

# 基于蛋白组学尿道下裂患儿的差异蛋白特点分析及 相关蛋白 ZEB1 的表达\*

农一敏<sup>1</sup> 张宝欣<sup>1</sup> 乌日尼勒图<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:基于蛋白组学观察尿道下裂患儿的差异蛋白特点,并分析相关蛋白 ZEB1 的表达。方法:收集我院 2018 年 6 月—2019 年 12 月泌尿外科 44 例尿道下裂患儿外周血标本,同时收集 44 例健康体检儿童血液样本。取两组患儿血浆样本,提取总蛋白,进行二维凝胶电泳分离和图像分析,筛选出差异蛋白,利用质谱技术进行鉴定,并运用 RT-PCR 方法测定相关蛋白 ZEB1 mRNA 的表达。结果:共筛选出 44 个差异表达蛋白,通过质谱分析和数据库检索论证,其中上调 32 个蛋白,下调 12 个蛋白;上调前 5 的蛋白有转录因子 HES-1、膜联蛋白 A3、E 盒结合锌指蛋白 1、锌指蛋白 12 和蓬乱蛋白,下调前 5 的蛋白则有锌转运蛋白 10、肌球蛋白 9、重组人碱性成纤维细胞生长因子受体 2、胰岛素样生长因子 2 及肌球蛋白 12。GO 功能分析显示,差异蛋白主要参与了碱基化合物合成、细胞代谢、DNA 转录、RNA 代谢等生物学过程。KEGG 通路分析表明这些蛋白主要集中在信号通路 Th17 细胞、Jak-STAT 信号通路、Wnt 信号通路等。通过 STRING 数据库构建差异蛋白相互作用网络分析发现,差异蛋白 ZEB1 与 STAT3、STAT6、CDH1、EB2、CDH2、CTBP1、SUMO1 和 TP53BP1 关系较为密切。尿道下裂患儿血浆中 ZEB1 mRNA 表达量为(1.04±0.14),显著高于健康对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:运用蛋白组学方法明确了尿道下裂患儿血清差异蛋白质的表达,ZEB1 在尿道下裂发生过程中具有重要作用。

**[关键词]** 蛋白组学;尿道下裂;E 盒结合锌指蛋白 1

**DOI:**10.13201/j.issn.1001-1420.2021.04.009

**[中图分类号]** R691 **[文献标志码]** A

## Characteristics analysis of differential protein in children with hypospadias based on proteomics and related protein ZEB1 expression

NONG Yimin ZHANG Baoxin WURINILETU

(Department of Pediatric Surgery, Shenzhen Baoan Women's and Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518102, China)

Corresponding author: ZHANG Baoxin, E-mail: lymihox@163.com

**Abstract Objective:** To investigate characteristics of differential protein in children with hypospadias based on proteomics and analyze related protein ZEB1 expression. **Methods:** From June 2018 to December 2019, 44 children with hypospadias were selected and the peripheral blood samples were collected. Meanwhile, the blood samples of 44 children with health check were also obtained. The serum samples of children in two groups were attained and the total proteins were extracted. Two gel electrophoresis separation and image analysis were used to select differential proteins. Then, mass spectrometry was employed to identify, and RT-PCR method was applied to determine the expression of related protein ZEB1 mRNA. **Results:** Forty-four differentially expressed proteins were screened by mass spectrometry and database retrieval, which 32 proteins were up-regulated, and 12 proteins were down-regulated. The first five proteins with up-regulation were the transcription factor HES-1, membrane protein A3, zinc finger E-box binding homeobox 1, zinc finger protein 12 and DVL. While, the first five proteins with down-regulation were zinc transporters 10, myosin 9, human recombinant basic fibroblast growth factor receptor 2, insulin-like growth factor 2 and myosin 12. GO function analysis indicated that the differential proteins were mainly involved in the biological processes such as nucleobase-containing compound metabolic process, cell metabolism, DNA, RNA transcription metabolism process. KEGG pathway analysis showed that these proteins were mainly concentrated in the signal path Th17 cells, Jak-STAT signal pathway, Wnt signaling pathways, etc. The differential protein network built by STRING database indicated differential protein ZEB1 had close relationship with STAT3, STAT6, CDH1, EB2, CDH2, CTBP1, SUMO1 and TP53BP1. Plasma ZEB1 mRNA expression in children with hypospadias was (1.04±0.14), which was significantly higher than that of healthy controls. The difference all presented statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The use of proteomics approach has been clear about the expression of differential protein in hypospadias children, and ZEB1 plays an important role in hypospadias.

**Key words** proteomics; hypospadias; zinc finger E-box binding homeobox

\*基金项目:深圳市宝安区科创局(No:2017JD013)

<sup>1</sup>深圳市宝安区妇幼保健院儿外科(广东深圳,518102)

通信作者:张宝欣,E-mail:lymihox@163.com

尿道下裂是指男性尿道开口位置异常,是小儿泌尿外科常见的先天缺陷疾病;近年其发病率呈现逐渐上升趋势,发病率约 3%~8%<sup>[1]</sup>。研究表明,尿道下裂是由多种因素共同导致的,胚胎在 8~14 周尿道形成的关键时期,受到内源性或外源性因素影响,雄激素基因表达异常,导致大量雌激素或孕酮暴露,进而影响尿道的正常发育<sup>[2]</sup>。目前临床多采取雌激素作为尿道下裂的早期筛查及诊断指标,但由于其诊断敏感性及特异性欠佳,寻找其他新的特异性标志物辅助尿道下裂早期筛查及诊断具有重要意义<sup>[3]</sup>。随着蛋白质组学的深入研究,质谱、肽鉴定和生物信息学分析等技术为高通量蛋白质检测及生物功能效应分析提供了可能,也为疾病特异性诊断开拓了新方法<sup>[4-5]</sup>。尿道下裂的具体发病机制尚不明确,与尿道下裂发生相关的差异蛋白质有哪些也不清楚。本研究尝试应用 TMT 技术联合高通量 LC-MS/MS 分析筛选出差异化表达的蛋白,并以 E 盒结合锌指蛋白 1(zinc finger E-box binding homeobox, ZEB1)为例进行分析<sup>[6]</sup>,探讨其尿道下裂发生、发展过程中的作用与价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集我院 2018 年 6 月—2019 年 12 月泌尿外科 44 例尿道下裂患儿外周血标本,同时收集 44 例健康体检儿童血液样本。本研究经过医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 血浆蛋白质提取及质量分析** 抗凝后离心取血浆上清液,收集蛋白样本,采用 BCA 试剂盒测定总蛋白量,然后应用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳跑胶。同时,根据 Thermo Scientific Pierce BCA 试剂盒中标准蛋白质,并通过酶标仪测定 OD 值制作标准曲线。

**1.2.2 TMT 标记定量蛋白质组学分析** 采用 TMT<sup>TM</sup>(Tandem Mass Tag<sup>TM</sup>)技术,以多种同位素标记多肽的氨基基团,通过高通量 LC-MS/MS 分析,结合质谱,识别鉴定峰形,比较各样品中蛋白质相对含量的差异,从而筛选差异蛋白,然后对差异表达基因进行生物信息学分析。

**1.2.3 对差异蛋白进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析** 通过检索数据库 Gene Ontology Database(<http://www.geneontology.org>),对差异蛋白进行 GO 功能显著性富集分析,阐明血浆中差异蛋白功能。同时还进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,探究其在尿道下裂发病机制中的作用。

**1.2.4 差异蛋白互作网络分析** 采用 STRING 数据库(<http://string-db.org/>)对差异蛋白进行分子间的相互作用网络分析。每个网络节点表示一

个蛋白分子,连线则反映了蛋白之间的相互作用关系,连线越宽代表得分越高,关联也就越大。

### 1.3 临床相关蛋白检测

qRT-PCR 检测 ZEB1 mRNA 水平。抽取外周血后分离提取白细胞上清液,加入 1 mL Trizol 至上清液中混匀,提取总 RNA,测定浓度,并根据公司设计引物,见表 1。反应条件如下:94℃ 预变性 180 s;94℃ 变性 5 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算 mRNA 相对表达量。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F:5'-TGGGTGTGAACACGAGAA-3'
	R:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
ZEB1	F:5'-AGGAACCTCACAGCTCCATTAC-3'
	R:5'-AATGGCTCCTCTCTGAGTT-3'

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较则采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质鉴定及差异蛋白表达

尿道下裂患儿和健康儿童血浆蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱如图 1 所示,蛋白样品条带丰富且清晰,提示蛋白提取率及浓度符合蛋白质组学分析。根据 LC-MS/MS 结果,计算分析同位素峰面积,并在相关数据库中对血浆蛋白质进行鉴定和相对定量分析,并获得 628 个蛋白,其中 267 个可定量。设定两组蛋白定量分析的差异倍数  $FC > 2.0$  为上调, $< 1:2$  则为下调,发现尿道下裂患儿和健康儿童共有 44 个差异蛋白,其中上调 32 个蛋白,下调 12 个蛋白;上调前 5 的蛋白有转录因子 HES-1、膜联蛋白 A3、E 盒结合锌指蛋白 1、锌指蛋白 12 和蓬乱蛋白,下调前 5 的蛋白则有锌转运蛋白 10、肌球蛋白 9、重组人碱性成纤维细胞生长因子受体 2、胰岛素样生长因子 2 及肌球蛋白 12,具体见表 2。

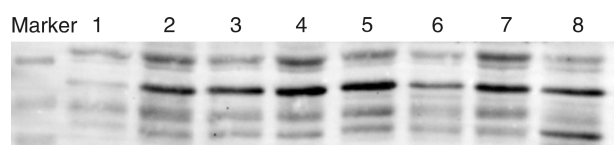


图 1 尿道下裂患儿和健康儿童血浆蛋白电泳图谱

表 2 尿道下裂/健康儿童血浆中差异表达的蛋白质

谱分析数据

编号	蛋白	差异倍数 (尿道下裂/健康儿童)
1	转录因子 HES-1(HES1)	4.64
2	膜联蛋白 A3(ANXA3)	3.27
3	锌指蛋白 12(ZNF12)	2.57
4	蓬乱蛋白(DVL)	2.34
5	E 盒结合锌指蛋白 1(ZEB1)	1.87
6	锌转运蛋白 ZIP10	0.57
7	肌球蛋白 9	0.52
8	重组人碱性成纤维细胞生长因子受体 2(FGFR2)	0.48
9	胰岛素样生长因子 2(IGF2)	0.45
10	肌球蛋白 12	0.44

### 2.2 差异蛋白的 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

对差异蛋白进行 GO 功能富集,结合筛选条件  $P < 0.01$ ,从生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)三个方面进行分析,得到生物过程相关条目 197 条、分子功能相关条目 35 条,细胞组分相关条目 20 条,具体见表 3(取各项前 10 的条目)。差异蛋白功能主要富集在以碱基化合物代谢负调节、细胞代谢正调节、DNA 转录正调节和 RNA 代谢正调节等为主的生物过程,差异蛋白可能主要通过碱基化合物、DNA、RNA 代谢过程介导尿道下裂的发生。差异蛋白设计的 MF 包括结合 DNA 结合转录因子、结合糖皮质激素受体及转录因子活性等。CC 分析显示差异蛋白主要位于细胞器、细胞核、核染色体等。

### 2.3 KEGG 通路途径分析

将差异蛋白递至 DAVID 数据库进行 KEGG 通路途径分析,结果筛选出 19 信号通路,如图 2 所示。这些蛋白集中在炎症性肠病、肿瘤信号通路、Th17 细胞分化、恶性肿瘤中的微小 RNA 及 Jak-STAT 信号通路等。

### 2.4 差异蛋白相互作用网络 STRING 分析

将差异蛋白导入 STRING 数据库,选择 homo sapiens 生成蛋白质 PPI 网络图(图 3),其中 ZEB1、STAT3、STAT6、CDH1、EB2、CDH2、CTBP1、SUMO1 和 TP53BP1 关系较为密切,均为关键蛋白。

### 2.5 尿道下裂患儿及健康体检儿童血样中 ZEB1 蛋白及 mRNA 表达

如表 4 和图 4 所示,尿道下裂患儿血样中 ZEB1 蛋白及 mRNA 水平分别为  $(0.64 \pm 0.13)$  和  $(1.04 \pm 0.14)$ ,显著高于健康对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

尿道下裂作为泌尿系统先天性畸形疾病之一,

在男性中发病率逐年上升,其具体的发病机制并未完全明确。既往研究表明,胚胎期睾酮合成途径异常是导致尿道下裂发生的主要原因<sup>[7]</sup>,相关蛋白差异化表达是否影响了睾酮合成及性发育过程未见报道。本研究对先天性尿道下裂患儿血液样本进行了蛋白质组学分析,筛选功能相关蛋白,通过 GO 功能富集、KEGG 通路及差异蛋白互作网络的构建分析了差异蛋白在尿道下裂中的作用及可能的致病机制。

本研究通过 TMT 标记定量蛋白组学分析了尿道下裂患儿血清中蛋白质表达谱的变化,共获得 44 个差异蛋白,其中上调 32 个蛋白,下调 12 个蛋白;上调前 5 的蛋白有转录因子 HES-1、膜联蛋白 A3、E 盒结合锌指蛋白 1、锌指蛋白 12 和蓬乱蛋白,下调前 5 的蛋白则有锌转运蛋白 10、肌球蛋白 9、重组人碱性成纤维细胞生长因子受体 2、胰岛素样生长因子 2 及肌球蛋白 12。其中既往研究对转录因子 HES-1、膜联蛋白 A3 进行过相关 GO 功能、KEGG 通路分析,而 E 盒结合锌指蛋白 1 相关 GO 功能、KEGG 通路作用尚未见定论。

E 盒结合锌指蛋白 1(ZEB1)作为细胞核转录的重要因子,位于 10 号染色体,参与了胚胎形成并与性发育密切相关,在细胞凋亡、肿瘤的发生发展中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。国外学者证实,尿道下裂组织中 ZEB1 明显高表达,且与尿道下裂严重程度有一定关系<sup>[9-10]</sup>。本研究通过蛋白组学技术发现尿道下裂患儿血浆中差异蛋白包括了 ZEB1,这表明 ZEB1 不仅在尿道下裂包皮组织中表达有差异,在血液中也存在差异。ZEB1 蛋白可与 E-钙粘蛋白启动子结合抑制 E-钙粘蛋白的转录和翻译,调节转录因子活性,导致尿道上皮细胞黏附减弱,这些都可能诱导尿道下裂的发生<sup>[11]</sup>。我们通过生物信息分析发现,尿道下裂中差异蛋白 ZEB1 可抑制碱基化合物代谢和 RNA 聚合酶 II 介导的逆转录,激活细胞凋亡代谢、高分子复合物形成等过程,同时在分子功能方面能调节转录因子活性,与 DNA 结合转录因子、糖皮质激素受体等绑定启动相关受体表达<sup>[12]</sup>,通过肿瘤信号通路、Th17 细胞分化、Jak-STAT 信号通路及 Wnt 信号通路等介导尿道等生殖系统组织发育异常<sup>[13-15]</sup>。钟晓峰等<sup>[16]</sup>在膀胱尿路上皮癌组织中发现 ZEB 表达上调,ZEB1 和 ZEB2 的高表达导致机体免疫功能紊乱,Th17/Treg 细胞分化失衡,从而诱导肿瘤细胞上皮-间质的转化,尿路上皮组织发生癌变。此外,周阳等<sup>[6]</sup>的研究也发现,尿道下裂患儿包皮组织中 ZEB1 表达也明显上调,且与尿道下裂严重程度正相关,尿道下裂畸形的主要病理因素是上皮细胞黏附融合异常,这可能是因为 ZEB1 诱导尿道上皮细胞发生间质转化。

表 3 差异蛋白的 GO 功能富集

GO-编号	说明	基因集计数	P
<b>生物学过程</b>			
GO:0051173	正性调节氮化合物代谢过程	11 of 2946	<0.001
GO:0045934	含碱基的负调控复合代谢过程	9 of 1424	<0.001
GO:0031325	正调控的细胞代谢过程	11 of 3060	<0.001
GO:0010604	正调控的高分子代谢进程	11 of 3081	<0.001
GO:0000122	受 RNA 聚合酶 II 引导的负性调控转录	8 of 809	<0.001
GO:0051094	正性调节的发育过程	8 of 1286	<0.001
GO:0051253	负调控的 RNA 代谢过程	8 of 1303	<0.001
GO:0048523	负调控的细胞学进程	11 of 4454	<0.001
GO:0048593	DNA 为模板的正调控转录	8 of 1435	<0.001
GO:0051254	正性调控的 RNA 代谢进程	8 of 1596	<0.001
<b>分子功能</b>			
GO:0140297	DNA 结合转录因子结合	6 of 327	<0.001
GO:0008134	转录因子结合	7 of 610	<0.001
GO:0035259	糖皮质激素受体结合	3 of 13	<0.001
GO:0043565	序列特异性 DNA 结合	7 of 1047	<0.001
GO:0140110	转录子活性	8 of 2069	<0.001
GO:0019902	磷酸酶结合	4 of 168	<0.001
GO:0000978	RNA 聚合酶 II 近端启动子序列特异性 DNA 结合	5 of 457	<0.001
GO:0005515	蛋白质结合	11 of 6605	<0.001
GO:0061629	RNA 聚合酶 II 一特异性 DNA 结合体转录因子结合	4 of 257	0.000 12
GO:0042802	同源蛋白质结合	7 of 1754	0.000 13
<b>细胞组份</b>			
GO:0070013	细胞内细胞器腔	10 of 5162	0.000 32
GO:0044454	核染色体	5 of 480	0.000 32
GO:0044427	染色体	6 of 819	0.000 32
GO:0016342	连环蛋白复合物	2 of 8	0.000 32
GO:0000785	染色质	5 of 489	0.000 32
GO:0031981	细胞核	9 of 4030	0.000 36
GO:0005667	转录因子复合物	4 of 326	0.000 36
GO:0000790	核染色质	4 of 333	0.000 36
GO:0005654	核浆	8 of 3446	0.000 98
GO:0044446	细胞内细胞器部分	11 of 8882	0.001 70

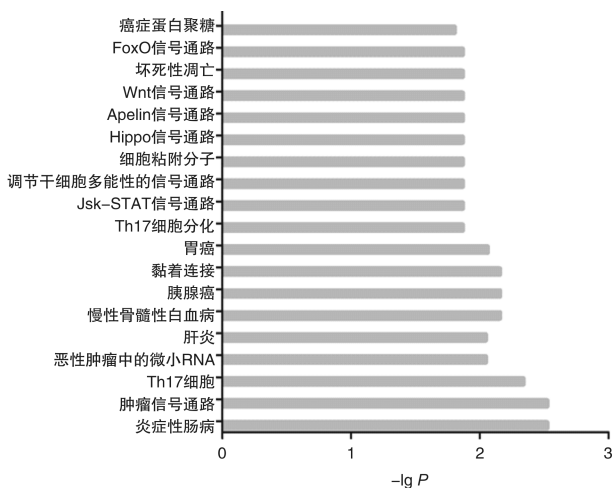


图 2 差异表达蛋白的 KEGG 注释

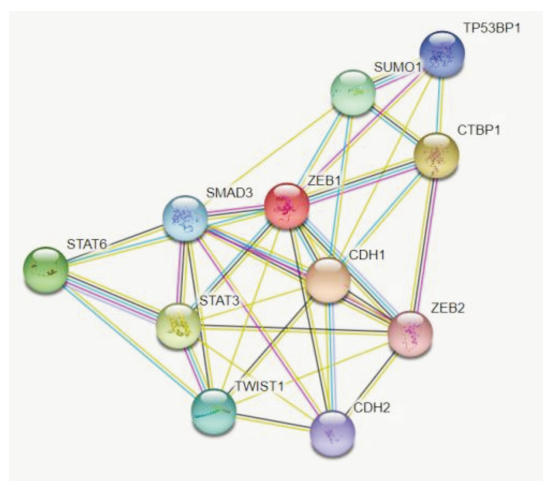


图 3 差异表达蛋白的相互作用网络 STRING 分析

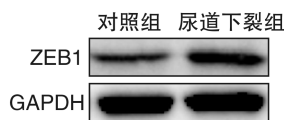


图 4 儿童血样中 ZEB1 蛋白表达

表 4 尿道下裂患儿及健康体检儿童血样中 ZEB1 蛋白及 mRNA 表达  $\bar{x} \pm s$

组别	ZEB1 蛋白灰度比值	ZEB1 mRNA
健康对照组	0.31±0.12	0.65±0.08
尿道下裂组	0.64±0.13	1.04±0.14
<i>t</i>	-12.563	-16.286
<i>P</i>	<0.001	<0.001

同时,本文还应用 STRING 数据库构建了差异蛋白相互作用网络分析图,差异蛋白 ZEB1 与 STAT3、STAT6、CDH1、EB2、CDH2、CTBP1、SUMO1 和 TP53BP1 关系较为密切。ZEB1 可通过 Jak-STAT 信号通路参与调节 STAT3、STAT6 活性,进而在尿道下裂的发生发展中介导 DNA 转录、细胞代谢和程序性进展等过程<sup>[13-14]</sup>。研究还通过 RT-PCR 探究了尿道下裂患儿与健康对照儿童血样中 ZEB1 表达情况,证实尿道下裂患儿血样中 ZEB1 mRNA 水平明显升高,与蛋白组学分析差异蛋白结果一致。

综上所述,本研究通过蛋白组学及生物信息学分析探究了尿道下裂患儿差异蛋白的表达,并进一步通过 RT-PCR 验证了 ZEB1 表达上调,其在尿道下裂中参与了 DNA 转录、细胞代谢等过程发挥了重要作用,其他差异蛋白及具体机制后续仍需深入探讨。

参考文献

[1] Huang WY, Chen YF, Guo YJ, et al. Epidemiology of hypospadias and treatment trends in Taiwan a nationwide study[J]. J Urol, 2011, 185(4): 1449-1454.  
 [2] 张智慧, 王书惠, 白吉祥. 雌激素受体基因多态性与东北地区儿童尿道下裂相关性分析[J]. 2017, 23(1): 61-64.  
 [3] 曹国锋, 咸华. 蓬乱蛋白在尿道下裂包皮中的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(11): 1561-1563.  
 [4] 李文卿, 任思楣, 等. 棕榈酰化蛋白质组学分析揭示前列腺癌细胞中雄激素促进代谢相关蛋白棕榈酰化修饰[J/OL]. 北京大学学报(医学版), 2020, 52(2): 227-233.

[5] 张建业, 徐长志, 张颖, 等. 草酸钙结石晶体对人近曲肾小管上皮细胞蛋白质表达谱的影响[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志(J/OL), 2019, 13(4): 225-229.  
 [6] 周阳, 乔梁, 李永响, 等. 尿道下裂患儿包皮组织中 E 盒结合锌指蛋白 1 的表达[J]. 中华男科学杂志, 2015, 21(6): 510-514.  
 [7] Lehmann KP, Phillips S, Sar M, et al. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rat sexposed to di(n-butyl)phthalate[J]. Toxicol Sci, 2004, 81(1): 60-68.  
 [8] Garavelli L, Cerruti-Mainardi P, Viridis R, et al. Genitourinary anomalies in Mowat-Wilson syndrome with deletion /mutation in the zinc finger homeo box 1B gene (ZFHX1B): Report of three Italian cases with hypospadias and review[J]. Horm Res, 2005, 63(4): 187-192.  
 [9] Wang Z, Liu BC, Lin GT, et al. Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias: Microarray analysis[J]. J Urol, 2007, 177(5): 1939-1946.  
 [10] Qiao L, Tasian GE, Zhang H, et al. ZEB1 is estrogen responsive in vitro in human foreskin cells and is over expressed in penile skin in patients with severe hypospadias[J]. J Urol, 2011, 185(5): 1888-1893.  
 [11] Dravis C, Yokoyama N, Chumley MJ, et al. Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development [J]. Dev Biol, 2004, 271(2): 272-290.  
 [12] Qiao L, Tasian GE, Zhang H, et al. Androgen receptor is overexpressed in boys with severe hypospadias, and ZEB1 regulates androgen receptor expression in human foreskin cells[J]. Pediatr Res, 2012, 71(4): 393-398.  
 [13] 常俊镨, 张炜, 沈百欣, 等. 尿道下裂仔鼠阴茎蛋白质组学分析及膜联蛋白 A3 的表达变化研究[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(10): 877-882.  
 [14] 沈华, 张炜, 马隆, 等. 邻苯二甲酸二丁酯诱导大鼠尿道下裂发生的阴茎组织差异蛋白质组分析[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(11): 1410.  
 [15] Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity [J]. Development, 2005, 132(20): 4421-4436.  
 [16] 钟晓健, 黄洪才, 叶东明, 等. 膀胱尿路上皮癌组织中 E 盒结合锌指蛋白 2、E-钙黏附蛋白的表达变化及其意义[J]. 山东医药, 2016, 56(39): 9-11.

(收稿日期: 2020-06-13)