论文

免疫性肝纤维化大鼠肝非实质细胞蛋白质组分析

赵倩倩^①, 冯艳玲^①, 贾小芳^①, 尹林^①, 郑燕^①, 欧阳冬生^②, 周宏灏^{②*}, 张丽军^{①②*}^① 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 上海 201508;^② 中南大学临床药理研究所, 长沙 410078

* 联系人, E-mail: hhzhou@public.cs.hn.cn; zhanglijun1221@163.com

收稿日期: 2013-03-27; 接受日期: 2013-05-20

国家自然科学基金(批准号: 81271834)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB910700)、中国博士后科学基金(批准号: 20100471238)、中国博士后科学基金特别资助项目(批准号: 201104516)、国家关键技术研发项目(批准号: 2012ZX10001003)、上海市科学技术委员会科研计划项目(批准号: 11DZ2292900)和重大新药创制专项课题(批准号: 2012ZX09303013)资助

摘要 研究肝纤维化发生机制对治疗肝纤维化有重要意义. 通过注射猪血清 2, 4, 6 和 8 周后构建纤维化程度 S0-1, S2, S3-4 及 S4 期的大鼠肝纤维化模型, 采用 Masson 染色法检测大鼠肝脏的病理学变化. Percoll 梯度密度离心富集肝非实质细胞. 提取处理 4 和 8 周的大鼠肝非实质细胞蛋白, 二维凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝(G250)染色. 在第 4 周样本中鉴定到 18 个非冗余差异蛋白, 通过进一步验证, PDIA3 和 NDUV 蛋白质在蛋白表达水平及 mRNA 水平具有一致性. 大鼠模型 Western blot 检测及人肝脏免疫组化检测验证 PDIA3 表达下调. 本研究阐明不同时期大鼠肝纤维化模型和正常对照肝非实质细胞蛋白表达变化, 揭示了有关肝纤维化进程的重要信息.

关键词肝纤维化
蛋白质组
非实质细胞
PDIA3

肝脏是人体最大的器官, 肝脏疾病严重影响人体健康. 在中国有近 6 亿感染乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)者, 约 1.3 亿 HBV 携带者, 3 亿肝炎(hepatitis B, HB)患者. 每年近 30 万人死于肝脏疾病, 包括肝硬化和肝癌, 其中 50%死于肝癌^[1,2]. 大多数肝脏疾病经历肝炎、肝纤维化、肝硬化及肝癌的病理过程. 其中, 只有肝纤维化是可以逆转的. 肝纤维化是慢性肝脏疾病一个重要的组织特征, 以细胞外基质的积累和重组为特点. 非实质细胞(nonparenchymal cell, NPCs)(主要包括肝窦状内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSECs)、淋巴细胞、枯否细胞(Kupffer cells, KCs)和肝纤维细胞)在基膜蛋白质合成及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成中发挥重要作用^[1-3]. 在肝纤维化进程中, 有很多生长

因子和细胞因子调节胶原代谢, 转化生长因子(beta-transforming growth factor, TGF- β)促进肝纤维化. 非实质细胞中的 T 细胞、枯否细胞和肝窦状内皮细胞是分泌细胞因子的主要细胞^[4,5]. 肝纤维化也是免疫炎症和免疫应答的过程, 非实质细胞在早期的初始免疫和适应性免疫应答中发挥重要作用^[3-6]. 因此, 研究非实质细胞在肝纤维化进程中的蛋白质表达谱的变化具有重要意义. 然而, 目前对于非实质细胞中参与肝纤维化病理过程的蛋白质及其信号通路的了解有限. 免疫性肝纤维化模型^[7-9]因其能够模仿 HBV 引起的慢性肝损伤而被广泛用于肝纤维化研究. 在众多免疫性肝纤维化模型中, 猪血清注射大鼠(*Rattus norvegicus*)肝纤维化模型门静脉周围的单核细胞的渗入和纤维化应答与人类非常相似, 因此应

引用格式: 赵倩倩, 冯艳玲, 贾小芳, 等. 免疫性肝纤维化大鼠肝非实质细胞蛋白质组分析. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 928-938

英文版见: Zhao Q Q, Feng Y L, Jia X F, et al. Proteome analysis on hepatic non-parenchymal cells of immune liver fibrosis rats. Sci China Life Sci, 2014, 57, in press

用最为广泛^[8]. 很多研究采用该模型研究人类肝纤维化^[7,10], 尤其是由 HBV 引起的肝纤维化^[11].

蛋白质组学是一种高通量和高灵敏度的技术, 被广泛用于研究肝纤维化和肝硬化病理进程^[12-16]. 大多数肝纤维化蛋白质组研究都集中于组织、血浆或细胞系, 很少有研究涉及原代细胞蛋白质组, 尤其是非实质细胞, 如枯否细胞^[17,18]、肝窦状内皮细胞^[19]和肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)^[20]. Hirsch 等人^[18]研究了局部出血及再灌注对大鼠枯否细胞蛋白质组表达的影响, 发现在局部出血及再灌注大鼠模型中 Cu, Zn-超氧化物歧化酶的活性提高了. Teufelhofer 等人^[17]分析了大鼠肝脏原代细胞及血浆与肝脏组织的蛋白质表达谱变化. Li 等人^[19]报道了正常大鼠肝窦状内皮细胞的质膜蛋白质表达谱. 目前为止, 还没有关于肝纤维化模型中非实质细胞蛋白质组的研究.

为了更好地理解肝纤维化非实质细胞蛋白质组表达谱变化, 并寻找新的肝纤维化的诊断、治疗的生物标记, 应用定量蛋白质组学方法分析了大鼠模型不同肝纤维化时期非实质细胞与正常对照的蛋白质组表达谱, 并对 8 个蛋白进行了定量 PCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析, 对其中 1 个蛋白进行了 Western blot 和免疫组化分析. 本研究首次应用蛋白质组学研究非实质细胞在肝纤维化进程中的蛋白质组变化.

1 材料与方法

1.1 动物处理

40 只雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(180~200 g)来自上海市公共卫生临床中心的动物中心, 所有动物实验通过伦理委员会批准. 构建动物模型在动物中心进行. 免疫性肝纤维化动物模型构建方法与本实验室已发表的文章^[21]相同. 猪血清组(pig serum, PS)每只大鼠腹腔注射 0.5 mL 猪血清, 正常对照组注射 0.5 mL 生理盐水. 分别在 2, 4, 6 和 8 周时, 每组处死 5 只大鼠. 大鼠先饥饿 16~18 h, 然后采用安乐死, 猪血清组也叫免疫性肝纤维化组, 分别命名为免疫-2、免疫-4、免疫-6 和免疫-8; 正常对照组分别命名为正常-2、正常-4、正常-6 和正常-8. 所有大鼠肝脏用于组织病理学检查及非实质细胞分离. 第 4 和 8 周

的样本用于二维凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2DE)、qRT-PCR 及 Western blot 分析.

1.2 肝非实质细胞分离

采用 percoll(Pharmacia, 瑞典)密度梯度离心的方法富集肝非实质细胞^[22,23], 与文献相比, 稍作修改. 首先, 用灌注液灌注肝脏组织 10 min; 再用胶原酶灌注直至肝脏组织完全消化. 获得的上清液用 200 μ m 尼龙布过滤, 再用 2 倍体积磷酸缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)稀释. 保留 2 mL 用于流式分析, 剩余的上清液 20 $^{\circ}$ C, 100 $\times$ g 离心 5 min. PBS 重悬细胞沉淀, 20 $^{\circ}$ C 400 $\times$ g 离心 10 min. 再用 PBS 重悬细胞沉淀, 并加到 25%percoll 液面上方, 细胞悬液、25%percoll 和 50%percoll 的体积比为 1:1:1. 然后 20 $^{\circ}$ C, 900 $\times$ g 离心 30 min, 非实质细胞被富集在 25%percoll 和上层清液之间, 收集非实质细胞层, PBS 洗 2 遍, 20 $^{\circ}$ C 900 $\times$ g 离心 10 min. 获得的非实质细胞, 一小部分用于流式细胞技术鉴定纯化效果, 其余的冻存在-80 $^{\circ}$ C 备用.

1.3 组织病理学验证

大鼠肝脏组织用 4%多聚甲醛固定后切成 5 μ m 的切片, 采用 Masson 染色法染色^[21]. 肝脏实质细胞以及通过梯度密度离心纯化的非实质细胞同样用 4%多聚甲醛固定, Masson 染色法染色.

1.4 流式细胞术分析

非实质细胞的纯化效果通过流式细胞技术进行验证^[24]. 简言之, 纯化的非实质细胞和总的肝脏细胞(1×10^6)分别用 1 μ L 的大鼠 CD3-PE, CD146-FITC 及 F4/80-APC 抗体室温暗处孵育 30 min. 离心去除未反应的抗体, 并用 200 μ L PBS 洗 2 遍, 细胞重悬在 3%多聚甲醛中, 用美国 BD 公司的流式细胞仪(FACS)分析. 对于每个样本, 收集 200000 个细胞, 以没有加抗体的空白对照画门. 结果以 F4/80, CD146 及 CD3 阳性细胞百分比表示. 数据通过 BD FACS FlowJo 软件分析.

1.5 蛋白质二维凝胶电泳分离和胶染色

从第 4 和 8 周动物模型获得的非实质细胞用于二维凝胶电泳分离. 2DE 使用 IPGphor(GE, 美国)和 Protean II(Bio-Rad, 美国)系统进行^[21,25]. 每组上样量 1000 μ g. 第一相等电聚焦电泳采用 pH 3~10 的非线

性胶条, 第一维等电聚焦的程序设置如下, 水化: 30 V, 12 h; 电泳: 500 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 30 min, 电压梯度递增; 8000 V, 6 h. 聚焦完成后, 胶条进行 DTT(dithiothreitol)和 IAA(iodacetamide)还原烷基化, 然后进行第二相十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离, 分离胶浓度为 11.5%. 电泳结束后, 进行考马斯亮蓝染色成像^[25].

1.6 图像分析

2DE 胶用 ImageScanner 扫描仪(通用电气公司, 美国)成像, 所得图像用 ImageMaster 软件分析. 同一周期的免疫性肝纤维化模型组与正常对照比较. 每个样本至少重复 3 次. 分析包括蛋白质斑点的检测、量化、背景去除和点的匹配. 免疫性肝纤维化模型组和正常对照组使用 *t*-检验($P < 0.05$), 选取表达量差异 2 倍以上的点作为后续质谱分析的候选蛋白质点.

1.7 差异蛋白的质谱鉴定

图像分析后, 切取差异蛋白质点进行酶切, 再通过 LC-ESI-MS(liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry)进行鉴定^[21,26]. 胰蛋白酶消化后的多肽样品先经过 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ C-18 预柱脱盐, 流速为 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. 经过预柱脱盐后, 多肽样品以 300 nL/min 的流速经内径与长度为 75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$ 、填料粒径为 3 μm 的 C-18 反向柱进行分离, 色谱的梯度为 4%~64% B 液(A 液: 0.1%甲酸; B 液: 80%乙腈, 0.1%甲酸), 色谱梯度分离的时间为 40 min. 通过 C-18 色谱柱分离的肽段由纳流喷针进入 HCT(high capacity trap)质谱进行实时的离子化分析检测. 通过 Mascot 软件查询数据库, 参数设置如下, 选择胰酶为切割酶, 允许最大未切割位点数为 1, 一级质谱 MS 的误差为 $\pm 1.2 \text{ Da}$, 二级质谱 MS/MS 的误差为 $\pm 0.6 \text{ Da}$; 固定修饰为半胱氨酸被修饰成脲甲基半胱氨酸, 可变修饰为甲硫氨酸氧化. 肽段的得分超过阈值的被视为鉴定的蛋白, 其可信度大于 95%. 每个蛋白至少有一条肽段同时检测到 4 个或 4 个以上连续的 y 离子或 b 离子(如 y4, y5, y6 和 y7).

1.8 数据分析和生物信息学分析

鉴定蛋白质的功能通过 SWISS-PROT 数据库

(<http://www.expasy.org>)分析, 差异蛋白质相互作用网络通过 STRING 8.0(<http://string.embl.de>)分析.

1.9 RNA 提取和 RT-PCR

采用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)提供的标准步骤提取非实质细胞总 RNA^[19], 每个反应取 2 μL cDNA 与 0.7 μL 的 10 nmol/L 的引物(表 1)等混合组成 25 μL PCR 反应体系. PCR 循环条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环. GAPDH (glycerol-dehyde-3-phosphate dehydrogenase)为对照(在每个待测基因管中同时加入 GAPDH 的引物).

1.10 Western blot 验证

第 4 和 8 周非实质细胞蛋白质(50 μg)先经过 SDS-PAGE 分离胶(浓度为 11.5%)电泳分离, 然后采用半干转膜仪将分离后的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 封闭 2 h 后, 加入一抗室温孵育过夜. PDIA3(protein disulfide-isomerase A3)抗体按 1:1000 稀释, prohibitin 抗体用抗体稀释液按 1:1000 稀释. 洗膜 3 次后, 二抗室温孵育 1 h, 采用 ECL(enhanced chemiluminescent)化学发光试剂盒(Millipore, 美国)进行检测.

表 1 8 个基因 RT-PCR 分析的引物序列

基因代号	链	引物序列(5'→3')
CH60_RAT	正义链	AAAGATGGGGTCACTGTTGC
	反义链	CATCACACCTCTCCGGATTT
HSP7C_RAT	正义链	CAGAATCCCCAAGATCCAGA
	反义链	GTGACATCCAAGAGCAGCAA
NDUV2_RAT	正义链	TACACCTTGCATGCTTCGAG
	反义链	TCCTTGGGTGTCAGATCCTC
OTC_RAT	正义链	CGTCTTCAAGCTTTCCAAGG
	反义链	TTGCAGGCATCAGAACTTTG
PDIA3_RAT	正义链	TATGATGGGCCTAGGACTGC
	反义链	GATTCAACGTTGGTGTGTGC
TTHY_RAT	正义链	ATGGTCAAAGTCCTGGATGC
	反义链	GCCAAGAGCCTTCCAGTATG
UCRI_RAT	正义链	AGGGGAAGAACATGGCTTTT
	反义链	GGGCAATAGTAGCCACCAAAA
ATPB_RAT	正义链	CAGGCTGGCTCAGAGGTATC
	反义链	ATGGGCAAAGGTAGTTGCAG

1.11 免疫组化分析人肝脏组织中 PDIA3 的表达

免疫分析参照文献[20]方法. 5 μm 厚的石蜡包埋组织经脱蜡、脱水和 PBS 洗涤 3 次后, 用 ANXA2(annexin A2)的抗体室温孵育 1 h. 然后用二抗孵育, 二氨基联苯氨(diaminobezidin, DAB)染色, 带有 logenE PAS9000 操作系统的 Olympus BX40 光学显微镜(Olympus, 日本)观察阳性信号. 半定量分析 PDIA3 在肝组织中的表达, 每一张片随机拍照 5 次, 采用 400 倍放大. 对每张图上 PDIA3 阳性的细胞进行计数. 来自 20 个 S3-4 病人的 100 张图片上平均细胞数与 20 个 S0-1 的 100 张图片上的平均细胞数之比, 即 PDIA3 在 S3-4 与 S0-1 患者中的表达差异倍数.

2 结果

2.1 组织病理学检测结果

如本实验室先前研究^[21]显示, 免疫性肝纤维化模型构建成功(网络版附图 1). 血清注射 2 周后, 在中央区发现有炎症细胞滤过和纤维细胞形成, 肝纤维化程度被诊断为 S0-1; 第 4 周, 肝组织发展为 S2; 6 周可见分隔的假小叶(诊断为 S3-4); 第 8 周可见非常明显的假小叶(S4), 而正常组的肝组织没有病理变化.

2.2 分离纯化非实质细胞

为了验证非实质细胞富集效果, 采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin, H&E)和流式检测 2 种方法进行验证. 流式细胞技术分别检测内皮细胞、枯否细胞和淋巴细胞的标记分子 CD146, F4/80 和 CD3. H&E 染色结果显示, 红细胞和肝细胞污染很低(网络版附图 2). 如网络版附图 2B 显示, 肝实质细胞基本上被去除. 在所有 H&E 图片中, 仅有一个肝实质细胞(网络版附图 2B). 在纯化的非实质细胞中红细胞所占的比例为 11.84%(网络版附图 2C 和 D). 以上结果表明, 使用 percoll 密度梯度离心成功分离了肝非实质细胞.

为了定量分析非实质细胞的富集情况, 采用流式细胞术定量检测 CD3, F4/80 和 CD146 阳性细胞(分别代表淋巴细胞、枯否细胞和内皮细胞), 同时以没有加 CD3, F4/80 和 CD146 抗体的空白对照画门(网络版附图 3 和图 1), 可知非实质细胞中 CD3, F4/80 和

CD146 阳性细胞比例分别为(30.10 $\pm$ 0.20)%, (8.04 $\pm$ 0.50)%和(41.17 $\pm$ 0.49)%; 总的肝细胞中 F4/80 和 CD146 阳性细胞比例分别为(19.07 $\pm$ 0.35)%, (2.52 $\pm$ 0.61)%和(11.00 $\pm$ 0.60)%. 与总的肝细胞相比, 纯化的非实质细胞中淋巴细胞、枯否细胞和内皮细胞分别富集了 1.5 倍(图 1A 和 B), 3.2 倍(图 1C 和 D)和 3.7 倍(图 1E 和 F).

2.3 二维凝胶电泳及图谱分析

免疫性肝纤维化模型和正常对照组的蛋白质样品采用 pH 3~10 的非线性胶条进行一维分离, 11.5% 的分离胶进行二维分离. 经过 ImageMaster 图像分析, 考马斯亮蓝染色的免疫-4、正常-4、免疫-8 及正常-8 胶上分别可检测到(637 $\pm$ 47), (608 $\pm$ 43), (639 $\pm$ 52)及(602 $\pm$ 36)个蛋白质点. 图像分析的原始数据包括点的强度、体积、体积百分比(归一化后)和面积(网络版附表 1). 蛋白表达谱分析(图 2 和网络版附图 4)表明, 处理组不同时期之间的差异比处理组和正常对照组之间的差异要小. 基于蛋白质点的平均强度比, 有 48 个蛋白质点被认为在肝纤维化进程中持续发生变化, 其中第 4 周有 22 个点, 第 8 周有 26 个点, 第 4 和 8 周分别鉴定 12 和 14 个表达上调的蛋白(比率免疫/正常 $\geq$ 2, $P\leq$ 0.05). 在这些差异表达的蛋白中, 有些蛋白质发生持续性变化, 如点 1 和 1*, 3 和 3*, 14 和 14*(图 2 和网络版附图 4). 图 3A 是点 14 和 14*的放大图, 可知在第 4 和 8 周肝纤维化模型中该蛋白的表达明显低于正常对照组. 此外, 还有一些点的表达前后不一致, 如点 2, 5 和 8 在 4 周的肝纤维化模型中表达上调, 但在第 8 周中表达下调(图 2C 和 D), 这些点分别标记为 2x, 5x 和 8x. 类似的, 点 10 在第 4 周的肝纤维化模型中下调表达, 但是在第 8 周中上调表达. 为了更快捷与经济地鉴定差异蛋白, 仅第 4 周的 2DE 胶上的差异点用作质谱鉴定, 第 8 周的胶用来验证在第 4 周鉴定到的蛋白质的动态表达情况.

2.4 差异表达蛋白质鉴定

经 HCT 鉴定, 22 个差异表达蛋白质点中共鉴定到 18 个具有 2 倍及以上差异表达的蛋白质, 包括在肝纤维化模型中 8 个表达上调和 10 个表达下调的蛋白. 18 个蛋白中仅有 1 个蛋白(carboxylesterase 3)是经 1 条多肽鉴定, 且此多肽的 mascot 得分大于 47(网络

图 1 流式分析 CD3, CD146 和 F4/80 阳性细胞

CD3, CD146 和 F4/80 流式抗体孵育非实质细胞和全肝脏细胞, 收集 200000 个细胞, 以没有抗体孵育的平行处理的样本作为空白对照. A: 非实质细胞中的 CD3 阳性细胞; B: 全肝脏细胞中的 CD3 阳性细胞; C: 非实质细胞中的 F4/80 阳性细胞; D: 全肝脏细胞中的 F4/80 阳性细胞; E: 非实质细胞中的 CD146 阳性细胞; F: 全肝脏细胞中的 CD146 阳性细胞

图 2 免疫性肝纤维化模型组和正常对照组非实质细胞蛋白质双向电泳图谱

A: 表达上调的蛋白质点; B: 表达下调的蛋白质点; C 和 D: 4 和 8 周 mRNA 水平和蛋白质水平持续上调或下调的蛋白质点, 标记为 1*, 3* 和 14*; 在 4 和 8 周 mRNA 水平表达一致, 但蛋白质水平表达相反的蛋白质点, 标记为 10#; 4 和 8 周 mRNA 水平和蛋白质水平表达一致的蛋白质点, 标记为 2x, 5x 和 8x

版附表 2 和附图 5). 每个蛋白至少有一条多肽同时检测到 4 个连续的 y 离子或 b 离子. 例如, 二硫化物异构酶 A3(14 号点), 22 条非冗余多肽被鉴定, 这些多肽匹配该蛋白 40% 的氨基酸(图 3B, 下画线标记), 肽段 DLLTAYYDVDEYK 的 MS/MS 图谱是二硫化物异构酶 A3 的代表性二级图谱, 通过 MS 几乎检测到了所有的 y 或 b 离子(图 3C). 通过 emPAI 值分析, 差异蛋白中有 14 个 emPAI 值小于 1, 属于低丰度蛋白(表 2, 网络版附表 2).

2.5 生物信息学分析

根据 UniProt(Swiss-Prot/TrEMBL, <http://www.uniprot.org/>) 和 Gene Ontology(<http://www.Geneontology.org/>) 数据库的分析, 被鉴定的蛋白中有 3 个位于细胞质膜, 7 个位于线粒体, 3 个位于胞浆, 3 个位于内质网(表 2). 这些蛋白质的功能分别为结合(ATP 结

合、DNA 结合和 actin 结合)(50%)、酶(38%)、电子载体(8%)(表 2).

非实质细胞在肝纤维化中发挥重要功能, 非实质细胞蛋白质除了蛋白质间的相互作用外, 还与肝细胞相互作用. 因此, 本研究创建了一个蛋白质相互作用网络, 其中 10 个蛋白与其他蛋白相互作用, 另外 7 个蛋白与其他蛋白没有相互作用(网络版附图 6). 有相互作用的蛋白包括 Uqcrrf1, Ndufv2 和 ATP5B, 三者相互作用; Hspa8 与 CH60, CH60 与 Pdia3, Ttr 与 Alb, Aldh2 与 Otc 两两相互作用. 这些相互作用蛋白质有些具有一致的表达变化, 如 Ndufv2, ATP5B 和 Uqcrrf1 在肝纤维化模型中均表达上调; 但是有些蛋白质的表达变化相反, 如 PDIA3 表达下调, 而其相互作用蛋白 CH60 表达上调. 在差异表达蛋白中, HSP7C, NDUV, PDIA3, OTC, UCRI, TTHY, ATPB 和 CH60 通过 qRT-PCR 进一步分析.

图3 2DE局部放大图及MS/MS鉴定结果

A: 14号点局部放大图; B: 14号点的序列图, 下划线标记的序列是MS鉴定到的序列; C: 14号点肽段二级质谱图

2.6 差异表达蛋白质转录水平分析

为了确定蛋白质表达变化是否发生在转录水平, 筛选了8个基因进行qRT-PCR, 以管家基因 *GAPDH* 作为内参(网络版附图7). 其中5个在蛋白水平和mRNA水平表达一致, 包括 *PDIA3*, *TTHY*, *NDUV*, *ATPD* 和 *CH60*. *PDIA3* 和 *TTHY* 在4和8周肝纤维化模型中表达下调, 并且从4~8周下调程度增加(表3, 网络版附表3和图4). *NDUV*, *ATPB* 和 *CH60* 在

4和8周肝纤维化模型中表达上调. 在这5个差异表达蛋白中仅有 *PDIA3* 和 *NDUV* 从4~8周在蛋白水平和mRNA水平表达一致.

2.7 Western blot 验证 *PDIA3*

PDIA3 在4和8周的肝纤维化模型组的非实质细胞中表达明显下调(图5C), 与2DE的结果一致. Western blot分析以prohibitin为内参(图5B), 考马斯亮蓝染色图谱见图5A.

2.8 免疫组化分析人肝组织中 PDIA 3 的表达

为了验证在大鼠模型中的发现, 使用 PDIA3 抗体检测 S0-1 和 S3-4 人肝脏穿刺样本 PDIA3 的表达.

免疫组化分析结果与 2DE 分析结果一致. S0-1(图 6A 和 B)样本的信号比 S3-4(图 6C 和 D)的信号强. 统计数据显示, S0-1($n=20\times5$)PDIA3 的表达是 S3-4($n=20\times5$)的 2 倍(图 6E).

表 2 差异表达蛋白质及其定位、功能和相互作用信息

点编号	蛋白代号	蛋白质名	Mascot 得分	等电点	分子量 (Da)	覆盖率	比率 ^{a)}	蛋白质丰度 emPAI 值	亚细胞定位	功能	网络节点名 ^{b)}
1	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	409	5.19	56318	19%	4.75	0.62	线粒体	结合/酶	ATP5B
2	OTC	ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	393	9.12	39919	32%	2.45	0.98	线粒体	结合/酶	Otc
3	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	95	6.23	27709	18%	4.67	0.31	线粒体	电子传递/结合	Ndufv2
4	ECH1	delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	389	8.13	36496	26%	8.50	0.73	线粒体	结合/酶	Ech1
5	UCRI	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	157	9.04	29717	8%	6.85	0.46	细胞质膜	电子传递/结合/酶	Uqcrrf1
6	C1QBP	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	388	4.77	31326	21%	3.49	0.56	线粒体	结合	C1qbp
7	ALDH2	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	1065	6.63	56975	42%	2.30	2.15	线粒体	酶	Aldh2
8	CH60	60-kD heat shock protein, mitochondrial	500	5.91	61091	30%	5.40	0.75	线粒体	结合/酶	CH60
9	TPM4	tropomyosin alpha-4 chain	273	4.66	28550	13%	0.40	0.3	胞浆	结合	Tpm4
10	HSP7C	heat shock cognate	208	5.37	71059	13%	0.49	0.32	胞浆	压力反应	Hspa8
11	GUAD	guanine deaminase	171	5.56	51564	14%	0.41	0.22	未知	酶	Gda
12	ANXA3	annexin A3	235	5.96	36573	21%	0.44	0.59	细胞质膜	结合	Anxa3
13	ACTG	actin, cytoplasmic 2	505	5.31	42114	34%	0.21	1.48	细胞质膜/胞浆	结合	Actg1
14	PDIA3	protein disulfide-isomerase A3	1630	5.88	57052	40%	0.49	1.65	内质网	结合/酶	Pdia3
15	PDIA3	protein disulfide-isomerase A3	71	5.88	57052	9%	0.43	0.1	内质网	结合/酶	Pdia3
16	ALBU	serum albumin	608	6.09	70716	28%	0.24	1.71	细胞质膜/细胞外间隙	结合	Alb
17	TTHY	transferrin	209	5.77	15826	30%	0.36	0.83	细胞外间隙	结合	Ttr
18	CES3	carboxylesterase 3	47	6.1	62398	1%	0.07	0.05	内质网	酶	Ces3

a) 免疫性纤维化/正常; b) 在 STRING 相互作用蛋白质网络中的蛋白质缩写名

表 3 8 个蛋白在蛋白水平和 mRNA 水平表达比较

点编号	蛋白质名	第 4 周蛋白质表达变化	第 8 周蛋白质表达变化	第 4 周 mRNA 表达变化	第 8 周 mRNA 表达变化
14	PDIA3	0.30	0.49	0.01	0.32
17	TTHY	0.34	未检测到	0.02	0.19
3	NDUV	4.40	2.91	2.15	1.37
1	ATPB	8.05	14.60	1.35	2.91
8	CH60	6.37	无变化	2.02	2.56
10	HSP7C	0.40	2.23	0.13	3.47
2	OTC	2.00	0.29	0.03	1.21
5	UCRI	4.76	0.63	0.01	1.90

图 4 qRT-PCR 验证差异蛋白质

TTHY-4 为第 4 周免疫性肝纤维化模型组与正常对照组的比值; TTHY-8 为第 8 周免疫性肝纤维化模型组与正常对照组的比值; GAPDH 为内参

图 5 Western blot 验证 PDIA3

A: SDS-PAGE; B: 4 和 8 周大鼠模型 PDIA3 和 prohibitin 的表达; C: Western blot 光密度分析. y 轴表示蛋白质表达的光密度值, 为 3 次重复的平均值

3 讨论

通过猪血清处理构建大鼠肝纤维化模型被广泛用于免疫性肝纤维化研究中^[7,8]. 本研究采用猪血清处理的方法构建大鼠肝纤维化模型. 肝脏组织在血清处理 2, 4, 6 和 8 周时, 模型的纤维化时期分别为 S0-1, S2, S2-4 和 S4. 第 6 周大鼠的病理期不如第 4 和 8 周那样明确, 而且 S2 和 S4 期在临床上代表中期和末期(肝化腹水), 因此为了更好地检测与肝纤维化进程相关的蛋白质, 这里采用 S2 和 S4 期作为 2DE 分析的样本.

图 6 免疫组化分析 PDIA3

A~D: 人肝组织 H&E 染色图. A: S0-1 期; B: S0-1 期; C: S3-4 期; D: S3-4 期; E: 统计分析 PDIA3 阳性细胞数平均值. 共分析了 20 个 S0-1 期病人肝组织样本和 20 个 S3-4 期病人肝组织样本, 每个病人样本在非实质细胞区域随机拍摄 5 张图片

本研究的对象是肝非实质细胞. 以往的研究通常关注的是肝细胞及其在肝脏中的作用, 然而, 在肝纤维发生过程中, 非实质细胞在细胞外基质和细胞因子分泌以及免疫应答中有重要功能^[1~6], 非实质细胞蛋白质组学分析有助于理解肝纤维化机制, 发现

可能作为诊断和预后的生物标记, 以及新的药物靶标. 然而, 非实质细胞在肝脏中的数量比肝实质细胞少很多, 采用完整肝组织蛋白质组学分析非实质细胞蛋白质, 尤其是低丰度蛋白质比较困难.

为了克服这个问题, 使用 percoll 密度梯度离心的方法纯化非实质细胞. H&E 染色的结果显示, 淋巴细胞、内皮细胞和枯否细胞是非实质细胞中的主要细胞. 为了检测非实质细胞富集的效果, 采用 CD3, CD146 及 F4/80 抗体流式分析淋巴细胞、内皮细胞和枯否细胞, 而肝实质细胞不表达 CD3, CD146 和 F4/80 分子^[27,28]. 然而, 非实质细胞中不全是这 3 种细胞, 据本实验室的了解, 分离获得纯净的非实质细胞非常困难, 而且也没有必要, 因为第 4 和 8 周肝纤维化模型和正常对照分离非实质细胞的方法相同; 低含量的细胞的蛋白质在蛋白质组学中检测不到.

本研究对大鼠肝脏非实质细胞用 2DE 分离并用考马斯亮蓝染色, 得到近 700 个蛋白质点, 离子阱质谱鉴定到 18 个差异表达蛋白. 对这 18 个蛋白采用 emPAI 值(一种基于鉴定到的多肽数和蛋白质丰度之间关联性的蛋白质浓度的衡量指标)^[29,30]分析其浓度. 结果显示, 有 14 个 emPAI 值低于 0.98, 在血浆中的浓度为 8~12 µg/L.

肝纤维发生是一个发展的过程, 在这个过程中很多蛋白质受到调节. 有些蛋白质可能持续上调或下调, 另外一些可能有不同的调节模式. 为了动态观察肝纤维发生中蛋白谱的变化, S2(处理 4 周)和 S4(处理 8 周)的肝脏非实质细胞蛋白质用于 2DE 分析. 共鉴定到 18 个差异表达蛋白.

功能分析显示, 18 个差异表达蛋白的功能主要为结合(ATP 结合、DNA 结合和 actin 结合)和酶活性. 这可能是由于在人体活动中, 具有蛋白质结合、酶活以及代谢功能的蛋白质所占的比例较高. 亚细胞定

位分析显示, 7 个差异蛋白位于线粒体, 包括 ATPB, OTC, NDUV2, ECH1, C1QBP, ALDH2 和 CH60. 这一现象与线粒体损伤是慢性肝脏疾病诱因的理论一致. 线粒体损伤增加肝细胞对 ATP 的损耗, 从而引起细胞坏死、膜通透性增加、细胞凋亡的敏感性增加^[31]. 为了进一步研究肝纤维发生过程调节通路, 构建了蛋白质相互作用网络. 18 个差异表达蛋白中, 7 个与其他蛋白质没有相互作用, 这一结果主要有 2 个原因: (i) 本实验仅研究非实质细胞; (ii) 蛋白质组学技术仅能检测到较高丰度的蛋白质.

8 个差异表达蛋白的 mRNA 分析显示, 5 个基因从 S2~S4 期持续表达上调或下调, ATPB, NDUV2 和 CH60 表达上调, DIA3 和 TTHY 表达下调. ATPB, NDUV2 和 PDIA3 从 S2~S4 期在蛋白水平和 mRNA 水平表达一致.

Western blot 进一步验证了 PDIA3 在 S4 期表达下调(与 S2 期相比). 在人肝脏组织中, 与 S0-1 相比, S3-4 期 PDIA3 表达下调. Aroor 等人^[32]也报道了类似的结果, PDIA3 在酒精处理的大鼠中表达明显下调. PDIA3 能够催化二硫键重排, 具有重要功能, 如电子载体活性和半胱氨酸型肽链内切酶活性. 本研究的结果补充、支持了线粒体损伤诱导肝纤维化的理论, 尤其是呼吸链^[33]. PDIA3 可能作为肝纤维化治疗的新靶标^[34].

总之, 本研究通过 2DE-MS 进行了免疫性肝纤维化模型和正常对照非实质细胞差异蛋白质组分析, 鉴定了众多与肝纤维化相关的蛋白质. 其中 3 个蛋白(PDIA3, ATPB 和 NDUV2)从 S2~S4 期在蛋白水平和 mRNA 水平表达一致. Western blot 分析进一步验证了在肝纤维化模型中 PDIA3 从 S2~S4 表达下调, 免疫组化分析在人肝脏中同样验证了 PDIA3 从 S0-1~S3-4 表达下调. 进一步研究 PDIA3 将扩展对肝纤维发生机制的理解, 并有助于发展新的治疗方法.

参考文献

- 1 Yuen M F, Hou J L, Chutaputti A. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region. *J Gastroen Hepatol*, 2009, 24: 346-353
- 2 Shen L P, Zhang Y, Wang F, et al. Epidemiological changes in hepatitis B prevalence in an entire population after 20 years of the universal HBV vaccination programme. *Epidemiol Infect*, 2011, 139: 1159-1165
- 3 Knolle P A, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 2000, 174: 21-34
- 4 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, et al. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol*, 2002, 169: 5188-5195
- 5 Ramadori G, Moriconi F, Malik I, et al. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59 (Suppl 1): 107-117
- 6 Wu J, Meng Z, Jiang M, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology*, 2009, 49: 1132-1140

- 7 Baba Y, Uetsuka K, Nakayama H, et al. Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, 55: 325–330
- 8 Tsukamoto H, Matsuoka M, French S W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis*, 1990, 10: 56–65
- 9 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 2001, 21: 351–372
- 10 Fujisawa G, Muto S, Okada K, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents pig serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Transl Res*, 2006, 148: 149–156
- 11 Villeneuve J P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol*, 2005, 34 (Suppl 1): S139–S142
- 12 Smyth R, Lane C S, Ashiq R, et al. Proteomic investigation of urinary markers of carbon-tetrachloride-induced hepatic fibrosis in the Hanover Wistar rat. *Cell Biol Toxicol*, 2009, 25: 499–512
- 13 Spano D, Cimmino F, Capasso M, et al. Changes of the hepatic proteome in hepatitis B-infected mouse model at early stages of fibrosis. *J Proteome Res*, 2008, 7: 2642–2653
- 14 Liu Y, He J, Ji S, et al. Comparative studies of early liver dysfunction in senescence-accelerated mouse using mitochondrial proteomics approaches. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 1737–1747
- 15 Diamond D L, Jacobs J M, Paepers B, et al. Proteomic profiling of human liver biopsies: hepatitis C virus-induced fibrosis and mitochondrial dysfunction. *Hepatology*, 2007, 46: 649–657
- 16 Molleken C, Sitek B, Henkel C, et al. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology*, 2009, 49: 1257–1266
- 17 Teufelhofer O, Parzefall W, Elbling L, et al. Divide and conquer: rat liver tissue proteomics based on the analysis of purified constituents. *Electrophoresis*, 2006, 27: 4112–4120
- 18 Hirsch J, Hansen K C, Choi S, et al. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 979–986
- 19 Li X, Xie C, Cao J, et al. An *in vivo* membrane density perturbation strategy for identification of liver sinusoidal surface proteome accessible from the vasculature. *J Proteome Res*, 2009, 8: 123–132
- 20 Kristensen D B, Kawada N, Imamura K, et al. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000, 32: 268–277
- 21 Zhang L, Peng X, Zhang Z, et al. Subcellular proteome analysis unraveled annexin A2 related to immune liver fibrosis. *J Cell Biochem*, 2010, 110: 219–228
- 22 Parzefall W, Kainzbauer E, Qin H M, et al. Response of isolated hepatocytes from carcinogen sensitive (C3H) and insensitive (C57BL) mice to signals inducing replication or apoptosis. *Arch Toxicol*, 2002, 76: 699–706
- 23 Friedman S L, Roll F J. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stratan. *Anal Biochem*, 1987, 161: 207–218
- 24 Wu J, Ma H, Qu Q, et al. Incorporation of immunostimulatory motifs in the transcribed region of a plasmid DNA vaccine enhances Th1 immune responses and therapeutic effect against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Vaccine*, 2011, 29: 7624–7630
- 25 Zhang L J, Wang X E, Peng X, et al. Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 1790–1804
- 26 Zhang L, Jia X, Zhang X, et al. Proteomic analysis of PBMCs: characterization of potential HIV-associated proteins. *Proteome Sci*, 2010, 8: 12
- 27 Scoazec J Y, Feldmann G. *In situ* immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology*, 1991, 14: 789–797
- 28 Couvelard A, Scoazec J Y, Feldmann G. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol*, 1993, 143: 738–752
- 29 Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 1265–1272
- 30 Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. emPAI Calc—for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 2010, 26: 576–577
- 31 Malhi H, Gores G J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1641–1654
- 32 Aroor A R, Lowery R J, Restrepo R J, et al. A Proteomic analysis of liver after ethanol binge in chronically ethanol treated rats. *Proteome Sci*, 2012, 10: 29
- 33 Malhi H, Gores G J, Lemasters J J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 2006, 43 (2 Suppl 1): S31–S44
- 34 Serviddio G, Bellanti F, Sastre J, et al. Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 2325–2337

论 文

附录

附图 1 免疫性肝纤维化病理检测 Masson 染色结果

A~D: 正常对照组, 生理盐水处理 2, 4, 6 和 8 周的大鼠. 2~8 周末观察到变化; E~H: 免疫性肝纤维化组, 猪血清处理 2, 4, 6 和 8 周的大鼠肝纤维化模型. 2~8 周肝纤维化的程度逐渐加深, 黑色箭头指示第 2 周的 S0-1 期(E)、第 4 周的 S2 期(F)、第 6 周的 S3-4 期(G)和第 8 周的 S4 期(H)

附图 2 分离的肝非实质细胞纯化鉴定 H&E 染色结果

A: 肝实质细胞; B: Percoll 密度梯度离心分离纯化的肝非实质细胞; C 和 D: 肝非实质细胞. 1: 肝细胞; 2: 肝非实质细胞(淋巴细胞); 3: 肝非实质细胞(纤维细胞); 4: 肝非实质细胞(枯否细胞); 5: 红细胞

附图 3 流式分析验证肝非实质细胞富集效果

分别采用 F4/80, CD146 和 CD3 抗体检测内皮细胞、枯否细胞和淋巴细胞. 在非实质细胞和全肝细胞中, CD3 阳性细胞率分别为 30.3%(B)和 18.7%(D), F4/80 阳性细胞率分别为 8.24%(F)和 2.28%(H), CD146 阳性细胞率分别为 42.4%(J)和 10.4%(L). 没有抗体染色的平行处理样本作为空白对照, A 和 C: CD3 的对照; E 和 G: F4/80 的对照; I 和 K: CD146 的对照

附图 4 免疫性肝纤维化模型和正常对照的蛋白双向电泳图谱

表达上调的蛋白质点标记在免疫(免疫性肝纤维化)胶图谱上, 表达下调的蛋白质点标记在正常(正常对照)胶图谱上

附表 1 ImageMaster 图像分析的原始数据

4 周																									
编号	免疫-4-1				免疫-4-2				免疫-4-3				正常-4-1				正常-4-2				正常-4-3				比率 (免疫/ 正常)
	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	
1	56.30	85.80	0.12	3.39	54.00	98.10	0.16	4.95	52.50	96.80	0.14	4.32	20.30	22.60	0.03	4.68	21.00	18.90	0.04	2.95	28.50	12.10	0.02	4.65	4.75
2	1.30	623.00	0.88	15.90	113.00	620.00	1.03	16.00	100.00	290.00	0.43	8.19	81.80	266.00	0.40	8.19	66.80	225.00	0.45	10.40	47.20	67.80	0.11	5.47	2.45
3	102.00	663.00	0.94	18.80	122.00	599.00	0.99	14.20	100.00	419.00	0.62	9.02	36.00	70.90	0.11	8.18	86.30	127.00	0.25	4.06	85.50	121.00	0.19	3.39	4.67
4	90.00	218.00	0.31	5.81	94.50	255.00	0.42	7.26	86.30	141.00	0.21	4.31	7.50	3.91	0.01	1.84	20.30	38.60	0.08	5.98	23.30	18.10	0.03	2.00	8.50
5	69.80	321.00	0.45	15.80	82.50	274.00	0.45	11.40	75.80	170.00	0.25	7.42	29.30	7.78	0.01	1.61	19.50	11.30	0.02	3.02	31.50	87.00	0.14	10.30	6.85
6	72.00	117.00	0.16	4.42	69.80	150.00	0.25	8.00	42.00	92.40	0.14	5.73	31.50	3.00	0.00	0.13	24.00	37.20	0.07	7.73	143.00	51.00	0.08	0.19	3.49
7	122.00	1186.00	1.67	16.80	123.00	1109.00	1.84	18.60	103.00	1068.00	1.59	17.30	102.00	407.00	0.61	7.05	111.00	554.00	1.10	11.50	97.50	334.00	0.51	8.08	2.30
8	74.30	117.00	0.17	3.87	65.30	91.60	0.15	3.74	75.80	92.10	0.14	3.10	49.50	36.40	0.05	1.92	13.50	9.07	0.02	1.94	52.50	7.26	0.01	0.32	5.40
9	29.30	35.10	0.05	4.71	24.00	10.40	0.02	3.15	20.30	21.50	0.03	4.39	57.00	68.90	0.10	4.21	38.30	44.90	0.09	3.84	16.50	36.10	0.06	6.94	0.40
10	33.80	14.40	0.02	1.13	37.50	37.40	0.06	3.39	30.80	37.80	0.06	3.24	51.00	68.20	0.10	2.44	29.30	36.40	0.07	3.95	48.80	68.10	0.11	3.61	0.49
11	18.00	16.00	0.02	4.29	22.50	9.44	0.02	1.27	16.50	11.70	0.02	3.19	33.00	18.40	0.03	1.56	51.80	43.90	0.09	2.71	21.00	12.60	0.02	2.63	0.41
12	16.50	17.20	0.02	3.44	36.00	7.24	0.01	0.57	17.30	36.40	0.05	7.77	54.00	50.70	0.08	2.56	48.00	42.80	0.09	2.63	18.80	27.10	0.04	4.08	0.44
13	87.80	177.00	0.25	4.82	60.00	82.80	0.14	4.71	61.50	74.50	0.11	3.44	106.00	720.00	1.09	14.20	74.30	200.00	0.40	6.97	102.00	577.00	0.89	10.50	0.21
14	63.00	141.00	0.20	5.95	54.80	75.40	0.13	3.23	59.30	99.20	0.15	4.87	86.30	182.00	0.28	5.81	91.50	26.80	0.53	8.40	46.50	98.80	0.15	5.26	0.49
15	83.20	194.00	0.27	4.65	49.50	78.90	0.13	4.02	99.80	298.00	0.44	8.13	105.00	427.00	0.64	8.48	128.00	574.00	1.14	10.00	78.00	111.00	0.17	3.02	0.43
16	30.00	19.20	0.03	2.10	62.30	84.30	0.14	3.47	26.30	50.30	0.07	4.81	84.00	178.00	0.27	5.26	92.30	182.00	0.36	5.66	75.80	235.00	0.36	7.44	0.24
17	21.00	40.80	0.06	6.19	29.30	14.00	0.02	1.32	76.50	7.46	0.01	0.11	53.30	91.20	0.14	4.97	24.00	26.50	0.05	3.50	48.00	40.60	0.06	2.23	0.36
18	18.80	24.90	0.04	3.40	42.00	15.20	0.03	0.89	24.80	34.70	0.05	2.74	84.00	320.00	0.48	9.90	110.00	361.00	0.72	7.68	87.80	328.00	0.51	11.20	0.07
8 周																									
编号	免疫-8 周-1				免疫-8 周-2				免疫-8 周-3				正常-8 周-1				正常-8 周-2				正常-8 周-3				比率 (免疫/ 正常)
	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	强度	体积	体积百分比	面积	
1*	65.30	65.70	0.05	2.73	40.50	53.00	0.04	1.00	48.80	69.90	0.08	4.08	33.80	33.60	0.03	2.82	66.80	33.60	0.03	9.98	50.30	36.10	0.03	0.15	2.01
2x	116.00	630.00	0.49	12.50	94.50	445.00	0.36	10.20	63.00	218.00	0.24	10.60	117.00	1278.00	1.11	23.80	134.00	1589.00	1.21	23.00	102.00	415.00	0.35	11.10	0.41
3*	109.00	508.00	0.39	11.60	99.00	511.00	0.41	12.50	85.50	372.00	0.41	12.60	111.00	197.00	0.17	19.00	129.00	202.00	0.15	17.90	81.00	263.00	0.22	19.00	2.23
5x	99.80	282.00	0.22	7.94	61.50	23.50	0.02	8.84	71.30	217.00	0.24	6.63	9.39	361.00	0.31	9.39	47.20	387.00	0.28	0.11	97.50	403.00	0.34	16.00	0.51
8x	39.80	46.50	0.04	3.76	33.00	44.30	0.04	4.10	101.00	105.00	0.12	15.00	45.80	94.80	0.08	5.44	90.00	242.00	0.18	6.68	60.80	168.00	0.14	7.13	0.46
10#	107.00	161.20	0.13	2.82	77.30	190.00	0.15	5.50	71.30	136.00	0.151	4.76	78.00	41.30	0.04	4.85	68.3	86.10	0.07	3.56	89.30	128.00	0.11	4.23	2.05
14*	119.00	724.90	0.56	26.70	143.00	887.00	0.71	22.00	99.80	561.00	0.623	6.48	96.00	1144.00	0.991	10.6	123.00	1278.00	0.97	13.60	123.00	2228.00	1.88	27.50	0.49

附表 2 差异表达蛋白质质谱检测到的肽段

1 ATPB_RAT

分子量: 56318; Mascot 得分: 409; 匹配的序列数: 8; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.62

ATP synthase subunit beta, mitochondrial

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
182	488.4500	974.8854	974.5549	0.3305	0	53	2.0×10^{-4}	1	K.IGLFGGAGVGK.T
185	519.9500	1037.8854	1037.5869	0.2985	0	38	4.8×10^{-3}	1	K.IPVGPETLGR.I
209	631.9400	1261.8654	1261.6336	0.2318	0	105	1.1×10^{-9}	1	R.TIAMDGTEGLVR.G
237	693.4800	1384.9454	1384.7020	0.2434	0	67	5.9×10^{-6}	1	R.IMNVIGEPIDER.G
250	729.5000	1456.9854	1456.8323	0.1531	0	48	5.4×10^{-4}	1	K.TVLIMELINNVAK.A
268	611.4100	1831.2082	1830.8570	0.3511	0	30	2.2×10^{-2}	1	R.IMDPNIVGSEHYDVAR.G +氧化修饰
272	640.4900	1918.4482	1918.0888	0.3594	1	85	6.3×10^{-8}	1	K.VLDSGAPIKIPVGPETLGR.I
286	687.8500	2060.5282	2059.9884	0.5398	0	53	1.0×10^{-4}	1	R.EGNDLYHEMIESGVINLK.D

2 OTC_RAT

分子量: 39919; Mascot 得分: 393; 匹配的序列数: 9; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.98

ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
171	501.9500	1001.8854	1001.5393	0.3461	0	58	6.5×10^{-5}	1	K.QSDLDILAK.E
180	559.5000	1116.9854	1116.6179	0.3676	0	49	5.1×10^{-4}	1	K.GEYLPPLLQKG.S
181	566.4100	1130.8054	1130.5608	0.2447	0	34	1.6×10^{-2}	1	K.GYEPDPNIVK.L
188	581.4500	1160.8854	1160.5826	0.3029	0	55	1.2×10^{-4}	1	R.SLVFPEAENR.K
194	401.1000	1200.2782	1199.6121	0.6661	0	48	5.7×10^{-4}	1	K.FGMHLQAATPK.G
209	631.9700	1261.9254	1261.6700	0.2554	0	79	3.8×10^{-7}	1	R.VLSSMTDAVLAR.V
221	659.4700	1316.9254	1316.6394	0.2860	0	84	1.4×10^{-7}	1	R.LSMTNDPLEAAR.G
237	707.4900	1412.9654	1412.7122	0.2532	0	91	2.4×10^{-8}	1	R.LQAFQGYQVTMK.T
262	570.7600	1709.2582	1708.7944	0.4638	0	41	1.8×10^{-3}	1	R.KPEEVDDEVFYSPR.S

3 NDUV2_RAT

分子量: 27709; Mascot 得分: 95; 匹配的序列数: 3; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.31

NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
184	451.9100	901.8054	901.4658	0.3397	0	40	4.8×10^{-3}	1	K.GPGFGVQAGL.-
212	622.9700	1243.9254	1243.6296	0.2959	0	53	1.6×10^{-4}	1	K.DIEEIIDELR.A
227	669.0300	1336.0454	1335.7874	0.2580	0	53	1.6×10^{-4}	1	R.AAAVLPVLDLAQR.Q

4 ECH1_RAT

分子量: 36496; Mascot 得分: 389; 匹配的序列数: 6; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.73

delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
196	439.9400	877.8654	877.5021	0.3633	0	45	1.4×10^{-3}	1	K.INLIYSR.D
228	625.9900	1249.9654	1249.6666	0.2988	0	82	1.9×10^{-7}	1	R.SLVNELTFTAR.K
254	703.9500	1405.8854	1406.6177	-0.7322	0	57	8.2×10^{-5}	1	R.YCTQDAFFQVK.E
266	755.9800	1509.9454	1509.6803	0.2651	0	118	5.4×10^{-11}	1	K.MMADEALDSGLVSR.V +氧化修饰
268	772.0100	1542.0054	1541.8049	0.2005	0	59	3.4×10^{-5}	1	K.EVDVGLAADVGTLR.L
297	775.1700	2322.4882	2322.1929	0.2952	1	32	1.1×10^{-2}	1	R.VFPDKDVMLNAAFALAADISSK.S

5 UCRI_RAT

分子量: 29427; Mascot 得分: 152; 匹配的序列数: 3; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.46

cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
----	---------	-------	-------	-----	-------	----	-----	----	----

190	499.8800	997.7454	997.4505	0.2949	0	50	4.2×10^{-4}	1	K.VPDFSDYR.R
249	794.0000	1585.9854	1585.7947	0.1907	0	81	3.0×10^{-7}	1	K.EIDQEAAVEVSQLR.D
257	572.4400	1714.2982	1713.8897	0.4085	1	42	1.8×10^{-3}	1	K.KEIDQEAAVEVSQLR.D
6 C1QBP_RAT									
分子量: 31320; Mascot 得分: 389; 匹配的序列数: 4; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.56									
complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
217	656.4800	1310.9454	1310.6758	0.2696	0	92	1.9×10^{-8}	1	K.AFVEFLTDEIK.E
238	771.4800	1540.9454	1540.6794	0.2660	0	75	1.1×10^{-6}	1	K.EVSFQTTGDSEWR.D
244	833.4900	1664.9654	1664.7352	0.2303	0	80	3.7×10^{-7}	1	K.MSGDWELEVNGTEAK.L
293	749.8300	2246.4682	2246.0954	0.3728	0	65	5.8×10^{-6}	1	K.AEEQEPELTSTPNFVVEVTK.T
7 ALDH2_RAT									
分子量: 56966; Mascot 得分: 1043; 匹配的序列数: 20; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 2.15									
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
158	415.4500	828.8854	828.4705	0.4150	0	50	4.5×10^{-4}	1	R.LADLIER.D
160	417.9600	833.9054	833.5374	0.3680	1	31	3.7×10^{-2}	1	K.KILGYIK.S
164	451.9400	901.8654	901.4869	0.3786	0	45	1.6×10^{-3}	1	K.TIEEVVGR.A
169	495.9200	989.8254	989.4931	0.3324	0	61	3.4×10^{-5}	1	R.VVGNPFDSR.T
171	520.9400	1039.8654	1039.5702	0.2952	0	48	5.6×10^{-4}	1	K.YGLAAAVFTK.D
178	589.4800	1176.9454	1176.6503	0.2952	1	50	3.1×10^{-4}	1	K.FKTIEEVVGR.A
200	693.5000	1384.9854	1384.7748	0.2106	0	71	2.3×10^{-6}	1	K.LGPALATGNVVVMK.V +氧化修饰
202	701.9800	1401.9454	1401.7153	0.2301	0	75	9.7×10^{-7}	1	K.AAQAAFQLGSPWR.R
204	702.5300	1403.0454	1402.7530	0.2924	0	67	5.9×10^{-6}	1	K.EEIFGPMQILK.F
214	736.0100	1470.0054	1469.7555	0.2500	0	90	2.9×10^{-8}	1	R.GYFIQPTVFQDVK.D
218	753.9700	1505.9254	1505.6998	0.2256	0	62	2.5×10^{-5}	1	R.TEQGPQVDETQFK.K
223	766.4800	1530.9454	1530.7355	0.2100	0	61	3.2×10^{-5}	1	K.TIPIDGDFFSYTR.H
231	800.5500	1599.0854	1598.7828	0.3027	0	84	9.9×10^{-8}	1	R.ELGEYGLQAYTEVK.T
232	818.0300	1634.0454	1633.7948	0.2507	1	36	7.0×10^{-3}	1	R.TEQGPQVDETQFKK.I
247	888.5000	1774.9854	1774.8050	0.1804	0	81	2.6×10^{-7}	1	R.TFVQEDVYDEFVER.S
255	615.4600	1843.3582	1843.0455	0.3127	0	65	7.0×10^{-6}	1	K.VAEQTPLTALYVANLIK.E
288	750.1700	2247.4882	2247.0842	0.4040	0	25	6.4×10^{-2}	1	K.TFPTVNPSTGEVICQVAEGNK.E
295	792.8500	2375.5282	2375.1791	0.3490	1	47	3.3×10^{-4}	1	K.KTFPTVNPSTGEVICQVAEGNK.E
298	838.1900	2511.5482	2511.2581	0.2901	1	36	4.8×10^{-3}	1	K.LLCGGGAAADRGYFIQPTVFQDVK.D
299	912.9100	2735.7082	2735.3716	0.3365	0	35	4.5×10^{-3}	1	R.HEPVGVCQIIPWNFLLMQAWK.L +氧化修饰
8 CH60_RAT									
分子量: 61088; Mascot 得分: 525; 匹配的序列数: 9; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.75									
60 kDa heat shock protein, mitochondrial									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
155	393.4400	784.8654	784.5058	0.3596	0	50	3.6×10^{-4}	1	K.IGIEIHK.R
171	451.4400	900.8654	900.5280	0.3374	0	68	7.1×10^{-6}	1	K.LSDGVAVLK.V
197	588.9500	1175.8854	1175.5856	0.2998	0	77	6.8×10^{-7}	1	K.DIGNIISDAMK.K
203	608.4400	1214.8654	1214.6507	0.2148	0	79	4.7×10^{-7}	1	K.NAGVEGSLIVEK.I
225	672.9800	1343.9454	1343.7085	0.2369	0	83	1.5×10^{-7}	1	R.TVIIQSWGSPK.V
231	695.4700	1388.9254	1388.6976	0.2278	0	61	3.0×10^{-5}	1	R.GYISPYFINTSK.G
239	753.0000	1503.9854	1503.7490	0.2364	0	89	3.5×10^{-8}	1	K.TLNDELEIIEGMK.F
250	562.4700	1684.3882	1683.8978	0.4904	0	77	5.0×10^{-7}	1	R.AAVEEGIVLGGGCALLR.C
288	710.5000	2128.4782	2128.1272	0.3510	0	45	5.9×10^{-4}	1	R.ALMLQGVDLLADAVAVTMGPK.G +氧化修饰

9 TPM4_RAT

分子量: 28549; Mascot 得分: 272; 匹配的序列数: 3; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.30
tropomyosin alpha-4 chain

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
196	585.9900	1169.9654	1169.6656	0.2999	0	76	8.4×10^{-7}	1	K.LVILEGELER.A
208	622.4700	1242.9254	1242.6456	0.2799	0	69	4.3×10^{-6}	1	R.IQLVEEELDR.A
239	801.0000	1599.9854	1599.7489	0.2366	0	110	3.4×10^{-10}	1	K.IQALQQQADDAEDR.A

10 HSP7C_RAT

分子量: 71059; Mascot 得分: 208; 匹配的序列数: 7; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.32
heat shock cognate 71 kDa protein

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
189	541.3700	1080.7254	1080.5604	0.1651	0	34	1.9×10^{-2}	1	K.LLQDFFNKG.E
205	600.4200	1198.8254	1198.6670	0.1585	0	46	1.1×10^{-3}	1	K.DAGTIAGLNVL.R
222	639.4100	1276.8054	1277.5962	-0.7907	0	34	1.5×10^{-2}	1	K.CNEIISWLDK.N
228	652.3600	1302.7054	1302.5914	0.1140	0	59	5.4×10^{-5}	1	K.NSLESYAFNMK.A
257	744.3700	1486.7254	1486.6940	0.0314	0	67	8.5×10^{-6}	1	R.TTPSYVAFDTTER.L
265	825.4400	1648.8654	1648.7879	0.0775	0	60	3.6×10^{-5}	1	K.NQVAMNPTNTVFDAK.R
110	661.4200	1981.2382	1980.9905	0.2476	0	59	1.7×10^{-4}	1	K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q

11 GUAD_RAT

分子量: 51554; Mascot 得分: 159; 匹配的序列数: 5; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.22
guanine deaminase

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
200	491.4400	980.8654	980.5001	0.3654	0	33	1.6×10^{-2}	1	R.FVSEMLQK.N
202	496.9200	991.8254	991.4975	0.3280	0	27	8.4×10^{-2}	1	R.EIGNFEVGK.D
211	587.4200	1172.8254	1172.6190	0.2065	0	53	2.0×10^{-4}	1	K.DFDALLINPR.A
236	686.5100	1371.0054	1370.7518	0.2537	0	65	9.2×10^{-6}	1	R.LATLGGSQALGLDR.E
240	719.0100	1436.0054	1435.7195	0.2860	0	91	2.5×10^{-8}	1	K.IVFLEESSQKE.L

12 ANXA3_RAT

分子量: 36569; Mascot 得分: 266; 匹配的序列数: 6; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.59
annexin A3

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
173	493.9600	985.9054	985.5556	0.3498	0	69	5.2×10^{-6}	1	K.ALLTLADGGR.D
181	526.4500	1050.8854	1050.5532	0.3323	0	55	1.1×10^{-4}	1	K.FTEILCLR.S
182	536.9800	1071.9454	1071.6288	0.3167	0	60	4.2×10^{-5}	1	K.TLINILTER.S
204	605.9100	1209.8054	1209.5513	0.2541	0	102	2.6×10^{-9}	1	K.DAQTLYDAGEK.K
224	664.8900	1327.7654	1327.5528	0.2126	0	64	1.7×10^{-5}	1	R.DDISSETSGDFR.K
287	679.1600	2034.4582	2033.9807	0.4775	0	48	3.3×10^{-4}	1	R.GTINNYPGFNPSVDAEAIK.K

13 ACTG_RAT

分子量: 42108; Mascot 得分: 428; 匹配的序列数: 9; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 1.48
actin, cytoplasmic 2

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
172	566.9200	1131.8254	1131.5197	0.3058	0	82	2.1×10^{-7}	1	R.GYSFTTTAER.E
176	581.4500	1160.8854	1160.6111	0.2744	0	64	1.5×10^{-5}	1	K.EITALAPSTMK.I
215	506.0400	1515.0982	1514.7419	0.3563	0	43	1.4×10^{-3}	1	K.IWHHTFYNELR.V
216	506.4200	1516.2382	1515.6954	0.5428	0	31	2.1×10^{-2}	1	K.QEYDESGPSIVHR.K
220	549.0900	1644.2482	1643.7903	0.4578	1	38	3.8×10^{-3}	1	K.QEYDESGPSIVHRK.C
231	597.7200	1790.1382	1789.8846	0.2535	0	47	5.0×10^{-4}	1	K.SYELPDGQVITIGNER.F
244	918.5000	1834.9854	1834.8441	0.1414	0	30	3.5×10^{-2}	1	M.EEEIAALVIDNGSGMCK.A
261	652.1400	1953.3982	1953.0571	0.3411	0	45	6.8×10^{-4}	1	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A

286	744.4900	2230.4482	2230.0576	0.3906	0	87	4.1×10^{-8}	1	K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M +氧化修饰
14 PDIA3_RAT									
分子量: 57044; Mascot 得分: 1419; 匹配的序列数: 21; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 1.65									
protein disulfide-isomerase A3									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
143	435.4200	868.8254	868.5018	0.3236	0	50	3.2×10^{-4}	1	K.DPNIVIAK.M
149	469.9900	937.9654	937.6324	0.3330	1	35	9.7×10^{-3}	1	R.LKGIVPLAK.V
155	498.4300	994.8454	994.5560	0.2895	0	69	4.3×10^{-6}	1	K.QAGPASVPLR.T
159	499.3800	996.7454	996.5029	0.2425	0	54	1.5×10^{-4}	1	K.DASVVGFFR.D
162	520.9200	1039.8254	1039.5662	0.2592	0	44	1.2×10^{-3}	1	R.TADGIVSHLK.K
167	542.9500	1083.8854	1083.5601	0.3254	0	56	8.9×10^{-5}	1	K.YGVSGYPTLK.I
173	586.9100	1171.8054	1171.5332	0.2723	0	37	7.9×10^{-3}	1	K.FVMQEEFSR.D
179	596.4100	1190.8054	1190.5931	0.2123	0	69	6.1×10^{-6}	1	R.LAPEYEAATR.L
184	599.4800	1196.9454	1196.7128	0.2326	1	28	4.6×10^{-2}	1	K.LSKDPNIVIAK.M
189	618.9100	1235.8054	1235.5054	0.3000	0	90	3.9×10^{-8}	1	R.DGEEAGAYDGPR.T
190	622.9600	1243.9054	1243.6561	0.2494	0	34	1.5×10^{-2}	1	R.FAHTNVESLVK.E
202	671.4500	1340.8854	1340.6765	0.2090	0	74	1.6×10^{-6}	1	K.GFPTIYFSPANK.K
219	687.4500	1372.8854	1372.6663	0.2191	0	64	1.7×10^{-5}	1	R.FLQEYFDGNLK.R
225	697.9800	1393.9454	1393.6514	0.2940	0	64	1.3×10^{-5}	1	R.DLFSDGHSEFLK.A
227	698.9600	1395.9054	1395.6882	0.2173	0	43	1.9×10^{-3}	1	K.SEPIPETNEGPVK.V
240	699.4800	1396.9454	1396.6987	0.2468	0	72	2.2×10^{-6}	1	R.ELNDFISYLQR.E
63	510.7500	1529.2282	1528.7674	0.4608	1	62	7.1×10^{-5}	1	R.FLQEYFDGNLKR.Y
265	797.5900	1593.1654	1592.8409	0.3245	0	46	6.9×10^{-4}	1	R.EATNPPIHQEEKPK.K
270	804.5000	1606.9854	1606.7403	0.2452	0	93	1.9×10^{-8}	1	K.DLLTAYYDVDEYK.N
278	818.9900	1635.9654	1635.7450	0.2204	0	74	1.6×10^{-6}	1	K.MDATANDVSPYEVK.G
301	821.8400	2462.4982	2462.1206	0.3776	1	51	1.5×10^{-4}	1	K.VDCTANTNTCNKYGVSGYPTLK.I
15 PDIA3_RAT									
分子量: 57052; Mascot 得分: 71; 匹配的序列数: 2; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.10									
protein disulfide-isomerase A3									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
215	671.3800	1340.7454	1340.6765	0.0690	0	26	1.1×10^{-1}	1	K.GFPTIYFSPANK.K
235	699.4400	1396.8654	1396.6987	0.1668	0	33	2×10^{-2}	1	R.ELNDFISYLQR.E
16 ALBU_RAT									
分子量: 70682; Mascot 得分: 879; 匹配的序列数: 21; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 1.71									
serum albumin									
访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
153	486.9500	971.8854	971.5651	0.3203	0	31	3.3×10^{-2}	1	K.QTALAELVK.H
156	509.4400	1016.8654	1016.5291	0.3363	0	41	3.2×10^{-3}	1	K.SIHTLFGDK.L
161	550.9700	1099.9254	1099.6601	0.2654	1	42	2.3×10^{-3}	1	K.KQTALAELVK.H
167	575.4400	1148.8654	1148.6077	0.2577	0	72	2.1×10^{-6}	1	K.LVQEVTDFAK.T
185	633.9400	1265.8654	1265.6292	0.2363	0	34	1.3×10^{-2}	1	R.FPNAEFAEITK.L
201	679.4400	1356.8654	1356.6384	0.2270	0	87	8.1×10^{-8}	1	K.TVMGDFAQFVDK.C
208	708.3900	1414.7654	1414.5493	0.2161	0	70	4.4×10^{-6}	1	R.DNYGELADCCAK.Q
212	716.4300	1430.8454	1430.6170	0.2285	0	75	1.3×10^{-6}	1	K.YMCENQATISSK.L
214	720.5100	1439.0054	1438.7780	0.2275	0	55	8.3×10^{-5}	1	K.APQVSTPTLVEAAR.N
217	487.4000	1459.1782	1458.7323	0.4459	0	30	2.7×10^{-2}	1	K.LQACCDKPVQK.S
220	733.5200	1465.0254	1464.7725	0.2529	0	83	1.5×10^{-7}	1	K.LGEYGFQNAVLVR.Y
224	740.5500	1479.0854	1478.8497	0.2358	0	73	1.5×10^{-6}	1	K.GLVLIAFSQYLQK.C
226	782.4700	1562.9254	1562.7147	0.2107	0	87	8.0×10^{-8}	1	K.DNCFATEGPNLVAR.S

233	832.0400	1662.0654	1661.8447	0.2208	0	95	8.3×10^{-9}	1	R.LPCVEDYLSAILNR.L
236	562.3700	1684.0882	1683.7345	0.3537	1	52	1.6×10^{-4}	1	K.LRDNYGELADCCAK.Q
241	873.9900	1745.9654	1745.7236	0.2418	0	54	1.4×10^{-4}	1	K.YNEVLTQCCTESDK.A
243	584.0700	1749.1882	1748.6553	0.5329	0	55	8.2×10^{-5}	1	K.ECCHGDLLECADDR.A
246	590.4300	1768.2682	1767.8614	0.4068	1	58	3.8×10^{-5}	1	R.MSQRFPNAEFAEITK.L
257	628.1000	1881.2782	1881.9295	-0.6513	0	34	8.1×10^{-3}	1	R.RPCFSALTVDETYVPK.E
266	650.4000	1948.1782	1947.9109	0.2673	1	37	4.4×10^{-3}	1	K.AADKDNCFATEGPNLVAR.S
271	654.1000	1959.2782	1959.0425	0.2356	1	33	1.1×10^{-2}	1	R.YTQKAPQVSTPTLVEAAR.N

17 TTHY_RAT
分子量: 15824; Mascot 得分: 199; 匹配的序列数: 4; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.83
transthyretin

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
188	436.3900	870.7654	870.4236	0.3419	0	39	5.1×10^{-3}	1	K.FTEGVYR.V
191	471.9500	941.8854	941.5182	0.3672	0	62	2.2×10^{-5}	1	R.GSPAVDVAVK.V
237	676.9300	1351.8454	1351.6044	0.2410	0	90	4×10^{-8}	1	K.TADGSWEPFASGK.T
249	530.0700	1587.1882	1586.7424	0.4458	0	42	1.8×10^{-3}	1	K.TAESGELHGLTTDEK.F

18 CES3_RAT
分子量: 62398; Mascot 得分: 47; 匹配的序列数: 1; 基于质谱肽段的浓度(emPAI): 0.05
carboxylesterase 3

访问	观察到的分子量	预期分子量	计算分子量	道尔顿	缺失酶切点	得分	期望值	排序	多肽
185	568.7900	1135.5654	1135.5662	-0.0007	0	47	1.1×10^{-3}	1	K.EVAFWSEL.RA

附图 5 carboxylesterase 3 的 MS/MS 图谱

附图 6 STRING 软件分析差异蛋白质相互作用网络

附图 7 8 个基因的 qRT-PCR 分析

分析样本是处理 8 周的样本, *GAPDH* 为内参. A: qRT-PCR 扩增曲线; B: *Ct* 值; C: 标准曲线; D: 溶解曲线

附表 3 差异表达蛋白质的 qRT-PCR 分析结果

		PDIA3-4	PDIA3-8	TTHY-4	TTHY-8		
与正常对照比, 在 4 和 8 周中在免疫性肝纤维化模型中下调的基因	实验 1	0.02	0.22	0	0.095		
	实验 2	0	0.4	0.03	0.32		
	实验 3	0.01	0.33	0.016	0.14		
	平均	0.01	0.32	0.02	0.19		
	标准偏差	0.01	0.09	0.02	0.08		
		NDUV-4	NDUV-8	ATPB-4	ATPB-8	CH60-4	CH60-8
与正常对照比, 在 4 和 8 周中在免疫性肝纤维化模型中上调的基因	实验 1	2.27	1.29	1.31	2.6	2.23	2.06
	实验 2	2.04	1.45	1.39	3.32	1.8	3.05
	实验 3	2.13	1.35	1.34	2.8	2	2.54
	平均	2.15	1.36	1.35	2.91	2.02	2.55
	标准偏差	0.12	0.08	0.04	0.37	0.22	0.5
		HSP7C-4	HSP7C-8	OTC-4	OTC-8	UCRI-4	UCRI-8
在 4 周和 8 周中表达不一致的基因	实验 1	0.15	4.8	0.04	1.25	0	1.77
	实验 2	0.11	2.16	0.01	1.17	0.01	2.03
	实验 3	0.13	3.45	0.03	1.2	0.01	1.8
	平均	0.13	3.47	0.03	1.21	0.01	1.9
	标准偏差	0.02	1.32	0.02	0.04	0.01	0.14