



水牛唾液蛋白组学研究进展

贾银海¹, 黄光云¹, 朱文¹, 姜建萍³, 文信旺¹,
肖正中¹, 黄明光¹, 吴柱月¹, 杨秀荣^{2*}, 蒋和生^{2*}

(1. 广西壮族自治区畜牧研究所, 南宁 530001; 2. 广西大学动物科技学院, 南宁 530004;
3. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530001)

摘 要:唾液具有溶菌、消化和滋润口腔等多种生物学功能, 唾液中含有各种酶类, 唾液是一种非损伤性的体液, 作为研究材料被应用。唾液蛋白质组学研究也成为现代组学研究的热点内容。本文对唾液的收集方法、组学研究方面的应用、疾病方面、生物标记, 特别是对水牛唾液蛋白质组学方面的研究进行了综述, 旨在为今后其他物种唾液蛋白质组学方面的研究奠定基础。

关键词: 水牛; 唾液蛋白质组学; 研究进展

中图分类号: S823.8⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2020)04-0069-04

唾液具有溶菌、消化和滋润口腔等多种生物学功能, 运用蛋白质组学和代谢组学技术可对唾液中含有丰富的微生物和代谢产物进行分析。Wong 等^[1]建立了富含大量人类唾液生物学信息的专业唾液组学数据库 (saliva omics knowledge base, SKB), 非常有利于唾液相关组学的进一步研究^[2]。随着高通量和高精度的蛋白质测序在蛋白质组学技术广泛的应用, 使得应用唾液蛋白质组学表达筛选口腔内环境及临床生物标记物成为可能。研究人员应用多种分离方法来提高唾液蛋白的含量, 并改善分离测定的灵敏度。

人类或动物的唾液中含有大量的化合物可提供大量的信息, 为监控疾病的发病机理以及口腔健康等起着非常重要的作用。Hardt 等^[3]使用 2D SDS-PAGE 结合质谱技术分离腮腺分泌唾液的蛋白质, 被识别的多肽范围在 1~6 kDa 以及相对较高分子量的蛋白质。Schipper 等从全唾液中鉴定到 1 100 个蛋白, 并且 Denny 等^[4]在全唾液中鉴定到大约 1 166 个蛋白。Wilmarth 等^[5]报道成功地应用二维液相色谱^[6-7]和毛细管电泳技术^[8]结合鉴定了人类唾液的蛋白质组。

1 唾液蛋白组学的研究应用

1.1 唾液收集方法的研究应用

唾液收集不受外界的影响, 无需任何刺激。非侵入性的唾液收集有助于减少病人压力和焦虑水平^[9], 特别是在老年和儿科这是非常重要的。简单的收集、处理、存储, 可以减少成本。人类的唾液可以用常规的吐痰管收集, 收集的程序非常简单, 不需要专业人员^[10]。但由于分析水平上的差异, 要求采集的唾液要进行不同的处理^[11-12]。因此, 探寻一种能够足量、客观采集唾液样品的方法具有重要的临床意义。目前动物唾液主要应用巴斯特吸管吸取法、自然流取法和咀嚼棉柱法进行收集。动物必须在饲喂前进行采集, 清洗口腔, 采集后的唾液去除食物碎屑等物质, 添加适量的蛋白酶抑制剂后低温保存备用^[13-14]。但现在采集的时间、贮藏的温度、储存的时间在不同的研究结果中表现不一致, 还有待进一步研究。

1.2 唾液蛋白质组学研究技术的应用

近年来, 应用蛋白质组学技术可以探测和识别人类体液和组织中的蛋白质。蛋白质控制着细胞的

收稿日期: 2020-03-15 修回日期: 2020-03-20

基金项目: 广西创新驱动发展专项资金项目(桂科 AA17204052); 广西科技重大专项(桂科 AA17204028)

作者简介: 贾银海(1977—), 男, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: yinhai18@163.com

* 通讯作者: 杨秀荣(1979—), 女, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: xiurongyang09@163.com

蒋和生(1962—), 男, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: hsjiang@126.com

发生发育过程,但是在疾病状态下可能会被改变。系统的分析并量化蛋白质的丰度,对于理解蛋白质—蛋白质的关系与蛋白质和动力学之间相互作用至关重要。简而言之,蛋白质组学是一种利用涉及的技术对分离液、细胞等分离得到的蛋白质进行质谱识别,并借助生物信息学对其进行分析的学科。目前主要有两种基本的蛋白质组学策略:自底向上和自顶向下^[15]。它们之间的主要区别在于样品制备的过程。在自底向上的样品制备技术,工作流程首先是蛋白质的提取和酶裂解,高效能的液相色谱—光谱法(HPLC-MS)分析可以识别的蛋白质。大多数的蛋白质转译后改变蛋白质的侧链,从而增加了蛋白质组的功能多样性。自底向上的策略往往是无法标识转录后修饰,特别是唾液蛋白质组^[16]。尤其是经过蛋白水解酶作用的唾液蛋白质。毛细管电泳或最近开发的 OFFGEL 分离液也可以用于样品分离^[16]。现在一般都采用串联质谱(MS/MS)和液相色谱连用的方法来提高质谱对蛋白质鉴定的准确性。但是随着蛋白质组学的研究技术的发展,需对一个基因组所表达的蛋白进行鉴定并精确的定量。

1.3 唾液蛋白质组学在疾病方面的应用

最近的研究表明,唾液可以反应口腔和身体的健康状态。口腔的健康也可作为一些疾病致病的决定因素^[17],这对于从病理生理学方面理解口腔的复杂环境和口腔疾病的动态变化是非常重要的。

Yao 等^[18]使用全唾液的蛋白质样本使用 2D-SDS-PAGE MALDI-TOF/ESI 和 MALDI-QcTOF/MS 分析方法来鉴定全唾液中的蛋白质。应用凝胶蛋白质组学的方法研究人唾液翻译后修饰,如唾液糖型^[19-20]。通过凝胶电泳方法研究全唾液来寻找有关疾病的生物标志物如牙周炎、龋齿等^[21]。

唾液中包括 IgA、IgM、IgG 等抗体,这些抗体主要是来源于唾液腺和血清,唾液中的这些抗体可以抵抗病毒、细菌、真菌和寄生虫等的感染,在感染 HIV 病毒人员的全唾液中通过 ELISA 和 Western blot assay 分析得出与血清中的抗体水平基本一致^[22]。研究发现,在成人牙周炎患者中显示有比较高的酶活性,且可能与唾液中的碱性磷酸酶的活性有关^[21]。唾液也可以用于确定免疫和感染检测与麻疹、腮腺炎和风疹等疾病^[23]。唾液中的 IgA 可作为检测感染轮状病毒(RV)血清中的抗体反应的一个较好的指标,同时还可以检测感染轮状病毒(RV)疫苗接种和免疫反应情况。Vitorino 等^[24]用高效液相色谱连用质谱法对唾液中的微量蛋白功能的表达研究发现唾液蛋白的鉴定率高于聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白测序免疫印迹法,并精确鉴定了 22

种蛋白,这些蛋白对口腔内抗菌和膜的形成起到了主要作用。到目前为止,Rosa 等^[25]通过口腔鉴定的蛋白有近 3 400 个,其中 3 115 个从唾液中被发现。

1.4 唾液蛋白质组学生物标记中的应用

唾液采集具有无创伤性,收集方便等优势,但同其他的体液的研究如乳液、精液、胰酶的应用相比较,在口腔生物标记的研究还处于初期^[26]。但是口腔唾液中独特的蛋白质成分、无机盐等成分是研究口腔疾病方面理想的生物标记。唾液中含有各种类型的蛋白质可以防止微生物感染口腔,溶菌酶则是众所周知的一类能直接穿透细菌细胞壁抑制细菌生长的酶类。研究发现,患有口腔炎症的患者在炎症周围溶菌酶的含量明显增加^[27],除了溶菌酶外其他抗菌肽类物质对口腔炎症也有很好的调节作用。龋齿的病原体可以刺激免疫细胞因子产生,可能会保护和防止细菌的感染,细胞因子的浓度可以控制炎症性过程^[28]。细胞因子 IL-6, IL-8, IL-1 β 和转化生长因子在口腔炎症组比对照组显著增加^[29-31]。研究人员发现,蛋白酶抑制剂具有抗菌作用,推测可能与其参与龋齿形成的过程有关,截至目前,蛋白酶抗菌活性的机制仍未阐明^[32]。

1.5 唾液蛋白质组学在其他方面的研究

唾液蛋白质组学的研究在人类口腔疾病生物标记物的筛选鉴定方面进行了大量的研究工作,并取得了初步成果。但与血液蛋白质组学等的研究相比,唾液蛋白质组学的研究还处在初级阶段,而且唾液中的蛋白含量低,受采集时间、保存时间等多种因素的影响,导致鉴定的唾液蛋白质的敏感性较差而丰度较低。但随着 OMIC 时代的带来,自动化、高通量、高灵敏度和可重复性的定量技术的研究成功将有效提高唾液蛋白质组的分析精度,蛋白组的全表达谱研究和疾病生物标记确立、生物靶向治疗药物的研究应用将成为今后唾液蛋白质组学研究的重点。

2 水牛唾液蛋白质组学研究

随着后基因组时代的开启,液相色谱与串联质谱技术的连用,结合生物信息学分析,使得唾液蛋白质组学向高通量、高灵敏度的方向发展,并取得的一定的成果。最近,运用组学方法来识别动物不同体液中存在的大量生物分子得到了关注。唾液、尿液等材料被用作动物的发情鉴定。在这些资源中,唾液有着复杂的功能,如润滑口腔,改善动物的咀嚼和吞咽,保护口腔组织和牙齿,还可以启动口腔内一些酶的消化功能。另外唾液可以作为各种细菌感染、癌症、药物滥用、激素水平、DNA 及 RNA 测试、唾液化

学分析(saliva-chemistry analysis)等,利用唾液样品通过检测特殊蛋白的表达并可作为蛋白的生物标记。唾液蛋白组学已经开始用于人类健康状况和疾病等方面的研究^[33-37]。在人类研究上,可以通过检测唾液中特殊蛋白来确定排卵的时间。Muthukumar和Onteru报道了运用蛋白质组分析水牛发情周期不同阶段的唾液和阴道粘液得出,这些体液可以识别和鉴定其发情^[38-39]。

利用唾液对不同动物的发情周期各个阶段蛋白质的变化进行了研究,如水牛^[40]、山羊^[41]、绵羊^[42]和牛^[42]等。Muthukumar等^[43]从水牛全唾液中采用SDS-PAGE,光谱分析的到179种蛋白,其中发情前期有22种特异性蛋白,发情期有37种特异性蛋白,发情后期有17种特异性蛋白,在这些蛋白中 β -enolase和TLR4被验证。运用免疫印迹技术发现这两种蛋白在发情阶段特异性表达。 β -enolase有报道在骨骼和心脏内被发现,这是第1次在水牛发情阶段被报道。Muthukumar子宫颈阴道分泌的液体研究表明,有416种蛋白在水牛发情期和发情后期阶段的阴道子宫液中被检测出,其中68种蛋白为发情特异性蛋白,HSP-70蛋白的含量发情期比发情前期、发情后期的含量高^[38]。

3 小 结

综上所述,唾液作为实验材料已经在多个领域进行研究,不同的个体、同一个体不同的时期唾液的成分不同,如何掌握最佳的采集时间、贮藏方法对后续研究结果的准确性至关重要。当前利用唾液蛋白组学研究还处在初级阶段,蛋白质与蛋白质之间相互作用网络关系等方面还需要进一步研究。但利用唾液蛋白质组学研究将成为未来组学研究的一种新的发展方向。

参考文献:

- [1] WONG D T. Salivaomics[J]. Journal of the American Dental Association, 2012,143:19-24.
- [2] 程德金. 基于唾液定量蛋白质组学的大肠癌病证结合分子诊断研究[D]. 武昌:湖北中医药大学,2017.
- [3] HARDT M, THOMAS L R, DIXON S E, et al. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: Identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry[J]. Biochemistry, 2005,44(8):2885-2899.
- [4] DENNY P, HAGEN F K, HARDT M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions[J]. J. Proteome Res., 2008,7(5):1994-2006.
- [5] WILMARTH P A, RIVIERE M A, RUSTVOLD D, et al. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome[J]. J. Proteome Res., 2004,3(5):1017-1023.
- [6] GUO T, RUDNICK P A, WANG W, et al. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS[J]. J. Proteome Res., 2006,5(6):1469-1478.
- [7] FANG X, YANG L, WANG W, et al. Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins[J]. Anal. Chem., 2007,79(15):5785-5792.
- [8] CASTAGNOLA M, CABRAS T, IAVARONE F, et al. The human salivary proteome: A critical overview of the results obtained by different proteomic platforms[J]. Expert Review Proteomics, 2012,9(1):33-46.
- [9] SHAH F D, BEGUM R, VAJARIA B N, et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer[J]. Indian J. Clin. Biochem., 2011,26:326-334.
- [10] SATHYAPALAN T. Salivary testosterone measurement in women with and without polycystic ovary syndrome [J]. Sci. Rep., 2017,7:3589.
- [11] TOPKAS E, KEITH P, DIMESKI G, et al. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of proteins[J]. Clin. Chim. Acta, 2012,413(13/14):1066-1070.
- [12] MOHAMED R, CAMPBELL J L, COOPER W J, et al. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and myoglobin immunoassays[J]. Clin. Transl. Med., 2012,1:19.
- [13] HENSON B S, WONG D T. Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications [J]. Methods Mol. Biol., 2010,666:21-30.
- [14] GOLATOWSKI C, SALAZAR M G, DHOPE V M, et al. Comparative evaluation of saliva collection methods for proteome analysis[J]. Clin. Chim. Acta, 2013,419:42-46.
- [15] CABRAS T, IAVARONE F, MANCONI B, et al. Top-down analytical platforms for the characterization of the human salivary proteome[J]. Bioanalysis, 2014,6(4):563-581.
- [16] CASTAGNOLA M, SCARANO E, PASSALI G C, et al. Salivary biomarkers and proteomics: Future diagnostic and clinical utilities [J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2017,37(2):94-101
- [17] JOSEPH B K, KULLMAN L, SHARMA P N, et al. The oral-systemic disease connection: A retrospective study[J]. Clin. Oral Investig., 2016,20:2267-2273.
- [18] YAO Y, BERG E A, COSTELLO C E, et al. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches[J]. J. Biol. Chem., 2003,278(7):5300-5308.
- [19] CABRAS T, FANALI C, MONTEIRO J A, et al. Tyrosine polysulfation of human salivary histatin 1. A post-translational modification specific of the submandibular gland [J]. J. Proteome Res., 2007,6(7):2472-2480.
- [20] SONDEJ M, DENNY P A, XIE Y, et al. Glycoprofiling of the human salivary proteome[J]. Clin. Proteomics, 2009,5:52-68.
- [21] BALDINI C, GIUSTI L, CIREGIA F, et al. Proteomic analysis of saliva: A unique tool to distinguish primary Sjögren's syndrome from secondary Sjögren's syndrome and other sicca syndromes[J]. Arthritis Res. Ther., 2011,13(6):194.

- [22] DA SILVA FIDALGO T K, FREITAS-FERNANDES L B, AM-MARI M, et al. The relationship between unspecific s-IgA and dental caries; A systematic review and meta-analysis [J]. *J. Dent.*, 2014,42(11):1372-1381.
- [23] JIN L, VYSE A, BROWN D W. The role of RT-PCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella [J]. *Bull World Health Organ*, 2002,80(1):76-77.
- [24] VITORINO R, LOBO M J, FERRER-Correira A J, et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics [J]. *Proteomics*, 2004,4(4):1109-1115.
- [25] ROSA N, CORREIA M J, ARRAIS J P, et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology [J]. *Arch. Oral Biol.*, 2012,57(7):853-864.
- [26] TULUNOGULU O, DEMIRTAS S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender [J]. *Int. J. Paed. Dent.*, 2006,16(3):186-191.
- [27] LERTSIRIVORAKUL J, PETSONGKRAM B, CHAIYARIT P, et al. Salivary lysozyme in relation to dental caries among thai preschoolers [J]. *J. Clin. Ped. Dent.*, 2015,39(4):343-347.
- [28] HORST O V, HORST J A, SAMUDRLA R, et al. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth [J]. *BMC Immunology*, 2011,12:9.
- [29] ZHAO A, BLACKBUM C, CHIN J, et al. Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries [J]. *BMC Oral Health*, 2014,14:108-113.
- [30] SHARMA V, GUPTA N, SRIVASTAVA N, et al. Diagnostic potential of inflammatory biomarkers in early childhood caries: A case control study [J]. *Clin. Chim. Acta*, 2017,471:158-163.
- [31] MENON M M, BALAGOPAL R V, SAJITHA K, et al. Evaluation of salivary interleukin-6 in children with early childhood caries after treatment [J]. *Contemp. Clin. Dent.*, 2016,7(2):198-202.
- [32] SALLENAVE J M. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2; Versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity [J]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2010,42(6):635-643.
- [33] PAULO J A, LEE L S, Wu B, et al. Mass spectrometry-based proteomics of endoscopically collected pancreatic fluid in chronic pancreatitis research [J]. *Proteomics Clin Appl.*, 2011,5(3/4):109-202.
- [34] LAMY E, MAU M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases [J]. *J. Proteomics*, 2012,75(14):4251-4258.
- [35] PRINCIPE S, HUI A B Y, BRUCE J, et al. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: Implications for tumor biology and biomarker discovery [J]. *Proteomics*, 2013,13(10/11):1608-1623.
- [36] SINGH M, SAU S, BHATT M, et al. Noninvasive diagnostic tool for pathological conditions salivary biomarkers [J]. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.*, 2014,5(3):1-12.
- [37] XIAO H, ZHANG Y, KIM Y, et al. Differential proteomic analysis of human saliva using tandem mass tags quantification for gastric cancer detection [J]. *Sci. Rep.*, 2016,6:1-13.
- [38] MUTHUKUMAR S, RAJKUMAR R, RAJESH D, et al. Exploration of salivary proteins in buffalo: An approach to find marker proteins for estrus [J]. *FASEB J.*, 2014,28(11):4700-4709.
- [39] ONTERU S K, BADDELA V S, RAVINDER R, et al. Direct saliva transcript analysis as a novel non-invasive method for estrus marker detection in buffaloes [J]. *Biomarkers*, 2015,21(2):99-101.
- [40] SHASHIKUMAR N G, BAITHALU R K, BATHLA S, et al. Global proteomic analysis of water buffalo (*Bubalus bubalis*) saliva at different stages of estrous cycle using high throughput mass spectrometry [J]. *Theriogenology*, 2018,110:52-60.
- [41] LAMY E, DA COSTA G, SANTOS R, et al. Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research [J]. *Physiol. Behav.*, 2009,98(4):393-401.
- [42] MAU M, MULLER C, LANGBEIN J, et al. Adhesion of bovine and goat salivary proteins to dental enamel and silicate [J]. *Arch. Tierz*, 2006,49(5):439-446.
- [43] MUTHUKUMAR S, RAJKUMAR R, KARTHIKEYAN K, et al. Buffalo cervico-vaginal fluid proteomics with special reference to estrous cycle: Heat shock protein (Hsp)-70 appears to be an estrus indicator [J]. *Biol. Reprod.*, 2014,90(5):97.

Research Progress of Saliva Proteomics in Buffalo

JIA Yin-hai¹, HUANG Guang-yun¹, ZHU Wen¹, JIANG Jian-ping³, WEN Xin-wang¹,
XIAO Zheng-zhong¹, HUANG Ming-guang¹, WU Zhu-yue¹, YANG Xiu-rong^{2*}, JIANG He-sheng^{2*}

(1. *Animal Husbandry Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001*;

2. *College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004*;

3. *Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530001*)

Abstract: Saliva contained various enzymes and had a variety of biological functions such as bacteria-dissolving, digestion and moistening the mouth. Besides, saliva, a non-damaging bodily fluid, were used as the research material. Saliva proteomics research had become a hot topic in modern proteomics. In this paper, it was reviewed that the methods of saliva collection, the application of omics, diseases, biomarkers, and especially the buffalo saliva proteomics. The aim was to lay a foundation for the future research on saliva proteomics of other species.

Key words: buffalo; saliva proteomics; research progress