

外泌体蛋白质组学分析 在心血管疾病中的应用的研究进展*

翁震, 何杨 (苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏苏州 215123)

摘要: 外泌体是由各种类型细胞从晚期内质体分泌的大小为 30~100 nm 的细胞外囊泡结构。多项研究显示外泌体在多种人类疾病尤其是心血管疾病中发挥着重要的作用。近来的研究显示外泌体蛋白质组学分析的方法能够成功鉴定多种外泌体相关的蛋白质, 并且有助于揭示其作用效应的新机制。该文将从分析评估不同蛋白质组学技术在鉴定外泌体蛋白中的应用并讨论蛋白质组学分析外泌体在心血管疾病研究中的最新进展进行综述。

关键词: 外泌体; 蛋白质组学; 心血管病; 应用

中图分类号: R446.11; R54 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)04-157-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.044

Research Progress of Proteomic Analysis of Exosomes and Its Application in Cardiovascular Disease

WENG Zhen, HE Yang

(Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

Abstract: Exosomes were 30~100 nm extracellular vesicles secreted from late endosomes by various types of cells. Numerous studies have suggested that exosomes play significant roles in multiple human diseases, especially cardiovascular diseases. Proteomics analysis of exosomes has been successfully used to identify various exosomal proteins and helped to uncover the novel mechanisms exerted by exosomes. This review was focused on evaluating the roles of various proteomic techniques in defining exosomal contents; discussing the research and clinical applications of proteomics and exosome in cardiovascular disease.

Keywords: exosome; proteomic profiling; cardiovascular disease; application

外泌体是大小为 30~100 nm 的细胞外囊泡, 其通常存在于细胞培养上清液中并天然存在于人体的各种体液中(包括血液、尿液及母乳)^[1]。研究发现, 包括微小 RNA 和蛋白质在内的多种生物分子存在于外泌体中^[2]。在众多外泌体蛋白分子中, 存在许多具有重要生物学功能的蛋白^[3,4]。以质谱(mass spectrometry, MS)技术为基础的蛋白质组学作为蛋白鉴定和定量及表征蛋白质的翻译后修饰的工具^[5], 因其能够提供机制、功能及疾病关联方面的重要信息, 而被应用于外泌体蛋白的分析并在过去几年进展迅速^[6,7]。此外, 临床样本来源外泌体蛋白质组学分析能够作为疾病诊断和预后生物标记物进行应用^[8,9]。由此可见, 有效的外泌体蛋白质组学分析具有实际意义, 因此有必要对最新的进展进行综述。

1 外泌体蛋白 MS 法鉴定和定量分析

1.1 外泌体蛋白鉴定 液相色谱偶联质谱(liquid chromatography coupled mass spectrometry, LC-MS)能够将外泌体来源的蛋白样品在反向柱上进

行分离。然后, 经柱洗脱样品通过电喷雾离子化, 使样品成分带电并在质谱仪中蒸发, 通过检测样品蛋白的质量和电荷实现蛋白的鉴定。一般情况下, 采用串联 MS(或 MS/MS)能够进一步将前体离子分解成碎片(产物离子)以获得肽测序的信息。LC-MS/MS 已被确立为能够有效分离和鉴定蛋白质的最强大工具之一。然而, 仅 LC-MS/MS 不足以研究蛋白质相互作用, 也不能区分来自不同来源的蛋白质及不同来源的相同蛋白质的相对丰度。为了克服这些问题, 开发了其他 MS 相关方法, 例如免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP), 串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP), 相对和绝对定量的同量异位标签(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)和细胞培养中氨基酸稳定同位素标记(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)。

1.2 外泌体蛋白标记和定量 iTRAQ 和 SILAC 与 MS 结合的方法, 已被广泛用于比较和定量蛋白

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81700129); 苏州市科技计划(SYS201704)。

作者简介: 翁震(1982—), 男, 博士, 助理研究员, 血管生物学方向, E-mail: zhweng@suda.edu.cn。

通讯作者: 何杨, E-mail: heyang1963@163.com。

的丰度的差异。对于 iTRAQ, 不同来源的外泌体蛋白经消化后与不同 iTRAQ 标签在体外通过生化反应进行标记。对于 SILAC, 标记过程通过掺入代谢相关同位素氨基酸得以实现。在使用这两种技术标记和纯化后, 所有样品能够在合并后通过 MS 分析进行鉴定并实现蛋白质的定量。虽然 SILAC 和 iTRAQ 能够用于外泌体蛋白的检测, 但它们各有优缺点。通常情况下, 如果涉及两个样品, SILAC 是一种可靠的方法, 因其易于实施并且标记变异性较低。然而, 由于 SILAC 依赖于氨基酸在蛋白质合成过程中的掺入, 使得该技术最适合快速增殖的细胞系而非缓慢增殖的原代细胞。对于后一种情况, iTRAQ 更适合。另外, iTRAQ 能够多次使用并可以同时比较最多 10 个样本。此外, 还可以使用基于光谱计数或前体信号强度的无标签蛋白质组学方法, 但这些方法的缺点在于定量精确度不高且需要大量的计算^[10]。

1.3 外泌体蛋白相互作用 Co-IP 和 TAP 是与 MS 分析结合使用以研究蛋白质相互作用的最常见的两种分离技术。Co-IP 通过运用针对已知外泌体蛋白的抗体, 将外泌体蛋白及相关蛋白进行沉淀后将沉淀的复合物进行 MS 分析。而 TAP 则是将感兴趣的蛋白质与含有蛋白酶切割位点的 TAP 标签融合。首先, 将外泌体蛋白提取物通过与 TAP 标签特异性抗体结合的琼脂糖微球柱, 获得捕获期望的蛋白和相关蛋白。随后, 通过蛋白酶消化将蛋白复合物从微球中释放进行肽测序鉴定。Co-IP 和 TAP 都适用于蛋白质相互作用研究, 特别是未知蛋白的相互作用。Co-IP 还被证实能够有效分离可溶性蛋白和膜蛋白, 这些蛋白在外泌体中含量丰富。需要注意的是, Co-IP 和 TAP 仅适用于稳定的相互作用, 但是它们无法区分直接还是间接相互作用。

2 外泌体蛋白组学分析在心血管疾病中的应用

2.1 疾病诊断价值 来自患者体液(如血浆、尿液等)的蛋白质组学分析能够发现疾病相关的生物标记物。早期的研究通过蛋白组学发现人血浆外泌体中存在过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR- γ) 可能参与到旁分泌效应功能发挥中^[11]。Damkjaer 等人^[12] 利用高速离心从原发性高血压患者中分离纯化了尿液外泌体, 并采用蛋白质组学的方法检测了外泌体相关蛋白, 结果显示有 12 种蛋白仅在患者中出现, 其中维甲酸诱导基因 2 蛋白水平下降, 而其他蛋白的水平增加。该结果表明外泌体蛋白可能参与疾病的发生发展过程。

2.2 疾病治疗应用反映微血管病变 作为无毒细

胞来源的脂质纳米囊泡, 外泌体可以有效地将生物活性分子递送至受体细胞, 并且如果能够合理地设计它们的跨膜肽, 甚至能赋予受体细胞高度靶向特异性。Chen 等^[13] 最近发现尿液干细胞来源外泌体高表达恶性脑瘤剔除基因 1 (the gene deleted in malignant brain tumors 1, DMBT1), 并且能够通过 DMBT1 促进内皮细胞的成血管效应, 该策略有望应用于糖尿病软组织的伤口愈合。Gonzalez-Calero 等^[14] 人利用 iTRAQ 技术并结合靶点分析确认高血压患者尿液外泌体存在 48 种与高血压症状有关的蛋白, 其中 21 种存在于 3 个主要功能基因簇中, 分别为糖胺聚糖降解、凝血和补体系统以及氧化应激。他们认为这些功能蛋白簇为高血压患者新型治疗方案的开发提供了重要的信息。另外, 低氧应激也能够影响外泌体的组成, Cosme 等人^[15] 通过蛋白组学分析了低氧和常氧处理后的心脏成纤维细胞外泌体蛋白成分差异, 结果发现低氧能够引起胞外基质信号相关蛋白表达水平增高。而之前的综述认为低氧处理的外泌体在心血管疾病中的治疗效果更佳^[16]。最近, Barile 等^[17] 人通过蛋白组学发现心脏前体细胞外泌体表面的孕相关浆蛋白 A (pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A) 蛋白能够通过蛋白酶解胰岛素生长因子结合蛋白 4 (insulin-like growth factor binding protein-4, IGFBP-4), 引起胰岛素生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R) 活化来减少心肌细胞的凋亡, 从而发挥心脏保护作用, 这无疑提出了外泌体发挥治疗效应的新机制, 即: 通过表面活化蛋白酶来释放后与邻近配体相互作用来发挥效应。

另外, 目前有三项研究报道了有关血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 来源外泌体蛋白组学分析的结果。Comelli 等^[18] 人首先通过蛋白质组学鉴定了猪冠状动脉 VSMCs 外泌体中的 64 种蛋白质; 而 Kapustin 等^[19] 人通过蛋白组学分析患者主动脉来源原代 VSMCs 外泌体鉴定了 345 种蛋白质。在这两项研究中, 总共鉴定了 387 种蛋白质。最近, Qiu 等^[20] 人在 VSMCs 外泌体中鉴定出 459 种蛋白质, 通路分析显示这些蛋白参与 179 个细胞成分, 120 个分子功能和 337 个生物学过程, 其中细胞-细胞黏附和血小板活化/凝固排在最前。

另外, 他们认为 VSMCs 外泌体的主要功能是维持血管动态平衡。由于 VSMCs 是心血管疾病中的重要参与细胞, 这些研究无疑为明确和干预 VSMCs 提供了可能。

3 外泌体蛋白组学研究展望 目前不同来源外泌

体在心血管疾病诊断和治疗中已显示出临床应用的可能,然而目前的研究均为实验室级别,因此需要在将来进一步进行临床试验来验证外泌体的诊断效率及治疗效果。总之,蛋白质组学技术的进展在研究外泌体的基础生物学,探索外泌体疾病发病机制,开发和监测外泌体治疗剂的功效等方面发挥核心作用。然而,相关探索性尝试的广度仍然有限,另外生物学上对外泌体包装和释放的调节机制的认识有限及受到外泌体分离和纯化方法的限制,目前关于外泌体蛋白组学分析的数据仍有待进一步证实,而有效的解决这些问题将极大有利于对理解疾病发病机制和疾病适用性。

参考文献:

- [1] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 328-334.
- [2] Geis-Asteggiante L, Belew AT, Clements VK, et al. Differential content of proteins, mRNAs, and miRNAs suggests that MDSC and their exosomes may mediate distinct immune suppressive functions[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(1): 486-498.
- [3] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. Exocarta: A web-based compendium of exosomal cargo[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(4): 688-692.
- [4] Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [5] Eguchi T, Sogawa C, Okusha Y, et al. Organoids with cancer stem cell-like properties secrete exosomes and HSP90 in a 3D nanoenvironment[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0191109.
- [6] Sinha A, Principe S, Alfaro J, et al. Proteomic profiling of secreted proteins, exosomes, and microvesicles in cell culture conditioned media[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1722: 91-102.
- [7] Rosa-Fernandes L, Rocha VB, Carregari VC, et al. A perspective on extracellular vesicles proteomics[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5: 102.
- [8] Atay S, Wilkey DW, Milhem M, et al. Insights into the proteome of gastrointestinal stromal tumors-derived exosomes reveals new potential diagnostic biomarkers[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(3): 495-515.
- [9] Intasqui P, Bertolla RP, Sadi MV. Prostate cancer proteomics: Clinically useful protein biomarkers and future perspectives[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2018, 15(1): 65-79.
- [10] Beer LA, Liu P, Ky B, et al. Efficient quantitative comparisons of plasma proteomes using label-free analysis with maxquant[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1619: 339-352.
- [11] Looze C, Yui D, Leung L, et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR gamma as an exosome-associated protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378(3): 433-438.
- [12] Damkjaer M, Jensen PH, Schwammle V, et al. Selective renal vasoconstriction, exaggerated natriuresis and excretion rates of exosomal proteins in essential hypertension[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014, 212(1): 106-118.
- [13] Chen CY, Rao SS, Ren L, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1607-1623.
- [14] Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, Martin-Lorenzo M, et al. Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with albuminuria[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44217-44231.
- [15] Cosme J, Guo H, Hadipour-Lakmehsari S, et al. Hypoxia-induced changes in the fibroblast secretome, exosome, and whole-cell proteome using cultured, cardiac-derived cells isolated from neonatal mice[J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(8): 2836-2847.
- [16] Ding S, Fan Z, Lin C, et al. Therapeutic effects of ischemic-preconditioned exosomes in cardiovascular diseases[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 998: 271-281.
- [17] Barile L, Cervio E, Lionetti V, et al. Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: Role of pregnancy-associated plasma protein-A[J]. *Cardiovascular Research*, 2018, 114(7): 992-1005.
- [18] Comelli L, Rocchiccioli S, Smirni S, et al. Characterization of secreted vesicles from vascular smooth muscle cells[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(5): 1146-1152.
- [19] Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion[J]. *Circulation Research*, 2015, 116(8): 1312-1323.
- [20] Qiu H, Shi S, Wang S, et al. Proteomic profiling exosomes from vascular smooth muscle cell[J]. *Proteomics Clinical Applications*, 2018: e1700097. [Epub ahead of print]

收稿日期:2018-05-27

修回日期:2018-06-29