

• 医药生物技术 •

不同微生物大鼠腹腔注射模型尿液蛋白组学的比较

孟文书, 张亚萌, 华元瑞, 江奕瑾, 孔嘉文, 高友鹤

北京师范大学 生物化学与分子生物系 基因工程药物与生物技术北京市重点实验室, 北京 100875

孟文书, 张亚萌, 华元瑞, 等. 不同微生物大鼠腹腔注射模型尿液蛋白组学的比较. 生物工程学报, 2021, 37(1): 276-289.

Meng WS, Zhang YM, Hua YR, et al. Comparison of urine proteome in rats intraperitoneally infected by different microorganisms. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 276-289.

摘要: 不同的微生物都可以引起腹腔感染, 文中尝试利用尿液来区分不同的微生物感染。通过在大鼠腹腔内分别注射大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌建立 3 种模型, 收集感染后 0、12、36、72 h 的尿液, 并使用液相色谱串联质谱技术 (LC-MS/MS) 对尿蛋白进行分析。与感染前相比, 在大肠杆菌腹腔注射模型中共鉴定到 69 个差异蛋白, 在金黄色葡萄球菌腹腔注射模型中共鉴定到 31 个差异蛋白, 在白色念球菌腹腔注射模型中共鉴定到 38 个差异蛋白。结果表明, 腹腔注射不同的微生物时尿蛋白质组不同, 提示尿液可能对不同的腹腔感染有鉴别诊断的潜能。

关键词: 腹腔感染, 尿液, 蛋白组学, 鉴别诊断

Comparison of urine proteome in rats intraperitoneally infected by different microorganisms

Wenshu Meng, Yameng Zhang, Yuanrui Hua, Yijin Jiang, Jiawen Kong, and Youhe Gao

Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Different microorganisms can cause intraperitoneal infection. This study was to distinguish different microbial infections by urine analysis. Rats were intraperitoneally injected with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, separately. Urine samples were collected from rats at 0, 12, 36 and 72 h after infection. Urinary proteins were profiled using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Compared with the control (without infection), a total of 69 differential proteins were identified in rats injected with *E. coli*. A total of 31 differences proteins were identified in rats injected with *S. aureus*. A total of 38 differential proteins were identified in rats injected with

Received: April 17, 2020; **Accepted:** July 6, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2018YFC0910202, 2016YFC1306300), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2020KJZX002), Beijing Natural Science Foundation (No. 7172076), Beijing Cooperative Construction Project (No. 110651103), Beijing Normal University (No. 11100704), Peking Union Medical College Hospital (No. 2016-2.27).

Corresponding author: Youhe Gao. Tel: +86-10-58804285; E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2018YFC0910202, 2016YFC1306300), 中央高校基础研究经费 (No. 2020KJZX002), 北京市自然科学基金 (No. 7172076), 北京市合作建设项目 (No. 110651103), 北京师范大学 (No. 11100704), 北京协和医院 (No. 2016-2.27) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200812.1056.010.html>

C. albicans. Urine proteome was different when rats were infected by different microorganisms, suggesting that urine may have the potential for differential diagnosis of different intraperitoneal infections.

Keywords: intraperitoneal infection, urine, proteome, differential diagnosis

不同的微生物都可以引起腹腔感染, 当前对腹腔感染的鉴别诊断仍然存在困难。尿液作为研究疾病标志物的良好来源, 具有早期和敏感的特点。首先, 尿液不受稳态机制的调控, 能够富集机体产生的早期变化^[1]。已经在多个疾病动物模型中发现, 在病理变化出现之前, 尿蛋白组就发生了变化^[2]。比如, 在阿尔兹海默症转基因小鼠的脑部淀粉斑块沉积出现之前, 尿液中有 29 个蛋白发生变化, 其中有 24 个蛋白曾被报道过与阿尔兹海默症有关或作为标志物^[3]。其次, 尿液能够极其敏感地反映机体的状态。比如, 在大鼠皮下注射极少量的肿瘤细胞时, 尿蛋白就能反映出与癌症相关的变化^[4]。此外, 当 Walker-256 肿瘤细胞被注射到皮下^[5]、肝脏^[6]、骨^[7]、肺^[8]和脑部^[9]不同的器官生长时, 尿蛋白的变化不同, 这表明尿液具有区分相同肿瘤细胞在不同器官生长的潜能, 提示尿液可能具有良好的鉴别诊断的能力。那么, 当不同的微生物注射到腹腔时, 尿液能表现出差异吗?

大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和白色念球菌 *Candida albicans* 是常见的腹腔感染的微生物。本研究通过将一定浓度的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌菌液分别注射到大鼠的腹腔建立 3 种腹腔感染模型, 对注射后 0、12、36、72 h 的尿液进行非标记定量蛋白组学分析, 探究 3 种模型尿液蛋白组的变化情况并进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型的建立

1.1.1 大肠杆菌腹腔注射模型的建立

雄性 Wistar 大鼠 8 只, 体重 140–160 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 所有动物在标准环境中 (室温 (22±1) °C, 湿度 65%–70%)

饲养。动物实验遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准。建立方法如下: 实验组和对照组各 4 只大鼠, 实验组大鼠腹腔内注射 2 mL 大肠杆菌菌液 (1×10^8 CFU/mL), 对照组注射同等体积的生理盐水。

1.1.2 金黄色葡萄球菌腹腔注射模型的建立

雄性 SD 大鼠 6 只, 体重 180–200 g。建立方法如下: 实验组和对照组各 3 只大鼠, 实验组大鼠腹腔内注射 2 mL 金黄色葡萄球菌菌液 (1×10^7 CFU/mL), 对照组注射同等体积的生理盐水。

1.1.3 白色念球菌腹腔注射模型的建立

雄性 SD 大鼠 6 只, 体重 180–200 g。建立方法如下: 实验组和对照组各 3 只大鼠, 实验组大鼠腹腔内注射 2 mL 白色念球菌菌液 (1×10^7 CFU/mL), 对照组注射同等体积的生理盐水。

1.2 尿液的收集

在腹腔注射菌液后的 0、12、36、72 h 统一将大鼠置于代谢笼中收集尿液, 并放入 -80 °C 冰箱保存。

1.3 尿液蛋白的提取和蛋白酶解

将每个模型中实验组大鼠在 4 个时间点收集的尿液用 12 000×g 离心 40 min, 取上清用 3 倍体积的乙醇沉淀过夜, 然后 12 000×g 离心 30 min。将蛋白沉淀重悬于裂解液中 (8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 25 mmol/L 二硫苏糖醇, 50 mmol/L Tris)。用 Bradford 法测量蛋白浓度。本研究共提取 40 个尿蛋白样品, 其中大肠杆菌模型 16 个, 金黄色葡萄球菌模型 12 个, 白色念球菌模型 12 个。

使用滤器辅助样品制备 (FASP) 方法进行尿蛋白酶解^[10]。将尿蛋白加载到 10 kDa 超滤管的滤膜 (Pall, Port Washington, NY, USA) 上, 用 UA 溶液 (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH

8.5) 和 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液洗涤两次;加入 20 mmol/L 二硫苏糖醇在 37 °C 中变性 1 h, 再与 50 mmol/L 碘乙酰胺在黑暗中烷基化 30 min, 用 UA 溶液和 NH_4HCO_3 洗涤两次, 以 1:50 比例加入蛋白胰酶在 37 °C 水浴中消化 14 h。将多肽混合物通过 HLB 柱 (Waters, Milford, MA) 除盐后用真空干燥仪进行抽干。

1.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

酶解后的样品用 0.1% 甲酸复溶, 肽段浓度稀释为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 每个样品取 1 μg 使用 EASY-nLC 1200 色谱系统 (Thermo Fisher Scientific, USA) 和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行质谱采集和分析。

1.5 数据分析

将质谱采集的数据用 Mascot 软件 (版本 2.4.1) 进行数据库检索, 设置参数: 数据库采用 SwissProt 大鼠数据库, 胰酶酶切, 最多允许两个漏切位点, 母离子质量容差 10 ppm, 碎片离子质量容差 0.05 Da。半胱氨酸的氨酰甲基化修饰为固定修饰, 蛋氨酸的氧化为可变修饰。Mascot 检索后的文件导入 Scaffold 软件 (版本 4.7.5), 参数设置: 多肽 FDR 设为 1%, 蛋白水平的 FDR 设为最大 (1%), 每个蛋白包含两个以上的特异肽段^[11]。根据谱图数进行差异蛋白筛选^[12]。

1.6 统计学分析

每个样品取两次技术重复的平均值用于统计学分析。采用自身对照的方式, 将 12、36、72 h 鉴定到的蛋白分别与 0 h 进行比较。筛选差异蛋白的条件为: 组间变化倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 双尾非配对 *t* 检验 $P < 0.05$, 高丰度组的平均蛋白谱图数 ≥ 3 , 且高丰度组每个样品的蛋白谱图都高于低丰度组。

1.7 Gene ontology 分析

使用 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 3 个模型鉴定到的差异蛋白进行生物学过程、细胞定位和分子功能 3 个方面的功能富集分析^[13]。

2 结果与分析

2.1 实验动物的行为学特征

本研究中, 在造模后对大鼠进行行为学观察。从行为学观察来看, 对照组大鼠活动正常, 饮食饮水正常, 实验组与对照组相比, 无明显的行为学差异。

2.2 腹腔注射微生物模型尿蛋白组学变化

2.2.1 腹腔注射大肠杆菌模型尿蛋白组学变化

在腹腔注射大肠杆菌的模型中, 选取 4 只实验组大鼠的 0、12、36、72 h 的尿液蛋白, 进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定。该模型共鉴定到 832 个蛋白 (≥ 2 个特异性的多肽, 蛋白水平 $\text{FDR} < 1\%$), 将 12、36、72 h 的尿蛋白分别与 0 h 进行比较, 筛选标准: 组间变化倍数 $\text{FC} \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 , $P < 0.05$, 高丰度组的平均蛋白谱图数 ≥ 3 , 且高丰度组每个样品的蛋白谱图都高于低丰度组。

相对于 0 h, 在大肠杆菌注射后 12 h 鉴定到 14 个差异蛋白, 其中 12 个上调, 2 个下调; 在 36 h 鉴定到 5 个差异蛋白, 其中 3 个上调, 2 个下调; 在 72 h 鉴定到 61 个差异蛋白, 其中 50 个上调, 11 个下调。不同时间点鉴定到的差异蛋白的详细信息列在表 1。用维恩图展示了不同时间点鉴定到的差异蛋白的重叠情况 (图 1), 其中有 1 个蛋白在 3 个时间点连续被鉴定到。

2.2.2 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型尿蛋白组学变化

在腹腔注射金黄色葡萄球菌的模型中, 选取 3 只实验组大鼠的 0、12、36、72 h 的尿液蛋白, 进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定。该模型共鉴定到 798 个蛋白 (≥ 2 个特异性的多肽, 蛋白水平 $\text{FDR} < 1\%$)。相对于 0 h, 在金黄色葡萄球菌注射后的 12 h 鉴定到 9 个差异蛋白, 其中 6 个上调, 3 个下调; 在 36 h 鉴定到 11 个差异蛋白, 其中 6 个上调, 5 个下调; 在 72 h 鉴定到 17 个差异蛋白, 其中 10 个上调, 7 个下调。不同时间点鉴定到的差异蛋白的详细信息列在表 2。用维恩图展示了不同时间点鉴定到的差异蛋白的重叠情况 (图 2), 其中有 2 个蛋白在 3 个时间点连续被鉴定到。

表 1 腹腔注射大肠杆菌模型鉴定到的尿液差异蛋白

Table 1 The differential proteins identified in *E. coli* intraperitoneal injection model

Accession	Protein name	Trend	Fold change			P value
			12 h	36 h	72 h	
Q9QZA2	Programmed cell death 6-interacting protein	↑	1.57	1.69	2.11	1.50E-02
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	↑	4.25		6.67	1.71E-04
P61589	Transforming protein RhoA	↑	2.75		2.25	1.45E-03
Q63751	Vomeromodulin	↑	2.61		3.14	7.05E-03
P85973	Purine nucleoside phosphorylase	↑	2.33		2.67	1.31E-03
P46413	Glutathione synthetase	↑	2.13		2.78	1.69E-03
Q9R063	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	↑	1.83		2.28	9.08E-03
Q64319	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	↑	1.54		2.06	1.67E-02
Q6AYT0	Quinone oxidoreductase	↑		1.66	2.06	7.18E-03
Q99PS8	Histidine-rich glycoprotein	↓		0.37	0.36	4.77E-03
P10760	Adenosylhomocysteinase	↑	6.50			1.86E-03
P11348	Dihydropteridine reductase	↑	2.07			9.28E-03
Q497B0	Omega-amidase NIT2	↑	2.00			3.21E-02
P55159	Serum paraoxonase/arylesterase 1	↑	1.75			1.67E-02
P13596	Neural cell adhesion molecule 1	↓	0.67			6.77E-03
P19218	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	↓	0.66			1.21E-03
P30120	Metalloproteinase inhibitor 1	↑		8.33		7.71E-03
D4ACX8	Protocadherin-16	↓		0.28		1.68E-02
O70377	Synaptosomal-associated protein 23	↑			∞	3.94E-03
P70502	Solute carrier organic anion transporter family member 1A3	↑			31.00	4.15E-03
P18757	Cystathionine gamma-lyase	↑			19.33	5.60E-03
Q4KLZ6	Triokinase/FMN cyclase	↑			10.25	1.52E-02
P53790	Sodium/glucose cotransporter 1	↑			10.00	2.76E-03
Q3ZAV1	Solute carrier family 22 member 12	↑			10.00	1.23E-02
P06760	Beta-glucuronidase	↑			9.00	5.68E-04
P46720	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1	↑			7.17	2.87E-03
Q63355	Unconventional myosin-Ic	↑			6.88	1.01E-03
Q5M7T9	Threonine synthase-like 2	↑			6.75	2.04E-03
Q62687	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT3	↑			6.60	2.99E-03
Q7TQ94	Deaminated glutathione amidase	↑			6.00	1.11E-03
Q9WUW9	Sulfotransferase 1C2A	↑			5.85	1.53E-03
Q711G3	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	↑			5.20	3.76E-03
Q9WTW7	Solute carrier family 23 member 1	↑			4.94	1.36E-03
P09606	Glutamine synthetase	↑			4.63	1.04E-02
Q80W57	ATP-binding cassette sub-family G member 2	↑			4.63	6.06E-03
Q63424	Solute carrier family 15 member 2	↑			4.11	5.87E-04
Q9ESG3	Collectrin	↑			3.57	1.52E-02
Q9Z0W7	Chloride intracellular channel protein 4	↑			3.56	2.38E-03
O08557	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	↑			3.29	2.31E-03
P25093	Fumarylacetoacetase	↑			3.13	8.35E-03
P19468	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	↑			3.09	1.43E-03
Q02974	Ketohexokinase	↑			2.69	1.87E-04

(待续)

(续表 1)

Accession	Protein name	Trend	Fold change			P value
			12 h	36 h	72 h	
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	↑			2.68	5.46E-03
Q9JJ40	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	↑			2.54	1.83E-03
Q63530	Phosphotriesterase-related protein	↑			2.47	6.29E-03
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	↑			2.38	4.46E-04
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	↑			2.30	1.61E-02
P38918	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	↑			2.27	1.59E-02
O35763	Moesin	↑			2.24	4.81E-04
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	↑			2.21	3.28E-03
P54311	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	↑			1.89	2.34E-02
Q9JJ19	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	↑			1.82	3.10E-03
P00884	Fructose-bisphosphate aldolase B	↑			1.81	4.03E-03
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	↑			1.77	4.01E-02
P31977	Ezrin	↑			1.75	1.94E-03
P07861	Nephrilysin	↑			1.68	4.30E-04
Q99MA2	Xaa-Pro aminopeptidase 2	↑			1.65	3.53E-03
P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	↑			1.63	2.79E-03
P60711	Actin, cytoplasmic 1	↑			1.52	4.08E-03
P04073	Gastricsin	↓			0.67	1.85E-03
P01015	Angiotensinogen	↓			0.64	3.61E-03
P97605	Ephrin-A5	↓			0.62	9.99E-04
P10959	Carboxylesterase 1C	↓			0.60	6.69E-04
Q1WIM1	Cell adhesion molecule 4	↓			0.54	7.34E-03
Q9QZQ5	CCN family member 3	↓			0.43	1.67E-02
P24594	Insulin-like growth factor-binding protein 5	↓			0.41	5.16E-03
P27590	Uromodulin	↓			0.40	1.44E-03
Q99MH3	Hepcidin	↓			0.29	1.16E-04
Q63108	Carboxylesterase 1E	↓			0.18	3.04E-03

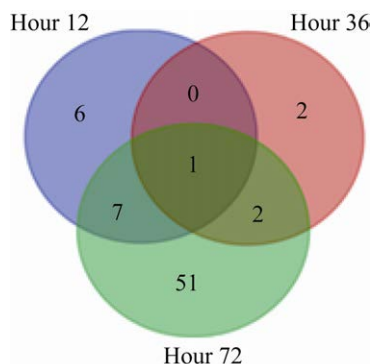


图 1 腹腔注射大肠杆菌模型中 12、36、72 h 鉴定的差异蛋白的维恩图

Fig. 1 The Venn diagram of differential proteins identified at 12, 36, and 72 h in *E. coli* intraperitoneal injection model.

2.2.3 腹腔注射白色念球菌模型尿蛋白组学变化

在腹腔注射白色念球菌的模型中, 选取 3 只实验组大鼠的 0、12、36、72 h 的尿液蛋白, 进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定。该模型共鉴定到 696 个蛋白 (≥ 2 个特异性的多肽, 蛋白水平 FDR $<1\%$)。相对于 0 h, 在白色念球菌注射后的 12 h 鉴定到 11 个差异蛋白, 其中 3 个上调, 8 个下调; 在 36 h 鉴定到 14 个差异蛋白, 其中 2 个上调, 12 个下调; 在 72 h 鉴定到 24 个差异蛋白, 其中 4 个上调, 20 个下调。不同时间点鉴定到的差异蛋白的详细信息列在表 3。用维恩图展示了不同时间点鉴定到的差异蛋白的重叠情况 (图 3), 其中有 1 个蛋白在 3 个时间点连续被鉴定到。

表 2 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型鉴定到的尿液差异蛋白

Table 2 The differential proteins identified in *S. aureus* intraperitoneal injection model

Accession	Protein name	Trend	Fold change			P value
			12 h	36 h	72 h	
Q66H12	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	↑	2.44	1.78	2.61	6.52E-03
P04639	Apolipoprotein A-I	↓	0.48	0.48	0.45	1.15E-02
O88766	Neutrophil collagenase	↑	3.23		2.62	1.43E-02
Q9WTW7	Solute carrier family 23 member 1	↓	0.65		0.59	2.70E-02
P02625	Parvalbumin alpha	↑	3.09			1.74E-03
Q9ES87	Prostasin	↑	2.00			1.73E-02
Q63416	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	↑	1.67			2.54E-02
P18292	Prothrombin	↑	1.52			2.20E-02
Q80WF4	Transmembrane protein 132A	↓	0.37			3.27E-02
P45592	Cofilin-1	↑		2.57		2.54E-02
P85973	Purine nucleoside phosphorylase	↑		2.55		1.61E-03
Q7TQ94	Deaminated glutathione amidase	↑		2.29		3.83E-02
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	↑		1.95		2.74E-02
P97574	Stanniocalcin-1	↑		1.67		2.49E-02
P31211	Corticosteroid-binding globulin	↓		0.55		1.47E-04
Q06496	Sodium-dependent phosphate transport protein 2A	↓		0.52		1.61E-02
Q99PS8	Histidine-rich glycoprotein	↓		0.37		4.47E-02
P47853	Biglycan	↓		0.24		3.29E-02
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	↑			4.40	1.91E-02
P25093	Fumarylacetoacetase	↑			2.77	4.52E-02
O35952	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	↑			2.18	3.14E-02
P26051	CD44 antigen	↑			2.05	3.65E-03
P01835	Ig kappa chain C region, B allele	↑			1.72	3.00E-02
Q80WD1	Reticulon-4 receptor-like 2	↑			1.68	2.20E-02
P82450	Sialate O-acetyltransferase	↑			1.67	3.02E-03
P14630	Apolipoprotein M	↑			1.59	4.54E-03
P54311	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	↓			0.61	4.37E-02
P54313	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	↓			0.56	3.11E-02
Q6MG71	Choline transporter-like protein 4	↓			0.53	2.73E-02
Q6RUV5	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	↓			0.47	1.94E-02
P08010	Glutathione S-transferase Mu 2	↓			0.29	3.16E-02

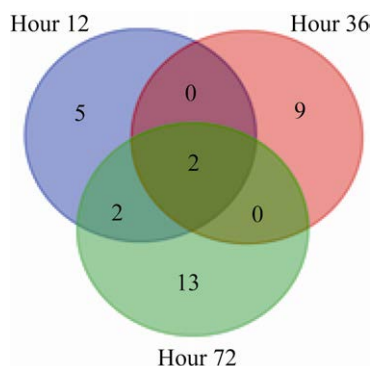


图 2 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型中 12、36、72 h 鉴定的差异蛋白的维恩图

Fig. 2 The Venn diagram of differential proteins identified at 12, 36, and 72 h in *S. aureus* intraperitoneal injection model.

2.3 差异蛋白的功能注释

2.3.1 腹腔注射大肠杆菌模型差异蛋白的功能注释

使用 DAVID 数据库对该模型鉴定到的总计 69 个差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能 3 个方面进行功能富集分析 (图 4)。在生物学过程中 (图 4A, 表 4), 这些差异蛋白倾向于参与谷氨酸代谢、谷胱甘肽生物合成、细胞蛋白分解代谢的正调控、肌动蛋白细胞骨架组织的调节和谷胱甘肽代谢等过程。在细胞成分中 (图 4B), 大多数的差异蛋白来源于细胞外的外泌体。在分子功能中 (图 4C), 这些差异蛋白倾向于受体结合、

表 3 腹腔注射白色念球菌模型鉴定到的尿液差异蛋白

Table 3 The differential proteins identified in *C. albicans* intraperitoneal injection model

Accession	Protein name	Trend	Fold change			P value
			12 h	36 h	72 h	
Q80WF4	Transmembrane protein 132A	↓	0.50	0.35	0.35	1.73E-02
P30152	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	↑	2.23	3.96		2.21E-02
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	↓	0.63		0.28	1.32E-02
P50137	Transketolase	↓	0.46		0.11	1.06E-02
P10758	Lithostathine	↑		7.00	6.67	3.99E-02
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	↓		0.63	0.18	2.85E-02
Q5U2Q3	Ester hydrolase C11orf54 homolog	↓		0.63	0.46	2.13E-02
Q8R5M3	Leucine-rich repeat-containing protein 15	↓		0.61	0.48	3.14E-02
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	↓		0.48	0.45	7.18E-03
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	↓		0.39	0.36	4.46E-02
P17559	Uteroglobin	↑	1.92			1.32E-02
P08721	Osteopontin	↑	1.86			4.57E-02
O08628	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	↓	0.64			2.32E-02
Q6X936	Kin of IRRE-like protein 1	↓	0.56			1.61E-02
Q9Z1Y3	Cadherin-2	↓	0.51			8.58E-03
Q793F9	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	↓	0.44			7.49E-03
P97710	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	↓	0.37			2.24E-02
Q9R1T3	Cathepsin Z	↓		0.64		2.32E-02
O88767	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	↓		0.59		2.54E-02
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	↓		0.59		3.80E-02
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	↓		0.48		4.91E-02
Q9Z2Y9	Klotho	↓		0.25		4.23E-02
Q63270	Cytoplasmic aconitate hydratase	↓		0.21		6.07E-03
Q920A6	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	↑			1.72	3.11E-02
Q4QQW8	Putative phospholipase B-like 2	↑			1.68	4.58E-02
Q6P7A9	Lysosomal alpha-glucosidase	↑			1.60	1.19E-02
P62630	Elongation factor 1-alpha 1	↓			0.67	1.61E-02
P62260	14-3-3 protein epsilon	↓			0.65	2.23E-02
P07340	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	↓			0.64	2.32E-02
P27139	Carbonic anhydrase 2	↓			0.62	3.15E-02
Q9WTQ2	Podocalyxin	↓			0.57	3.16E-02
P41562	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	↓			0.55	3.84E-02
P01026	Complement C3	↓			0.55	7.96E-03
P19112	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	↓			0.53	3.07E-02
Q9R066	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	↓			0.46	3.25E-02
Q9QWJ9	Neuropilin-1	↓			0.44	2.42E-02
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	↓			0.39	3.50E-02
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	↓			0.37	3.89E-02

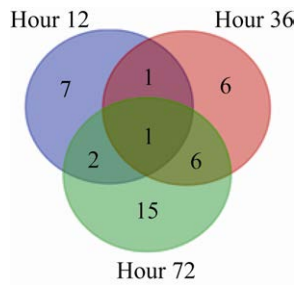


图3 腹腔注射白色念珠菌模型中12、36、72 h鉴定的差异蛋白的维恩图

Fig. 3 The Venn diagram of differential proteins identified at 12, 36 and 72 h in *C. albicans* intraperitoneal injection model.

不依赖钠的有机阴离子跨膜转运蛋白活性和谷氨酸-半胱氨酸连接酶活性等功能。

2.3.2 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型差异蛋白的功能注释

同上，使用 DAVID 数据库对该模型鉴定到的总计 31 个差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能 3 个方面进行功能富集分析 (图 5)。在生物学过程中 (图 5A, 表 5), 这些差异蛋白倾向于参与谷胱甘肽代谢、糖皮质激素代谢、高密度脂蛋白颗粒组装、反向胆固醇运输和高密度脂蛋白

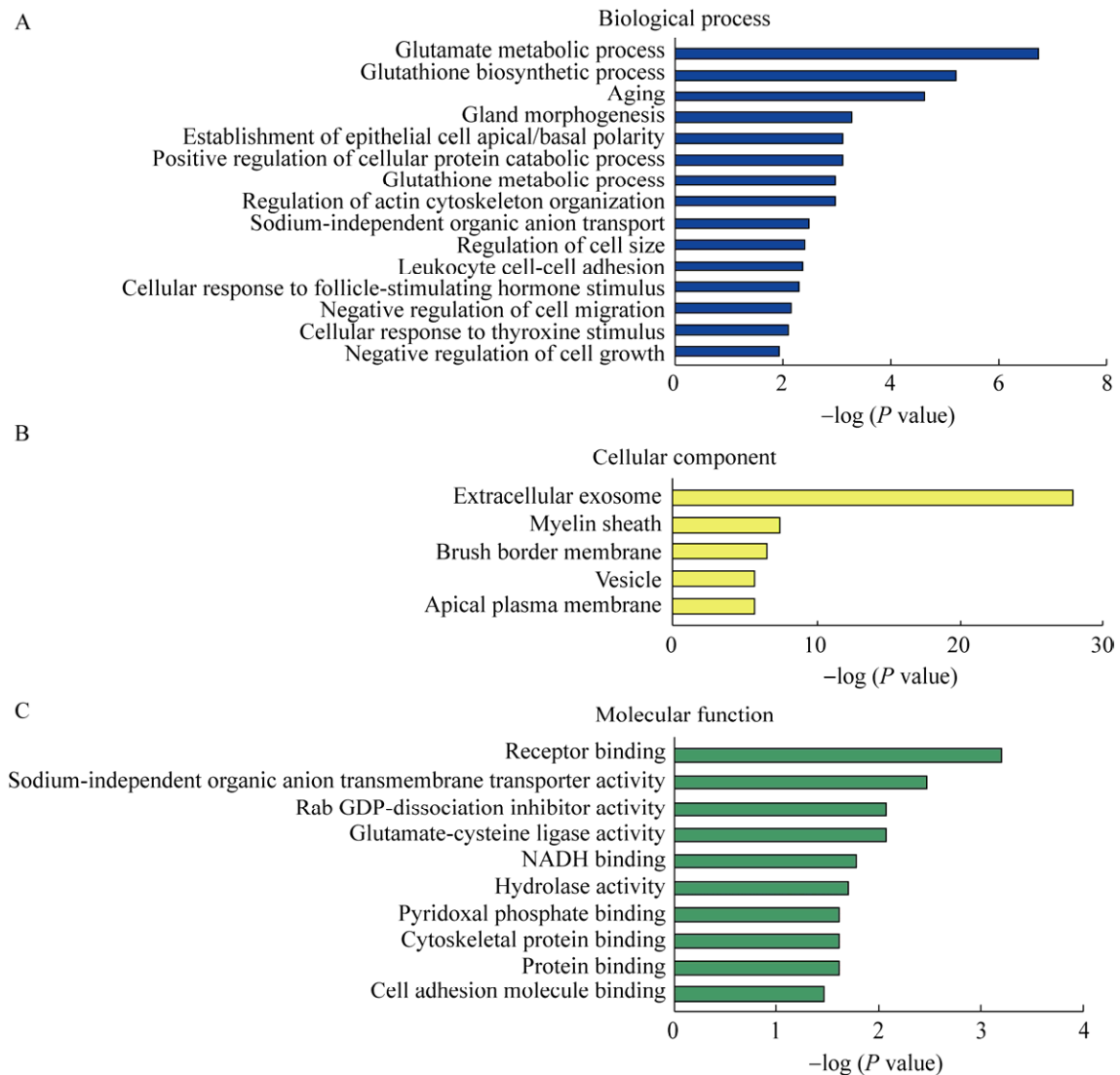


图4 腹腔注射大肠杆菌模型中差异蛋白的功能注释

Fig. 4 Functional analysis of differential proteins in *E. coli* intraperitoneal injection model. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function.

表 4 腹腔注射大肠杆菌模型中差异蛋白参与的生物学过程

Table 4 Biological process of differential proteins in *E. coli* intraperitoneal injection model

Biological process	<i>P</i> value	Count	Uniprot
Glutamate metabolic process	1.80E-07	5	P09606, Q64602, P48508, P07314, P19468
Glutathione biosynthetic process	6.00E-06	4	P48508, P07314, P19468, P46413
Aging	2.30E-05	9	P01015, P13596, P30120, P48508, P07314, Q99MH3, P19468, P24594, P46413
Gland morphogenesis	4.90E-04	3	O35763, P31977, Q9JJ19
Positive regulation of cellular protein catabolic process	7.50E-04	3	O35763, P31977, Q9JJ19
Establishment of epithelial cell apical/basal polarity	7.50E-04	3	O35763, Q99MH3, P31977
Regulation of actin cytoskeleton organization	9.90E-04	4	Q9Z0W7, P18757, P48508, P19468
Glutathione metabolic process	9.90E-04	4	P61589, P31977, P97605, Q99PS8
Sodium-independent organic anion transport	3.10E-03	3	P70502, Q3ZAV1, P46720
Regulation of cell size	3.70E-03	3	O35763, P31977, Q9JJ19
Leukocyte cell-cell adhesion	4.00E-03	3	O35763, P27590, P31977
Cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus	4.60E-03	3	P48508, P19468, P97605
Negative regulation of cell migration	6.70E-03	4	Q9Z0W7, P24594, Q5XI73, Q9JJ19
Cellular response to thyroxine stimulus	7.50E-03	2	P48508, P19468
Negative regulation of cell growth	1.10E-02	4	P01015, P18757, Q9QZQ5, Q99PS8

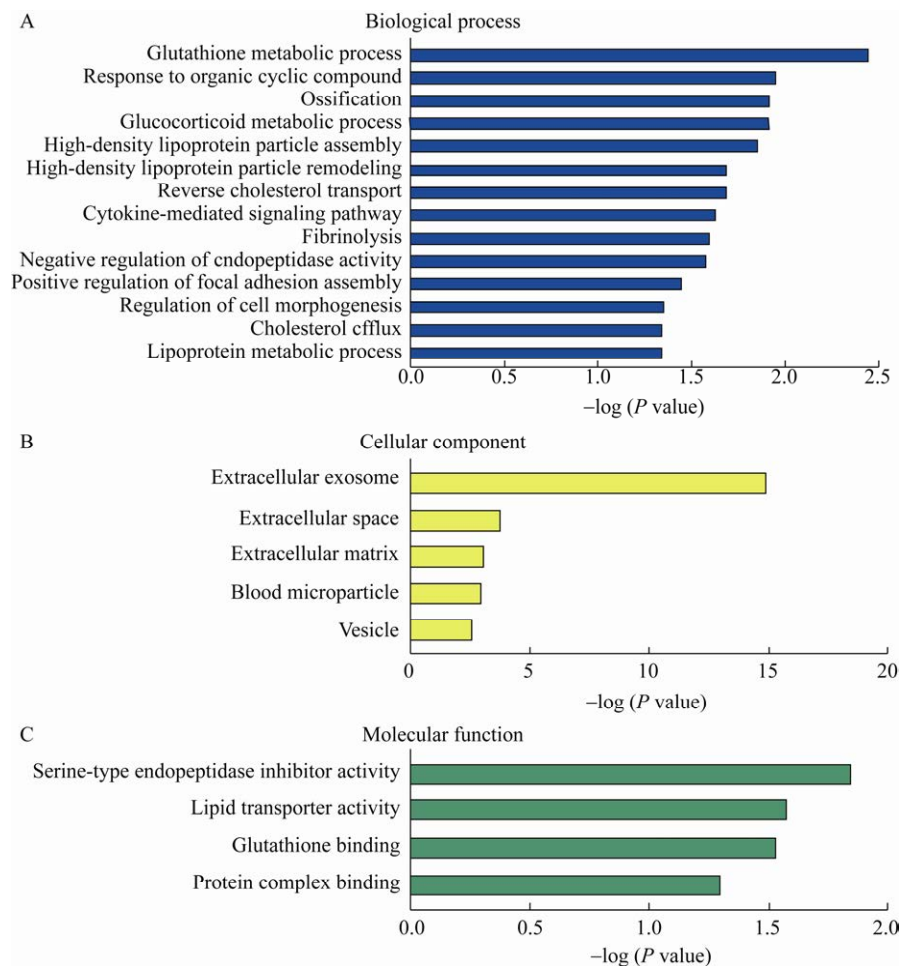


图 5 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型中差异蛋白的功能注释

Fig. 5 Functional analysis of differential proteins in *S. aureus* intraperitoneal injection model. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function.

表 5 腹腔注射金黄色葡萄球菌模型中差异蛋白参与的生物学过程

Table 5 Biological process of differential proteins in *S. aureus* intraperitoneal injection model

Biological process	P value	Count	Uniprot
Glutathione metabolic process	3.56E-03	3	P14942, O35952, P08010
Response to organic cyclic compound	1.10E-02	4	P08010, P97574, P26051, Q99PS8
Glucocorticoid metabolic process	1.19E-02	2	P31211, P04639
Ossification	1.21E-02	3	O88766, Q06496, P97574
High-density lipoprotein particle assembly	1.36E-02	2	P14630, P04639
Reverse cholesterol transport	2.03E-02	2	P14630, P04639
High-density lipoprotein particle remodeling	2.03E-02	2	P14630, P04639
Cytokine-mediated signaling pathway	2.32E-02	3	P26051, P47853, Q80WD1
Fibrinolysis	2.54E-02	2	P18292, Q99PS8
Negative regulation of endopeptidase activity	2.64E-02	3	Q63416, P31211, Q99PS8
Positive regulation of focal adhesion assembly	3.53E-02	2	Q6RUV5, Q99PS8
Regulation of cell morphogenesis	4.36E-02	2	P45592, Q6RUV5
Lipoprotein metabolic process	4.52E-02	2	P14630, P04639
Cholesterol efflux	4.52E-02	2	P14630, P04639

颗粒重塑等过程。在细胞成分中 (图 5B), 大多数的差异蛋白来源于细胞外的外泌体和细胞外空间。在分子功能中 (图 5C), 这些差异蛋白倾向于丝氨酸型内肽酶抑制剂的活性、脂质转运蛋白活性和谷胱甘肽结合等功能。

2.3.3 腹腔注射白色念球菌模型差异蛋白的功能注释

同上, 使用 DAVID 对该模型鉴定到的总计 38 个差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能 3 个方面进行了功能富集分析 (图 6)。在生物学过程中 (图 6A, 表 6), 这些差异蛋白倾向于参与碳水化合物代谢、糖质新生、糖酵解、醛分解和类固醇激素反应等过程。在细胞成分中 (图 6B), 大多数的差异蛋白来源于细胞外的外泌体。在分子功能中 (图 6C), 这些差异蛋白倾向于蛋白结合、单糖结合和乳酸脱氢酶活性等功能。

2.4 三种微生物腹腔注射模型尿蛋白的比较

对 3 种微生物腹腔注射模型鉴定到的尿液差异蛋白进行比较, 重叠情况如图 7 所示。从图中可以看出, 3 个模型鉴定到的差异蛋白没有重合,

但是在腹腔注射大肠杆菌和金黄色葡萄球菌两个模型中共同鉴定到 6 个差异蛋白, 包括 S23A1、HRG、NIT1、FAAA、GBB1 和 PNPB; 在腹腔注射大肠杆菌和白色念球菌两个模型中共同鉴定到 2 个差异蛋白, 包括 GDIA 和 GDIR1; 在腹腔注射金黄色葡萄球菌和白色念球菌两个模型中共同鉴定到 T132A 这 1 个差异蛋白。对 3 种模型尿液差异蛋白富集到的生物学过程进行比较, 发现大鼠腹腔注射不同的微生物时尿蛋白富集的生物学过程也不同。

3 讨论

本研究使用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌建立了 3 种微生物腹腔注射大鼠模型, 通过对尿液进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定, 探究不同微生物感染腹腔时尿蛋白的变化情况。结果显示, 在大肠杆菌腹腔注射模型中共鉴定到 69 个差异蛋白, 在金黄色葡萄球菌腹腔注射模型中共鉴定到 31 个差异蛋白, 在白色念球菌腹腔注射模型中共鉴定到 38 个差异蛋白。

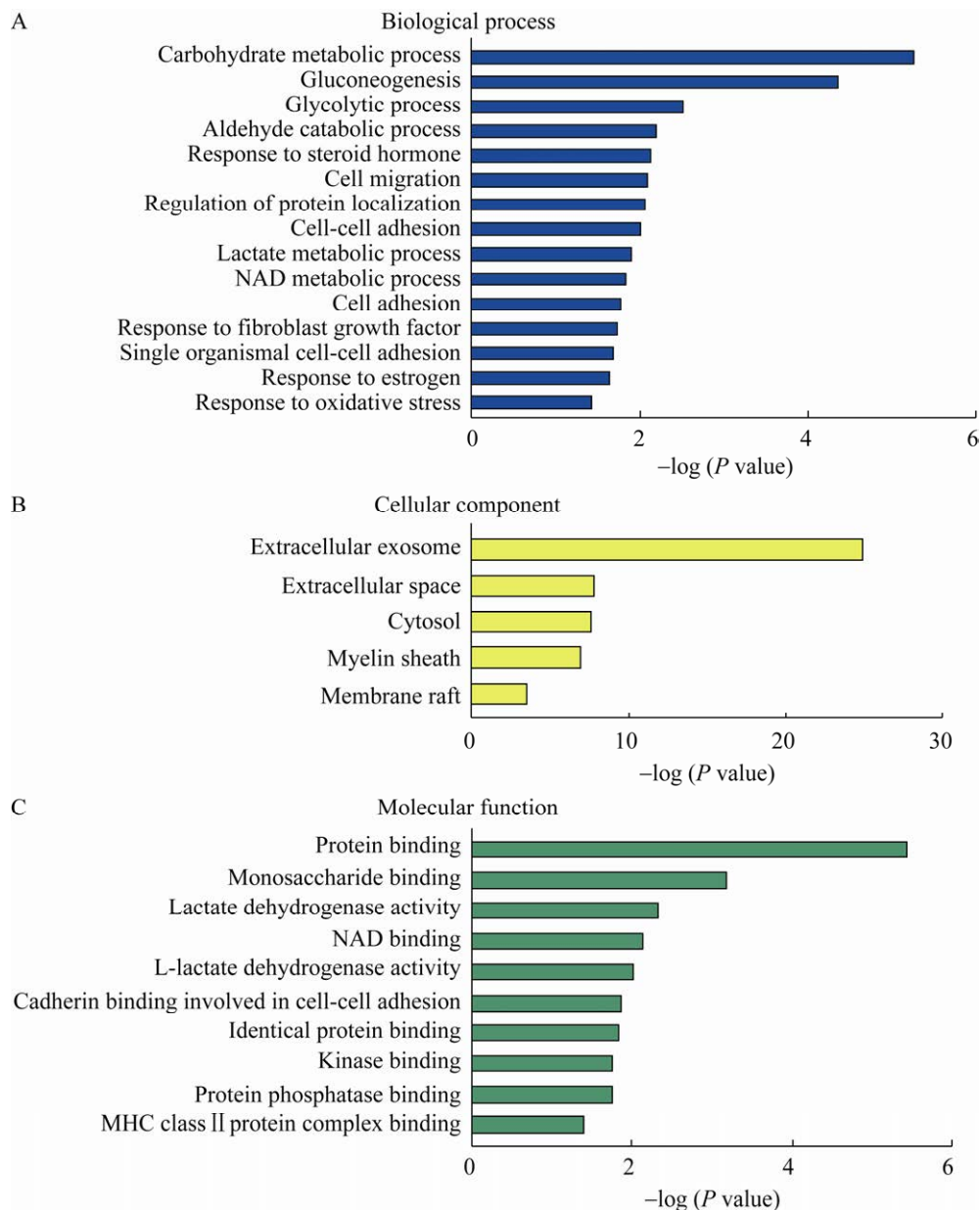


图 6 腹腔注射白色念球菌模型中差异蛋白的功能注释 (A: 生物学过程; B: 细胞成分; C: 分子功能)

Fig. 6 Functional analysis of differential proteins in *C. albicans* intraperitoneal injection model. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function.

腹膜炎大多是由于腹腔感染了微生物而引起的^[14], 有趣的是, 在 3 个模型鉴定到的差异蛋白中有多个蛋白在之前的研究中被报道与腹膜炎有关。在腹腔注射大肠杆菌模型中, 有 4 个蛋白与腹膜炎有关。血清对氧磷酶 1 (PON1) 是一种具

有抗氧化作用的血清酶, 有研究报道在细菌和病毒感染时 PON1 活性会降低^[15]。金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1) 作为腹膜透析患者腹膜损伤的生物标志物^[16]。β-葡萄糖醛酸酶 (BGL1) 的活性被报道作为细菌性腹膜炎的诊断指标^[17]。有研究报

表 6 腹腔注射白色念球菌模型中差异蛋白参与的生物学过程

Table 6 Biological process of differential proteins in *C. albicans* intraperitoneal injection mode

Biological process	P value	Count	Uniprot
Carbohydrate metabolic process	5.36E-06	6	P04642, P42123, Q6P6V0, Q9Z2Y9, P19112, P16617
Gluconeogenesis	4.16E-05	4	Q6P6V0, P19112, P16617, P25113
Glycolytic process	2.90E-03	3	Q6P6V0, P16617, P25113
Aldehyde catabolic process	6.15E-03	2	Q6P6V0, P51635
Response to steroid hormone	6.95E-03	3	P41562, P27139, P08721
Cell migration	7.59E-03	4	Q9QWJ9, P97710, Q9WTQ2, Q9Z1Y3
Regulation of protein localization	8.33E-03	3	Q793F9, Q9Z1Y3, Q5XI73
Cell-cell adhesion	9.16E-03	4	O88767, P41562, P04642, P62260
Lactate metabolic process	1.23E-02	2	P04642, P42123
NAD metabolic process	1.43E-02	2	P04642, P42123
Cell adhesion	1.62E-02	4	P07340, Q9WTQ2, Q9Z1Y3, P08721
Response to fibroblast growth factor	1.83E-02	2	Q9Z2Y9, P17559
Single organismal cell-cell adhesion	1.96E-02	3	Q6X936, Q9R066, Q9Z1Y3
Response to estrogen	2.17E-02	3	P04642, P27139, P01026
Response to oxidative stress	3.61E-02	3	O88767, P41562, P30152

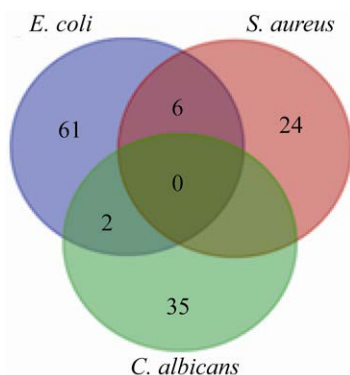


图 7 三种微生物腹腔注射模型鉴定到的差异蛋白的维恩图

Fig. 7 The Venn diagram of differential proteins identified by intraperitoneal injection models of three microorganisms.

道, 血浆中铁调素 (HEPC) 在感染和炎症期间的浓度大幅升高, 而本次研究中该蛋白下调^[18]。在腹腔注射金黄色葡萄球菌模型中, 有 2 个蛋白与腹膜炎有关。中性粒细胞胶原酶 (MMP8) 是一种组织基质降解酶, 在炎症刺激下由白细胞释放, 可能导致腹膜相关器官损伤, 继发性腹膜炎患者的腹膜液样品中 MMP-8 水平显著升高^[19]。CD44

缺乏与大肠杆菌诱导的腹膜巨噬细胞释放促炎性因子和趋化因子的增强有关^[20]。在腹腔注射白色念球菌模型中, 有 3 个蛋白与腹膜炎有关。中性粒细胞明胶酶相关的脂蛋白 (NGAL) 是抗菌性先天免疫系统的重要组成部分, 研究发现腹膜炎患者的腹膜液中 NGAL 水平升高, 可能作为早期诊断的有用工具^[21-22]。胰石蛋白 (LITH) 在区分腹膜炎严重程度和预测重症监护病房患者死亡方面具有很高的诊断准确性^[23-24]。有研究发现, 在发生腹膜炎的肝硬化患者中, 腹水补体 3 (CO3) 水平显著降低^[25]。这些尿蛋白将来有可能成为腹膜炎敏感的早期诊断标志物。

对 3 个模型尿液蛋白质组的结果进行比较后发现, 3 个模型尿蛋白差别显著, 尿蛋白富集的生物学过程也不同, 猜测这可能与 3 种微生物自身的特点和对腹腔感染的严重程度不同有关, 这表明尿液可以反映腹腔被不同菌液感染时的状态。仅在大肠杆菌腹腔注射模型中富集到了白细胞黏附这一个与免疫相关的过程, 其他模型的尿蛋白没有富集到与炎症或者免疫直接相关的生物

学过程, 猜测这可能与大鼠自身的免疫水平较强有关。值得注意的是, 虽然本研究的 3 个动物模型是由两组研究人员进行的, 使用了两种大鼠品系, 但是我们采用的是被感染前后自身对照的方法来筛选差异蛋白, 所以理论上差异蛋白主要与感染和刺激有关, 与大鼠品系无关。本次研究是尝试利用尿蛋白区分不同微生物腹腔感染的初步探索, 这些结果还需要在更大量的动物实验中进行验证。

4 结论

我们发现不同的微生物注射到大鼠腹腔时尿蛋白质组差别显著, 提示尿液可能具有良好的鉴别诊断潜能。

REFERENCES

- [1] Gao YH. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 2013, 56(12): 1145-1146.
- [2] Gao YH. Now is the time to test early urinary biomarkers in large-scale human samples. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(6): 851-853.
- [3] Zhang FS, Wei J, Li XD, et al. Early candidate urine biomarkers for detecting alzheimer's disease before amyloid- β plaque deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis*, 2018, 66(2): 613-637.
- [4] Wei J, Meng WS, Gao YH. Urine proteome changes in rats subcutaneously inoculated with approximately ten tumor cells. *Peer J*, 2019, 7(11): e7717.
- [5] Wu JQ, Guo ZG, Gao YH. Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. *Cancer Med*, 2017, 6(11): 2713-2722.
- [6] Zhang YM, Gao YF, Gao YH. Early changes in the urine proteome in a rat liver tumour model. *Peer J*, 2020, 8: e8462.
- [7] Wang T, Li LJ, Qin WW, et al. Early urine proteome changes in an implanted bone cancer rat model. *Bone Rep*, 2020, 12: 100238.
- [8] Wei J, Ni N, Meng WS, et al. Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. *Sci Rep*, 2019, 9: 13804.
- [9] Zhang LP, Li YQ, Meng WS, et al. Dynamic urinary proteomic analysis in a Walker 256 intracerebral tumor model. *Cancer Med*, 2019, 8(7): 3553-3565.
- [10] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [11] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, 75(17): 4646-4658.
- [12] Schmidt C, Grønborg M, Deckert J, et al. Mass spectrometry-based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *RNA*, 2014, 20(3): 406-420.
- [13] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [14] Spalding DRC, Williamson RCN. Peritonitis. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2008, 69(S1): M12-M15.
- [15] Farid AS, Horii Y. Modulation of paraoxonases during infectious diseases and its potential impact on atherosclerosis. *Lipids Health Dis*, 2012, 11: 92.
- [16] Cho Y, Johnson DW, Vesey DA, et al. Higher dialysate matrix metalloproteinase-2 levels are associated with peritoneal membrane dysfunction. *Perit Dial Int*, 2016, 36(1): 16-25.
- [17] Beratis NG, Georgiou G, Eliopoulou M. Increased activity of lysosomal enzymes in the peritoneal fluid of bacterial peritonitis. *Pediatrics*, 2002, 109(3): E44.
- [18] Stefanova D, Raychev A, Deville J, et al. Hepcidin protects against lethal *Escherichia coli* sepsis in mice inoculated with isolates from septic patients. *Infect Immun*, 2018, 86(7): e00253-18.
- [19] Hästbacka J, Hynninen M, Kolho E, et al. Collagenase 2/matrix metalloproteinase 8 in critically ill patients with secondary peritonitis.

- Shock, 2007, 27(2): 145-150.
- [20] van der Windt GJ, Van't Veer C, Florquin S, et al. CD44 deficiency is associated with enhanced *Escherichia coli*-induced proinflammatory cytokine and chemokine release by peritoneal macrophages. *Infect Immun*, 2010, 78(1): 115-124.
- [21] Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(4): 471-479.
- [22] Martino FK, Filippi I, Giavarina D, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the early diagnosis of peritonitis: the case of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Contrib Nephrol*, 2012, 178: 258-263.
- [23] Fisher OM, Oberkofler CE, Raptis DA, et al. Pancreatic stone protein (PSP) and pancreatitis-associated protein (PAP): a protocol of a cohort study on the diagnostic efficacy and prognostic value of PSP and PAP as postoperative markers of septic complications in patients undergoing abdominal surgery (PSP study). *BMJ Open*, 2014, 4(3): e004914.
- [24] Gukasjan R, Raptis DA, Schulz HU, et al. Pancreatic stone protein predicts outcome in patients with peritonitis in the ICU. *Crit Care Med*, 2013, 41(4): 1027-1036.
- [25] Mustafa G, Khan M, Alam K, et al. Study on ascitic fluid complement 3 level in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and without spontaneous peritonitis. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(79): 1905-1907.

(本文责编 郝丽芳)