

[文章编号] 1000-4718(2006)08-1493-04

预热适应成纤维细胞 NIH-3T3 应激 保护相关蛋白的初步筛选*

陈雪梅, 邹飞[△]

(南方医科大学劳动与职业卫生学系, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 初步分析应激与适应对蛋白质合成的影响, 筛选应激适应相关蛋白。方法: 通过双向电泳分离总蛋白、PDQUEST 软件分析、肽质量指纹图谱分析候选蛋白肽段组成, 分析应激与适应对细胞蛋白质合成的影响。初步鉴定应激适应蛋白质点的类别。结果: 预适应后再次热应激组表达增加的蛋白质点在各分子量范围均有分布, 而直接热应激组表达增加的蛋白质点大多局限于低分子量范围。肽质量指纹图谱分析候选蛋白序列, 初步鉴定了 Tubulin β 、中间丝 vimentin、起始因子 eIF-4AI、Eno1 蛋白与应激适应密切相关。结论: 细胞在紧急应激状态, 可能会倾向于选择性地合成能够迅速翻译的小分子量蛋白质, 应对应激损伤。预适应可通过提高细胞内保护性蛋白的贮备量, 在再次应激时发挥保护作用。Tubulin β 、中间丝 vimentin、起始因子 eIF-4AI、Eno1 蛋白差异表达, 提示细胞骨架、蛋白质合成、糖代谢通路在应激适应中的重要作用。

[关键词] 热预处理; 应激; 蛋白质组; 成纤维细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Primary screening of stress protective proteins in heat - preconditioned fibroblast NIH - 3T3

CHEN Xue - mei, ZOU Fei

(Department of Occupational Hygiene, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To establish stress adaptation model of mouse fibroblast cell line NIH - 3T3 to analyze the effect of stress and adaptation on protein synthesis, and to screen for stress adaptation related proteins. **METHODS:** A stress - adapted cell model was established by thermal preconditioning (42 °C, 20 min). Total cytolites were separated by 2 - DE, analyzed by PDQUEST software, and the selected differential expression spots were detected by MOLDI - TOF. The effect of stress and adaptation on protein synthesis was studied. The stress adaptation related spots were identified by PMF. **RESULTS:** Comparative proteomics method by 2 - DE was used to find different distributions of total proteins of heat stress group and thermal preconditioning group. Expression - increased protein spots were found almost limited in low molecular weight range in directly stress group, whereas expression - increased protein spots in thermal preconditioning group have more extensive molecular weight distribution. PMF results showed that tubulin β , vimentin, eIF - 4AI, Eno1 protein might be related to stress adaptation. **CONCLUSION:** 2 - DE analysis suggested, cell might favor to synthesize low small molecular weight protein to deal with hostile stress. Cellular protein storage might be increased by preconditioning, and may play a protection role during successive stress. The increased expression of tubulin β , vimentin, eIF - 4AI, Eno1 protein suggests that cytoskeletons, protein synthesis pathway and glycometabolism pathway may play an important role in stress adaption.

[KEY WORDS] Heat preconditioning; Stress; Proteomics; Fibroblasts

非致死性应激如可逆性缺血、热应激、锻炼等可导致一系列化学信号(NO、ROS、腺苷酸、阿片受体兴奋剂)释放。上述物质及其造成的细胞损伤启动了一系列复杂的信号转导级联反应,使多种保护基因的转录和保护性蛋白的合成增多,并在应激后一段

时间内起保护作用,此过程称为预适应(preconditioning)^[1]。在细胞水平上,靶细胞经过适应过程,可以使其在后期暴露于刺激时减少应答,并可逆地调节对刺激的敏感性。应激与适应是一系列损伤与修复的过程,必然导致细胞内功能执行体-蛋白质的损

[收稿日期] 2006-03-09 [修回日期] 2006-04-21

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371575; No. 30500580); 广东省自然科学基金资助项目(No. 5300465)

[△]通讯作者 Tel:020-61648301; E-mail:zfei@fimmu.com

伤、耗竭与重新合成,分析各蛋白量的变化有助于揭示细胞的应激损伤与适应机制^[2]。本研究在建立应激适应细胞模型的基础上,利用蛋白质组学的研究方法,通过双向电泳分离细胞总蛋白,PDQUEST 软件分析蛋白质丰度变化,MOLDI - TOF 分析候选蛋白质的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF),初步找寻与应激适应密切相关的蛋白质分子。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

尿素、CHAPS、DTT、TBP、Iodoacetamide、低熔点琼脂糖、2 - D SDS - PAGE Standards 购自 Bio - Rad (美国),硫脲购自 Sigma (美国),其余试剂购自北京鼎国生物公司。

2 细胞培养

NIH - 3T3 细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,DMEM 培养基中含 10% 小牛血清和 1 × 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。

3 细胞预适应与应激

每组以 1 × 10⁵ 平行接种 3 瓶;70% 融合时预处理(42 °C,水浴 20 min);分别于处理后 6 h 高温应激(44 °C,水浴 40 min)^[3]。

4 细胞样品的处理

吸出培养液,用细胞刮子收获细胞。加入 PBS 溶液,1 500 × g 离心 10 min,弃上清。重复 3 次。按 1 × 10⁶ 细胞悬于 100 μL 裂解液(8 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,2 mmol/L TBP,0.2% (W/V) Bio - Lyte,0.001% 溴酚蓝)中混匀。液氮中反复冻融 3 次。加 50 mg/L RNase 及 200 mg/L DNase,在 4 °C 放置 15 min。15 000 r/min,4 °C 离心 15 min。收集上清,分装后冻存于 -70 °C。Bradford 法测定总蛋白浓度。

5 双向电泳、图像分析

总蛋白 300 μg 的样品溶液,再加水化上样缓冲液(同裂解液)至总体积 500 μL,充分混匀。室温下被动水化 16 h。以 250 V、1 000 V、10 000 V 的电压梯度于 PROTEAN IEF CELL (Bio - Rad) 行等电点聚焦。以 20 - 30 mA/gel 于 PROTEAN II MUTLI - CELL (Bio - Rad) 进行垂直电泳。电泳结束后,进行蛋白质的银染。PDQUEST 7.2.0 完成凝胶点的检测(Spot Detection Wizard)、背景消减、水平垂直条纹的扣除,相对分子质量和等电点校正(利用 Bio - Rad 2D Marker 进行 Mr、PI 的定点)、归一化处理(normalization)和凝胶配比(Match Set)分析。

6 脱色、酶切、质谱分析

每组样品加样量增加 10 倍,再次进行 2 - DE,考马斯亮蓝染色。切取差异蛋白质点。

6.1 脱色 沿染色边缘切下蛋白点,另切一块无蛋白的 2D 凝胶作为空白对照。用 100 mmol/L 碳酸氢氨:乙腈 1:1 的溶液在 37 °C 振摇 30 min,重复此步骤直到完全脱色,之后倾出液体,加 50 μL 乙腈并使胶脱水 10 - 15 min。在 Speed - Vac 中完全干燥。

6.2 酶切 在 50 mmol/L 含测序级胰酶的碳酸氢氨溶液(13 mg/L)中再水化。加入约 20 μL 的胰酶溶液于胶块中(充分再水化后的胶块)并放置在 4 °C 下再水化 45 - 60 min,移走过量的胰酶溶液加入少量的 50 mmol/L 的碳酸氢氨溶液(10 - 20 μL)使胶块在酶解过程中保持浸润,在 37 °C 孵育 1 h,然后在室温下过夜。

6.3 质谱分析 新鲜配制 10 g/L 的 α - 氰基 - 4 - 羟基肉桂酸(CHCA)。点约 1 μL 基质和样品混合液于靶上,让靶自然干燥,最后将靶装入质谱仪。制备好的样品使用 ABI 的 Voyager DE Pro 质谱仪进行分析,仪器相应的参数为反射模式、氮激光(337 nm, 3 ns pulse width, 3 Hz repetition rate),离子延迟提取 100ns,Grid voltage 68%,真空度为 4e - 008,质谱信号的单次扫描累加 150 次,正离子谱测定。用胰酶自解峰 842.51、2 211.1046 作为内部标准校正。

7 数据库检索

获得的混合物肽片段质量数据通过 PS1 系统的 MS - FIT 搜索引擎进行检索,肽片段质量范围为 800 - 4 000 D,检索的参数为:半胱氨酸为尿甲基半胱氨酸(carbamidomethyl - Cys),最大允许肽质量误差为 0.5 D,每个肽允许有 1 个不完全裂解位点,蛋白质的分子量范围为 1 000 - 100 000 D,等电点为 3 - 10。

以上脱色、酶切、质谱分析委托上海基康生物技术公司蛋白质服务中心进行。

结 果

1 图像分析

1.1 匹配分析 每一批次胶以对照组为参考胶进行自动匹配(auto matching),再经过手动匹配,去除伪点,合并蛋白质点。最少匹配点达 811 点,最小匹配率为 66%,可进行进一步配比分析。

1.2 分子量和等电点的估计 根据 2D marker 的位置,参考线性胶条 pH 梯度和分子量及 SWISS - PORT 网上资源中的小鼠的双向电泳数据库(2 - DE Database)中已知蛋白质点,描绘 Mr、PI 网格图(图 1)。

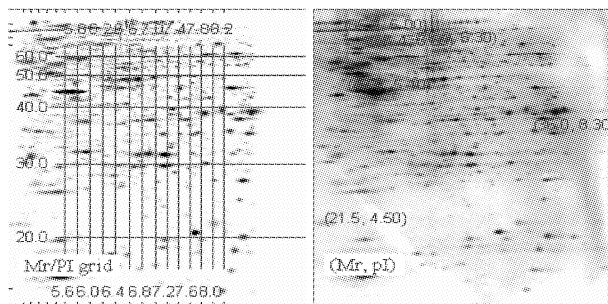


Fig 1 Estimation of Mr and PI.

图1 分子量和等电点的估计

1.3 热应激保护相关蛋白质点的找寻 相对于对照组而言,仅在预适应组和预适应 + 热应激组中高表达的点,则极有可能与应激保护密切相关。因此,在分析组 (analysis set) 中设置寻找预适应组和预适

应 + 热应激组中较对照组 2 倍增高的蛋白质点,剔除亦在热应激组中增高的蛋白质点。选取在 3 次重复实验中均满足上述要求的蛋白质点,共 64 点,作为质谱测定候选点,其中部分点见图 2。

与对照组相比,直接热应激和预适应后再次热应激 2 倍增高的蛋白质点数量存在显著区别,合成增多的蛋白质点的分子量分布亦有明显差别。预适应后再次热应激组表达增加的蛋白质点在各分子量范围均有分布,而直接热应激组的表达增加的蛋白质点大多局限于低分子量范围。

2 肽质量指纹图谱分析结果

初步鉴定候选差异蛋白,提交 4 个蛋白质点 SSP608、SSP1605、SSP1624、SSP4608 进行 PMF 检测和数据库分析,结果如下:

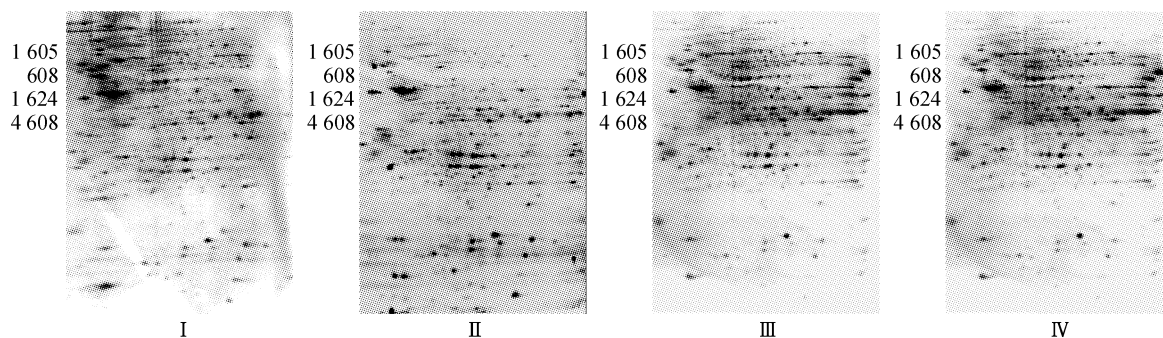


Fig 2 2-DE map of different groups. I : control; II : heat stress; III : heat preconditioning; IV : heat stress after preconditioning.

图2 不同组别的双向电泳图

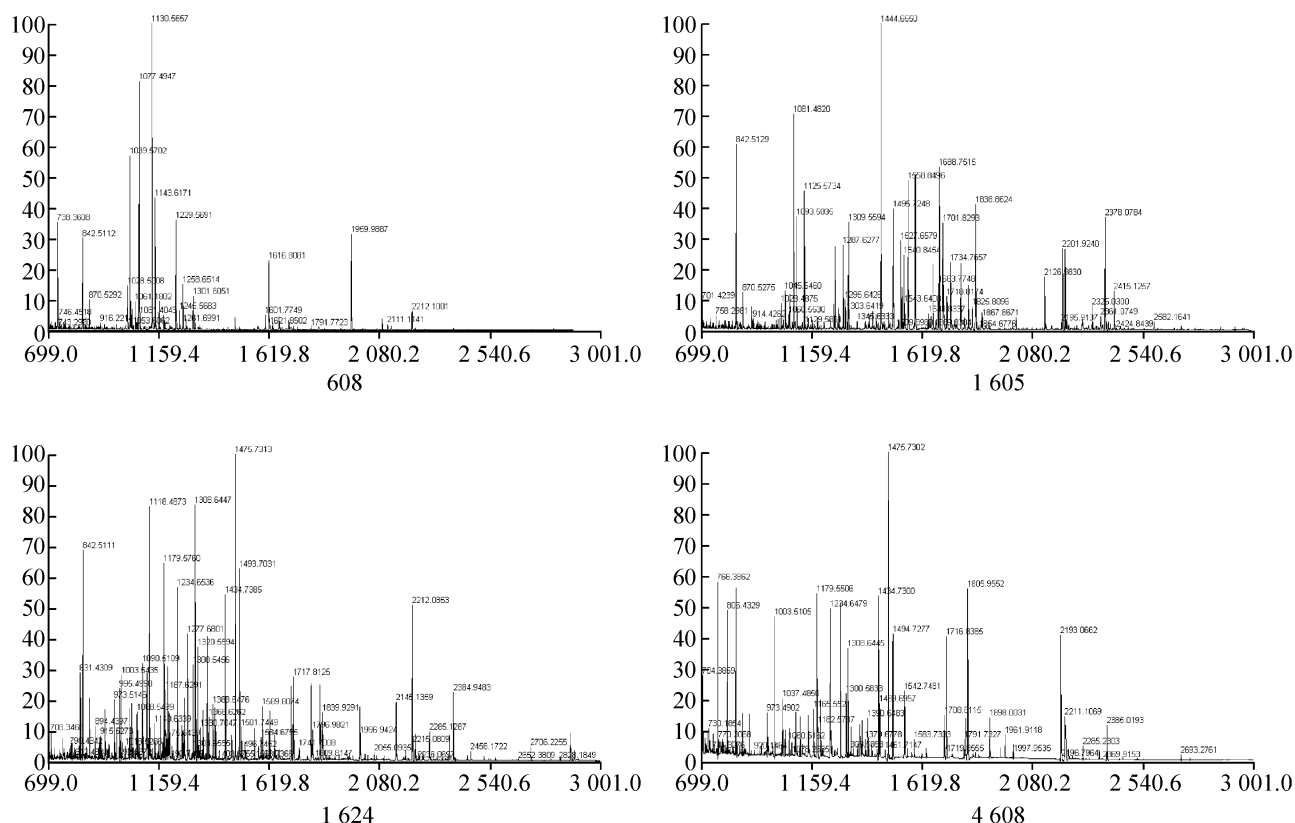


Fig 3 PMF map of SSP 608, 1605, 1624, 4608.

图3 候选蛋白点 608、1605、1624、4608 的肽质量指纹图谱

检索结果表明,SSP608 蛋白斑点的肽质量指纹谱与 tubulin β 序列覆盖率为 93%。SSP1605 蛋白斑点的肽质量指纹谱与 vimentin 的高度一致,均为小鼠源性,序列覆盖率为 93%,且与其它蛋白得分差异较大,故认为 SSP1605 蛋白斑点应为 vimentin 可能性较大。SSP1624 蛋白斑点的肽质量指纹谱与数据库内已有蛋白 50814 吻合率为 36%,得分率较高。在 NCBI 数据库中搜索 50814 提示为翻译起始因子 eIF-4A1。SSP4608 蛋白斑点的肽质量指纹谱与 NCBI 蛋白质序列库中索取序列号 13637776 的 Eno1 protein 较为一致,均为小鼠源性,序列覆盖率为 60%,且与其它蛋白得分差异较大,故认为 SSP1624 蛋白斑点应为 Eno1 蛋白的可能性较大。

讨 论

到目前为止,NCBI 蛋白质数据库中可检索到 582 种小鼠与应激相关的蛋白质,分别为应激信号转导通路相关蛋白,蛋白质代谢、脂类代谢、糖代谢相关蛋白、与氧化还原状态相关蛋白以及与细胞核/细胞骨架相关的蛋白。虽然应激会影响上述蛋白质质量的变化,但其发生变化的原因可能是应激损伤的后果,也可能是机体长期进化过程中形成的抗应激损伤的主动适应现象。

本实验参照动物早期适应周期,建立早期预适应的细胞模型。通过检测应激后细胞膜和 DNA 损伤,反映细胞的损伤情况。结果表明,预处理 6 h 后,可使 NIH-3T3 细胞达到适应状态,减轻再次应激造成的细胞损害^[3]。

与对照组和直接热应激组相比,预热适应可导致小鼠成纤维细胞内的 tubulin β 、vimentin、起始因子 eIF-4A1、Eno1 蛋白合成增多,并在热应激时维持较高水平。Vimentins 属于细胞骨架蛋白的第三类中间丝,广泛存在于间质来源的细胞中。细胞骨架蛋白 vimentins 在氧化应激时易受损,并下调表达。亦有实验表明,高热可导致大鼠海马胶质细胞合成 vimentin^[4-6]。本实验提示预热处理可提高细胞内的骨架蛋白 tubulin β 、vimentin 含量,抗衡热应激引起的细胞骨架损伤。起始因子 eIF4A 既是发挥 mRNA 帽识别作用的高分子量蛋白质复合物 eIF4F 的亚基组份,也参与协助引导 mRNA 与核糖体结合,同时也是 ATP 依赖的 DNA 结合蛋白,具有解旋酶活性。eIF4F 复合物的组成变化随细胞内外环境变化而异,必需的组份包括与 PAIP1 结合的 eIF4A、eIF4E、eIF4G。英国 Manchester 大学的最新研究资料表明,非洲酒裂殖酵母 eIF4E 异构体 2 是一类新

的应激反应因子^[7]。本研究结果表明起始因子 eIF4A 在预热适应组中有高表达,提示其在应激适应中发挥重要作用。Eno1 蛋白为糖酵解代谢中的烯醇化酶,催化 2-磷酸甘油生成磷酸烯醇丙酮酸。本室前期关于预热适应 mRNA 差异显示研究结果表明^[8],热适应与糖原代谢途径相关基因表达的变化有关。本研究发现预适应会导致细胞内 Eno1 蛋白合成的增多,并能在再次热应激时维持较高水平,提示应激适应与细胞内能量代谢通路上关键蛋白适应性调整关系密切。

由于应激的始动环节对后继的损伤与修复至关重要,本研究关注应激后蛋白质的即时变化。实验结果提示,机体在紧急应激状态,可能会倾向于选择性地合成能够迅速翻译的小分子量蛋白质,应对应激损伤。预适应可通过提高细胞内保护性蛋白的贮备量,在再次应激时发挥保护作用。在预适应组与再次热应激组中进一步选取与直接热应激组差异表达的蛋白质点,将有助于阐明应激适应机制和发现应激保护蛋白。

[参 考 文 献]

- [1] Andoh T, Chock PB, Chiueh CC. Preconditioning - mediated neuroprotection: role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 962: 1-7.
- [2] Weston AD, Hood L. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine [J]. *J Proteome Res*, 2004, 3 (2): 179.
- [3] 陈雪梅,陈斯泽,邹 飞. HSP90 在预热适应成纤维细胞中的作用 [J]. *中国公共卫生学报*, 2005, 21(9): 1057-1058.
- [4] Allani PK, Sum T, Bhansali SG, et al. A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196(1): 29-36.
- [5] Paron I, D'Elia A, D'Ambrosio C, et al. A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells [J]. *Biochem J*, 2004, 378 (Pt 3): 929-937.
- [6] Bechtold DA, Brown IR. Induction of Hsp27 and Hsp32 stress proteins and vimentin in glial cells of the rat hippocampus following hyperthermia [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(8): 1163-1173.
- [7] Ptushkina M, Malys N, McCarthy JE. eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(3): 311-316.
- [8] 王光海,邹 飞. 热适应大鼠下丘脑基因差异表达的研究 [J]. *中国公共卫生学报*, 2002, 18(4): 342-369.