

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

谢的主要场所, 还有储存蛋白质的作用。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。比较蛋白质的表达水平, 是目前蛋白质组学研究的主要内容^[6]。本文寻找造成肝脏损伤的相关差异蛋白, 研究其功能与作用机理, 为保肝药物研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 动物

昆明6周龄雌性小鼠, 清洁级, 购自天津医科大学实验动物中心。

1.2 试剂和仪器

四氧嘧啶、十二烷基磺酸钠(SDS)、低分子量标准蛋白质、过硫酸铵、丙稀酰胺、甲叉丙烯酰胺购于sigma公司。四甲基乙二胺(TEMED)、溴酚蓝、甘氨酸、考马斯亮蓝R-250均为Amresco进口分装。盐酸, 丙酮, 丙三醇均为国产分析纯。

DY89-I型电动玻璃匀浆机(上海标本模型厂); 梯度电泳装置(北京六一仪器厂); FR-200紫外可见分光光度计(上海复日科技有限公司); Smart View生物电泳图像分析系统; 超速冷冻离心(Beckman); DESTRA MALDI-TOF质谱仪(ABI)。

1.3 动物造模与标本取材

取6周龄雌性小鼠20只, 随机分成两组: 正常组和模型组, 每组10只, 染毒前禁食16 h, 按200 mg/kg体重剂量给模型组小鼠腹腔注射四氧嘧啶, 正常组小鼠注射等量的生理盐水。1 h后恢复正常饮食, 3 d后禁食过夜, 断头处死, 取肝脏用冰生理盐水冲洗, 滤纸吸干称重。

1.4 小鼠肝脏外观与组织病理学观察

10% 甲醛固定肝脏, 每组选6例标本, 石蜡包埋切片, H&E染色。

1.5 肝脏蛋白质样品制备

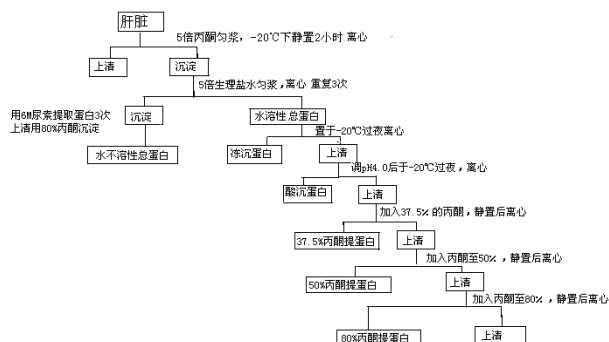


图1 肝脏可溶性蛋白提取流程图

Fig.1 Extraction procedure of soluble protein from mouse liver

取5对正常组和模型组的肝脏, 分别按图1方法进行蛋白质提取, 然后将蛋白质样品进行组内等量混合, 分装冻存。

1.5.1 水溶性总蛋白的制备

将正常组和模型组小鼠肝脏按1:5 (w/v) 加入丙酮匀浆, -20°C 下静置2 h后, 离心取沉淀。沉淀按1:5 (w/v) 的比例加入生理盐水, 匀浆后离心取上清液, 沉淀按上述操作用生理盐水洗涤、离心3次, 将所得上清液混合得生理盐水蛋白溶液。然后取部分生理盐水蛋白溶液, 用80%丙酮沉淀得水溶性总蛋白。

1.5.2 水不溶性蛋白的制备

将1.5.1中不溶于生理盐水的沉淀物用6 mol/L的尿素提取3次, 上清液混合后用80%丙酮沉淀得水不溶性蛋白。

1.5.3 冻沉蛋白的制备

将1.5.1中部分生理盐水蛋白溶液置于 -20°C 过夜离心, 收集得冷冻沉淀蛋白。

1.5.4 酸沉蛋白的制备

将1.5.3中得到的上清液调pH 至4.0后于 -20°C 过夜, 离心收集得酸沉蛋白。

1.5.5 37.5% 丙酮沉淀蛋白的制备

向1.5.4得到的上清液中加入37.5%的丙酮, 静置后离心收集沉淀得37.5%丙酮沉淀蛋白。

1.5.6 50% 丙酮沉淀蛋白的制备

1.5.5中的上清液继续加入丙酮至其浓度为50%, 静置后离心收集沉淀得50%丙酮沉淀蛋白。

1.5.7 80% 丙酮沉淀蛋白

将1.5.6中的上清液加入丙酮至丙酮浓度为80%, 静置后离心收集沉淀得80%丙酮沉淀蛋白。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质

取1 mg 蛋白样品溶于0.5 mL上样缓冲液(2% SDS, 10%甘油, 1.25% Tris 6.8, 50%双蒸水, 0.01%溴酚蓝), 沸水加热3~5 min, 16000 r/min离心5 min, 取上清液在12%~20%的SDS-PAGE梯度凝胶中进行蛋白分离。以考马斯亮蓝R-250对凝胶染色, 然后脱清底色即可。每组实验重复3次。

1.7 图像采集与分析

用FR-200紫外与可见分析装置扫描凝胶, 用Smart View生物电泳图像分析系统分析差异蛋白条带。

1.8 差异蛋白条带肽质量指纹分析

将明显差异的蛋白条带从胶上切下, 于真空冷冻干燥机中干燥10 h, 冻干的蛋白点置于 -25°C 冰箱中保存。用质谱鉴定时, 蛋白点用胶内酶切的方法处理^[7], 然后用MALDI-TOF质谱得到肽质量指纹图谱, 最后

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

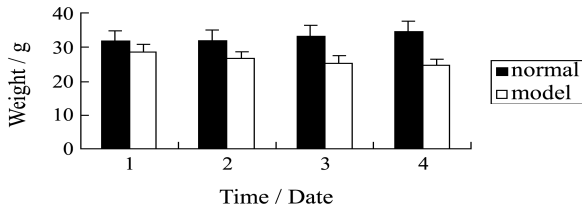


图2 四氧嘧啶对小鼠体重影响

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



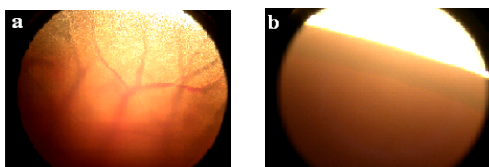
a.正常/normal b.模型/model

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



a.正常组/normal b.模型组/model

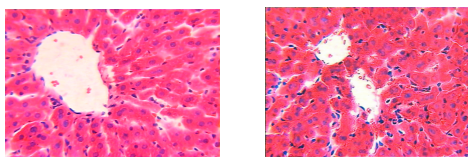
图4 四氧嘧啶对小鼠肝脏损伤光学显微镜观察(×40)

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



a.正常组/normal b.模型组/model

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

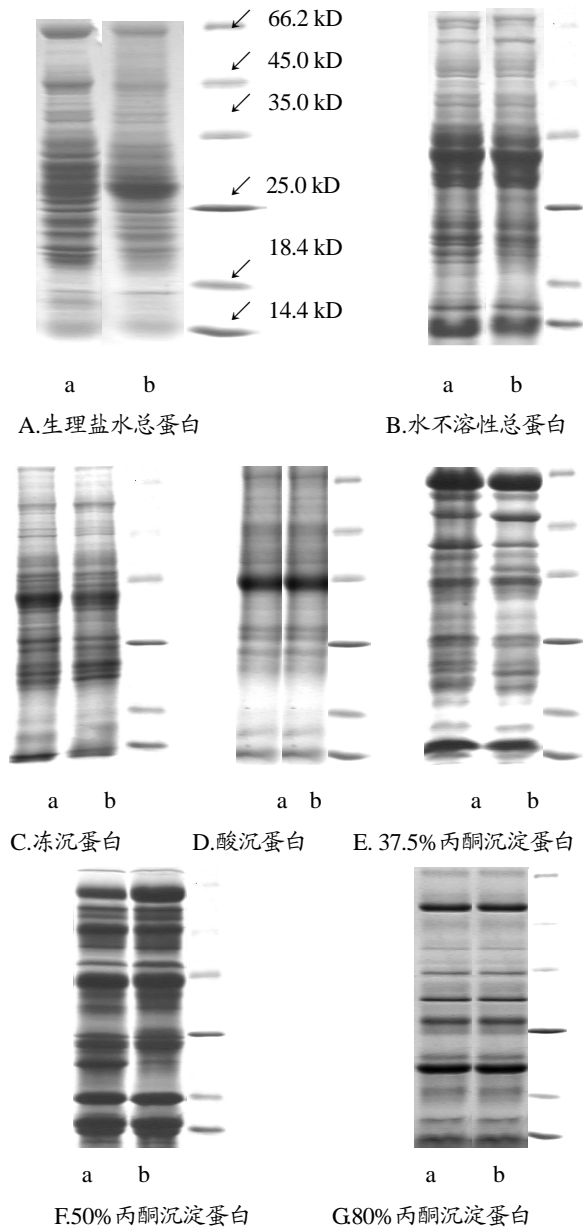
Injury in Mice

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。



注:a为正常组/normal, b为模型组/model

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。

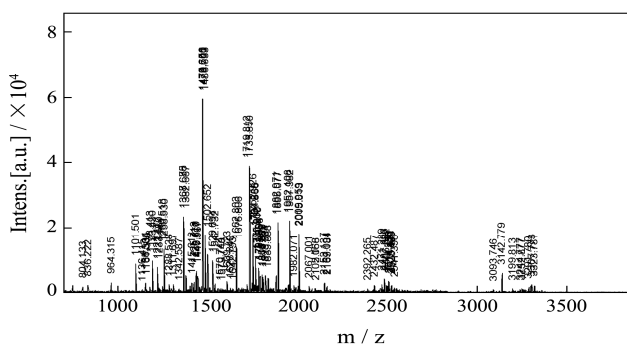


图 7 差异蛋白条带质谱检测图

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