



不同来源乳汁外泌体蛋白质及其磷酸化修饰差异分析*

刘昌梅^{1,2)} 胡一帆¹⁾ 陈文彦¹⁾ 刘丹³⁾ 施杰^{1,2)} 杨刚龙^{1)**}

¹⁾ 江南大学生物工程学院, 无锡 214122; ²⁾ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;

³⁾ 四川省内江市农业科学院中药研究所, 内江 641000)

摘要 目的 外泌体是一种由不同类型细胞分泌到胞外的囊泡结构, 其粒径范围在 30~150 nm, 广泛存在于血液、尿液、乳汁等多种生物流体。由于外泌体内部含核酸、脂质、蛋白质等多种生物活性分子, 因此被认为是潜在的生物标记物和药物载体。乳汁来源的外泌体获取成本低、生物相容性高且免疫原性低, 已被广泛应用于药物递送等领域以治疗相关疾病。目前对于乳汁外泌体磷酸化的研究尚未报道。本文旨在对不同来源乳汁外泌体进行磷酸化蛋白质组学分析, 以期寻找其中具有特殊功能的通路和蛋白质, 为探索寻找更加丰富多样的疾病治疗手段提供思路。方法 利用多肽和磷酸化多肽富集技术, 分离牛乳、猪乳、羊乳来源外泌体与乳清中样品进行全蛋白质组学与磷酸化蛋白质组学分析, 并结合多种生物信息学工具, 分析不同来源乳汁外泌体蛋白质信号通路相关信息。结果 从上述 3 种不同物种乳汁外泌体中鉴定到 4 191 种蛋白质, 1 640 种磷酸化修饰蛋白质以及 4 064 个磷酸化修饰肽段, 其中不同物种外泌体蛋白质及其磷酸化修饰的种类均明显高于乳清, 且不同物种样品中蛋白质种类差异较大, 表明外泌体中蛋白质种类与其来源细胞种类和状态密切相关。结果显示, 牛乳来源外泌体蛋白质在吞噬作用 (由 Fc γ 受体介导) 通路的富集, 羊乳外泌体蛋白质显著富集于神经与免疫相关通路, 猪乳外泌体所含蛋白质参与多个生命活动的正/负调控。结论 本研究将为不同来源外泌体在疾病靶向治疗和载药方面的应用提供理论依据。

关键词 乳汁外泌体, 质谱, 蛋白质组学, 磷酸化蛋白质组学

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0433

几乎所有细胞都会大量分泌胞外囊泡, 根据不同细胞的类型和所处状态 (例如转化、分化、刺激与应激状态), 胞外囊泡可以分为外泌体、凋亡膜泡、脱落囊泡、微粒等, 其中外泌体是最受关注并被广泛应用的胞外微泡之一^[1]。外泌体同样存在于多种体液中, 如血液、唾液、尿液以及乳汁。与细胞结构类似, 外泌体具有磷脂双分子层结构, 粒径普遍在 30~150 nm 区间内, 在体液中主要以球形存在, 是一种独特的纳米球状囊泡^[2-3]。

外泌体可以将各种类型的生物分子, 如蛋白质、脂质、mRNAs、miRNAs、受体、效应分子等, 运输到受体细胞中, 进而参与调控细胞间的物质交换和信息交流等生命活动, 如血管形成、抗原呈递、细胞程序性死亡、免疫应答等, 并影响生物体的生理与病理过程, 包括癌症、神经退行性疾病以及自身免疫性疾病的发生等。根据现有的研究, 外泌体主要通过两种不同方式来调节受体细胞的生

命活动过程与生理状态: a. 外泌体可以与受体细胞形成配体-受体结构, 进而调控受体细胞相关通路, 实现相应的功能; b. 外泌体与受体细胞接触, 以膜融合或胞内吞的方式进入受体细胞, 携带的相关生物分子释放, 通过调控特定基因的表达或信号通路引起受体细胞相关反应^[4]。外泌体携带有大量且丰富的生物信息分子, 可以参与调节多种生命活动, 因此近些年针对外泌体的研究越来越广泛。

目前, 外泌体的形成途径主要有经典途径与直接途径^[5], 两种途径所需的蛋白质和细胞种类不同。乳汁来源外泌体是由经典途径产生^[6], 其中含有核酸、蛋白质等物质, 首先形成多泡体 (multivesicular bodies, MVBs), 再通过内体分拣转运复合物 (endosomal sorting complex required

* 江苏省重点研发计划 (BE2023682) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0510-85916667, E-mail: glyanglife@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2023-11-06, 接受日期: 2024-02-07

for transport, ESCRT) 或四肽、神经酰胺等分子的辅助作用被释放到胞外, 进而与特定的靶细胞进行结合^[7]。还有一种更为直接的外泌体形成路径, 如T细胞外泌体直接由相关囊泡从T细胞质膜上特定的内体样结构域 (endosome-like domains, ELDs) 中出芽而形成^[8], 而T细胞本身的活性提升或特定病毒蛋白如 HIV 辅助蛋白 (HIV accessory protein negative factor, Nef) 的表达均可以促进外泌体通过上述直接途径从T细胞中被释放出来^[9]。

近年来, 不同类型的外泌体已被证实可以应用于阿尔茨海默病、帕金森病以及心肌梗死等疾病的治疗^[10-11]。而乳汁来源外泌体具有获取成本低、更易被消化道吸收等特点, 在疾病治疗领域具有巨大的潜力, 可应用于靶向递送外源性分子治疗疾病、天然外泌体直接用于疾病治疗等方面。乳汁来源外泌体在疾病治疗方面的应用, 最受关注的研究对象是牛乳来源外泌体, 近年来的研究极大推动了牛乳来源外泌体在疾病治疗领域的发展^[12-16]。除牛乳来源外泌体外, 羊乳与猪乳来源的外泌体也得到了一定程度上的研究与应用^[17-19]。

磷酸化是蛋白质的一种重要的翻译后修饰, 在真核细胞中, 磷酸化修饰主要发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基。蛋白质的磷酸化对信号转导、基因表达和细胞间通讯等活动起到关键的调控作用。同时, 磷酸化修饰也是深入研究各种疾病的切入点与突破口, 对于治疗癌症等重大疾病的研究有着重要的指导意义^[20]。到目前为止, 针对外泌体中蛋白质的分析大多集中在全蛋白质组学层面, 磷酸化修饰方面的研究基本都集中在尿液、血液等体液来源的外泌体。Gonzales等^[21]针对人尿液外泌体的全蛋白质组学与磷酸化蛋白质组学开展了全面分析, 从中鉴定到14种磷酸化蛋白质与16个磷酸化位点, 其中有8个位点是新发现的。Iliuk等^[22]对人血浆内细胞外囊泡 (包括外泌体与微泡, 简称EVs) 中的磷酸化蛋白质进行鉴定, 从1 ml血浆样品中鉴定到近1 600种磷酸化蛋白质。此外Iliuk等^[22]还对患有肾相关疾病患者血浆中的EVs进行了上述组学分析, 发现数十种在患病与健康组之间具有显著差异的磷酸化蛋白质, 有潜力作为肾病标记物用于疾病诊断、靶向治疗等领域。

与其他类型的外泌体相比, 乳汁来源外泌体具有易被消化道充分吸收和易获取的优势。目前对于乳汁外泌体的蛋白质组学研究较少, Yang等^[23]利

用iTRAQ蛋白质组学结合LC-MS/MS对人、牛初乳和成熟乳样品中外泌体的比较蛋白质组学分析, 鉴定到575种差异表达外泌体蛋白, 这些蛋白质参与了几种京都基因和基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 途径, 表明人和牛乳汁样品中存在许多差异表达的外泌体蛋白, 这些蛋白质可能具有不同的生物学功能。同年, 另一项研究也针对泌乳期不同阶段的牛奶外泌体进行了定量蛋白质组学分析^[24], 功能富集分析显示, 初乳外泌体可能含有调节免疫反应和生长的蛋白质, 强调了初乳外泌体的重要性。本研究针对不同物种乳汁来源外泌体进行蛋白质组学及其磷酸化蛋白质组学全面分析和对比, 发现牛乳来源外泌体蛋白质主要在吞噬作用通路富集, 其中糖基化依赖的细胞黏附因子I (P80195) 具有5个磷酸化修饰位点, 可识别相同的蛋白质并与之结合, 表明其有望成为外泌体识别靶细胞或是装载药物分子的关键蛋白质。羊乳外泌体中发现了15种与参与长时程抑制 (long-term depression, LTD) 有关的蛋白质以及与适应性免疫密切相关的C型凝集素受体信号通路, 表明其有望成为与神经及免疫疾病的相关工具。在猪乳外泌体样品中鉴定到与机体免疫密切相关的白细胞跨内皮迁移这一显著富集通路, 其中紧密连接蛋白Claudin-3 (C3VPJ5) 是人体正常组织中紧密连接最重要的一种蛋白质, 存在多个磷酸化位点, 表明猪乳来源外泌体所含蛋白质参与多个生命活动的正/负调控。本研究将为不同来源外泌体在疾病靶向治疗和载药方面的应用提供理论依据, 对利用外泌体进行疾病治疗的推广具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尿素、碳酸氢钠、乙醇、二硫苏糖醇、碘乙酸铵、甲醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸、乙二胺四乙酸、抗蛋白酶肽、亮抑蛋白酶肽、苯甲磺酰氟 (PMSF)、氟化钠、氯化铁、磷酸酶抑制剂、O-(2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖亚氨基)-N-苯基氨基甲酸酯 (PUGNAc) 等试剂购自Sigma-Aldrich公司; 氢氧化钠、氯化钠等购自国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白酶购自Promega公司; Ni-NTA琼脂糖凝珠、10 ku超滤管购自Millipore公司; BCA蛋白质检测试剂盒购自碧云天公司; C18柱 (Sep-Pak 1cc) 购自Waters公司; CDS C-18 HD SPE 47mm Disks购自3M公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牛乳、羊乳、猪乳来源乳汁外泌体的提取与表征

从当地牧场收集新鲜的健康牛、羊、猪的乳汁, 样品均为超过50头动物乳汁混样, 8 000 r/min离心2 min后对样品进行均质化处理, 再以9 000 r/min离心30 min去除脂肪, 取上清加入等体积超纯水, 用2 mol/L盐酸调pH至等电点用于去除主要杂质酪蛋白(牛乳 $pI=4.6$ 、羊乳 $pI=4.1$ 、猪乳 $pI=4.6$), 加入终浓度为0.125 mol/L的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 搅拌15 min后, 于18°C 12 500 r/min离心1 h取上清, 上清液经0.22 μm 水系滤膜过滤后再于4°C 36 200 r/min离心1 h, 得到的上层溶液为不含外泌体的乳清, 下层沉淀经无菌预冷处理的PBS溶液清洗3次, 重悬于1 ml PBS溶液, 即提取得到外泌体样品。通过透射电镜(transmission electron microscope, TEM)对其进行可视化观察, 负染时, 将2.5 μl 纯化的外泌体滴入发光碳包覆的铜网, 用蒸馏水洗涤后, 新配制的2.0%醋酸铀酰水悬浮液染色, 使用H-7650透射电子显微镜(日本日立)扫描拍摄。再利用纳米粒度仪对外泌体样品进行纳米粒径与Zeta电位检测, 对其进行表征。

1.2.2 乳汁乳清蛋白的提取

向超速离心得到的上清液乳清中加入等体积乙醇, 置于-20°C冷却40 min后, 9 000 r/min, 离心10 min, 收集沉淀-80°C放置10 min待其凝固, 之后将沉淀的乳清蛋白冻干成粉状固体。

1.2.3 乳汁来源外泌体蛋白与乳清蛋白样品的还原烷基化与酶切

分别取外泌体和乳清蛋白样品, 加入等体积裂解液(8 mol/L尿素, 75 mmol/L NaCl, 1 mol/L NH_4HCO_3 , 1 mmol/L EDTA, 2 mg/L抑蛋白酶多肽(aprotinin), 10 mg/L亮抑酶肽(leupeprin), 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L蛋白酶抑制剂混合液2(PIC2), 1 mmol/L PIC3, 20 $\mu\text{mol/L}$ PUGNAc, 超声混匀后低温保存), 混匀后于10 ku超滤管, 12 000 r/min离心5 min使裂解得到的蛋白质吸附在超滤管膜上, 加入DTT(100 mmol/L, 样品体积的1%), 置于37°C摇床中孵育1 h, 反应结束后加入碘乙酰胺(200 mmol/L, 样品体积的1%), 避光反应45 min; 12 000 r/min离心5 min后, 加入0.1 mol/L NH_4HCO_3 使原裂解液中含有的尿素终浓度稀释为1 mmol/L, 调pH至

8.5, 按样品质量: 酶质量=50:1加入胰蛋白酶, 37°C孵育12 h, 孵育结束后加入剩余量胰蛋白酶(样品质量: 酶质量终比例=40:1), 反应4 h。反应结束后离心2~3次将下清液中的肽段收集。

1.2.4 多肽样品的除盐

除盐前测定总肽段浓度, 用三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)将pH调至3, 向层析柱依次加入乙腈、0.1% TFA/80%乙腈(acetonitrile, ACN)和0.1% TFA各3 ml活化层析柱, 随后向体系中加入1 ml肽段样品, 收集流出液, 重复上样3~4次。加入3 ml 0.1% TFA和1 ml 1%甲酸(formic acid, FA), 用于除去盐离子。再加入400~1 000 μl 0.1% FA/50% ACN, 收集下清液即为除盐后的肽段, 测定浓度并冻干。

1.2.5 磷酸化肽段的富集

将Ni-NTA琼脂糖凝珠用蒸馏水清洗后, 加入100 mmol/L EDTA, 4°C孵育1 h后, 去上清液, 蒸馏水清洗。加入与EDTA等体积的10 mmol/L FeCl_3 溶液, 4°C孵育30 min, 1 000g离心清洗。最后溶于乙腈、甲醇、0.01%乙酸等体积的混合溶液。向冻干样品中加入200 μl 80% ACN/0.1% TFA使样品完全溶解, 再加入上述 Fe^{3+} -NTA琼脂糖凝珠, 4°C孵育, 离心, 上清液即完整总肽段(用于进行全蛋白质组学分析)。0.1% TFA水重悬样品, 上样至C18-tips柱, 去流出液。再按顺序分别用80% ACN/0.1% FA、1% FA清洗两次, 洗脱液(50% ACN/0.1% FA), 流出液即为磷酸化肽段, 测定浓度并冻干。

1.2.6 液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)条件

将完整总肽段和磷酸化肽段分别重悬并调节浓度至0.5 g/L, 使用EASY-nLC 1200串联高分辨率Orbitrap Fusion Lumos质谱仪进行分析。

(a) 完整总肽段

流动相用水、0.1% FA (A) 和90% ACN (B) 梯度洗脱。具体条件为: 3%~8% B, 0~8 min; 8%~28% B, 9~88 min; 28%~32% B, 89~110 min; 32%~80% B, 111~115 min; 80% B, 116~120 min。流速450 nl/min, 一级质谱参数: 在350~2 000 m/z 范围内以60 000分辨率进行收集, AGC目标 4×10^5 , 离子最大注入时间50 ms, 电荷数2~6, 质量容忍度 ± 10.00 ppm, 数据依赖性采集, 依赖扫描数量20。二级质谱参数: 离子碎裂模式被设置为HCD, 分辨率30 000, 碰撞能量34%, 阶梯碰撞能量 $\pm 5.00\%$, AGC目标 5×10^4 , 最大注入时间为35 ms。

(b) 磷酸化修饰肽段

流动相用水 (A), 0.1% FA 和 90% ACN (B) 梯度洗脱。具体条件为: 2%~22% B, 88 min; 22%~32% B, 22 min; 32%~80% B, 5 min; 80% B, 5 min。流速保持在 550 nl/min。一级质谱的参数设置如下: 在 350~1 550 m/z 范围内以 60 000 的分辨率进行收集, AGC 目标为 4×10^5 , 离子最大注入时间为 50 ms, 电荷数 2~6, 质量容忍度 ± 10.00 ppm, 数据依赖性采集, 依赖扫描数量 20。二级质谱参数: 离子碎裂模式 HCD, 分辨率 30 000, 碰撞能量 32%, 阶梯碰撞能量 $\pm 5.00\%$, AGC 目标 5×10^4 , 离子最大注入时间 35 ms。

1.2.7 全蛋白质和磷酸化修饰蛋白质的鉴定

对于完整总肽段和磷酸化肽段使用 MaxQuant 软件^[25] 搜索获得的谱图, 使用 2022 年 2 月更新的 Bos taurus/Sus scrofa/Capra hircus UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行搜库处理。搜库的参数设置为默认值, 酶切方法被设置为胰蛋白酶/P (Arg 或 Lys 的 C 端允许在脯氨酸键处断裂), 另外被遗漏的酶切位点的最大数量被设置为两个。脲甲基化 (carbamidomethyl) (C, 43.028) 被设定为固定修饰。脱酰胺基作用 (deamidation) (N, 29.018) 和磷酸化作用 (phosphorylation) (S/T/Y, 97.977) 被设置为可变修饰。在 Revert mode 下使用 Target-decoy 方法鉴定蛋白质和肽段, 并使用集成到 MaxQuant 环境中的 Andromeda 搜索引擎进行

匹配。搜库时, 片段离子的分子质量容忍度为 0.02 u, 母离子容忍度为 10.0 ppm。蛋白质基团、全肽段和磷酸化肽段的错误发现率 (FDR) 被设置为小于 0.01。每个磷酸化位点的定位信概率被设置为大于 0.75, 即 1 类磷酸化位点。使用强度值数据 (提取离子色谱的峰面积) 进行定量分析。

1.3 实验数据处理与可视化

处理牛乳、羊乳与猪乳来源外泌体与乳清样品的质谱谱图与原始数据, 除了其中以 CON 或 REV 开头的非样品所含蛋白质, 筛选 Q -Value 小于 0.05 且 Score 值大于 0 的蛋白质, 将其认定为高质量蛋白质, 可以用于 Label free 全蛋白质组学与磷酸化蛋白组学数据的定性分析。使用 Excel 软件对数据进行整理与统计分析, 对已鉴定到的全蛋白质和磷酸化修饰蛋白质以及磷酸化修饰位点等数量信息进行整合与统计。使用 Omicstudio (<https://www.omicstudio.cn/tool>), BioVenn (<http://www.biovenn.nl>) 与 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 等生物信息学工具对上述数据进行不同的定性分析与图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 不同来源乳汁外泌体表征

根据外泌体提取步骤, 分别得到猪乳、羊乳和牛乳的外泌体后, 用透射电镜和纳米粒度仪对提取获得的外泌体进行表征分析 (图 1)。透射电镜结果显示, 存在多个圆形囊泡样颗粒 (图 1a~c)。纳

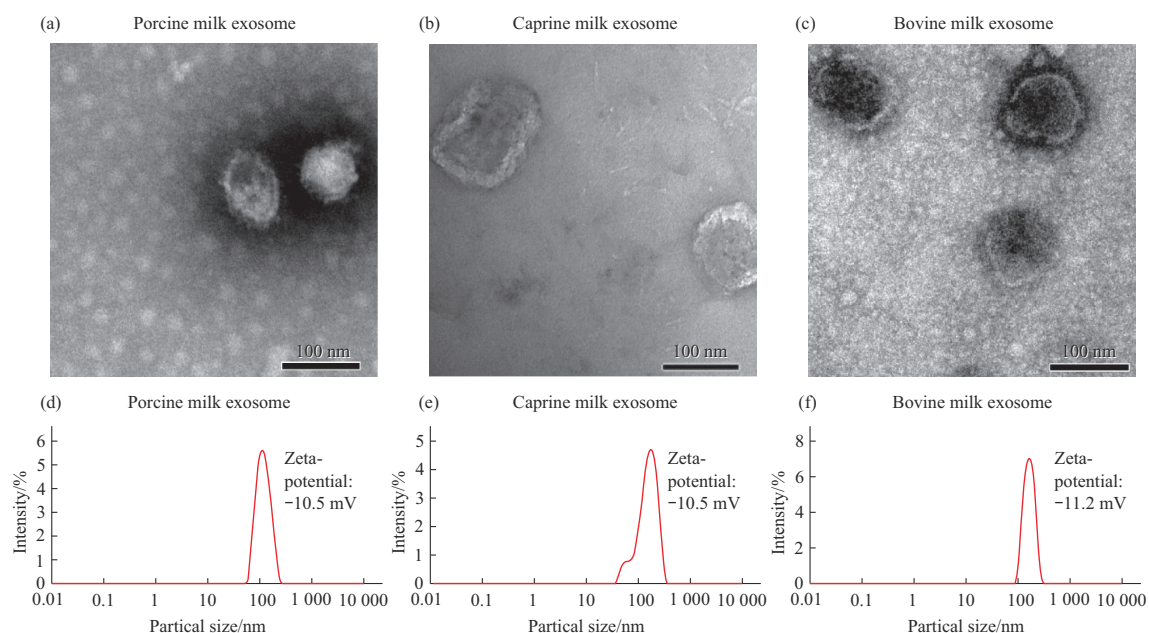


Fig. 1 Characterization of milk exosomes from different species

(a-c) TEM images and average size of milk exosomes from porcine, caprine and bovine. (d-f) The average partical size and Zeta potential of milk exosomes from different species.

米粒度仪分析结果显示 (图 1d~f), 3 种不同来源乳汁外泌体的平均直径分别为 110.1 nm (Zeta 电位 -10.5 mV)、131.2 nm (Zeta 电位 -10.5 mV) 和 148 nm (Zeta 电位 -11.2 mV), 符合外泌体定义的大小范围, 并与刚发表的研究结果一致 [26]。

2.2 不同来源乳汁外泌体和乳清蛋白质组差异分布

乳汁来源的外泌体在疾病治疗方面有着较好的应用前景, 目前牛乳来源外泌体应用最为广泛。因此, 分析比较不同物种来源的乳汁外泌体及其内容物成分, 可为外泌体的进一步的应用提供依据。对牛乳、羊乳和猪乳样品进行非标记全蛋白质组学研

究, 结果显示, 乳汁中蛋白质种类丰富, 且不同乳汁来源外泌体中蛋白质种类均大于乳清中的蛋白质种类, 如牛乳外泌体共鉴定蛋白质 1 379 种, 牛乳清中共鉴定蛋白质 314 种 (图 2)。同物种的外泌体与乳清对比发现, 其同时出现的蛋白质占蛋白质总数约 20% (图 2a, b)。对仅在乳清中存在的蛋白质进行简要的统计与分析, 发现不论物种, 仅在乳清中出现的蛋白质均大量存在于细胞外空间与溶酶体, 且主要发挥调控丝氨酸型内肽酶抑制剂活性等功能。其中有多达 574 种蛋白质仅出现在牛乳来源外泌体, 另外 3 种外泌体共同存在的蛋白质有 144 种 (图 2c), 这些蛋白质主要负责组成细胞质

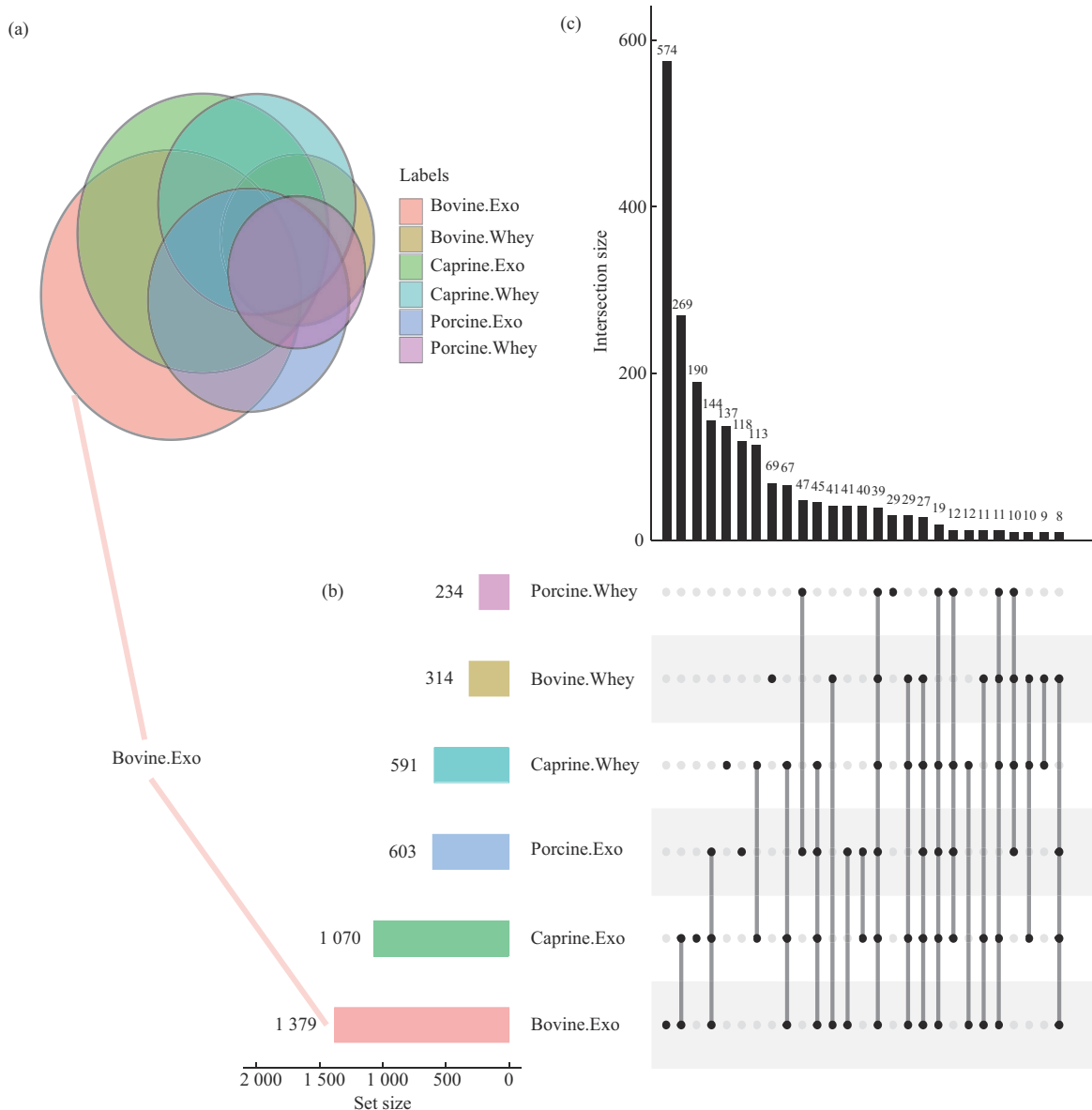


Fig. 2 Different proteins in exosomes and whey of milk from different species

Venn diagrams of identified proteins and their distribution in different milk-derived exosomes and whey. Pink: bovine exosome; tawny: bovine whey; green: caprine exosome; light green: caprine whey; cambridge blue: porcine exosome; light purple: porcine whey.

膜与胞浆，参与外泌体组成、释放有关的生物过程 (biological process, BP)。此外在3种乳清中均鉴定到 α 葡萄糖苷酶 (GAA) 与胰岛素样生长因子II (IGF2)。

2.3 不同乳汁来源外泌体蛋白质功能差异分析

乳清的作用更多的是提供营养物质，而乳汁外泌体中蛋白质的作用主要是传递来自母亲的信号。利用基因本体 (gene ontology, GO) 和KEGG数据库针对仅在外泌体中出现的蛋白质进行功能分析

($P < 0.05$)。3种不同乳汁来源的外泌体蛋白质在分子功能方面发挥的功能相似，主要集中在改变GTP酶活、促进蛋白质与核苷酸结合等方面，与文献报道的外泌体功能分析结果一致^[23, 27]。在生物过程方面，牛羊乳外泌体蛋白质主要参与细胞内蛋白质运输 (图3a, b)，猪乳外泌体蛋白质则主要参与调控细胞质膜上蛋白质的定位过程 (图3c)。细胞成分 (cellular composition, CC) 方面，3种样品中的蛋白质绝大多数存在于细胞质与细胞膜上。

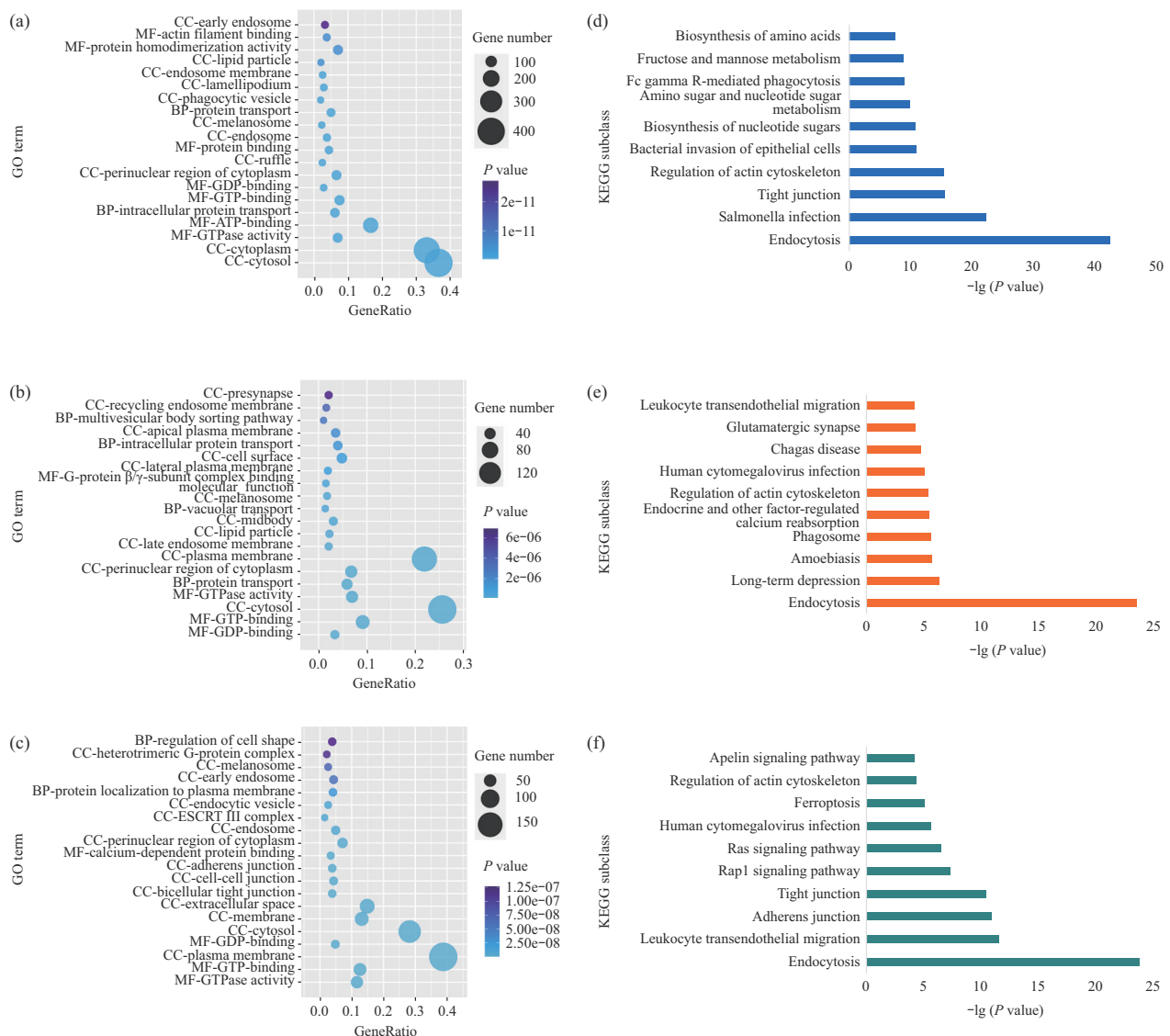


Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis of exosomal proteome from different species

(a) GO enrichment analysis of bovine milk exosome; (b) GO enrichment analysis of caprine milk exosome; (c) GO enrichment analysis of porcine milk exosome; (d) KEGG enrichment analysis of bovine milk exosome; (e) KEGG enrichment analysis of caprine milk exosome; (f) KEGG enrichment analysis of porcine milk exosome.

对不同物种外泌体蛋白质涉及的生物体内通路经KEGG富集分析发现, 这些蛋白质主要涉及细胞内吞途径(图3d~f), 该途径与囊泡形成、运输紧密相关, 对于外泌体的形成十分关键。除了参与细胞内吞途径外, 牛乳外泌体中较为显著的肌动蛋白细胞骨架调控与紧密连接通路同样促进了外泌体的形成。值得注意的是, 研究还发现, 羊乳外泌体中cGMP依赖性蛋白激酶、酪氨酸蛋白激酶等15种蛋白质参与LTD。LTD是突触可塑性的关键表现形式之一, 是调节生物体学习与记忆的基本神经机制, 目前普遍认为诱导LTD的发生有助于快速消除记忆, 原因可能是LTD可促进突触后膜表面受体数量减少。而酪氨酸蛋白激酶等分子在诱导LTD方面发挥重要作用, 针对这些分子进行药物设计抑制其表达可能有助于记忆的延长, 进而希望应用于阿尔茨海默病等疾病的定向治疗^[28]。而在近些年, LTD也被证明可以充当标记物在临床水平对早期阿尔茨海默病相关疾病进行诊断^[29]。LTD是本研究发现的唯一与神经领域有密切联系且富集显著的通路。可以认为, 与其他两种动物乳源外泌体不同的是, 羊乳外泌体在神经及相关疾病治疗领域可能具有一定的应用潜力。此外, 在猪乳外泌体样品中鉴定到了白细胞跨内皮迁移^[30]这一显著富集通路, 其与机体免疫联系紧密。

2.4 不同来源乳汁外泌体和乳清蛋白质磷酸化修饰差异分布

磷酸化作为一种重要的蛋白质翻译后修饰, 参与机体多种信号通路的转导, 与多种疾病的发生、治疗密切相关, 蛋白质组研究结果显示, 外泌体中含有大量的蛋白激酶, 说明外泌体含有大量的磷酸化蛋白质, 因此对外泌体蛋白质中的磷酸化修饰研究具有重要意义。为了分析不同乳汁来源外泌体与乳清样品的蛋白质磷酸化修饰, 本文利用Fe³⁺-NTA琼脂糖凝珠法富集磷酸化修饰肽段, 并通过高分辨率的质谱进行组学分析。从3种来源外泌体与乳清样品中共鉴定到4 064种的高质量磷酸化修饰肽段用于后续定性分析, 对应1 640种磷酸化蛋白(图4a, b)。结果显示, 外泌体中蛋白质磷酸化修饰水平高于乳清中的水平, 如牛乳外泌体中共鉴定到499个磷酸化蛋白, 同时牛乳乳清中鉴定到142个磷酸化蛋白。且不同来源的乳汁样品中蛋白质磷酸

化修饰差异显著, 3种外泌体中同时被修饰的磷酸化蛋白有46种(图4c), 这些蛋白质在细胞组成和生物过程方面与全蛋白质组学的结果类似。蛋白质的磷酸化修饰发生于多个位点是磷酸化修饰的重要特征, 不同来源乳汁外泌体所有被检测的样品中存在大量蛋白质有多个磷酸化位点(≥2个)修饰的情况, 其中牛乳外泌体中有100个多磷酸化位点蛋白质(约占总数的15.8%), 羊乳外泌体中有133个(约占20.0%), 猪乳外泌体中有176个(约占51.6%)。

对不同物种间特异性多磷酸化修饰蛋白质进行功能富集分析。GO富集结果(图5)显示, 牛乳来源外泌体中磷酸化蛋白质分子功能(molecular function, MF)、CC均与全蛋白质组学中牛乳外泌体的结果类似。而在生物过程方面, 牛乳外泌体蛋白质主要参与调节性胞吐过程, 后者可释放囊泡中的生物分子, 完成细胞间通讯, 而调节性胞吐又包括至少3种不同的胞吐机制, 分别为完全胞吐、复合胞吐与kiss-and-run胞吐^[31]。针对羊乳来源外泌体, 研究发现, 部分蛋白质的细胞组成为谷氨酸能突触, 在神经领域发挥重要功能。此外, 在生物过程方面大多数蛋白质参与JNK级联通路的正调控。该通路在细胞凋亡中起到至关重要的作用, 通过对JNK通路的正向调控, JNK信号蛋白活化, 启动细胞凋亡程序^[32]。而在猪乳样品中, 外泌体蛋白质的细胞组成、分子功能与生物过程均与细胞间的黏附、结合、定位有关。令人欣喜的是, 我们发现部分蛋白质对维持血脑屏障通透性具有正向调控作用。考虑到血脑屏障可以阻挡几乎所有的大、小分子药物进入中枢神经系统发挥作用, 因此猪乳外泌体可以为中枢药物的研发与递送提供新的思路: 一方面, 该外泌体可以与大、小分子药物结合, 实现药物的递送与释放, 另一方面, 该外泌体自身携带的蛋白质可以正向调控血脑屏障的通透性, 加大药物在中枢神经系统中的暴露量, 实现药物从递送到释放一体化。这将会为中枢神经系统疾病治疗提供全新的思路与方案。

不同物种间特异性多磷酸化修饰蛋白质通路分析(KEGG)发现, 牛乳来源外泌体磷酸化蛋白质主要特异性富集在两个通路(图6a), 分别是胰岛素信号通路和AMPK信号通路。羊乳外泌体样品

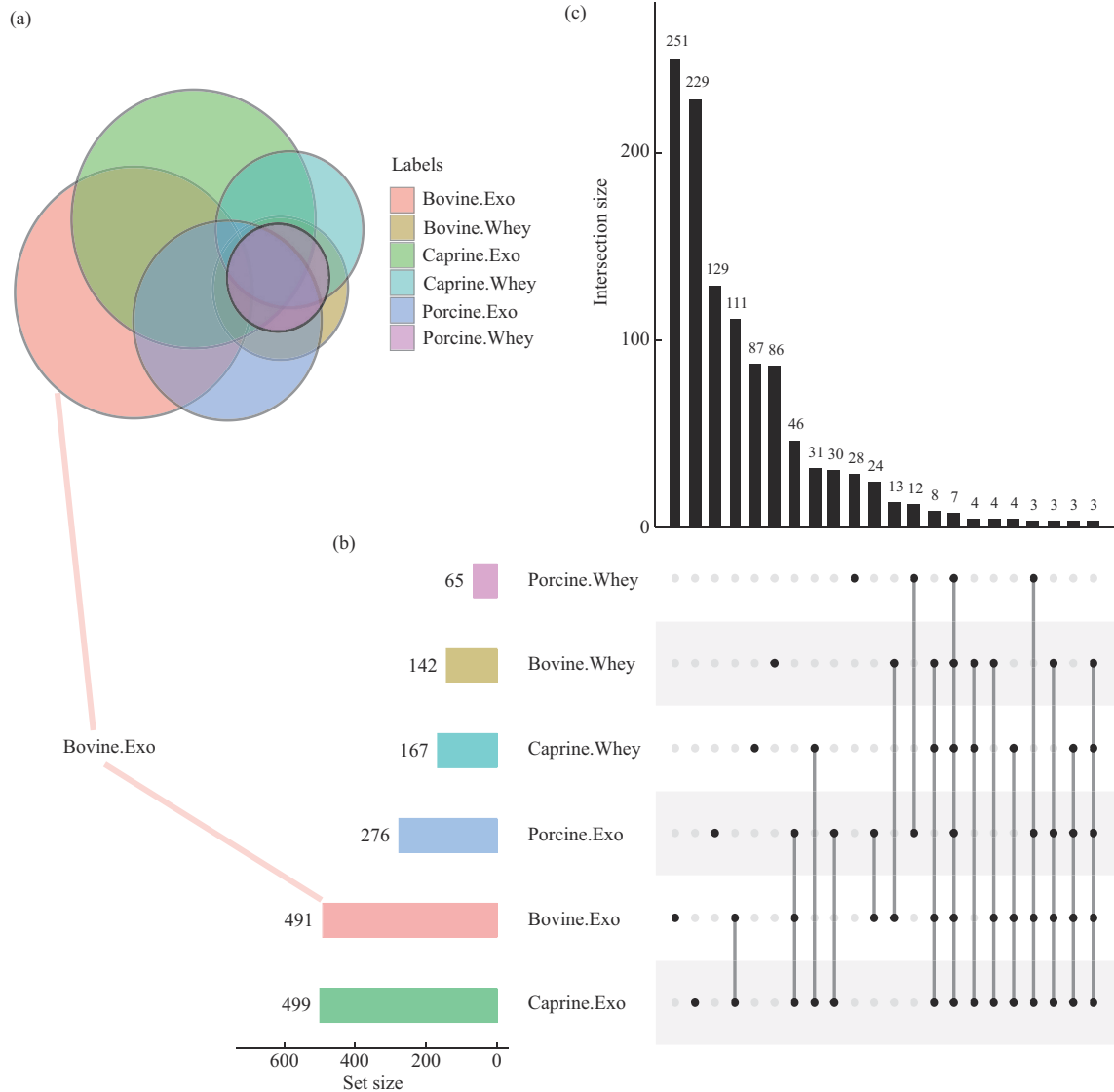


Fig. 4 Different phosphoproteins in exosomes and whey of milk from different species

Venn diagrams of identified phosphoproteins and their distribution in different milk-derived exosomes and whey. Pink: bovine exosome; tawny: bovine whey; green: caprine exosome; light green: caprine whey; cambridge blue: porcine exosome; light purple: porcine whey.

富集结果中值得关注的是C型凝集素受体信号通路(图6b), 其与适应性免疫密切相关^[33]。猪乳外泌体样品富集结果(图6c)与蛋白质组分析结果类似。除此之外, 牛乳外泌体中的糖基化依赖的细胞黏附因子I(P80195)多达5个磷酸化修饰位点, 该蛋白质主要功能为识别相同的蛋白质并与其结合, 表明P80195有望通过改造成为外泌体识别靶细胞或是装载药物分子的关键蛋白质。此外, 在牛乳与羊乳外泌体中的磷酸化蛋白质 Prominin 2 同样

有5个磷酸化位点被修饰, 该蛋白质是一种铁应激反应蛋白, 主要帮助外泌体等囊泡结构快速形成, 后者则通过促进铁运输帮助细胞抵抗铁死亡效应, 进而防止肿瘤细胞受铁死亡效应而凋亡^[34]。而在猪乳外泌体中, 紧密连接蛋白 Claudin-3(C3VPJ5)同样存在多个磷酸化位点, 该蛋白质是人体正常组织中紧密连接最重要的一种蛋白质, 具有多种亚型^[35], 其中 Claudin-18.2 是目前非常热门的癌症治疗靶点, 相关的药物也已获批进入临床阶段^[36-37]。

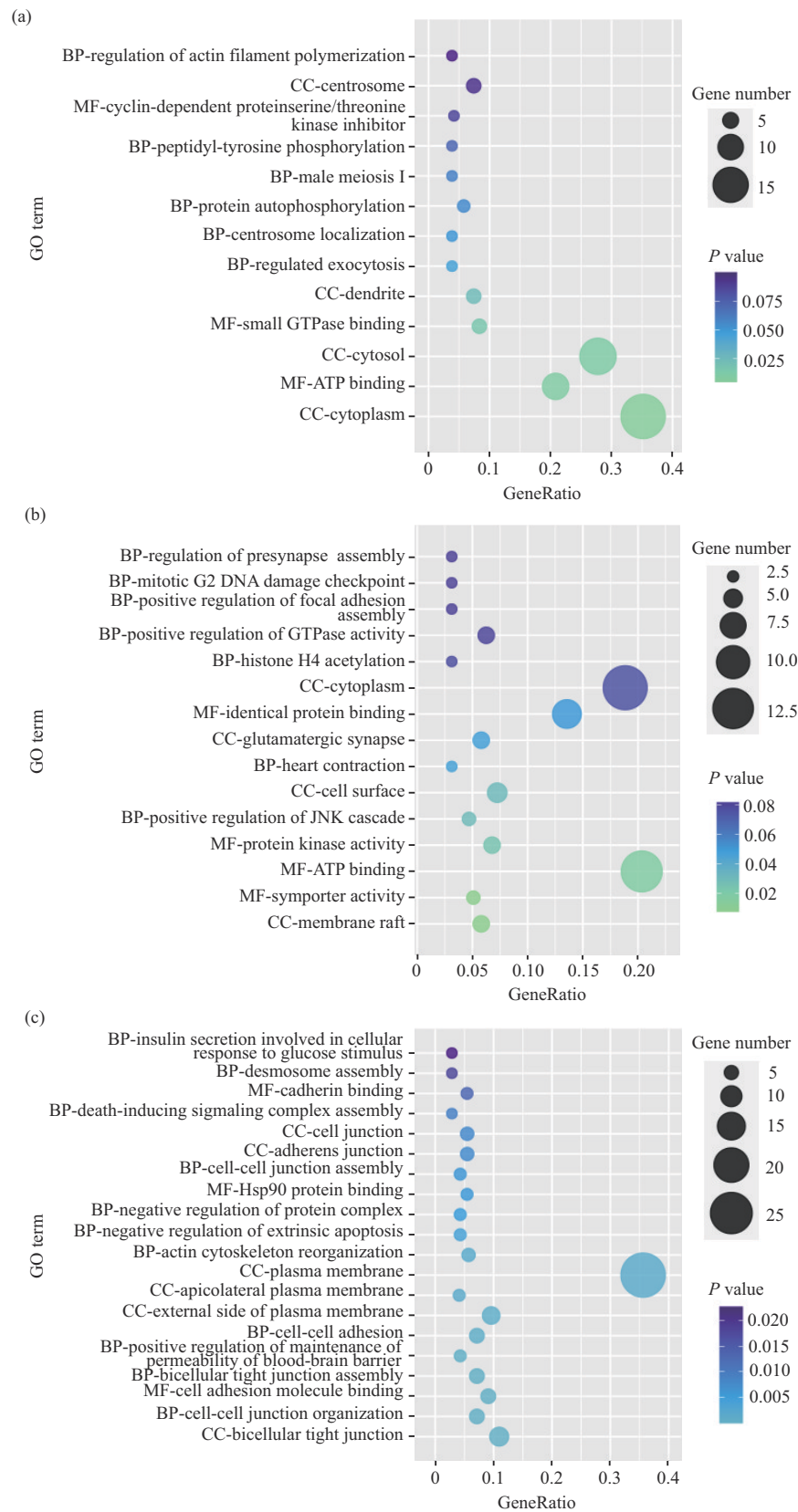


Fig. 5 GO enrichment analysis of exosome-specific multisite phosphorylated proteins from different species

(a) GO enrichment analysis of bovine milk exosome; (b) GO enrichment analysis of caprine milk exosome; (c) GO enrichment analysis of porcine milk exosome.

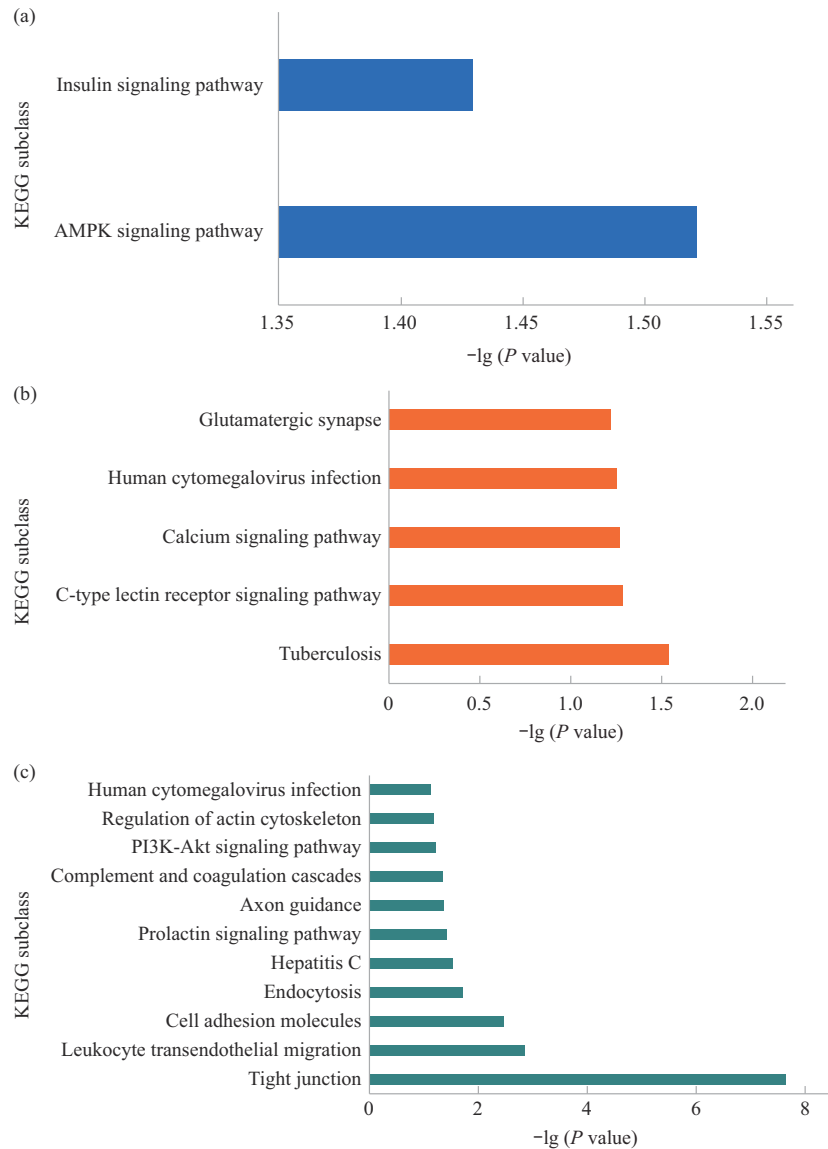


Fig. 6 KEGG enrichment analysis of exosome-specific multisite phosphorylated proteins from different species

(a) KEGG enrichment analysis of bovine milk exosome; (b) KEGG enrichment analysis of caprine milk exosome; (c) KEGG enrichment analysis of porcine milk exosome.

3 结 论

本研究主要针对3种不同物种来源（牛、羊、猪）乳汁外泌体与乳清进行蛋白组学和磷酸化蛋白质组学深入分析。在全蛋白质组学中，乳汁外泌体中含有大量的蛋白质和磷酸化蛋白质，本文共鉴定到4 191种高质量蛋白质，1 640种磷酸化修饰蛋白质，对应到4 064个磷酸化修饰肽段，且不同乳汁来源外泌体蛋白质的功能分布相似。其中羊乳来源外泌体蛋白质主要参与LTD通路，猪乳外泌体参

与维持血脑屏障通透性的正调控。不同来源外泌体的蛋白质组与磷酸化蛋白质组研究有利于揭示可用于临床治疗外泌体和靶向载药的分子机制，推动外泌体治疗的应用。

参 考 文 献

- [1] Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, *et al.* Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1820**(7): 940-948

- [2] Adriano B, Cotto N M, Chauhan N, *et al.* Milk exosomes: nature's abundant nanoplatform for theranostic applications. *Bioact Mater*, 2021, **6**(8): 2479-2490
- [3] 张敏, 张晨光, 丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义. *生理科学进展*, 2014, **45**(5): 372-378
Zhang M, Zhang C G, Ding W. *EProg Physiol Sci*, 2014, **45**(5): 372-378
- [4] 王含必, 邓成艳. 外泌体的生物功能及临床应用潜能. *生殖医学杂志*, 2021, **30**(7): 966-970
Wang B H, Deng C Y. *J Reprod Med*, 2021, **30**(7): 966-970
- [5] 仝令君, 郝海宁, 张兰威, 等. 乳源外泌体的组成及其生物功能研究进展. *食品科学*, 2020, **41**(13): 310-317
Tong L J, Hao H N, Zhang L W, *et al.* *Food Sci*, 2020, **41**(13): 310-317
- [6] Zempleni J, Aguilar-Lozano A, Sadri M, *et al.* Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *J Nutr*, 2017, **147**(1): 3-10
- [7] Zempleni J, Sukreet S, Fang Z, *et al.* Milk-derived exosomes and metabolic regulation. *Annu Rev Anim Biosci*, 2019, **7**(1): 245-262
- [8] Fang Y, Wu N, Gan X, *et al.* Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol*, 2007, **5**(6): e158
- [9] Lenassi M, Cagney G, Liao M, *et al.* HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic*, 2010, **11**(1): 110-122
- [10] 铁岩, 李潇, 杨鑫伟, 等. 外泌体对神经系统疾病的作用研究进展. *医学研究杂志*, 2021, **50**(6): 158-160+176
Tie Y, Li X, Yang X W, *et al.* *J Med Res*, 2021, **50**(6): 158-160+176
- [11] 王红, 井玲. 关于外泌体在心血管疾病中作用研究的进展. *心血管康复医学杂志*, 2022, **31**(1): 74-77
Wang H, Jin L. *Clin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2022, **31**(1): 74-77
- [12] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, *et al.* Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*, 2016, **371**(1): 48-61
- [13] González-Sarriás A, Iglesias-Aguirre C E, Cortés-Martín A, *et al.* Milk-derived exosomes as nanocarriers to deliver curcumin and resveratrol in breast tissue and enhance their anticancer activity. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(5): 2860
- [14] Kim G Y, Y Lee, Ha J, *et al.* Engineering exosomes for pulmonary delivery of peptides and drugs to inflammatory lung cells by inhalation. *J Control Release*, 2021, **330**(12): 684-695
- [15] Zhang Q, Xiao Q, Yin H, *et al.* Milk-exosome based pH/light sensitive drug system to enhance anticancer activity against oral squamous cell carcinoma. *RSC Adv*, 2020, **10**(47): 28314-28323
- [16] Yun B, Maburutse B E, Kang M, *et al.* Short communication: dietary bovine milk - derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model. *J Dairy Sci*, 2020, **103**(9): 7752-7760
- [17] 陈婷, 谢梅英, 魏立民, 等. 猪乳外泌体对猪流行性腹泻病毒的抑制作用. *生物技术通报*, 2021, **37**(12): 141-150
Chen T, Xie M Y, Wei L M, *et al.* *Biotechnol Bull*, 2021, **37**(12): 141-150
- [18] Xie M Y, Chen T, Xi Q Y, *et al.* Porcine milk exosome miRNAs protect intestinal epithelial cells against deoxynivalenol-induced damage. *Biochem Pharmacol*, 2020, **175**(1): 113898
- [19] Ahmed F, Tamma M, Pathigadapa U, *et al.* Drug loading and functional efficacy of cow, buffalo, and goat milk-derived exosomes: a comparative study. *Mol Pharm*, 2022, **19**(3): 763-774
- [20] 姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展. *生物技术通讯*, 2009, **20**(2): 233-237
Jiang Z, Wang F, He X, *et al.* *Lett Biotechnol*, 2009, **20**(2): 233-237
- [21] Gonzales P A, Pisitkun T, Hoffert J D, *et al.* Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*, 2009, **20**(2): 363-379
- [22] Iliuk A, Wu X, Li L, *et al.* Plasma-derived EV phosphoproteomics through chemical affinity purification. *J Proteome Res*, 2020, **19**(7): 2563-2574
- [23] Yang M, Song D, Cao X, *et al.* Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food Res Int*, 2017, **92**(1): 17-25
- [24] Samuel M, Chisanga D, Liem M, *et al.* Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 5933
- [25] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(12): 1367-1372
- [26] Wang X Y, Li H J, Wang Z B, *et al.* Site- and structure-specific glycosylation signatures of bovine, caprine, porcine, and human milk-derived extracellular vesicles. *J Agric Food Chem*, 2023, **71**(51): 20826-20837
- [27] Vaswani K M, Peiris H, Koh Y Q, *et al.* A complete proteomic profile of human and bovine milk exosomes by liquid chromatography mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*, 2021, **18**(8): 719-735
- [28] 占祖兵, 杜严华. 长时程抑制在学习记忆中的作用及其分子机制的研究进展. *生物物理学报*, 2004, **20**(5): 337-343
Zhan Z B, Du Y H. *Acta Biophys Sin*, 2004, **20**(5): 337-343
- [29] Ahmed T, Blum D, Burnouf S, *et al.* Rescue of impaired late-phase LTD in a tau transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, 2015, **36**(2): 730-739
- [30] Renkawitz J, Kopf A, Stopp J. *et al.* Nuclear positioning facilitates amoeboid migration along the path of least resistance. *Nature*, 2019, **568**(7753): 546-550
- [31] Klein O, Roded A, Hirschberg K, *et al.* Imaging FITC-dextran as a reporter for regulated exocytosis. *J Vis Exp*, 2018, **1**(136): 57936
- [32] Detian Y, Shan H, Emanuel B, *et al.* Kupffer cell-derived Tnf triggers cholangiocellular tumorigenesis through JNK due to chronic mitochondrial dysfunction and ROS. *Cancer Cell*, 2017, **31**(6): 771-789
- [33] 杨芸宁, 徐媛媛, 龙珊, 等. C型凝集素受体在肿瘤免疫作用中

- 的研究进展. 中国免疫学杂志, 2019, **35**(9): 1139-1142
- Yang Y N, Xu Y Y, Long S, *et al.* Chin J Immunol, 2019, **35**(9): 1139-1142
- [34] Brown C W, Amante J J, Chhoy P, *et al.* Prominin2 drives ferroptosis resistance by stimulating iron export. Dev Cell, 2019, **51**(5): 575-586
- [35] Sikora M, Chrabąszcz M, Waśkiel-Burnat A, *et al.* Claudin-3-a new intestinal integrity marker in patients with psoriasis: association with disease severity. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2019, **33**(10):1907-1912
- [36] Zhu G, Davide F, Liu X, *et al.* Targeting CLDN18.2 by CD3 bispecific and ADC modalities for the treatments of gastric and pancreatic cancer. Sci Rep, 2019, **9**(1): 8420
- [37] Lordick F, Thuss-Patience P, Bitzer M, *et al.* Immunological effects and activity of multiple doses of zolbetuximab in combination with zoledronic acid and interleukin-2 in a phase 1 study in patients with advanced gastric and gastroesophageal junction cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2023, **149**(9): 5937-5950

Comprehensive Analysis of Proteins and Their Phosphorylation in Milk-derived Exosomes From Different Species*

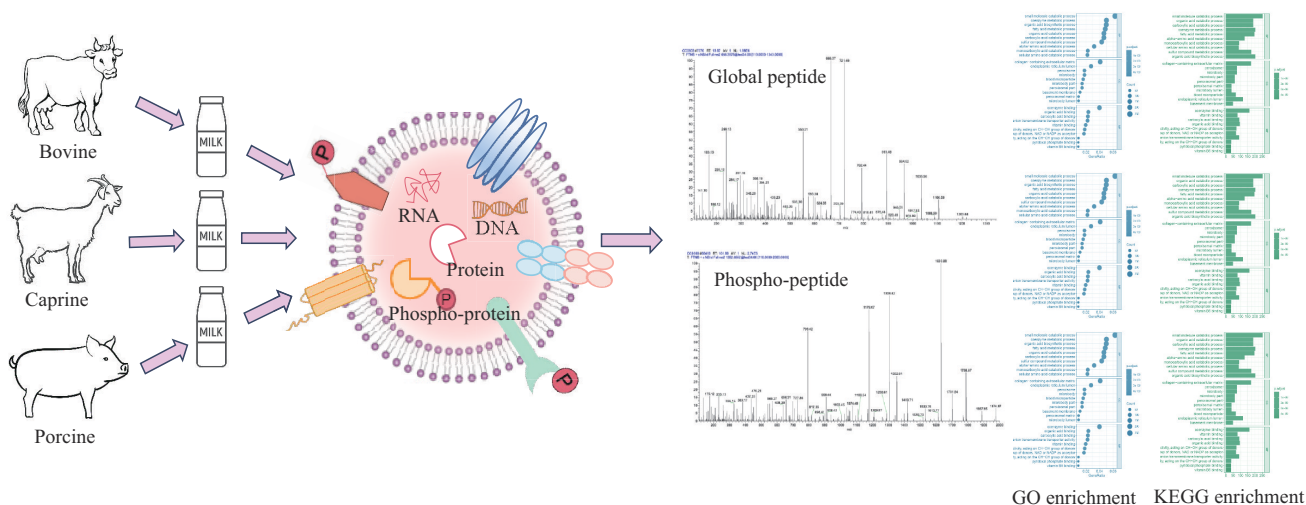
LIU Chang-Mei^{1,2)}, HU Yi-Fan¹⁾, CHEN Wen-Yan¹⁾, LIU Dan³⁾, SHI Jie^{1,2)}, YANG Gang-Long^{1)**}

¹⁾School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²⁾The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

³⁾Institute of Chinese Medicine, Neijiang Academy of Agricultural Sciences, Neijiang 641000, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Exosomes are microvesicles which could be secreted by all cell types with diameters between 30 and 150 nm. It was widely distributed in body fluids including blood, urine, and breast milk. Exosomes are considered as potential biomarkers and drug carriers by reason of containing nucleic acids, lipids, proteins and other bioactive molecules. Milk-derived exosomes have been widely used as drug delivery carriers to treat targeted diseases with a lower cost, higher biocompatibility and lower immunogenicity. Until now, there is no research about the milk-derived exosomes phosphorylation to reveal the difference of protein phosphorylation in different species of milk. To investigate the pathways and proteins with specific functions, phosphorylated proteomic analysis of milk-derived exosomes from different species is performed, and provide new ideas for exploring diversified treatments of disease. **Methods** Whey and exosomes derived from bovine, porcine and caprine milk were performed for proteomics and phosphoproteomics analysis. The relationship between milk exosome proteins from different species and signaling pathways were analyzed using bioinformatics tools.

* This work was supported by a grant from Jiangsu Key Research and Development Plan (BE2023682).

** Corresponding author.

Tel: 86-510-85916667, E-mail: glyanglife@jiangnan.edu.cn

Received: November 6, 2023 Accepted: February 7, 2024

Results A total of 4 191 global proteins, 1 640 phosphoproteins and 4 064 phosphosites were identified from 3 species of milk-derived exosomes, and the exosome proteins and phosphoproteins from different species were significantly higher than those of whey. Meanwhile, some special pathways were enriched like Fc γ -mediated phagocytosis from bovine exosomes, pathways related with neural and immune system from caprine exosomes, positive and negative regulation of multiple activities from porcine exosomes. **Conclusion** In this study, the proteomic and phosphoproteomic analyses of exosomes and whey from bovine, porcine and caprine milk were carried out to reveal the difference of composition and related signaling pathways of milk exosome from different species. These results provided powerful support for the application of exosomes from different milk sources in the field of disease treatment.

Key words milk-derived exosomes, mass spectrometry, proteomics, phosphoproteomics

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0433