



# 先天性肾盂输尿管连接部狭窄的比较蛋白质组学研究

刘靖<sup>1</sup> 刘明学<sup>2</sup> 杨振宇<sup>2</sup> 苏毅<sup>2</sup> 纪延辉<sup>2</sup> 覃宇冰<sup>2</sup> 黄文倩<sup>2</sup> 何朝升<sup>2</sup> 黄桂珍<sup>2</sup>  
杨国柱<sup>2</sup> 胡增隆<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 厦门大学附属第一医院检验科, 厦门 361003; <sup>2</sup> 厦门大学附属第一医院儿外科, 厦门 361003

通信作者: 刘明学, Email: 983759194@qq.com

**【摘要】 目的** 对先天性肾盂输尿管连接部(ureteropelvic junction, UPJ)狭窄患儿狭窄段输尿管组织与邻近正常输尿管组织进行比较蛋白质组学研究, 探索先天性 UPJ 狭窄的可能病因及发病机制。

**方法** 以厦门大学附属第一医院收治的 30 例先天性 UPJ 狭窄并在本院行 Anderson-Hynes 术的患儿为研究对象, 标本离体后立即取狭窄段输尿管组织(A 组,  $n=30$ )及与狭窄段远端邻近的正常输尿管组织(B 组,  $n=30$ )。采用基于串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)标记的高通量蛋白质组相对定量方法对两组中的差异蛋白进行高通量筛选, 随后对筛选出的差异蛋白进行平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)的靶向蛋白质组学定量验证, 利用生物信息学方法对差异蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路注释的富集分析, 并对蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络进行分析。

**结果** 两组标本共鉴定出蛋白质 6 093 种, 包含差异蛋白 160 种, 其中表达上调的 65 种, 表达下调的 95 种。进行 PRM 相对定量分析的 9 种目标蛋白中, 碳酸酐酶 1 等 7 种蛋白质在 A 组与 B 组的蛋白含量比值, 在 PRM 和 TMT 的定量结果中均小于 1; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-6 和具有多重剪接的 RNA 结合蛋白在 A 组与 B 组的蛋白含量比值, 在 PRM 和 TMT 的定量结果中均大于 1。GO 功能富集分析发现, 两组中差异表达蛋白质在体液免疫反应、抗微生物体液反应、对真菌的反应、对真菌的防御反应和对细菌的防御反应等生物学过程的 GO 功能富集度具有高的显著性水平( $P<0.05$ )。KEGG 通路富集分析结果表明, 氮代谢、PPAR 信号通路等 20 条信号通路富集度具有高的显著性水平( $P<0.05$ )。在 PPI 网络中, 连接度最高的蛋白质是: 中性粒细胞弹性蛋白酶(连接度为 9)和组织蛋白酶抑制素抗菌肽(连接度为 8)。

**结论** 比较蛋白质组学研究结果提示, 先天性 UPJ 狭窄的发病与微生物感染相关, 这为进一步研究先天性 UPJ 狭窄的病因及发病机制提供了参考。

**【关键词】** 肾盂/外科学; 输尿管疾病/并发症; 蛋白质组学; 计算生物学

**基金项目:** 福建省自然科学基金(2019J01564)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202104005-014

## Comparative proteomic analysis of congenital ureteropelvic junction stenosis

Liu Jing<sup>1</sup>, Liu Mingxue<sup>2</sup>, Yang Zhenyu<sup>2</sup>, Su Yi<sup>2</sup>, Ji Yanhui<sup>2</sup>, Qin Yubing<sup>2</sup>, Huang Wenqian<sup>2</sup>, He Chaosheng<sup>2</sup>, Huang Guizhen<sup>2</sup>, Yang Guozhu<sup>2</sup>, Hu Zenglong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

Corresponding author: Liu Mingxue, Email: 983759194@qq.com

**【Abstract】 Objective** To conduct comparative proteomics study between the stenotic and the normal ureteral tissues adjacent to the stenotic ureter in children with ureteropelvic junction (UPJ) stenosis, and explore the etiology and pathogenesis of congenital UPJ stenosis. **Methods** 30 children with congenital UPJ stenosis underwent Anderson-Hynes operation. The ureteral tissue of the narrow segment (group A) and the normal ureteral tissue adjacent to the distal end of the stenosis (group B) were taken immediately after the operation. A relative quantitative method of high-throughput proteomics based on tandem mass tag (TMT) was used to

screen the differentially expressed proteins in these two groups. And then the targeted proteomics quantitative verification of the screened differential proteins was carried out by parallel reaction monitoring (PRM). Gene Ontology (GO) functional annotation, Kyoto Encyclopedia of genes and genomics (KEGG) pathway were enriched and analyzed by bioinformatics method, and protein-protein interaction (PPI) network was analyzed.

**Results** A total of 6093 proteins were identified in the two groups of specimens, including 160 differential proteins, of which 65 were up-regulated and 95 were down-regulated. Among the 9 target proteins subjected to PRM relative quantitative analysis, the ratio of protein content of 7 proteins including carbonic anhydrase 1 in group A and group B was less than 1 in the quantitative results of PRM and TMT; Glypican The ratio of protein content of -6 and RNA-binding proteins with multiple splicing in group A to group B was greater than 1 in the quantitative results of PRM and TMT. GO functional enrichment analysis found that the GO functional enrichment of differentially expressed proteins in the two groups in biological processes such as humoral immune response, anti-microbial humoral response, response to fungi, defense response to fungi, and defense response to bacteria were significantly higher. High level of significance ( $P < 0.05$ ). The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that the enrichment of 20 signaling pathways including nitrogen metabolism and PPAR signaling pathway had a high significant level ( $P < 0.05$ ). In the PPI network, the most connected proteins were: neutrophil elastase (connectivity of 9) and cathepsin antimicrobial peptide (connectivity of 8). **Conclusion** The results of comparative proteomics suggest that the pathogenesis of congenital UPJ stenosis is related to microbial infection, which provides a reference for further study on the etiology and pathogenesis of this disease.

**[Key words]** Kidney Pelvis/SU; Ureteral Diseases/CO; Proteomics; Computational Biology

**Fund program:** Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01564)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202104005-014

肾盂输尿管连接部梗阻 (ureteropelvic junction obstruction, UPJO) 所致肾积水是小儿外科常见病。其中, 先天性肾盂输尿管连接部 (ureteropelvic junction, UPJ) 狭窄占 UPJO 的绝大部分。明确 UPJ 狭窄的病因及发病机制对预防 UPJO 具有重要意义。我们前期利用比较蛋白质组学方法研究了胎鼠肾积水的发生机制<sup>[1-2]</sup>。本研究拟在前期动物实验的基础上, 对先天性 UPJ 狭窄患儿狭窄段输尿管组织及邻近的正常输尿管组织进行蛋白质组学分析, 期望应用高通量蛋白质组学技术对先天性 UPJ 狭窄的病因及发病分子机制进行探索。

## 材料与方法

### 一、研究对象

研究对象为厦门大学附属第一医院 2017 年 1 月至 2019 年 12 月的 30 例因先天性 UPJO 行 Anderson-Hynes 术的患儿, 男 17 例, 女 13 例; 左侧 24 例, 右侧 6 例; 年龄 ( $35.7 \pm 7.9$ ) 个月。

本研究接受厦门大学附属第一医院伦理委员会的指导和监督, 参与研究的患儿监护人均签署知情同意书。纳入标准: ①符合 UPJO 诊断标准; ②年龄 1 个月至 14 岁; ③单侧或双侧 UPJO, 需手术治疗。排除标准: ①不符合诊断及纳入标准; ②合

并其他泌尿系统畸形、伴有输尿管多段狭窄的 UPJO; ③术中发现伴 UPJ 瓣膜、高位输尿管开口、迷走血管压迫 UPJ、输尿管上段扭曲。本研究经厦门大学附属第一医院伦理委员会审批通过 (伦理审批号: KY-2019-011)。

### 二、实验分组及组织标本的处理

留取手术后新鲜肾盂输尿管连接部组织, 取狭窄段输尿管标本 0.5 g 作为实验组 (A 组,  $n = 30$ ), 取与狭窄段远端邻近的正常输尿管组织标本 0.5 g 作为对照组 (B 组,  $n = 30$ )。无菌状态下以生理盐水反复清洗后, 立即保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 三、TMT 相对定量蛋白质组学分析

#### (一) 蛋白质提取和肽段酶解

将 A、B 两组各 30 份标本混合在一起提取的蛋白质分别作为 A、B 两组的蛋白质样品。蛋白质提取采用 SDT 裂解法, 蛋白质定量采用 BCA 法。每个样品取适量蛋白质用于胰蛋白酶酶解和肽段定量 (OD280)<sup>[3]</sup>。

#### (二) TMT 标记

每份样品取 100  $\mu\text{g}$  肽段, 根据 TMT 标记试剂盒说明书 (Thermo 公司) 进行标记。

#### (三) 高 pH 反相肽段分级

等量混合每组标记后肽段, 肽段分级采用高 pH 反相肽分离试剂盒。经柱平衡、上样、脱盐、梯度洗

脱后,每份洗脱的肽段样品予真空干燥、复溶、测定肽段浓度。

#### (四)液相色谱串联质谱数据采集

采用高效液相色谱系统 Easy nLC 对样品进行分离,质谱分析采用 Q-Exactive 质谱仪。

#### (五)蛋白质鉴定和定量分析

质谱分析所使用的原始数据为 RAW 格式文件,查库鉴定及定量分析所采用的软件为 Mascot2.2 和 Proteome Discoverer1.4。

#### (六)生物信息学分析

①GO 功能注释:对目标蛋白质集合的 GO 注释采用 Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>)。②KEGG 通路注释:目标蛋白质集合的 KEGG 通路注释采用 KAAS(KEGG Automatic Annotation Server)软件。③GO 注释和 KEGG 注释的富集分析:对目标蛋白质集合进行 GO 注释的富集分析或 KEGG 通路注释的富集分析。④聚类分析:首先归一化处理目标蛋白质集合的定量信息,然后采用 Complexheat-map R 软件包对样品和蛋白质的表达量进行分类,生成层次聚类热图。⑤PPI 网络分析:分析目标蛋白质之间的相互作用关系,利用 STRING (<http://string-db.org/>) 中的信息进行查找,并使用 Cytoscape 软件生成相互作用网络。

### 四、目标蛋白 PRM 定量分析

#### (一)样品制备

①蛋白提取:采用 TMT 实验制备完的样品。②蛋白酶解:每例样品取约 200  $\mu\text{g}$  蛋白进行酶解,酶解后的肽段脱盐冻干、复溶、测定肽段浓度 (OD280)。

#### (二)LC-PRM/MS 检测分析

①高效液相色谱:按照预实验结果,对鉴定得到的 9 种目标蛋白的 16 条肽段进行 PRM 定量分析。将肽段信息导入 Xcalibur 软件中进行 PRM 方法设置。每例样品分别取 1  $\mu\text{g}$  肽段,掺入 20 fmol 标肽执行检测。运用高效液相色谱系统进行色谱分离。②高分辨质谱 PRM/MS 分析:用 Q-Exactive HF 质谱仪对高效液相色谱分离后的样品进行 PRM 质谱分析。对 6 份(A、B 两组每组各 3 份)样品分别进行 PRM 检测,最后利用 Skyline 3.5.0 软件对 PRM 原始文件进行数据分析。

## 结 果

### 一、手术情况

30 例 UPJO 患儿均成功完成 Anderson-Hynes 术。术中证实肾积水均为 UPJ 狭窄所致,不伴有 UPJ 瓣膜、高位输尿管开口、迷走血管压迫及输尿管上段扭曲。

#### 二、差异表达蛋白筛选

两组标本共鉴定出蛋白 6 093 种,筛选出差异蛋白 160 种。A 组与 B 组比较,表达上调的蛋白有 65 种,表达下调的蛋白有 95 种。前 10 种显著上调的蛋白是 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related(染色质亚家族 E 成员 1 相关的 SWI/SNF 相关基质相关肌动蛋白依赖性调节剂,SMARCE1)、DnaJ homolog subfamily B member 14(DnaJ 同源亚家族 B 成员 14,DNAJB14)、NEDD4-binding protein 1(NEDD4 结合蛋白 1,N4BP1)、Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3(反式作用 T 细胞特异性转录因子 GATA-3,GATA-3)、Rho GTPase-activating protein 39(Rho GTP 酶激活蛋白 39,RHOGAP39)、Tubuliny-Tyr carboxypeptidase 1(微管蛋白酪氨酸羧肽酶 1,TTC1)、Anaphase-promoting complex subunit 4(后期促进复合亚基 4,ANAPC4)、Anaphase-promoting complex subunit 5(后期促进复合亚基 5,ANAPC5)、cAMP-regulated phosphoprotein 19(cAMP 调节磷蛋白 19,ARPP19)、Zinc finger protein 266(锌指蛋白 266,ZFP266)。前 10 种显著下调的蛋白质是 Perilipin-1(外周脂蛋白-1,PLIN1)、Diacylglycerol kinase zeta(甘油二酯激酶  $\zeta$ ,DGK $\zeta$ )、Cathelicidin antimicrobial peptide(组织蛋白酶抑制素抗菌肽,CAMP)、Fatty acid-binding protein, adipocyte(脂肪酸结合蛋白,脂肪细胞,FABP)、Iron-responsive element-binding protein 2(铁反应元件结合蛋白 2,IRP2 或 IREB2)、Melanocyte protein PMEL(黑素细胞蛋白,PMEL)、Protein S100-A9(蛋白质 S100-A9,S100-A9)、Zinc finger protein 397(锌指蛋白 397,ZFP397)、Ankyrin repeat domain-containing protein 22(含有连结蛋白重复结构域的蛋白质 22,ANKRD22)、Protein S100-A8(蛋白 S100-A8,S100-A8)。蛋白定量结果以火山图形式展示(图 1)。

#### 三、差异表达蛋白聚类分析

采用层次聚类算法对 A、B 两组差异表达的蛋白进行聚类分析,并采用热图形式进行数据呈现(图 2),以倍数变化大于 1.2 且  $P$  值小于 0.05 的标准筛选获取的差异表达蛋白质能够有效地把比较组分开,进一步表明差异表达蛋白筛选的合理性。

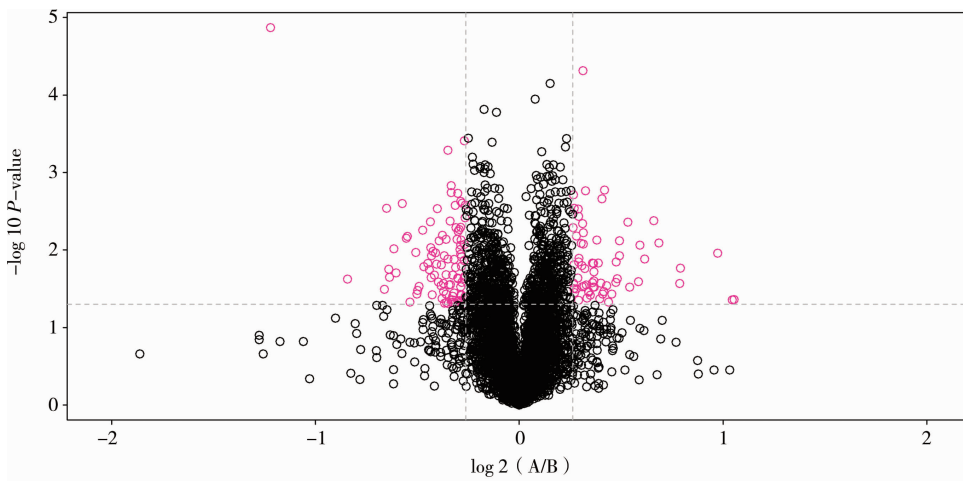


图1 两组输尿管组织标本之间的差异火山图 以A、B组样本间蛋白质表达的差异倍数以及 $t$ 检验得到的 $P$ 值绘制火山图,用于呈现两组样本数据的差异。以差异倍数(以2为底的对数变换)作为横坐标,差异的 $P$ 值(以10为底的对数变换)作为纵坐标,图中黑点为差异表达不显著的蛋白,红点为差异表达显著的蛋白(倍数变化大于1.2倍且 $P < 0.05$ )

Fig.1 Volcano plot of differences between group A and group B

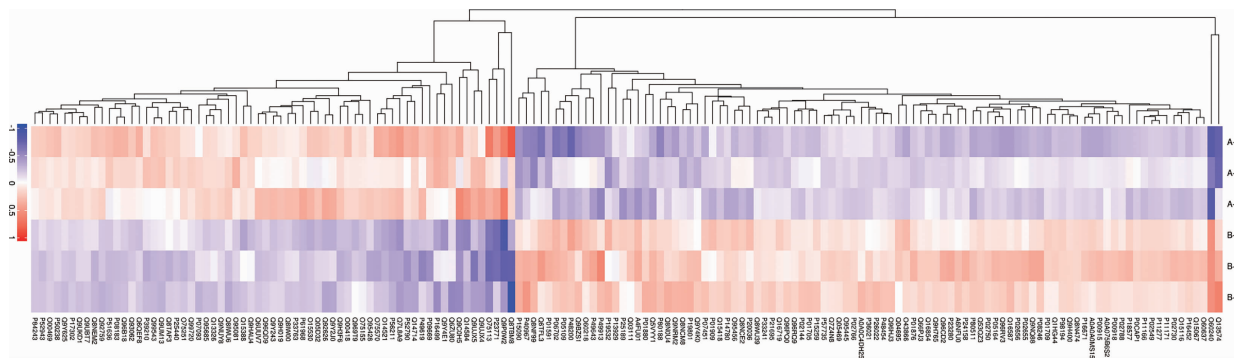


图2 两组输尿管组织标本差异表达蛋白质的聚类分析结果 层次聚类结果采用树型热图呈现,图中每一列代表一份样品(横坐标为样品信息),每一行代表一种蛋白(纵坐标为表达具有显著性差异的蛋白),A、B两组各有3份样品。在热图中,以不同颜色展现显著性差异表达蛋白在各样品中表达量的对数值,红色为显著性上调,蓝色为显著性下调,无蛋白定量信息用灰色表示

Fig.2 Clustering for differentially expressed proteins between group A and group B

#### 四、差异表达蛋白质 GO 功能富集分析

对两组差异表达蛋白进行 GO 功能富集分析,结果表明,体液免疫反应、抗微生物体液反应、对真菌的反应、对细菌的防御反应等生物过程,碳酸盐脱水酶活性、MHC II 类受体活性、Toll 样受体结合等分子功能以及二聚体 IgA 免疫球蛋白复合物、特异颗粒腔、免疫球蛋白复合物等定位蛋白变化显著(图3)。

#### 五、差异表达蛋白质的 KEGG 通路富集分析

对 A、B 两组的差异表达蛋白质进行 KEGG 通路富集分析,结果表明,氮代谢、PPAR 信号通路、IL-17 信号通路、炎症性肠病、人 T 细胞白血病病毒 1 感染、脂肪细胞脂解调节、胰岛素抵抗、Th17 细胞分化、胆汁分泌、Th1 和 Th2 细胞分化、AMPK 信号通路、金黄色葡萄球菌感染、结核病、胆固醇代谢、甘油脂代谢等重要通路变化显著(图4)。

#### 六、PPI 网络分析

将两组的差异表达蛋白构建 PPI 网络图(图5)。在 PPI 网络中,处于关键节点、连接度最高的两种蛋白质是中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和组织蛋白酶抑制素抗菌肽(cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP)。

#### 七、PRM 相对定量分析

本次实验所选取的 9 种目标蛋白在 A 组与 B 组间的表达量存在一定的差异(表1)。PRM 的定量结果和 TMT 总体趋势非常一致(表2)。

### 讨论

蛋白质组学研究可用于多种疾病标志物的筛选,也可解释细胞在不同因素下的病理生理机制<sup>[4-5]</sup>。本研究利用 TMT 蛋白定量结合 PRM 靶向



蛋白验证技术,对先天性 UPJ 狭窄患儿狭窄段输尿管组织与邻近的正常输尿管组织进行了比较蛋白质组学分析。TMT 技术利用同位素试剂标记,通过高分辨质谱仪串联分析,可同时对十多种样品之间的蛋白表达量进行比较<sup>[6]</sup>。利用该技术,我们筛选

出了 160 种差异蛋白。从差异表达的蛋白质中随机选取 20 种蛋白质进行 PRM 靶向蛋白验证,成功定量到 9 种差异蛋白,且 PRM 的定量结果和 TMT 总体趋势非常一致,说明了实验体系的稳定性和定量的准确性。

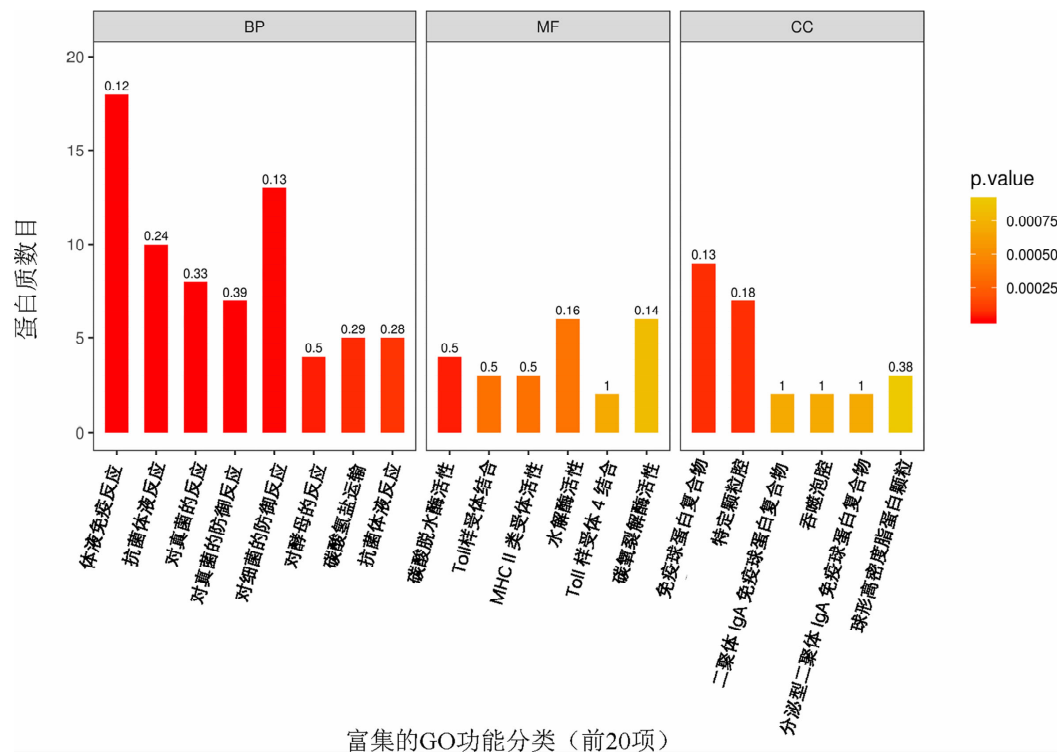


图 3 两组输尿管组织标本差异表达蛋白的 GO 功能富集分析 图中横坐标为富集到的 GO 功能分类,包括生物过程、分子功能和细胞组分 3 类;纵坐标为各功能分类下差异蛋白质的数目;条形图由橘色至红色渐变,越接近红色表明 P 值越小;条形图上方标签为富集因子,代表某 GO 功能类别鉴定到的所有蛋白中,注释到该 GO 功能类别的差异表达蛋白数目所占的比例

Fig.3 Enrichment analysis for GO function of differentially expressed proteins between group A and group B

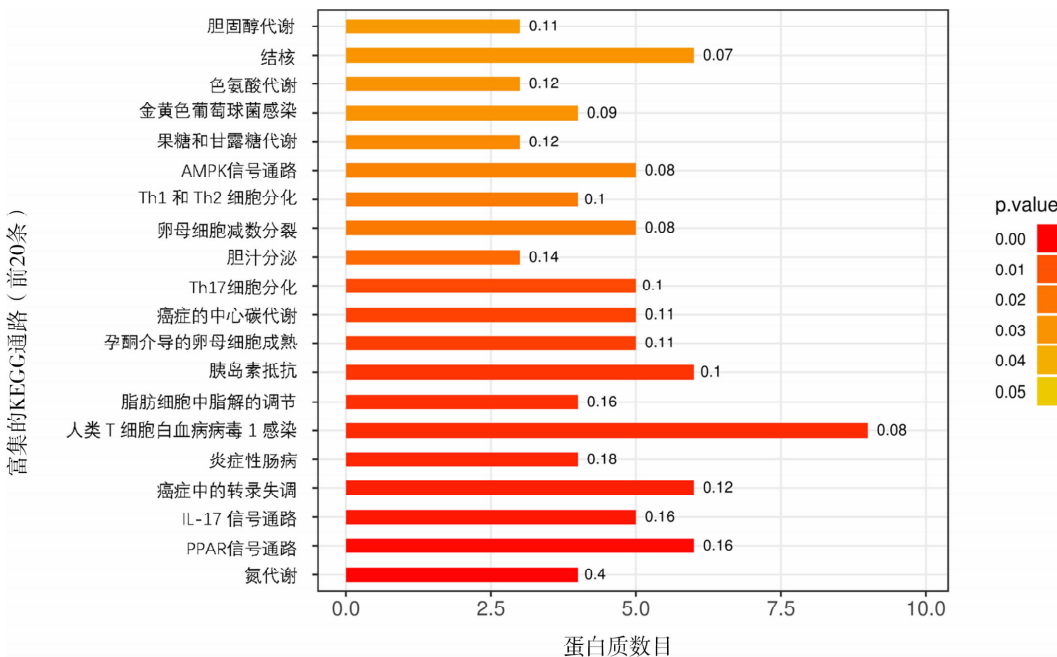


图 4 两组输尿管组织标本差异表达蛋白 KEGG 通路富集分析

Fig.4 Enrichment analysis for KEGG pathway of differentially expressed proteins between group A and group B

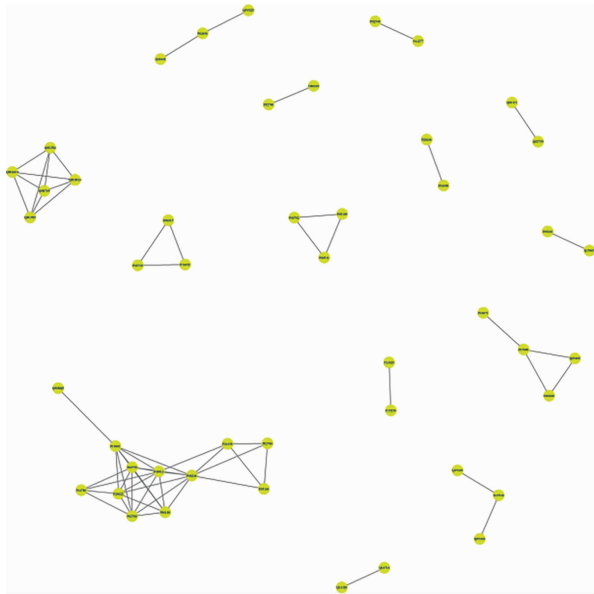


图5 两组输尿管组织标本差异表达蛋白质相互作用网络 图中的黄色结点代表蛋白,线代表蛋白-蛋白之间的相互作用。与某种蛋白直接相互作用的蛋白数目表示该蛋白的连接度

Fig.5 PPI of differentially expressed proteins between group A and group B

表 1 目标蛋白 PRM 相对定量分析结果

Table 1 Relative quantitative analysis results of PRM of target proteins

蛋白代码	蛋白名称	每组样品蛋白含量均值		蛋白含量比值 (A 组/B 组)	t 值 (A 组/B 组)
		A 组	B 组		
P00915	碳酸酐酶 1	0.5088	0.8999	0.565314518	0.010667094
P02750	富含亮氨酸的 $\alpha$ -2-糖蛋白	0.1276	0.1438	0.886955183	0.228938016
P02788	乳铁蛋白	0.0404	0.0773	0.522008427	0.001491321
P05109	蛋白 S100-A8	0.9495	1.5801	0.60092125	0.004164598
P05164	髓过氧化物酶	0.1221	0.2042	0.598101702	0.001768014
Q04695	角蛋白, I 型细胞骨架 17	0.1962	0.2388	0.821480352	0.090846309
P08246	中性粒细胞弹性蛋白酶	0.2506	0.3536	0.708738659	0.085856785
Q9Y625	磷脂酰肌醇蛋白聚糖-6	0.1267	0.0692	1.831960169	0.032165105
Q93062	具有多重剪接的 RNA 结合蛋白	0.1160	0.0700	1.656525636	0.208332783

注 PRM:平行反应监测

表 2 PRM 和 TMT 的定量结果比较

Table 2 Comparison of quantitative results of PRM and TMT

蛋白代码	蛋白名称	A 组/B 组的蛋白含量比值		t 值	
		PRM	TMT	PRM	TMT
P00915	碳酸酐酶 1	0.565314518	0.766726	0.010667094	0.015482513
P02750	富含亮氨酸的 $\alpha$ -2-糖蛋白	0.886955183	0.780052	0.228938016	0.007263192
P02788	乳铁蛋白	0.522008427	0.819674	0.001491321	0.038437372
P05109	蛋白 S100-A8	0.60092125	0.680732	0.004164598	0.007002391
P05164	髓过氧化物酶	0.598101702	0.7518	0.001768014	0.010887951
Q04695	角蛋白, I 型细胞骨架 17	0.821480352	0.779665	0.090846309	0.020789783
P08246	中性粒细胞弹性蛋白酶	0.708738659	0.732552	0.085856785	0.014794726
Q9Y625	磷脂酰肌醇蛋白聚糖-6	1.831960169	1.22434	0.032165105	0.003681724
Q93062	具有多重剪接的 RNA 结合蛋白	1.656525636	1.244145	0.208332783	0.008409019

注 PRM:平行反应监测; TMT:串联质谱标签

狭窄段输尿管组织表达上调的前 10 位蛋白质,其功能主要涉及基因转录、蛋白质降解、炎症反应、神经元发育、细胞周期、胚胎发育等生物学过程<sup>[7-10]</sup>。狭窄段输尿管组织表达下调的前 10 位蛋白质,其功能主要涉及脂质代谢、炎症反应、针对感染和肿瘤的免疫应答、抗微生物活性、神经变性等生物学过程<sup>[11-23]</sup>。

GO 功能富集分析发现,差异蛋白主要涉及体液免疫反应、抗微生物体液反应、对真菌的反应、对真菌的防御反应、对细菌的防御反应等与微生物感染相关的生物过程。

在 PPI 网络中,处于关键节点、连接度最高的两种蛋白是 NE 和 CAMP,它们均与微生物感染以及感染相关的炎症反应联系密切。CAMP 是一种重要的先天免疫效应分子,由循环免疫细胞、骨髓祖细胞和免疫屏障部位的上皮表面(如呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道上皮)产生<sup>[24]</sup>。作为一种内源性抗菌肽,CAMP 具有广谱强抗菌活性,对金黄色葡萄球菌的抗菌活性高于常规的抗生素,对结核分枝杆菌也有较强的抗菌活性<sup>[25-28]</sup>。NE 是一种具有广泛底物特异性的颗粒状丝氨酸蛋白酶,在人中性粒细胞中表达和储存,在中性粒细胞激活时释放,主要参与宿主防御。中性粒细胞是先天免疫的先行者,保护宿主免受感染性病原体的侵害。在这个过程中,中性粒细胞到达炎症/感染部位,通过吞噬作用以及形成由 NE、明胶酶、髓过氧化物酶等颗粒蛋白组成的中性粒细胞胞外陷阱来清除病原体(包括细菌、真菌、病毒)<sup>[29]</sup>。在吞噬病原体衍生化合物等外来物质的过程中,NE 和其他蛋白也会被排泄到周围的细胞外环境中,攻击入侵微生物的蛋白,同时使宿主细胞外基质中的蛋白(如Ⅳ型胶原和弹性蛋白)水解<sup>[30]</sup>。金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌和肺炎支原体感染者的 NE 分泌均增加<sup>[31-33]</sup>。由于 NE 具有降解细胞外基质蛋白的潜力,在抵抗微生物感染的同时,可能参与局部组织损伤,导致 UPJ 狭窄。当然,这种假说还需要更多的后续研究去验证。

综上所述,本研究采用蛋白质组学方法对先天性 UPJ 狭窄患儿狭窄段输尿管组织与邻近正常输尿管组织的差异蛋白数据进行挖掘,发现差异蛋白主要涉及微生物感染、炎症反应、免疫反应、脂质代谢等生物学过程。微生物感染后往往继发炎症反应与免疫反应,而脂质代谢与炎症反应之间也存在密切关联。但生物信息学方法也存在一定的局限性,通过生物信息学方法富集获得的多条信号通

路,需要进行大量的基础实验验证,这些验证实验在后续的研究中是必不可少的。根据本研究的实验结果,虽然尚不能肯定微生物感染是先天性 UPJ 狭窄的病因,但高度提示先天性 UPJ 狭窄的发生与微生物感染相关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 文献检索为纪延辉、覃宇冰,论文调查设计为黄文倩、何朝升,数据收集与分析为黄桂珍、杨国柱、胡增隆,论文结果撰写为刘靖,论文讨论分析为刘明学、杨振宇、苏毅

## 参 考 文 献

- [1] Liu M, Liu J, Liu X, et al. Peroxiredoxin I protein, a potential biomarker of hydronephrosis in fetal mice exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. J Pediatr Urol, 2014, 10(3): 474-481. DOI:10.1016/j.jpuro.2013.10.005.
- [2] 刘明学,魏光辉,刘靖,等. 2,3,7,8-TCDD 所致胎鼠肾积水发生机制的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2009, 30(4): 253-256. DOI:10.3760/cma.j.jssn.0253-3006.2009.04.020. Liu MX, Wei GH, Liu J, et al. 2,3,7,8-TCDD induced hydronephrosis in murine fetuses[J]. Chin J Pediatr Surg, 2009, 30(4): 253-256. DOI:10.3760/cma.j.jssn.0253-3006.2009.04.020.
- [3] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 359-362. DOI:10.1038/nmeth.1322.
- [4] Dong W, Qiu C, Gong D, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for the identification of plasma biomarkers to detect Parkinson's disease[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(4): 2833-2842. DOI:10.3892/etm.2019.7888.
- [5] Guo X, Liu C, Wang GB, et al. Quantitative proteomics and bioinformatics analyses of human coronary artery endothelial cell injury induced by Kawasaki disease[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2020, 22(7): 796-803. DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2001069.
- [6] McAlister GC, Huttlin EL, Haas W, et al. Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses[J]. Anal Chem, 2012, 84(17): 7469-7478. DOI:10.1021/ac301572t.
- [7] Sopha P, Kadokura H, Yamamoto YH, et al. A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins[J]. Cell Struct Funct, 2012, 37(2): 177-187. DOI:10.1247/csf.12017.
- [8] Gitlin AD, Heger K, Schubert AF, et al. Integration of innate immune signalling by caspase-8 cleavage of N4BP1[J]. Nature, 2020, 587(7833): 275-280. DOI:10.1038/s41586-020-2796-5.
- [9] Wu W, Jin YQ, Gao Z. Directly reprogramming fibroblasts into adipogenic, neurogenic and hepatogenic differentiation lineages by defined factors[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 2685-2690. DOI:10.3892/etm.2017.4365.
- [10] Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, et al. Zinc-finger proteins in health and disease[J]. Cell Death Discov, 2017, 3: 17071. DOI:10.1038/cddiscovery.2017.71. eCollection 2017.
- [11] Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, et al. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy[J]. N Engl J Med, 2011, 364(8): 740-748. DOI:10.1056/NEJMoa1007487.

- [12] Mahajan S, Mellins ED, Faccio R. Diacylglycerol Kinase Regulates Macrophage Responses in Juvenile Arthritis and Cytokine Storm Syndrome Mouse Models [J]. *J Immunol*, 2020, 204 (1): 137–146. DOI:10.4049/jimmunol.1900721.
- [13] Zhang S, Liu G, Xu C, et al. Perilipin 1 Mediates Lipid Metabolism Homeostasis and Inhibits Inflammatory Cytokine Synthesis in Bovine Adipocytes [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 467. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00467.
- [14] Bals R, Wang X, Zasloff M, et al. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (16): 9541–9546. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9541.
- [15] Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, et al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77 (4): 451–459. DOI:10.1189/jlb.0704380.
- [16] Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, et al. Lipid chaperones and metabolic inflammation [J]. *Int J Inflam*, 2011: 642612. DOI: 10.4061/2011/642612.
- [17] Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, et al. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases [J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2015, 8 (Suppl 3): 23–33. DOI:10.4137/CMC.S17067.
- [18] Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11 (10): 592–605. DOI:10.1038/nrendo.2015.122.
- [19] Li H, Huang X, Chang X, et al. S100-A9 protein in exosomes derived from follicular fluid promotes inflammation via activation of NF- $\kappa$ B pathway in polycystic ovary syndrome [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (1): 114–125. DOI:10.1111/jcmm.14642.
- [20] Pan T, Liu J, Xu S, et al. ANKRD22, a novel tumor microenvironment-induced mitochondrial protein promotes metabolic reprogramming of colorectal cancer cells [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (2): 516–536. DOI:10.7150/thno.37472.
- [21] Singh BK, Kambayashi T. The Immunomodulatory Functions of Diacylglycerol Kinase [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 96. DOI:10.3389/fcell.2016.00096.
- [22] Chromek M, Slamová Z, Bergman P, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (6): 636–641. DOI: 10.1038/nm1407.
- [23] Peng H, Purkerson JM, Schwaderer AL, et al. Metabolic acidosis stimulates the production of the antimicrobial peptide cathelicidin in rabbit urine [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313 (5): F1061–F1067. DOI:10.1152/ajprenal.00701.2016.
- [24] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4: 361–372. DOI:10.1016/s1286-4579(02)01549-6.
- [25] Di Francesco A, Favaroni A, Donati M. Host defense peptides: General overview and an update on their activity against *Chlamydia* spp [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11 (11): 1215–1224. DOI:10.1586/14787210.2013.841450.
- [26] Buck CB, Day PM, Thompson CD, et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (5): 1516–1521. DOI:10.1073/pnas.0508033103.
- [27] Kang J, Dietz MJ, Li B. Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (6): e0216676. DOI:10.1371/journal.pone.0216676. eCollection 2019.
- [28] Deshpande D, Grieshaber M, Wondany F, et al. Super-Resolution Microscopy Reveals a Direct Interaction of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* with the Antimicrobial Peptide LL-37 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (18): 6741. DOI:10.3390/ijms21186741.
- [29] Kumar S, Gupta E, Kaushik S, et al. Neutrophil extracellular traps: formation and involvement in disease progression [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018, 17 (3): 208–220.
- [30] Thierry AR. Anti-protease Treatments targeting plasmin (ogen) and neutrophil elastase may be beneficial in fighting COVID-19 [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100 (4): 1597–1598. DOI:10.1152/physrev.00019.2020.
- [31] Zimmermann F, Lautenschläger K, Heppert V, et al. Expression of elastase on polymorphonuclear neutrophils in vitro and in vivo; identification of CD11b as ligand for the surface-bound elastase [J]. *Shock*, 2005, 23 (3): 216–223.
- [32] Moideen K, Kumar NP, Nair D, et al. Heightened Systemic Levels of Neutrophil and Eosinophil Granular Proteins in Pulmonary Tuberculosis and Reversal following Treatment [J]. *Infect Immun*, 2018, 86 (6): e00008–18. DOI:10.1128/IAI.00008–18. Print 2018 Jun.
- [33] Chen Z, Shao X, Dou X, et al. Role of the *Mycoplasma pneumoniae*/Interleukin-8/Neutrophil Axis in the Pathogenesis of Pneumonia [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (1): e0146377. DOI:10.1371/journal.pone.0146377. eCollection 2016.

(收稿日期: 2021-04-04)

**本文引用格式:** 刘靖, 刘明学, 杨振宇, 等. 先天性肾盂输尿管连接部狭窄的比较蛋白质组学研究 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2022, 21 (5): 474–481. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202104005-014.

**Citing this article as:** Liu J, Liu MX, Yang ZY, et al. Comparative proteomic analysis of congenital ureteropelvic junction stenosis [J]. *J Clin Ped Sur*, 2022, 21 (5): 474–481. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202104005-014.