

在镉盐胁迫下扇贝鳃组织应激蛋白的研究

方财王¹, 黄清育^{1,2}, 凌雪萍^{1,3}, 柯才煊², 黄河清^{1,2,3}

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 3. 化学化工学院化学生物学系, 厦门 361005)

摘要 采用透射电子显微镜观察了虾夷盘扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 鳃组织细胞的超微结构, 发现镉盐能胁迫鳃组织中的腮丝、细胞核和线粒体产生病变. 利用双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 优化分离扇贝鳃组织的全蛋白, 获得约 800 个蛋白质斑点, 并筛选出 37 个由于镉盐胁迫而产生的差异蛋白质斑点. 选用基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术和数据库检索鉴定差异蛋白, 结果发现 7 个与镉毒性密切相关的蛋白质, 即热休克蛋白 70 和 β -淀粉酶等上调蛋白质及原肌球蛋白、肌动蛋白和钙活化核苷酸酶 1 等下调蛋白质. 此外, 还发现转录调节子 Crp/Fnr 家族为低表达蛋白质, 而 ABC 转运子为高表达蛋白质. 在这些差异蛋白中, 部分蛋白质适合作为连续监测流动海水中镉污染程度及评价其危害性的蛋白指示物.

关键词 蛋白质组学; 虾夷盘扇贝; 鳃; 镉胁迫; 应激蛋白

中图分类号 O629; Q51

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)03-0507-07

金属镉或镉盐是流动水体污染源中毒性较强且不易代谢的重金属污染物之一, 即使水体中含有微量或超微量的镉, 也能产生毒性较高的生物学效应. 近几十年来, 环境、生物和化学科学家已对金属镉的毒理学、危害性和含量分析法进行了大量的研究, 并有详细的研究报道^[1~3], 但至今尚不很清楚其毒理学和代谢机制, 许多学术观点一直存在着分歧. 在生物体内, 金属镉易取代金属蛋白质中的 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} , 使之降低或丧失生物学功能^[1], 并产生活性羟基自由基 ($\cdot OH$), 造成脂质过氧化等氧化损伤^[4,5]; 此外, 镉还可与蛋白质中的巯基等敏感基团紧密结合, 导致许多蛋白不可逆失活^[6,7]. 相对水生动物其它器官而言, 鳃与流动水体接触机率最高, 受污染程度最强. 镉、锌及铜等重金属可通过干扰鳃上皮细胞的离子运输进入鳃组织, 从而损害鳃的呼吸和渗透调节功能^[2].

快速且高灵敏度地监测流动水体中重金属污染程度一直是环境科学研究的热点之一. 但常规的重金属理化监测方法只能反映水体瞬时和局部的污染状况, 难以进行连续监测, 且难以反映重金属的富集及其对水生生物产生的危害性^[8~10]. 因此, 拓展高效且能连续监测流动水体中重金属污染程度的化学和生物分析法是目前环境污染监测的重要科研课题之一.

近十几年来, 基于生物标志物的监测方法逐渐成为环境质量评价的主要手段之一, 筛选高特异性且敏感的生物标志物是环境污染生物监测的重要分析技术, 相关的研究一直是环境科学研究领域的重点课题. 金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是适合于作为环境镉污染评价的重要生物标志物之一^[7,11], 目前已有大量且详细的研究报道, 但直接应用于环境污染监测的并不多. 近几年来, 为了更加科学地揭示金属镉的毒理学机制, 蛋白质组学技术已被逐步运用于筛选与鉴定镉盐胁迫下动植物体内器官组织表达的差异蛋白质, 并用于监测水体镉污染程度及评价危害性指示蛋白质, 且已获得了系列研究成果, 所建立的分析技术, 尤其是微量金属镉分析技术已引起环境科学和生物分析化学研究领域的广泛关注^[12~14].

本文选用虾夷盘扇贝为实验材料, 以镉盐 ($CdCl_2$) 作为重金属污染源, 采用蛋白质组学技术筛选与鉴定了受镉胁迫后扇贝鳃组织表达的差异蛋白质, 以期为深入揭示镉的致毒机理以及连续监测流动海水镉污染程度提供指示蛋白质.

收稿日期: 2009-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 04776060) 和国家“九七三”计划项目 (批准号: 2010CB12640) 资助.

联系人简介: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质结构与功能及蛋白质组学研究. E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

载体两性电解质, pH = 5 ~ 8 (Amersham 公司); 胰蛋白酶 (Promega 公司); α -氰-4-羟肉桂酸 (HCCA, 美国 ICN 生物医学公司); 碘乙酰胺 (Sigma 公司); SDS 分子量标准 (Fermentas 公司); 氯化镉 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、乙基苯基聚乙二醇 (NP-40)、二硫苏糖醇 (DTT)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、过硫酸铵 (AP) 和 N, N, N', N' -四甲基乙二胺 (TEMED) 等试剂均购自上海生物工程公司。

JEM 2100 透射电镜 (日本电子株式会社); 双向电泳仪 (北京六一仪器厂); REFLEXTM III 型 MALDI-TOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 真空浓缩离心机 (Labconco 公司); 高速、超速冷冻离心机 (Beckman 公司)。

1.2 样品处理

所用虾夷盘扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 捕获于厦门近海海域, 在实验室驯养 7 d 后, 选取健康及大小相近的扇贝随机分为对照组和实验组。在天然无污染的海水中添加 $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 使水中 Cd^{2+} 的终浓度维持在 10 mg/L, 实验组扇贝受污染胁迫的时间为 24 h。采用剥离外壳的方式处死扇贝, 在冰浴环境下迅速解剖, 取鳃组织, 并用预冷的生理盐水洗涤, 用滤纸吸干多余液体, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。实验组扇贝的人工培养条件是在大量模拟实验的基础上建立起来的, 所选镉胁迫浓度和时间最适合于诱导扇贝表达差异蛋白质。

1.3 透射电镜观察

取对照组和实验组扇贝新鲜鳃组织, 切成约 1 mm^3 小块, 经 2.5% 戊二醛前固定 3 h, 用磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗 2 次, 每次 10 min, 再用 1% 锇酸固定 2 h, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min, 以上操作均在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 进行。继后用乙醇-丙酮系列脱水, Epon618 包埋, NOVA 超薄切片机切片及铅铀双染色, 用 JEM 2100 透射电镜观察、拍照。

1.4 双向电泳样品制备

分别称取 0.1 g 对照组和实验组扇贝鳃组织, 剪碎, 加入 2 mL 预冷的三氯乙酸 (TCA)/丙酮提取液, 置于冰浴下研磨至无可见组织块, 吸取匀浆; 再加入 2 mL 提取液冲洗研钵, 合并提取液, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜沉淀蛋白, 以 12000 r/min 离心 10 min。弃去上清液, 以冷丙酮洗去蛋白沉淀中残余的 TCA, 放置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 吹干, 加入 500 μL 样品裂解液 (组成为 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、60 mmol/L DTT、10 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA、0.5% 两性电解质及 0.0002% 溴酚蓝) 溶解蛋白沉淀, 略微超声以促进溶解, 然后以 35000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。采用 Bradford 法测定样品的蛋白质含量。

1.5 双向凝胶电泳

取 0.825 g 尿素 + 300 μL 双蒸水 + 300 μL 10% NP-40 + 200 μL 单体储备液 (29.2% 丙烯酰胺/0.8% 甲叉双丙烯酰胺), 待完全溶解后, 加入 35 μL 载体两性电解质 (pH = 5 ~ 8), 混匀, 分别加入 AP 和 TEMED 各 1.2 μL , 混匀后迅速灌制凝胶柱。每根柱加入 20 μL 裂解液覆盖, 再加入阴极缓冲液 (阴极电泳缓冲液为 0.02 mol/L NaOH 溶液, 阳极电泳缓冲液为 0.01 mol/L H_3PO_4 溶液) 至满。按照条件 (1) 200 V, 15 min; (2) 300 V, 30 min; (3) 400 V, 60 min 进行预电泳。预电泳结束后, 每根柱上样 40 μL , 按条件 (1) 400 V, 4 h; (2) 600 V, 18 h 进行等电聚焦电泳。

等电聚焦电泳结束后, 以注射器注水吹出胶条, 用双蒸水清洗 2 次, 将每根胶条浸泡于 4 mL 平衡液 (6 mol/L 尿素、30% 甘油、50 mmol/L Tris-HCl、2% SDS 及 0.0002% 溴酚蓝, pH = 8.8, 使用前加 DTT 至 10 mg/mL) 中, 摇床振荡 20 min。平衡后, 用双蒸水冲洗去除残留的平衡液, 将胶条转移至 SDS 凝胶 ($T = 12\%$) 顶端, 并在胶条上覆盖一层加有溴酚蓝的 1.0% 琼脂糖, 以每块胶 30 mA 衡流进行电泳, 至指示剂接近底端时停止。

1.6 凝胶染色与图像分析

参考文献[15]的方法对2D-PAGE凝胶中的蛋白质进行银染. 采用GDS 8000pc凝胶成像分析系统对染色后的凝胶进行扫描, 用Melanie 4.0 Trial软件对图谱进行分析.

1.7 蛋白质胶内酶解和质谱分析

用干净的解剖刀从胶条上切下蛋白质斑点, 保存在0.5 mL离心管中, 参照文献[8]方法进行酶解和肽片段提取. 采用文献[16, 17]提出的MALDI-TOF质谱分析方法测定差异蛋白质的肽质量指纹(PMF)图谱, 并采用自行设计的Killer软件, 筛选合适的肽质量指纹谱峰用于蛋白鉴定.

1.8 数据库检索和蛋白质鉴定

通过Matrix Science Ltd. 网站提供的检索工具(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)对差异蛋白质进行鉴定与分析. 查询条件: 将PMF图谱中的肽片段质量控制在600~3000, 肽片段分子质量最大允许误差为 ± 0.0001 , 离子选择单同位素分子量 MH^+ , 酶解漏切位点为1个, 被选择的片段峰信号均应为基线宽度的1倍以上, 在SwissProt和NCBI nr数据库中进行检索与比对分析.

2 结果与讨论

2.1 镉盐胁迫下扇贝鳃组织的超微结构

图1为在氯化镉胁迫前后扇贝鳃组织的电镜照片. 图1(A)为正常扇贝鳃组织的电镜图, 图1(B)为在10 mg/L氯化镉胁迫24 h后, 扇贝鳃组织的电镜图. 从图1(A)可以看出, 对照组扇贝的鳃细胞结构较为完整, 无异常现象; 而图1(B)却显示出鳃组织中部分细胞器已严重受损. 如在鳃的超薄切片上已很难看到一个完整的细胞, 且细胞核的某些部位膨胀, 核内[图1(B)的N区域]还有空泡存在; 鳃丝[图1(B)的GL区域]严重受损; 胞浆内有大量空泡; 部分线粒体的外层膜消失, 内嵴不清晰; 有的线粒体[图1(B)的M区域]空泡化. 可见镉胁迫使扇贝鳃组织中的部分细胞器受损, 且破坏程度较为严重. 这一现象可为后续筛选和鉴定氯化镉诱导扇贝鳃组织细胞器表达的应激蛋白提供实验证据.

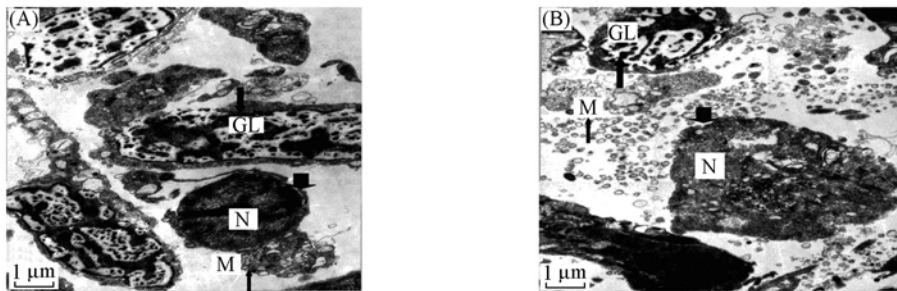


Fig. 1 Ultrastructure($\times 5000$) of cell organelle from the gill tissue in *Patinopecten yessoensis*

N: Nucleus; GL: gill filament; M: mitochondria. (A) Control group; (B) experimental group treated with $CdCl_2$.

2.2 扇贝鳃蛋白质组分离

图2(A)为对照组扇贝鳃组织蛋白质组的双向凝胶电泳图谱($pH = 5.0 \sim 8.0$). 由图2(A)可见, 多数蛋白质斑点分布在 $pH = 6.0 \sim 7.5$ 的范围内, 蛋白质分子量在18400~116000之间. 图2(B)是经氯化镉诱导后, 扇贝鳃组织蛋白质组的双向凝胶电泳图谱. 选用蛋白质组学专业软件进行比对分析后发现, 图2(A)和(B)所显示的蛋白质斑点数目比较接近, 约为800个, 并且两者蛋白斑点的分布规律较为相似, 表明全蛋白质的提取与分离均有较好的重复性, 所获得的2D-PAGE图谱适于开展后续筛选与鉴定差异蛋白质的研究.

2.3 差异蛋白质的筛选

选用蛋白质组学分析软件, 对图2(A)和(B)中显示的蛋白质斑点进行比对分析后, 从中筛选出37个差异较为明显的蛋白质斑点, 标记为No. 1~37. 与对照组[图2(A)]相比, 镉处理组[图2(B)]有17个斑点(Nos. 3, 4, 5, 6, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35)表达量上调, 15个斑点(Nos. 1, 2, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 34)表达量下调. 此外还发现2个蛋

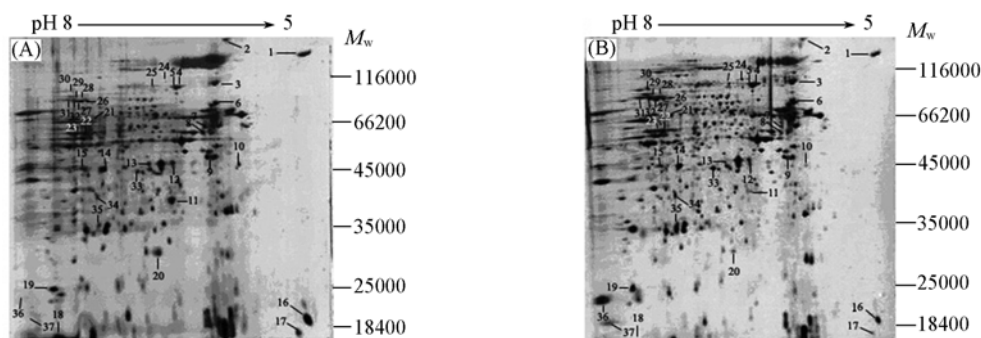


Fig. 2 2D-PAGE map of proteome from the gill tissue in *Patinopecten yessoensis*

(A) Control group; (B) experimental group treated with CdCl_2 .

白质斑点 (Nos. 11, 18) 处于低表达状态, 而 3 个蛋白质斑点 (Nos. 30, 36, 37) 却处于高表达状态. 对这 37 个差异蛋白质斑点进行局部放大, 并获得如图 3 所示的结果.

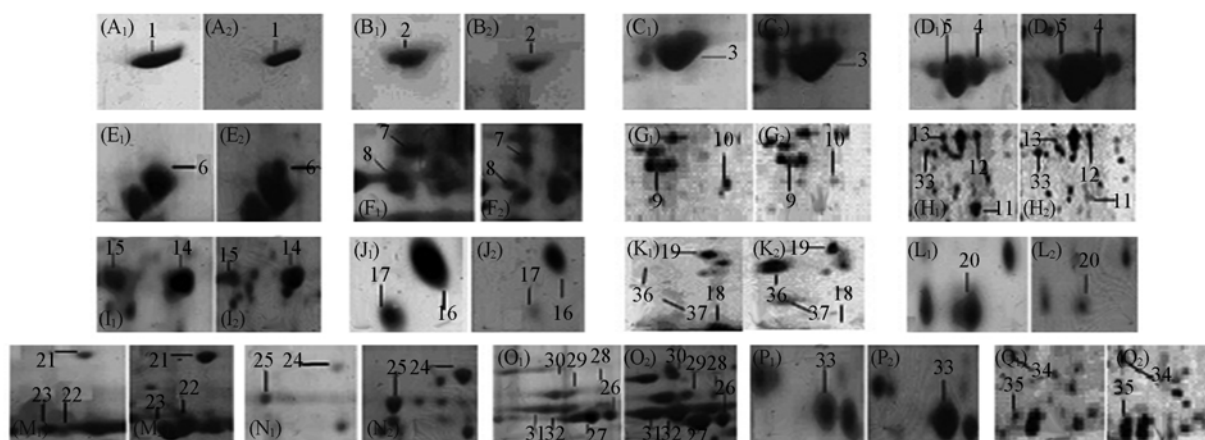


Fig. 3 Enlarged images of differential protein spots according to the results shown in Fig. 2

(A₁—Q₁) Control group; (A₂—Q₂) experimental group treated with CdCl_2 .

2.4 差异蛋白质的鉴定

采用肽质量指纹 (PMF) 技术、MALDI-TOF 质谱技术和数据库检索对图 3 所示的 37 个差异蛋白进行鉴定, 其结果列于表 1. 据报道, 镉毒性与机体的物质能量代谢、氧化损伤保护、转录调控和基因修复等多种机制有关^[18]. 由表 1 的差异蛋白鉴定结果可以看出, 受镉胁迫后, 扇贝鳃差异表达的蛋白质种类复杂多样, 反映了镉毒理机制的复杂性. 在这些蛋白质中, 有 7 种 (见表 2) 与镉胁迫密切相关, 包括下调的原肌球蛋白 (Tropomyosin)、肌动蛋白 (Actin) 及钙活化核苷酸酶 1 (Calcium activated nucleotidase 1); 上调的热休克蛋白 70 (Hsp70) 及 β -淀粉酶 (β -Amylase); 高表达的 ABC 转运子 (ATP-binding cassette transporter) 以及低表达的转录调节子 Crp/Fnr 家族 (Transcriptional regulator, Crp/Fnr family). 采用 LOCtree 数据库对这 7 种蛋白进行亚细胞定位, 结果列于表 2. 由表 2 数据可知, 热休克蛋白 70 和肌动蛋白定位于细胞质; 转录调节子 Crp/Fnr 家族、ABC 转运子和钙活化核苷酸酶 1 位于线粒体内; 原肌球蛋白存在于细胞核中, 说明镉作用于扇贝鳃细胞中的细胞质、细胞核与线粒体, 并诱导应激蛋白的差异表达, 这与前文观察到的扇贝受镉胁迫后, 其鳃组织细胞中的细胞质、细胞核和线粒体等结构严重受损的现象相符合.

Table 1 Identification of differential proteins in the gill tissue of *Patinopecten yessoensis* exposed to CdCl_2

Spot No.	Accession	Score	Taxonomy	M_w /Da	pI	Description
1	gi189093358	42	Oceanospirillum	117934	4.86	Sensory transduction histidine kinase
2	gi187119810	47	Marinomonasp. MED121	114270	5.34	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase
3	gi16899136	47	Ureaplasma parvum	81829	5.64	Conserved hypothetical
4	gi118159700	52	Pyrobaculum aerophilum	77488	6.86	ATP-dependent, DNA binding helicase
5	gi142794532	52	Macrobrachium	71317	5.24	Heat shock protein 70

Continued

Spot No.	Accession	Score	Taxonomy	M_w /Da	pI	Description
6	gi 30249497	43	Nitrosomonas europaea	42347	5.40	Acetyl-CoA acetyltransferase
7	Q89QH2	37	Bradyrhizobium japonium	46794	6.77	Probable formyl-coenzyme A transferase
8	gi 22788779	47	Heliothis zea virus 1	49271	6.53	Glycine hydroxyl methyl transferase
9	gi 99034067	62	Wolbachia endosymbiont of drosophila willistoni	33949	5.36	Hypothetical protein Wendoof_01001018
10	gi 11177141	76	Mizuhopecten yessoensis	32689	4.55	Tropomyosin
11	gi 83592957	49	Rhodospirillum rubrum	28719	5.76	Transcriptional regulator, Crp/Fnr family
12	gi 66827139	56	Dictyostelium discoideum	40280	5.56	Actin
13	gi 47458171	47	Mycoplasma mobile 163 K	43654	5.59	Phosphate binding protein
14	gi 81687110	60	Capsicum annuum	35420	6.21	Nitrite reductase
15	gi 76668136	60	Bos taurus	38218	8.19	Similar to transmembrane protein 28
19	gi 87302236	54	Synechococcus sp. WH5701	21379	8.13	Nuclease-like protein(SNase)
20	gi 16519880	45	Rhizobium sp. NGR234	23544	5.51	Y40D
21	gi 2983577	45	Aquifex aeolicus VF5	63060	9.27	ABC transporter(hlyB subfamily)
22	gi 2351689	60	Trichomonas vaginalis	43732	8.11	Adhesin protein AP51-3
23	gi 75511479	63	Escherichia coli 53638	48948	9.87	Hypothetical protein Ecol5_01004211
24	gi 3435082	45	Mycoplasma bovis	66478	9.18	Deoxyribodipyrimidine photolyase
25	gi 3925826	60	Bacillus cereus	61875	6.29	β -Amylase
26	gi 84686182	51	Rhodobacterales bacterium HTCC2654	77272	9.74	Glycosyl transferase, family 2
27	gi 49574351	53	Human immuno-deficiency virus 1	64391	8.24	Reverse transcriptase
30	gi 191214876	56	Psychroflexus torquis	63927	5.45	ABC transporter
31	gi 28851361	58	Pseudomonas syringae	55917	9.60	mutT/nudix family protein
32	gi 74193999	45	Mus musculus	66078	4.84	Unnamed protein product
33	gi 227629	49	Paracoccus denitricans	40951	7.58	Phe transaminase
34	gi 71896115	51	Gallus gallus	34594	6.71	Calcium activated nucleotidase 1
35	gi 32445285	53	Rhodopirellula baltica SH 1	37907	9.91	Probable lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase
36	gi 2668742	58	Zea mays	14776	5.82	Glycine-rich RNA binding protein
37	gi 15215572	52	Salmonella choleraesuis	19487	6.86	Mobilization protein MobB

Table 2 Subcellular localization of typical differential proteins according to the results of Table 1

Spot No.	Description	Change type	Previous reports (Cd response)	Reference	Subcellular localization
5	Heat shock protein 70	Up-regulated	Heat shock protein 70	[19]	Cytoplasmic
10	Tropomyosin	Down-regulated	Tropomyosin	[20]	Nuclear
11	Transcriptional regulator, Crp/Fnr family	Low expression	Transcriptional regulator	[21]	Mitochondria
12	Actin	Down-regulated	Actin	[22]	Cytoplasmic
25	β -Amylase	Up-regulated	Amylase	[23]	Extra-cellular
30	ABC transporter	High expression	ABC transporter	[24]	Mitochondria
34	Calcium activated nucleotidase 1	Down-regulated	Nucleotidase	[25]	Mitochondria

细胞骨架(Cytoskeleton)是由蛋白质与蛋白质搭建起的骨架网络结构,在细胞的分裂、延长、成型和胞质流动等细胞生理活动中起着重要的作用,同时细胞骨架也是神经毒剂的主要作用靶标^[26]。研究表明,细胞内的镉能取代钙与肌动蛋白、微管及微丝相结合,从而破坏细胞骨架的完整性,损害细胞的功能^[27,28]。在重金属作用下,原肌球蛋白和肌动蛋白的表达量往往降低。Miyado等^[20]发现,用ZnSO₄处理后,细胞的原肌球蛋白表达量降低;在镉作用下,贻贝血细胞肌动蛋白减少,细胞骨架瓦解^[22]。我们发现,在CdCl₂胁迫下扇贝鳃的原肌球蛋白和肌动蛋白等细胞骨架蛋白均表达下调。

热休克蛋白(Heat shock protein, Hsp)是一类高度保守的蛋白质家族,不仅参与许多正常的生理活动,而且与一些疾病如肿瘤等密切相关^[29]。作为分子伴侣,Hsp的生理功能主要是辅助蛋白折叠与去折叠,维持细胞蛋白稳定,防止蛋白凝聚及变性。热休克蛋白70(Hsp70)是Hsp家族中最重要的一员。Valbonesi等^[19]报道指出,镉胁迫下人胚胎滋养层细胞的Hsp70表达量提高;Hung等^[30]研究发现,镉可诱导鼠脑瘤细胞Hsp70;Liao等^[31]发现,Hsp70是线虫镉暴露响应蛋白。近年来许多研究者认为,Hsp可作为一种有效的分子标志物从而被应用于环境污染的早期预警^[32~34]。在本研究中,镉暴露后扇

贝鳃组织中 Hsp70 表达上调,反映了 Hsp70 对镉胁迫的应激保护作用。

淀粉酶是水解淀粉和糖原的酶类总称,广泛存在于动物、植物和微生物中,是生物体内的一种重要的消化酶。生物体摄入重金属后,会影响其体内的消化酶分泌和营养吸收。本实验结果显示,经 10 mg/L 氯化镉暴露 24 h 后扇贝鳃 β -淀粉酶表达上调。说明受镉胁迫后,虽然摄食能力减弱,扇贝却可以通过增强淀粉酶等消化酶的表达以提高现有食物的同化吸收效率,从而在一定程度上弥补了食物匮乏的不利影响,体现了机体对镉中毒的应激反应。研究发现,经镉暴露后,大型溞和蟑螂体内的淀粉酶均表达上调^[23,35]。

ABC 转运子(ATP-binding cassette transporter)是膜整合蛋白,它利用水解 ATP 的能量对溶质中各种生物分子进行跨膜转运,其转运的底物包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、细胞代谢产物和药物等。研究结果显示,部分 ABC 转运子参与多种有毒物质的吸收、积累和排泄,并在机体组织防御过程中起着重要作用^[36]。本研究发现,在镉胁迫下 ABC 转运子高表达,从而可以结合更多的镉离子并将其运输到胞外,保护机体免受重金属的毒害。Nagya 等^[24]报道,暴露于 CdCl₂ 中的酵母,其 ABC 转运蛋白 Yor1p 大量表达,说明该蛋白在镉解毒方面起着重要作用。

本文选用透射电子显微镜观察 CdCl₂ 胁迫前后虾夷盘扇贝鳃组织细胞的超微结构,结果发现,在 Cd²⁺ 胁迫下,扇贝鳃组织的腮丝、细胞核和线粒体等均发生病变,结构受损严重,反映了镉对扇贝腮细胞的毒性作用。采用双向凝胶电泳和 MALDI-TOF 质谱技术研究受镉胁迫后扇贝鳃蛋白质组的差异表达情况,筛选出多个与镉毒性相关的蛋白质。实验结果表明,镉可通过破坏细胞结构(Tropomyosin, Actin)、引起蛋白凝聚变性(Heat shock protein 70)、阻碍基因转录调控(Transcriptional regulator, Crp/Fnr family)和营养代谢(β -Amylase)等多种途径致使生物体中毒。因此,这些蛋白质适合作为研究金属镉毒理学机制的新颖指示蛋白。而这些蛋白是否适合作为连续监测流动海水中的镉污染程度的蛋白指示物,还需要开展大量辅助性研究,并需建立金属镉和指示蛋白质种类及表达量的对应定量分析方程式等,相关的研究正在进行中。值得一提的是,本研究结果并未筛选出金属硫蛋白(MT)这一常见的镉胁迫应激蛋白。原因可能在于 MT 的分子量在 6000 左右,而本研究中扇贝腮蛋白质组的双向电泳分离的蛋白质分子量范围主要在 18400 ~ 116000 之间,故无法从凝胶中检测到 MT 及其相应的表达量变化趋势。

参 考 文 献

- [1] Ling X. P., Zhu J. Y., Huang L., *et al.*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* [J], 2009, **27**: 212—218
- [2] Kamunde C.. *Aquat. Toxicol.* [J], 2009, **91**: 291—301
- [3] He L., Wang B., Hay E. B., *et al.*. *Toxicol Appl. Pharmacol.* [J], 2009, **238**: 250—257
- [4] Halliwell B., Gutteridge J. M. C.. *Biochem.* [J], 1984, **219**: 1—14
- [5] Brennan R. J., Schiestl R. H.. *Mutat. Res.* [J], 1996, **356**: 171—178
- [6] Aina R., Labra M., Fumagalli P., *et al.*. *Environ. Expt. Bot.* [J], 2007, **59**: 381—391
- [7] Klaassen C. D., Liu J., Diwan B. A.. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [J], 2009, **238**: 215—220
- [8] HUANG Lin(黄琳), CHEN Dong-Shi(陈东仕), YAN Li(颜利), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2009, **30**(2): 314—319
- [9] LI Yu(李鱼), CHEN Jie-Jiang(陈界江), WANG Xiao-Li(王晓丽), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2006, **27**(4): 627—631
- [10] YU Jing-Hua(于京华), GE Shen-Guang(葛慎光), DAI Ping(戴平), *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)* [J], 2008, **36**(4): 549—554
- [11] Xu L. C., Sun H., Wang S. Y., *et al.*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* [J], 2005, **20**: 83—87
- [12] Wang G. S., Fowler B. A.. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [J], 2008, **233**: 92—99
- [13] Kieffer P., Schroder P., Dommes J., *et al.*. *J. Proteomics* [J], 2009, **72**: 379—396
- [14] Rustichelli C., Visioli G., Kosticka D., *et al.*. *Environ. Pollu.* [J], 2008, **156**: 1121—1127
- [15] ZHUO Hui-Qin(卓慧钦), JIN Hong-Wei(金宏伟), HUANG He-Qing(黄河清), *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)* [J], 2007, **35**(5): 791—796
- [16] CHEN Dong-Shi(陈东仕), HUANG He-Qing(黄河清), WU Han-Zhi(吴韩志), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化*

- 学学报)[J], 2006, **27**(7): 1257—1261
- [18] HUANG Lin(黄琳), CHEN Xu(陈旭), LIN Qing(林青), *et al.*. Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2007, **35**(12): 1745—1750
- [19] ZHANG Jian-Peng(张建鹏), REN Xu-Yi(任绪义), GUO Ting-Ting(郭婷婷), *et al.*. Letters in Biotechnology(生物技术通讯)[J], 2005, **16**(4): 357—362
- [20] Valbonesi P., Ricci L., Franzellitti S., *et al.*. Placenta[J], 2008, **29**(8): 725—733
- [21] Miyado K., Kimura M., Taniguchi S.. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1996, **225**(2): 427—435
- [22] Kidd S. P., Brown N. L.. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2003, **302**(4): 697—702
- [23] Olabarrieta I., L'Azou B., Yuric S., *et al.*. Toxicol. *in vitro*[J], 2001, **15**: 511—517
- [24] de Coen W. M., Janssen C. R.. Chemosphere[J], 1997, **735**(5): 1053—1067
- [25] Nagya Z., Montignya C., Leverrier P., *et al.*. Biochimie. [J], 2006, **88**: 1665—1671
- [26] de Souza Dahm K. C., Rückert C., Marchezan E., *et al.*. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. [J], 2006, **143**(3): 316—320
- [27] Damodaran T. V., Mecklai A. A., Abou-Donia M. B., *et al.*. Neurochem. Res. [J], 2002, **27**: 177—181
- [28] Prozialeck W. C., Niewenhuis R.. J. Toxicol. Appl. Pharmacol. [J], 1991, **107**(1): 81—97
- [29] Prozialeck W. C., Niewenhuis R.. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1991, **181**(3): 1118—1123
- [30] WANG Xiao-Hong(王笑虹), MIAO Ying-Qiu(苗迎秋), SONG Guang(宋光). Journal of Dalian University(大连大学学报)[J], 2003, **24**(2): 103—105
- [31] Hung J. J., Cheng T. J., Chang M. D., *et al.*. J. Cell Biochem. [J], 1998, **71**: 21—35
- [32] Liao V. H., Freedman J. H.. J. Biol. Chem. [J], 1998, **273**: 31962—31970
- [33] Köhler H. R., Triebkorn R., Stocker W., *et al.*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. [J], 1992, **22**: 334—338
- [34] Cajaville M. P., Bebianno M. J., Blasco J., *et al.*. Sci. Total Environ. [J], 2000, **247**: 295—311
- [35] Efremova S. M., Margulis B. A., Irina V.. Aquat. Toxicol. [J], 2002, **57**: 267—280
- [36] Nakonieczny M.. Sci. Total Environ. [J], 1993, **134**(Supplement 1): 573—583
- [37] Rea P. A., Li Z. S., Lu Y. P., *et al.*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. [J], 1998, **49**: 727—760

Stress Proteins of Gill Tissue in *Patinopecten yessoensis* Exposed to Cadmium Salt

FANG Cai-Wang¹, HUANG Qing-Yu^{1,2}, LING Xue-Ping^{1,3}, KE Cai-Huan², HUANG He-Qing^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Ministry of Education, School of Life Sciences,

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, 3. Department of Chemical Biology,
College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The organelle ultrastructure in gill tissue was observed by transmission electron microscope(TEM) in *Patinopecten yessoensis* (PY), finding the pathological changes of gill filaments, nucleus and mitochondria in the tissue exposed to CdCl₂ (10 mg/L). The proteome of gill tissue in PY was perfectly separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2D-PAGE), obtaining approximately 800 protein spots, and selecting 37 differential spots intimidated with cadmium salt in the gel. In addition, these differential proteins were identified by both matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) and database searching. The results showed that 7 differential proteins tightly connected with the cadmium toxicity were considered to be up-regulated proteins such as heat shock protein 70 and β -amylase, and down-regulated proteins such as tropomyosin, actin and calcium activated nucleotidase 1. Moreover, transcriptional regulator Crp/Fnr family showed low expression, while ABC transporter showed high expression. We suggest that these differential proteins in part have strong potentials to be utilized as protein biomarkers for monitoring the pollution level of cadmium continuously and evaluating its risk to organisms.

Keywords Proteomics; *Patinopecten yessoensis*; Gill; Cadmium stress; Stress protein

(Ed.: H, J, Z)