋白尿 $+$;尿蛋白 $100 \sim <300$ mg/dL,为蛋白尿 $2+$,尿蛋白 $300 \sim <1\ 000$ mg/dL,为蛋白尿 $3+$;尿蛋白 $\geq 1\ 000$ mg/dL,为蛋白尿 $4+$ 。在重复试验中,尿蛋白 ≥ 300 mg/dL,为蛋白尿 $4+$ 。在重复试验中,尿蛋白 ≥ 300 mg/dL,为重型LN;尿蛋白 <300 mg/dL,为轻型LN^[3]。在小鼠28周龄时,将40只重型LN小鼠分为HCQ组和对照组,每组20只。HCQ组给与HCQ $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,对照组给予等量生理盐水灌胃^[4]。

1.3 方法

1.3.1 肾小球分离:在小鼠36周龄时,1%戊巴比妥钠($30 \sim 40$ mg/kg)腹腔注射麻醉。经胸主动脉灌注磁珠(美国Dynal公司)进入肾脏中,分离肾小球^[5]。采用2-D Clean-up Kit(美国GE Healthcare公司)纯化肾小球蛋白,采用2-D Quant Kit(美国GE Healthcare公司)测定蛋白含量。

1.3.2 双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE):蛋白质样品用CyDyes(美国GE Healthcare公司)标记。将HCQ组和对照组小鼠肾小球的可溶性蛋白质样品 $50\ \mu\text{g}$,分别用 $400\ \text{pmol}$ 的Cy3或Cy5标记。Cy2用于标记内参,内参是指所有样本等量混合后平均分至各张胶的样本量。黑暗中反应30 min,相同条件下加入 $1\ \mu\text{L}$ 赖氨酸($10\ \text{mmol/L}$,美国FLUKA公司)以终止反应。采用Ettan IPGphor 3进行等电聚焦程序,采用Ettan DALTsix system进行垂直电泳(12.5% SDS-PAGE)。

1.3.3 蛋白凝胶染色:采用SYPRO Ruby蛋白凝胶染色(美国Thermo Fisher公司),根据说明书操作。

1.3.4 图像采集分析:将凝胶放入Typhoon Trio扫描仪中采集图像。将图像储存在计算机内,采用DeCyder差异分析软件进行分析,将表达差异1.5倍以上的蛋白点标记为差异点。扫描每张胶上的所有蛋白点,进行胶内分析,然后将不同胶上的同一个蛋白点与内标匹配进行胶间分析,对匹配后的每个蛋白点相对量进行比较后(Cy3/Cy2或Cy5/Cy2),确定差异蛋白。

1.3.5 MALDI-TOF-MS分析:经过挖点、酶解、点靶后,采用Flex3.0软件获得蛋白质斑点的肽和指纹图谱。应用Flex3.0软件, Mascot搜索引擎,在SWISS-PROT数据库(<http://www.matrixscience.com>)中检索蛋白质。

1.3.6 免疫组织化学染色:选择核糖核酸酶抑制剂(ribonuclease inhibitor, RI)和 α -烯醇化酶(α -enolase, ENOA)作为候选蛋白。石蜡切片脱蜡,梯度水化,高温高压修复。滴加一抗anti-RI, anti-EONA抗体(美国Santa公司), $4\ ^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。滴加生物素标记的二抗, $37\ ^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。 $100\ \mu\text{L}$ DAB(北京索莱宝科技有限公司)显色,苏木素(北京索莱宝科技有限公司)复染。梯度乙醇再次脱水,中性树脂封片。

1.3.7 肾脏病理学观察:36周时处死小鼠,立即留取肾皮质,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,分别按照HE染色试剂盒(北京索莱宝试剂有限公司)、PAS染色试剂盒(北京索莱宝试剂有限公司)、Masson染色试剂盒(福州迈鑫生物科技发展有限公司)说明书进行HE、PAS、Masson染色。常规脱水、透明、中性树脂封片,在光学显微镜下观察肾皮质的病理变化。

2 结果

2.1 LN小鼠肾脏病理学变化

对照组小鼠肾脏呈现典型的弥漫增生性肾小球肾炎,肾小球系膜细胞明显增生,大量中性粒细胞浸润,系膜基质增加,甚至有部分硬化,部分区域基底膜僵硬,有局限性肾小管坏死。与对照组小鼠相比,HCQ组小鼠肾小球系膜细胞增殖减少,肾小管轻度肿胀,无变性和坏死,肾间质细胞浸润不明显。见图1。

2.2 二维蛋白质图像分析

采用Typhoon Trio扫描仪对凝胶进行分析,获得

二维差异凝胶电泳图(图2)。

2.3 差异表达蛋白MALDI-TOF-MS鉴定

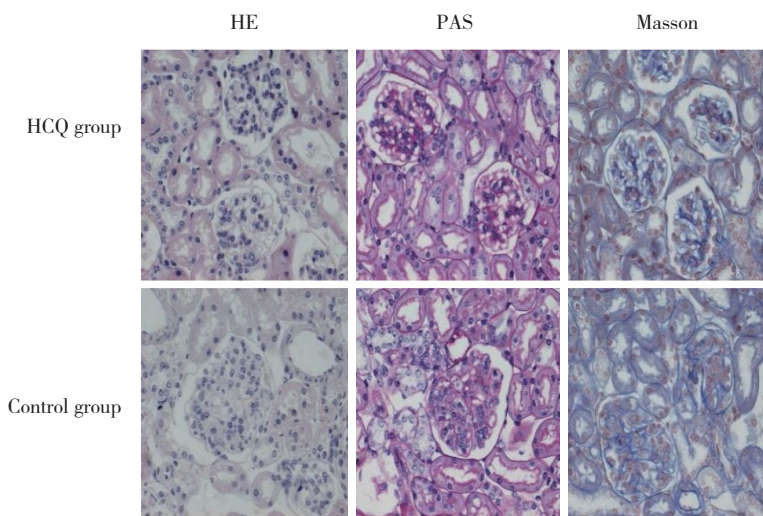
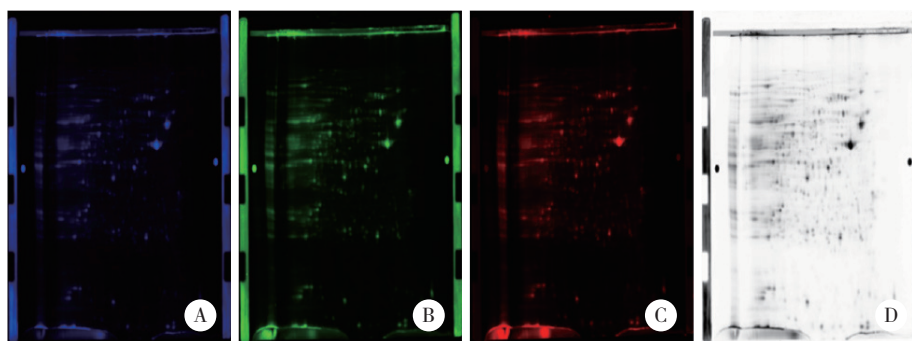


图1 HCQ对LN小鼠肾脏病理的影响 × 400

Fig.1 Effect of the HCQ treatment on renal pathology in mice with LN × 400



A, dyed blue image using Cy2 as the internal standard; B, dyed green image using Cy3 in the HCQ group; C, dyed red image using Cy5 in the control group; D, superposition of three fluorescence channels (Cy3, CY5, and Cy2).

图2 2D-DIGE图像

Fig.2 The images of the two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis

采用DeCyder软件分析每张胶,得到4 367个蛋白点,使用Ettan spot picker去除受损的胶粒。HCQ组与对照组比较,获得LDHD、VATA、FEN1、PDAI3、UTP20、ENOA、SYDC、CALU、ACTB、PNPH、SPRE、GPX3、DDX6、UBP15、CC110、TP3CL、RSSA、COPE、TPMT、DIAP3、DHRS1、PTX3、PRDX1、ATG4D共24个表达下调的蛋白和SYDC、RI、TBX6、ATG4D、PDIA1、SBP1、PSME2共7个表达上调的蛋白(蛋白表达差异1.5倍, $P < 0.05$)。

2.4 免疫组织化学染色检测RI和ENOA表达

免疫组织化学染色结果(图3)显示,RI和ENOA

呈棕黄色或棕褐色颗粒,在肾脏组织中均有表达。与对照组相比,治疗组小鼠肾小球内RI阳性颗粒数目多,着色明显增强,说明治疗组RI表达较对照组多;治疗组小鼠肾小球内ENOA表达阳性颗粒数目较少,着色较浅,说明治疗组ENOA表达较少。这与质谱鉴定的差异表达蛋白一致。

3 讨论

LN是SLE最严重的损害之一。体液和细胞免疫参与了LN的发病机制,包括形成免疫复合物的各种自身抗体,激活的B细胞、浸润性T细胞、巨噬细胞

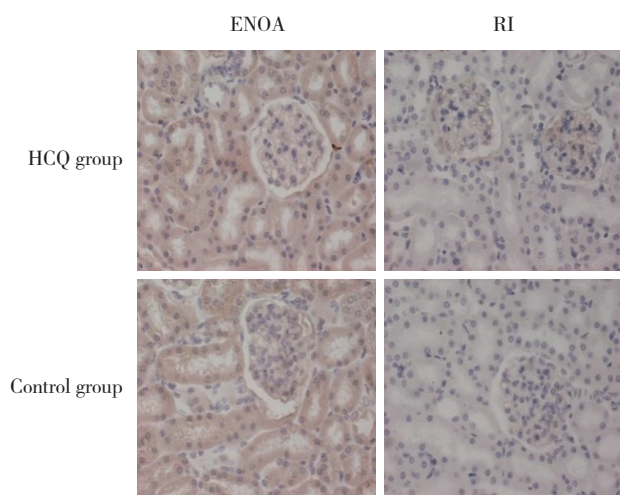


图3 ENOA和RI在LN小鼠肾小球内的表达 ×400

Fig.3 Expression of EONA and RI in the glomeruli of mice with LN ×400

释放,嗜中性粒细胞失调等。近年来,随着对SLE/LN发病机制的逐渐了解,生物制剂开始被大量用于临床,但是这些疗法仅与传统疗法联合应用时才被证明有效,且这些药物的长期不良反应有待评估。

欧洲抗风湿病联盟于2019年提出治疗应以缓解或至少降低疾病活动性和预防发作为目标^[6]。所有SLE患者都应接受HCQ治疗,适当启动免疫调节剂(甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、霉酚酸酯),在持续活动性或发作性疾病中,应考虑添加生物制剂。因此,HCQ的作用备受瞩目。HCQ治疗LN的机制尚不十分明确,本研究希望通过探讨HCQ治疗前后LN小鼠肾小球蛋白质组学的变化,了解HCQ治疗LN的机制。

NZB/W F1小鼠是新西兰黑鼠和新西兰白鼠杂交子一代,自然发生免疫复合物介导的肾小球肾炎,类似于人类弥漫性增生性LN,是经典的SLE/LN动物模型。本研究采用2D-DIGE联合MALDI-TOF-MS蛋白质组学技术,对接受HCQ治疗的LN小鼠的肾小球蛋白质变化进行研究,共筛选出31个有统计学意义的差异蛋白。HCQ组与对照组比较,肾小球内下调蛋白24个,上调蛋白7个。同时,以RI和ENOA为候选蛋白,对肾组织进行免疫组化染色,结果与蛋白质组学分析结果一致。提示这些蛋白是LN肾小球病变发生和发展的重要因素。

ENOA最初被确定为糖酵解途径的一种成分,使用ENOA抑制剂可以减轻某些症状,如降低2型糖尿病患者的血糖、低密度脂蛋白胆固醇、纤维化和细胞凋亡^[7]。多项研究表明,20%~50%的SLE患者

ENOA抗体阳性,说明SLE患者体内有ENOA抗原。BRUSCHI等^[8]通过蛋白质组学方法发现,LN患者肾脏组织中ENOA较高;未经治疗的SLE患者血清中ENOA抗体滴度和24 h尿蛋白定量高于初发患者。ENOA是一种纤溶酶原受体,能促进细胞迁移和肿瘤转移^[9]。研究^[10]发现,LN患者经过12个月的治疗,循环中ENOA抗体下降较快,且与蛋白尿减少程度平行。本研究中,HCQ治疗后小鼠肾小球内ENOA表达显著减少,这与BRUSCHI等^[8]在SLE/LN患者中发现的结果高度一致。

核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)是一类能将RNA中的核苷酸紧密结合的酶,RI通常用于阻断RNA酶的活性,如基因表达、细胞生长、分化、代谢等。因此,RI在调节RNA的寿命中起重要作用^[11]。目前,只有少数天然RI在癌症、过敏等领域被发现。人类蛋白质组分析鉴定出122种RNase。RNase与激酶、蛋白酶和表观遗传酶类似,是开发具有新机制的治疗方法的合理靶点,RI也成为改善患者预后的治疗选择^[12]。研究^[13]报道,肾盂肾炎时RI表达降低。目前,关于肾脏与RI关系的研究很少。根据RI的生理作用,推测它会影响肾脏细胞的生长、代谢、分化、细胞凋亡等。因此,它可能在SLE/LN的发生和发展中起重要作用。

综上所述,本研究采用2D-DIGE联合MALDI-TOF-MS蛋白质组学技术,分析HCQ治疗前后LN小鼠肾小球内蛋白质差异,这些蛋白可能是LN新的生物标志物,后续研究将进一步挖掘这些蛋白的功能和作用机制,为探讨SLE/LN的发病机制提供基础。

参考文献:

- [1] LEE YH, CHOI SJ, JI JD, et al. Overall and cause-specific mortality in systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis [J]. *Lupus*, 2016, 25 (7): 727-734. DOI: 10.1177/0961203315627202.
- [2] BASHANT KR, APONTE AM, RANDAZZO D, et al. Proteomic, biomechanical and functional analyses define neutrophil heterogeneity in systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80 (2): 209-218. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218338.
- [3] ZHANG D, FUJIO K, JIANG Y, et al. Dissection of the role of MHC class II A and E genes in autoimmune susceptibility in murine lupus models with intragenic recombination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (38): 13838-13843. DOI: 10.1073/pnas.0405807101.
- [4] VIRDIS A, TANI C, DURANTI E, et al. Early treatment with hydroxychloroquine prevents the development of endothelial dysfunction in a murine model of systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res*

- cancer metastasis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Aging* (Albany NY), 2020, 12 (4) : 3574-3593. DOI: 10.18632/aging.102831.
- [2] KIM J, PARK C, KIM KH, et al. Single-cell analysis of gastric pre-cancerous and cancer lesions reveals cell lineage diversity and intratumoral heterogeneity [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2022, 6 (1) : 9. DOI: 10.1038/s41698-022-00251-1.
- [3] WANG W, PAN H, REN F, et al. Targeting ASCT2-mediated glutamine metabolism inhibits proliferation and promotes apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42 (3) : BSR20212171. DOI: 10.1042/BSR20212171.
- [4] HE Z, GAO Y, LI T, et al. HepaCAM-PIK3CA axis regulates the reprogramming of glutamine metabolism to inhibit prostate cancer cell proliferation [J]. *Int J Oncol*, 2022, 60 (4) : 37. DOI: 10.3892/ijo.2022.5327.
- [5] JI C, ZHAO Y, KOU YW, et al. Cathepsin F knockdown induces proliferation and inhibits apoptosis in gastric cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2018, 26 (1) : 83-93. DOI: 10.3727/096504017X14928634401204.
- [6] QI W, YANG Z, FENG Y, et al. Gli1 regulates stemness characteristics in gastric adenocarcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2020, 15 (1) : 60. DOI: 10.1186/s13000-020-00949-5.
- [7] DI ROSA M, SANFILIPPO C, LIBRA M, et al. Different pediatric brain tumors are associated with different gene expression profiling [J]. *Acta Histochem*, 2015, 117 (4/5) : 477-485. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.02.010.
- [8] SONG L, WANG X, CHENG W, et al. Expression signature, prognosis value and immune characteristics of cathepsin F in non-small cell lung cancer identified by bioinformatics assessment [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21 (1) : 420. DOI: 10.1186/s12890-021-01796-w.
- [9] ZHENG L, CAO J, LIU L, et al. Long noncoding RNA LINC00982 upregulates CTSF expression to inhibit gastric cancer progression via the transcription factor HEY1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 320 (5) : G816-G828. DOI: 10.1152/ajpgi.00209.2020.
- [10] NIE K, CAI M. SNAT2/SLC38A2 confers the stemness of gastric cancer cells via regulating glutamine level [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67 (7) : 2948-2956. DOI: 10.1007/s10620-021-07110-2.
- [11] LI B, CAO Y, MENG G, et al. Targeting glutaminase 1 attenuates stemness properties in hepatocellular carcinoma by increasing reactive oxygen species and suppressing Wnt/ β -catenin pathway [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39 : 239-254. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.11.063.
- [12] CICIRÒ Y, SALA A. MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer [J]. *Oncogenesis*, 2021, 10 (2) : 19. DOI: 10.1038/s41389-021-00309-y.
- [13] LI Y, JIN K, VAN PELT GW, et al. C-Myb enhances breast cancer invasion and metastasis through the Wnt/ β -catenin/Axin2 pathway [J]. *Cancer Res*, 2016, 76 (11) : 3364-3375. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2302.
- [14] QU X, YAN X, KONG C, et al. C-Myb promotes growth and metastasis of colorectal cancer through c-fos-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110 (10) : 3183-3196. DOI: 10.1111/cas.14141.
- [15] GAO Y, ZHANG W, LIU C, et al. miR-200 affects tamoxifen resistance in breast cancer cells through regulation of MYB [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1) : 18844. DOI: 10.1038/s41598-019-54289-6.

(编辑 陈 姜)

(上接第404页)

- Ther*, 2015, 17 : 277. DOI: 10.1186/s13075-015-0790-3.
- [5] TIAN S, LIU X, FAN Q, et al. Microarray expression and functional analysis of circular RNAs in the glomeruli of NZB/W F1 mice with lupus nephritis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18 (4) : 2813-2824. DOI: 10.3892/etm.2019.7901.
- [6] FANOURIAKIS A, TZIOLOS N, BERTSIAS G, et al. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80 (1) : 14-25. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218272.
- [7] CHO H, UM J, LEE JH, et al. ENOblock, a unique small molecule inhibitor of the non-glycolytic functions of enolase, alleviates the symptoms of type 2 diabetes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 44186. DOI: 10.1038/srep44186.
- [8] BRUSCHI M, SINICO RA, MORONI G, et al. Glomerular autoimmune multicomponents of human lupus nephritis in vivo: α -enolase and annexin AI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25 (11) : 2483-2498. DOI: 10.1681/ASN.2013090987.
- [9] LI M, LI J, WANG J, et al. Serum level of anti- α -enolase antibody in untreated systemic lupus erythematosus patients correlates with 24-hour urine protein and D-dimer [J]. *Lupus*, 2018, 27 (1) : 139-142. DOI: 10.1177/0961203317721752.
- [10] PAL-BHOWMICK I, MEHTA M, COPPENS I, et al. Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase [J]. *Infect Immun*, 2007, 75 (11) : 5500-5508. DOI: 10.1128/IAI.00551-07.
- [11] BRUSCHI M, MORONI G, SINICO RA, et al. Serum IgG2 antibody multi-composition in systemic lupus erythematosus and in lupus nephritis (Part 2) : prospective study [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60 (7) : 3388-3397. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa793.
- [12] WANG X, TEFEREDEGNE B, SHATZKES K, et al. Endogenous RNase inhibitor contributes to stability of RNA in crude cell lysates: applicability to RT-qPCR [J]. *Anal Biochem*, 2016, 513 : 21-27. DOI: 10.1016/j.ab.2016.08.011.
- [13] SPENCER JD, SCHWADERER AL, EICHLER T, et al. An endogenous ribonuclease inhibitor regulates the antimicrobial activity of ribonuclease 7 in the human urinary tract [J]. *Kidney Int*, 2014, 85 (5) : 1179-1191. DOI: 10.1038/ki.2013.395.
- [14] DIHAZI H, DIHAZI GH, BIBI A, et al. Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 16) : 3649-3663. DOI: 10.1242/jcs.125088.

(编辑 陈 姜)