

四氧嘧啶导致小鼠肝脏损伤相关肝脏 差异蛋白的研究

刘安军, 孟艳丽, 曹东旭, 王维君

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 目的: 用更为简便的蛋白提取方法提取小鼠肝脏蛋白, 寻找四氧嘧啶导致小鼠肝脏损伤差异表达蛋白质, 为四氧嘧啶损伤肝脏的机理研究提供理论基础, 为保肝药物研究提供理论依据。方法: 将小鼠随机分成正常组、模型组, 给模型组腹腔注射四氧嘧啶, 同时给正常组注射等量生理盐水; 小鼠处死后对肝脏进行外观和组织学观察。采用不同浓度丙酮分级沉淀肝脏蛋白, 用SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(SDS-PAGE)实验寻找正常组和模型组的差异表达蛋白质, 进一步以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测差异蛋白的肽质量指纹, 在蛋白质数据库中检索鉴定差异蛋白的种类。结论: 正常组和模型组的水溶性总蛋白和非水溶性总蛋白均有差异表达的蛋白质分子。选取水溶性蛋白50%丙酮沉淀中某一差异蛋白条带进行肽指纹图谱鉴定, 检索结果为一未命名蛋白质。

关键词: 四氧嘧啶; 肝损伤; 差异蛋白表达

中图分类号: R575.2⁺9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0020-04

Study on Differential Expressions of Liver Tissue Proteins in the Alloxan-Induced Hepatic Injury in Mice

LIU An-jun, MENG Yan-li, CAO Dong-xu, WANG Wei-jun

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective: To research the differential expression of liver tissue proteins in the Alloxan-Induced hepatic injury in mice by using the simpler method to extract the proteins of liver tissue in mice and provide the theoretical study of the mechanism of alloxan-induced hepatic injury. **Methods:** The mice were divided into two groups. In the model group, the mice were injected with alloxan and in the control group they were injected with 0.9% brine. Then the liver tissues of the killed mice in the two groups were investigated on aspect and histology. Proteins in the liver tissue were deposited into different grades and the attained proteins were separated by SDS-PAGE grads electrophoresis with colloidal staining method. The differential expressions of proteins in the model group and the control group were analyzed and the peptide mass fingerprints were detected with MALDI-TOF-MS. The corresponding proteins were retrieved in Databank. **Results:** The differential depressions of proteins were found both in the water-soluble proteins and non-water-soluble proteins in the two groups. One of the differential proteins in water-solubility-protein extracted by 50% acetone was choose for further analysis and was found to be an unnamed protein.

Key words: alloxan; hepatic Injury; different expression of protein

蛋白质是极为重要而又有限的生物战略资源, 蛋白质科学与技术因此逐步成为本世纪各国争夺的重要战略点。蛋白质科学与技术是建立现代生物技术与产业的基础, 其研究成果可以广泛应用于医药、农业、工业、食品加工、环境保护以及新型资源、能源的开发与利用^[1]。其的发展必将促进医药、环境、农业等新的生物经济产业的形成和发展。肝脏作为强大的蛋

收稿日期: 2007-06-02

作者简介: 刘安军(1963-), 男, 教授, 研究方向为食品功能因子与保健机理。

白质合成器官一直成为蛋白质组学的研究热点。开展肝脏蛋白质组学研究对于肝病的预防、诊断、治疗都有重大意义^[2]。四氧嘧啶在动物体内一方面在水中自动分解产生自由基, 另一方面进入体内由于酶促或非酶促分解而产生自由基, 自由基在体内引起各种生物学反应, 亦可破坏胰腺 β 细胞, 降低胰岛素水平^[3], 因此药理实验中常用于制作衰老模型^[4]和糖尿病模型。同时自由基作用于肝脏, 使肝脏的细胞膜、线粒体膜等受损, 肝脏的丙二醛(MDA)含量上升, 肝指数下降, 从而造成肝脏损伤^[5]。然而肝脏是蛋白质代

在NCBI数据库中用Matrix Science软件进行查询。

2 结果

2.1 四氧嘧啶对小鼠体重变化影响

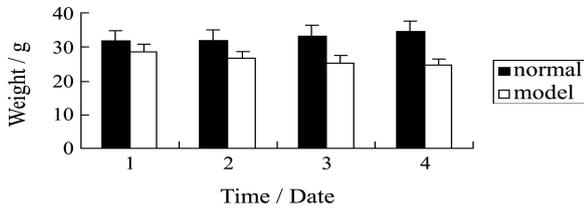


图2 四氧嘧啶对小鼠体重影响

Fig.2 The impact on weight of the mice by Alloxan

从图2知,正常小鼠未受任何影响,体重仍然上升。而给药后的小鼠体重连续下降。

2.2 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤的外形观察

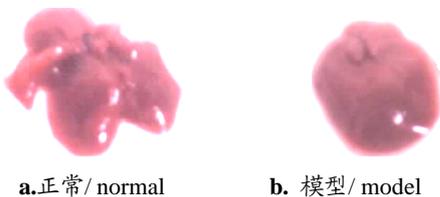


图3 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤的外形观察

Fig.3 observation on Alloxan-Induced Hepatic Injury in Mice

从图3知,正常组小鼠肝脏表面平整光滑,色泽亮呈鲜红色、质软,肝叶清晰。模型组小鼠肝脏肿大,肝小叶发生严重粘连现象,整个肝组织呈球型样变。

2.3 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤光学显微镜观察

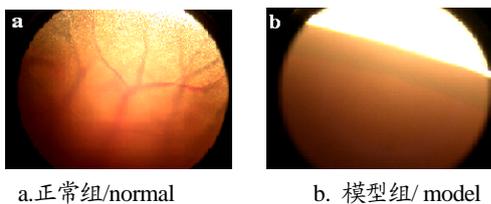


图4 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤光学显微镜观察(×40)

Fig.4 Microscope observation on Alloxan-Induced Hepatic Injury in Mice

从图4知,正常组小鼠肝脏毛细血管丰富清晰可见,模型组小鼠已不能见到毛细血管结构。

2.4 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤的组织学观察

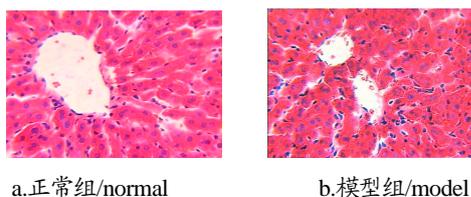


图5 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤的组织学观察(×200)

Fig.5 Histological observation on Alloxan-Induced Hepatic Injury in Mice

从图5知,正常组(a)肝细胞索排列整齐,细胞形态正常。模型组(b)中央静脉周围肝细胞皱缩变形,部分坏死,周围炎症细胞浸润,肝窦淤血。

从小鼠体重变化以及对小鼠肝脏的光学显微镜观察和切片观察可以看出模型组较正常组有明显变化,可以确定四氧嘧啶造成小鼠肝脏损伤。

2.5 四氧嘧啶处理后小鼠肝脏蛋白变化

对不同制备方法获得的蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以考察四氧嘧啶对小鼠肝脏蛋白表达的影响,结果如图6所示。

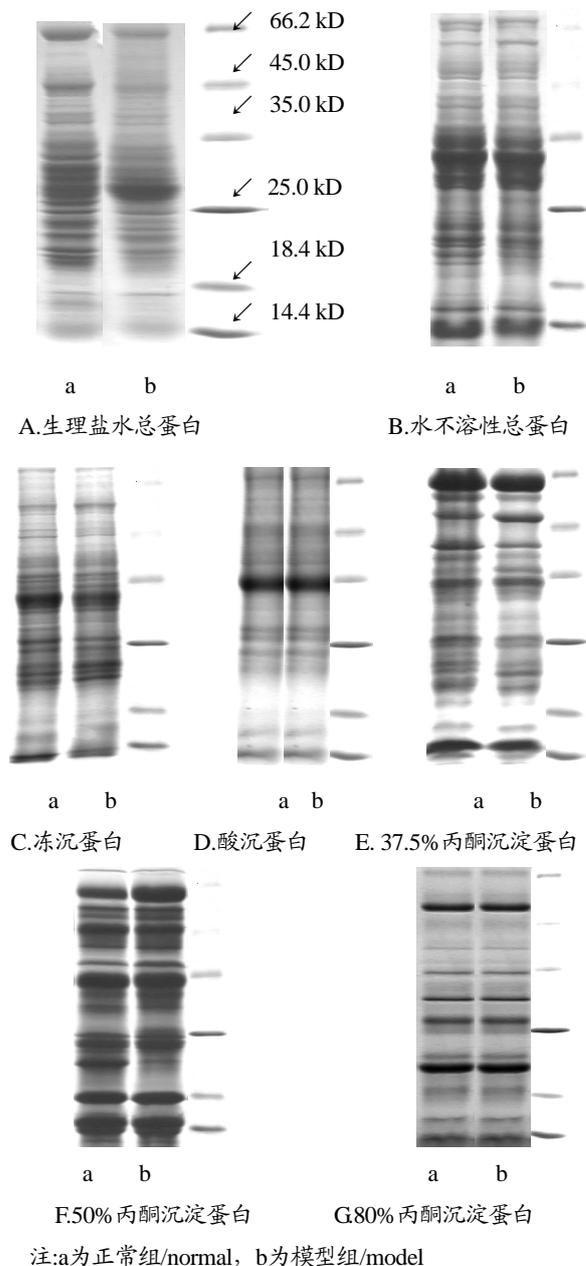


图6 四氧嘧啶处理后小鼠肝脏蛋白变化
Fig.6 differential expression of proteins in the Alloxan-Induced hepatic injury in mice

从图 6 知,与正常组相比,模型组小鼠的生理盐水提取总蛋白和水不溶性总蛋白均有明显变化。如图 6A,模型组大部分蛋白表达明显下调,分子量为 30.0 kD 左右的一部分蛋白表达升高。图 6B 模型组中由上而下第二条蛋白条带含量明显降低,分子量在 18.4~25.0 kD 的蛋白变化也比较明显。选取生理盐水总蛋白将其分级沉淀,发现图 6F 中 50%丙酮沉淀蛋白有一蛋白条带在模型组中表达下调,分子量在 21 kD 左右。

2.6 差异蛋白的肽质量指纹图谱分析

将图 6F 中 50%丙酮沉淀后模型组表达下调的蛋白条带做质谱检测,结果如图 7 所示;将所获得的肽质量指纹图谱在 NCBI 数据库检索(检索号 gi|12851568),进行肽段匹配,鉴定出该蛋白的分子量为 21033(与 SDS-PAGE 结果基本吻合),为主要尿蛋白系列(MUP)或未命名蛋白(Score 163)。经排除被确定为一未命名蛋白。

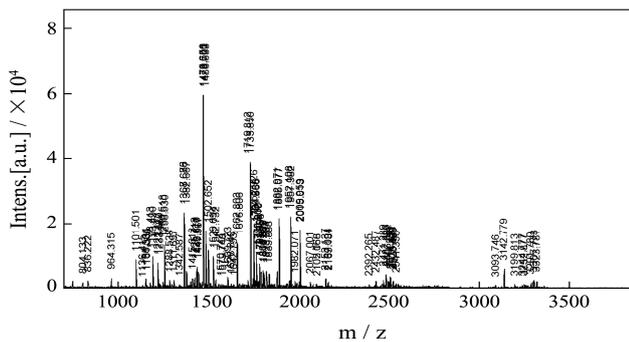


图 7 差异蛋白条带质谱检测图

Fig.7 Result of the differential expression of protein detected by mass spectrograph

3 结果与讨论

(1) 实验采用标本混合的方法,先将同一组的肝脏组织蛋白质混合均匀,在同一条件下反复进行验证,能够有效降低个体差异所造成的分析上的复杂性,避免错误信息。因此,在蛋白质组研究中,标本混合的方法可以作为实验设计的一个新思路^[8]。

(2) 目前蛋白质组学技术并不能完全分离出所有的蛋白质,最常用的蛋白分离方法为双向电泳法。本试验采用的分级沉淀方法,按照蛋白不同性质将其分类提取,同时采用梯度凝胶电泳法,能够尽可能的将蛋白进行充分的分离。保证蛋白条带的纯度,便于后期的肽质量指纹图谱分析,操作简便易行。

(3) 在本试验中,给小鼠注射四氧嘧啶,其体重明显降低,并对小鼠肝脏做了光学显微镜观察和组

织学观察,从表观上说明了四氧嘧啶对小鼠肝脏起到了损伤作用。

(4) 肝脏是蛋白质代谢的主要场所,在不同应激或病理状态下,蛋白质组细胞或组织在特定条件下表达的所有蛋白质组成和含量都会发生变化。通过 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳对小鼠肝脏蛋白做了进一步差异表达研究,从蛋白组学角度深入研究了四氧嘧啶对肝脏的损伤作用。对保肝药物的研究提供了有力的理论依据。

(5) 本实验所选的蛋白条带在蛋白质数据库中检索,得到两类可能的蛋白,一类是主要尿蛋白系列,另一类为一未命名蛋白。主要尿蛋白系列(MUP)是一种雄性小鼠特有的蛋白质,其由雄激素调控其表达,在肝脏中合成,分泌到血管中,最后由尿液排出体外。而本实验使用的都是雌性小鼠,所以确定此蛋白为一未命名蛋白。

(6) MUP 作用是结合小鼠的信息素,延缓信息素在尿液中的挥发,可能与动物的个体识别有关^[9]。据结果推测,在雌鼠体内的此种未命名蛋白可能与雄鼠体内的尿蛋白系列结构性质非常相似。具体的功能和作用还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 成军.蛋白质组学与肝脏疾病研究[J].世界华人消化杂志,2004,12(10):2276-2279
- [2] 孙薇,贺福初.蛋白质组学在肝病研究中的应用[J].中国科学 C 辑,2004,34(1):1-5
- [3] 陈舟.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996
- [4] 王洪侠,高微微.抗衰老中药的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2005,(1):74-78
- [5] 刘安军,王秀丽,陈影,等.胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物对四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用[J].营养学报,2006,28(6):487-493
- [6] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J].Nature,2000,405:837-846
- [7] 廖翔,应天翼,王恒樑,等.考马斯亮蓝染色双向电泳凝胶内酶切方法的改[J].生物技术通讯.2003,14(6):509-511
- [8] 王立顺,尹艳慧,高素君,等.以双向凝胶电泳为基础的食管癌组织蛋白质组学分析新策略[J].中国免疫学杂志,2003,19(4):230
- [9] Beynon RJ,Hu t. IL. Multiple roles of major urinary proteins in the house. Mus domesticus[J]. Biochem Soc Trans,2003,31(1):142-146